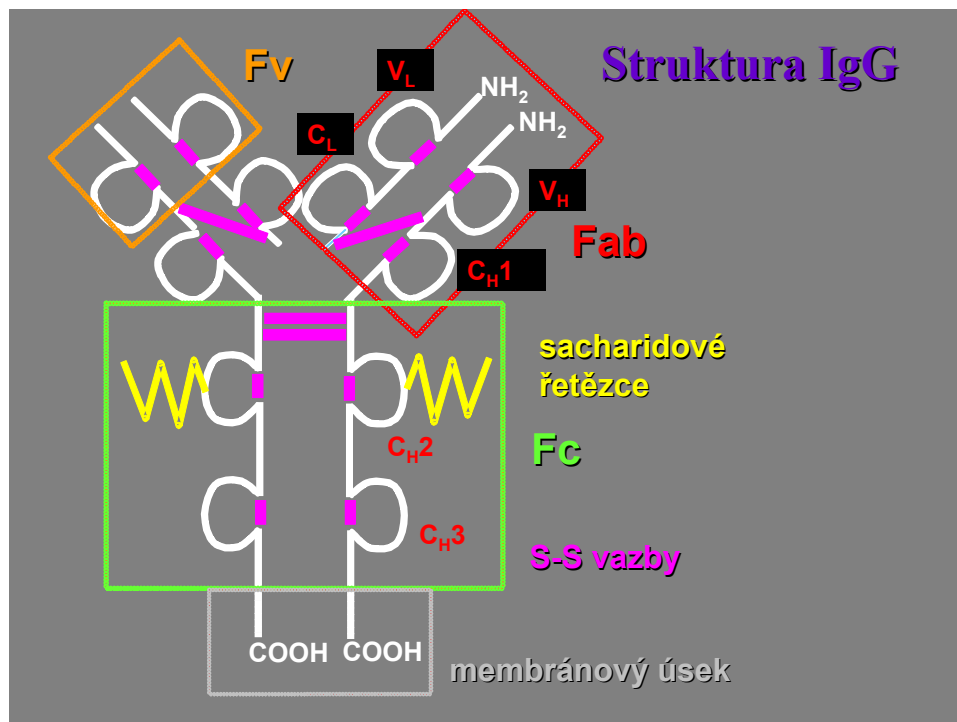
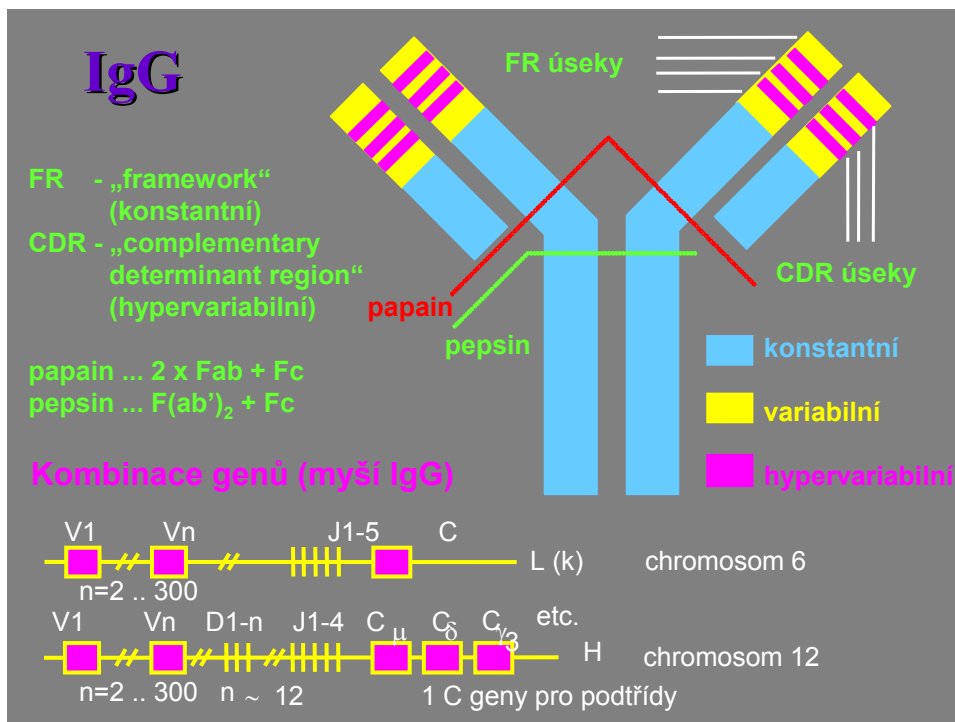
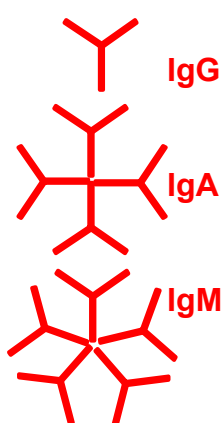


Imunosensory





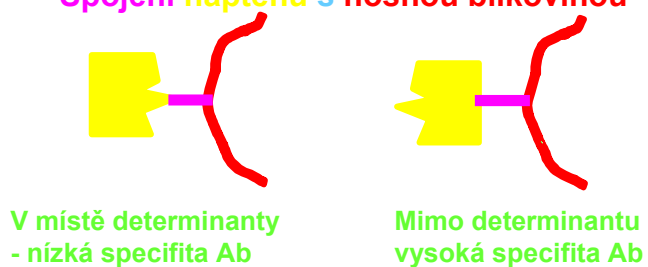
Immunoglobuliny



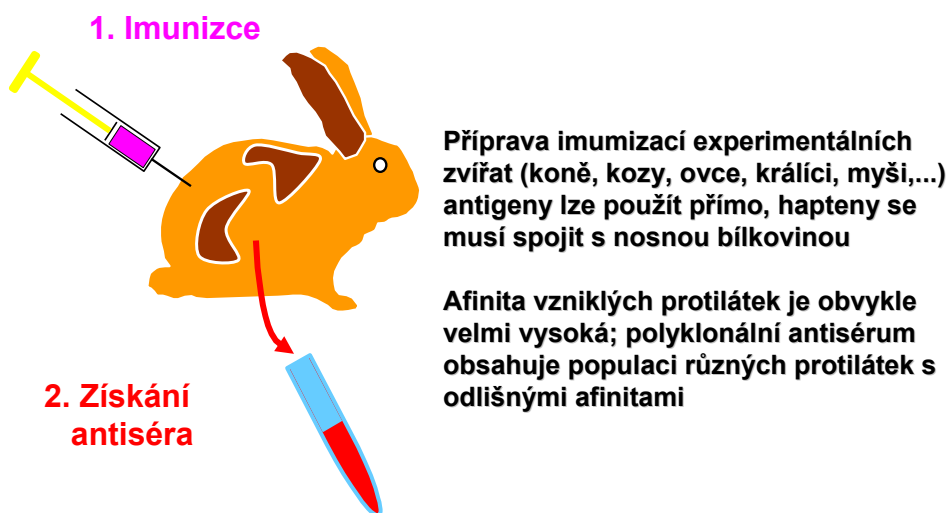
Vlastnosti protilátek (myší třídy)

Třída	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
M (kDa)	170	180	190	160	900
H řetězec	α	δ	ε	γ	μ
Sacharid (%)	7-11	12-15	12	2-3	9-12

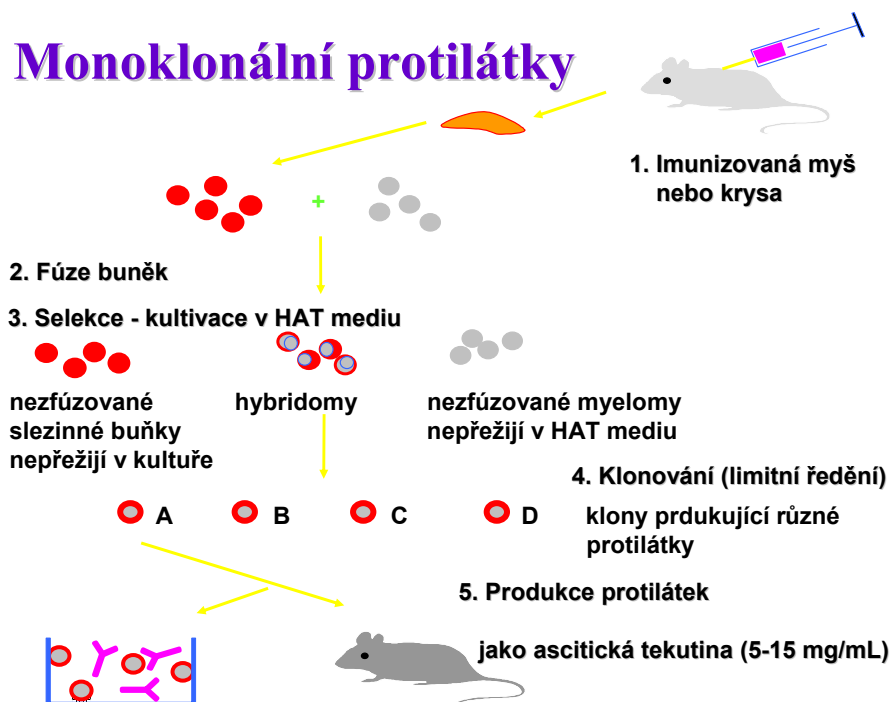
Spojení haptenu s nosnou bílkovinou



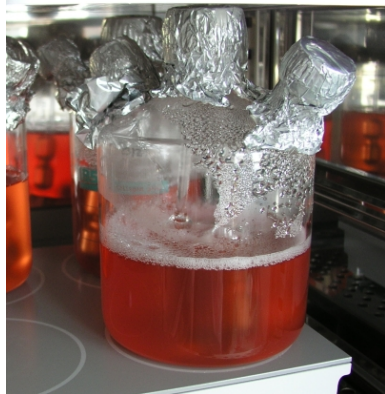
Polyklonální protilátky



Monoklonální protilátky



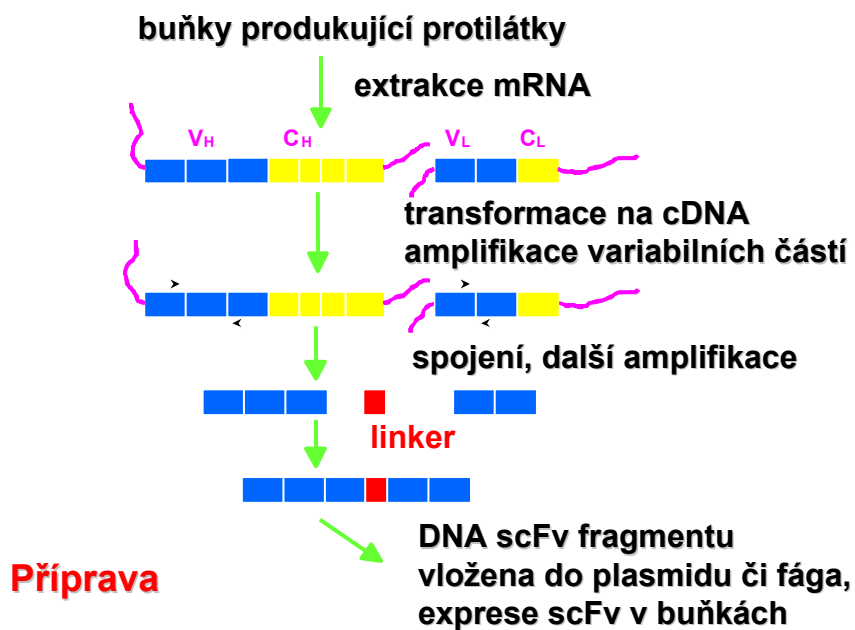
Výroba monoklonálních Ab



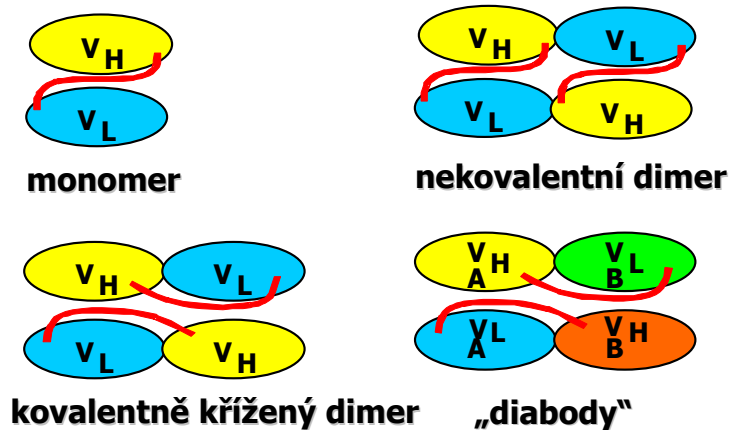
převedení výroby ascitické tekutiny (produkce protilátky in vivo v myších) do in vitro podmínek (produkce v tkáňových kulturách)

výroba velkých šarží (gramová množství) v kontinuálních fermentačních systémech (ověření procesu, výběr vhodných médií)

Rekombinantní protilátky



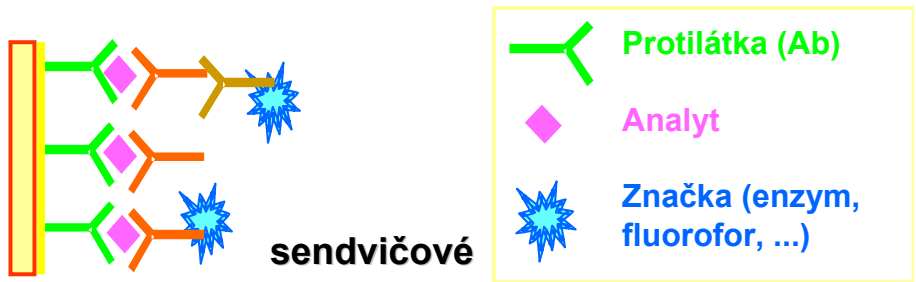
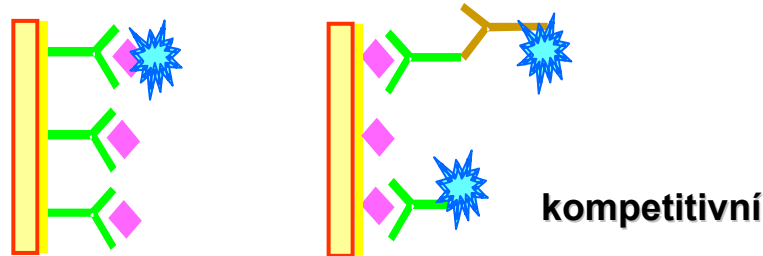
Formy scFv molekul



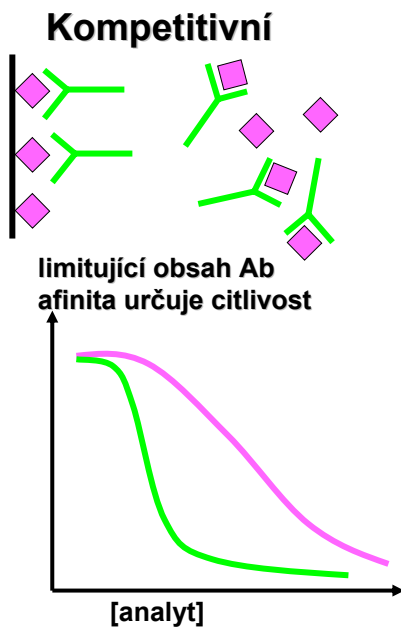
rAb z fágových knihoven

- fágová knihovna: semisyntetická scFv V_H+V_L, kolekce scFv phagemidů připravenou ze syntetických V-genových segmentů exprimovaných na povrchu filamentózního fága
- selekce scFv protilátek
- konjugát analytu s nosným proteinem se smíchá s polyklonální populací rekombinantních fágů, po inkubaci se komplexy analyt-rekombinantní fág zachytí na povrch magn. částic (např. interakce avidin-biotin), nenavázané fágy se odstraní promytím
- navázané, tedy antigen-specifické fágy se uvolní z magn. částic a použijí poté k infikování buněk *E. coli*
- specifickými fágy infikované *E. coli* buňky jsou poté namnoženy a infikovány helper fágem (spustí replikaci rekombinantních fágů)
- namnožené fágy jsou poté koncentrovány precipitací polyethylen glykolem a použity v dalším kole selekce uvedné výše (4 kola)
- ELISA testem se vyberou monoklonálními fágy s reaktivitou výhradně proti molekule analytu

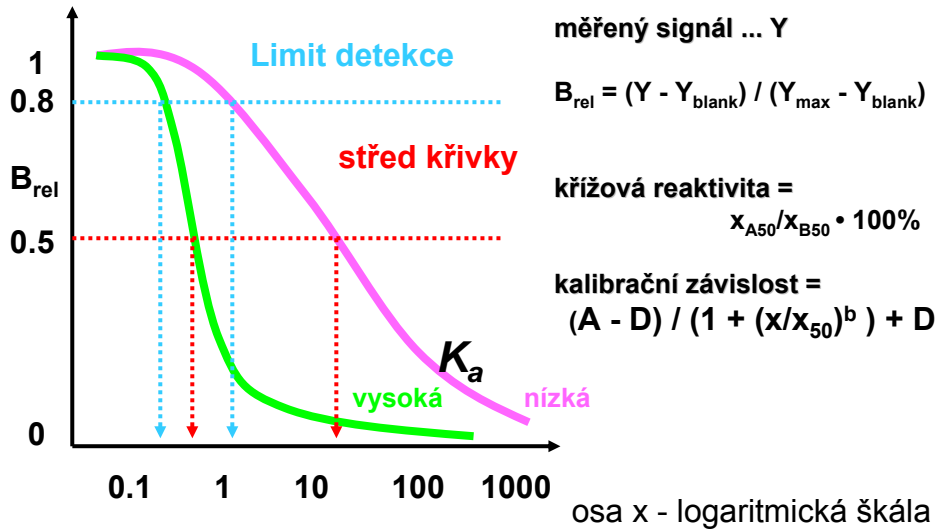
Formáty imunostanovení



Imunostanovení

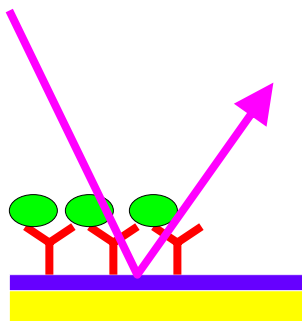


Parametry imunostanovení

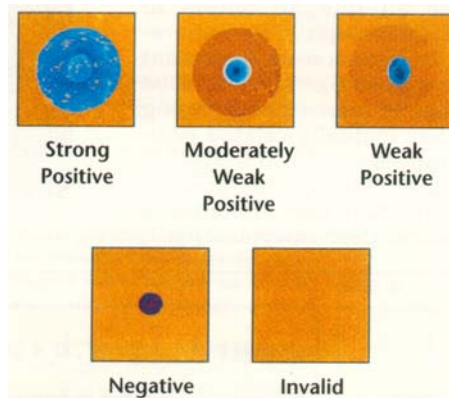


Optické imunostanovení

změna tloušťky vrstvy vede ke změně barvy

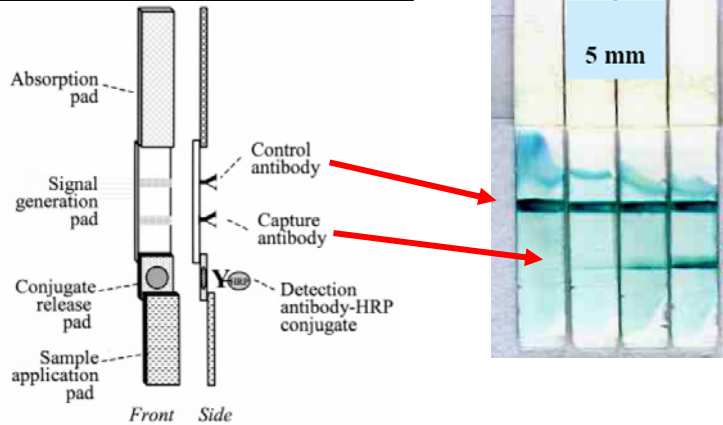


analyt
biovrstva
optická vrstva
Si „wafer“



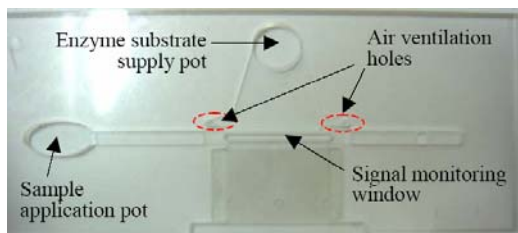
Přímé vizuální hodnocení

ELISA-on a strip

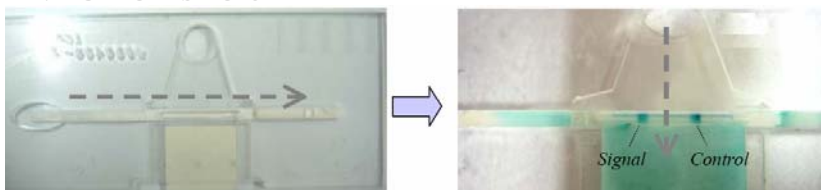


- **imunostripy** – samovolný pohyb roztoků v membránovém systému prostřednictvím kapilárních sil
- **záchytné zóny**, zviditelnění pomocí barvotvorné enzymové reakce, případně zlaté nanočástice (červené)
- **vizuální vyhodnocování**

ELISA-on a chip

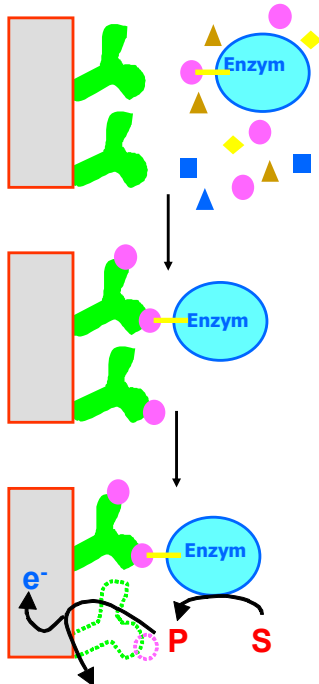
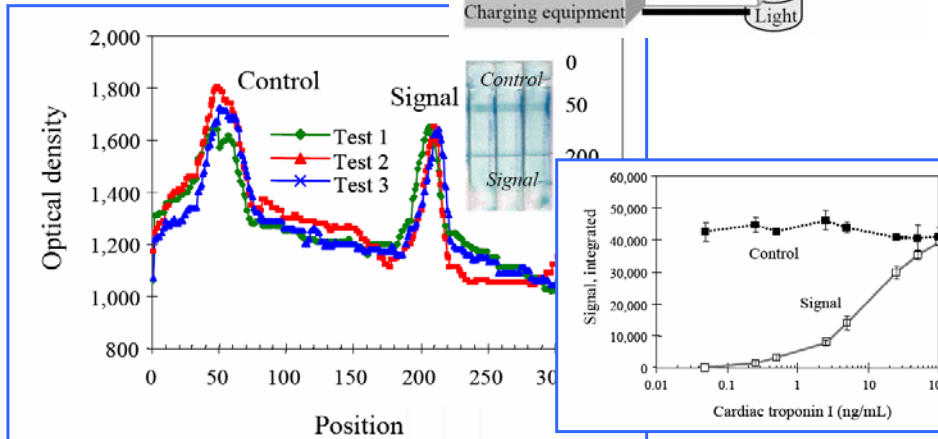
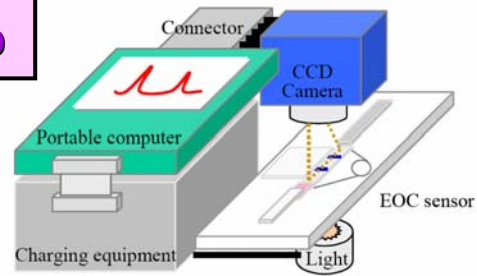


- **plastový přípravek („čip“)** pro vložení úzkého imunostripu – zlepšená reprodukovatelnost transportu látek
- **pohyb vzorku jedním směrem, pohyb substrátové směsi v kolmém směru**



ELISA-on a chip

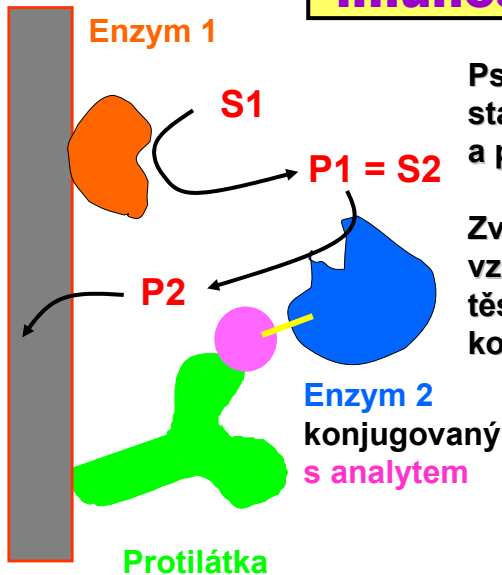
- vyhodnocovací systém na bázi CCD
- zlepšená reprodukovatelnost díky srovnání odezvy kontrolní a měřicí zóny



Elektrochemická imunostanovení

1. Inkubace se vzorkem a s „tracerem“
2. Separace, promytí
3. Přídavek substrátu (inkubace)
4. Změření signálu

Enzymové „tunelové“ imunostanovení



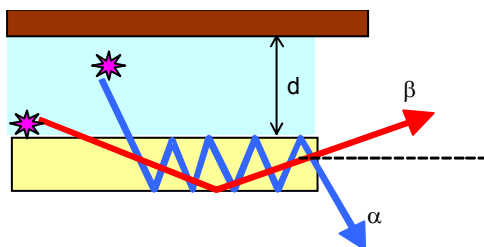
Pseudohomogenní stanovení - bez separace a promývacích kroků

Zvýšená reakční odezva vzniká na povrchu důsledkem těsného kontaktu dvou kooperujících enzymů

FCFD

fluorescence capillary fill device

- je optický afinitní imuno/biosensor, využívá k detekci fluorescentní značku (fluorofor)
- značka emituje světlo do planárního světlovodu, nesoucího imobilizovaný bioligand
- základem jsou dvě paralelní skleněné destičky vytvářející pracovní prostor o tloušťce pouze 0.1 mm ("kapilární" rozměr), což umožňuje samovolné naplnění definovaným objemem vzorku.

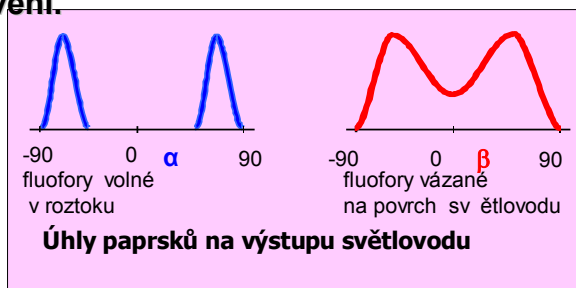


Odlišení volného a vázaného fluoroforu

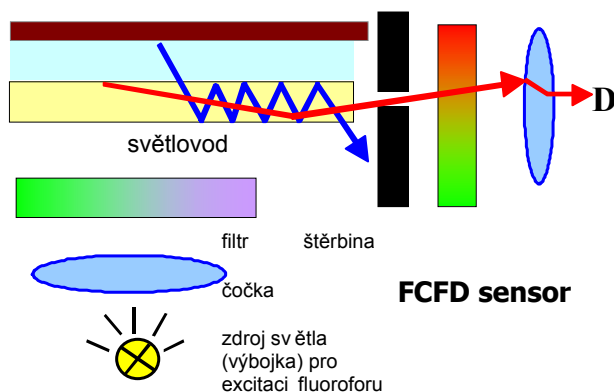
- po afinitní interakci je část fluoroforu volně v roztoku a část je vázána v komplexu s bioligandem na povrchu světlovodu
- emitované světlo (fluorescence) z roztoku vstupuje do světlovodu jen pod omezenými úhly (větší než kritické), světlo z vázaných fluoroforů může vstupovat i pod menšími úhly (fluorofor je vázán v penetrační oblasti exponenciální vlny).

FCFD

- po výstupu světla z konce světlovodu pak lze podle výstupního úhlu odlišit fluorescenci z volného roztoku a z povrchové oblasti, tím lze kvantitativně určit podíl vázaného fluoroforu bez separačního kroku - homogenní stanovení
- Výstupní úhly světla emitovaného vázaným a volným fluoroforem (např. fluorescein), se liší, což umožňuje jednoduše rozlišit vázanou a volnou formu fluoroforu, a tak vyhodnotit průběh homogenního imunochemického stanovení.

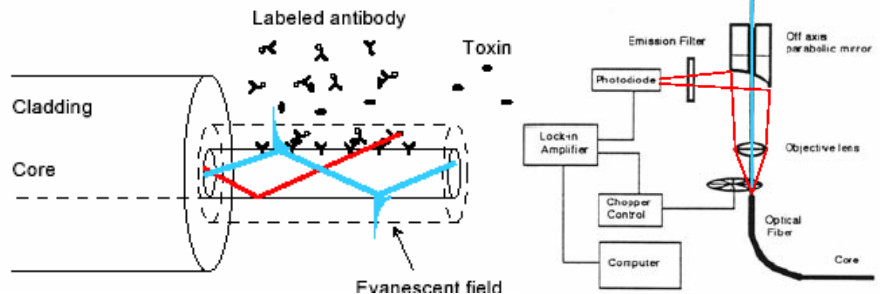


FCFD



- zdroj světla - výbojka fotoblesku, omezení výstupních úhlů se provede pomocí štěrbin, další součásti filtry, čočky a detektor
- zařízení je jednoduché, levné, snadná masová výroba, na jedno použití
- malé vzdálenosti v systému sensoru zkracují dobu odezvy, kterou pak primárně určuje kinetika vazebné interakce, ne transportní pochody (5 min kompetitivní, 15 sendvičové stanovení)
- není třeba odměřovat vzorek (přímo krev, sérum, moč), nejsou nároky na manipulaci.

Excitace fluoroforů evanescentní vlnou



- imunoreakce probíhá na povrchu světlovedné vrstvy
- evanescentní vlna se šíří mimo světloved, kde excituje tam přítomné fluorescentní značky, navázané v průběhu imunostanovení
- světloved pak dále slouží jako „sběrač“ záření emitovaného při fluorescenci

Imunosensory - enzymové značky

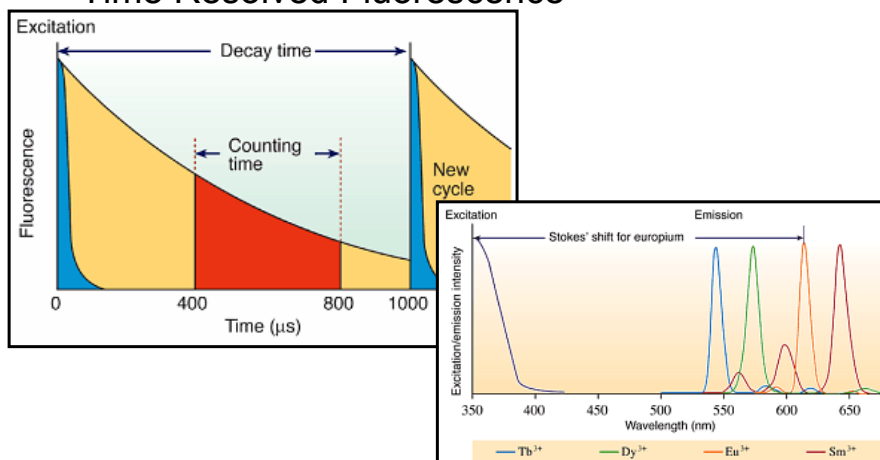
- **peroxidasa (HRP)**
 - substráty - vždy peroxid vodíku plus další oxidovatelné látky:
 - 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) měření fotometricky při 450 nm
 - 2,2'-azino-di(3-ethyl)benzthiazolin sulfonová kys. (ABTS) při 650 nm
 - 5-aminosalicylová kyselina (ASA) při 450 nm
 - elchem: jodid, hydrochinon, ferrocen, ASA, ...
- **lakasa**
 - obdobná HRP, ale stačí jí kyslík místo peroxidu vodíku
- **alkalická fosfatasa (ALP)**
 - *p*-nitrofenylfosfát (PNPP), hydrolysou vznikající *p*-nitrofenol se stanovuje fotometricky v alkalické prostředí kolem 405 nm
 - *p*-aminofenylfosfát (PAPP), vzniklý aminofenol se oxiduje na elektrodě
- **β -galaktosidasa**
 - *o*-nitrofenyl- β -D-galaktosid (ONPG), hydrolysou vzniklý *o*-nitrofenol se měří při 420 nm
- **ureasa**
 - močovina, změna pH vyvolaná hydrolysou se měří pomocí indikátoru bromkresolová modř při 588 nm, nebo potenciometricky (LAPS)
- **glukosa oxidasa**
 - velmi stabilní, měří se generovaný peroxid vodíku
- **acetylcholinesterasa**
 - vysoké číslo přeměny

Imunosensory - fluorescenční značky

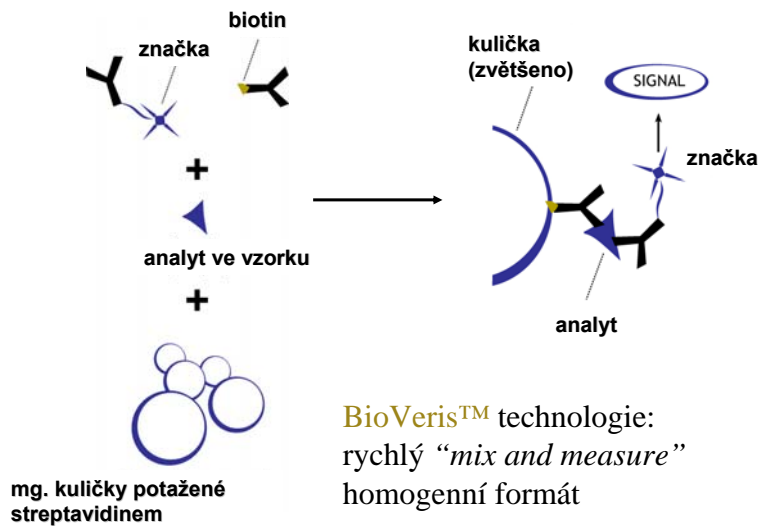
- fluorescein, tetramethylrhodamin
 - klasické, dostupné v aktivované formě (NHS, biotin, ...)
- Cy5, Cy3 - cyaniny, NIR 650/667 nm
 - levná instrumentace
- QD „quantum dots“
 - anorganické nanočástice obsahující volné elektrony, s velikostí narůstá vlnová délka emise, stabilita a vysoké výtěžky, velké Stokesovy posuny

Imunosensory - fluorescenční značky

- cheláty lanthanidů (Eu, Sm, Dy)
 - dlouhá životnost excitovaného stavu
 - Time Resolved Fluorescence

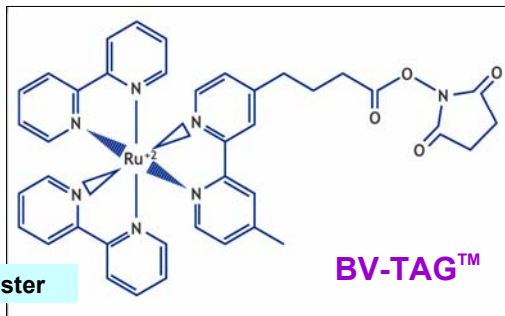


Elektrochemiluminiscence



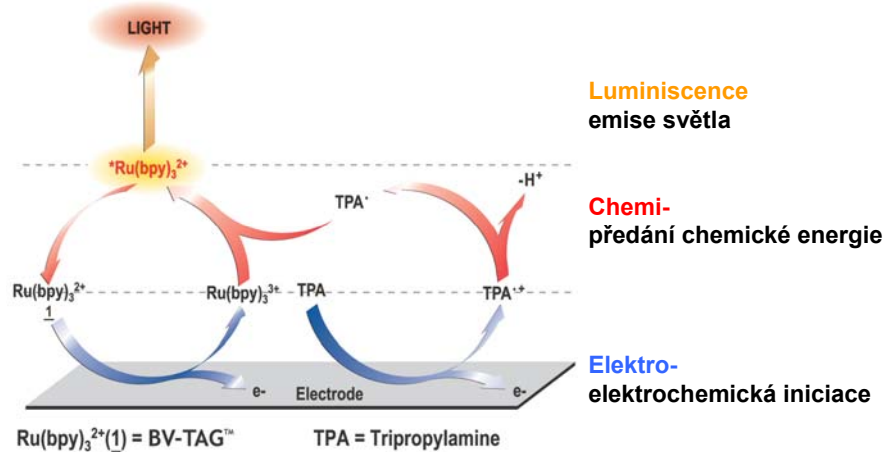
ECL značka

ruthenium(II) tris(bipyridin) NHS ester



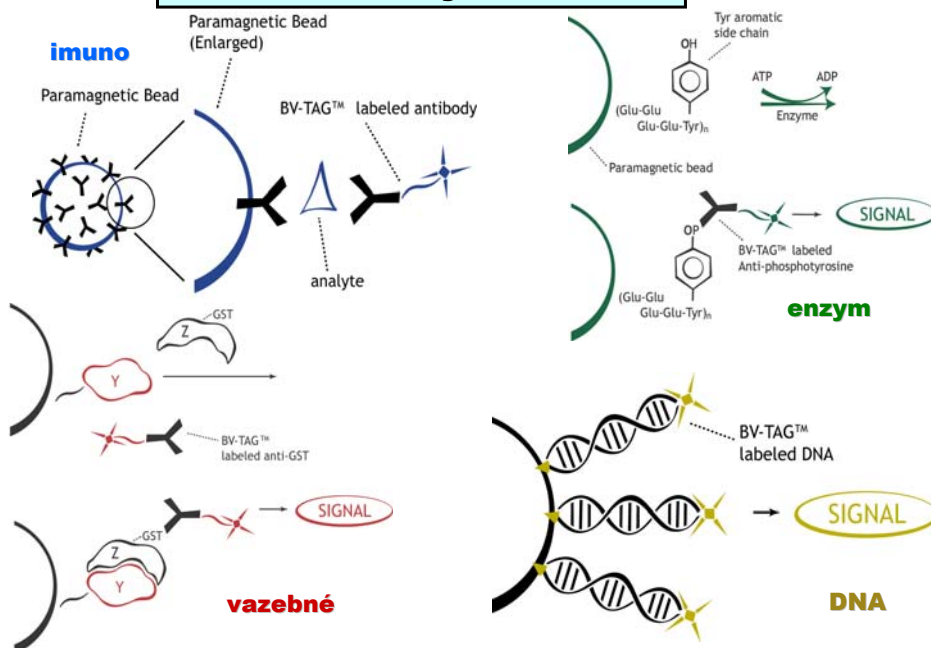
- Stabilní neizotopická značka, různé formy pro různé biomolekuly:
- BV-Tag-NHS-ester aminy (bílkoviny)
- BV-Tag-fosforamid fosfokupiny (nukleové kyseliny)
- BV-Tag-maleimid thioy
- BV-Tag-hydrazid sacharidy
- BV-Tag-amin karboxyly

ECL reakce

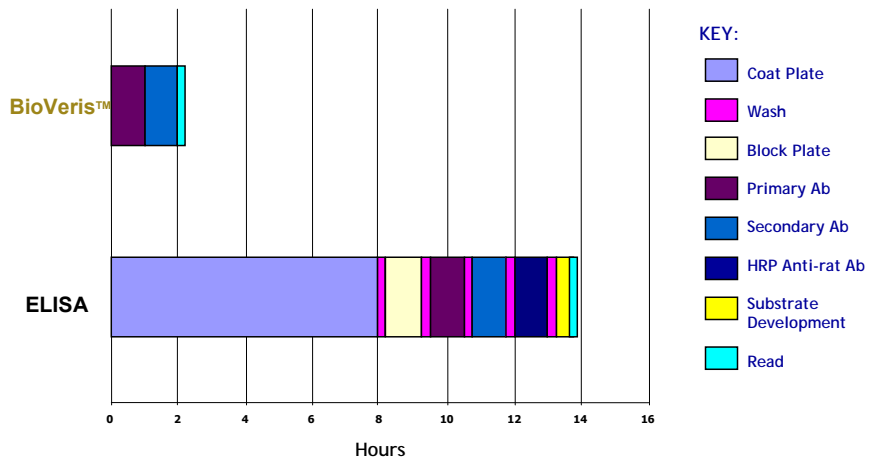


- ruthenium a TPA jsou oxidovány po aplikaci napětí na elektrodu
- TPA⁺ ztrácí proton, redukuje Ru³⁺ na Ru²⁺, které z excitovaného stavu přechází do základního za vyzáření fotonu
- Ru se nespotřebává – recykluje – zesilovací mechanismus – zvýšení citlivosti stanovení

Různé formáty stanovení



Homogenní formát stanovení



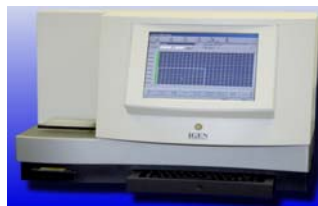
- Shorter Incubation Times
- Reduced Assay Steps

Moving BioVeris™ Technology Forward

BioVeris Detection System

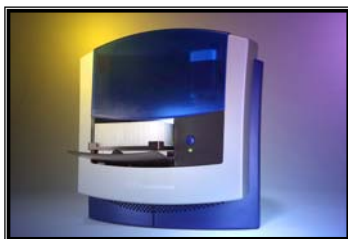


M-SERIES® 384 Analyzer

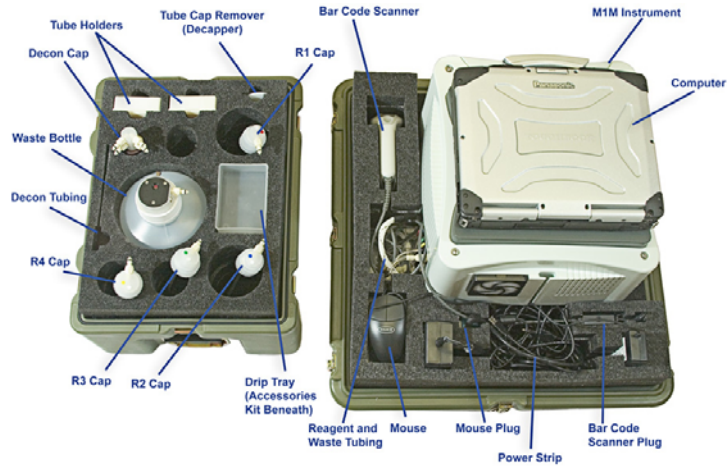


M-SERIES M1M Analyzer

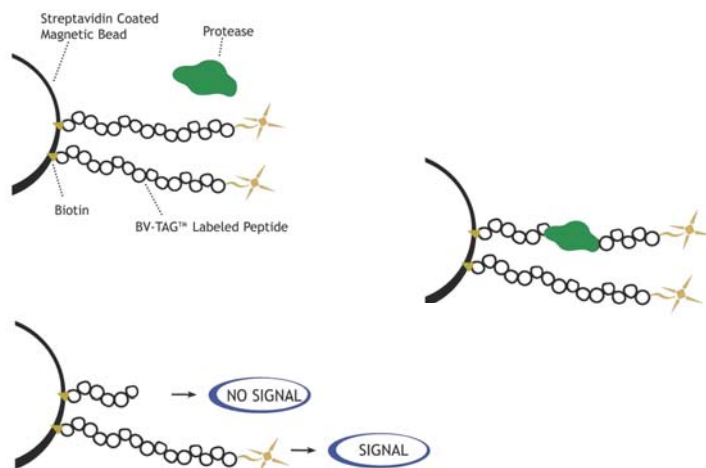
M-SERIES M1R Analyzer



M1M System in Transport Cases




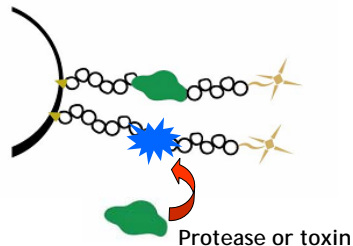
Enzymatic Assays for Toxins



Enzymatic Assays for Screening Drug Targets

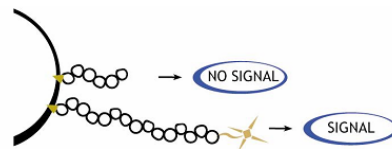
A) Protease binds to substrate

B) Compound  in drug library recognizes substrate and binds, preventing toxin from binding



A) Substrate is cleaved, no signal

B) Compound inhibits protease activity of toxin, signal is generated and viable drug candidate identified!



Imunosensory - co lze měřit

- teoreticky každý analyt, pro který ...
 - jsou k dispozici příslušné protilátky
 - případně již existuje ELISA stanovení
 - lze připravit protilátky klasickými postupy
 - lze připravit rekombinantní protilátky pomocí genetické knihovny

Imunosensory - příklady stanovení

- **klinická oblast**
 - markery: albumin, apolipoprotein, hCG, hLH, thyroxin, fetoprotein, hlgE, troponin, FABP, PSA, HBsA, ...
 - léčiva: amfetamin, digoxin, fenytoin, theophylin, ...
 - drogy: kokain, heroin, ...
- **životní prostředí**
 - pesticidy: triaziny (atrazin), fenoxycyklohexanové k. (2,4-D), organochlorové (acetochlor, DDT)
 - toxické látky: mikrocystiny, polychlorované bifenyly (PCB)
- **potravinářství**
 - bakterie: *Listeria*, *Cryptosporidium*, *Salmonella*, *E. coli* O157H7
 - kontaminanty: antibiotika (penicilin), aflatoxiny
- **vojenství**
 - bakterie, viry, toxiny