

Ivona Voráčová¹, František Foret¹, Vladimíra Datinská², Jakub Novotný¹, Pantea Gheibi², Jan Berka², Yann Astier²

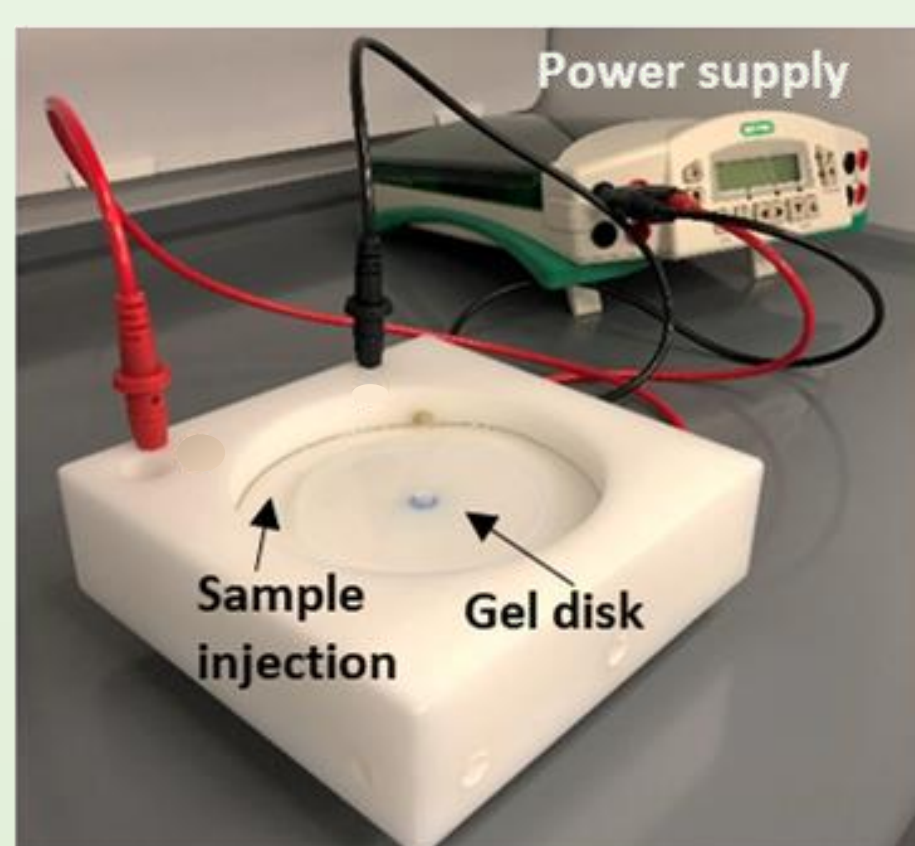
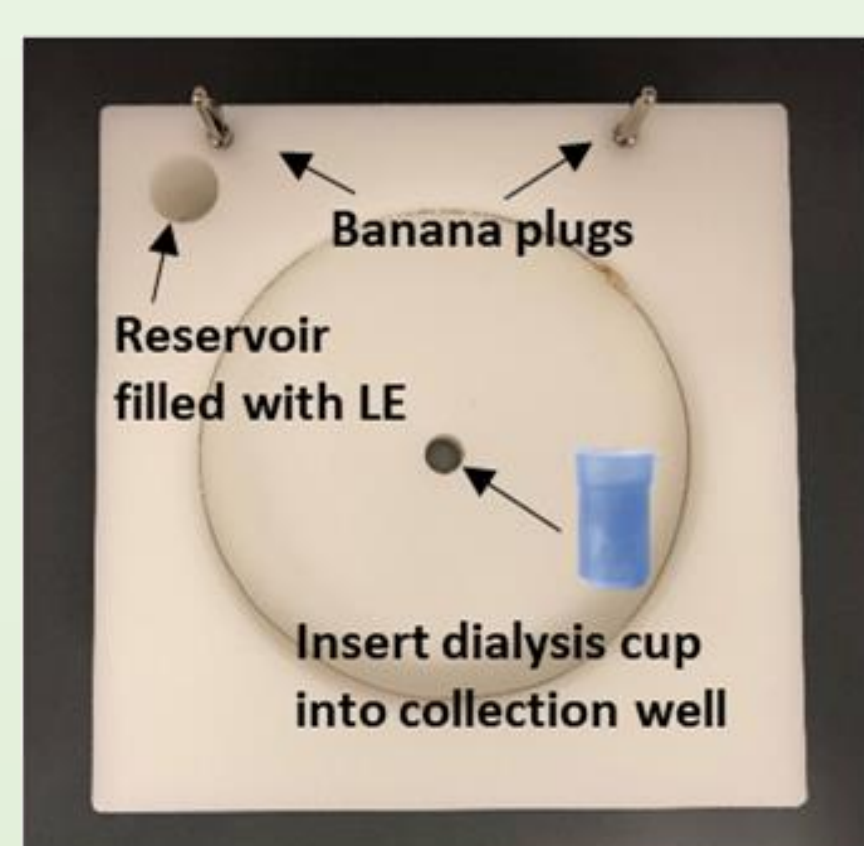
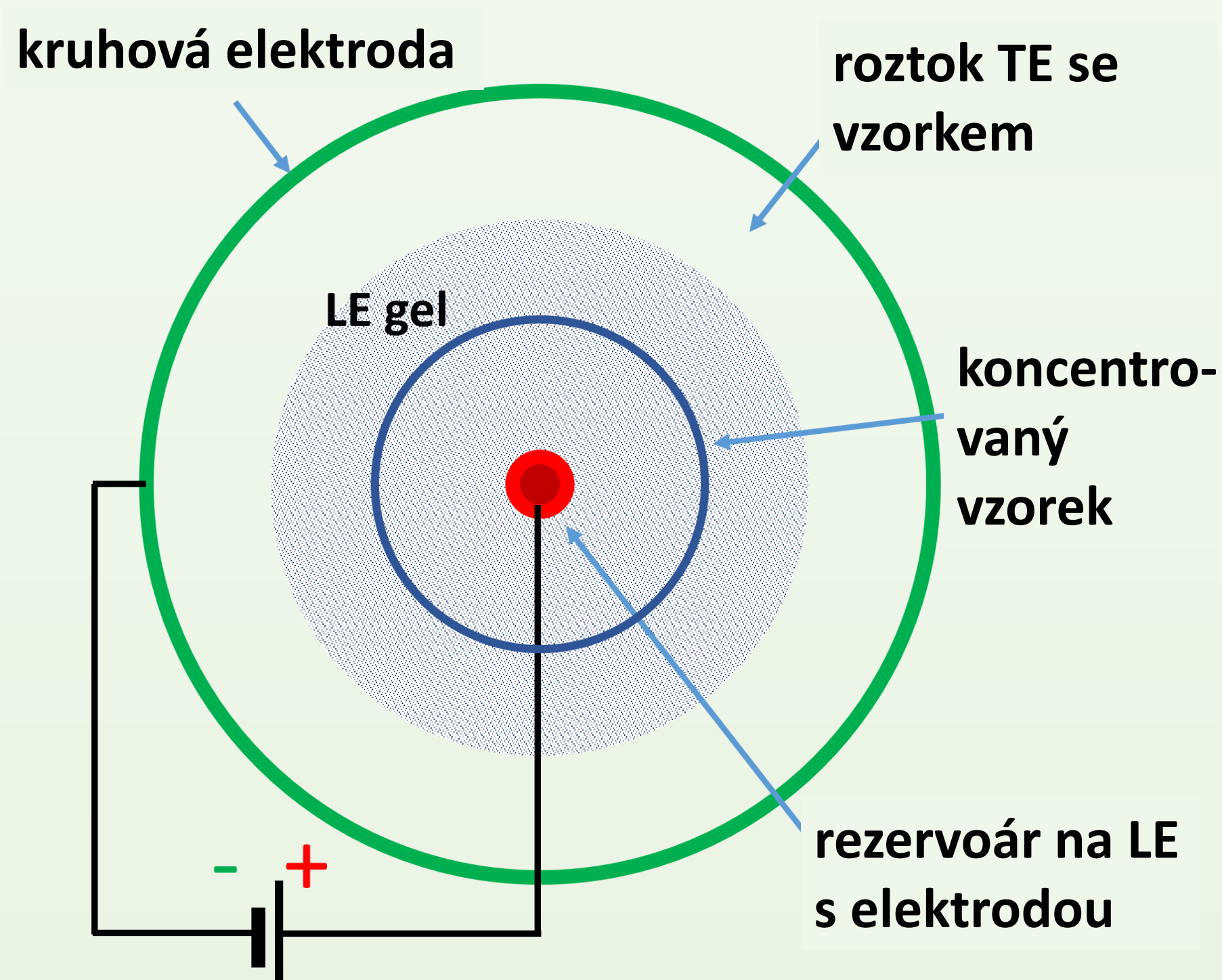
¹ Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 97, Brno

² Roche Sequencing Solutions, Inc., Pleasanton, USA

ÚVOD

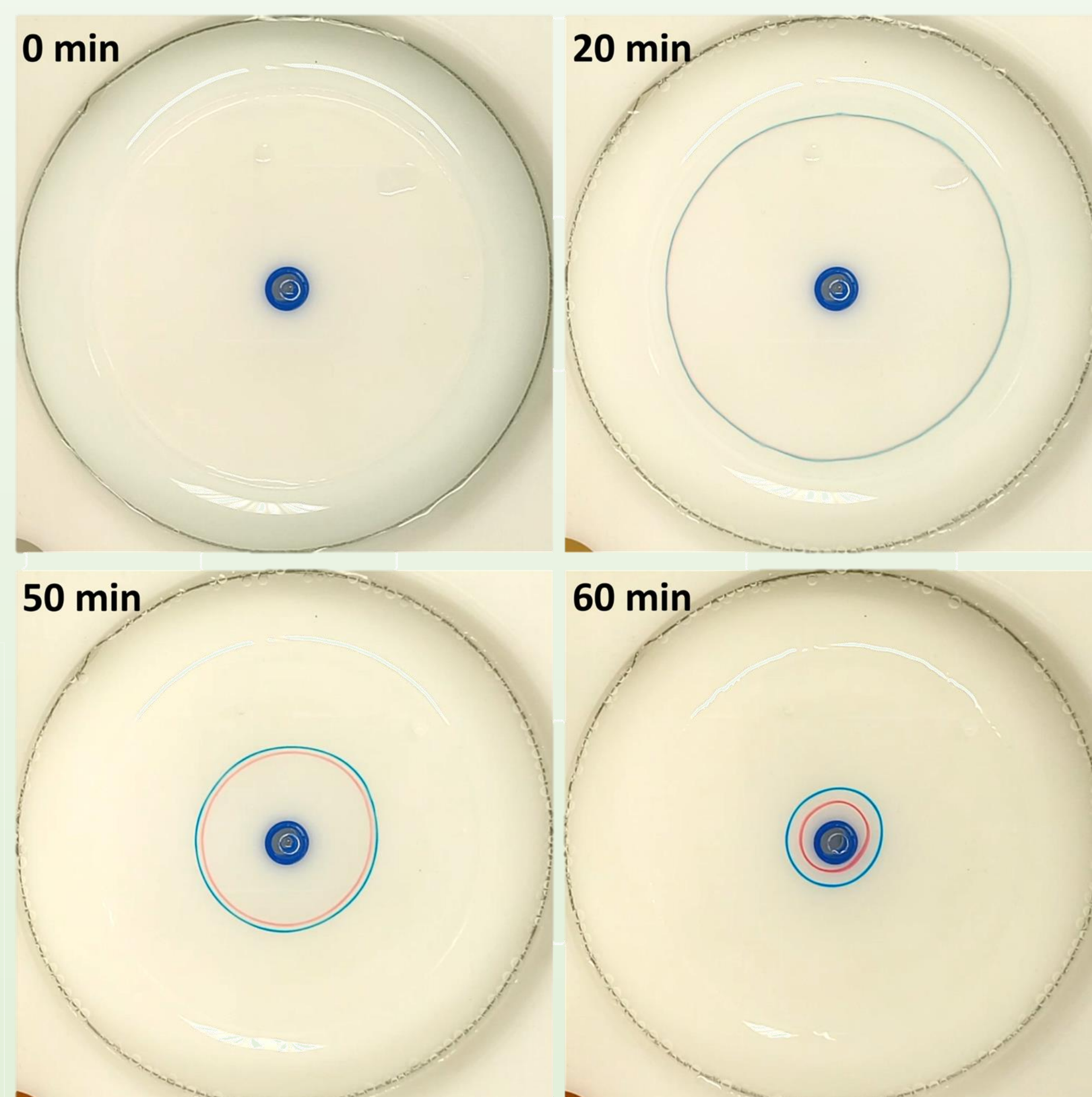
V průběhu posledních let jsou koncentrace a čištění biomolekul jako jsou nukleové kyseliny, bílkoviny, peptidy, metabolity a malé organické ionty ze složitých maticí a velkých objemů vzorků velmi žádané a tím i předmětem intenzivního výzkumu. Izotachoforéza se jeví jako vhodná alternativa k extrakci na pevné fázi. Jedná se o metodu, která umožňuje vysoké výtěžky, je snadno automatizovatelná a šetrná ke vzorku (biologickému materiálu) [1]. Abychom zajistili její použitelnost na velké množství vzorku, vyvinuli jsme nový koncept izotachoforézy, který je založen na kruhovém designu separačního zařízení. Protože v tomto konceptu nejsou dodrženy podmínky pro izotachoforézu (konstantní tloušťka a rychlost zóny) nazvali jsme novou metodu epitachoforéza [2]. Nově vyvinuté zařízení je schopno koncentrovat a separovat vybrané analyty z velkého výchozího objemu vzorku (až 15 ml), vykazuje vysokou výtěžnost (až 80%) a výsledný objem je 200 μ l. Zařízení bylo testováno na DNA, kdy všechny velikosti fragmentů DNA jsou zakonzentrovány v jedné zóně.

SCHÉMA ZAŘÍZENÍ



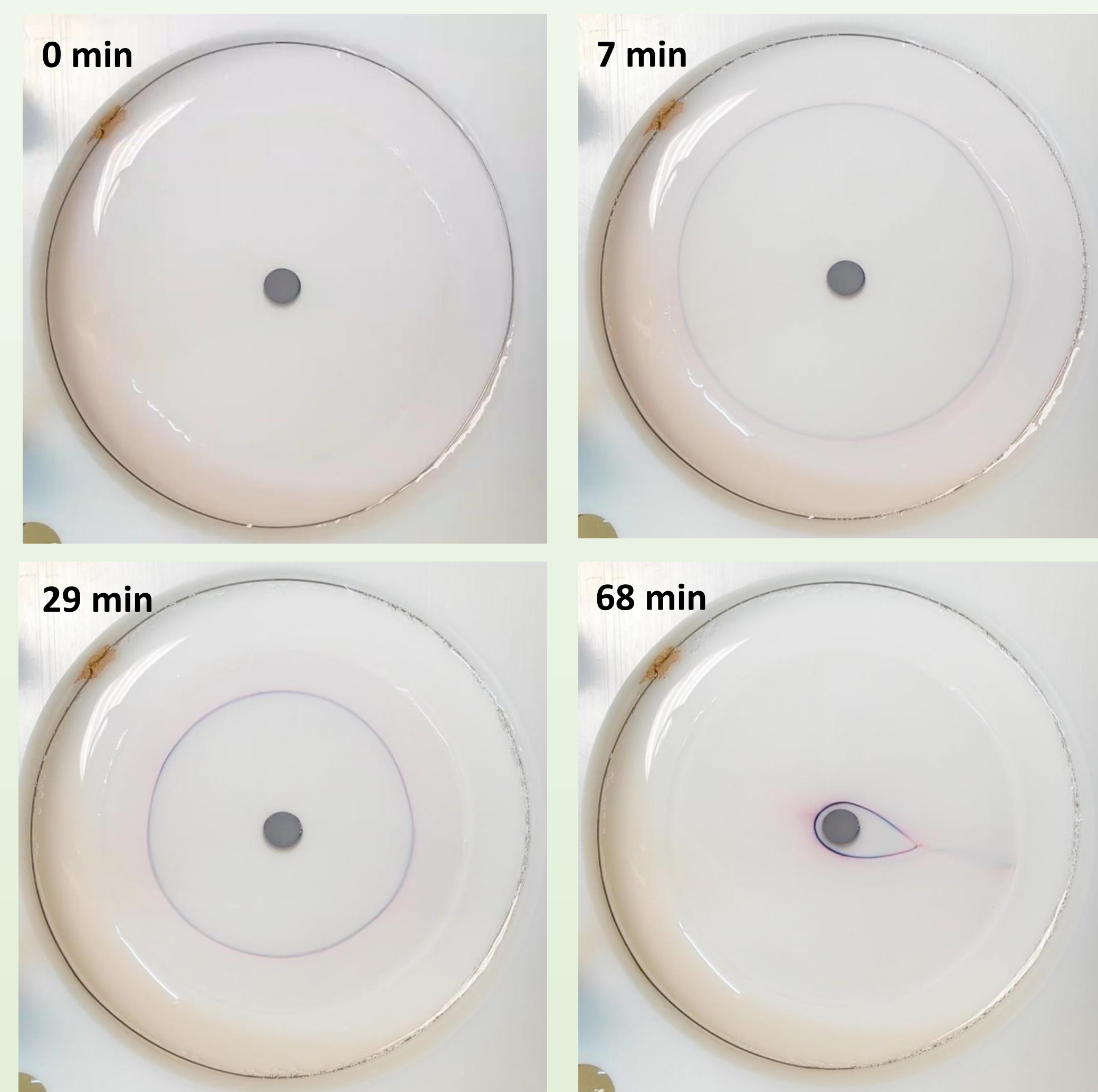
SEPARACE ANIONŮ

LE: 20 ml agarózového gelu 0.3% v 20 mM HCl/HIS 6.2
Vzorek/TE: 100 μ l 0.1 mM SPADNS, 100 μ l 0.1 mM Patentová modř V, 10 μ l 10 mM kyseliny octové a 15 ml 10 mM TAPS/TRIS pH 8.30, konstantní výkon 2 W.



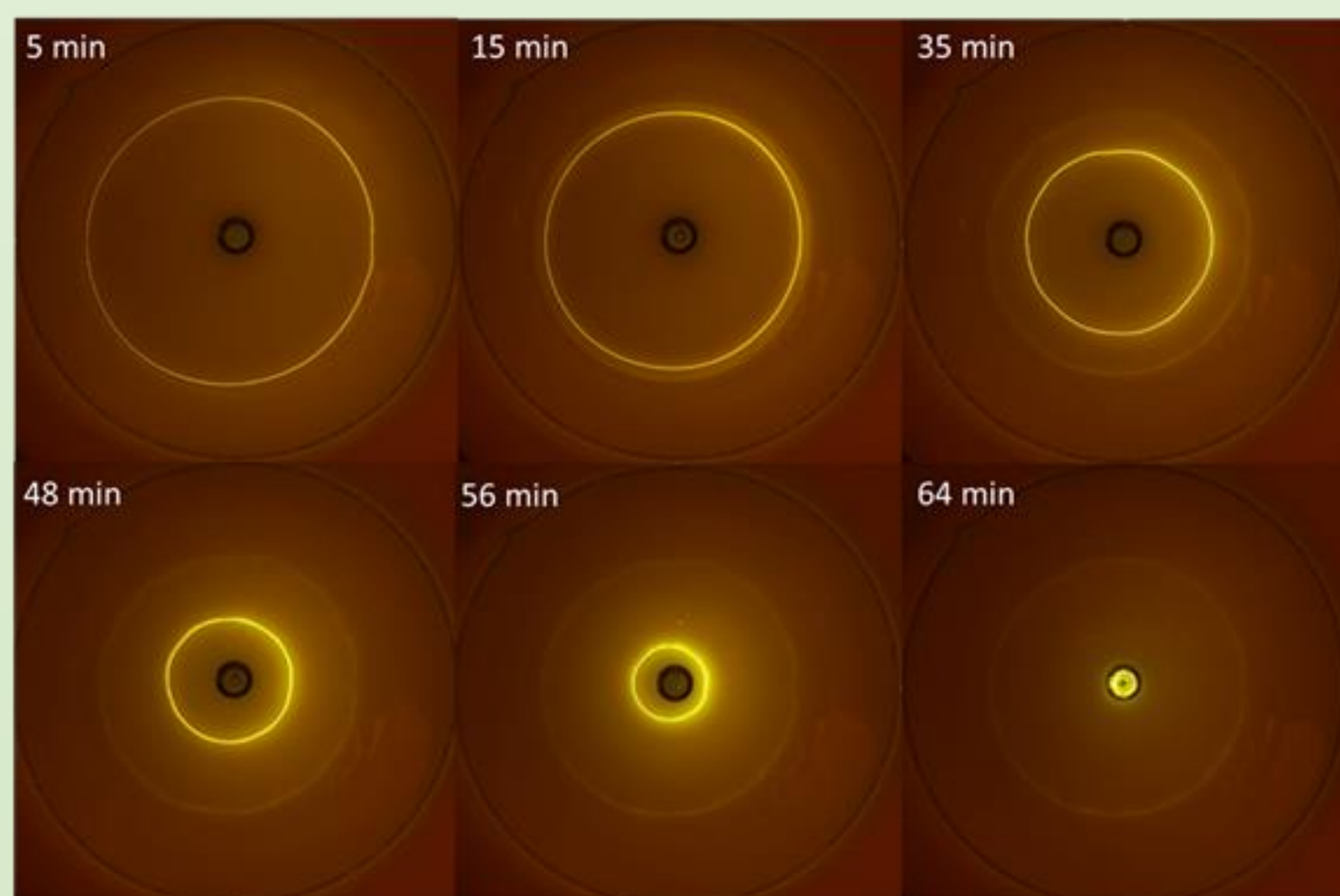
SEPARACE KATIONŮ

LE: 20 ml agarózového gelu 1% v 20 mM $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 5.25
Vzorek/TE: 200 μ l 0.1 mM Safranin O, 25 μ l Metylová zeleň a 15 ml 50 mM HAc, konstantní výkon 6 W.



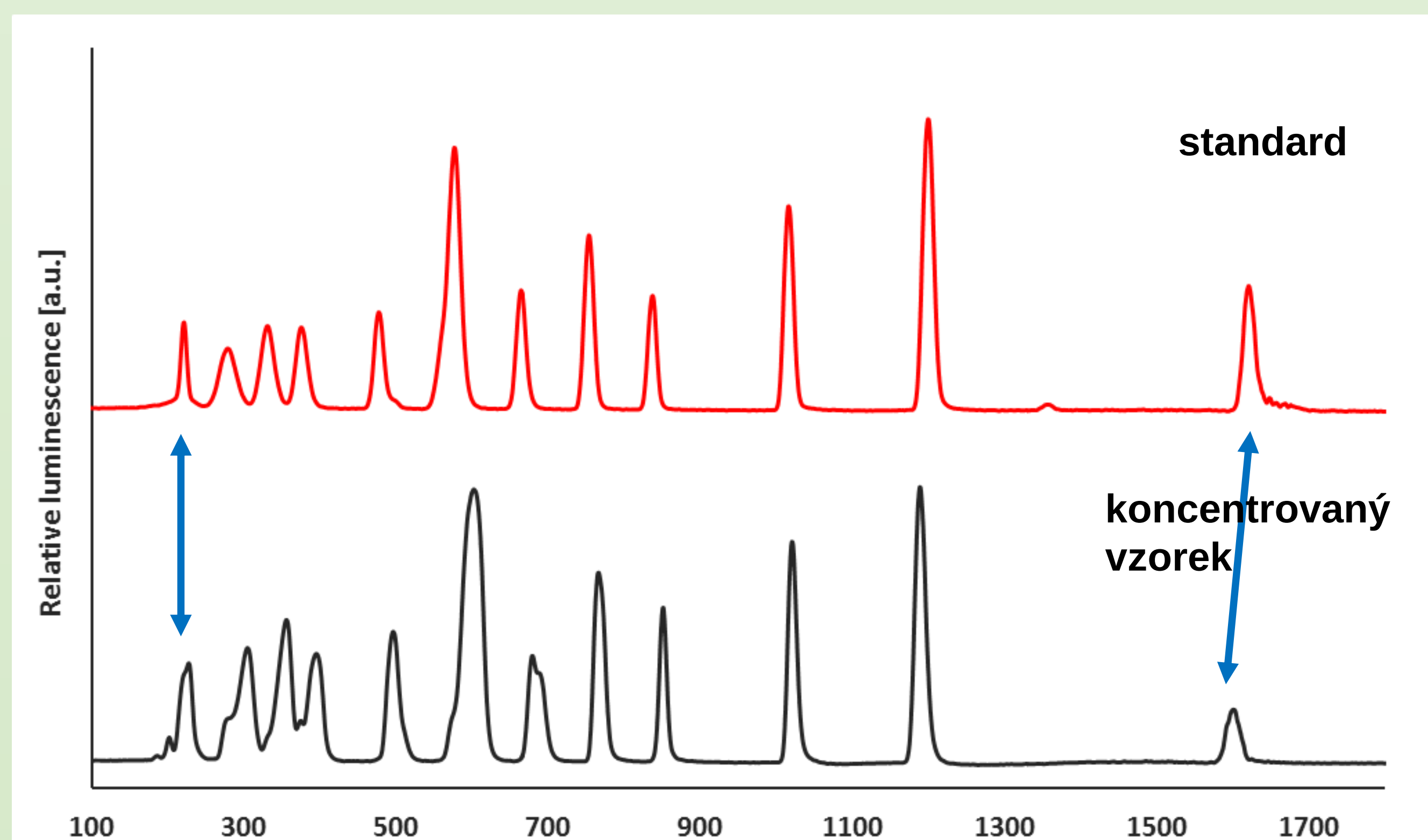
Koncentrace DNA značené SYBRgold

LE: 20 ml agarózového gelu 0.3% v 20 mM HCl/HIS 6.2.
Vzorek/TE: 15 ml 10 mM TAPS/TRIS pH 8.30 + 2.5 μ g DNA žebříku
Konstantní výkon 2 W



Separace DNA pomocí Bioanalyzeru

Standard – 2.5 μ g DNA žebříku rozpuštěného v 200 μ l H_2O
Koncentrovaný vzorek - 2.5 μ g DNA žebříku rozpuštěného v 15 ml TE a zakonzentrovaného pomocí epitachoforézy na 200 μ l



ZÁVĚR

Pomocí nově vyvinutého zařízení jsme schopni separovat, koncentrovat a sbírat ionty z několika mililitrů původního vzorku na několik desítek mikrolitrů. Metodu je možné využívat jak pro koncentraci a separaci kationů, tak i anionů ze vzorků se složitou maticí. Vyvinutou metodu a zařízení je možno použít na velmi široké spektrum analytů od malých iontů po velké biopolymery jako jsou peptidy, proteiny, DNA, polysacharidy a také částice, viry a bakterie. Zde je ukázána koncentrace barviv jak se záporným, tak i kladným nábojem a také vzorku fluorescenčně značené DNA a její následná analýza pomocí elektroforézy na čipu.

LITERATURA

1. Datinská, V., Voráčová, I., Schlecht, U., Berka, J., Foret, F., J. Sep. Sci. 2018, 41, 236-247.
2. Foret, F., Datinská, V., Voráčová, I., Novotný, J., Gheibi, P., Berka, J., Astier, Y., Anal. Chem. 2019, 91, 11, 7047-7053.

PODĚKOVÁNÍ

Tento projekt byl podporován Grantovou agenturou České republiky, projekt P20612G014. Dále byl podporován firmou Roche Sequencing Solutions (Pleasanton, USA) a institucionální podporou RVO 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně, Česká republika. Tento výzkum je součástí projektu CEITEC 2020 (LQ1601) s finanční podporou od Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České republiky v programu Národní program udržitelnosti II.