

Abstrakt

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Kandidát: Maxim Hof

Školitel: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Ondřej Horáček

Název práce: Separace molekulárních sond pomocí kapilární elektroforézy

Oligonukleotidy jsou organické molekuly, které nacházejí uplatnění v oblastech jako je biotechnologie, molekulární biologie, diagnostika a terapie. Pro použití oligonukleotidů jako molekulárních sond je nutné oligonukleotidy kovalentně modifikovat např. fluorescenčním barvivem a zhášecem. Produkty těchto značících reakcí jsou dvojitě značená oligonukleotidová sonda, ale také vedlejší produkty, jako je neznačený oligonukleotid a oligonukleotidy značené buď fluorescenčním barvivem nebo zhášecem. Produkty této reakce je nutné separovat, což je téžistěm této diplomové práce.

Separace takto dvojitě značených oligonukleotidových sond byla dosud prováděna pouze v chromatografických podmínkách. Cílem této práce je prozkoumat využití kapilární elektroforézy pro tuto separaci. Konkrétně bylo zkoumáno použití kapilární elektroforézy pro separaci oligonukleotidových sond jednoduše značených BHQ zhášecem od dvojitě značených BHQ zhášecem s fluorescenčním barvivem 6-FAM (BHQ-FAM) a jednoduše značených oligonukleotidových sond azaftalocyaninovým zhášecem (PCQ) od dvojitě značených azaftalocyaninovým zhášecem a fluorescenčním barvivem 6-FAM (PCQ-FAM) nebo Cy5 (PCQ-Cy5). Pozoruhodné je, že planární a hydrofobní struktura azaftalocyaninového zhášeče se liší od dosud používaných zhášečů, a proto lze separaci molekul značených azaftalocyaninem považovat za novou výzvu.

Experimentální podmínky pro elektroforetickou separaci jednoduše značených sond BHQ od dvojitě značených sond BHQ-FAM a také jednoduše značených PCQ od dvojitě značených sond PCQ-Cy5 byly kompletně optimalizovány. Oddělení PCQ od PCQ-FAM sond však vyžadovalo 40 minut. Použité elektroforetické podmínky pro separaci BHQ od BHQ-FAM a PCQ z PCQ-Cy5 jsou vhodnější než u HPLC. Nicméně separace pomocí HPLC za izokratických podmínek a s acetonitrilem jako organickým rozpouštědlem se zdá být vhodnější pro separaci PCQ a PCQ-FAM.