

MAGNETICKÉ ČÁSTICE V MIKROFLUIDNÍM ZAŘÍZENÍ CHIPGENIE A JEHO VYUŽITÍ V BIOANALÝZE

Michaela Černá, Zuzana Svobodová, Pavla Krulišová a Zuzana Bílková

*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická,
Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

Abstract

This work deals with the use of superparamagnetic particles functionalized by lectin in the ChipGenie microfluidic system for the IgG isolation. The objective was to select magnetic particles, which can be integrated into this microfluidic system and then isolate IgG from human serum by Lectin chromatography. The superparamagnetic particles were functionalized by Lectin Concanavalin A, which has affinity to glycosidic chains of IgG molecules. In parallel, we performed the ELISA with superparamagnetic particles as a solid phase for the verification of the system's functionality.

Souhrn

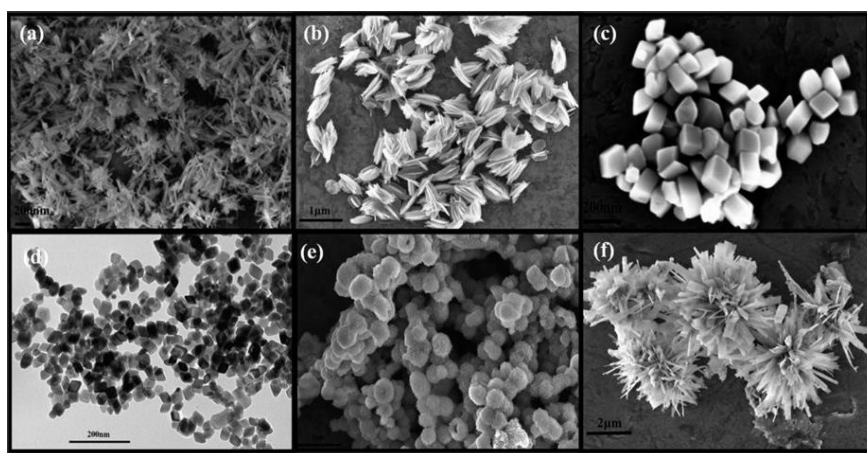
Tato práce se zabývá využitím superparamagnetických částic s navázaným lektinem v mikrofluidních systémech typu ChipGenie pro izolaci IgG. Cílem bylo vybrat magnetické částice vhodné pro integraci do tohoto mikrofluidního systému a celý systém pak použít pro izolaci IgG z lidského séra lektinovou chromatografií. Superparamagnetické částice byly funkcionalizovány lektinem konkanavalinem A, který má afinitu na glykosidické řetězce přítomné na IgG molekule. Paralelně byla pro ověření funkčnosti celého systému provedena metoda ELISA na magnetických částicích.

1. Úvod

Magnetické částice (MČ) se v posledních letech staly spolehlivou a nedílnou součástí mnoha biochemických a biologických analýz. Jejich využití je široké. Používají se např. pro průkaz, izolaci nebo purifikaci biomolekul typu enzymů, protilátek nebo nukleových kyselin. Magnetické částice lze také použít pro izolaci specifických buněk nebo při katalýze reakcí, kde MČ slouží jako nosiče enzymových molekul. Dnes je na trhu dostupná řada komerčně i experimentálně vyvíjených částic různých velikostí, složení, funkčních skupin na povrchu, koloidní stability, biologické kompatibility nebo tvarů. Některé komerčně dodávané magnetické částice mají již na povrchu navázaný specifický ligand. Výběr MČ závisí také na tom, pro jaký účel chceme magnetické částice používat. Velikost magnetických částic se

pohybuje od několika nanometrů až po desítky mikrometrů. Na obr. č. 1 jsou zobrazeny různé tvary magnetických částic.

Magnetické částice se velmi často využívají v mikrofluidních systémech. Díky jejich velkému reakčnímu povrchu v malém objemu lze výrazně zkrátit čas separačních kroků analýzy. Magnetické částice lze jako nosiče použít opakovaně, což je i ekonomicky výhodné. Avšak magnetické částice díky složení mohou nesespecificky sorbovat na stěny kanálků, komůrek nebo hadiček. Řeší se problémy integrace, fixace a míchání MČ. V současné době jsou tyto kroky klíčové pro větší využití techniky v analytické praxi [1, 2, 3, 4].



Obrázek 1: Různé tvary magnetických materiálů. A) nanotyčinky, b) nanočástice ve tvaru skořápky, c) protáhlé krychle, d) nanokrychle, e) nanočástice kulatého tvaru, f) nanočástice ve tvaru květiny [5].

Hlavním cílem této práce bylo ověřit vlastnosti a možnosti využití mikrofluidního zařízení ChipGenie P edition I. a II. generace, najít vhodný tvar a materiál mikrofluidních čipů pro analýzu a separace bioaktivních látek v kombinaci s magnetickými částicemi jako nosiče specifických ligandů. Cílem bylo stanovit optimální podmínky pro plnění reakční komůrky čipu, jeho promývání a nastavit optimální podmínky pro manipulaci se vzorkem. Dalším krokem bylo porovnat chování různých magnetických částic ve velikostní škále 0,5 - 100 μm uvnitř reakčních komůrek čipů a vybrat vhodné částice pro vlastní experimenty. Následně byly v čipu provedeny dvě různé stanovení a to: ELISA na magnetických částicích a lektinová afinitní chromatografie.

2. Experimentální část

2.1 Magnetické částice

Tabulka 1: Přehled použitých magnetických částic

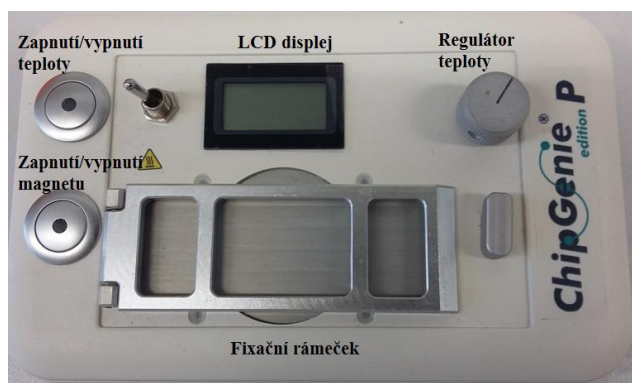
Název (zkratka)	Výrobce	Velikost (μm)	Funkční skupina	Materiál
SiMAG-Amine	Chemicell, Berlín, Německo	0,5	NH ₂	maghemit, matrix silika
SeraMag	SeraMag, Freemont, CA, USA	0,771	COOH	polystyrenové jádro obalené dvojitou vrstvou magnetitu, 40 %
SeraMag Speed Beads	SeraMag, Freemont, CA, USA)	0,816	COOH	polystyrenové jádro obalené dvojitou vrstvou magnetitu, 60 %
SeraMag	SeraMag, Freemont, CA, USA)	0,816	COOH	polystyrenové jádro obalené dvojitou vrstvou magnetitu, 40 %
ProMag	ProMag, Warrington, PA, USA	0,88	COOH	magnetit
SiMAG-Amine	Chemicell, Berlín, Německo	1	NH ₂	maghemit, matrix silika
Dynabeads My One	ThermoFisher scientific, Carlsbad, CA, USA	1	COOH	sférický tvar, polystyrenové
Dynabeads M270	ThermoFisher scientific, Carlsbad, CA, USA	2,8	NH ₂	sférický tvar, polystyrenové
Micromer M	Micromod, Rostock, Německo	3	NH ₂	sférický tvar, polystyrenové
hypersíťované poly(styren-co-divinylbenzen)ové částice	Institut makromolekulární chemie, Akademie věd, Praha, ČR	3,9	SO ₃ ²⁻	polystyrenové
Micromer M, PEG	Micromod, Rostock, Německo	4	NH ₂	sférický tvar, polystyrenové
PGMA-Albumin	Institut makromolekulární chemie, Akademie věd, Praha, ČR	4,5	NH ₂ , COOH	maghemit
Iontosorb MG 200	Iontosorb, Ústí nad Labem, ČR	80-100	OH	magnetit, matrix celulóza

2.2 Přístroje a zařízení

K experimentům byly použity magnetická zařízení ChipGenie P edition a mikrofluidní čipy (ChipShop, Jena, Německo). Zařízení ChipGenie P Edition (obr. č. 2) je všestranné mikrofluidní zařízení určené pro *on-chip* analýzu za použití MČ. Jedná se o malé stolní zařízení o rozměrech 150 x 90 x 30 mm. Zařízení umožňuje regulaci teploty pomocí vyhřívací destičky umístěné pod rámečkem fixujícím mikrofluidní čip velikosti podložního sklíčka

mikroskopu. Pod ní je ještě umístěn permanentní magnet nebo magnety zajišťující pohyb magnetických částic v komůrkách mikrofluidního čipu.

V této práci byly použity dvě verze mikrofluidního čipu, vyrobené z polymethylmetakrylátu. Prvním z nich byl mikrofluidní čip o objemu dvou komůrek 120 μl , dále označován jako čip (120 μl). Každá komůrka měla 2 vstupy a 2 výstupy umístěné nad sebou po bocích komůrky. Druhým typem byl mikrofluidní čip obsahující čtyři komůrky, každá o objemu 100 μl , dále označován jako čip (100 μl). Tato komůrka má 2 vstupy a 2 výstupy, které jsou umístěny po dvou na každé straně komůrky v sériovém zapojení.

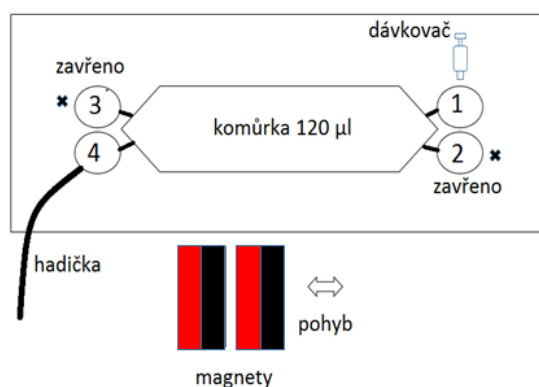


Obrázek 2: Mikrofluidní zařízení ChipGenie P edition II. generace.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Instalace mikrofluidního systému ChipGenie

Experimenty byly prováděny na dvou mikrofluidních zařízeních lišících se pouze velikostí, množstvím a uspořádáním magnetů. Jako první byl používán ChipGenie P edition I. generace (ChG I), obsahující dva permanentní magnety, každý o velikosti 30 x 5 x 10 mm. Severní póly magnetů směřují vlevo. Pro toto zařízení byl vybrán mikrofluidní čip se dvěma komůrkami každá o velikosti 120 μl (čip 120 μl), viz obr. č. 3.



Obrázek 3: Schématické zapojení mikrofluidního systému ChG I a čipu (120 μl).

Dalším použitým zařízením bylo ChipGenie P edition II. generace (ChG II), které obsahovalo pouze jeden delší magnet o velikosti 35 x 10 x 15 mm. Severní pól směřoval nahoru směrem k čipu. U tohoto zařízení se používal mikrofluidní čip se čtyřmi komůrkami, každá o velikosti 100 μ l (čip 100 μ l). K aplikaci roztoků a magnetických částic dovnitř čipu byla používána injekční stříkačka o velikosti 2 ml, která měla odnímatelný vršek pro umístění druhé stříkačky. Všechny reagentie a MČ byly dávkovány dovnitř stříkačky pomocí pipety. Po zakrytí víčka s aplikátorem pro další injekční stříkačku naplněnou vzduchem vznikl na hladinu napipetované kapaliny tlak, pomocí kterého byla kapalina zaváděna do reakční komůrky čipu. Výstupem byla tygonová hadička jdoucí do nádoby zachytávající odpad nebo do zkumavky jímající vzorek. Ostatní vstupy byly uzavřeny umělohmotnými minizátkami.

3.2 Výběr MČ vhodných pro experimenty prováděné na ChipGenie I

Úkolem bylo zjistit, jak se MČ v mikrofluidním systému chovají a poté vybrat vhodné částice pro další experimenty a pro vazbu ligandu. Na výběr bylo velké množství dostupných komerčních i experimentálně vyvíjených MČ, které se liší materiálem, velikostí, povrchovými vlastnostmi a funkčními skupinami na svém povrchu (viz tabulka č. 1).

Částice se testovaly v čipu (120 μ l) v kombinaci s ChG I. Hodnotila se především rychlost posunu částic v reakční komůrce, vymývání, shlukování částic a tvorba kompaktního fluidního lože. Např. částice Iontosorb vytvořily kompaktní fluidní lože, jak je znázorněno na obr. č. 4.



Obrázek 4: Příklad kompaktního fluidního lože magnetických částic Iontosorb

Bylo zjištěno, že vymývání částic není závislé jen na velikosti částic, ale také na jejich magnetismu, respektive poměru velikosti a obsahu oxidů železa, tedy jejich magnetizovatelnosti v přítomnosti magnetického pole. Některé MČ se vymývaly, pokud docházelo k jejich shlukování. Dalším důležitým kritériem bylo množství zaváděných magnetických částic. U malého množství částic nedocházelo k rovnoměrnému vytvoření kompaktního fluidního lože v rámci komůrky. U většího množství částic docházelo k překročení kapacity systému a k masivnějšímu vymývání. Jak se jednotlivé částice v čipu chovaly, je shrnuto v tabulce č. 2, kde je hodnoceno maximální aplikované množství částic v

čipu, jejich pohyb, zda měly MČ tendenci se vymývat nebo agregovat. Poté jsou MČ ohodnoceny celkově, zda jsou vhodné pro mikrofluidní uspořádání.

Tabulka 2: Přehled MČ a hodnocení jejich chování v ChG I.

Název	Max (mg)	Velikost (μm)	Agregace	Posun v komůrce při pohybu magnetu	Vymývání	Celk. hodnoc.
SiMAG-NH ₂	6	0,5	ano	rychle	od začátku slabě	-
SeraMag	4	0,771	ne	velmi rychle	od začátku silně	-
SeraMagSpeed	6	0,816	ne	středně	po 3 mg silně	-
SeraMag	5	0,816	ne	velmi rychle	od začátku silně	-
ProMag	3	0,88	ne	rychle	pouze u 1. mg	+
SiMAG-NH ₂	10	1	ano	středně	od začátku silně	-
DynOne	4	1	ne	rychle	od začátku silně	-
Dynabeads	10	2,8	ne	pomalu	od 8. mg slabě	+
Micromer	10	3	ne	středně	od 5 mg slabě	+
HMP-S-MG4	9	3,9	ne	pomalu	od začátku slabě	-
Micromer	10	4	ne	středně	od 9 mg slabě	+
PGMA-ALB	10	4,5	ne	pomalu	od 8 mg slabě	+
Iontosorb	6	80-100	ne	rychle	od 3 mg silně	-

Nejlépe se v čipu chovaly částice v rozmezí velikostí 2,8 – 4,5 μm a částice ProMag o velikosti 0,88 μm. Žádné z těchto MČ neagregovaly, vytvořily ucelené fluidní lože, nevymývaly se. K dalším experimentům na ChipGenie I a čipu (120 μl) byly vybrány částice Micromer o velikosti 3 μm s NH₂ funkční skupinou.

Dále se magnetické částice testovaly v zařízení ChipGenie P Edition II. generace s jiným uspořádáním magnetu a čipem o objemu 100 μl. U tohoto uspořádání se částice pohybovaly v souladu s pohybem magnetů. Vzhledem k tomu, že generace ChG II nabízí jiné uspořádání fluidního lože, byly sledovány i trochu jiné parametry. Hodnocení magnetických částic je shrnuto v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Přehled MČ a hodnocení jejich chování v ChG II.

název	Velikost (μm)	fluidní lože	posun lože v komůrce	promíchání roztoku pomocí 2 mg. MČ	Celk. Hodnoc.
SeraMagSpeed	0,816	kompaktní	ano	5 min.	+
ProMag	0,88	kompaktní	ano	30 min.	+
Dynabeads	2,8	neucelené	ne	30 min.	-
Micromer	3	kompaktní	ne	více než 45 min.	-
PGMA-ALB	4,5	kompaktní	ne	více než 45 min.	-
Intosorb	80-100	kompaktní	ano	30 min.	+
Micromer + Intosorb	3, 80-100	kompaktní	ano	30 min.	+

Nejlépe se chovaly částice SeraMagSpeed (0,816 μm), které měly celistvé fluidní lože, částice se v reakční komůrce čipu pohybovaly po celou dobu spolu s magnetem. Plánované experimenty se tedy prováděly na MČ Micromer (3 μm) v kombinaci s ChG I a čipem (120 μl) nebo na MČ SeraMagSpeed (0,816 μm) v kombinaci s ChG II a čipem (100 μl).

3.3 ELISA na magnetických částicích

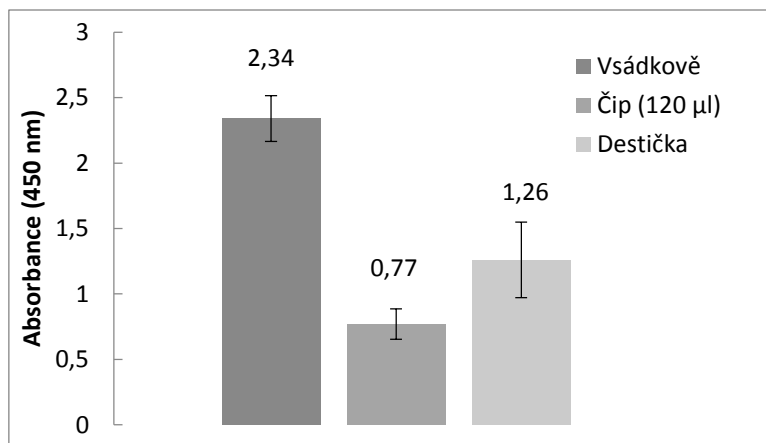
K ověření funkčnosti mikrofluidního systému, chování MČ, promíchávání roztoků a optimalizaci mikrofluidního čipu byla vybrána metoda ELISA na magnetických částicích tzv. MELISA. V této práci jsme zavedenou metodu MELISA převedli do mikrofluidního systému. Byl použit modelový systém pro průkaz antichymotrypsinových protilátek pomocí magnetického nosiče s antigenem α -chymotrypsinem. Souběžně se pracovalo v uspořádání vsádkovém a mikrofluidním pro porovnání citlivosti obou metod.

Nejdříve byly připraveny MČ s kovalentně navázaným α -chymotrypsinem. U magnetických částic Micromer o průměru 3 μm byla průměrná koncentrace navázaného α -chymotrypsinu 117,2 μg na 1 mg částic. U magnetických částic SeraMagSpeed o průměru 0,816 μm byla průměrná koncentrace navázaného α -chymotrypsinu 91,1 μg na 1 mg částic.

3.3.1 Stanovení množství specifických protilátek pomocí MELISA na částicích Micromer

Nejdříve bylo nutné ověřit velikost nespecifické sorpce na částicích v čipu. Měření se provádělo na ChG I, v čipu (120 μl) na 1 mg magnetických částic Micromer. Z výsledků měření vyplývá, že v mikrofluidním systému i vsádkovém uspořádání můžeme i s větším množstvím použitých částic dosáhnout podobně nízké nespecifické sorpce, jakou dosahujeme v mikrotitrační destičce, pokud dojde k dodržení všech promývacích kroků.

Následovalo stanovení specifických antichymotrypsinových IgG z hyperimunního séra předředěného 1:30 000 ve všech třech uspořádáních. Ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání se pracovalo s 1 mg MČ, v mikrotitrační destičce s 30 μg MČ na jamku. Průměrné hodnoty absorbance všech měření jsou zobrazeny pomocí grafu se směrodatnou odchylkou na obr. č. 5. V mikrotitrační destičce byla průměrně naměřená hodnota absorbance při 450 nm 1,26. U vsádkového uspořádání byla hodnota absorbance vyšší průměrně 2,34. V mikrofluidním systému byla ovšem hodnota absorbance nižší než v mikrotitrační destičce, průměrně 0,77. Byla ověřena funkčnost mikrofluidního uspořádání s pozitivním výsledkem měření.



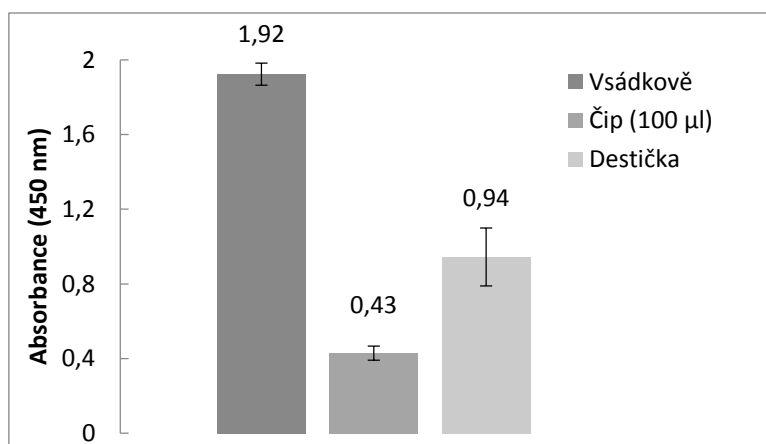
Obrázek 5: Výsledky stanovení specifických antichymotrypsinových protilátek (výchozí ředění séra 1:30 000) metodou MELISA na MČ Micromer.

Z dosažených výsledků vyplývá, že metoda nedosahuje citlivosti jako v klasickém uspořádání na mikrotitrační destičce. To mohlo být také způsobeno neuspokojivým technickým stavem mikrofluidního zařízení ChipGenie I, kdy velmi často docházelo k zaseknutí magnetu a částice se tak nepromíchávaly po celou dobu analýzy. Možnou variantou bylo přejít na zařízení ChipGenie II, s menším objemem komůrky (100 µl) a částicemi SeraMagSpeed, které vykazovaly shodné parametry

3.3.2 Stanovení množství specifických protilátek pomocí MELISA na částicích SeraMagSpeed

V tomto experimentu bylo používáno magnetické míchadlo ChG II, čip (100 µl) a MČ SeraMagSpeed o velikosti 0,816 µm v množství 1 mg MČ ve vsádkovém a mikrofluidním uspořádání a 30 µg MČ na jamku mikrotitrační destičky.

Bylo prováděno stanovení hyperimunního séra předředěného 1:30 000 (obsahujícího antichymotrypsinové protilátky) ve všech třech uspořádáních. Nejvyšší hodnoty absorbance byly naměřeny ve vsádkovém uspořádání, kde se průměrná hodnota pohybovala okolo 1,92. Průměrná hodnota absorbance v mikrotitrační destičce byla 0,94. U mikrofluidního systému došlo k nepatrnému zvýšení absorbance (0,43) proti slepým vzorkům. Mikrofluidní uspořádání se v tomto případě neosvědčilo. Průměrné hodnoty absorbance a velikost směrodatné odchylky jsou zobrazeny v grafu na obr. č. 6.



Obrázek 6: Výsledky stanovení specifických antichymotrypsinových protilátek (výchozí ředění séra 1:30 000) metodou MELISA na MČ SeraMagSpeed.

Porovnáním obou typů testovaných mikrofluidních systémů bylo zjištěno, že u prvního typu s použitím ChG I, čipu (120 µl) a MČ Micromer o průměru 3 µm jsou naměřené hodnoty absorbance vyšší než u druhého typu ChG II, čipu (100 µl) a MČ SeraMagSpeed o průměru 0,816 µm. Možným důvodem byla vyšší nespecifická sorpce v čipu (100 µl). Z naměřených výsledků vyplynulo, že MELISA metodu lze z mikrotitrační destičky převést do mikrofluidního systému, ale je zapotřebí tento systém pečlivě optimalizovat. Takto převedený systém nenabízí žádné zlepšení proti mikrotitrační destičce, kde lze při jedné analýze proměřit více vzorků najednou.

3.4 Lektinová afinitní izolace na magnetických částicích

Druhou testovanou metodou byla lektinová afinitní izolace na magnetických částicích. Principem této metody je schopnost konkanavalinu A v přítomnosti Mn^{2+} , Mg^{2+} a Ca^{2+} iontů vázat specifické oligosacharidové struktury. Toho lze využít k izolaci imunoglobulinu G, který obsahuje glykosidické řetězce na Fc fragmentu.

Nejdříve byl konkanavalin A navázán na magnetické částice a účinnost vazby byla ověřena gelovou elektroforézou. Poté bylo přistoupeno k samotné izolaci IgG v mikrofluidním a vsádkovém uspořádání. Po vzniku biospecifického komplexu magnetická částice-konkanavalin A-IgG byly odstraněny nenavázané látky a poté se přistouplilo k eluci, kdy se rozvolnilo spojení konkanavalinu A-IgG a tak byla izolována samotná molekula IgG. Alternativně byla vyzkoušena i izolace těžkých řetězců po rozvolnění IgG na H a L řetězce.

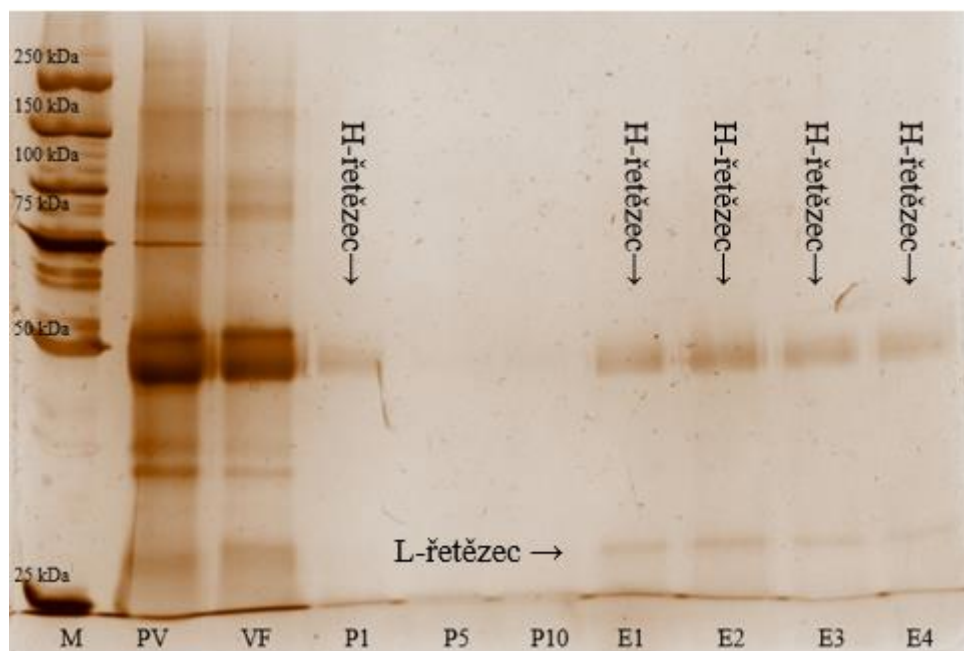
3.4.1 Izolace H řetězců IgG pomocí MČ SeraMagSpeed s konkanavalinem A

Nejdříve byl připraven lektinový nosič (SeraMagSpeed částice s imobilizovaným konkanavalinem A) a rozvolněno IgG na lehké a těžké řetězce. Izolace IgG probíhala v čipu

(100 μ l) na zařízení ChG II s 2 mg nosiče. Kontinuálně byla prováděna izolace i ve vsádkovém uspořádání s použitím stejného množství částic a objemů roztoků. Samotná inkubace nosiče s rozvolněným IgG probíhala 1,5 hodiny. Bylo zvoleno promývání 10 x 1 ml promývacího pufru, které bylo gelovou elektroforézou ověřeno pro odstranění nežádoucích kontaminantů jako dostačující. Eluční roztok měl toto složení: 20mM TRIS, 0,5M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0,2 M methyl α -D-glukopyranosid, 0,2 M methyl α -D-manopyranosid.

V některých člancích, které se zabývaly kompetitivní elucí IgG molekul z lektinového nosiče, použili eluční mobilní fázi různých hodnot pH. Proto bylo testováno kyselé pH 3 a neutrální pH 6. Z opakovaných gelových elektroforéz bylo zjištěno, že při pH 6 dochází k eluci většího množství těžkých řetězců IgG než u pH 3. Počet elučních kroků byl nastaven na čtyři opakování po 15 minutách. Izolace se prováděla ve třech opakováních.

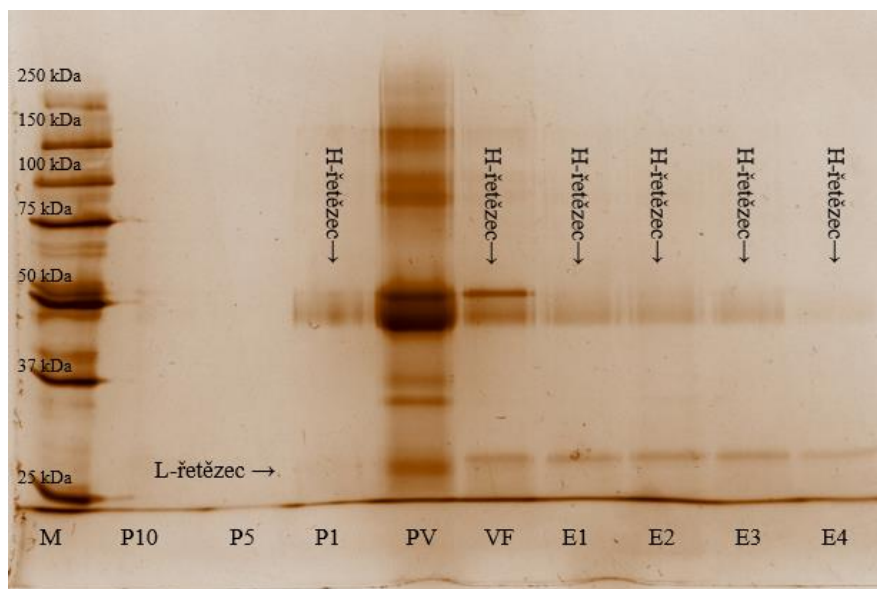
Po izolaci těžkých řetězců IgG došlo k proměření všech vzorků gelovou SDS-PAGE elektroforézou. Na obr. č. 7 je zobrazen elektroforeogram eluce všech frakcí v mikrofluidním systému, gel byl barven dusičnanem stříbrným.



Obrázek 7: Elektroforeogram lektinové afinitní izolace v mikrofluidním systému, SDS-PAGE, 12% gel, barveno dusičnanem stříbrným. (M: marker, PV: původní vzorek, VF: vazebná frakce, P1, P5, P10: 1., 5. a 10. promytí, E1 - E4: 1. - 4. eluční frakce)

Bylo potvrzeno, že na lektinovém nosiči dochází k účinné izolaci H a L řetězců IgG s využitím všech výhod fluidního systému. Na elektroforeogramu je patrné, že dochází

k uvolnění H řetězců ve všech čtyřech elučních frakcích. Ve vazebné frakci zůstává 54 % původního vzorku H řetězců, tato hodnota je pouze orientační. Na obr. č. 8 je zobrazen elektroforeogram izolace ve vsádkovém uspořádání. Z výsledků vyplývá, že vazebná kapacita nosiče byla vícenásobně překročena.



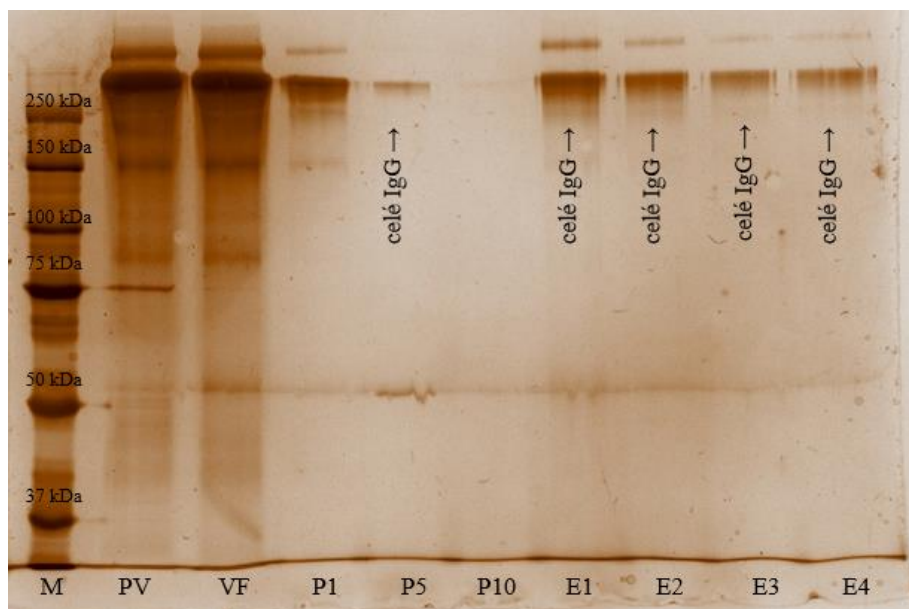
Obrázek 8: Elektroforeogram lektinové afinitní izolace ve vsádkovém uspořádání, SDS-PAGE, 12% gel, barveno dusičnanem stříbrným. (M: marker, PV: původní vzorek, VF: vazebná frakce, P1, P5, P10: 1., 5. a 10. promytí, E1 - E4: 1. - 4. eluční frakce)

U vsádkového uspořádání byly H řetězce IgG eluovány v největší míře při druhém elučním kroku a to 26,5 %. Hodnota je pouze orientační. Vsádkové uspořádání izolace IgG na lektinovém nosiči je proti mikrofluidnímu systému pomalejší. U mikrofluidního systému došlo ke zkrácení celé analýzy o půl hodiny. Při porovnání obou uspořádání se více osvědčilo uspořádání mikrofluidní. Především kvůli snadnější manipulaci s roztoky. Pokud jde o dosažené výsledky samotné izolace, nebyly patrné velké rozdíly v účinnosti.

3.4.2 Izolace imunoglobulinu G

Cílem bylo ověřit, že lze pomocí konkanavalinu A izolovat celé molekuly IgG ze séra, aniž by musely být molekuly rozvolňované na těžké a lehké řetězce. Postup byl stejný jako u izolace těžkých řetězců IgG pouze se pracovalo s celou molekulou IgG v koncentraci 100 μg / 100 μl vazebného pufru. Izolace IgG byla opakována 3x. Bylo zjištěno, že na MČ s konkanavalinem A dochází ke kvantitativní izolaci celé molekuly a není zapotřebí

rozvolňování. Na obr. č. 9 je elektroforeogram izolace se zobrazením promývacích kroků a elučních frakcí.



Obrázek 9: Elektroforeogram lektinové afinitní izolace v mikrofluidním systému, SDS-PAGE, 12% gel, barveno dusičnanem stříbrným. (M: marker, PV: původní vzorek, VF: vazebná frakce, P1, P5, P10: 1., 5. a 10. promytí, E1 - E4: 1. - 4. eluční frakce)

Z obrázku je patrné, že 10 promývacích kroků je dostačujících. IgG se eluovalo ve všech čtyřech elučních frakcích, nejvíce v prvních dvou elucích. Ve všech čtyřech elucích se eluovalo okolo 46 % z původního vzorku.

Celkově lze hodnotit, že lze pomocí konkanavalinu A v mikrofluidním systému izolovat celou molekulu IgG stejně tak jako rozvolněné IgG se srovnatelnou účinností.

4 Závěr

Hlavním cílem práce bylo otestovat vlastnosti a možnosti využití mikrofluidního zařízení ChipGenie P edition I. a II. generace pro magnetické částice a různé bioaplikace. Konkrétně se jednalo o ELISA metodu s MČ jako pevnou fází a lektinovou afinitní chromatografií. V rámci experimentů byly otestovány dva druhy mikrofluidních čipů, lišící se velikostí reakční komůrky. Dále dvě generace ChipGenie, lišící se především pozicí, pohybem a velikostí magnetů nutných k fixaci magnetických částic uvnitř čipu. Podstatné bylo vybrat vhodné magnetické částice pro každou generaci zařízení, stejně jako typ použitého čipu. Naše pracoviště disponuje širokou škálou různých komerčních i experimentálně vyvinutých částic

lišících se velikostí, funkční skupinou a obsahem magnetického materiálu. Celkem jich bylo v této práci otestováno 13 různých druhů.

První aplikací bylo převedení ELISA metody na magnetických částicích z mikrotitrační destičky do mikrofluidního systému. Obě varianty mikrofluidních systémů byly paralelně porovnávány se vsádkovým uspořádáním a jako kontrola bylo prováděno měření v mikrotitrační destičce. Obě uspořádání se prokázala jako funkční, přesto naměřené hodnoty absorbance nebyly srovnatelné se vsádkovým uspořádáním ani mikrotitrační destičkou. Nevýhodou mikrofluidního uspořádání je nemožnost paralelně provést kalibraci ke zjištění množství přítomných protilátek jako je tomu při uspořádání v mikrotitrační destičce, a proto používání této metody v mikrofluidním systému není dle našich výsledků výhodné.

Druhou aplikací byla lektinová afinitní izolace glykozylovaných částí molekuly imunoglobulinu G na nosiči s imobilizovaným konkanavalinem A. Lze hodnotit, že výsledky z mikrofluidního uspořádání jsou srovnatelné se vsádkovým. Navíc u mikrofluidního uspořádání dochází ke zrychlení analýzy, díky jednodušší manipulaci při promývání a aplikaci vzorků a elučních roztoků.

Byla vyzkoušena i izolace celých molekul IgG. Izolací celé molekuly IgG bylo potvrzeno, že není zapotřebí při lektinové afinitní chromatografii v mikrofluidním uspořádání IgG rozvolňovat pro zpřístupnění glykozylačního místa.

Závěrem lze říci, že ze dvou vyzkoušených aplikací převedených do mikrofluidního systému se osvědčila lektinová afinitní izolace. Podařilo se odstranit problémy a úskalí spojené s manipulací částic, nastavit vhodné promývací kroky, upravit dávkování a vybrat vhodné podmínky eluce.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Studentské grantové soutěže Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, projekt č. SGSFChT_2016001.

Literatura

1. HORÁK, D.; MACKOVÁ, H.; BENEŠ, M.: Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*, 2007, 30.11: 1751-1772

2. SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M.: Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2004, 2.1: 1-7
3. PAMME, N.: Magnetism and microfluidics. *Lab on a Chip*, 2006, 6.1: 24-38.
4. JAMSHAD, T.; NETO, E. T. T.; EISSA, M. M.; ZINE, N.; KUNITA, M. H.; EL-SALHI, A. E.; ELAISSARI, A.: Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 2015.
5. SAYED, F. N.; POLSHETTIWAR, V.: Facile and Sustainable Synthesis of Shaped Iron Oxide Nanoparticles: Effect of Iron Precursor Salts on the Shapes of Iron Oxides. *Scientific reports*, 2015, 1.5: 1-6.

