

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-929**  
(22) Přihlášeno: **14.12.2010**  
(40) Zveřejněno: **14.03.2012**  
(Věstník č. 11/2012)  
(47) Uděleno: **01.02.2012**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.03.2012**  
(Věstník č. 11/2012)

(11) Číslo dokumentu:

## 303 056

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*G01N 33/48* (2006.01)  
*G01N 33/52* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)  
*C07K 1/00* (2006.01)  
*H01J 49/02* (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2004043497 A.; US 2006145089 A.; US 2004119010 A.; WO 2004034011 A.; EP 1612550 A.; CN 101825615 A.

(73) Majitel patentu:

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ

(72) Původce:

Volný Michael Ph.D., Praha 4, CZ

Novák Petr Ph.D., Dolní Břežany, CZ

Havlíček Vladimír Doc. Dr. Ing., Praha 4, CZ

Pompach Petr Ph.D., Mratín, CZ

(74) Zástupce:

Středisko společných činností AV ČR, v.v.i., Patentové a  
licenční služby, Národní 1009/3, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci  
fosforylovaných peptidů pro desorpčně-  
ionizační techniky hmotnostní spektrometrie**

(57) Anotace:

Podstatou řešení je způsob provedení modifikace pevných substrátů pro účinnou povrchovou prekoncentraci fosfopeptidů ze složitých peptidických směsí před detekcí založenou na desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii. Předmětem ochrany je způsob modifikace povrchů používaných jako substráty pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii. Metoda je založena na elektronebulizaci (elektrosprejování) roztoku organokovových sloučenin prvků skupiny 4B, a to zirkonia, hafnia a titanu. Vzniklý nabitý elektrosprej je vysušen v reálném čase průchodem vyhříváním prostorem a dopadá na povrch, na který se pevně naváže ve formě oxidu. Takto modifikovaný povrch potom může být použit pro prekoncentraci fosfopeptidů z peptidových směsí s následnou analýzou desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii.

CZ 303056 B6

## Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci fosforylovaných peptidů pro desorpčně-ionizační techniky hmotnostní spektrometrie

### 5 Oblast techniky

Fosfoproteomika; modifikované povrchy pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii. Modifikace pevných substrátů pro účinnou povrchovou prekoncentraci fosfopeptidů ze složitých peptidických směsí před detekcí založenou na desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii.

10

### Dosavadní stav techniky

Chemické změny proteinů v buňce, takzvané posttranslační modifikace, jsou důležitým projevem složitých biochemických procesů a jsou přímo spojené s biologickým stavem buňky. Proto jsou posttranslační modifikace spojené s celou řadou onemocnění, včetně onkologických. Jejich poznání je proto nutnou podmínkou k vývoji nové generace cílených terapií. Jednou z nejčastěji studovaných posttranslačních modifikací je připojení fosforečnanové skupiny kovalentní vazbou, takzvaná fosforylace. Její důležitost je dána tím, že fosforylace je používána k zapínání a vypínání většiny biologických procesů v buňce. Standardní proteomické postupy (Aebersold, 2001), založené na kombinaci kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s kolizí indukovanou disociací, nejsou ve většině případů schopny odlišit posttranslačně fosforylované peptidy ve směsi s ostatními peptidy. Důvodem je záporný náboj na fosfoskupině, který brání efektivní ionizaci v pozitivním elektrosprejovém módu a diskriminuje tak fosfopeptidy oproti nefosforylovaným peptidům. Proto je obvykle zapotřebí zredukovat složitost směsi oddělením fosfopeptidů a do stanovení tak musí být zařazen další identifikační krok. Metody používané pro odlišení fosfopeptidů od peptidů nefosforylovaných mohou být rozděleny do dvou skupin na chemické a afinitní (Bodenmiller, 2007). Chemické metody jsou založeny na beta eliminaci fosforečnanové skupiny, přičemž vzniklá dvojná vazba může dále reagovat s různými nukleofilními činidly a nově vzniklá funkcionalizace umožní selektivní izolaci takto modifikovaného fosfopeptidu. Mezi důležité chemické metody patří například metoda PAC (*phosphoramidate chemistry*) (Zhou, 2001). Afinitní metody jsou založené na oddělení fosfopeptidů ze směsi pomocí afinitní interakce s pevným substrátem. Patří sem zejména *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) a/nebo oddělení na oxidu titaničitém, zirkoničitém nebo hlinitém (Bodenmiller, 2007). Všechny výše uvedené metody se používají ve spojení s hmotnostní spektrometrií, a to buď přímo on-line spojením jako další dimenze chromatografické separace, nebo off-line, přičemž oddělené frakce jsou potom sbírány a stanovovány pomocí elektrosprejové hmotnostní spektrometrie nebo pomocí *matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry* (MALDI-MS). Hlavními nevýhodami takového přístupu je nemožnost automatizace a problémy při práci s malými objemy. Proto se začalo experimentovat s obohacováním fosfopeptidů před analýzou pomocí metody MALDI-MS přímo na povrchu, ze kterého je provedena ionizace. V těchto experimentech je povrch, ze kterého mají být analyzovány fosfopeptidy, předem upraven nanosením vrstvy afinitního činidla, které přednostně zadrží fosfopeptidy ze směsi. Po omytí ostatních peptidů jsou potom afinitně vázané fosfopeptidy analyzovány pomocí standardního provedení metody MALDI-MS. Tento způsob je výrazně jednodušší než spojení s elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií (ať již v on-line nebo off-line režimu) a navíc dosahuje lepších limitů detekce. Problémem však zůstává nalezení vhodného způsobu přípravy modifikovaného MALDI povrchu. Nejpoužívanějším modifikovaným povrchem pro analýzu fosfopeptidů je vrstva oxidů titanu nebo zirkonia. Tato vrstva je připravovaná různými způsoby, které s sebou přináší řadu nevýhod, a to jak v samotné přípravě, tak při provádění analýz fosfopeptidů. Například dva v literatuře nedávno popsány způsoby trpí značnými nedostatky. Blacken (Blacken 2007, 2009) použil metodu takzvaného *reactive landing*. Tento způsob úpravy povrchu se odehrává ve vakuu a povrch je bombardován desolvatovanými ionty, respektive iontovými klastry (Løver, 1997), které byly získány měkkou ionizací alkoxidů stabilních prvků 4B skupiny. Nabité klastry alkoxidů stabilních prvků 4B skupiny, které v metodě *reactive landing* podle Blackena

55

5 narážejí do povrchu a modifikují jej, se pohybují v prostředí s dostatečně dlouhou střední volnou  
 dráhou na to, aby mohly být externím elektrostatickým polem urychleny na výrazně hyper-  
 termální energii (Blacken 2007, 2009) až napětím 15V, což by při dopadu odpovídalo více než  
 tisícinásobku normální interní energie při laboratorní teplotě). K modifikaci tak dojde v důsledku  
 10 rozbití urychlených původních iontů o povrch – jedná se tedy o kinetickou energii indukovanou  
 reakcí. Metoda poskytuje kvalitní a mechanicky stálou modifikaci povrchu schopného akumulovat  
 fosfopeptidy. Nevýhodou tohoto postupu je nepřiměřená délka celého procesu přípravy povrchu – až několik hodin.  
 K provedení je navíc zapotřebí zkonstruovat speciální přístroj, do kterého  
 15 se vloží povrch určený k modifikaci. Přístroj se potom vypumpuje tak, aby v něm bylo vakuum,  
 které se musí udržovat po celou dobu modifikace. Po dosažení vakua se na povrch střílí ionty o  
 vysoké energii po dobu přibližně tří hodin, ty se rozbíjejí a vytváří na povrchu vrstvu oxidu.  
 V přístroji tak lze připravit jen několik vzorků denně a tomu odpovídá i potenciální cena jeho  
 modifikace. Druhým známým způsobem je pulzní laserová depozice oxidu titaničitého (Torta,  
 2009), zcela odlišná technika, která však poskytuje horší a méně kvalitní pokrytí a která je rovněž  
 20 nákladná. Další alternativou je standardní depozice pomocí vlhkého elektrospreje. Ten lze využít  
 například pro depozici oxidu zirkoničitého na horký povrch. Teplota povrchu vede k rozkladu  
 deponovaných kapiček, což má ovšem za následek nestabilní pokrytí s popraskanou vrstvou  
 depozitu (Blacken 2009 a vlastní experimenty). Jinou možností je přímo elektrosprejová depozice  
 oxidu titaničitého (Niklew, 2010). Tento postup je však ztížen tím, že oxid titaničitý je zcela  
 25 nerozpustná látka, a je tedy třeba sprejovat jeho suspenzi. To je spojeno s technickými problémy  
 (mechanické ucpávání sprejeru, nestabilita sprejovacího proudu). Další příklady řešení jsou cito-  
 vány na obr. 5 a obr. 6 v tabulkách, ze kterých je patrné, že v analýze fosfopeptidů kaseinu mají  
 svá omezení.

## 25 Literatura

- Aebersold R, Goodlett DR: CHEMICAL REVIEWS (2001) 101, 2, 269 až 295.  
 Blacken, GR; Volny, M; Diener, M, et al.: JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR  
 MASS SPECTROMETRY (2009) 20, 6, 915 až 926.  
 30 Blacken, GR; Volny, M; Vaisar, T, et al.: ANALYTICAL CHEMISTRY (2007) 79, 14, 5449 až  
 5456.  
 Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller, M, Domon B, Aebersold R: NATURE METHODS (2007)  
 4, 3, 231 až 237.  
 Lover T, Henderson W, Bowmaker GA, Seakins JM, Cooney RP: JOURNAL OF MATERIALS  
 35 CHEMISTRY (1997) 7, 8, 1553 až 1558.  
 Niklew ML Analytical Chemistry 2010, 82, 1047 až 1053  
 Torta F, Fusi, Casari CS, Bottani CE, Bachi A: JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH (2009)  
 8, 4, 1932 až 1942.  
 Zhou HL, Watts JD, Aebersold R: NATURE BIOTECHNOLOGY (2001) 19, 4, 375 až 378.  
 40

## Podstata vynálezu

45 Předmětem tohoto vynálezu je nová metoda modifikace povrchů pro účinnou separaci fosfo-  
 peptidů ze směsi, která je poměrně snadná, nenáročná na přístrojové vybavení a připravený modi-  
 fikovaný povrch je stabilní a kvalitní. Modifikace je dosaženo elektrosprejováním roztoků alko-  
 xidů titanu, zirkonia nebo hafnia při atmosférickém tlaku v bezvodém alkoholu v přítomnosti  
 nosného plynu, kterým může být kterýkoliv inertní plyn nebo kyslík. Sprejem je vytvářen aerso-  
 50 sol, který je nebulizován nosným plynem a vysušen při průchodu libovolně vyhřívaným prosto-  
 rem, odkud je vlivem vysokého napětí přiváděn na povrch určený k modifikaci. K modifikaci  
 povrchu dochází nalepením vzniklého oxidu titaničitého, zirkoničitého nebo hafničitého.

Modifikován může být kterýkoliv pevný povrch alespoň s minimální vodivostí až do měrného elektrického odporu (rezistivity) přibližně  $10^{20} \Omega \cdot m$ . Použitými materiály mohou být veškeré tepelně stálé kovy, s výhodou nerezová ocel, zlato, hliník, dále je použitelné sklo, syntetický polymer, vrstva křemíkových nanostruktur, uhlíkových nanotrubiček, atp. Modifikace je viditelná  
 5 pouhým okem a její mikrostruktura je demonstrována pomocí elektronové skenovací mikroskopie (obr. 3).

Nesporné výhody řešení jsou v tom, že modifikace je prováděna za atmosférického tlaku, povrch pro modifikaci i elektrosprejovaný roztok jsou při laboratorní teplotě a kapičky jsou zahřívány při  
 10 průchodu vyhříváním prostorem. V důsledku toho jsou na povrch napařovány horké nabitě částičky, nikoliv studené kapičky. Efektivnějšího fokusování částic k povrchu je možné dosáhnout vlivem vysokého elektrického potenciálu z externího zdroje opačné polarity než nabitě částičky, na kterém je držen povrch pro modifikaci nebo maska umístěná v maximální vzdálenosti 3 mm před povrchem. Získá se mechanicky stabilní vrstva depozitu oxidu titanu, zirkonia nebo  
 15 hafnia kvalitní houbovitě struktury s mikropóry, která se neporuší při nanášení vzorku, a je vhodná pro použití za účelem prekoncentračního obohacování fosfopeptidů.

Pro modifikaci povrchu bylo použito zařízení (obr. 1), které se skládá z elektrosprejovací části, vyhříváního prostoru a koncové části obsahující povrch pro modifikaci. Elektrosprejovací část  
 20 obsahuje rozdělovník ve tvaru T, který je napojen na stříkačkovou pumpu. Stříkačková pumpa vyvíjí tlak na píst v ní umístěné stříkačky, která je naplněná zásobním roztokem alkoxidu o koncentraci v rozmezí 0,001 až 0,5 mol/l. Tlakem na píst stříkačky dochází k pumpování roztoku do teflonové hadičky směrem do rozdělovníku (obvyklá průtoková rychlost 5 až 10  $\mu l$ /minutu). Rozdělovník je zakončen sprejovací jehlou. Dále je k rozdělovníku připojen přívod nosného plynu,  
 25 přičemž tlak jeho ventilu je v rozmezí 0,2 až 0,8 MPa. Součástí elektrosprejové části je zdroj vysokého napětí [ $\pm$  (1000 až 8000)V], který je připojený v libovolném vodivém místě na elektrosprejovací část. Vyhřívání prostor je externě vyhříván na teplotu 50 až 350 °C. Koncová část obsahuje povrch pro modifikaci. Dále jako součást koncové části může být před povrchem pro modifikaci umístěna maska uzemněná nebo připojená na druhý zdroj vysokého napětí (až do  
 30  $\pm 8000$ V). V případě, že maska není použita, může být napětí připojeno rovnou na povrch pro modifikaci. Vzdálenost masky od výstupu z vyhříváního prostoru je méně než 15 mm a méně než 3 mm od povrch pro modifikaci. V případě, že maska není použita, tak vzdálenost povrchu od výstupu z vyhříváního prostoru je méně než 20 mm.

Proces modifikace probíhá následujícím způsobem: zdroj vysokého napětí je připojen na elektrosprejovací část. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) je pod tlakem zaváděn do proudu stlačeného nosného plynu. V důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu je roztok sloučeniny alkoxidu (A) elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitě aerosolu (B). Ten je  
 35 následně zaveden do vyhříváního prostoru, kde dojde k vysušení aerosolu.

Takto vybuzený aerosol se mění v suchý aerosol respektive dým nabitých částic (C). Suché nabitě částice (C) mohou být navíc fokusovány pomocí vysokého napětí opačné polarity než je napětí na elektrospreji přivedeného na masku nebo přímo na samotný povrch a díky energii získané rapidním ohřevem jsou přilepeny na modifikovaný povrch, kde vytvoří makroskopicky  
 45 homogenní otisk oxidu, jehož tvar a velikost je definován tvarem a velikostí otvorů na masce. Pokud není maska použita, pak je velikost a tvar otisku definován průřezem vyhříváního prostoru. Takto modifikovaný povrch může pak být použit přímo pro prekoncentraci fosfopeptidů z peptidové směsi a po nanesení ionizační matrice mohou být fosfopeptidy analyzovány desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrií (například pomocí MALDI). Obrázky modifikovaných povrchů získané pomocí elektronové mikroskopie jsou na obr. 3.

Tento způsob modifikace povrchu pro analýzu fosfopeptidů poskytuje kvalitní povrch prostý prasklin a jiných makroskopických nehomogenit.

Modifikovaný povrch připravený v příkladech 1 až 3 byl použit pro analýzu fosfopeptidů získanou standardním tryptickým rozkladem kaseinu. Získaná data byla porovnána s dosud publikovanými výsledky. Za použití modifikovaného povrchu připraveného podle vynálezu bylo identifikováno 20 fosforylovaných peptidů kaseinu. Pomocí publikovaných metod bylo identifikováno pouze 2 až 8 peptidů (Obr. 5 a 6). S povrchem připraveným podle vynálezu je tedy dosahováno mnohem lepší analýzy fosfopeptidů.

#### Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1

Aparatura pro modifikaci povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii obsahuje T-rozdělovník 1, stříkačkovou pumpu 2 působící na píst 3 stříkačky 4 se zásobním roztokem A, hadičku 5, sprejovací jehlu 6 na rozdělovníku 1, přívod nosného plynu 7, zdroj vysokého napětí 8 pro elektrosprej připojený na vodivou část 9 stříkačky 4, vyhřívaný prostor 10, povrch 12 pro modifikaci a masku 13, zdroj vysokého napětí 11 pro povrch připojený na masku 13. Při průchodu zásobního roztoku sprejerem vzniká nabitý aerosol (B), který se při průchodu vyhřívanou trubičkou mění na vysušený aerosol/dým (C).

Obr. 2

Aparatura pro modifikaci povrchů pro desorpčně-ionizační hmotnostní spektrometrii obsahuje T-rozdělovník 1, stříkačkovou pumpu 2 působící na píst 3 stříkačky 4 se zásobním roztokem A, hadičku 5, sprejovací jehlu 6 na rozdělovníku 1, přívod nosného plynu 7, zdroj vysokého napětí 8 pro elektrosprej připojený na vodivou část 9 stříkačky 4, vyhřívaný prostor 10, povrch 12 pro modifikaci, zdroj vysokého napětí 11 pro povrch připojený na povrch pro modifikaci 12. Při průchodu zásobního roztoku sprejerem vzniká nabitý aerosol B, který se při průchodu vyhřívanou trubičkou mění na vysušený aerosol/dým C.

Obr. 3

Obrázky modifikovaných povrchů získané pomocí elektronové mikroskopie A) povrch získaný postupem z příkladu č. 1, B) povrch získaný postupem z příkladu č. 2, C) povrch získaný postupem z příkladu č. 3. Elektronová mikroskopie demonstruje kvalitní pokrytí houbovitým oxidem. Povrch je prostý prasklin a jiných makroskopických nehomogenit.

Obr. 4

Srovnání výsledků analýzy téhož vzorku směsi tryptických peptidů kaseinu na povrchu podle vynálezu a na povrchu bez jakéhokoli obohacení. Šipkami jsou označeny nalezené (identifikované) peptidy. A) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu za normálních podmínek. B) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu z modifikovaného povrchu z příkladu č. 1. C) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu z modifikovaného povrchu z příkladu č. 2. D) MALDI-MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu z modifikovaného povrchu z příkladu č. 3.

Obr. 5

Tabulka porovnání výsledků vynálezu s literaturou demonstrovaného na beta kaseinu. První sloupec ukazuje číslo píku ve spektru dle obr. 4B (povrch připraven v příkladu č. 1). Druhý ukazuje m/z detekovaných iontů (v závorce jejich náboj), třetí odpovídající sekvenci, včetně fosforylačních míst, čtvrtý sloupec ukazuje počet fosforylací a pátý podjednotku kaseinu, na které se příslušný peptid nalézá. Šestý až desátý sloupec ukazují porovnání s výsledky dosaženými v literatuře:

- 2 = Eriksson A., et al., Anal. Chem. 2010, 82, 4577 až 4583  
 3 = Bi H., et al., Anal. Chem. 2009, 81, 1177 až 1183  
 4 = Torta F. et al., Journal of Proteome research, 2009, 8, 4, 1932 až 1942  
 5 = Larsen R. M. et al., Molecular&Cellular Proteomics, 2005, 4, 873 až 886  
 5 6 = Hoang T. et al., Anal. Chem. 2010, 82, 219 až 228  
 Znak „+“ znamená, že fosfopeptid byl detekován, znak „-“, že nebyl.

## Obr. 6

- 10 Tabulka porovnání výsledků vynálezu s literaturou demonstrovaného na alpha S1 kaseinu. První sloupec ukazuje číslo píku ve spektru dle obr. 4B. Druhý ukazuje m/z detekovaných iontů (v závorce jejich náboj), třetí odpovídající sekvenci, včetně fosforylačních míst, čtvrtý sloupec ukazuje počet fosforylací a pátý podjednotku kaseinu, na které se příslušný peptid nalézá. Šestý až desátý sloupec ukazují porovnání s výsledky dosaženými v literatuře:
- 15 2 = Blacken R. G. et al., Anal. Chem. 2007, 79, 5449 až 5456  
 3 = Eriksson A., et al., Anal. Chem. 2010, 82, 4577 až 4583  
 4 = Torta F. et al., Journal of Proteome research, 2009, 8, 4, 1932 až 1942  
 5 = Larsen R. M. et al., Molecular&Cellular Proteomics, 2005, 4, 873 až 886  
 6 = Hoang T. et al., Anal. Chem. 2010, 82, 219 až 228  
 20 Znak „+“ znamená, že fosfopeptid byl detekován, znak „-“, že nebyl.

Příklady provedení vynálezu

25

## Příklad 1

Modifikovaný povrch byl připraven provedením suché elektrosprejové depozice po dobu 15 minut podle následujícího postupu:

30

Hodnoty na aparatuře z obr. 1 byly nastaveny následujícím způsobem:

Průtoková rychlost pumpy 2: 5 μL/min

Napětí ze zdroje 8 přivedené na vodivou část 9 stříkačky 4: 3500 V

Teplota vyhříváního prostoru ve tvaru trubičky 10: 130 °C

Napětí ze zdroje 11 na masce 13: -5000 V

35

Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,5 MPa

Typ nosného plynu: dusík

Tvar otvoru na masce: kruh o průměru 1 mm

40

Stříkačková pumpa 2 byla naplněna roztokem propoxidu zirkoničitého v 2-propanolu o koncentraci 0,02 mol/l (Roztok A). Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na vodivou část 9 stříkačky 4 se zásobním roztokem, která byla hadičkou 5 spojena s rozdělovníkem 1. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do vyhříváního prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel maskou 13 až na povrch 12 pro modifikaci, který byl z nerezové oceli. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut 2-propanolem, ethanolem a vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito 1,5 μmol propoxidu zirkoničitého a vytvořená vrstva oxidu zirkoničitého měla tvar kruhu s průměrem daným maskou (1 mm). Tato vrstva byla stabilní jak

50 pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu peptidů.

## Příklad 2

5 Modifikovaný povrch byl připraven provedením suché elektrosprejové depozice po dobu 15 minut podle následujícího postupu:

Hodnoty na aparatuře z obr. 1 byly nastaveny následujícím způsobem:

Průtoková rychlost stříkačkové pumpy 2: 8  $\mu\text{L}/\text{min}$

Napětí ze zdroje 8 přivedené na sprejovací jehlu 6: -3000 V

Teplota vyhříváního prostoru ve tvaru trubičky 10: 100 °C

10 Napětí ze zdroje 11 na masku 13: +6000 V

Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,4 MPa

Typ nosného plynu: argon

Tvar otvoru na masce: kruh o průměru 0,5 mm

15 Stříkačková pampa 2 byla naplněna roztokem propoxidu zirkoničitého v 1-propanolu o koncentraci 0,03 mol/l (Roztok A) a propojena hadičkou 5 s rozdělovníkem. Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na sprejovací jehlu 6. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do vyhříváního prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel maskou 13 až na povrch 12 pro modifikaci, který byl ze skla. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut 2-propanolem, ethanolem a vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito 3,6  $\mu\text{mol}$  propoxidu zirkoničitého a vytvořená vrstva oxidu zirkoničitého měla tvar kruhu s průměrem daným maskou (0,5 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu peptidů.

## Příklad 3

30

Modifikovaný povrch byl připraven provedením suché elektrosprejové depozice po dobu 20 minut podle následujícího postupu:

Hodnoty na aparatuře z obr. 2 byly nastaveny následujícím způsobem:

Průtoková rychlost stříkačkové pumpy 2: 6  $\mu\text{L}/\text{min}$

35 Napětí ze zdroje 8 přivedené na vodivou část stříkačky (9): +3000 V

Teplota vyhříváního prostoru ve tvaru trubičky 10: 120 °C

Napětí ze zdroje 11 přivedené na povrch 12: -4500 V

Tlak na přívodu nosného plynu 7: 0,5 MPa

Typ nosného plynu: oxid uhličitý

40

Stříkačková pampa 2 byla naplněna roztokem propoxidu zirkoničitého v 1-butanolu o koncentraci 0,05 mol/l (Roztok A). Zdroj vysokého napětí 8 byl připojen na vodivou část 9 stříkačky 4 se zásobním roztokem, která byla hadičkou 5 spojena s rozdělovníkem 1. Roztok sloučeniny alkoxidu (A) byl stříkačkovou pumpou 2 zaváděn do rozdělovníku, kde byl v důsledku vysokého napětí a proudu stlačeného nosného plynu z přívodu elektronebulizován ze sprejovací jehly za vzniku nabitého aerosolu (B). Vzniklý aerosol byl přiváděn do vyhříváního prostoru 10 ve tvaru trubice o průměru 5 mm, kde došlo k vysušení aerosolu a dále procházel maskou 13 až na povrch 12 pro modifikaci, který byl z hliníku. Po ukončení bylo vypnuto vysoké napětí ze zdroje 8 i zdroje 11, povrch byl vyjmut a opláchnut 2-propanolem, ethanolem a vodou. Tímto postupem bylo pro modifikaci povrchu použito 6  $\mu\text{mol}$  propoxidu titaničitého a vytvořená vrstva oxidu zirkoničitého

50

měla tvar kruhu s průměrem daným průměrem vyhřívaného prostoru (5 mm). Tato vrstva byla stabilní jak pro přípravu vzorku, tak pro samotnou analýzu peptidů.

#### 5 Příklad 4

Příprava směsi fosfopeptidů z kaseinu a koncentrační obohacení na modifikovaných površích připravených v příkladech 1, 2 a 3.

10 Kasein (10  $\mu\text{g}$ , Sigma–Aldrich) byl separován pomocí SDS–PAGE na prefabrikovaném gradientovém gelu (Invitrogen). Získaný gel byl po separaci obarven pomocí CBB–R250 a vizualizovaný protein byl spolu s gelem vyříznut a gel obsahující protein byl dále rozřezán na malé kostičky ( $\sim 1 \text{ mm}^3$ ). Poté byl protein v gelu odbarven, redukován (50 mM TCEP, pH 8), alkylován (55 mM iodoacetamid, pH 8) a natráven trypsinem. Výsledné peptidy a fosfopeptidy byly z gelu  
 15 extrahovány, odsoleny na obrácené fázi (microtrap, Michrom), usušeny a následně použity jako testovací směs pro analýzu na modifikovaných površích. Připravený povrch byl třikrát omyt methanolem, a dále pětkrát DHB pufrém (20 mg/mL kyseliny dihydroxybenzoové ve směsi acetonitril/voda/kyselina trifluoroctová v poměru 50:49.9:0.1 (v/v)). Vzorek peptidů získaných trypsinací kaseinu dle výše uvedeného postupu byl rozpuštěn ve 40  $\mu\text{L}$  DHB pufru a 0,7  $\mu\text{L}$  bylo dávkováno na povrch. Nanesený povrch byl ponechán při pokojové teplotě. Po uschnutí byl povrch se vzorkem pětkrát omyt DHB pufrém a potom vložen na 3 minuty do směsi acetonitril/voda/kyselina trifluoroctová v poměru 80:19.9:0,1 (v/v) (aby se povrch zbavil nefosforylovaných peptidů, které nebyly navázány). Na povrch bylo kápnuto 0,5  $\mu\text{L}$  400 mM roztoku amoniaku a po kompletním uschnutí bylo přidáno 0,5  $\mu\text{L}$  2% kyseliny trifluoroctové. Po uschnutí  
 20 bylo na povrch naneseo 0,5  $\mu\text{L}$  roztoku ionizační matrice (20 mg/mL kyseliny dihydroxybenzoové ve směsi acetonitril/voda/kyselina fosforečná v poměru 50:49: 1 (v/v) a peptidy byly analyzovány standardní technikou MALDI–MS. Výsledná spektra jsou na obr. 4B

#### *Zpracování dat a vyhodnocení informace o přítomnosti fosfopeptidů*

30 Na panelu A obrázku 3 je MALDI–MS spektrum směsi tryptických peptidů kaseinu za normálních podmínek. Na panelu B je výsledné MALDI–MS spektrum získané po provedení obohacení na povrchu dle příkladů 1, 2 a 3. Ze srovnání spekter je vidět, že signály ve spektru o nominálních hodnotách 1031, 1562, 1661, 1833, 1864, 1928, 1944, 1952, 2062, 2556, 2560, 2577, 2640,  
 35 2657, 2720, 2737, 2966, 2962, 3042, 3122 (viz obr. 5 a 6) jsou relativně zvýšeny na panelu B (spektrum po obohacení na povrchu) oproti panelu A (standardní spektrum). Z této informace lze tedy správně určit, že tyto signály přísluší fosforylovaným peptidům, protože byly navýšeny po provedení povrchového obohacení. Stejně by se postupovalo při vyhodnocování spekter na panelech C a D.

40

#### Průmyslová využitelnost

Instrumentální biologická analýza bílkovin, konkrétně fosfoproteomika.

45

## PATENTOVÉ NÁROKY

50

1. Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci fosforylovaných peptidů pro desorpčně–ionizační techniky hmotnostní spektrometrie, **vyznačující se tím**, že do uzavřeného prostoru, který je pod napětím [ $\pm$  (800–8000) V] je pod tlakem 0.2 až 0,8 MPa přiváděn nosný



plyn a alkoholický roztok alkoxidu zirkoničitého/ titaničitého/ hafničitého, přičemž vzniklý nabitý aerosol vycházející z elektrospreje je zaváděn do vyhřívaného prostoru (10), vyhřívaného na 50 až 250 °C a vycházející vysušený aerosol je zaváděn na povrch (12) pro modifikaci, který je umístěn za vyhřívaným prostorem (10).

5

2. Způsob modifikace povrchu pro prekoncentraci fosforylovaných peptidů pro desorpčně-  
ionizační techniky hmotnostní spektrometrie podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že  
povrch (12) pro modifikaci je vodivý s měrným odporem suchého materiálu menším než  
10<sup>20</sup> Ω•m a je pod napětím [± (500 až 10000) V] opačné polaroty vůči napětí na elektrospreji.

10

3. Způsob modifikace povrchu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že mezi vyhří-  
vaným prostorem (10) a povrchem (12) pro modifikaci je ve vzdálenosti do 3 mm od povrchu  
(12) pro modifikaci umístěna maska (13), která je pod napětím [± (500 až 10000) V] opačné  
polaroty vůči napětí na elektrospreji.

15

4. Způsob modifikace povrchu podle nároku 1 nebo 2 nebo 3, **vyznačující se tím**,  
že jako nosný plyn je použit oxid dusný nebo dusík nebo oxid uhličitý nebo plyn z 8.A skupiny  
periodické tabulky prvků nebo kyslík.

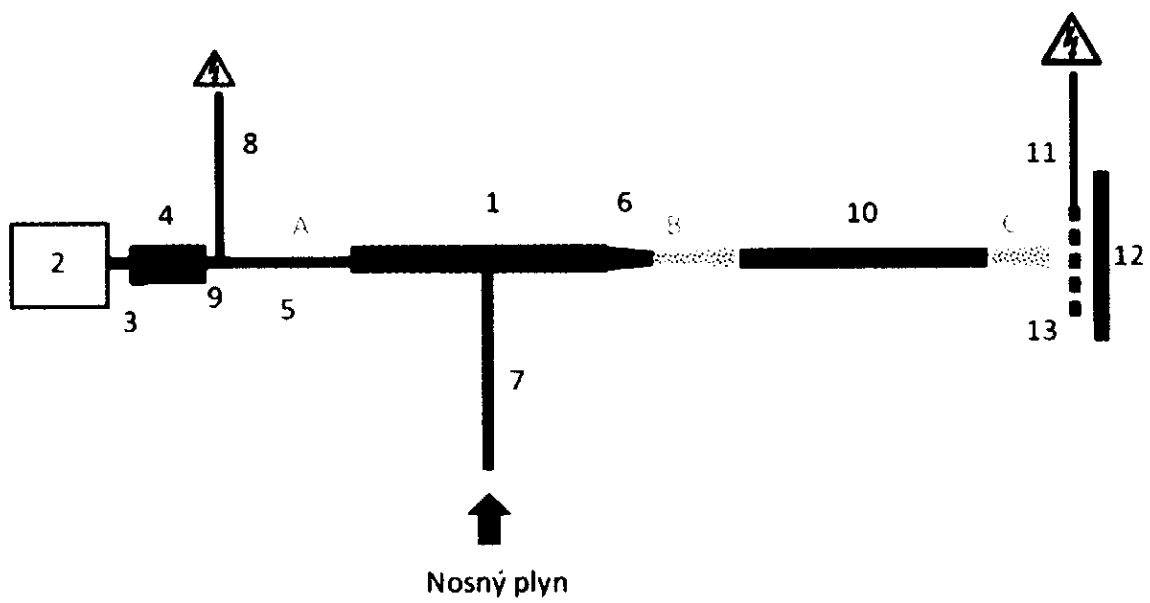
20

5. Způsob modifikace povrchu podle nároku 1 nebo 2 nebo 3, **vyznačující se tím**,  
že povrch (12) pro modifikaci je z tepelně stabilního kovu, skla, křemíkových nanostruktur, uhlí-  
kových nanotrubiček, tepelně a mechanicky stabilního syntetického polymeru.

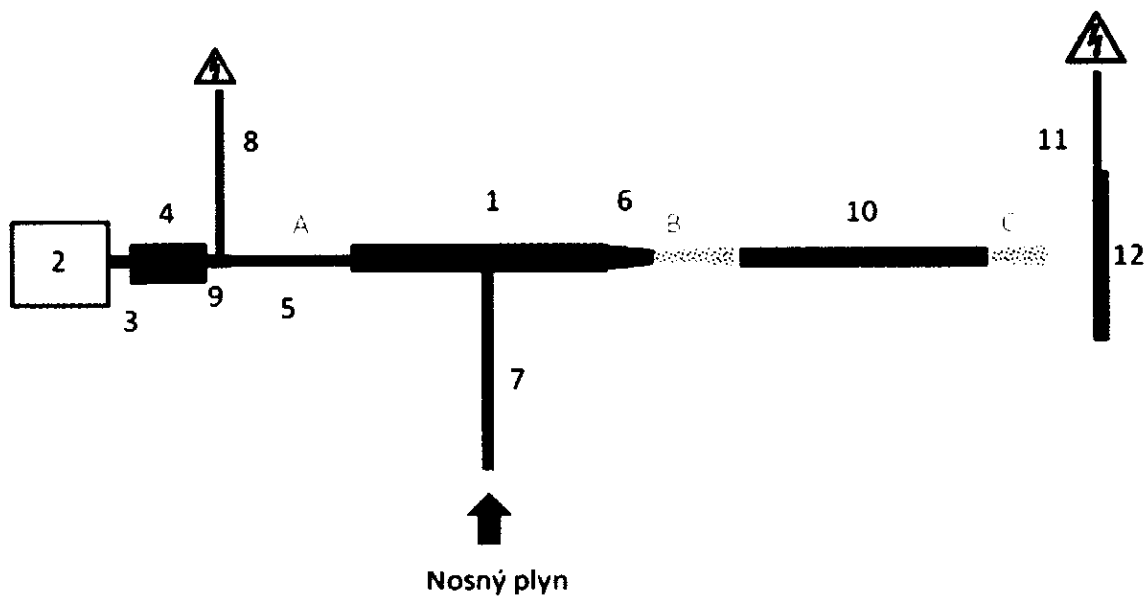
25

4 výkresy

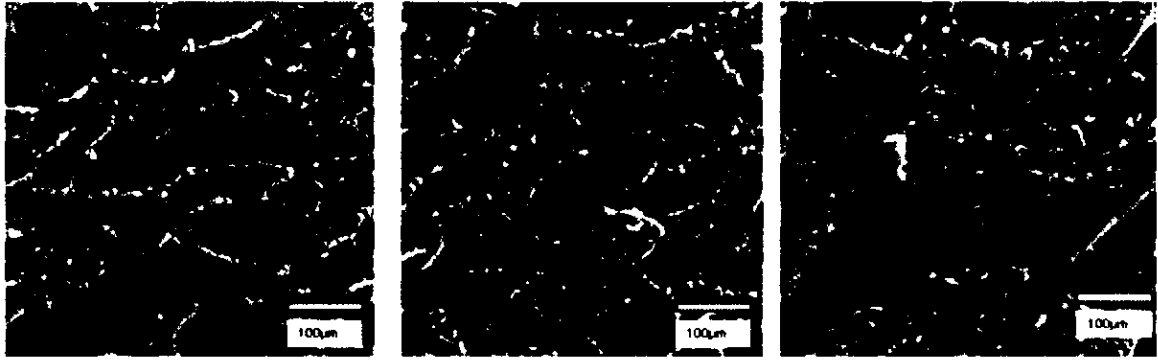
Obr.1



Obr.2



Obr. 3

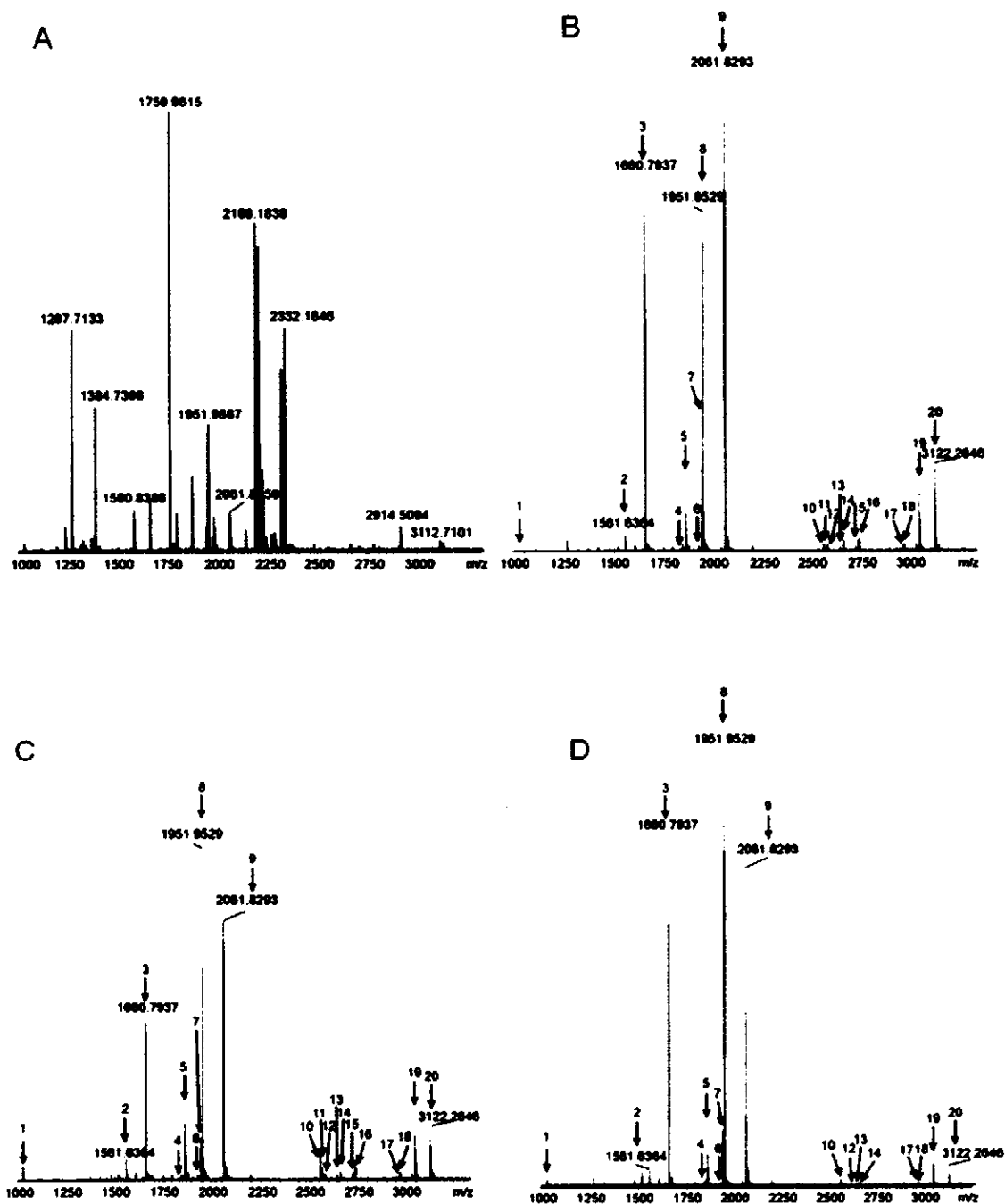


A

B

C

Obr. 4



Obr. 5

Číslo piku	m/z (náboj)	peptid	počet fosforylací	kasein	2	3	4	5	6
1	1031.42440 (2+)	FQ-pS-EEQQQTEDELQDK	1	beta	+	-	-	-	-
2	1561.63686 (2+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-pS-EESITR	4	beta	+	-	-	-	-
9	2061.82930 (1+)	FQ-pS-EEQQQTEDELQDK	1	beta	+	+	+	+	+
10	2556.08588 (1+)	FQ-pS-EEQQQTEDELQDKIHPPF	1	beta	+	+	+	-	+
17	2966.19345 (1+)	ELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-pS-EESITR	4	beta	+	-	-	+	-
18	2962.37302 (1+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-SSEESITR	2	beta	-	-	-	-	-
19	3042.27711 (1+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-SEESITR	3	beta	-	-	-	-	-
20	3122.26464 (1+)	RELEELNVPGEIVE-pS-L-pS-pS-pS-EESITR	4	beta	+	+	+	+	+

Obr. 6

Číslo piku	m/z (náboj)	peptid	počet fosforylací	kasein	1	2	4	5	6
3	1660.79372 (1+)	VPQLEIVPN-pS-AEER	1	alpha S1	+	+	+	+	+
4	1832.85326 (1+)	YLGEYLIVPNSAEER	1	alpha S1	-	-	+	+	-
5	1863.71919 (1+)	DIG-pS-ESTEDQA-oxM-EDIK	1	alpha S1	-	-	-	-	-
6	1927.69375 (1+)	DIG-pS-E-pS-TEDQAMEDIK	2	alpha S1	-	-	-	+	+
7	1943.68659 (1+)	DIG-pS-E-pS-TEDQA-oxM-EDIK	2	alpha S1	-	-	+	-	-
8	1951.95287 (1+)	YKVPQLEIVPN-pS-AEER	1	alpha S1	+	+	+	+	+
11	2559.94371 (1+)	Q(deamid)-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-SEEIVPNSVEQK	3	alpha S1	-	-	-	-	-
12	2576.99571 (1+)	Q-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-SEEIVPNSVEQK	3	alpha S1	-	-	-	-	-
13	2639.93462 (1+)	Q(deamid)-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPNSVEQK	4	alpha S1	-	-	-	-	-
14	2656.95603 (1+)	Q-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPNSVEQK	4	alpha S1	-	-	-	-	-
15	2719.90729 (1+)	Q(deamid)-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPN-pS-VEQK	5	alpha S1	-	-	-	-	-
16	2736.92778 (1+)	Q-oxM-EAE-pS-I-pS-pS-pS-EEIVPN-pS-VEQK	5	alpha S1	-	-	-	-	-

---

Konec dokumentu

---