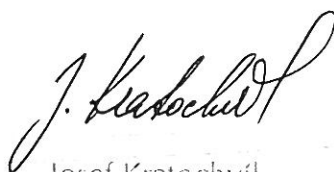




ČESKÁ REPUBLIKA
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ



PATENTOVÁ
LISTINA



Josef Kratochvíl
předseda
Úřadu průmyslového vlastnictví

Úřad průmyslového vlastnictví
udělil podle § 34 odst. 3 zákona č. 527/1990 Sb., v platném znění,

PATENT

číslo

303383

na vynález uvedený v příloženém popisu.



V Praze dne 21.8.2012

Za správnost:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mrva', written in a cursive style.

Ing. Jan Mrva
vedoucí oddělení rejstříků

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-40**
(22) Přihlášeno: **27.01.2011**
(40) Zveřejněno: **22.08.2012**
(Věstník č. 34/2012)
(47) Uděleno: **12.07.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **22.08.2012**
(Věstník č. 34/2012)

(11) Číslo dokumentu.

303 383

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

G01N 27/26 (2006.01)
G01N 27/333 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2009/0218222 A1; CZ PV 2008-494

Sandrine Bronzeau, Nicole Pamme : Simultaneous bioassays in a microfluidic channel on plugs of different magnetic particles, *Analytica Chimica Acta* 609 (2008), str. 105-112; Nicole Pamme, Jan C.T. Eijkel, Andreas Manz : On-chip free-flow magnetophoresis: Separation and detection of mixtures of magnetic particles in continuous flow, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 307 (2006), str. 237-244; Dapeng Wu, Jianhua Qin, Bingcheng Lin : Electrophoretic separations on microfluidic chips : *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008), str. 542-559.

(73) Majitel patentu:

Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ

(72) Původce:

Kizek René Doc. Ing. Ph.D., Bořitov, CZ
Adam Vojtěch RNDr. Ph.D., Brno, CZ
Húska Dalibor Ing., Jihlava, CZ
Ryvolová Markéta Mgr. Ph.D., Karlovy Vary, CZ
Hubálek Jaromír Doc. Ing. Ph.D., Brno, CZ
Provazník Ivo Prof. Ing. Ph.D., Boskovice, CZ

(54) Název vynálezu:

Dvojdímní způsob izolace a analýzy látek z biologických vzorků

(57) Anotace:

Předmětem řešení je způsob izolace a analýzy látek z biologických vzorků pomocí povrchově modifikovaných magnetizovatelných částic a čipové kapilární elektroforézy. Metoda je založena na manipulaci s magnetizovatelnými částicemi přímo v elektroforetickém rezervoáru čipu pro kapilární elektroforézu, kdy se působením vnějšího magnetického pole z biologického vzorku izoluje požadovaný analyt, který se následně separuje, identifikuje a kvantifikuje pomocí čipové kapilární elektroforézy.

Dvojdímenzionální způsob izolace a analýzy látek z biologických vzorků

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu selektivní izolace biomolekul ze složitých biologických vzorků pomocí magnetizovatelných částic v kombinaci s rychlou a jednoduchou analýzou pomocí kapilární elektroforézy.

10

Dosavadní stav techniky

Komplexnost biologických vzorků je základním problémem ztěžujícím stanovení vybraných analytů. Každému stanovení musí předcházet určitá forma extrakčního, separačního nebo izolačního procesu. Metody co nejjednodušší detekce biologicky významných látek z velmi malých objemů vzorku jsou obecně velmi důležité.

Extrakce případně izolace minoritních složek komplikované směsi vede k výrazným ztrátám v objemu vzorku a tento jev představuje významný problém především u vzorků, jejichž získání ve větších objemech může být komplikované (mozkomíšni mok, nádorové výpotky aj.). Současný trend vede k intenzivnímu tlaku na rychlost, jednoduchost a komplexnost analytických metod. S tím souvisí také snaha o miniaturizaci analytických přístrojů, které by umožnily přenositelnost těchto zařízení a jejich použití mimo laboratoř, tedy přímo v místě odběru vzorku (např. v přírodě nebo u lůžka pacienta). Analýza *in situ* urychluje celý analytický proces a snižuje celkové náklady na analýzu.

Podstata vynálezu

Výše uvedené požadavky jsou do značné míry splněny způsobem izolace a analýzy biologicky významných látek podle tohoto vynálezu.

Podstatou vynálezu je dvojdímenzionální způsob izolace a analýzy látek z biologických vzorků, kdy se analyzované látky před zahájením analýzy kapilární elektroforézou izolují pomocí povrchově modifikovaných magnetizovatelných částic (jedna dimenze) v elektroforetickém rezervoáru čipu kapilární elektroforézy, poté se v elektroforetickém rezervoáru čipu pro kapilární elektroforézu působením vnějšího magnetického pole separují od modifikovaných magnetizovatelných částic a teprve pak se provede druhá separace a analýza látek pomocí standardní kapilární elektroforézy v čipovém uspořádání (druhá dimenze).

Izolace pomocí povrchově modifikovaných magnetických částic se provádí přímo v elektroforetickém rezervoáru čipu pro kapilární elektroforézu působením vnějšího magnetického pole, které je realizováno pomocí stacionárního magnetu nebo elektromagnetu. Při tomto způsobu je možné využít velmi malého objemu snadno dostupného vzorku, jako jsou veškeré typy tělních tekutin (krev, krevní sérum, mozkomíšni mok, pot, moč, nádorové výpotky).

Způsob podle vynálezu integruje proces izolace látek pomocí magnetizovatelných částic s povrchem selektivně modifikovaným pro studovaný analyt a identifikaci analyzovaných látek pomocí kapilární gelové elektroforézy v mikrofluidním uspořádání. Magnetizovatelné částice s povrchem selektivně modifikovaným pro záchyt proteinů, nukleových kyselin nebo dalších analytů, umístěné do rezervoáru komerčního mikrofluidního čipu specifického pro určitý analyt slouží jako extrakční fáze s velkým povrchem, a tím také s vysokou extrakční kapacitou. Kapilární elektroforéza optimalizovaná pro analýzu specifického analytu následně poskytuje informace nejen o koncentraci sledované látky, ale například i čistotě, velikost molekul a dalších parametrech.

55

Ve výhodném uspořádání se využívá komerčně dodávaného elektroforetického čipu, v jehož rezervoáru je prováděna izolace sledované látky (nukleové kyseliny, proteinu) pomocí modifikovaných magnetizovatelných částic. Pro manipulaci s magnetizovatelnými částicemi se ve výhodném uspořádání používá vnějšího magnetického pole, jehož zdroj je umístěn pod elektroforetickým čipem. Alternativní možností je využití tubulárního magnetu vkládaného do rezervoáru elektroforetického čipu. Magnetické pole lze realizovat buď pomocí stacionárního magnetu požadované velikosti, nebo elektromagnetu. Po ukončení promývacích procesů spojených s izolací je možné „odpadní“ (nebo použité) magnetické částice v rezervoáru ponechat, protože nedochází k jejich migraci separačním kanálem, a tím rušení procesu stanovení, případně je lze odstranit pomocí z miněného tubulárního magnetu.

Pojem „povrchově modifikované magnetizovatelné částice“ zahrnuje částic vyrobené z magnetických materiálů (např. Fe_2O_3 , Fe_3O_4 aj.) o rozměrech v řádu nano- nebo mikrometrů modifikované látkou schopnou interagovat s analytem (např. protilátka, oligonukleotidová komplementární sekvence, aj.).

Pojem „rezervoár elektroforetického čipu“ pojmenovává prostor na elektroforetickém čipu, který je určen k nanášení roztoků. Jde o miniaturní nádobku, která je součástí plastového pláště čipu a vymezuje vstupy do jednotlivých kanálů v čipu.

Pojem „tubulární magnet“ pojmenovává magnet tyčinkovitého tvaru o rozměrech vhodných pro vsunutí do rezervoáru elektroforetického čipu.

Pojem „elektromagnet“ pojmenovává magnet tyčinkovitého tvaru o rozměrech vhodných pro vsunutí do rezervoáru elektroforetického čipu, jehož magnetické vlastnosti jsou ovládány pomocí průchodu elektrického proudu.

Základní postup izolace biomolekul pomocí magnetizovatelných částic je uveden na obr. 1. Ve zkumavce (a) je homogenát vzorku, do kterého byly přidány magnetizovatelné částice. Při procesu zvaném hybridizace (interakce dvou vláken nukleových kyselin), konjugace (protein-protein interakce) či dalších fyzikálně-chemických interakcích (adsorpce, iontová interakce) dochází k navázání konkrétních biomolekul (DNA, RNA, proteiny) na specificky modifikovaný povrch magnetizovatelných částic (b), který je upraven podle druhu izolovaných molekul. Například pro izolaci nukleové kyseliny je povrch magnetizovatelných částic modifikován řetězcem komplementárním k hledané sekvenci nebo řetězcem tvořeným repetitivní sekvencí (oligo dT, oligo G apod.). Při izolaci proteinů se používá modifikace streptavidinem, avidinem, neutravidinem, proteiny G, A, polymerními sloučeninami nebo například protilátkami (monoklonální, polyklonální). Konjugované složky při hybridizaci bývají pro výslednou detekci biologické interakce značené; nejčastěji technologicky využívané způsoby značení zahrnují streptavidin-biotin nebo avidin-biotin, neutravidin-biotin apod. Poté následuje promytí magnetizovatelných částic s již navázanými molekulami, při kterém se odstraní ostatní interferující látky (c). Oddělení izolovaných biomolekul od magnetizovatelných částic se docílí zvýšením teploty (d), změnou iontové síly, změnou složení elučního roztoku či dalšími fyzikálně-chemickými změnami prostředí, ve kterém hybridizace probíhá (e). Po oddělení izolovaných biomolekul se magnetizovatelné částice přitáhnou magnetem a cílové biomolekuly se odpipetují do nové zkumavky (f). Takto separované biomolekuly jsou připraveny pro další analýzu.

Předmětem vynálezu je spojení principu izolace biomolekul pomocí magnetizovatelných částic se separací a následnou analýzou pomocí čipové kapilární elektroforézy (obr. 2). Schematické znázornění komerčně dodávaného čipu je uvedeno v části (A). K tomuto čipu je připojen magnet, umožňující práci s magnetizovatelnými částicemi přímo v čipu (A), (B). Obrázek (C) ukazuje princip separace pomocí magnetizovatelných částic, homogenát s cílovými biomolekulami, interakci částic s cílovou skupinou biomolekul, promytí a odstranění interferujících látek, denaturaci a následnou separaci ve spojení s detekcí cílových biomolekul pomocí čipové kapilární elektroforézy.

Možnosti manipulace s magnetickými částicemi v jamce elektroforetického čipu jsou znázorněny na obr. 3. Částice je možné přidržet na dně jamky pomocí planárního magnetu umístěného pod čipem (obr. 3A), případně lze částice z jamky vyjmout pomocí tenkého tubulárního magnetického mechanismu (obr. 3B, 3C). Přesná manipulace s čipem podél os x a y, stejně jako manipulace s magnetickým separátorem v ose z, je v ideálním případě zajištěna pomocí 3D mikromanipulátoru. Realizace magnetického separátoru je možná pomocí permanentního magnetu o vhodném tvaru a rozměrech nebo pomocí elektromagnetu.

Kapilární elektroforéza pomocí jakéhokoli čipu poskytuje informace nejen o koncentraci sledované látky, ale násobí separační potenciál předkládaného patentu o druhou dimenzi, tzn. izolované molekuly pomocí magnetických částic jsou dále rozlišeny dle velikosti a stanovena jejich koncentrace podle určení daného čipu. Způsob podle vynálezu umožňuje rozšířit možnosti běžně dostupných čipů kapilární elektroforézy na efektivní, snadnou a rychlou izolaci a analýzu látek z velmi malých objemů biologických vzorků i mimo laboratoř bez nutnosti specializovaných separačních kanálů s magnety.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: Postup izolace biomolekul pomocí magnetizovatelných částic

Obr. 2: Izolace biomolekul pomocí magnetizovatelných částic ve spojení s čipovou kapilární elektroforézou

Obr. 3: Možnosti manipulace s magnetickými částicemi

Vynález bude podrobněji popsán pomocí příkladu provedení a přiložených obrázků. Uvedený příklad není omezující z hlediska dalších možných provedení v rozsahu patentových nároků.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

Izolace oligonukleotidů specifických pro virus žloutenky typu B

Streptavidinem modifikované magnetické částice byly konjugovány s biotinem značeným oligonukleotidem (HBV) komplementárním k hledanému oligonukleotidu specifickému pro virus žloutenky typu B.

Příprava magnetizovatelných částic k hybridizaci mimo čip v mikrozkuhavce

Magnetizovatelné částice v nativním roztoku se odebraly v objemu 110 μ l, umístily se do mikrozkuhavky, mikrozkuhavka se přiložila k magnetu a nativní roztok se odsál. Přidalo se 200 μ l promývacího roztoku (50 mM HEPES), roztok se pipetou 5x promíchal, přiložil k magnetu a promývací roztok se odsál.

HBV oligonukleotid značený biotinem se rozpustil v 2 M NaCl roztoku na výslednou koncentraci 5 μ g/ml a přidal se k promytým částicím. Mikrozkuhavka se vložila do termostatu a třepala se 30 min při 1100 rpm a teplotě 25 $^{\circ}$ C. Pak se přenesla na magnet, 2 M roztok NaCl s HBV oligonukleotidem se odsál 3x promyl 50 mM roztokem HEPES, po posledním promytí se roztok odstranil, takže v mikrozkuhavce zůstaly pouze HBV oligonukleotidem modifikované magnetizovatelné částice.

K promytým modifikovaným magnetizovatelným částicím v mikrozkumavce s HBV oligonukleotidem se přidalo 110 μl hybridizačního roztoku (100 mM Na_2HPO_4 , 100 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl a 0,15 M Tris-báze s upraveným $\text{pH} = 7,5$).

Vlastní izolace a analýza cílových molekul na čipu

Do každé z 11 jamek na čipu, určených pro vzorky, se napipetovalo 6 μl připravených částic na hybridizaci a do každé jamky se napipetovalo maximálně 5 μl vzorku. Vzorek s magnetizovatelnými částicemi se pipetou 5x promíchal.

Celý čip s napipetovanými vzorky se překryl parafilmem a umístil do termostatu a třepal se 10 min při 600 rpm a teplotě 25 °C. Čip se pak umístil na 30 až 60 s na magnet (viz obr. 2A), až se magnetizovatelné částice přitáhly k magnetu, opatrně se odsál roztok nad částicemi a přidalo se 10 μl promývacího roztoku (50 mM HEPES). Poté se čip odstranil z dosahu magnetu a vzorek s promývacím roztokem v jednotlivých jamkách se 5x promíchal pipetou. Promývání se třikrát zopakovalo, při posledním promytí se promývací roztok odsál a čip se ponechal na magnetu.

Do jednotlivých jamek se přidalo 10 μl 50 mM HEPES, čip se překryl parafinem, umístil na termostat a třepal se 10 min při 600 rpm a teplotě 85 °C. Po uvolnění vzorku z magnetických částic (eluci) se čip okamžitě umístil na magnet a led. Analýza vzorků pomocí kapilární čipové elektroforézy se provedla podle návodu dodávaného k vlastnímu čipu a kapilární čipové elektroforéze a spustila se analýza. Pomocí streptavidinem modifikovaných magnetických částic se takto přímo v elektroforetickém čipu izoloval hledaný biotinem značený HBV oligonukleotid, který se následně analyzoval kapilární elektroforézou. Pomocí softwaru dodávaného k čipu se vyhodnotily vzorky a získala se informace o množství oligonukleotidů specifických pro virus žloutenky typu B, jejich čistotě a také velikosti oligonukleotidového fragmentu.

Průmyslová využitelnost

Dvojdímenzionální způsob izolace a analýzy látek v čipovém uspořádání kapilární elektroforézy umožňuje současně izolaci biologicky významných molekul z biologických vzorků i analýzu na jednom zařízení. Při tomto způsobu izolace analytu pomocí povrchově modifikovaných magnetizovatelných částic nevznikají ztráty odebraného biologického vzorku. Způsob podle vynálezu umožňuje rozšířit možnosti běžně dostupných čipů kapilární elektroforézy na efektivní, snadnou a rychlou izolaci a analýzu látek z velmi malých objemů biologických vzorků i mimo laboratoř bez nutnosti specializovaných separačních kanálů s magnety.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Dvojdímenzionální způsob izolace a analýzy látek z biologických vzorků, **v y z n a ě u j í - c í s e t í m**, že analyzované látky se před zahájením analýzy kapilární elektroforézou izolují pomocí povrchově modifikovaných magnetizovatelných částic v elektroforetickém rezervoáru čipu kapilární elektroforézy, poté se v elektroforetickém rezervoáru čipu pro kapilární elektroforézu působením vnějšího magnetického pole separují od modifikovaných magnetizovatelných částic a teprve pak se provede druhá separace látek a analýza pomocí standardní kapilární elektroforézy v čipovém uspořádání.

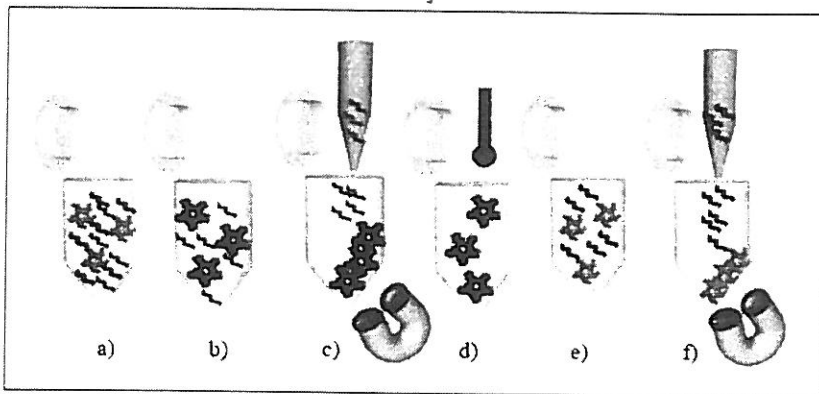
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že magnetické pole je realizováno pomocí stacionárního magnetu nebo elektromagnetu.

3. Způsob podle nároků 1 a 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že magnetizovatelné částice jsou paramagnetické mikro- nebo nanočástice.

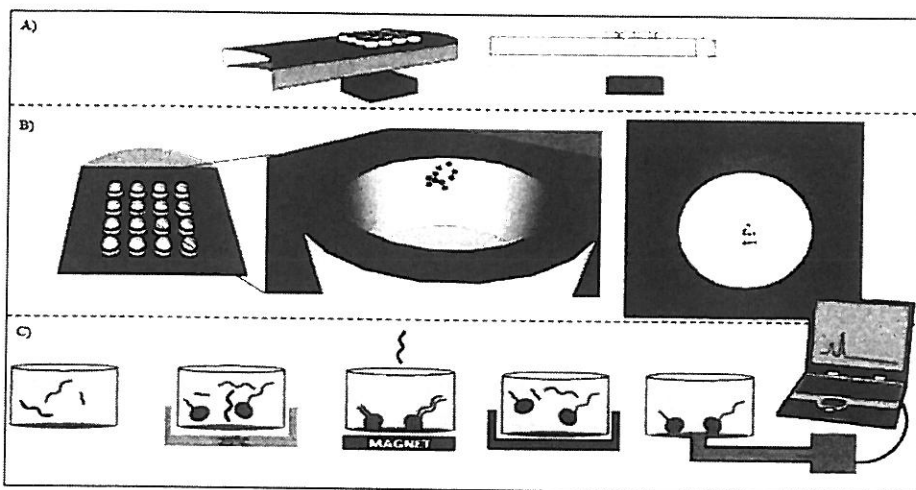
5

1 výkres

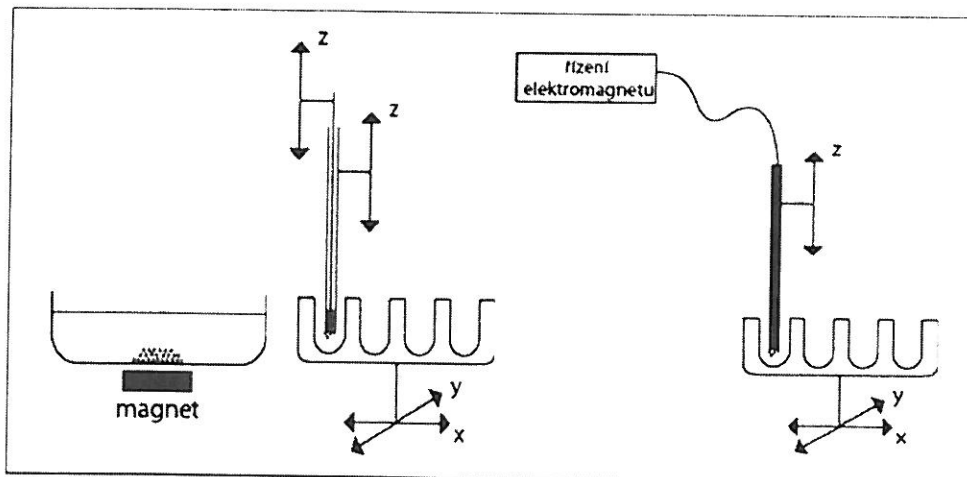
30U



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Konec dokumentu