

Usporedba preciznosti robotizirane i manualne metode za analizu glikozilacije proteina

Fančović, Matko

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:409102>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



Matko Fančović

Usporedba preciznosti
robotizirane i manualne metode
za analizu glikozilacije proteina

DIPLOMSKI RAD

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Sveučilište u Zagrebu

Voditelji rada:

prof. dr. sc. Tomislav Bolanča, FKIT
prof. dr. sc. Gordan Lauc, Genos d.o.o

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Tomislav Bolanča, FKIT
doc. dr. sc. Matija Cvetnić, FKIT
dr. sc. Lidija Furač, viši predavač, FKIT

Zagreb, 2023.

Diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitička kemija na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tomislava Bolanče.

Rad je izrađen u tvrtki Genos d.o.o. pod stručnim mentorstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca. Ulogu suvoditelja ovog Diplomskog rada obnašali su dr. sc. Tea Pribić i mag. med. biochem. Borna Rapčan.

Ovim putem želim zahvaliti mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu na pruženoj prilici i uvodu u svijet glikobiologije i analitičke kemije.

Posebno se zahvaljujem suvoditeljima dr. sc. Tei Pribić i mag. med. biochem. Borni Rapčanu na strpljenju i vremenu kojeg su odvojili kako bi mi pružili odgovore i pomoć na sve moje probleme.

Također, zahvaljujem se svim zaposlenicima tvrtke Genos koji su svojevrijem donirali svoje uzorke krvi radi provođenja ovog Diplomskog rada te omogućili pozitivnu atmosferu svaki dan.

Zahvaljujem se mom prijatelju i kolegi mag.appl. chem Ivanu Petricu na doniranju većih količina krvi za provođenje eksperimentalnog dijela nakon nekoliko neuspješnih pokušaja. Za kraj, najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji i prijateljima bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

Sažetak

Glikani su lančane strukture sastavljene od velikog broja glikozidno povezanih molekula šećera. Glikozilacija je enzimski kontrolirani proces kovalentnog vezanja glikana na mjesto neglikanskog entiteta (aglikona). Ona igra ključnu ulogu u funkcioniranju organskog sustava u njegovim fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Imunoglobulin G (IgG) je glavni serumski glikoprotein koji obnaša ulogu protutijela u imunskom sustavu. Razvojem univerzalne automatizirane metode pripreme za analizu glikozilacije proteina, uspjeti bi se izbjeći problemi koji nastaju djelovanjem ljudske ruke.

U okviru ovog rada razvila se robotizirana metoda pripreme glikana za analizu glikozilacije proteina iz krvi s Guthrijevih kartica, nakon čega se preciznost iste usporedila s već korištenom manualnom metodom. Robotska radna stanica na kojoj je vršen ovaj rad je TECAN EVO 200 unutar kojeg je implementirana samostalna jedinica za pozitivni tlak Reslovex A200. Karakterizacija uzoraka je provedena multipleksnom kapilarnom gel elektroforezom potpomognutom laserski induciranim fluorescencijom.

Metoda je uspješno razvijena, a kvantitativnom i kvalitativnom analizom statističkih izračunatih podataka potvrđuje se pouzdanost robotizirane metode pripreme za analizu glikozilacije proteina. Robotizirana i manualna metoda su međusobno usporedne budući da su vrijednosti prosječnih relativnih postotnih površina glikanskih vrhova vrlo slične. Standardne devijacije su nešto veće za robotiziranu metodu, što je bilo i očekivano s obzirom da je u ovom radu ova metoda prvi puta pokrenuta. Daljnjim razvojem metode te implementacijom dodatnih uređaja preciznost će se povećati te će se ova metoda približiti potpunoj automatizaciji.

Summary

Glycans are chain-like structures composed of a large number of glycosidically linked sugar molecules. Glycosylation is an enzymatically controlled process of covalently attaching glycans to a non-glycan entity (aglycone). It plays a key role in the functioning of the organic system in both physiological and pathophysiological states. Immunoglobulin G (IgG) is the main serum glycoprotein that functions as an antibody in the immune system. By developing a universal automated preparation method for protein glycosylation analysis, the problems caused by human intervention could be avoided.

In this study, a robotic method for glycan preparation from blood samples collected on Guthrie cards was developed and its accuracy was compared with the previously used manual method. The robotic workstation used for this study was the TECAN EVO 200, equipped with a self-contained positive pressure Reslovex A200 unit. Sample characterization was performed using multiplex capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.

The method was successfully developed, and the reliability of the robotic method for protein glycosylation analysis was confirmed through quantitative and qualitative analysis of statistically calculated data. The robotic and manual methods were comparable, as the values of the average relative percentage areas of glycan peaks were very similar. The standard deviations were slightly higher for the robotic method, which was expected since this method was first implemented in this study. Further method development and implementation of additional devices will increase precision and bring this method closer to complete automation.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1 Glikani	4
2.2. Struktura glikana	5
2.3. Glikozilacija	7
2.4. Glikokonjugati	8
2.5. N-vezani glikani	9
2.6. O-vezani glikani	10
2.7. Imunoglobulin G	11
2.8. Analiza strukture glikana/ Visokoprotočne analize N-glikana imunoglobulina G	15
2.8.1. HILIC UHPLC (Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofiličnim interakcijama)	16
2.8.2. CGE-LIF (kapilarna gel elektroforeza s laserom induciranom fluorescencijskom detekcijom)	22
2.9. Automatizacija procesa glikozilacije	24
2.9.1. TECAN EVO 200	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO	30
3.1. Materijali	31
3.1.a. Anorganske kemikalije	31
3.1.b. Organske kemikalije	31
3.1.c. Biološki materijali	32
3.1.d. Otopine i puferi	32
3.1.e. Laboratorijska oprema i pribor	35
3.2. Ispitanici i uzorkovanje	37
3.3. Protokol pripreme uzoraka	37
3.3.1. Izolacija imunoglobulina G uz Protein G pločicu	38
3.3.2. Deglikozilacija i obilježavanje glikana fluorescentnom bojom	40
3.3.3. Pročišćavanje glikana	41
3.3.4. Priprema izoliranih uzoraka IgG-a za xCGE-LIF	42

3.4. Analiza glikana CGE-LIF-om.....	42
4. REZULTATI.....	44
5. RASPRAVA.....	53
5.1. Automatska (robotizirana) metoda.....	54
5.2. Manualna metoda.....	66
5.3. Usporedba metoda.....	69
6. ZAKLJUČAK.....	72
7. POPIS SIMBOLA.....	74
8. LITERATURA.....	77
9. PRILOZI.....	85

1. UVOD

Glikozilacija proteina je kompleksna post-translacijska i ko-translacijska modifikacija proteina koja upravlja funkcijom i biološkom aktivnošću glikoproteina. Ona kontrolira važne biološke puteve od putovanja (eng. *trafficking*) proteina i stanične adhezije do svih interakcija između patogena i domaćina. Raznolika i vrlo složena struktura glikana koji su vezani za proteine je važna za usmjeravanje bioloških procesa, a ukoliko se ona promijeni, može doći do razvoja određenih bolesti. Danas je sve više dokaza koji ukazuju na to da glikozilacija može mijenjati funkcije proteina koji su važni u terapiji. Iz tog razloga je razumijevanje procesa glikozilacije od iznimne važnosti za medicinu i biologiju.

Razvojem automatizirane metode za analizu glikozilacije proteina riješili bi se mnogi problemi koji se javljaju pri manualnom izvođenju. Primjerice, spriječilo bi se rukovanje opasnim kemikalijama, uklonila bi se mogućnost pogreške uzrokovane ljudskom rukom ukoliko analitičar nema puno iskustva, sama analiza bi se ubrzala budući da se automatizacija može provoditi cijeli dan te se postupak provođenja može prenositi od laboratorija do laboratorija čime se lagano prenosi znanje.

U ovom radu pokušala se razviti robotizirana metoda već postojeće manualne metode analize glikozilacije proteina. Rezultati robotizirane metode su uspoređeni s rezultatima manualne metode kako bi se ispitala mogućnost primjene robota u svrhu poboljšanja i ubrzanja analize.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Glikani

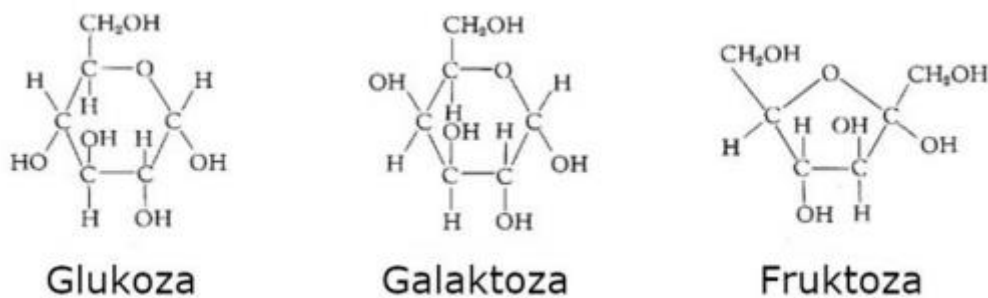
Proteini, lipidi, nukleinske kiseline i ugljikohidrati su osnova građe svih organizama. Ugljikohidrati su najbrojnija skupina bioloških molekula [1], a njihova uloga je posebno istaknuta u izgradnji složenih višestaničnih organizama i organa koji zahtijevaju međudjelovanje između stanica i okolne matrice.

Glikani (često zvani polisaharidi) su lančane strukture velike molekulske mase koje se sastoje od pojedinačnih molekula šećera (monosaharida) međusobno povezanih kemijskim vezama te su poput, nukleinskih kiselina, proteina i lipida nužni za postojanje svih živih organizama [2]. Glikani su prisutni u svim stanicama živih organizama bilo samostalno kao „slobodni šećeri“ ili češće, kao kovalentno povezani na neku drugu biomolekulu pri čemu čine glikokonjugate.[3] Glikani su nalaze u većini organizama kao i u virusima koji nose na svome omotu lance oligosaharida koji potječu iz stanica zaraženog domadara.[4] Svi glikani nekog sustava, bilo to tkiva, stanice ili organizma, nazivaju se glikomom od čega i proizlazi naziv glikomika za područje znanosti koje se bavi glikanima. Kod čovjeka se glikom sastoji od devet različitih monosaharidnih jedinica koje su povezane specifičnim mehanizmima posebnim enzimima. [5]

Prisutnost glikana u prirodi je vrlo velika, budući da su sve stanice u prirodi prekrivene s gustim i kompleksnim razmještajem glikana. Kod eukariota sekretijski proteini posjeduju velike količine kovalentno vezanih glikana, a površinski i sekretijski glikani stanice se uglavnom sastavljaju ER - Golgi putem. Osim toga, izvanstanična matrica, sekrecija te tjelesne tekućine eukariota su vrlo bogate glikanima.[6] Sintetski put glikana počinje od ostataka monosaharida pri čemu se odvija enzimski regulirani proces glikozilacije. Nastali glikani se definiraju slijedom nukleotida koji je prisutan u genima organizma, a proces oblikovanja glikana se vrši preko dinamičkih interakcija raznih enzima i proteina. [2] Za razliku od proteina za čiju promjenu je potrebno i do nekoliko godina (ili određene mutacije), ljudski genom se mijenja gotovo trenutno nakon promjena koje se javljaju u životnom ciklusu. [7]

2.2. Struktura glikana

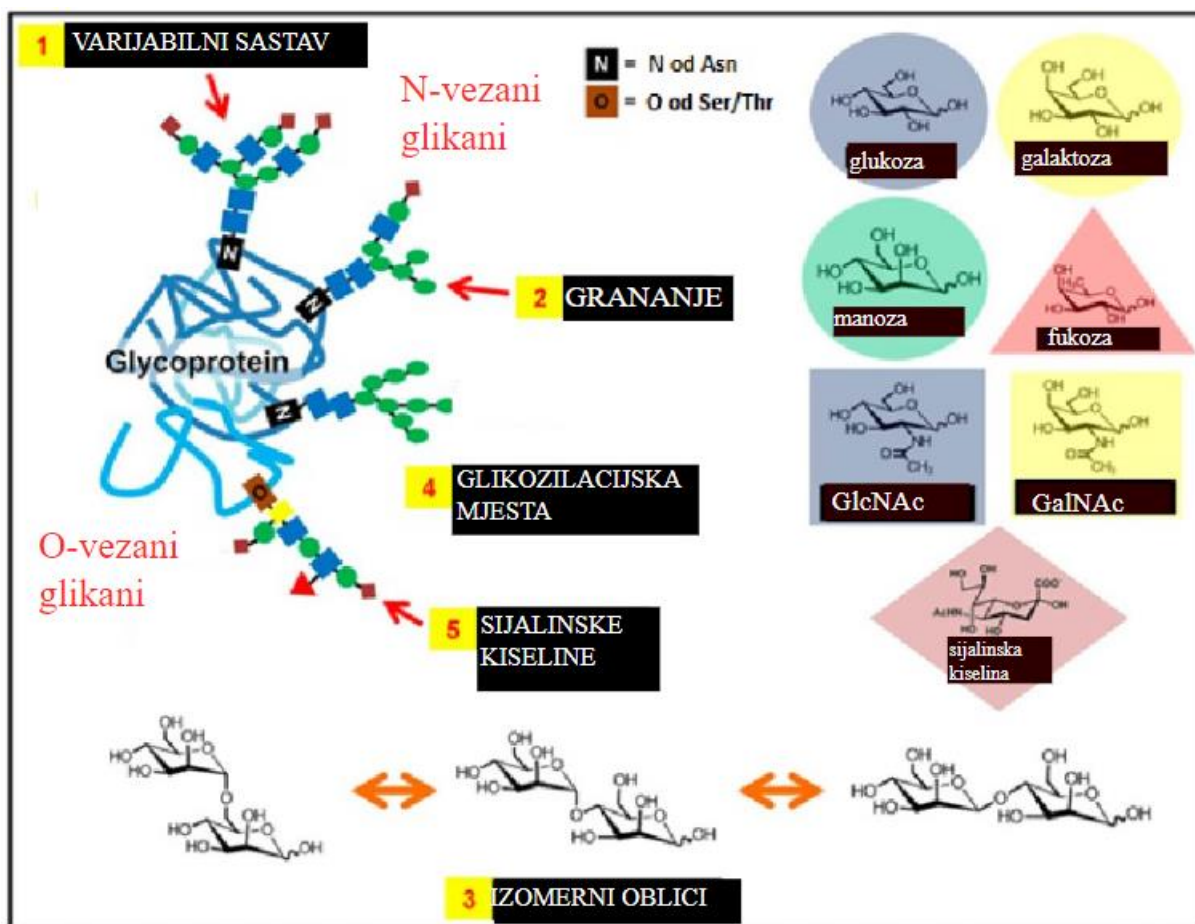
Ugljikohidrati su definirani kao polihidroksialdehidi, polihidroksiketoni ili njihovi derivati, te kao složeniji spojevi koji reakcijom hidrolize prelaze u navedene spojeve. Monosaharidi posjeduju karbonilnu skupinu vezanu na kraju ugljikovog lanca (tzv. aldehidna grupa) ili karbonilnu skupinu vezanu na ugljikov atom unutar lanca (tzv. ketolna grupa). Stoga se ove dvije vrste monosaharida nazivaju aldoze i ketoze, te se ne mogu hidrolizirati u jednostavnije oblike.[2] Slobodni monosaharidi mogu postojati kao otvoreni lanci ili kao prstenaste strukture. Najjednostavniji monosaharid je gliceraldehid, dok su najčešći nama najpoznatiji monosaharidi sa šest ugljikovih atoma - glukoza, galaktoza i fruktoza.



Slika 1. Najpoznatiji ugljikohidrati (preuzeto iz Varki, Essentials of glycobiology, 2022.[2])

Do formiranja disaharida dolazi povezivanjem molekula monosaharida posebnom vrstom veze koja se zove glikozidna veza. Glikozidna veza je kovalentna veza između molekule ugljikohidrata (glikana) i neke druge skupine koja ne mora strogo biti ugljikohidrat. Glikozidna veza obično uključuje vezanje molekule monosaharida na neki ostatak putem hidroksilne grupe anomerskog centra, pri čemu dolazi do nastajanja alfa ili beta veza koje su određene odnosom između glikozidnog kisika i anomernog ugljika. Navedene vrste veza su u velikoj mjeri zaslužne za različita strukturna svojstva i biološke funkcije jedinica koje su jednake u sastavu. Prstenaste strukture monosaharida su osnova oligosaharida, kod kojih se linearni ili razgranati lanci monosaharida povezuju jedni na druge putem glikozidne veze. [2]

Primarna struktura glikana je određena redoslijedom i vrstom monosaharidnih ostataka, prirodom i mjestom neglikanskog entiteta, koji se naziva još i aglikon, na kojeg je glikan vezan te samim položajem glikozidne veze. Osim toga, glikani mogu biti povezani na različita mjesta na glikoproteinu. [8]



Slika 2. Kompleksna struktura glikana (preuzeto i modificirano iz Creative Proteomics, Structural Characterization of Glycans)

2.3. Glikozilacija

Glikozilacija je najčešći i najkompleksniji oblik ko- i post-translacijske modifikacije proteina. [9] Glikozilacija je enzimski proces u kojoj se glikani kovalentno vežu na funkcionalnu skupinu druge molekule pri čemu dolazi do formiranja glikokonjugata. Svojstva nastalih glikokonjugata (glikoziliranih proteina i lipida) ovise o mjestu na kojem se određeni glikan veže na akceptorsku molekulu te o samoj složenosti glikana. Glikozilacija igra važnu ulogu u različitim biološkim i biokemijskim procesima[10+], kao što su oplodnja, bolesti srca, dijabetes te razvoj patoloških događaja, npr. infekcije, upale pa čak i karcinom.[10] [11] Osim toga, glikozilacija igra bitnu ulogu u razvoju i funkcioniranju organskih sustava, posebice kardiovaskularnog, živčanog i imunskog sustava.[11] [12] Zbog navedenih karakteristika glikozilacije, ona je čest predmet laboratorijskih istraživanja budući da postoji velika raznolikost u glikozilaciji proteina kod različitih vrsta, što može uveliko pomoći u razumijevanju bolesti i bioloških procesa. Razumijevanje same glikozilacije proteina može pomoći u razvoju novih oblika terapija i poboljšanju zdravlja pojedinca.[13]

Razlikuju se četiri tipa glikozilacije: *N*-glikozilacija, *O*-glikozilacija, *C*-glikozilacija i *S*-glikozilacije. Kod *N*-glikozilacije se odvija proces adicije glikana na dušikov atom asparagina koji se nalazi u proteinu.

N-glikozilacija je od posebnog značaja za istraživanje, budući da sudjeluje u imunskom odgovoru tijela, stabilizaciji proteina i signalizaciji stanica.

Proces koji se odvija kod

O-glikozilacije je dodavanje glikana na hidroksilne skupine serina (Ser) u proteinima. Osim serina, moguća je adicija i na hidroksilnu skupinu treonina u proteinu. Ovaj oblik glikozilacije je zastupljen u ekstracelularnim proteinima (npr. proteoglikanima) koji su važni za izgradnju i funkciju vezivnog tkiva. [14]

C-glikozilacija je rjeđi oblik glikozilacije te je za nju karakteristično dodavanje glikana na atom ugljika aminokiseline u proteinu (uglavnom triptofan ili tirozin).

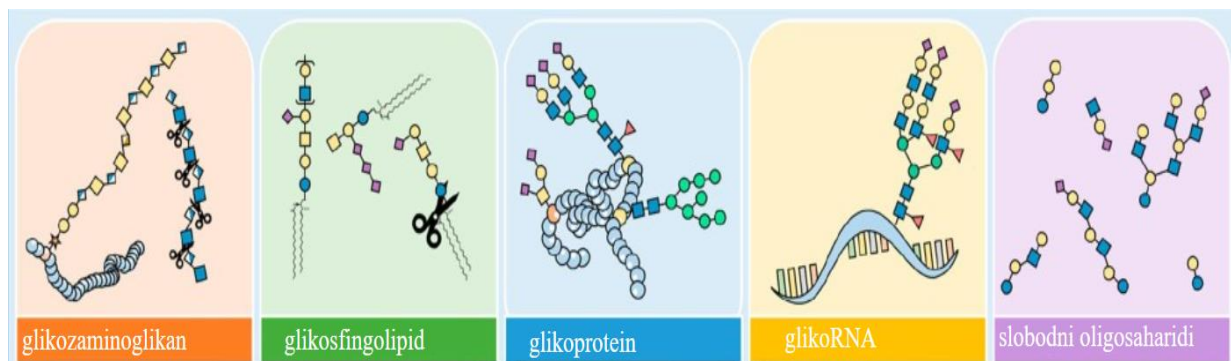
S-glikozilacija se odnosi na vezanje oligosaharida na atom sumpora cisteina. Ovaj oblik glikozilacije je rijedak u odnosu na ostale, a prvi put je uočena u ljudskim i bakterijskim peptidima. [15]

Dvije najviše istražene vrste glikozilacije su *N*- i *O*-glikozilacija. Vezanje *N*-glikana na protein započinje u endoplazmatskom retikulumu dok još traje translacija proteina, a nastavlja se u

Golgijevom aparatu, dok se *O*-glikozilacija odvija isključivo posttranslacijski u Golgijevom aparatu.[16] Ovisno o tome dolazi li do *N*- ili *O*- glikozilacije, odnosno jesu li glikani na protein vezani *N*- ili *O*- glikozidnom vezom, razlikujemo *N* vezane i *O* vezane glikane. [17]

2.4. Glikoproteini

Glikokonjugat je spoj kod kojeg je jedan ili više monosaharidnih ili oligosaharidnih jedinica kovalentno povezano na aglikon. Budući da se glikozilacija javlja na različitim biomolekulama, to rezultira glikoproteinima, proteoglikanima i glikosfingolipidima. Osim ovakvog oblika postojanja glikokonjugata, druge klase glikana mogu postojati kao slobodni oligosaharidi pa čak i kao glikozilirana RNA.



Slika 3. Prikaz vrsta glikokonjugata (slika preuzeta i modificirana iz High-Throughput Glycomic Methods, I. Trbojević-Akmačić i sur. 2022[18])

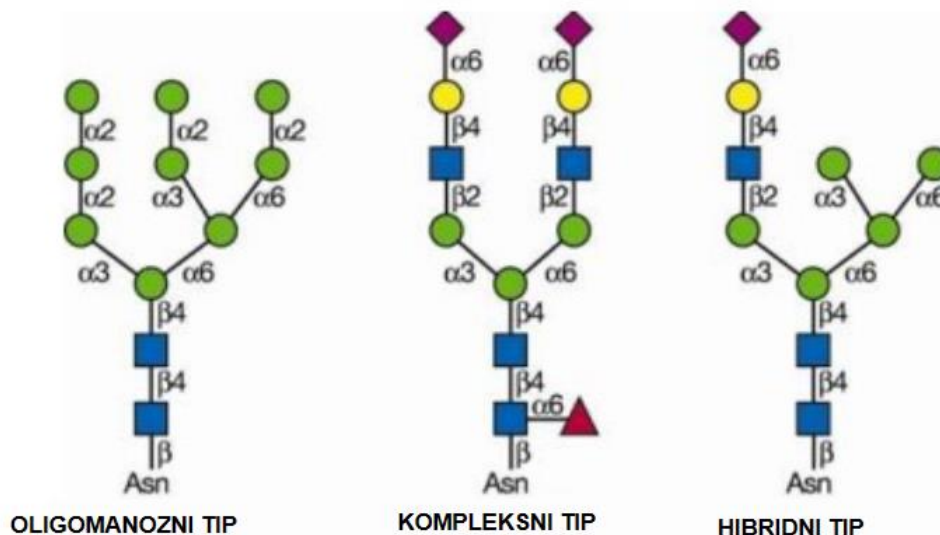
Proteinski glikokonjugati se dijele na proteoglikane i glikoproteine, ovisno o udjelu glikana u masi molekule. Proteoglikani posjeduju razgranate saharidne strukture koje mogu biti povezane na peptidne (kraće) ili proteinske (dulje) lance. Kod glikoproteina su jednostavne glikanske strukture vezane na proteine te oni čine gotovo dvije trećine ukupnog broja proteina u organizmu.[18]

2.5. *N* - vezani glikani

N - vezani glikani se klasificiraju u 3 skupine prema vrsti, veličini i načinu vezanja struktura glikana na okosnicu. Skupine su oligomanozni, kompleksni i hibridni glikani. Okosnica na koju se vežu monosaharidi je ista kod svih skupina, a čine ju dva *N* - acetilglukozamina (GlcNAc) na koje su vezane tri manozne jedinice ($\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$). Takva veza između monosaharida i skupine koja sadrži dušikov atom se naziva *N*-glikozidna veza. [19]

Unutar niza *Asn-X-Ser/Thr*, *X* predstavlja neku aminokiselinu osim prolina, zbog toga što on sterički ometa formiranje glikozidne veze zbog svoje strukture. Otprilike 70% proteina posjeduje *Asn-X-Ser/Thr* sekvencu, a otprilike 70% sekvenci posjeduje *N* - glikane. [2] Oligomanozna skupina posjeduje dva do šest manoznih ogranaka koji se povezuju na glikansku okosnicu. Kompleksni tipovi posjeduju tzv. „antene“ sastavljene od *N* - acetilglukozamina, galaktoze i sijalinske kiseline, dok je hibridni tip kombinacija je prethodna dva tipa. *N* - glikozilacija je visoko konzerviran proces od velikog značaja budući da je ustanovljeno da je više od 7000 proteina u ljudskom organizmu *N* - glikozilirano. [19] *N* - glikozilacija sudjeluje u smatanju proteina, prijenosu proteina i prijenosu signala te je zato vrlo važna u raznim fiziološkim fenomenima kao što su razvoj, neurogeneza i imunitet na koje djeluje reguliranjem funkcije proteina.[20]

Prekursor *N* - glikana je biosintetiziran u endoplazmatskom retikulumu od dolikol fosfata (Dol-P) koji je izrazito hidrofobna, poliizoprenoidna molekula. Djelovanjem raznih enzima (glikozidaze i glikoziltransferaze) dolazi do stvaranja oligosaharida koji se prebacuju u *Asn-X-Ser/Th* sekvencu proteina. [19]



SIMBOLIČNI PRIKAZ NAJČEŠĆIH MONOSAHARIDA I VEZA

Galaktoza (Gal)	Ksiloz (Xyl)
N - acetilgalaktozamin (GalNAc)	N - acetilneuraminska kiselina (Neu5Ac)
Galaktozamin (GalN)	N - glükolilneuraminska kiselina (Neu5Gc)
Glukoza (Glc)	2 - keto - 3 - deoksinonoska kiselina (Kdn)
N - acetilglukozamin (GlcNAc)	Fukoza (Fuc)
Glukozamin (GlcN)	Glukuronska kiselina (GlcA)
Manoz (Man)	Iduronska kiselina (IdoA)
N - acetilmanozamin (ManNAc)	Galakturonska kiselina (GalA)
Manozamin (ManN)	Manuronska kiselina (ManA)

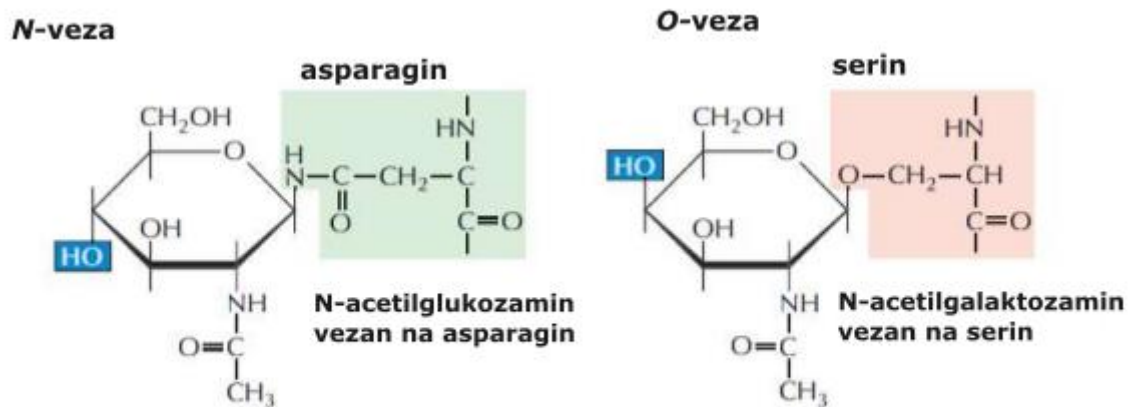
Slika 4. Prikaz tipova *N* - vezanih glikana (preuzeto i modificirano iz Stanley i sur., 2017[16])

2.6. *O* - vezani glikani

Postoji mnogo razloga zašto se *N* - vezani glikani proučavaju više od *O* - glikana. Ti razlozi su činjenica da su *N* - glikani povezani na evolucijski konzerviranu aminokiselinsku sekvencu, dok *O* - glikani mogu biti povezani na bilo koji Ser ili Thr u proteinu. Drugi razlog je taj što skoro niti jedan enzim ne može otpustiti *O* - glikane, dok se *N* - glikani jednostavno otpuštaju iz proteina s enzimima poput PNGaze F ili A. [21]

O - vezani glikani su vezani na polipeptid preko *N* - acetilgalaktozamina (GalNAc) na hidroksilnu grupu serinskog ili treoninskog ostatka preko tzv. *O* - glikozidne veze. U širem

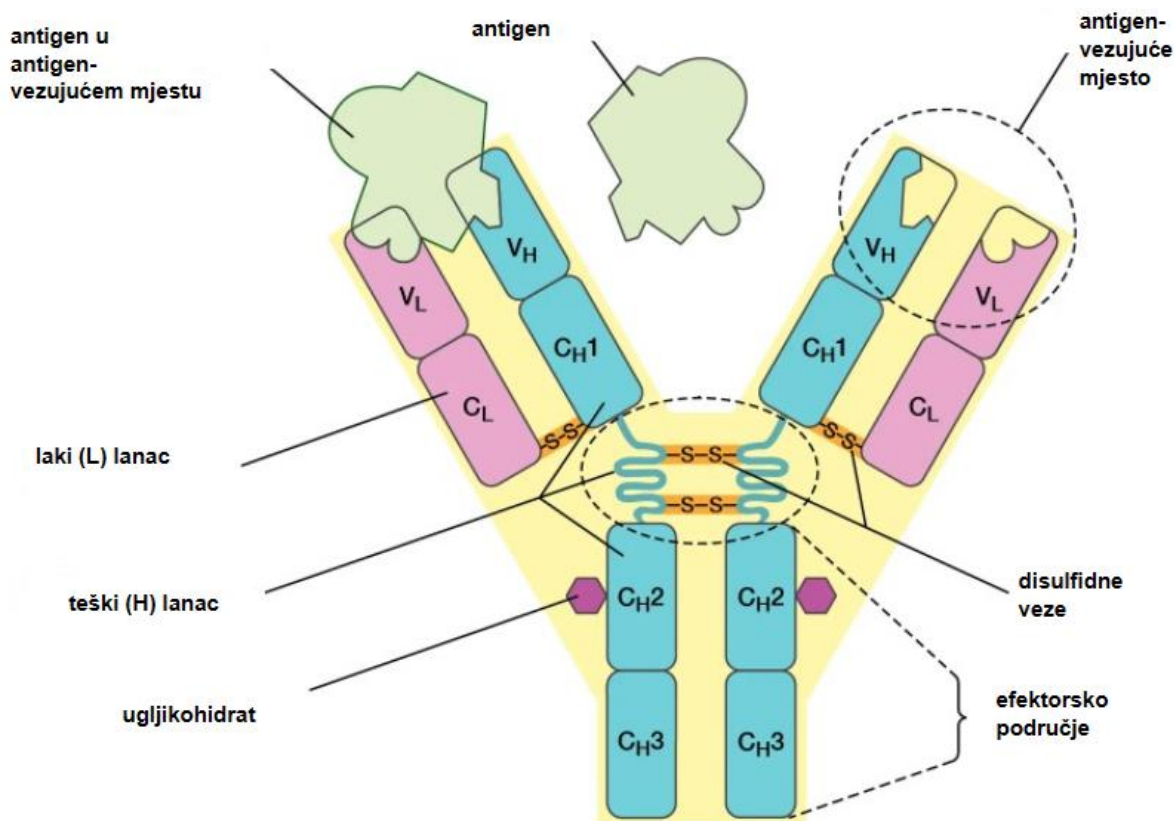
značenju, oni predstavljaju povezivanje molekule šećera na atom kisika. *O* - glikozilacija se odvija u Endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu nakon smatanja proteina. Za odvijanje ovog procesa je zaslužni su enzimi GalNAc transferaze (GALNTs), kojih ima 20 različitih tipova. [2]



Slika 5. Prikaz vrsta glikoproteina (preuzeto iz Cooper i Hausman, 2004.[1])

2.7.Imunoglobulin G

Prepoznavanje antigena u imunskom sustavu čovjeka se vrši preko dvije vrste limfocita, limfocita B i limfocita T. Limfociti B su odgovorni za stvaranje protutijela poznatijih pod nazivom imunoglobulini. [22] Imunoglobulini su heterodimerni glikoproteini koji su građeni od dva laka i dva teška lanca. Laki i teški lanci posjeduju varijabilna područja koja mogu djelovati kao kontaktna mjesta za antigen. Također, posjeduju i konstantna područja koja omogućuju sklapanje proteina i posredničke efektorske funkcije. Izotipovi i podklase protutijela su određene konstantnim područjem teškog lanca implementiranog u imunoglobulinski (Ig) kompleks. Ljudski Ig sustav je podijeljen u 5 izotipova: IgM, IgD, IgA, IgE, i IgG. [21]



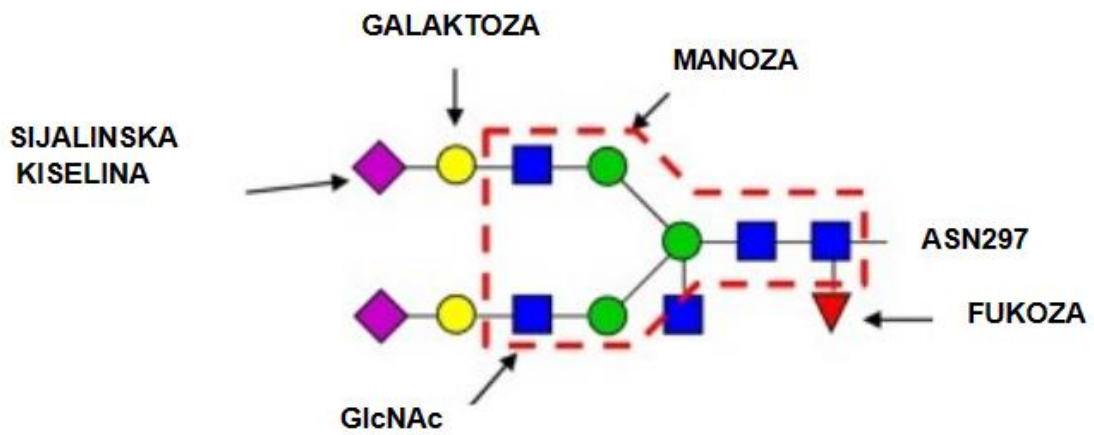
Slika 6. Strukturna građa protutijela (preuzeto i modificirano iz Antibody structure and classes, Britannica)

Imunoglobulin G (IgG) je glavni serumski glikoprotein koji obnaša ulogu protutijela u imunom sustavu. Koncentracija u plazmi zdravih osoba je između 7-16 mg/mL. [22] IgG se sastoji od četiri polipeptidna lanca, dva identična teška i laka lanca. Laki lanac se sastoji od dvije domene čiji su nazivi V_L i C_L , dok se teški lanac sastoji od četiri domene, odnosno V_H , C_{H1} , C_{H2} i C_{H3} . Oznake V i C označavaju dvije regije: varijabilne (NH_2 -) na koje se veže antigen i konstantne ($COOH$ -) regije koje određuju efektorske funkcije. Svaka C i V regija se sastoji od otprilike 110 do 130 aminokiselina. Varijabilne domene nastaju složenim nizom događaja preuređivanja gena, nakon čega se mogu podvrgnuti somatskoj hipermutaciji nakon izlaganja antigenu. Postoji pet glavnih klasa domena C teškog lanca i prema tome se razlikuju izotipovi. [23]

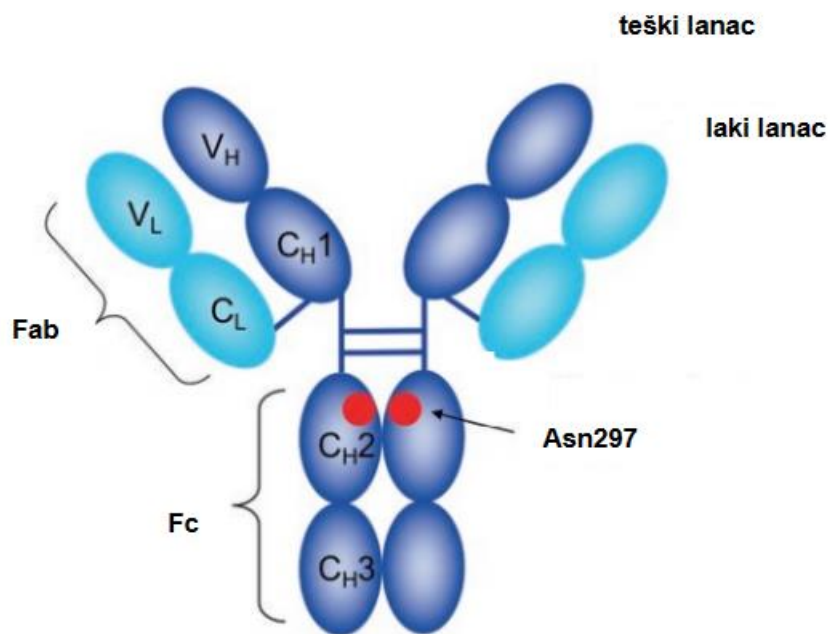
Teški i laki lanci formiraju tri strukturno nezavisne proteinske jedinice, uključujući dva antigen-vezujuća fragmenta (Fab) i jedan kristalizirajući fragment (Fc). Prepoznavanje antigena se vrši preko njegovih Fab regija, točnije preko domena V_L i V_H . Oni odgovaraju gornjim krajevima

strukture Y-oblika, dok se Fc regija nalazi u podnožju Y oblika. [24] Fab se može dalje podijeliti na varijabilni fragment Fv koji se sastoji od V_L i V_H domena, i na konstantni fragment Fb koji se sastoji od C_L i C_{H1} domena. C_{H1} domena teškog lanca se nalazi unutar Fab regije, dok C_{H2} i C_{H3} pripadaju Fc regiji. Ovaj Fc fragment je zaslužan za definiranje izotopa i podklase imunoglobulina između kojih postoje značajne razlike u aminokiselinama. Podklase imunoglobulina G su IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Bez obzira na te razlike, svaka C_H regija se savija u poprilično konstantnu strukturu koja se sastoji od 3 do 4 lančane beta pločice koje su povezane disulfidnom vezom. [25] Fc fragment obnaša efektorsku ulogu vezanjem na Fc receptor na efektorskim stanicama ili aktiviranjem nekih drugih imunskih medijatora. Zato promjene u Fc regiji uvelike utječu na rezultat ukupne interakcije protutijelo - antigen. Sekundarna uloga Fc regije je utjecaj na kinetiku vezanja (pa čak i na afinitet vezanja) protutijela na Fv regiju što utječe na prepoznavanje antigena. [26]

Iako je IgG podijeljen u nekoliko podklasa (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4), Fc regijama svake podklase zajedničko je jedno konzevirano *N* - glikozilacijsko mjesto u svakoj C_{H2} domeni te je par *N* - glikana smješten upravo između dvije C_{H2} domene.[26] Profili glikozilacija IgG - Fc ovise o više različitih čimbenika kao recimo o vrsti, dobi, uvjetima te o patološkom statusu organizma čije ga stanice proizvode. Pojavom različitih upalnih bolesti taj profil glikozilacije se može promijeniti. [27] [28] Konzervirano *N* - glikozilacijsko mjesto se nalazi na poziciji 297 na granici između dvije domene C_{H2} i C_{H3} . Iako je ovo mjesto često smatrano kao jedino glikozilacijsko mjesto u IgG - u, V regija otprilike 10-15% svih protutijela je također glikozilirana i takva glikozilacija utječe na karakteristike vezanja antigena. [29] Struktura IgG glikana se sastoji od *N* - acetilglukozamina i ostataka manoze. [30]



Slika 7. Prikaz *N*-glikana vezanog na IgG (preuzeto i modificirano iz IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions; Visarsson i sur., 2014 [28])

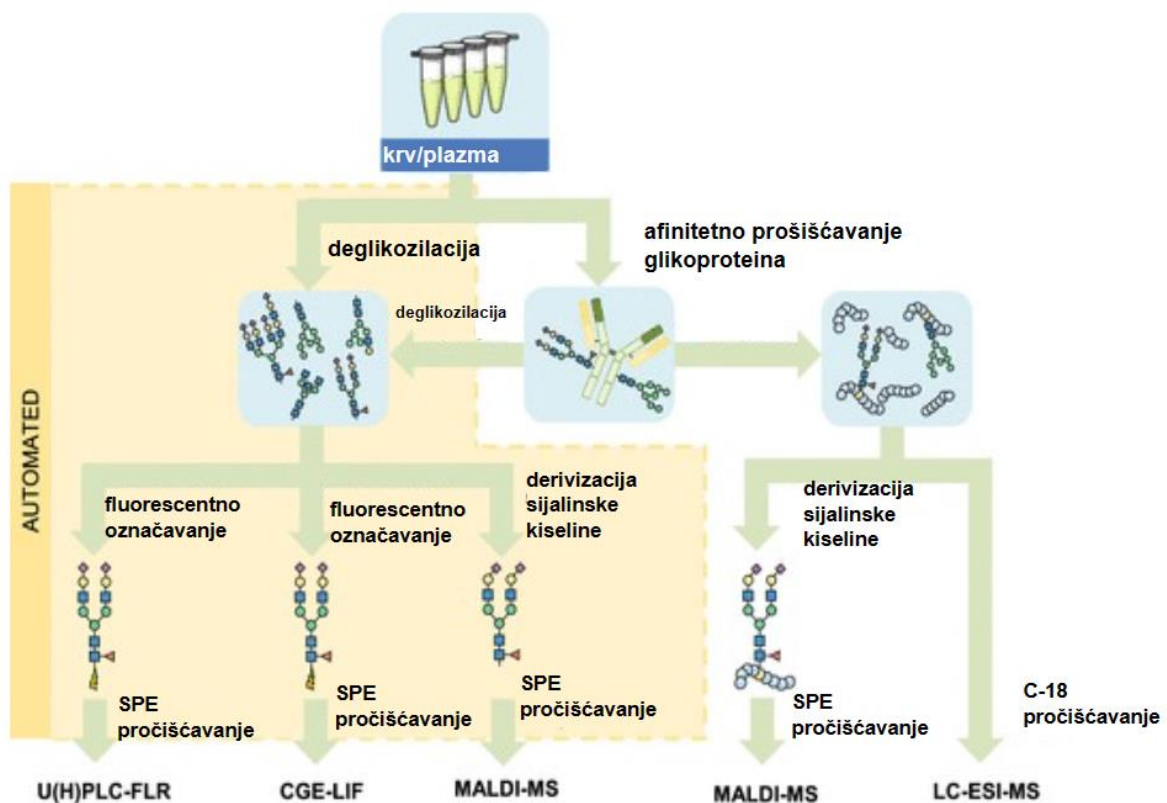


Slika 8. Građa imunoglobulina G (preuzeto i modificirano iz Cruse, J.M., and Lewis, R.E. Atlas of immunology)

2.8. Analiza strukture glikana/ Visokoprotokne analize N-glikana imunoglobulina G

Budući da su glikani i glikokonjugati jedinice vrlo male veličine, za analizu njihove strukture potrebno je primijeniti izrazito osjetljive tehnike analize koje će biti kompatibilne za analizu složene strukture i male količine analita. [31]

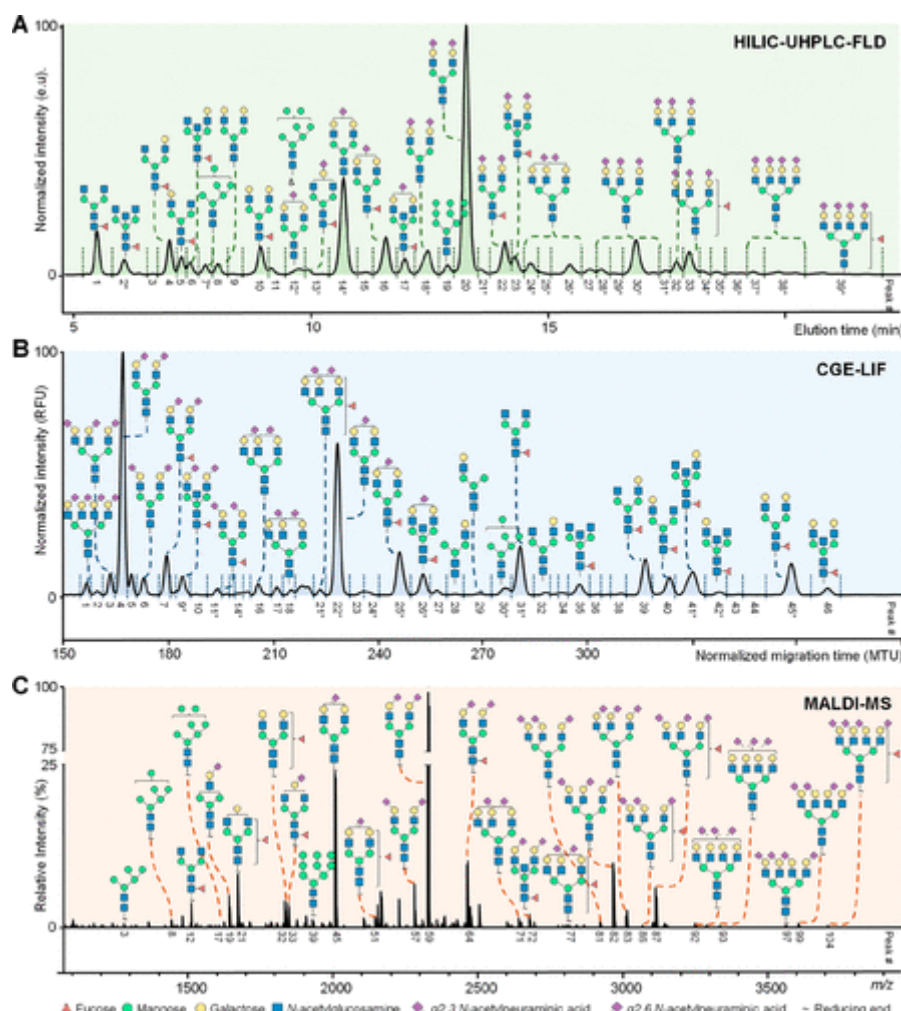
Visokoprotokna glikomika se temelji na nekoliko različitih tehnologija koje se koriste za profiliranje glikana. Takve tehnologije najbolje rezultate daju kada se koriste paralelno. Svaka od ovih tehnologija zahtjeva specifične analitičke uvjete i postupke obrade podataka kako bi se dobili pouzdani i robusni podaci. [18]



Slika 9. Prikaz metoda visokoprotokne analize N-glikana IgG-a (preuzeto i modificirano iz High-Throughput Glycomic Methods, I. Trbojević-Akmačić i sur. 2022[[18])

2.8.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofiličnim interakcijama (HILIC - UHPLC)

Trenutno postoji nekoliko pristupa visokoprotočnoj analizi N-glikana: tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (UHPLC, eng. *ultra-high-performance liquid chromatography*), tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS, eng. *liquid chromatography mass spectrometry*), kapilarna gel elektroforeza (CGE, eng. *capillary gel electrophoresis*) i matriksom potpomognuta laserska desorpcija spregnuta sa spektrometrijom masa (MALDI-MS, eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*). [18]



Slika 10. Krajnji rezultati visokoprotočnih metoda za analizu glikana (preuzeto i modificirano iz High-Throughput Glycomic Methods, I. Trbojević-Akmačić i sur. 2022[[18])

Najčešće se koristi UHPLC zbog relativno niske cijene opreme, vrlo dobre, pouzdane i robusne kvantifikacije i mogućnosti odvajanja glikanskih izomera.[32] Ukratko, ona uključuje

otpuštanje N-glikana iz proteina, fluorescentno bojanje otpuštenih N-glikana s 2-AB u prisutnosti reducensa, postupak čišćenja te naposljetku UHPLC analizu.

HILIC - UHPLC kromatografija je tehnika razdvajanja kemijskih spojeva koja svoju primjenu često nalazi u analitičkoj kemiji i biokemiji budući da je pogodna za razdvajanje polarnih spojeva (tj. polarnog analita), npr. aminokiselina, šećera, peptida i dr. u relativno kratkom vremenskom intervalu. [33]

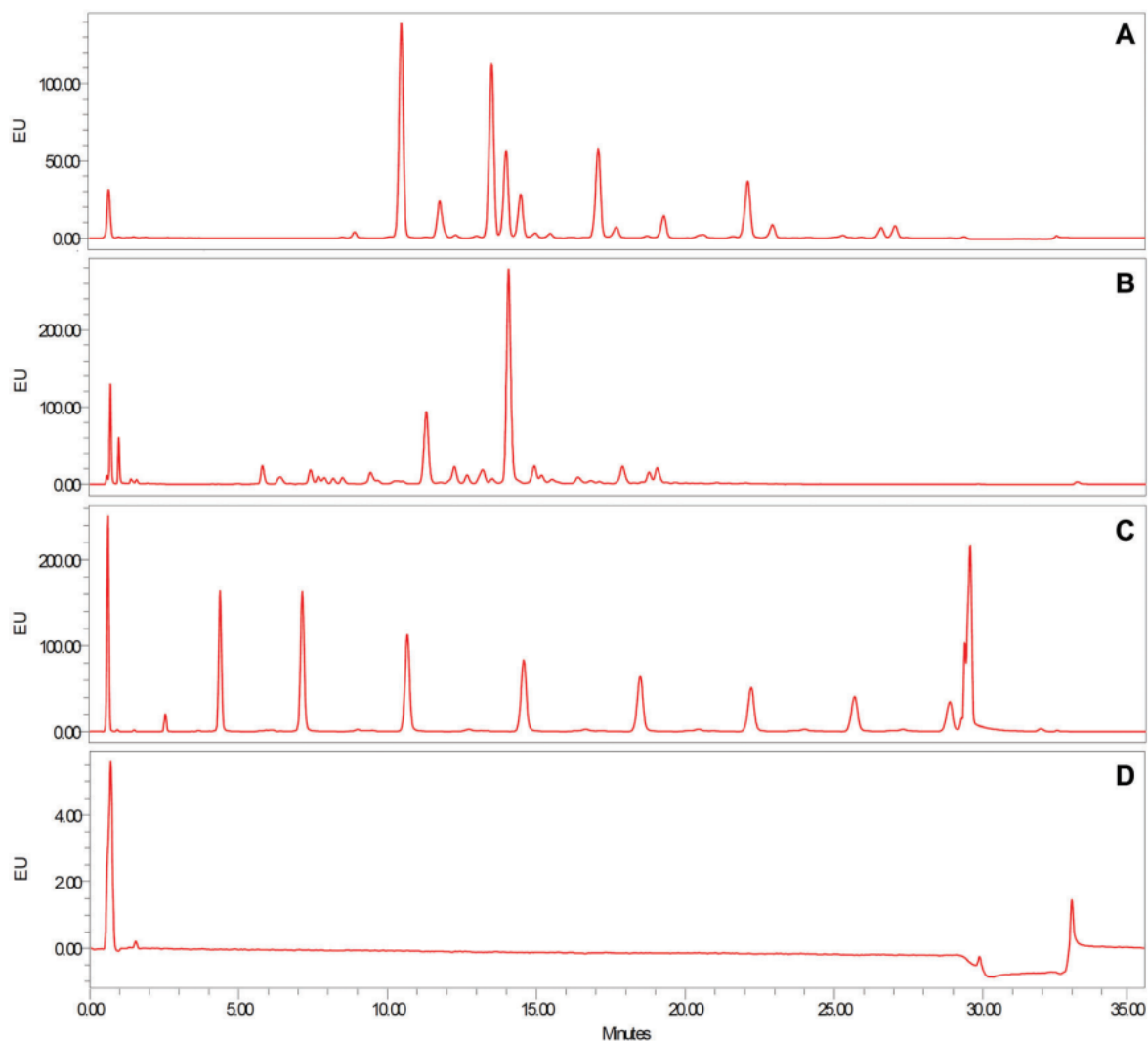
Budući da se koristi hidrofilna stacionarna faza i hidrofobna mobilna faza, ovaj oblik kromatografije pripada podvrsti normalno-fazne kromatografije. Mobilna faza HILIC - UHPLC kromatografije posjeduje veći sadržaj organskog otapala nego što je to slučaj kod tradicionalne kromatografije, dok je stacionarna faza hidrofilna. Takva izvedba uvelike povećava selektivnost i osjetljivost ove tehnike jer omogućuje preciznije razdvajanje polarne i hidrofilne molekule. Drugim riječima, što je analit hidrofilniji, njegovo retencijsko vrijeme će biti dulje. Ova tehnika je posebno korisna za analizu malih molekula koje su previše polarne za analizu pomoću standardne reverzne faze tekuće kromatografije. [34]

Kolone HILIC - UHPLC kromatografije su ispunjene sitnim česticama obično silicij dioksida ili nekim drugim materijalom koji također posjeduje hidrofilne grupe koje su vezane na stacionarnu fazu. Prisustvo takvih grupa omogućuje bolje zadržavanje polarnih analita. Budući da su glikani izrazito polarni hidrofilni spojevi, HILIC - UHPLC kromatografija omogućava njihovo razdvajanje te karakterizaciju prema veličini, sastavu, funkciji i strukturi. Ta činjenica je ključna za istraživanje glikozilacije proteina, budući da se HILIC - UHPLC kromatografijom mogu razdvojiti glikozilirani proteini, što omogućava analizu šećernih lanaca vezanih na proteine. [18]

Međutim, HILIC - UHPLC kromatografija posjeduje i neke nedostatke. Naime, ona je osjetljiva na promjene u pH vrijednosti mobilne faze, što dovodi do slabljenja tehničkih karakteristika sustava. Osim toga, rukovanje i održavanje HILIC - UHPLC kromatografije je skupo i složeno. HILIC - UHPLC se često koristi za analizu slobodnih (tj. otpuštenih) glikana koji su prije detekcije odvojeni sa svoga proteinskog nosača, koji je u većini slučajeva monolitna protein G pločica. Postupak pripreme uzoraka za ovaj oblik kromatografije se sastoji od nekoliko koraka. Prvi postupak, oslobađanje N-glikana, može se izvesti od pročišćenog glikoproteina od interesa (npr. IgG) ili izravno od složenijeg uzorka poput krvne plazme/seruma. Slijedeći korak je

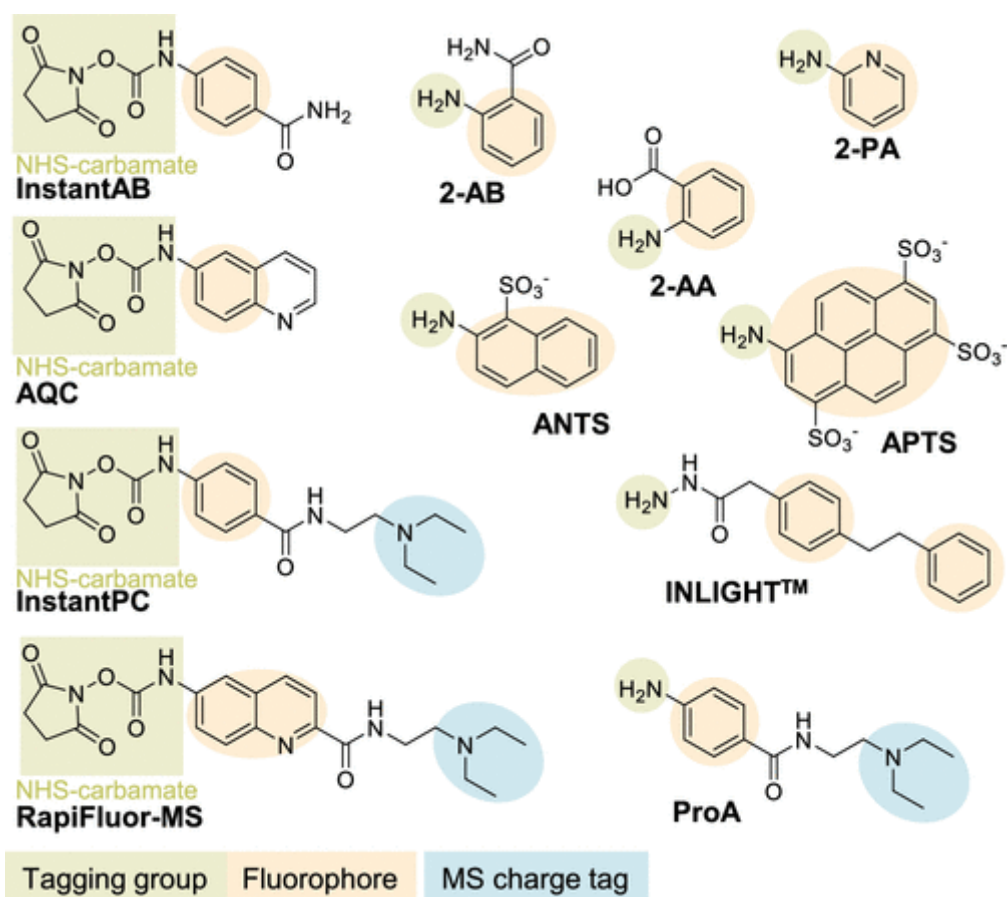
deglikozilacija, koja predstavlja proces uklanjanja ugljikohidratnog entiteta od glikoproteina pomoću enzima PNGase F. [35] Nakon nje, slijedi postupak fluorescentnog označavanja otpuštenih glikana, postupak čišćenja (eng. *clean up*) te naposljetku kromatografska analiza. Detekcija glikana se može odvijati preko elektrokemijskog detektora ili čak u masenom spektrometru (u slučaju da iz nekog razloga glikani nisu obilježeni). Budući da glikani ne posjeduju ni kromofornu ni fluorofornu skupinu oni se sami kao takvi ne mogu detektirati u HILIC - UHPLC kromatografiji. Zbog toga se glikanima modificira struktura, odnosno derivatiziraju se reduktivnom aminacijom obično 2-AB-om.[34] Proces obilježavanja se vrši na reducirajućem kraju oligosaharida tako da je stehiometrijski omjer u kojem se odvija reakcija obilježavanja 1:1. Drugim riječima, jedan glikan reagira s jednom molekulom 2-AB. [35]

Profil “obilježenih” glikana na kromatogramu se uspoređuje s profilom oligomera glukoze, odnosno produktima reakcije hidrolize dekstrana. Analizom linearnih glukoznih oligomernih lanaca dobivena retencijska vremena rastu s brojem monomera, a taj broj nazivamo glukoznim jedinicama (eng. *glucose units*, GU) te on služi za prikaz retencijskih vremena glikana analiziranog uzorka. [36] [37] [38]



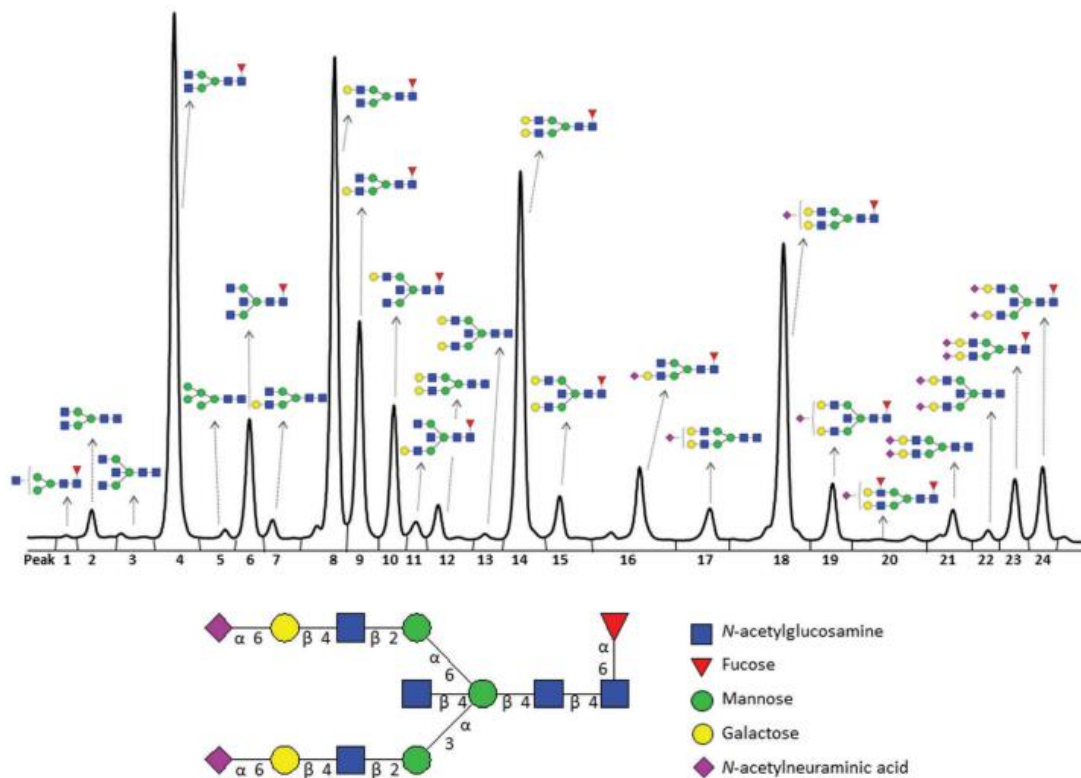
Slika 11. Reprezentativni kromatogrami: A) 2-AB označeni IgG *N*-glikani; B) 2-AB označeni *N*-glikani iz plazme/seruma; C) 2-AB označeni dextran; D) slijepa proba/voda (preuzeto iz High-Throughput Glycomic Methods, I. Trbojević-Akmačić i sur. 2022[16])

Najčešće korištena fluorescentna boja je 2-AB koje daje visoke fluorescentne signale, iako se ne ionizira lako. Zadnji nekoliko godina počela su se koristiti bojila koja su bolje primjenjiva u odnosu na 2-AB kao što su: prokainamid (ProA), 6-aminokvinolil-*N*-hidroksisucinimidil karbamat (AQC) i RapiFluor-MS. [39] [40] Primjenom novih boja, npr. AQC, Instant AB, InstantPC i RapiFluor-MS-a se postiže značajno smanjenje vremena potrebnog za označavanje glikana.

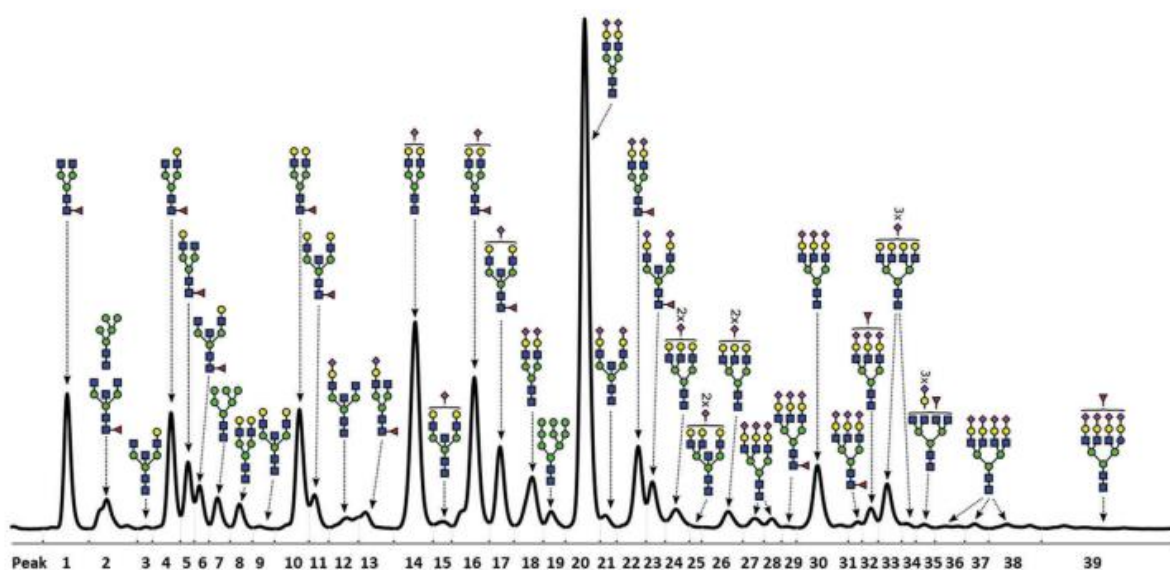


Slika 12. Prikaz kemijskih struktura korištenih bojila

Postupak oslobađanja *N*-glikana može se izvesti od pročišćenog glikoproteina od interesa (npr. IgG) ili od složenijeg uzorka poput krvne plazme/seruma.



Slika 13. Reprezentivni kromatogram IgG 2-AB označenih glikana koji su razdvojeni u 24 kromatografska vrha metodom HILIC - UHPLC (preuzeto iz High-Throughput Glycomic Methods, I. Trbojević-Akmačić i sur. 2022[[18])



Slika 14. Reprezentivni kromatogram plazma/seruma 2-AB označenih N - glikana koji su razdvojeni u 39 kromatografskih vrhova metodom HILIC-UHPLC (preuzeto iz High-Throughput Glycomic Methods, I. Trbojević-Akmačić i sur. 2022[[18])

2.8.2. CGE-LIF (kapilarna gel elektroforeza s laserom induciranom fluorescencijskom detekcijom)

Povijesno gledano, CGE-LIF je često korištena metoda za sekvencioniranje DNA. Budući da se radi o izrazito osjetljivoj metodi, ona svoju primjenu nalazi i u karakterizaciji glikana. [40] Najčešća izvedba ove elektroforeze je kao 4, 8 ili 16 kapilarna izvedba. U odnosu na MS i UHPLC, ova metoda pruža veću osjetljivost te separaciju izobarnih struktura bez žrtvovanja svoje robusnosti i bez povećanja cijene analize. [41]

Glavni nedostatak ove metode i razlog zašto upravo ona nije najzastupljenija metoda karakterizacije glikana su nedovoljne razvijene baze podataka koje se koriste za označavanje glikanskih vrhova (eng. peaks) i nedostatak glikanskih standarda. Štoviše, povezivanje CGE-a s MS-om još uvijek je izazovno, čineći strukturnu oznaku vrhova glikana prilično složenom. S druge strane, kapilarna elektroforeza (CE) u kombinaciji s pozitivnim ionskim načinom rada ESI-MS putem sučelja bez omotača omogućuje učinkovitu desolvataciju kapljica i ionizaciju analita. Iako se zbog duljeg vremena analize i manje robusnosti uglavnom koristio za dubinsko profiliranje, a ne u HT (High Throughput) glikomici. [42]

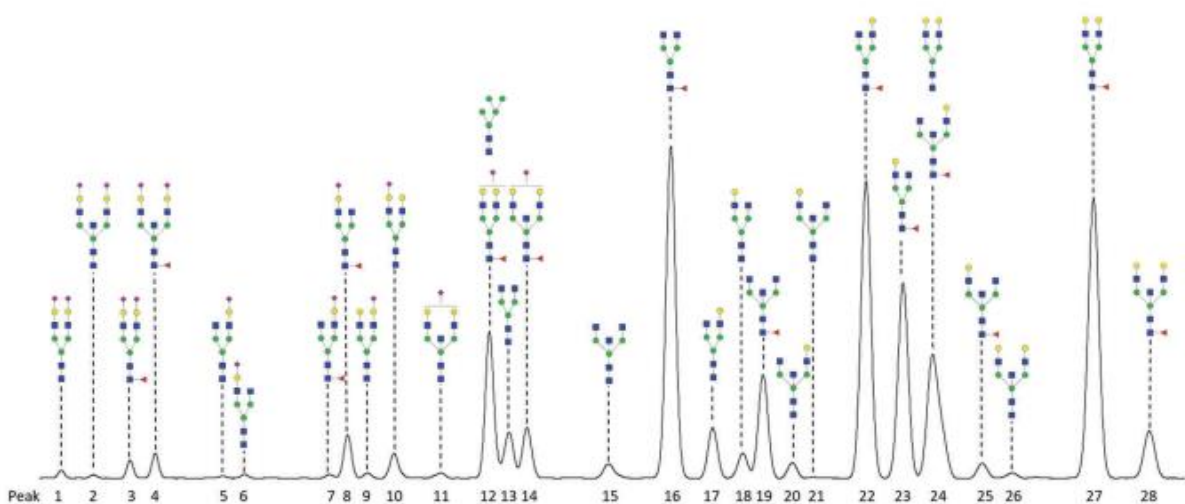
Priprema uzoraka za CGE se sastoji od nekoliko koraka: izolacija proteina od interesa (ukoliko je potrebno), deglikozilacija, fluorescentno označavanje slobodnih *N* - glikana, proces pročišćavanja nakon kojeg slijedi CGE separacija s LIF detekcijom. Za razliku od fluorescentnih tvari koje se koriste za označavanje glikana kod UHPLC-a, tvari korištene kod CGE analize su nabijene kako bi se mogla odvijati elektroforetska separacija. Najčešće korišteno bojilo je negativno nabijeni APTS, koje je upareno s *N*-glikanima procesom reduktivne aminacije koristeći NaBH_3CN ili 2 pikolin boran kao reducense. Dodatkom octene ili limunske kiseline povećava se učinkovitost označavanja glikana APTS-om. Primjerice, octena kiselina omogućuje postizanje učinkovitosti označavanja glikana od 95%. [43] Budući da se radi o analizi čije je provođenje skupo, ona zahtjeva iznimno učinkovite postupke pročišćavanja glikana kako bi se dobili čisti fluorescentno obilježeni *N* - glikani te osigurala mogućnost ponavljanje analize.

Temperatura provođenja procesa derivatizacije i vrijeme trajanja istog su faktori koji utječu na brzinu i učinkovitost označavanja glikana i minimalnu desijalizaciju, stoga je ove parametre potrebno optimirati. Tako je skupina znanstvenika [2] dokazala da APTS označavanje glikana

(uz prisustvo octene kiseline) pokazuje otprilike 50% lošije rezultate ako se provodi 2 sata u odnosu na provođenje istog procesa preko noći. U slučaju provođenja procesa preko noći, količina sijalinskih kiselina će se smanjiti. Provođenjem procesa uz limunsku kiselinu, doći će do brže reakcije označavanja (50 min na 50 °C za razliku od inkubacije preko noći na 37 °C) s 10 puta nižom upotrebom APTS-a i gotovo nikakvim gubitkom sijalinske kiseline. Stoga se reakcije označavanja u HT studijama mogu izvoditi u otopini uz upotrebu limunske kiseline. [44]

Princip rada CGE-LIF metode se zasniva na elektrokinetičkom injektiranju fluorescentno označenih negativno nabijenih glikana u kapilare tako što primjenjujemo nizak napon u kratkom vremenu. [45] Nabijeni glikani putuju električnim poljem kroz kapilare te se razdvajaju na temelju njihovog odnosa masa/naboj i hidrodinamičkog volumena. Dobiveni rezultati se prikazuju u elektroferogramu gdje se nakon integracije svakog vrha (eng. *peak*) odvija normalizacija ukupne površine koja se koristi za ekstrahiranje količina glikana kao relativnih udjela ukupne površine ispod grafa. [18]

Kao što je navedeno kod UHPLC metode, provođenjem analize glikana CGE metodom, pojedinačne stukture glikana su prikazane određenim vrhovima s vrijednostima (GP). Određene vrijednosti koje se pripisuju svakom glikanskom vrhu se računaju na temelju fluorescentno označene standardne oligosaharidne ljestvice (obično maltodekstrin ili dekstran). [46] [47]

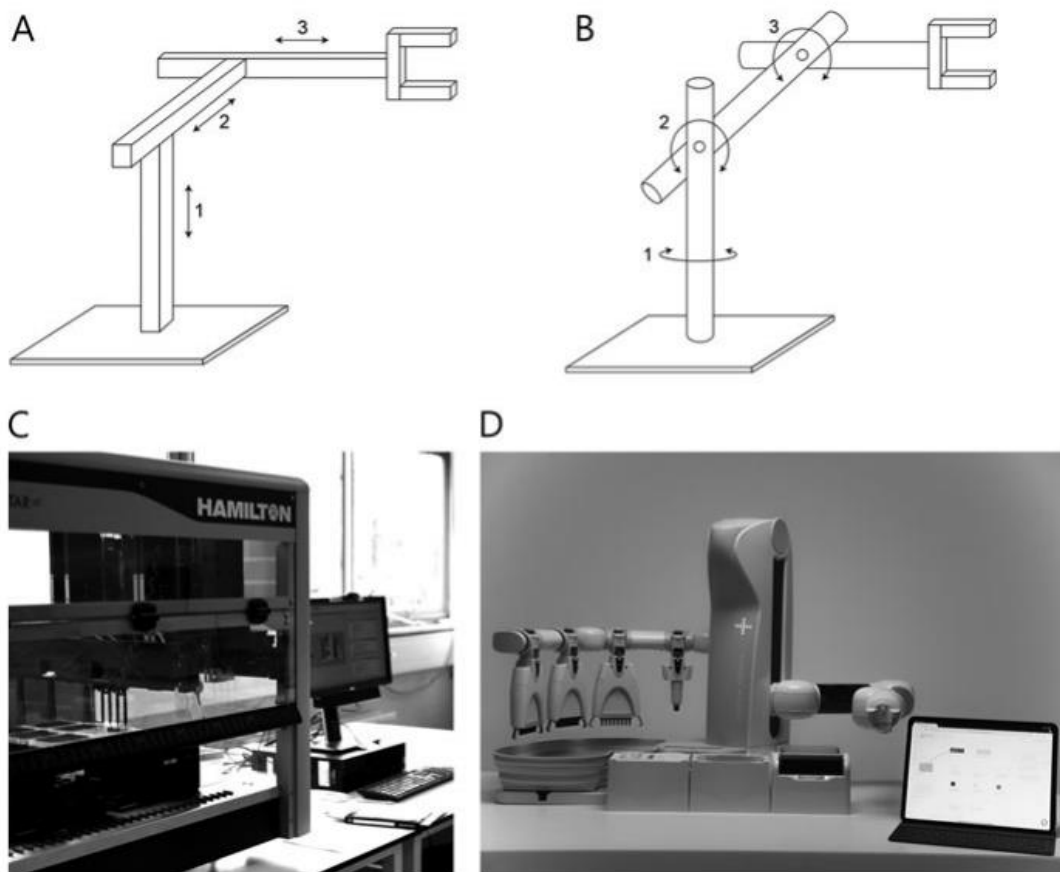


Slika 15. Elektroferogram dobiven na kapilarnoj elektroforezi koji prikazuje glikane razdvojene u 28 glikanskih vrhova (preuzeto iz High-Throughput Glycomic Methods, I. Trbojević-Akmačić i sur. 2022[[18])

2.9. Automatizacija procesa glikozilacije

Glikozilacija je vrlo bitan proces u fiziološkim i patofiziološkim stanjima. Zbog toga je glikozilacija danas često istraživano područje jer omogućuje predviđanje, a samim time i sprječavanje različitih bolesti kao npr. dijabetesa i raznih kardiovaskularnih bolesti. Razvojem automatizirane metode analize glikozilacije proteina ona bi se proširila na različite laboratorije te bi se izbjegli problemi koji se javljaju pri manualnom izvođenju. U tu svrhu su se dizajnirale višenamjenske robotske radne stanice kako bi zamijenile proces manualnog uzorkovanja, miješanja i kombiniranja kapljevih uzoraka. Ovi uređaji su postali sve češći stanovnici bioloških istraživačkih laboratorija te rješavaju probleme kontaminacije uzoraka i mijenjaju čovjeka. [48] [49]

Robotske radne stanice počinju sve više pronalaziti ulogu u području glikomike, budući da omogućuju rad bez ljudskog nadzora. Unutar robotskog prostora moguće je implementirati opremu koja će također služiti za potrebe odvijanja procesa kao što su vakumski uređaj za filtriranje uzoraka, centrifuga, inkubatori, miješalo, itd. [50] Prilikom implementacije automatizirane opreme u laboratorijski rad, treba uzeti u obzir volumen s kojim robot može raditi, preciznost koju pruža robot, potreban prostor za njegov smještaj te kompleksnost rukovanja njegovog programskog sučelja.



Slika 16. Prikaz dva tipa automatiziranih radnih stanica

Razlikuju se dva tipa automatiziranih radnih stanica koje se koriste u glikološkim laboratorijima: kartezijevska konfiguracija i antropomorfska konfiguracija. Robotska radna stanica s kartezijevskom konfiguracijom je programirana da može pomicati injektor u smjeru sve tri osi (x,y,z) [50] Takvo pomicanje omogućuje translatorno gibanje tzv. end-effector-a koji upravlja uređajem za doziranje kapljevina ili hvatanja ploča. Glavne prednosti robota za rukovanje s tekućinama su ponovljivost, stabilnost i preciznost. [49] Antropomorfska radna stanica kako i naziv govori, nastoji oponašati gibanje ljudske ruke, a glavna komponenta stanice je robotska višezglobna ruka koja u sebi ima implementirane prste kao hvataljke. Ti prsti se koriste za rukovanje pipetama i plastičnim posuđem. [48]

U analitičkim postupcima glikomike postoje brojne radnje koje su moraju provesti kako bi se proces uspješno doveo do kraja kao npr. gel filtracija, resuspendiranje, ionska izmjena ili afinitetna kromatografija. Nažalost, ne mogu se svi ti procesi automatizirati u procesu HT analize. [51]

Što se tiče glikoprofiliranja seruma ili plazme *N*-glikoma, postoji određen izazov zbog izrazite kompleksnosti glikoproteina koji se moraju izolirati i pročistiti kako bi se dobili izolirani glikani iz kojih će se dohvaćati informacije za istraživanje. Za automatizaciju tog procesa, koriste se dvije strategije za izoliranje pročišćavanje protutijela na kojemu su glikani: korištenje pločica s 96 jažica s proteinskim nosačem ili korištenje upakiranih vrhova pipeta s afinitetnom smolom. [52] Zbog same složenosti izvedbe, vrhovi s afinitetnom smolom se ne koriste tako često u automatizaciji glikozilacije. S druge strane, svaki alat koji je izveden u obliku ploče se može jednostavno implementirati u bilo koju robotsku radnu stanicu. Konkretno, za izolaciju IgG-a iz seruma ili plazme se koriste pločice s proteinom G na koje se glikoprotein veže te ispire. [52]

Jedan od najvećih nedostataka glikozilacijskih analiza je vrijeme potrebno za pripremu uzoraka za analizu. Zato se sama primjena robotskih radnih stanica za automatizaciju procesa nameće kao novo i relativno pouzdano rješenje. Važnu ulogu u postepenoj automatizaciji glikozilacije ima plastični pribor, točnije pločice na kojima se provodi ili vezanje glikana ili pročišćavanje, zato je komercijalna dostupnost istih vrlo bitna. Uz pločice, ključnu ulogu igraju i nastavci za pipete bez kojih se proces glikozilacije ne može prevesti iz manualnog u automatsko. [53]

Korak gdje je vrlo važno iskustvo i znanje operatera je prijenos manualne HT metode na automatiziranu platformu pri čemu se ta metoda mora optimirati radi postizanja najboljih rezultata. Osim toga, analitičar mora biti sposoban programirati robotiziranu radnu stanicu u njezinom operativnom programu kako bi računalo i robot bili savršeno usklađeni. Zato je potrebno da je operater radne stanice visoko osposobljen analitičar te sposoban razmišljati iznad radnih okvira (eng. *out of the box*) kako bi odlučio koje korake je moguće supstituirati, ukloniti ili dodati kako bi se ukupni proces proveo do kraja. [54]

Postoji nekoliko prednosti korištenja automatiziranih metoda: automatizacija uklanja većinu ljudskih pogrešaka te tako daje pouzdanije rezultate; povećava se sama preciznost metode što daje kvalitetnije rezultate; automatizacija uklanja fizički stres repetitivnog pipetiranja rukom; smanjuje se sklonost rukovanja s opasnim kemikalijama i procesima; više uzoraka se može procesirati u isto vrijeme; potpuno automatiziran proces znači da nema potrebe za ljudskom intervencijom te se analitičar može posvetiti drugim zadaćama; računalizirani protokoli omogućuju jednostavan transfer u druge laboratorije što osigurava veću globalizaciju; roboti su spremni pružiti sofisticirane računalne značajke kao pipetiranje s kontroliranim istiskivanjem zraka, rad s neovisno rasprostranjenim kanalima za pipetiranje i zapisnicima programa koji

ukazuju na pogrešku, u jednokratne vrhove za pipetiranje mogu se ugraditi sonde za detekciju razine tekućine koje mjere razliku otpora itd.; automatizirani procesi su znatno ekonomičniji. Međutim postoje i određeni izazovi povezani s implementiranjem i razvojem robotiziranih metoda koje će supstituirati manualne metode kao što su: nemogućnost automatizacije baš svakog koraka u procesu (mogućnost automatizacije ovisi isključivo o dostupnoj opremi i priboru) te je zato postizanje potpune automatizacije teško ostvariv proces; prilikom rukovanja s kapljevinama moraju se uzet u obzir mrtvi volumeni koji unose određenu dozu pogreške u sustav (zato je potrebno sve kapljevine u spremnicima pohraniti u velikom suvišku kako ne bi došlo do uvlačenja zraka); stabilnost uzoraka i hlapljenje otopina; veliki su troškovi implementiranja robotike u laboratorij stoga start-up nije za sve toliko jednostavan; nužno je da u neposrednoj blizini robota bude barem jedan operater koji je stručnjak u računalnim znanostima i programiranju ako se dogodi neka nepredviđena pogreška. [53]

Budućnost automatiziranih procesa u području glikobiologije je obećavajuća, budući da se javlja sve veća potreba za visokoprotočnim analizama uzoraka. Glikobiologija je jedno od najbrže rastućih područja znanosti te će svakako automatizacija njenih protokola pratiti taj trend jer će se povećati potreba za bržom analizom većeg broja uzoraka. Povećanje osjetljivosti strojeva za karakterizaciju, poboljšanje kvalitete plastičnog pribora (pločica) te poboljšanja u separaciji na krutoj fazi su realni ciljevi koji će se kroz nekoliko godina dostići, a njihova implementacija će biti važan korak ka automatizaciji glikozilacijskih protokola. Iz navedenih primjera, prednosti i nedostataka automatizacije, može se zaključiti da automatizacija pruža vrlo izgledna rješenja za smanjenje varijabilnosti zbog ljudske pogreške, nudi veću konzistenciju i smanjuje rukovanje i napor. [52] [53] [54]

2.9.1. TECAN EVO 200

TECAN je višenamjenska robotska platforma za aplikacije velikih razmjera i visoke propusnosti. Ona pruža veliko radno područje i varijabilne konfiguracije s izborom rukovanja željenih uzoraka. Ova platforma omogućuje izvođenje sustava prema željenim potrebama za automatizaciju procesa ili kao alternativa za neko već unaprijed konfigurirano rješenje.

TECAN nudi širok raspon nosača koji se koriste za pozicioniranje standardnog laboratorijskog pribora poput pločica, epruveta ili posuda za reagense na radnom stolu koji se može modificirati dodavanjem nekog vanjskog uređaja. Ti nosači se mogu jednostavno ukloniti ukoliko postoji potreba za rekonfiguracijom platforme. Robot omogućuje paralelnu obradu što povećava propusnost, osigurava ponovljivost i garantira učinkovito iskorištavanje resursa. [55]

Glavni element TECAN-a je Air LiHa ruka za istiskivanje zraka koja omogućuje precizno i pouzdano pipetiranje kapljevina pri čemu pruža veću pogodnost i manje zahtjeve za održavanjem. Sastoji se od 8 kanala koji mogu pipetirati volumene od 0,5 do 1000 μ L.



Slika 17. Prikaz robota TECAN EVO 200

Druga ruka TECAN-a koja je zaslužna za transport standardnog laboratorijskog pribora je RoMa (Robotic Manipulator Arm). Ona prenosi pločice i ostalu opremu od radnog stola do nekog vanjskog uređaja ili na drugu poziciju stola. U sklopu radnog stola TECAN-a nalazi se visokoučinkovito orbitalno miješalo koje nudi mogućnost zagrijavanja pločice na 105. Miješalo posjeduje široki dinamički raspon miješanja, konfigurabilnu orbitu i promjenjiv smjer rotacije što omogućuje optimizaciju protokola miješanja. [56]

Robotska konfiguracija TECAN-a u izvedbi na kojoj je rađen rad usko surađuje s vanjskom konfiguracijom Reasolvex A-200. Resolvex A-200 je samostalna jedinica za pozitivni tlak koji se nalazi u sklopu TECAN-a. Ona se može koristiti za različite procese u laboratoriju kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije uzorka u proteomskim radnim procesima. Ona posjeduje HEPA filter i zatvoreno okruženje kako bi se smanjio rizik od utjecaja prašine u zraku na rezultate.



Slika 18. Prikaz robotske konfiguracije Resolvex A-200

Ova jedinica posjeduje pneumatski sustav stezanja koji osigurava konzistentne tlakove. Također, nudi preciznu kontrolu protoka koja smanjuje potrebno vrijeme obrade i poboljšava učinkovitost zbog programibilnog doziranja tekućine. Pokret ruke je kontroliran senzorom koji proračunava postavljanje glave dispensera točno iznad jažice pločice, a cjelokupni sustav se jednostavno programira za izvedbu automatiziranog procesa prilikom suradnje s TECAN-om. Resolvex A200 omogućuje automatiziranu primjenu vakuuma na pločice s uzorcima i brzo pipetiranje određenih otopina. Na A-200 su priključene staklene boce s otopinama (maksimalno 11 boca) koje se želi precizno i sigurno pipetirati u pločicu. [57]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Anorganski kemikalije

Tablica 1. Prikaz korištenih anorganskih kemikalija

Anorganske kemikalije	Proizvođač
Natrijev klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Dinatrijev hidrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Kalijev dihidrogenfosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Kalijev klorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Amonijev bikarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Sigma-Aldrich
Natrijev hidroksid (NaOH)	CARLO ERBA Reagents
MQ voda	/

3.1.2. Organske kemikalije

Tablica 2. Prikaz korištenih organskih kemikalija

Organske kemikalije	Proizvođač
Mravlja kiselina (CHOOH)	Merck
Apsolutni etanol (C ₂ H ₅ OH)	Sigma-Aldrich
Metanol (CH ₃ OH)	Sigma-Aldrich
2-propanol (C ₃ H ₇ OH)	Fluka
TRIS (hidroksimetil aminometan)	Sigma-Aldrich
SDS (natrij-dodecil sulfat)	Invitrogen Life Technologies
Igepal CA-630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol)	Sigma-Aldrich
Acetonitril (ACN)	PanReac AppliChem
2-pikolin boran (2PB)	Sigma-Aldich
APTS 30Mm u 3,6 M limunskoj kiselini	Sigma-Aldrich
DMSO (dimetilsulfoksid)	Sigma-Aldich
Limunska kiselina (C ₆ H ₈ O ₇)	Sigma-Aldrich
Trietilamin(C ₆ H ₁₅ N)	Sigma-Aldrich

3.1.3. Biološki materijali

Tablica 3. Prikaz korištenih bioloških materijala

Biološki materijali	Proizvođač
PNGaza F (peptid-N-glikozidaza)	Promega
Bio-Gel P-10	Bio-Rad Laboratories

3.1.4. Otopine i puferi

Tablica 4. Prikaz korištenih otopina i njihovih postupaka primjene

Otopine i puferi	Postupak pripreme										
1XPBS pH 7,4	Otopina se pripremi razrjeđivanjem primarne otopine 10XPBS devet puta koristeći menzuru i MQ vodu										
5XPBS	Otopina se pripremi razrjeđivanjem primarne otopine 10XPBS u omjeru 1:2 (v/v). Za pripremu 1L ove otopine potrebno je 500 mL 10XPBS razrijediti ultračistom vodom do 1 L te čuvati na 4°C.										
10XPBS pH 6,6	Za pripremu otopine 10XPBS potrebno je odvagati određene vrijednosti NaCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ i KCl tako da njihova koncentraciju u sustavu odgovara sljedećoj tablici: <table border="1"><thead><tr><th>Sol</th><th>Koncentracija [mmol/L]</th></tr></thead><tbody><tr><td>NaCl</td><td>137,94</td></tr><tr><td>Na₂HPO₄</td><td>9,74</td></tr><tr><td>KH₂PO₄</td><td>2,18</td></tr><tr><td>KCl</td><td>2,65</td></tr></tbody></table>	Sol	Koncentracija [mmol/L]	NaCl	137,94	Na ₂ HPO ₄	9,74	KH ₂ PO ₄	2,18	KCl	2,65
Sol	Koncentracija [mmol/L]										
NaCl	137,94										
Na ₂ HPO ₄	9,74										
KH ₂ PO ₄	2,18										
KCl	2,65										

	Za pripremu 1L 10XPBS potrebno je određene odvage soli staviti u 800 mL ultračiste vode. Razrijedi se otopina do 1L te se sustav se miješa i mjeri se pH vrijednost koja se s 1M NaOH podešava na 6,6.						
0,5% SDS	Za pripremu 0,1 L ove otopine potrebno je otopiti 0,5 g SDS u 100 mL ultračiste vode te čuvati na 4°C.						
0,1 M NaOH	Za pripremu 500 mL otopine potrebno je otopiti 2 g NaOH u 500 mL ultračiste Vode nakon čega se ta otopina filtrira i čuva na sobnoj temperaturi.						
20% etanol u 20mM TRIS + 0,1 M NaCl pH=7,4	<p>Za pripremu ove otopine potrebno je odvagati određene vrijednosti TRIS i NaCl tako da njihova koncentraciju u sustavu odgovara sljedećoj tablici:</p> <table border="1" data-bbox="810 1077 1390 1411"> <thead> <tr> <th>Sol</th> <th>Koncentracija [mmol/L]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td> <td>0,1</td> </tr> <tr> <td>TRIS (Mr = 121, 14 g/mol)</td> <td>0,02</td> </tr> </tbody> </table> <p>Za pripremu 1L pufera potrebno je određene odvage soli otopiti u 200 mL etanola (bezvodnog). Razrijedi se otopina do 700mL ultračistom vodom te se sustav podesi s 1M HCl na pH vrijednost od 7,4. Otopina se nadopuni do 1L ultračistom vodom.</p>	Sol	Koncentracija [mmol/L]	NaCl	0,1	TRIS (Mr = 121, 14 g/mol)	0,02
Sol	Koncentracija [mmol/L]						
NaCl	0,1						
TRIS (Mr = 121, 14 g/mol)	0,02						
80% acetonitril + 100 mM TEA	Za pripremu 500 mL otopine potrebno je u 400 mL acetonitrila dodati 6,925 mL						

	100 mM trietanolamina (TEA), 1,2 mL ocetene kiseline te nadopuniti do 500 mL ultračistom vodom. Čuvati na 4°C.
0,1 M mravlja kiselina, pH=2,5	Za pripremu 1 L ovog pufera potrebno je dodati 3,77 mL mravlje kiseline u 1 L ultračiste vode nakon čega se otopina čuva na 4°C.
1 M amonijev bikarbonat	Za pripremu 100 mL ove otopine potrebno je 79,06 g amonijevog bikarbonata otopiti u 100 mL ultra-čiste vode te čuvati na 4°C.
30% (v/v) propan-2-ol	Za pripremu 500 mL ove otopine potrebno je dodati 350 mL ultračiste vode u 150 mL propan-2-ola te otopinu filtrirati. Čuvati na 4°C.
4% Igepal	Za pripremu 500 mL ove otopine potrebno je u 48 mL ultračiste vode dodati 2 mL Igepala te čuvati na 4°C.
70% etanol	Za pripremu 50 mL otopine potrebno je u 35 mL bezvodnog etanola dodati 15 mL ultračiste vode.
Otopina za označavanje (labeling) N-glikana	Za obilježavanje jedne pune pločice uzoraka potrebno je pomiješati 230µL APTS otopine s 230µL PB

3.1.5. Laboratorijska oprema i pribor

Tablica 5. Prikaz korištenog laboratorijskog pribora i opreme

Laboratorijska oprema i pribor	
Digestor	/
MiniSpin centrifuga	Eppendorf
Centrifuga 5804	Eppendorf
Vakumska pumpa	Thermo Scientific
Vakuumski manifold	Thermo Scientific
NanoDrop 8000 Spektrofotometar	Thermo Scientific
GFL 3023 vibracijski shaker	GFL
Jednokanalne pipete 2-20 um	Rainin (Mettler Toledo)
Jednokanalne pipete 20-200 um	Rainin (Mettler Toledo)
Jednokanalne pipete 200-1000 um	Rainin (Mettler Toledo)
Multikanalne pipete 2-20 um	Rainin (Mettler Toledo)
Multikanalne pipete 20-200 um	Rainin (Mettler Toledo)
Multikanalne pipete 200-1000 um	Rainin (Mettler Toledo)
6mm DBS bušać	/
Mini Protein G pločica (pločica monolita s proteinom G)	BIA Separations (dio Sartoriusa, SAD),
2 mL kolekcijska pločica	Waters
1 mL kolekcijska pločica	Waters
Armadillo PCR pločica	Thermo Scientific
Termalna folija za brtvljenje	Porvair
1 mL AcroPrep wwPTFE 0,45 um filter pločica	Pall Corporation
Nastavci za pipete 20ul	Rainin (Eppendorf)
Nastavci za pipete 100ul	Rainin (Eppendorf)
Nastavci za pipete 200 ul	Rainin (Eppendorf)
Nastavci za pipete 500ul	Rainin (Eppendorf)
Nastavci za pipete 1000ul	Rainin (Eppendorf)
Kimwipes	Kimtech

Inkubator DNI 50	MRC
PCR stripovi 0,2 mL	Thermo Scientific
Magnetsko miješalo MR 3023	GLF
350µL AcroPrep wwPTFE 0,2 um filter pločica	Pall Corporation
Filteri za pufere (Nalgene™ Rapid-Flow™, 0,2 µm)	Thermo Scientific
Analitička vaga (Explorer®)	OHAUS

3.2. Ispitanici i uzorkovanje

U svrhu istraživanja usporedbe preciznosti robotizirane i manualne metode analize glikozilacije proteina, uzeti su uzorci krvi zdravih osoba u dobi od 23 do 53 godine. Svaka osoba je dala informirani pristanak te je uzorkovanje obavljeno poštivanjem načela privatnosti. Uzorci krvi su uzeti pomoću lancete iz prsta ili direktno iglom iz vene. U oba slučaja su kapljice krvi prebačene na Guthrijeve kartice za pohranjivanje suhih kapi krvi (eng. dried blood spot, DBS) koje su skladištene na -20°C do trenutka analize. Opisanim postupcima u poglavljima koji slijede je izvršena izolacija IgG-a na dva načina, manualno i robotizirano.

3.3. Protokol pripreme uzorka

Postupak analize glikozilacije proteina se sastoji od tri koraka: izolacije imunoglobulina G iz uzorka krvi uz pločicu monolita s proteinom G; deglikozilacije glikana od proteina IgG-a i obilježavanja deglikoziliranih glikana fluorescentnom bojom; te njihovog pročišćavanja. Nakon toga, pročišćeni uzorci se karakteriziraju xCGE-LIF-om pri čemu se kao rezultat dobije elektroferogram.

Prije samog početka izolacije izrađuje se raspored uzoraka po pločici (eng. *plate layout*) koji prikazuje kako su uzorci, standardi i slijepe probe raspoređeni u pločici s 96 jažica. Izgled „*plate layout-a*“ s triplikatima uzoraka i tetraplikatima standarda prikazan je u *tablici 6*.

Tablica 6. Prikaz reprezentativnog plate layout-a

Stupac	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRT_3	stand_ 5_4	JŠ_2	FŠ_3	BR_3	IW_1	DH_3	JŠ_3	SB_1	JŠ_1	PR_1	AC_2
B	TP_2	IP_3	IW_2	AMP_ 1	NNB_ 1	DP_3	stand_ 5_2	VJ_1	MH_2	stand_ 6_4	stand_ 6_1	BR_1
C	BP_2	DP_2	MF_2	NM_1	SS_3	HD_1	stand_ 6_2	DL_2	FK_2	BRT_1	stand_ 4_3	AMP_ 2
D	VJ_2	DH_3	HD_1	TK_2	MV_3	FŠ_1	NM_3	IP_1	PR_2	TP_3	BP_1	VJ_3
E	DH_2	IW_3	MV_1	GL_3	NM_2	PT_1	FK_3	PR_3	TK_1	stand_ 6_3	IDO_3	MH_1
F	stand_ 5_3	DP_1	stand_ 4_1	DL_1	AC_3	HD_2	stand_ 4_2	BRT_2	NNB_ 2	GL_1	BP_3	NNB_ 3
G	TP_1	SS_2	IDO_2	MH_3	SS_1	PT_2	AC_1	TK_3	PT_3	FK_1	stand_ 4_4	MF_1
H	BR_2	SB_3	MV_2	IDO_1	DL_3	FŠ_2	SB_2	GL_2	Blank	stand_ 5_1	AMP_ 3	IP_2

3.3.1. Izolacija imunoglobulina G uz pločicu monolita s proteinom G

3.3.1.1. Priprava uzorka

Smrznuti uzorci se izvade iz hladnjaka (-20°C) na sobnu temperaturu. Koristeći bušač, u svaku jažicu čiste kolekcijske pločice od 2 mL se izbuši odgovarajući uzorak ili standard prema izrađenom *plate layout-u*. Na područja slijepih proba se izbuši DBS papir za uzorkovanje bez uzorka krvi. U 82 jažice u kojima se nalaze probušeni DBS papiri se stavi 800 µL vezujućeg pufera 1XPBS. Takav sustav se stavi na miješalo 3 sata. Nakon toga se u preostala prazna mjesta stavi 25 µL odgovarajućih plazma standarda na za to predviđena mjesta u pločici. Standardi se razrjeđuju s puferom 1XPBS nakon čega slijedi resuspendiranje svih uzoraka koji se zatim prebacuju u wwPTFE filter pločicu od 1 mL i promjera pora 0,45 µm. U filter pločici se uzorci miješaju na miješalu tri sata prije nego se započne s filtracijom. Koristeći vakuumski uređaj za filtriranje uzoraka, uzorci, standardi i negativne probe se filtriraju u čistu kolekcijsku pločicu od 2 mL pri čemu dolazi do odvajanja kapljevito uzorka od papira DBS-a.

3.3.1.2. Prekondicioniranje pločice monolita s proteinom G (protein G pločice)

Protein G pločica se stavi na vakuumski uređaj za filtriranje uzoraka kako bi se uklonilo pufer za skladištenje (eng. *storage buffer*). Zatim se dodaje redom ultračista voda, 1XPBS (0,25M NaCl), 0,1M mravlja kiselina, 10XPBS te ponovno 1XPBS (0,25 M NaCl) u svaku jažicu protein G pločice. Nakon svakog dodavanja se pomoću vakuumskog uređaja za filtriranje uklanja odgovarajuća otopina iz protein G pločice.

3.3.1.3. Vezanje IgG-a iz krvi i ispiranje

Filtrirani uzorci u kolekcijskoj pločici od 2 mL se prebace u prekondicioniranu protein G pločicu nakon čega se pomoću vakuumskog uređaja za filtriranje propuštaju. Slijedi postupak ispiranja pri čemu se pipetira 1XPBS(0,25 M NaCl) u svaku jažicu protein G pločice i propusti primjenom vakuuma. Taj postupak se ponovi još dva puta.

3.3.1.4. Elucija IgG-a

Neutralizacijski pufer, 1 M amonijev bikarbonat, se dodaje u novu, čistu, kolekcijsku pločicu od 1 mL koja se stavlja ispod protein G pločice u vakuumski uređaj za filtriranje. U gornju filter pločicu dodaje se 0,1 M mravlja kiselina koja se propušta u kolekcijsku pločicu od 1 mL. Takva pločica se prekrije folijom i stavi se na miješalo sve dok se ne završi postupak regeneracije protein G pločice (5) i započne postupak mjerenja koncentracije.

3.3.1.5. Regeneracija i skladištenje protein G pločice

Regeneracija protein G pločice se provodi tako da se dodaju redom 10XPBS, 1XPBS (0,25 M NaCl) i 20% (v/v) EtOH u 20mM TRIS + 0,1 M NaCl pri čemu se nakon svakog dodavanja isti propuste primjenom vakuumskog uređaja za filtriranje. Protein G pločica se skladišti tako da se do vrha svake jažice ulije otopina za skladištenje i skladišti se na 4 °C.

3.3.1.6. Mjerenje koncentracije IgG-a

Mjerenje koncentracije prethodno miješanih uzoraka se provodi pomoću NanoDrop 8000 spektrofotometra. U prostor predviđen za uzorak se prenese kapljica (3 μ L) svakog uzorka iz čega uređaj proračunava koncentracije te ih izlistava na sučelje programa spektrofotometra. Spektrofotometar očitava spektar valnih duljina područja od 260 do 280 nm.

3.3.1.7. Sušenje izoliranog IgG-a za postupak deglikozilacije

Alikvotira se 20 μ L svakog plazma standarda i 40 μ L svakog uzorka u čistu PCR pločicu tako da uzorci budu dosljedni *plate layout-u*. Pomoću vakuumske sušionike pločica se suši 1 sat nakon čega se skladišti na -20°C do trenutka deglikozilacije. Ostatak izoliranog uzorka u 1 mL pločici se skladišti na -20°C dok se ne ukaže potreba za njegovo ponovno korištenje.

3.3.2. Deglikozilacija i označavanje glikana

3.3.2.1. Priprema uzorka

PCR pločica s osušenim IgG eluatima te otopine 0,5% SDS-a, 4% Igepala, 1,66XPBS i 5XPBS se izvade na sobnu temperaturu.

3.3.2.2. Denaturacija

U svaki uzorak se dodaje 3 μ L 1,66XPBS i 4 μ L 0.5% SDS-a. Pločica se zatvori adhezivnom folijom i inkubira se 10 minuta na 65 °C. U procesu automatskog rada inkubira se na 60°C 10 minuta. Nakon toga dodaje se 2 μ L Igepala i resuspendira uzorak. Pločica se stavi na miješalo dok se ne pripremi smjesa enzima.

3.3.2.2. Deglikozilacija

Smjesa enzima se pripremi miješanjem 5XPBS i PNGaze F. U svaki uzorak se dodaje 1 μ L takve smjese (kod robota se dodaje 5 μ L smjese vode, pufera i enzima) te se pločica zatvori termalnom folijom i inkubira 3 sata na 37 °C kako bi došlo do oslobađanja *N*-glikana. Nakon inkubacije, pločica se suši 1 sat u rotacijskom vakuumskom koncentratoru. U osušeni uzorak se dodaje 2 μ L ultra čiste vode te pločica se miješa na miješalu dok se ne pripremi otopina za označavanje uzoraka .

3.3.2.3. Označavanje uzorka APTS-om

Obilježavanje deglikoziliranih glikana se provodi s APTS fluorescentnom bojom. Smjesa za obilježavanje glikana se priredi dodavanjem jednakog volumena APTS-a u pikolinboran (PB). U svaku jažicu se doda 4 μ L takve smjese te se pločica zatvori termalnom folijom i stavi na inkubaciju 16 sati na 37°C kako bi se slobodni glikani obojali.

3.3.3. Postupak pročišćavanja glikana

3.3.3.1. Zaustavljanje reakcije obilježavanja glikana APTS-om

Reakcija označavanja se zaustavlja dodavanjem hladnog 80%-tnog ACN-a u svaku jažicu PCR pločice uz naknadno resuspendiranje. Pločica se pokrije aluminijskom folijom i stavi na miješalo dok se ne pripremi filter pločica s BioGel P-10 gelom.

3.3.3.2. Priprema i kondicioniranje Bio-Gel P-10 gela

BioGel P-10 gel se stavi u čistu filter pločicu koja se u vakuumskom uređaju za filtriranje postavi na kadicu za prikupljanje otpada. Voda iz BioGel-a se propusti pomoću vakuuma dok ne ostane u svakoj jažici suhi BioGel koji se zatim ispiru ultračistom vodom i 80%-tnim ACN-om.

3.3.3.3. Primjena i čišćenje APTS-om obilježenih N-glikana

Cijeli volumen uzorka (uzorak + hladni ACN) se prebaci u filter pločicu s prethodno nanesenim BioGel-om. Sustav se miješa i podvrgne se vakuumu pri čemu se kapljevinu propušta kroz filter. Slijedi postupak pročišćavanja glikana vezanih na BioGel pri čemu se oni čiste s 80% ACN/100mM TEA pet puta (kako bi se neutralizirao suvišak boje) i tri puta s 80% ACN (koji neutralizira TEA i reducira udio soli). Nakon toga, filter plate se stavi na čistu okruglu kolekcijsku pločicu od 0,8 mL te započinje postupak elucije obilježenih glikana.

3.3.3.4. Elucija APTS-om obilježenih N-glikana

U filter pločicu se dodaje 100 μ L ultračiste vode nakon čega se ona filtrira u čistu pločicu. Taj postupak se provede još dva puta s volumenom od 200 μ L pri čemu se u čistoj pločici skupe tri frakcije glikana. Pločica se stavi na miješanje dok nije spremna za analizu na CGE.

3.3.4. Priprema izoliranih uzoraka IgG-a za xCGE-LIF

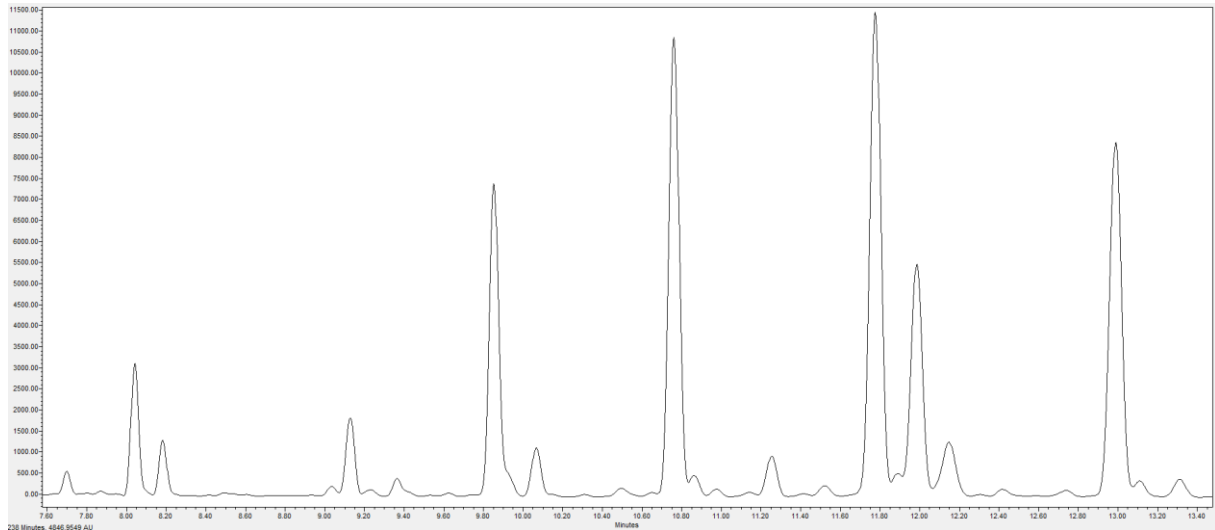
Razdvajanje APTS-om obilježenih *N*-glikana se provodi na multipleksnoj kapilarnoj gel elektroforezi. Njihova detekcija se vrši pomoću lasera koji potiče fluorescenciju kako i njezino puno ime govori (xCGE-LIF). Za analiziranje uzoraka potrebno ih je pripremiti za uređaj xCGE-LIF. Priprema započinje dodavanjem 7 μ l HiDi formamida u svaku jažicu čiste MicroAmp Optical 96-Well pločice. Nakon toga uzorci se prebacuju u tu pločicu poštujući pravila *plate layout*-a pri čemu se ručno resuspendiraju. U prethodno zagrijan uređaj se na željenu poziciju (A ili B) stavlja pločica prethodno pokrivena septom i centrifugirana.

3.4 Analiza uzoraka xCGE-LIF-om

Puno ime uređaja koji se koristi za kapilarnu gel elektroforezu je 3500 Series Genetic Analyzer za humanu identifikaciju. On posjeduje 8 kanala kapilarnog sistema ispunjenih polimerom, pumpe koja potiskuje polimer (POP-4TM, POP-6TM, POP-7TM), anodni i katodni

pufere s njihovim nosačima, pećnicu i laser koji eksitira pri 505nm. Protokol korišten u radu je IPV4, napon od 15 kV, temperatura pećnice 60°C uz vrijeme injektiranja 4 sekundi.

Koristeći Python paket Pyabif (*prilog 5.*) dostupan na GitHub-u konvertirali smo rezultate elektroforeze u oblik pogodan za prikaz u programu Empower. Kao rezultat analize dobiven je elektroferogram prikazan u programu Empower na *slici 19.*



Slika 19. Prikaz reprezentativnog elektroferograma nakon analize na xCGE-LIF

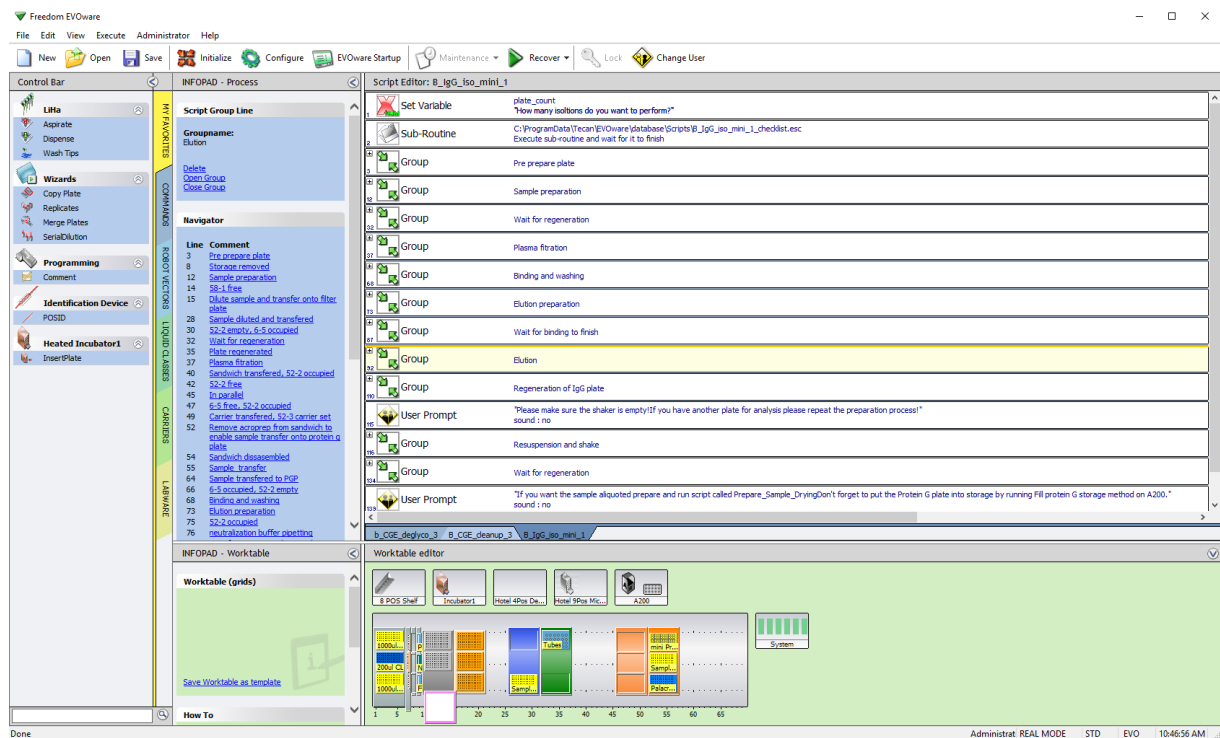
Koristeći program naziva Empower, moguće je provesti integraciju dobivenog elektroferograma pri čemu se kao rezultat dobije relativna postotna površina svakog glikanskog vrha. Svaki integrirani elektroferogramski vrh predstavlja određenu glikansku strukturu, a njegova količina u samom vrhu je prikazana upravo vrijednošću relativne postotne ukupne površine svih vrhova u sustavu. Za statističku analizu rezultata korišten je Microsoft Excel i Python (s bibliotekom paketa), koji su ujedno i omogućili prikazivanje rezultata u grafičkom obliku.

4. REZULTATI

Cilj ovog rada bio je usporediti preciznost robotizirane (automatske) i manualne metode analize glikozilacije proteina. Manualna metoda analize glikozilacije je već korištena, robusna i precizna metoda na osnovu koje je moguće utvrditi preciznost automatizirane metode analize glikozilacije proteina. Robot na kojem je vršena robotizirana metoda je TECAN, koji pripada grupi robota kartezijskog sustava što znači da je za njegovo funkcioniranje potrebno definirati određene vektore, parametre i veličine.

TECAN i Resolvex A200 koriste svoje vlastite programe za vođenje i upravljanje procesa. Programi omogućuju izradu skripte u kojoj se nalaze naredbene akcije koje roboti prate i izvršavaju. U skripti je potrebno definirati vektore po kojima se TECAN kreće, volumene otopina koje se pipetiraju, mjesta na radnom stolu gdje se želi obaviti određena radnja i drugo. Izgledi skripta i konfiguracija u programima za TECAN i A200 su prikazani na *slici 20*. Potpuni prikaz skripta za TECAN nalazi se u *prilogu 1*.

a)



b)

Freedom EVOware

File Edit View Execute Administrator Help

Control Bar: New, Open, Save, Initialize, Configure, EVOware Startup, Maintenance, Recover, Lock, Change User

Script Editor: B_IgG_iso_min1.1

Script Group Line: Elution

Groupname: Elution

Navigator:

Line	Comment
3	Pre prepare plate
8	Storage removed
12	Sample preparation
14	S&2 free
15	Dilute sample and transfer onto filter plate
28	Sample diluted and transferred
30	S&2 empty, S&3 occupied
32	Wait for regeneration
35	Plate regeneration
37	Plasma filtration
40	Sandwich transferred, S&2 occupied
42	S&2 free
45	In parallel
47	S&3 free, S&2 occupied
49	Carrier transferred, S&3 carrier set
52	Remove scrap from sandwich to enable sample transfer onto protein plate
54	Sandwich disassembled
55	Sample transfer
64	Sample transferred to ppg
66	S&3 occupied, S&2 empty
68	Binding and washing
73	Elution preparation
75	S&2 occupied
76	neutralization buffer pipetting

Worktable editor:

Worktable (grids):

How To: Define your process select on the Control Bar and move them into your process by connecting them.

Administrat REAL MODE STD EVO 10:46:56 AM

c)

Freedom EVOware

File Edit View Execute Administrator Help

Control Bar: New, Open, Save, Initialize, Configure, EVOware Startup, Maintenance, Recover, Lock, Change User

Script Editor: B_CGE_cleanup_3

Script Group Line: Step 0: Checklist

Groupname: Step 0: Checklist

Navigator:

Line	Comment
1	Step 0: Checklist
15	Step 0: Precondition plate
23	Step 1: Cleanup
39	Step 2: Elution

Worktable editor:

Worktable (grids):

How To: Define your worktable by dragging carriers from the labware tab off the control bar to the on the worktable. To place labware on a carrier drag the labware to the carrier. Show me

Carrier and labware can be deleted from the worktable by dragging them off the worktable area.

The worktable can be saved as a template by right-clicking on it.

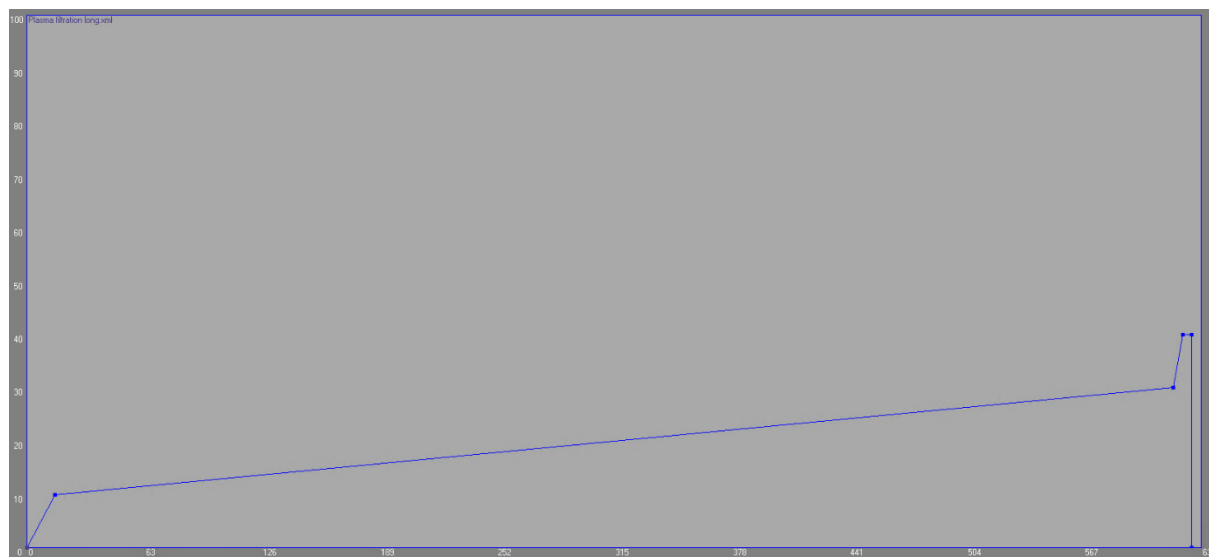
Administrat REAL MODE STD EVO 10:45:57 AM

d)

The screenshot shows the TECAN software interface. On the left, a list of methods is displayed, including 'IgG_isolation_04_FA_Elution', '1_ProtG_Conditioning', 'IgG_isolation_05_ProtG_Regeneration', '2_Flush_before>Loading', '3_IgG_Binding_&_Washing', '4_FA_Elution', '5.1_ProtG_Regeneration_&_Cond', '5_ProtG_Regeneration', 'IgG_isolation_03_binding_and_washing', 'IgG_isolation_05_ProtG_Regeneration_&_C', '2 ml dispense & flush', 'Camera 0.1mL H2O', 'A200 test method', 'Flash Protein G plate', 'Fill protein G plate 1xPBS', and 'CGE_cleanup_02_acn_tea'. On the right, a table shows the sequence of operations for the 'IgG_isolation_03_binding_and_washing_2_mini' method.

#	Operation	Solvent	Parameter 1	Parameter 2	Par...
1	Flash		mini_proteinG_profile_long		Yes
2	Pause				
3	Dispense Reagent	1x PBS (0.25M NaCl)	250 uL		
4	Flash		mini_proteinG_profile		Yes
5	Dispense Reagent	1x PBS (0.25M NaCl)	250 uL		
6	Flash		mini_proteinG_profile		Yes
7	Dispense Reagent	1x PBS (0.25M NaCl)	250 uL		
8	Flash		mini_proteinG_profile		Yes
9	Dispense Reagent	1x PBS (0.25M NaCl)	250 uL		
10	Flash		mini_proteinG_profile		Yes
11	Pause				
12	Dispense Reagent	1x PBS (0.25M NaCl)	250 uL		
13	Flash		mini_proteinG_profile		Yes

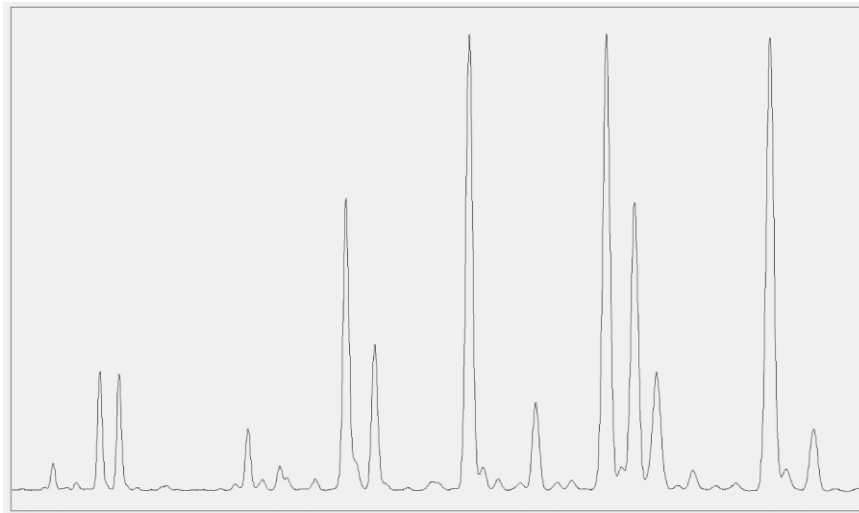
e)



Slika 20. Prikaz skripti u programu TECAN-a za: a) proces izolacije; b) proces deglikozilacije; c) proces pročišćavanja glikana; d) Prikaz skripte za Resolvex A200; e) filtracijski profil za Resolvex A200

Provođenje postupka pripreme i analize glikana rezultira u dobivanju elektroferograma za svaki uzorak i standard koji se sastoje od 30 glikanskih vrhova.

Integriranjem dobivenih grafičkih rezultata dobivene su vrijednosti koje predstavljaju relativni postotak površine koji određeni glikanski vrh predstavlja. Budući da svaki glikanski vrh predstavlja određenu strukturu glikana, relativni postotak površine je proporcionalan količini tog glikana u vrhu.



Slika 21. Prikaz primjera dobivenog elektroferograma u radu

Rezultati prosječne relativne postotne površine za svaki od 80 uzoraka dobiveni manualno i automatski su prikazani u *tablici 7.*

Tablica 7. Rezultati prosječne relativne postotne površine za 80 uzoraka dobivenih manualno i automatski

GP	Prosječna relativna postotna površina (manualno)	Prosječna relativna postotna površina (robotizirano)
GP1	0,62609	0,674166027
GP2	0,25384	0,279399
GP3	3,60896	3,916958
GP4	1,55351	1,740056
GP5	0,16696	0,184930
GP6	0,05117	0,057864
GP7	0,30632	0,304609
GP8	2,49373	2,556122
GP9	0,29098	0,303900
GP10	0,76128	0,810002
GP11	0,24457	0,270817
GP12	11,54761	11,889327
GP13	1,80657	1,922775
GP14	0,54463	0,438177
GP15	19,48553	18,543694
GP16	0,32766	0,320268
GP17	0,23165	0,227724
GP18	1,70003	1,699635
GP19	0,16029	0,164138
GP20	0,60281	0,501587
GP21	20,63057	20,453028
GP22	10,87776	10,811752
GP23	3,09512	3,186849
GP24	0,40513	0,417394
GP25	0,06848	0,076868
GP26	16,70782	16,811467
GP27	0,81605	0,849671

Tablica 8. Rezultati standardne devijacije relativne postotne površine za 80 uzoraka dobivenih manualno i automatski

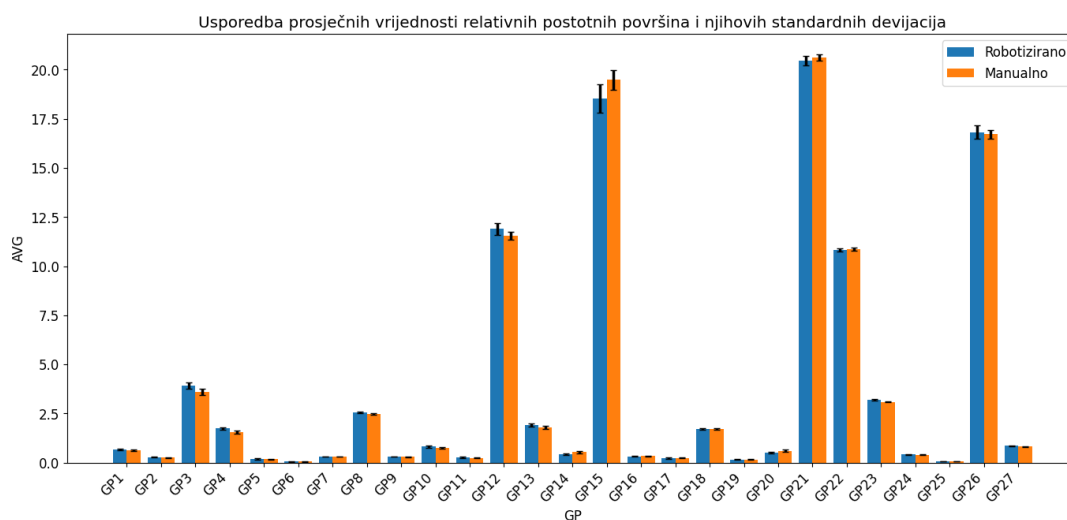
GP	Standardna devijacija (manualno)	Standardna devijacija (robotizirano)
GP1	0,03440	0,040430
GP2	0,02495	0,029753
GP3	0,16305	0,159472
GP4	0,07912	0,070949
GP5	0,01360	0,027287
GP6	0,00885	0,018677
GP7	0,00997	0,012430
GP8	0,04044	0,045987
GP9	0,01454	0,016167
GP10	0,03774	0,045995
GP11	0,02966	0,034287
GP12	0,18836	0,294233
GP13	0,08308	0,084974
GP14	0,06184	0,034038
GP15	0,49675	0,720537
GP16	0,01350	0,015171
GP17	0,01561	0,026191
GP18	0,03303	0,040940
GP19	0,00869	0,008115
GP20	0,06687	0,037009
GP21	0,16013	0,230090
GP22	0,07806	0,077230
GP23	0,03732	0,045162
GP24	0,01302	0,014797
GP25	0,00776	0,008518
GP26	0,23112	0,341851
GP27	0,03011	0,032411

Tablica 9. Rezultati vrijednosti CV (koeficijenta varijacije) relativne postotne površine za 80 uzoraka dobivenih manualno i automatski

GP	CV (manualno)	CV (robotizirano)
GP1	5,49416	5,997100
GP2	9,82965	10,648763
GP3	4,51798	4,071310
GP4	5,09318	4,077371
GP5	8,14668	14,755333
GP6	17,29572	32,277411
GP7	3,25391	4,080671
GP8	1,62185	1,799110
GP9	4,99771	5,319845
GP10	4,95735	5,678441
GP11	12,12922	12,660418
GP12	1,63119	2,474764
GP13	4,59873	4,419367
GP14	11,35486	7,768012
GP15	2,54935	3,885619
GP16	4,12097	4,736885
GP17	6,73745	11,501271
GP18	1,94306	2,408752
GP19	5,42214	4,943727
GP20	11,09329	7,378454
GP21	0,77619	1,124968
GP22	0,71766	0,714316
GP23	1,20586	1,417134
GP24	3,21379	3,545065
GP25	11,33356	11,081920
GP26	1,38329	2,033439
GP27	3,68940	3,814529

Koristeći Excel i Python s odgovarajućim bibliotekama za vizualizaciju (Pandas, Seaborn i Matplotlib) izvršena je statistička obrada i grafički prikaz rezultata dobivenih provođenjem analize glikozilacije proteina robotizirano i automatski.

Graf koji objedinjuje prosječne relativne postotne površine za svaki glikanski vrh i standardne devijacije prikazan je na slici 22.



Slika 22. Prikaz prosječnih relativnih postotnih površina za narančasto (plavo) i robotizirano (plavo) vođenje procesa te standardnih devijacija za iste (crno)

5. RASPRAVA

5.1. Robotizirana metoda

U fokusu ovog rada je bilo učenje robota da pouzdano izvede manualno postojeću metodu analize glikozilacije proteina. Proces učenja je ostvaren iz šestog pokušaja pri čemu je svaki prethodni pokušaj značajno pomogao pri ostvarenju konačne i pouzdane metode robotizirane (automatske) analize glikozilacije proteina.

Zbog praktičnih razloga, protokol se morao u nekim koracima promijeniti jer robot nije mogao u potpunosti izvršiti neke radnje koje su predviđene za manualnu izvedbu. Razlika u protokolu robotizirane metode u odnosu na manualnu prikaza je u *tablici 10*.

Tablica 10. Razlika u izvođenju manualne i automatizirane metode glikozilacije proteina

Manualni korak u protokolu koji je zamijenjen, modificiran ili implementiran u robotiziranu metodu	Modificirani korak na robotu
Stavljanje uzoraka na DBS-u u pločicu, dodavanje plazma standarda u pločicu, dodavanje 1xPBS i filtriranje u koraku izolacije	Zbog praktičnih razloga ovaj korak se nije mogao izvršiti automatski te je izvršen manualno
U procesu prekondicioniranja protein G pločice, ona se ispiru s 0,25 mL 0.1 M mravlje kiseline.	Radi mogućnosti ponovnog korištenja skripte, robot pere protein G pločicu su dva navrata s 0,25 mL mravlje kiseline
Radi bolje homogenizacije sustava važno je provesti resuspendiranja pipetom	Budući da robot nema mogućnost resuspendiranja (moguće ga je uvesti u skriptu, ali uvijek ostane u nastavku za pipetiranje uzorka) ono je zamijenjeno miješanjem na miješalu
U postupku npr. prekondicioniranja kada ne radimo s uzorcima, nije nužno mijenjati nastavke za pipete	Robot nakon svakog pipetiranja mijenja nastavke za pipete jer tako uvelike smanjuje pogrešku prilikom pipetiranja
Mjerenje koncentracije na NanoDrop spektrofotometru	Ovaj postupak se provodi manualno jer robot u sebi nema implementiran spektrofotometar

U procesu deglikozilacije, pločica se brtvi adhezivnom ili termalnom folijom	Ovaj postupak se provodi manualno jer u robotu nije implementiran uređaj za brtvljenje
U procesu deglikozilacije, prva inkubacija se odvija na 65°C u trajanju od 10 minuta	Inkubator robota postiže najveću temperaturu od 60 °C koja se provodi u trajanju od 10 minuta
Priprema smjese enzima se provodi miješanjem 1ul 5XPBS i 0,12 µL PNGaze F za svaki uzorak	Robotu pada preciznost kad radi s malim volumenima, stoga se provođenjem testova zaključilo da robot za jedan uzorak uzima smjesu enzima drugačijeg sastava: 3,2µL ultračiste vode, 1,8µL 5XPBS-a i 0,12µL PNGaze F
Dodavanje smjese za bojanje u suvišku	Robot pipetira manualno pripremljenu smjesu u većem volumenu zbog mrtvog volumena
Inkubacija na 37 °C u trajanju od 16 sati	Kako bi se robot mogao dalje koristiti, jednostavnije je pločicu inkubirati u vanjskom inkubatoru, nego 16 sati držati pločicu u upaljenom robotu
Zaustavljanje reakcije bojanja glikana APTS-om dodavanjem hladnog 80%-tnog ACN-a	Ovaj korak se provodi manualno
Nanošenje BioGel gela na filter pločicu i vakuumiranje radi uklanjanja vode	Ovaj korak se provodi manualno zbog nepraktičnosti dodavanja BioGel gela robotizirano, budući da unutar radne stanice robota nije implementirano magnetno miješalo
Priprema uzoraka za analizu koristeći xCGE-LIF	Priprema se radi manualno zbog toga što robotu opada preciznost prilikom rukovanja s malim volumenima

5.1.1. Prvi pokušaj

Prikupljeni su uzorci krvi 28 zdravih osoba u dobi od 24 do 52 godine. Uzorci krvi su prebačeni na DBS i skladišteni na -20°C do analize. Uzorci su bili raspoređeni po pločici u triplikatima pomoću bušača. Prikaz pločice (eng. *plate layout*) je prikazan u *tablici 11*.

Tablica 11. Prikaz plate layout-a za prvi pokušaj

Stupac	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRT_3	stand_5_4	JŠ_2	FŠ_3	BR_3	IW_1	DH_3	JŠ_3	SB_1	JŠ_1	PR_1	AC_2
B	TP_2	IP_3	IW_2	AMP_1	NNB_1	DP_3	stand_5_2	VJ_1	MH_2	stand_6_4	stand_6_1	BR_1
C	BP_2	DP_2	MF_2	NM_1	SS_3	HD_1	stand_6_2	DL_2	FK_2	BRT_1	stand_4_3	AMP_2
D	VJ_2	DH_3	HD_1	TK_2	MV_3	FŠ_1	NM_3	IP_1	PR_2	TP_3	BP_1	VJ_3
E	DH_2	IW_3	MV_1	GL_3	NM_2	PT_1	FK_3	PR_3	TK_1	stand_6_3	IDO_3	MH_1
F	stand_5_3	DP_1	stand_4_1	DL_1	AC_3	HD_2	stand_4_2	BRT_2	NNB_2	GL_1	BP_3	NNB_3
G	TP_1	SS_2	IDO_2	MH_3	SS_1	PT_2	AC_1	TK_3	PT_3	FK_1	stand_4_4	MF_1
H	BR_2	SB_3	MV_2	IDO_1	DL_3	FŠ_2	SB_2	GL_2	Blank	stand_5_1	AMP_3	IP_2

Prilikom provođenja procesa izolacije, TECAN nije bio sposoban otpipetirati kapljevit uzorak bez da pokupi kruti papirić DBS-a. Zbog toga su kruti DBS papiri pali u jažice drugog uzorka pri čemu je došlo do kontaminacije. Također, u nekoliko koraka u procesu deglikozilacije i čišćenja, vektori TECAN-a nisu bili dobro namješteni što je rezultiralo promašajima nastavaka za pipete u jažice pločica. Prvi pokušaj je služio čisto kao proces predučenja kako bi se u grubo pokušao automatizirati proces analize glikozilacije proteina. Iako je došlo do vidljivih pogrešaka prilikom procesa izolacije, koncentracije dobivene na Nanodropu nisu pokazale veliku grešku kao što se očekivalo. Koncentracije su prikazane u *tablici 12*.

Tablica 12. Prikaz koncentracija po plate layout-u za prvi pokušaj

Stupac	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1289	0,3422	0,07073	0,1477	0,005957	0,1635	0,1029	0,1703	0,0715	0,1607	0,218	0,08849
B	0,06314	0,2261	0,1261	0,06004	0,09114	0,1741	0,7082	0,1522	0,09742	0,5998	0,7119	0,0405
C	0,0535	0,1731	0,03846	0,171	0,172	0,08417	0,7317	0,1642	0,00183	0,2026	1,076	0,08663
D	0,1022	0,06076	0,129	0,1302	0,1739	0,1286	0,2007	0,1262	0,2106	0,1578	0,1018	0,07693
E	0,04993	0,1718	0,1873	0,1701	0,1778	0,2161	0,04569	0,1946	0,1084	0,6063	0,1699	0,05742
F	0,6725	0,273	0,6132	0,1519	0,06653	0,0882	0,5462	0,1944	0,2126	0,2001	0,111	0,2078
G	0,1856	0,1422	0,2594	0,09283	0,18	0,2	0,09454	0,09594	0,216	0,09972	1,045	0,09707
H	0,03939	0,08632	0,1789	0,2629	0,1358	0,1193	0,1034	0,162	-0,0120	0,6131	0,05513	0,1093

Iako se u samom početku izvođenja procesa glikozilacije pojavila pogreška, proces se pokušao provesti do kraja. Međutim, robot nije uključio u rad uputu za prekondicioniranje protein G pločice u postupku pročišćavanja što je uzrokovalo nemogućnost daljnjeg provođenja procesa.

5.1.2. Pokušaj dva

Izolirani uzorci iz prethodnog pokušaja su ponovno podvrgnuti procesu deglikozilacije i pročišćavanja iako se znalo da su oni kontaminirani. Rad s ovakvim uzorcima je poslužio za ispitivanje točnosti skripte koja je uvedena u program TECAN-a. Ovaj puta TECAN je uključio proces prekondicioniranja protein G pločice te se pokušaj uspješno proveo do kraja. Završni uzorci karakterizirani su pomoću xCGE-LIF-a, a kao rezultat dobiven je elektroferogram.

Za standarde su proračunate prosječne relativne postotne površine, standardna devijacija i CV vrijednost (koeficijent varijacije).

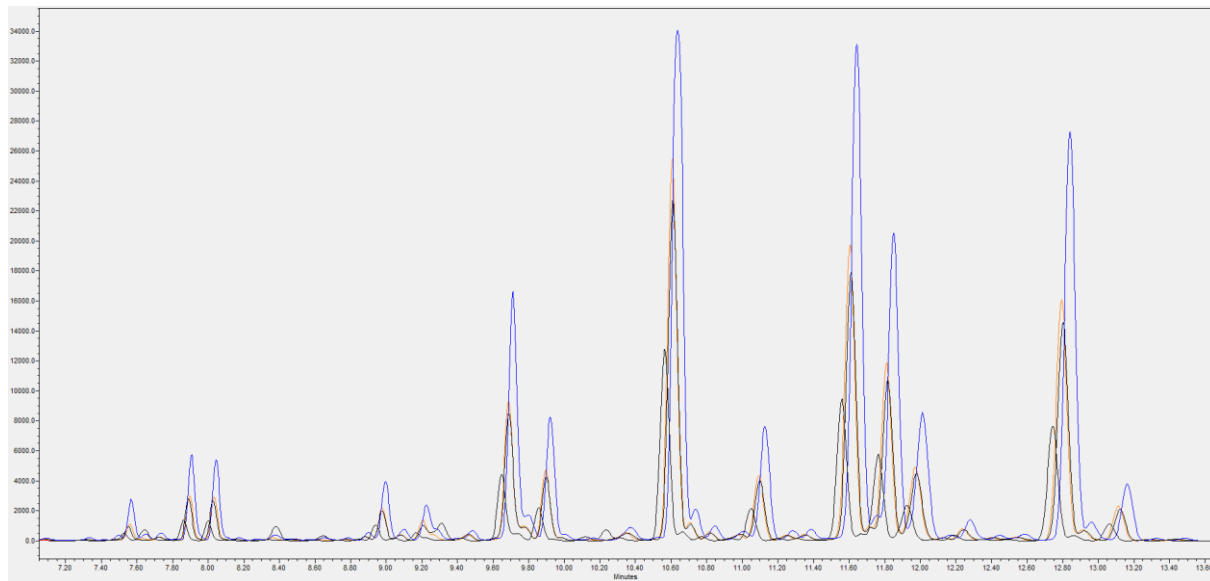
Tablica 13. Prikaz dobivenih statističkih vrijednosti za pokušaj dva

<i>Glikanski vrh(GA - glycan Peak)</i>	Prosječna relativna postotna površina	Standardna devijacija	CV
<i>GP1</i>	0,651143	0,209129	32,11722
<i>GP2</i>	0,282403	0,083158	29,44674
<i>GP3</i>	2,330565	0,69474	29,80993
<i>GP4</i>	2,111537	0,63937	30,27986
<i>GP5</i>	0,204039	0,038295	18,76831
<i>GP6</i>	0,036753	0,012115	32,96184
<i>GP7</i>	0,088354	0,019112	21,63094
<i>GP8</i>	0,228408	0,033349	14,60075
<i>GP9</i>	1,956612	0,268898	13,74305
<i>GP10</i>	0,309083	0,037275	12,05994
<i>GP11</i>	0,882433	0,172279	19,52313
<i>GP12</i>	0,332146	0,080386	24,202
<i>GP13</i>	9,370883	1,851996	19,7633
<i>GP14</i>	2,99522	1,139666	38,0495
<i>GP15</i>	0,159142	0,06233	39,16627
<i>GP16</i>	0,51893	0,115002	22,16145
<i>GP17</i>	18,04626	3,199645	17,73024
<i>GP18</i>	0,386309	0,0327	8,464669
<i>GP19</i>	0,316725	0,052354	16,52974
<i>GP20</i>	3,039043	0,709404	23,34302
<i>GP21</i>	0,305037	0,052134	17,09113
<i>GP22</i>	0,441989	0,066104	14,95592
<i>GP23</i>	18,69584	1,929167	10,3187
<i>GP24</i>	11,10317	0,350157	3,153665
<i>GP25</i>	5,043696	0,331866	6,579809
<i>GP26</i>	0,701218	0,102126	14,56409
<i>GP27</i>	0,164958	0,046406	28,13196

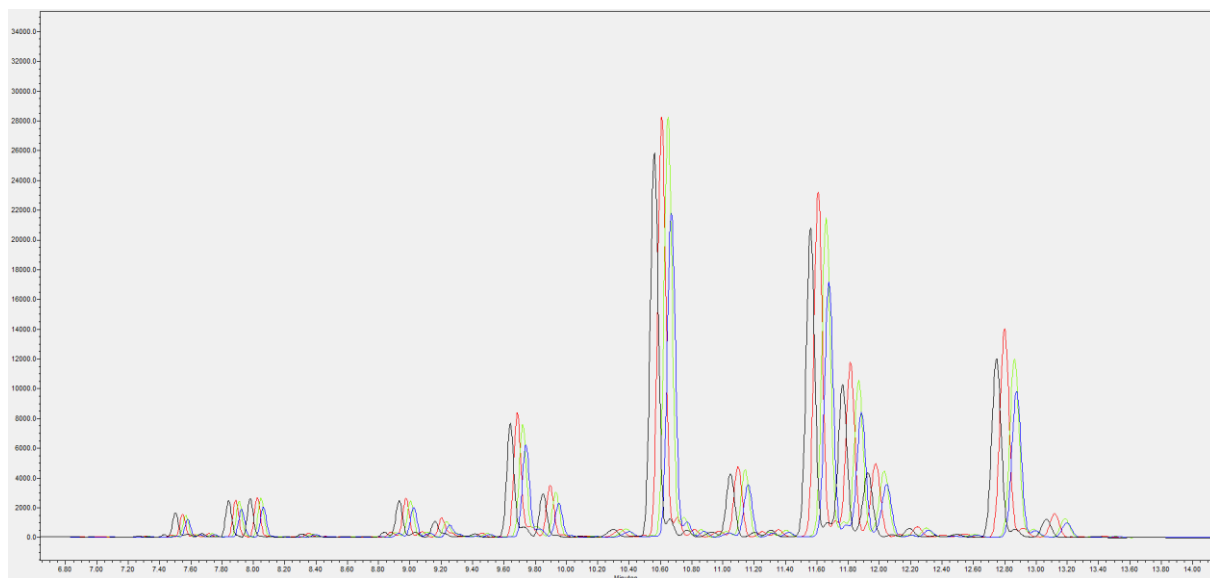
Dobivene CV vrijednosti su bile prevelike, primjerice za GP14, CV je iznosio 38% što nam jasno daje do znanja da je došlo do pogreške ili kontaminacije. Da bi metoda robotizirane

glikozilacije bila valjana, potrebne su CV vrijednosti u rasponu od 0 do 15 %. Na slici prikazani su elektroferogrami kontaminiranih plazma standarda.

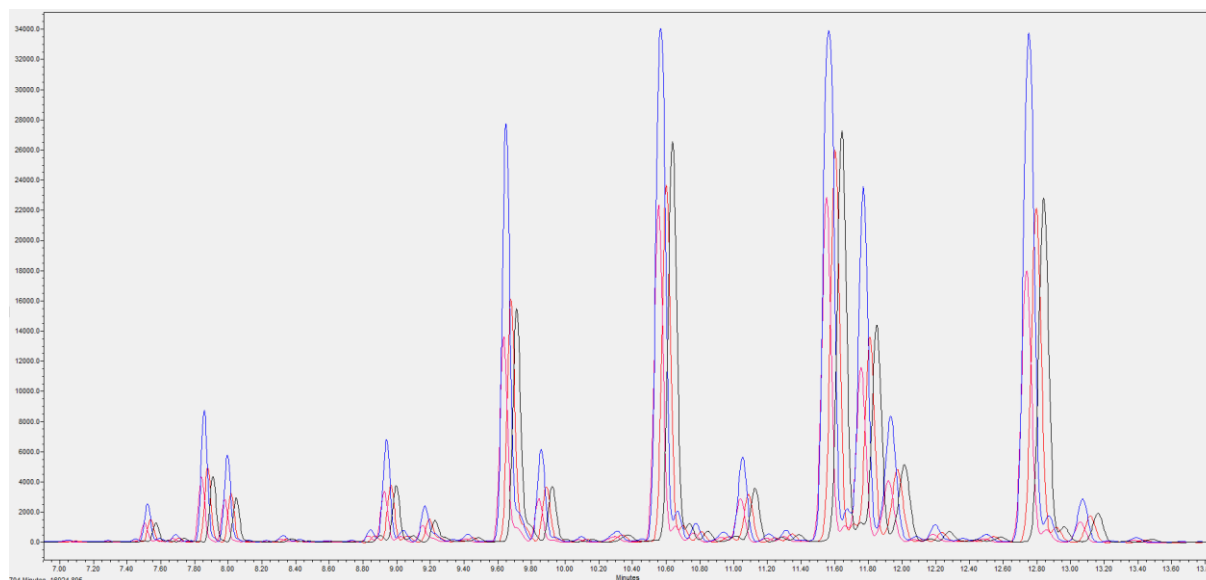
a)



b)



c)



Slika 23. Prikaz plazma standarda u pokušaju broj dva. a) plazma standard 6; b) plazma standard 5; c) plazma standard 4

Kvalitativnom analizom od strane stručnjaka xCGE-LIF elektroforeze, potvrdila se kontaminacija prilikom uzorkovanja zbog prisutnosti pomaka (eng. *shifting*) glikanskih vrhova.

5.1.3. Pokušaj tri

Problem kontaminacije iz prvog i drugog pokušaja se probao izbjeći zamjenom pločica. Umjesto kolekcijske pločice u kojima se nalazio DBS i 10XPBS u početku, novi uzorci su prebačeni u filter pločicu te se pomoću vakuumnog uređaja za filtriranje uzoraka pokušao odvojiti kapljeviti uzorak od krutog DBS-a. Zbog same složenosti uzorkovanja 28 različitih osoba, odlučeno je testove provoditi na uzorku jedne osobe kako bi se u prvi plan stavila analitička, a ne biološka varijacija. Za ovaj pokušaj korišteni su uzorci zdrave muške osobe od 26 godina. Izgled plate layouta prikazan je na tablici 14.

Tablica 14. Prikaz plate layout-a za pokušaj broj tri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	sample_ 40	sample_ 41	sample_ 25	blank_1	sample_ 10	sample_ 75	sample_ 46	sample_ 32	sample_ 47	sample_ 7	sample_ 79	sample_ 11
B	sample_ 13	sample_ 16	sample_ 74	stand_6 _2	blank_4	stand_4 _1	sample_ 62	sample_ 77	sample_ 28	sample_ 5	sample_ 55	sample_ 17
C	sample_ 53	sample_ 37	sample_ 39	sample_ 71	sample_ 22	sample_ 20	sample_ 51	sample_ 69	sample_ 26	sample_ 21	stand_4 _3	sample_ 78
D	blank_2	sample_ 80	stand_5 _4	sample_ 54	sample_ 31	sample_ 60	sample_ 58	sample_ 27	sample_ 64	stand_4 _2	stand_5 _3	sample_ 1
E	sample_ 4	stand_6 _4	sample_ 34	sample_ 48	sample_ 23	sample_ 43	sample_ 3	sample_ 65	sample_ 9	sample_ 56	stand_6 _3	sample_ 61
F	sample_ 36	sample_ 29	sample_ 35	sample_ 67	sample_ 12	sample_ 59	sample_ 6	sample_ 63	sample_ 14	sample_ 19	sample_ 66	sample_ 38
G	stand_5 _2	sample_ 45	sample_ 2	stand_5 _1	sample_ 44	sample_ 8	stand_6 _1	sample_ 24	stand_4 _4	sample_ 49	sample_ 72	sample_ 18
H	sample_ 68	sample_ 76	sample_ 52	sample_ 33	sample_ 15	sample_ 73	sample_ 30	sample_ 57	sample_ 50	sample_ 42	sample_ 70	blank_3

Ovaj pokušaj bio je neuspješan jer su papirići DBS-a zatvorili pore filter pločice što je dovelo do nastajanja podtlaka i efekta pjenjenja niz pločicu. Na taj način se ponovno nije uspjela izbjeći kontaminacija uzorka. Daljnje provođenje procesa je obustavljeno zbog očite i vidljive kontaminacije.

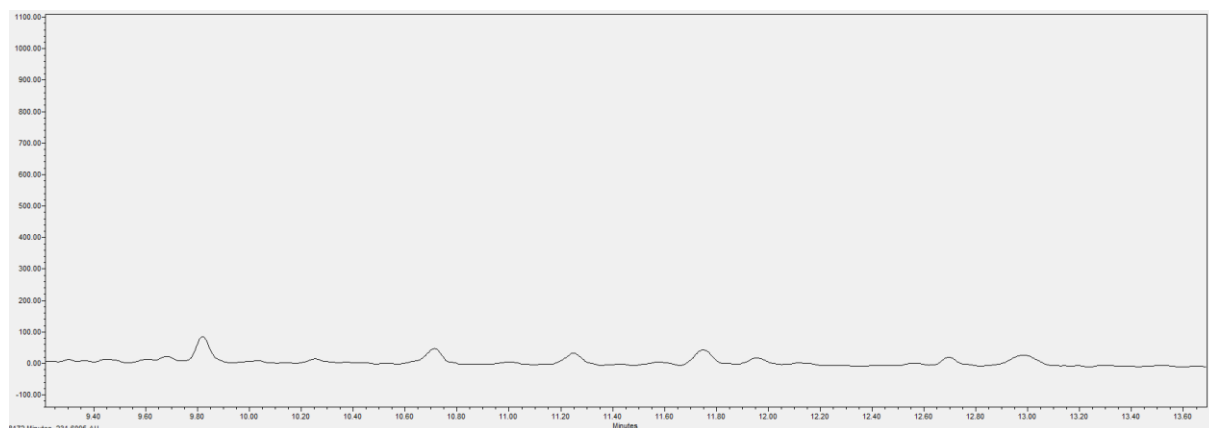
5.1.4. Pokušaj četiri

Za pokušaj broj četiri su se koristili uzorci krvi zdrave muške osobe starosti 23 godina. Izgled plate layout-a bio je isti kao u prethodnom slučaju. Postupak odvajanja kapljevito uzorka od papirića DBS-a se u ovom pokušaju provodio manualno jer je u tom trenutku to bilo jedino pogodno rješenje. U ovom pokušaju nije uočena vidljiva kontaminacija u procesu izolacije. Koncentracije uzoraka mjerene na Nanodropu nakon izolacije su prikazane u *tablici 15*.

Tablica 15. Koncentracije IgG-a u pokušaju broj četiri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,2031	0,2154	0,1985	-0,0309	0,2143	0,2322	0,1885	0,1643	0,1914	0,1448	0,1863	0,1705
B	0,1875	0,2275	0,1838	0,5222	-0,081	0,779	0,2006	0,2089	0,2165	0,2026	0,1942	0,1923
C	0,2048	0,218	0,179	0,2013	0,2116	0,1849	0,2386	0,168	0,1797	0,1933	0,6288	0,1738
D	-0,0113	0,2026	0,6235	0,03361	0,1228	0,1613	0,1942	0,1817	0,2126	0,6468	0,6353	0,1691
E	0,2129	0,5106	0,1995	0,2493	0,1805	0,2051	0,2028	0,1967	0,1965	0,1827	0,3407	0,2465
F	0,1803	0,2161	0,2561	0,1897	0,2002	0,2043	0,2357	0,2106	0,1987	0,1925	0,1989	0,2303
G	0,4253	0,2216	0,1721	0,2538	0,1924	0,2259	0,1537	0,2159	0,549	0,2206	0,1927	0,195
H	0,1796	0,2309	0,1798	0,2135	0,4035	0,1958	0,191	0,2381	0,1378	0,2262	0,1689	-0,017

Postupak je proveden do kraja te su dobiveni elektroferogrami. Na elektroferogramima je uočeno da je odziv glikanskih vrhova vrlo mali ili ne postoji. Kontrolom protokola i skripte u programu, kao jedan od mogućih razloga za ovu pogrešku bila je nemogućnost TECAN-a da otpipetira male uzorke enzima PNGaze F koja se dodaje u volumenu oko 1 μ L. Prikaz dobivenog elektroferograma s nedovoljnom količinom enzima prikazan je na slici 24.



Slika 24. Elektroferogram malog intenziteta

5.1.5. Pokušaj pet

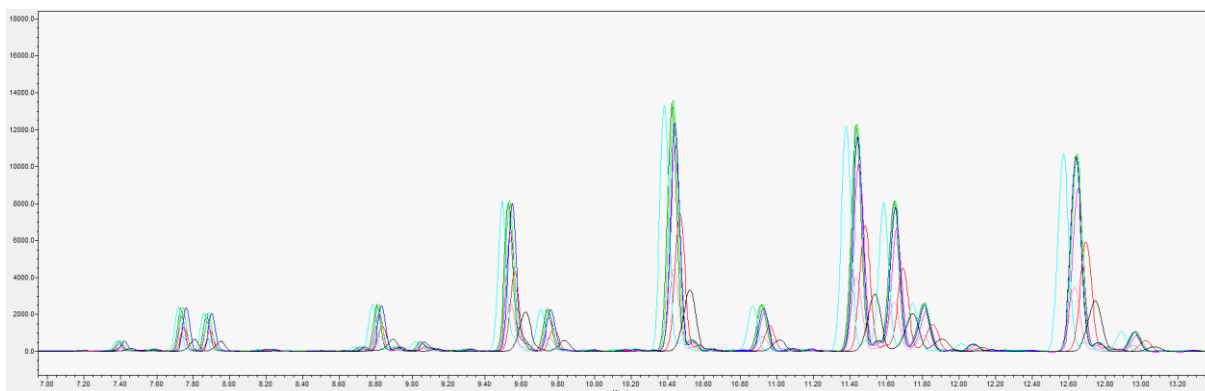
Ovaj pokušaj je bio test pipetiranja enzima pri čemu su kao uzorci poslužili već izolirani glikani od strane stručno osposobljenog analitičara čime su otklonjene mogućnosti kontaminacije u procesu izolacije. Ovim testom pokušao se odrediti najbolji omjer MQ vode, enzima i 5xPBS-a koji TECAN uspješno može dodati u svaku jažicu, a da se dobiju uspješni elektroferogrami. Plate layout je izgledao kao u tablici 16.

Tablica 16. Prikaz plate layout-a za pokušaj broj tri

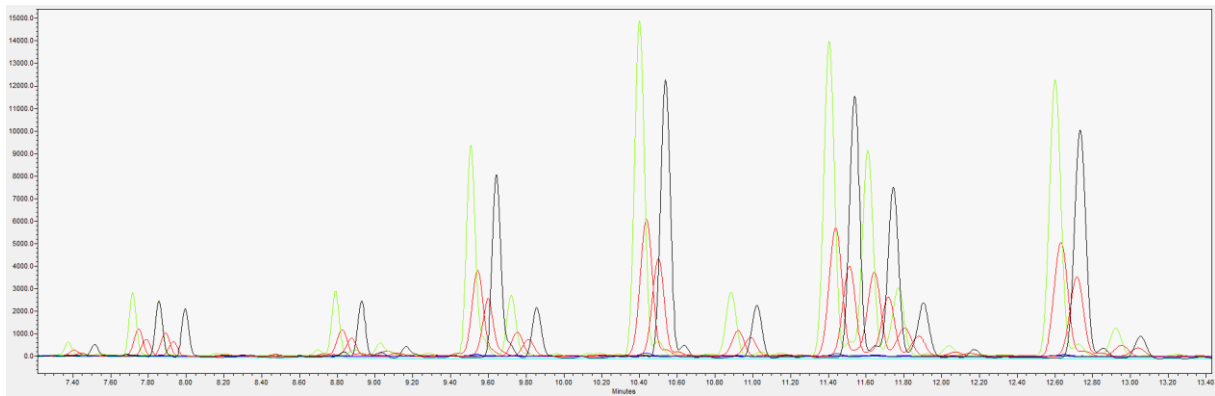
	1	2	3	4	5	6
A	sample 1ul.1	MANUAL 1	sample 1ul.9	MANUAL 9	sample 2ul.1	sample 5ul.1
B	sample 1ul.2	MANUAL 2	sample 1ul.10	MANUAL 10	sample 2ul.2	sample 5ul.2
C	sample 1ul.3	MANUAL 3	sample 1ul.11	MANUAL 11	sample 2ul.3	sample 5ul.3
D	sample 1ul.4	MANUAL 4	sample 1ul.12	MANUAL 12	sample 2ul.4	sample 5ul.4
E	sample 1ul.5	MANUAL 5	sample 1ul.13	MANUAL 13	sample 2ul.5	sample 5ul.5
F	sample 1ul.6	MANUAL 6	sample 1ul.14	MANUAL 14	sample 2ul.6	sample 5ul.6
G	sample 1ul.7	MANUAL 7	sample 1ul.15	MANUAL 15	sample 2ul.7	sample 5ul.7
H	sample 1ul.8	MANUAL 8	sample 1ul.16	MANUAL 16	sample 2ul.8	sample 5ul.8

U prvi i treći stupac pločice dodana je količina enzima od 1 μL koliko se i dodaje u protokolu za manualnu glikozilaciju. U drugi i četvrti stupac dodan je isti volumen, ali ovaj put ručno kako bi se rezultati mogli usporediti. U peti stupac dodana je smjesa koja se sastoji od 1 μL MQ vode, 1 μL 5XPBS i 0,12 μL enzima. U šesti stupac dodano je 0,12 μL enzima, 3,2 μL MQ vode i 1,8 μL 5XPBS. Proučavanjem rezultata testa, zaključeno je da se najbolji rezultati javljaju kada se koristi sustav od 5 μL .

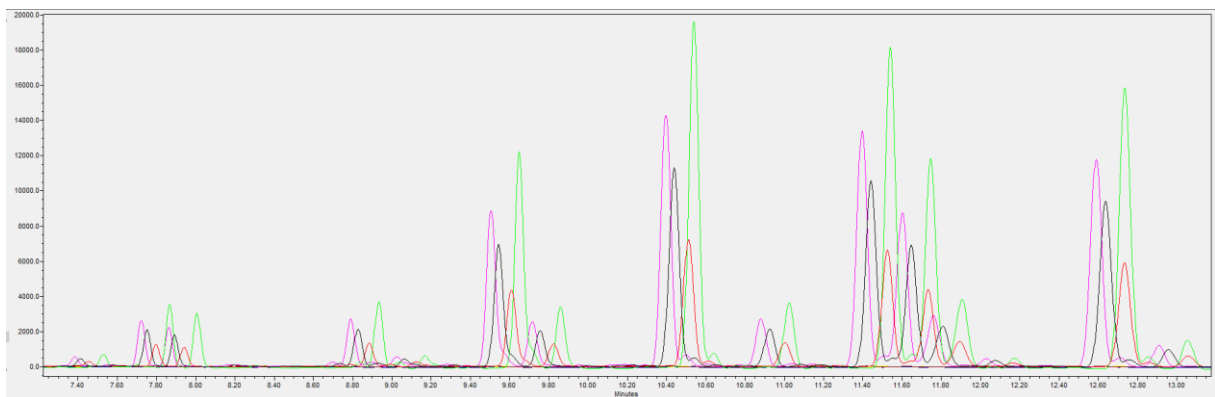
a)



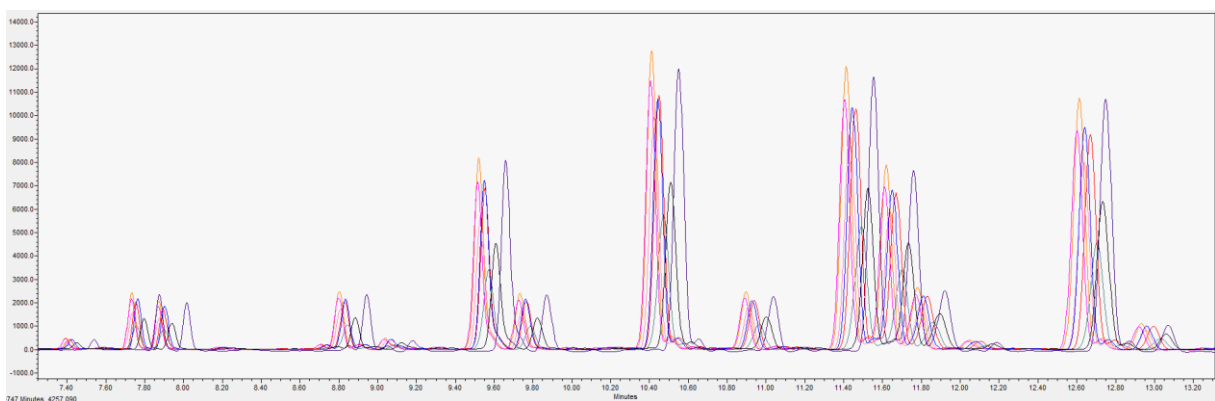
b)



c)



d)

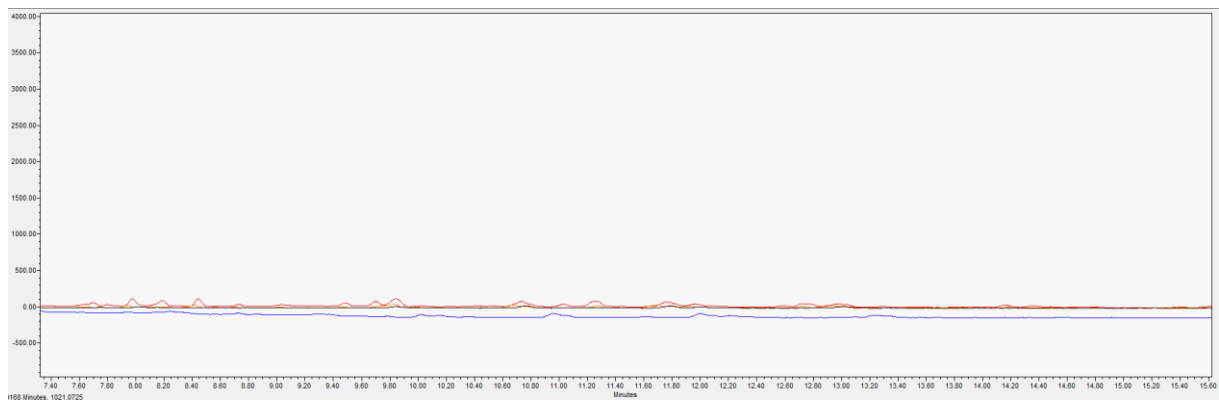


Slika 25. Rezultati testa pipetiranja enzima. a) Manualna metoda; b) 1ul; c) 2ul; d)5ul

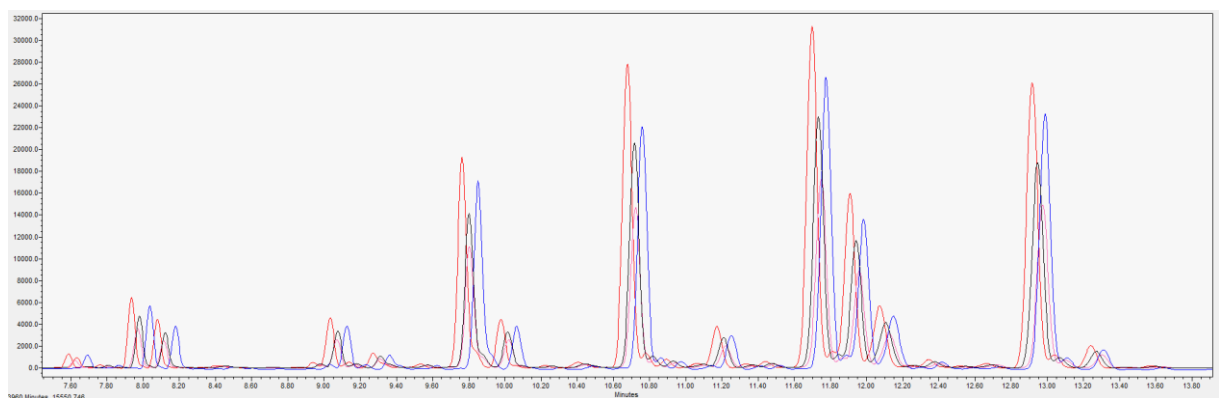
5.1.6. Pokušaj šest

U šestom pokušaju korišteni su uzorci krvi zdrave muške osobe u starosti od 23 godine. *Plate layout* je isti kao u pokušaju broj četiri. Primjenom rezultata testa iz pokušaja pet, skripta je modificirana. Test je proveden uspješno, nisu bile vidljive kontaminacije, robotska ruka je precizno odradila zamišljene poslove, unutarnji standardi su pokazali da je kvaliteta analize zadovoljavajuća te su dobiveni elektroferogrami željenog oblika. Na *slici 25* su prikazani elektroferogrami standarda, negativnih proba i uzoraka. Slijepe probe nisu pokazale prisutnost glikana.

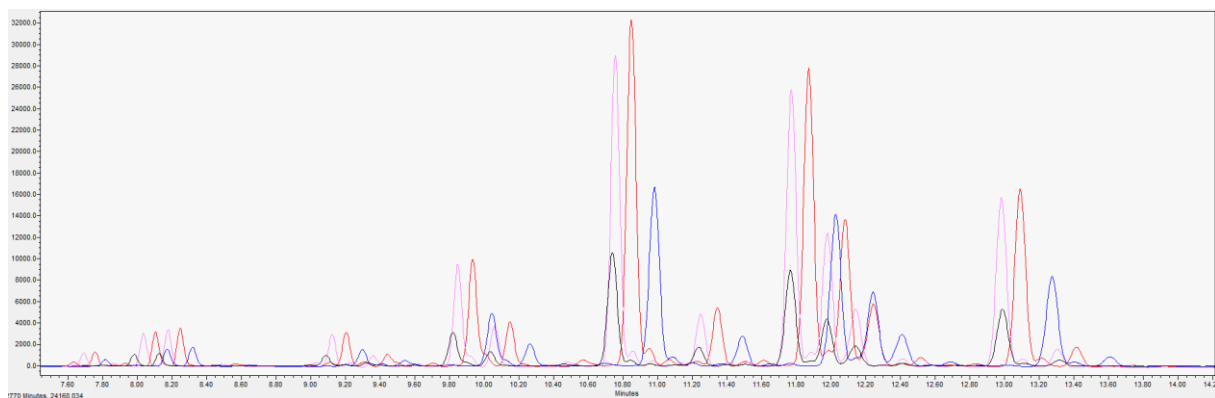
a)



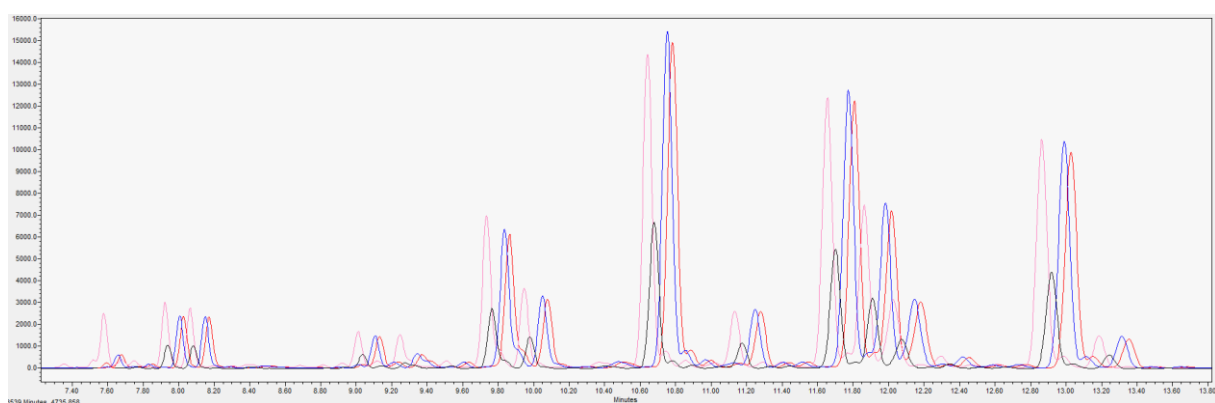
b)



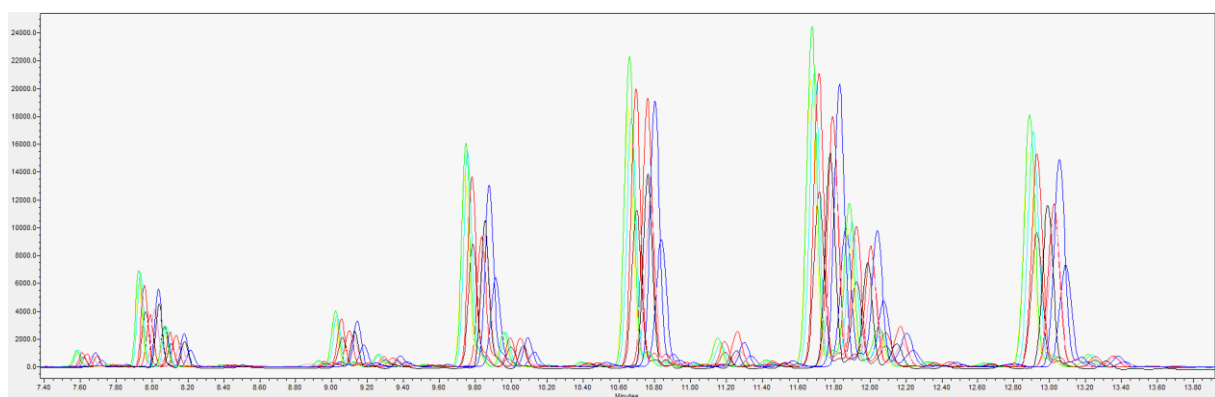
c)



d)



e)



Slika 26. Prikaz rezultata dobivenih u pokušaju šest. a) prikaz slijepe probe; b) prikaz plazma standarda 4 ; c) prikaz plazma standarda 5 ; d) prikaz plazma standarda 6; e) prikaz uzoraka

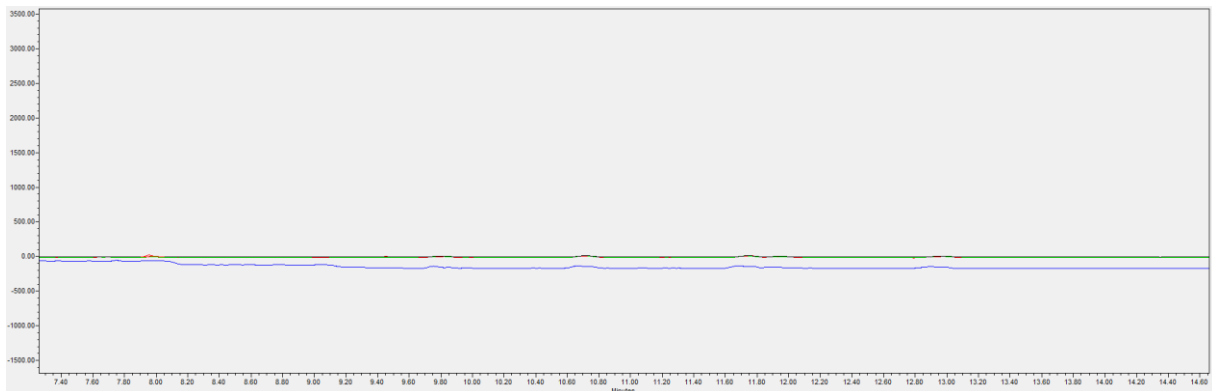
Uzorci vode na elektroferogramu prikazuju skoro pa nikakav odziv što znači da je postupak proveden uspješno, bez kontaminacije. Odzivi plazma standarda su također točni (male oscilacije u intenzitetima i pomacima se mogu zanemariti), a uzorci pokazuju ujednačen profil. Postupak robotiziranog vođenja procesa analize glikozilacije proteina je proveden uspješno.

5.2. Manualno

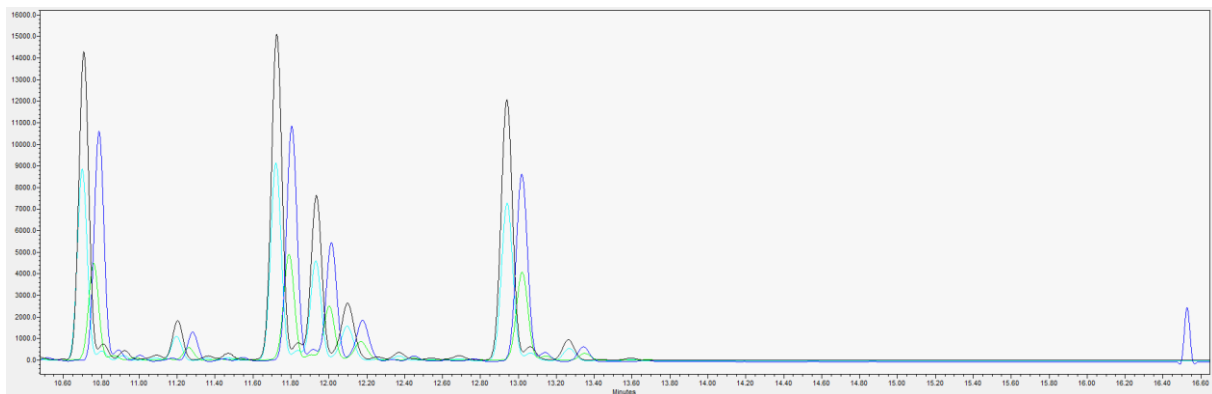
Za točno izvršenje manualnog procesa analize glikozilacije proteina bila su potrebna dva pokušaja. U prvom pokušaju došlo je do kontaminacije uzorka zbog manjka iskustva i prakse u radu tog protokola. Slijepa proba je pokazivala prisutnost potencijalne kontaminacije glikanima, pokazujući očekivani elektroferogram glikana IgG-a, a unutrašnji standardi su pokazali velike varijacije između glikanskih vrhova ukazujući na nezadovoljavajuću kvalitetu analize.

U drugom slučaju postupak je odrađen ispravno, budući da je analitičar stekao iskustva u procesu analize glikozilacije proteina. Analiza je provedena uspješno, nisu bile vidljive kontaminacije slijepih proba, unutarnji standardi su pokazali da je kvaliteta analize zadovoljavajuća te su dobiveni elektroferogrami željenog oblika. Prikaz odziva slijepa probe, plazma standarda i uzoraka u procesu elektroforeze prikazan je na slici.

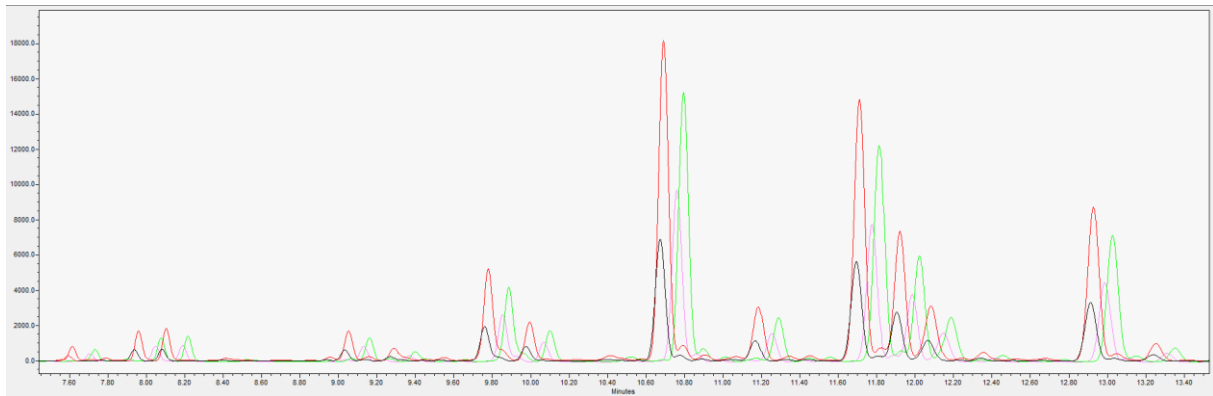
a)



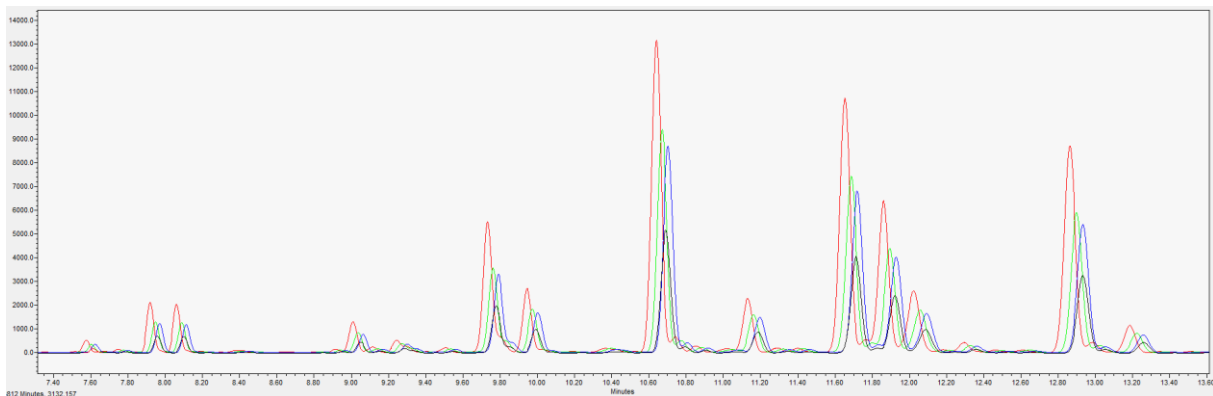
b)



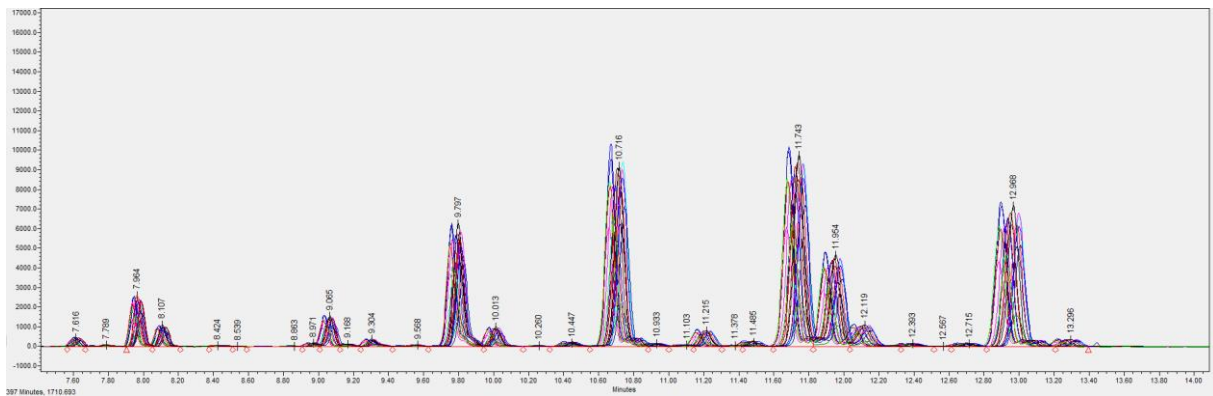
c)



d)



e)



Slika 27. Prikaz rezultata dobivenih manualno u pokušaju dva. a) prikaz slijepe probe; b) prikaz plazma standarda 4 ; c) prikaz plazma standarda 5 ; d) prikaz plazma standarda 6; e) prikaz uzoraka

Uzorci vode na elektroferogramu ne prikazuju značajan odziv što znači da je postupak proveden uspješno. Odzivi plazma standarda su također točni kao i kod robotiziranog procesa, a uzorci

pokazuju ujednačen profil. Postupak manualnog vođenja procesa analize glikozilacije proteina je proveden uspješno.

5.3. Usporedba manualnog i robotiziranog procesa

Promatrajući profile slijepih proba, plazma standarda i uzoraka na elektroferogramima možemo provesti kvalitativnu usporedbu manualne i robotizirane metode analize glikozilacije proteina.

Uzorci slijepih proba pri obje metode su zadovoljavajući jer su odzivi skoro pa neznatni. Dubljim promatranjem zaključuje se da pri manualnom provođenju ipak dolazi do malo manjeg odziva negativne probe, ali samo to nije ozbiljan i dovoljan razlog za zaključiti koja je metoda preciznija.

Međutim, ono što se može primijetiti je da su pri manualnom provođenju profili uzoraka mnogo konzistentniji u odnosu na automatsko provođenje. Takav rezultat je i očekivan budući da je manualna metoda već razvijena i poboljšana jer se koristi duži vremenski period, a robotizirana metoda je po prvi puta provedena upravo sada.

Ipak, za stvarnu usporedbu preciznosti ovih metoda potrebno se okrenuti numeričkim vrijednostima dobivenim integracijom glikanskih vrhova elektroferograma. Za kvantitativnu analizu računaju se prosječne relativne postotne površine glikanskih vrhova, standardne devijacije i CV vrijednosti. Cilj je robotiziranom metodom dobiti rezultate što sličnije manualnoj metodi. Na slici 21 je prikazan graf u kojem su obuhvaćene sve vrijednosti za kvantitativnu analizu.

Tablica 17. Prikaz odstupanja prosječnih relativnih postotnih površina glikanskih vrhova dobivenih manualno i robotizirano

GP	ODSTUPANJE
GP1	0,076788
GP2	0,100689
GP3	0,085343
GP4	0,12008
GP5	0,107631
GP6	0,130819
GP7	-0,00559
GP8	0,02502
GP9	0,044402
GP10	0,064
GP11	0,107319
GP12	0,029592
GP13	0,064324
GP14	-0,19546
GP15	-0,04834
GP16	-0,02256
GP17	-0,01695
GP18	-0,00023
GP19	0,024006
GP20	-0,16792
GP21	-0,00861
GP22	-0,00607
GP23	0,029637
GP24	0,030272
GP25	0,122488
GP26	0,006204
GP27	0,0412

Promatrajući rezultate zaključujemo da se vrijednosti prosječnih relativnih postotnih površina ne razlikuju znatno. U *tablici 11.* prikazano je prosječno odstupanje prosječnih relativnih postotnih površina glikanskih vrhova dobivenih manualno i robotizirano. Odstupanja su relativno niska (ispod 10%) osim za vrhove 4, 6, 20 i 25. Odstupanja u tim vrhovima iako su veća mogu se zanemariti budući da se radi o vrhovima malog intenziteta pa čak i mala varijacija

vrijednosti rezultira velikim odstupanjima. Primjerice, za GP6 prosječna vrijednost relativne postotne površine za robotiziranu metodu iznosi 0,057864, a za manualno 0,05117. Ova razlika je u apsolutnoj vrijednosti vrlo mala, a odgovarajuće odstupanje iznosi 12% što se čini kao veliku odstupanje ako se ne primjeni u ovom kontekstu.

S druge strane, kod glikanskih vrhova velikog relativnog udjela (relativna postotna površina veća od 10%) očekuju se puno manja odstupanja. Tako primjerice najveći zapaženi CV takvih vrhova je 3,88% kod automatizirane metode.

Standardne devijacije rezultata dobivenih manualno i automatski pokazuju značajniju razliku. U globalu standardne devijacije su veće kod robotizirane metode što je i očekivano jer se radi o novoj metodi provođenja analize glikozilacije proteina i nije realno za očekivati da iz prvog uspješnog pokušaja rezultati budu točniji. Iznosi standardnih devijacija su stavljeni u kontekst uvođenjem statističke vrijednosti CV koja predstavlja omjer standardne devijacije i prosječne vrijednosti relativne postotne površine glikanskog vrha.

Promatrajući statističku CV vrijednost, dolazi se do zaključka da je manualna metoda i dalje rješenje koje ćemo upotrijebiti ukoliko provodimo analizu gdje je preciznost od posebne važnosti. Međutim, iako je robotu ovo prva implementacija metode, on je čak u nekim glikanskim vrhovima precizniji i konzistentniji kao npr. u trećem, četvrtom, trinaestom, četrnaestom, devetnaestom, dvadesetom i dvadesetpetom vrhu.

Prema provedenom ispitivanju usporedbe robotizirane i manualne metode za analizu glikozilacije proteina, manualna metoda se i dalje nameće kao bolje rješenje. Osim što pokazuje vidljivo bolje rezultate analize, nju je znatno lakše provesti u ovom trenutku. TECAN u određenim vrhovima pokazuje svoju kvalitetu, međutim njegov puni potencijal se može postići jedino implementacijom vanjskih uređaja te optimiranjem metode i posuđa.

6. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada razvijena je automatizirana metoda analize glikozilacije proteina IgG-a koja je izravno uspoređena s postojećom validiranom manualnom metodom. Razvijena metoda uvelike smanjuje interakciju laboratorijskog osoblja s opasnim tvarima, smanjuje mogućnost ljudske pogreške, protokol se može jednostavno prenijeti u drugi laboratorij, a potencijalno se može smanjiti vrijeme pripreme uzorka za analizu. Uspoređivala se preciznost dvaju metoda te se pomoću Excel-a i Pythona (s odgovarajućim bibliotekama) provela kvantitativna statistička analiza rezultata koja je predložena u grafički oblik. Statistička kvantitativna analiza je pokazala da su dvije metode usporedne jer su vrijednosti prosječne relativne postotne površine i koeficijenti varijacije glikanskih vrhova u velikoj mjeri usporedive. Prisutna standardna devijacija automatizirane metode je nešto veća, što je očekivani rezultat budući da je izvedba ovog rada bila prva implementacija te metode. Daljnjim razvojem metode očekujemo da će se razlika između tih metoda smanjiti.

Moguća poboljšanja u ovom području uključivala bi implementaciju dodatnih uređaja koji otežavaju opsežniju automatizaciju metode kao npr. Uređaj za brtvljenje, NanoDrop spektrofotometar, vakuumski sušionik te centrifuga. Dodatni razvoj uređaja za analizu glikanskih struktura i laboratorijskog posuđa (u najvećoj mjeri plastičnih pločica) će biti vrlo važan čimbenik za ostvarenje potpune automatizacije procesa.

Trenutno je nemoguće provesti potpunu automatizaciju procesa analize glikozilacije uz postojeće robotske radne stanice te vanjske uređaje i aparaturu. Postoji veliki potencijal za razvoj potpuno automatizirane metode ako bi se u sustav implementirali određeni uređaji, razvile bolje pločice i steklo veće iskustvo u rukovanju radnom stanicom. Potencijalni idući korak bio bi dugoročno testiranje metode i usporedba s više analitičara u periodu od 6 mjeseci, gdje bi bilo očekivano da će robotski sustav imati prednost u odnosu na laboratorijsko osoblje. Također, može se provesti ispitivanje preciznosti metode na uzorcima različitih osoba, kako bi se u prvi plan stavila biološka varijacija.

Smatram da je automatizacija glikozilacije proteina IgG-a veliki korak prema naprijed u visokoprotočnoj analizi glikana te će se ona, u skorijoj budućnosti, nametati kao izvrsno rješenje za provođenje različitih glikobioloških procesa znatno točnije, preciznije i brže od čovjeka.

7. POPIS SIMBOLA

2-AB	2-aminobenzamid (eng. 2-aminobenzamide)
ACN	Acetonitril
Asn	aminokiselina asparagin
APTS	8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina
Asn	Asparagin
CH	konstantna regija teškog lanca imunoglobulina G
CL	konstantna regija lakog lanca imunoglobulina G
DMSO	dimetil sulfoksid (eng. dimethyl sulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid)
ER	Endoplazmatski retikulum
EtOH	etanol (eng. ethanol)
Fab	fragment koji veže antigen (eng. antigen-binding fragment)
Fc	fragment koji kristalizira (eng. crystalizable fragment)
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GP	glikanski (kromatografski) pik (eng. glycan peak)
GPI	glikozilfosfatidilinozitol - sidra (eng. Glycosylphosphatidylinositol, GPI anchor)
GU	glukozne jedinice (eng. glucose units)
HC	teški lanac imunoglobulina G (eng. heavy chain)
HILIC	tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (eng. hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatography)
IG	imunoglobulini
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LC	laki lanac imunoglobulina G (eng. light chain)
LC-MS	tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (eng. Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry)

PB	2 - pikolin boran (eng. 2-picoline borane)
PBS	fosfatni pufer (eng. phosphate buffered saline)
PNGaza F	peptid-N-glikozidaza (eng. peptide-N ⁴ -(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine amidase F)
SDS	natrijev dodecil sulfat (eng. sodium dodecyl sulfate)
Ser	aminokiselina serin
TEA	Trietanolamin
Thr	aminokiselina treonin
TRIS	tris (hidroksimetil) aminometan (eng. tris (hydroxymethyl) aminomethane)
UHPLC	tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (eng. Ultra Performance Liquid Chromatography)
VH	varijabilna regija teškog lanca imunoglobulina G
VL	varijabilna regija lakog lanca imunoglobulina G
xCGE-LIF	Multipleksna kapilarna gel elektroforeza s laserom potaknutom fluorescencijom

8. LITERATURA

- [1] G. M. Cooper, R.E. Hausmann, *Stanica: Molekularni pristup*, Medicinska naklada, Zagreb, (2006)
- [2] A. Varki, R. D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger; Essentials of Glycobiology, 4th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2022)
- [3] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*, W.H.Freeman and Co., New York, (2008)
- [4] M. Wacker, D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, H. R Morris, A. Dell; *N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli*, (2022)
- [5] R.L. Schnaar, *Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation*, (2016)
- [6] K. Ohtsubo i J.D. Marth, *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease*, Cell. (2006); 126(5):855-67
- [7] O. Gornik, T. Pavić, G. Lauc, *Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease*. Biochimica et Biophysica Acta, (2011), 1820(9), 1318-1326.
- [8] S. M. Haslam, D. I. Freedberg, B. Mulloy, A. Dell, P. Stanley, J. H. Prestegard; *Structural Analysis of Glycans: In: Varki A, Essentials of Glycobiology*, 4th ed, Cold Spring Harbor (NY), (2022), Chapter 50
- [9] R. Zhu, L. Zacharias, K. M. Wooding, W. Peng, Y. Mechref; *Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages*. Methods Enzymol. (2017);585:397-429
- [10] A. Knežević, O. Gornik, O. Polašek, M. Pučić, I. Redžić, M. Novokmet, P. M Rudd, A. F Wright, H. Campbell, I. Rudan, G. Lauc, *Effects of aging body mass index*,

- plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. Glycobiology* 20, 959–969 Oxford University Press (OUP), (2010)
- [11] F. H. Roosmarijn, H. Lemmers, M. Vilaj, D. I. Urda, F. Agakov, M. Šimurina, L. Klaric, I. Rudan, H. Campbell, C. Hayward, J. F. Wilson, A. G. Lieveise, O. Gornik, E. J. G. Sijbrands, G. Lauc, M. van Hoek; *IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861, 2240–2249 Elsevier BV, (2017)
- [12] C. Reily, T. J. Stewart, M. B. Renfrow, J. Novak; *Glycosylation in health and disease, Nat Rev Nephrol.* (2019)
- [13] K. J. Loaeza-Reyes, E. Zenteno, A. Moreno-Rodríguez, R. Torres-Rosas, L. Argueta-Figueroa, R. Salinas-Marín, L. M. Castillo-Real, S. Pina-Canseco, Y. P. Cervera; *An Overview of Glycosylation and its Impact on Cardiovascular Health and Disease, Front Mol Biosci,* (2021)
- [14] J. Eichler, *Protein glycosylation, Curr Biol.* (2019); 29(7):R229-R231
- [15] Y. Tsukamoto, H. Takeuchi, *Other Types of Glycosylation.* In: Lauc, G., Trbojević-Akmačić, I. (eds) *The Role of Glycosylation in Health and Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1325. Springer, Cham. (2021)
- [16] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzle; *Essentials of Glycobiology.* 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; (2009)
- [17] S. Yang, P. Onigman, W. W. Wu, J. Sjogren, Nyhlen H, R. F. Shen, J. Cipollo; *Deciphering Protein O-Glycosylation: Solid-Phase Chemoenzymatic Cleavage and Enrichment. Anal Chem.* (2018); 90(13):8261-8269.

- [18] I. Trbojević-Akmačić, S. M. Guinevere, Lageveen-Kammeijer, B. Heijs, T. Petrović, H. Deriš, M. Wuhrer, G Lauc; *High-Throughput Glycomic Methods*; Chemical Reviews (2022) 122 (20), 15865-15913
- [19] T. Hirata, Y. Kizuka; *N-Glycosylation*, Adv Exp Med Biol. (2021); 1325:3-24
- [20] Z. Huang, P. F. Lai, A. T. H. Cocker, S. M. Haslam, A. Dell, H. J. M. Brady, M. R. Johnson, *Roles of N-linked glycosylation and glycan-binding proteins in placentation: trophoblast infiltration, immunomodulation, angiogenesis, and pathophysiology*. Biochem Soc Trans. (2023), 26;51(2):639-653.
- [21] G. Zauner, R. P. Kozak, R. A. Gardner, D. L. Fernandes, A. M. Deelder, M. Wuhrer, *Protein O-glycosylation analysis*; Biol Chem. (2012) 393(8):687-708.
- [22] C. A. Janeway Jr, P. Travers, M. Walport, et al.; *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*; 5th edition, New York: Garland Science; (2001).
- [23] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al.; *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; (2002)
- [24] K.M. Morrill, J. Polo, A. Lago, J. Campbell, J. Quigley, H. Tyler, *Estimate of serum immunoglobulin G concentration using refractometry with or without caprylic acid fractionation*; Journal of Dairy Science, Volume 96, Issue 7, (2013), Pages 4535-4541
- [25] R. C. Williams Jr, C. C. Malone, J. H. Roemer, F. Silvestris, A. Solomon; *IgG anti-F(ab')₂ antibodies from SLE patients react with immunodominant residues in kappa CDRs, but show reduced C kappa region reactivity*. Clin Immunol Immunopathol. (1995);77(3):366-73
- [26] S. Yanaka, R. Yogo, K. Kato; *Biophysical characterization of dynamic structures of immunoglobulin G*; Biophys Rev. (2020) 12(3):637-645
- [27] H. Yagi, S. Yanaka, K. Kato; *Structure and Dynamics of Immunoglobulin G Glycoproteins*; Adv Exp Med Biol. (2018);1104:219-235.




- [28] H. W. Schroeder Jr, L. Cavacini; *Structure and function of immunoglobulins*; J Allergy Clin Immunol; (2010);125; S41-52
- [29] T Mizuochi, T Taniguchi, A Shimizu, A Kobata; *Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G*; J Immunol; (1982); 129 (5)
- [30] G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispen; *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*; Front Immunol. (2014); 5:520
- [31] S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima; *A highly sensitive method for analyses of sugar moieties of glycoproteins by fluorescence labeling*. J Biochem. (1981); 90(2):407-14.
- [32] M. Norris, E. Gillian E; *The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosylasparaginase from Flavobacterium meningosepticum*; Structure 2 11 (1994): 1049-59 .
- [33] Di Liu; *Immunoglobulin G N-Glycan Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography*; J Vis Exp. (2020); 155
- [34] A. Messina, A. Palmigiano, F. Esposito, A. Fiumara, A. Bordugo, R. Barone, L. Sturiale, J. Jaeken, D. Garozzo; *HILIC-UPLC-MS for high throughput and isomeric N-glycan separation and characterization in Congenital Disorders Glycosylation and human diseases*. Glycoconj J. (2021) (2):201-211.
- [35] S. Chatterjee, L. Y. Lee, R. Kawahara, J. L. Abrahams, B. Adamczyk, M. Anugraham , C. Ashwood, Z. Sumer-Bayraktar, M. T. Briggs, J. H. L. Chik, A. Everest-Dass, S. Förster, H. Hinneburg, K. R. M. Leite, I. Loke, U. Möglinger, E. S. X. Moh, M. Nakano, S. Recuero, M. K. Sethi, M. Srougi, K. Stavenhagen, V. Venkatakrishnan, et al. *Protein Paucimannosylation Is an Enriched N-Glycosylation Signature of Human Cancers*; Proteomics (2019) (21-22):e1900010
- [36] G. C. Vreeker, M. Wuhrer; *Reversed-phase separation methods for glycan analysis*, Anal Bioanal Chem. (2017); 409(2):359-378.




- [37] T. Saito, H. Yagi; *High-Performance Liquid Chromatography Mapping Method for the Structural Analysis of N-Glycans at the Molecular, Cellular, and Tissue Levels*. *Methods Mol Biol.* (2022); 2556:19-30
- [38] G. R. Guile, P. M. Rudd, D. R. Wing, S. B. Prime, R. A. Dwek; *A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles*; *Anal Biochem* (1996); 240:210–226.
- [39] D. J. Harvey, L. Royle, C. M. Radcliffe, P. M. Rudd, R. A. Dwek; *Structural and quantitative analysis of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption ionization and negative ion nanospray mass spectrometry*,. *Anal Biochem.* (2008); 376:40–60.
- [40] H. Deriš, A. Cindrić, M. Lauber, T. Petrović, A. Bielik, C. H. Taron, M. van Wingerden, G. Lauc, I. Trbojević-Akmačić; *Robustness and repeatability of GlycoWorks RapiFluor-MS IgG N-glycan profiling in a long-term high-throughput glycomic study*; *Glycobiology*, (2021); 31(9):1062-1067
- [41] C. Váradi, V. Hajdu, F. Farkas, I. Gilányi, C. Oláh, B. Viskolcz, *The Analysis of Human Serum N-Glycosylation in Patients with Primary and Metastatic Brain Tumors*, *Life (Basel)*, (2021); 11(1):29.
- [42] N. Saraswathy, P. Ramalingam, *5 - DNA Sequencing Methods. In Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, Saraswathy, N., Ramalingam, P. Eds.; Woodhead Publishing, (2011)
- [43] A. Guttman, Andra, *Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis*, *ELECTROPHORESIS 17* (1996)
- [44] G. S. M. Lageveen-Kammeijer, N. de Haan, P. Mohaupt, S. Wagt, M. Filius, J. Nouta, D. Falck, M. Wuhrer; *Highly sensitive CE-ESI-MS analysis of N-glycans from complex biological samples*; *Nat Commun*; (2019); 10(1):2137

- [45] A. Guttman; *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*; Nature 380, 461–462 (1996)
- [46] Z. Szabo, A. Guttman, T. Rejtar, B. L. Karger, *Improved sample preparation method for glycan analysis of glycoproteins by CE-LIF and CE-MS*, Electrophoresis, (2010) (8):1389-95
- [47] A. Guttman; *Multistructure sequencing of N-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis and enzyme matrix digestion*; Electrophoresis; (1997); (7):1136-41.
- [48] M. Alexovič, P. L. Urban, H. Tabani, J. Sabo; *Recent advances in robotic protein sample preparation for clinical analysis and other biomedical applications*; Clinica Chimica Acta, Volume 507, 2020, Pages 104-116,
- [49] F. Kong, L. Yuan, Y. F. Zheng, W. Chen; *Automatic liquid handling for life science: a critical review of the current state of the art*; J. Lab. Auto.; (2012). 17 169–185.
- [50] M. Alexovič, Y. Dotsikas, P. Bober, J. Sabo; *Achievements in robotic automation of solvent extraction and related approaches for bioanalysis of pharmaceuticals*; Journal of Chromatography B, Volume 1092, (2018), Pages 402-421, ISSN 1570-0232
- [51] L. Royle, M. P. Campbell, C. M. Radcliffe, D. M. White, D. J. Harvey, J. L. Abrahams, Yun-Gon Kim, G. W. Henry, N. A. Shadick, M. E. Weinblatt, D. M. Lee, P. M. Rudd, R. A. Dwek, *HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software*; Anal Biochem; (2008); 376(1):1-12.
- [52] H. Stöckmann, B. Adamczyk, J. Hayes, P. M. Rudd; *Automated, High-Throughput IgG-Antibody Glycoprofiling Platform*, Analytical Chemistry (2013) 85 (18), 8841-8849








- [53] J. L. Hendel, R. A. Gardner, D. I. R. Spencer; *Automation of Immunoglobulin Glycosylation Analysis*; Exp Suppl. (2021); 112:173-204.
- [54] J. L. Hendel, R. A. Gardner, D. I. R. Spencer; *Automation of Immunoglobulin Glycosylation Analysis*; Exp Suppl; (2021); 112:173-204
- [55] L. Bessemans, V. Jully, C. de Raikem, M. Albanese, N. Moniotte, P. Silversmet, D. Lemoine; *Automated Gravimetric Calibration to Optimize the Accuracy and Precision of TECAN Freedom EVO Liquid Handler*, SLAS Technology, Volume 21, Issue 5, (2016), 693-705.
- [56] V. Kallapurackal, T. Kausel, A. Sulzer, P. Voegeli, A. Kratzer; *Automating PrepFiler forensic DNA extraction kit: Optimization and validation on Freedom EVO® 150*; Forensic Science International: Genetics Supplement Series, Volume 5, (2015), e101-e103,
- [57] T. Sup Lee, Y. Kim, W. Zhang, In Ho Song, Ching-Hsuan Tung; *Facile metabolic glycan labeling strategy for exosome tracking*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Volume 1862, Issue 5, (2018), 1091-1100,








9. PRILOZI

1	Sub-Routine	C:\ProgramData\Tecan\EVOware\database\Scripts\B_IgG_iso_mini_1_checklist.esc Execute sub-routine and wait for it to finish
2	Group	Sample preparation
3	Comment	58-1 free
4	Group	Dilute sample and transfer onto filter plate
5	Begin Loop	96 times "input"
6	Set Variable	loop_no = ~LOOP_input~
7	Import Variable	1 variable(s) <== C:\Users\Admin\Desktop\Variable\Input.csv retrieve LINE [loop_no]
8	Set Variable	pipetting_volume_~loop_no~ = startconc
9	Export Variable	1 variable(s) ==> C:\Users\Admin\Desktop\Variable\Output.csv
10	End Loop	"input"
11	Begin Loop	12 times "Column"
12	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
13	Begin Loop	8 times "Row"
14	Set Variable	number = ~LOOP_Row~+8*(~LOOP_Column~-1)
15	Set Variable	sample_volume = pipetting_volume_~NUMBER~
16	If - Then	sample_volume > 160
17	Get DiTis	 1 DiTI 1000ul CL LiHa
18	Else	
19	Get DiTis	 1 DiTI 200ul CL LiHa
20	End If	
21	Set Variable	TIP_OFFSET = TIP_OFFSET+1
22	Export Variable	2 variable(s) ==> C:\Users\Admin\Desktop\Variable\Output_pipeted.csv


23	End Loop	"Row"
24	Set Variable	TIP_OFFSET = 0
25	Begin Loop	8 times "Aspirate"
26	Set Variable	number = ~LOOP_Aspirate~+8*(~LOOP_Column~-1)
27	Set Variable	sample_volume = pipetting_volume_~NUMBER~
28	Aspirate	 sample_volume µl Water free dispense no detection "PBS" (Col. 1, Row 1)
29	Set Variable	TIP_OFFSET = TIP_OFFSET+1
30	End Loop	"Aspirate"
31	Set Variable	TIP_OFFSET = 0
32	Begin Loop	8 times "Dispense"
33	Set Variable	number = ~LOOP_Dispense~+8*(~LOOP_Column~-1)
34	Set Variable	sample_volume = pipetting_volume_~NUMBER~
35	Dispense	 sample_volume µl Water free dispense no detection "Palacoprep96 on 1ml short" (Col. 1, Row 1) , 2 options
36	Set Variable	TIP_OFFSET = TIP_OFFSET+1
37	End Loop	"Dispense"
38	Set Variable	TIP_OFFSET = 0
39	Drop DiTis	 DITI Nested Waste LiHa
40	End Loop	"Column"
41	Set Variable	sandwich_site = 3
42	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '3'; Destination: Grid '26', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
43	inhecoMTC	StartShake(1,250,0 Circle antidockwise)
44	Start Timer	1







45	Wait for Timer	Timer 1 : 9600 sec
46	Group	Pre prepare plate
47	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '1'; Destination: Grid '69,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)
48	A200	TestMethod(IgG_isolation_01_storage_removal_2_mini)
49	A200	RunWasteMethod(IgG_isolation_01_storage_removal_2_mini; StopOnAbort=True; LayoutDefinition=Range=1-96; Columns=)
50	A200	WaitForMethod()
51	Comment	Storage removed
52	A200	TestMethod(IgG_isolation_05_ProtG_Regeneration__Cond_2_mini)
53	A200	RunWasteMethod(IgG_isolation_05_ProtG_Regeneration__Cond_2_mini; StopOnAbort=False; LayoutDefinition=Range=1-96; Columns=)
54	Group End	Pre prepare plate
55	Start Timer	2
56	Wait for Timer	Timer 2 : 1200 sec
57	inhecoMTC	StopShake(1)
58	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
59	Group End	Dilute sample and transfer onto filter plate
60	Comment	Sample diluted and transfered
61	A200	WaitForMethod()
62	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)
63	Group End	Sample preparation
64	Group	Plasma filtration
65	Comment	Sandwich transfered, 52-2 occupied
66	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '69,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)

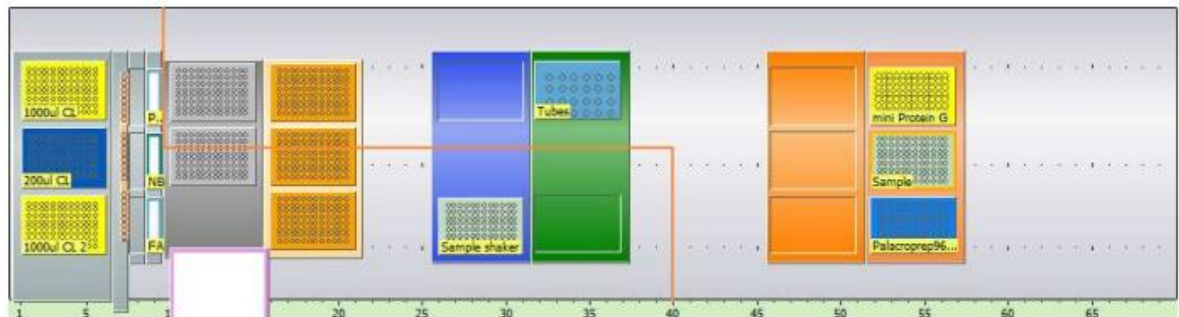
67	Comment	S2-2 free
68	A200	TestMethod(IgG_isolation_02_PTFEfiltration)
69	A200	RunWasteMethod(IgG_isolation_02_PTFEfiltration;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
70	Comment	In parallel
71	A200	WaitForMethod()
72	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
73	Comment	Remove acroprep from sandwich to enable sample transfer onto protein g plate
74	Comment	Sandwich disassembled
75	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
76	User Prompt	"Has the sandwich separated properly? Check the bottom for droplets!" sound : no
77	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 3 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
78	Group	Sample_transfer
79	Begin Loop	12 times "Transfer_sample_onto_PGP"
80	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
81	Get DiTis	 DiTi 1000ul CL LIHa
82	Aspirate	  800 µl Water free dispense no detection "Sample" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
83	Dispense	  800 µl Water free dispense no detection "mini Protein G" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
84	Drop DiTis	 DiTi Nested Waste LIHa
85	End Loop	"Transfer_sample_onto_PGP"
86	Group End	Sample_transfer
87	Comment	Sample transferred to PGP

88	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '6', Site '5'; Narrow (ROMA 1)
89	Comment	6-5 occupied, 52-2 empty
90	Group End	Plasma filtration
91	Group	Binding and washing
92	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '1'; Destination: Grid '69', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
93	A200	TestMethod(IgG_isolation_03_binding_and_washing_2_mini)
94	A200	RunWasteMethod(IgG_isolation_03_binding_and_washing_2_mini; StopOnAbort=False; LayoutDefinition=Range=1-96; Columns=)
95	Group End	Binding and washing
96	Group	Elution preparation
97	Transfer Labware	Source: Grid '58,' Site '1'; Destination: Grid '52', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
98	Comment	52-2 occupied
99	Group	neutralization buffer pipetting
100	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
101	Get DITis	 DITI 1000ul CL LIHa
102	Aspirate	  42.5*13 µl >> Water free dispense no detection << "NB" (Col. 1, Rows 1-8)
103	Begin Loop	12 times "single"
104	Dispense	  42.5 µl Water free dispense no detection "Sample" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
105	End Loop	"single"
106	Drop DITis	 DITI Nested Waste LIHa
107	Group End	neutralization buffer pipetting
108	Comment	52-2 free, carrier with neutralization buffer transfered to 52-1
109	Group End	Elution preparation









110	Group	Wait for binding to finish
111	A200	WaitForMethod()
112	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)
113	Comment	Sample bound and washed
114	Group End	Wait for binding to finish
115	Group	Elution
116	Comment	formic add dispensed
117	Comment	S2-2 occupied
118	ROMA Vector	Vector "Drop Acroprep filter plate onto 2ml DeepWell plate v2-2 collect", Grid 52, Site 1 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
119	User Prompt	"Has the sandwich separated properly?" sound : no
120	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
121	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '69,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)
122	Group	elution
123	A200	TestMethod(IgG_isolation_04_FA_Elution_2_mini)
124	A200	RunWasteMethod(IgG_isolation_04_FA_Elution_2_mini;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
125	Group End	elution
126	Group	parallel with elution
127	Comment	pqp carrier returned
128	A200	WaitForMethod()
129	Comment	sample eluted
130	Group End	parallel with elution
131	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)








132	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
133	User Prompt	"Has the sandwich separated properly?" sound : no
134	ROMA Vector	Vector "Drop Acroprep filter plate onto 2ml DeepWell plate v2-2 collect", Grid 52, Site 1 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
135	Comment	sandwich disassembled
136	Group End	Elution
137	Group	Regeneration of IgG plate
138	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '1'; Destination: Grid '69,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)
139	A200	TestMethod(IgG_isolation_05_ProtG_Regeneration__Cond_2_mini)
140	A200	RunWasteMethod(IgG_isolation_05_ProtG_Regeneration__Cond_2_mini; StopOnAbort=False; LayoutDefinition=Range=1-96; Columns=)
141	Group End	Regeneration of IgG plate
142	User Prompt	"Please make sure the shaker is empty! If you have another plate for analysis please repeat the preparation process!" sound : no
143	Group	Resuspension and shake
144	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '26,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
145	inhecoMTC	StartShake(1,750,0 Circle antidockwise)
146	Start Timer	15
147	Wait for Timer	Timer 15 : 60 sec
148	inhecoMTC	StopShake(1)
149	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
150	Group	resuspend and shake
151	Begin Loop	12 times "Resuspend"
152	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml














153	Get DiTis		DITI 1000ul CL LIHa
154	Aspirate	 	100 µl >> Water free dispense no detection << "Sample" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
155	Dispense	 	100 µl Water free dispense no detection "Sample" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
156	Drop DiTis		DITI Nested Waste LIHa
157	End Loop	"Resuspend"	
158	Group End	resuspend and shake	
159	Comment	sample resuspended	
160	Group End	Resuspension and shake	
161	Group	Wait for regeneration	
162	A200	WaitForMethod()	
163	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)	
164	Comment	Plate regenerated	
165	Group End	Wait for regeneration	
166	User Prompt	"If you want the sample aliquoted prepare and run script called Prepare_Sample_Drying Don't forget to put the Protein G plate into storage by running Fill protein G storage method on A200." sound : no	












Prilog 1. Konfiguracija stola i skripta u programu Ewaware za izolaciju IgG-a

1	Start Timer	1
2	Heated Incubator1	SetTemperature(2,60)
3	Heated Incubator1	SetTemperature(3,37)
4	Wash Tips	 20 + 20 ml
5	Group	Step 0: Checklist
6	Set DiTi position	DiTi 50ul CL LIHa Grid : 1, Site : 1, First position in labware : 1
7	Set DiTi position	DiTi 200ul CL LIHa Grid : 1, Site : 2, First position in labware : 1
8	Set DiTi position	DiTi 1000ul CL LIHa Grid : 1, Site : 3, First position in labware : 1
9	User Prompt	"1. Refill 50 ul tips if necessary! 2. Set your sample plate onto pos 52-2. 3. Prepare a reagent containing PCR place. 4. Prepare 1.66% PBS and put it in column 1 of reagent PCR plate." sound : no
10	User Prompt	"5. Prepare 0.5% SDS and put it in column 2 of reagent PCR plate. 6. Prepare 4% Igepal and put it in column 3 of reagent PCR plate. 7. Prepare the enzyme mixture by mixing 1 µL of 5xPBS with 0.12 µL of PNgase F per sample. Make sure to prepare some extra to account for pipetting errors(cca 2 extra per well)" sound : no
11	User Prompt	"7. Add ultra pure water to column 5 of reagent PCR plate. 8. Prepare APTS/PB labelling mixture. Put it in column 6 of reagent PCR plate." sound : no
12	Group End	Step 0: Checklist
13	Group	Step 1: Resuspend
14	Begin Loop	12 times "PBS"
15	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
16	Get DiTis	 DiTi 50ul CL LIHa
17	Aspirate	  3 µl Water free dispense no detection "Reagents PCR" (Col. 1, Rows 1-8)
18	Dispense	  3 µl Water dry contact custom "Sample PCR" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
19	Drop DiTis	 DiTi Nested Waste LIHa

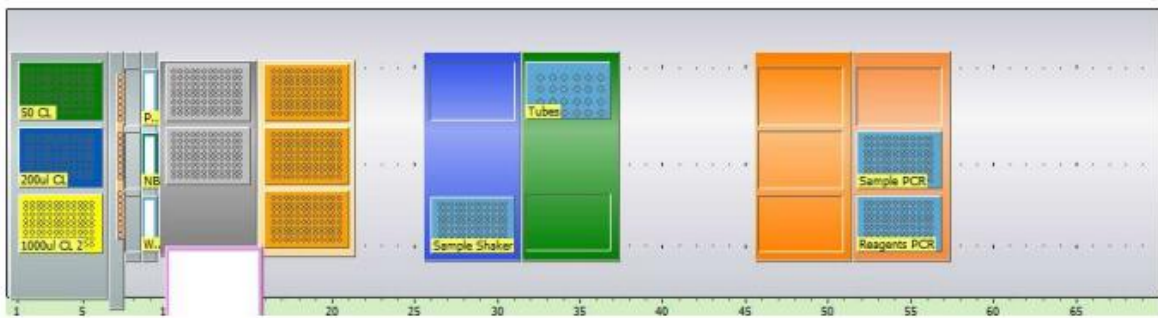
20	End Loop	"PBS"
21	Begin Loop	12 times "SDS"
22	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
23	Get DiTis	 DITI 50ul CL LiHa
24	Aspirate	  4 µl Water free dispense no detection "Reagents PCR" (Col. 2, Rows 1-8)
25	Dispense	  4 µl Water dry contact custom "Sample PCR" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
26	Drop DiTis	 DITI Nested Waste LiHa
27	End Loop	"SDS"
28	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '26,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
29	User Prompt	"Cover the plate!" " sound : no
30	inhecoMTC	StartShake(1,750,0 Circle antidockwise)
31	Start Timer	2
32	Wait for Timer	Timer 2 : 300 sec
33	inhecoMTC	StopShake(1)
34	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
35	User Prompt	"Resuspend manually if necessary!" sound : no
36	Group End	Step 1: Resuspend
37	Wait for Timer	Timer 1 : 1800 sec
38	Group	Step 2: Incubate
39	User Prompt	"Make sure to seal the plate!" sound : no
40	ROMA Vector	Vector "Open incubator", Grid 40, Site 2 (ROMA 1) move from Safe to End Position, from End to Safe Position

41	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '40,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
42	Heated Incubator1	CloseDoor()
43	Start Timer	1
44	Wait for Timer	Timer 1 : 600 sec
45	ROMA Vector	Vector "Open incubator", Grid 40, Site 2 (ROMA 1) move from Safe to End Position, from End to Safe Position
46	Transfer Labware	Source: Grid '40,' Site '2'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
47	Heated Incubator1	SetTemperature(2,0)
48	Heated Incubator1	CloseDoor()
49	User Prompt	"Spin plate if necessary! Make sure to unseal the plate! " sound : no
50	Begin Loop	12 times "Igepal"
51	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
52	Get DiTis	 DiTi 50ul CL LiHa
53	Aspirate	  2 µl Water free dispense no detection "Reagents PCR" (Col. 3, Rows 1-8)
54	Dispense	  2 µl Water dry contact custom "Sample PCR" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
55	Drop DiTis	 DiTi Nested Waste LiHa
56	End Loop	"Igepal"
57	Begin Loop	12 times "Enzyme"
58	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
59	Get DiTis	 DiTi 50ul CL LiHa
60	Aspirate	  1 µl Water free dispense no detection "Reagents PCR" (Col. 4, Rows 1-8)
61	Dispense	  1 µl Water dry contact custom "Sample PCR" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option


62	Drop DiTis	 DITI Nested Waste LIHa
63	End Loop	"Enzyme"
64	User Prompt	"Make sure to seal the plate!" sound : no
65	ROMA Vector	Vector "Open incubator", Grid 40, Site 3 (ROMA 1) move from Safe to End Position, from End to Safe Position
66	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '40', Site '3'; Narrow (ROMA 1)
67	Heated Incubator1	CloseDoor()
68	Start Timer	1
69	Wait for Timer	Timer 1 : 10800 sec
70	ROMA Vector	Vector "Open incubator", Grid 40, Site 3 (ROMA 1) move from Safe to End Position, from End to Safe Position
71	Transfer Labware	Source: Grid '40,' Site '3'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
72	Heated Incubator1	SetTemperature(3,0)
73	Heated Incubator1	CloseDoor()
74	User Prompt	"Dry the deglycosylation mix for 1 hour in a vacuum concentrator." sound : no
75	Group End	Step 2: Incubate
76	Group	Step 3: Label
77	Begin Loop	12 times "Water"
78	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
79	Get DiTis	 DITI 50ul CL LIHa
80	Aspirate	  2 µl Water free dispense no detection "Reagents PCR" (Col. 5, Rows 1-8)
81	Dispense	  2 µl Water dry contact custom "Sample PCR" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
82	Drop DiTis	 DITI Nested Waste LIHa
83	End Loop	"Water"








84	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '26,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
85	User Prompt	"Cover the plate!" " sound : no
86	inhecoMTC	StartShake(1,750,0 Circle antidodwise)
87	Start Timer	2
88	Wait for Timer	Timer 2 : 180 sec
89	inhecoMTC	StopShake(1)
90	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
91	User Prompt	"Check plate seating!" " sound : no
92	Begin Loop	12 times "Labeling colour"
93	Wash Tips	 3.0 + 4.0 ml
94	Get DiTis	 DiTi 50ul CL LIHa
95	Aspirate	  4 µl Labeling dispense no detection "Reagents PCR" (Col. 7, Rows 1-8)
96	Aspirate	  4 µl Labeling dispense no detection "Reagents PCR" (Col. 6, Rows 1-8)
97	Dispense	  8 µl Wet contact no detection "Sample PCR" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
98	Drop DiTis	 DiTi Nested Waste LIHa
99	End Loop	"Labeling colour"
100	Group End	Step 3: Label
101	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '26,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
102	User Prompt	"Cover the plate!" " sound : no
103	inhecoMTC	StartShake(1,750,0 Circle antidodwise)

104	Start Timer	2
105	Wait for Timer	Timer 2 : 300 sec
106	inhecoMTC	StopShake(1)
107	User Prompt	"Spin down the plate and put it in the oven at 37 °C for exactly 16 hours!" sound : no



Prilog 2. Konfiguracija stola i skripta u programu Evoware za proces deglikozilacije

1	Group	Step 0: Checklist
2	Wash Tips	 20 + 20 ml
3	Set DiTi position	DiTi 50ul CL LiHa Grid : 1, Site : 1, First position in labware : 1
4	Set DiTi position	DiTi 200ul CL LiHa Grid : 1, Site : 2, First position in labware : 1
5	Set DiTi position	DiTi 1000ul CL LiHa Grid : 1, Site : 3, First position in labware : 1
6	User Prompt	"1. Set a filter plate with biogel onto carrier onto pos 52-3. 2. Prepare at least 200ml of 80% ACN, 100ml 80%ACN + 0.1M TEA and 300ml of deionized water and set them on A200. 3. Put the sample plate onto carrier pos 52-1. 4. Put a clean 1.2ml short plate onto Hotel pos 58-1 and a carrier onto 52-2." sound : no
7	A200	TestConnection()
8	A200	TestMethod(CGE_deanup_01)
9	A200	TestMethod(CGE_deanup_02_acn_tea)
10	A200	TestMethod(CGE_deanup_02_flash)
11	A200	TestMethod(CGE_deanup_02_ACN)
12	A200	TestMethod(CGE_deanup_02_water)
13	A200	TestMethod(CGE_deanup_03)
14	Group End	Step 0: Checklist
15	Group	Step 0: Precondition plate
16	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '3'; Destination: Grid '69', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
17	A200	TestMethod(CGE_deanup_01)
18	A200	RunWasteMethod(CGE_deanup_01;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
19	A200	WaitForMethod()
20	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '3'; Narrow (ROMA 1)

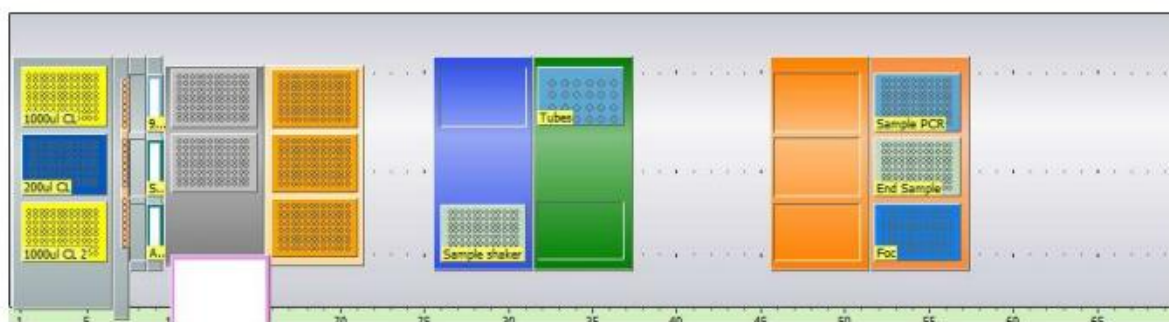
21	Group End	Step 0: Precondition plate
22	Group	Step 1: Cleanup
23	Begin Loop	12 times "transfer_sample"
24	Wash Tips	 3 + 4 ml
25	Get DiTis	 DiTi 200ul CL LIHa
26	Aspirate	  115 µl Water free dispense no detection "Sample PCR" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
27	Dispense	  115 µl Water free dispense no detection "Foc" (Col. 1, Rows 1-8) , 1 option
28	Drop DiTis	 DiTi Nested Waste LIHa
29	End Loop	"transfer_sample"
30	ROMA Vector	Vector "Grab Acroprep filter plate centered grip", Grid 52, Site 3 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
31	User Prompt	"Has the sandwich separated properly? Check the bottom for droplets!" sound : no
32	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
33	User Prompt	"Check the sandwich?" " sound : no
34	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '26', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
35	User Prompt	"Cover the plate only to prevent sample cross-contamination!" " sound : no
36	inhcoMTC	StartShake(1,450,0 Circle antidodwise)
37	Start Timer	2
38	Wait for Timer	Timer 2 : 300 sec
39	inhcoMTC	StopShake(1)
40	User Prompt	"Uncover the plate!" " sound : no

41	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '52', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
42	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
43	User Prompt	"Has the sandwich separated properly? Check the bottom for droplets!" sound : no
44	ROMA Vector	Vector "Grab Acroprep filter plate centered grip", Grid 52, Site 3 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
45	User Prompt	"Check the sandwich?" " sound : no
46	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '3'; Destination: Grid '69', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
47	A200	TestMethod(CGE_cleanup_02_flash)
48	A200	RunWasteMethod(CGE_cleanup_02_flash;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
49	A200	WaitForMethod()
50	Begin Loop	8 times "acn_tea"
51	If - Then	LOOP_acn_tea < 6
52	A200	TestMethod(CGE_cleanup_02_acn_tea)
53	A200	RunWasteMethod(CGE_cleanup_02_acn_tea;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
54	A200	WaitForMethod()
55	Else	
56	A200	TestMethod(CGE_cleanup_02_ACN)
57	A200	RunWasteMethod(CGE_cleanup_02_ACN;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
58	A200	WaitForMethod()
59	End If	
60	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52', Site '3'; Narrow (ROMA 1)
61	ROMA Vector	Vector "Grab Acroprep filter plate centered grip", Grid 52, Site 3 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position

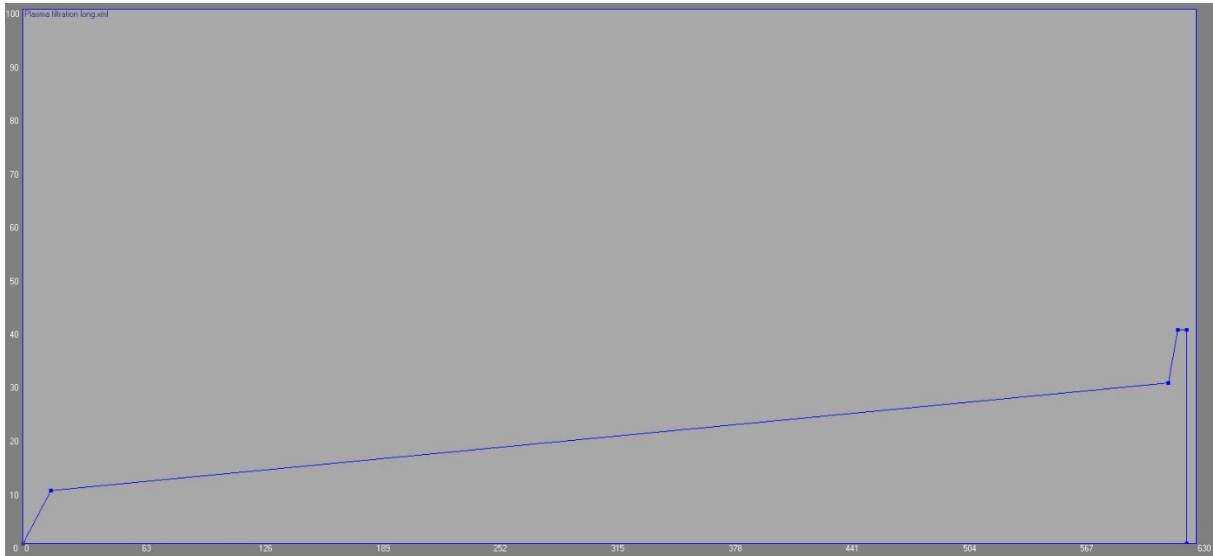
62	User Prompt	"Has the sandwich separated properly? Check the bottom for droplets!" sound : no
63	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
64	User Prompt	"Check the sandwich?" " sound : no
65	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '26', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
66	User Prompt	"Cover the plate only to prevent sample cross-contamination!" " sound : no
67	inhcoMTC	StartShake(1,450,0 Circle antidockwise)
68	Start Timer	2
69	Wait for Timer	Timer 2 : 120 sec
70	inhcoMTC	StopShake(1)
71	User Prompt	"Uncover the plate!" " sound : no
72	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '52', Site '2'; Narrow (ROMA 1)
73	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) open, from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
74	User Prompt	"Has the sandwich separated properly? Check the bottom for droplets!" sound : no
75	ROMA Vector	Vector "Grab Acroprep filter plate centered grip", Grid 52, Site 3 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
76	User Prompt	"Check the sandwich?" " sound : no
77	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '3'; Destination: Grid '69', Site '1'; Narrow (ROMA 1)
78	A200	TestMethod(CGE_cleanup_02_flash)
79	A200	RunWasteMethod(CGE_cleanup_02_flash;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
80	A200	WaitForMethod()

81	End Loop	"acn_tea"
82	A200	TestMethod(CGE_deanup_02_water)
83	A200	RunWasteMethod(CGE_deanup_02_water;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
84	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '6,' Site '5'; Narrow (ROMA 1)
85	Transfer Labware	Source: Grid '58,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
86	A200	WaitForMethod()
87	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '3'; Narrow (ROMA 1)
88	Group End	Step 1: Cleanup
89	Group	Step 2: Elution
90	ROMA Vector	Vector "Grab Acroprep filter plate centered grip", Grid 52, Site 3 (ROMA 1) move from Safe to End Position, grip, from End to Safe Position
91	User Prompt	"Has the sandwich separated properly?" sound : no
92	ROMA Vector	Vector "Drop filter plate onto 1ml Short Deepwell plate", Grid 52, Site 2 (ROMA 1) move from Safe to End Position, open, from End to Safe Position
93	User Prompt	"Check the sandwich? Check the bottom for droplets!" " sound : no
94	Transfer Labware	Source: Grid '52,' Site '2'; Destination: Grid '26,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
95	Begin Loop	2 times "Elute steps"
96	User Prompt	"Cover the plate only to prevent sample cross-contamination!" " sound : no
97	inhecoMTC	StartShake(1,450,0 Circle antidockwise)
98	Start Timer	2
99	Wait for Timer	Timer 2 : 300 sec
100	inhecoMTC	StopShake(1)

101	User Prompt	"Uncover the plate! " sound : no
102	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '69,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)
103	A200	TestMethod(CGE_cleanup_03)
104	A200	RunWasteMethod(CGE_cleanup_03;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
105	A200	WaitForMethod()
106	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '26,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
107	End Loop	"Elute steps"
108	User Prompt	"Cover the plate only to prevent sample cross-contamination! " sound : no
109	inhcoMTC	StartShake(1,450,0 Circle antidodwise)
110	Start Timer	2
111	Wait for Timer	Timer 2 : 300 sec
112	inhcoMTC	StopShake(1)
113	User Prompt	"Uncover the plate! " sound : no
114	Transfer Labware	Source: Grid '26,' Site '2'; Destination: Grid '69,' Site '1'; Narrow (ROMA 1)
115	A200	TestMethod(CGE_cleanup_02_flash)
116	A200	RunWasteMethod(CGE_cleanup_02_flash;StopOnAbort=False;LayoutDefinition=Range=1-96;Columns=)
117	A200	WaitForMethod()
118	Transfer Labware	Source: Grid '69,' Site '1'; Destination: Grid '52,' Site '2'; Narrow (ROMA 1)
119	Group End	Step 2: Elution



Prilog 3. Konfiguracija stola i skripta u programu Evoware za proces pročišćavanja



Pressure Profile

Pressure Profile File: **Protein g plate test profile 10% short** [Delete] [Save]

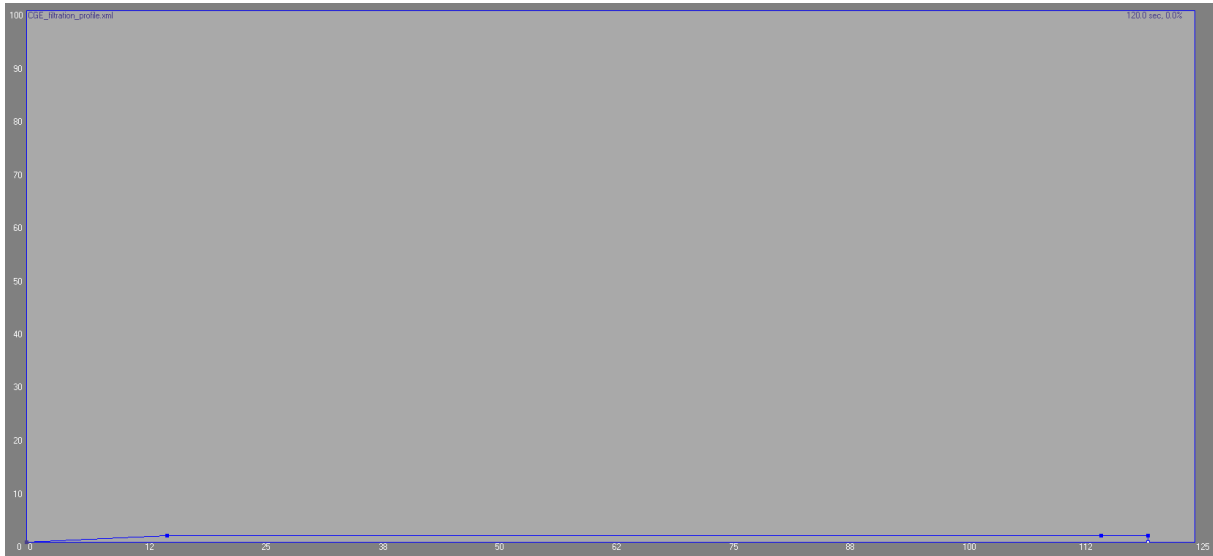
Pressure Profile Description:

Pressure Range: **High**

Time (s)	Pressure
0	0
8	10
16	12
24	14
32	15
40	16
48	17
56	18
64	19
72	20
80	0

Seconds < [0] [10] [20] [30] [40] [50] [60] [70] [80] [Ok]

1:09 PM 10-Mar-23



	Time	%
▶ Min	0.0	
	0.0	0.00
	15.0	1.25
	115.0	1.25
	120.0	1.25
	120.0	0.00
Max	125.0	

Prilog 4. Prikaz profila tlaka za Resolvex A200

```

1 import struct 74
2 import pkgutil 75
3 import csv 76
4 import io 77
5 import datetime 78
6 import functools 79
7 import hashlib 80
8 # import xml.etree.ElementTree as ET 81
9 82
10 83
11 __all__ = ('ABIF',) 84
12 85
13 86
14 BIG_ENDIAN = '>' 87
15 ENDIAN = BIG_ENDIAN 88
16 89
17 # Current Data Types 90
18 # Described on page 13. of the Manual 91
19 TYPES = '- B B H h l - f d - h2B 4B l1BB ? - - - p s'.split() 92
20 93
21 HEADER = f'{ENDIAN}4sh' 94
22 ITEM = f'{ENDIAN}4si2h4i' 95
23 96
24 DIGEST = '0ac522f4b022c72ced9227ff7056b40bcc6bf9c4113af14defd94128292594e3' \ 97
25 'bb7faa91d740576a249ab50da7ed400b9e42aa764b5d952bfb0b4f324cbb12d6' 98
26 99
27 100
28 def read_tags(): 101
29     package = __name__.rsplit('.', 1)[0] 102
30     fh = io.StringIO(pkgutil.get_data(package, 'tags.csv').decode()) 103
31 104
32     digest = hashlib.sha512(fh.read()).hexdigest() 105
33     assert digest == DIGEST 106
34     fh.seek(0) 107
35 108
36     reader = csv.reader(fh, delimiter='\t') 109
37     next(reader) 110
38     tag2desc = {} 111
39     for line in reader: 112
40         line = [field for field in line if field] 113
41         tag, num, type_, desc = line 114
42         if num.isdigit(): 115
43             num = int(num) 116
44         tag2desc[(tag, num)] = desc 117
45     return tag2desc 118
46 119
47 120
48 class ABIFMeta(type): 121
49     tag2desc = read_tags() 122
50 123
51     def __new__(cls, name, bases, namespace, **kwargs): 124
52         tag2desc = cls.tag2desc 125
53         read = namespace['read'] 126
54         for tag, num in cls.tag2desc: 127
55             desc = tag2desc[tag, num] 128
56             name = tag + str(num) 129
57 130
58             if name in namespace: 131
59                 method = namespace[name] 132
60                 method.__doc__ = desc 133
61 134
62             else: 135
63                 try: 136
64                     method = functools.partial(namespace[tag], number=num) 137
65 138
66                 except KeyError: 139
67                     method = functools.partial(read, tag=tag, number=num) 140
68 141
69                 method = property(method, doc=desc) 142
70 143
71             namespace[name] = method 144
72 145
73         for tag, num in tag2desc:

```

```

    if num == 1:
        namespace[tag] = namespace[tag + '1']

    return super().__new__(cls, name, bases, namespace, **kwargs)

class ABIF(metaclass=ABIFMeta):
    '''a ABIF file reader

    ABIF (Applied Biosystems Genetic Analysis Data File Format) is a binary
    file format used by genetic analyzers from Applied Biosystems (today
    Thermo). Files are designated as ABIF encoded by *.ab1* or *fsa* name
    extension.

    ABIF encoding can be described as directory of tag, value pairs,
    where tags are 4 character plus a single digit designation.
    For example 'DATA1' is described as *Channel 1 raw data*.

    For some tags single digit can be replaced with multidigit number,
    for example 'DATA105' represents *Raw data for dye 5*,
    while 'DATA5' is reserved for *Voltage, measured (decavolts)*.

    There are number of tags using unlimited number (1-N) designation,
    for example 'Of5CN' for *List of scans that are marked off scale in
    Collection*, with number designation from 1 to N.

    '''
    _tag2desc = read_tags()

    def __init__(self, fileobj):
        '''ABIF(fileobj)

        Parameters
        -----
        fileobj
            filename or file like object

        '''
        if isinstance(fileobj, str):
            self.filename = fileobj
            self.fileobj = None
        else:
            self.filename = None
            self.fileobj = fileobj

        self.closed = None

    @classmethod
    def describe(cls, tag, number=None):
        tag2desc = cls._tag2desc
        if number is None:
            tag, number = tag[:4], tag[4:]
            if number.isdigit():
                number = int(number)
            else:
                number = 1
        return tag2desc.get((tag, number)) or tag2desc.get((tag, 'N'))

    def open(self):
        if self.filename:
            self.fileobj = open(self.filename, 'rb')

        self._read_header()
        self._read_directory()

        self.closed = False

    def close(self):
        if self.closed is False:
            self.fileobj.close()

```

```

146 def __enter__(self):
147     if self.closed is None or self.closed is True:
148         self.open()
149     return self
150
151 def __exit__(self, type_, value, traceback):
152     self.close()
153
154 def _read_header(self):
155     abif, version = self._unpack(HEADER, offset=0)
156     assert abif == b'ABIF'
157     self.version = version
158
159     directory = self._unpack(ITEM)
160     tdir, one, _, _, elements, size, offset, _ = directory
161
162     assert tdir == b'tdir'
163     assert one == 1
164
165     self._dir_offset = offset
166     self._dir_elements = elements
167
168 def _read_directory(self):
169     self.fileobj.seek(self._dir_offset)
170
171     self.directory = {}
172     for i in range(self._dir_elements):
173         item = self._unpack(ITEM)
174         tag, num, type_, _, elements, size, offset, _ = item
175         tag = tag.decode()
176         self.directory[tag, num] = (type_, elements, size, offset)
177
178 def _unpack(self, format, packed=None, offset=None):
179     if offset:
180         assert packed is None
181         self.fileobj.seek(offset)
182
183     if packed is None:
184         packed = self.fileobj.read(struct.calcsize(format))
185
186     else:
187         packed = packed[:struct.calcsize(format)]
188
189     data = list(struct.unpack(format, packed))
190
191     if len(data) == 1:
192         data = data[0]
193
194     try:
195         data = data.decode()
196
197     except AttributeError:
198         pass
199
200     else:
201         if data.endswith('\x00'):
202             data = data[:-1]
203
204     return data
205
206 def __getattr__(self, attr):
207     if attr == 'directory':
208         raise ValueError(f"{self} is not opened.")
209
210     if len(attr) > 4:
211         tag, num = attr[:4], attr[4:]
212         num = int(num)
213
214         return self.read(tag, num)
215
216     else:
217         raise AttributeError
218
219 def read(self, tag, number):
220     num = number
221     try:
222         type_, elements, size, offset = self.directory[tag,
223
224     except KeyError:
225         raise AttributeError
226
227     user = False
228     if type_ >= 1024:
229         type_ = 1
230         user = True
231
232     if elements == 1:
233         fmt = f'{{ENDIAN}}{{TYPES[type_]}}'
234
235     else:
236         fmt = f'{{ENDIAN}}{{elements}}{{TYPES[type_]}}'
237
238     if size <= 4:
239         value = struct.pack(f'{{ENDIAN}}l', offset)
240         value = self._unpack(fmt, packed=value)
241
242     else:
243         value = self._unpack(fmt, offset=offset)
244
245     if type_ == 10:
246         value = datetime.date(*value)
247
248     elif type_ == 11:
249         value = datetime.time(*value)
250
251     elif user:
252         value = bytes(value)
253
254     return value
255
256 @property
257 def CpEP1(self):
258     value = self.read('CpEP', 1)
259     return value
260
261 def DyeB(self, number):
262     value = self.read('DyeB', number)
263     return chr(value)
264
265 @property
266 def APRX1(self):
267     value = self.read('APRX', 1)
268     return bytes(value).decode()
269
270 @property
271 def FWO_1(self):
272     value = self.read('FWO_', 1)
273     return bytes(value).decode()
274
275 @property
276 def RMDX1(self):
277     value = self.read('RMDX', 1)
278     return bytes(value).decode()
279
280 @property
281 def MODL1(self):
282     value = self.read('MODL', 1)
283     return bytes(value).decode()

```

Prilog 5. Prikaz programa Pyabif za konverziju podataka