

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Alžběta Kavková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

APLIKACE MIKROFLUIDNÍHO ZAŘÍZENÍ V KOMBINACI
S MAGNETICKÝMI ČÁSTICEMI V BIOANALÝZE

Bc. Alžběta Kavková

Diplomová práce
2019

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

APPLYING A MICROFLUIDIC DEVICE IN COMBINATION
WITH MAGNETIC PARTICLES IN BIOANALYSIS

Bc. Alžběta Kavková

Diploma thesis
2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alžběta Kavková**
Osobní číslo: **C17444**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Aplikace mikrofluidního zařízení v kombinaci s magnetickými částicemi v bioanalýze**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

- Teoretický úvod pro mikrofluidní systémy - zařízení, vlastnosti, výroba a využití mikročipů, regulace tlaku a průtoku.
- Rešerše na mikročipové aplikace s magnetickými částicemi.
- Kapitola o magnetických mikro a nanočásticích, současný stav technologií.
- Imuno- a afinitní chromatografické aplikace s využitím magnetických částic, mikročipů.

Experimentální část:

- Sestavení vhodného schématu pro využití mikrofluidních pump a ventilů pro bioanalytické aplikace ve vybraném mikrofluidním čipu.
- Experimenty optimalizace kontroly průtoku (s barevnými roztoky).
- Experimenty s magnetickými částicemi, jejich zavádění do mikrofluidních systémů.
- Zavedení a využití mikrofluidního zařízení pro aplikace využívající magnetické mikro/nanočástice a specifické interakce biomolekul za použití modelového systému (proti-látky, proteiny, peptidy...). Porovnání zde zavedených metod se standardním vsádkovým uspořádáním.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Rudolf Kupčík**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....

Alžběta Kavková

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Rudolfovi Kupčíkovi, za jeho trpělivost, nápady a pomoc při řešení úkolů spjatých s experimentální částí mé práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu v průběhu celého studia.

Anotace:

Tato diplomová práce se zabývá využitím nových trendů v oblasti mikrofluidiky a současně využitím magnetických mikro- a nanočástic v bioanalytických aplikacích. Cílem práce bylo sestavení vhodného schématu pro využití mikrofluidních pump a ventilů pro aplikace ve vybraném mikrofluidním čipu a dále porovnat funkčnost provedení analýz v mikrofluidním systému se standardním vsádkovým uspořádáním.

Testovány byly tři bioanalytické aplikace. Štěpení α -kaseinu trypsinem navázaným na magnetických částicích. Fosforylace peptidového substrátu, na jehož základě byla dále testována operační stabilita použitého nosiče, a izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů. Všechny uváděné aplikace byly úspěšně převedeny do mikrofluidního uspořádání.

Klíčová slova:

mikrofluidika, magnetické částice, interakce enzym-substrát, imunoafinitní chromatografie, lab-on-chip

Annotation:

This thesis focuses on new trends in microfluidics and current use of magnetic micro- and nanoparticles in bioanalytical applications. The aim of the work was to set and optimize the microfluidic system, pumps and valves for applications in a selected microfluidic chip and compare the accomplishment of the analysis in a microfluidics system with a standard batch arrangement.

Three bioanalytical applications were tested. Cleavage of α -casein by trypsin immobilized on magnetic particles. Phosphorylation of the peptide substrate and ovalbumin isolation from the protein standard. All reported applications have been successfully converted for use in a microfluidic system.

Keywords:

microfluidics, magnetics particles, enzyme-substrate interaction, immunoaffinity chromatography, lab-on-chip

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 MIKROFLUIDIKA.....	13
1.1.1 Vývoj a aplikace	14
1.1.2 Výroba mikrofluidních čipů.....	16
1.1.3 Fyzikální jevy v mikrofluidice.....	18
1.1.4 Mikropumpy	20
1.1.5 Současný stav technologií.....	21
1.2 MAGNETICKÉ MIKRO- A NANOČÁSTICE	25
1.2.1 Magnetické vlastnosti	26
1.2.2 Funkcionalizace a stabilizace povrchu magnetických částic	27
1.2.3 Mikročipové aplikace s magnetickými částicemi	28
1.3 IMUNOAFINITNÍ A AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE.....	30
1.3.1 Využití afinitních chromatografie.....	34
1.3.2 Imunoafinitní chromatografie	34
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	35
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	36
3.2 DISKONTINUÁLNÍ ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (SDS-PAGE)	37
3.2.1 Tris-tricin-SDS-PAGE.....	39
3.3 ANALÝZA VZORKŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	40
3.3.1 Odsolení a aplikace vzorků pro analýzu pomocí MALDI LTQ Orbitrap XL	40
3.4 ZAVÁDĚNÍ MAGNETICKÝCH ČÁSTIC DO MIKROFLUIDNÍHO SYSTÉMU	41
3.5 ŠTĚPENÍ α -KASEINU TPCK - TRYPSINEM A POROVNÁNÍ VSÁDKOVÉHO A MIKROFLUIDNÍHO USPOŘÁDÁNÍ.....	42
3.5.1 Imobilizace trypsinu na magnetické částice	42
3.5.2 Stanovení aktivity TPCK-trypsinu imobilizovaného na magnetických částicích	44
3.5.3 Štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem ve vsádkovém uspořádání.....	45
3.5.4 Štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem v mikročipovém uspořádání	46
3.6 FOSFORYLACE PEPTIDOVÉHO SUBSTRÁTU A ZAVEDENÍ AUTOMATICKÉHO TESTOVÁNÍ OPERAČNÍ STABILITY IMOBILIZOVANÉ KINÁZY.....	47
3.6.1 Imobilizace proteinkinázy A na magnetické částice s -COOH funkční skupinou	47
3.6.2 Fosforylace peptidového substrátu ve vsádkovém uspořádání.....	48
3.6.3 Fosforylace peptidového substrátu v mikročipovém uspořádání a operační stabilita	49
3.7 IZOLACE OVALBUMINU ZE STANDARDNÍ SMĚSI PROTEINŮ	50
3.7.1 Imobilizace anti-ovalbuminových protilátek na magnetické mikročástice s -COOH funkční skupinou.....	50
3.7.2 Vsádková izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinu pomocí specifického imun sorbentu 51	
3.7.3 Mikrofluidní izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů pomocí specifického imun sorbentu.....	52
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	54
4.1 SESTAVENÍ VHDNÉHO SCHÉMATU PRO VYUŽITÍ MIKROFLUIDNÍCH PUMP A VENTILŮ PRO BIOANALYTICKÉ APLIKACE VE VYBRANÉM MIKROFLUIDNÍM ČIPU	54
4.1.1 Experimenty s barevnými roztoky	57
4.1.2 Stanovení mrtvých objemů mikrofluidního systému.....	59
4.2 ŠTĚPENÍ α -KASEINU TRYPSINEM IMOBILIZOVANÝM NA MAGNETICKÝCH ČÁSTICÍCH.....	60
4.2.1 Stanovení aktivity imobilizovaného TPCK-trypsinu.....	61
4.2.2 Štěpení α -kaseinu trypsinem imobilizovaným na magnetických částicích ve vsádkovém uspořádání	62
4.2.3 Štěpení α -kaseinu trypsinem imobilizovaným na magnetických částicích v mikrofluidním uspořádání	65
4.2.4 Analýza štěpeného α -kaseinu pomocí hmotnostní spektrometrie	70

4.3	FOSFORYLACE PEPTIDOVÉHO SUBSTRÁTU A POSOUZENÍ OPERAČNÍ STABILITY NOSIČE S IMOBILIZOVANOU PROTEINKINÁZOU A	76
4.3.1	Operační stabilita nosiče s imobilizovanou PKA	81
4.4	IZOLACE OVALBUMINU ZE STANDARDNÍ SMĚSI PROTEINŮ	82
5	ZÁVĚR.....	86
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88
7	PŘÍLOHY	98

SEZNAM ZKRATEK

μTAS	totální mikro-analytické systémy
Ab	protilátka (z angl. antibody)
AC	afinitní chromatografie
ACN	acetonitril
Ag	antigen
ATP	adenosintrifosfát
BAPNA	N- α -benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid hydrochlorid
BSA	hovězí sérový albumin
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DTT	dithiotreitol
EDAC, EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
EGTA	ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N,N-tetraoctová kyselina
IAC	imunoafinitní chromatografie
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice (z angl. „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization“)
MČ	magnetické částice
MS	hmotnostní spektrometrie
MW	molekulová hmotnost
PDMS	polydimethylsiloxan
PKA	proteinkináza A
PMMA	polymethylmethakrylát
PV	původní vzorek
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
Sulfo-NHS	sodná sůl N-hydroxysukcinimidu
TEMED	N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TICs	tumor iniciující buňky
TPCK	L-1-tosylamido-2-fenylethyl chloromethyl keton
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VF	vazebná frakce

ÚVOD

Obliba moderních biologických metod pro analýzy vzorků neustále roste, a s ní rostou také požadavky na efektivnější a rychlejší postupy všech kroků v průběhu analýzy. Automatizace je proto nezbytnou součástí dnešních výzkumů nejen v různorodých biologických disciplínách, ale i environmentálních technologiích, medicíně a potravinářství. Tento trend je znatelný také v oblasti mikrofluidiky, což je obor zabývající se prouděním tekutin v zařízeních s velmi malými rozměry. Z toho plyne výhoda mikrofluidních systémů, tedy možnost vystačit s omezeným množstvím vzorku a nízkou spotřebou reakčních činidel s potenciálem zvýšení citlivosti metod. Pro snadnější manipulaci s kapalinami v mikrofluidních systémech byla vyvinuta zařízení, která umožňují automatizaci ovládní a kontrolu průtoku kapalin. Zavedení těchto zařízení do běžné praxe by mohlo vést ke zjednodušení a zdokonalení průběhu analýz. V současné době je klíčové prozkoumat limity i benefity takovýchto zařízení a optimalizovat podmínky pro jejich použití.

V biochemických a biologických aplikacích prováděných v mikročipovém uspořádání jsou dnes již běžně využívány magnetické částice (MČ). Ty představují relativně rychlou a snadnou cestu pro izolaci biospecifických látek či katalýzu reakcí jako nosiče enzymů. Spojení vlastností mikrofluidních systémů s magnetickými částicemi otevřelo nové možnosti studia biologických procesů *in vitro*. V souvislosti s tím jsou zmiňovány například izolace a studium cirkulujících nádorových buněk či transport a distribuce léčiv v organismu.

Ve své práci se zaměřuji na testování mikrofluidního systému pro nastavení a kontrolu průtoku pro mikročipové aplikace a převod experimentů, důležitých pro studium biologicky aktivních látek, do mikročipu. Jednou z aplikací je enzymová modifikace - fosforylace peptidového substrátu. Studium fosforylací je nezbytné pro pochopení posttranslačních modifikací proteinů, které mají významnou roli v regulaci biologických procesů. Nejen v tomto směru by mohla mikrofluidní zařízení v kombinaci s magnetickými částicemi pomoci objasnit fungování metabolických procesů a poruch v lidském organismu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mikrofluidika

Již několik desetiletí slyšíme o trendu miniaturizace, který je spojován s moderními technologiemi napříč všemi vědními obory. Díky tomuto trendu vznikl také obor zabývající se prouděním tekutin v zařízeních s velmi malými rozměry, a to v řádu mikrometrů. Tento obor se nazývá mikrofluidika [1]. Mikrofluidika je považována za multidisciplinární obor, neboť je využívána v různorodých odvětvích. Mezi ně patří například chemické inženýrství, fyzika, chemie, biochemie, nanotechnologie či biotechnologie [2]. Každá z těchto oblastí využívá výhod mikrofluidiky, které plynou z jejích základních vlastností. Vlastnosti, které mikrofluidní zařízení charakterizují jsou snadná přenositelnost, relativně dobře definované podmínky, malý vnitřní objem, velký poměr vnitřní plochy a vnitřního objemu a konečně, malé množství zpracovávaného vzorku. Obvykle jsou dávkovány objemy v rozsahu mikrolitrů až femtolitrů. Mikrofluidní zařízení tedy nabízejí obecně nízkou spotřebu vzorku a také nízké náklady na experiment [3, 4].

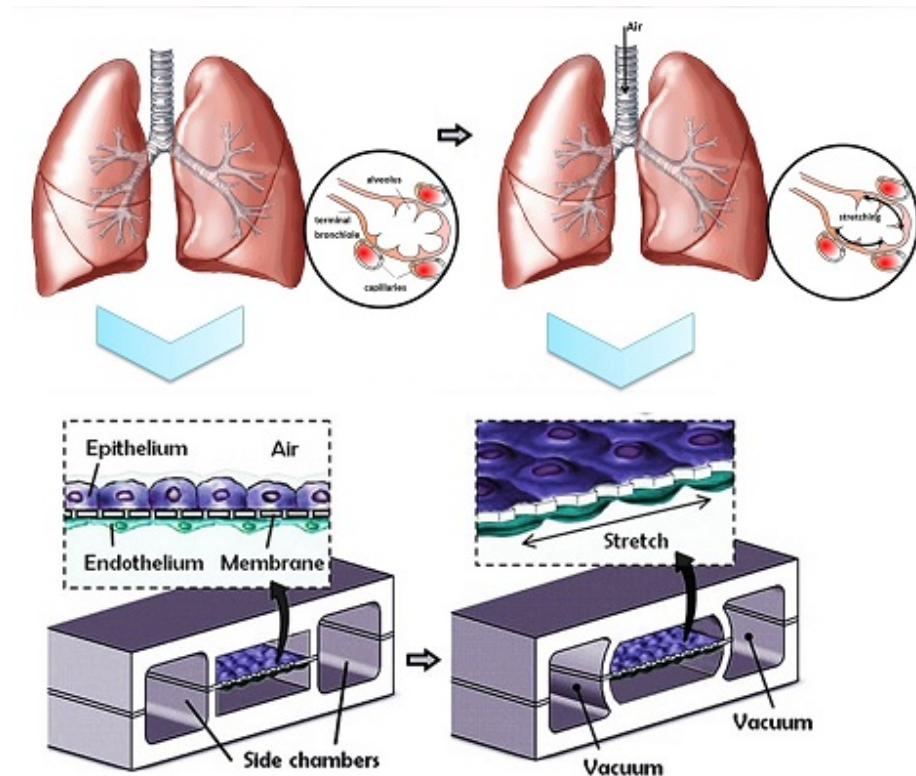
Jedním z pojmů, který je v souvislosti s mikrofluidikou užíván, je integrace typických kroků zpracování vzorku do jednoho funkčního zařízení, označovaného jako *Lab-on-chip* (laboratoř na čipu) nebo také Mikroprůtokové analytické systémy (*μ TAS – Micro total analysis system*). Masivní nástup vývoje *μ TAS* zařízení odstartovaly významné projekty na přelomu 80. a 90. let. Díky finanční podpoře agentury DARPA (Defense Advanced Research Project Agency) byl odstartován projekt, jehož cílem bylo vybavit armádu přenosnými a snadno ovladatelnými analyzátory. Ukázalo se, že takovéto systémy by byly vhodné i například pro laboratoře rozvojových zemí [2].

1.1.1 Vývoj a aplikace

Mikrofluidní systémy prochází fází intenzivního vývoje již dvě desetiletí. Čipy byly zpočátku navrženy pouze na principu rovných kanálků a vyvinuly se přes separační kříže až k poměrně složitým konstrukcím, které spojují několik na sebe navazujících kroků analýzy [2]. Vědecké týmy po celém světě využívají mikrofluidiku ve svých projektech a jejich aplikace jsou rozličné. Od již zmíněné laboratoře na čipu [2], DNA čipů [5], diagnostických zařízení až po spojení s elektroforézou [6], PCR [7] či hmotnostní spektrometrií [8].

V souvislosti se zdokonalováním a zmenšujícími se vnitřními průměry bylo nutné zdokonalovat také instrumentaci. Byly proto vyvinuty mikroreaktory, mikromišiče, mikroseparatory, mikropumpy, mikroventily i mikrosenzory pro měření průtoku. Na rozdíl od proudění v makro světě využívá mikrofluidika rozdílné poháněcí principy, což je způsobeno požadavky, které jsou kladeny na rozměry zařízení. Modulace průtokové rychlosti a stabilita průtokového profilu hrají rozhodující roli ve výkonu takovýchto zařízení. Hydrodynamické kolísání zhoršuje výkon mikrofluidních systému, které vyžadují stálé toky [9]. Obzvláště v biologických experimentech je nezbytné dávkovat tekutinu při rychlosti $\leq 1 \mu\text{l}/\text{min}$. po celou dobu průběhu experimentu, tedy v řádu hodin. Proto jsou mikrofluidní pumpy nedílnou součástí pro správné fungování a modulaci průtoku v mikrofluidních systémech. V některých případech musejí být pumpy schopny pracovat při extrémně vysokých tlacích a zároveň při nízkých průtocích [9].

Díky stálému zdokonalování se v posledních letech výzkum dostal tak daleko, že dal vzniknout termínu *Organs-on-a-chip*, neboli orgány na čipu. Jedná se o mikrofluidní zařízení pro kultivaci buněk, které simuluje činnost, mechaniku i fyziologickou odezvu daných orgánů a orgánových systémů. Tato aplikace by mohla umožnit monitorování v reálném čase [10]. Některé studie šly ještě dále a vytvořily multiorgánové zařízení, které se nazývá *Human-on-a-chip* (člověk na čipu). Díky němu by bylo možné předvídat vedlejší účinky testovaných léčiv. To by potenciálně mohlo do značné míry omezit či zcela eliminovat testování léků na zvířatech. Na takovémto typu čipu by v nejlepším možném případě šlo sledovat průběh infekcí nebo vliv různorodých látek na lidský organismus jako celek [11, 12]. Dodnes byly jako umělé mikroorgány vykultivovány například ledviny, plíce, játra i srdce.



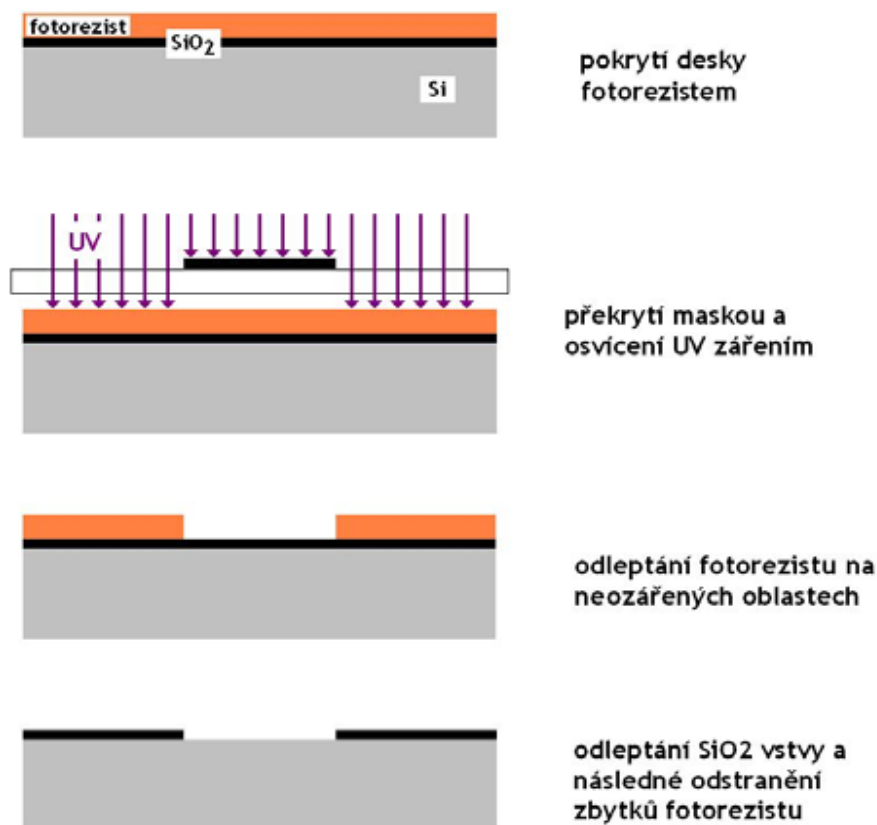
Obrázek 1 – Plíce na čipu (upraveno podle [13])

Každý orgánový čip je složen z čírého ohebného polymeru o velikosti počítačové paměťové karty. Obsahuje duté mikrofluidní kanálky lemované živými buňkami specifickými pro lidské orgány a propojenými umělým cévním systémem s lidskými endoteliálními buňkami. Mechanickými silami lze napodobovat mikroprostředí živých orgánů, včetně dechových pohybů v plicích či peristaltických ve střevech [12]. V roce 2018 publikovala skupina vědců pod záštitou Wyss Institute při Harvardské univerzitě článek, ve kterém hovoří o čipu s modelem neurovaskulární jednotky, díky kterému odhalili vazbu endotelových a neuronálních buněk [14]. Další studie vědeckého týmu společnosti Wyss, která byla publikována v časopise *Lab on a chip*, byla zaměřena na rozšíření funkčnosti čipů tím, že integruje multielektroskopické pole do čipů, které mohou měřit chování elektricky aktivních buněk jako je tomu například u buněk srdečního svalu [15]. Vědci z britské Imperial College London byli první, kdo použil technologii umělých lidských orgánů na čipu k výzkumu patogenů a jejich interakcí s daným orgánem. K výzkumu byla použita umělá játra na čipu, která vyvinuli vědci v MIT, University of Oxford a biotechnologické společnosti CN Bio Innovations. Zaměřili se na studium infekce virem hepatitidy B a sledovali, jak virus na játra působí [16].

1.1.2 Výroba mikrofluidních čipů

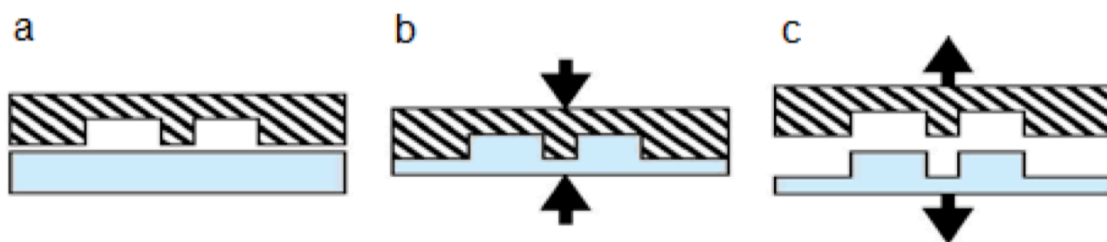
V prvopočátku byla většina mikrofluidních zařízení vyráběna z křemíku či ze skla. S pokrokem v jednadvacátém století však byly vyvinuty technologie, které pro odlévání zařízení o mikrorozměrech používají polymery. Tato možnost umožnila mnohým laboratorům začít provádět výzkumy na poli mikrofluidiky, díky výrazně nižším nákladům a časové náročnosti [17]. Mikrofluidní čipy jsou vyráběny pomocí mnoha metod jako je například odpařování materiálu laserem, mikroobrábění polymerů pomocí laseru, ražení za tepla a různými druhy litografie. Fotolitografie je technika přenosu vzoru na povrch substrátu. Dochází k rozptření fotoreaktivního materiálu po rotujícím podkladu. Následně je fotorezist vystaven UV záření a poté dochází k odleptání zbytků fotorezistu (Obr. 1) [18].

FOTOLITOGRAFIE



Obrázek 2 – Fotolitografie (upraveno podle [18])

Technika lisování za tepla je založena na tlačení zahřátého polymeru do formy. Po ochlazení je vyndán a díky zahřátí má sklovitou nebo polokrystalickou mikrostrukturu. Výhodou této techniky je možnost vytvořit nano nebo mikro strukturu a rychlé zhotovení mnoha kopií bez poškození originálu (Obr. 2) [18].



Obrázek 3 - Technika lisování za tepla (upraveno podle [18])

Z pohledu separačních možností je jednou z nejdůležitějších vlastností mikrofluidní technologie možnost vytvářet mnohočetná spojení kanálků bez nebezpečí tvorby mrtvých objemů a netěsností [9].

Co se týče čipů v medicínských aplikacích, jako jsou například již zmíněné orgány na čipu, je v dnešní době nejčastější technologií pro jejich výrobu měkká litografie polydimethylsiloxanu (PDMS). Jednoznačnou výhodou pro použití PDMS pro výrobu mikrofluidních čipů je jeho průhlednost, která umožňuje sledovat proces v čipu pod mikroskopem. Také se vyznačuje nízkou mírou autofluorescence, přilnavostí ke sklu či další vrstvě PDMS. Podobné vlastnosti mají čipy vyrobené z polymethylmetakrylátu (PMMA). Mohou být tedy vyrobeny vícevrstvá zařízení. Materiál je deformovatelný, což poskytuje možnost integrace mikrofluidních ventilů a snadné připojení propustných kapalinových spojů. Dalšími materiály používanými pro výrobu mikročipů jsou polyethyltereftalát (PET) a polykarbonát [13]. Oproti dříve používanému křemíku či sklu, je výroba několikanásobně levnější, ale chemická odolnost je u polymerních materiálů obecně horší. Dají se však najít i výjimky.

1.1.3 Fyzikální jevy v mikrofluidice

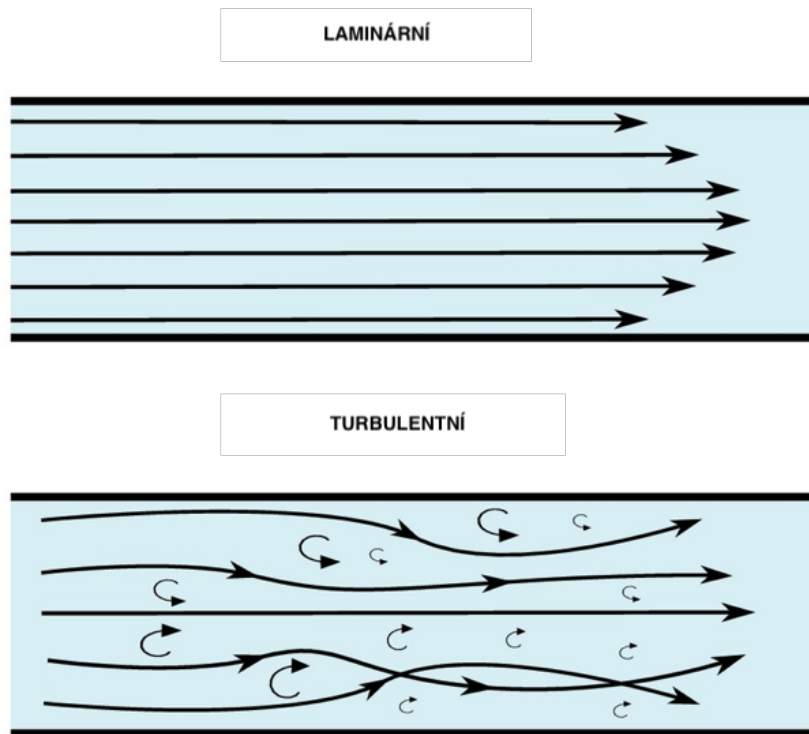
1.1.3.1 Reynoldsovo číslo

Přechod mezi makro a mikro prostředím je doprovázen změnou vlastností kapalin. V mikrokánálcích se projevuje rozdílné proudění kapalin, než je tomu například v potrubí. Děje v tekutinách jsou charakterizovány Reynoldsovým číslem [2].

$$Re = \frac{\rho \cdot l \cdot v}{\eta}$$

Re – Reynoldsovo číslo, η – dynamická viskozita [Pa·s], ρ – hustota [kg·m⁻³], l – charakteristický rozměr [m], v – rychlost [m·s⁻¹]

Reynoldsovo číslo je bezrozměrná veličina. Podle jeho hodnoty lze usuzovat na to, zda se bude jednat o turbulentní či laminární proudění [19]. Dává totiž do souvislosti rozměry, viskozitu tekutiny a rychlost průtoku [2]. Experimentálně se dá pro různá uspořádání stanovit kritická hodnota Re. Pokud je Re systému nižší než kritická hodnota, jedná se o laminární proudění a pokud je tomu naopak, tak o proudění turbulentní. V mikrofluidice nabývá Re hodnoty jednotek až stovek, uvažujeme proto jen proudění laminární [20].



Obrázek 4 - Zobrazení rozdílu mezi laminárním a turbulentním prouděním (upraveno podle [21])

1.1.3.2 Laminární proudění

V případě laminárního proudění jsou dráhy jednotlivých částic v kapalině rovnoběžné, viz obr. 4. Nedochozí tedy k mísení jednotlivých vrstev a při pohybu v kanálku se jednotlivé vrstvy nepohybují stejnou rychlostí. Částice kapaliny nacházející se nejbližně stěnám trubice se pohybují nejpomaleji, oproti tomu osová vrstva tekutiny se pohybuje nejrychleji [20]. Pro zajištění mísení kapaliny v zařízeních mikrorozměrů musejí být do systému instalována mikromíchadla [2].

V mikrokanálku roste tlaková ztráta z důvodu malých rozměrů. Proudění kapaliny v mikrofluidních zařízeních nejlépe popisuje Navier-Stokesova rovnice. Jedná se formulaci zákona zachování hybnosti proudící viskózní kapaliny a popisuje laminární proudění pro nestlačitelnou newtonskou tekutinu [19, 20].

$$F_m + F_p + F_t = F_s$$

$$\vec{a} - \frac{1}{\rho} \cdot \text{grad } p + v \cdot \Delta \vec{v} + \frac{v}{3} \cdot \text{grad } \text{div } \vec{v} = \vec{v} \cdot \text{grad } \vec{v} + \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}$$

F_m – silové působení vnějších hmotnostních sil, F_p – silové působení tlakových sil, F_t – silové působení třecích sil, F_s – silové působení setrvačných sil, a – výslednice vnějších zrychlení od hmotnostních sil, $\text{grad } p$ – tlakové zrychlení od tlakových sil, Δv – třecí zrychlení od třecí síly, $\text{div } v$ – zrychlení vlivem viskozity u stlačitelných kapalin od třecí síly, $v \cdot \text{grad } v$ – konvektivní složka zrychlení od setrvačné síly, $\frac{\partial v}{\partial t}$ – lokální složka zrychlení od setrvačné síly

Existují dvě základní metody pro zajištění proudu v kanálcích mikrofluidních zařízení. První možností je zajištění proudu tlakem. V tomto případě je kapalina pumpována přes zařízení pomocí čerpadla, pomocí pump [19]. Více o tomto postupu bude rozebráno v následujících kapitolách. Druhou možností je využití elektrokinetického toku, který využívá elektroosmotického pumpování kapaliny. Na povrchu kanálku se vytvoří elektrická dvojrivrva opačně nabitých iontů. Když se připojí elektrické pole, ionty v dvojrivrve se začnou pohybovat k opačně nabitě elektrodě, a to vytvoří pohyb kapaliny od stěny kanálku, který se přenáší do celého objemu kapaliny. Avšak vzhledem k rozdílným vlastnostem použitých povrchů nelze předpovídat rychlost proudění, což je výraznou nevýhodou oproti předchozí možnosti [20].

1.1.4 Mikropumpy

Vývoj mikropump byl zahájen v 80. letech 20. století. Mikropumpy konkrétně pro systémy MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*) v 90. letech vyvinuli Jan Smits a Harald Van Lintel [22]. Jsou hlavní součástí systémů, které vyžadují dávkování objemů v řádech mikrolitrů za minutu nebo i méně. Dělí se na mikropumpy mechanické s pohyblivou částí a nemechanické [23]. Součástí mikropump je pohon jako nezbytná řídicí jednotka přenášející energii na pohyb, která je využívána jako síla potřebná pro proudění. Energie může být dodávána ve formě elektrického proudu, tlaku tekutin, tepla i tlaku vzduchu. Další potřebnou součástí jsou ventily, které slouží k otevírání a zavírání průtoku kapalin. Řízení ventilů je závislé na tlakovém rozdílu v komoře. U aktivních ventilů jsou jejich aktivní části poháněny vnějším pohonem. Mikropumpy obsahují také komory. Ty mohou zásadním způsobem ovlivnit objemový tok, tlakové vlastnosti i ztrátové koeficienty trysky. Původně existovaly mikropumpy

jen s jednou komorou, ale dnes již existují konfigurace s dvěma i více komorami pro zvýšení výkonu. Mikropumpy se dělí také podle umístění komor, zda jsou rozmístěny odděleně, sériově nebo paralelně. Důležité jsou také trysky a difuzor, které jsou používány u bezventilových pump z důvodu usměrňování toku. Během dávkování vstupuje více kapaliny do komory přes difuzor a zároveň vstupuje méně kapaliny do komory přes trysku. Tím dochází ke zvětšování pracovního objemu komory. Naopak když dochází k čerpání je pracovní objem komory snižován a kapalina vychází přes trysku a difuzor ven [23].

Pumpy fungující na principu injekční stříkačky takzvané „syringe“ pumpy jsou nejčastěji používaným řešením pro řízení průtoku. Oblíbené jsou především pro svou jednoduchost a často nízkým nákladům ve srovnání s jinými metodami řízení toku. Klasické injekční pumpy jsou sice levné, ale za cenu vzniku oscilací toku při nízkých průtocích. Lepší výkonnost nabízejí pulzní čerpadla [24].

Peristaltické pumpy pracují na principu sevření fluidní trubice řadou válečků připojených k rotoru v kruhovém pouzdru čerpadla, aby se tekutina v daném směru protlačila trubkou. I když vytvářejí silné pulsy v průtoku, umožňují kontinuální cirkulaci tekutiny, což je užitečné převážně u dlouhodobých experimentů [23]. Další výhodou peristaltických čerpadel je jejich provoz bez kontaktu s tekutinou, přičemž kapalina, která je čerpadlem, a samotný čerpací mechanismus jsou zcela odděleny od sebe stěnou trubky. To je užitečné především u aplikací, kde není přípustná žádná kontaminace [24,25]. Avšak od používání peristaltických pump se v poslední době ustupuje [26].

Tlakové pumpy jsou nejčastěji používány pokud jsou vyžadovány citlivé a stabilní toky. Regulátory tlaku umožňují, aby byly tlakem řízené změny tlaku v celém systému bez zpoždění. Mezi výrobce tlakových pump patří francouzská firma Elveflow, jejíž produkt je představen v následující kapitole [24].

1.1.5 Současný stav technologií

Přesné řízení průtoku v mikrofluidních čípech je důležité pro mnoho biochemických testů a experimentů v mikroskopickém měřítku. Není proto divu, že se této oblasti v posledních letech věnovalo a stále věnuje mnoho vědeckých týmů po celém světě [27].

Například Lam a kolektiv vyvinuli zařízení, které obsahuje řadu propouštěcích ventilů pro regulaci průtoku. Avšak toto zařízení zahrnovalo poměrně komplikovanou platformu pro ovládání mimo čip [28]. Většina vyvinutých systémů umožňuje řízení toku mimo čip. Nevýhodou těchto zařízení je relativně velký mrtvý objem mezi ventilem vně čipu a bodem

kontroly na čipu. Časová přesnost takovýchto zařízení je proto omezena [27]. Nicméně provoz těchto zařízení je jednoduchý a umožňuje rychlou regulaci průměrného průtoku. Každý typ mikrofluidního řízení toku má své výhody a nevýhody v závislosti na tom, pro jakou aplikaci je používán [24].

Díky rozvoji na technologickém poli narůstá také množství společností zabývajících se výrobou zařízení pro správné fungování mikroprůtokových systémů. V rámci této kapitoly je proto nutné vybrat k porovnání jen zástupce předních výrobců a zaměřit se převážně na jejich technické parametry.

Výše zmiňovaná firma Elveflow nabízí systémy řízení průtoku, založené na patentované piezoelektrické technologii inspirované letectvím. Duální pumpa AF1 je navržena tak, aby generovala stabilní a bezpulzní tok. Může být použita jako zdroj vakua nebo jako zdroj tlaku a umožňuje přepnutí z podtlaku na tlak na stejném kanálu [26]. Rozsah tlaků a průtoků je uveden v tabulce č. 1. Technologie firmy Elveflow jsou využívány například ve studiích zabývajících se vývojem orgánů na čipu a mnohých dalších. Ve studii publikované v časopise *The Cell* byl popsán experiment s použitím více proudů laminárních tekutin v mikrofluidních kanálech pro dodávání reakčních činidel do buněk a jejich odstraňování z buněk. Tato technika umožnila fluorescenčně značit různé subpopulace mitochondrií, chemicky narušit vybrané oblasti cytoskeletu a pozorovat endocytózu v jednotlivých buňkách [29].

Dalším výrobcem mikrofluidních systémů je firma Dolomite. V jejich sortimentu lze nalézt tlakové, peristaltické i injekční pumpy. Například pumpa s označením Mito Duo XS nabízí dvě na sobě nezávislé pumpy s rotačními ventily. Výhodou je možnost snadné výměny stříkaček o různých objemech, a tedy široký rozsah průtoku [30]. Ve studii, kterou v roce 2018 publikoval Moore a kolektiv, využili mikrofluidní pumpy od této firmy. Na mikrofluidním modelu nazvaném EVIDENT (*ex vivo* imuno-onkologické dynamické prostředí pro nádorové biopsie). Ten má představovat *in vitro* model vyhovující interakcím mezi tumory a imunitními buňky, pro hodnocení fragmentů nádorů získaných přímo z biopsií pacienta [31].



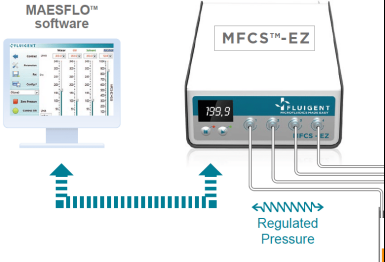

Firma Fluigent vyrábí tlakové pumpy a příslušenství pro mikrofluidní aplikace. Pumpa tohoto výrobce pod označením MFCSTM-EZ v kombinaci s modulem řízení průtoku umožňuje přímo řídit průtoky ve více kanálech odděleně [32]. Uživatelé, jako je například tým doktora Andrew Hudsona z Leicesterské univerzity nebo MMN Laboratory Institutu Pierre Gelles de Gennes oceňují, že je požadované rychlosti průtoku dosaženo rychle a bez dalších nestabilit. A zůstávají stabilní po celé hodiny bez stálého dozoru [33].

Americká společnost LabSmith založená v roce 1995 vyvinula produkty pro automatizaci s názvem uProcessTM, včetně injekčních čerpadel a ventilů uspořádaných na desce. uProcessTM

je systém hardwarových a softwarových produktů určených ke zjednodušení konstrukce a automatizovaného řízení mikrofluidních systémů [34]. Výhodou je, že si uživatel může pořídit jak jednotlivé nástroje, tak celou soupravu, která obsahuje vše potřebné pro plné využití v mikrofluidních aplikacích. Injekční pumpa SPS01 je vybavena jednou skleněnou stříkačkou a pístem, ta je s ventily spojena kapilárou a celý systém je ovládán softwarem. Výrobce nabízí stříkačky v rozsahu objemů od pěti do sta mikrolitrů [34]. Produkty této firmy byly použity například ve studii publikované roku 2012 v časopise Lab on a Chip, kde izolovali prostatické nádorové buňky (TICs – Tumor initiating cells) na základě jejich dielektroforetické odezvy [35].

Všechny výše zmíněné firmy poskytují poradenství a nabízejí pomoc s návrhem nejvhodnějšího řešení kontroly průtoku v mikroobjemech pro konkrétní aplikace. Technické parametry vybraných produktů jsou uvedeny v tabulce č. 1 [26, 30, 32, 34].

Tabulka 1 – Přehled pump a jejich technických parametrů pro mikrofluidní aplikace

Výrobce	Typ	Tlak	Průtok	Obrázek
Elveflow	AF1 DUAL – tlaková a vakuová pumpa	-700 mbar – 1 bar	0,07 – 5000 μl/min	
Dolomite	Mitos DUO XS – injekční pumpa	0-20 bar	0.1 μl/min- 10ml/min	
Fluigent	MFCST TM -EZ – tlaková pumpa	-800 mbar - 7 bar	nl/min - μl/min	
LabSmith	SPS01 – injekční pumpa	0 - 18 bar	1.0 – 5600 μl/min	

1.2 Magnetické mikro- a nanočástice

Magnetické částice (MČ) jsou v dnešní době všestrannou součástí biologických a biochemických analýz. Velikost mikročástic se pohybuje většinou v rozmezí 0,1 až 100 μm [36]. Správný výběr velikosti magnetických částic pro konkrétní analýzu je velice důležitý, protože příliš malé částice jsou méně citlivé na působení vnějšího pole a naopak velké částice vykazují vyšší odolnost proti působení magnetického pole a mohou sedimentovat. MČ se používají jako inertní nosiče enzymů, protilátek a dalších molekul. Díky tomu jsou vhodné pro izolace biospecifických molekul, pro katalýzu reakcí či chemickou modifikaci látek [6, 37].

Nanomateriály a nanočástice přitahovaly pozornost spolu s vývojem mikrofluidních systémů [36]. Obzvláště zajímavá byla kategorie magnetických materiálů.

Magnetické síly jsou nyní využívány v celé řadě mikrofluidních aplikací. Magnetohydrodynamický tok byl využit při čerpání tekutin přes mikrokanály. Magnetické materiály použity při výrobě ventilů a magnetické částice našly uplatnění nespočet [37]. Například při míchání kapalin v kanálcích, ale také jako pevné nosiče pro bioreakce probíhající v zařízeních o mikro rozměrech [6]. Jednou z velkých výhod je možnost manipulace magnetickými objekty uvnitř kanálku externím magnetem, který není v přímém kontaktu s tekutinou [37]. Zajímavé jsou zejména magnetické materiály sestávající z feromagnetických nanočástic o průměru několika desítek nebo stovek nanometrů uložených v nemagnetické matici, například z polymeru nebo křemene [36]. Takto připravené mikročástice mají superparamagnetické vlastnosti. To znamená, že vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Po jeho odstranění částice magnetické vlastnosti ztrácejí [37].

Výběr vhodných MČ pro jednotlivé aplikace se odvíjí od jejich magnetických vlastností. Podstatné jsou tedy materiály, ze kterých jsou vyrobeny a také jejich velikost. Podle chování v magnetickém poli můžeme magnetické materiály rozdělit do několika skupin [37].



Obrázek 5 - Struktura magnetických částic SeraMag (obal, magnetická vrstva, jádro) [38]

1.2.1 Magnetické vlastnosti

Magnetické vlastnosti jsou způsobeny elektrony v atomech látky, které se pohybují, a tím kolem sebe vytvářejí magnetické pole. Tato magnetická pole se skládají a určují výsledné magnetické pole atomů, čímž určují i vlastnosti látky. Jednotlivé skupiny magnetických materiálů se liší uspořádáním elektronů v atomu [37, 39].

Diamagnetické materiály

Tyto materiály vykazují velmi slabé magnetické vlastnosti a tento typ magnetismu není permanentní. Přetrvává jen tak dlouho, dokud je materiál vystaven působení magnetického pole. V nepřítomnosti magnetického pole je magnetický moment těchto látek nulový. To je způsobeno tím, že magnetické momenty magnetického pole a diamagnetické látky mají opačný směr, což vyvolá zeslabení vnějšího magnetického pole [39]. Většina materiálů je slabě diamagnetických, včetně vody, bílkovin, DNA, polymerů, dřeva a skla. Často se takovéto materiály jednoduše nazývají nemagnetické [37].

Feromagnetické materiály

Feromagnetismu je nejsilnější formou magnetismu. Vykazuje permanentní magnetický moment [39]. Feromagnetické materiály, jako je železo, kobalt a nikl jsou silně přitahovány magnetickými poli [37]. Magnetické momenty jednotlivých atomů feromagnetických materiálů

mají tendenci se mezi sebou spojovat a orientovat se ve směru vnějšího magnetického pole. Takovéto látky zůstávají částečně zmagnetizovány i tehdy, jsou-li z magnetického pole odstraněny [39]. Tím se liší od látek paramagnetických.

Paramagnetické materiály

Atomy těchto látek mají permanentní dipólový moment, a to díky neúplnému vyrušení magnetických momentů elektronů. Pokud jsou vystaveny vnějšímu magnetickému poli, dojde k natočení magnetických dipólů ve směru vytvořeného magnetického pole. Tím vznikne magnetický moment se stejnou orientací jako je původní orientace vnějšího magnetického pole [39]. Příklady paramagnetických látek zahrnují platinu a mangan či oxid železnatý.

Dalším zvláštním případem paramagnetismu je superparamagnetismus. Superparamagnetické částice mají jádro malých krystalů oxidu železa potažených polymerem. Částice jsou magnetizovány magnetickým polem. Nicméně nemají magnetickou paměť a po odstranění vnějšího pole se částice rozptýlí a chovají se jako nemagnetický materiál [36, 37].

Většina MČ využívaných v biotechnologických aplikacích je superparamagnetických. A ačkoli je již v dnešní době komerčně dostupná celá řada takovýchto částic, vývoj nových typů s nejrůznějšími povrchovými modifikacemi je stále aktuální [37].

MČ pro biologické aplikace jsou tvořeny magnetickým jádrem a ochranným obalem tvořeným polymerní vrstvou chránící jádro před kontaktem se vzorkem a umožňující úpravu povrchu nosiče za účelem cílené separace [40]. Jedinečnou vlastností MČ je to, že vzorky na nich navázané mohou být ovlivňovány pomocí magnetických sil nezávisle na jakémkoliv jiném mikrofluidním, biologickém nebo chemickém procesu [36].

1.2.2 Funkcionalizace a stabilizace povrchu magnetických částic

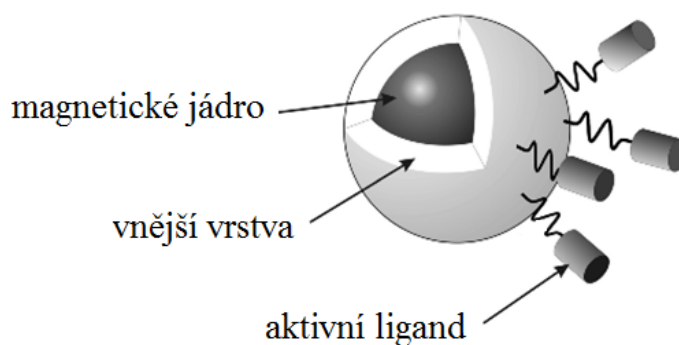
MČ tvořené pouze magnetickými jádry nejsou dostatečně stabilní a mohlo by docházet k jejich snadné oxidaci či k jiným nežádoucím interakcím s okolním prostředím. Proto je nutná jejich povrchová úprava. Jak již bylo uvedeno výše, jsou MČ pokryty nejčastěji polymerním obalem. Významem této vrstvy není pouze stabilizovat povrch částic, ale umožňuje také jeho funkcionalizaci [41]. Funkcionalizace obecně zahrnuje modifikaci povrchu pevného materiálu s ohledem na jeho fyzikální, chemické nebo biologické vlastnosti. Tato modifikace může být provedena různými metodami s cílem měnit širokou škálu vlastností povrchu. Než může dojít k funkcionalizaci je nutné povrch částic modifikovat. Důvodem k povrchové modifikaci

je například absence funkčních skupin pro vazbu ligandu (obr. č. 6), vysoká nespecifická sorpce proteinů či agregace a adheze částic [39].

Pokud je vhodná funkční skupina již součástí polymerního obalu, stačí ji aktivovat vhodným chemickým činidlem [41]. Často používanou metodou pro modifikaci povrchu je silanizace, kdy je na povrch částic vnášena další chemická vrstva. Při silanizaci se používají většinou alkoxysilany nebo trimethoxysilan. Silanizací vzniká vazba -Si-O-Si- mezi povrchem nosiče a silanem zakončeným požadovanou reaktivní skupinou (-NH₂, -COOH, -SH) [42].

Kromě modifikace za účelem zavedení vhodných funkčních skupin na povrch nosiče se provádějí také modifikace s cílem zlepšit povrchové vlastnosti MČ. Agregaci částic se zabraňuje přidávkem detergentů a stabilizačních nízkomolekulárních látek, jako je kyselina citrónová či olejová. Další možností je modifikace povrchu inertními materiály jako je zlato [43] či křemík, ale i polysacharidy, například albumin, chitosan či celulóza. Elektrostatickou stabilizaci povrchu zajišťují polymery jako polyetylenglykol, polyvinylalkohol nebo dextran [44]. Modifikace povrchu částic značně ovlivňuje jejich velikost i vlastnosti, proto se nutně volit úpravu povrchu s ohledem na budoucí použití nosiče [45].

Komerčně dostupné superparamagnetické částice jsou k dispozici například s karboxylovými skupinami nebo aminoskupinami na jejich povrchu. Biomolekuly jako jsou DNA řetězce nebo protilátky se díky tomu mohou snadno připojit k povrchu částic. Mezi známé společnosti dodávající magnetické částice s povrchovou úpravou patří Dynal, Micromod, Bangs Laboratoires, Polyscience, Seradyn a Estapor [37]. Funkcionalizace MČ je dále zmiňována v rámci kapitoly 1.2.3.



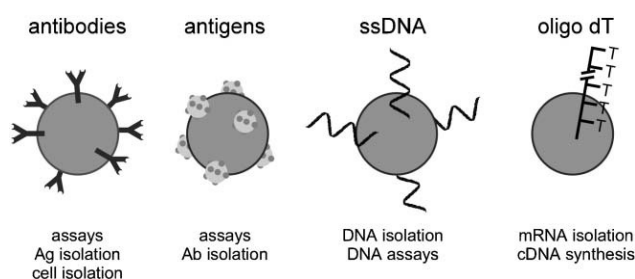
Obrázek 6 - Struktura magnetické částice s aktivním ligandem na povrchu (upraveno podle [40])

1.2.3 Mikročipové aplikace s magnetickými částicemi

Výhody MČ pro použití v mikročipových aplikacích plynou z jejich již výše uvedených vlastností. Pro shrnutí se jedná o snadnou manipulaci, možnost opakovaného použití, malé rozměry a specifický reakční povrch [46]. MČ tak zajišťují velký reakční povrch v jinak malém

objemu mikročipu, čímž lze výrazně zkrátit časovou náročnost analýzy [47]. Manipulace MČ v mikročipu je zajišťována pomocí elektromagnetu nebo permanentních magnetů [48]. Magnet musí být dost silný na to aby udržel částice v čipu během proudění kapalin, ale musí být zajištěno aby byly částice ve vznosu a procházející analyt měl přístup k co největšímu reakčnímu povrchu [49, 50].

Základní aplikací prováděnou v mikročipu s použitím magnetických částic jako nosiče je izolace a purifikace biomolekul (obr. č. 7), například proteinů, nukleových kyselin, sacharidů či jiných biologicky aktivních látek [51, 52]. Izolace je založena na rozdílné afinitě cílových molekul k ligandu navázanému na MČ. Avšak i zde může částečně docházet k nespecifické sorpci nežádoucích molekul na ligand nebo přímo na nosič.



Obrázek 7 – Možnosti využití magnetických částic s imobilizovanými protilátkami, antigeny, ssDNA a primeru oligo dT (praveno podle [37])

Jedním z příkladů může být izolace nukleových kyselin, což je jeden z nejdůležitějších nástrojů pro molekulární biologii. Použití MČ v kombinaci s mikročipy tyto analýzy značně ulehčuje a snižuje se také riziko kontaminace a degradace nukleových kyselin [53]. Významné využití nachází MČ v čipu také při izolaci nádorových a kmenových buněk [54]. Shi a kolektiv ve své studii popisují záchyt nádorových buněk pomocí magnetických částic potažených protilátkou proti transmembránovému glykoproteinu EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). Po odstranění magnetického pole byly zachycené buňky uvolněny z čipu a mohly být dále kultivovány pro další analýzu [55].

Hojně studovány jsou aplikace pro detekci střevních patogenů *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Shigella* a *Salmonella*. Příkladem je platforma s názvem DEC (Disposable Enterics Card), která je schopna detekovat přítomnost těchto patogenů ze vzorku stolice na jednom mikročipu [56]. To souvisí s často zmiňovanou včasnou a přesnou diagnostikou infekčních onemocnění. Mikrofluidní čipy s magnetickými částicemi mohou být nápomocny při detekci infekce, a tím zajistit možnost včas reagovat při volbě léčby. To je v rámci epidemiologie podstatné hlavně v rozvojových zemích. V této oblasti jsou však pořád limitující

parametry zařízení, hlavně jejich velikost a zdroj energie pro jejich provoz [57,58]. Ve vědeckém světě probíhají neustálé snahy o vytvoření zařízení, které bude všechny tyto vlastnosti splňovat a bude možno ho použít pro diagnostiku HIV [59], malárie, tuberkulózy [60] průjmových onemocnění [61], černého kašle, respiračních onemocnění [62] a horečky dengue [63].

V neposlední řadě jsou MČ v mikrofluidních čípech využívány jako magnetické biokatalyzátory. Ty jsou výhodné zejména když je používán drahý enzym, protože se připravené nosiče dají použít opakovaně a vykazují dobrou stabilitu při skladování [41]. Konkrétním příkladem je využití magnetických částic s imobilizovaným trypsinem v proteomice ke štěpení proteinů na fragmenty peptidů [64].

MČ se osvědčily hlavně jako nástroj pro specifické připojení biomolekul k detekci, analýze a kvantifikaci. Jejich široké využití ve výzkumných institucích je doloženo vysokým počtem vědeckých publikací zaměřených na aplikace magnetických částic [36].

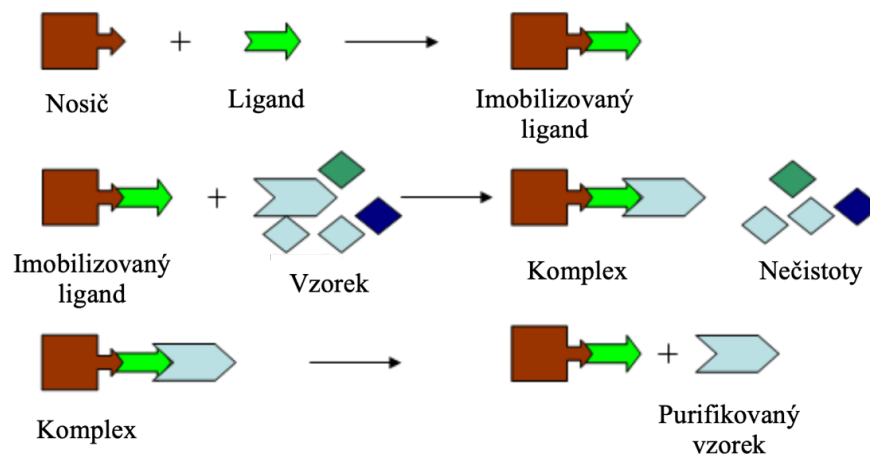
1.3 Imunoafinitní a afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie (AC) je chromatografická separační technika vyznačující se vysokou selektivitou [65]. Používá se pro izolaci a purifikaci biologicky aktivních látek a je vhodná pro studium interakcí biopolymerů (např. enzymy). AC využívá jedinečné schopnosti některých látek (afinantů, ligandů či afinitních ligandů) specificky a reverzibilně vázat komplementární látky. Při vazbě mezi biologicky aktivní látkou a ligandem jsou uplatňovány nekovalentní vazby, jako např. vodíkové můstky, hydrofobní interakce, dipólové interakce, iontové síly či Londonovy disperzní síly [66]. Díky tomu je možné cílovou látku z komplexu uvolnit a získat ji tak v její aktivní formě. Příklady biospecifických párů jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2 – Příklady biospecifických párů (komplementární molekuly)

Enzym	Substrát Kompetitivní inhibitor Koenzym
Protilátka	Antigen Hapten
Lektin	Glykoproteiny Oligo(poly)sacharidy
Histony	DNA
Buněčný povrchový receptor, léčivo	Hormon

Afinitní ligand se váže kovalentní vazbou na vhodný nerozpustný inertní nosič – stacionární fáze, zatímco cílová molekula je ve fázi mobilní. Molekula afinantu reaguje s ligandem za vzniku komplexu a látky bez afinity k ligandu zůstanou nezadrženy (Obr. č. 8) [65].



Obrázek 8 - Schéma afinitní chromatografie (převzato a upraveno podle [67])

Tvorba komplexu cílové molekuly a afinitního ligandu je charakterizována rovnovážnou konstantou K , vyjádřenou v rovnici níže. Rovnovážná konstanta musí být dostatečně vysoká, aby mohlo dojít k tvorbě komplexu, ale nesmí být až tak vysoká, aby znemožňovala eluci látek. Pro stabilní vazbu jsou typické hodnoty disociační konstanty v rozmezí 10^6 až 10^8 mol/l [68].

$$K = \frac{[AL]}{[A] + [L]}$$

K – rovnovážná konstanta, $[A]$ – koncentrace afinantu, $[L]$ – koncentrace ligandu, $[AL]$ – koncentrace komplexu afinant-ligand

Mnoho běžně používaných ligandů vázaných na nosiče je komerčně dostupných a jsou připraveny k přímému použití. V některých případech však může být nutné vytvořit nový afinitní chromatografický systém vazbou ligandu na matici tak, aby si ligand zachoval specifickou vazebnou afinitu k cílové molekule. Podstatný je proto výběr nosiče, ligandu a správné chemické vazby [69].

Nosiče

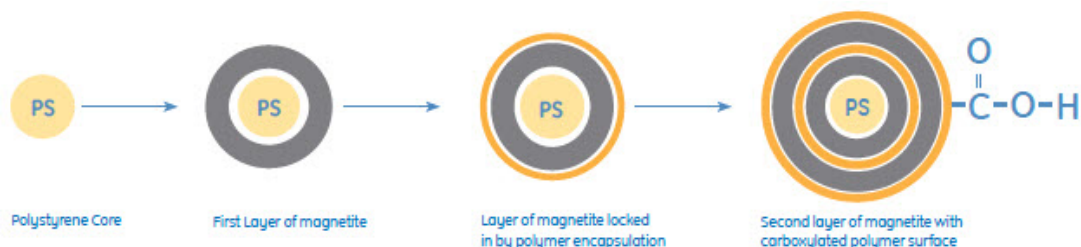
Nosiče používané v AC jsou buď jednosložkové nebo složené. Jednosložkové nosiče jsou dále rozlišovány podle jejich chemické povahy na organické (celulóza, dextran, agaróza, atd.) [68], anorganické nosiče (křemičité, skleněné) či syntetické nosiče (polyakrylamid, metakrylát). Mezi nosiče složené se řadí polysacharid-polyakrylamid a magnetické částice [70].

Volba nosiče záleží na typu ligandu, průtokové rychlosti, podmínkách separace a dané aplikaci. Vhodný nosič musí splňovat základní vlastnosti [71]:

- Velký specifický povrch
- Makroporézní struktura
- Mechanická i chemická stabilita
- Nerozpustnost
- Přítomnost funkčních skupin (karboxylová, aminová, hydroxylová, atd.)
- Snadno přístupný povrch pro ligand
- Chemicky inertní povrch
- Dobré chromatografické vlastnosti

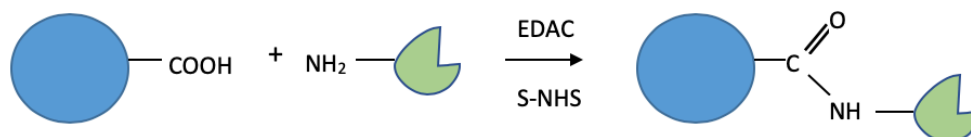
Agaróza a polyakrylamid jsou nosiče vhodné pro aplikace v nízko- až střednětlakém kolonovém uspořádání. Pro aplikace ve vsádkovém uspořádání je vhodnou volbou celulóza či magnetické částice. Schéma přípravy komerčně dostupných magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou je uvedeno na obrázku č. 9.

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole vyznačují se magnetické nosiče snadnou manipulací, rychlostí provedení izolace a možností opakovaného použití. MČ jsou obzvláště vhodné pro aplikace prováděné v mikročipu [72].



Obrázek 9 – Schéma přípravy komerčně dostupných magnetických částic s karboxylovou skupinou (upraveno podle [38])

Vazba ligandu na nosič musí být pevná (kovalentní), aby nedošlo k jejímu poškození v průběhu experimentu, například během promývání. Z toho důvodu je před imobilizací prováděna takzvaná aktivace nosiče. Přesněji aktivace funkčních skupin na povrchu nosiče. Aktivace může být provedena například reakcí s bromkyanem, epoxidem či karbodiimidem [68]. Karbodiimid, konkrétně N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid(EDAC) se využívá pro aktivaci karboxylové skupiny (Obr. č. 10) [71].



Obrázek 10 – Aktivace karboxylové skupiny nosiče s využitím EDAC (převzato a upraveno podle [73])

Ligandy

Taktéž ligandy v AC musí splňovat určité vlastnosti, které jsou nezbytné pro účinné provedení separace. Zásadní je vysoká afinita k cílové molekule a specifická, reverzibilní vazba mezi nimi. Další podmínkou je přítomnost chemicky modifikovatelné skupiny pro vazbu na nosič [74].

Ligandy dělíme buď podle chemické povahy na přirozené a syntetické nebo podle jejich specifity na ligandy s úzkou specifitou (anti-ovalbuminové protilátky pro izolaci ovalbuminu), a ty které jsou skupinově specifické (kináza – substrát). Aby byla zajištěna správná prostorová přístupnost pro makromolekulu, vkládá se občas mezi ligand a povrch nosiče oddalovací raménko, tzv. spacer. K této možnosti se přistupuje většinou u malých ligandů [71].

Uvolnění cílové molekuly z komplexu vyžaduje změnu reakčních podmínek. K tomu dochází přidáním elučního roztoku, tj. roztok o odlišném pH, polaritě či iontové síle. Eluce může být zajištěna také specificky přidáním kompetitivního ligandu nebo analogu cílové látky [66, 74].

Uspořádání afinitní chromatografie

AC může být prováděna v kolonovém uspořádání, vsádkovém uspořádání, a také v mikročipu. V případě kolonového uspořádání se dává přednost krátkým a širokým kolonám, které umožňují maximální kontakt cílové molekuly s ligandem [71]. Při vsádkovém a mikročipovém uspořádání jsou s velkou oblibou používány jako nosiče magnetické částice. Stacionární fáze jsou obvykle připravovány na míru přímo pro požadovanou aplikaci [68]. Při vsádkovém uspořádání je velkou výhodou použití magnetického separátoru, který umožňuje rychlou separaci magnetických částic z reakční směsi. Tím je vyloučena centrifugace. Tím je manipulace se vzorkem šetrnější, nedochází k mechanickému poškození analytu a ztráty reagujících složek jsou minimalizovány. Nosič je navíc možno použít opakovaně. Stejně výhody charakterizují také mikročipové uspořádání. Zde lze navíc využít automatizace, čímž dochází k úspoře času a množství reagensů.

1.3.1 Využití afinitních chromatografie

Metody afinitní chromatografie se nejčastěji využívá k izolaci peptidů, proteinů, glykoproteinů a obecně biologicky aktivních látek [71]. Avšak možnosti využití této metody jsou mnohem širší. Hodí se pro prekoncentraci stopových množství sloučenin, čištění analytů v komplexních směsích i k analýze metabolismu látek. Četné aplikace jsou zmiňovány v lékařství a medicíně, například studium hormonů, virů a jejich genetického fondu, nádorových markerů, protilátek, léčiv i enzymů. Biospecifického páru enzym-substrát využívají například imobilizované enzymové reaktory (IMER) pro screening potenciálních inhibitorů enzymů, výzkum metabolismu léčiv nebo mapování peptidů. Enzymové reaktory slouží ke konverzi (např. fosforylaci) substrátu prostřednictvím enzymové reakce [75]. Hojně používanými enzymy v rámci enzymových reaktorů jsou proteinové kinázy, které jsou významné pro buněčnou signalizaci a kontrolu. Porucha proteinkináz je spojena s řadou onemocnění, zejména s nádorovým bujením, Alzheimerovou chorobou a diabetem.

10-50 % proteinů v buňce je fosforylováno v určitém bodě buněčného cyklu, a proto je studium mechanismu působení proteinkináz velice účelné. Afinitní chromatografie tak vytváří základ pro vývoj nové léčby a diagnostiku [76]. AC je často následována a doplňuje s dalšími analytickými technikami, jako je například diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu nebo hmotnostní spektrometrie [68].

1.3.2 Imunoafinitní chromatografie

Imunoafinitní chromatografie (IAC) je jednou z forem AC, kdy je ligandem imobilizovaná protilátka (Ab) či antigen (Ag). Navázáním polyklonální nebo monoklonální Ab vzniká imunosorbent vhodný pro izolaci příslušného Ag. I v tomto případě je možné využít nízkotlakého kolonového, vsádkového či mikročipového uspořádání. Běžně jsou dostupné komerčně vyráběné protilátky proti nejrůznějším proteinům. Výjimkou nejsou ani potravinové antigeny, jako je kasein či ovalbumin [77]. Po imobilizaci protilátek proti ovalbuminu na vybraný nosič můžeme izolovat ovalbumin ve vysoké čistotě, velkém množství a současně v jeho aktivní formě. Získaný purifikovaný ovalbumin může být následně využit pro obecné studie struktury a vlastností proteinů nebo jako modelový alergen pro stimulaci alergické reakce. Výskyt alergií na složky potravy má rostoucí tendenci a ovalbumin patří mezi šest hlavních potravinových alergenů [78].

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- 1) Sestavení vhodného schématu pro využití mikrofluidních pump a ventilů s vybraným mikročipem v kombinaci s magnetickými částicemi. Kontrola nastavení průtoku a stanovení mrtvých objemů v systému.
- 2) Štěpení α -kaseinu trypsinem imobilizovaným na magnetických částicích – sestavení vhodného protokolu pro analýzu v mikročipu, srovnání více druhů magnetických částic, porovnání se vsádkovým uspořádáním.
- 3) Fosforylace peptidového substrátu a posouzení operační stability nosiče s imobilizovanou proteinkinázou A – sestavení vhodného protokolu pro analýzu v mikročipu.
- 4) Izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů imunoafinitní chromatografií – sestavení vhodného protokolu pro analýzu v mikročipu, porovnání izolace ve vsádkovém uspořádání a v mikročipu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

Mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Mikrozkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Analytické váhy SBC 32 (Scaltec Instrumental GmbH, Gottingen, Německo)

Rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

Hamiltonova stříkačka (Hamilton, Reno, NV, USA)

pH metr PT-370 (Boeco, Hamburg, Německo)

Systém pro kontrolu mikrofluidního průtoku (LabSmith, CA, USA)

ChipGenie edition P (Chipshop, Jena, Německo)

Chip eP1 (Chipshop, Jena, Německo)

Koncentrátor RVC 2-18 (Christ, Psterode am Harz, Německo)

Ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Berlín, Německo)

Blokový termostat TS-100C (Biosan, Riga, Lotyšsko)

Elektroforetická aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Zdroj pro elektroforézu Powerpac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Hmotnostní spektrometr MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

3.2 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Chemikálie:

Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

N,N'-Methylenbisakrylamid 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dodecylsulfát sodný (SDS; Fluka, Buchs, Switzerland)

Kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, CZ)

Persíran amonný (Lachema, Neratovice, CZ)

N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Glycin (Merck, Darmstadt, Německo)

Precision Plus Protein™ nebarvený standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Roztoky:

Roztok A: 30% směs akrylamidu a bisakrylamidu

Roztok B: 1,5M Tris-HCl pufr pH 8,8

Roztok C: 1,0M Tris-HCl pufr pH 6,8

Roztok D: 10% roztok SDS

Roztok E: 10% roztok persíranu amonného

TEMED (N, N,N,N-tetramethylenethylendiamin)

Roztok G: 100mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4% SDS, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří

Elektrokový pufr: 0,025M Tris, 0,192M glycin s 0,1% SDS pH 8,3 – 8,6

Pracovní postup:

V první řadě byla sestavena aparatura a skla byla umístěna do držáku pro přípravu gelů. Následně byl připraven 12% dělicí gel podle tabulky č. 3. Roztok byl napipetován mezi skla a převrstven destilovanou vodou. Zhruba 30 minut se gel nechal zpolymerizovat. Jakmile gel zpolymeroval byla destilovaná voda odsáta filtračním papírem a byl připraven 5% zaostřovací gel, podle totožné tabulky. Zaostřovací gel byl napipetován až k okraji skel a mezi skla byla vložena šablona s jamkami. Gel se nechal zpolymerovat. Takto připravená skla s gelem byla vyjmuta ze stojánku a přemístěna do elektroforetické vany. Skla jsou do držáku umístěna tak, aby kratší skla byla naproti sobě a bylo možné převrstvit je elektrodoým pufrem. Do elektroforetické vany byl elektrodoý pufir nalit po rysku, podle počtu analyzovaných gelů. Po zalití pufrem byla vyjmuta šablona a vytvořené jamky byly promyty elektrodoým pufrem, aby se vypláchly případné zbytky gelu.

Tabulka 3 – Objemy roztoků pro přípravu polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE

	10% dělicí gel (ml)	5% zaostřovací gel (ml)
Destilovaná voda	2	1,4
Roztok A	1,65	0,33
Roztok B	1,25	-
Roztok C	-	0,25
Roztok D	0,05	0,02
TEMED	0,002	0,002
Roztok E	0,05	0,02

Příprava vzorku:

K 10 μ l vzorku byl napipetován stejný objem roztoku G, směs byla promíchána a tři minuty povařena v blokovém termostatu. Hamiltonovou stříkačkou byly do jednotlivých jamek pipetovány vzorky po 15 μ l. Standard byl dávkován v objemu 7 μ l. Mezi vzorky byla stříkačka promývána ethanolem a destilovanou vodou.

Elektroforetické dělení:

Elektroforetická nádoba byla uzavřena víkem a dělení bylo provedeno při konstantním napětí 180 V a s proudem 30 mA na jeden gel. Elektroforetické dělení probíhalo tak dlouho, dokud čelo značené bromfenolovou moří nedoputovalo téměř na úroveň dolního okraje skel.

Po odpojení zdroje byly skla vyjmuty z aparatury a gel byl velmi opatrně přenesen do Petriho misky.

Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant blue:

Roztoky:

Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol

Roztok pro barvení gelu: Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Postup:

Gel v Petriho misce byl promyt destilovanou vodou a na 1 hodinu převrstven fixačním roztokem. Následně byl gel rehydratován 30 min v destilované vodě a 1x promyt destilovanou vodou, aby došlo k odstranění kyseliny octové. K promytému gelu byl přidán roztok pro barvení Bio-Safe™ Coomassie Stain 30-50 ml. Gel byl ponechán v roztoku po dobu 1 hodiny. Poté byl barvicí roztok vylit do odpadu a gel byl zhruba 1 hodinu odbarvován destilovanou vodou.

3.2.1 Tris-tricin-SDS-PAGE

Chemikálie:

Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

N,N'-metylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

SDS (Fluka, Buchs, Switzerland)

Persíran amonný (Lachema, Neratovice, CZ)

N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tricin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Roztok A: 49,5% T, 3% C – 48% (w/v) akrylamid a 1,5% (w/v)

Roztok B: 3,0M Tris-HCl pH 8,45 s 0,3% SDS (gelový pufr)

Roztok C: 10% (w/v) persíran amonný

Roztok D: TEMED

Tris-Tricine pufr pro vzorky (Bio-Rad): 200mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glycerol, 2% SDS, 0,04% Coomassie Blue G250 (komerční)

Elektrodotový pufr: 0,1M Tris, 0,1M tricin, 0,1% SDS

Postup:

Byla sestavena aparatura a skla byla umístěna do držáku totožně jako v kapitole 4.3.

Dělicí a zaostřovací gel byl připraven podle tabulky č. 4.

Tabulka 4 – Objemy roztoků pro přípravu gelů pro Tricin-SDS-PAGE

	Dělicí gel (ml) (Mr 1-70 kDa) tj. 16,5% T, 3% C	Zaostřovací gel (ml)
Destilovaná voda	2,1	1,666
Roztok A	0,25	1,666
Roztok B	0,775	1,666
Roztok C	0,025	0,025
Roztok D	0,0025	0,0025

Od kapitoly 3.2 se postup liší použitým elektrodotovým pufrům a k přípravě vzorků se používá Tris-tricine pufr pro vzorky. Dávkované objemy se neliší. Samotné elektroforetické dělení probíhalo 30 minut při konstantním napětí 30 V a při proudu 30 mA na jeden gel. Po zatažení vzorků do dělicího gelu byla aparatura přesunuta do lednice (4 °C) a hodnota napětí byla zvýšena na 100 V. Elektroforetické dělení probíhalo za těchto podmínek dokud čelo obarvené bromfenolovou modří nedoputovalo téměř k dolnímu okraji skel. Vyjmutí gelů a barvení bylo provedeno podle kapitoly 3.2.

3.3 Analýza vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie

3.3.1 Odsolení a aplikace vzorků pro analýzu pomocí MALDI LTQ Orbitrap XL

Částice:

OLIGO™ R3 nosič (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Chemikálie:

Acetonitril (ACN; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB; LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie)

Kyselina fosforečná (Merck, Darmstadt, Německo)

Roztoky:

80% ACN/0,1% TFA

0,1% TFA

Roztok DHB matrice (10 mg/ml 50% ACN/0,1% TFA + 1% kyselina fosforečná)

Pracovní postup:

Odsolení probíhalo na laboratorně připravených mikrokolonkách. Ty byly vytvořeny z GELoader špiček, které byly naplněny suspenzí reverzní fáze OLIGO R3 tak aby délka kolonky nepřesahovala 1,5 cm. Kolonka byla promyta 10 µl roztoku 80% ACN/0,1% TFA a následně 15 µl 0,1% TFA. Vzorky byly do mikrokolonky napipeptovány v objemu 20 µl a vzorek byl potlačen kolonkou. Následovalo promytí 15 µl 0,1% TFA k vymytí nečistot a solí. Navázané vzorky byly z kolonky eluovány pomocí 1 µl roztoku matrice a přímo nanášeny na MALDI (Ionizace laserem za účasti matrice) destičku.

Analýza vzorků pomocí MALDI LTQ Orbitrap XL

Veškeré analýzy na hmotnostním spektrometru byly prováděny školitelem a následně byly poskytnuty výsledky, které byly dále zpracovány ve spolupráci se školitelem.

3.4 Zavádění magnetických částic do mikrofluidního systému

Roztoky:

Promývací roztok: PBS pufr pH 7,4

Skladovací roztok: PBS pufr pH 7,4 s 0,05% azidem sodným

Magnetické částice:

SeraMag Speed Beads, COOH, průměr 0,816 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Si-Mag, NH₂, průměr 0,750 μm (Chemicell, Berlín, Německo)

Magnetické nanočástice Fe₃O₄@SiO₂ s -NH₂, průměr 100-200 nm (Ústav organické chemie a technologie, FCHT, Univerzita Pardubice)

Postup:

Ze zásobního roztoku testovaných magnetických částic v suspenzi bylo odebráno potřebné množství nosiče. Následně byly částice promyty 5 x 1 ml PBS pufrům pH 7,4 s pomocí magnetického separátoru. Používaný čip o velikosti kanálku 120 μl byl umístěn do fixačního rámečku ChipGenie a připojen k zařízení pro kontrolu mikrofluidního průtoku od společnosti LabSmith. Prázdný čip byl promyt 2 x 2 ml promývacího roztoku. Vstupy a výstupy, které nebyly aktuálně používány byly uzavřeny svorkami. Vzápětí byl do komůrky čipu postupně aplikován Hamiltonovou stříkačkou 1 mg promytých magnetických částic v objemu suspenze 200 μl. Hamiltonova pipeta uložena v držáku a rychlost dávkování byla upravována s pomocí závaží. Částice v čipu byly promyty 1 ml promývacího roztoku. Dávkování je zobrazeno na obrázku č.23. Po provedení analýzy byly částice v čipu opět promyty dle potřeby promývacím roztokem a z čipu vyjmuty. Nosič byl skladován v 500 μl skladovacího roztoku při 4 °C.

3.5 Štěpení α-kaseinu TPCCK - trypsinem a porovnání vsádkového a mikrofluidního uspořádání

3.5.1 Imobilizace trypsinu na magnetické částice

Magnetické částice:

SeraMag Speed Beads, COOH, průměr 0,816 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Si-Mag, NH₂, průměr 0,750 μm (Chemicell, Berlín, Německo)

Magnetické nanočástice Fe₃O₄@SiO₂ s -NH₂, průměr 100-200 nm (Ústav organické chemie a technologie, FCHT, Univerzita Pardubice)

Chemikálie:

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

N-hydroxysuccinimide (Sulfo-NHS; Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Enzym:

TPCK-trypsin z hovězího pankreatu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

(vázáno 50 µg resp. 500 µg na 1 mg částic)

Roztoky

0,1M fosfátový pufr pH 7,3

Zásobní roztok benzamidinu: 5mg/0,5 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,3

Zásobní roztok trypsinu: 1 mg/1 ml destilované vody

Roztok EDAC: 7,5 mg rozpuštěno v 200 µl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3

Roztok sulfo-NHS: 1,25 mg v 200 µl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3

Skladovací roztok: 0,1M fosfátový pufr pH 7,3 s 2mM benzamidinem a 0,05% azidem sodným

Postup:

Ze zásobního roztoku bylo odebráno potřebné množství magnetických částic (2,5 mg) a byly promyty 5 x 1 ml 0,1M fosfátového pufru. Pro vazbu trypsinu byla použita 2. kroková metoda se Sulfo-NHS. K 2,5 mg promytých částic bylo přidáno 7,5 mg EDAC ve 200 µl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3 a 1,25 mg Sulfo-NHS ve 200 µl stejného pufru. Aktivace funkčních skupin byla prováděna 10 minut při pokojové teplotě a otáčení na rotátoru. Současně bylo 10 minut inkubováno 470 µl roztoku TPCK-trypsinu s 30 µl zásobního roztoku benzamidinu. Po inkubaci následovalo promytí částic 1 x 1 ml fosfátového pufru. K preaktivovaným částicím bylo přidáno 500 µl roztoku trypsinu s benzamidinem a doplněno fosfátovým pufrem na celkový objem 1 ml. Inkubace probíhala přes noc při 4°C a otáčení na rotátoru.

Následující den byly pomocí magnetického separátoru odstraněny nenavázané složky a nosič byl promyt 10 x 1 ml fosfátového pufru. U všech testovaných částic byla stanovena aktivita vázaného enzymu a zbytek nosiče byl uskladněn v příslušném skladovacím roztoku.

Pro imobilizaci nanočástic byl postup mírně upraven. Procesu imobilizace předcházela resuspendace a promytí částic v 1 ml ultračisté vody a vzorek byl ultrazvukován po dobu 30 minut. Následovalo promytí 5 x 1 ml 10mM fosfátového pufru pH 7,3 s 0,3% TWEEN 20 a 2 x 1 ml 10mM fosfátového pufru pH 7,3. 10mM fosfátový pufr pH 7,3 byl používán po celou dobu imobilizace. Postup a množství jednotlivých látek je totožný s výše uvedeným.

3.5.2 Stanovení aktivity TPCK-trypsinu imobilizovaného na magnetických částicích

Chemikálie:

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Chlorid vápenatý (Penta, Praha, ČR)

N- α -benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid hydrochlorid (BAPNA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

N,N-dimethylformamid 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Kyselina octová 99% (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

Roztoky:

Promývací a ředící roztok: 0,1M Tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,025M CaCl₂

Roztok TPCK-trypsinu: 1 mg TPCK-trypsinu v 1 ml ředícího roztoku

Substrátový roztok: 0,055M BAPNA v N,N-dimethylformamidu

Zastavovací roztok: 30% kyselina octová

Enzym:

TPCK-trypsin z hovězího pankreatu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

Do zkumavek o objemu 1,5 ml bylo odebráno 0,2 mg připravených magnetických částic s imobilizovaným TPCK-trypsinem. Částice byly promyty 5 x 1 ml promývacího roztoku a resuspendovány ve 100 μ l promývacího roztoku. Nejdříve byla připravena kalibrační řada solubilního TPCK-trypsinu o celkovém objemu 100 μ l koncentracích 0,1; 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 11; 13 a 15 μ g/100 μ l. K roztokům kalibrační řady i k roztokům s částicemi s imobilizovaným TPCK-trypsinem byl přidán 1 ml ředícího roztoku a 20 μ l substrátového roztoku. Následovala inkubace ve tmě po dobu 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po proběhnutí inkubace byla reakce zastavena přidáním 200 μ l zastavovacího roztoku. Pomocí magnetického separátoru byly odtaženy magnetické částice a z jednotlivých vzorků bylo odebráno v 200 μ l na mikrotitrační destičku. Absorbance jednotlivých roztoků byla změřena na spektrofotometru

při vlnové délce 405 nm. Z rovnice kalibrační přímky bylo následně vypočteno množství imobilizovaného TPCK-trypsinu na magnetických částicích.

3.5.3 Štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem ve vsádkovém uspořádání

Magnetické částice:

SeraMag Speed Beads, COOH, průměr 0,816 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Si-Mag, NH_2 , průměr 0,750 μm (Chemicell, Berlín, Německo)

Magnetické nanočástice $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ s $-\text{NH}_2$, průměr 100-200 nm (Ústav organické chemie a technologie, FCHT, Univerzita Pardubice)

Chemikálie:

Hydrogenuhlíčan amonný (Lachema, Neratovice, CZ)

Kyselina trifluoroctová (TFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

50mM NH_4HCO_3

5% TFA

Vzorek:

α -kasein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

K analýze byl použit α -kasein, u kterého není nutná redukce a alkylace. Aby byl poměr aktivního navázaného enzymu a α -kaseinu 1:20, bylo použito 1 mg připravených částic od každého druhu. 1 mg částic s imobilizovaným TPCK-trypsinem bylo odebráno do zkumavek a byly promyty 4 x 1 ml 50mM NH_4HCO_3 . Následně byl k promytým částicím přidán připravený roztok α -kaseinu (1 mg v 500 μl 50mM NH_4HCO_3). Na rotátoru byla při laboratorní teplotě provedena inkubace. V průběhu inkubace byly odebrány jednotlivé frakce štěpeného α -kaseinu po 10 μl v čase 15 minut, 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 3 hodiny, 5 hodin a 20 hodin. Celkem tedy bylo odebráno sedm frakcí, které byly následně okyseleny 2 μl 5% TFA. Získané vzorky byly analyzovány pomocí Tris-tricinové SDS-PAGE a jako doplňková metoda byla použita hmotnostní spektrometrie.

3.5.4 Štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem v mikročipovém uspořádání

Magnetické částice:

SeraMag Speed Beads, -COOH, průměr 0,816 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Si-Mag, -NH₂, průměr 0,750 μm (Chemicell, Berlín, Německo)

Magnetické nanočástice Fe₃O₄@SiO₂ s -NH₂, průměr 100-200 nm (Ústav organické chemie a technologie, FCHT, Univerzita Pardubice)

Chemikálie:

NH₄HCO₃ (Lachema, Neratovice, CZ)

TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

50mM NH₄HCO₃

5% TFA

Vzorek:

α -kasein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

Předem připravené magnetické částice s imobilizovaným TPCK-trypsinem (500 μg na 1 mg částic) byly promyty a zavedeny do komůrky čipu v množství 1 mg na základě postupu 3.4. Místo PBS pufru byl použit 0,1M fosfátový pufr pH 7,3. Poté byly částice v čipu promyty 1 ml 50mM NH₄HCO₃ při průtoku 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Následovalo dávkování vzorku. Bylo zachováno stejné množství α -kaseinu ve vzorku jako v případě vsádkového uspořádání, tedy 1 mg v 500 μl 50mM NH₄HCO₃. Vzorek byl na nosič nanášen při průtoku 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se zpožděním 120 μl byly odebírány čtyři frakce po 125 μl . Tyto frakce byly okyseleny dle potřeby 5% TFA, aby dále nedocházelo ke štěpení. Hned po nanesení vzorku byly částice promyty 400 μl roztoku hydrogenuhličitanu amonného. Prvních 50 μl bylo dávkováno ještě při průtoku 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Poté byl průtok zvýšen na 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vzorky získané z analýzy v čipu byly hodnoceny totožně jako v případě analýzy ve vsádkovém uspořádání. Použité magnetické částice byly z čipu vyjmuty, promyty a uloženy ve skladovacím roztoku.

3.6 Fosforylace peptidového substrátu a zavedení automatického testování operační stability imobilizované kinázy

3.6.1 Imobilizace proteinkinázy A na magnetické částice s -COOH funkční skupinou

Magnetické částice:

SeraMag Speed Beads, -COOH, průměr 0,816 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Chemikálie:

2-(N-Morfolin-4-yl)ethansulfonová kyselina (C₆H₁₃NO₄S) (MES; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina (HEPES; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

Dithiotreitol (DTT; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

Ethylenglykol-bis-2-aminoethylether-N,N,N,N-tetraoctová kyselina (EGTA; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

EDAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Sulfo-NHS (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

Enzym:

Proteinkináza A (myšší c-AMP-dependentní proteinkináza, typ α, 0,68 mg/ml) (PKA; Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Německo)

Roztoky

0,5M MES pufr pH 6,0

50mM MES pufr pH 6,0

40mM HEPES pufr pH 7,2

Postup:

Ze zásobního roztoku byly do zkumavky odebrány 2 mg magnetických částic v suspenzi. Byly promyty 5 x 1 ml 50mM MES pufru o pH 6,0. Poté byly aktivovány funkční skupiny na nosiči, a to tak, že k promytým magnetickým částicím bylo přidáno 165 µl 0,5M MES pH 6,0, 990 µl redestilované vody, S-NHS (3,63 mg/330 µl ddH₂O) a EDAC (3,3 mg/165 µl ddH₂O). Inkubace probíhala na rotátoru 30 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byly částice promyty 1 x 1 ml 0,5M MES pH 6,0 a 1 x 1 ml 50mM MES pH 6,0. K promytým částicím bylo přidáno 594 µl 50mM MES pH 6,0 s 0,05% BSA a 5,9 µl PKA (4 µg). Inkubace probíhala přes noc při 4°C a otáčení na rotátoru. Po inkubaci následovalo promytí 3 x 50mM MES pH 6,0 a 4 x 40mM HEPES pH 7,2. Takto připravené částice byly skladovány v 500 µl HEPES pufru pH 7,2 při 4°C.

3.6.2 Fosforylace peptidového substrátu ve vsádkovém uspořádání

Magnetické částice:

SeraMag Speed Beads, -COOH, průměr 0,816 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s imobilizovanou PKA

Chemikálie:

ATP (10 mM, BioLabs, New England, USA)

Kemptide: peptidový substrát (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA)

NaOH (Penta, Chrudim, CZ)

HEPES (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

DTT (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

EGTA (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Promývací a skladovací roztok: 40mM HEPES pH 7,2

Reakční roztok: 40mM HEPES pH 7,2 + 5mM MgCl₂ + 2mM DTT + 5mM EGTA

Postup:

1 mg magnetických částic s imobilizovanou PKA bylo promyto 3 x 1 ml promývacího roztoku. K promytým částicím bylo přidáno 180 µl reakčního pufru, 10 µl ATP a 10 µl peptidového substrátu Kemptide. Fosforylace probíhala za mírného třepání při 25 °C 30 minut. Pomocí magnetického separátoru byly přitaženy magnetické částice a byl odebrán vzorek s fosforylovaným substrátem. Ten byl okyselen 5% TFA a ponechán k následné analýze na hmotnostním spektrometru. Částice byly promyty 3 x 500 µl promývacího roztoku a ve skladovacím roztoku byly skladovány při 4°C.

3.6.3 Fosforylace peptidového substrátu v mikročipovém uspořádání a operační stabilita***Magnetické částice:***

SeraMag Speed Beads, -COOH, průměr 0,816 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s imobilizovanou PKA

Chemikálie:

ATP (10mM, BioLabs, New England, USA)

Kemptide: peptidový substrát (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA)

NaOH (Penta, Chrudim, CZ)

HEPES (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

DTT (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

EGTA (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

Promývací a skladovací roztok: 40mM HEPES pH 7,2

Reakční roztok: 40mM HEPES pH 7,2 + 5mM MgCl₂ + 2mM DTT + 5mM EGTA

Vzorek:

47 µl reakčního pufru + 3 µl ATP + 10 µl Kemptide

Postup:

Podle postupu v kapitole 3.4, byly zavedeny magnetické částice s navázanou PKA do čipu. Místo PBS pufru byl použit 40mM HEPES pufr o pH 7,2. Částice v čipu byly promyty 200 µl promývacího roztoku a 200 µl reakčního pufru. Oba roztoky jsou dávkovány do čipu při průtoku 50 µl/min. Po promytí bylo na nosič v čipu dávkováno 60 µl vzorku. Prvních 25 µl bylo dávkováno při průtoku 50 µl/min než bylo dosaženo lože částic v čipu. Poté byl průtok snížen na 2 µl/min. Při tomto průtoku bylo po nanesení vzorku do čipu dávkováno ještě 40 µl reakčního pufru. Dalších 10 µl reakčního pufru bylo dávkováno při průtoku 50 µl/min. Následovalo promytí 200 µl promývacího roztoku a 150 µl reakčního pufru. Obojí při průtoku 50 µl/min. Postup byl podle potřeby opakován až 8x tak, aby bylo možné testovat operační stabilitu částic.

3.7 Izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů**3.7.1 Imobilizace anti-ovalbuminových protilátek na magnetické mikročástice s -COOH funkční skupinou*****Magnetické částice:***

SeraMag Speed Beads, -COOH, průměr 0,816 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Chemikálie:

EDAC (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA)

Sulfo-NHS (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

MES (Sigma-Aldrichm St. Louis, MO, USA)

PBS pufr pH 7,4

Protilátky

Monoklonální protilátky proti ovalbuminu (vázáno 100 µl na 1 mg částic)

Roztoky:

0,1M MES pH 5,0

PBS pufr pH 7,4

0,05% TFA

Postup:

Postup byl zahájen promytím magnetických částic, které byly do zkumavky odebrány ze zásobního roztoku. Promytí proběhlo 5 x 1 ml 0,1M MES pufru. Pro vazbu anti-ovalbuminových protilátek byla použita 2. kroková imobilizační technika. K promytným částicím bylo přidáno 7,5 mg EDAC ve 250 μ l 0,1M MES pufru a 1,25 mg S-NHS ve 250 μ l 0,1M MES pufru. Takto připravený roztok s částicemi byl inkubován na rotátoru 10 minut při laboratorní teplotě. Preaktivované částice byly promyty 1 x 1 ml 0,1M MES pufru. Poté bylo k částicím přidáno 100 μ l zásobního roztoku anti-ovalbuminu a 900 μ l MES pufru. Vzápětí bylo odebráno 20 μ l původního vzorku k následné elektroforetické analýze. Částice s protilátkami byly inkubovány 20 hodin při 4 °C a otáčení na rotátoru. Po uplynutí této doby byly odstraněny nenavázané složky a 20 μ l z vazebné frakce bylo opět ponecháno k analýze. Částice byly promyty 3 x 1 ml 0,1M MES pufrům a odebráno 20 μ l promývací frakce. Další promývání probíhalo 4 x 1 ml PBS pufru pH 7,4. Byla provedena kyselá eluce přidáním 500 μ l 0,05% TFA – 15 minut při otáčení na rotátoru, po odseparování částic byl odebrán vzorek eluční frakce. Závěrečné promytí částic bylo provedeno 5 x 1 ml PBS pufru pH 7,4. Připravený nosič byl resuspendován v 500 μ l PBS pufru a byl k němu přidán azid sodný. Nosič byl skladován při 4 °C. Kontrola vazby byla kontrolována pomocí SDS-PAGE s 10% gelem.

3.7.2 Vsádková izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinu pomocí specifického imunisorbentu

Magnetické částice

SeraMag Speed Beads, -COOH, průměr 0,816 μ m (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s imobilizovanými anti-ovalbuminovými protilátkami

Roztoky:

0,1M fosfátový pufr pH 7,0

0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 1M NaCl

0,01M fosfátový pufr pH 7,0

PBS pufr pH 7,4

Eluční roztok: 0,05% TFA

Skladovací roztok: PBS pufr pH 7,4 + 0,05% azid sodný

Vzorek proteinů:

Standardní směs proteinů: ovalbumin, BSA, α -kasein, konkanavalin A - v 1,5 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 (200 μ g každého proteinu v 1 ml).

Postup:

Ze suspenze připravených částic s imobilizovanými anti-ovalbuminovými protilátkami byl odebrán 1 mg alikvot. 1 mg částic byl promyt 5x 1ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0. Na 1 mg promytého imunosorbentu byl nanášen 1 ml vzorku při otáčení na rotátoru po dobu 1,5 hodiny při laboratorní teplotě. Část původního vzorku byla ponechána k analýze. Po inkubaci bylo odebráno 200 μ l roztoku vazebné frakce. Částice byly promyty 10 x 1 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 a první promývací frakce byla v objemu 200 μ l taktéž ponechána. Promývání pokračovalo 5 x 1 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 s 1M NaCl a 5 x 1 ml 0,01M fosfátovým pufrům pH 7,0. Následovala eluce, která byla provedena přidáním 200 μ l 0,05% TFA a částice byly s elučním roztokem inkubovány na rotátoru za mírného otáčení po dobu 15 minut. Eluce byla opakována ještě 2x a po každé inkubaci byla odebrána eluční frakce o objemu 200 μ l. Po eluci byl nosič regenerován 2 x 1 ml elučního roztoku a první regenerační frakce byla ponechána k analýze. Imunosorbent byl promyt 5 x 1 ml PBS pufru a v 500 μ l skladovacího roztoku byl uschován při 4 °C pro další aplikace.

3.7.3 Mikrofluidní izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů pomocí specifického imunosorbentu

Magnetické částice

Magnetické částice SeraMag® s -COOH funkční skupinou (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s imobilizovanými anti-ovalbuminovými protilátkami

Roztoky:

0,1M fosfátový pufr pH 7,0

0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 1M NaCl

0,01M fosfátový pufr pH 7,0

PBS pufr pH 7,4

Eluční roztok: 0,05% TFA

Skladovací roztok: PBS pufr pH 7,4 + 0,05% azid sodný

Vzorek proteinů:

Standardní směs proteinů: *ovalbumin, BSA, α -kasein, konkanavalin A* - v 1,5 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 (400 μ g každého proteinu na 1 ml).

Postup:

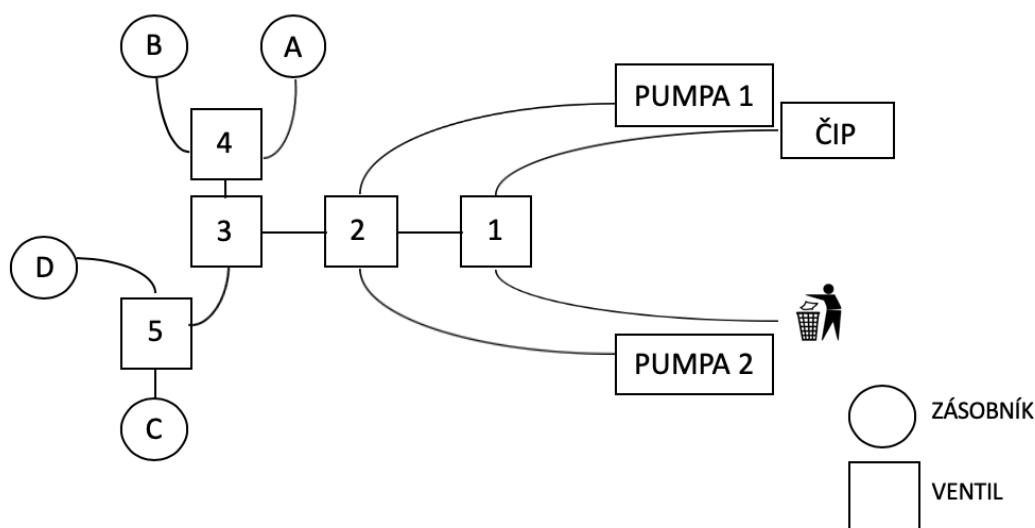
Připravený nosič s navázanými anti-ovalbuminovými protilátkami byl vnesen do čipu podle postupu v kapitole 4.3. Promytí částic bylo provedeno v čipu, a to dávkováním 1 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 při průtoku 60 μ l/min. Po promytí následovala aplikace připravené směsi proteinů. Vzorek byl nanášen v objemu 500 μ l na 1 mg imunosorbentu v čipu při průtoku 9 μ l/min. Část původního vzorku a vzorek vazebné frakce byly ponechány k elektroforetické analýze. Vazebná frakce byla odebírána se zpožděním 50 μ l. Po nanesení celého objemu vzorku byly částice v čipu promyty 1 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0. První promývací frakce byla odebírána se zpožděním 50 μ l a v objemu 200 μ l ponechána. Dále byl imunosorbent promyt 600 μ l 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 s 1M NaCl a 400 μ l 0,01M fosfátového pufru pH 7,0. Všechny promývací kroky probíhaly při průtoku 60 μ l/min. Následovala eluce nanesením 300 μ l 0,05% TFA při průtoku 15 μ l/min. Jednotlivé eluční frakce byly jímány se zpožděním 50 μ l v objemu 100 μ l. Sběr elučních frakcí byl ukončen v polovině promývání zředěným puftrem, který byl nanášen v objemu 100 μ l při stejném průtoku. Analýza byla zakončena promytím imunosorbentu 500 μ l 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 při průtoku 60 μ l/min. Po vyjmutí nosiče z čipu byly částice promyty ještě 2 x 1 ml PBS pufru a byly uloženy ve skladovacím roztoku ve 4 °C.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Sestavení vhodného schématu pro využití mikrofluidních pump a ventilů pro bioanalytické aplikace ve vybraném mikrofluidním čipu

Při zahájení experimentální části práce bylo prvním úkolem seznámit se s mikrofluidním zařízením pro řízení a kontrolu průtoku od společnosti LabSmith. Součástí systému μ Process je software verze 1.46 a hardware, který zahrnuje jak programovatelné injekční pumpy SPS01, tak automatizované ventily řady AV a snímače tlaku. Tento systém umožňuje ovládání a monitorování mikrofluidních systémů přes počítač. Důležité bylo zjistit možnosti, které nám tento systém nabízí, aby byly bioanalytické aplikace co nejlépe a uživatelsky přívětivě převedeny do čipu.

Nejdříve bylo sestaveno schéma a byly zaznamenány polohy ventilů (na obrázku č. 11 a 12 zobrazeny jako čtverce 1-6) při čerpání roztoků z jednotlivých zásobníků (na obrázku č. 11 a 12 znázorněny jako kolečka A-E). Ventily mohou být otevřeny buď v poloze A nebo opačně v poloze B. Pokud je ventil zavřený, nachází se v poloze X. Nastavení ventilů je pro čerpání a dávkování každou pumpou jiné (tab. 5). Nejjednodušší zapojení je použito u pumpy 3, která je zapojena samostatně a je používána pouze pro zásobník E (obr. č. 12). V jejím případě probíhá čerpání ze zásobníku pokud je ventil (6) v poloze A, a pro dávkování je ventil přepnut do polohy B. V tabulce č. 5 jsou polohy ventilů značeny zleva doprava pro ventily 1-5.



Obrázek 11 – Schéma zapojení zásobníků, ventilů a pump na platformě pro nasávání a dávkování roztoku do čipu či do odpadu

Tabulka 5 – Nastavení pozic ventilů pro nasávání a dávkování roztoku do čipu či do odpadu pumpou 1 a 2

PUMPA 1

Zásobník A

- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	B	B	B	X
A	A	B	B	X
B	A	B	B	X

Zásobník B

- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	B	B	A	X
A	A	B	A	X
B	A	B	A	X

Zásobník C

- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	B	A	X	A
A	A	A	X	A
B	A	A	X	A

Zásobník D

- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	B	A	X	B
A	A	A	X	B
B	A	A	X	B

PUMPA 2

Zásobník A

- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	A	B	B	X
A	B	B	B	X
B	B	B	B	X

Zásobník B

- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	A	B	A	X
A	B	B	A	X
B	B	B	A	X

Zásobník C

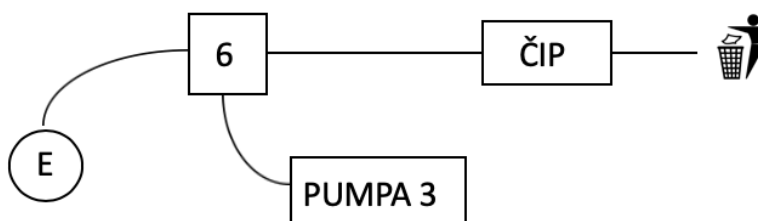
- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	A	A	X	A
A	B	A	X	A
B	B	A	X	A

Zásobník D

- Napouštění
- Čip
- Odpad

A	A	A	X	B
A	B	A	X	B
B	B	A	X	B



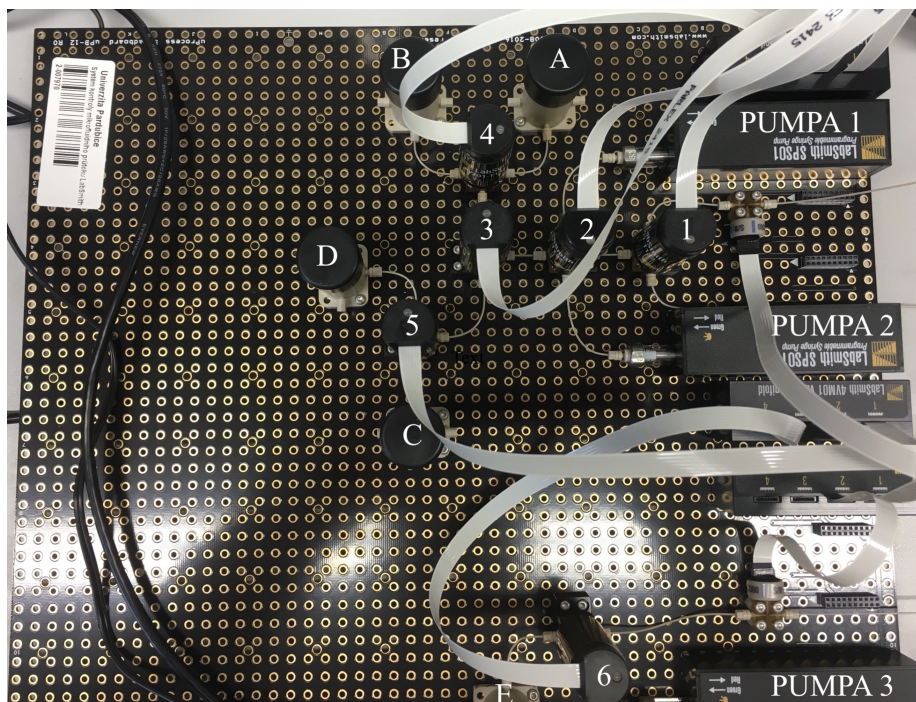
PUMPA 3

- Napouštění
- Čip

A
B

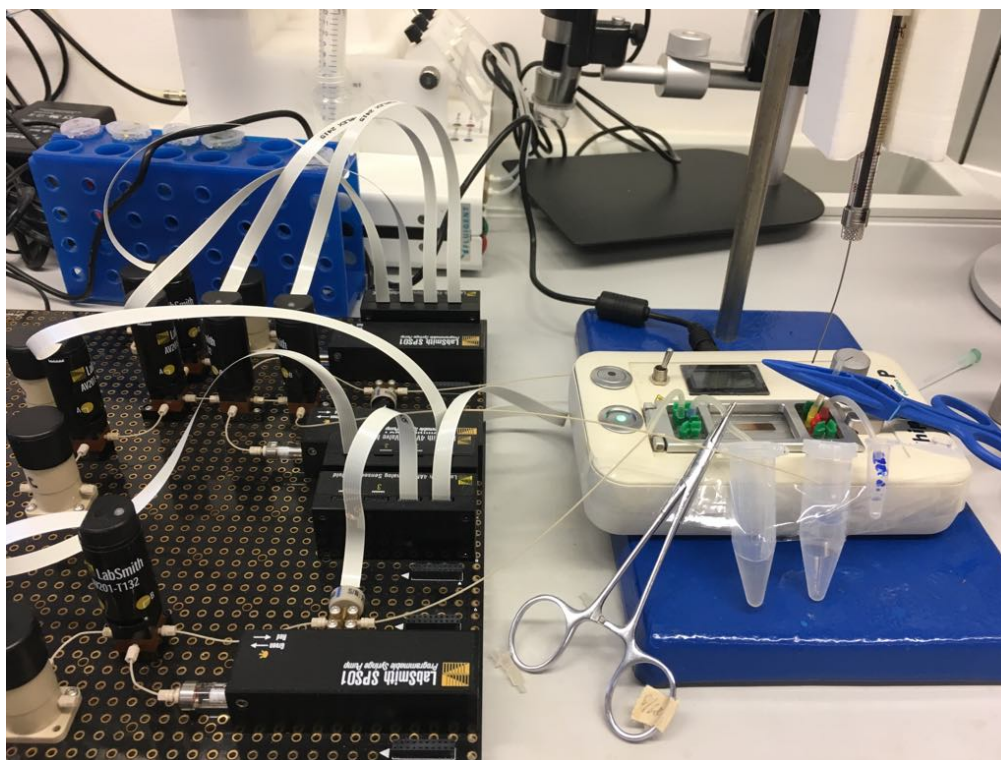
Obrázek 12 - Schéma zapojení a ovládání ventilů pro nasávání a dávkování roztoku ze zásobníku E pumpou 3

Pumpy 1-3 jsou vybaveny skleněnými nástavci o objemu 100 μl a mohou čerpat a dávkovat kapaliny při průtoku 0,073 až 2800 $\mu\text{l}/\text{min}$. (obr. 13)



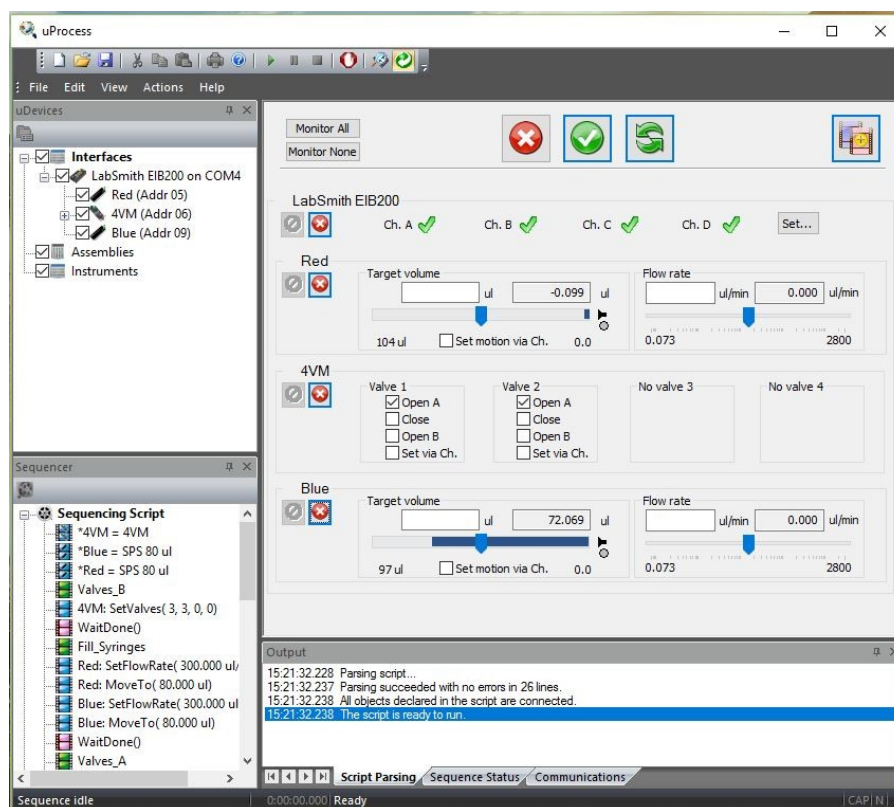
Obrázek 13 - Ukázka zapojení pump a ventilů na platformě

Mikrofluidní čip fixovaný v zařízení ChipGenie s magnetickým míchadlem je s platformou propojen hadičkami, které jsou přes těsnění zapojeny do vstupu u kanálku (obr. 14).



Obrázek 14 - Propojení platformy pro nastavení a kontrolu průtoku společnosti LabSmith s čipem v magnetickém zařízení ChipGenie

Na obrázku č. 15 je uvedena ukázka prostředí softwaru μ Process, který umožňuje nejen nastavit a monitorovat tlaky a průtoky v mikrofluidním systému, ale také naprogramovat a uložit protokoly s nastavením tak, aby mohly být opakovaně spuštěny.

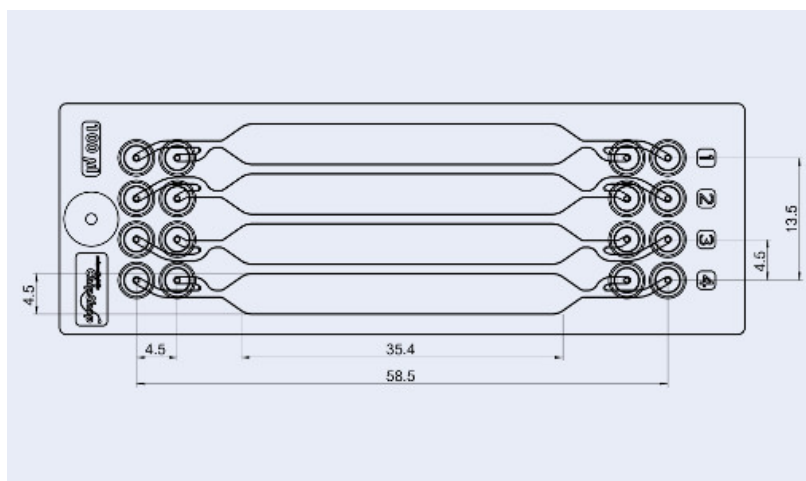


Obrázek 15 - uProcess software společnosti LabSmith

4.1.1 Experimenty s barevnými roztoky

Dalším postupem bylo nastavení promývacích kroků. Před a po každé aplikaci bylo nutné promýt všechny zásobníky, pumpy a hadičky dostatečným množstvím destilované vody, aby se zamezilo kontaminaci a ucpávání hadiček, například z důvodu krystalizace solí.

Vybraný mikročip eP1 firmy ChipShop (Jena, Německo) byl vybrán s ohledem na objem injekční pumpy SPS01. Tento čip byl vyroben z polymethylmetakrylátu (PMMA) a obsahuje 4 komůrky. Každá o objemu 100 μ l. Jednotlivé komůrky mají každá 2 vstupy a 2 výstupy, viz obrázek č. 16. Pro prvotní experimenty s mikrofluidním systémem a jeho adekvátní nastavení byly zvoleny potravinářské barvy.



Obrázek 16 - Schéma čipu ePI (ChipShop, Jena, Německo) se čtyřmi kanálky o objemu 100 μl

Celkem byly použity čtyři potravinářské barvy (žlutá – zásobník A, zelená – B, červená - C a žlutá - D). Naprogramovány byly zkušební demo verze pro zapojení pump. Jako první bylo testováno zapojení pumpy 1 s využitím pouze jednoho vstupu do čipu. Z každého zásobníku bylo postupně dávkováno do čipu 100 μl od každé barvy. Jakmile byl naprogramován funkční protokol, bylo možné měřit čas, za který jedna pumpa nadávkuje všechny barvy o daném objemu do čipu a následně jej porovnat s časem dávkování při využití pumpy 1 i 2 současně. Nadávkování všech čtyř barev jednou pumpou při průtoku 500 $\mu\text{l}/\text{min}$. trvalo 1 minutu a 50 vteřin. Při stejném průtoku a zapojení obou pump, kdy jedna čerpala, zatímco druhá dávkovala, byla doba nadávkování všech barev zkrácena o více než polovinu na 48 vteřin.

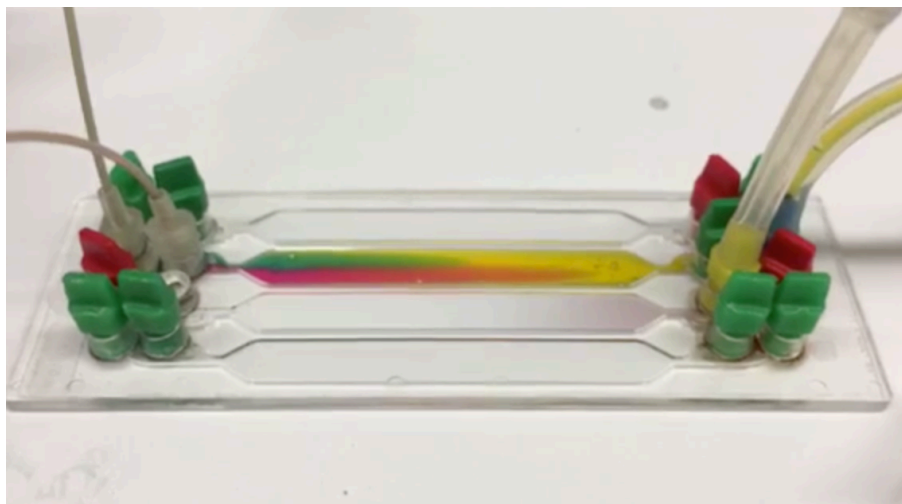
Během prvního experimentu byla pozorována kontaminace dávkované barvy barvou předchozí, která zůstávala v hadičkách. Z toho důvodu byla vytvořena modifikace původního nastavení. A to tak, že mezi dávkování barev do čipu byl vložen mezikrok, v němž bylo 20 μl barvy vždy vypuštěno do odpadu, aby byly vyplaveny zbytky předchozí barvy z hadiček.

Dále bylo testováno zapojení pumpy 1 a 2, každé do jiného kanálku v čipu. A bylo nastaveno střídání jednotlivých barev. V jednom kanálku byly dávkovány barvy za sebou v pořadí zelená, červená, žlutá, modrá a v druhém žlutá, modrá, červená, zelená.

Dalším testovaným postupem bylo zapojení třetí pumpy do systému tak, že byl její vývod zapojen do druhého vstupu kanálku čipu. Jak je patrné ze schématu (obr. č. 12), pumpa 3 může čerpat pouze ze zásobníku E. Do zásobníku E byla nadávkována destilovaná voda. 100 μl destilované vody bylo dávkováno do kanálku čipu vždy po 100 μl jedné z barev a bylo pozorováno vymývání barev destilovanou vodou. Při tomto postupu bylo zjištěno, že 100 μl destilované vody není dostatečné pro úplné vymytí barvy z kanálku. A byl tedy navýšen objem na 250 μl .

Poslední nastavení obsahovalo výměnu destilované vody v zásobníku E za červenou barvu. Přívod z pumpy 3 byl napojen na stejný kanálek a červená barva byla vpouštěna druhým vstupem mezi každou barvou dávkovanou pumpou 1. Docházelo tedy ke střídání barev v jedné komůrce při zapojení všech tří pump (obr. č. 17)

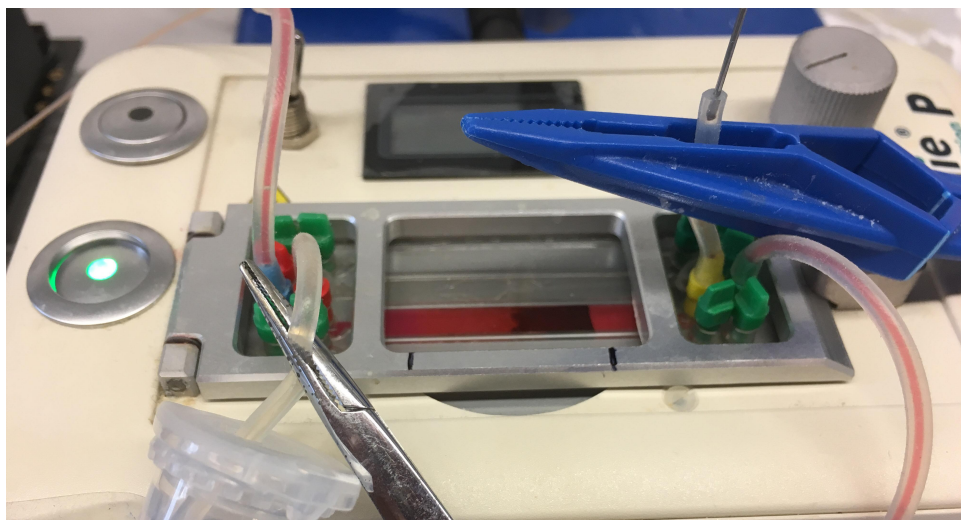
Tyto experimenty sloužily k ověření nastavení všech ventilů a injekčních pump. A zároveň k seznámení se se systémem a jeho chováním. Barevné roztoky byly použity kvůli jejich snadné vizuální detekci.



Obrázek 17 - Experimenty s barevnými roztoky – pumpa 3 dává červenou barvu vstupem blíže ke kanálku, zatímco pumpa 1 dává zelenou barvu

4.1.2 Stanovení mrtvých objemů mikrofluidního systému

Dalším podstatným úkolem bylo stanovení mrtvých objemů daného mikrofluidního systému s již aplikovanými magnetickými částicemi. Stanovení mrtvých objemů je důležité hlavně pro určení přesného času pro odběr vzorku (potřebné frakce). Mikročip byl zafixován v rámečku zařízení ChipGenie, které obsahuje lineárně se pohybující magnet zajišťující promíchávání částic. Pro stanovení mrtvých objemů byla použita červená barva, a aby byly zaznamenány mrtvé objemy shodné s těmi v následujících experimentech, byly do čipu aplikovány magnetické částice SeraMag v množství 1 mg podle postupu v kapitole 3.4 (obr. č. 18). Magnetické částice byly odebrány ze zásobní suspenze, promyty PBS puřem a obsah zkumavky byl doplněn na 500 μ l. Nebyla prováděna žádná biofunkcionalizace.



Obrázek 18 - Červená barva dávkována přes 1 mg magnetických částic SeraMag při stanovení mrtvých objemů

Prvním zaznamenávaným údajem z tohoto experimentu byl objem kapaliny (červené barvy), která projde systémem přesně k začátku hmoty částic. Rozsah, ve kterém se pohybují částice v čipu pomocí míchadla zabudovaného v zařízení ChipGenie, je znázorněn černými svislými čárkami na obrázku č. 18. Tento objem byl 35 μl a byl stanoven z času, za který červená barva doputovala k magnetickým částicím a z průtoku, při kterém byla barva dávkována. Stejným způsobem byl zaznamenán také objem kapaliny procházející oblastí, ve které se pohybovalo lože 1 mg magnetických částic. Tento objem byl stanoven také na 35 μl . Červená barva na konci odpadní hadičky byla poprvé zaznamenána po protečení 120 μl na pumpě. V závěru experimentu byla přes magnetické částice v čipu dávkována destilovaná voda, aby bylo možno zaznamenat úplné vymytí barvy z částic. Potřebné množství destilované vody bylo stanoveno na 250 μl , aby došlo k viditelnému promytí.

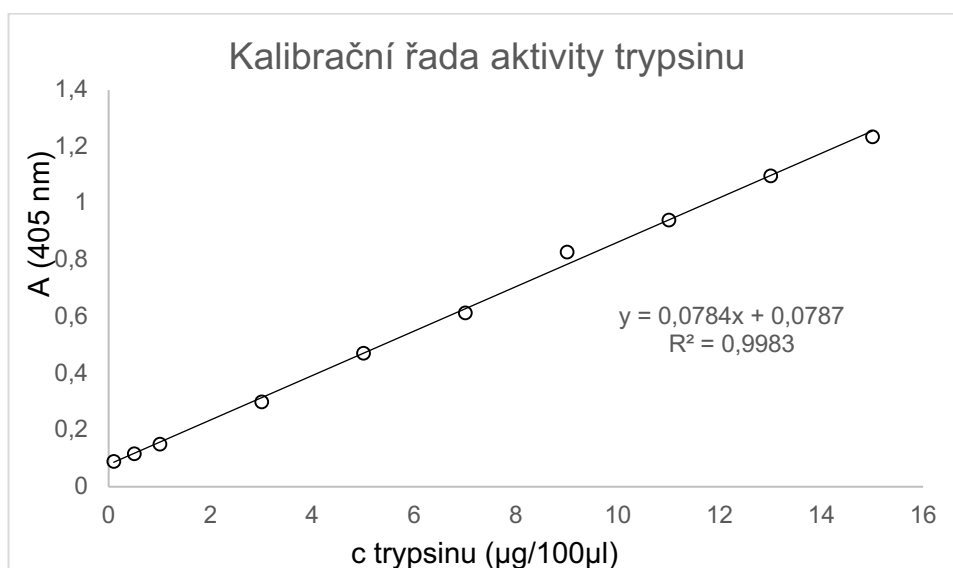
4.2 Štěpení α -kaseinu trypsinem imobilizovaným na magnetických částicích

Po seznámení se všemi prvky sestaveného mikrofluidního systému bylo možno přistoupit k první aplikaci. Byl použit proteolytický enzym trypsin imobilizovaný na magnetické částice SeraMag, Si-Mag a nanočástice. Modelovým proteinem k proteolýze byl zvolen α -kasein. Štěpení proteinů trypsinem je charakteristické tím, že štěpí pouze na karboxylovém konci lysinu a argininu, pokud po nich nenásleduje prolin.

Imobilizace TPCK-trypsinu na magnetické částice byla provedena podle postupu v kapitole 3.5.1. Byly testovány dvě koncentrace použité k imobilizaci trypsinu, a to 50 µg a 500 µg na 1 mg částic. U všech takto připravených nosičů byla stanovena aktivita navázaného trypsinu s použitím substrátu BAPNA podle postupu 3.5.2.

4.2.1 Stanovení aktivity imobilizovaného TPCK-trypsinu

Pro zjištění aktivity imobilizovaného trypsinu byla připravena kalibrační závislost absorbance na koncentraci trypsinu. Hodnoty naměřené absorbance kalibračních roztoků byly použity pro sestavení kalibrační přímky závislosti absorbance na koncentraci TPCK-trypsinu. Záznam této závislosti je vyobrazen v grafu č. 1.



Graf 1 – Graf závislosti absorbance na koncentraci TPCK-trypsinu

Po dosažení hodnot absorbance pro jednotlivé vzorky do rovnice kalibrační přímky, byla vypočtena koncentrace imobilizovaného enzymu. Pro přehlednost byly hodnoty absorbance a koncentrace navázaného trypsinu zaznamenány do tabulky č. 6. Koncentrace uvedena v µg/100µl je vztažena na 0,2 mg částic.

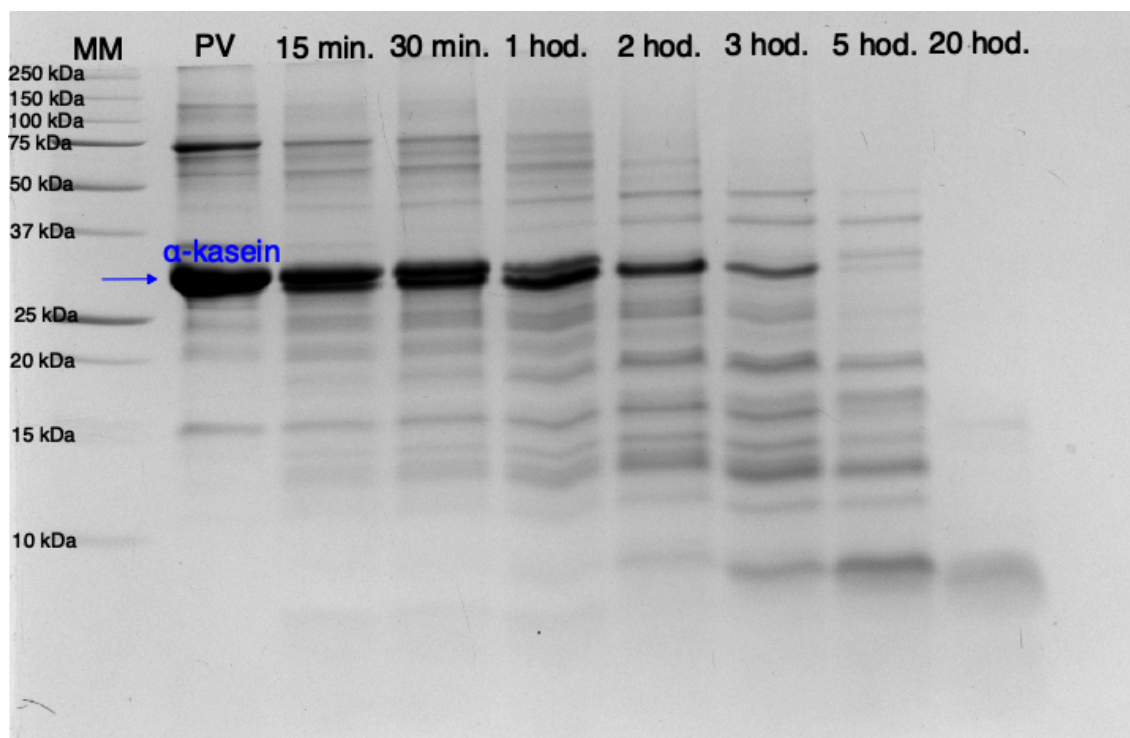
Tabulka 6 – Hodnoty vypočtených koncentrací trypsinu navázaného na MČ

	c (µg/100µl)	µg trypsinu/mg částic
Nanočástice (50µg/mg)	-	-
Nanočástice (500µg/mg)	1,3431	6,7155
Si-Mag (50µg/mg)	0,4630	2,3150
Si-Mag (500µg/mg)	2,6951	13,4755
SeraMag (50µg/mg)	1,2793	6,3965
SeraMag (500µg/mg)	8,7921	43,9605

Nejvyšší aktivitu navázaného trypsinu vykazovaly magnetické částice SeraMag. Částice Si-Mag vykazovaly o více než polovinu nižší aktivitu a u nanočástic byla koncentrace imobilizovaného TPCK-trypsinu zdaleka nejnižší. Skutečné množství navázaného trypsinu pro nanočástice s původně vázanými 50 μg trypsinu nemohla být vyčíslena, protože se hodnota absorbance nacházela mimo kalibrační řadu. Účinnost nosiče byla ověřována taktéž provedením štěpení ve vsádkovém uspořádání podle postupu v kapitole 3.5.3. Všechny připravené nosiče s imobilizovaným TPCK-trypsinem byly použity pro vsádkové štěpení α -kaseinu.

4.2.2 Štěpení α -kaseinu trypsinem imobilizovaným na magnetických částicích ve vsádkovém uspořádání

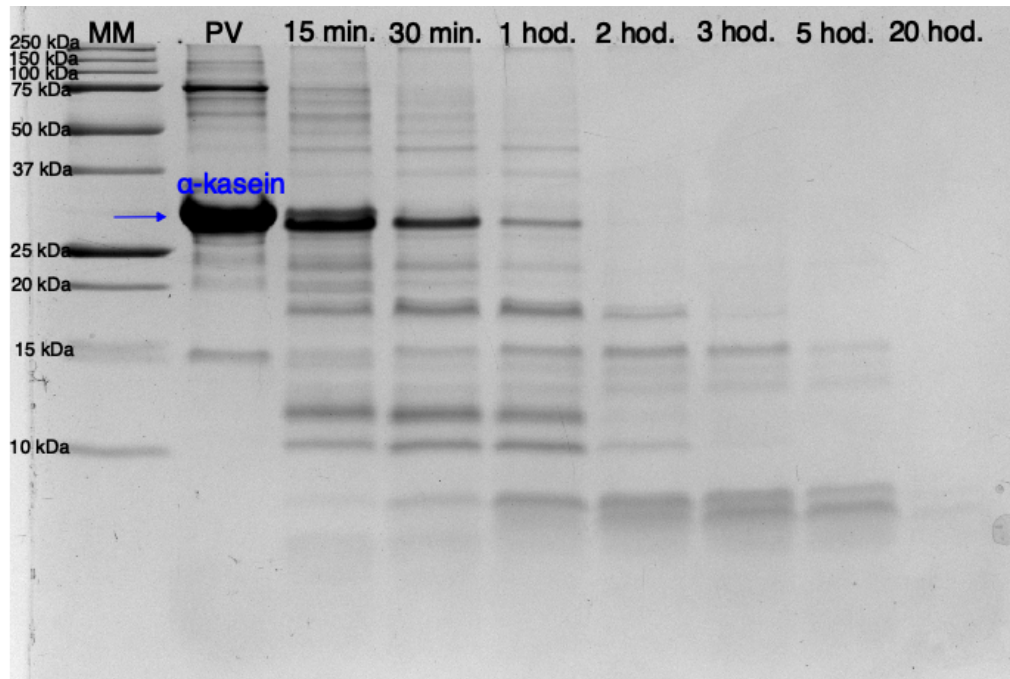
Nejdříve byly testovány částice s původním množstvím trypsinu 50 μg na 1 mg částic. Na obrázku č. 19 je zobrazen elektroforetický gel s produkty štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem na magnetických částicích SeraMag. Elektroforetické dělení α -kaseinu bylo prováděno podle postupu 3.2.1 a proteiny byly barveny Coomassie Brilliant Blue.



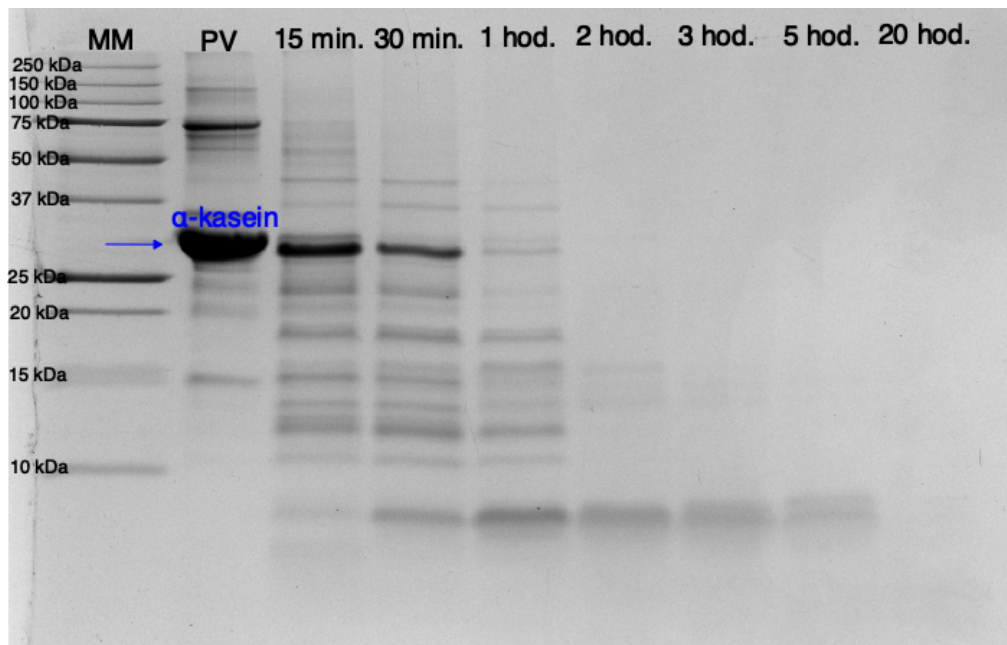
Obrázek 19 - Kontrola účinnosti štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ imobilizovaném na magnetických částicích SeraMag ve vsádkovém uspořádání metodou tricine SDS-PAGE

S narůstajícím časem byl patrný ztelný úbytek α -kaseinu a nárůst množství jeho fragmentů, avšak dostatečné naštěpení původního kaseinu bylo pozorováno až po pěti hodinách, kdy se však nacházelo ve vzorku velké množství fragmentů s vysokou molekulovou

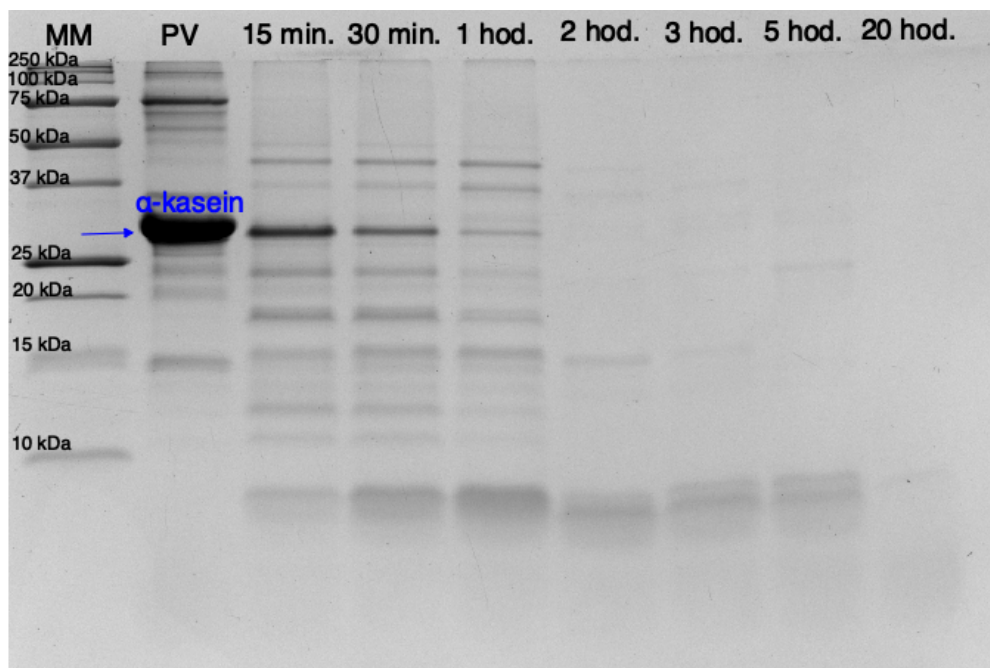
hmotností. Tyto fragmenty byly naštěpeny až po dvaceti hodinách inkubace. Z toho důvodu byla tato koncentrace vyhodnocena pro štěpení jako nedostatečná a dále byly v analýze používány pouze částice o původní koncentraci trypsinu 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (obr. č. 20 – 22).



Obrázek 20 - Kontrola účinnosti štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem o koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ na magnetických nanočásticích ve vsádkovém uspořádání metodou SDS-PAGE



Obrázek 21 - Kontrola účinnosti štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem o koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ na magnetických částicích Si-Mag ve vsádkovém uspořádání metodou SDS-PAGE



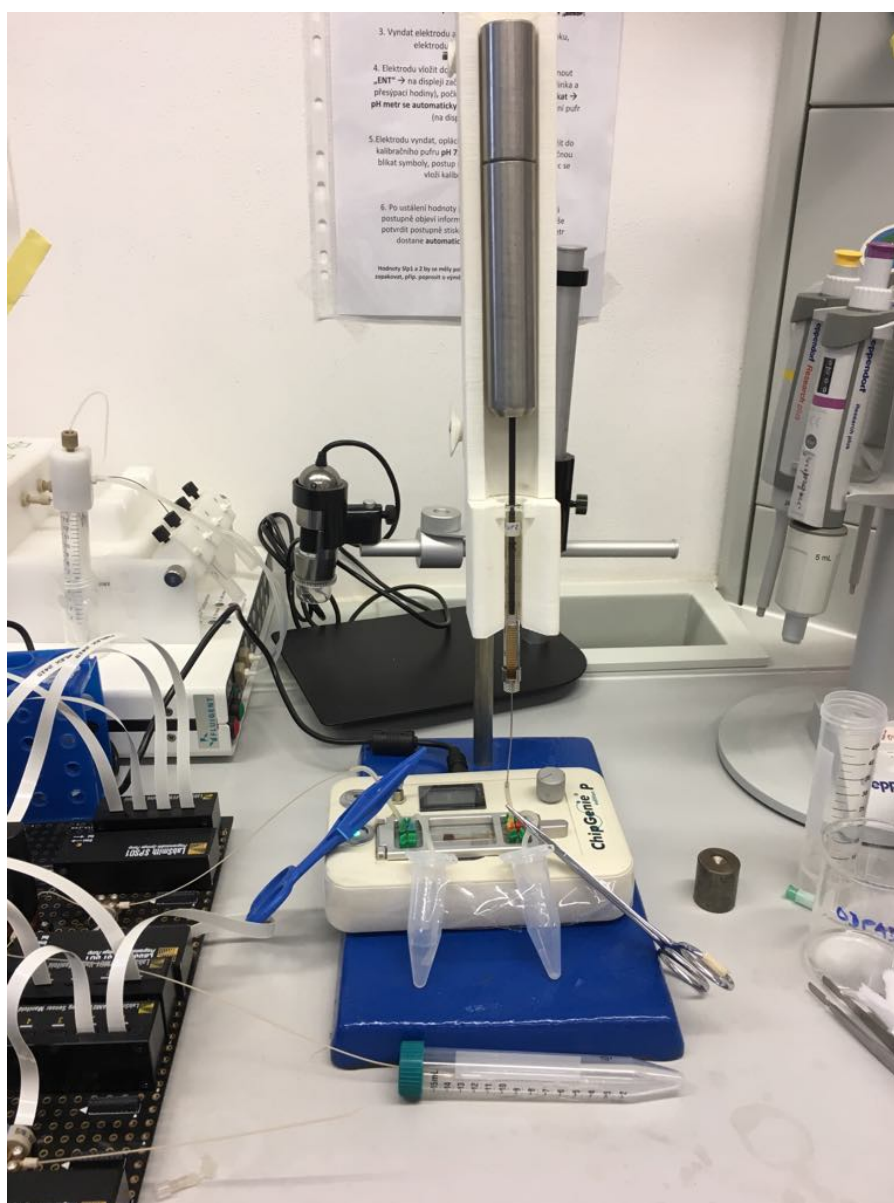
Obrázek 22 - Kontrola účinnosti štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem o koncentraci 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ na magnetických částicích SeraMag ve vsádkovém uspořádání metodou SDS-PAGE

Na obrázku č. 20 je zobrazen záznam elektroforetického dělení pro vzorky štěpení TPCK-trypsinem na magnetických nanočásticích. Výsledky odpovídaly údajům zjištěným při stanovení aktivity imobilizovaného enzymu na nosiči. Tedy že trypsin imobilizovaný na nanočásticích byl navázán s nejnižší účinností a tento nosič tak vykazoval nízkou proteolytickou aktivitu. Přesto výsledky vsádkového štěpení u nanočástic ukazují na mírnou proteolýzu. Již po třiceti minutách byl patrný výrazný úbytek vzorkového α -kaseinu. Po jedné hodině bylo štěpení takřka kompletní a po dvou hodinách nebyl na gelu zřetelný proužek odpovídající molekule α -kaseinu, jen větší fragmenty s vynechaným štěpným místem.

Obrázek č. 21 zobrazuje záznam elektroforetického dělení pro vzorky štěpení TPCK-trypsinem na magnetických částicích Si-Mag. Zde byly výsledky štěpení příznivější než v případě nanočástic. K téměř úplnému naštěpení vzorkového α -kaseinu došlo již po jedné hodině a po dvou hodinách byla patrná jen velmi slabá intenzita proužků odpovídajících neodštěpeným fragmentům. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo při štěpení α -kaseinu TPCK-trypsinem navázaným na magnetických částicích SeraMag (Obr. č. 22). Již po prvních patnácti minutách je vidět znatelný úbytek α -kaseinu ve vzorku a již po hodině je štěpení téměř kompletní. Tento výsledek byl poměrně překvapivý vzhledem k tomu, že na základě stanovení aktivity navázaného trypsinu vykazovaly MČ SeraMag více než dvojnásobnou aktivitu navázaného TPCK-trypsinu oproti částicím Si-Mag. Tento jev mohl být způsoben případnou agregací částic v prostředí 50mM NH_4HCO_3 , čímž byl zmenšen reakční povrch nosiče. Přesto byl α -kasein naštěpen s velmi vysokou účinností.

4.2.3 Štěpení α -kaseinu trypsinem imobilizovaným na magnetických částicích v mikrofluidním uspořádání

Jakmile byla prokázána funkčnost připravených nosičů, bylo možno přistoupit k převedení proteolýzy do mikrofluidního uspořádání. Analýza byla provedena podle postupu v kapitole 3.5.4. Nejprve byly zavedeny magnetické částice do čipu fixovaného v zařízení ChipGenie. Bylo postupováno na základě postupu v kapitole 3.4, který se osvědčil již při zavádění částic do čipu během experimentů s barvami. Bylo také velice nutné dbát na to, aby se do systému nedostala vzduchová bublina. Proces zavádění nosiče do čipu je zobrazeno na obrázku č. 23.



Obrázek 23 - Zavádění magnetických částic do čipu pomocí Hamiltonovy stříkačky a závaží

Mikrofluidní uspořádání má několik limitů, se kterými bylo potřeba počítat při úpravách protokolu pro jeho použití při mikročipové analýze. Limitující bylo například minimum i maximum použitých částic. Částice musely být do čipu dávkovány v dostatečném množství, aby bylo zajištěno rovnoměrné lože přes celou šířku čipu. Optimální množství částic bylo zvoleno na 1 mg.

V prostředí μ Process softwaru bylo na základě protokolu 3.5.4 naprogramováno ovládání pump a ventilů. Do experimentu byly zapojeny dvě pumpy (1 a 2) a byly využity pouze dva zásobníky. Zásobník A obsahoval 50mM NH_4HCO_3 a zásobník B obsahoval vzorek α -kaseinu. Finální verze nastavení je uvedena v příloze A tak, jak vypadá po naprogramování v aplikaci μ Process. Na záznamu jsou vidět polohy ventilů a průtoky nastavené pro čerpání a dávkování. Jednotlivé kroky jsou označeny s ohledem na možnost opakování analýzy jinou osobou než je ta, která protokol programovala. Průtok pro dávkování 50mM NH_4HCO_3 byl nastaven na 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ a pro dávkování vzorku byl zvolen průtok 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Konstantní průtok 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ měl zajistit dostatečnou dobu kontaktu vzorku s nosičem blížící se třem hodinám.

Během promývání magnetických částic v čipu 1 ml 50mM NH_4HCO_3 bylo zaznamenáno shlukování částic. Tento jev byl nejvýraznější u nanočástic a částic SeraMag. Nanočástice tvořily drobné shluky pohybující se v čipu díky magnetickému míchadlu zabudovanému v zařízení ChipGenie. Avšak nebylo zachováno rovnoměrné lože nutné k účinnému štěpení (Obr. č. 24). Částice SeraMag tvořily v prostředí 50mM NH_4HCO_3 kompaktní shluk velmi těžko se pohybující v čipu. Tím bylo zamezeno účinnému míchání (Obr. č. 25). Příznivější chování v prostředí roztoku hydrogenuhličitanu amonného vykazovaly částice Si-Mag. Přestože byla patrná mírná agregace částic, docházelo k rovnoměrnému přesunu částic čipem a částice byly rozprostřeny po celé šířce kanálku (Obr. č. 26).



Obrázek 24 - Chování nanočástic v prostředí 50mM NH_4HCO_3



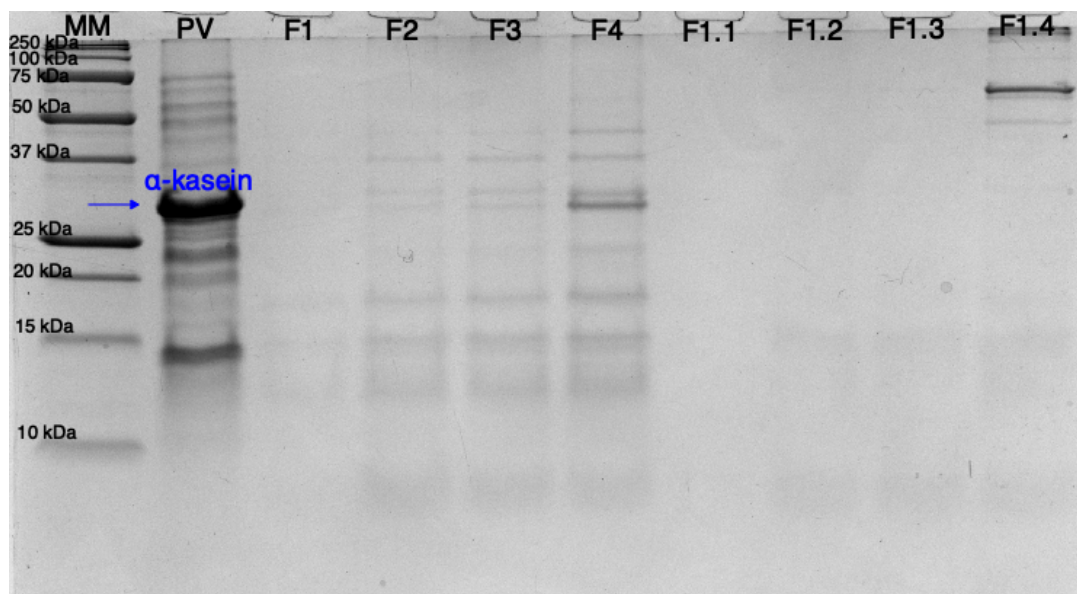
Obrázek 25 - Chování Seramag částic v prostředí 50mM NH_4HCO_3



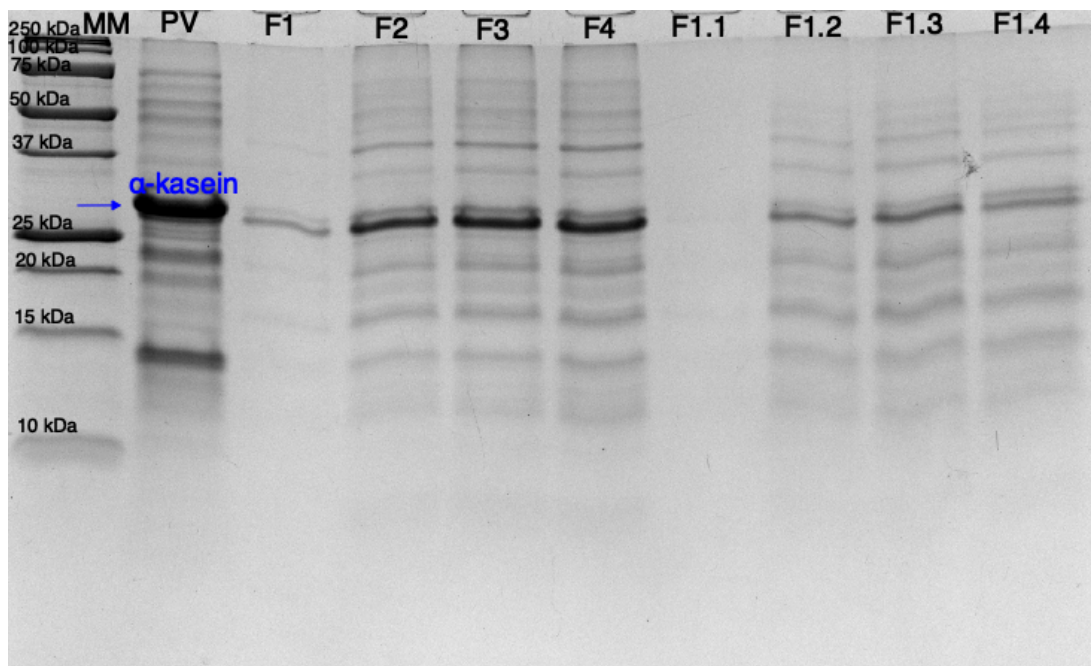
Obrázek 26 - Chování částic Si-Mag v prostředí 50mM NH_4HCO_3

K částicím s imobilizovaným trypsinem byl dávkován vzorek 1 mg kaseinu v 500 μl 50mM NH_4HCO_3 . Byly odebírány vždy čtyři frakce po 125 μl na obrázcích č. 27-29 značeny F1-F4. Sesbírané frakce byly ihned po odběru okyseleny 5% TFA. Pro srovnání byl v druhé analýze dávkován vzorek s 200 μg α -kaseinu v 500 μl 50mM NH_4HCO_3 . Počet frakcí a jejich objem byl zachován včetně následného okyselení. Na záznamech gelů elektroforetického dělení (obr. č. 27-29) jsou frakce z druhé analýzy značeny F1.1 až F1.4. První frakce byla nejspíš odebrána příliš brzy a výsledek štěpení je vidět pouze lehce. Protože ke sběru frakcí docházelo průběžně za kontinuálního dávkování vzorku při průtoku 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebyla možnost sledování štěpení v čase. Z toho důvodu by ve všech frakcích měly být detekovány totožné štěpné fragmenty. Na všech gelech jsou znatelné produkty štěpení a značný úbytek α -kaseinu v porovnání s původním vzorkem. Nicméně se výsledky štěpení s magnetickými částicemi Si-Mag a nanočásticemi zdaleka neblíží výsledkům získaným z experimentu ve vsádkovém uspořádání po třech hodinách.

Agregace MČ SeraMag v prostředí hydrogenuhličitanu zapříčinila nedostatečné promíchávání v bioreaktoru a bylo by vhodné povrch částic dále upravit, například vazbou polyethylenglykolu. Nižší účinnost štěpení mohl také ovlivnit fakt, že vzorek v čipu není po celou dobu reakce v kontaktu s nosičem a reálná doba štěpení je tedy kratší, přestože se blíží třem hodinám. Důvodem mohlo být také příliš silné magnetické míchadlo v zařízení ChipGenie, které zabránilo částicím pohybovat se ve vzhledu. Ze záznamu elektroforetického dělení na obrázku č. 27 je ale patrné, že štěpení proběhlo v pořádku i přes agregaci nosiče, což značí ztráta proužku pro původní vzorek kaseinu a v případě 200 µg vzorku došlo k naštěpení dlouhých fragmentů. To vedlo ke konstatování, že MČ SeraMag jsou vhodné pro tuto konkrétní analýzu prováděnou v mikročipu i přes jejich agregaci v prostředí 50mM NH₄HCO₃. Částice SeraMag vykazovaly nevyšší účinnost štěpení v obou typech uspořádání, což odpovídá výsledkům získaným při zjišťování aktivity navázaného trypsinu.

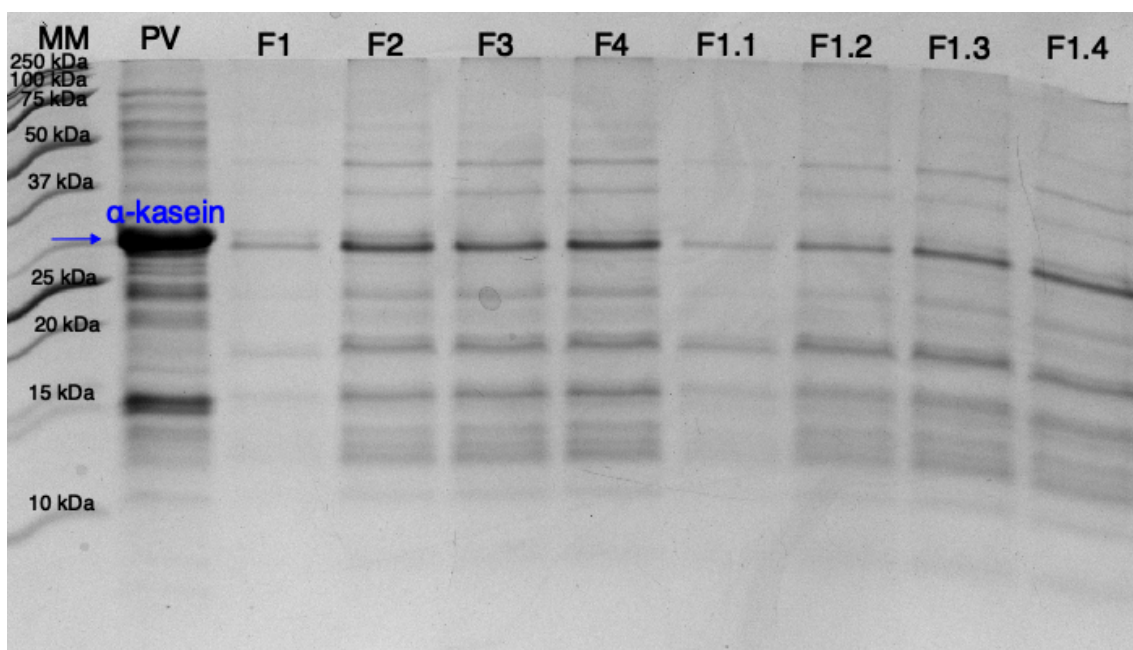


Obrázek 27 - Štěpení alfa-kaseinu (1 mg a 200 µg/500µl) TPCK-trypsinem na magnetických částicích SeraMag v čipu



Obrázek 28 - Štěpení alfa-kaseinu (1 mg a 200 $\mu\text{g}/500\mu\text{l}$) TPCK-trypsinem na magnetických částicích Si-Mag v čipu

Přestože magnetické částice Si-Mag vykazovaly nejlepší chování v průběhu analýzy v čipu, a oproti nanočásticím prokázaly vyšší účinnost během experimentu ve vsádkovém uspořádání, nedá se z výsledku elektroforetického dělení (obr. č. 28) tvrdit, že by docházelo k účinnějšímu štěpení α -kaseinu než v případě nanočástic (obr. č. 29). Z analýzy s nanočásticemi byly i přes shlukování v prostředí NH_4HCO_3 získány výsledky srovnatelné s výsledky získanými po jedné hodině štěpení ve vsádkovém uspořádání.



Obrázek 29 - Štěpení alfa-kaseinu (1 mg a 200 $\mu\text{g}/500\mu\text{l}$) TPCK-trypsinem na nanočásticích v čipu

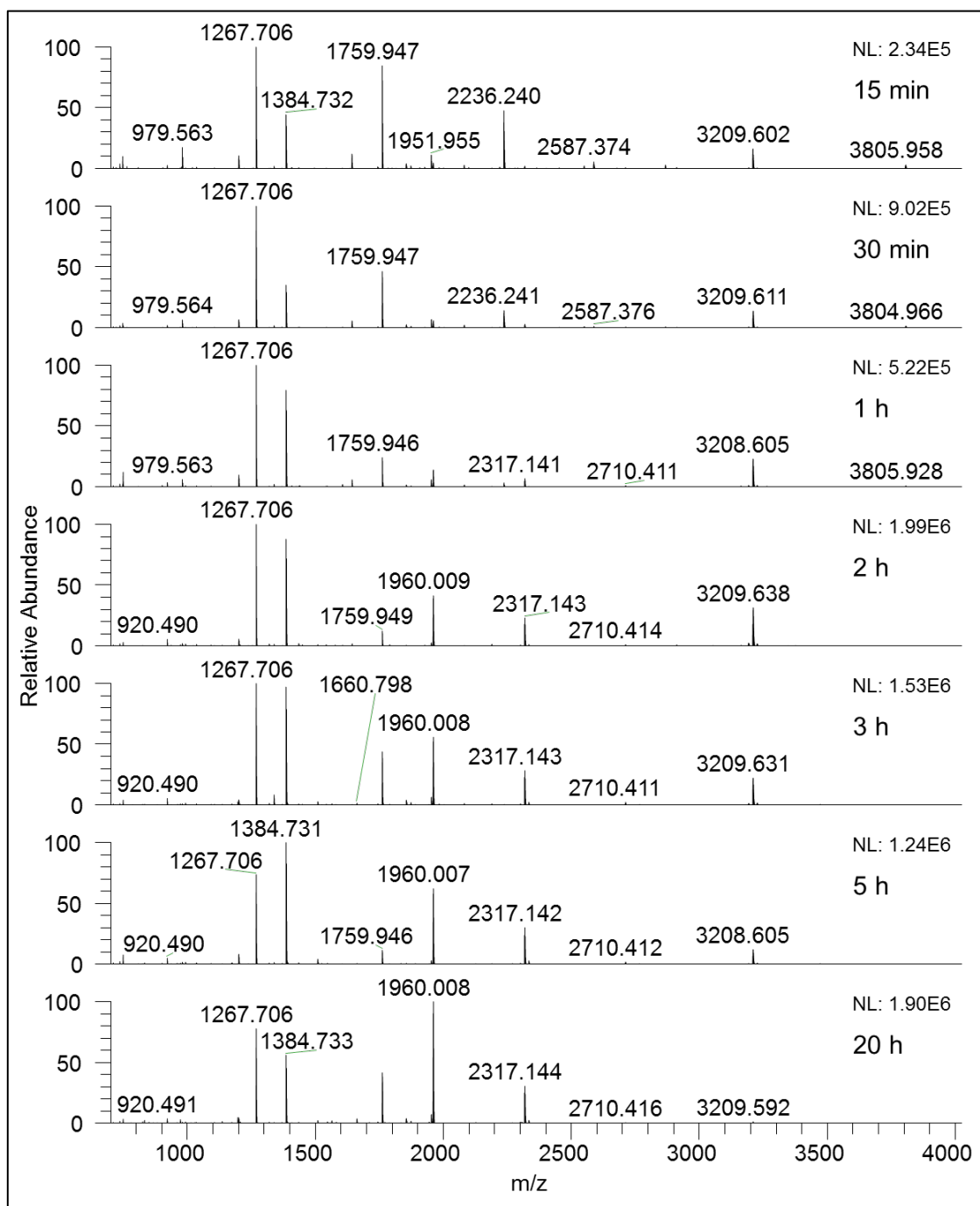
Ačkoliv výsledky štěpení z analýzy v mikročipu se mírně lišily od výsledků očekávaných na základě experimentů ve vsádkovém uspořádání, můžeme konstatovat, že byl experiment úspěšně převeden do mikrofluidního uspořádání. Toho bylo dosaženo díky možnosti nastavení pump a ventilů na platformě společnosti LabSmith. Naprogramovaný protokol byl uložen a je k dispozici pro další možnosti analýzy.

4.2.4 Analýza štěpeného α -kaseinu pomocí hmotnostní spektrometrie

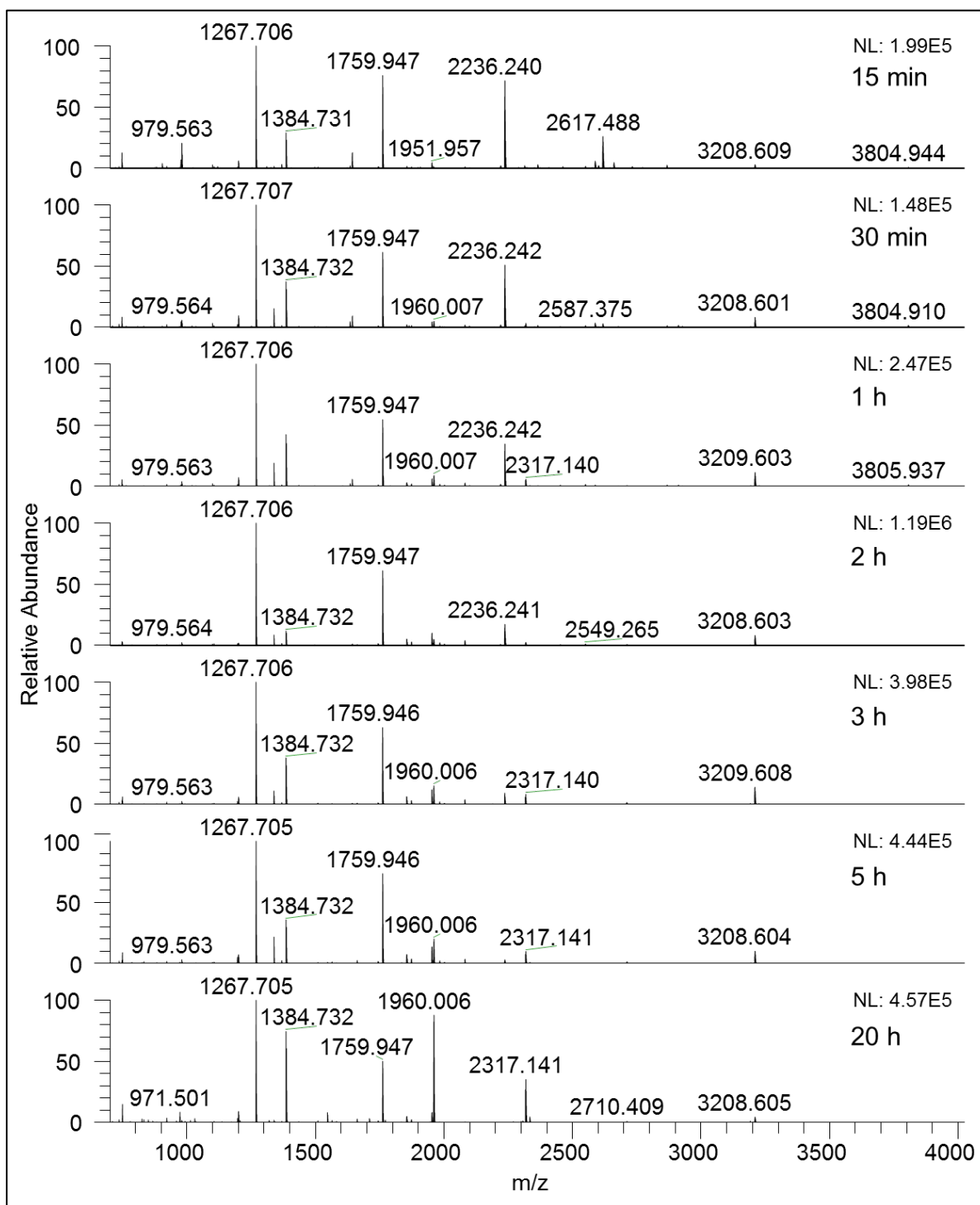
Vzorky uvedené v předchozí sekci byly podrobeny nejen analýze pomocí gelové elektroforézy, ale také analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Z každého vzorku bylo odebráno 40 pmol a tento vzorek byl připraven podle postupu v kapitole 3.3. Vzorky byly analyzovány pomocí MALDI LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu v rozsahu m/z 700-4000. Metoda hmotnostní spektrometrie je výhodná pro určení přítomnosti specifických a nespecifických fragmentů po štěpení. Trypsin štěpí specificky za argininem a lysinem (R a K) pokud nenásleduje prolin (P). Každý pík uvedený v hmotnostních spektrech (obr. č. 30-33) odpovídá určitému peptidu pocházejícímu z α -kaseinu. Specificita štěpení může být charakterizována pomocí hmotnostní spektrometrie, kdy je možné sledovat především nespecificky naštěpené peptidy a dále množství vynechaných štěpných míst v jednotlivých peptidech. Dále je možné určit pokrytí sekvence štěpeného proteinu po štěpení. Protein α -kasein se skládá ze dvou podjednotek, α -S1 a α -S2. V tabulce v příloze B je ukázána tabulka identifikovaných peptidů z obou podjednotek α -kaseinu pro druhou frakci štěpení v čipu trypsinem imobilizovaným na částicích SeraMag (1mg vstupního α -kaseinu). Dosažené pokrytí sekvence bylo 50,9% pro α -S1-kasein a 53,6% pro α -S2-kasein. Tyto hodnoty byly bohužel obdobné i pro ostatní vzorky, nezávisle na inkubační době a použitém přístupu. To lze vysvětlit tím, že je hmotnostní spektrometrie vysoce citlivá metoda a již při minimálním množství přítomného peptidu je možné jej detekovat. Peptidy s vynechaným štěpným místem mají navíc delší sekvenci a jejich přídavek do pokrytí sekvence je tak vyšší. Na základě pokrytí sekvence nelze tedy bohužel hodnotit kvalitu štěpení. Ta byla již poměrně dobře hodnocena v předchozí kapitole gelovou elektroforézou.

Zde byly vybrány pouze některé pomocné postupy a to je především poměr intenzit peptidů s jediným vynechaným štěpným místem a jeho již zcela naštěpenou variantou. I přes to že MALDI-MS v tomto případě není možné používat pro kvantifikaci a je nutné brát výsledky s určitou opatrností, trend je poměrně jednoznačný. Pro tyto účely byly vybrány páry 2235,241 (ve spektrech cca 2236,46 z důvodu označení druhého izotopu u vyšších m/z) který odpovídá sekvenci HPIK**H**QGLPQEVLENLLR a 1759,945 který odpovídá sekvenci

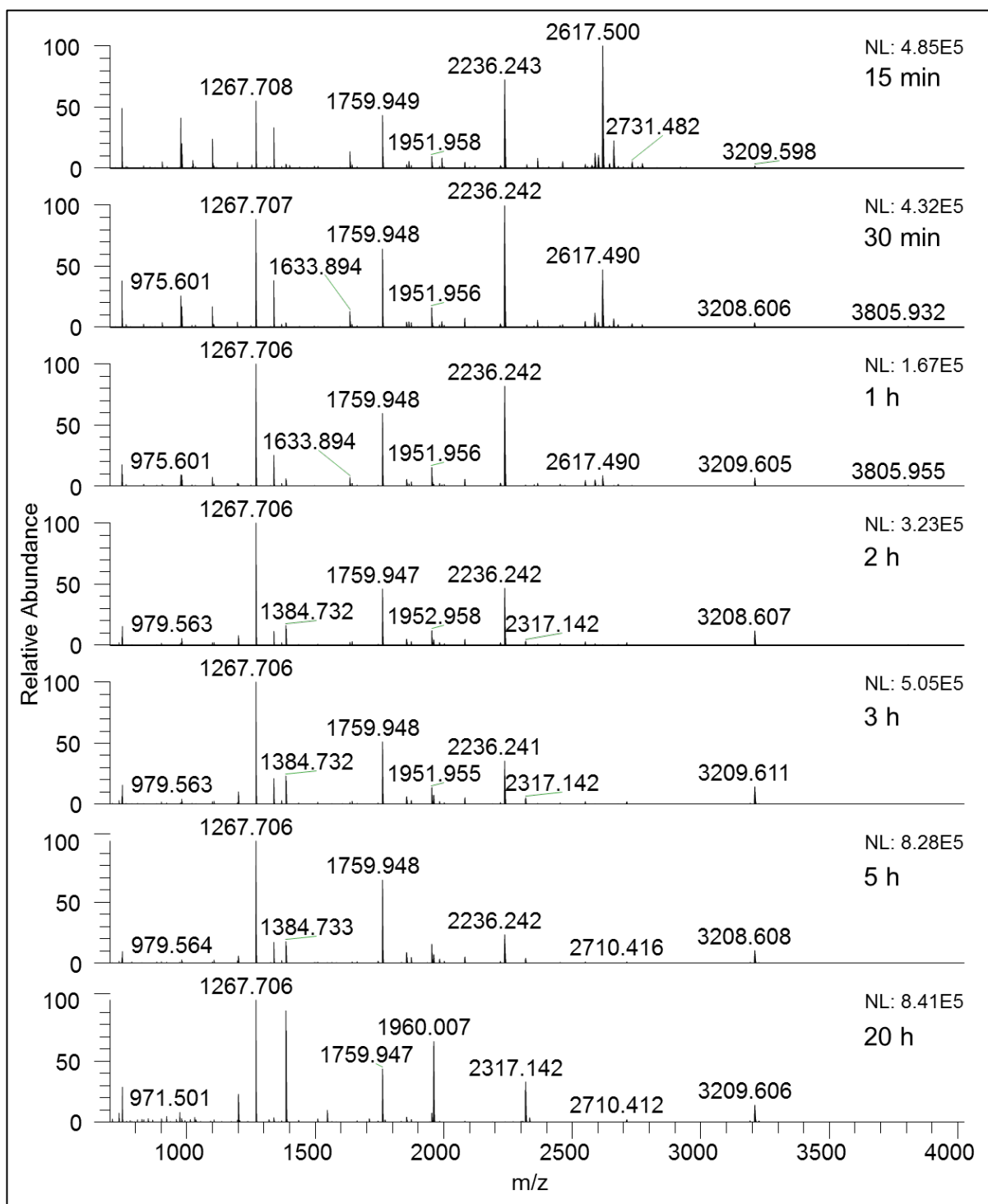
HQGLPQEVLENLLR. A dále to byl pík 3207,593 (ve spektrech přibližně 3209,61) odpovídající sekvenci EGIHAQQK EPMIGVQNQELAYFYPELFR a peptidy po úplném naštěpení 2316,137 EPMIGVQNQELAYFYPELFR (ve spektrech přibližně 2317,14) a 910,474 odpovídající sekvenci EGIHAQQK. Pík 910,474 je ale ve spektrech špatně viditelný, a tak byl hodnocen pouze pík 2316,137. Na obrázcích jsou vidět spektra naštěpeného α -kaseinu vsádkově imobilizovaným trypsinem na částicích SeraMag (obr. 30), Si-Mag (obr. 31) a nanočásticích (obr. 32). U částic Seramag je patrné, že dochází k nárůstu intenzit u obou variant i zcela naštěpených peptidů a také k úbytku intenzity pro peptidy s jedním vynechaným štěpným místem (m/z 3209,61 a 2236,46) a nárůstu intenzity 2317,14 (bez vynechaného štěpného místa). U částic Si-mag a nanočástic nejsou výsledky tak přesvědčivé pravděpodobně z důvodu počáteční nižší účinnosti štěpení. Nicméně pokles intenzity píku 2236,46 (jedno vynechané štěpné místo) a zároveň nárůst intenzity 2317,14 (bez vynechaného štěpného místa) je patrný i zde.



Obrázek 30 - Hmotnostní spektra naštěpeného α -kaseinu vsádkově imobilizovaným trypsinem na částicích SeraMag

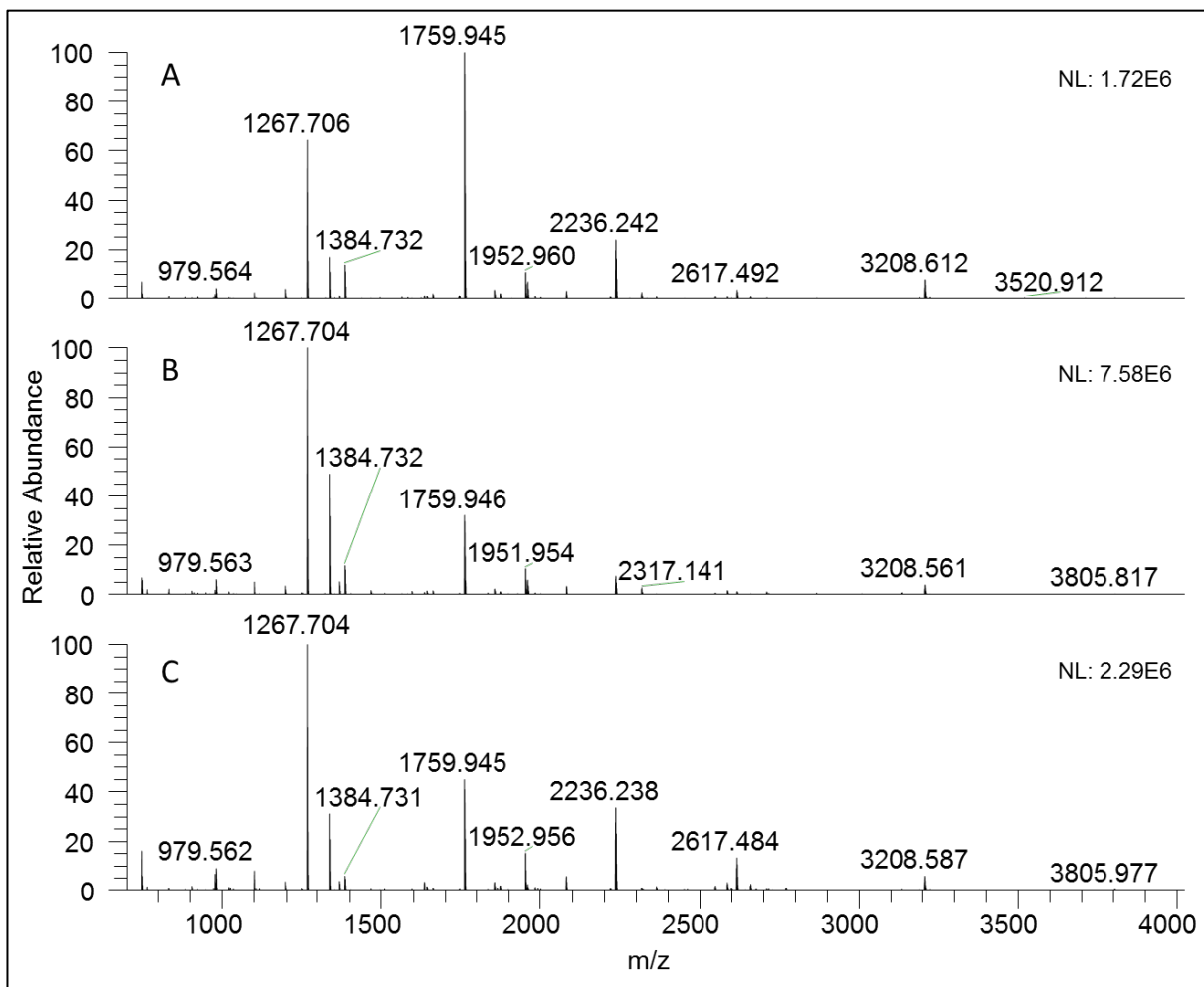


Obrázek 31 - Hmotnostní spektra naštěpeného α -kaseinu vsádkově imobilizovaným trypsinem na částicích SiMag



Obrázek 32 - Hmotnostní spektra naštěpeného α -kaseinu vsádkově imobilizovaným trypsinem na nanočásticích

V případě mikročipových aplikací bohužel není možné sledovat tento vývoj v čase a jedná se pouze o konečný stav štěpení (obr. 33). Pro všechny typy částic je zřejmé, že štěpení proběhlo úspěšně. Při hodnocení je tedy nutné vycházet především z analýzy gelovou elektroforézou a MS analýzu považovat pouze za doplňkovou. V případě celkového hodnocení oběma metodami je zřejmé, že nejlépe štěpil trypsin imobilizovaný na částice SeraMag.



Obrázek 33 - Hmotnostní spektra naštěpeného α -kaseinu imobilizovaným trypsinem na částicích A - Seramag, B - Si-mag, C - nanočástice v mikročipu (1 mg kaseinu)

4.3 Fosforylace peptidového substrátu a posouzení operační stability nosiče s imobilizovanou proteinkinázou A

Další aplikací, která byla určena k převedení do čipu byla fosforylace peptidového substrátu imobilizovanou proteinkinázou A. Cílem tohoto experimentu bylo fosforylovat peptidový substrát s dostatečnou účinností a celý proces úspěšně automatizovat. Fosforylace patří mezi jednu z nejdůležitějších post-translačních modifikací proteinů, proto je studium fosforylace velice důležité. Jednou z metod identifikace míst fosforylace proteinů je porovnání hmotnostních spekter vzorku před a po fosforylaci. Imobilizovaná forma enzymu má oproti volným formám řadu výhod. Jednou z nich je možnost opakovaného použití a zvýšení stability enzymu po imobilizaci.

Metoda pro kontrolu účinnosti fosforylace peptidů pomocí imobilizovaných kináz byla již dříve zpracována v [79] a [80]. Imobilizovaný enzym pro tento experiment byl připraven podle postupu 3.6.1. Byly použity magnetické částice SeraMag s karboxylovou funkční skupinou a jako ligand byla použita PKA. Substrátem byl syntetický peptid kemptid, který slouží jako fosfátový akceptorový peptid. Aminokyselinová sekvence kemptidu je LRRASLG s teoretickou molekulovou hmotností 771,471, pro fosforylovaný peptid LRRApSLG je teoretická molekulová hmotnost 851,437.

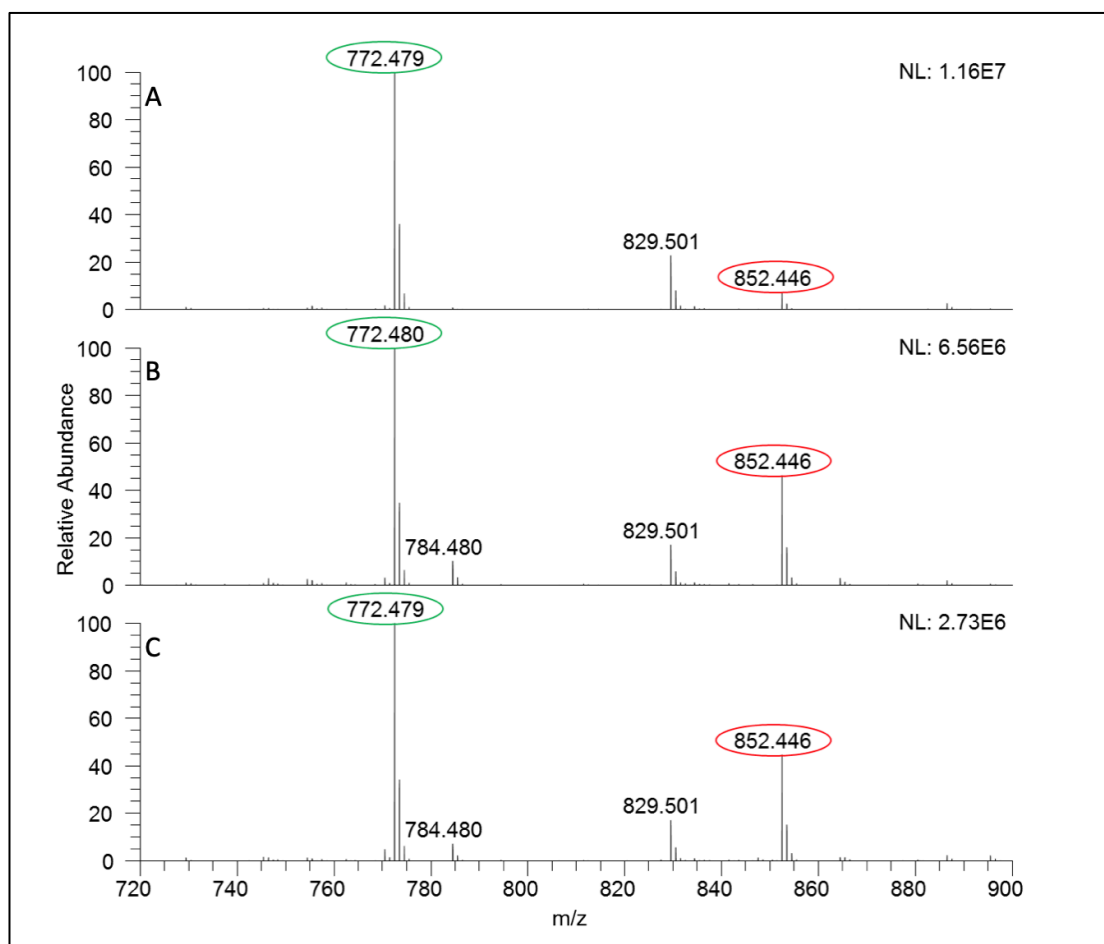
Aktivita kinázy byla vyhodnocena z dat získaných metodou hmotnostní spektrometrie, kdy byly vzorky analyzovány pomocí MALDI LTQ Orbitrap XL v pozitivním módu v rozsahu m/z 500-2000. Aktivita byla vyjádřena jako procentuální míra intenzit fosforylovaného a nefosforylovaného peptidu získaná z poměru relativní intenzity píku odpovídajícího fosforylované formě substrátu a celkové intenzity signálu. Ta je dána součtem relativních intenzit píků odpovídajících nefosforylované a fosforylované formě peptidu.

Na 1 mg magnetických částice SeraMag o průměru 0,816 μm bylo navázáno 2 μg PKA podle postupu v kapitole 3.6.1. Takto připravený nosič byl vnášen do čipu umístěného v zařízení ChipGenie podle postupu v kapitole 3.4. K 1 mg magnetických částic s navázanou PKA v čipu byl přidán vzorek obsahující reakční pufr, kemptid v množství 10 μl a 3 μl ATP v celkovém objemu 60 μl . Podle protokolu v kapitole 3.6.3, který byl vytvořen s ohledem na zachování principu experimentu ve vsádkovém uspořádání, byl naprogramován postup pro ovládání mikrofluidních zařízení na platformě viz příloha C. Nastavení protokolu bylo v tomto případě složitější než u štěpení α -kaseinu. Se zapojením pěti ventilů (1-5) a dvou pump bylo kontinuálně čerpáno ze zásobníku A – vzorek, C – promývací pufr a D – reakční pufr.

Skript je navržen tak, aby se v případě testování operační stability pokračovalo krokem dávkování promývacího pufru. Uvedená verze skriptu je ve finální podobě.

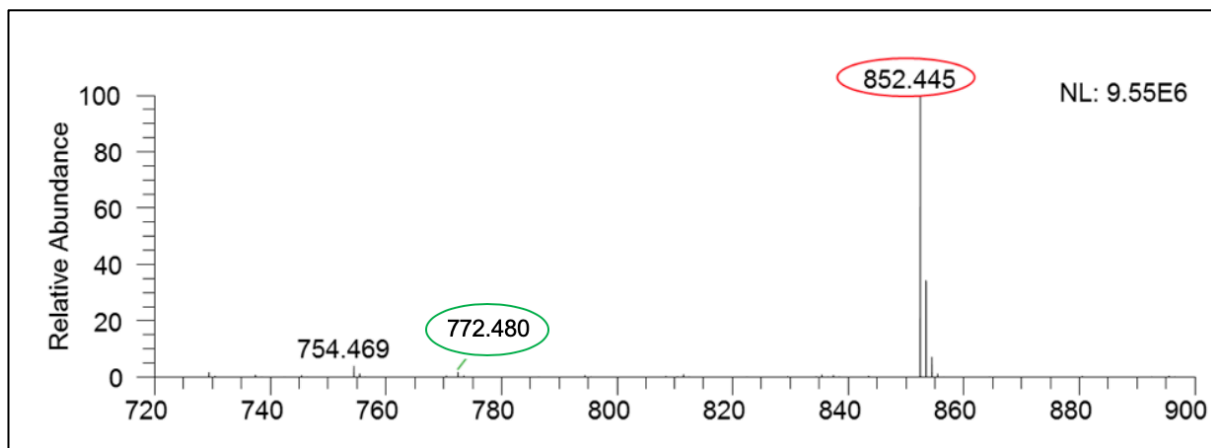
Na záznamu z hmotnostního spektrometru v pozitivním módu $[M+H]^+$ bychom měli sledovat teoretické hodnoty 772,478 a 852,446. V případě našeho experimentu byly zaznamenány hodnoty 772,480 pro nefosforylovaný substrát a 852,446 pro fosforylovaný substrát (obr. č. 34-38).

Nejprve byla testována tři možná nastavení protokolu. Průtok byl nastaven tak, aby doba, kdy je vzorek v kontaktu s magnetickými částicemi s imobilizovanou PKA, odpovídala 7,5 minutám (A), 15 minutám (B) a 30 minutám (C). Výsledky hmotnostních spekter pro tato tři nastavení jsou k vidění na obrázku č. 34. Z obrázku je patrné, že fosforylace není dostatečná ani v jednom případě. To mohlo být způsobeno špatnou účinností imobilizované PKA nebo špatným nastavením protokolu. Abychom vyloučili nefunkčnost nosiče byla provedena referenční fosforylace ve vsádkovém uspořádání. Viz obrázek č. 35. Je však znatelné, že prodloužení doby analýzy výrazně přispělo ke zvýšení míry fosforylace. Z toho důvodu bylo nastavení protokolu pro dobu analýzy 7,5 minuty vyřazeno z dalšího testování.



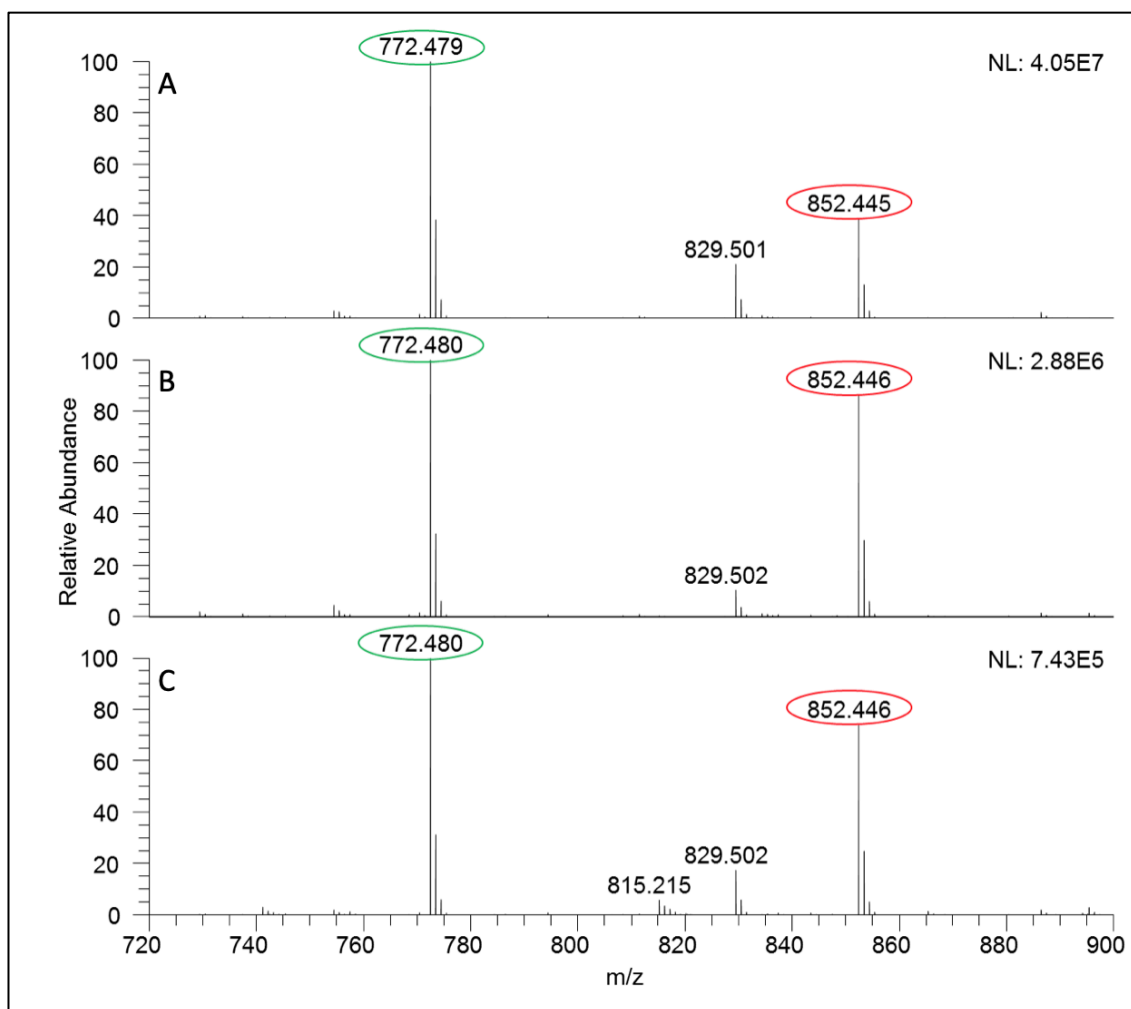
Obrázek 34 – Hmotnostní spektrum nefosforylovaného (zeleně) a fosforylovaného (červeně) substrátu kemptidů. Experiment se třemi možnostmi doby reakce (A – 7,5 min., B – 15 min., C – 30 min.)

Provedením referenčního experimentu ve vsádkovém uspořádání podle postupu v kapitole 3.6.2 bylo prokázáno, že připravený nosič s imobilizovanou PKA je funkční a aktivita PKA je zachována. Intenzita fosforylovaného substrátu dosahovala 98 %.



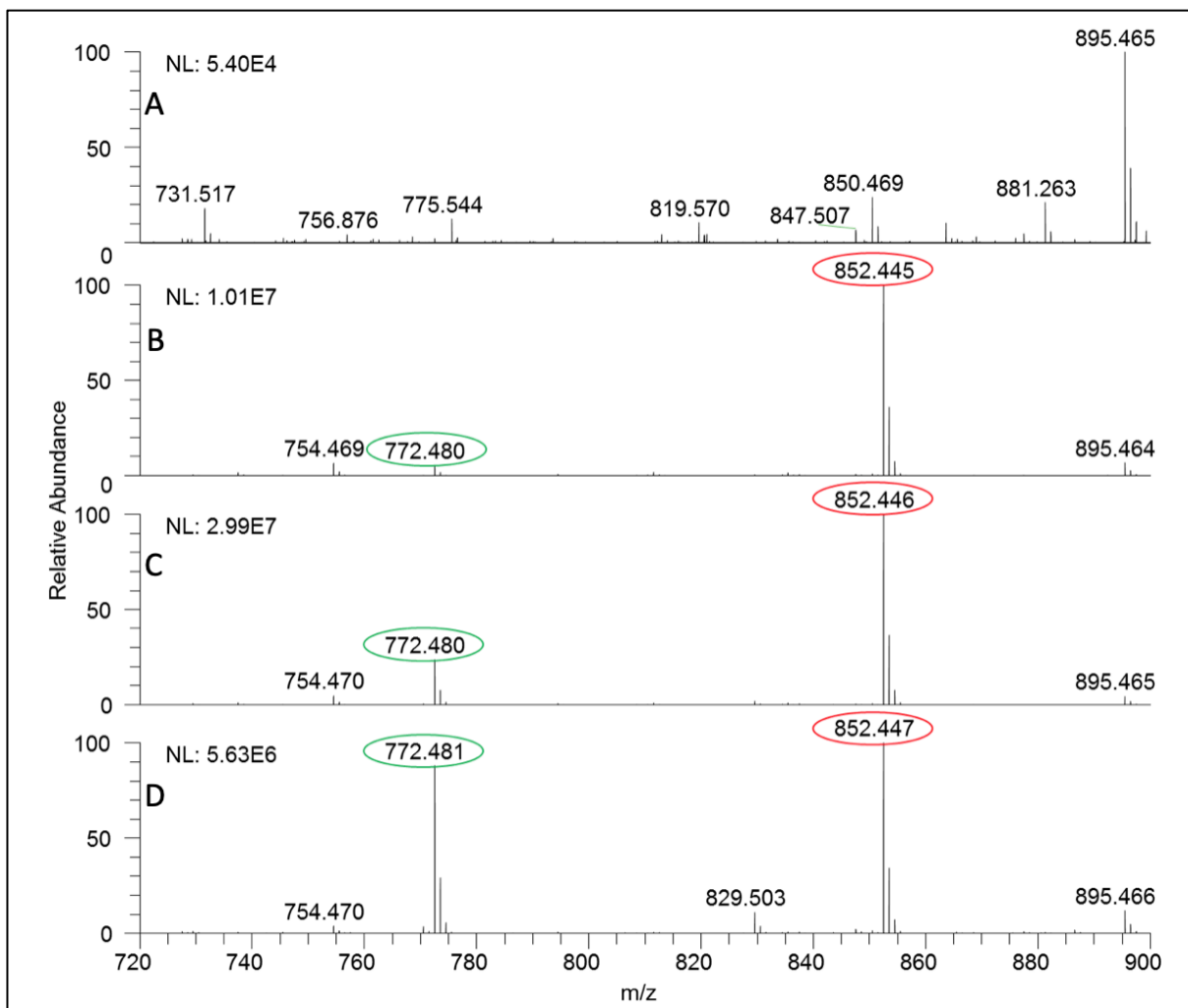
Obrázek 35 – Hmotnostní spektrum nefosforylovaného (zeleně) a fosforylovaného (červeně) kemptidu z experimentu referenční vsádkové fosforylace na magnetických částicích s imobilizovanou PKA

Z výsledků experimentu ve vsádkovém uspořádání bylo usouzeno, že je nutné hledat problém v nastavení protokolu. Přistoupilo se proto k opakování experimentu se dvěma modifikacemi. První úpravou bylo snížení průtoku již po protečení prvních 25 μ l, čímž byl posunut i sběr frakce (obr. č. 36 – B). Pro tento experiment bylo použito nastavení pro dobu reakce 30 min. Pro porovnání byl proveden taktéž původní experiment při 30 minutách, aby bylo možné pozorovat případné změny (obr. č. 36 – A). Druhou modifikací bylo prodloužení doby reakce na 1 hodinu (obr. č. 36 – C).



Obrázek 36 – Hmotnostní spektrum nefosforylovaného (zeleně) a fosforylovaného (červeně) kemtidu. Porovnání analýzy 30 minut s původním nastavením (A), 30 minut (B) a 1 hodina (C) s modifikovaným protokolem

Jak je vidět z porovnání na obrázku č. 36, první modifikace prokazatelně zvýšila účinnost fosforylace (36-B). Avšak mezi reakcí probíhající 30 minut a 1 hodinu není vidět žádný patrný rozdíl. Druhá modifikace tedy nebyla nutná a v následujících analýzách se od ní upustilo. Přestože úprava protokolu prokázala zlepšení účinnosti fosforylace, nebylo stále dosaženo dostatečné intenzity. Problém mohl být v nastavení protokolu nebo v průchodu substrátu přes částice. Bylo proto rozhodnuto, že zavedeme dělení frakcí na čtyři a připravíme nový nosič s dvojnásobným množstvím (4 μg /1 mg částic) imobilizované PKA, aby byly zajištěny lepší podmínky pro účinnou fosforylaci.

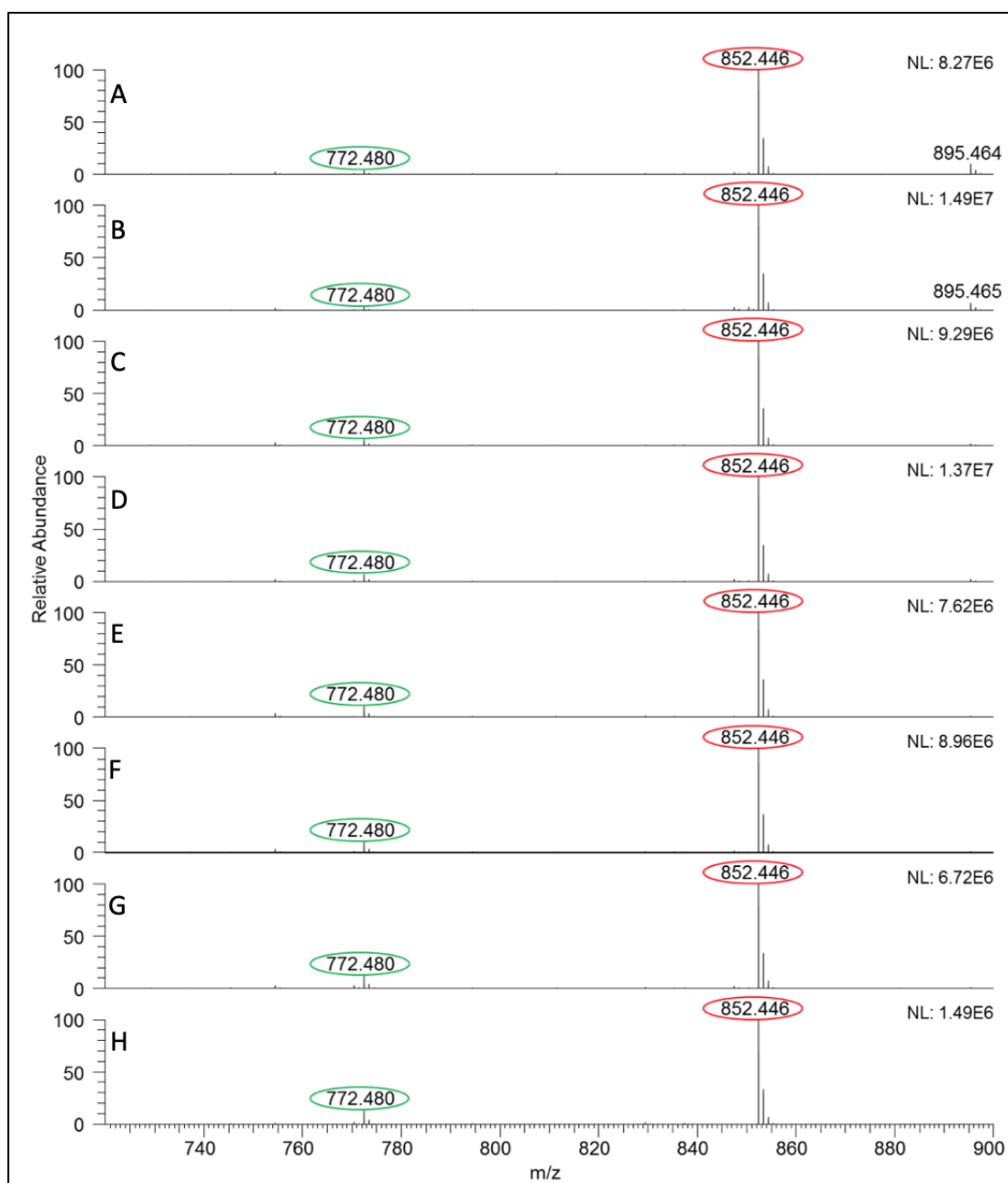


Obrázek 37 – Hmotnostní spektrum nefosforylovaného (zeleně) a fosforylovaného (červeně) kemptidu. Porovnání frakcí 1-4 (A-D)

Jedna sběrná frakce byla rozdělena na čtyři, které byly odebírány po 20 μ l. Byl zachován čas reakce 30 minut. Z hmotnostních spekter na obrázku č. 37 lze říci, že v první frakci se nacházejí pouze kontaminanty (37-A). Druhá frakce obsahuje úspěšně nafosforylovaný peptid (37-B), ve třetí frakci se nachází již i zbytky nedofosforylovaného peptidu (37-C) a v poslední frakci je nefosforylovaného peptidu nejvíce a zdá se, že část substrátu prochází nezreagována (37-D). Průchod nezreagovaného substrátu je s největší pravděpodobností zapříčiněn špatnou manipulací magnetických částic v čipu. Je pravděpodobné, že mikrofluidní zařízení ChipGenie obsahující magnet pro zajištění promíchávání MČ v čipu nezajišťuje udržení částic ve vznosu. Nicméně, pokud by byla analyzována a hodnocena pouze druhá frakce, bylo by možné provést další experimenty s fosforylací substrátu.

4.3.1 Operační stabilita nosiče s imobilizovanou PKA

Operační stabilita je parametr, který je běžně sledován u imobilizovaných bioaktivních systémů. Jedná se o zhodnocení změn aktivity nosiče s vázaným enzymem během jeho opakovaném použití. Stanovení operační stability imobilizované PKA bylo provedeno na základě postupu uvedeného v kapitole 4.5.3. Bylo provedeno celkem osm opakování bezprostředně po sobě a pro každé opakování byly odebrány čtyři frakce. Pro vyhodnocení operační stability byla vybrána frakce č. 2, která byla v předchozím experimentu vyhodnocena jako relevantní.



Obrázek 38 – Hmotnostní spektrum nefosforylovaného (zeleně) a fosforylovaného (červeně) kemptidu. Experiment stanovení operační stability

Na obrázku č. 33 jsou vyobrazena hmotnostní spektra z finálního experimentu, kdy byla testována operační stabilita nosiče s imobilizovanou PKA. Odshora je možné vidět opakování 1 až 8 (A-H). Přičemž jsou měřeny vždy druhé frakce ze čtyř odebíraných. Z obrázku je patrné, že maximální intenzita fosforylovaného substrátu byla pozorována pro první a druhé opakování, kdy dosahovala přibližně 96 %. To je v porovnání s referenčním vsádkovým uspořádáním (obr. č. 30), kdy bylo dosaženo intenzity 98 %, přibližně o 2 % méně. Od třetího opakování docházelo k pozvolnému snižování intenzity fosforylovaného substrátu a nárůst intenzity nenafosforylovaného peptidů, což značí nižší účinnost fosforylace. Nicméně i po osmém opakování experimentu je intenzita fosforylovaného substrátu 88 %. Tato hodnota se dá pokládat za dostatečnou pro účinnou fosforylaci proteinu, pokud budou reakční časy vyšší než 30 minut.

Výsledkem tohoto experimentu byl také funkční protokol, s takovým nastavením pump a ventilů, který vedl k úspěšně nafosforylovanému substrátu a zhodnocení operační stability připraveného nosiče. Po úspěšném převedení procesu fosforylace do čipu, jsme mohli konstatovat, že nosič lze použít minimálně osmkrát, kdy celá analýza probíhala v čipu, což značně eliminuje pracnost tohoto experimentu, který se běžně provádí ve vsádkovém uspořádání.

4.4 Izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů

Nejdříve byl připraven afinitní nosič - magnetické částice SeraMag s imobilizovanými protilátkami proti ovalbuminu podle postupu v kapitole 3.7.1. Standardní směs proteinů obsahovala BSA, ovalbumin, konkanavalin A a α -kasein. Izolace ovalbuminu probíhala v čipu podle postupu v kapitole 3.7.3 na 1 mg nosiče a souběžně byla prováděna izolace ve vsádkovém uspořádání s použitím stejného množství částic podle postupu v kapitole 3.7.2. Protokol nastavení pump a ventilů pro tuto aplikaci je uveden v příloze D. V protokolu pro izolaci ovalbuminu se jedná o vysoce komplexní zapojení všech zásobníků, ventilů a pump, tak, že tvoří jeden funkční celek. Za účelem provedení eluce byla zapojena pumpa 3, která čerpala eluční roztok umístěný v zásobníku E tak, aby docházelo k uvolnění ovalbuminu z komplexu s antiovalbuminovými protilátkami navázanými na magnetických částicích.

Z obrázku č. 39 je patrné, že v prostředí fosfátového pufru nedocházelo k agregaci částic a magnetické částice SeraMag tvořily lože po celé šířce kanálku.



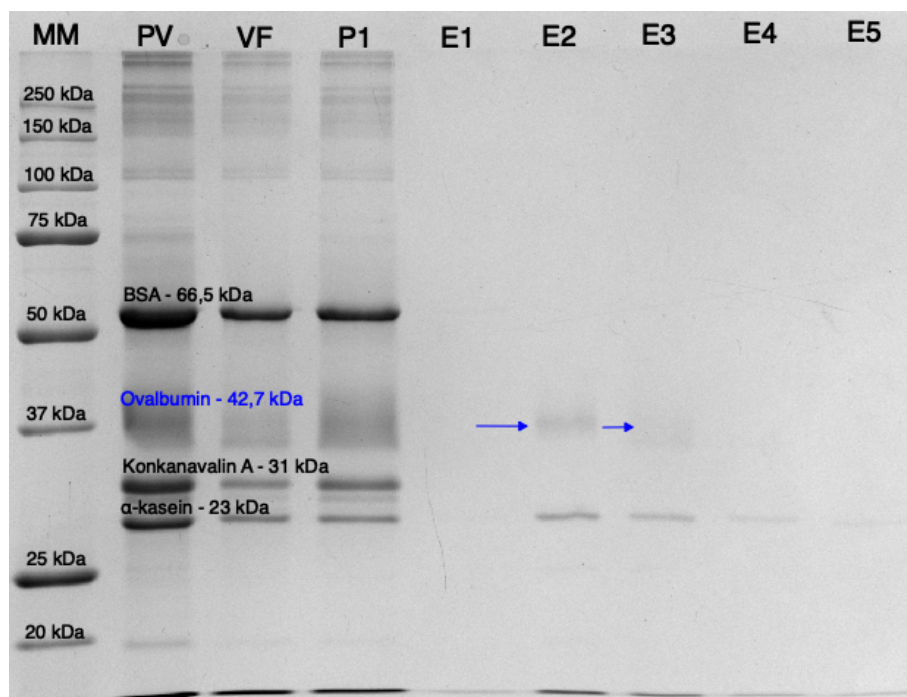
Obrázek 39 - Chování seramag částic ve fosfátovém pufru

Jako promývací roztoky byly zvoleny 0,1M fosfátový pufru o pH 7,0, dále tentýž pufr s 1M NaCl a 10x zředěný 0,1M fosfátový pufr o pH 7,0. V případě experimentu ve vsádkovém uspořádání byl k promývání použit magnetický separátor (obr. 32).



Obrázek 40 - Magnetický separátor k separaci magnetických částic během experimentu ve vsádkovém uspořádání

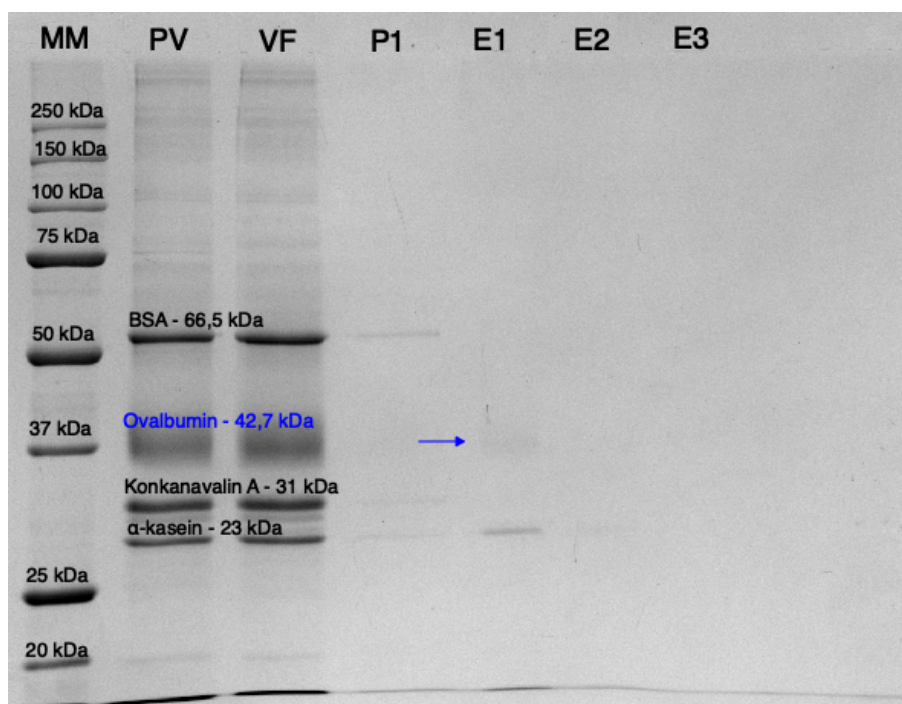
Eluční roztokem byl zvolen roztok 0,05% TFA, který splňoval podmínku pH nižšího než 2,5. Počet elucí byl nastaven na tři opakování v případě vsádkového uspořádání a ekvivalent pěti opakováním pro mikročipovou analýzu, každá po 15 minutách. Vsádková analýza probíhala podle postupu v kapitole 3.7.2. Izolace v mikročipu probíhala podle postupu v kapitole 3.7.3 včetně uvedených objemů a průtoků.



Obrázek 41 – Elektroforetický záznam izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů anti-ovalbuminovými protilátkami na magnetických částicích SeraMag v čipu metodou SDS-PAGE, barveno Coomassie blue

Na obrázku č. 41 je zobrazen elektroforetický záznam izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů v mikrofluidním uspořádání. Bylo prokázáno, že dochází k eluci ovalbuminu, a že jsou správně nastaveny eluční kroky. Je také patrné, že větší část ovalbuminu zůstala nenavázána, jak je vidět ve vazebné frakci. Bylo předpokládáno, že proužky viditelné na obrázku č. 41 v promývací frakci jsou ještě součástí vazebné frakce a bylo by potřeba odebrat vzorek promývací frakce s větším zpožděním průtoku promývacího roztoku na pumpě. Ze záznamu je dále patrné, že docházelo k nespecifické sorpci α -kaseinu, to mohlo být způsobeno železem, které zůstalo odkryté na magnetických částicích, což pravděpodobně zapříčinilo nespecifickou sorpci α -kaseinu na částice. Na vině mohla být také nižší specifita protilátek, avšak to nebylo zcela možné rozlišit. K nejučinnější eluci docházelo v případě mikročipového uspořádání ve druhé eluci, ale patrný je proužek ovalbuminu i ve třetí eluci značené na obrázku č. 41 jako E3. Z toho důvodu by bylo vhodné prodloužit sběr druhé eluční frakce, a získat tak co největší množství izolovaného ovalbuminu.

Jako referenční metoda byla použita vsádková izolace. Během které bylo zjištěno, že nespecifická sorpce α -kaseinu není způsobena špatným nastavením průtoků a promývacích kroků během programování protokolu v programu μ Process. I zde docházelo k nespecifické sorpci α -kaseinu, přestože bylo provedeno dostatečné množství promývacích kroků podle postupu v kapitole 3.7.2. Taktéž na elektroforetickém záznamu z izolace ovalbuminu ve vsádkovém uspořádání (obr. č. 42) byla zaznamenána nižší vazebná účinnost ovalbuminu, což je vidět ve vazebné frakci. V promývací frakci již proužek ovalbuminu vidět nebyl a byly patrné jen proužky ostatních proteinů ve směsi, které se nenašly na nosič.



Obrázek 42 – Elektroforetický záznam izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů anti-ovalbuminovými protilátkami imobilizovanými na magnetických částicích SeraMag vsádkově metodou SDS-PAGE, barveno Coomassie blue

Při porovnání obou uspořádání se více osvědčilo mikrofluidní uspořádání, a to především díky snadnější manipulaci s roztoky a možnosti automatizace celého procesu. Co se týče výsledků samotné izolace nebyly patrné velké rozdíly mezi jednotlivými uspořádáními. V obou případech docházelo k úspěšné izolaci ovalbuminu, ale u mikrofluidního uspořádání měl proužek odpovídající ovalbuminu v elučních frakcích vyšší intenzitu.

Výsledkem tohoto experimentu byla úspěšná izolace ovalbuminu v obou typech uspořádání a především funkční protokol, s takovým nastavením pump a ventilů, který vedl k úspěšné analýze. Protokol uložen a je možné jej dále využít pro různorodé izolace proteinů s možností použití jiných magnetických částic, než které byly použity zde.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo otestovat vlastnosti a možnosti mikrofluidního zařízení od společnosti LabSmith v kombinaci se zařízením ChipGenie disponujícím magnetickým míchadlem a následně převést bioanalýzy prováděné ve vsádkovém uspořádání do mikročipu a porovnat získané výsledky. S ohledem na objem nástavců pro injekční pumpy SP01 byl pro experimenty vybrán mikrofluidní čip s komůrkou o objemu 100 μl . Pro analýzy byly zvoleny magnetické částice, které jsou běžně využívány pro aplikace prováděné v laboratořích na pracovišti, kde byla práce prováděna. Limitujícím faktorem bylo minimum a maximum částic v čipu, aby vytvořily lože přes celou šířku kanálku a zajistil se tak rovnoměrný kontakt vzorku s nosičem. Množství zaváděných částic do čipu bylo určeno na 1 mg.

Do mikrofluidního uspořádání byly celkem převedeny tři aplikace. Konkrétně se jednalo o štěpení α -kaseinu proteolytickým enzymem TPCK trypsinem. Trypsin byl imobilizován na tři různé druhy magnetických částic, a to SeraMag (0,816 μm), Si-Mag (0,750 μm) a nanočástice (100-200 nm). Štěpení bylo prováděno v čipu a také ve vsádkovém uspořádání. Účinnost štěpení byla ověřována u obou typů uspořádání tris-tricinovou elektroforézou a metodou hmotnostní spektrometrie. Bylo prokázáno, že nejvhodnějšími magnetickými částicemi pro tuto aplikaci ve vsádkovém i mikročipovém uspořádání jsou částice SeraMag.

Druhou aplikací převedenou do mikrofluidního uspořádání byla fosforylace peptidového substrátu s využitím proteinkinázy A navázané na magnetické částice SeraMag a následné testování operační stability těchto částic. Cílem aplikace bylo převést velice pracnou a vsádkově prováděnou metodu opakované fosforylace substrátu do mikročipu, a tím zjednodušit manuální a snížit časovou náročnost celého procesu. Současně se prokázáno, že nosič připravený pro tuto aplikaci lze použít minimálně osmkrát.

Třetí aplikací byla izolace ovalbuminu ze standardní směsi proteinů. V tomto případě bylo využito metody imunoafinitní chromatografie. Jako afinitní ligand byly použity protilátky proti ovalbuminu, které byly imobilizovány na magnetické částice SeraMag. Standardní směs proteinů obsahovala BSA, ovalbumin, konkanavalin A a α -kasein. Lze hodnotit, že výsledky z mikrofluidního uspořádání jsou srovnatelné s výsledky z analýzy prováděné ve vsádkovém uspořádání, i když ve výsledcích z mikročipové aplikace byla pozorována vyšší intenzita v elučních frakcích.

I přes všechna úskalí se podařilo všechny testované aplikace převést do mikrofluidního uspořádání. Protokoly byly funkční a mohou být opakovaně použity i pro experimenty s jinými nosiči či pufrů. Bylo prokázáno, že systém je funkční a bylo dosaženo štěpení kaseinu,

opakované fosforylace substrátu i izolace ovalbuminu ze směsi proteinů. Zdá se ale, že slabinou celého systému bylo magnetické míchadlo a zařízení ChipGenie. Domníváme se, že magnet obsažený v tomto zařízení nejspíš vytváří příliš silné magnetické pole. Z toho důvodu nejsou magnetické částice v čipu ve vznosu, ale jsou spíše posouvány po dně. Nad částicemi pak vzniká prostor, kudy může protékat nezreagovaný vzorek. Proto by bylo vhodné pro příští aplikace zajistit příznivější řešení pro míchání částic v čipu. Mikrofluidní platforma pro nastavení a kontrolu průtoku od LabSmith se projevila jako velice uživatelsky přívětivá varianta. Usnadnila experimenty a umožnila opakování experimentů bez nutnosti znovu programovat jednotlivá zařízení na desce.

Je pravděpodobné, že se mikrofluidní zařízení pro nastavení a kontrolu průtoku budou nadále zdokonalovat. Například aby bylo dosaženo nulových mrtvých objemů, zamezeno kontaminacím a byla zajištěna přenositelnost a spolehlivost zařízení Lab-on-chip.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. TESAŘ, Václav. Mikrofluidika. *Automa, časopis pro automatizační techniku* [online]. 2008, 10, 6-9. [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <http://automa.cz/page-flip/casopis/automa/2008/10/index.html>
2. SMEJKAL, P. a F. FORET. Microfluidics in Bioanalytical Instrumentation. *Chemické listy*. 2012, 106(2), 104-112
3. SEEMANN, Ralf, Martin BRINKMANN, Thomas PFOHL a Stephan HERMINGHAUS. Droplet based microfluidics. *Reports on Progress in Physics* [online]. 2012, 75(1) [cit. 2018-05-08]. ISSN 0034-4885. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0034-4885/75/i=1/a=016601?key=crossref.625e08f5dcc53a00ab8de4226e032ae4>
4. WHITESIDES, George M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* [online]. 2006, 442(7101), 368-373 [cit. 2018-05-08]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature05058>
5. HUANG, Shu-Hong, Yu-Shin CHANG, Jyh-Ming Jimmy JUANG, et al. An automated microfluidic DNA microarray platform for genetic variant detection in inherited arrhythmic diseases. *The Analyst* [online]. 2018, 143(6), 1367-1377 [cit. 2018-05-08]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7AN01648D>
6. PAGADUAN, Jayson V., Vishal SAHORE a Adam T. WOOLLEY. Applications of microfluidics and microchip electrophoresis for potential clinical biomarker analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, 407(23), 6911-6922 [cit. 2018-05-10]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-015-8622-5>
7. OBLATH, Emily A., W. Hampton HENLEY, Jean Pierre ALARIE a J. Michael RAMSEY. A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacteria in saliva. *Lab on a Chip* [online]. 2013, 13(7) [cit. 2019-05-10]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc40961a>
8. WANG, Xue, Lian YI, Nikita MUKHITOV, Adrian M. SCHRELL, Raghuram DHUMPA a Michael G. ROPER. Microfluidics-to-mass spectrometry: A review of coupling methods and applications. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, 1382, 98-116 [cit. 2018-05-10]. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314016112>

9. KALANTARIFARD, Ali, Elnaz ALIZADEH HAGHIGHI a Caglar ELBUKEN. Damping hydrodynamic fluctuations in microfluidic systems. *Chemical Engineering Science* [online]. 2018, 178, 238-247 [cit. 2018-05-10]. ISSN 00092509. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250917307820>
10. BHISE, Nupura S., João RIBAS, Vijayan MANOHARAN, Yu Shrike ZHANG, Alessandro POLINI, Solange MASSA, Mehmet R. DOKMECI a Ali KHADEMHOSEINI. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, 190, 82-93 [cit. 2018-05-10]. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914002958>
11. ABACI, Hasan Erbil a Michael L. SHULER. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integrative Biology*[online]. 2015, 7(4), 383-391 [cit. 2018-05-10]. ISSN 1757-9694. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ib/article/7/4/383-391/5199152>
12. WYSS INSTITUTE. Human Organs-on-Chips. [online]. 2016 [cit. 2018-08-24]. Dostupné z: <https://wyss.harvard.edu/technology/human-organs-on-chips/>
13. ELVEFLOW plug&play microfluidics. PDMS: A REVIEW. [online]. [cit. 2018-08-24]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidics/>
14. MAOZ, Ben M, Anna HERLAND, Edward A FITZGERALD, et al. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. *Nature Biotechnology* [online]. 2018, 36(9), 865-874 [cit. 2018-08-24]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt.4226>
15. MAOZ, Ben M., Anna HERLAND, Olivier Y. F. HENRY, et al. Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities. *Lab on a Chip* [online]. 2017, 17(13), 2294-2302 [cit. 2018-08-25]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7LC00412E>
16. ORTEGA-PRIETO, A. M., J. K. SKELTON, S. N. WAI, et al. 3D microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection. *Nature Communications* [online]. 2018, 9(1) [cit. 2018-08-25]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-02969-8>

17. ELVEFLOW plug&play microfluidics. Microfluidics and microfluidic devices: A review. [online]. France, 2015 [cit. 2018-08-10]. Dostupné z: <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review>
18. ALRIFAIY, Ahmed, Olof A. LINDAHL a Kerstin RAMSER. Polymer-Based Microfluidic Devices for Pharmacy, Biology and Tissue Engineering. *Polymers* [online]. 2012, 4(3), 1349-1398 [cit. 2018-08-25]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/4/3/1349>
19. ELVEFLOW plug&play microfluidics. FLOW CONTROL IN MICROFUIDIC DEVICES, Nanofluidics, microfluidics and milli-fluidics. [online]. [cit. 2018-08-11]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/flow-control-in-microfluidic-device/>
20. HOLMES, Douglas P. *Confined Fluid Flow: Microfluidics and Capillarity* [online]. Sapienza, Università di Roma, 2015 [cit. 2018-08-10]. Dostupné z: http://www.bu.edu/moss/files/2015/08/Sapienza2015_Microfluidics.pdf. Short Course. Boston University.
21. Laminar vs. turbulent flow, A simple sketch of difference between laminar fluid flow and turbulent fluid flow in a pipe., [online]. [cit. 2018-08-11]. Dostupné z: <https://www.cfdsupport.com/OpenFOAM-Training-by-CFD-Support/node275.html>
22. WOIAS, Peter. Micropumps—past, progress and future prospects. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2005, 105(1), 28-38 [cit. 2018-08-11]. ISSN 09254005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092540050400108X>
23. ASHRAF, Muhammad Waseem, Shahzadi TAYYABA a Nitin AFZULPURKAR. Micro Electromechanical Systems (MEMS) Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, 12(6), 3648-3704 [cit. 2018-08-11]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/6/3648>
24. McMILLAN, Alex. Flow Control in Microfluidics. Review. *Darwin microfluidics* [online]. 2017. [cit. 2019-03-28]. Dostupné z: <https://darwin-microfluidics.com/blogs/reviews/flow-control-in-microfluidics>
25. ZHANG, Xiannian, Zitian CHEN a Yanyi HUANG. A valve-less microfluidic peristaltic pumping method. *Biomicrofluidics* [online]. 2015, 9(1) [cit. 2018-08-25]. ISSN 1932-1058. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4907982>

26. ELVEFLOW plug&play microfluidics. [online] [cit. 2019-03-28] Dostupné z: <https://www.elveflow.com>
27. PRENTICE-MOTT, Harrison, Mehmet TONER a Daniel IRIMIA. Microfluidic proportional flow controller. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2010, 20(11) [cit. 2019-03-28]. ISSN 0960-1317. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0960-1317/20/i=11/a=115020?key=crossref.e31069d72ea042e39156998fcd9e1b41>)
28. LAM, Eric W., Gregory A. COOKSEY, Bruce A. FINLAYSON a Albert FOLCH. Microfluidic circuits with tunable flow resistances. *Applied Physics Letters* [online]. 2006, 89(16) [cit. 2019-03-28]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.2363931>
29. TAKAYAMA, Shuichi, Emanuele OSTUNI, Philip LEDUC, Keiji NARUSE, Donald E. INGBER a George M. WHITESIDES. Selective Chemical Treatment of Cellular Microdomains Using Multiple Laminar Streams. *Chemistry & Biology* [online]. 2003, 10(2), 123-130 [cit. 2019-03-28]. ISSN 10745521. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107455210300019X>
30. Dolomite Microfluidics. [online] [cit. 2019-03-28] Dostupné z: <https://www.dolomite-microfluidics.com>
31. MOORE, N., DOTY, D., ZIELSTORFF, M., KARIV, I., MOY, LY., GIMBEL, A., CHEVILLET, JR., LOWRY, N., SANTOS, J., MOTT, V. KRATCHMAN, L., LAU, T., ADDONA, G., CHEN, H., BORENSTEIN, JT. A multiplexed microfluidic system for evaluation of dynamics of immune.tumor interactions. *Lab Chip*, 2018, 18(13), 1844-1858 [cit. 2019-03-28]
32. FLUIGENT, Smart microfluidics. [online]. 2019 [cit. 2019-03-28]. Dostupné z: <https://www.fluigent.com>
33. WEINMEISTER, Robert, Emma FREEMAN, Ian C. EPERON, Alison M. STUART a Andrew J. HUDSON. Single-Fluorophore Detection in Femtoliter Droplets Generated by Flow Focusing. *ACS Nano* [online]. 2015, 9(10), 9718-9730 [cit. 2019-03-28]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b02422>
34. LABSMITH, Inc., Tools For Science. [online]. 2019 [cit. 2019-03-28]. Dostupné z: <http://labsmith.com>

35. SALMANZADEH, Alireza., Lina ROMERO, Hadi SHAFIEE, Roberto C. GALLO-VILLANUEVA, Mark A. STREMLER, Scott D. CRAMER, Rafael V. DAVALOS. Isolation of prostate tumor initiating cells (TICs) through their dielectrophoretic signature. *Lab Chip* [online]. 2012, 12(1), 182-189. [cit. 2019-03-29] ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1LC20701F>
36. RUFFERT, Christine. Magnetic Bead – Magic Bullet. *Micromachines* [online]. 2016, 7(2) [cit. 2019-01-15]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-666X/7/2/21>
37. PAMME, Nicole. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip* [online]. 2006, 6(1), 24-38 [cit. 2019-01-15]. ISSN 1473-0197 Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2006/lc/b513005k>
38. Sera-Mag Magnetic Speed Beads (obrázek) [online] [cit. 2019-01-15] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sera-mag-and-sera-mag-speedbeads-magnetic-particles.html>
39. RAMANUJAN, Raju V. Magnetic Particles for Biomedical Applications. NARAYAN, Roger, ed. *Biomedical Materials* [online]. Boston, MA: Springer US, 2009, 2009, s. 477-491 [cit. 2019-01-30]. ISBN 978-0-387-84871-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-84872-3_17
40. McBAIN, Stuart C., Humphrey HP YIU, Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International journal of nanomedicine*. [online]. 2008, 3(2), 169-180 [cit. 2019-01-15]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/magnetic-nanoparticles-for-gene-and-drug-delivery-peer-reviewed-article-IJN>
41. PEČOVÁ, Michaela, Ludmila ZAJONCOVÁ, Kateřina POLÁKOVÁ, Jan ČUDA, Mirka ŠAFARÍKOVÁ, Marek ŠEBELA, Ivo ŠAFARÍK. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, 105, 524-530
42. LU, An-Hui, E. L. SALABAS a Ferdi SCHÜTH. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2007, 46(8), 1222-1244 [cit. 2019-04-28]. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200602866>

43. LIN, Jun, Weilie ZHOU, A. KUMBHAR, J. WIEMANN, Jiye FANG, E.E. CARPENTER a C.J. O'CONNOR. Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-Assembly. *Journal of Solid State Chemistry* [online]. 2001, 159(1), 26-31 [cit. 2019-04-28]. ISSN 00224596. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022459601991170>
44. AUDONNET, Virginie; MALAQUIN, Laurent; VIOVY, Jean-Louis. Polymeric coatings on micro-and nanometric particles for bioapplications. *Bioanalytical Reviews* [online], 2011, 3(2-4), 41-66 [cit. 2019-04-28]. ISSN 1867-2086. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12566-011-0022-5>
45. KARIMI, Z., L. KARIMI a H. SHOKROLLAHI. Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2013, 33(5), 2465-2475 [cit. 2019-04-28]. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493113000581>
46. DERVEAUX, S., B. G. STUBBE, K. BRAECKMANS, C. ROELANT, K. SATO, J. DEMEESTER a S. C. DE SMEDT. Synergism between particle-based multiplexing and microfluidics technologies may bring diagnostics closer to the patient. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, 391(7), 2453-2467 [cit. 2019-04-30]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-008-2062-4>
47. GRUMANN, M., A. GEIPEL, L. RIEGGER, R. ZENGERLE a J. DUCRÉE. Batch-mode mixing on centrifugal microfluidic platforms. *Lab on a Chip* [online]. 2005, 5(5), 560-565 [cit. 2019-04-28]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b418253g>
48. PHURIMSAK, Chayakom, Ender YILDIRIM, Mark D. TARN, Sebastiaan J. TRIETSCH, Thomas HANKEMEIER, Nicole PAMME a Paul VULTO. Phaseguide assisted liquid lamination for magnetic particle-based assays. *Lab Chip* [online]. 2014, 14(13), 2334-2343 [cit. 2019-04-28]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4LC00139G>
49. VERPOORTE, E.: Beads and chips: new recipes for analysis. *Lab on a Chip* [online]. 2003, 3(4), 60-68. [cit. 2019-04-28]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b313217j>

50. SATO, Kiichi, Maho YAMANAKA, Tomokazu HAGINO, Manabu TOKESHI, Hiroko KIMURA a Takehiko KITAMORI. Microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay (microELISA) system with thermal lens detection. *Lab on a Chip* [online]. 2004, 4(6) [cit. 2019-05-08]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b411356j>
51. DUNNILL, P. a M. D. LILLY. Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1974, 16(7), 987-990 [cit. 2019-04-30]. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260160710>
52. KONERACKÁ, M, P KOPČANSKÝ, M TIMKO, C.N RAMCHAND, A DE SEQUEIRA a M TREVAN. Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. 2002, 18(1-3), 13-18 [cit. 2019-04-30]. ISSN 13811177. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117702000164>
53. SCHULZE, Holger, Gerard GIRAUD, Jason CRAIN a Till T. BACHMANN. Multiplexed optical pathogen detection with lab-on-a-chip devices. *Journal of Biophotonics* [online]. 2009, 2(4), 199-211 [cit. 2019-04-30]. ISSN 1864063X Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.200910009>
54. LIU, Yan-Jun, Shi-Shang GUO, Zhi-Ling ZHANG, Wei-Hua HUANG, Damien BAIGL, Min XIE, Yong CHEN a Dai-Wen PANG. A micropillar-integrated smart microfluidic device for specific capture and sorting of cells. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2007, 28(24), 4713-4722 [cit. 2019-04-30]. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200700212>
55. SHI, Wentao, Shunqiang WANG, Ahmad MAAROUF, Christopher G. UHL, Ran HE, Doruk YUNUS a Yaling LIU. Magnetic particles assisted capture and release of rare circulating tumor cells using wavy-herringbone structured microfluidic devices. *Lab on a Chip* [online]. 2017, 17(19), 3291-3299 [cit. 2019-04-30]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7LC00333A>
56. RAMACHANDRAN, S., J. GERDES, P. TARR, et al. Dry-Reagent Storage for Disposable Lab-On-Card Diagnosis of Enteric Pathogens. In: *1st Transdisciplinary Conference on Distributed Diagnosis and Home Healthcare, 2006. D2H2* [online]. IEEE, 2006, s. 16-19 [cit. 2019-04-30]. ISBN 1-4244-0058-9. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1624786/>

57. CHIN, Curtis D., Vincent LINDER a Samuel K. SIA. Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab Chip* [online]. 2007, 7(1), 41-57 [cit. 2019-04-30]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B611455E>
58. YAGER, Paul, Thayne EDWARDS, Elain FU, Kristen HELTON, Kjell NELSON, Milton R. TAM a Bernhard H. WEIGL. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* [online]. 2006, 442(7101), 412-418 [cit. 2019-04-30]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature05064>
59. CORSTJENS, P. L. A. M, Z. CHEN, M. ZUIDERWIJK, H. H. BAU, W. R. ABRAMS, D. MALAMUD, R. SAM NIEDBALA a H. J. TANKE. Rapid Assay Format for Multiplex Detection of Humoral Immune Responses to Infectious Disease Pathogens (HIV, HCV, and TB). *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2007, 1098(1), 437-445 [cit. 2019-04-30]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1384.016>
60. COOKSEY, Robert C., Josef LIMOR, Glenn P. MORLOCK a Jack T. CRAWFORD. Identifying Mycobacterium species and strain typing using a microfluidic labchip instrument. *BioTechniques* [online]. 2003, 35(4), 786-794 [cit. 2019-04-30]. ISSN 0736-6205. Dostupné z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/03354rr01>
61. WEIGL, B. H., Ian PAPAUTSKY, Wanjun WANG, et al. Fully integrated multiplexed lab-on-a-card assay for enteric pathogens. *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems IV* [online]. 2006, 6112(2), 11. [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.644714>
62. DE LA ROSA, C., P.A. TILLEY, J.D. FOX a K.V.I. KALER. Microfluidic Device for Dielectrophoresis Manipulation and Electrodisruption of Respiratory Pathogen *Bordetella pertussis*. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* [online]. 2008, 55(10), 2426-2432 [cit. 2019-04-30]. ISSN 0018-9294. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4487107/>
63. ZAYTSEVA, Natalya V., Richard A. MONTAGNA a Antje J. BAEUMNER. Microfluidic Biosensor for the Serotype-Specific Detection of Dengue Virus RNA. *Analytical Chemistry* [online]. 2005, 77(23), 7520-7527 [cit. 2019-04-30]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac0509206>

64. KLUCHOVA, Katerina, Radek ZBORIL, Jiri TUCEK, et al. Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis – Their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic carrier for trypsin immobilization. *Biomaterials* [online]. 2009, 30(15), 2855-2863 [cit. 2019-04-30]. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209001586>
65. LOWE, Christopher Robin, Peter Duncan Goodearl DEAN. *Affinity Chromatography*. London: John Wiley&Sons, Ltd., 1974, 272 s. ISBN 0471549401
66. TURKOVÁ, Jaroslava. *Bioaffinity chromatography*. Second, Completely Revised Edition. Amsterdam: Elsevier Science, 1993, 251-255 s. ISBN: 9780080858630
67. DUBEY, Vikash Kumar. Steps of affinity purification. *Proteomics&Genomic* [online]. [cit. 2019-04-21] Dostupné z: https://nptel.ac.in/courses/102103017/module6/lec6_slide1.htm particles.html
68. VAŘILOVÁ, Tereza. Stacionární fáze v afinitní chromatografii. *Chemické listy* [online]. 2005, 99, s. 570-577. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: http://ww.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_08_570-577.pdf
69. URH, Marjeta, Dan SIMPSON a Kate ZHAO. Chapter 26 Affinity Chromatography. *Guide to Protein Purification, 2nd Edition* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 417-438 [cit. 2019-04-21]. Methods in Enzymology. ISBN 9780123745361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687909630263>
70. HERMANSON, Greg T., A. Krishna MALLIA, Paul K. SMITH. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. San Diego: Academic Press, 1992. 132-134 s. ISBN 0123423309
71. PHILLIPS, Terry M. *Analytical techniques in immunochemistry*, New York: Marcel Dekker, 1992. 34-42 s. ISBN 0824784774
72. FIELDS, Deborah. *Affinity Chromatography – How Does it Work?* News Medical: Life Sciences [online]. 2019 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/life-sciences/Affinity-Chromatography-e28093-How-Does-it-Work.aspx>
73. SLOVAKOVA, M., JANKOVICOVA, B., ROSNEROVA, S.; KORECKÁ L., MINC, N.; HERNYCHOV A, L.; HUBALEK, M.; BILKOV A, Z.: Chip-based Magnetic Bioaffinity Technique Adapted for Qualitative Analysis of Food Allergens, *Proceedings of MicroTAS, 2007 Conference*, 637-639. ISBN 978-0-9798064-0-7

74. TETALA, Kishore K. R. a Teris A. VAN BEEK. Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, 33(3), 422-438 [cit. 2019-04-18]. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200900635>
75. HAGE, David S., Jeanethe A. ANGUIZOLA, Cong BI, et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2012, 69, 93-105 [cit. 2019-04-21]. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708512000088>
76. LUND, Bjarte Aarmo. *Biotech applications of protein kinase affinity interactions*. Tromso, 2013. Thesis in Chemistry, Faculty of Science and Techology, University of Tromso. [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <https://munin.uit.no/handle/10037/8289>
77. DATTA, Diptendu, Sangita BHATTACHARJEE, Arijit NATH, Ranjana DAS, Chiranjib BHATTACHARJEE a Siddhartha DATTA. Separation of ovalbumin from chicken egg white using two-stage ultrafiltration technique. *Separation and Purification Technology* [online]. 2009, 66(2), 353-361 [cit. 2019-04-21]. ISSN 13835866. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586608005224>
78. GOLIAS, Jaroslav, Martin SCHWARZER, Michael WALLNER, et al. Heat-Induced Structural Changes Affect OVA-Antigen Processing and Reduce Allergic Response in Mouse Model of Food Allergy. *PLoS ONE*[online]. 2012, 7(5) [cit. 2019-04-20]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037156>
79. HROMADKOVA, Lenka, Rudolf KUPCIK, Marie VAJRYCHOVA, et al. Kinase-loaded magnetic beads for sequential in vitro phosphorylation of peptides and proteins. *The Analyst* [online]. 2018, 143(2), 466-474 [cit. 2019-05-08]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7AN01508A>
80. ŠŤOVÍČKOVÁ, E. *Fosforylace rekombinantních proteinů solubilními a imobilizovanými kinázami*. Pardubice, 2017. 150s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D

7 PŘÍLOHY

Příloha A - Protokol vytvořený pro štěpení α -kaseinu TPCK trypsinem imobilizovaným na magnetické částice v programu μ Process	99
Příloha B - Tabulka identifikovaných peptidů z obou podjednotek α -kaseinu pro druhou frakci štěpení v čipu trypsinem imobilizovaným na částicích SeraMag (1mg vstupního α -kaseinu).....	101
Příloha C – Protokol vytvořený pro fosforylaci peptidového substrátu proteinkinázou A imobilizovanou na magnetických částicích v programu μ Process	103
Příloha D - – Protokol vytvořený pro izolaci ovalbuminu metodou imunoafinitní chromatografie na magnetických částicích v programu μ Process.....	105

Příloha A - Protokol vytvořený pro štěpení α -kaseinu TPCK trypsinem imobilizovaným na magnetické částice v programu μ Process

*03Pumpa2 SPS01 = SPS01 80 ul

*02Pumpa1 SPS01 = SPS01 80 ul

*01Ventily1-4 4VM = 4VM01

RA_NH4HCO3_1ml

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul

<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 3

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul

03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min

03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul

<WaitAllDone>

P2_chip

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3

03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min

03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul

<WaitAllDone>

<Loop> RA_NH4HCO3_1ml 5

RB_Sample_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 1

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul

<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load2

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 1

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 3.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul

03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min

03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul

<WaitAllDone>

P2_chip2

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 1

03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 3.000 ul/min

03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul

<Loop> RB_Sample_load 2

P1_100ul_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 1

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul

<WaitAllDone>

P1_100ul_chip

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 1

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 3.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul

<WaitAllDone>

RA_NH4HCO3_400ul

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul

<WaitAllDone>

P1_NH4HCO3_50ul

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 3

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 3.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 50.000 ul

<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load3

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 3

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min

02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul

03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min

03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul

<WaitAllDone>

P2_chip3

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3

03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min

03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul

<WaitAllDone>

<Loop> RA_NH4HCO3_1ml 2

Příloha B - Tabulka identifikovaných peptidů z obou podjednotek α -kaseinu pro druhou frakci štěpení v čipu trypsinem imobilizovaným na částicích SeraMag (1mg vstupního α -kaseinu)

Alfa-S1-kasein								
m/z exp.	MH+ teor.	Intenzita	Δ ppm	Modifikace	Začátek v sekvenci	Konec v sekvenci	Vynechaná štěpení	Aminokyselinová sekvence
748,372	748,370	37035	2,6		209	214	0	(K)TTMPLW(-)
831,387	831,384	21285	3,2		99	105	0	(K)EDVPSER(Y)
1267,706	1267,705	1090588	1,4		106	115	0	(R)YLGYLEQLLR(L)
1337,684	1337,681	290935	2,6		95	105	1	(K)HIQKEDVPSER(Y)
1384,732	1384,730	236643	1,5		38	49	0	(R)FFVAPFPEVFGK(E)
1580,830	1580,828	8874	1,3		121	134	0	(K)VPQLEIVPNSAEER(L)
1641,870	1641,868	22271	1,4		38	51	1	(R)FFVAPFPEVFGK EK(V)
1660,798	1660,794	36769	2,4	1 Fosfo	121	134	0	(K)VPQLEIVPNSAEER(L)
1759,945	1759,945	1712994	0,1		23	37	0	(K)HQGLPQEV LNE NLLR(F)
1871,991	1871,986	35839	2,5		119	134	1	(K)YKVPQLEIVPNSAEER(L)
1951,957	1951,953	181244	2,1	1 Fosfo	119	134	1	(K)YKVPQLEIVPNSAEER(L)
2000,085	2000,081	8290	2,1		118	134	2	(K)KYKVPQLEIVPNSAEER(L)
2080,053	2080,047	51531	2,5	1 Fosfo	118	134	2	(K)KYKVPQLEIVPNSAEER(L)
2235,239	2235,236	340706	1,6		19	37	1	(K)HPIKHQGLPQEV LNENLLR(F)
2316,139	2316,137	32838	1,0		148	166	0	(K)EPMIGVNQELAY FYPELFR(Q)
2332,136	2332,132	2780	1,9	1 Oxidace	148	166	0	(K)EPMIGVNQELAY FYPELFR(Q)
2548,264	2548,263	9631	0,5	1 Fosfo	119	139	2	(K)YKVPQLEIVPNSAEERLHSMK(E)
2586,373	2586,368	9870	1,9		95	115	2	(K)HIQKEDVPSERY LGYLEQLLR(L)
3207,595	3207,593	78802	0,6		140	166	1	(K)EGIIHAQQKEPMI GVNQELAYFYPELFR(Q)
3223,587	3223,588	2503	-0,4	1 Oxidace	140	166	1	(K)EGIIHAQQKEPMI GVNQELAYFYPELFR(Q)
Alfa-S2-kasein								
m/z exp.	MH+ teor.	Intenzita	Δ ppm	Modifikace	Začátek v sekvenci	Konec v sekvenci	Vynechaná štěpení	Aminokyselinová sekvence
746,458	746,4559	119229	2,8		215	220	0	(K)VIPYVR(Y)
748,3718	748,3723	37035	-0,8		168	173	0	(K)LTTEEK(N)
903,4709	903,4683	7477	2,9		197	203	0	(K)TVYQHQA(A)

975,602	975,5986	33706	3,5		213	220	1	(K)TKVIPYVR(Y)
979,5638	979,5611	73498	2,7		189	196	0	(K)FALPQYLK(T)
1018,519	1018,516 4	8992	2,7		168	175	1	(K)LTEEEKNR(L)
1022,607	1022,603 3	5519	3,4		215	222	1	(K)VIPYVRYL(-)
1098,616	1098,612 8	44862	2,6		204	212	0	(K)AMKPWIQPK(T)
1195,682	1195,679 3	68047	2,4		130	140	0	(R)NAVPITPTLNR(E)
1247,662	1247,659	6176	2,3		166	175	2	(K)TKLTEEEKNR(L)
1351,784	1351,780 5	6144	2,7		129	140	1	(K)RNAVPITPTLNR(E)
1367,699	1367,695 4	22468	2,3		96	106	0	(K)ALNEINQFYQK(F)
1466,614	1466,612 1	4040	1,3	1 Fosfo	153	164	0	(K)TVDMESTEVFTK(K)
1594,712	1594,707	4927	2,9	1 Fosfo	152	164	1	(K)KTVDMESTEVEFTK(K)
1594,712	1594,707	4927	2,9	1 Fosfo	153	165	1	(K)TVDMESTEVFTK(K)(T)
1633,894	1633,890 8	24064	2,1		168	180	2	(K)LTEEEKNRLNFLK(K)
2709,415	2709,407 5	4353	2,8		107	128	0	(K)FPQYLQYLYQGP IVLNPWDQVK(R)
2716,259	2716,259	2862	0,1	2 Fosfo	130	152	2	(R)NAVPITPTLNR QLSTSEENSKK(T)
2865,51	2865,508 6	1861	0,6		107	129	1	(K)FPQYLQYLYQGP IVLNPWDQVKR(N)

Příloha C – Protokol vytvořený pro fosforylaci peptidového substrátu proteinkinázou A imobilizovanou na magnetických částicích v programu μ Process

*04Ventily5a6 4VM = 4VM01
*03Pumpa2 SPS01 = SPS01 80 ul
*01Ventily1-4 4VM = 4VM01
*02Pumpa1 SPS01 = SPS01 80 ul

RC-WashB_P1_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 1 0 0 0
<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 1 1
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 1 0 0 0
<WaitAllDone>

P2_chip

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<WaitAllDone>

RD-ReagB_P1_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 3 0 0 0
<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 1 0
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P2_chip

01Ventily1-4 4VM: SetValves 0 3 0 0
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<WaitAllDone>

RA-sample_P1_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 200.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 60.000 ul
<WaitAllDone>

P1_chip_25ul

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 3
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 35.000 ul
<WaitAllDone>

P1_chip_35ul

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 2.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<WaitAllDone>

ReactionB_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 1 0
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 50.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 3 0 0 0
<WaitAllDone>

ReactionB_chip_40ul

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 2.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 10.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 3 0 0 0
<WaitAllDone>

ReactionB_chip_10ul

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 50.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul

Příloha D - Protokol vytvořený pro izolaci ovalbuminu metodou imunoafinitní chromatografie na magnetických částicích v programu μ Process

*02Pumpa1 SPS01 = SPS01 80 ul
*03Pumpa2 SPS01 = SPS01 80 ul
*01Ventily1-4 4VM = 4VM01
*04Ventily5a6 4VM = 4VM01

0,1M_pH7_fospufr.

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load.

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 3
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P2_chip.

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<WaitAllDone>

<Loop> 0,1M_pH7_fospufr. 5

RB_Sample_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 1
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 1
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 9.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P2_chip

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 1
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 9.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<Loop> RB_Sample_load 2

P1_100ul_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 1

02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P1_100ul_chip

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 1
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 9.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<WaitAllDone>

0,1M_pH7_fosfpufr

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load..

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 3 3
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul
<WaitAllDone>

P2_chip..

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 3 3
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<WaitAllDone>
<Loop> 0,1M_pH7_fosfpufr 5

RC_P1_load

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 1 0 0 0
<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load...

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 1 0
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 1 0 0 0
<WaitAllDone>

P2_chip...

01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul

04Ventily5a6 4VM: SetValves 1 0 0 0
<Loop> RC_P1_load 3
<WaitAllDone>

RD_P1_load_400
01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 3 1 0
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 100.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 3 0 0 0
<WaitAllDone>

P1_chip_P2_load_400
01Ventily1-4 4VM: SetValves 1 1 1 0
02Pumpa1 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
02Pumpa1 SPS01: MoveTo 0.000 ul
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 800.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 100.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 3 0 0 0
<WaitAllDone>

P2_chip_400
03Pumpa2 SPS01: SetFlowRate 60.000 ul/min
03Pumpa2 SPS01: MoveTo 0.000 ul
04Ventily5a6 4VM: SetValves 3 0 0 0
<Loop> RD_P1_load_400 2
<WaitAllDone>

P3_Elution
04Ventily5a6 4VM: SetValves 0 0 0 1
06Pumpa3 SPS01: SetFlowRate 500.000 ul/min
06Pumpa3 SPS01: MoveTo 75.000 ul
<WaitAllDone>

P3_chip
04Ventily5a6 4VM: SetValves 0 0 0 3
06Pumpa3 SPS01: SetFlowRate 100.000 ul/min
06Pumpa3 SPS01: MoveTo 0.000 ul
<WaitAllDone>
<Loop> P3_Eluce 4