

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



**Gelová elektroforéza na čipu**

**Bakalářská práce**  
Chemie v přírodních vědách

**Martina Riesová**

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 7. června 2006

*Harbina Zita*

.....  
podpis

Děkuji Prof. Bohuslavu Gašovi za vedení mé bakalářské práce a Mgr. Vlastimilu Hruškovi za obětavou pomoc při teoretické přípravě i experimentech.

Také bych chtěla poděkovat ostatním členům Gašovy skupiny za milé pracovní zázemí.

# Obsah

1	Úvod .....	2
2	Literární přehled .....	4
3	Cíle práce .....	7
4	Experimentální část .....	8
4.1	Popis přístroje .....	8
4.2	Použité chemikálie .....	10
4.3	Experimenty a diskuse výsledků .....	11
4.3.1	Ovlivnění zředovacího poměru.....	11
4.3.2	Identifikace systémových píků v systému firmy Agilent.....	13
4.3.3	Sledování systémových píků v Tris-acetátovém systému .....	14
4.3.4	Tris-dodecylsulfátový systém .....	16
4.3.5	Analýza proteinů ve zvolených systémech.....	20
5	Závěr .....	21
6	Seznam použitých zkratk.....	22
7	Použitá literatura.....	23

# 1 Úvod

Ačkoliv je elektroforéza známa už více jak sto let, její význam neustále roste a je jednou z nejvíce se rozvíjejících metod. Zájem o tuto metodu stoupl znovu v osmdesátých letech, kdy se elektroforéza začala provádět v kapilárním uspořádání. Jednalo se hlavně o zónovou elektroforézu, izoelektrickou fokusaci a gelovou elektroforézu. Nově se vyvíjely také bioafinitní elektroforéza a metody kombinované s chromatografickými principy. Kapilární elektromigrační metody dosáhly vysoké účinnosti i citlivosti a staly se uznávaným protějškem různým variantám kapalinové chromatografie.

Dalším nevyhnutelným krokem se stala miniaturizace. Vývoj elektrotechniky a metod umožňujících výrobu stále lepších skleněných nebo plastových čipů s mikrokanály zapříčinil, že už počátkem devadesátých let byly provedeny mnohé elektroforetické separace na čipech. Elektroforéza na čipech zachovala vysokou účinnost kapilárních elektromigračních metod při velmi nízké spotřebě vzorků i ostatních činidel. Díky vysoké intenzitě elektrického pole, které bylo možno na krátkých separačních kanálech dosáhnout, se doba separace zkrátila na řádově sekundy či minuty. Velkým příslibem byla i potenciální integrace ostatních kroků analýzy (příprava vzorku, dávkování, detekce) přímo na čip. Této integrace bylo zanedlouho dosaženo a dnes jsou již běžné čipy, na kterých je možné provést veškeré požadované kroky dané analýzy.

Asi největší uplatnění našla čipová elektroforéza v biochemických aplikacích. Výzkum v této oblasti často stojí na analýzách vzorků obsahujících nukleové kyseliny nebo proteiny. K těmto separacím se dlouhá léta používaly různé varianty gelové elektroforézy v klasickém plošném uspořádání. Tyto metody jsou sice účinné, ale celá analýza trvá řádově hodiny až dny a spotřeba chemikálií (často i toxických) je vysoká. Příchod kapilárního elektroforetického uspořádání tuto oblast ještě mnoho neovlivnil. Zkrátil sice dobu analýzy a snížil spotřebu chemikálií, ale neumožňoval separaci více vzorků najednou a velkým problémem se zdála být také výměna gelu v kapiláře. Tento problém byl vyřešen použitím lineárních polymerů jako síťovacího prostředí, ale v té době

se už ukazuje perspektivnější gelová čipová elektroforéza. Ta umožnila separaci více vzorků na jednom čipu a to, podle uspořádání mikrokanálů, buď paralelně nebo sériově. Zanedlouho se začaly vyrábět i jednoúčelové čipy pro komerční použití. Starost s výměnou gelu tedy odpadla úplně.

Poté, co byl rozluštěn lidský genom, obrátila se pozornost na proteomiku. Proteiny mají ohromný význam pro fungování a řízení buněčných mechanismů a je žádoucí proteiny studovat a porozumět jejich úlohám v organismu. O proteomice se poprvé hovořilo v souvislosti s vytvářením seznamu proteinů obsažených v proteomu. Odhaduje se, že lidský proteom se skládá z asi 30 000 proteinů. Nástroji tohoto odvětví byly 2D-SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie. Během let se pod pojem proteomika dostalo i studium struktury a funkce proteinů. Takové studium se stalo rychle se rozvíjícím odvětvím a žádá si stále nové technologie, které lze automatizovat. Mezi tyto technologie můžeme zařadit i gelovou elektroforézu na čipu.

Gelová čipová elektroforéza se zaměřením na analýzu proteinů se proto stala i předmětem této bakalářské práce.

## 2 Literární přehled

O separačních principech kapilárních elektromigračních metod, které byly zmíněny v úvodu se můžeme stručně dovědět v práci [1]. Princip separace proteinů metodou SDS-PAGE i gelovou elektroforézou na čipu, kde se SDS používá, je následující. SDS vytváří s denaturovanými proteiny komplexy s konstantním poměrem molekulové hmotnosti a náboje. Tyto komplexy mají tedy stejnou nebo velice blízkou mobilitu a v elektrickém poli by se ve volném roztoku pohybovaly stejnou rychlostí. Procházejí-li však komplexy SDS-protein síťovacím prostředím, gelem, pak s tímto médiem interagují úměrně své velikosti a dojde k jejich separaci. Menší proteiny migrují separačním prostředím rychleji než větší. Studium komplexů SDS-protein se zabývala skupina kolem Reynoldse v pracích [2,3].

Budeme-li se zajímat o celkovou problematiku mikrofluidních zařízení, základní přehled o jejich využití a technologiích, pro které se vžily názvy *Micro Total Analysis Systems* nebo *Lab-on-a-chip*, a jejich vývoji získáme v pracích [4,5,6,7]. Zaměříme-li se na kapilární elektroforézu na čipu, přehled jejích aplikací provedených za dané období najdeme v člancích Dolníka a spol. [8,9]. O systémech používaných v bioanalýzách píše autoři v pracích [10,11]. I pokud zůžeme zájem jen na proteomiku, můžeme najít souhrnné články [12,13], které mohou poskytnout náhled na vývoj v této oblasti.

V roce 1999 Yao a spol. [14] jako první úspěšně předvedli SDS-CGE na čipu a separovali 6 fluorescenčně označených proteinů v rozsahu velikostí 9 – 116 kDa za méně než 35 s a s účinností srovnatelnou s kapilární elektroforézou. V roce 2001 bylo v práci [15] představeno dynamické nekovalentní vázání fluorescenčního barviva na komplexy SDS-protein. Stěžejní prací byl článek Bousseho a kol. [16], kde byl představen první komerční čip LabChip® (Caliper Technologies, Mountain View, California) a přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, California). V práci je popsána integrace všech potřebných kroků (separace, barvení, virtuální odbarvení, detekce) na jeden čip. Čip byl navržen tak, že dovoval navázání fluorescenčního barviva na SDS-protein komplex na začátku

separace a zředění SDS pod jeho kritickou micelární koncentrací před vstupem na detekční místo. Tím, že se přebytečné SDS micely zředěním rozpustily, se snížila odezva základního elektrolytu a bylo dosaženo vysoké citlivosti. Na čipu bylo možno analyzovat 10 odlišných vzorků v méně než 30 minutách. Dalšími pracemi, ve kterých bylo použito přístrojového vybavení Agilent 2100 Bioanalyzer při studiu imunoglobulinů, byly publikace [17] a [18]. Mezi další výrobce čipů pro komerční účely můžeme zařadit Gyros [19], Cepheid [20], Fluidigm [21], Micronics [22]. V roce 2003 byla na skleněném čipu demonstrována analýza proteinů z buněk linie Jurkat během 45 s [23]. Současnou separaci nativních i denaturovaných proteinů (SDS-protein komplexů) v 36 paralelních mikrokanálech na jediném čipu provedli Tsai a kol. [24]. Novou techniku představili Han a Singh v práci [25]. Místo lineárních gelů použili mikrokanály s pevným zesíťovaným polyakrylamidovým gelem. Dosáhli tak velké síťovací schopnosti a SDS-PAGE provedli na velmi krátké vzdálenosti. Vzorek s proteiny s  $M_r = 20\ 000$  až  $200\ 000$  rozseparovali během 30 s v 2 mm dlouhém kanálu při intenzitě elektrického pole 170 V/cm. Předvedli také IEF v mikrokanálech dlouhých 4 – 10 mm. Hawtin a kol. [26] využili koncepce Lab-on-a-chip k hodnocení čistoty proteinů. Integraci izotachoforetické prekoncentrace a SDS-PAGE na čip uskutečnili v roce 2005 Huang a kol. [27]. Navrhli čip, kde byl každý kanál spojen s dlouhým dávkovacím kanálem, ve kterém probíhala ITP. Využili tuto metodu ke kvalitativní analýze neznámých proteinových vzorků. Oproti samotné SDS-PAGE se až čtyřicetkrát snížil detekční limit.

Pro detekci v proteinové analýze je kvůli malým objemům detekčních prostorů potřeba použít detektor s velkou citlivostí. Z optických metod byla zkoušena přímá UV detekce, ale díky omezené optické dráze paprsku, dané hloubkou mikrokanálu, nedosáhl tento způsob detekce dostatečné citlivosti. Zato optický detektor založený na měření laserem indukované fluorescence barviva vázaného na SDS-protein komplexy, LIF detektor, se stal jedním z nejpoužívanějších detektorů. Informace o něm i jeho použití najdeme v článku [8] a v odkazech v něm obsažených. Například v [28] je uvedeno, že LIF detektor je schopen detekovat fluorescein o koncentraci 300 fM. Nejrozšířenější neoptickou metodou detekce je hmotnostní spektrometrie, často



s elektrosprejovou ionizací. Použitím hmotnostního spektrometru v proteinové analýze se zabývala skupina kolem Figeyse [29,30].

Značným problémem při separaci proteinů SDS elektroforézou na čipu je výskyt tzv. systémových píků [31]. Systémový pík nemá nic společného se separovanými proteiny a vzniká v důsledku toho, že základní elektrolyt při SDS elektroforéze obsahuje dva nebo více koiontů. Tento systémový pík se bohužel vyskytuje v oblasti, kde jsou píky separovaných proteinů a svým tvarem je i napodobuje. Software dodávaný výrobcem zařízení má sice identifikovat a eliminovat systémové píky, ale vzhledem k tomu, že jejich tvar je často proměnný a nepředvídatelný, dochází někdy k chybám při softwarovém vyhodnocení.

Přehledné uvedení do problematiky systémových píků lze nalézt v článku [31] a tam uvedených odkazech na další práce.

### 3 Cíle práce

Cíle mé práce byly následující:

1. V rešeršní části práce podat přehled o stavu problematiky elektroforézy na čípech
2. Osvojit si práci s čipovou elektroforézou
3. Porozumět procesům při separaci proteinů metodou SDS-PAGE a nabyté znalosti si experimentálně ověřit
4. Navrhnout separační systém, který by měl lepší vlastnosti z hlediska výskytu systémových píků a ověřit jeho vlastnosti

## 4 Experimentální část

### 4.1 Popis přístroje

Veškeré experimenty byly prováděny na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornie, USA) a na čípech Protein LabChip<sup>®</sup> (Caliper Technologies, Mountain View, Kalifornie, USA). Přístroj byl ovládán pomocí programu Agilent 2100 Bio Sizing, verze A.02.12 a data byla vyhodnocována programy Bio Sizing – Data Evaluation, 2100 Expert (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornie, USA) a Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Součástí Agilent 2100 Bioanalyzer je LIF detektor. Protein tvoří s SDS komplexy, na které se váže barvivo a detektor je schopen tyto komplexy zaznamenat. Barvivo se ale stejně tak váže na micely samotného SDS a tak na detektoru má velikou odezvu i základní elektrolyt.

Elektroforéza probíhá na čípech Protein LabChip<sup>®</sup> v systému mikrokanálů ve skleněné podložce. Vrchní část čipu je plastová. Je v ní vytvořeno 16 otvorů, nádobek (wells), kterými se na čip dávkuje separační gel, odbarvovací gel, vzorky i takzvaný ladder\*, tj. směs proteinů se známou délkou řetězce. Obrázek čipu je dostupný na webových stránkách [32]. Separační gel vždy obsahuje SDS a barvivo. Odbarvovací gel naopak barvivo ani SDS neobsahuje a slouží k naředění SDS v separačním gelu pod jeho kritickou micelární koncentraci, kdy už s barvivem netvoří komplexy a snižuje se tak odezva základního elektrolytu na detektoru (sniží se základní linie na elektroferogramu). Ladder slouží při analýze jako standard.

Pokud umístíme čip do přístroje, vnoří se do každé nádoby na čipu elektrody programovatelného vysokonapěťového zdroje. Tok látek mikrokanály je řízen elektroforeticky. To znamená, že vhodnou volbou napětí na dvojici elektrod, či proudu mezi dvěma elektrodami, můžeme řídit tok z požadovaných nádobek na dané místo na čipu. Vypínání a zapínání napětí na jednotlivých nádobkách a tedy proudů v jednotlivých kanálech lze přístroji předepsat

---

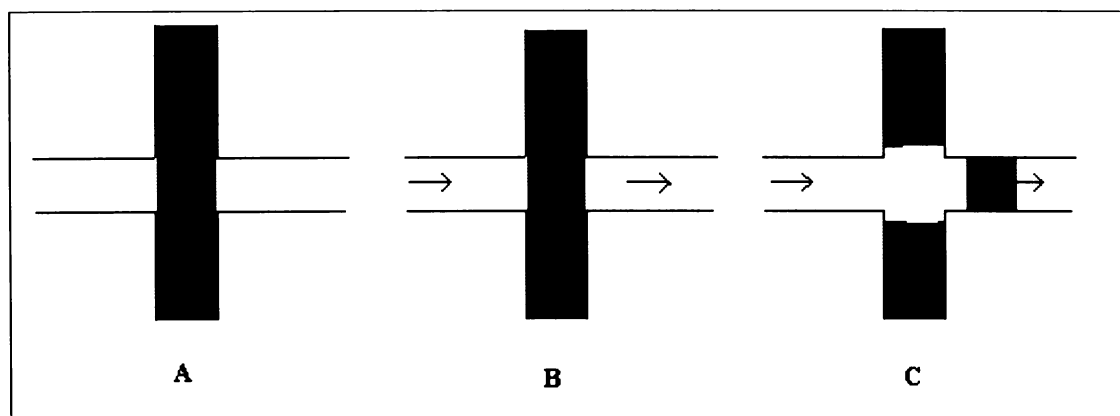
\* Do češtiny bývá slovo překládáno jako žebřík, ale v této práci se přidržíme anglického výrazu ladder.

prostřednictvím skriptu v programu Agilent 2100 Bio Sizing. Ukázka skriptu je na Obrázku 1. Lze pracovat v modu konstantního napětí nebo konstantního proudu.

Time	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	Ch7	Ch8
0,1	400V	400V	400V	400V	400V	400V	1100V	400V
3,5	-0.2uA	-0.2uA	-0.2uA	-0.2uA	-0.2uA	-0.2uA	1200V	-0.2uA
1	0V	0V	0V	0V	0V	0V	0V	0V
120	0uA	0uA	0uA	0uA	362V	0uA	1500V	325V
100	0uA	0uA	0uA	0uA	362V	0uA	1500V	325V
60	0uA	0uA	0.05uA	1500V	-0.2uA	0uA	0uA	0uA
6	0uA	0uA	0uA	0uA	0uA	1500V	0uA	0uA
2	0uA	0uA	0uA	0.1uA	-3uA	0.2uA	1500V	0uA
47	0uA	0uA	0uA	0uA	362V	0.2uA	1500V	325V

**Obrázek 1 Část skriptu**

Schéma kanálů je znázorněno na Obrázku 1 v práci [16]. Kanály tvoří dvě důležité křižovatky. První je křižovatka, kde dochází k nadávkování vzorku. Při vložení vhodného napětí na nádoby na opačných stranách dávkovacího kanálu bude vzorek putovat přes dávkovací křižovatku. Poté zapneme napětí v separačním kanálu a tím nadávkujeme vzorek. Princip je znázorněn na Obrázku 2.



**Obrázek 2 Dávkování vzorku**

A) vzorek (označen modře) je veden kanálem kolmým na separační kanál. Následně je zapnuto napětí na separačním kanálu B) a tím je nadávkován vzorek C)

Vzorek prochází separačním kanálem, kde dochází k dělení proteinů. Na konci separačního kanálu následuje křižovatka, kde probíhá ředění SDS, tedy

rozpouštění přebytečných micel a dochází tedy k „odbarvení“ základního elektrolytu. V této sekci je postranými kanály přiváděn odbarvovací gel. Pomocí skriptu lze nastavit, jaký proud poteče za zředovací křížovatkou a jaký bude v postranních kanálech nebo v separačním kanálu. Zbýlý proud je pak už jednoznačně dán Kirchhoffovým pravidlem. Je tedy možné elektrokinetické ředění ovlivnit. Definuje se zředovací poměr (dilution ratio; DR), což je poměr elektrického proudu v separačním kanálu k proudu, který protéká kanálem za touto křížovatkou. Toto zředování je popsáno Boussem a spol. v práci [16], kde je ředění na obrázku 3 i vyfotografováno.

Po tomto kroku již následuje detekce. Získáme závislost odezvy detektoru – fluorescenčních jednotek (FU) na čase. Elektroferogram je buď v klasické podobě, nebo je možné ho převést na „gelový“ elektroferogram, který napodobuje obarvený gel po klasické plošné SDS-PAGE.

## 4.2 Použité chemikálie

CH<sub>3</sub>COOH – Fluka Chemie, Buchs, Švýcarsko

NaCl - Lachema, Brno, Česká republika

PA gel „P50 gel (12514)“ – katalogové číslo 547115; Agilent, Palo Alto, USA

SDS - Fluka Chemie, Buchs, Švýcarsko

TDS – Sigma Chemical, St. Luis, USA

Tris – Merck, Darmstadt, Německo

chemikálie obsažené v sadě Protein 200 Plus LabChip® Kit [33]

Protein 200 Plus Gel-Matrix

Protein 200 Plus Dye Concentrate

Protein 200 Plus Sample Buffer

Protein 200 Plus Ladder (L200)

a dále Protein 50 Ladder (L50) ze sady Protein 50 LabChip® Kit

## 4.3 Experimenty a diskuse výsledků

### 4.3.1 Ovlivnění zředovacího poměru

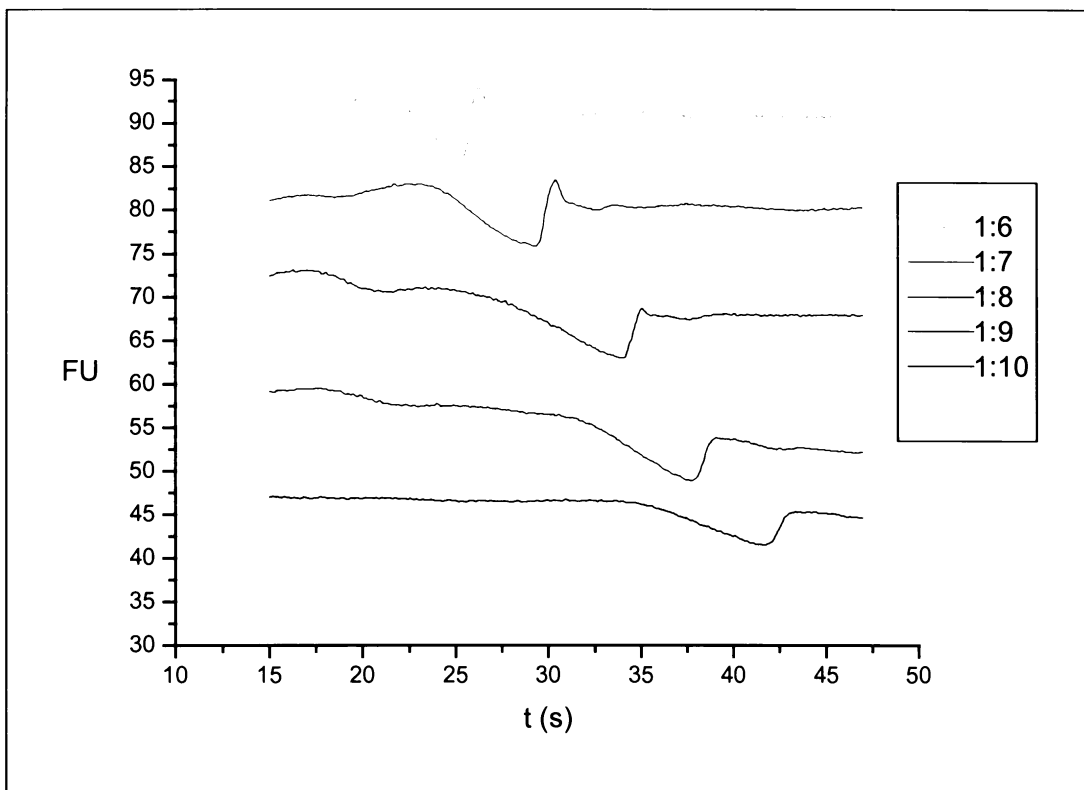
Na straně 10 byla zmíněna možnost ovlivnit zředovací poměr pomocí naprogramování patřičných proudů ve skriptu. Pro demonstraci tohoto tvrzení jsem napsala skript, který měnil zředovací poměr, DR, během měření ladderu a deseti vzorků na jednom čipu z 1:10 na 1:6. Proud v separačním kanále  $I_S$  a celkový proud za zředovací křížovatkou  $I_C$  byly naprogramovány dle Tabulky 1. Základní elektrolyt (BGE) i odbarvovací gel (DS) byly připraveny dle návodu [33] z originální sady Agilent Protein 200 Plus LabChip<sup>®</sup>. Dávkován byl vzorek L200.

Tabulka 1

DR	$I_C$ ( $\mu A$ )	$I_S$ ( $\mu A$ )
1:10	5	0,50
1:9	5	0,56
1:8	5	0,62
1:7	5	0,71
1:6	5	0,83

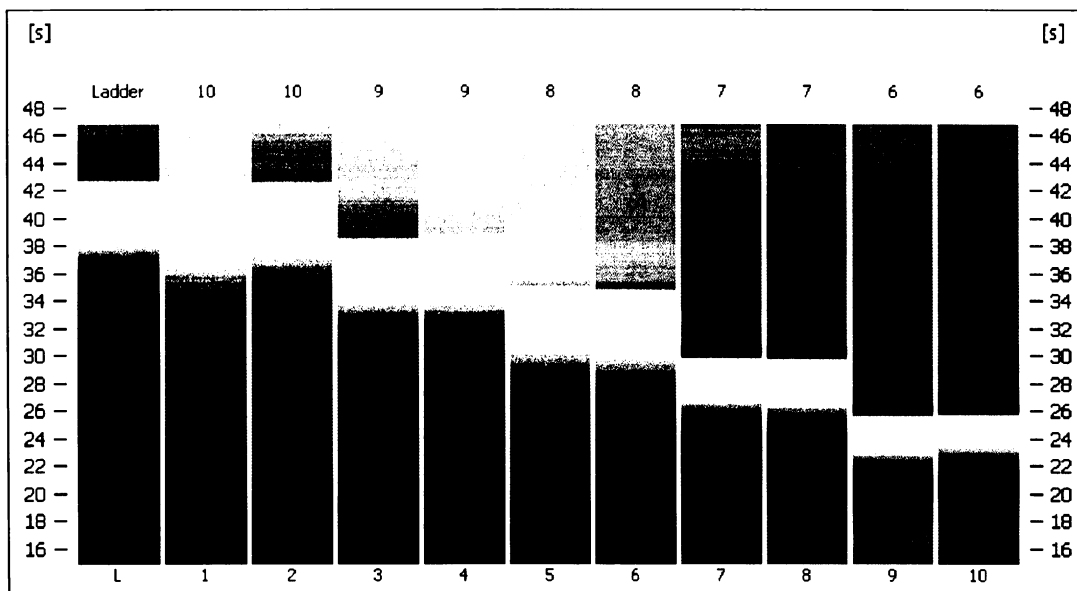
Změna DR přinesla, podle očekávání, dva jevy. Směrem od DR 1:10 k DR 1:6 rostla základní linie elektroferogramu. To je způsobeno tím, že při menším zředění je rozbito méně micel SDS a odezva základního elektrolytu je větší (Obrázek 3). Také se při zmenšování ředění zvětšuje proud v separačním kanálu – zvětšuje se tedy i intenzita elektrického pole v separačním prostoru a zóny látek putují rychleji. Toto je nejlépe patrné na „gelovém“ elektroferogramu (Obrázek 4), kde světlá místa odpovídají záporným píkům z Obrázku 3. Oba elektroferogramy ukazují stejný experiment. Protože proudy byly oproti předepsanému skriptu Protein 200 Plus (P200) menší, je na elektroferogramech vidět pouze nejrychlejší pík.

Pro další měření byl již výhradně používán skript P200.



**Obrázek 3**

BGE: Agilent; DS: Agilent (oba dle návodu [33]); vzorek L200; vlastní skript pro změnu DR

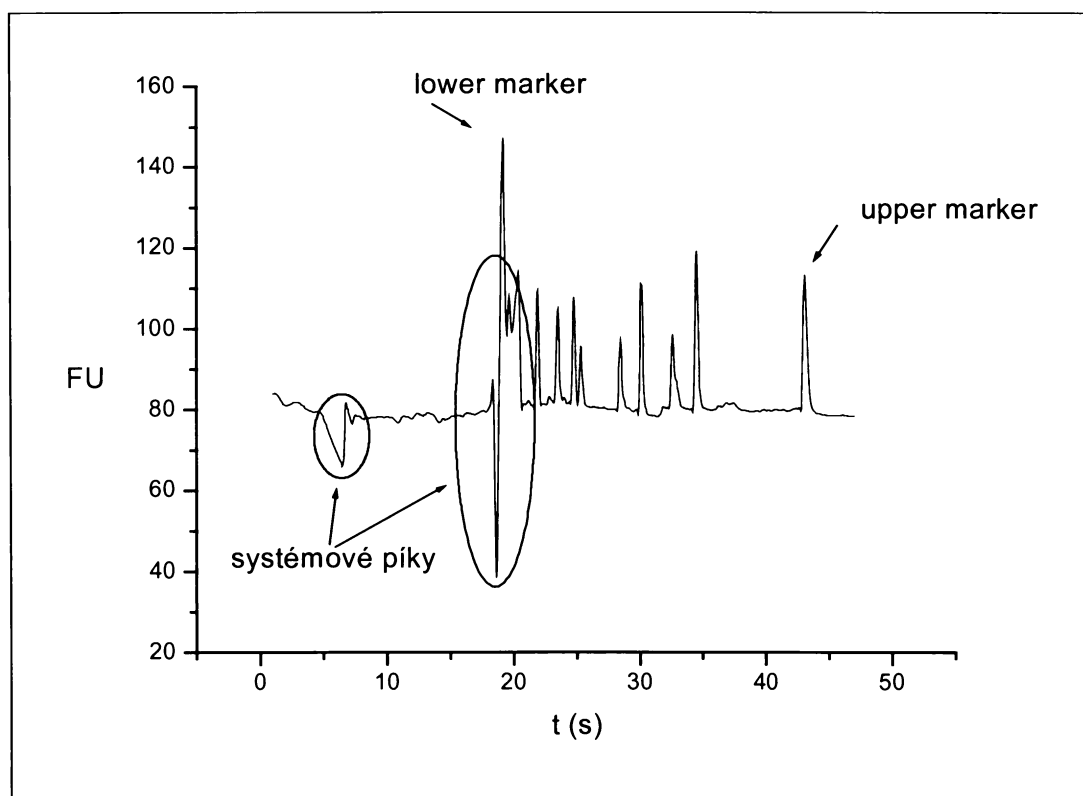


**Obrázek 4**

BGE: Agilent; DS: Agilent (oba dle návodu [33]); vzorek L200; vlastní skript pro změnu DR; DR je 1:x, kde x je číslo nad daným „gelovým“ sloupcem

### 4.3.2 Identifikace systémových píků v systému firmy Agilent

Se skriptem P200 byl nejprve proveden ukázkový experiment s originálními chemikáliemi dodávanými firmou Agilent v sadě Protein 200 Plus LabChip® Kit dle návodu [33]. Jako vzorek byl použit L200, který obsahuje proteiny o velikosti 14 – 200 kDa a je rovněž dodáván v této sadě, kde slouží jako standard. Získaný výsledek zobrazený na Obrázku 5 byl ve velmi dobré shodě s ukázkovým elektroferogramem, otištěným v [33], a to jak v případě píků proteinů, tak i systémových píků. Dobře odpovídaly i polohy dolní a horní značky (lower marker, upper marker).



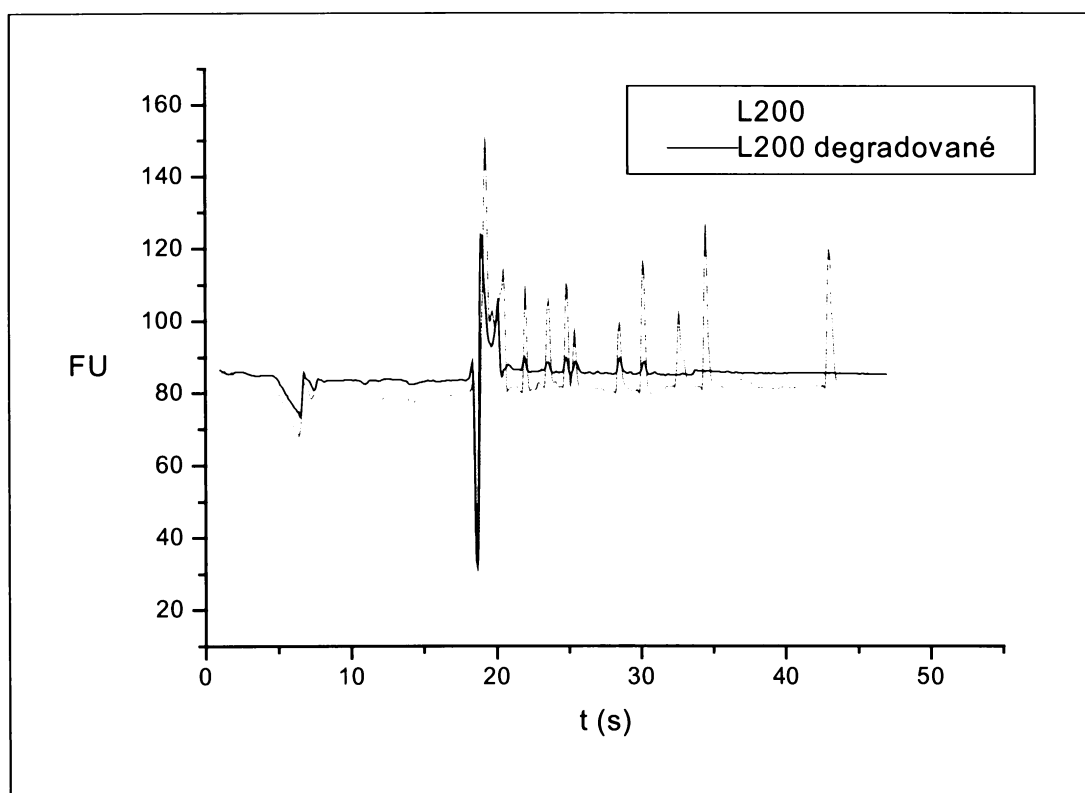
**Obrázek 5**

BGE: Agilent; DS: Agilent (oba dle návodů [33]); vzorek L200; skript P200

Pro ověření, zda jsou označené píky skutečně systémové, bylo provedeno následující měření. Jako vzorek byl použit L200 po uplynutí doby použitelnosti, u něhož již byla předpokládána alespoň částečná degradace proteinů a dalo se tedy očekávat, že proteinové píky budou výrazně menší nebo



vymizí úplně. Systémové píky by se i v takovém případě měnit neměly, protože bylo opět použito stejného systému. Výsledky měření byly v souladu s uvedeným předpokladem a byla ověřena správnost identifikace systémových píků (Obrázek 6). Také se dá předpokládat, že horní značku tvoří protein s velkou molekulovou hmotností, neboť tato značka také úplně vymizela. Pík dolní značky byl sice menší, ale zůstal stále zachován.



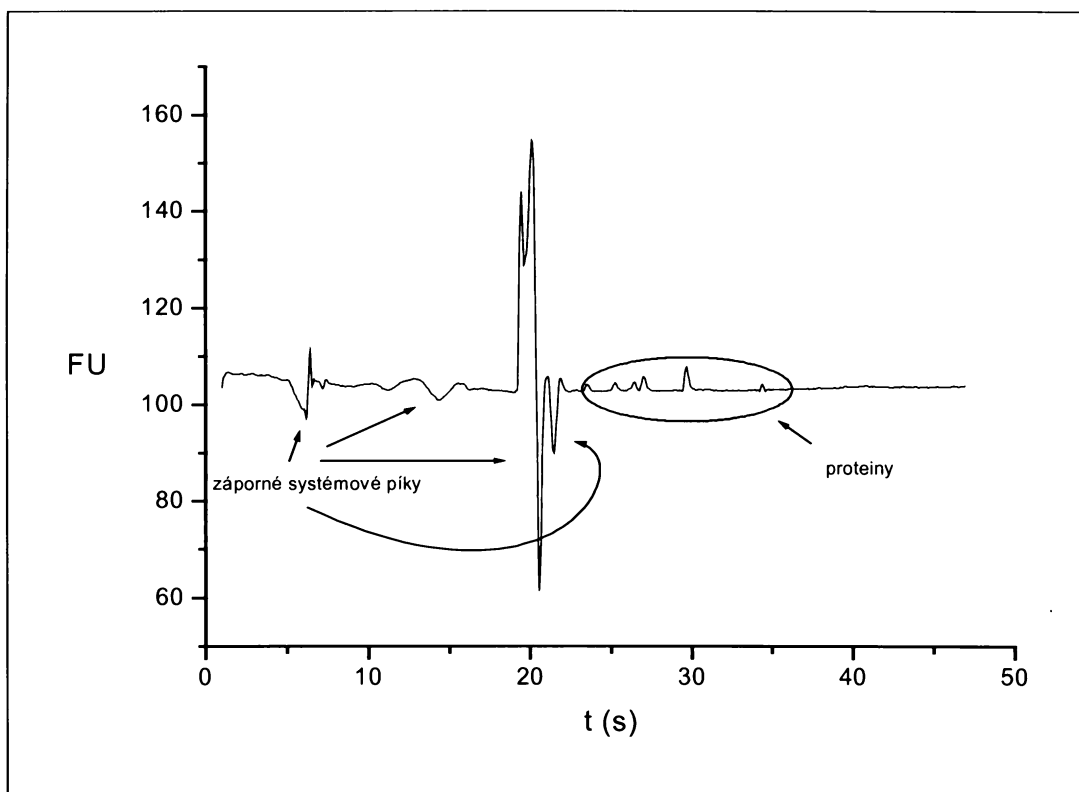
**Obrázek 6**

oranžová křivka - elektroferogram totožný jako na Obrázku 5  
černá křivka - BGE: Agilent; DS: Agilent (oba dle návodu [33]); vzorek L200 po uplynutí doby použitelnosti; skript P200

#### 4.3.3 Sledování systémových píků v Tris-acetátovém systému

Pro sledování chování systémových píků nebylo možné používat originální systém od firmy Agilent, neboť nebylo známo jeho přesné složení. Proto byl navržen systém nový – Tris-acetátový pufr, který je jeho obdobou a který udržuje pH na hodnotě přibližně 8 (takové pH má totiž originální Agilent

system). Dalšími složkami BGE byl PA gel a ponechala jsem barvivo Agilent, které obsahuje i potřebnou koncentraci SDS. Odbarvovací roztok se skládal jen z Tris-acetátového pufru a PA gelu. Jako vzorek byl dávkován L50 (obsahuje proteiny o velikosti 5 – 50 kDa). Na Obrázku 7 jsou na výsledném elektroferogramu vidět čtyři záporné a dva kladné píky. Jeden z kladných píků přísluší dolní značce a druhý je systémový. Systémové jsou rovněž všechny záporné píky. Z elektroferogramu na obrázku 5 víme, že pík dolní značky je zaznamenán těsně před časem 20 s. Mohlo by se tedy zdát, že dolní značce náleží první ze dvou kladných píků.

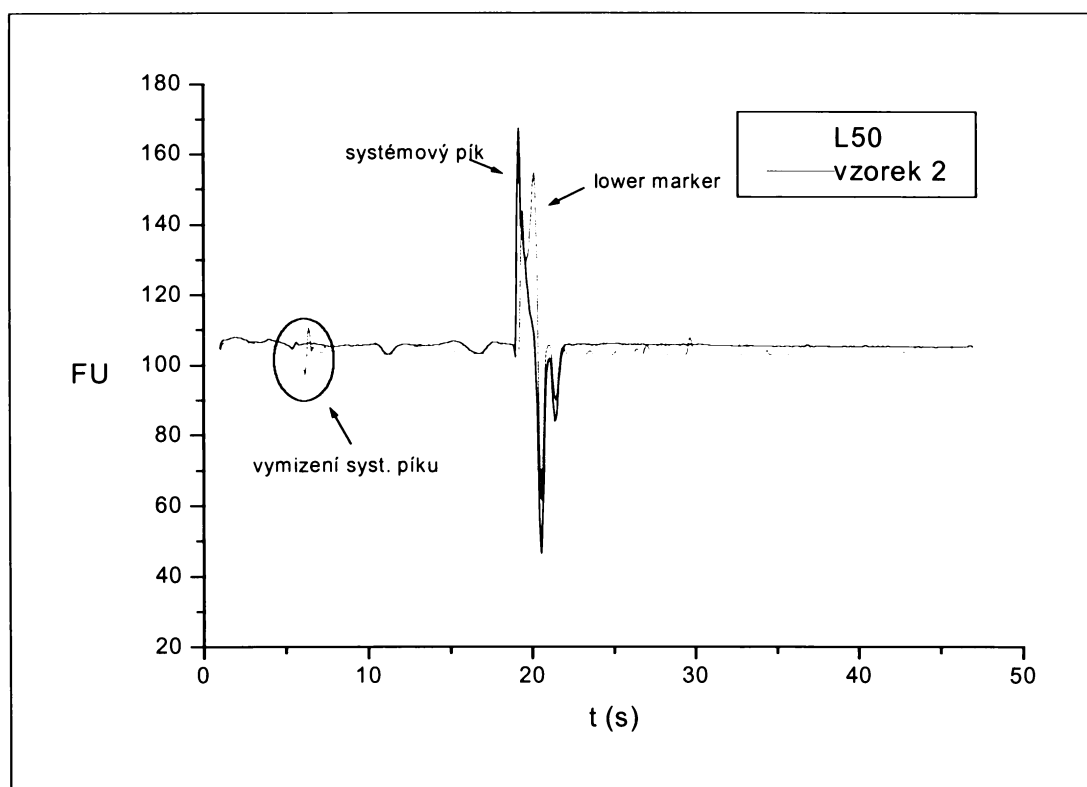


**Obrázek 7**

BGE: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel, 3,7  $\mu$ M Agilent barvivo, 10 mM SDS (obsažený v barvivu); DS: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel; vzorek: L50; skript P200

Ve snaze rozpoznat oba kladné píky na obrázku 7 jsem provedla následující měření. Při zachování stejného systému byl kromě vzorku L50 dávkován i nově připravený vzorek 2. Tento vzorek obsahoval Tris-acetátový pufr, NaCl a SDS. Vzorek 2 neobsahoval dolní značku. Očekávala jsem, že porovnáním elektroferogramů obou vzorků dojde k identifikaci kladných píků.

Z Obrázku 8 můžeme usuzovat, že dolní značka tvoří v pořadí druhý kladný pik. Přihlédneme-li ale k možnosti interakce obou piků a k jejich případnému míchání, nelze toto tvrdit s naprostou jistotou. Můžeme si také povšimnout vymizení nejrychlejšího ze záporných systémových piků. Je tedy pravděpodobné, že je spojen se složkou obsaženou v ladderu.



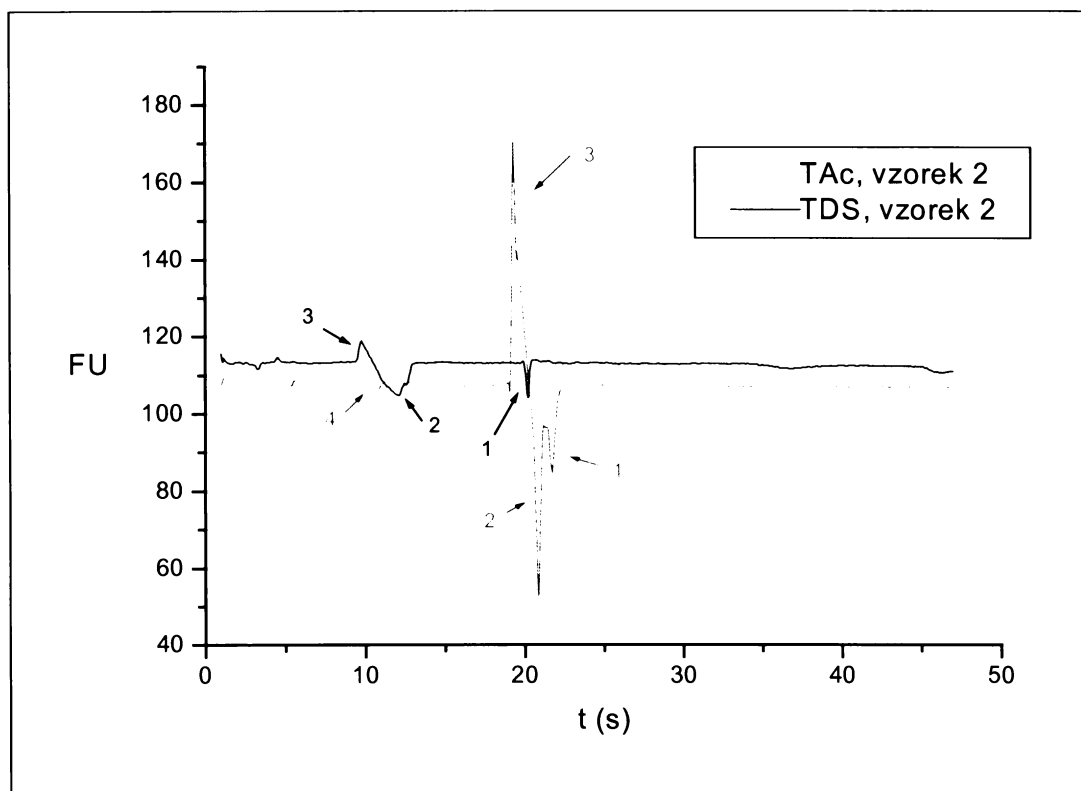
**Obrázek 8**

BGE: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel, 3,7  $\mu$ M Agilent barva, 10 mM SDS (obsažený v barvě); DS: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel; vzorky: oranžová křivka - L50; černá křivka: vzorek 2, který obsahoval 4 mM Tris, 2 mM HAc, 2 mM NaCl a 4 mM SDS; skript P200

#### 4.3.4 Tris-dodecylsulfátový systém

Ve snaze zmenšit počet systémových piků jsem navrhla ještě jednodušší systém: Tris-acetátový pufr s SDS byl nahrazen systémem, jehož základ tvoří Tris-dodecylsulfátový (TDS) pufr. Tento pufr je také schopný vytvořit BGE mající pH = 8. Dodecylsulfátový aniont, doposud plnící jen funkci látky komplexující s proteiny, se stal i složkou pufru. Není tedy nutné přidávat jiný

aniont (další složku BGE) a oproti TAc systému jsem očekávala zmenšení počtu systémových píků o jeden. Při měřeních byl v základním elektrolytu obsažen TDS pufr, PA gel, a barvivo Agilent, tentokrát už bez obsahu SDS. V odbarvovacím gelu byl TDS pufr, PA gel, ale nikoliv barvivo. Dala se tedy očekávat výše položená základní linie elektroferogramu, protože odbarvovací roztok obsahuje také dodecylsulfátové ionty a k rozbití micel nedochází. Ředí se tedy pouze barvivo. Dávkován byl vzorek 2 (Obrázek 9). Oproti očekávání se nárůst základní linie ve srovnání s TAc systémem zcela nepotvrdil. Pokud však porovnáme počet a polohu systémových píků, všimneme si, že v systému TDS je opravdu o jeden systémový pík méně. Ovšem polohy píků se v obou systémech liší. Je to důkaz toho, že přítomnost různých koiontů v různých koncentracích v obou dvou systémech silně ovlivňuje i polohu systémových píků. Nelze tedy určit, který konkrétní pík byl způsoben acetáty.



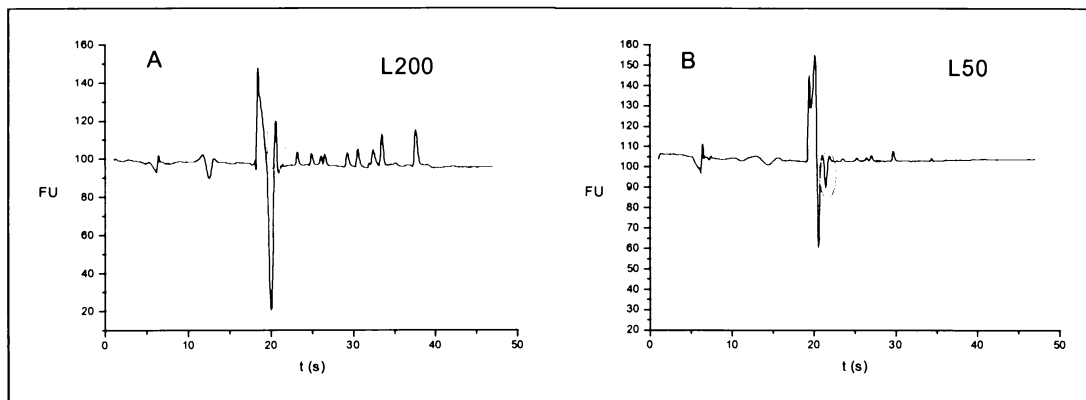
**Obrázek 9**

oranžová křivka:

BGE: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel, 3,7  $\mu$ M Agilent barva, 10 mM SDS (obsažený v barvě); DS: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel; vzorek: vzorek 2 (4 mM Tris, 2 mM HAc, 2 mM NaCl a 4 mM SDS); skript P200

černá křivka: BGE: 20 mM Tris, 20 mM Trisdodecylsulfát, 4,5% PA gel, 3,7  $\mu$ M barvivo; DS: 20 mM Tris, 20 mM Trisdodecylsulfát, 4,5% PA gel; Vzorek: vzorek 2 (4 mM Tris, 2 mM HAc, 2 mM NaCl a 4 mM SDS); skript P200

Nestálosti a snadného ovlivnění polohy či charakteru systémových píků si lze povšimnout i na obrázku 10. V případech A i B jsou systémy zcela totožné, ale v měření A byl dávkován L200 a v případě B vzorek L50. Lze předpokládat, že složení obou ladderů bude, až na velikosti proteinů, velice podobné. Přesto došlo k překlopení označeného systémového píku.



**Obrázek 10**

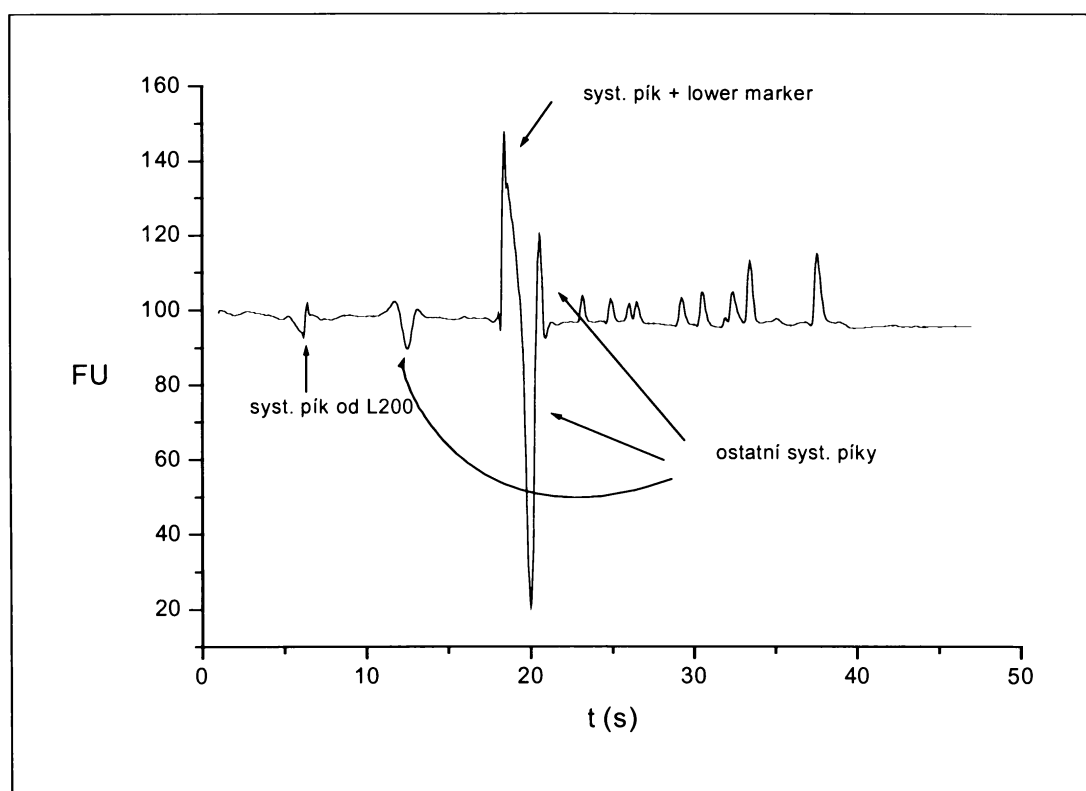
A: BGE: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel, 3,7  $\mu$ M Agilent barva, 10 mM SDS (obsažený v barvě); DS: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel; vzorek: L200; skript P200

B: BGE: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel, 3,7  $\mu$ M Agilent barvivo, 10 mM SDS (obsažený v barvivo); DS: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel; vzorek: L50; skript P200

Zakroužkováno je překlopení systémového píku

### 4.3.5 Analýza proteinů ve zvolených systémech

Nakonec jsem ověřila, zda zvolené systémy, Tris-acetátový a Tris-dodecylsulfátový, jsou při uvedených složení a iontových silách vhodné pro analýzu proteinů. Byl dávkován čerstvý vzorek L200. Zatímco v Tris-acetátovém pufru byly píky proteinů zaznamenány, Obrázek 11, v Tris-dodecylsulfátovém pufru nikoliv. (Tento experiment není zobrazen.) I u prvního zmíněného systému však byly píky ve srovnání s originální sadou menší.



**Obrázek 11**

BGE: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel, 3,7  $\mu$ M Agilent barva, 10 mM SDS (obsažený v barvě); DS: 60 mM Tris, 30 mM HAc, 4,5% PA gel; vzorek: L200; skript P200

## 5 Závěr

1. Uvedla jsem přehled o stavu problematiky elektroforézy na čipech.
2. Zopakovala jsem ukázkový experiment, který byl ve shodě s otištěnými experimenty v návodech dodávaných k přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer.
3. Byly naprogramovány různé proudy v separačním kanále a za zředovací křížovatkou a měnil se tedy zředovací poměr. Tímto experimentem byly potvrzeny předpokládané výsledky. S klesajícím proudem v separačním kanále klesá rychlost migrace zón. Základní linie elektroferogramu roste s rostoucí hodnotou zředovacího poměru.
4. Originální systém Agilent byl nejprve nahrazen systémem založeným na Tris-acetátovém pufru. Žádoucí bylo snížit počet systémových píků, což odpovídalo požadavku odebrat jednu ze složek BGE. Proto jsem navrhla použít Tris-dodecylsulfátový pufr. Odstraněním jedné ze složek systému, acetátů, skutečně ubyl jeden systémový pík. Zároveň došlo k výrazné změně poloh jednotlivých píků, což znemožnilo jejich přesnější identifikaci. Při separaci směsi proteinů L200 byly pozorovány píky proteinů jen u TAc systému. I v tomto systému měly však menší intenzitu, než jak je tomu u originálního systému. Oba systémy si proto do budoucna žádají hlubší optimalizaci.

Další studium chování systémových píků a zlepšování podmínek pro separaci proteinů bylo nad rámec této práce, ale zůstává motivací k další činnosti.

## 6 Seznam použitých zkratek

BGE - *background electrolyte*; základní elektrolyt

DR - *dilution ratio*; zředovací poměr

DS - *destaining solution*; odbarvovací roztok, gel

FU - *fluorescence unit*; flourescenční jednotka

$I_C$  - celkový elektrický proud za zředovací křížovatkou

$I_S$  - proud v separačním kanále

IEF - *isoelectric focusing*; izoelektrická fokusace

ITP - *isotachopheresis* ; izotachoforéza

L200 - ladder 200 (proteiny o velikosti 14 - 200 kDa)

L50 - ladder 50 (proteiny o velikosti 5 - 50 kDa)

LIF - *laser-induced fluorescence*; laserem indukovaná fluorescence

$M_r$  - molekulová relativní hmotnost

P200 - skript Protein 200 Plus

PA - polyakrylamid

SDS - *sodium dodecylsulfate*; dodecylsulfát sodný

SDS-CGE - *sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoresis*; kapilární SDS gelová elektroforéza

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*; SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

2D-SDS-PAGE – two dimensional *sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*; dvourozměrná SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza

TAc - Tris-acetát

TDS - Tris-dodecylsulfát

UV - *ultra violet*; ultrafialová



## 7 Použitá literatura

- 
- [1] Kašička V.: Theoretical Bases and Separation Principles of Capillary Electromigration Methods. *Chem. Listy* 91, 320 - 329 (1997)
- [2] Reynolds J.A., Tanford C.: The Gross Conformation of Protein-Sodium Dodecyl Sulfate Complexes. *J. Biol. Chem.* 245, 5161-5165 (1970)
- [3] Steinhardt J, Reynolds J.A.,: Multiple equilibria in proteins, Academic Press, New York, 1970
- [4] Bruin G. J. M.: Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices. *Electrophoresis* 21, 3931 - 3951 (2000)
- [5] Reyes D.R., Iossifidis D., Auroux P. A., Manz A.: Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. *Anal. Chem.* 74, 2623 - 2636 (2002)
- [6] Reyes D.R., Iossifidis D., Auroux P. A., Manz A.: Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications. *Anal. Chem.* 74, 2637 - 2652 (2002)
- [7] Vilkner T., Janasek D., Manz A.: Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. *Anal. Chem.* 76, 3373 - 3386 (2004)
- [8] Dolnik V., Liu S., Jovanovich S.: Capillary electrophoresis on microchip. *Electrophoresis* 21, 41 - 54 (2000)
- [9] Dolnik V., Liu S.: Applications of capillary electrophoresis on microchip. *J. Sep. Sci.* 28, 1994 - 2009 (2005)
- [10] Sanders G. H. W., Manz A.: Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis. *Trends Anal. Chem.* 19, 364 - 378 (2000)
- [11] Khandurina J., Guttman A.: Bioanalysis in microfluidic devices. *J. Chromatogr. A* 943, 159 - 183 (2002)
- [12] Figeys D., Pinto D.: Proteomics on a chip: Promising developments. *Electrophoresis* 22, 208 - 216 (2001)
- [13] Chang H. T., Huang Y. F., Chiou S. H., Chiu T. Ch., Hsieh M. M.: Advanced capillary and microchip electrophoretic techniques for proteomic. *Current Proteomics* 1 325 - 347 (2004)
- [14] Yao S., Anex D. S., Caldwell W. B., Arnold D. W., Smith K. B., Schultz P. G.: SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5372 - 5377 (1999)
- [15] Jin L. J., Giordano B. C., Landers J. P.: 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)
- [16] Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., Dubrow R.: Protein Sizing on a Microchip. *Anal. Chem.* 73, 1207 - 1212 (2001)
- [17] Ohashi R., Otero J. M., Chwistek A., Hamel J.-F.: Determination of monoclonal antibody production in cell culture using novel microfluidic and traditional assays. *Electrophoresis* 23, 3623 - 3629 (2002)

- 
- [18] Vasilyeva E., Woodard J., Taylor F. R., Kretschmer M., Fajardo H., Lyubarskaya Y., Kobayashi K., Dingley A., Mhatre R.: Development of a chip-based capillary gel electrophoresis method for quantification of a half-antibody in immunoglobulin G<sub>4</sub> samples. *Electrophoresis* 25, 3890 - 3896 (2004)
- [19] [www.gyros.com](http://www.gyros.com)
- [20] [www.cepheid.com](http://www.cepheid.com)
- [21] [www.fluidigm.com](http://www.fluidigm.com)
- [22] [www.micronics.net](http://www.micronics.net)
- [23] Tabuchi M., Kuramitsu Y., Nakamura K., Baba Y.: A 15-s Protein Separation Employing Hydrodynamic Force on a Microchip. *Anal. Chem.* 75, 3799 - 3805 (2003)
- [24] Tsai S.-W., Loughran M., Suzuki H., Karube I.: Native and sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of proteins on a single microchip. *Electrophoresis* 25, 494 - 501 (2004)
- [25] Han J., Singh A. K.: Rapid protein separations in ultra-short microchannels: microchip sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *J. Chromatogr. A* 1049, 205 - 209 (2004)
- [26] Hawtin P., Hardern I., Wittig R., Mollenhauer J., Poustka A.-M., Salowsky R., Wulff T., Rizzo Ch., Wilson B.: Utility of lab-on-a-chip technology for high-throughput nucleic acid and protein analysis. *Electrophoresis* 26, 3674 - 3681 (2005)
- [27] Huang H., Xu F., Dai Z., Lin B.: On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. *Electrophoresis* 26, 2254 - 2260 (2005)
- [28] Ocvirk G., Tang T., Harrison D. J.: Optimization of confocal epifluorescence microscopy for microchip-based miniaturized total analysis systems. *Analyst* 123, 1429 - 1434 (1998)
- [29] Figeys D., Aebersold R.: Nanoflow Solvent Gradient Delivery from a Microfabricated Device for Protein Identifications by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 70, 3721 - 3727 (1998)
- [30] Figeys D., Ning Y. B., Aebersold R.: A Microfabricated Device for Rapid Protein Identification by Microelectrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 69, 3153 - 3160 (1997)
- [31] Gaš B., Kenndler E.: System zones in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 25, 3901 - 3912 (2004)
- [32] [www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com)
- [33] Reagent Kit Guide Protein 200 Plus Assay, Edition 06/2003, Agilent Technologies