

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 23748

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011 - 23910**

(22) Přihlášeno: **09.02.2011**

(47) Zapsáno: **10.05.2012**

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**G01N 27/447** (2006.01)

**G01N 27/26** (2006.01)

**B01D 57/02** (2006.01)

(73) Majitel:

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 užitého vzoru:

**Sestava pro selektivní izolaci a analýzu látek z biologických vzorků**

CZ 23748 U1

## Sestava pro selektivní izolaci a analýzu látek z biologických vzorků

### Oblast techniky

Technické řešení se týká sestavy pro selektivní izolaci a analýzu látek z biologických vzorků, jehož součástí je zařízení pro čipovou kapilární elektroforézu.

### 5 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.

- 10 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
- 15 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 technického řešení

- 20 Výše uvedené požadavky do značné míry splňuje sestava pro selektivní izolaci a analýzu látek z biologických vzorků podle technického řešení.

Podstatou technického řešení je sestava pro izolaci a analýzu látek z biologických vzorků, jehož součástí je zařízení pro čipovou kapilární elektroforézu. Toto zařízení zahrnuje elektroforetický čip s rezervoáry obsahujícími povrchově modifikované magnetizovatelné částice, přičemž je elektroforetický čip ve spojení s magnetem.

- 25 Izolace pomocí povrchově modifikovaných magnetických částic se provádí přímo v rezervoáru elektroforetického 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).

- 30 Sestava podle technického řešení umožňuje izolaci 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 v rezervoáru komerčního mikrofluidního čipu 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
- 35 látky, ale například i čistotě a dalších parametrech.

- 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
- 45 je možné „odpadní“ (neboli použité) magnetické částice v rezervoáru ponechat, protože nedochá-

zi k jejich migraci separačním kanálem a tím rušení procesu stanovení, případně je lze odstranit pomocí zmíněného tubulárního magnetu.

Pojem „povrchově modifikované magnetizovatelné částice“ zahrnuje částice vyrobené z magnetických materiálů (např.  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  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.

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

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

### 15 Přehled obrázků na výkrese

Obr. 1: Princip izolace biomolekul z homogenátu vzorku pomocí magnetizovatelných částic a magnetu.

Obr. 2: Izolace biomolekul z homogenátu vzorku pomocí magnetizovatelných částic v zařízení pro čipovou kapilární elektroforézu.

20 Obr. 3: Možnosti manipulace s magnetizovatelnými částicemi pomocí planárního, tubulárního magnetu nebo elektromagnetu.

Technické řešení bude podrobněji popsáno pomocí příkladu provedení a přiložených obrázků. Uvedený příklad není omezující z hlediska dalších možných provedení v rozsahu nároků na ochranu.

### 25 Příklady provedení technického řešení

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.

45 Předmětem technického řešení je sestava umožňující izolaci biomolekul pomocí magnetizovatelných částic i analýzu 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.

#### Příklad 1

Izolace oligonukleotidů specifických pro virus žloutenky typu B s využitím sestavy podle technického řešení

Streptavidinem modifikované magnetizovatelné částice 1 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  $\mu$ l, umístily se do mikrozkuhavky, mikrozkuhavka se přiložila k magnetu 5 a nativní roztok se odsál. Přidalo se 200  $\mu$ l promývacího roztoku (50 mM HEPES), roztok se pipetou 5x promíchal, přiložil k magnetu 5 a promývací roztok se odsál.

HBV oligonukleotid značený biotinem se rozpustil v 2 M NaCl roztoku na výslednou koncentraci 5  $\mu$ g/ml a přidalo se k promývaným částicím. Mikrozkuhavka se vložila do termostatu a třepala se 30 min při 1100 rpm a teplotě 25 °C. Pak se přenesla na magnet 5, 2 M roztok NaCl s HBV oligonukleotidem se odsál a 3x promyl 50 mM roztokem HEPES, po posledním promytí se roztok odstranil, takže v mikrozkuhavce zůstaly pouze HBV oligonukleotidem modifikované magnetizovatelné částice 1.

K promývaným modifikovaným magnetizovatelným částicím 1 v mikrozkuhavce s HBV oligonukleotidem se přidalo 110  $\mu$ l hybridizačního roztoku (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl a 0,15 M Tris-base s upraveným pH = 7,5).

Vlastní izolace a analýza cílových molekul na elektroforetickém čipu

Do každého z 11 rezervoárů 4 elektroforetického čipu, určených pro vzorky, se napipetovalo 6  $\mu$ l připravených modifikovaných magnetizovatelných částic 1 na hybridizaci (obr. 2B) a do každého rezervoáru 4 elektroforetického čipu se napipetovalo maximálně 5  $\mu$ l homogenátu 2 vzorku (obr. 2C). Homogenát 2 vzorku s modifikovanými magnetizovatelnými částicemi 1 se pipetou 5x promíchal.

Celý elektroforetický čip 3 s napipetovanými vzorky (obr. 2C) se překryl parafilmem a umístil do termostatu a třepal se 10 min při 600 rpm a teplotě 25 °C. Elektroforetický čip 3 se pak umístil na 30 - 60 s na magnet 5 (obr. 2A), až se modifikované magnetizovatelné částice 1 přitáhly k magnetu 5, opatrně se odsál roztok nad částicemi a přidalo se 10  $\mu$ l promývacího roztoku (50 mM HEPES). Poté se elektroforetický čip 3 odstranil z dosahu magnetu 5 a vzorek s promývacím roztokem v jednotlivých jamkách se 5x promíchal pipetou. Promývání se třikrát zopakovalo, při posledním promytí se promývací roztok odsál a elektroforetický čip 3 se ponechal na magnetu 5.

Do jednotlivých rezervoárů 4 elektroforetického čipu (obr. 2B) se přidalo 10 µl 50 mM HEPES, elektroforetický čip 3 se překryl parafínem, umístil na termostat a třepal se 10 min při 600 rpm a teplotě 85 °C. Po uvolnění vzorku z modifikovaných magnetizovatelných částic 1 (eluci) se elektroforetický čip 3 okamžitě umístil na magnet 5 a led. Analýza vzorků pomocí vyhodnocovacího zařízení 8 kapilární čipové elektroforézy se provedla podle návodu dodávaného k vlastnímu elektroforetickému čipu 3 a kapilární čipové elektroforéze a spustila se analýza. Pomocí streptavidinem modifikovaných magnetizovatelných částic 1 se takto přímo v elektroforetickém čipu 3 izoloval hledaný biotinem značený HBV oligonukleotid, který se následně analyzoval zařízením kapilární elektroforézy. Pomocí softwaru dodávaného k elektroforetickému čipu 3 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

Sestava pro selektivní izolaci a analýzu látek z biologických vzorků zahrnující zařízení pro čipovou kapilární elektroforézu s rezervoárem elektroforetického čipu, obsahujícím povrchově modifikované magnetizovatelné částice ve spojení s magnetem umožňuje současně izolaci biologicky významných molekul z biologických vzorků pomocí povrchově modifikovaných magnetizovatelných částic i analýzu na jednom zařízení. Při tomto způsobu izolace analytu nevznikají ztráty odebraného biologického vzorku. Sestava podle technického řešení umožňuje efektivní, snadnou a rychlou izolaci a analýzu látek z velmi malých objemů biologických vzorků i mimo laboratoř.

20

## N Á R O K Y   N A   O C H R A N U

25

1. Sestava pro izolaci a analýzu látek z biologických vzorků, jehož součástí je zařízení pro čipovou kapilární elektroforézu, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zařízení pro čipovou kapilární elektroforézu zahrnuje elektroforetický čip (3) s rezervoáry (4) obsahujícími povrchově modifikované magnetizovatelné částice (1), přičemž je elektroforetický čip (3) ve spojení s magnetem (5).

2. Sestava podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že magnet (5) je v podobě stacionárního magnetu nebo elektromagnetu.

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

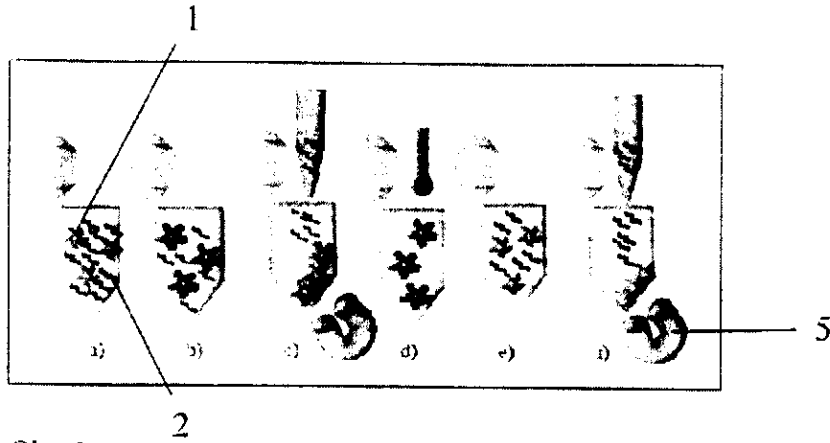
30

1 výkres

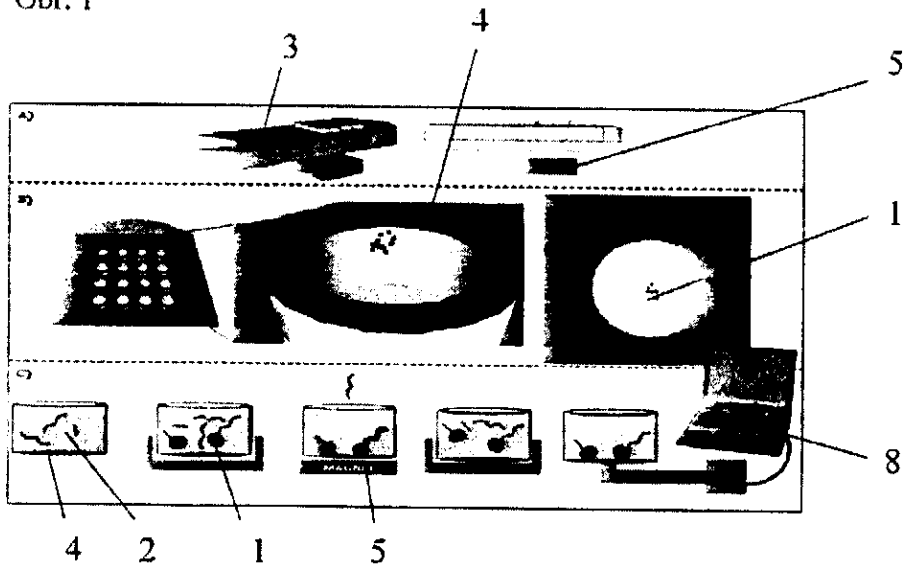
#### Seznam vztahových značek:

- 1- modifikované magnetizovatelné částice
- 2 - homogenát vzorku
- 3- elektroforetický čip
- 4- rezervoár elektroforetického čipu
- 5 - magnet
- 6- elektromagnet
- 7- ovládání elektromagnetu
- 8- vyhodnocovací zařízení.

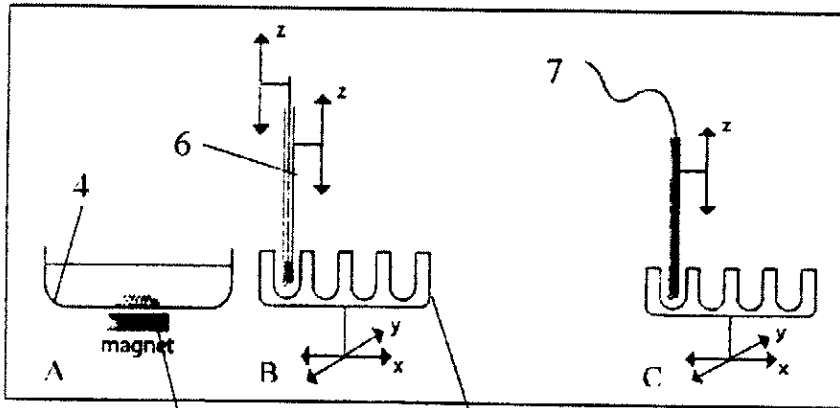
40



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Konec dokumentu