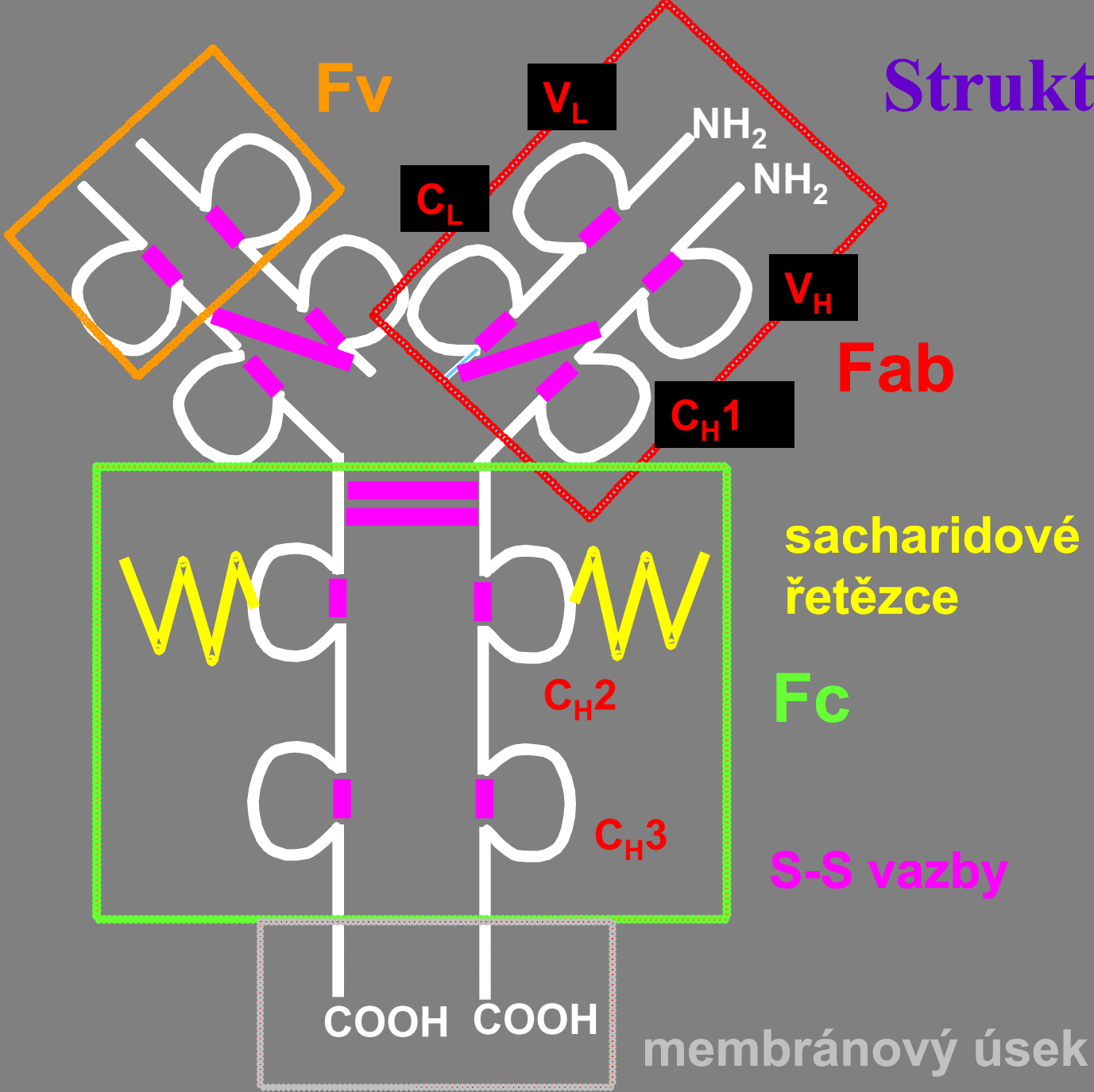


Imunosensory



Struktura IgG

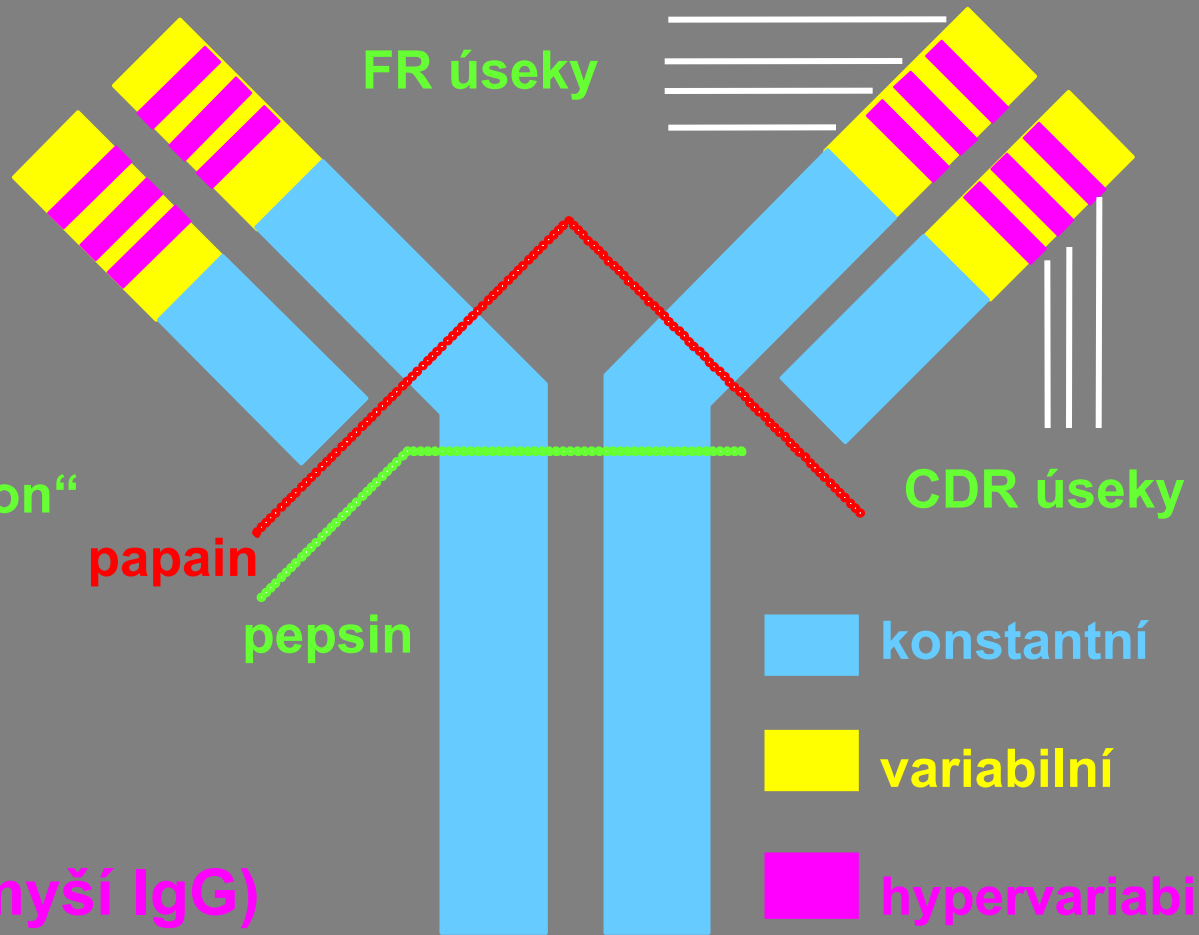
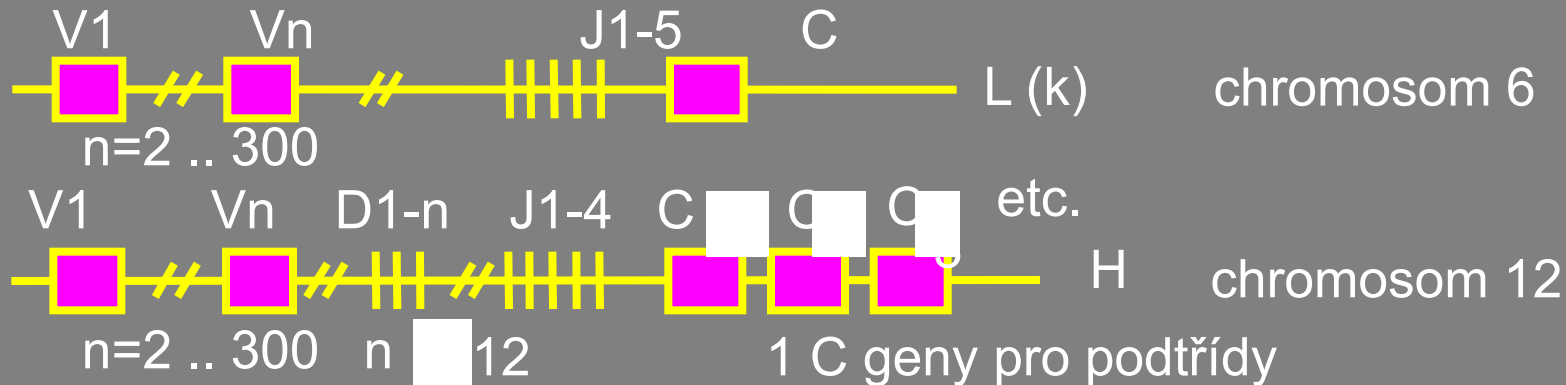


IgG

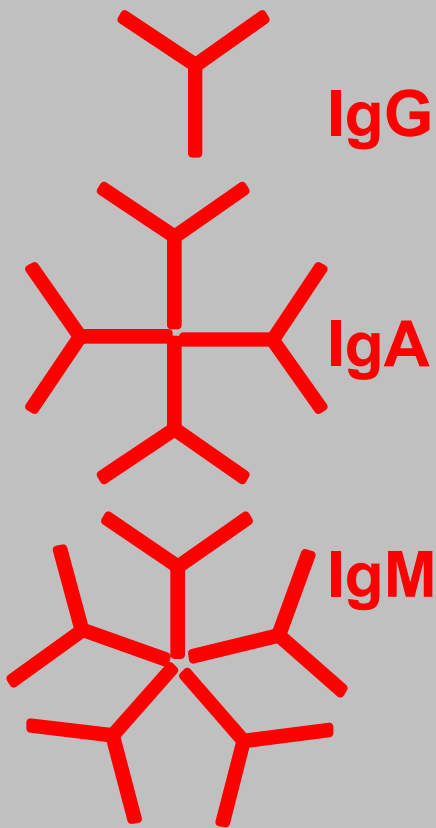
FR - „framework“
(konstantní)
CDR - „complementary
determinant region“
(hypervariabilní)

papain ... 2 x Fab + Fc
pepsin ... F(ab')₂ + Fc

Kombinace genů (myší IgG)



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



V místě determinanty
- nízká specifita Ab

Mimo determinantu
vysoká specifita Ab



Polyklonální protilátky

1. Imunizace



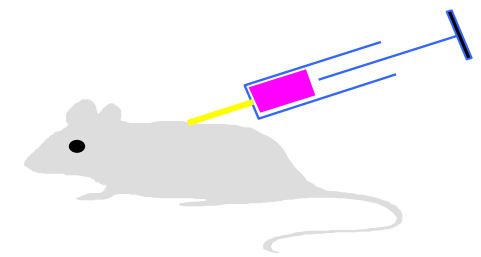
2. Získání antiséra

Příprava imunizací experimentálních zvířat (koně, kozy, ovce, králíci, myši,...) antigeny lze použít přímo, hapteny se musí spojit s nosnou bílkovinou

Afinita vzniklých protilátek je obvykle velmi vysoká; polyklonální antisérum obsahuje populaci různých protilátek s odlišnými afinitami



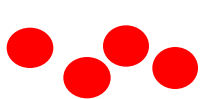
Monoklonální protilátky



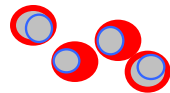
1. Imunizovaná myš
nebo krysa

2. Fúze buněk

3. Selekce - kultivace v HAT mediu



nezfúzované
slezinné buňky
nepřežijí v kultuře



hybridomy



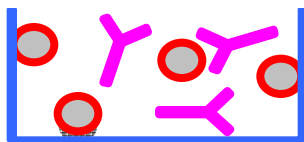
nezfúzované myelomy
nepřežijí v HAT mediu

4. Klonování (limitní ředění)

klony produkující různé
protilátky



5. Produkce protilátek



jako ascitická tekutina (5-15 mg/ml)



Výroba monoklonálních Ab



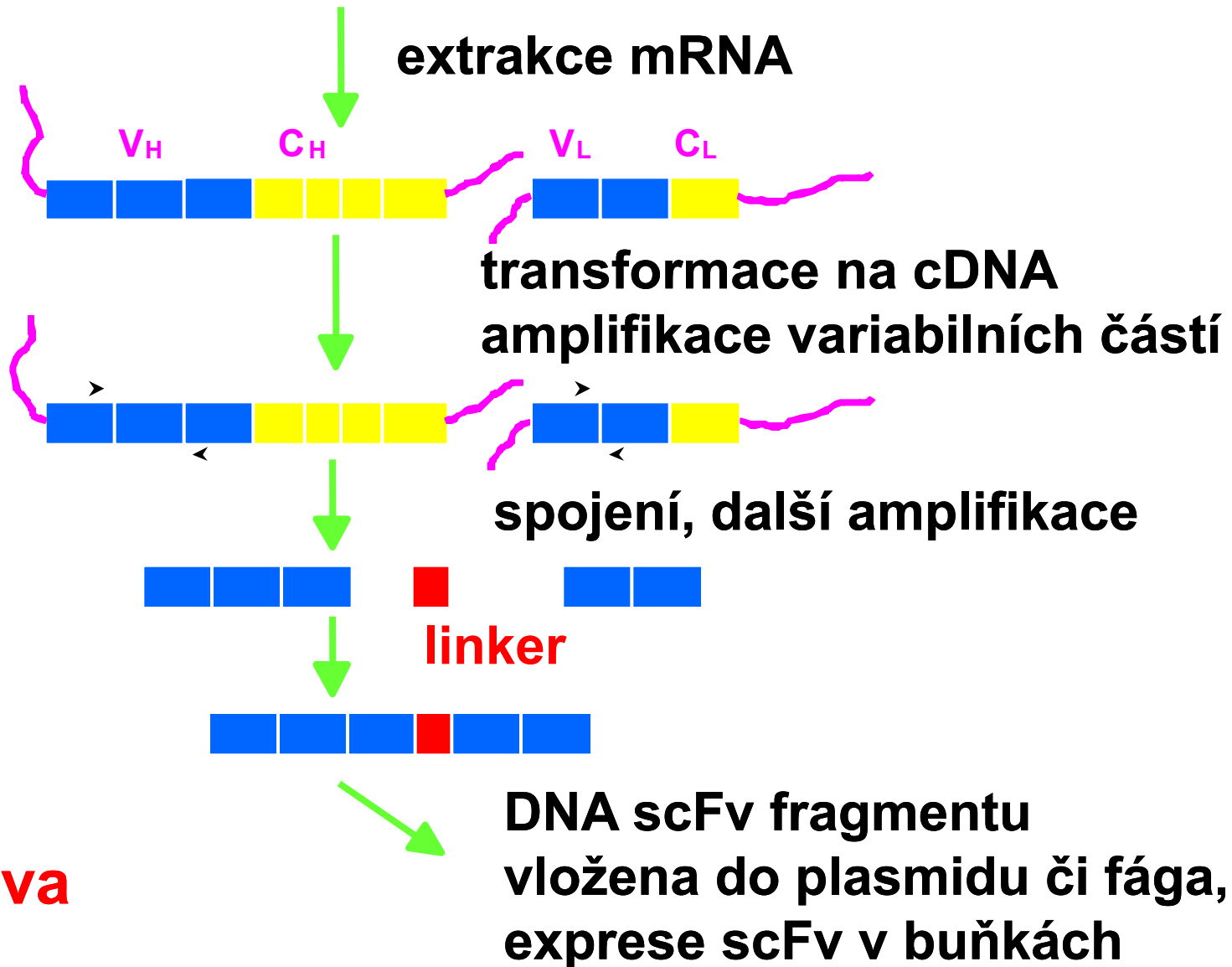
převedení výroby ascitické tekutiny (produkce protilátky in vivo v myších) do in vitro podmínek (produkce v tkáňových kulturách)

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

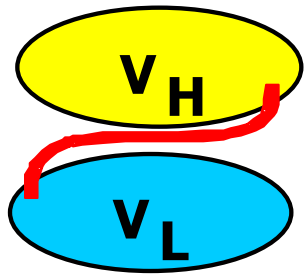


Rekombinantní protilátky

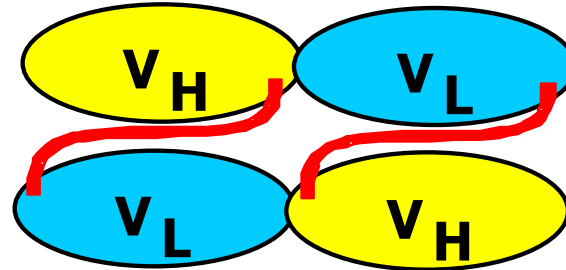
buňky produkující protilátky



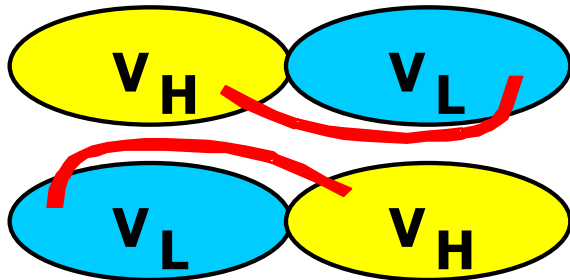
Formy scFv molekul



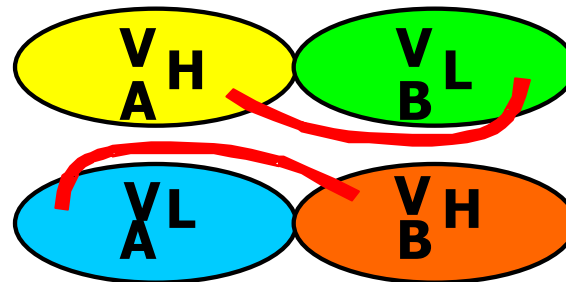
monomer



nekovalentní dimer



kovalentně křížený dimer



„diabody“

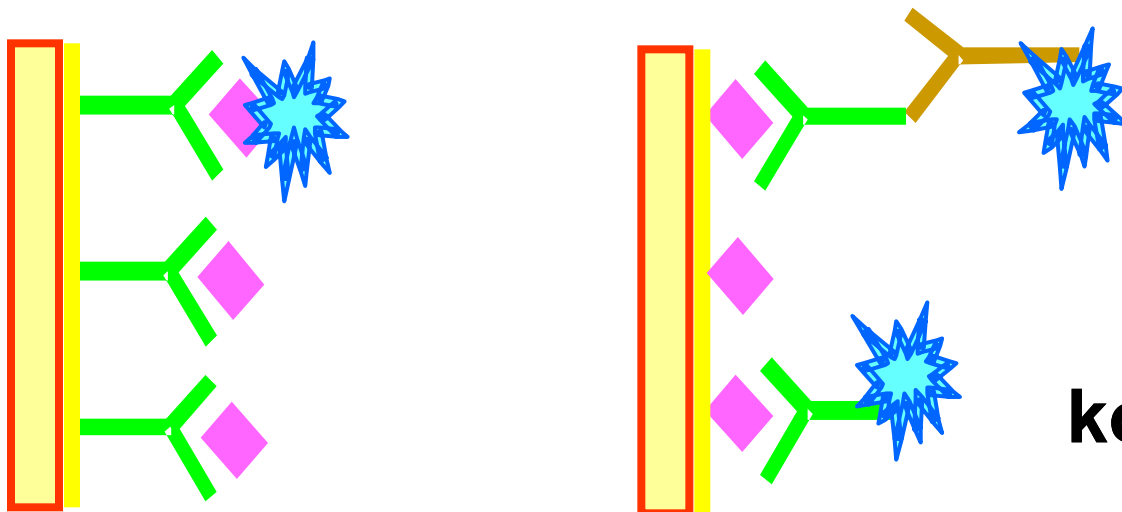


rAb z fágových knihoven

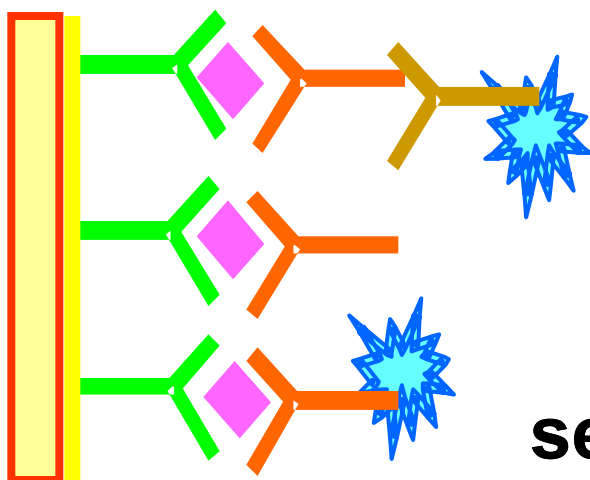
- fágová knihovna: semisyntetická scFv V_H+V_L , kolekce scFv phagemidů připravenou ze syntetických V-genových segmentů exprimovaných na povrchu filamentózního fága
- selekce scFv protilátek
- konjugát analytu s nosným proteinem se smíchá s polyklonální populací rekombinantních fágů, po inkubaci se komplexy 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 mg. 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



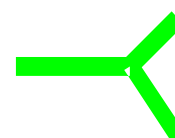
Formáty imunostanovení



kompetitivní



sendvičové



Protilátka (Ab)



Analyt

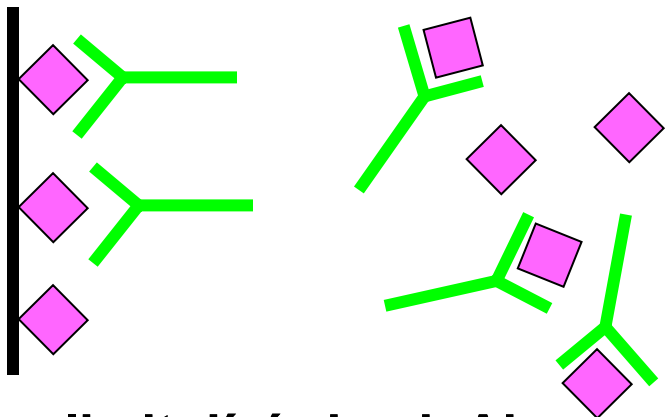


**Značka (enzym,
fluorofor, ...)**

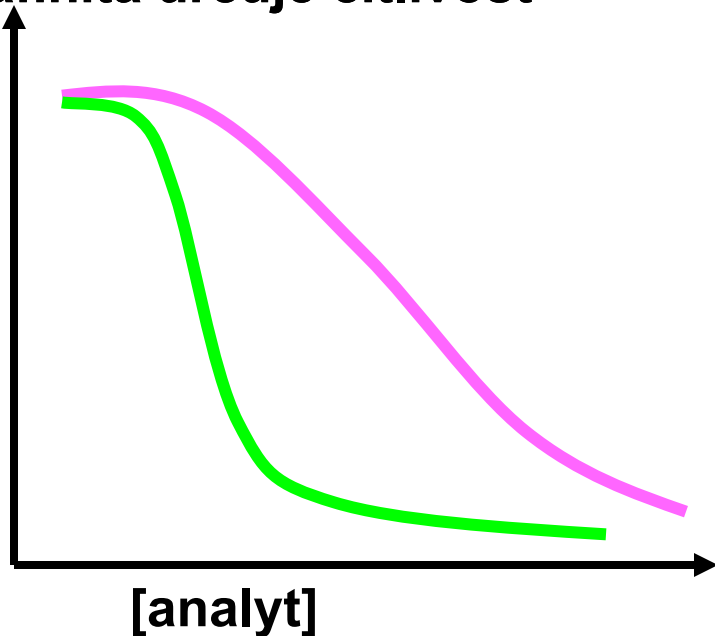


Imunostanovení

Kompetitivní

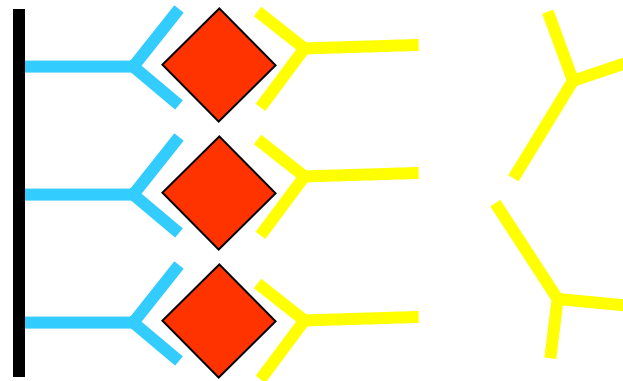


limitující obsah Ab
afinita určuje citlivost

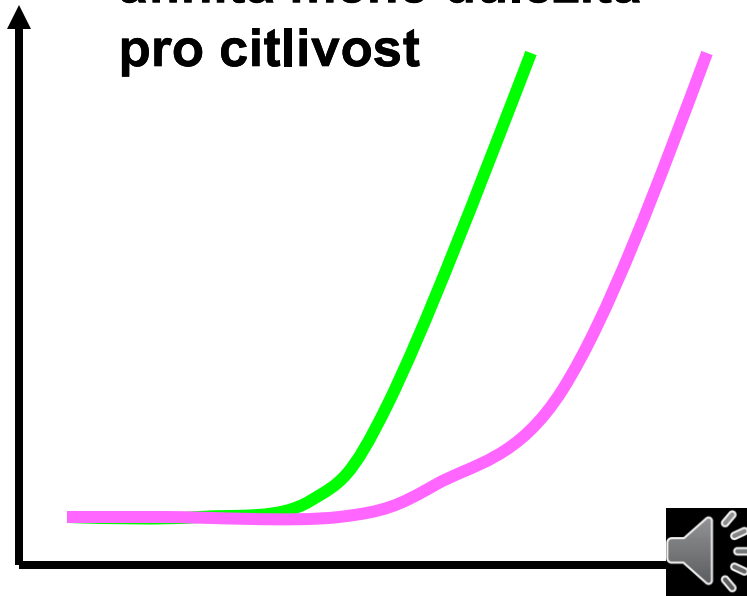


K_a
nízká
vysoká

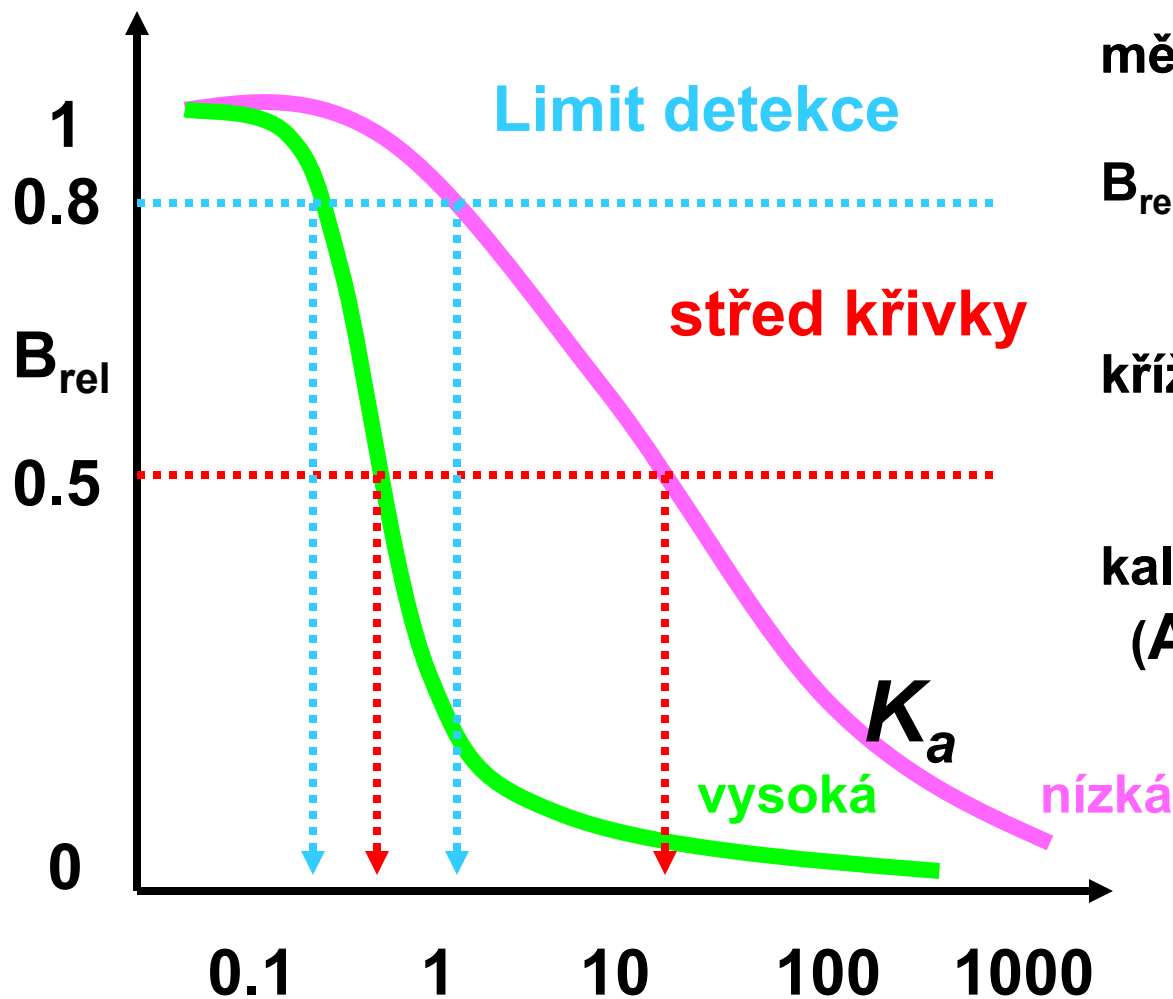
Sendvičové



nadbytek Ab
afinita méně důležitá
pro citlivost



Parametry imunostanovení



měřený signál ... Y

$$B_{rel} = (Y - Y_{blank}) / (Y_{max} - Y_{blank})$$

křížová reaktivita =

$$x_{A50} / x_{B50} \cdot 100\%$$

kalibrační závislost =

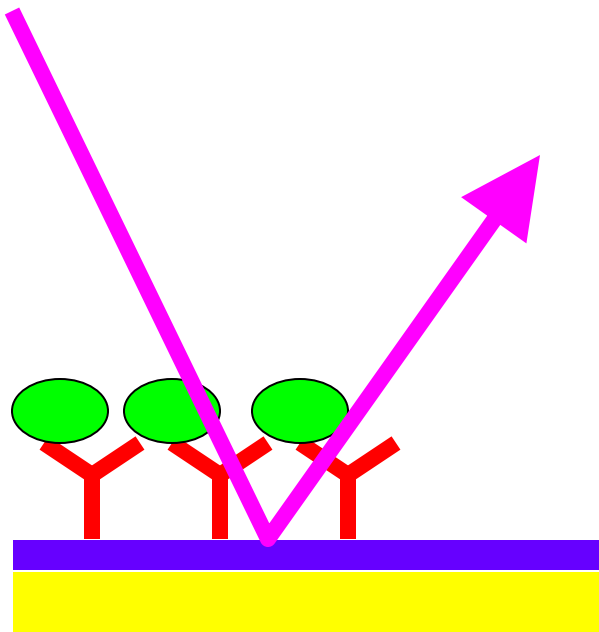
$$(A - D) / (1 + (x/x_{50})^b) + D$$

osa x - logaritmická škála



Optické imunostanovení

změna tloušťky
vrstvy vede ke
změně barvy



analyt

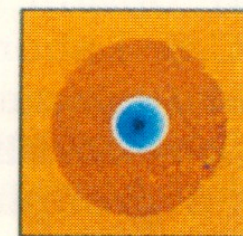
biovrstva

optická vrstva

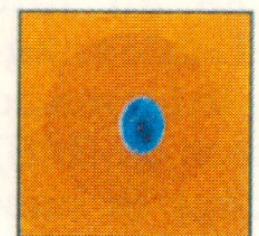
Si „wafer“



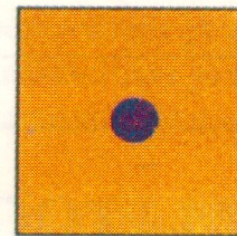
Strong
Positive



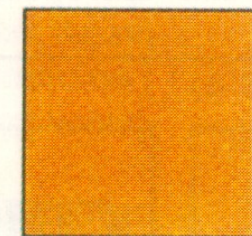
Moderately
Weak
Positive



Weak
Positive



Negative

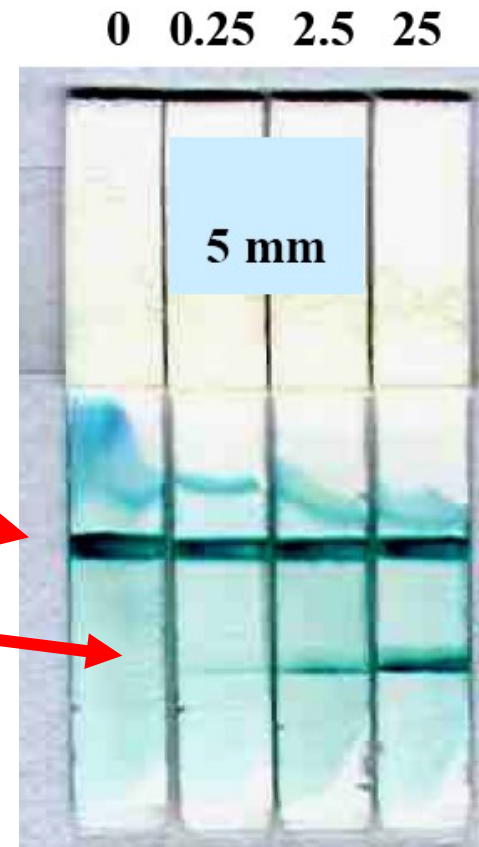
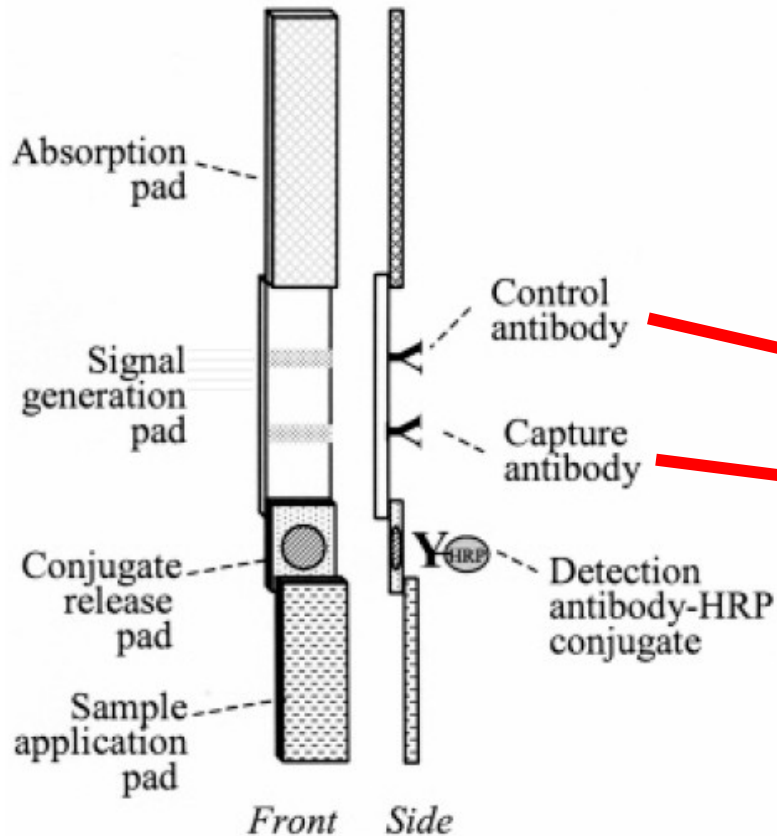


Invalid

**Přímé vizuální
hodnocení**



ELISA-on a strip



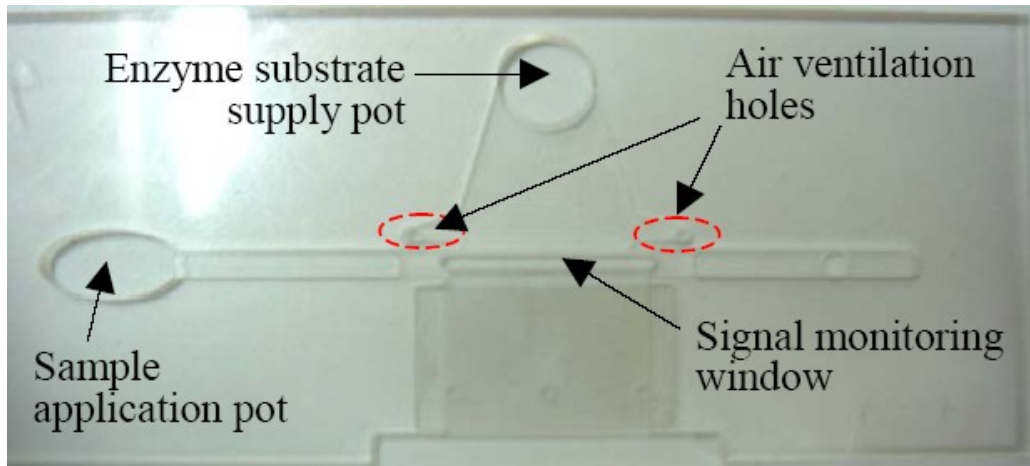
- imunostripy – samovolný pohyb roztoků v membránovém systému prostřednictvím kapilárních sil
- záchytné zóny, zviditelnění pomocí barvotvorné enzymové reakce, případně zlaté nanočástice (červené)
- vizuální vyhodnocování



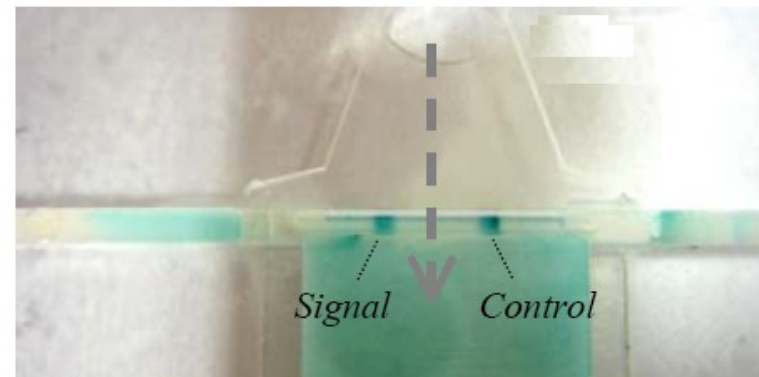
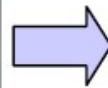
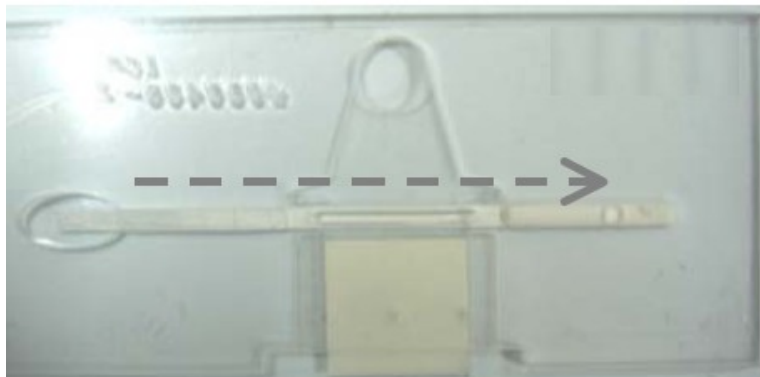
ELISA-on a chip

pro inspiraci:

www.microfluidic-chipshop.com

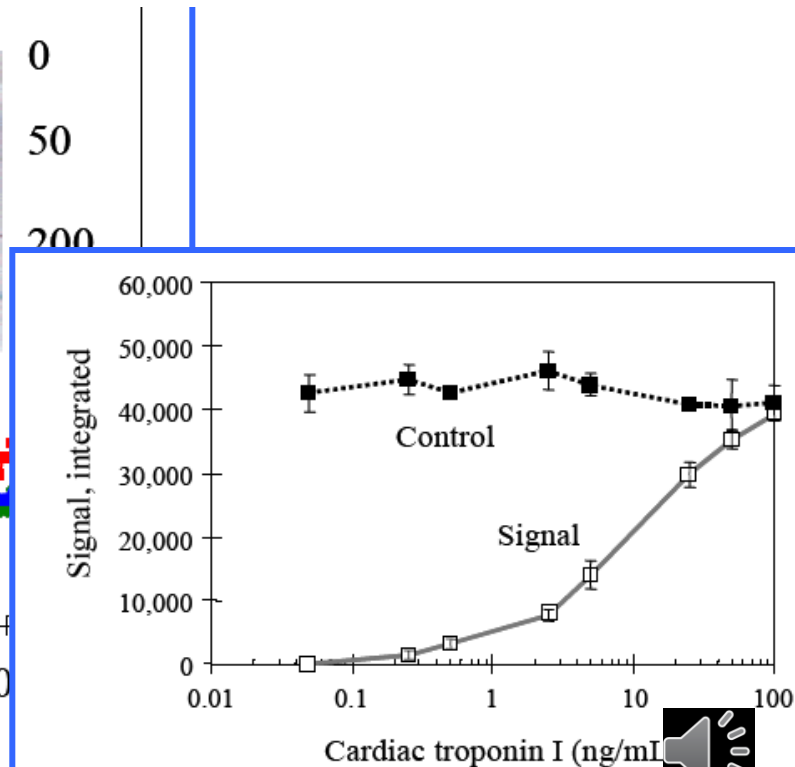
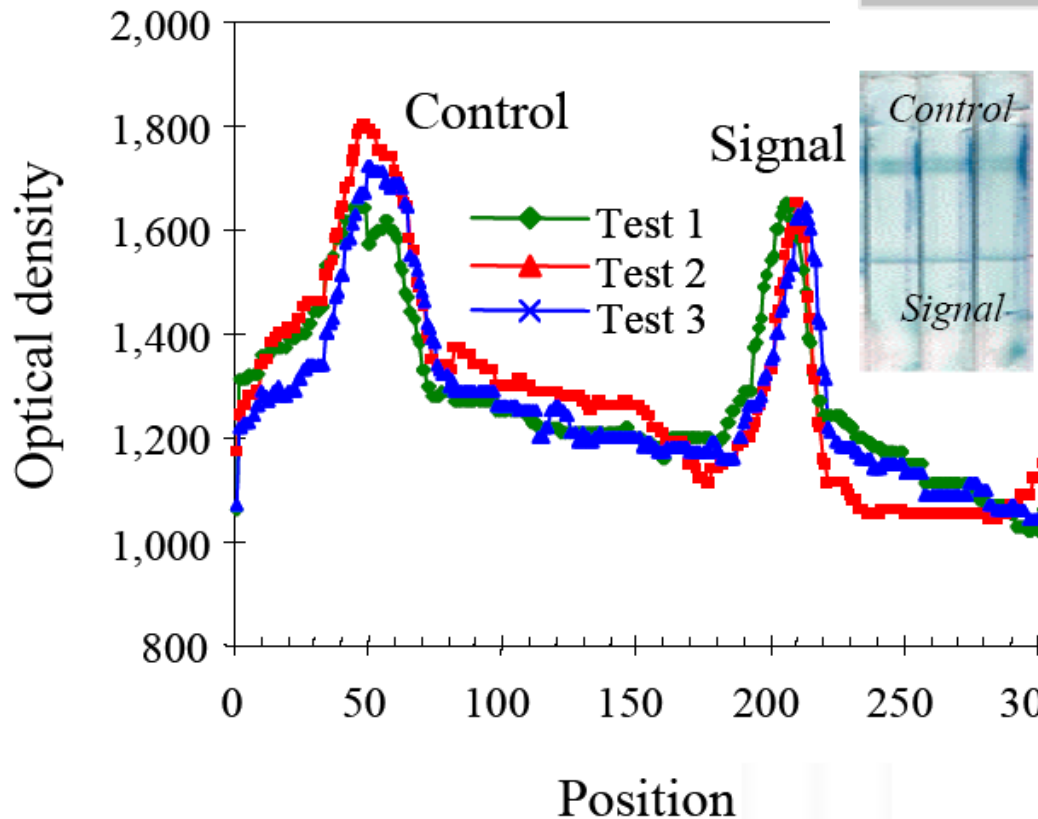
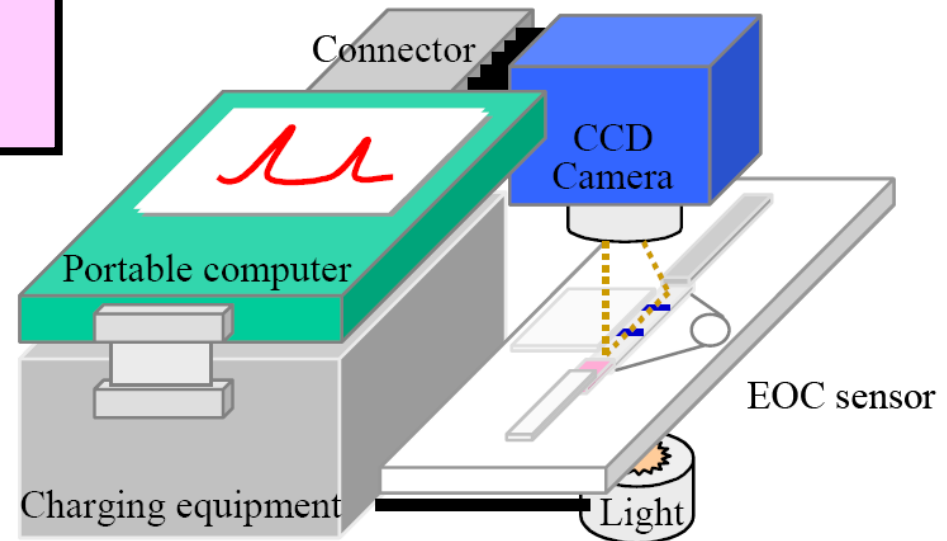


- **plastový přípravek („čip“) pro vložení úzkého imunostripu – zlepšená reprodukovatelnost transportu látek**
- **pohyb vzorku jedním směrem, pohyb substrátové směsi v kolmém směru**

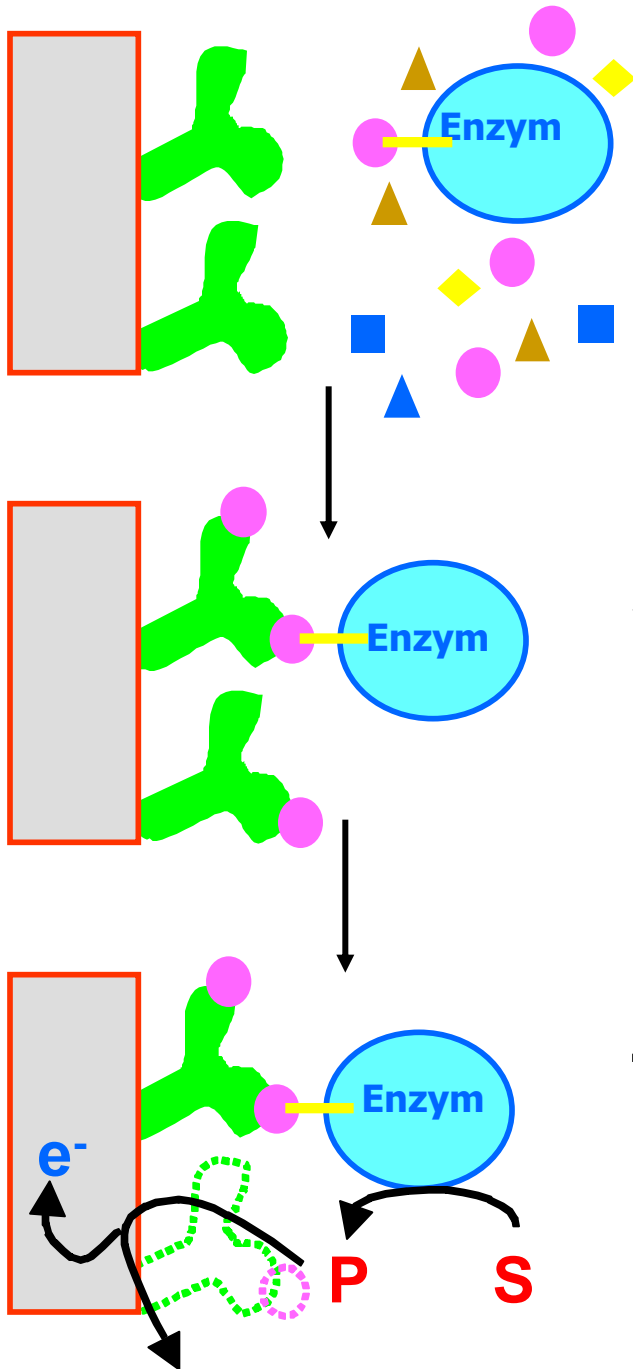


ELISA-on a chip

- vyhodnocovací systém na bázi CCD kamery (dnes smartphone)
- zlepšená reprodukovatelnost díky srovnání odezvy kontrolní a měřící zóny



Elektrochemická imunostanovení



1. Inkubace se vzorkem a s „**tracere**m“
– konjugát Ab (nebo Ag) se značkou

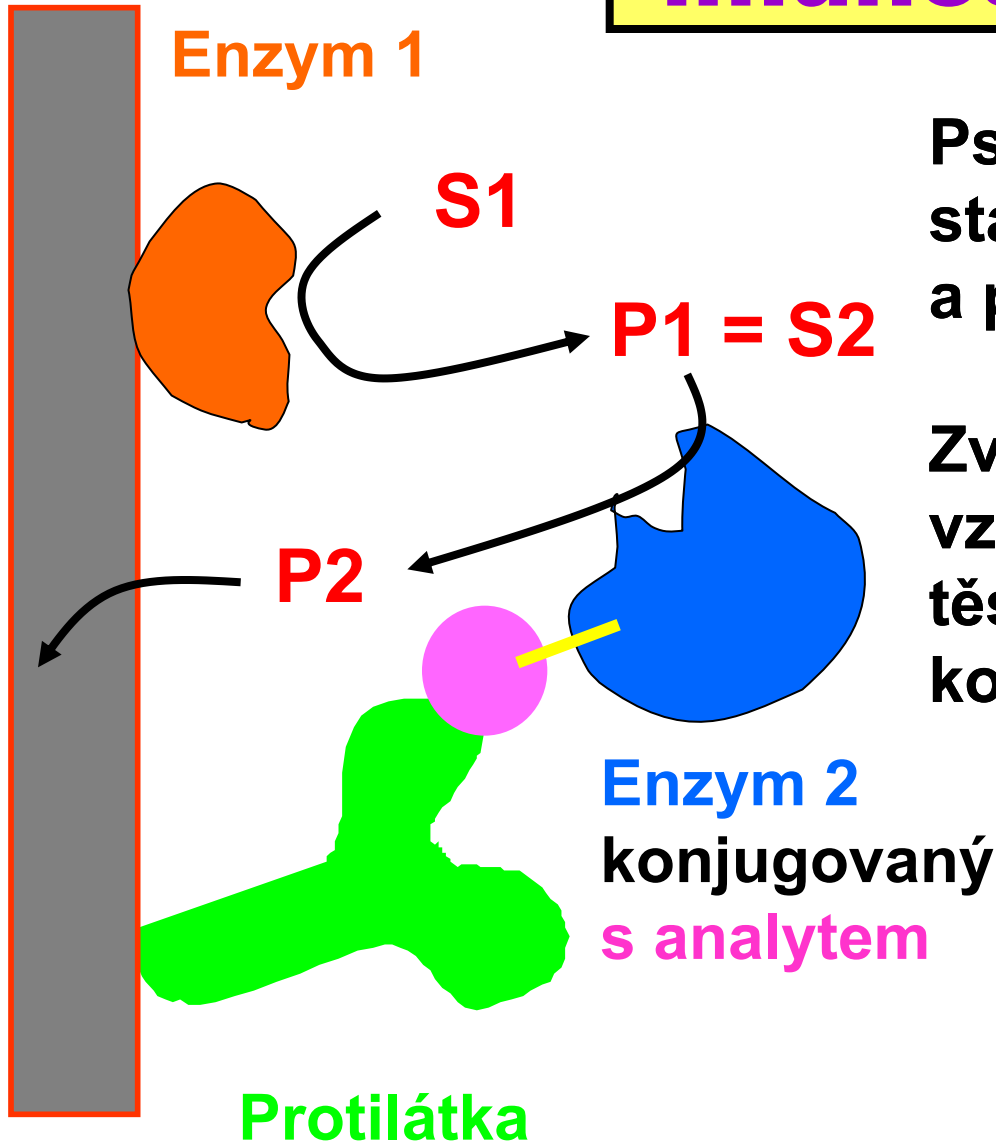
2. Separace, promytí

3. Přídavek substrátu pro enzym
(inkubace)

4. Změření signálu



Enzymové „tunelové“ imunostanovení



Pseudohomogenní
stanovení - bez separace
a promývacích kroků

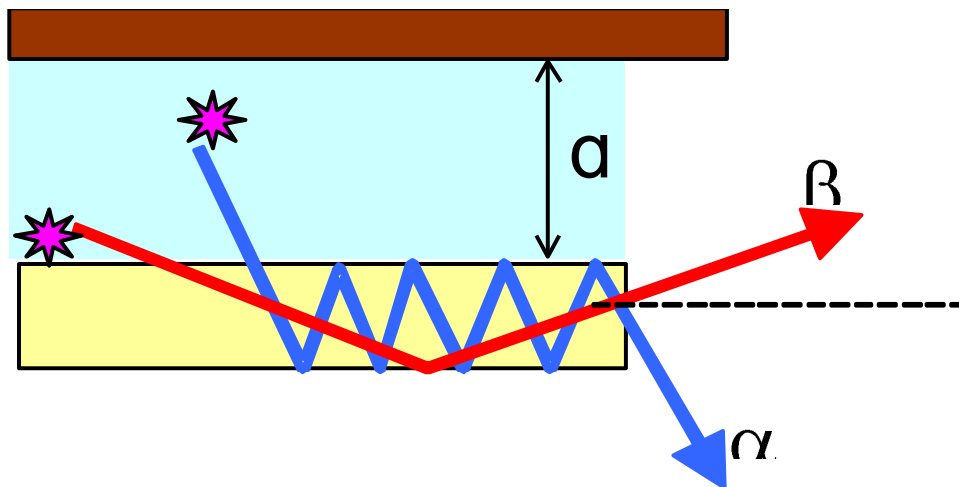
Zvýšená reakční odezva
vzniká na povrchu důsledkem
těsného kontaktu dvou
kooperujících enzymů



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.



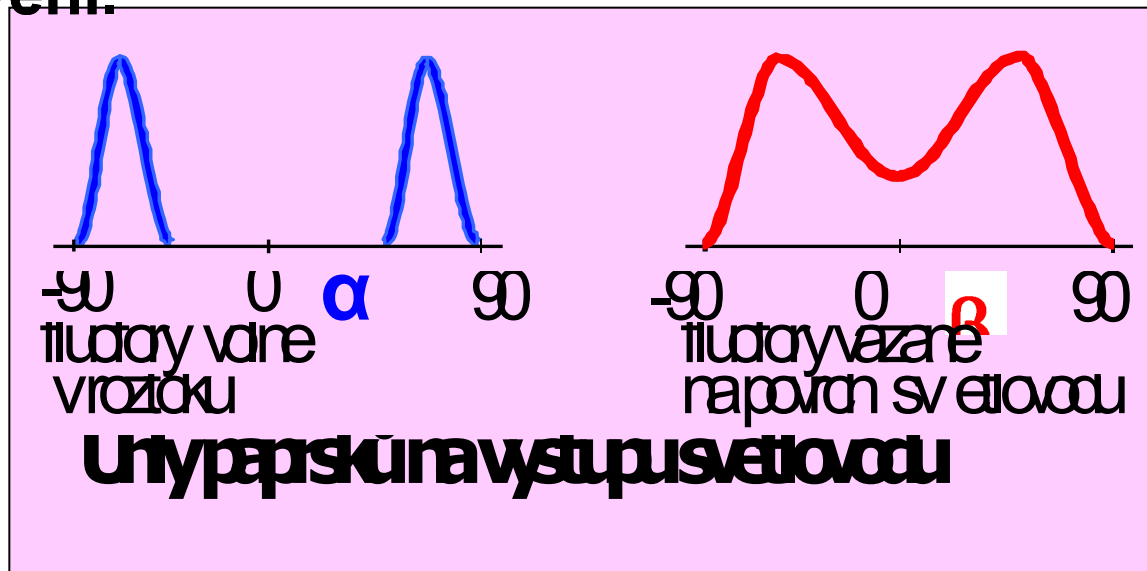
Wiseři volně vázaného fluoroforu

- 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).

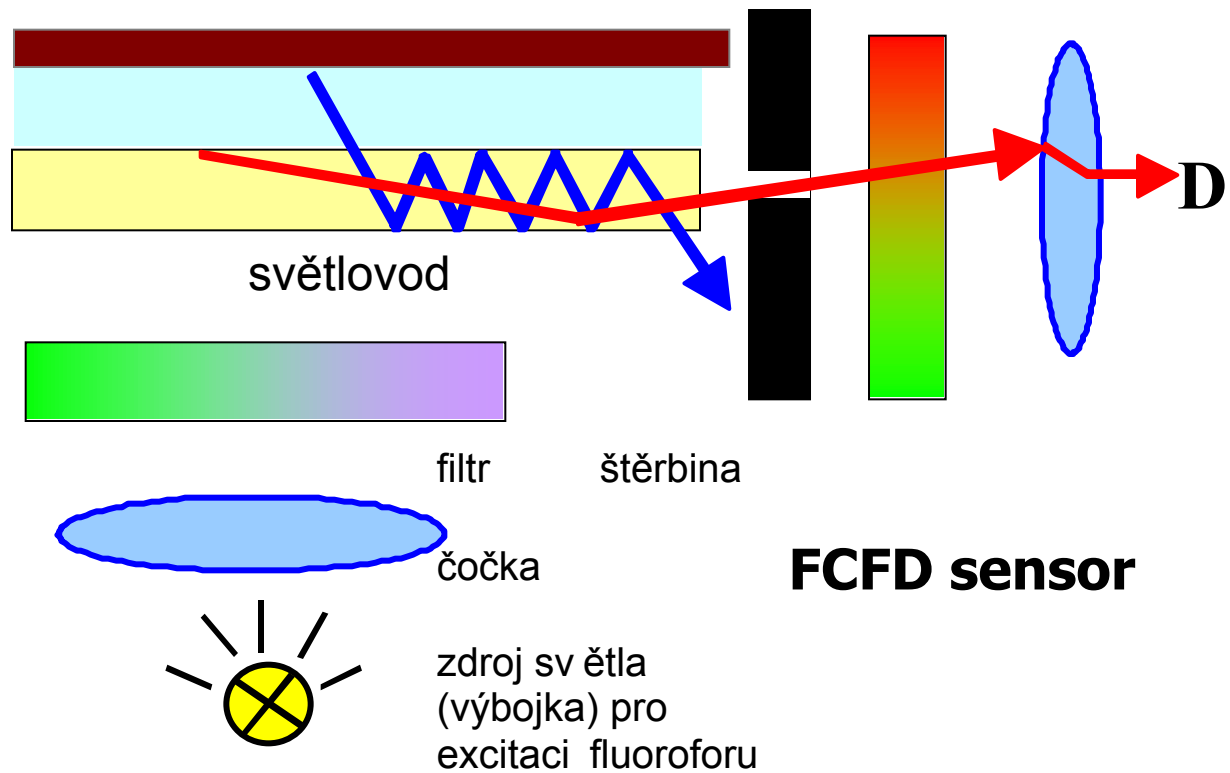


FCFD

- 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.



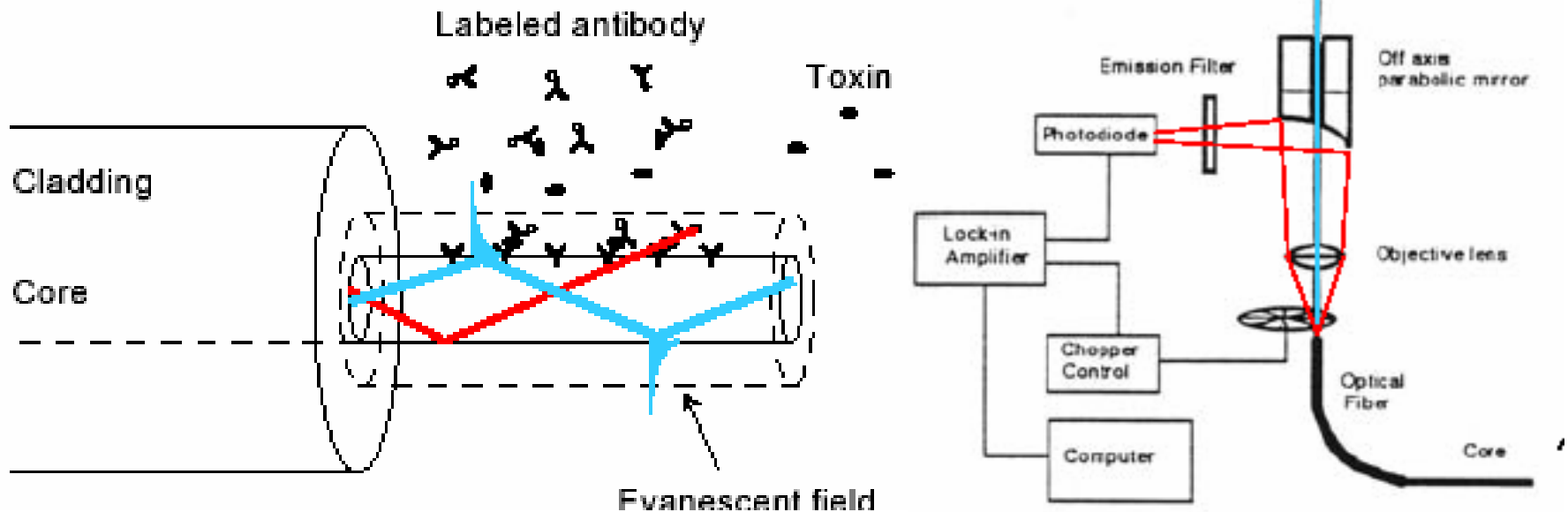
FCFD



- 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 světlovodné vrstvy
- evanescentní vlna se šíří mimo světlovod, kde excituje tam přítomné fluorescenční značky, navázané v průběhu imunostanovení
- světlovod 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



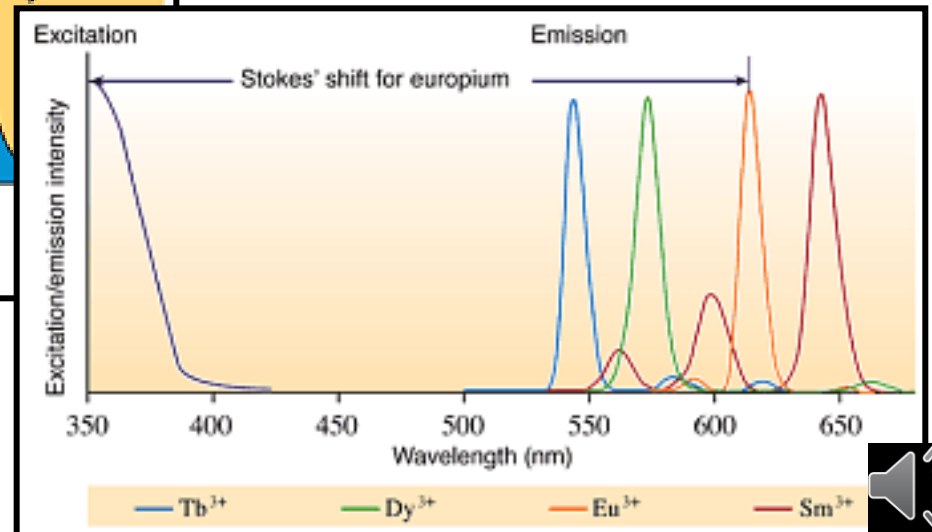
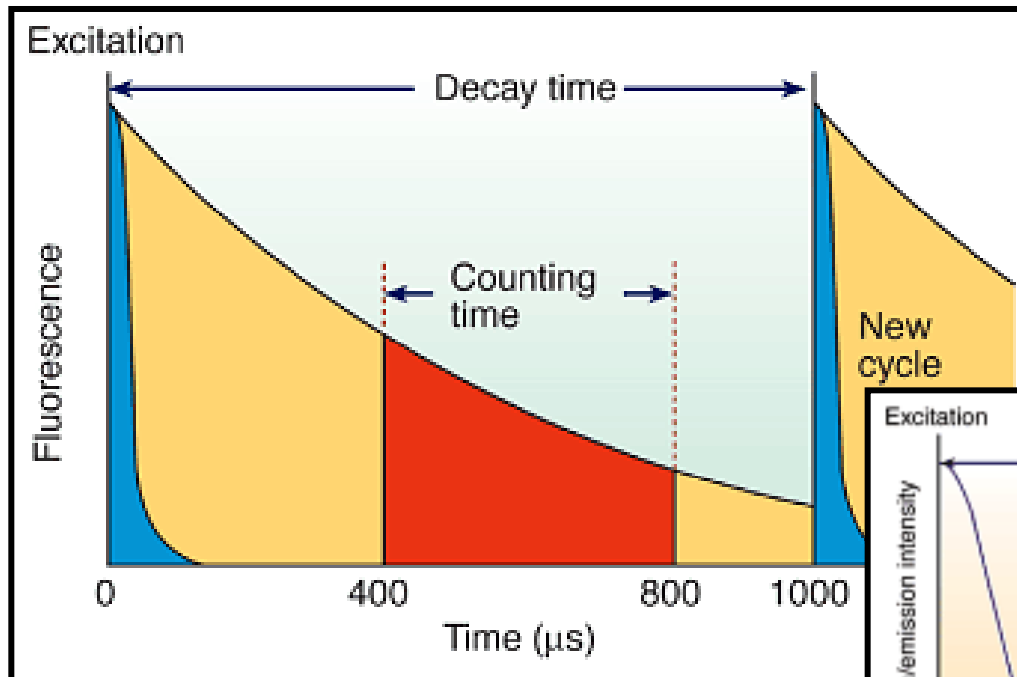
Imunosensory - fluorescenční značky

- 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

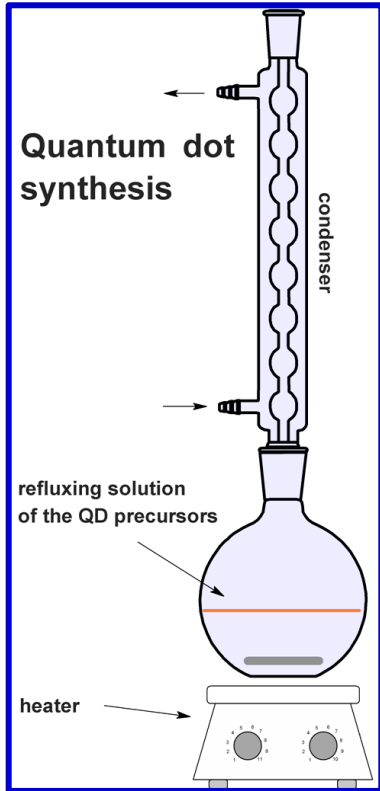


Imunosensory - fluorescenční značky

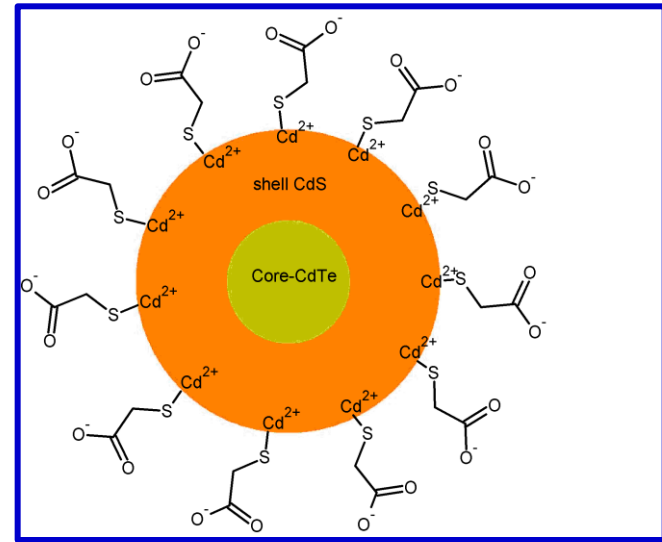
- cheláty lanthanidů (Eu, Sm, Dy)
 - dlouhá životnost excitovaného stavu
 - Time Resolved Fluorescence



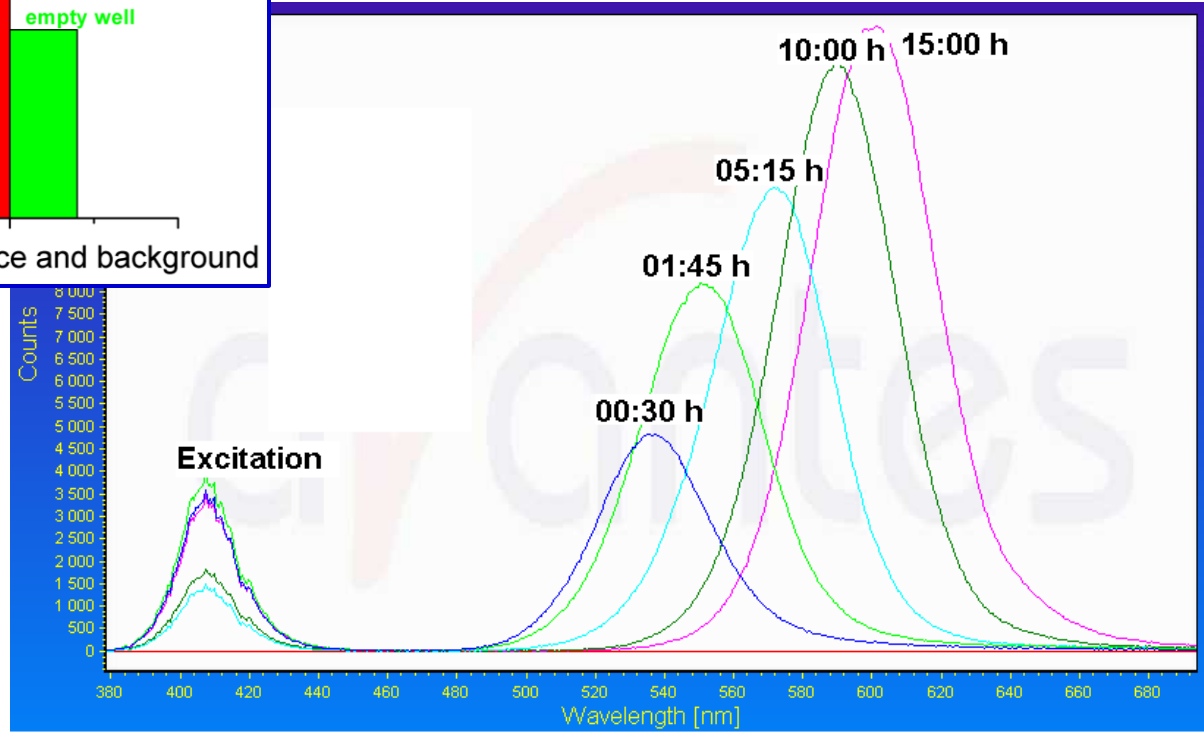
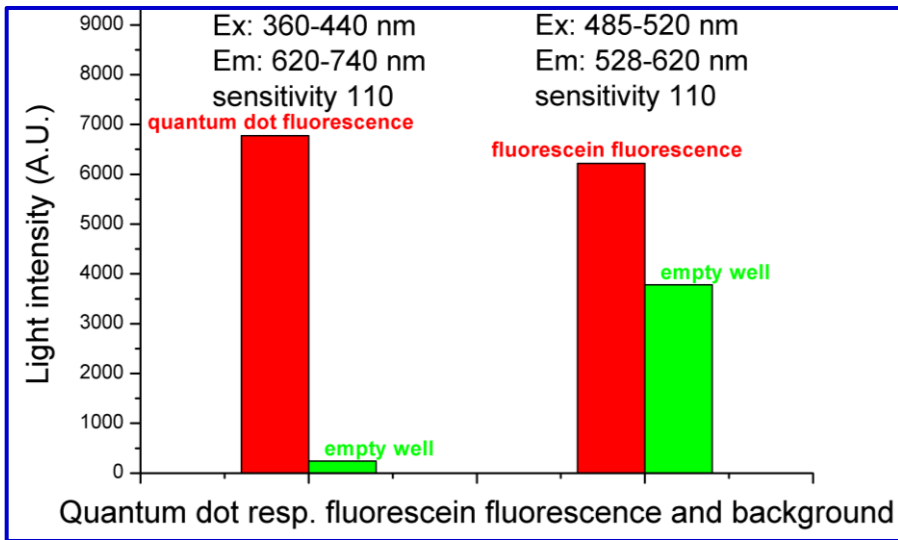
Kvantové tečky (QD)



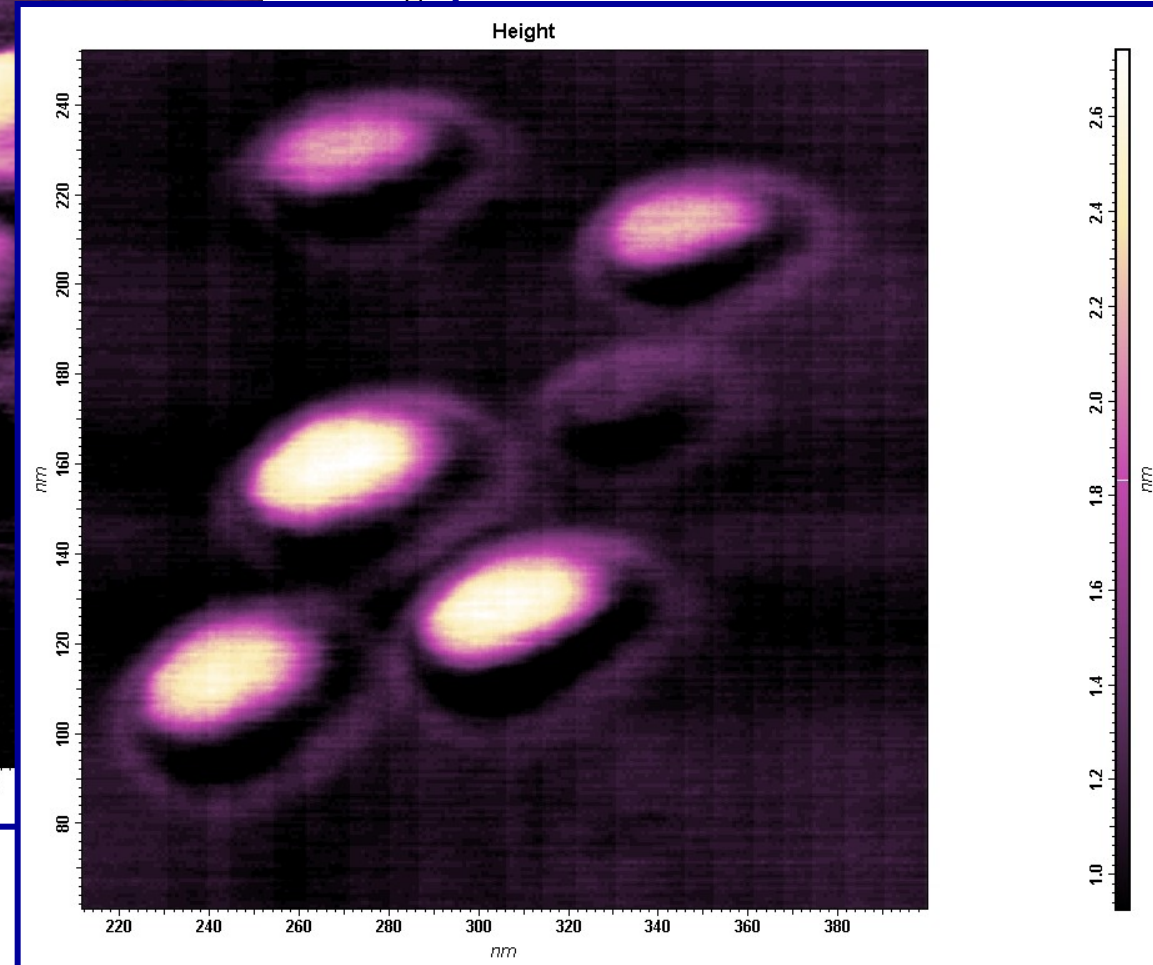
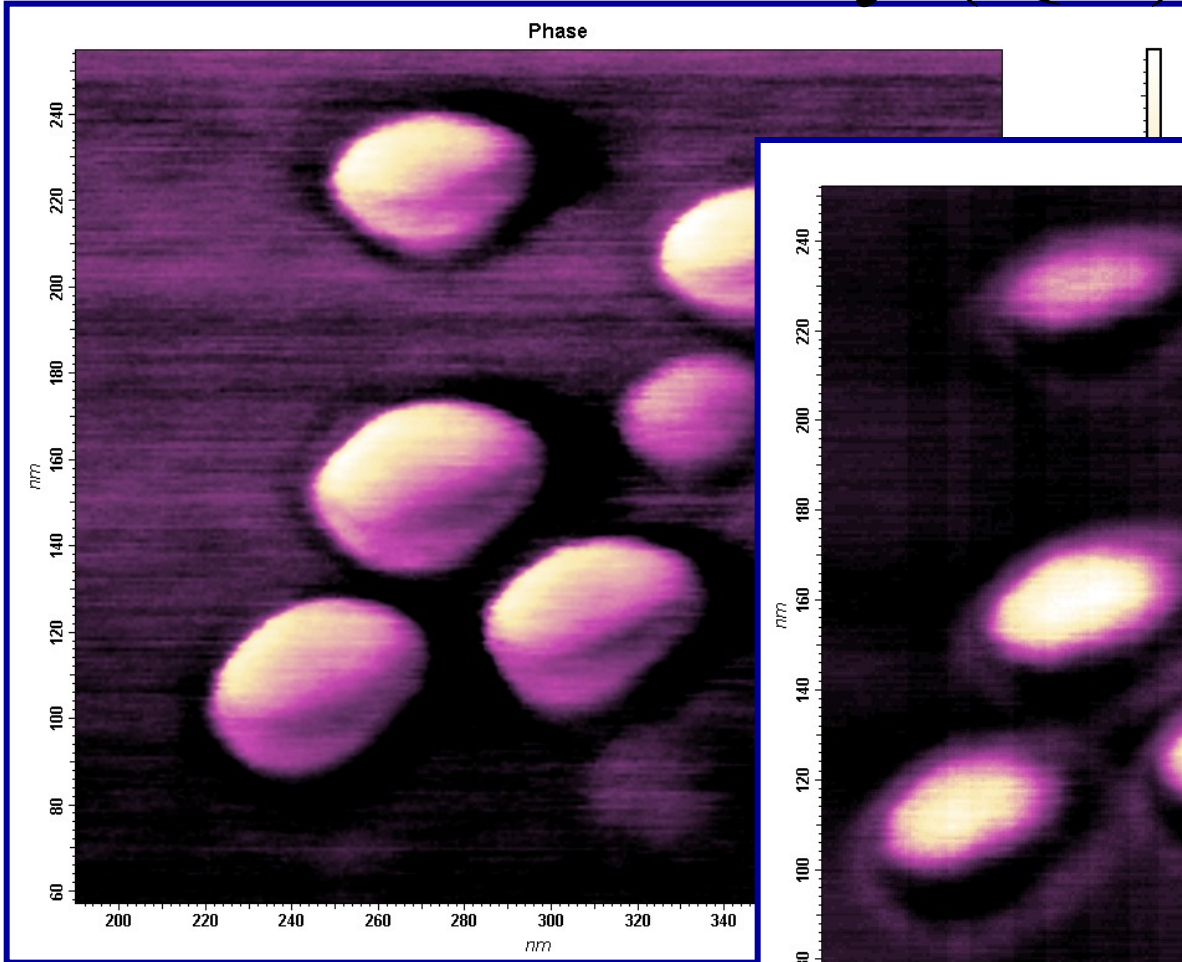
- unikátní fluorescenční vlastnosti - stabilita vůči fotorozkladu, velké Stokesovy posuny
- CdTe jádro obalené CdS, rozpustnost díky vazbě thioglykolové kys. (TGA)
- prekursorzy - Te, CdCl₂, TGA a NaBH₄
 - NaHTe připraven redukcí Te pomocí NaHB₄
 - nástřik roztoku NaHTe do směsi CdCl₂ a TGA v inertní atmosféře
 - refluxace na vzduchu (minuty až hodiny)
- při zahřívání roste průměr QD, emisní maximum se posouvá k delším vln. délkám
- větší QD mají lepší stabilitu



Připravené QD



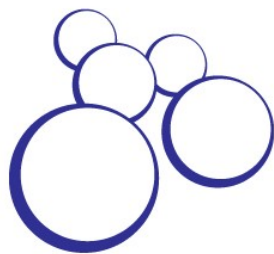
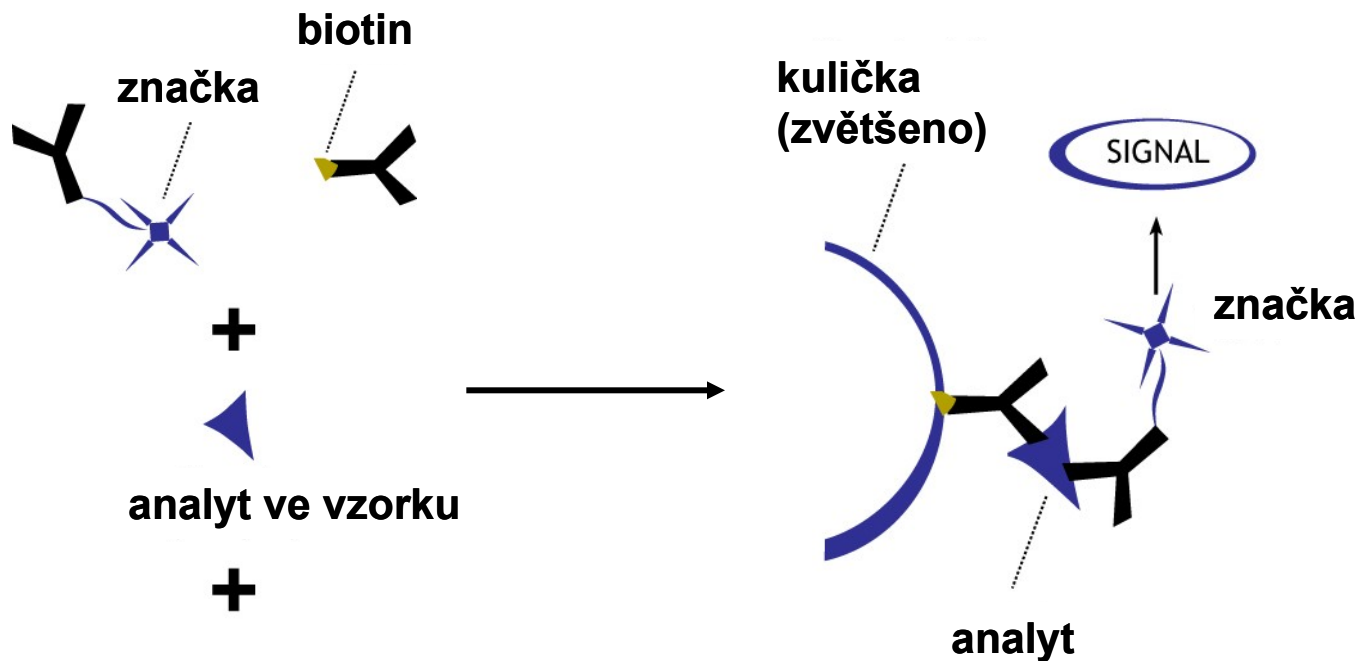
Kvantové tečky (QD)



- QD s teluridovým jádrem, obal CdS, povrch modifikován - glutathion, thioly s funkční skupinou, křemičitanová slupka, ...



Elektrochemiluminiscence

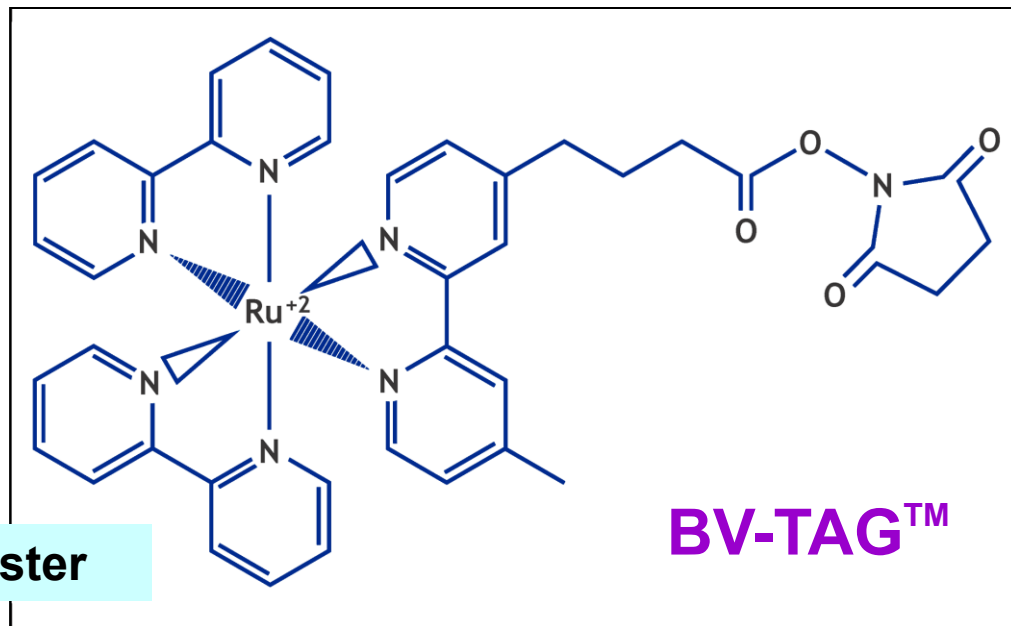


mg. kuličky potažené streptavidinem

BioVeris™ technologie:
rychlý “*mix and measure*”
homogenní formát



ECL značka

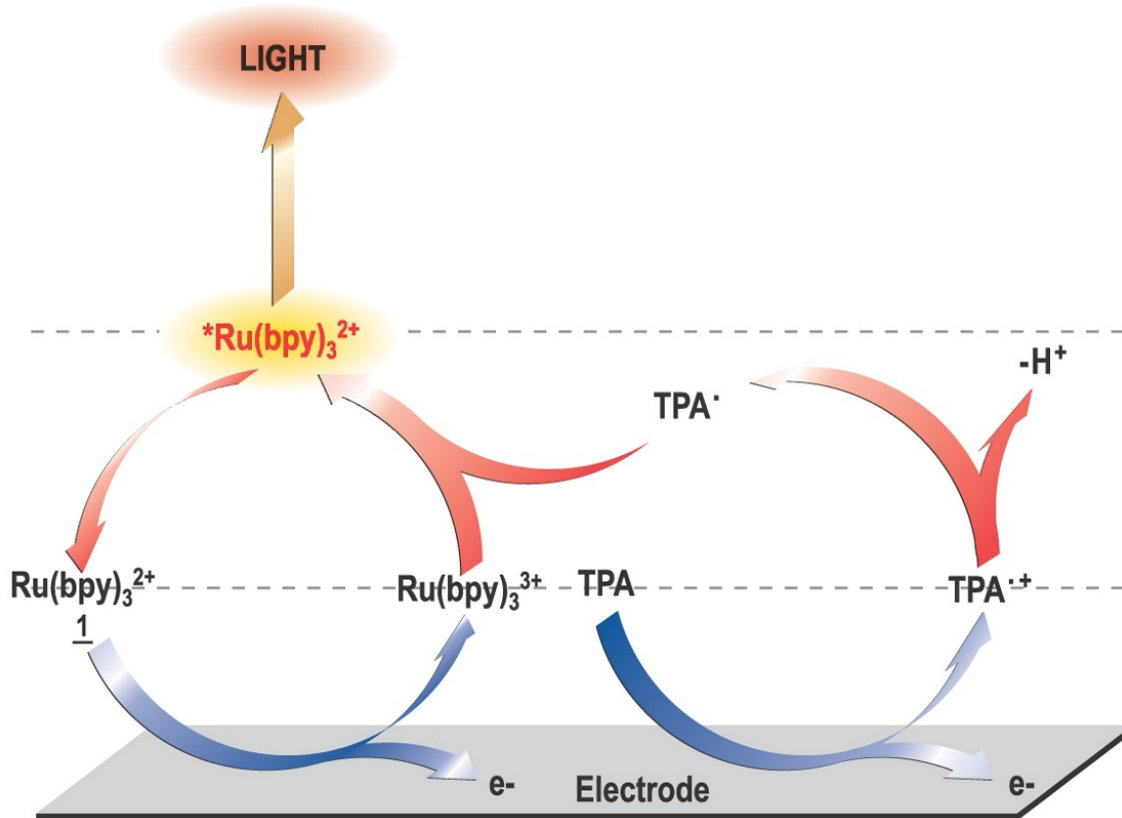


ruthenium(II) tris(bipyridin) NHS ester

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



ECL reakce



Luminiscence
emise světla

Chemi-
předání chemické energie

Elektro-
elektrochemická iniciace

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}(1) = \text{BV-TAG}^{\text{TM}}$

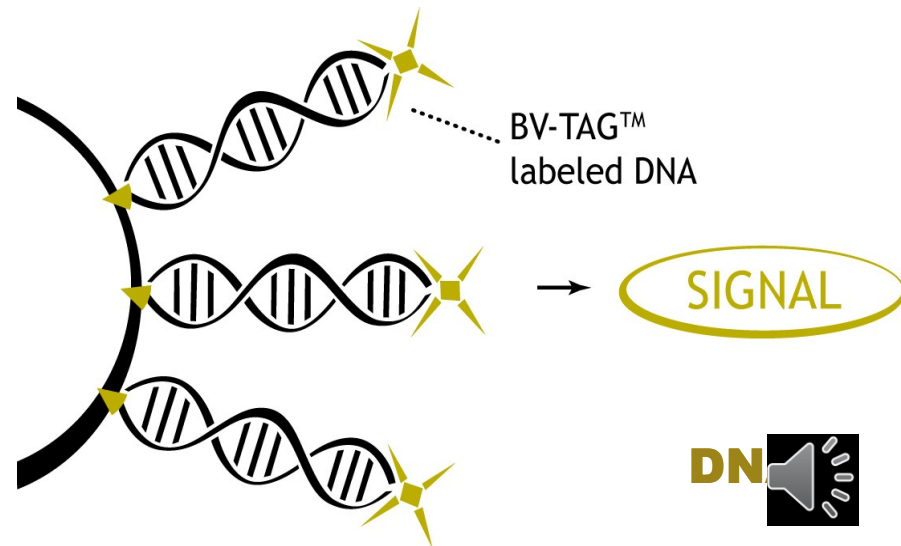
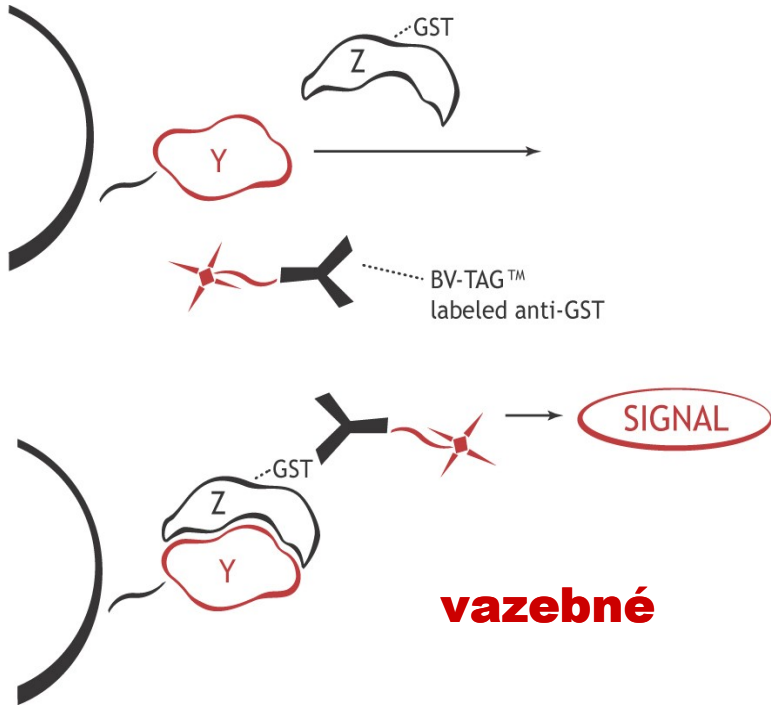
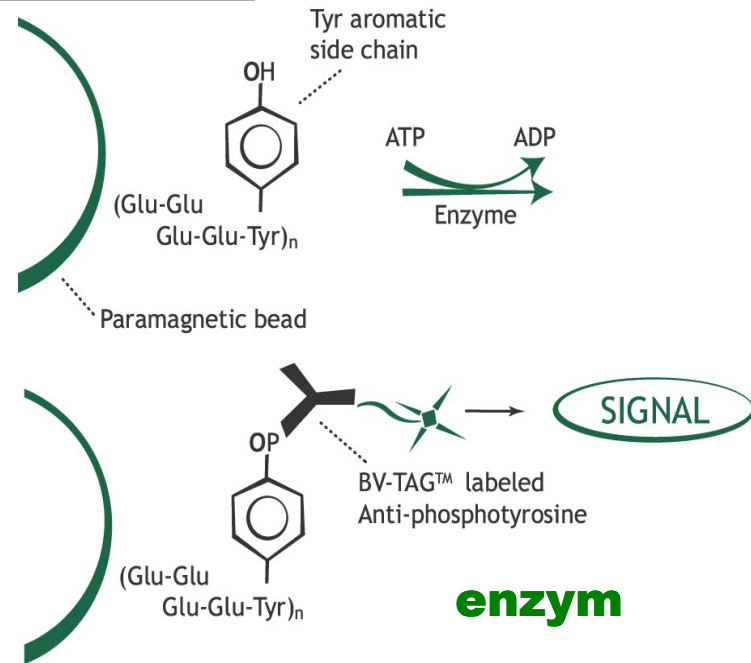
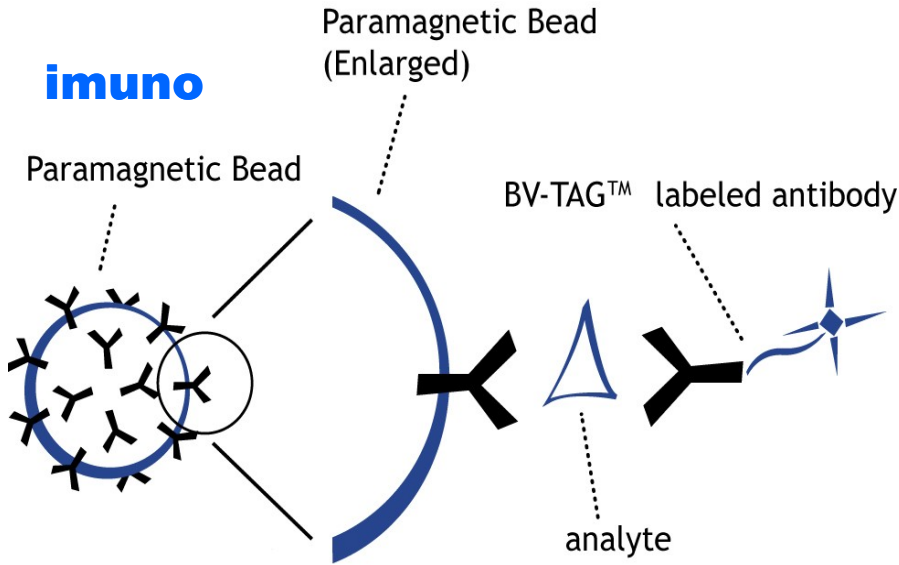
TPA = Tripropylamine

- ruthenium a TPA jsou oxidovány po aplikaci napětí na elektrodu
- TPA^+ ztrácí proton, redukuje Ru^{3+} na Ru^{2+} , které z excitovaného stavu přechází do základního za vyzáření fotonu
- Ru se nespotřebává – recykluje – zesilovací mechanismus – zvýšení citlivosti stanovení



Různé formáty stanovení

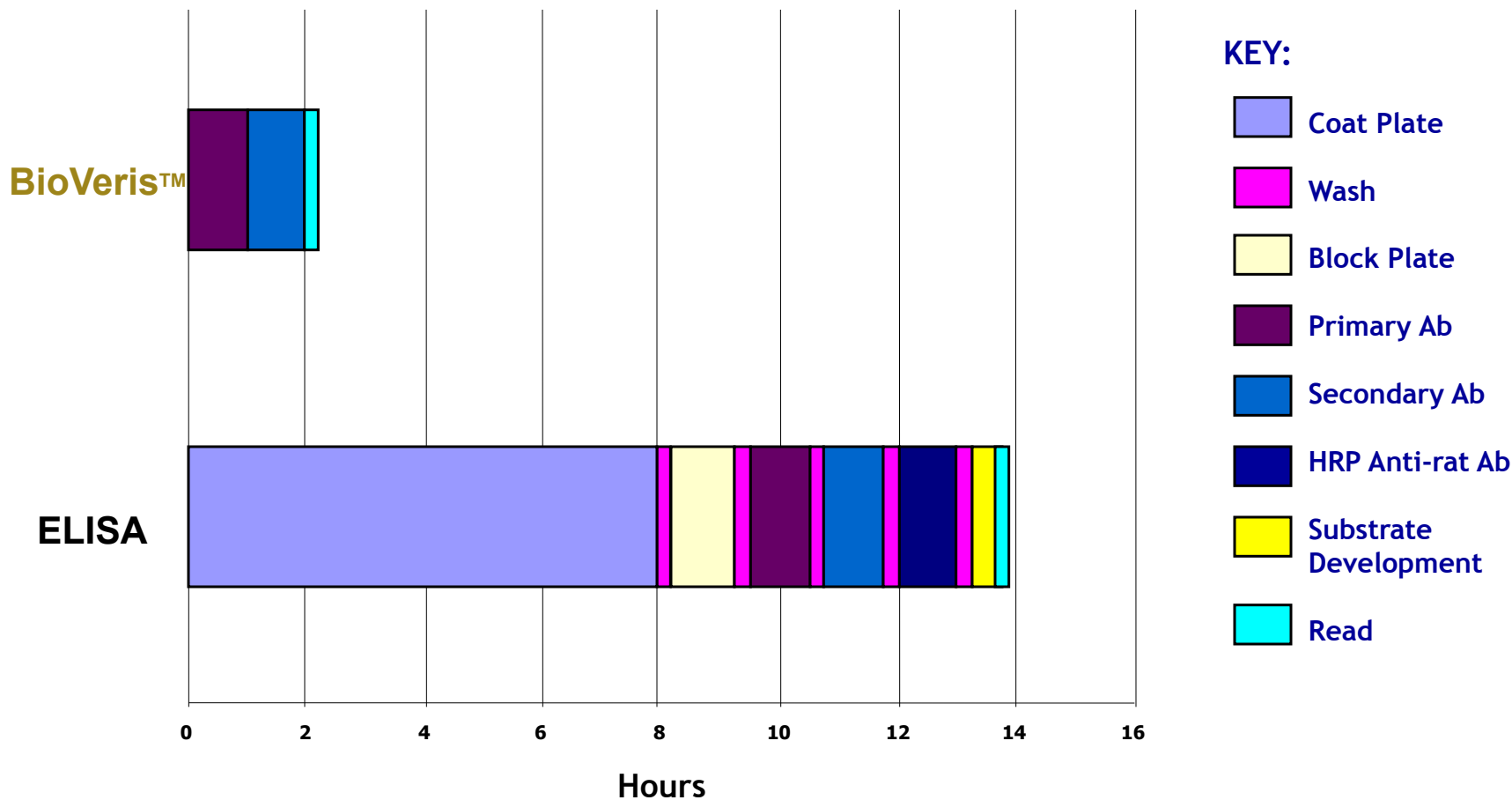
imuno



vazebné



Homogenní formát stanovení



- Shorter Incubation Times
- Reduced Assay Steps



Moving BioVeris™ Technology Forward

BioVeris Detection System



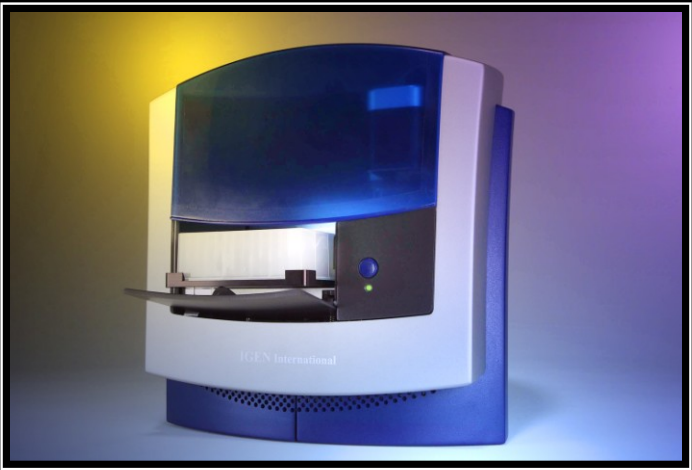
M-SERIES® 384 Analyzer



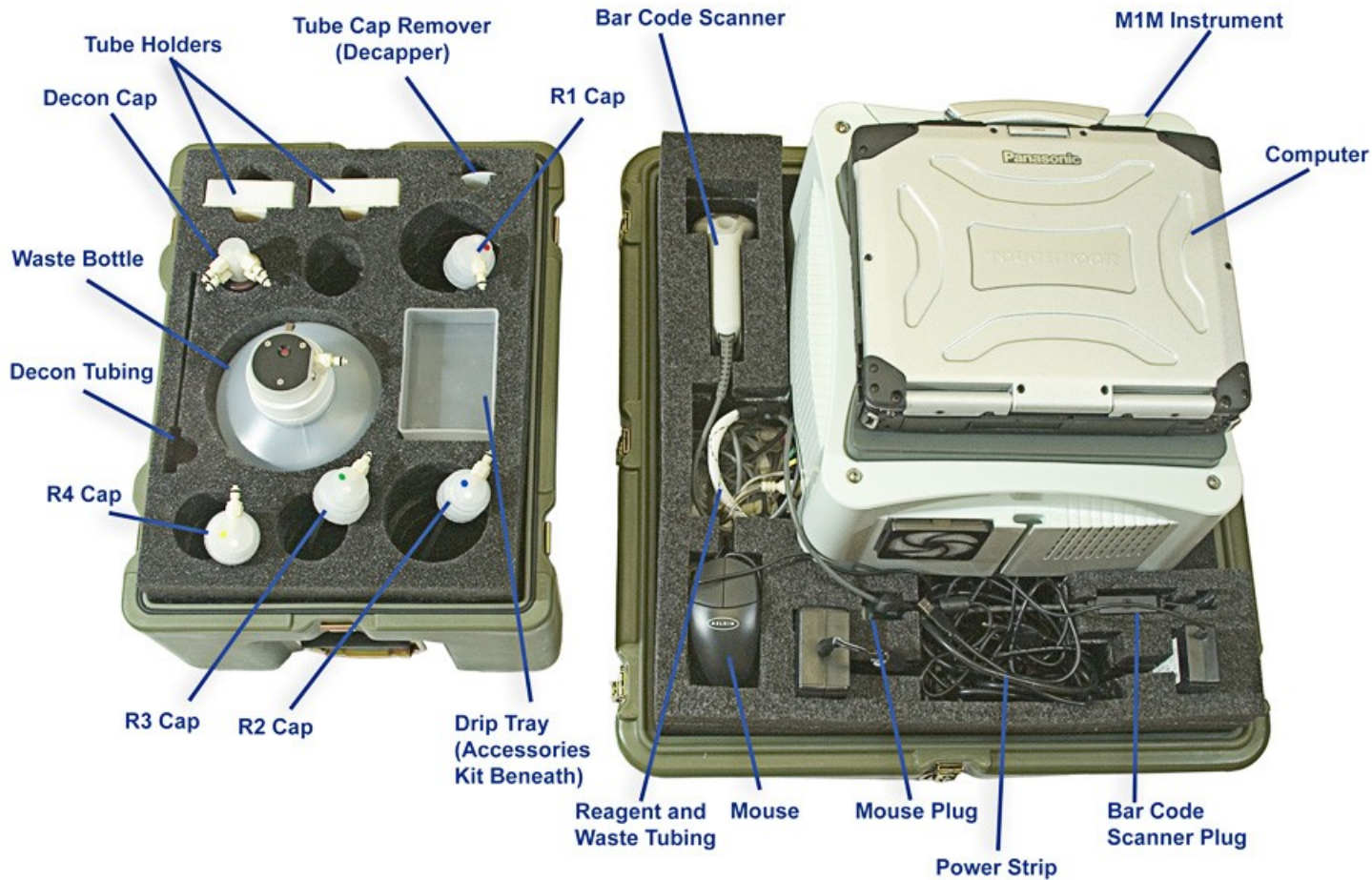
M-SERIES M1M Analyzer



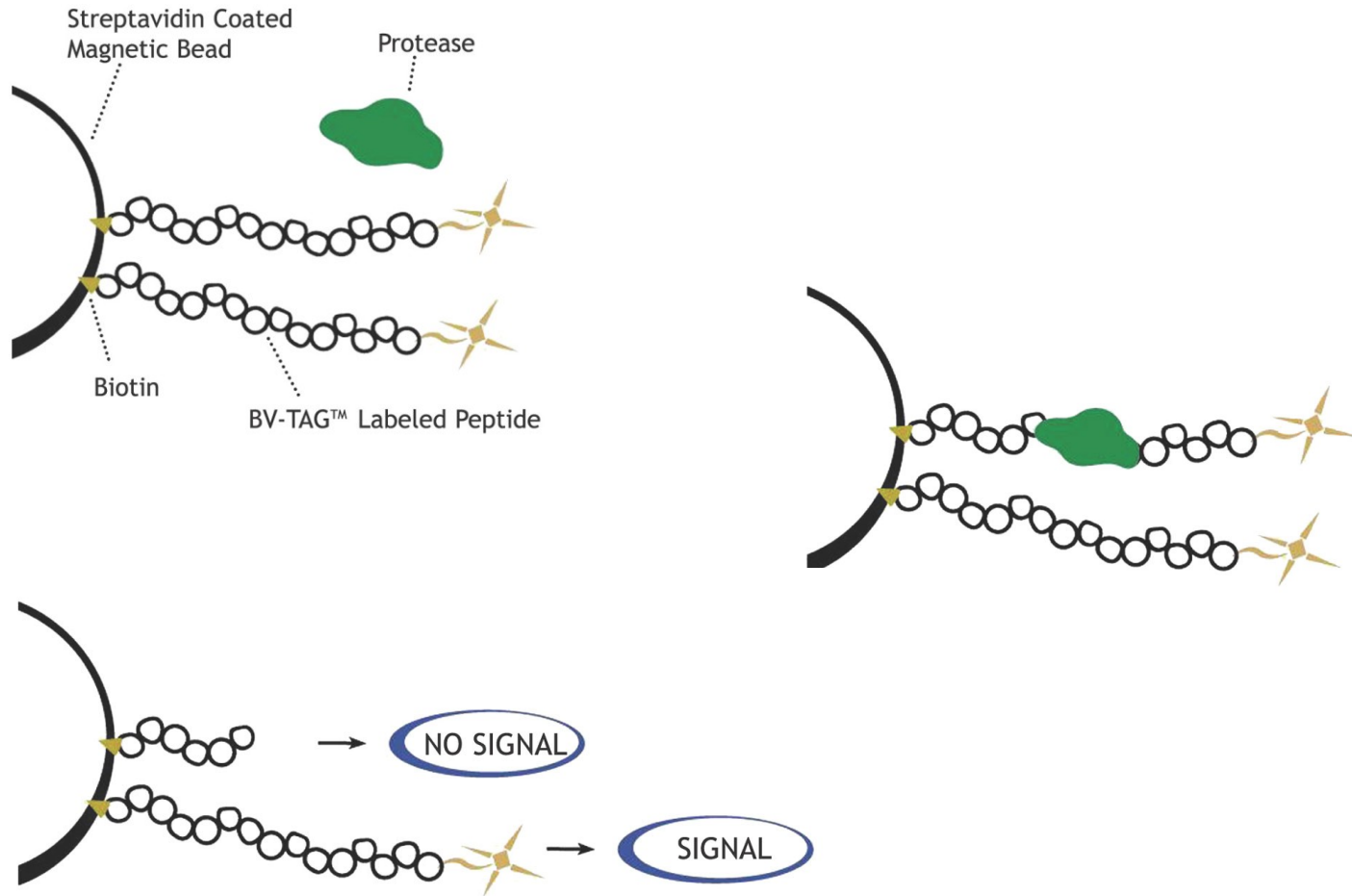
M-SERIES M1R Analyzer



M1M System in Transport Cases




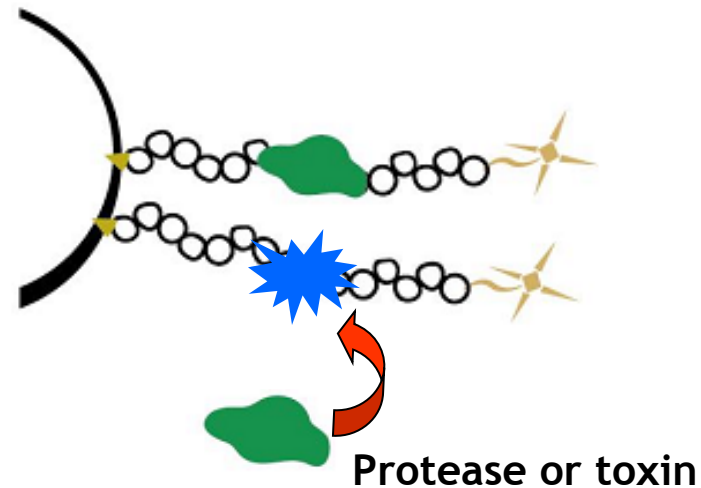
Enzymatic Assays for Toxins



Enzymatic Assays for Screening Drug Targets

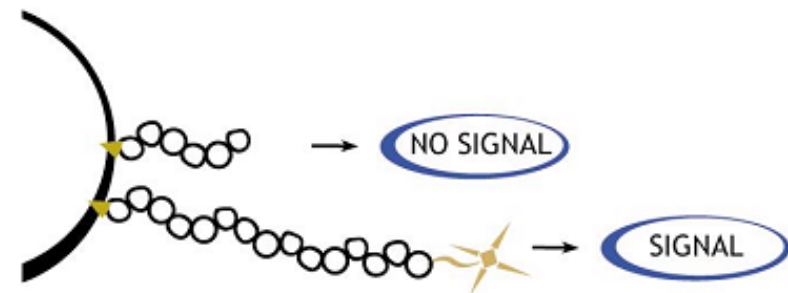
A) Protease binds to substrate

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: mikrocytiny, polychlorované bifenyly (PCB)

- **potravinářství**

- bakterie: *Listeria*, *Cryptosporidium*, *Salmonella*, *E. coli* O157H7
- kontaminanty: antibiotika (penicilin), aflatoxiny

- **vojenství**

- bakterie, viry, toxiny

