

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



**Markéta Hezinová**

Systémové píky v čipové elektroforéze  
System Peaks in Chip Electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce – školitel:  
Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Praha, 2011

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Bakalářská práce byla vypracována na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením školitele Prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 30. 5. 2011

podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc., Mgr. Vlastimilovi Hruškovi, Ph.D. a Mgr. Martině Riesové za trpělivé vedení mé bakalářské práce. Dále Susanne Glueck z firmy Agilent Technologies, za spolupráci a pomoc s výzkumným projektem.

## **Abstrakt**

Práce se zabývá systémovými píky v proteinové čipové elektroforéze. Cílem práce bylo navrhnout vhodná separační prostředí s ohledem na pozice a počty systémových píků.

Teoretický úvod se věnuje procesům odehrávajícím se při separaci proteinů metodou SDS-PAGE, její miniaturizaci a podává přehled současných aplikací této metody. Dále je stručně shrnuta problematika systémových zón.

Systémové píky byly sledovány ve třech separačních systémech. Chování systémových zón bylo nejprve vyšetřeno teoreticky v programu PeakMaster a získané výsledky byly ověřeny experimentálně na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer.

V experimentech byl zaznamenán větší počet systémových píků, než odpovídalo teoretickému složení systémů. Vzhledem k této skutečnosti nebylo možné zcela ztotožnit výsledky PeakMasteru s reálnými experimenty.

## **Abstract**

This work investigates the behavior of system peaks in chip electrophoresis. The aim of this work was to propose a suitable separation environments with regard to the position and number of system peaks.

In the theoretical introduction we first deal with processes taking place in the separation of proteins by SDS-PAGE method, its miniaturization and provide an overview of current application of this method. Then there is briefly summarized the issue of system zones.

System peaks were observed in the three separation systems. The behavior of the system zones was first investigated theoretically in PeakMaster program and results were then verified experimentally by means of Agilent 2100 Bionalyzer.

In the experiments there was recorded larger number of system peaks than should correspond to the theoretical composition of the systems. Due to this fact it was not possible to fully identify the theoretical results from PeakMaster with the results from real experiments.

## Obsah

1	Úvod .....	9
2	Teoretický úvod .....	11
2.1	SDS-PAGE a čipová elektroforéza .....	11
2.2	Teorie systémových zón .....	14
3	Cíle práce .....	15
4	Experimentální část .....	16
4.1	Popis přístroje a metodika měření .....	16
4.2	PeakMaster .....	18
4.2.1	Navržení vhodných systémů pomocí programu PeakMaster.....	19
4.3	Použité chemikálie a materiál .....	22
4.3.1	Příprava základního elektrolytu, zředovacího gelu, denaturačního činidla a vzorků .....	23
4.4	Experimenty a diskuze výsledků .....	26
4.4.1	Identifikace systémových píků v původním separačním systému firmy Agilent .....	26
4.4.2	SDS systém .....	28
4.4.3	SDeS systém .....	30
4.4.4	HDeS systém .....	32
5	Závěr .....	35
6	Použitá literatura .....	36

## Seznam použitých zkratk

$\mu$ TAS	Micro Total Analysis system	
ACBP	Acyl coenzyme A binding protein	Acyl koenzym A vazebný protein
BGE	Background electrolyte	Základní elektrolyt
CMC	Critical micelle concentration	Kritická micelární koncentrace
FU	Fluorescence unit	Fluorescenční jednotka
HDeS	Decylsulphuric acid	Decylsírová kyselina
LIF	Laser-induced fluorescence	Laserem indukovaná fluorescence
LTE	Linear theory of electromigration	Lineární teorie elektromigrace
MU	Mobility units	Jednotka mobility (rozměr $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
P80	Skript Protein 80 Series II	
PA	Polyacrylamide	Polyakrylamidový
SDeS	Sodium decylsulphate	Decylsíran sodný
SDS	Sodium dodecylsulphate	Dodecylsíran sodný
SDS-CGE	Sodium dodecylsulphate capillary gel electrophoresis	Kapilární gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TRICINE	N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine	N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymetyl)etyl)glycin
TRIS	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol	2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol
UV-VIS	Ultra violet-visible	Ultrafialová-viditelná



# 1 Úvod

Obecné principy, na nichž je založena elektroforéza, byly známy již před více než 100 lety, ale až v 60. letech minulého století byla vyvinuta nová metoda separace proteinů – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). SDS-PAGE našla uplatnění především v biologii, molekulární biologii, genetice i mikrobiologii a dodnes představuje jednu ze základních metod analýzy proteinů. Kromě stanovení molekulové hmotnosti proteinů je tato metoda používána také pro detekci proteinových modifikací a při studiu jejich kvarterní struktury. Zvýšení separační účinnosti, oproti klasické SDS-PAGE, bylo docíleno kombinací známých separačních technik. Jako příklad lze uvést často používanou SDS-PAGE kombinovanou s metodou izoelektrické fokusace. SDS-PAGE v klasickém plošném uspořádání je zdlouhavou metodou vyžadující přípravu separačního gelu polymerizací z monomerů (často toxických), nepohodlné dávkování vzorků do jamek gelu i pracnou detekci po skončení analýzy. Ani samotný separační proces není rychlý a trvá řádově hodiny. Proto se další vývoj snažil metodu SDS-PAGE automatizovat a urychlit.

Pozornost se proto obrátila na elektromigrační metody probíhající v kapilárách. Princip SDS-PAGE byl úspěšně převeden do kapilárního uspořádání, což významně snížilo spotřebu chemikálií a urychlilo analýzu. Oproti klasické SDS-PAGE je automatizována optická detekce analytů, což také přispívá k vyšší účinnosti a rychlosti analýzy.

Pokrok ve vývoji analýzy biologicky aktivních látek pokračoval v 90. letech miniaturizací metody na skleněné nebo plastové mikročipy. Koncept analýzy v mikroměřítku s integrací všech jednotlivých kroků analýzy na jeden mikročip zajišťoval další zkrácení doby analýzy, vysokou citlivost měření a především možnost analyzovat velmi malé objemy vzorků. Potenciál těchto miniaturizovaných elektroforetických systémů brzo objevily i firmy, zabývající se separačními technikami biologických látek (např. Agilent Technologies, Bio-Rad) a začaly na trh dodávat přístroje a jednorázové čipy pro analýzy proteinů, DNA a dalších biologicky významných látek.

Dostupnost těchto nových technologií vedla v roce 2001 k založení „Human Proteome Organization“, jejímž hlavním cílem je identifikace všech proteinů kódovaných lidským genomem. Do projektu se zapojily analytické laboratoře po celém světě. Výsledky nacházejí široké uplatnění v klinické praxi, kdy se na základě rozboru vzorků (moči, slin, krve) odhalují nové biologické markery, které by v budoucnosti mohly pomoci ke včasné diagnóze a léčbě konkrétních onemocnění.

Vyhodnocování elektroforetických analýz však není vždy zcela jednoznačné a může být zkresleno přítomností systémových píků. Systémové píky jsou vlastností základního elektrolytu a nepřísluší žádnému z analytů. Systémové píky mohou být s píky analytů lehce zaměněny nebo mohou vést k rozmývání píků analytu a k rušení průběhu analýzy. Je proto nutné umět systémové píky bezpečně identifikovat nebo

provádět analýzy v takových systémech, kde jsou systémové píky mimo oblast píků analytů a nemůže dojít k jejich záměně.

Systemové píky v proteinové čipové elektroforéze se proto staly předmětem této bakalářské práce.

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 SDS-PAGE a čipová elektroforéza

S obecnými principy elektromigračních metod se můžeme seznámit např. v publikaci Kašičky [1]. Elektroforetické metody jsou založeny na rozdílné rychlosti putování látek v elektrickém poli. V SDS-PAGE je do základního elektrolytu (BGE) přidán nabitý surfaktant dodecylsírán sodný (SDS). SDS se váže na povrch proteinu, denaturuje<sup>1</sup> ho a dodecylsíránové anionty obalí rozbalený protein tak, že mu udělí konstantní specifický náboj, tj. náboj vztahený na jednotku relativní molekulové hmotnosti. Ve volném roztoku pak takto obalené proteiny bez ohledu na jejich velikost vykazují velice blízkou či identickou elektroforetickou mobilitu a nedochází k jejich separaci. Proto je třeba látky separovat v síťovacím prostředí. Síťovací efekt způsobuje zpomalení rychlosti migrujících částic, jež je přímo úměrné velikosti těchto částic a jednotlivé látky jsou rozděleny v pořadí podle vzrůstajících relativních molekulových hmotností. Jako síťovací prostředí se používají různé druhy gelů. Nejběžnějším však zůstává polyakrylamidový (PA) gel, který je možné připravit různými způsoby a s potřebnou velikostí pórů [2].

Denaturace proteinu surfaktantem je složitý proces, který závisí na iontové síle roztoku, koncentraci a typu surfaktantu i na samotném proteinu. Moosavi-Movahedi [3] sleduje interakci SDS s různými proteiny z termodynamického hlediska a potvrzuje odlišné chování proteinů při různých koncentracích SDS, které bylo pozorováno již dříve. V práci [4] Giancola a spol. sledovali denaturaci 0,1 mM hovězího sérového albuminu různými nízkými koncentracemi SDS pod hodnotou jeho kritické micelární koncentrace (CMC) a až do zastoupení SDS ku koncentraci proteinu v poměru 10:1 SDS stabilizovalo sbalenou strukturu proteinu, při navýšení poměru ve prospěch SDS se protein denaturoval. Stabilizace a dokonce částečné znovusbalení močovinou denaturovaného proteinu cytochromu C nízkými podmicelárními koncentracemi SDS bylo pozorováno v práci [5].

Mechanismus denaturace proteinů byl diskutován již v 70. letech. Bylo zjištěno, že na denuraci se významným způsobem podílejí SDS monomery, zatímco SDS micely proteiny nendenaturují. Vliv iontové síly na denuraci proteinů je tedy vysvětlován jako ovlivnění CMC surfaktantu a tedy množství volných monomerních jednotek a jednotek vázaných v micelle [6]. Tyto předpoklady se ukazují jako správné i v nových studiích, kdy například Fano a spol. [7] dokázali denaturovat lipázu z *Thermomyces langinosus* v prostředí neutrálního pH. Tento protein byl do té doby považován za odolný vůči denuraci SDS. Autoři lipázu denaturovali až při nízkých hodnotách iontové síly, kde se zvýší hodnota CMC a

---

<sup>1</sup> Denuraci budeme v této práci, s ohledem na princip separace SDS-PAGE, označovat konformační změnu vedoucí k rozbalení proteinu do lineární podoby

v roztoku se tedy sníží koncentrace micel. Větší množství monomerních SDS je pak schopno lipázu denaturovat.

SDS je tvořeno hydrofilní hlavičkou a hydrofobním uhlíkatým řetězcem. Změní-li se délka tohoto uhlíkatého řetězce, dojde i ke změně denaturační schopnosti surfaktantu. Andersen v článku [8] sledoval denaturační schopnosti surfaktantů o různé délce  $n$ -uhlíkatého řetězce (v rozmezí  $n = 8 - 16$ ) vůči proteinu ACBP (acyl coenzyme A binding protein). Bylo zjištěno, že mechanismus denaturace ACBP je pro všechny délky řetězce surfaktantu stejný, probíhá ve dvou krocích, ale s rostoucí délkou hydrofobního řetězce výrazně roste denaturační potenciál surfaktantu. Tento trend není ovlivněn ani snižující se CMC pro surfaktanty s delším řetězcem. Podobných výsledků bylo dosaženo i v práci Chamaniho a spol. [9], kdy byla sledována interakce oktylsíranu sodného, decylsíranu sodného a dodecylsíranu sodného s lysozymem. Opět se potvrdilo, že největší denaturační účinek má surfaktant s nejdelším uhlíkatým řetězcem.

Úspěšně denaturované proteiny jsou v klasickém uspořádání SDS-PAGE po separaci detekovány různými způsoby [10]. Gelová destička může být například obarvena stříbrem nebo barvivem (Coomassie Blue, Amido Black), které reagují s proteiny a po zpětném odbarvení gelové destičky zůstanou barevná jen místa, kde je přítomen protein. Dále lze použít metody Western Blotting, kdy protein reaguje se specifickou protilátkou [11]. Každá z těchto detekčních technik je pracná a zdlouhavá.

Způsoby detekce a dlouhá doba analýzy klasické SDS-PAGE zapříčinily snahu celý proces separace automatizovat. Na SDS-PAGE proto v 80. letech navázala kapilární SDS gelová elektroforéza (SDS-CGE). První separace, s využitím této metody, byly prováděny v zesít'ovaných gelech. Chemicky zesít'ované gely nebylo možno v kapiláře vyměnit (byly chemicky provázány i se stěnou kapiláry) a měly i další nevýhody. Později byly nahrazeny fyzikálními gely, které bylo možno jednoduše vymýt z kapiláry a nahradit gelem novým [12,13]. Nejpoužívanějšími metodami detekce proteinů v SDS-CGE je UV-VIS absorpční detekce [12]. Problémem při UV-VIS detekci proteinů v SDS-CGE může být nízká citlivost detekce způsobená absorpcí použitých gelů při sledované vlnové délce 200-220 nm, kde absorbují peptidové vazby [14]. Proto byly vyvinuty i gely, které jsou UV transparentní [13].

Významný pokrok s sebou přinesla miniaturizace separačních technik na mikročip. Analýza, probíhající na mikrofluidních zařízeních, je v literatuře označována pojmy „Micro Total Analysis System“ ( $\mu$ TAS) nebo „Lab-on-a-chip“. Analýza na mikročipu našla široké uplatnění v mnoha odvětvích a nedávný vývoj technologií v této oblasti je zaznamenán v souhrnných člancích [15,16]. Hlavním důvodem prudkého nárůstu počtu separací prováděných v mikroměřítku, je především zkrácení času analýzy a snížení objemu zkoumaného vzorku při zachování vysokého rozlišení a citlivosti detekce. O používaných detekčních metodách na mikročipech pojednává Gotz [17]. Nejběžněji používanou optickou

detekční metodou se stalo měření laserem indukované fluorescence (LIF) fluorescenčního barviva, vázaného na komplex protein-SDS. UV-VIS detekce neposkytovala na mikročipech dostatečnou citlivost díky krátké optické dráze dané hloubkou kanálku [18]. Další možnost detekce látek v mikroměřítku představuje hmotnostní spektrometrie v kombinaci s elektrosprejovou ionizací [19] a vodivostní detekce [20].

Fluorescenční barvivo může být pro účely LIF detekce vázáno na komplex protein-SDS buď kovalentně nebo nekovalentně. Metody barvení proteinů se vyvíjely společně s proteinovou čipovou elektroforézou.

V roce 1999 Yao a kol. [21] poprvé uskutečnili gelovou elektroforézu proteinů na skleněném mikročipu. Separovali směs šesti proteinů, o velikosti 9 kDa až 116 kDa za méně než 35 s za působení separačního napětí o velikosti 5 kV. K detekci byl použit LIF detektor. Proteiny byly před analýzou značeny kovalentně vázanými barvivy na bázi fluoresceinu. V porovnání s SDS-CGE se čas separace pětkrát snížil. Následně Liu a kol. [22] přidali na mikročip místo, kde po skončení separace přiváděli fluorescenční barvivo Nano Orange, které se nekovalentně vázalo na separované proteiny. Obarvené proteiny následně putovaly kanálkem k detekčnímu místu. Autoři také testovali přidání barviva NanoOrange přímo do základního elektrolytu, ale účinnost separace byla menší, než v případě barvení proteinu až po separaci. Také Landersova skupina [23] přidala NanoOrange přímo do BGE. Ačkoliv NanoOrange ve volné formě prakticky nefluoreskuje, pozorovali vysoké fluorescenční pozadí záznamu. To bylo způsobeno navázáním barviva nejen na komplex protein-SDS, ale i na samotné SDS micely. Fluorescenční pozadí proto snížili snížením koncentrace SDS v BGE pod hodnotu jeho CMC.

Stěžejní prací je článek Bousseho a kol. [24] z roku 2001, v němž autoři jako první představili komerčně vyráběný čip LabChip® (Caliper Life Science, Mountain View, Kalifornie, USA) spolu s přístrojem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Analýzy prováděné na skleněném mikročipu byly automatizovány integrací jednotlivých kroků analýzy (dávkování, separace, virtuální odbarvení a detekce proteinů) na mikročip. K obarvení vzorku bylo použito nekovalentně vázané fluorescenční barvivo označované jako Agilent dye. Nekovalentně se váže na SDS-proteinový komplex i na SDS micely. Vysoké fluorescenční pozadí bylo redukováno zavedením nového zředovacího kroku. Krok se uskutečňuje v místě křížení dvou kanálků umístěných těsně před detekčním místem a SDS je naředěn pod hodnotu jeho CMC. Bylo docíleno snížení fluorescenčního pozadí a zvýšení citlivosti detekce. Na čipu je možné provádět až 10 analýz různých vzorků najednou za méně než 30 minut.

Agilent 2100 Bioanalyzer v kombinaci s Protein LabChip® Kitem byl použit k analýze mnoha proteinových vzorků. Pomocí této techniky byly stanoveny proteiny přítomné v tělních tekutinách, konkrétně v slzách [25], v lidském séru [26,27] či proteiny obsažených v hadím jedu [28]. Stejného přístrojového vybavení bylo použito i při studiu imunoglobulinů [29].

Vývojem čipů pro komerční účely se kromě Agilent Technologies [30] zabývají i další firmy Caliper Life Science [31], Bio-Rad [32], GE Healthcare [33] a Shimadzu Biotech [34].

Analýzy proteinů na mikročipech jsou prováděny nejen na principu SDS-PAGE, ale i dalšími elektroforetickými metodami. Jejich vývoj a aplikace v proteomice jsou shrnuty v článku [35]. Separační metody mohou být výhodně kombinovány, jako je tomu například u spojení metody SDS-PAGE s izoelektrickou fokusací [36].

## 2.2 Teorie systémových zón

Systémová zóna vzniká v důsledku porušení původně homogenního prostředí základního elektrolytu, do kterého je nadávkován vzorek [37]. V místě dávkování vzniknou poruchy v koncentraci všech složek základního elektrolytu. Tyto poruchy se po zapnutí elektrického napětí pohybují kapilárou (kanálkem) jako systémové zóny. Mobility, se kterými se systémové zóny pohybují, nazýváme systémové mobility (vlastní mobility). Pokud systémová zóna doputuje k detektoru, může být zaznamenána jako systémový pík. Systémové píky se v záznamu objevují pouze tehdy, pokud detektor reaguje na alespoň jednu složku základního elektrolytu, tedy při nepřímé nebo vodivostní detekci.

Elektromigraci každé látky lze fyzikálně popsat rovnicí kontinuity. Jelikož ale pohyb jedné látky je závislý na přítomnosti a pohybu ostatních látek, je výsledná sada rovnic nelineární povahy a proto řešitelná jen numericky [38]. Zjednodušení přinesla linearizace tohoto problému, kterou poprvé popsal v roce 1992 Poppe a kol. [39]. Na jeho práci navázala řadou článků Gašova skupina [40,41]. Z lineární teorie elektromigrace (LTE) plyne, že systém složený z počtu  $N$  složek, bude mít i  $N$  systémových zón. Na základě tohoto modelu můžeme vypočítat i mobility těchto zón – systémové mobility. Gašova skupina také implementovala LTE do volně dostupného programu PeakMaster [42], který tak slouží jako cenný nástroj pro předpovědi elektromigračních procesů, počtu a pozic systémových píků a umožňuje rychle a pohodlně navrhnout vhodné separační systémy. Podrobnějšímu popisu funkcí, obsažených v PeakMasteru, bude věnována kapitola 4.2.

Problémy se systémovými píky v čipové elektroforéze se zabývá jen několik prací. O ovlivnění tvaru a šířky píku systémovými zónami na mikročipech se můžeme dočíst v souhrnném článku [43]. Ve své práci navazují na bakalářskou práci Riesové [44], ve které byly pozice systémových zón v proteinové čipové elektroforéze měněny záměnou anionů v základním elektrolytu.

### 3 Cíle práce

Cíle této práce byly následující:

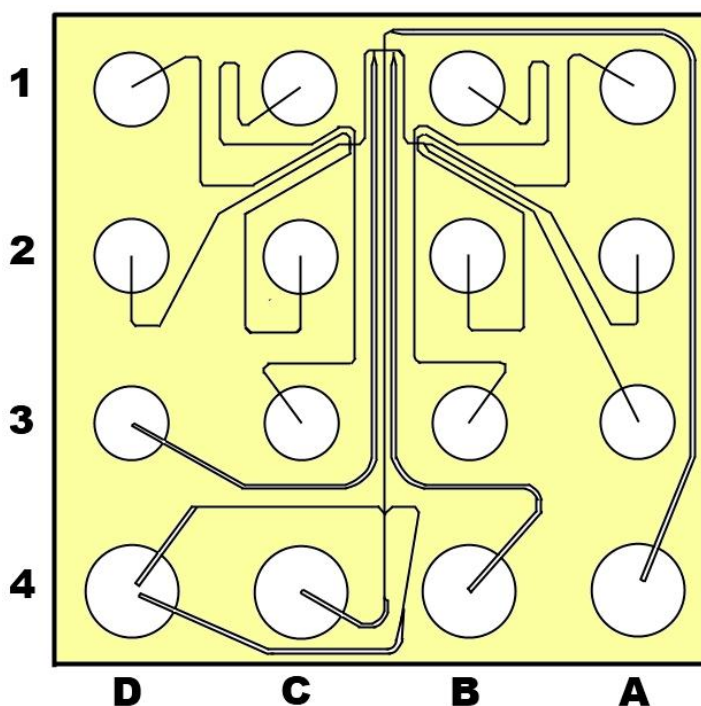
1. Seznámit se s obecnými principy metody SDS-PAGE a zdokumentovat vývoj a současný stav proteinové čipové elektroforézy
2. Osvojit si práci na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer
3. Pomocí programu PeakMaster navrhnout takové separační systémy, které budou vhodné z hlediska polohy či počtu systémových píků.
4. Experimentálně ověřit předpovězené chování navržených systémů.
5. Ověřit, zda je v nově navržených systémech možné pozorovat píky proteinů.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Popis přístroje a metodika měření

Všechna měření byla prováděna na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) a na čípech Protein LabChip<sup>®</sup> (Caliper Technologies, Mountain View, California, USA). Přístroj byl ovládán softwarem Agilent 2100 Expert, verze B.02.03.SI307. Data byla vyhodnocována v programu 2100 Expert a v programu Origin verze 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Mikročip je tvořen soustavou kanálků, vyleptaných do sodno-vápenatého skla, které navzájem propojují 16 nádobek, umístěných na svrchním plastovém obalu čipu. Separční kanálek je 12,5 mm dlouhý, 36  $\mu\text{m}$  široký a 13  $\mu\text{m}$  hluboký [45]. Schéma čipu je znázorněno na Obr. 1.



**Obrázek 1**

Schéma mikročipu Protein LabChip<sup>®</sup> (převzato z [24])

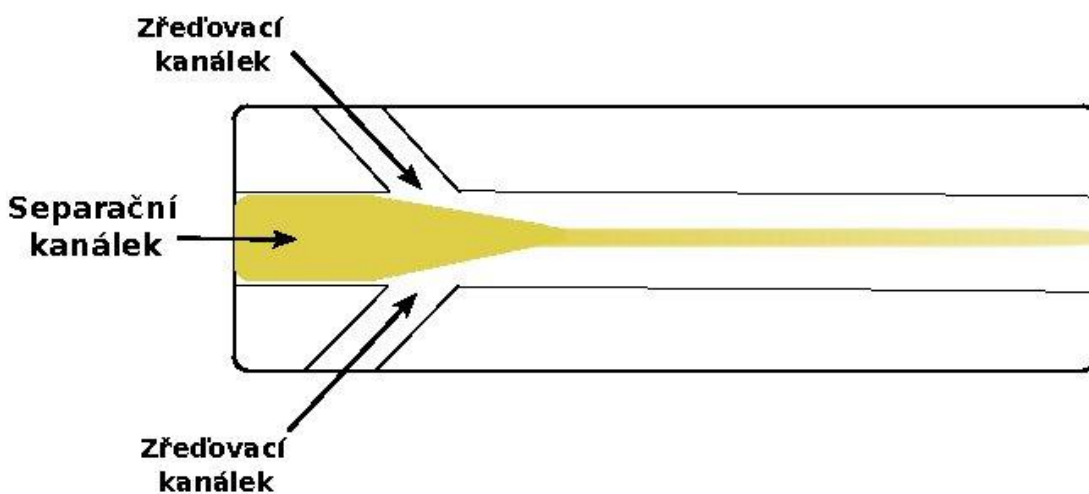
Do nádobek mikročipu je nejprve napipetováno příslušné množství separačního gelu, zředovacího gelu, vzorků a případně i tzv. ladderu<sup>2</sup> podle postupu

<sup>2</sup> Ladder při analýze slouží jako standard. Obsahuje směs proteinů o známé molekulové hmotnosti a porovnání pozic jejich píků ve výsledném elektroferogramu s pozicí píku proteinu ve vzorku umožňuje určit molekulovou hmotnost tohoto proteinu.



uvedeném v návodu [47]. Připravený mikročip je následně vložen do přístroje a do jednotlivých nádobek jsou ponořeny elektrody. Celá analýza je pak řízena skriptem, který je součástí programu Agilent 2100 Expert a který zapínáním a volbou napětí mezi jednotlivými elektrodami řídí jednotlivé kroky analýzy. Pro všechny prováděné experimenty byl používán skript Protein 80 Series II (P80). Tento skript, společně s příslušnou hustotou PA gelu (8%) je vhodný pro separaci proteinů o velikosti 5 – 80 kDa.

Prvním krokem analýzy je dávkování vzorku. Vzorek se v elektrickém poli pohybuje dávkovacím kanálkem až na místo křížení dávkovacího a separačního kanálku. Na křižovatce dojde k přepnutí napětí a vzorek se nadávkuje do separačního kanálku. Následně je v separačním kanálku vytvořeno elektrického pole o intenzitě 200 – 300 V/cm [45], které zajišťuje separaci vzorku. Separační gel obsahuje SDS, pufr a fluorescenční barvivo, které se váže nejen na komplex SDS-protein, ale i na samotné micely SDS a zpříčiňuje tak vysoké fluorescenční pozadí a snižuje citlivost detekce. Proto je před detekcí zařazen ředící krok, kdy je z bočních (zředovacích) kanálků přiváděn do hlavního kanálku zředovací gel, který neobsahuje SDS ani barvivo (Obr. 2). Tím je SDS ředěno pod jeho CMC. Fluorescenční barvivo se tak již nemůže vázat na micely, a protože volné barvivo fluoreskuje jen málo, sníží se tak základní linie elektroferogramu a zvýší se citlivost detekce.

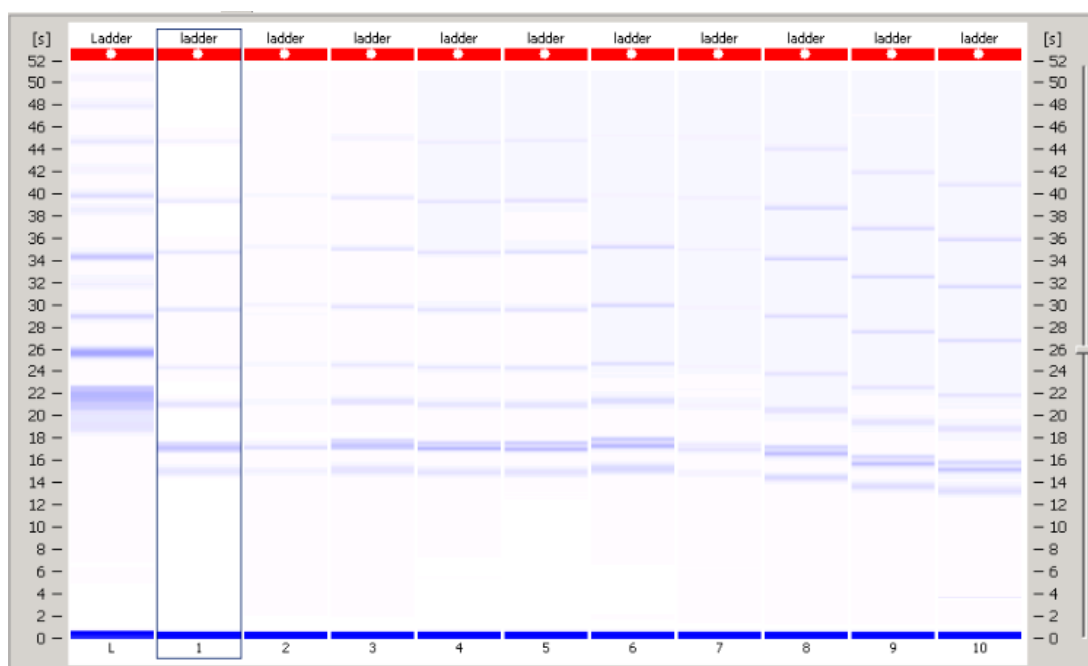


**Obrázek 2**

Schéma ředící křižovatky, kde je koncentrace SDS v separačním gelu ředěna pod CMC zředovacím gelem. Fluorescenční barva má menší fluorescenci, pokud neinteraguje s micelami. Dojde tedy ke snížení fluorescenčního pozadí.

Posledním krokem je detekce komplexů protein-SDS-barvivo LIF detektorem. Použité fluorescenční barvivo, označené jako Agilent dye, je excitováno při 650 nm a emituje záření při 680 nm [45].

Analýza 10 vzorků trvá přibližně 30 minut. Program Agilent 2100 Expert umožňuje zobrazit výsledek buď ve formě elektroferogramu (závislosti odezvy detektoru na čase) nebo v gelové podobě, kdy záznam napodobuje výstup z klasické SDS-PAGE (Obr. 3).



**Obrázek 3**

Jedno z možných zobrazení výsledku analýzy v programu Agilent 2100 Expert. Napodobení gelové destičky z klasické SDS-PAGE.

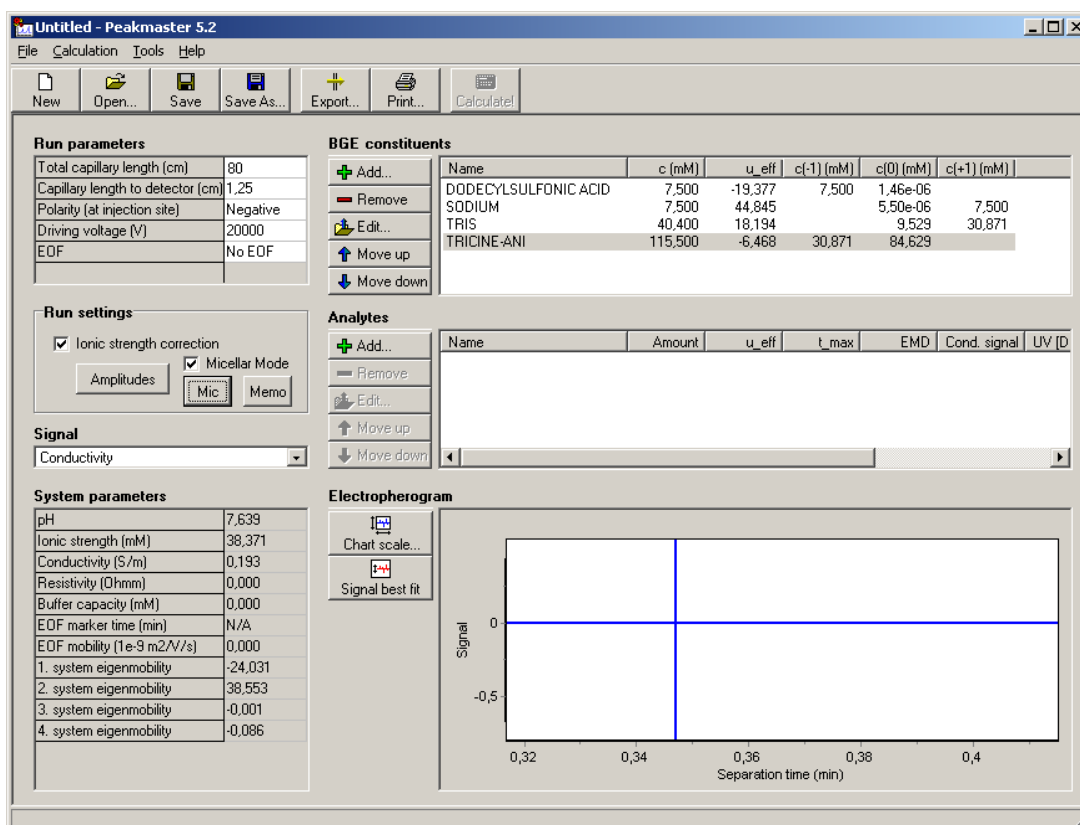
## 4.2 PeakMaster

Teoretické výpočty a předpovědi chování systémových píků v BGE o daném složení byly prováděny v programu PeakMaster 5.2 [46].

Jako vstupní data pro výpočty v PeakMasteru je potřeba zadat disociační konstanty a limitní iontové mobility použitých látek. Hodnoty těchto parametrů je možné pro mnoho běžných látek vybrat z databáze, která je součástí programu. Po zadání složení daného BGE a vybrání případných analytů program vypočítá charakteristiky BGE (pH, iontovou sílu, vodivost, pufrační kapacitu), efektivní mobilitu analytů a v neposlední řadě vlastní mobility systémových zón. Pokud jsou zadány i parametry experimentálního uspořádání (celková délka kapiláry a délka kapiláry k detektoru, polarita a velikost vloženého napětí), pak PeakMaster zobrazí

předpověď experimentu formou elektroferogramu. V pokročilejší verzi programu je zahrnut i micelární mód, který po zadání CMC, agregačního čísla a odhadu limitní mobility micel umožní předpovídat chování systému i s ohledem na přítomnost micel.

Program představuje cenný zdroj informací o chování systémových píků jakéhokoliv systému a možnost rychlého nalezení vhodného složení BGE pro dané účely. Pracovní okno programu PeakMaster je znázorněno na Obr. 4.



**Obrázek 4**

Pracovní okno programu PeakMaster 5.2 s micelárním modem

#### 4.2.1 Navržení vhodných systémů pomocí programu PeakMaster

Z teorie systémových zón (kapitola 2.2) vyplývá, že volbou různého složení systému lze ovlivnit polohy a počty systémových píků. Jak bude ukázáno v kapitole 4.4.1, při analýze proteinů v původní sadě Protein 80 Plus LabChip<sup>®</sup> Kit je systémový pík přítomen v oblasti, kde se nacházejí píky proteinů a může tak tuto analýzu rušit. Snahou je tedy systémové píky posunout mimo oblast detekce proteinů, případně některé systémové píky odstranit úplně snížením počtu složek BGE. K navržení takových systémů byl použit právě program PeakMaster.

První separační prostředí, dále v práci označované jako SDS systém, bylo navrženo tak, aby svým složením co nejlépe odpovídalo složení původní separační sady firmy Agilent. Původní sada firmy Agilent obsahuje již předpřipravené separační gely, pufry, barvivo i denaturační roztok a nebylo by možné měnit jejich složení. Proto je SDS systém napodobeninou tohoto separačního systému a výchozím systémem pro následné experimenty a změnu složení. Pro vyšetřování systémových píků je rozhodující složení separačního gelu, přesněji základního elektrolytu, který je s gelem smíchán. Barvivo je nenabitá látka, a proto ji ve výpočtech není třeba uvažovat. Důležitými složkami BGE jsou tak SDS a pufr. Koncentrace gelu i barviva bude držena konstantní pro všechny navržené systémy. Dále jsou systémy navrhovány tak, aby měly stejnou či podobnou hodnotu pH i iontové síly.

Základní elektrolyt pro SDS systém měl složení uvedené v Tab. 1. Toto složení bylo vloženo do PeakMasteru umožňujícího pracovat s micelárním modelem. Další vložené parametry byly následující: hodnota CMC pro SDS 1,7 mM (platí při dané iontové síle), agregační číslo 64 a mobilita SDS micel 25 MU<sup>3</sup>.

Systém obsahuje čtyři složky, a proto jsou výsledkem čtyři mobility systémových zón (Tab. 2). Tento BGE má pH = 7,64 a iontovou sílu 38,4 mM.

**Tabulka 1** Složení BGE pro SDS systém

složka	koncentrace [mM]
DS <sup>-</sup>	7,5
Na <sup>+</sup>	7,5
TRIS	40,4
TRICIN	115,5

DS<sup>-</sup> značí dodecylsírnanový anion

**Tabulka 2** Systémové mobility BGE v SDS systému

BGE pro SDS systém	1. systémová mobilita	2. systémová mobilita	3. systémová mobilita	4. systémová mobilita
[MU]	-24,0	38,6	0,00	-0,10

Je patrné, že třetí a čtvrtá systémová mobilita má hodnoty blízké nule, tyto zóny se prakticky nepohybují. Druhá systémová zóna v pořadí má kladnou hodnotu mobility a v elektroferogramu tento pík nebude zaznamenán, protože putuje na opačnou stranu než záporně nabitě proteiny. Zásadní význam má první systémová

<sup>3</sup> Všechny hodnoty mobilit budou udány v jednotkách mobilit MU, které odpovídají 10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup> V<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

mobilita. Má hodnotu  $-24,0$  MU a zóna s touto mobilitou je zaznamenána jako systémový pík v oblasti, kde migrují proteiny.

V druhém systému bylo SDS nahrazeno decylsíránem sodným (SDeS), Separáční systém bude označován jako SDeS systém. Složení BGE pro tento systém je uvedeno v Tab. 3.

**Tabulka 3** Složení BGE pro SDeS systém

složka	koncentrace [mM]
DeS <sup>-</sup>	7,5
Na <sup>+</sup>	7,5
TRIS	40,4
TRICIN	115,5

DeS<sup>-</sup> značí decylsíránov y anion

Iontová síla a pH nabývají stejných hodnot jako v předešlém případě. SDeS má při této iontové síle vyšší CMC (30 mM) a při uvedené koncentraci SDeS (7,5 mM) se tedy v BGE nevyskytují micely. Nebylo tedy nutné pracovat s micelárním modem PeakMasteru. Vliv záměny detergentu na hodnoty systémových mobilit je vidět z Tab. 4.

**Tabulka 4** Systémové mobility BGE v SDeS systému

BGE pro SDeS systém	1. systémová mobilita	2. systémová mobilita	3. systémová mobilita	4. systémová mobilita
[MU]	$-21,0$	38,5	0,00	0,00

Z výsledků je z řejm e, že došlo jen k malému zpomalení první systémové zóny, která bude pravd epodobn e i nadále migrovat v oblasti proteinů. Nepřítomnost micel může sn ížit základní linii elektroferogramu a systémový p ík nemusí být ve výsledném záznamu patrný, přesto však systémová zóna může ovlivnit píky proteinů.

Výměna detergentů a přechod do submicel rn iho modu by nep řineslo žádané výsledky. Proto byl navržen třetí, jednodušší systém, který obsahuje kyselinu decyls ırovou (HDeS), která zároveň plní funkci pufrující složky (Tab. 5). Bylo tedy mozn e sn ížit počet složek BGE a tím i počet systémových píků při zachování iontové síly, pH elektrolytu i dostatečné pufr acn ı kapacity.

**Tabulka 5** Složení BGE pro HDeS systém

složka	koncentrace [mM]
DeS <sup>-</sup>	38,3
TRIS	50,0

Pro výpočty systémových mobilit tohoto BGE bylo opět použito micelárního modu PeakMasteru, neboť koncentrace decylsíranových anionů je nad hodnotou jejich CMC. Parametry pro výpočet tedy byly následující: hodnota CMC pro decylsíranové aniony 30 mM, agregační číslo a mobilita micel byla ponechána stejná jako pro dodecylsíranové micely.

Oproti předešlým systémům byly ubrány dvě složky (TRICIN a Na<sup>+</sup>), počet systémových zón je tedy menší o dvě. Zbývající dvě systémové mobility jsou téměř nulové (Tab. 6). Hodnoty pH i iontové síly dosahují stejných hodnot jako v předešlých případech. Tento systém je tedy teoreticky vhodný, systémové píky by neměly rušit analýzu.

**Tabulka 6** Systémové mobility BGE v HDeS systému

BGE v HDeS systému	1. systémová mobilita	2. systémová mobilita
[MU]	-0,01	0,00

V následujících kapitolách bude chování jednotlivých systémů, předpovězené programem PeakMaster, zkoumáno experimentálně.

### 4.3 Použité chemikálie a materiál

11,1% PA gel – Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

SDS – Fluka Chemie, Buchs, Švýcarsko (čistota > 99%)

SDeS – Fluka Chemie, Buchs, Švýcarsko (čistota > 99%)

TRIS – Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

TRICIN – Fluka Chemie, Buchs, Švýcarsko

β -merkптоethanol – Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

Lysozym (z vaječného bílku) – Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

Albumin (z hovězího séra) – Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo

NaOH – Lach-Ner, Neratovice, Česká republika (čistota 98%)

Fenolftalein – Lach-Ner, Neratovice, Česká republika

Chemikálie obsažené v sadě Agilent Protein 80 Kit

Protein 80 Plus Gel-Matrix

Protein 80 Plus Dye Concentrate

Protein 80 Plus Sample Buffer

Protein 80 Plus Ladder

Syto 60 – Molecular Probes, Oregon, USA

Alexa Fluor 647 – Molecular Probes, Oregon, USA

Dowex<sup>®</sup> 50WX4-100-ion-exchange resin – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Spinifiltry Spin-X<sup>®</sup>, Cellulose Acetate Centrifuge Tube Filter, 0,45 µm – Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Německo

Pro přípravu všech roztoků byla použita voda deionizovaná systémem Watrex Ultrapur (Watrex, Praha, Česká republika)

#### 4.3.1 Příprava základního elektrolytu, zředovacího gelu, denaturačního činidla a vzorků

Všechny separační gely, zředovací gely a denaturační roztoky (přidávají se ke vzorkům proteinů, obsahují surfaktant a denaturují protein), které byly v experimentech použity, byly připraveny pipetováním příslušných množství zásobních roztoků látek, případně doředěny deionizovanou vodou a přefiltrovány přes spinifiltr při 2500 ot./min. Složení všech navržených separačních systémů, které byly diskutovány v kapitole 4.2.1, je uvedeno v Tab. 7 – 9.

**Tabulka 7** Složení separačního gelu, zředovacího gelu a denaturačního roztoku pro SDS systém

SDS systém	Separací gel	Zředovací gel	Denaturační roztok
Gel [%]	8,0	8,0	-
SDS [mM]	7,5	-	54,1
TRIS [mM]	40,4	40,4	46,4
TRICIN [mM]	115,5	115,5	132,4
Syto 60 [µM]	3,7	-	-
Alexa [µg/ml]	-	-	20,7
β-merkapt ethanol [mM]	-	-	35,0

**Tabulka 8** Složení separačního gelu, zředovacího gelu a denaturačního roztoku pro SDeS systém

<b>SDeS systém</b>	Separací gel	Zředovací gel	Denaturační roztok
Gel [%]	8,0	8,0	-
SDeS [mM]	7,5	-	54,1
TRIS [mM]	40,4	40,4	46,4
TRICIN [mM]	115,5	115,5	132,4
Syto 60 [μM]	3,7	-	-
Alexa [μg/ml]	-	-	20,7
β-merkptoethanol [mM]	-	-	35,0

**Tabulka 9** Složení separačního gelu, zředovacího gelu a denaturačního roztoku pro HDeS systém

<b>HDeS systém</b>	Separací gel	Zředovací gel	Denaturační roztok
Gel [%]	8,0	8,0	-
SDeS [mM]	-	-	54,1
TRIS [mM]	50,0	40,4	46,4
TRICINE [mM]	-	115,5	132,4
Syto 60 [μM]	3,7	-	-
Alexa [μg/ml]	-	-	20,7
β-merkptoethanol [mM]	-	-	35,0
HDeS [mM]	38,3	-	-

TRIS a TRICIN tvoří v každé části separačního systému pufr, gel zajišťuje síťovací efekt a Syto 60 je fluorescenční barvivo, které je přítomné v separačním gelu a váže se nekovalentně na komplexy surfaktant-protein a umožňuje tak detekci proteinů. Jak je v Tab. 7 – 9 zřejmé, zředovací gel, který neobsahuje žádný surfaktant ani barvivo, byl pro všechny separační systémy stejný. V denaturačním roztoku pro SDeS a HDeS systémy byl nahrazen dodecylsírán sodný decylsíránem sodným, aby byl protein denaturován stejným surfaktantem, jaký je obsažen v BGE daného systému. Do všech denaturačních roztoků je přidáváno fluorescenční barvivo Alexa. Alexa je nízkomolekulární látka a není zpomalována separačním gelem, bude tedy migrovat před všemi přítomnými proteiny. Je zaznamenána jako tzv. dolní značka.

V experimentech byly používány dva proteinové vzorky. První vzorek byl připraven smícháním 2 μl zásobního roztoku albuminu (3,9 mg/ml), 2 μl zásobního roztoku lysozymu (3,4 mg/ml) a 2 μl příslušného denaturačního roztoku. Směs byla zahřívána po dobu 5 minut ve vodní lázni při 95 °C a poté byla zředěna



deionizovanou vodou na celkový objem 90  $\mu\text{l}$ . Výsledná koncentrace proteinů ve vzorky tedy byla 37,7  $\mu\text{g/ml}$  lysozymu a 43,3  $\mu\text{g/ml}$  albuminu. Příprava druhého vzorku byla obdobná. Byly smíchány 4  $\mu\text{l}$  proteinu albuminu (1,8  $\text{mg/ml}$ ) a 2  $\mu\text{l}$  denaturačního roztoku. Konečná koncentrace albuminu ve vzorky po zahřátí a naředění destilovanou vodou na objem 90  $\mu\text{l}$  byla 80  $\mu\text{g/ml}$ .

Pokud nebyly během experimentu analyzovány proteiny, byly dávkovány vzorky, které jen porušily koncentraci BGE a vyvolaly tak systémové píky. Tyto vzorky jsou označeny jako „porucha TRIS“ a „porucha TRICIN“ a byly připraveny smícháním 4  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku TRISu ( $c = 1,52 \text{ M}$ ) nebo TRICINu ( $c = 1,05 \text{ M}$ ) s 2  $\mu\text{l}$  příslušného denaturačního roztoku. I tyto vzorky byly zahřívány po dobu 5 minut ve vodní lázni při 95  $^{\circ}\text{C}$  a poté byly zředěny deionizovanou vodou na celkový objem 90  $\mu\text{l}$ .

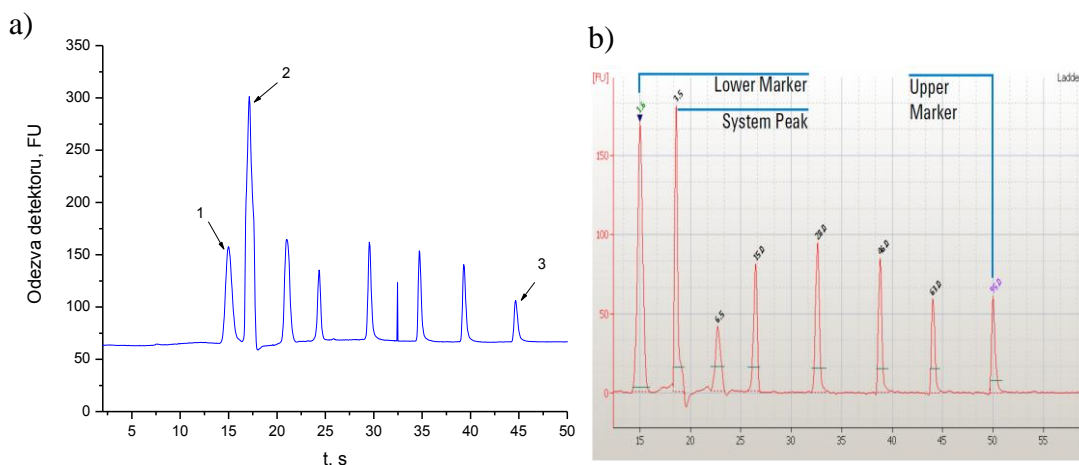
Kyselina decylsírová se průmyslově nevyrábí, ale dá se laboratorně připravit z SDeS výměnou kationtů na katexu. K iontové výměně  $\text{Na}^+$  za  $\text{H}^+$  byl použit iontoměnič Dowex 50WX4-100. Katex byl nejprve třikrát promyt 2 M roztokem kyseliny chlorovodíkové, aby se iontoměničová kolona dostala do  $\text{H}^+$  cyklu. Poté bylo na kolonu nanášeno 10 ml 350 mM roztoku SDeS a kolona byla promývána deionizovanou vodou. Eluát byl jímán do odměrné baňky až do neutrální reakce pH papírku s eluátem. Ke stanovení koncentrace HDeS byl vzniklý roztok titrován 0,1 M hydroxidem sodným na fenolftalein.

## 4.4 Experimenty a diskuze výsledků

Složení všech použitých separačních systémů i vzorků bylo uvedeno v kapitole 4.3.1 a v následujících kapitolách se pro přehlednost přidržíme označení systémů a vzorků zavedených v uvedené kapitole.

### 4.4.1 Identifikace systémových píků v původním separačním systému firmy Agilent

Nejprve byl proveden ukázkový experiment s použitím původní sady Protein 80 Plus LabChip<sup>®</sup> Kit, dodávané firmou Agilent Technologies. Analýza byla řízena skriptem P80. Čip byl připraven podle návodu [47]. Jako vzorek byl dávkován Ladder 80, který je rovněž součástí sady a obsahuje směs proteinů o velikosti 16 – 80 kDa a dále tzv. dolní a horní značku<sup>4</sup>. Získaný záznam analýzy (Obr. 5a) byl porovnán s ukázkovým výsledkem (Obr. 5b) stejného měření v návodech firmy Agilent [47]. Z těchto záznamů je vidět, že si dobře odpovídají polohy dolních a horních značek, píky příslušející proteinům i systémový pík.



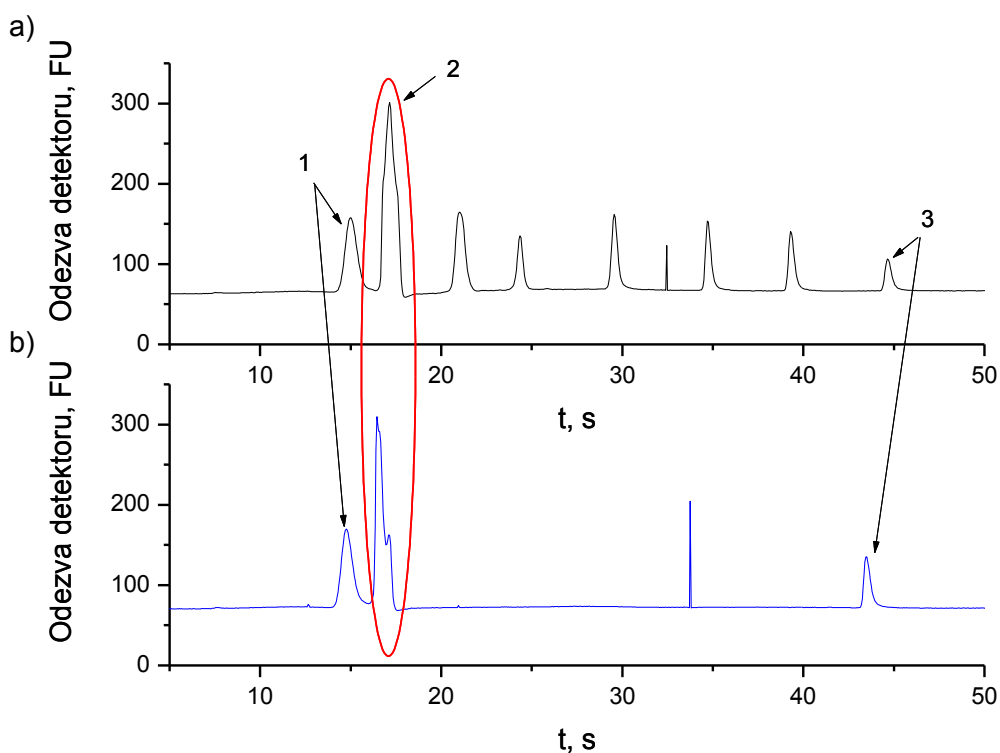
**Obrázek 5**

- a) Experiment provedený s původními roztoky sady Protein 80 Plus LabChip<sup>®</sup> Kit; Vzorek: Ladder 80; Skript: P80 ; 1. dolní značka; 2. systémový pík; 3. horní značka; ostatní píky přísluší jednotlivým proteinům  
b) Výsledek stejného experimentu ukázaný v návodech firmy Agilent [47].

Pro ověření, že druhý pík v pořadí je skutečně systémový, bylo provedeno následující měření. Do stejného systému, jako v předešlém případě, byl dávkován vzorek „porucha TRIS“. Protože tento vzorek neobsahuje proteiny, měly by

<sup>4</sup> Dolní značka je již zmiňované fluorescenční barvivo Alexa (kapitola 4.3.1). Horní značka je vysokomolekulární látka, která se v daném separačním prostředí pohybuje pomaleji než všechny proteiny. Obě značky tak vymezují oblast výskytu píků proteinů v elektroferogramu.

z elektroferogramu vymizet proteinové píky. Naproti tomu poloha systémového píků by měla zůstat zachována, jelikož analýza probíhala ve stejném systému. Dále by na elektroferogramu měly zůstat píky horní a dolní značky, které jsou obsaženy v denaturačním roztoku. Výsledek tohoto měření v porovnání s předešlým experimentem je zobrazen na Obr. 6. Porovnání přineslo očekávané výsledky a pomocí nich byla ověřena poloha systémového píku. Experiment také ukázal, že se v dané oblasti nevyskytuje jeden systémový pík, ale že se na jednom místě překrývá více systémových píků (Obr. 6b). To může být způsobeno například přítomností nečistot v gelu nebo interakcí nenabitých látek (například barviva) s nabitými micelami.



**Obrázek 6**

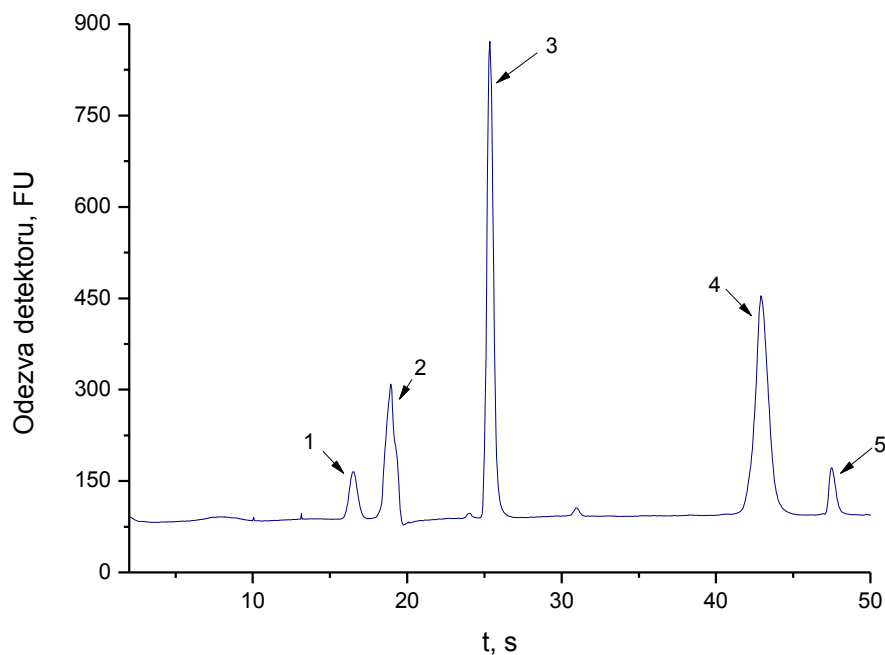
a) Elektroferogram stejný jako na Obr. 5a; Experiment provedený s původními roztoky sady Protein 80 Plus LabChip® Kit; Vzorek: Ladder 80; Skript: P80

b) Separační a zřed'ovací gel a denaturační roztok ze sady Protein 80 Plus LabChip® Kit; Vzorek: „porucha TRIS“; Skript: P80

1. dolní značky, označená oblast 2 – systémové píky, 3. horní značky

V každém z navržených systémů bylo třeba ověřit, zda skutečně umožňuje separovat proteiny. Množství Ladderu 80 v originální Agilent sadě bylo jen omezené a vzhledem k tomu, že jsme se zabývali zejména systémovými píky, počet proteinů v tomto Ladderu byl zbytečně velký. Proto byl připraven proteinový vzorek, který se skládal jen z lysozymu a albuminu. Nejprve byl tento vzorek analyzován v původní sadě firmy Agilent za použití originálního denaturačního roztoku. Záznam analýzy je

na Obr. 7. Lysozym má menší molekulovou hmotnost než albumin a ve výsledném elektroferogramu se jeho pík nachází poměrně blízko za systémovým píkem. Protože účelem této práce je sledovat systémové píky a případně ovlivňovat jejich pozice, mohlo by se stát, že by v nějakém z navržených systémů pík lysozemu interagoval se systémovým píkem. Například při přechodu z SDS systému do SDeS systému očekáváme zpomalení systémového píku (kapitola 4.2.1). Proto byl pro další testování schopnosti systémů analyzovat proteiny vybrán jako vzorek pouze albumin.



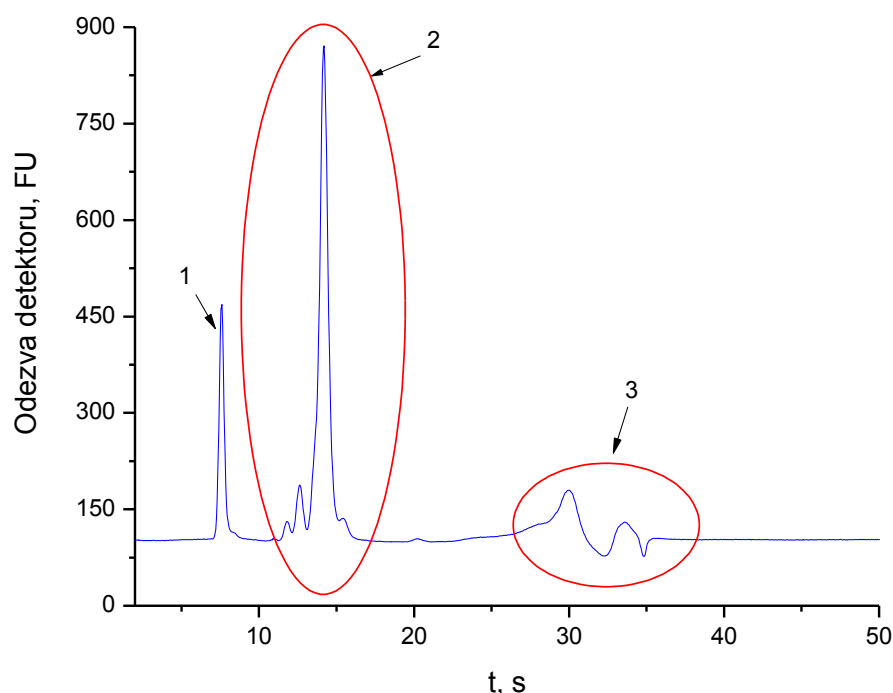
### Obrázek 7

Separáčn1 a zředřovací gel a denaturační roztok ze sady Protein 80 Plus LabChip<sup>®</sup> Kit; Vzorek: směs proteinů lysozemu (37,7  $\mu\text{g/ml}$ ) a albuminu (43,3  $\mu\text{g/ml}$ ); Skript: P80; 1. dolní značka, 2. systémový pík, 3. lysozym, 4. albumin, 5. horní značka

### 4.4.2 SDS systém

Dalším experimentem byla snaha napodobit výsledky získané v původním Agilent systému pomocí námi navrženého SDS systému. Navržený systém měl velmi podobné složení jako původní Agilent sada (Tab. 7). Cílem bylo tedy získat obdobný elektroferogram jako na Obr. 6b. Byl dávkován vzorek „porucha TRICIN“, tedy vzorek neobsahující proteiny. Na Obr. 8 je zaznamenán výsledný elektroferogram. V záznamu se objevuje pík dolní značky (pík 1 v Obr. 8), který je v porovnání se záznamem na Obr. 6b výrazně rychlejší. Námi dávkovaná dolní značka (Alexa Fluor 647) se tedy pravděpodobně o něco lišila od dolní značky v původním systému. Za píkem dolní značky následují, obdobně jako v původním systému, systémové píky.

V našem případě bylo patrné, že se v dané oblasti nacházejí minimálně čtyři systémové píky (oblast 2 Obr. 8). Dále byly mezi 25 až 35 s pozorovány další systémové píky (oblast 3 Obr. 8). Tyto výsledky naznačují, že gel, který byl firmou Agilent dodán pro tyto experimenty, není zcela totožný s gelem obsaženým v původní sadě a že tento gel obsahuje několik příměsí. Příměsmi mohou být nízkomolekulární látky z polymerizační směsi, krátké nabitě lineární řetězce gelu a podobně. Přítomnost těchto příměsí tak znemožňuje přesnější předpovědi počtu a pozic systémových píků v daných systémech. Přesto však byl tento gel použit pro přípravu systémů navržených v PeakMasteru (kapitola 4.2.1) a získané výsledky jsou uvedeny v následujících kapitolách.

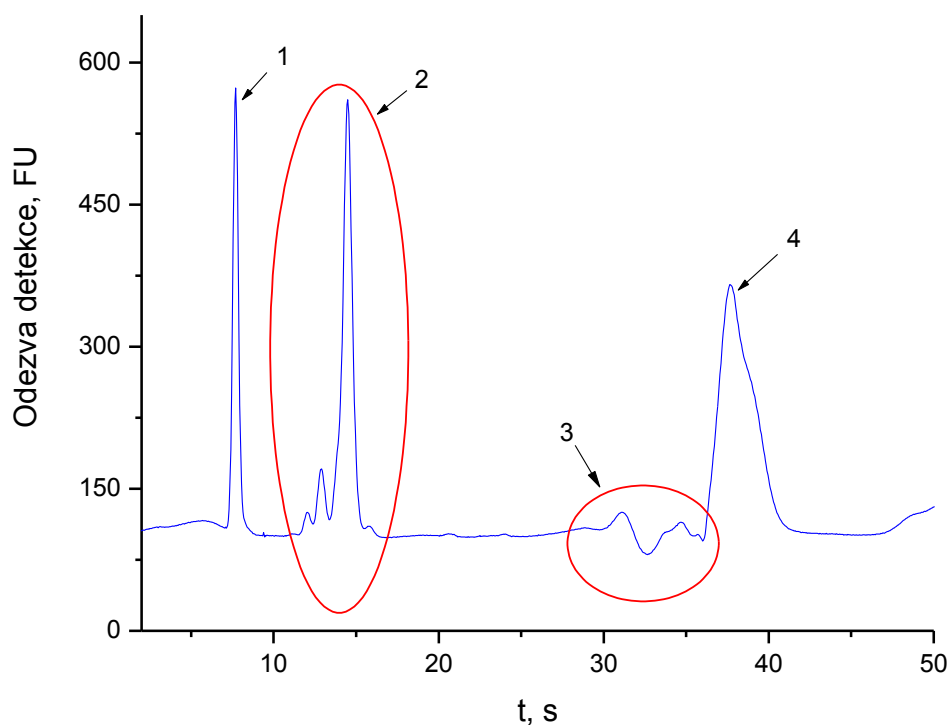


### Obrázek 8

SDS separační systém (Tab. 7); Vzorek: „porucha TRICIN“; Skript: P80; 1. dolní značka, oblast 2 a 3 – systémové píky

V experimentu na Obr. 9 je provedena analýza proteinu albuminu v SDS separačním systému. V záznamu je opět jako první vidět dolní značka (pík 1 Obr. 9) a následně dvě oblasti systémových píků (oblast 2 a 3 na Obr. 9). Pík albuminu (pík 4 Obr. 9) je zaznamenán v těsné blízkosti za druhou oblastí systémových zón a není tedy vyloučené, že jeho nepravidelný tvar je způsoben interakcí se systémovou zónou. Dalším důvodem k rozmytí píku oproti originální Agilent sadě může být změna složení denaturačního roztoku. V SDS systému byl používán denaturační roztok (Tab. 7), jehož složení bylo oproti původnímu denaturačnímu roztoku firmy

Agilent zjednodušeno. Ovšem v obou případech byla držena stejná hodnota iontové síly a pH roztoku a byl použit shodný surfaktant v obdobné koncentraci.



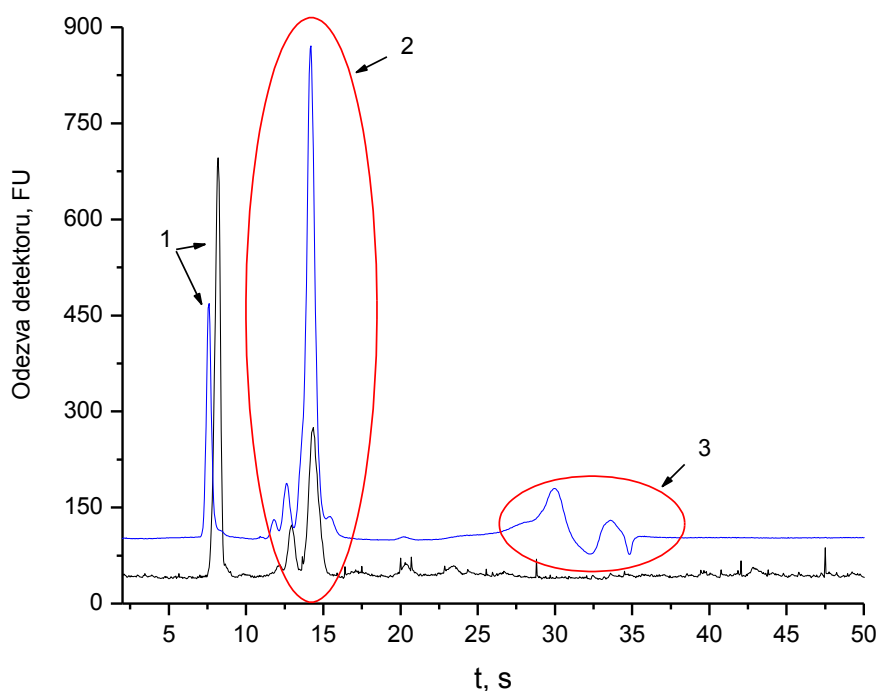
**Obrázek 9**

SDS separační systém (Tab. 7); Vzorek: albumin ( $c = 80 \mu\text{g/ml}$ ); Skript P80;  
1. dolní značka, oblast 2 a 3- systémové píky, 4. albumin

#### 4.4.3 SDeS systém

Z předpovědi programu PeakMaster (kapitola 4.2.1) vyplývá, že náhradou dodecylsírany sodného za decylsírany sodný, tedy při přechodu z SDS do SDeS systému, dojde ke zpomalení systémového píku. Díky výskytu většího počtu systémových píků, než by teoreticky příslušelo daným systémům (Obr. 8), je však situace složitější. Při prvním měření nebyl dávkován žádný protein, ale pouze vzorek „porucha TRICIN“. Získaný elektroferogram je na Obr. 10 porovnán s obdobným měřením v SDS systému. V oblasti mezi 27 až 37 s (oblast 3 Obr. 10) došlo k vyrovnání základní linie. Vymizení systémových píků může souviset s přechodem z micelárního do podmicelárního separačního systému. Předpovídané zpomalení systémových píků (oblast 2 Obr. 10) však nebylo pozorováno. Kvůli přechodu do podmicelárního módu bylo očekáváno i snížení základní linie elektroferogramu. Fluorescenční barvivo Syto 60 ve volném stavu fluoreskuje jen málo, zatímco v přítomnosti micel s micelami interaguje a vzniklý komplex barvivo-micela má

vyšší fluorescenci. Snížení základní linie elektroforegramu bylo skutečně potvrzeno (Obr. 10).



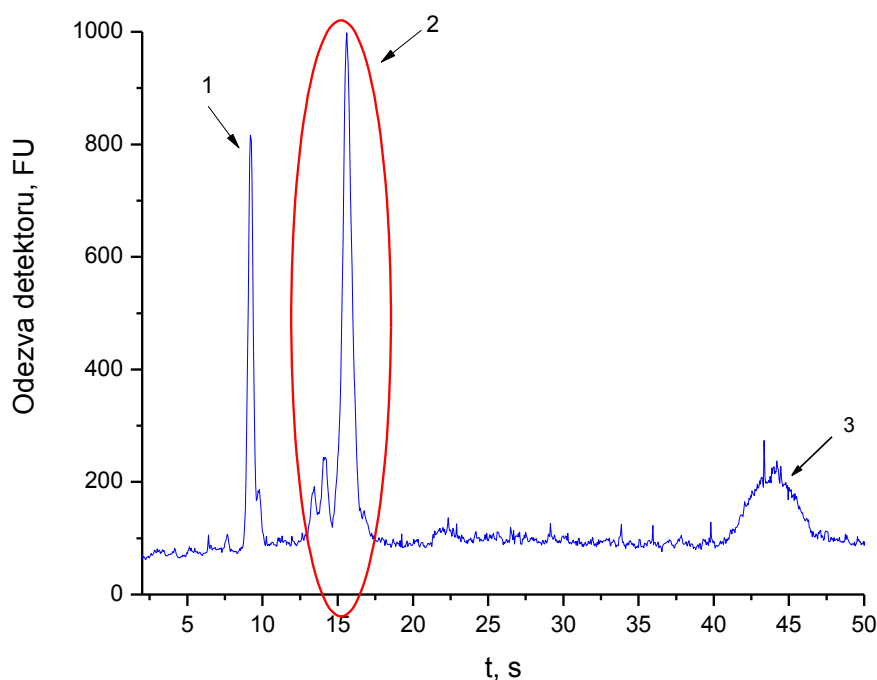
### Obrázek 10

Modrý záznam – stejný elektroferogram jako Obr. 8, SDS separační systém (Tab. 7);  
Vzorek: „porucha TRICIN“; Skript: P80

Černý záznam – SDeS separační systém (Tab. 8); Vzorek: „porucha TRICIN“;  
Skript: P80

1. dolní značka, oblasti 2 a 3 - systémové píky

Surfaktanty byly zaměněny nejen v separačním gelu, ale i v denaturačním roztoku. Tato změna byla důležitá z pohledu denaturace proteinového vzorku. Denaturační schopnosti SDeS byly tedy ověřeny v následujícím experimentu. Do separačního SDeS systému byl dávkován vzorek albuminu, denaturovaný denaturačním roztokem o složení uvedeném v Tab. 8. Získaný záznam je na Obr. 11. V porovnání s Obr. 9 je vidět, že došlo ke značnému rozšíření píku albuminu, což může souviset s horší denaturační schopností SDeS.



**Obrázek 11**

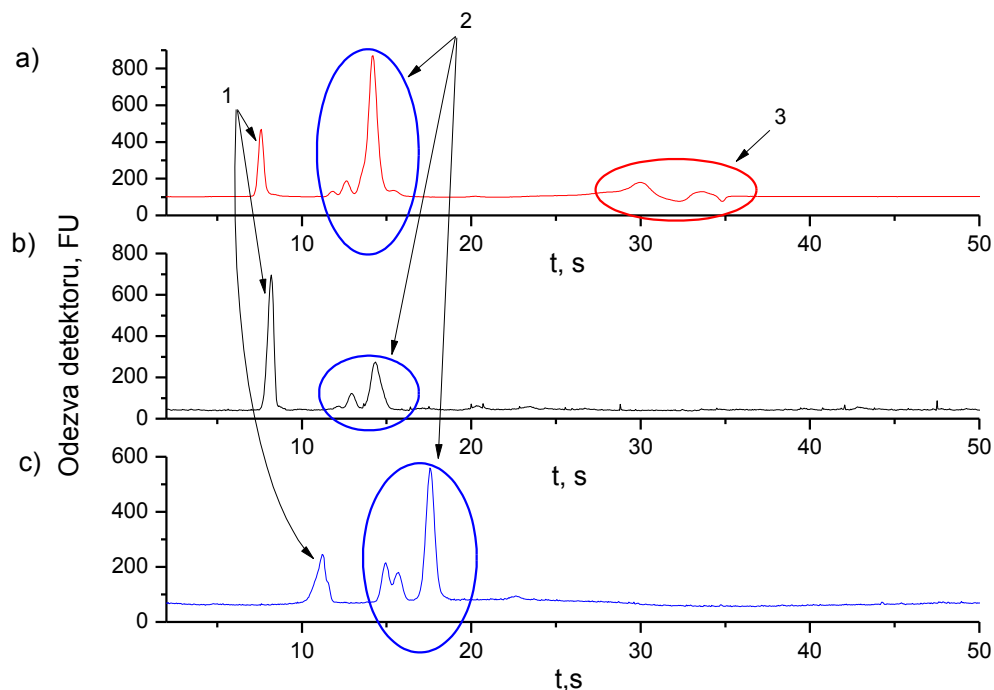
SDeS separační systém (Tab. 8); Vzorek: albumin ( $c = 80 \mu\text{g/ml}$ ); Skript: P80;  
1. dolní značka, oblast 2 - systémové píky, 3. albumin

#### 4.4.4 HDeS systém

HDeS systém je nejjednodušším systémem, kde kyselina decylsírová plní funkci denaturačního činidla i složky pufrujícího roztoku zároveň. Počet systémových píků by měl tedy poklesnout (kapitola 4.2.1). Opět byl nejprve dávkován pouze vzorek „porucha TRICIN“ a výsledný záznam byl porovnán s příslušnými výsledky SDS a SDeS systémů (Obr. 12)

Z porovnání záznamů je zřejmé, že snížení počtu systémových píků nebylo možné potvrdit. V záznamu totiž zůstává i nadále velký počet systémových píků, které se navíc překrývají. Zajímavým výsledkem je skutečnost, že při návratu do micelárního módu (při přechodu s SDeS do HDeS systému), nebyly pozorovány systémové píky v oblasti kolem 30 s (oblast 3 Obr. 12). Vzhledem ke komplikovanosti systému však nelze s určitostí nepřítomnost těchto píků připsat právě snížení složek v separačním systému.

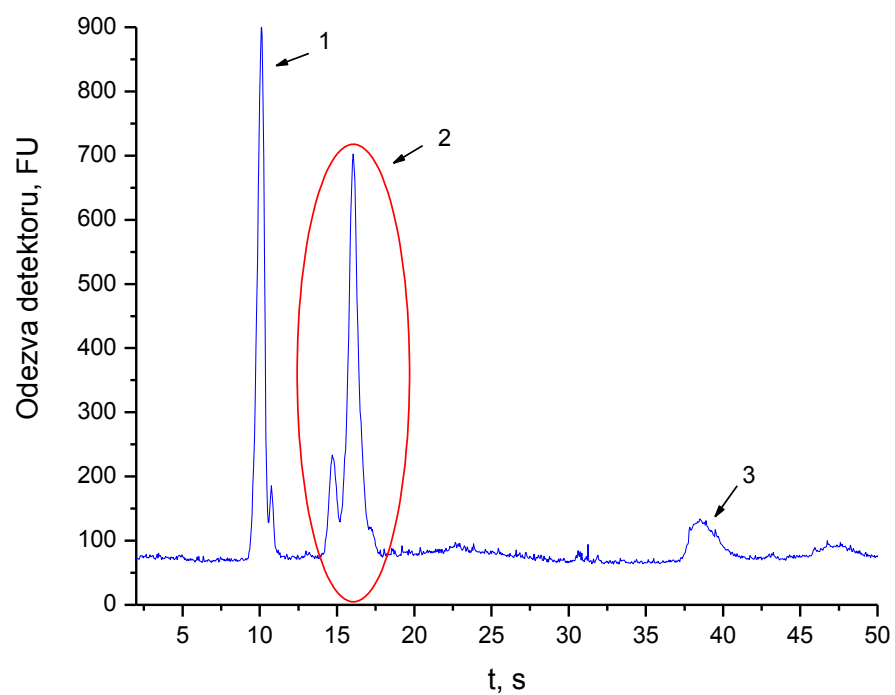




**Obrázek 12**

- a) Elektroferogram stejný jako na Obr. 8; SDS separační systém (Tab. 7); Vzorek: „porucha TRICIN“; Skript: P80
- b) Elektroferogram stejný jako černý záznam na Obr. 10; SDeS separační systém (Tab. 8); Vzorek: „porucha TRICIN“; Skript: P80
- c) HDeS separační systém (Tab. 9); Vzorek: „porucha TRICINE“; Skript: P80
1. dolní značka, oblast 2 a 3 – systémové píky

Na závěr bylo ověřeno chování proteinu albuminu v HDeS systému (Obr. 13). Pík albuminu je na záznamu sice patrný, ale oproti předešlým systémům je tento pík menší i přesto, že koncentrace albuminu ve vzorku byla stejná jako v předešlých případech. Ačkoliv se tedy HDeS systém zdá z hlediska systémových píků velmi vhodný, denaturace proteinu SDeS a separace v HDeS separačním prostředí nepřináší z pohledu analýzy proteinů příliš dobré výsledky. Zlepšení by mohlo být dosaženo optimalizací složení denaturačního roztoku nebo prodloužením času denaturace v případě použití surfaktantu decylsírany sodného, který má menší denaturační potenciál než dodecylsírany sodný.



**Obrázek 13**

HDeS separační systém (Tab. 9); Vzorek: albumin ( $c = 80 \mu\text{g/ml}$ ); Skript: P80

1. dolní značka, oblast 2 – systémové píky, 3. albumin

## 5 Závěr

1. V teoretickém úvodu práce byly analyzovány procesy, odehrávající se při separaci proteinů metodou SDS-PAGE, její miniaturizace a přehled současných aplikací této metody. Dále byla stručně shrnuta problematika systémových zón.
2. Pro výzkum chování systémových píků a minimalizace jejich vlivu na analýzu byly navrženy celkem tři systémy (SDS systém, SDeS systém a HDeS systém). V posledním HDeS systému byl počet složek, obsažených v základním elektrolytu, snížen o dvě (sodné ionty a aniontovou složku TRICINE). Na základě teoretické předpovědi chování systémových píků v jednotlivých systémech pomocí programu PeakMaster bylo potvrzeno, že odstraněním složek v HDeS systému by mělo dojít k úplnému odstranění systémového píku ze záznamu. Získané teoretické výsledky byly poté ověřovány experimentálně.
3. Byl zopakován ukázkový experiment s použitím původní sady Protein 80 Plus LabChip® Kit. Výsledek byl v dobré shodě se záznamem v návodu firmy Agilent. Protože není známo přesné složení původního kitu firmy Agilent, byl navržen vlastní SDS systém, který se svým složením velice podobal původnímu systému. To umožňovalo další modifikaci složek BGE a následné pozorování chování systémových píků v navržených systémech. Polohy všech píků SDS systému byly oproti původnímu systému urychleny. V oblasti výskytu systémových píků se namísto jednoho píku objevilo několik dalších. Tento jev jsme připsali skutečnosti, že separační gel pravděpodobně obsahoval další nečistoty či nabitě příměsi.
4. Po náhradě SDS za SDeS v separačním systému bylo pozorováno snížení fluorescenčního pozadí v záznamu, protože SDeS byl použit v submicelární koncentraci. Bylo rovněž ověřeno, že surfaktant SDeS je schopen dostatečně denaturovat proteiny.
5. Byl ověřen předpoklad odstranění systémového píku v dvousložkovém HDeS systému. Naměřené výsledky bohužel nepotvrdily, že by některé systémové píky ze záznamu vymizely. Navíc proteiny byly v HDeS systému špatně identifikovatelné. Další studium chování systémových píků a vylepšování separačních technik pro separaci proteinů zůstává motivací k další činnosti.

## 6 Použitá literatura

---

- [1] Kasicka V.: Theoretical Bases and Separation Principles of Capillary Electromigration Methods. *Chem. Listy* 91, 320 – 329 (1997)
- [2] Righetti P.G., Gelfi C.: Electrophoresis gel media: state of the art. *J. Chrom. B* 669, 63 – 75 (1997)
- [3] Moosavi-Movahedi A. A.: Thermodynamics of protein denaturation by Sodium Dodecyl Sulphate. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2, 189 – 196 (2005)
- [4] Giancola C., Sena C., Fessas D., Graziano G.: DSC studies on bovine serum albumine denaturation Effect of ionic strength and SDS concentration. *Int. J. Biol. Macrom.* 20,193 – 2004 (1997)
- [5] Chattopadhyay K., Manzumdar S.: Stabilization of partially folded states of cytochrome C in aqueous surfactant: effects of ionic and hydrophobic interactions. *Biochemistry* 42, 14606 – 4613 (2003)
- [6] Reynolds J. A., Tanford CH.: Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes. *Proceedings of the National Academy of Science* 1002 – 1007 (1970)
- [7] Fano M., Weert M., Moeller E. H., Kruse N. A., Frokjaer S.: Ionic strength-dependent denaturation of *Thermomyces Lanuginosus* lipase induced by SDS. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 506, 92 – 98 (2011)
- [8] Andersen K. K., Otzen D. O.: How the chain length affect surfactant denaturation of acyl coenzyme A binding protein (ACBP). *J. Phys. Chem. B* 113, 13942 – 13952 (2009)
- [9] Chamani J., Deghahn-Neari N., Saleh-Mohamad M.: Anionic surfactant binding to lysozyme and hydrophobic interactions effect to the binding: a novel binding model, *Asian Journal of Chemistry* 22, 4347 – 4355 (2010)
- [10] Miller I., Crawford J., Gianazza E.: Protein stains for proteomic applications: Which, when, why?, *Proteomics* 6, 5385 – 5408 (2006)
- [11] Burnette W.N. : Wester Blotting : Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal. Chem.* 112, 192-203 (1981)
- [12] Guttman A.: Capillary sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins, *Electrophoresis* 17, 1333 – 1341 (1996)
- [13] Ganzler k., Greve K. S., Cohen A. S., Karger B. L., Guttman A., Cooke N.C.: High-performance capillary electrophoresis of SDS-protein complexes using UV-transparent polymer networks. *Anal.Chem.* 64, 2665 -2671 (1992)
- [14] Lian Ji Jin,<sup>†</sup> Braden C. Giordano,<sup>†</sup> and James P. Landers\*,<sup>†,‡,‡</sup>: Dynamic Labeling during Capillary or Microchip Electrophoresis for Laser-Induced Fluorescence Detection of Protein-SDS Complexes without Pre- or Postcolumn Labeling, *Anal. Chem.*, 73, 4994-4999 (2001)

- 
- [15] Dittrich P. S., Manz A., Tachikawa K.: Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Anal. Chem.* 78, 3887 – 3907 (2006)
- [16] Arora A, Simone G, Salieb-Beugelaar GB, et al.: Latest Developments in Micro Total Analysis Systems, *Anal. Chem.* 82, 4830 – 4847 (2010)
- [17] Gotz S., Karst U.: Recent development in optical detection methods for microchip separation. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 183 – 192 (2007)
- [18] Dolnik V., Liu S., Stevan J.: Capillary electrophoresis on microchip. *Electrophoresis* 21, 41 – 54 (2000)
- [19] Akashi S., Suzuki K., Aria A., Yamada N., Suzuki E., Hirayama K., Nakamura S., Nishimura Y.: Top-down analysis of basic proteins by microchip capillary electrophoresis mass spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry* 20, 1932 – 1938 (2006)
- [20] Kuban P., Hauser P. C., Abad-Vilar E. M.: Determination of biochemical species on electrophoresis chips with an external contactless conductivity detector. *Electrophoresis* 26, 3609 – 3614 (2005)
- [21] Yao S., Anex D. S., Caldwell W. B., Arnold D. W., Smith K. B., Schulz P. G.: SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5372 – 5377 (1999)
- [22] Liu Y. J., Foote R. S., Jacobs S. C., Ramsey R. S., Ramsey J. M.: Electrophoresis separation of proteins in a microchip with noncovalent, postcolumn labeling. *Anal. Chem.* 72, 4608 – 4613 (2000)
- [23] Jin L. J., Giordano B. C., Landers J. P.: Dynamic Labeling during Capillary or Microchip Electrophoresis for Laser-Induces Fluorescence Detection of Protein-SDS complexes without Pre- or Postcolumn Labeling. *Anal. Chem.* 73, 4994 – 4999 (2001)
- [24] Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., Dubrow R.: Protein sizing on microchip. *Anal. Chem.* 73, 1207 – 1212 (2001)
- [25] Schmut O., Horwath-Winter J., Zenker A., Trummer G.: The effect of sample treatment on separation profiles of tear proteins: Qualitative and semi-quantitative protein determination by an automated analysis system. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology* 240, 900 – 905 (2002)
- [26] Kim H. R., Andrieux K., Delomenie C., Chacun H., Appel M. et al.: Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and protein Lab-on-chip ((R)) system. *Electrophoresis* 28, 2252-2261 (2007)
- [27] Hsieh J.-F., Sinchaikul S., Ou B.-M., Chen S.-T.: Studies on the Analysis of Human Serum Proteins by the Gel-based Microchip and SDS.PAGE. *J. Food and Drug Analysis* 18, 434 – 439 (2010)
- [28] Nawarak J., Sinchaikul S., Wu C. Y. et al.: Proteomics of venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis* 24, 2838 – 2854 (2003)

- 
- [29] Vasilyeva E., Woodard J., Taylor F. R., et al.: Development of a chip-based capillary gel electrophoresis method for quantification of a half-antibody in immunoglobulin G(4) samples. *Electrophoresis* 25, 3890 – 3896 (2004)
- [30] <http://www.agilent.com>
- [31] <http://www.caliperls.com>
- [32] <http://www.bio-rad.com>
- [33] <http://www.gehealthcare.com>
- [34] <http://www.shimadzu-biotech.net>
- [35] Peng Y., Pallandre A., Tran N. T., Taverna M.: Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods. *Electrophoresis* 29,157 – 178 (2009)
- [36] Han J., Singh A.K.: Rapid protein separation in ultra-short microchannels: microchip sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *J. Chrom. A* 1094, 205 – 209 (2004)
- [37] Gas B., Hruska V., Dittmann M., Bek F., Witt K.: Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis. *J. Sep. Sci.* 30, 1435 – 1445 (2007)
- [38] Gas B.: Theory of electrophoresis: Fate of one equation. *Electrophoresis* 30, 7-15 (2009)
- [39] Poppe H.: Overloading and interaction phenomena in electrophoretic separations. *Anal. Chem.* 17, 1908 – 1919 (1992)
- [40] Stedry M., Jaros M., Hruska V., Gas B.: Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III. Linear theory of electromigration. *Electrophoresis* 25, 3071 – 3079 (2004)
- [41] Hruska V., Stedry M., Zuskova I., Gas B.: Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster, *Electrophoresis* 25, 3080 (2004)
- [42] Gas B., Jaros M., Hruska V., Zuskova I., Stedry M.: PeakMaster – A freeware simulation of capillary zone electrophoresis. *LC – GC Europe* 18, 282 – 288 (2005)
- [43] Gas B., Kenndler E.: Peak broadening in microchip electrophoresis : A discussion of the theoretical background. *Electrophoresis* 23, 3817 – 2826 (2002)
- [44] Riesova M.: Bakalarska prace, PrF UK, Praha 2006
- [45] V., Liu S. R.: Applications of capillary electrophoresis on microchip. *Journal of separation science* 28 1994 – 2009 (2005)
- [46] <http://www.natur.cuni.cz/gas>
- [47] Agilent Protein 80 Reagent Kit Guide, Edition 08/2006, Agilent Technologies