

**UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**Přípravné kroky k vývoji bioafinitního nosiče pro izolaci  
A-beta peptidů a anti A-beta specifických protilátek**

**Bc. Lucie FAJKISOVÁ**

**Diplomová práce**

**2009**

Zadání

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Lucie Fajkisová

Ráda bych na tomto místě poděkovala především Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D a doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení a konzultace při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům laboratoře za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři.

Velké díky patří také rodině za psychickou podporu a umožnění studia.

## Abstrakt

V této diplomové práci jsme se zabývali vytypováním vhodných částic pro imobilizaci IgG. Imobilizace IgG byla provedena na různé typy -OH a -COOH částic. Poté byla provedena kvantifikace imobilizovaného IgG různými metodami: výpočet IgG z hodnot absorbancí při 280 a 260 nm naměřených před a po imobilizaci, stanovení IgG pomocí specifického konjugátu, detekce IgG elektroforézou, turbidimetrické stanovení IgG. Dále byla zavedena kvantifikace IgG metodou ELISA, kdy nejdříve byla provedena optimalizace metody ELISA, jejíž výsledky byly použity k vlastnímu stanovení imobilizovaného IgG. Nakonec byly testovány různé typy magnetických částic v roztocích o různém složení. Byla změřena doba separace částic v jednotlivých roztocích na magnetickém separátoru a také byla mikroskopem pozorována míra aglomerace částic v testovaných roztocích.

## Abstract

We were considering in this diploma thesis by selection available particles for immobilization IgG. Immobilization IgG was implemented on various types – OH and – COOH particles. Then it was carried out quantification of immobilized IgG by different methods: calculation IgG from values absorbance near 280 and 260 nm measured out before and after immobilization, determination IgG assist in specific conjugate, detection IgG by electrophoresis, turbidimetric determination IgG. Further there was instituted quantification IgG by the method ELISA when firstly there was implemented optimization of the method ELISA which results were used to own determination immobilized IgG. Finally there were tested different types of magnetic particles in solution with the different constitution. Time period of particles separation was measured in each solution on the magnetic separator and they were observed by microscope measure of agglomeration of elements in tested solutions.

## Seznam použitých zkratek:

APS - persulfát amonný

ACVA - 4,4'-azobis(4-kyanovaleřová kyselina)

B - označení veličiny magnetická indukce

BET- Brunauer-Emmett-Teller

BSA - hovězí sérový albumin

CMC – kritická micelová koncentrace

CTC - circulating tumour cells

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenylindol

Disponil AES 60 - alkylaryl ether polyoxyethylenu sodného

EDC - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

FTIR - infračervená spektra s Fourierovou transformací

GMA - glycidyl metakrylát

H - označení veličiny intenzita magnetického pole

HEMA - 2-hydroxyethyl metakrylát

HRP – křenová peroxidáza

IA-MDT - implant assisted magnetic drug targeting

IDA - iminodioctová kyselina

IgG – imunoglobulin G

$K_u$  - uniaxiální konstanta

LCST - spodní kritická rozpouštěcí teplota

M - označení veličiny magnetizace

MCLs - magnetitové kationické lipozómy

mPEG - methyl ether polyethylenglykolu

MRI - zobrazení magnetickou resonancí

NIPAM - N-izopropylakrylamid

NTA - nitrolotrioctová kyselina

OPD - o-fenylendiamin

PCL - poly( $\epsilon$ -kaprolakton)

PEG - polyethylenglykol

PEI - polyethylenimin

PGMA - poly(glycidyl metakrylát)

PHEMA - Poly(2-hydroxyethyl metakrylát)  
PLL - poly (L-lysin)  
QDs - quantum dots  
SEM - rastrovací (skanovací) elektronová mikroskopie  
S-NHS - N-hydroxysulfosukcinimid sodný  
SPIO - superparamagnetické partikule oxidu železa  
 $T_c$  - označení veličiny Curieova teplota  
TED - tris(karboxymethyl) ethylendiamin  
TEM - transmisní elektronová mikroskopie  
TEOS - tetraethyl orthosilicate  
TRITON X-100 - polyoxyethylen izooktyl fenyl ether  
TWEEN 20 - polyoxyethylen (20) sorbitan monolaurát  
 $X_m$  - označení veličiny magnetická susceptibilita



## Obsah

1	Úvod.....	12
2	Teoretická část.....	13
2.1	Magnetické částice .....	13
2.1.1	Typy magnetismů .....	14
2.1.2	Fyzikální vlastnosti magnetických nanočástic .....	15
2.2	Příprava magnetických částic .....	16
2.2.1	Syntetická výroba .....	16
2.2.2	Obalované syntetické částice .....	19
2.2.3	Příprava magnetických částic uvnitř bakterií .....	23
2.3	Charakterizace syntetizovaných částic .....	24
2.4	Aplikace magnetických částic .....	25
2.4.1	Uplatnění magnetických částic v analýze biologických materiálů.....	26
2.4.1.1	Magnetická separace proteinů .....	26
2.4.1.2	Separace buněk.....	28
2.4.1.3	Separace nukleových kyselin.....	29
2.4.2	Uplatnění magnetických částic v lékařství.....	31
2.4.2.1	Doručení léku do cílové oblasti .....	31
2.4.2.2	Zlepšení signálu zobrazení magnetickou resonancí (MRI) ..	33
2.4.2.3	Termická léčba.....	34
2.4.2.4	Diagnostika a léčba rakoviny.....	35
3	Experimentální část .....	39
3.1	Přístroje .....	39
3.2	Imobilizace lidského imunoglobulinu G na perlovou celulozu-OH..	39
3.2.1	Použité chemikálie a pomůcky: .....	39
3.2.2	Použité roztoky:.....	39
3.2.3	Postup: .....	40
3.3	Imobilizace lidského IgG na magnetické -COOH partikule .....	40
3.3.1	Použité chemikálie .....	40
3.3.2	Použité roztoky.....	40
3.3.3	Postup: .....	41
3.4	BCA-test pro kvantifikaci proteinů ve vzorku.....	41

3.4.1	Použité chemikálie: .....	41
3.4.2	Použité roztoky:.....	41
3.4.3	Postup: .....	41
3.5	SDS-PAGE elektroforéza proteinů.....	42
3.5.1	Použité chemikálie: .....	42
3.5.2	Použité roztoky:.....	43
3.5.3	Použité pomůcky a přístroje: .....	44
3.5.4	Postup: .....	44
3.6	Barvení PAA gelu roztokem amoniakálního stříbra .....	46
3.6.1	Použité roztoky:.....	46
3.6.2	Postup: .....	46
3.7	Kvantifikace IgG pomocí specifického konjugátu anti-IgG .....	47
3.7.1	Použité chemikálie a pomůcky: .....	47
3.7.2	Použité roztoky:.....	47
3.7.3	Postup: .....	47
3.7.4	Příprava kalibrační řady konjugátu .....	48
3.8	Turbidimetrické stanovení koncentrace lidského IgG.....	48
3.8.1	Použité chemikálie a pomůcky: .....	48
3.8.2	Roztoky: .....	48
3.8.3	Postup: .....	49
3.9	Optimalizace testu ELISA pro stanovení koncentrace lidského IgG 49	
3.9.1	Použité chemikálie a pomůcky: .....	49
3.9.2	Použité roztoky:.....	50
3.9.3	Postup optimalizace ELISA testu-chymotrypsinový systém: .....	50
3.9.4	Postup optimalizace ELISA testu koncentrace lidského IgG: .....	52
3.10	Kvantifikace IgG metodou ELISA.....	53
3.10.1	Použité chemikálie a pomůcky: .....	53
3.10.2	Použité roztoky:.....	53
3.10.3	Postup: .....	53
3.11	Kvantifikace IgG výpočtem z absorbance při 280 a 260 nm.....	54

3.12	Vázková analýza magnetických částic.....	55
3.12.1	Postup: .....	55
3.13	Testování vlastností magnetických nosičů.....	55
3.13.1	Testované magnetické nosiče:.....	55
3.13.2	Testované roztoky:.....	55
3.13.3	Postup: .....	56
4	Výsledky a diskuze .....	57
4.1	Metody pro kvantifikaci proteinů imobilizovaných na nosiče .....	57
4.2	Imobilizace IgG na nemagnetické a superparamagnetické částice	59
4.2.1	Imobilizace IgG na PERLOZA MT 100.....	60
4.2.2	Imobilizace IgG na PERLOZA MG .....	65
4.2.3	Imobilizace IgG na MGCM .....	67
4.2.4	Imobilizace IgG na PGMA .....	72
4.2.5	Imobilizace IgG na částice HEMA-co-EDMA.....	74
4.3	Zavedení metody ELISA pro kvantifikaci IgG.....	78
4.3.1	Optimalizace metody ELISA – chymotrypsinový systém:.....	78
4.3.2	Optimalizace metody ELISA pro kvantifikaci IgG: .....	79
4.3.3	Kvantifikace IgG metodou ELISA .....	80
4.4	Testování vlastností magnetických nosičů.....	80
5	Závěr.....	85
6	Literatura.....	87

# 1 Úvod

Cílem této práce je provedení přípravných kroků k vývoji bioafinitního nosiče pro izolaci A-beta peptidů a anti-A-beta specifických protilátek. Jedná se o výběr magnetických částic různých velikostí (mikro- až nanometrových) a funkčních skupin –OH nebo –COOH, které by byly vhodné pro imobilizaci ligandů (proteinů). U vybraných částic bude zvolena vhodná metoda kovalentní vazby ligandu, v našem případě se bude jednat o imunoglobulin G (IgG). Dále se budeme snažit najít vhodnou metodu pro imobilizovaného ligandu. Pro kvantifikaci budeme používat metody: výpočet množství z hodnot absorbancí při 280 a 260 nm naměřených před a po imobilizaci, stanovení BCA testem, elektroforetická detekce, kvantifikace pomocí specifického konjugátu, turbidimetrické stanovení. Citlivost a kompatibilitu se vzorky těchto metod kvantifikace budeme posuzovat podle výsledků získaných při kvantifikaci imobilizovaného IgG na vybrané nosiče.

Dalším úkolem je zavedení metody ELISA pro kvantifikaci imobilizovaného IgG. Nejdříve bude provedena optimalizace metody ELISA s vybranou primární protilátkou a sekundární značenou protilátkou (konjugátem). Optimalizací bude získána optimální koncentrace primární protilátky a optimální ředění konjugátu, které budou použity jako systém metody ELISA vhodný pro kvantifikaci IgG. Tato metoda bude vyzkoušena na kvantifikaci IgG imobilizovaného na vybrané nosiče.

Dále budou testovány vlastnosti vybraných magnetických částic, komerčních i nově vyvinutých a bude sledováno jejich chování v různých roztocích. Roztoky budou mít různé pH, různé koncentrace solí, detergentů. Bude posuzována míra aglomerace testovaných nosičů v těchto roztocích.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Magnetické částice

Magnetické částice jsou hojně používány v biomedicíně pro svou malou velikost, která dosahuje nano- až mikro- metrů, a částice tak mohou snadno pronikat do potřebných míst. Magnetické nanočástice jsou široce studovány a používány v různých oborech medicíny a biologie pro magnetické navádění léčiv. Jejich výhodou je velký funkční povrch partikulí v poměru k objemu, který je možné obalit různými biologickými molekulami, prostřednictvím kterých interagují s žádoucími látkami nebo se vážou na cílové buňky. Velmi žádoucí jsou jejich magnetické vlastnosti, kterých se využívá při manipulaci partikulí do určitých míst vystavením magnetickému poli (1).

Pro jednotlivé aplikace magnetických částic jsou vhodné různé vlastnosti, kterých se snažíme dosáhnout. Vlastnosti částic je možné ovlivnit při jejich syntéze, kdy je třeba zvolit vhodné podmínky. Částice by měly mít vhodnou velikost, měly by být uniformní, monodisperzní. Dále se provádí různé modifikace částic, aby se zamezilo aglomeraci a aby byly částice stabilní. Pokud se jedná o *in vivo* aplikaci, je důležité, aby byly částice netoxické.

Magnetické částice mohou být definovány jako částice složené z nejméně dvou složek. Jednou z nich je polymerní látka, přírodní nebo syntetická, a druhou je magnetický materiál. Takové částice mají přibližně kulový tvar a průměr řádově v nanometrech nebo mikrometrech. Pro praktické využití modifikovaných částic v biologických vědách je důležité, aby byl jejich povrch vhodný pro navázání biomolekuly, nebo byl biokompatibilní, a to buď bioaktivní nebo bioinertní. Modifikované částice mohou být bioorganickými chemiky, biochemiky, molekulárními biology a biology dále upravovány. Biologicky aktivní molekuly, jako jsou různé proteiny (enzymy, protilátky), nukleové kyseliny, případně oligonukleotidy, mohou být imobilizovány na částice různými technikami, které zahrnují fyzikální adsorpci, elektrostatické vazby, specifické rozpoznávání, kovalentní připojení, apod.. Modifikované částice se uplatní v různých biologických disciplínách. Také

velikost částic je důležitá v oblasti medicíny, kde ovlivňuje významně účinnost působení aktivní složky. Magnetické částice obsahují nejčastěji magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), méně často maghemit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Z fyzikálního hlediska magnetit krystaluje ve struktuře spinelu s železnatými a železitými ionty na oktaedrickém místě mřížky spinelu a konstantní mřížce kolem 8,39 Å. Maghemit  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  je defektní spinel (2).

### 2.1.1 Typy magnetismů

Magnetické částice se podle svých magnetických vlastností mohou označit jako paramagnetické, superparamagnetické a feromagnetické.

Paramagnetické částice:

Tyto částice obsahují atomy s nenulovým permanentním magnetickým momentem. Může se jednat o částice s obsahem např. Pt, Mn, Al, oxidů železa. Magnetické dipólové momenty jednotlivých částic spolu interagují nepatrně. Pokud nejsou vystaveny vnějšímu magnetickému poli, jsou orientovány nahodile, výsledný magnetický moment je nulový a látka není zmagnetizována. Po vystavení vnějšímu magnetickému poli se orientují souhlasně s vnějším magnetickým polem. Mírně zesilují magnetické pole.

Feromagnetické částice:

Jedná se o částice z velmi silných magnetických prvků, např. Fe, Ni, Co. Jejich atomy spolu velmi silně interagují. Obsahují mikroskopické oblasti, tzv. domény, uvnitř kterých jsou magnetické momenty jednotlivých částic orientovány souhlasně. Ve zmagnetizovaném stavu dochází k orientaci domén. Stávají se z nich trvalé magnety. U feromagnetik se vyskytuje hystereze – jev, kdy závislost magnetizace (M) a magnetické indukce (B) není jednoznačná. Feromagnetismus se vyskytuje pouze u pevných látek v krystalickém stavu. Pokud tuto látku zahřejeme na určitou teplotu, tzv. Curieovu teplotu ( $T_c$ ), stane se z ní paramagnetická látka. Feromagnetika výrazně zesilují magnetické pole (3).

Superparamagnetické částice:

Jsou to feromagnetické částice, které se v nemagnetickém médiu chovají jako paramagnetické částice. Pokud na superparamagnetické částice působí

vnější magnetické pole, jsou zmagnetizované. Jakmile vnější magnetické pole přestane působit, magnetizmus ztrácí (4).

### **2.1.2 Fyzikální vlastnosti magnetických nanočástic**

Každá nanočástice má magnetický moment, představuje tedy miniaturní permanentní magnet. Vyplývá to z toho, že nanočástice tvoří Weissovu doménu se spontánní magnetizací. Charakteristický pohyb, kterým se nanočástice pohybují v nosné kapalině, je tepelný (Brownův) pohyb. Pokud na magnetické částice nepůsobí žádné magnetické pole, jsou magnetické momenty těchto částic orientovány náhodně a jeví se proto jako nemagnetické (5).

Žádoucí je, aby magnetické kapaliny byly koloidně stabilní, tedy aby nedocházelo mezi nanočásticemi k vzájemné aglomeraci (shlukování magnetických nanočástic) působením přitažlivých sil (van der Waalových a magnetických sil). Koloidní stability lze dosáhnout obalením nanočástic detergentem (povrchově aktivní látka, surfaktant). Toto obalení zabraňuje přímému kontaktu mezi nanočásticemi, protože vyvolá odpudivé síly mezi nanočásticemi (6).

Důležitou charakteristikou surfaktantů je kritická micelová koncentrace (CMC). CMC je koncentrace surfaktantu, při které se začínají spontánně formovat micely. Při dosažení CMC se dalším přidáváním surfaktantu zvyšuje počet micel (7).

Běžně používaným surfaktantem je kyselina olejová, která je vhodná pro magnetické částice syntetizované tradiční koprecipitační metodou. Dochází k formování silné vazby mezi karboxylovou kyselinou a amorfními částicemi oxidu železa. Slouží k stérické stabilizaci v nepolárním rozpouštědle. Na kyselinu olejovou se váže ještě druhý surfaktant, např. PLURONIC, což je kopolymer, který se skládá ze tří částí: oxid polyethylenu-oxid polypropylenu-oxid polyethylenu (PEO-PPO-PEO). Takto upravené magnetické částice jsou vhodné pro aplikaci v doručení léku (8).

Dalšími surfaktanty používanými k stabilizaci magnetických částic jsou Disponil AES 60 (alkylaryl ether polyoxyethylenu sodného), TRITON X-100 (polyoxyethylen izooktyl fenyl ether) (9).

Působením magnetického pole na magnetickou kapalinu se suspendované nanočástice polarizují, což znamená, že se stáčí podle směru magnetického pole (5).

U ferrokapalin závisí  $B$  na intenzitě magnetického pole ( $H$ ) a to tak, že s rostoucím  $H$  se  $B$  asymptoticky blíží hodnotě ve stavu nasycení (saturace). Ferrokapaliny se vyznačují poměrně vysokou magnetickou susceptibilitou ( $X_m$ ). Hodnota  $X_m$  klesá s rostoucí teplotou ferrokapaliny. Při dosažení Curieovy teploty ( $T_c$ ) ztrácí ferrokapalina své magnetické vlastnosti:  $X_m = 0$ .

Magnetické pole působící na ferrokapalinu ovlivňuje některé její fyzikální vlastnosti, např. viskozitu. U ferrokapalin se vyskytuje magnetoviskozní jev, kdy s rostoucí intenzitou magnetického pole se zvyšuje viskozita. Magnetické pole dále ovlivňuje optické vlastnosti ferrokapalin (5).

## **2.2 Příprava magnetických částic**

### **2.2.1 Syntetická výroba**

Nanočástice oxidů železa jsou připravovány různými metodami. Nejběžněji používanou metodou je koprecipitace z vodného roztoku. Další možnosti syntézy zahrnují rozklad karboxylátů s následnou redukcí nanovelikosti hematitu, mikroemulzní technologie, laserová pyrolýza a plamenová sprejová syntéza (2).

Syntéza magnetitových částic precipitací probíhá ve vodné směsi železnatých a železitých solí, která je smíchána se zásadou pro indukci precipitace magnetitových částic. Maghemit pak může být získán mírnou oxidací magnetitu. Průměrná velikost vzniklých partikulí je 5-100 nm, podle zvolených reakčních podmínek. Nevýhodou těchto částic je polydisperzita, tzn. částice nejsou stejně velké. Pro dosažení monodisperzity, tzn. stejné velikosti nanočástic, se zkouší různé postupy (10).



Jednou z možností dosažení monodisperzity je využití centrifugace, kdy použitím různých g-sil jsou separovány jednotlivé frakce částic o různých velikostech. V každé frakci pak jsou získány monodisperzní částice (11).

Charakteristiky magnetitových nanoparticulí připravených koprecipitačními metodami mohou být kontrolovány podmínkami syntézy, jako např. koncentrace solí železa, teplota roztoku a reakční časy. Nevýhodou je, že krystalinita a magnetické vlastnosti nejsou vždy ideální, protože koloidy železnatých a železitých hydroxidů se formují při nízké teplotě. Tomuto lze předejít temperováním po sušení produktu (12).

Příklad klasické precipitační syntézy hydrofobních magnetitových částic: během koprecipitace  $\text{FeCl}_2$  a  $\text{FeCl}_3$  (1:2) amoniakem se ke stabilizaci iontových oxidů nanočástic přidává kyselina olejová. Koprecipitace probíhá v atmosféře  $\text{N}_2$  při teplotě  $60^\circ\text{C}$  po dobu 10 minut. Disperze se provádí zahřátím na  $90^\circ\text{C}$  po dobu 0,5 hodiny. Po ochlazení se provede úprava pH na 4 přidáním 3 M HCl. Vzniklé magnetické částice jsou z roztoku separovány, odděleny magnetem, 5x se promyjí deionizovanou vodou k odstranění  $\text{Cl}^-$  a 2x promyty ethanolem (popř. acetonem). Nakonec se partikule redisperzují do cyklohexanu pro další užití (13).

Modifikací precipitační metody je elektro-precipitace v ethanolu. V této metodě se používají dva uhlíkové válce, které mají funkci elektrod v elektrochemické vaně. Roztok je v průběhu procesu míchán prostřednictvím magnetické tyče. Jako zásoba železa je použit roztok  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$  v ethanolu. V průběhu procesu se udržuje konstantní napětí 62 V mezi elektrodami, proud může nepatrně kolísat ( $\approx 10\%$ ). Vznikající partikule magnetitu jsou zachyceny na katodě, jako černé magnetické makroskopické destičky. Poté jsou promyty ethanolem a vysušeny proudem vzduchu při pokojové teplotě (10).

Jednou z možností syntézy magnetických částic je emulzní polymerizace. Tato metoda se využívá k syntéze např. PGMA (polyglycidyl methakrylát) částic. Reakční směs se skládá z vody, oxidu železitého, Disponil AES 60 (popř. jiný detergent), GMA (glycidyl methakrylát) a APS (persulfát amonný) nebo ACVA (4,4'-azobis(4-kyanovalerová kyselina) v NaOH. Tato reakční

směs se probublává dusíkem 10 minut, polymerizace probíhá 20 hodin při 70 °C za neustálého míchání. Vzniklé částice jsou čištěny např. dialýzou nebo ultracentrifugací (9).

K syntéze Ni-Zn-ferit částic může být využita mikroemulzní technologie. Jako reverzní micelový systém se používá roztok AOT (sodium dioctyl sulfosuccinate)- 0,56 M AOT v izooktanu. Vytvoří se vodná fáze z 0,07 M  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 M,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a 0,02 M  $\text{ZnCl}_2$ . Ve vodné fázi se udržuje pH 1,2 pro zamezení předčasné oxidace železnatých iontů. Pak se vytvoří dvě mikroemulze: 1. se skládá z vodné fáze a roztoku AOT v izooktanu (poměr AOT/vodě je 6:1), 2. se vytvoří z roztoku amoniaku a roztoku AOT v izooktanu. Obě mikroemulze se smíchají. Probíhá reakce za neustálého míchání, která trvá asi 2 hodiny. Barva směsi se mění ze zelené na červenou. Po dokončení reakce se přidá methanol, čímž dojde k rozpadu micel. Následuje odtažení supernatantu od částic a promytí částic. Vzniklé částice se suší přes noc (14).

Další možností syntézy magnetických částic laserová pyrolýza, která se používá např. k tvorbě železných nanočástic obalených uhlíkem. Jako prekurzor železa se používá pentakarbonyl železa a prekurzorem uhlíku může být směs ethyle/acetylen nebo toluen. Pentakarbonyl železa je toxický, proto může být nahrazen ferrocenem, čímž se dosáhne nižší toxicity. Proces laserové pyrolýzy kombinuje rychlé zahřátí plynných prekurzorů laserem s rychlým ochlazením reakčních produktů. Prekurzory jsou rozprášeny a dopraveny prostřednictvím nosného plynu, kterým může být argon, k reakční zóně (15).

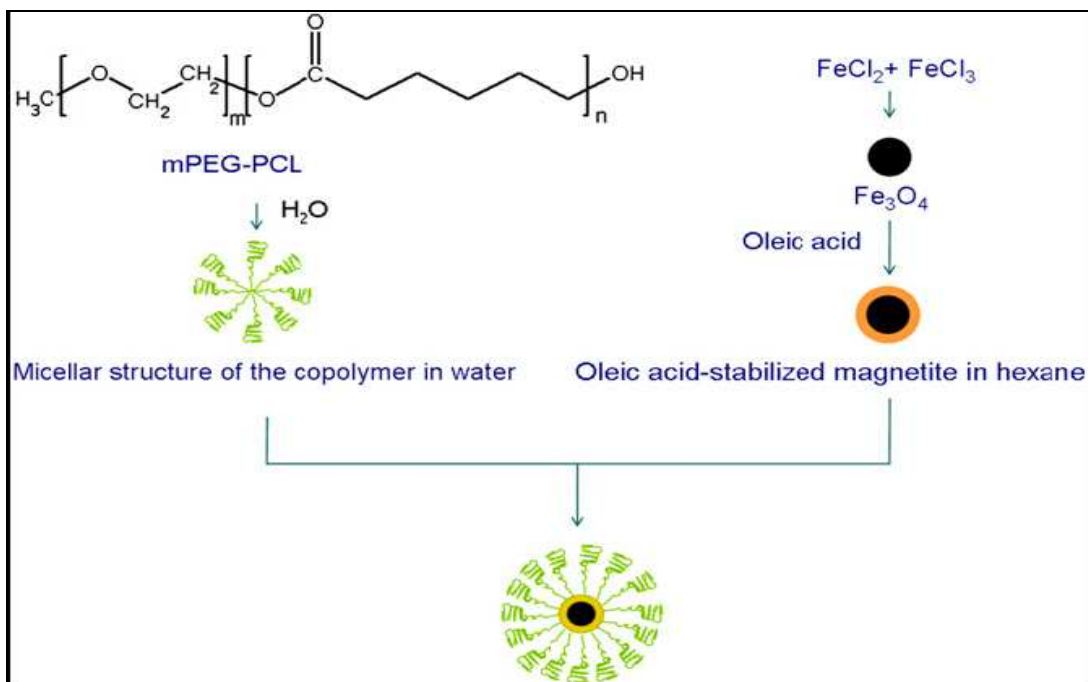
Plamenová sprejová metoda syntézy se většinou používá k tvorbě kovových magnetických nanočástic (např. kobalt, železo, měď), které jsou obalené uhlíkem. Změnou podmínek procesu lze tvořit nanočástice kobaltu bez obalení uhlíkem. Prekurzorem kobaltu je 2-ethylhexanoát rozpuštěný 2:1 v tetrahydrofuranu. Vzniklé částice jsou separovány použitím filtru. (16)

### **2.2.2 Obalované syntetické částice**

Magnetické nosiče mohou být vyráběny užitím anorganických materiálů (Au, C, Co, Cu, Pt) nebo polymerů. Tyto nosiče jsou pak mechanicky vysoce odolné, tepelně stálé, odolné k rozpouštění a mikrobiálnímu ataku. Magnetické nosiče z anorganických materiálů jsou ideálními nosiči, ale mají omezené funkční skupiny pro selektivní vazbu. Polymery mají různé povrchové funkční skupiny, které mohou být přizpůsobeny jejich specifické aplikaci (17). Příkladem jsou silanolové funkční skupiny Si(OH) na povrchu křemenných částic. Díky silanolovým skupinám jsou křemenné částice využívány k imobilizaci specifických ligandů, především enzymů (18).

Částice jsou obvykle stabilizovány odpuzováním nábojem elektrické dvojvrstvy nebo stericným odpuzováním dlouhých řetězců polymerních surfaktantů adsorbovaných na jejich povrchu. Stabilizace slouží jako prevence přiblížení sousedních částic a následné aglomeraci. Jako stericný stabilizátor formovaných magnetitových nanočástic rozptýlených v organickém rozpouštědle se používá kyselina olejová. Tyto částice ale nejsou rozptýlené ve vodě a to znemožňuje jejich použití pro aplikace v biomedicině. Proto se připravují magnetitové nanočástice jejichž povrch se obalí hydrofilním stabilizátorem a jsou rozptýlené ve vodě. Tímto obalením mohou získat částice žádoucí vlastnosti. K obalení se mohou použít funkční molekuly jako kyselina listová nebo biologickými molekulami jako je DNA a protilátky (19).

Magnetitové nanočástice rozptýlené ve vodě mohou být obaleny polymerní dvojvrstvou primárního a sekundárního surfaktantu pro stabilizaci. Příkladem jsou magnetitové částice s hydrofobním povrchem obalené kyselinou olejovou jako primárním surfaktantem v kombinaci s blokovým kopolymerem poly-(ethylenglykol) methyl ether (mPEG)- poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL). Hydrofobní PCL adsorbuje na presyntetizované magnetitové nanočástice obalené kyselinou a hydrofilní mPEG vyčnívá vně z povrchu částic (19).



Obr.1: Magnetitové nanočástice stabilizované kyselinou olejovou a mPEG-PCL (19)

Provádí se obalení superparamagnetických částic oxidu železa vrstvou amorfního křemene. Tyto částice obsahují pouze jednu nebo několik málo nanočástic oxidu železa a proto je jejich odpověď na vnější magnetické pole slabá(20).

Provedení syntézy nanočástic oxidů železa obalených oxidem křemičitým: hydrofobní magnetitové nanočástice se 2x promyjí ethanolem a pak se ethanol odstraní. Za otáčení se přidává tetraethyl orthosilicate (TEOS), Triton X-100 a deionizovaná voda a emulze získá hnědou barvu. Poté se dá na 10 min. na ultrazvuk. K emulzi se přidá ethanol a amoniak. Reakce probíhá 4,5 hodiny při pokojové teplotě. Konečná suspenze se rozptýlí ultrazvukem, odebere se magnetickou separací, promyje se deionizovanou vodou a vysuší se ve vakuu při 40°C (13).

Další možností je syntéza monodisperzních magnetických nanočástic s mezoporézní křemennou skořápkou, které vykazují značně vyšší magnetizaci, ale nejsou superparamagnetické a tudíž je znemožněna jejich biomedicínská aplikace. Magnetitové nanočástice jsou nejdříve stabilizovány kyselinou olejovou a pak se rozptýlí v octanu. Tato ferrokapalina se přidá

do vodného roztoku polyoxyethylenu (20) sorbitan monolaurat (TWEEN 20) a pak se upraví ultrazvukem. TWEEN 20 je zde sekundárním surfaktantem, který shromáždí hydrofobní magnetitové částice do sfér s vyšší frakcí magnetitu. Vrstva křemene je vsazena do povrchu magnetitových aglomerátů pomocí sol-gel procesu (20).

Dalšími velmi využívanými magnetickými částicemi jsou částice s křemičitým povrchem. Důvodem jejich využití jsou povrchové silanolové skupiny (-SiOH) a jejich vhodné vlastnosti. Tyto částice se mohou vyrábět třemi způsoby. 1. metoda je založena na Stöber procesu, ve kterém se křemen formuje in situ hydrolyzou a kondenzací. Prekurzorem je např. tetraethyl orthosilicate. 2. metoda je založena na vylučování křemene z roztoku kyseliny křemičité. Tato metoda je efektivnější než první, protože má vyšší pokrytí povrchu magnetitu křemenem. 3. způsobem tvorby křemenného povrchu je mikroemulzní metoda, kde se používají micely nebo inverzní micely k upevnění křemene na povrchu částic (21).

Uniformní magnetické křemenné nanočástice jsou vhodné pro aplikaci v biologii a medicíně, např. kontrastní agents v MRI, magnetická separace oligonukleotidů, buněk a biokomponent, doručení léků. Křemenné magnetické nanočástice jsou velké 2 až 30 nm, jsou stabilní, neagregují a chovají se superparamagneticky. Na povrchu těchto částic jsou thiolové skupiny, prostřednictvím kterých vážou molekuly ligandu. Užívají se především k imobilizaci enzymů, proteinů, DNA. K imobilizaci dochází několika způsoby: 1. imobilizace biomolekuly amino skupinou na karboxylát-modifikované částice. 2. imobilizace prostřednictvím vazby avidin-biotin, kdy biotin je jednoduše spojen s biomolekulou a váže se na avidin, který je imobilizovaný na křemenných nanočásticích. 3. Pro imobilizaci oligonukleotidů je efektivní disulfidická vazba. 4. Provádí se modifikace křemenných částic kyanobromidem. Takto modifikované částice jsou vhodné pro biokonjugaci molekul obsahujících tři aminoskupiny (18).

Často bývají magnetické částice oxidů železa, např. magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemitu ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) nebo směsných oxidů železa, hlavně  $\text{CoO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,

$\text{CuO.Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MnO.Fe}_2\text{O}_3$ , obaleny polysacharidy nebo jejich deriváty. Využívá se zde postranních funkčních skupin(22).

Vrstva polymeru musí kompletně pokrývat povrch částic, aby chránila jádro z oxidů železa před kontaktem se sérovými proteiny, které by způsobily opsonizaci částic (23).

Dalším příkladem polymeru je dextran, což je polysacharid, který má mnoho biologických výhod, např. biodegradabilita, biokompatibilita a bioaktivita (17). Dextran je polymer ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) anhydroglukózy, který má  $\alpha$ -D(1-6) vazby a několik 1,3-glukosidických vazeb v místě větvení (23). Jedná se o poly-kationt, který je hydrofilní a obsahuje poly-hydroxy (-OH) skupiny a je proto používán jako základní materiál magnetických nosičů (17). Ve vodném roztoku dextran interaguje s kovy a pokrývá jejich povrch agregáty o průměru 20-150nm (23). Magnetické mikročástice obalené dextranem jsou připraveny použitím ultrazvuku (17).

Možností modifikace povrchu magnetických částic oxidu železa vytvořených precipitací Fe (II) a Fe (III) hydroxidem amonným je následná adice poly(L-lysinu) (PLL). Toto obalení PLL se provádí pro podporu buněčné sorpce. Průměrná velikost těchto částic je 6 nm (24).

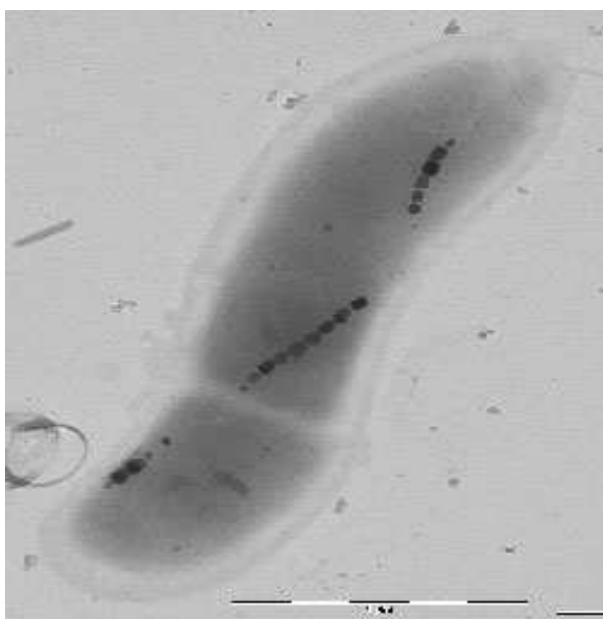
Zlaté nanočástice jsou jedním typem kovových magnetických nanočástic. Jejich velikost je  $< 50$  nm. Připravují se v různých geometrických uspořádáních. Jsou vynikajícími značkami pro biosenzory, protože mohou být detekovány mnoha technikami, jako je optická absorpce, fluorescence a elektrická vodivost (25).

Monodisperzní FePt nanočástice s plošně centrovanou tetragonální strukturou vykazují tepelnou stabilitu. Mají vysokou hodnotu uniaxiální konstanty ( $K_u$ ). Žádoucí plošně centrovanou tetragonální strukturu získáme přeměnou plošně centrované kubické struktury tepelným ošetřením při 600-700 °C. K syntéze těchto monodisperzních částic s kontrolovanou velikostí a velikosti distribuce se použil MCM - 41 molekulární filtr s uniformní velikostí mezopór (3 nm). FePt nanočástice byly izolovány dielektrickou tenkou vrstvou amorfního  $\text{SiO}_2$ . Tato vrstva představuje difúzní bariéru a prevenci shlukování nanočástic během tepelného ošetření (26).

### 2.2.3 Příprava magnetických částic uvnitř bakterií

Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) může být formován tzv. magnetotaktickými bakteriemi-*Magnetospirillum magneticum*, jako výsledek biologicky navozené produkce v magnetozómech. Magnetozómy jsou orgány, které umožňují bakterii využití magnetických vlastností magnetitu k pohybování do oblastí s obsahem kyslíku a orientaci k jednomu z magnetických pólů Země (má pro bakterii tedy má funkci kompasu) (27).

Magnetické částice z bakterií jsou uniformované o velikosti 50 nm a mají žádoucí magnetické vlastnosti. Formují se do řetězců vázaných k membráně. Vznik částic je dán proteinem vyskytujícím se u těchto bakterií. Byly provedeny studie syntézy částic stejnou cestou jako u bakterií (tedy s použitím proteinu z bakterií), ale vzniklé částice neměly tak dobré magnetické vlastnosti a nedostatečně specifickou morfologii krystalu (28).



Obr.2: Řetězce magnetických nanočástic v bakterii (AMES LABORATORY)

Mikroorganismy *Pseudomonas stutzeri* formují intracelulárně při kultivaci ve vysoké koncentraci stříbrných iontů stříbrné nanočástice. Dalším příkladem mikroorganismů tvořících magnetické nanočástice je *Lactobacillus*, které v podmáslí v prostředí stříbrných a zlatých iontů produkují nanočástice. *Aktinomyce* *Thermomonospora* se používají k syntéze monodisperzních zlatých nanočástic. Také některé houby slouží k syntéze nanočástic

v prostředí vodných roztoků kovových iontů, např. *Fusarium oxysporum*, *Verticillium sp.*(29).

### **2.3 Charakterizace syntetizovaných částic**

Po přípravě částic se provádí kontrola velikosti a vlastností částic. Charakterizace fyzikálních vlastností se soustředí především vztah mezi velikostí částic a jejich magnetickými vlastnostmi. Pro charakterizaci magnetických částic se používají různé metody (30).

Pro pozorování morfologie partikulí se používá transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a rastrovací elektronová mikroskopie (SEM). Transmisní elektronový mikroskop (TEM) umožňuje pozorování preparátů do tloušťky 100 nm při vysokém zvětšení a s velkou rozlišovací schopností. Je analogií světelného mikroskopu, jejich společné části jsou: zdroje světla nebo elektronů, čočky skleněné nebo elektromagnetické a umístění preparátu na mechanický stolek. TEM má navíc vysokonapěťový zdroj, elektroniku k řízení mikroskopu a výkonný vakuový systém pro vyčerpání jeho vnitřních prostor mikroskopu na hodnotu, která zabezpečí střední volnou dráhu elektronu alespoň v délce 3 m (30).

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) je přístroj určený k pozorování povrchů nejrůznějších objektů. Na rozdíl od světelného mikroskopu je výsledný obraz tvořen pomocí sekundárního signálu - odražených nebo sekundárních elektronů. Zobrazení v SEM je považováno za nepřímou metodu. Velkou předností SEM je velká hloubka ostrosti, v důsledku které lze z dvojrozměrných fotografií ze SEM nalézt jistý trojrozměrný aspekt. Další předností těchto mikroskopů je, že v komoře preparátů vzniká při interakci urychlených elektronů s hmotou vzorku kromě výše zmíněných signálů ještě řada dalších, např. rtg. záření, Augerovy elektrony, katodoluminiscence, které nesou mnoho dalších informací o vzorku. Při jejich detekci je možné určit např. prvkové složení preparátu v dané oblasti a při porovnání s vhodným standardem určit i kvantitativní zastoupení jednotlivých prvků (31).



Měření síly difrakce rentgenového záření nám poskytne velikost částic a rentgenový difraktogram. Velikost částic a specifický povrch získáme BET metodou (2). Brunauer–Emmett–Teller (BET) metoda je používána především k stanovení povrchové plochy z fyzikální adsorpce plynu (většinou dusík) na pevný povrch. Pro toto měření se používá přístroj GEMINI 2360 (32).

K další charakterizaci částic se používá infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). U této metody se měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Analytickým výstupem jsou infračervená spektra, která znázorňují závislost absorpance na vlnové délce dopadajícího záření (33).

## **2.4 Aplikace magnetických částic**

Magnetické nanočástice jsou aplikovány v různých oborech, především v oblasti elektroniky, jako biomedicíncké prostředky, v energetických aplikacích, v armádním využití (detoxikace kontaminovaných osob), v managementu odpadu. Potenciál pro využití magnetických nanočástic vyplývá z jejich fyzikálních, elektronických a magnetických vlastností (34).

Magnetické částice jsou nejvíce rozšířeno v medicínské diagnostice a terapii, bioinženýrství a molekulární biologii. Používané magnetické nanočástice musí být uniformní, monodisperzní, nesmí agregovat, neměly by být toxické. Je snaha o syntézu částic s co nejlepšími vlastnostmi pro danou aplikaci. Nové trendy zahrnují vývoj funkčních částic, které jsou konjugovány biologickými molekulami, jako peptidy, proteiny a nukleové kyseliny. V klinických studiích jsou nejběžněji využívány superparamagnetické částice oxidu železa (SPIO), v rozmezí velikostí 80 – 150 nm (35).

Nově se používají magnetické křemenné nanosféry k separaci nukleových kyselin, imobilizaci enzymů, hypertermii a k doručení léku. Vznikla nová imobilizační afinitní separační metoda založená na interakci kovových iontů s histidinem nebo cysteinem na konci proteinů navázaných na povrchu. Ve srovnání s klasickými metodami užívajícími biologické afinitní ligandy jsou tyto magnetické částice malé, nenákladné, chemicky a fyzikálně stálé

a mohou být jednoduše obaleny různými hmotami s vysokou kapacitou adsorbentů. Eluce adsorbovaného proteinu z nanosfér se provádí za mírných podmínek. Používají se různé karboxymethylované aminy, obsahující iminodioctovou kyselinu (IDA)- nejpoužívanější, tris(karboxymethyl) ethylendiamin (TED), nitrolotrioctová kyselina (NTA), jako cheletační ligandy. Výsledné cheláty kovů jsou dobře přístupné pro aminokyselinové zbytky na površích proteinů (18).

Magnetické částice jsou dále používány jako nosiče protilátek pro imunoeseje, buněčnou separaci a tkáňovou typizaci. Toto využití je vhodné pro plnou automatizaci, což vede k minimalizaci manuální práce v laboratoři a k poskytnutí přesných výsledků (36).

#### **2.4.1 Uplatnění magnetických částic v analýze biologických materiálů**

Pro své vlastnosti (hlavně magnetické vlastnosti, velký specifický povrch, velikost) mají magnetické částice velký potenciál k aplikaci v magnetické separaci. Principem této metody je využití magnetických částic k vazbě k cílovým molekulám prostřednictvím ligandu na povrchu magnetických částic. Tím vznikne komplex, který může být separován z roztoku působením gradientu magnetického pole. Tato aplikace zahrnuje imobilizaci enzymu, buněčné třídění, adsorpci proteinu a purifikaci. Výhodou magnetické separace je rychlost, jednoduchost a správnost (37).

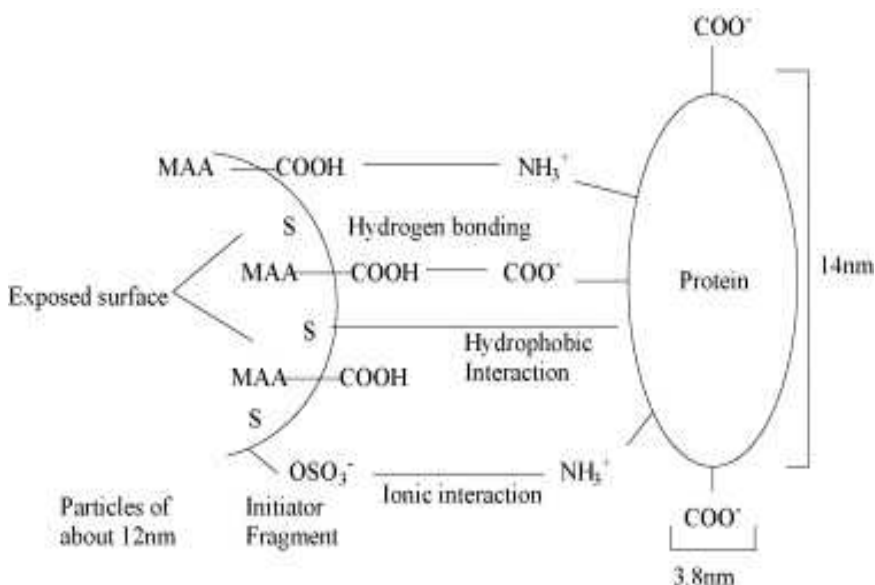
Magnetické částice se přidávají ke vzorku, kde na sebe naváží cílové molekuly. Modifikované magnetické částice se pak přitáhnou magnetem ke stěně zkumavky a zbylý roztok se odstraní. Následuje promývání a oddálení z vnějšího magnetického pole k uvolnění magnetických částic s navázanými molekulami do přidaného roztoku. Různými fyzikálně-chemickými kroky se oddělí navázané molekuly od magnetických částic, čímž získáme cílové molekuly a můžeme s nimi dále pracovat (38).

##### **2.4.1.1 Magnetická separace proteinů**

Magnetické částice poskytují rozsáhlou plochu specifického povrchu a mohou poskytnout vysokou adsorpční kapacitu pro proteiny. K separaci

proteinu se nejčastěji používají submikrometrické magnetické částice. Zjistilo se, že vodíkové vazby, hydrofobní interakce a elektrostatický odpor mohou podporovat adsorpci. K desorpci proteinu z magnetických částic se používá kyselina nebo báze. Např. k desorpci lysozymu z magnetického chitinu se používá 0,01 M HCl. Přišlo se ale na to, že pro desorpci proteinu z částic je kyselina octová obsahující soli efektivnější než HCl nebo glycin-HCl (35).

Snahou této oblasti je vyvíjet polymerní materiály vhodné pro obalení oxidů železa v magnetické částici. Hodně studovaný je termosenzitivní polymer N-izopropylakrylamid (NIPAM). Má dolní kritickou rozpouštěcí teplotu (LCST) ve vodě 32 °C, která je blízká pokojové teplotě. Proto byl použit k vratné adsorpci a desorpci lidského sérového albuminu. Ten adsorbuje při vyšší teplotě (40 °C) a může být desorbován z partikulí při nižší teplotě (25 °C), ale menší frakce. Desorpce je závislá na různých parametrech. Desorpci hovězího sérového albuminu (BSA) můžeme provést roztokem alkalického pufru. Alkalických podmínek (pH 10-13) se využívá také k desorpci rekombinantní *Escherichia coli* z chitosanem konjugovaného magnetitu. Studují se kvantitativní efekty povrchových funkčních skupin a interakční síly na vysoce karboxylovaných makrosférách (39).



Obr.3: Mechanismus adsorpce proteinu na karboxylové termosenzitivní nanočástice (39)

Dále se k separaci proteinu mohou použít magnetické nanočástice obalené zlatem a stabilizované citrátem. Tyto syntetizované partikule jsou velké 15-40 nm s plošně centrovaným kubickým tvarem a jsou rozpustné ve vodě. K zlatému obalu částic jsou připojeny IgG prostřednictvím elektrostatických interakcí. Následná separace IgG poskytuje 35 % z koncentrace IgG 0,4 µg/ml. Magnetická separace imobilizovaného IgG byla provedena použitím permanentního magnetu 3000 G (40).

Provádí se studia kinetiky adsorpce BSA a vliv pH a koncentrace solí na adsorpci BSA. Adsorpce BSA je provedena v přítomnosti karboimidu při různých hodnotách pH a koncentrací solí. pH má velký vliv na adsorpci BSA, na rozdíl od nižších koncentrací solí, které mají nevýznamný vliv na adsorpci BSA. Maximální adsorpce BSA je dosaženo při hodnotě pH odpovídající izoelektrickému bodu BSA. Bylo docíleno víc jak 90% desorpce BSA (36).

#### 2.4.1.2 *Separace buněk*

Buněčné třídění s využitím magnetických částic je mnohem jednodušší a rychlejší než využití průtokového cytometru. Slouží k studiu funkcí a druhů leukocytů. Na buněčném povrchu jsou povrchové antigeny specifické pro danou buňku. Protilátky proti těmto povrchovým antigenům jsou imobilizovány na magnetické částice a provede se magnetická separace daných buněk. Tato metoda je přesná, citlivá a rychlá (36).

Problémem u syntetických částic je dosažení uniformity velikosti a tvaru a dosažením dobré disperzity ve vodném roztoku. Proto se využívají magnetitové částice vytvořené bakteriemi *Magnetospirillum magnetikum*, u kterých tyto problémy nejsou (36).

Bakteriální magnetitové částice s kovalentně vázaným proteinem A, který vytváří komplex s Fc fragmentem anti-mouse IgG, byly použity k magnetické separaci mononukleárních buněk z periferní krve. Využívá se zde inhibičního efektu na CD14+ buňky (separace monocytů) a proliferační a diferenciací kapacita CD34+ (frakce kmenových buněk). Může tak být pozorována proliferace a diferenciací separovaných kmenových buněk. Pro zvýšení

citlivosti a specifity k CD8+ a CD14+ se optimalizují podmínky vazby monoklonální protilátky s proteinem A navázaným na magnetitových částicích (36).

Magnetitové bakteriální částice byly použity k přímé magnetické separaci buněk imunitního systému z plné krve. Na povrchu částic byl vyjádřen protein G genovou fúzní technikou, díky kterému částice získaly vysokou vazebnou kapacitu k mnoha typům protilátek a mohly se pak vázat s různými anti-CD monoklonálními protilátkami. Takto byly separovány B lymfocyty (prostřednictvím anti-CD19) a T lymfocyty (prostřednictvím anti-CD3). Čistota separované frakce buněk byla vyšší než 96 % (41).

#### 2.4.1.3 Separace nukleových kyselin

Vývoj systémů pevné fáze, které adsorbují DNA, umožňuje automatizaci a miniaturizaci procesu izolace DNA. Výhodou použití magnetických nosičů adsorbujících DNA je minimalizace degradace DNA v průběhu její purifikace. DNA adsorbuje na magnetické částice v prostředí vysoké koncentrace chloridu sodného a polyethylenglykolu (PEG) a následně je obnovena ve vodě. Pro tuto aplikaci jsou vhodné křemenné částice a kobalt-ferrit ( $\text{CoOxFe}_2\text{O}_3$ ) částice (42).

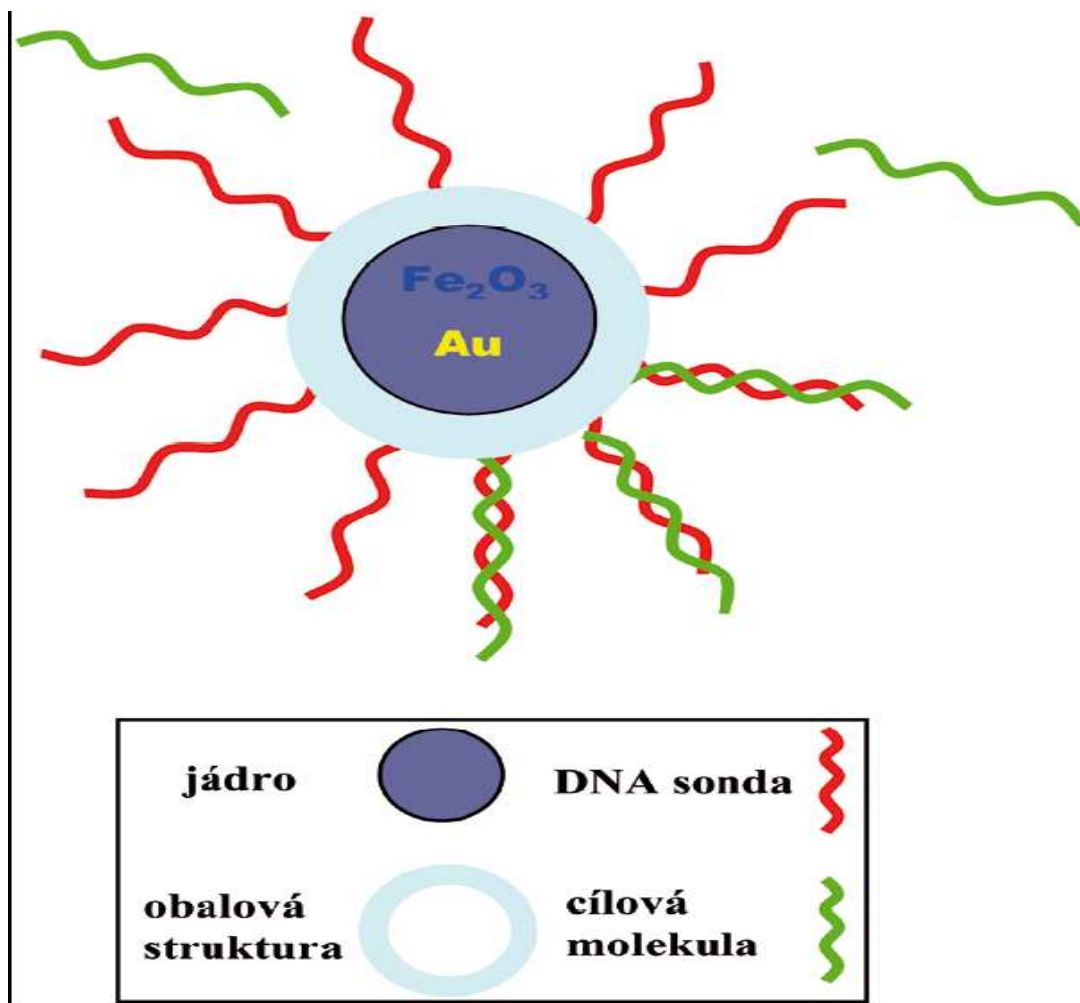
Pro imobilizaci DNA se také používají magnetické mikročástice s hydrofilními vlastnostmi, které neinterferují s produkty PCR a jsou jednoduše připraveny, a to jedнокrokovým rozptýlením polymerací. Výhodou těchto hydrofilních mikročástic je nízká nespecifická adsorpce biologicky aktivních sloučenin. Magnetitové částice jsou obaleny polymery pro stabilizaci. Používají se částice s 2-hydroxyethyl metakrylátem (HEMA) a s glycidyl metakrylátem (GMA). Poly(2-hydroxyethyl metakrylát) (PHEMA) je netoxický, biokompatibilní a proto je používán v biomedicínských aplikacích. Oxiranové skupiny poly(glycidyl metakrylátu) (PGMA) jsou ochotně modifikovány (hydrolyzou, aminolýzou, oxidací). Vlastnosti polymerních mikročástic jsou kontrolovány změnami reakčních parametrů, jako je polarita reakční směsi, koncentrace, polymerační teplota (43).

Suspence superparamagnetických částic v koloně se používají k elektroforetické separaci dlouhých molekul DNA (44). Další možností separace DNA je využití mikrofluidních čipů s magnetickými částicemi, které jsou po vystavení magnetickému poli uspořádány hexagonálně. Tato metoda je vhodná pro separaci dlouhých fragmentů DNA (45).

Na magnetické mikročástice mohou být imobilizovány různé enzymy, protilátky. V tomto případě se jednalo o RNázu A, DNázu I, pro degradaci bakteriální RNA, chromozomální a plazmidové DNA. Pozoruje se efekt některých sloučenin užívaných při přípravě mikročástic na PCR DNA izolované z G+ bakterií *Bifidobacterium longum*. Izolace DNA proběhla v přítomnosti PEG a chloridu sodného (43).

Pro purifikaci plazmidové DNA z 3 ml lyzátu bakteriálních buněk se používají polyethyleniminem (PEI) modifikované magnetické  $Fe_3O_4$  nanočástice. Oxid železa obalený PEI může vnášet kladný náboj, který je prospěšný pro obnovení rozptýlení a umožňuje iontové interakce DNA. Iontové síly a pH hrajou roli v ovlivnění adsorpčních interakcí na PEI modifikovaných magnetických nanočásticích. Důležitý je výběr vhodného elučního pufru – optimální iontová síla (1,25 M) a pH 9 (46).

Magnetické částice jsou vhodné pro rychlou a selektivní izolaci mRNA. K izolaci mRNA se používají komerčně dostupné magnetické částice Dynabeads® Oligo(dT)<sub>25</sub> (Invitrogen Dynal AS), které mají na povrchu ukotveny nukleotidové řetězce z 25 thyminů. Každá mRNA má na jednom svém konci řetězec složený z opakující se sekvence adeninu. Na základě komplementarity bází nukleových kyselin za určitých podmínek dochází k vazbě řetězce z adeninů s řetězcem složeným z thyminů (hybridizace), jenž je ukotven na magnetických částicích. Následuje kvantifikace cílových molekul (37).



Obr.4: Schematicky znázorněné (para)magnetické částice určené pro izolaci nukleových kyselin (37)

## 2.4.2 Uplatnění magnetických částic v lékařství

### 2.4.2.1 Doručení léku do cílové oblasti

V současnosti dochází k velkému rozvoji efektivnějších metod léčby léky, které jsou doručené na specifické místo v těle. U těchto metod je kladen důraz na snížení množství léku ve zdravé tkáni, zmenšení množství léku k dosažení terapeutického efektu a zvýšení terapeutického působení v cílové oblasti. Tyto žádoucí vlastnosti splňují různé systémy doručení léku, které využívají magnetické materiály a působení magnetického pole. Po injekci magnetických částic, jako nosičů léků, do těla se využívá zdroje vnějšího magnetického pole. Toto magnetické pole slouží k chycení a zadržení

magnetických částic ve specifickém místě. Tato metoda se aplikuje při léčbě obvyklých onemocnění, léčbě rakoviny hypertermií nebo radiační terapií (47).

Metody doručení léku jsou studovány na zvířecích modelech. Jsou relativně bezpečné a efektivní, ale vyskytují se zde významná omezení. Jedná se o velikost magnetické síly, která musí být dostatečně vysoká, protože při slabé magnetické síle je zadržení magnetických částic ve specifickém místě málo efektivní. Dalším omezením je vzdálenost specifického místa od zdroje magnetického pole. Síla magnetického pole se totiž prudce snižuje se vzdáleností specifického místa od zdroje magnetického pole. Vzdálenější místa v těle jsou proto nedostupná k doručení léku (47).

Jednou z efektivních metod doručení léku je použití vehikul. Využívá se částic malé velikosti s velkou povrchovou plochou pokrytou funkčními ligandy, díky kterým jsou nanočástice cíleny k specifickým místům nebo buňkám v těle. Jedná se o částice z pevné lipidové hmoty, uvnitř kterých jsou uzavřeny molekuly léku a na povrchu jsou polymerní stabilizátory. Tato metoda je vhodná pro doručení lipofilních léků a dochází při ní k snížení nepříznivých vedlejších účinků léku. Jakmile se lipidové vehikuly dostanou k specifickému místu, provede se zahřátí na teplotu kolem 45-55 °C. Toto zvýšení teploty způsobí rozpad lipidové hmoty a tím se dostanou molekuly léku z částic a mohou pak působit v postižené oblasti. Zvýšená teplota může také způsobit stimulaci imunitní odpovědi pro nespecifickou imunoterapii při určitých onemocněních. V této metodě dochází ke spojení metody doručení léku s hypertermií (48).

Jedním typem doručení léku je IA-MDT (implant assisted magnetic drug targeting). Tento systém se skládá ze tří složek: jeden nebo více magnetů vytvářejících nízký gradient magnetického pole, implantovaná nebo injikovaná zařízení, která po magnetizaci nízkým gradientem magnetického pole vytváří lokalizovaný vysoký gradient magnetického pole. Třetí složkou jsou magnetické částice, u kterých dochází ke shlukování (aglomeraci) jen ve vysokém gradientu magnetického pole ve specifickém místě.



Tento způsob doručení léku využívá změny nízkého a vysokého gradientu magnetického pole (47).

#### 2.4.2.2 Zlepšení signálu zobrazení magnetickou resonancí (MRI)

MRI je diagnostická metoda využívající magnetické vlastnosti atomů vodíku, které jsou přítomny v tkáních těla ( ve vodě, v lipidech membrán, proteinech, atd. ). Tato metoda se používá k trojrozměrnému neinvazivnímu skenování lidského těla. Jako kontrastní agens pro zlepšení diagnostiky MRI se nejčastěji používají  $Gd^{3+}$  cheláty (48). Kontrastní agens slouží k zesílení signálu MRI. Zesílení signálu je závislé na koncentraci kontrastního agens. Pro zvýšení citlivosti MRI mohou být do částic enkapsulovány specifické enzymy (49).

Pro vizualizaci aterosklerotických plaků byly použity Gd obsahující imunomicely Gd-DOTA-C16 o velikosti 85-130 nm. Na povrchu micel byly navázány specifické protilátky proti makrofágům (50).

SPIO se také používají k identifikaci zánětu mozku po mrtvici (51) nebo zánětu jako výsledku rejekce transplantátu (52). Partikule jsou totiž pohlceny makrofágy, které se akumulují v místě vzplanutí zánětu. Infiltrace makrofágy v oblastech CNS postižených encefalomyelitidou byla zkoumaná *in vivo* MRI na zvířecím modelu (53). Dále částice poskytují dobré výsledky při kardiovaskulárním zobrazení, např. při identifikaci koronárních a periferních vaskulitid (35).

Ke zvýšení specifity SPIO k zobrazení určitých buněk se provádí obalení částic ligandy, které se specificky vážou k daným buňkám (35). Příkladem je využití dextrans stabilizovaných částic oxidu železa, na jejichž povrchu je vázán sekretin. Tyto částice se využívají k *in vivo* MRI pankreatických buněk, na jejichž povrchu jsou receptory pro sekretin, prostřednictvím kterých se k nim připojí částice se sekretinem. Zjistilo se, že při prosté konjugaci sekretinu k částicím je výtěžek nižší, než při konjugaci sekretinu, kdy je streptavidin imobilizován na dextrans stabilizované částice a biotinilovaný sekretin je pak konjugován k částicím prostřednictvím interakce biotin-streptavidin (54).

Částice mohou být také využity k detekci tumoru. Dochází k odlišení normální tkáně a rakovinových lézí při zobrazení MRI. Normální tkáň je zbarvena tmavě, protože sbírá SPIO a rakovinové léze vylučují částice, proto je pozorujeme jako světlé skvrny. Podle typů tkáně se používají různé typy částic- závisí to na akumulaci v tkáni. Např. ultramalé SPIO o velikosti 20-40 nm jsou primárně akumulovány v lymfatických uzlinách, což vede k jejich užití k identifikaci nádorových buněk v lymfatických uzlinách (35).

Využití magnetických nanočástic poskytuje výhodnou techniku k označení a sledování nefagocytujících buněk *in vivo* MRI. Představuje to možnost studia biodistribuce kmenových buněk (55), po implantaci neinvazivní monitorování jejich migrace a stanovení úspěšnosti terapie buněčnou transplantací. Příkladem je studium označení a sledování nervových transplantátů, T buněk a monocytů. Studium T buněk a monocytů může pomoci s porozuměním odpovědi imunitního systému na různé choroby. Není však zcela znám dlouhodobější efekt magnetických částic na osud buněk, ke kterým jsou připojeny (35).

#### 2.4.2.3 Termická léčba

Tradiční hypertermická léčba poškozuje rakovinové, ale také zdravé buňky po aplikaci pyrogenu do těla. Je třeba docílit takového užití hypertermie, kde by nedocházelo k poškození zdravých buněk a aby byly zničeny pouze postižené buňky. Toho je docíleno magneticky indukovanou hypertermickou léčbou. Využívá se magnetických částic, které jsou vstříknuty do těla a jsou stimulovány alternujícím magnetickým polem. Po stimulaci magnetické částice v místě nádoru generují teplo, které ničí nádorové buňky (56).

Zahřívání magnetických částic v alternujícím magnetickém poli může být způsobeno různými mechanismy. U ferromagnetických nanočástic je generování tepla docíleno hlavně hysterézními ztrátami. U magnetických částic, kde jsou hysterézní ztráty zanedbatelné je zahřívání způsobeno příslušnými magnetickými momenty a fyzikálním pohybem částic po aplikaci alternujícího magnetického pole (56).

Pro hypertermickou léčbu jsou vhodné superparamagnetické částice pro snadnou lokalizaci hypertermické léčby. Částice musí být netoxické pro tělo a musí být vhodně obaleny pro zamezení aglomerace. Je třeba, aby magnetické částice generovaly takové teplo, které by ničilo nádorové buňky, ale zároveň aby bylo neškodné pro zdravé buňky (55).

Pro využití magnetické fluidní hypertermie je důležité správně zvolit typ magnetických částic, protože teplo generované částicemi je závislé na vlastnostech, tvaru a velikosti použitých magnetických částic. Např. při použití částic  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  vzniká teplo příliš vysoké, které ničí i zdravou tkáň. Proto jsou tyto částice pro MFH nevýhodné. Dobré vlastnosti pro MFH vykazují magnetické částice z komplexních oxidů, které jsou obaleny vrstvou  $\text{SiO}_2$  pro stabilizaci a na povrchu částic je PEG, který slouží k zamezení aglomerace (57).

#### 2.4.2.4 Diagnostika a léčba rakoviny

Mnoho studií se v současné době zabývá možností využití magnetických částic při léčbě rakoviny. Jedná se především o doručení léku k místu, kde se rakovina nachází. Další možností je hypertermická léčba, kdy jsou nádorové buňky zničeny teplem (35).

Mikro- a nanočástice mohou být využity pro snížení a eliminaci vedlejších efektů chemoterapeutických léků. Dále slouží jako specifické nosiče k transportu do cílové oblasti v těle (58).

Využívá se velkého povrchu magnetických částic, které mají na povrchu funkční skupiny, prostřednictvím kterých vážou diagnostická a terapeutická agents, jako tumor-cílené ligandy, např. monoklonální protilátky proti antigenům tumorů (59).

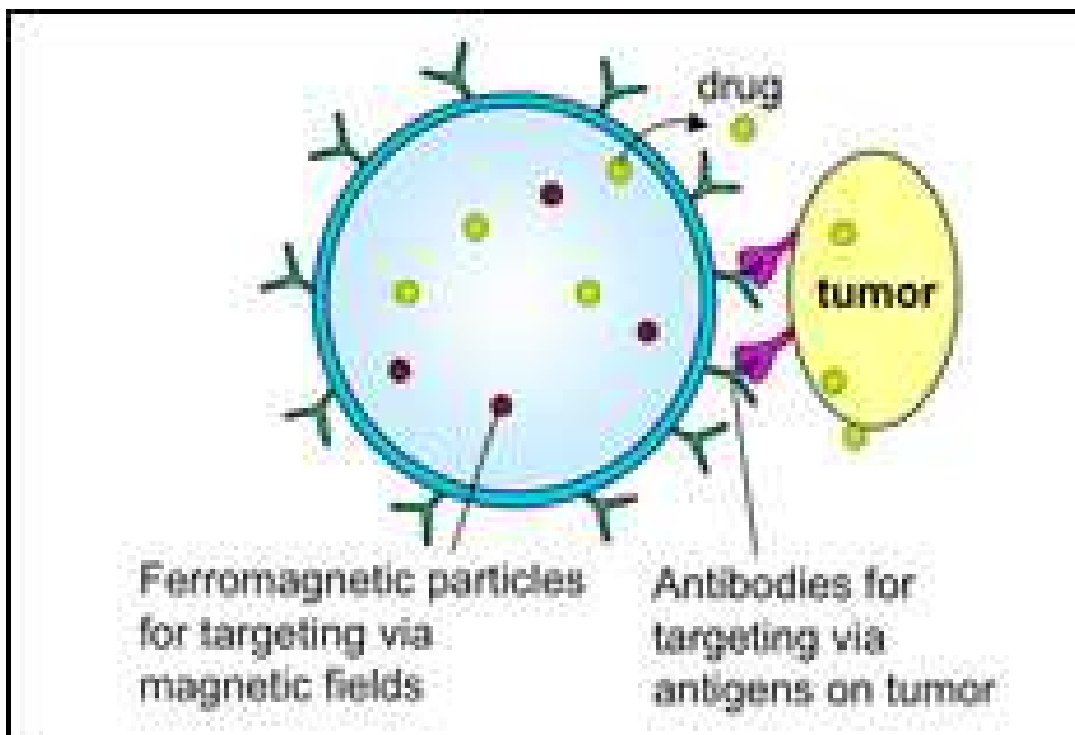
Cytotoxický lék je připojen k mikro- a nanočásticím, čímž dojde k vytvoření komplexu nosič/lék. Tento komplex je vpraven do těla intravenózně nebo intraarteriálně. Prostřednictvím působení vnějšího magnetického pole je určitá koncentrace léku vedena do oblasti, kde se nachází tumor. Poté se terapeutické agens uvolní z magnetického nosiče a to cestou enzymatické aktivity nebo skrz změnu fyziologických podmínek,

jako pH, osmolalita nebo teplota, vedoucí ke zvýšení uptake léku do nádorových buněk (58).

Mohou být použity různé typy magnetických nanočástic, např. nanočástice obalené lipozómy, magnetitem obalené nanosféry a magnetické kapaliny. Na částice působí alternující magnetické pole a ty pak generují teplo, které ničí nádorové buňky (60).

Kombinace magnetických částic s kvantovými tečkami (QDs) je dalším přístupem k léčbě nádorového onemocnění. Pokud jsou tyto nanočástice spojeny s tumor cílenými ligandy, jako monoklonální protilátky, peptidové fragmenty tumor specifických proteinů, mohou být tyto částice užity k cílovým tumorovým antigenům s vysokou afinitou a specifitou. Tyto částice mají v průměru 5-100 nm, rozsáhlou povrchovou plochu s funkčními skupinami a jsou užívány jako terapeutické a diagnostické agens. Příkladem využití je souběžná detekce mnoha nádorových biomarkerů. Nejběžnější strukturou kvantových teček je CdSe tvořící jádro obalené vrstvou ZnS a pak jsou ještě obaleny biofunkčními ligandy. Umožňují pozorování dynamických buněčných procesů, např. sledování migrace buněk, diferenciací buněk a metastáz (61).

K zlepšení účinků chemoterapie při léčbě rakoviny jsou používány kapsle z biopolymerů (chitosan, želatin), které jsou uvnitř duté. Tyto kapsle se používají k doručení léku do cílové oblasti. Lék rozpuštěný ve vodě (chemoterapeutikum) je chycen uvnitř kapslí. Kromě léků jsou uvnitř kapslí také magnetické částice, které ulehčují transport kapslí tělem aplikací magnetického pole. Na povrchu kapslí jsou navázány protilátky proti antigenům tumoru. Díky těmto protilátkám se kapsle vážou v oblasti tumoru a použitím světla nebo teploty se kapsle rozpadnou a chemoterapeutikum se uvolní do rakovinové tkáně (62).



Obr.5: kapsle s magnetickými částicemi, léky a protilátkami (62)

V případě nemožnosti chirurgického odstranění nádoru, např. pokud se jedná o malé, špatně definované, opakující se nebo metastatické tumory, lze využít termoterapii. Výhodou je minimální invazivita (63).

Rakovina prostaty je nejfrekventovaněji diagnostikovanou malignitou u mužů, jejíž incidence je neustále na vzestupu. Léčba většinou probíhá chirurgickým vnyětím a následným ozařováním, popř. jinými možnostmi léčby. Provádí se studie in vitro, které se zabývají využitím hypertermie při léčbě karcinomu prostaty. Zjistilo se, že hypertermie zvyšuje efekt záření na nádorové buňky prostaty. Hypertermie je založena na faktu, že rakovinové buňky jsou více citlivé na teplo, než buňky zdravé tkáně. Při využití hypertermie vznikají problémy s dosažením uniformity zahřátí pouze v oblasti tumoru (nesmí dojít k poškození zdravé tkáně). Velikost specifického tepla, které působí na nádorové buňky závisí na mnoha faktorech, především na velikosti tumoru a pozici elektrod (64).

Při využití hypertermie k léčbě rakoviny se používají magnetické částice, které produkují teplo pod alternujícím magnetickým polem v důsledku hysterézní smyčky. Pro indukci intracelulární hypertermie se používají např. magnetitové kationické lipozómy (MCLs). MCLs vykazují vyšší afinitu

k nádorovým buňkám, než neutrálně nabité magnetolipozómy, v důsledku elektrostatických interakcí s negativně nabitou buněčnou membránou. Hypertermický efekt MCLs na nádorové buňky je vyzkoušen i *in vivo* na krysách s rakovinou prostaty. Hypertermie nádorové buňky nejen zabíjí přímo, ale také navozuje imunitní odpověď (64).

Hypertermická léčba gliomu s využitím magnetických částic má nevýhodu v dosažení klinické efektivity (problém se získáním dostatečně vysoké intratumorální teploty). Využívá se superparamagnetických nanočástic oxidů železa. Po přímé injikaci do cílové oblasti produkují teplo ve vnějším magnetickém poli. *In vivo* experimenty v modelu karcinomu mléčné žlázy a krysím modelu rakoviny prostaty vykazují významný antitumorální efekt (65).

K novým trendům v diagnostice nádorového onemocnění patří izolace cirkulujících nádorových buněk (CTC) pomocí sensibilizovaných magnetických částic (66). Tyto buňky jsou odvozené z primárního nádoru a podle posledních výzkumů poukazují na tzv. mikrometastázy. Tyto cirkulující nádorové buňky jsou šířeny krevním a lymfatickým oběhem již v ranném stádiu primárního nádoru a mohou tak sloužit k včasné diagnostice metastazujících nádorů. Byla studována např. izolace mikrometastáz u karcinomu prsu a sledování možnosti odstranění mikrometastáz chemoterapií (67).

Pro rutinní stanovení CTC v krvi pacientů s metastatickým karcinomem prsu je využíván např. Cell Search Epithelial Cell kit (Veridex, Warren, NJ). Využívá se zde ferrofluidních částic s navázanými anti-EpCAM protilátkami, anti-cytokeratin protilátkami (rozpoznávají především cytokeratin 8, 18 a 19) ke specifické identifikaci epiteliálních buněk, protilátka proti CD45 k identifikaci leukocytů a fluorescenční značku DAPI (4,6-diamidino-2-fenylyndol) (68).

## 3 Experimentální část

### 3.1 Přístroje

- aparatura pro diskontinuální elektroforézu název (BioRad)
- zdroj napětí (BioRad Power Pac 200)
- fotometr na destičky (Labsystems Multiskan RC)
- fotometr: Biophotometer (Eppendorf)
- mikroskop (PZO, Warszawa)
- ultrazvuk: Sonorex digitec (Bandelin)
- termostat: Biological termostat BT 120 M
- míchadlo: Shaker Rotisserie (Labquake)
- Vortex: Vortex mixer (Velp scientifica)
- centrifuga: Labofuge 400 (Heraeus instruments)

### 3.2 Imobilizace lidského imunoglobulinu G na perlovou celulozu-OH

#### 3.2.1 Použité chemikálie a pomůcky:

- lidský imunoglobulin G (IgG) (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- jodistan sodný ( $\text{NaIO}_4$ ) (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- kyanoborohydrid sodný ( $\text{NaCNBH}_3$ ) (Fluka, Sigma-Aldrich Schweiz, Buchs SG, Švýcarsko)
- BSA (AppliChem, Darmstadt, Německo)
- ostatní chemikálie čistoty p.a. (Penta, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- částice: PERLOZA MT 100-OH, PERLOZA MG

#### 3.2.2 Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 0,2 M NaCl
- 0,1 M fosfátový pufr pH 6

### **3.2.3 Postup:**

0,5 ml partikulí bylo promyty 10x destilovanou vodou, pak byl přidán 1 ml 0,1 M NaIO<sub>4</sub> a 90 min. se inkubovalo za otáčení při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly partikule promyty 0,1 M fosfátovým pufrům s 0,2 M NaCl. Následně bylo přidáno 200 µl zásobního roztoku IgG o koncentraci 1 mg/ml a 800 µl fosfátového pufru a inkubovalo se 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 0,5 mg kyanoborohydridu sodného a inkubovalo se přes noc při laboratorní teplotě. Po imobilizaci byl odsát supernatant a partikule byly promyty 1x fosfátovým pufrům s 0,2 M NaCl a pak fosfátovým pufrům, dokud A<sub>280</sub> nekleslo k 0. Poté byl přidán 1 ml 1% BSA (0,01g) v 0,1 M fosfátovém pufru pH 6 a inkubovalo se 1 hodinu při laboratorní teplotě. Pro uskladnění vzorku byl přidán merthiolát sodný.

## **3.3 Imobilizace lidského IgG na magnetické -COOH partikule**

### **3.3.1 Použité chemikálie**

- lidský IgG (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (S-NHS) (Fluka, Sigma – Aldrich Schweiz, Buchs SG, Švýcarsko)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (Penta, Chrudim, ČR)
- BSA (AppliChem, Darmstadt, Německo)
- ostatní chemikálie čistoty p.a. (Penta, Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- magnetické partikule: MGCM- COOH Iontosorb, PGMA- COOH, HEMA- COOH

### **3.3.2 Použité roztoky**

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 0,2 M NaCl
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 0,4 M NaCl
- 0,1 M fosfátový pufr pH 6
- 0,05 M TRIS/HCl pufr pH 7,8



### **3.3.3 Postup:**

0,5 ml partikulí bylo 10x promyto 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,3 s 0,2 M NaCl. Byl připraven zásobní roztok IgG (1mg/ml fosfátového pufru pH 7,3). 15 mg EDC bylo rozpuštěno v 300  $\mu$ l fosfátového pufru pH 7,3 s 0,2 M NaCl, dále bylo rozpuštěno 2,5 mg S-NHS ve 100  $\mu$ l fosfátového pufru pH 7,3 s 0,2 M NaCl. 100  $\mu$ l zásobního roztoku IgG s EDC, S-NHS a 500  $\mu$ l fosfátového pufru pH 7,3 s 0,2 M NaCl bylo přidáno k promytým partikulím. Partikule byly inkubovány 4 hodiny za mírného otáčení při laboratorní teplotě. Po imobilizaci byly partikule promývány fosfátovým pufrům (1x s 0,4 M NaCl), dokud absorbance při 280 nm neklesla k nule. Blokace aktivních skupin byla provedena 0,05 M TRIS/HCl pufrům pH 7,8 po dobu 15 minut při pomalém otáčení. Poté byly partikule promyty fosfátovým pufrům a byl přidán 1 ml 1 % BSA v 0,1 M fosfátovém pufrům pH 6 pro zamezení nespecifické sorpce proteinů na povrch částic a inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě.

## **3.4 BCA-test pro kvantifikaci proteinů ve vzorku**

### **3.4.1 Použité chemikálie:**

- lidský IgG (SIGMA - ALDRICH, St. Louis, MO, USA)
- BCA kit (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)

### **3.4.2 Použité roztoky:**

- 0,05 M Tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,005 M CaCl<sub>2</sub>
- reagentie A(MA): uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný a vinnan sodný v 0,2 M NaOH
- reagentie B(MB): 4% kyselina bicinchoninová
- reagentie C(MC): 4% pentahydrát síranu měďnatého ve vodě

### **3.4.3 Postup:**

Byla připravena kalibrační řada IgG ze zásobního roztoku 1mg/ml podle tabulky č. 1. Ředícím roztokem byl 0,05 M Tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,005 M

CaCl<sub>2</sub>. Dále byl připraven pracovní roztok, jehož potřebné množství se rovná: (9 standardů + počet neznámých vzorků) x 2 opakování x 0,5. Složení pracovního roztoku bylo: 25 částí reagensie A + 24 částí reagensie B + 1 část reagensie C. Do zkumavky Eppendorf bylo pipetováno 0,5 ml standardu nebo neznámého vzorku (naředěného tak, aby jeho koncentrace ležela v rozmezí kalibrační řady) a 0,5 ml pracovního roztoku. Zkumavky Eppendorf byly inkubovány 1 hodinu při 60°C, po inkubaci se nechaly ochladit na laboratorní teplotu a změřila se A<sub>562</sub>. Z naměřených hodnot absorbancí kalibrační řady byla sestrojena kalibrační křivka a koncentrace IgG byla vypočtena podle rovnice regrese kalibrační řady.

Tab. č.1: Kalibrační řada IgG

zásobní roztok: IgG 1mg/ml

Zkumavka Eppendorf	množství pufru [ml]	množství IgG [ml]	koncentrace IgG [μg/ml]
1.	1,6	0,4	200
2.	1,6	0,4	40
3.	1	1	20
4.	1	1	10
5.	1	1	5
6.	1	1	2,5
7.	1,2	0,8	1
8.	1	1	0,5
9.	2	0	0

### 3.5 SDS-PAGE elektroforéza proteinů

#### 3.5.1 Použité chemikálie:

- akrylamid (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N, N'-metylen-bis-akrylamid (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Tris-(hydroxymethyl)-amonimethan ( $C_4H_{11}NO_3$ ), p.a., (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
- sodiumdodecylsulfát (SDS), p.a. (Lachema a.s., Neratovice, ČR)
- persíran amonný, p.a.
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin  $C_6H_{16}N_2$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- marker molekulových hmotností, 10-250 kD (BioRad)

Obr.6: Marker molekulových hmotností 10-250 kD



### 3.5.2 Použité roztoky:

- roztok A: 30 % směs akrylamidu a bisakrylamidu: 2,92 g akrylamidu+0,08 g N,N'-bis-methylenakrylamidu (bylo rozpuštěno ve 3 ml destilovaného, nechalo se bobtnat a pak se doplnilo do 10 ml destilovanou vodou)

- roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8: 1,815 g Tris do 10 ml destilované vody- upravení pH na 8,8 pomocí 6 M HCl
- roztok C: 1,0 M Tris-HCl pufr pH 6,8: 0,242 g Tris do 20 ml destilované vody- upravení pH na 6,8 pomocí 6 M HCl
- roztok D: 10 % roztok SDS 1 g SDS do 10 ml destilované vody
- roztok E: 10 % roztok persíranu amonného: 100 mg persíranu amonného do 1 ml destilované vody, připravuje se vždy čerstvý, těsně před použitím
- roztok F: 100 mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4 % SDS, 200 mM merkaptoethanolem, 20 % glycerolem a 0,2 % bromfenolovou modří
- roztok G: 100 mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4 % SDS, 20 % glycerolem a 0,2 % bromfenolovou modří
- elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin s 0,1 % SDS pH 8,3 – 8,6:  
15 g glycinu + 3,025 g Tris + 1 g SDS do 1000 ml destilované vody

### **3.5.3 Použité pomůcky a přístroje:**

- mikropipety, Eppendorf
- Hamiltonova pipeta

### **3.5.4 Postup:**

Sestavení aparatury:

Delší a kratší sklo byly důkladně umyty destilovanou vodou a vyleštěny líhem. Umytá skla byla vložena do držáku na rovné ploše. Následně byl držák s upevněnými skly umístěn do stojanu.

Příprava dělicího a zaostřovacího gelu:

Nejprve byl připraven 10 % dělicí gel. Do zkumavky byla napipetována destilovaná voda a roztoky A, B, D podle tabulky č. 2. Vše bylo promícháno a odzdušněno. Poté byl přidán TEMED a roztok E. Směs byla opatrně, ale rychle promíchána a pipetována mezi skla po rysku a převrstvena vodou. Polymerace probíhala 20 – 30 minut a poté byla voda odsáta filtračním papírem.

Pak byl připraven 5 % zaostřovací pufr a to smícháním destilované vody, roztoků A ,C ,D podle tabulky č. 2. Vše bylo promícháno a odvzdušněno. Pak byl přidán TEMED a roztok E. Směs byla promíchána a nepipetována na dělicí gel a pak byl mezi skla vložen hřeben s 10ti jamkami pro nanesení vzorků a polymerace probíhala 15 minut. Po polymeraci byl hřeben odstraněn a jamky byly naplněny elektrodoým puftrem.

Tab. č.2: Příprava polyakrylamidových gelů

	5%-ní zaostřovací gel (ml)	10%-ní dělicí gel (ml)
Destilovaná voda	1,4	2,0
Roztok A	0,33	1,65
Roztok B	-	1,25
Roztok C	0,25	-
Roztok D	0,02	0,05
Roztok E	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002

Příprava a aplikace vzorků:

K 20  $\mu$ l vzorku v zkumavce Eppendorf bylo přidáno 20  $\mu$ l roztoku G. Směs byla dobře promíchána. Připravené vzorky i standardy o známé molekulové hmotnosti (10-250 kD) byly považeny po dobu 2 minut.

Než byly aplikovány vzorky byla skla s polymerovanými gely odebrána ze stojanu a vložena do elektroforetické aparatury tak, aby krátké sklo bylo uvnitř. Do jamek naplněných elektrodoým puftrem bylo napipetováno 15  $\mu$ l připravených vzorků pomocí Hamiltonovy pipety. Standardu byly pipetovány 3  $\mu$ l.

Elektroforetické dělení:

Elektroforetická vana s gely s aplikovanými vzorky byla naplněna elektrodoým puftrem (400 ml + 100 ml do vnitřního prostoru). Elektroforetická vana byla přiklopena víkem a připojena ke zdroji konstantního napětí 180 V. Hodnota proudu byla nastavena na 30 mA

(pro jeden gel). Elektroforetické dělení bylo zastaveno, jakmile čelo doputovalo k okraji skel (asi 45 minut).

### **3.6 Barvení PAA gelu roztokem amoniakálního stříbra**

#### **3.6.1 Použité roztoky:**

- Fixační roztok- 5 % kyselina octová + 50 % ethanol :50 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 500 ml  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  do 1000 ml
- 10 % glutaraldehyd: 20 ml 50 % glutaraldehydu do 100 ml vody (připravovat čerstvý)
- 20 % dusičnan stříbrný: 2 g  $\text{AgNO}_3$  do 10 ml destilované vody
- 9 M NaOH: 3,6 g NaOH do 6 ml destilované vody, po rozpuštění doplnit na 10 ml
- Vyvolávací roztok- 0,05 % kyselina citronová + 0,04 % formaldehyd: 250 mg kyseliny citronové + 540  $\mu\text{l}$  37 % formaldehydu do 500 ml destilované vody
- Ustalovací roztok- 5 % kyselina octová: 50 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do 1000 ml destilované vody

#### **3.6.2 Postup:**

Po elektroforetickém dělení byl gel přenesen na Petriho misku a byla provedena fixace fixačním roztokem přes noc. Po fixaci byl gel rehydratován destilovanou vodou po dobu 20 – 30 minut. Poté byl gel inkubován v 10 % glutaraldehydu 30 minut. Následně byl gel 6x promyt destilovanou vodou po 10 minutách. Roztok amoniakálního stříbra byl připraven přikapáváním 20 % dusičnanu stříbrného k směsi 1,4 ml amoniaku + 239  $\mu\text{l}$  9 M NaOH + 21 ml destilované vody (pro 2 gely) do vzniku hnědého zákalu. Pak byla provedena inkubace s roztokem amoniakálního stříbra 15 minut a gel byl promyt destilovanou vodou. Za míchání ve vyvolávacím roztoku byl gel vyvolán a po vzniku hnědých proužků byl gel uskladněn v ustalovacím roztoku.

## 3.7 Kvantifikace IgG pomocí specifického konjugátu anti-IgG

### 3.7.1 Použité chemikálie a pomůcky:

- konjugát: prasečí imunoglobulin proti lidskému IgG značený peroxidázou (SwAHu/IgG) (SEVAPHARMA, Praha, ČR)
- ostatní chemikálie čistoty p.a. (Penta, Lach-Ner, Neratovice, ČR)

### 3.7.2 Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7 s 0,15 M NaCl
- 0,1 M acetátový pufr pH 4 s 0,5 M NaCl
- 0,1 M acetátový pufr pH 5,5 s 0,15 M NaCl
- substrátový pufr: 0,1% BSA(0,01g) v 10 ml 0,1 M octanovém pufru pH 5,5, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20(5 $\mu$ l)
- roztok substrátu: 5 ml 0,1 M acetátového pufru pH 5,5 s 0,15 M NaCl, 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 mg OPD

### 3.7.3 Postup:

Byl odpipetován supernatant a partikule byly promyty od merthiolátu sodného 0,1 M fosfátovým pufrem pH 7 s 0,15 M NaCl. Po promytí byl k 50  $\mu$ l partikulí přidán 1 ml konjugátu ředěného 1:10000 (2  $\mu$ l na 20 ml fosfátového pufru) a partikule s naředěným konjugátem byly inkubovány 1 hodinu. Po skončení inkubace byly partikule promyty 2x 0,1 M acetátovým pufrem pH 4 s 0,5 M NaCl a poté 4x 0,1 M acetátovým pufrem pH 5,5 s 0,15 M NaCl. Po promytí byl k partikulím přidán 1 ml substrátového roztoku naředěného substrátovým pufrem- 100  $\mu$ l substrátového roztoku a 900  $\mu$ l substrátového pufru. Pak byly partikule inkubovány za otáčení ve tmě, dokud roztok nezežloutl a následně byla proměřena A<sub>450</sub> v dubletu a jako blank stejně naředěný substrátový roztok.

### 3.7.4 Příprava kalibrační řady konjugátu

Tab. č.3: Kalibrační řada konjugátu

ředění	c [ng/ml]
1:15000	493,33
1:20000	370
1:30000	246,7
1:40000	185
1:60000	123,33
1:80000	92,5

0,5 ml konjugátu a 0,5 ml substrátového roztoku ředěného 1:9 bylo inkubováno dokud se směs nezbarvila (asi 10 minut). Poté byla reakce zastavena 0,5 ml 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a byla proměřena A<sub>450</sub> v tripletu. V programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka konjugátu. Z kalibrace konjugátu byla získána rovnice regrese, ze které bylo vypočteno množství IgG ve vzorcích.

## 3.8 Turbidimetrické stanovení koncentrace lidského IgG

### 3.8.1 Použité chemikálie a pomůcky:

- Mikrotitrační destičky typ P,
- Mikropipety 10-50, 50-200 $\mu$ l a 8.kanálová (50-200 $\mu$ l), (Eppendorf)
- Q-antisérum: Q- SwAHu/IgG (SEVAPHARMA, Praha, ČR)
- SRL sérum – sérum lidské referenční (SEVAPHARMA, Praha, ČR)

### 3.8.2 Roztoky:

- PBS (pH 7,2-7,4) (NaCl 8g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g, KCl 0,2g , Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,9g; destilovaná H<sub>2</sub>O do 1 l)
- PEG (5%) starší 12 hodin (PEG 6000 50g, TWEEN 20 1g do 1l PBS)



### 3.8.3 Postup:

Předem ředěné standardy (o koncentracích uvedených v tabulce č. 4) a vzorky (neředily se, protože se předpokládá, že koncentrace IgG ve vzorcích leží v rozsahu kalibrační řady standardu) byly pipetovány po 50  $\mu\text{l}$  na jamku. Poté bylo do jamek lichých sloupců přidáno 200  $\mu\text{l}$  naředěného Q-antiséra a do sudých sloupců 200  $\mu\text{l}$  5 % PEG (jako blank). Následně byla destička protřepána a byla provedena inkubace 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla proměřena absorbance při 405 nm. Z kalibrace standardu byla získána rovnice regrese, ze které bylo vypočteno množství IgG ve vzorcích.

Tab. č.4: Kalibrační řada IgG

Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Koncentrace (%)	1. řada		2. řada	
		Standard ( $\mu\text{l}$ )	Pufr ( $\mu\text{l}$ )	Standard ( $\mu\text{l}$ )	Pufr ( $\mu\text{l}$ )
320	100	125	0	150	0
256	80	100	25	200	50
192	60	75	50	150	100
160	50	60	60	125	125
128	40	50	75	100	150
64	20	25	100	50	200
32	10	25	225	25	225

## 3.9 Optimalizace testu ELISA pro stanovení koncentrace lidského IgG

### 3.9.1 Použité chemikálie a pomůcky:

- mikrotitrační destička typu P
- jedno- a vícekanálové mikropipety (Eppendorf)
- prasečí  $\alpha$ - chymotrypsin (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- pozitivní kontrola: prasečí anti-chymotrypsin, (SEVAPHARMA, Praha, ČR)
- negativní kontrola: negativní prasečí sérum
- primární protilátka: anti – human IgG, kozí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- standard lidského IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- sekundární protilátka, tzv. konjugát: anti-pig IgG - Peroxidase, králičí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- sekundární protilátka: anti – human IgG - Peroxidase, králičí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- promývačka (Socorex, Swiss)

### **3.9.2 Použité roztoky:**

- 2,5 % glutaraldehyd – 1 ml 50 % glutaraldehydu + 49 ml uhličitanového pufru pH 9,49
- promývací a ředící – PBS pH 7,4; 0,05% Tween 20 (Sigma) (5 $\mu$ l/10ml), 0,1% BSA.
- ředění konjugátu Px – uhličitanový pufr pH 9,49 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  4,29g,  $\text{NaHCO}_3$  2,93g, dest. voda 1000ml), 0,05% Tween 20; 0,1 % BSA.
- substrátový roztok – fosfátový pufr pH 6,2 100ml, do 10 ml 50 $\mu$ l 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 5 mg OPD

### **3.9.3 Postup optimalizace ELISA testu-chymotrypsinový systém:**

- jamky mikrotitrační destičky byly upraveny 2,5 % glutaraldehydem – bylo pipetováno po 150  $\mu$ l do každé jamky a inkubovalo se 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci se obsah destičky vyklepl a osušil se její povrch.
- připravené koncentrace chymotrypsinu podle tabulky č. 5 byly pipetovány do mikrotitrační destičky po 150  $\mu$ l na jamku. Chymotrypsin byl ředěn ředícím puftrem (bez BSA a Tween 20). Inkubace probíhala přes noc při 4  $^{\circ}\text{C}$  a po inkubaci byla destička 3 x promyta destilovanou vodou.
- 1 % BSA v ředícím pufru bylo pipetováno po 150  $\mu$ l na jamku. Byla provedena inkubace při 37  $^{\circ}\text{C}$  1 hodinu a následně se destička vyklepla.

- do jamek lichých sloupců bylo pipetováno 100 µl pozitivní kontroly (prasečí anti-chymotrypsin) ředěné 1:2000 ředícím pufrem. Do sudých sloupců byla pipetována negativní kontrola (negativní prasečí sérum) ředěná 1:2000 ředícím pufrem po 100 µl na jamku. Byla provedena inkubace při 37 °C 1 hodinu a poté byla destička 3 x promyta destilovanou vodou.
- bylo provedeno dvojkové ředění konjugátu po 100 µl na jamku podle tabulky č. 5. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C a pak byla destička 5 x promyta destilovanou vodou.
- byl připraven čerstvý substrátový roztok a pipetovalo se 100 µl do každé jamky. Byla provedena inkubace 15 minut při 37 °C a poté byla reakce zastavena 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po zastavení reakce se proměřila absorbance při 490 nm

Tab. č.5: koncentrace chymotrypsinu a ředění konjugátu

	1 P	2 N	3 P	4 N	5 P	6 N	7 P	8 N	9 P	10 N	11 P	12 N
A	100 ug/ml 1:2000		100 ug/ml 1:4000		100 ug/ml 1:8000		100 ug/ml 1:16000		100 ug/ml 1:32000		100 ug/ml 1:64000	
B	75 ug/ml 1:2000		75 ug/ml 1:4000		75 ug/ml 1:8000		75 ug/ml 1:16000		75 ug/ml 1:32000		75 ug/ml 1:64000	
C	50ug/ml 1:2000		50 ug/ml 1:4000		50 ug/ml 1:8000		50 ug/ml 1:16000		50 ug/ml 1:32000		50 ug/ml 1:64000	
D	40 ug/ml 1:2000		40 ug/ml 1:4000		40 ug/ml 1:8000		40 ug/ml 1:16000		40 ug/ml 1:32000		40 ug/ml 1:64000	
E	30 ug/ml 1:2000		30 ug/ml 1:4000		30 ug/ml 1:8000		30 ug/ml 1:16000		30 ug/ml 1:32000		30 ug/ml 1:64000	
F	15 ug/ml 1:2000		15 ug/ml 1:4000		15 ug/ml 1:8000		15 ug/ml 1:16000		15 ug/ml 1:32000		15 ug/ml 1:64000	
G	7,5 ug/ml 1:2000		7,5 ug/ml 1:4000		7,5 ug/ml 1:8000		7,5 ug/ml 1:16000		7,5 ug/ml 1:32000		7,5 ug/ml 1:64000	
H	0 ug/ml 1:2000		0 ug/ml 1:4000		0 ug/ml 1:8000		0 ug/ml 1:16000		0 ug/ml 1:32000		0 ug/ml 1:64000	

- Hodnocení metody: Optimální ředění konjugátu a koncentrace chymotrypsinu je dáno nejvyšší hodnotou podílu pozitivní/negativní kontrola.

### **3.9.4 Postup optimalizace ELISA testu koncentrace lidského IgG:**

- jamky mikrotitrační destičky byly upraveny 2,5 % glutaraldehydem – bylo pipetováno po 150  $\mu$ l do každé jamky a inkubovalo se 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci se obsah destičky vyklepl a osušil se její povrch.
- připravené koncentrace primární protilátky proti lidskému IgG (60, 40, 30, 20, 10, 7,5  $\mu$ g/ml) byly pipetovány do mikrotitrační destičky po 150  $\mu$ l na jamku. Primární protilátka byla ředěna ředícím pufrům (bez BSA a Tween 20). Inkubace probíhala 72 hodin při 4  $^{\circ}$ C a po inkubaci byla destička 3 x promyta destilovanou vodou.
- 1 % BSA v ředícím pufru bylo pipetováno po 150  $\mu$ l na jamku. Byla provedena inkubace při 37  $^{\circ}$ C 1 hodinu a následně se destička vyklepla.
- do jamek lichých sloupců bylo pipetováno 100  $\mu$ l pozitivní kontroly (IgG 40  $\mu$ g/ml). Do sudých sloupců byla pipetována negativní kontrola (ředící pufr) po 100  $\mu$ l na jamku. Byla provedena inkubace při 37  $^{\circ}$ C 1 hodinu a poté byla destička 3 x promyta destilovanou vodou.
- bylo provedeno ředění konjugátu (protilátky proti lidskému IgG značené peroxidázou), které bylo 1:15000, 1:30000 a 1:60000. Každé ředění bylo pipetováno do dvou sloupců po 100  $\mu$ l na jamku. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37  $^{\circ}$ C a pak byla destička 5 x promyta destilovanou vodou.
- byl připraven čerstvý substrátový roztok a pipetovalo se 100  $\mu$ l do každé jamky. Byla provedena inkubace 15 minut při 37  $^{\circ}$ C a poté byla reakce zastavena 2 M  $H_2SO_4$ . Po zastavení reakce se proměřila absorbance při 490 nm.
- Hodnocení metody: Optimální ředění konjugátu a koncentrace primární protilátky je dáno nejvyšší hodnotou podílu pozitivní/negativní kontrola.

## 3.10 Kvantifikace IgG metodou ELISA

### 3.10.1 Použité chemikálie a pomůcky:

- mikrotitrační destička typu P
- jedno- a vícekanálové mikropipety (Eppendorf)
- primární protilátka: anti – human IgG, kozí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- standard lidského IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- sekundární protilátka: anti – human IgG - Peroxidase, králičí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- promývačka (Socorex, Swiss)

### 3.10.2 Použité roztoky:

- 2,5 % glutaraldehyd – 1 ml 50 % glutaraldehydu + 49 ml uhličitanového pufru pH 9,49
- promývací a ředící – PBS pH 7,4; 0,05% Tween 20 (Sigma) (5 $\mu$ l/10ml), 0,1% BSA.
- ředění konjugátu Px – uhličitanový pufr pH 9,49 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  4,29g,  $\text{NaHCO}_3$  2,93g, dest. voda 1000ml), 0,05% Tween 20; 0,1% BSA.
- substrátový roztok – fosfátový pufr pH 6,2 100ml, do 10 ml 50  $\mu$ l 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 5 mg OPD

### 3.10.3 Postup:

- jamky mikrotitrační destičky byly upraveny 2,5 % glutaraldehydem – bylo pipetováno po 150  $\mu$ l do každé jamky a inkubovalo se 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci se obsah destičky vyklepl a osušil se její povrch.
- do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150  $\mu$ l primární protilátky proti lidskému IgG o koncentraci 20  $\mu$ g/ml. Inkubace probíhala 72 hodin při 4  $^{\circ}\text{C}$  a po inkubaci byla destička 3 x promyta destilovanou vodou.

- 1 % BSA v ředícím pufru bylo pipetováno po 150  $\mu$ l na jamku. Byla provedena inkubace při 37  $^{\circ}$ C 1 hodinu a následně se destička vyklepla.
- do prvních dvou řádků destičky byla pipetována kalibrační řada IgG v dubletu, která byla získána dvojkovým ředěním od koncentrace 100  $\mu$ g/ml (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125  $\mu$ g/ml) po 100  $\mu$ l na jamku. Dále byla pipetována pozitivní kontrola (IgG 100  $\mu$ g/ml), blank (ředící pufr) a vzorky (vzorek před imobilizací, vzorek po imobilizaci a tři promývací frakce) po 100  $\mu$ l na jamku v dubletu. Byla provedena inkubace při 37  $^{\circ}$ C 1 hodinu a poté byla destička 3 x promyta destilovanou vodou.
- konjugát (protilátky proti lidskému IgG značené peroxidázou) ředěný 1:15000 byl pipetován po 100  $\mu$ l na jamku. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37  $^{\circ}$ C a pak byla destička 5 x promyta destilovanou vodou.
- byl připraven čerstvý substrátový roztok a pipetovalo se 100  $\mu$ l do každé jamky. Byla provedena inkubace 15 minut při 37  $^{\circ}$ C a poté byla reakce zastavena 2 M  $H_2SO_4$ . Po zastavení reakce se proměřila absorbance při 490 nm.

### 3.11 Kvantifikace IgG výpočtem z absorbance při 280 a 260 nm

U této metody kvantifikace IgG byla hodnota IgG vypočtena z hodnot  $A_{280}$ ,  $A_{260}$  a  $A_{\text{směs proteinů}}$  naměřených u vzorků původních (s koncentrací IgG, která byla použita k imobilizaci), dále u surfaktantů odsátých po imobilizaci a také u promývacích frakcí. Všechny vzorky byly měřeny proti blanku, který byl tvořen z pufru a látek obsažených ve vzorku. Koncentrace pak byla vypočtena dvěma způsoby. 1. Od hodnoty absorbance v původním vzorku byl odečten součet absorbancí surfaktantu odsátého po imobilizaci a promývacích frakcí. Ze získané hodnoty absorbance pak byla vypočtena koncentrace IgG podle vzorce  $c_{\text{IgG}} = (A_{\text{PV}}/A_{\text{IgG}}) \times c_{\text{PV}}$ . 2. Dalším způsobem je

kvantifikace IgG prostřednictvím extinkčního koeficientu IgG a  $A_{280}$  podle vzorce  $c_{\text{IgG}} = (A_{280}/E^{1\%}_{280}) \times 10$ . Hodnota  $E^{1\%}$  pro IgG je 13,6.

### **3.12 Vážková analýza magnetických částic**

#### **3.12.1 Postup:**

Do zkumavky Eppendorf bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  částic, u kterých vážkovou analýzu provádíme. Byl zvážen prázdný filtrační papír, na který bylo vysypáno 100  $\mu\text{l}$  částic ze zkumavky. Hmotnost prázdného filtračního papíru byla zapsána. Částice se nechaly schnout na filtračním papíru přes noc. Na druhý den byl filtrační papír s částicemi vážen vždy po 30 minutách. Hmotnost nejříve klesala, pak se zase začala zvyšovat. 100  $\mu\text{l}$  částic odpovídá nejnižší hodnota, od které se odečte hmotnost čistého filtračního papíru.

### **3.13 Testování vlastností magnetických nosičů**

#### **3.13.1 Testované magnetické nosiče:**

HEMA-40% EDMA (UMCH AVČR), CHEMICEL-1302 (SIMAGCHEM), R-0039 (ESTAPOR), M1-030/40 (ESTAPOR), M1-070/40 (ESTAPOR), PGMA (UMCH AVČR), C-2 (UMCH AVČR), PERLOZA L-1798 (UMCH AVČR), PERLOZA MG (IONTOSORB), MGCM (IONTOSORB)

#### **3.13.2 Testované roztoky:**

- A. destilovaná voda
- B. 0,5 M NaCl
- C. 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- D. 0,3 M fosfátový pufr pH 7,3
- E. 0,1 M acetátový pufr pH 4
- F. 0,1 M acetátový pufr 5,5
- G. 0,05 M TRIS-HCl pH 7,8
- H. 0,2 M NaCl v 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- I. 0,2 M NaCl v 0,3 M fosfátový pufr pH 7,3

- J. 0,05 % TWEEN 20 v 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- K. 0,05 % TWEEN 20 v 0,3 M fosfátový pufr pH 7,3
- L. 6 M urea pH 8,2

### **3.13.3 Postup:**

Do zkumavky Eppendorf byl odebrán 1 mg jednotlivých magnetických částic, u některých musela být nejdřív provedena vážková analýza. K magnetickým částicím bylo přidáno 100  $\mu$ l jednotlivých testovaných roztoků. Byl změřen čas magnetické separace jednotlivých magnetických částic na magnetickém separátoru pomocí laboratorních stopek. Magnetické částice v testovaném roztoku byly promíchány na Vortexu, míchadle a dále byly ultrazvukovány po dobu 1 minuty. Poté bylo 5  $\mu$ l homogenizovaných částic pipetováno, což odpovídá 50  $\mu$ g částic, na podložní sklíčko a částice byly pozorovány mikroskopem při zvětšení 20x nebo 40x. Bylo zaznamenáno chování částic. Stejný postup byl proveden u všech testovaných roztoků. Při změně roztoku byly částice nejdříve 3 x promyty testovaným roztokem a znovu ultrazvukovány.



## 4 Výsledky a diskuze

V následující části diplomové práce jsou uvedeny výsledky jednotlivých experimentů. Cílem této práce bylo provést přípravné kroky k vývoji bioafinitních nosičů pro izolaci A $\beta$  peptidů a anti-A $\beta$  specifických protilátek na modelovém systému. Pro kovalentní imobilizaci standardního lidského imunoglobulinu G jsme vybrali vhodné nosiče: perlovou celulózu PERLOZA MT 100, PERLOZA MG a MGCM, a syntetické nosiče polyglycidyl metakrylátový (PGMA) a hydroxyetyl metakrylátový (HEMA-co-EDMA). Funkční skupiny nosičů byly hydroxylové a karboxylové.

U každého typu vazby jsme sledovali výtěžnost vazby a to pomocí analytických a imunoanalytických metod: výpočet koncentrace IgG z hodnot absorbancí při 280 a 260 nm naměřených před a po imobilizaci v supernatantech a detekce IgG SDS-PAGE elektroforézou, kvantitativní stanovení IgG pomocí specifického konjugátu, BCA-testu, turbidimetrického stanovení a sendvičovou metodou ELISA. U jednotlivých metod jsme sledovali jejich citlivosti a kompatibilitu se vzorky.

V druhé části diplomové práce jsme se zaměřili na studium chování vybraných superparamagnetických částic v roztocích běžně používaných v imunoafinitní chromatografii. Cílem bylo získat podrobné informace o vhodných částicích jako nosičů pro bioaktivní molekuly.

V diskuzi jsme konfrontovali dosažené experimentální výsledky s předpokládanými s údaji nalezenými v literatuře.

### 4.1 Metody pro kvantifikaci proteinů imobilizovaných na nosiče

Pro kvantifikaci proteinů imobilizovaných na nosiče mohou být použity různé metody. Testovali jsme, zda jsou metody pro kvantifikaci vhodné, to znamená jaká je jejich citlivost a kompatibilita s vazebnými roztoky.

Pro zjištění relativního množství imobilizované látky je vhodná SDS-PAGE elektroforetická detekce. Vzorky před a po imobilizaci, promývací frakce a standard molekulových hmotností byly elektroforeticky děleny

a na gelech obarvených roztokem amoniakálního stříbra byly proteiny detekovány pomocí standardu. Citlivost SDS-PAGE ve spojení se stříbřením je uváděna až 0,5 ng (69).

Jednoduchou metodou kvantifikace je výpočet množství imobilizované látky z naměřených hodnot absorbancí při 280 a 260 nm vzorků před a po imobilizaci a promývacích frakcí. Tato metoda však nebyla pro kvantifikaci vždy vhodná, protože docházelo k interferenci látek použitých při imobilizaci.

Další používanou metodou kvantifikace byl BCA test. Tento test je rychlý a jednoduchý, ale reagentie BCA testu interferují s mnoha látkami, proto byla tato metoda ke kvantifikaci imobilizovaných látek využita jen omezeně.

Kvantifikace imobilizovaných proteinů pomocí specifické protilátky konjugované s enzymem je metodou citlivou (70). Podmínkou je orientovaná vazba proteinů (protilátek) na částice. Pokud protein není vázán na částice orientovanou vazbou, nelze předpokládat, že výsledky získané touto metodou odpovídají skutečnému množství navázaného IgG. Reakce konjugátu anti-human IgG značeného křenuvou peroxidázou (HRP) (ředěného 1:10 000) s částicemi byla vizualizována po inkubaci přidavkem substrátového roztoku s peroxidem vodíku a chromogenem o-fenylendiaminem (OPD) a byla proměřena absorbance při 450 nm proti blanku. Kalibrací různých koncentrací konjugátu (1:15 000 - 1:80 000) byla získána rovnice regrese  $y = 0,0013x + 0,2191$  s  $R^2 = 0,997$ , ze které bylo získáno po dosazení hodnoty  $A_{450}$  koncentrace IgG.

Kvantifikace proteinu v roztoku pomocí precipitace v prostředí PEG a turbidimetrickou detekcí je metodou vhodnou, ale málo citlivou. Metoda je jednoduchá, rychlá. Podstatou této metody je reakce proteinu se specifickým antisérem. Po vzniku precipitátu byl proměřován zákal a z rovnice regrese bylo vypočítáno množství látky.

Metoda ELISA je velmi citlivá ve srovnání s předchozími, ale náročná na čas i provedení.

## 4.2 Imobilizace IgG na nemagnetické a superparamagnetické částice

Byla provedena imobilizace protilátky IgG na magnetické a nemagnetické částice. Pro imobilizaci byl použit lyofilizovaný lidský imunoglobulin G (IgG) a částice uvedené v tabulce č. 6.

Tab. č.6: Přehled částic použitých pro imobilizaci IgG

částice	velikost [ $\mu\text{m}$ ]	funkční skupina	materiál	výrobce
MGCM	80 – 100	COOH	perlová celulóza a magnetit	IONTOSORB
PGMA	5	COOH	polyglycidyl metakrylát	UMCH AVČR
HEMA-co-EDMA	4	COOH	hydroxyetyl metakrylát	UMCH AVČR
PERLOZA MG	80 – 100	OH	perlová celulóza a magnetit	IONTOSORB
PERLOZA MT 100	30-50	OH	perlová celulóza	IONTOSORB

Následně po vazbě byly pro kvantifikaci IgG navázaného na částicích a nevyvázaného IgG v supernatantech využity metody uvedené v tabulce č.7.

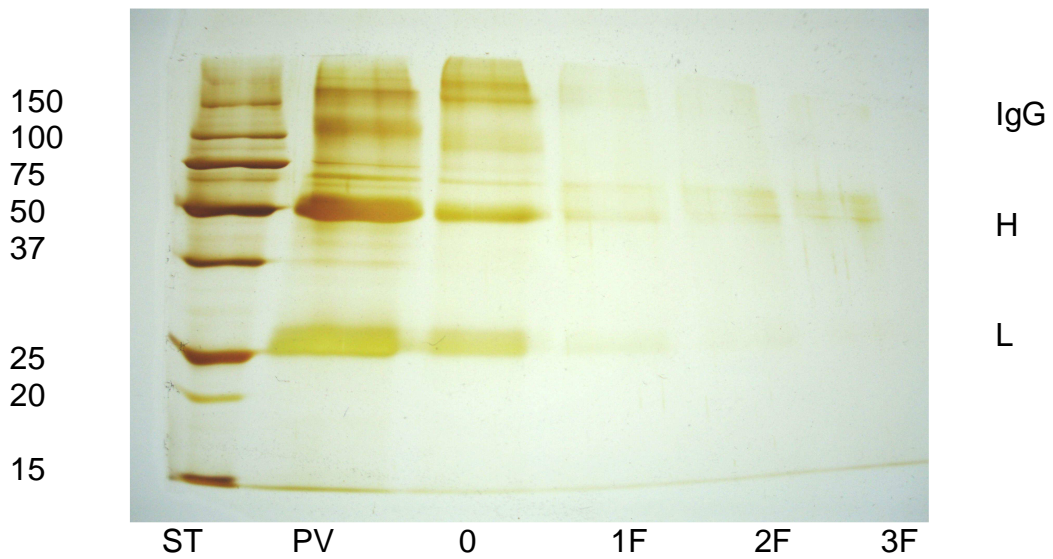
Tab. č.7. Metody kvantitativního stanovení a detekce IgG

metody detekce / kvantifikace IgG	stanovení na částicích	stanovení v supernatantu	metoda uvedena v kapitole
absorbance roztoku při 280 a 260 nm	ne	ano	3.10
použití specifického konjugátu	ano	ne	3.7
BCA-test	ano	ano	3.4
SDS-PAGE elektroforéza			3.5
imunoprecipitace s turbidimetrickou detekcí	ne	ano	3.6
sendvičová metoda ELISA	ne	ano	3.10

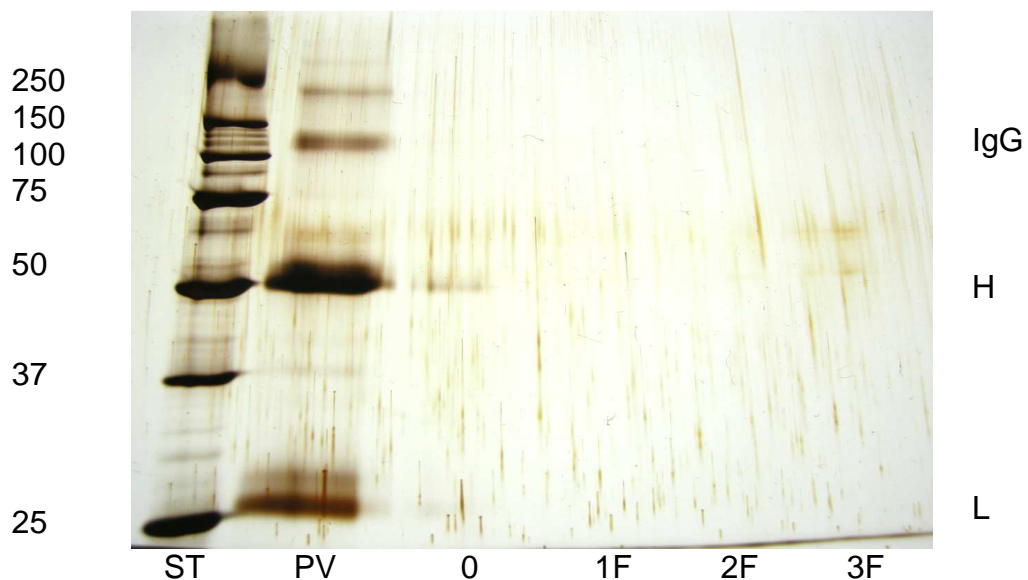
#### **4.2.1 Imobilizace IgG na PERLOZA MT 100**

Imobilizace IgG na nemagnetickou perlovou celulózu byla provedena 3x, kdy při první imobilizaci bylo použito 200  $\mu$ l IgG o koncentraci 1 mg/ml a při druhé imobilizaci bylo použito 100  $\mu$ l IgG o koncentraci 1 mg/ml. Jednalo se o imobilizaci s použitím NaIO<sub>4</sub> pro oxidaci –OH skupin na aldehydicke skupiny, které reagují s amino skupinami proteinů podle metody popsané v kapitole 3.2. Stabilizace Schiffových vazeb byla provedena kyanoborohydridem sodným, kdy vznikly stabilní amidové vazby. Po promytí puforem s 0,1 M NaCl pro odstranění nespecificky sorbovaných molekul byla provedena kvantifikace IgG imobilizovaného na nosič i nevyvázaného IgG v supernatantu.

Po provedení SDS-PAGE vzorků před a po imobilizaci společně se standardem molekulových hmotností a po barvení amoniakálním stříbrem bylo patrné, že došlo k úspěšné imobilizaci.



Obr.7: Detekce IgG imobilizovaného na PERLOZA MT-100 metodou SDS-PAGE – imobilizace 200 ug/ml: St- standard molekulových hmotností 10-250 kDa, PV - původní vzorek, 0 - vzorek po imobilizaci, 1F - 1. promývací frakce, 2F - 2. promývací frakce, 3F - 3. promývací frakce, L- lehké řetězce, H- těžké řetězce, IgG- celá molekula IgG



Obr.8: Detekce IgG imobilizovaného na PERLOZA MT-100 metodou SDS-PAGE – imobilizace 100 ug/ml: St- standard molekulových hmotností, PV - původní vzorek, 0 - vzorek po imobilizaci, 1F - 1. promývací frakce, 2F - 2. promývací frakce, 3F - 3. promývací frakce, L- lehké řetězce, H- těžké řetězce, IgG- celá molekula IgG

Množství IgG, které bylo imobilizováno na nemagnetickou perlovou celulózu PERLOZA MT 100 bylo nejdříve vypočteno z naměřených hodnot absorbancí při 280 nm v roztoku před a po imobilizaci a také v promývacích frakcích (naměřené hodnoty absorbancí jsou uvedeny v tabulce č.8, č.9 a č.10). Hodnoty imobilizovaného IgG jsou uvedeny v tabulce č.13. Tyto hodnoty IgG byly vyšší než v původním vzorku. Zjistilo se, že to bylo způsobeno interferencí kyanoborohydridu sodného při 280 nm.

Tab. č.8: Naměřené hodnoty absorbancí při 280 a 260 nm u vzorků získaných při 1. imobilizaci:

	PV	0	1	2	3
A <sub>260</sub>	0,312	0,379	0,123	0,075	0,025
A <sub>280</sub>	0,500	0,369	0,127	0,095	0,066

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Tab. č.9: Naměřené hodnoty absorbancí při 280 a 260 nm u vzorků získaných při 2. imobilizaci:

	PV	0	1	2	3
A <sub>260</sub>	0,121	0,710	0,261	0,091	0,000
A <sub>280</sub>	0,277	0,160	0,063	0,028	-0,001

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Tab. č.10: Naměřené hodnoty absorbancí při 280 a 260 nm u vzorků získaných při 3. imobilizaci:

	PV	0	1	2	3
A <sub>260</sub>	0,120	0,297	0,055	-0,009	-0,048
A <sub>280</sub>	0,075	0,460	0,099	-0,006	-0,060

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Druhou metodou kvantifikace IgG imobilizovaného na povrch částic bylo využití specifického prasečího konjugátu anti-IgG značeného křenovou peroxidázou (HRP). Naměřené hodnoty absorbancí při 450 nm uvedené v tabulce č.11 byly dosazeny do rovnice regrese a bylo vypočteno množství imobilizovaného IgG (hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.13).

Tab. č.11: Naměřené hodnoty absorbancí při 450 nm u vzorků jednotlivých imobilizací

	$A_{450}$ V	$A_{450}$ K	$A_{450}$ V-K
1. PERLOZA MT 100	0,69	0,044	0,646
2. PERLOZA MT 100	0,8075	0,120	0,6875
3. PERLOZA MT 100	0,1305	0,017	0,1135

V – partikule s imobilizovaným IgG, K – kontrola, partikule bez imobilizovaného IgG

Koncentrace IgG získaná pomocí BCA testu je uvedena v tabulce č.8, hodnota imobilizovaného IgG byla vyšší než 100% původního vzorku. Hodnota IgG byla vypočtena z rovnice regrese  $y = 0,0102x + 0,026$ , získané kalibrací IgG. U standardů a vhodně naředěného vzorku pak byla změřena absorbance při 570 nm ( $A_{570}$  20x naředěného vzorku byla 0,2015). Kvantifikaci IgG pomocí BCA testu nebylo možné brát v úvahu, docházelo pravděpodobně k interferenci kyanoborohydridu sodného s reagensy BCA testu.

Výtěžky imobilizovaného IgG stanovená imunoprecipitační reakcí s turbidimetrickou detekcí byly zjištěny nepřímo stanovením množství IgG v supernatantech po vazbě s využitím rovnice regrese  $y = 0,0008x + 0,0486$  s  $R^2 = 0,9901$  (2.) a  $y = 0,0009x + 0,037$  s  $R^2 = 0,9869$  (3.), do které byly dosazeny hodnoty absorbance při 405 nm (hodnoty uvedeny v tabulce č.12). Množství imobilizovaného IgG (uvedeno v tabulce č.13) bylo vypočteno

z rozdílu 100 % ve vazebném roztoku a koncentrace naměřené v supernatantu po vazbě.

Tab. č.12: Naměřené hodnoty absorbancí při 405 nm

částice	A <sub>405</sub> PV	A <sub>405</sub> 0	A <sub>405</sub> 1	A <sub>405</sub> 2	A <sub>405</sub> 3
2. PERLOZA MT 100	0,268	0,015	0,015	0,0195	0,024
3. PERLOZA MT 100	0,151	0,013	0,004	0,018	0,013

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Tab. č.13: Stanovené koncentrace IgG imobilizovaného na 0,5 ml sedimentovaných částic

	koncentrace IgG ve vazebném roztoku [µg/ml]	A <sub>280</sub> [µg]	konjugát [µg]	BCA [µg]	ELISA [µg]	turbidimetrie [µg]
1. PERLOZA MT 100	200	> 100	3,622	> 100	ND*	ND*
2. PERLOZA MT 100	100	> 100	3,603	ND*	38,42	> 100
3. PERLOZA MT 100	100	> 100	4,684	ND*	21,72	75,56

\* nedetekováno

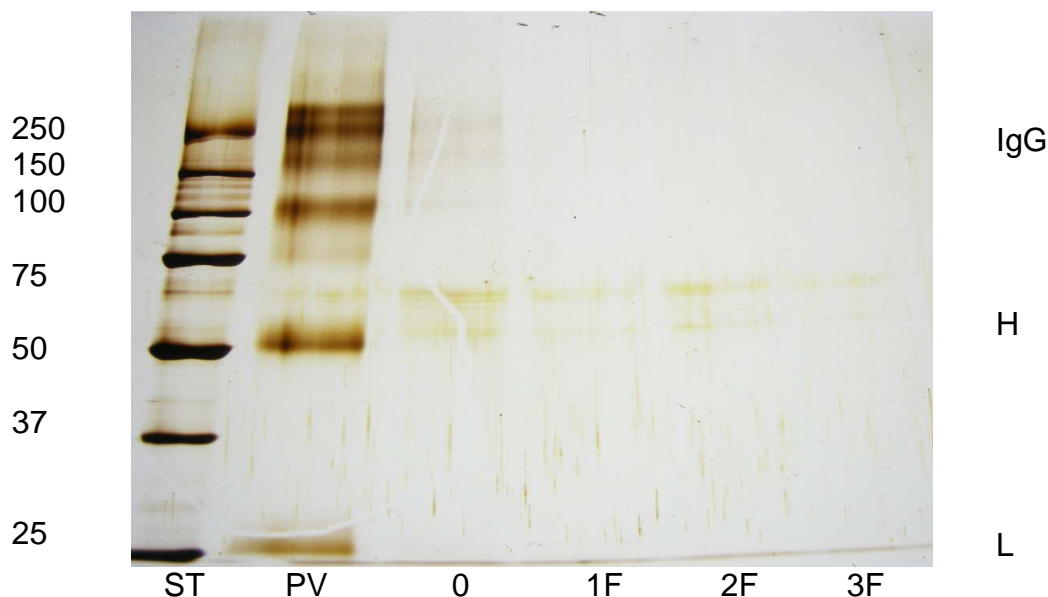
Ze výsledků vyplývá, že výpočet z hodnot absorbancí při 280 nm a BCA test nelze použít ke kvantifikaci IgG, protože dochází k interferenci látek použitých k imobilizaci. Elektroforetickou metodou jsme zjistili (viz. obrázek č.7 a č.8), že v třetím pokusu vazby se imobilizovalo více IgG, než v prvním pokuse i když výchozí koncentrace IgG byla ve vazebném roztoku poloviční. Stanovené množství IgG vázaného na částice nekoreluje v žádných z použitých metod, nelze tedy tyto výsledky brát jako závazné.



#### 4.2.2 Imobilizace IgG na PERLOZA MG

Pro imobilizaci IgG 0,1 mg/ml na 0,5 ml magnetických částic PERLOZA MG byla použita metoda pospaná v kapitole 3.2, kde se nejdříve provádí oxidace –OH skupin na aldehydické skupiny prostřednictvím NaIO<sub>4</sub>. Poté se přidává kyanoborohydrid sodný pro stabilizaci. Následuje promytí pufrům s 0,1 M NaCl a kvantifikace IgG imobilizovaného na nosič i nevyvázaného v supernatantu.

Detekce množství IgG imobilizovaného na částice byla provedena elektroforeticky. Po elektroforetickém dělení vzorků před a po imobilizaci, promývacích frakcí a standardu molekulových hmotností (10-250 kD) bylo na obarvených gelech vidět, že se navázalo velké množství IgG.



Obr.9: Detekce IgG imobilizovaného na PERLOZA MG elektroforeticky: St- standard molekulových hmotností, PV - původní vzorek, 0 - vzorek po imobilizaci, 1F - 1. promývací frakce, 2F - 2. promývací frakce, 3F - 3. promývací frakce, L- lehké řetězce, H- těžké řetězce, IgG- celá molekula IgG

Množství imobilizovaného IgG bylo nejdříve stanoveno prostřednictvím proměření absorbance při 280 nm před i po imobilizaci a v promývacích

frakcích. Množství imobilizovaného IgG je zaznamenáno v tabulce č.17. Tato hodnota je větší, než množství IgG v původním vzorku. Příčinou je interference kyanoborohydridu sodného při 280 nm.

Tab. č.14: Naměřené hodnoty absorbancí při 280 a 260 nm u vzorků získaných při 1. imobilizaci:

	PV	0	1	2	3
A <sub>260</sub>	0,075	0,468	0,113	-0,017	-0,070
A <sub>280</sub>	0,120	0,299	0,060	-0,024	-0,056

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Poté byla provedena kvantifikace IgG využitím specifického konjugátu, který byl naředěn 1:10 000. Částice s imobilizovaným IgG byly inkubovány s ředěným prasečím konjugátem značeným HRP a poté byla reakce vizualizována přidáním substrátového roztoku s OPD a zbarvení bylo měřeno při 450 nm (hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.15). Hodnota imobilizovaného IgG byla stanovena 0,552 µg/ml.

Tab. č.15: Naměřené hodnoty absorbancí při 450 nm

	A <sub>450</sub> V	A <sub>450</sub> K	A <sub>450</sub> V-K
1. PERLOZA MG	0,3425	0,0875	0,255

V – partikule s imobilizovaným IgG, K – kontrola, partikule bez imobilizovaného IgG

Jako poslední metoda stanovení množství IgG byla použita imunoturbidimetrie. Nejdříve byla vytvořena kalibrační řada IgG ze standardu, kterým bylo SLR sérum o známé koncentraci IgG, ke které bylo přidáno Q-antisérum. Po vzniku precipitátu byla změřena absorbance při 405 nm. Tím byla získána rovnice regrese  $y = 0,0009x + 0,037$  s  $R^2 = 0,9869$ . K vzorkům před a po imobilizaci a promývacím frakcím bylo přidáno Q-antisérum

a po vzniku precipitátu byla změřena absorbance při 405 nm (hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.16). Tyto hodnoty byly dosazeny do rovnice. Získané množství IgG je uvedeno v tabulce č.17.

Tab. č.16: Naměřené hodnoty absorbancí při 405 nm

částice	A <sub>405</sub> PV	A <sub>405</sub> 0	A <sub>405</sub> 1	A <sub>405</sub> 2	A <sub>405</sub> 3
PERLOZA MG	0,159	0,021	0,014	0,018	0,014

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Tab. č.17: Koncentrace IgG imobilizovaného na 0,5 ml sedimentovaných částic

	koncentrace IgG ve vazebném roztoku [μg/ml]	A <sub>280</sub> [μg]	konjugát [μg]	ELISA [μg]	turbidimetrie [μg]
PERLOZA MG	100	>100	0,276	ND*	46,67

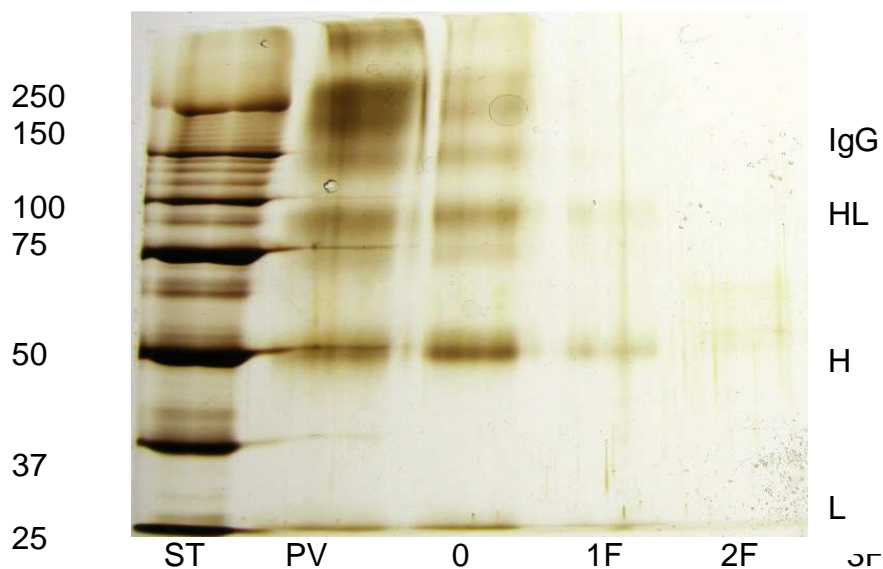
\* nedetekováno

Z elektroforetické detekce IgG (obrázek č.9), turbidimetrického stanovení a kvantifikací IgG vyplývá, že určité množství IgG se imobilizovalo. Hodnoty absorbance při 280 nm a BCA test nelze použít ke kvantifikaci imobilizovaného IgG z důvodů interference kyanoborohydridu sodného použitého při imobilizaci.

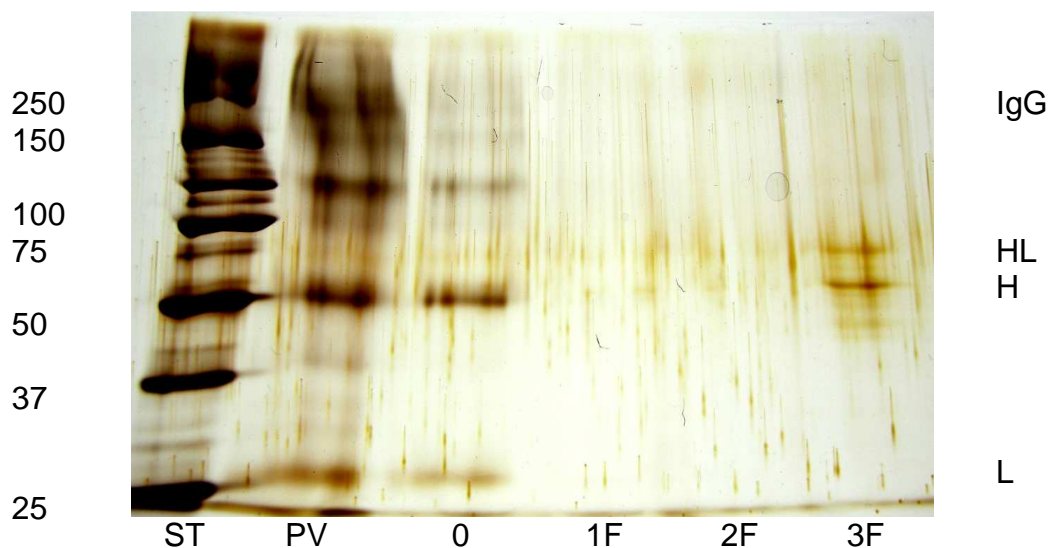
#### 4.2.3 Imobilizace IgG na MGCM

Imobilizace IgG 0,1 mg/ml na 0,5 ml magnetických -COOH částic MGCM byla provedena metodou s využitím EDC a S-NHS popsané v kapitole 3.3. Po imobilizaci byly částice s navázaným IgG promyty puforem s 0,1 M NaCl pro odstranění nespecificky sorbovaných molekul a následně byla provedena kvantifikace IgG navázaného na částicích i nevyvázaného v supernatantu.

Při elektroforetické detekci bylo z gelu obarveného amoniakálním stříbrem patrné, že část množství IgG se imobilizovalo na částice.



Obr.10: Detekce IgG imobilizovaného na MGCM elektroforetický – první imobilizace: St- standard molekulových hmotností, PV- původní vzorek, 0- vzorek po imobilizaci, 1F- 1. promývací frakce, 2F- 2. promývací frakce, 3F- 3. promývací frakce, L- lehké řetězce, H- těžké řetězce, HL- lehké a těžké řetězce, IgG- celá molekula IgG



Obr.11: Detekce IgG imobilizovaného na MGCM elektroforeticky – třetí imobilizace: St- standard molekulových hmotností, PV- původní vzorek, 0- vzorek po imobilizaci, 1F- 1. promývací frakce, 2F- 2. promývací frakce, 3F- 3. promývací frakce, L- lehké řetězce, H- těžké řetězce, HL- lehké a těžké řetězce, IgG- celá molekula IgG

Množství IgG imobilizovaného na magnetické -COOH částice bylo nejprve zjištěno z naměřených hodnot absorpance při 280 a 260 nm před a po imobilizaci. Vzhledem k vysokým hodnotám slepého vzorku (způsobeno interferencí EDC a S-NHS), bylo nutné slepý vzorek i ostatní vzorky naředit. Po naředění vzorků byly získány záporné hodnoty absorpance (pravděpodobně špatně zvolené ředění), pouze u druhé imobilizace byly po naředění získány hodnoty  $A_{260}$  (hodnoty uvedeny v tabulce č.18), ze kterých bylo možné vypočítat množství imobilizovaného IgG, které jsou uvedeny v tabulce č.21.

Tab. č.18: Naměřené hodnoty absorbancí při 280 a 260 nm u vzorků 16x naředěných, získaných při 2. imobilizaci:

	ředění	PV	0	1	2	3
A <sub>260</sub>	16x	0,166	0,023	-1,756	-2,728	-2,650
A <sub>280</sub>	16x	0,103	-0,009	-1,500	-2,300	-2,236

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Dále byla provedena kvantifikace imobilizovaného IgG použitím specifického konjugátu. K částicím byl přidán ředěný prasečí konjugát značený HRP (1:10 000) a po inkubaci byl přidán substrátový roztok s OPD pro vizualizaci reakce. Pak byla změřena hodnota absorbance při 450 nm (hodnoty uvedeny v tabulce č.19). Z rovnice regrese byly vypočteny příslušné hodnoty navázaného IgG. Množství IgG je zaznamenáno v tabulce č.21.

Tab. č.19: Naměřené hodnoty absorbancí při 450 nm

	A <sub>450</sub> V	A <sub>450</sub> K	A <sub>450</sub> V-K
1. MGCM	0,5595	0,047	0,5125
2. MGCM	2,1485	1,799	0,3495
3. MGCM	1,1585	0,5825	0,576

V – partikule s imobilizovaným IgG, K – kontrola, partikule bez imobilizovaného IgG

Použitím BCA testu byla získána hodnota imobilizovaného IgG mnohem vyšší než v původním vzorku, což bylo způsobeno interferencí látek použitých při imobilizaci s reagensy BCA testu. Získaná hodnota IgG je uvedena v tabulce č.21. Hodnota IgG byla získána dosazením hodnoty absorbance při 562 nm 20x naředěného vzorku, která byla 2,0095 do rovnice regrese  $y = 0,011x + 0,0305$ .

Následovalo turbidimetrické stanovení IgG po reakci vzorku s Q-antisérem, kdy po vzniku precipitátu byly změřeny hodnoty absorbance při 405 nm (hodnoty uvedeny v tabulce č.20), které byly dosazeny do rovnice

$y = 0,0008x + 0,0486$  s  $R^2 = 0,9901$  (2.) a  $y = 0,0009x + 0,037$  s  $R^2 = 0,9869$  (3.). Získané množství imobilizovaného IgG je zapsáno v tabulce č.21.

Tab. č.20: Naměřené hodnoty absorbancí při 405 nm

částice	A <sub>405</sub> PV	A <sub>405</sub> 0	A <sub>405</sub> 1	A <sub>405</sub> 2	A <sub>405</sub> 3
2. MGCM	0,1525	0,0735	0,013	0,01	0,0115
3. MGCM	0,127	0,028	0,009	0,012	0,009

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Tab. č.21: Koncentrace IgG imobilizovaného na 0,5 ml sedimentovaných částic

	koncentrace IgG ve vazebném roztoku [μg/ml]	A <sub>260</sub> [μg]	Konjugát [μg]	ELISA [μg]	BCA [μg]	Turbidimetrie [μg]
1.MGCM	100	ND*	2,257	ND*	> 100	ND*
2.MGCM	100	86,1	1,003	ND*	ND*	55,625
3.MGCM	100	ND*	2,745	ND*	ND*	76,77

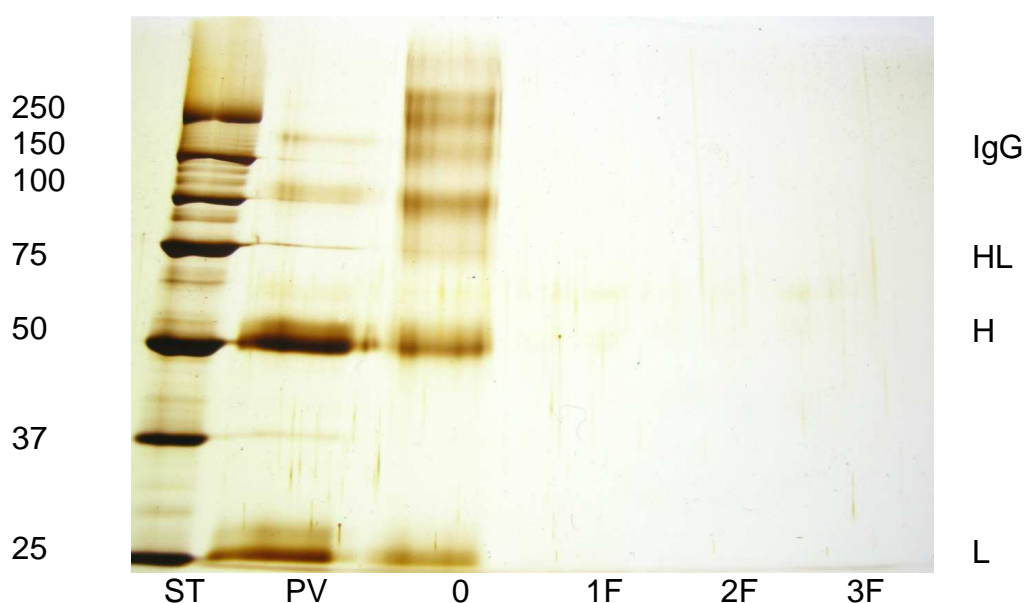
\* nedetekováno

Z výsledků získaných elektroforetickou detekcí (obrázek č.10 a č.11), ačkoliv se vypočtené hodnoty váženého IgG liší v řádech, lze usuzovat, že nejvíce IgG se imobilizovalo ve třetí imobilizaci. BCA test ani hodnoty absorbance při 260 nm nelze využít ke kvantifikaci IgG, protože dochází k interferenci s EDC a S-NHS použitými k imobilizaci IgG. Prostřednictvím metody ELISA nešlo stanovit množství imobilizovaného IgG, protože stanovená koncentrace IgG v původních vzorcích byla mnohem nižší než v supernatantech odsátých po imobilizaci. Pravděpodobně došlo k chybě při měření.

#### 4.2.4 Imobilizace IgG na PGMA

Metoda využívající EDC a SNH-S byla použita také k imobilizaci IgG 100 µg/ml na 1 mg - COOH magnetických částic PGMA. Po imobilizaci IgG jsme částice promyli pufrům s 0,1 M NaCl a stanovili jsme množství IgG imobilizovaného na částice a nevyvázaného v supernatantu.

Dále byla provedena elektroforetická detekce IgG. Po provedení SDS-PAGE byly gely obarveny roztokem amoniakálního stříbra. Z gelů bylo patrné, že se imobilizovalo jen malé množství IgG.



Obr.12: Detekce IgG imobilizovaného na PGMA elektroforetický:  
St- standard molekulových hmotností, PV- původní vzorek, 0- vzorek po imobilizaci, 1F - 1. promývací frakce, 2F - 2. promývací frakce, 3F - 3. promývací frakce, L- lehké řetězce, H- těžké řetězce, HL- lehké a těžké řetězce, IgG- celá molekula IgG

Kvantifikací IgG pomocí naměřených hodnot absorbance při 280 nm před a po imobilizaci byla získána hodnota imobilizovaného IgG 17,96 µg/ml. Protože hodnota absorbance slepého vzorku byla příliš vysoká (z důvodu interference EDC a S-NHS), musel být slepý vzorek naředěn. Stejně ředění bylo použito i pro vzorky (hodnoty uvedeny v tabulce č.22).



Tab. č.22: Naměřené hodnoty absorbancí při 280 a 260 nm u vzorků 13x naředitelných:

	ředění	PV	0	1	2
A <sub>260</sub>	13x	ND*	ND*	-2,457	-2,813
A <sub>280</sub>	13x	0,206	0,169	-2,104	-2,400

\* nedetekováno

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce,

Pomocí specifického prasečího konjugátu značeného HRP (1:10 000), který byl přidán k částicím s imobilizovaným IgG, byla získána hodnota imobilizovaného IgG 3,572 µg/ml. Hodnota IgG byla získána po dosažení hodnot absorpance při 450 nm uvedených v tabulce č.23 do rovnice regrese.

Tab. č.23: Naměřené hodnoty absorbancí při 450 nm

	A <sub>450</sub> V	A <sub>450</sub> K	A <sub>450</sub> V-K
PGMA	1,709	1,0255	0,6835

V – partikule s imobilizovaným IgG, K – kontrola, partikule bez imobilizovaného IgG

Při turbidimetrickém stanovení bylo k vzorkům před a po imobilizaci přidáno Q-antisérum. Po vzniku precipitátu byla změřena hodnota absorpance při 405 nm (hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.24). Hodnota IgG byla ale mimo rozsah kalibrační řady IgG (jako standard bylo použito SRL-sérum), proto turbidimetricky nebylo možné stanovit IgG imobilizované na PGMA (imobilizovalo se příliš malé množství IgG).

Tab. č.24: Naměřené hodnoty absorbancí při 405 nm

částice	A <sub>405</sub> PV	A <sub>405</sub> 0	A <sub>405</sub> 1	A <sub>405</sub> 2	A <sub>405</sub> 3
PGMA	0,152	0,143	0,02	0,016	0,017

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Tab. č.25: Koncentrace IgG imobilizovaného na 1 mg částic

částice	koncentrace IgG ve vazebném roztoku [μg/ml]	A <sub>280</sub> [μg]	konjugát [μg]	ELISA [μg]	turbidimetrie [μg]
PGMA	100	17,96	3,572	59,8	ND*

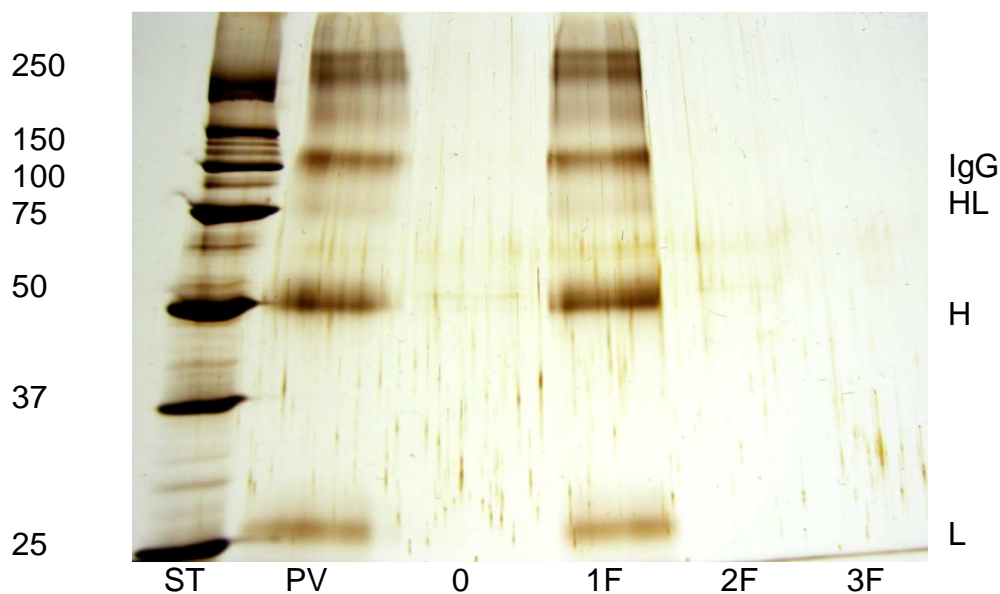
\* nedetekováno

Z výsledků získaných kvantifikací IgG s pomocí konjugátu (anti-IgG-HRP), metodou ELISA a detekcí IgG elektroforeticky (obrázek č.12) je patrné, že k vazbě IgG došlo, množství IgG se nepodařilo přesně stanovit, naměřené a vypočtené hodnoty vázaného IgG nekorelují u žádné ze zvolených metod. Turbidimetricky nešlo množství IgG stanovit, protože hodnota byla příliš nízká a ležela mimo rozsah kalibrace IgG.

#### 4.2.5 Imobilizace IgG na částice HEMA-co-EDMA

Pro imobilizaci IgG 100 μg/ml na magnetické – COOH částice HEMA-co-EDMA byla použita metoda s EDC a S-NHS (kapitola 3.3). K imobilizaci byl odebrán 1 mg částic. Po imobilizaci byly částice promyty a byla provedena blokáce aktivních skupin. Poté byla provedena kvantifikace imobilizovaného IgG.

Po elektroforetickém dělení vzorků před a po imobilizaci, promývacích frakcí a standardu molekulových hmotností (10-250 kD, BioRad), byly gely obarveny roztokem amoniakálního stříbra. Z gelu bylo patrné, že dochází k vymývání imobilizovaného IgG.



Obr.13: Detekce IgG imobilizovaného na HEMA-co-EDMA elektroforeticky: St- standard molekulových hmotností, PV- původní vzorek, 0- vzorek po imobilizaci, 1F- 1. promývací frakce, 2F- 2. promývací frakce, 3F- 3. promývací frakce, L- lehké řetězce, H- těžké řetězce, HL- lehké a těžké řetězce, IgG- celá molekula IgG

Ke kvantifikaci byly nejdříve použity naměřené hodnoty absorbancí při 280 nm vzorků před a po imobilizaci a promývacích frakcí. Vzhledem k vysokým hodnotám slepého vzorku (způsobeno interferencí EDC a S-NHS), bylo nutné slepý vzorek i ostatní vzorky naředit (hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.26). Po naředění bylo z hodnot absorbancí vypočteno množství imobilizovaného IgG, které bylo 40,68  $\mu\text{g/ml}$ .

Tab. č.26: Naměřené hodnoty absorbancí při 280 a 260 nm u vzorků 14x nařaděných:

	ředění	PV	0	1	2
A <sub>260</sub>	14x	ND*	ND*	-2,776	-2,967
A <sub>280</sub>	14x	0,236	0,140	-2,353	-2,514

\* nedetekováno

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce

Při kvantifikaci imobilizovaného IgG pomocí specifického prasečího konjugátu značeného HRP, kdy byl ředěný konjugát (1:10 000) přidán k částicím s imobilizovaným IgG. Reakce pak byla vizualizovaná přidáním substrátového roztoku. Byla změřena hodnota absorbance při 450 nm (hodnota je uvedena v tabulce č.27) a hodnota byla dosazena do rovnice regrese. Hodnota imobilizovaného IgG byla 1,708 µg/ml.

Tab. č.27: Naměřené hodnoty absorbancí při 450 nm

	A <sub>450</sub> V	A <sub>450</sub> B	A <sub>450</sub> V-B
HEMA-co-EDMA	0,3895	0,054	0,3355

V – partikule s imobilizovaným IgG, B – blank

Ke kvantifikaci imobilizovaného IgG byl použit BCA test. Získaná hodnota IgG, kterou jsme získali dosazením hodnoty absorbance při 595 nm, která byla 1,855, do rovnice regrese  $y = 0,0035x + 0,1788$ , je uvedena v tabulce č.29. Tato hodnota je vyšší než hodnota IgG v původním vzorku, což je dáno interferencí reagensů BCA testu s látkami použitými při imobilizaci.

Dále bylo provedeno stanovení IgG turbidimetricky, kdy bylo ke vzorkům před a po imobilizaci a k promývacím frakcím přidáno Q-antisérum a po vzniku precipitátu byla změřena absorbance při 405 nm (hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.28). Z naměřených hodnot absorbance při 405 nm bylo, po dosazení do rovnice regrese  $y = 0,0017x + 0,1577$  s  $R^2 = 0,9518$  získané

z kalibrační řady standardu, nebylo možné získat množství IgG, protože hodnoty ležely mimo rozsah kalibrační řady.

Tab. č.28: Naměřené hodnoty absorbancí při 405 nm

částice	A <sub>405</sub> PV	A <sub>405</sub> 0	A <sub>405</sub> 1	A <sub>405</sub> 2	A <sub>405</sub> 3
HEMA-co-EDMA	0,1715	0,1565	0,0330	0,0315	0,0330

PV – původní vzorek, 0 – vzorek po imobilizaci, 1 – první promývací frakce, 2 – druhá promývací frakce, 3 – třetí promývací frakce

Tab. č.29: Koncentrace IgG imobilizovaného na 1 mg částic

	koncentrace IgG ve vazebném roztoku [µg/ml]	A <sub>280</sub> [µg]	konjugát [µg]	ELISA [µg]	BCA [µg]	turbidimetrie [µg]
HEMA-co-EDMA	100	40,7	1,7	ND*	> 100	ND*

\* nedetekováno

Kvantifikace IgG turbidimetricky nebyla možná, protože získané hodnoty byly příliš nízké a ležely mimo rozsah kalibrace IgG. Metodou ELISA nebylo získáno množství IgG, protože množství IgG v původním vzorku bylo menší než množství IgG v supernatantu odsátém po imobilizaci. BCA test nelze ke kvantifikaci IgG použít, z důvodů interference látek použitých při interferenci. Stanovením IgG reakcí s konjugátem bylo vidět, že k imobilizaci IgG došlo, avšak přesné množství vázaného IgG nebylo možné určit. Z hodnoty absorbance při 280 nm byla vypočtena hodnota IgG, ale tato hodnota je ovlivněna interferencí EDC a S-NHS použitých při imobilizaci.

## 4.3 Zavedení metody ELISA pro kvantifikaci IgG

### 4.3.1 Optimalizace metody ELISA – chymotrypsinový systém:

V rámci ušetření drahých protilátek (primární protilátka – kozí anti-IgG a sekundární protilátka – králičí anti-IgG značený peroxidázou) jsme nejprve, pro nácvik, provedli optimalizaci chymotrypsinového systému. Hledali jsem vhodný modelový systém pro využití ke stanovení protilátek proti chymotrypsinu prostřednictvím ELISA testu. Optimalizaci jsme provedli na titrační mikrodestičce. Začali jsme ředěním prasečího konjugátu značeného HRP 1:2 000 a pokračovali jsme dvojkovým ředěním do ředění 1:64 000. Dále jsme použili koncentraci chymotrypsinu 0-100 µg/ml. Pozitivní i negativní kontrolu jsme naředili 1:2 000. Po provedení ELISA testu jsme dospěli k třem možným systémům, které by mohly být využity k stanovení protilátek proti chymotrypsinu.

Tab. č.30 : Hodnoty podílů pozitivní/negativní kontrola:

ředění konjugátu	1:2 000	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000
$C_{\text{chymotrypsin}}$ [µg/ml]						
100	22,31	22,06	50,32	13,75	6,81	23,33
75	31,65	65,30	29,26	13,10	10,54	28,67
50	18,92	40,19	21,80	29,94	16,89	12,00
40	31,29	34,31	43,35	20,24	32,20	ND*
30	45,86	70,00	22,07	12,86	20,29	10,00
15	29,50	32,23	19,63	20,41	6,78	9,43
7,5	24,63	27,37	35,85	23,50	16,00	15,00

\* nedetekováno

Tab. č.31: Výsledky optimalizace:

systém	ředění konjugátu	koncentrace chymotrypsinu [ $\mu\text{g/ml}$ ]
1.	1:4 000	30
2.	1:8 000	40
3.	1:16 000	50

Mezi těmito systémy se dále budeme rozhodovat podle ceny a dostupnosti konjugátu a chymotrypsinu.

#### 4.3.2 Optimalizace metody ELISA pro kvantifikaci IgG:

Hledala jsem optimální koncentraci kozí primární protilátky (anti-IgG) proti lidskému IgG a optimální ředění králíčího konjugátu (anti-IgG-HRP), pro následné využití pro stanovení IgG. Použité koncentrace primární protilátky byly 60, 40, 30, 20, 10 a 7,5  $\mu\text{g/ml}$  a ředění konjugátu bylo 1:15 000, 1:30 000 a 1:60 000. Jako pozitivní kontrola bylo použito IgG 100  $\mu\text{g/ml}$  a negativní kontrolou bylo PBS s BSA a Tween 20. Jako neoptimálnější vyšla koncentrace primární protilátky 20  $\mu\text{g/ml}$  a konjugát ředěný 1:15 000. Tento systém jsme použili pro kvantifikaci IgG metodou ELISA.

Tab. č.32: Hodnoty podílů pozitivní/negativní kontrola:

ředění konjugátu	1:15 000	1:30 000	1:60 000
$C_{\text{anti-IgG}}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
60,0	8,165	5,300	3,600
40,0	7,143	5,200	3,500
30,0	7,562	5,560	3,700
20,0	9,162	4,940	3,426
10,0	8,744	5,839	3,323
7,5	8,550	5,552	3,629

### 4.3.3 Kvantifikace IgG metodou ELISA

Bylo provedeno stanovení IgG metodou ELISA, kde byla použita koncentrace kozí primární protilátky (anti-IgG) 20 µg/ml, ředění konjugátu 1:15 000, pozitivní kontrola – IgG 100 µg/ml, blank – ředící pufr. Vzorky byly naředěny tak, aby hodnota IgG ležela v rozsahu kalibrace. IgG bylo stanoveno ve vzorcích před a po imobilizaci a ve třech promývacích frakcích a to pomocí rovnice regrese  $y = -0,1372x + 0,6579$  s  $R^2 = 0,896$  získané z kalibrační řady IgG.

Tab. č.33: Naměřené hodnoty absorbancí při 492 nm a vypočtené množství imobilizovaného IgG:

částice	A <sub>492</sub> PV (ředění)	A <sub>492</sub> O (ředění)	C <sub>IgG</sub> [µg/ml]
2. PERLOZA MT 100	0,4430 (4x)	0,4610 (4x)	38,42
3. PERLOZA MT 100	0,4745 (2x)	0,4745	21,72
2. MGCM	0,5015 (2x)	0,0500	ND*
3. MGCM	0,7210 (2x)	ND*	ND*
PERLOZA MG	0,5890 (2x)	0,1535	ND*
PGMA	0,4200 (2x)	0,4265	59,8
HEMA-co-EDMA	0,4175 (2x)	0,3095	ND*

Prostřednictvím metody ELISA bylo získáno množství imobilizovaného IgG pouze u částic PERLOZA MT a PGMA. Množství imobilizovaného IgG na ostatní částice nebylo možné stanovit. Důvodem by mohl být málo naředěný konjugát nebo chyba při měření.

### 4.4 Testování vlastností magnetických nosičů

U vybraných magnetických částic uvedených v tabulce č.34 byl sledován vliv prostředí na chování částic, a to pomocí dvou parametrů. Jedním bylo sledování času v sekundách potřebného k úplné separaci na magnetickém separátoru (Dynal) a dále tendence částic k agregaci v testovaných roztocích



pomocí pozorování částic v mikroskopu značky PZ Warszawa (zvětšení 20x, 40x).

Částice, které byly vybrány k testování, jsou vhodnými kandidáty jako nosič pro imobilizaci specifických protilátek s ohledem na svou velikost, složení, funkční skupinu. Jejich přehled je uveden v tabulce č.34. Jednotlivé částice byly hodnoceny podle těchto tří kritérií: 1. Částice se separují podle jejich velikosti a především podle obsahu magnetických materiálů. 2. V roztocích, ve kterých částice aglomerují a vytváří velké shluky, proběhne jejich separace úměrně podle obsahu magnetického materiálu v celém aglomerátu. 3. Srovnání výsledků tabulek č. 34 a č. 35 pro jednotlivé typy částic.

Tab. č.34: Testované magnetické částice

částice	velikost [μm]	1mg částic [μl]	funkční skupina	výrobce
HEMA-co- EDMA	0,142	6,8	COOH	UMCH AVČR
CHEMICEL- 1302	< 0,5	40	COOH	SIMAGCHEM
R-0039	0,174	10	COOH	ESTAPOR (MECK)
M1-030/40	0,410	10	COOH	ESTAPOR (MECK)
M1-070/40	0,600	10	COOH	ESTAPOR (MECK)
PGMA	5	32,2	COOH	UMCH AVČR
C-2	0,142	7,69	COOH	UMCH AVČR
PERLOZA L- 1798	není k dispozici	11,11	COOH	UMCH AVČR
PERLOZA MG	80-100	21,277	OH	IONTOSORB
MGCM	80-100	9,524	COOH	IONTOSORB

Tab. č.35: Přehled roztoků, ve kterých se sledovala stabilita, měřila se doba magnetické separace a byla pozorována tendence aglomerace

označení roztoku	název roztoku
A	destilovaná voda
B	0,5 M NaCl
C	0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
D	0,3 M fosfátový pufr pH 7,3
E	0,1 M acetátový pufr pH 4,0
F	0,1 M acetátový pufr pH 5,5
G	0,05 M TRIS-HCl pH 7,8
H	0,2 M NaCl v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3
I	0,2 M NaCl v 0,3 M fosfátovém pufru pH 7,3
J	0,05 % TWEEN 20 v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3
K	0,05 % TWEEN 20 v 0,3 M fosfátovém pufru pH 7,3
L	6 M urea pH 8,2

Tab. č.36: Experimentálně naměřené hodnoty času magnetické separace testovaných magnetických částic v testovaných roztocích – měřeno v sekundách

roztoky	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
HEMA-co-EDMA	3	4	5	6	4	5	5	3	6	4	4	8
CHEMICEL-1302	13	8	12	9	8	11	10	13	8	7	7	13
R-0039	22	12	4	4	8	10	10	4	6	6	9	13
M1-030/40	7	11	5	5	5	10	12	2	5	5	8	20
M1-070/40	10	10	4	4	6	8	11	4	4	6	6	10
PGMA	10	3	3	4	3	3	4	3	4	3	3	6
C-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PERLOZA L-1798	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
PERLOZA MG	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
MGCM	1	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2

U částic C-2 k magnetické separaci vůbec nedocházelo. Magnetické částice se nejpomaleji separovaly v destilované vodě a roztoku urey. Pomalejší separace částic byla také v roztocích B, F a G. Nejrychleji se separovaly částice v roztocích C, H a J. U roztoku urey bylo patrné snížení rychlosti separace pro syntetické částice (HEMA-co-EDMA, CHEMICEL-1302, R-0039, M1-030/40, M1-070/40 a PGMA). V případě částic z biopolymerů (PERLOZA L-1798, PERLOZA MG a MGCM), vzhledem k jejich vysokému obsahu magnetického materiálu a vysoké hydrofilítě celulózy, se jejich separační časy v různých roztocích nelišily.

Magnetické částice v testovaných roztocích jsem pozorovala mikroskopem při zvětšení 20x nebo 40x (podle velikosti jednotlivých částic), poté co byly promíchány a dány na 1 minutu do ultrazvuku. Tendence aglomerovat částic v jednotlivých roztocích je uvedena v tabulce č.37. Nejvíce testované částice aglomerovaly v destilované vodě, 0,5 M NaCl a 0,05 M TRIS-HCl pH 7,8. Menší aglomeraci vykazovaly částice v roztocích C, D, E, F a L. V roztocích obsahujících 0,2 M NaCl a 0,05 % TWEEN 20 částice agregovaly nejméně. Nejméně částice agregovaly v roztocích H a J.

U částic HEMA-co-EDMA byla tendence aglomerovat pozorována v roztocích A, B a G. Přesto rozdíly v rychlosti separace nebyly zjevné. Delší doba separace byla v roztoku urey (L). Částice CHEMICEL-1302 se nechovají podle 2. kritéria o koleraci míry aglomerace a rychlosti separace. Tendence aglomerovat je u nich totiž pozorována v roztocích, kde se separují pomaleji. Nejvíce aglomerují v roztoku urey. U PGMA částic není kolerace mezi mírou aglomerace a rychlostí separace. Rozdíly v době separace nejsou zjevné. Chování částic R-0039, M1-030/40, M1-070/40 je podobné jako u částic CHEMICEL-1302, rychleji se separují v roztocích, kde mají menší tendenci aglomerovat (C, D, E, H, I, J, K). Částice z biopolymerů (PERLOZA L-1798, PERLOZA MG a MGCM) neaglomerovaly v žádném z testovaných roztoků.

Tab. č.37: Aglomerace částic v testovaných roztocích:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
HEMA-co-EDMA	xx x	xxx	xx	xx	xx	xx	xxx	x	x	xx	x	xx
CHEMICEL-1302	xx	xx	x	xx	x	xx	xx	x	x	x	xx	xx x
R-0039	xx x	xx	x	x	xx	xxx	xxx	x	xx			xx
M1-030/40	xx x	xxx	xx	xx	xxx	xx	xxx	xx	xx	x	xx	xx
M1-070/40	xx x	xx	xxx	xx	xx	xx	xxx	xx	xx	xx	x	xx
PGMA	xx x	xxx	xx	xx	xxx	xxx	xxx	x	xx	xx	xx	xx x
PERLOZA L-1798												
PERLOZA MG												
MGCM												

xxx - velká aglomerace, xx - aglomerace, x - mírná aglomerace, žádný křížek – žádná aglomerace

## 5 Závěr

Tématem této diplomové práce byly přípravné kroky k vývoji bioafinitního nosiče pro izolaci A-beta peptidů a anti-A-beta specifických protilátek. Nejdříve byly vytypovány magnetické částice vhodné k imobilizaci IgG. Jednalo se o –OH částice (PERLOZA MT 100, PERLOZA MG), na které bylo IgG imobilizováno metodou s kyanoborohydridem sodným a –COOH částice (MGCM, PGMA, HEMA), kde k imobilizaci IgG byla použita metoda s S-NHS a EDC. Množství IgG imobilizované na jednotlivé částice bylo kvantifikováno různými metodami. Stanovení množství IgG výpočtem z hodnot absorbancí při 280 a 260 nm naměřených před a po imobilizaci se ukázalo být ne příliš vhodnou metodou, protože výsledné hodnoty koncentrace IgG byly zkresleny přítomností látek používaných při imobilizaci. Kvantifikace IgG prostřednictvím BCA testu je nevhodnou metodou, protože dochází k rozsáhlé interferenci látek použitých k imobilizaci IgG s reagensy BCA testu. Metodou kvantifikace IgG pomocí specifického konjugátu byly získány příliš nízké hodnoty IgG, což bylo způsobeno tím, že IgG nebylo vázáno na částice orientovanou vazbou. Dále byla k detekci imobilizovaného IgG použita elektroforéza, kde na obarvených gelech po elektroforetickém dělení vzorků bylo patrné, zda se IgG imobilizovalo nebo ne. Vhodnou metodou pro kvantifikaci IgG bylo turbidimetrické stanovení, kdy u většiny částic byly získány odpovídající hodnoty imobilizovaného IgG. Nejlépe se IgG imobilizovalo na PERLOZA MT-100, MGCM a PERLOZA MG.

Dále bylo úkolem této diplomové práce zavedení metody ELISA pro kvantifikaci IgG. Nejdříve byla provedena optimalizace metody ELISA. Získaná optimální koncentrace primární protilátky (20 µg/ml) a optimální ředění konjugátu (1:15000) byly použity ke kvantifikaci IgG pomocí metody ELISA. Metoda byla vyzkoušena na vzorcích získaných při imobilizaci IgG na vybrané nosiče.

U různých typů magnetických částic bylo zkoumáno chování v roztocích o různém složení. Byl měřen čas, za který se částice v jednotlivých roztocích separovaly na magnetickém separátoru. Částice C-2 se neseperovaly vůbec. Nejpomaleji se separovaly částice CHEMICEL-1302 a R-0039. Nejlépe se

separovaly částice PERLOZA MG, PERLOZA L-1798 a MGCM. Dále byly testované částice v různých roztocích pozorovány mikroskopem a bylo zjišťováno, zda částice aglomerují nebo ne. U větších částic PERLOZA MG, PERLOZA L-1798 a MGCM nebyla aglomerace pozorována v žádném roztoku. Ostatní částice aglomerovaly nejméně ve fosfátových pufrách s obsahem 0,2 M NaCl a TWEEN 20. Naopak nejvíce aglomerovaly částice ve vodě, 0,5 M NaCl a 0,05 M TRIS/HCl pH 7,8.

## 6 Literatura

1. KATEŘINA KLUCHOVÁ: Magnetické nanočástice v medicíně. <http://atmilab.upol.cz/texty.html>; 5. 11. 2008
2. JULIA MÚRBE, ANNETE RECHTENBACH, JÖRG TÖPFER: Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles. *Material chemistry and physics*, 2008, 110(2-3), 426-433
3. KOLEKTIV ÚFI FSI, Elektřina a magnetismus, 2005, s. 94-97
4. GEORGE L. TRIGG: Encyclopedia of applied physics, svazek 10, s. 103, Willey-VCH, 2004
5. DANIEL MAYER: Magnetické kapaliny a jejich použití. *Elektro*, 2007, 3, 78
6. B. M. BERKOWSKI, V. BASHTOVOY: Magnetic fluids and applications handbook, Wallingford, 1996
7. Wikipedia: [http://en.wikipedia.org/wiki/Critical\\_micelle\\_concentration](http://en.wikipedia.org/wiki/Critical_micelle_concentration), 20.4.2009
8. IRAM MAHMOOD, CHEN GUO, HANSONG XIA, JUNHE MA, YANGYANG JIANG, HUIZHOU LIU: Lipase immobilization on oleic acid-pluronic (L-64) block kopolymer coated magnetic nanoparticles, for hydrolysis at the oil/water interface. *Industrial & engineering chemistry research*, 2008, 47, 6379-6385
9. DANIEL HORÁK, NATALIYA CHELSIA: Preparation of magnetic poly(glycidylmethacrylate) microspheres by emulsion polymerization in the presence of sterically stabilized iron oxide nanoparticles. *Journal of applied polymer science*, 2006, 102, 4348-4357
10. RODRIGO F.C. MARQUES, CÉCILE GARCIA, PIERRE LECANTE, SIDNEY J.L. RIBEIRO, LAURE NOÉ, NUNO J.O. SILVA, VÍTOR S. AMARAL, ANGEL MILLÁN, MARC VERELST: Electro-precipitation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in ethanol. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2008, 320(19), 2311 – 2315
11. HAVVA YA CI ACAR, RACHEL S. GARAAS, FAISAL SYUD, PETER BONITATEBUS, AMIT M. KULKARNI: Superparamagnetic

- nanoparticles stabilized by polymerized PEGylated coatings. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, 293(1), 1-7
12. TOMOSHIRO IWASAKI, KAZUNORI KOSAKA, NAOYA MIZUTANI, SATORU WATANO, TAKESHI YANAGIDA, HIDEKÁZU TANAKA, TOMOJI KAWAI: Mechanochemical preparation of magnetite nanoparticles by coprecipitation. *Materiale letters*, 2008, 62(25), 4155-4157
  13. DANDAN SHAO, AO XIA, JIANHUA HU, CHANGHCUN WANG, WEIMING YU: Monodisperzed magnetite silica composite microspheres: Preparation and application for plasmid DNA purification. *Colloids and Surfaces: Physicochemical and engineering aspects*, 323(1-3), 2008, 61-65
  14. SANGEETA THAKUR, S. C. KATYAL, M. SINGH: Structural and magnetic properties of nano nickel-zinc ferrite synthesized by reverse micelle technique. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2009, 321(1), 1-7
  15. Y. LECONTE, S. VEINTEMILLAS-VERDAGUER, M. P. MORALES, R. COSTO, I. RODRÍGUEZ, P. BONVILLE, B. BOUCHET-FABRE, N. HERLIN-BOIME: Continuous production of water dispersible carbon-iron nanocomposites by laser pyrolysis: application as MRI contrasts. *Journal of colloid and interface science*, 2007, 313(2), 511-518
  16. ROBERT N. GRASS, WENDELIN J. STARK: Gas phase synthesis of fcc-cobalt nanoparticles. *Journal of materials chemistry*, 2006, 16(19), 1825-1830
  17. HONG XU, NAIHU TONG, LONGLAN CUI, YING LU, HONGCHEN GU: Preparation of hydrophilic magnetic nanospheres with high saturation magnetization. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2007, 311(1), 125-130
  18. CHRISTOF NIEMEYER, CHAD MIRKIN: Nanobiotechnology. 2004, s. 449-451



19. SIRAPRAPA MEEROD, GAMOLWAN TUMCHARERN, UTHAI WICHAI, METHA RUTNAKORNPITUK: Magnetite nanoparticles stabilized with polymeric bilayer of poly(ethylen glykol) methyl ether-poly( $\epsilon$ -caprolactone) copolymers. *Polymer*, 2008, 49(18), 3950-3956
20. ZEFENG XIA, GUOBIN WANG, KAIXIONG TAO, JIANXING LI: Preparation of magnetite-dextran microspheres by ultrasonication. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2005, 293(1), 182-186
21. ZHI-YA MA, XIAN-QUAIO LIU, YUE-PING GUAM, HUI ZHOU LIU: Synthesis of magnetic silica nanospheres with metal ligands and application in affinity separation of proteins. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2006, 275(1-3), 87-91
22. MILAN BENEŠ, JIŘÍ LENFELD, ALENA ŠPANOVÁ, BOHUSLAV RITTICH, ZUZANA BÍLKOVÁ : Magnetické částice pokryté vybranými polysacharidy. CZ 299349
23. M. CARMEN BAUTISTA, OSCAR BOMATI-MIGUEL, MARÍA DEL PUERTO MORALES, CARLOS J. SERNA, SABINO VEINTEMILLAS-VERDDAGUER: Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2005, 293(1), 20-27
24. M. BABIC, D. HORÁK, M. TRCHOVÁ, P. JENDELOVÁ, K. GLOGAROVÁ, P. LESNÝ, V. HERYNEK, M. HÁJEK, E. SYKOVÁ: Poly (L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *BIOCONJUG Chem.*, 2008, 19(3), 740-750
25. SANVICENS NURIA, MARCO M. PILAR: Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology*, 2008, 26(8), 425 – 433
26. KAWAHARA KATSUNORI, KOHIKI SHIGEMI, YOSHITOMI TOHORU, NISHI SACHIO, SHIMOOKA HIROKAZU, MITOME MASANORI, BANDO, SHISHIDO TOETSU, OKU MASAOKI: Size control and dielectric isolation of FePt nanoparticles using the MCM-41 molecular sieve. *Materials letters*, 2008, 62(21 – 22), 3682 – 3684

27. BOB KOPP: Biomineralization in Magnetotactic Bacteria.  
<http://www.gps.caltech.edu/~rkopp/collegepapers/biomagnetite.pdf>;  
 15. 10. 2008
28. Researchers Mimic Bacteria To Produce Magnetic Nanoparticles.  
 ScienceDaily, 2008, Apr. 15, Number of stories in archives: 44,032;  
<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/04/080414113207.htm>,  
 15. 10. 2008
29. MURALI SASTRY, ABSAR AHMAD, M. KHAN, RAJIV KUMAR:  
 Nanobiotechnology: Microbial nanoparticle production. 2004, s. 126-  
 135
30. JANA NEBESÁŘOVÁ: Elektronová mikroskopie pro biology- kapitola  
 3.0: Transmisní elektornový mikroskop (TEM);  
<http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/3.0.html>, 11. 12. 2008
31. JANA NEBESÁŘOVÁ: Elektronová mikroskopie pro biology- kapitola  
 7.0: Skanovací elektronový mikroskop (SEM);  
<http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/7.0.html>, 11. 12. 2008
32. Adsorption from a one-dimensional lattice gas and the Brunauer-  
 Emmett-Tellerr equation. Proceedings of the national academy of  
 sciences of the united states of america, č. 93, s. 14328 – 14332;  
<http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1977/A1977DR64000002.pdf>, 11. 12. 2008
33. <http://www.kfy.zcu.cz/vyzkum/pristroje/FTIR.php>; 25. 3. 2009
34. [www.engr.sjsu.edu/MatE297/Singh\\_Magnetic\\_NanoPaticles.doc](http://www.engr.sjsu.edu/MatE297/Singh_Magnetic_NanoPaticles.doc);  
 10. 3. 2009
35. LESLIE LA CONTE, NITIN NITIN, GANG BAO: Magnetic nanoparticle  
 probes. *Materials today*, 2005, 8(5), 32–38
36. MOTOKI KUHARA, HARUKO TAKEYAMA, TSUIOSHI TANAKA,  
 TADASHI MATSUNAGA: Magnetic cell separation using antibody  
 binding with protein A expressed on bacterial magnetic particles.  
*Analytical chemistry*, 2004, 76(21), 6207-6213

37. DALIBOR HÚSKA, JIŘÍ BALOUN, LIBUŠE TRNKOVÁ, VOJTĚCH ADAM, RENÉ KIZEK: Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *Chemagazín*, 2008, 18(3), 14-15
38. Z. G. PENG, K. HIDAJAT, M. S. UDDIN: Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *Journal of colloid and interface science*, 2004, 271(2), 277-283
39. N. SHAMIM, L. HONG, K. HIDAJAT, M. S. UDDIN: Thermosensitive polymer coated nanomagnetic particles for separation of biomolecules. *Separation and purification technology*, 2007, 53(2), 164-170
40. THAO THI HIEN PHAM, CUONG CAO, SANG JUN SIM: Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2008, 320(15), 2049-2055
41. M. TAKAHASHI, T. YOSHINO, H. TAKEYAMA, T. MATSUNAGA: Direct magnetic separation of immune cells from whole blood using bacterial magnetic particles displaying protein G. *Biotechnology progress*, 2009, 25(1), 219-226
42. JANA PRODĚLALOVÁ, BOHUSLAV RITTICH, ALENA ŠPANOVÁ, KATEŘINA PETROVÁ, MILAN J. BENEŠ: Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1056(1-2), 43-48
43. DANIEL HORÁK, BOHUSLAV RITTICH, ALENA ŠPANOVÁ, MILAN J. BENEŠ: Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. *Polymer*, 2005, 46(4), 1245-1255
44. ANTOINE-EMMANUEL SALIBA, NICOLAS MINC, JEAN-LOUIS VIOVY, CHARLIE GOSSE, CHRISTOPHE ROBLIN: Magnetic beads self-organization on ni pattern: Application to long DNA. *Houille Blanche-revue internationale de l'eau*, 2007, 6, 34-38
45. NICOLAS MINC, SLOVAKOVA MARCELA, KEVIN. D. DORFMAN, CLAUS FUTTERER, PLAMEN BOKOV, ZUZANA BILKOVA, CLAIRE SMADGA, MYRIAM TAVERNA, JEAN-LOUIS VIOVY: Microfluidic systems of self-assembled magnetic particles; application to DNA

- separation and protein digestion. *Houille Blanche-revue internationale de l'eau*, 2006, 4, 51-54
46. CHEN-LI CHIANG, CHING-SHAN SUNG: Purification of transfection-grade plasmid DNA from bacterial cells with superparamagnetic nanoparticles. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2006, 302(1), 7-13
47. MISAEL O. AVILÉS, ARMIN D. EBNER, JAMES A. RITTER: Implant assisted – magnetic drug targeting: Comparison of in vitro experiments with theory. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2008, 320(21), 2704-2713
48. MING – HUANG HSU, YU – CHUAN SU: Iron-oxide embedded solid lipid nanoparticles for magnetically controlled heating and drug delivery. *Biomed Microdevices*, 2008, 10(6), 785-793
49. NICOLE JAGIELSKI, SONU SHARMA, VINZENZ HOMBACH, VOLKER MAILÄNDER, VOLKER RASCHE, KATHARINE LANDFESTER: Nanocapsules synthesized by miniemulsion technique for application as new contrast agent materials. *Macromolecular chemistry and physics*, 2007, 208(19-20), 2229-2241
50. M. J. LIPINSKI, V. AMIRBEKIAN, J. C. FRIAS, J. G. S. AGUINALDO, V. MANI, K. C. BRILEY-SAEBO, V. FUSTER, J. T. FALLON, E. A. FISHER, Z. A. FAYAD: MRI to detect atherosclerosis with gadolinium-containing immunomicelles targeting the macrophage scavenger receptor. *Magnetic resonance in medicine*, 2006, 56(3), 601-610
51. ANDREAS SALEH, MICHAEL SCHROETER, CORNELIA JONKMANN, HANS-PETER HARTUNG, URLICH MÖDDER, SEBASTIAN JANDER: In vivo MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain*, 2004, 127(7), 1670-1677
52. N. BECKMANN, C. CANNET, M. FRINGELI-TANNER, D. BAUMANN, C. PALLY, C. BRUNS, H.-G. ZERWES, E. ANDRIAMBELOSON, M. BIGAUD: Macrophage labeling by SPIO as an early marker of

- allograft chronic rejection in a rat model of kidney transplantation. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2003, 49(3), 459-467
53. KURT BAETEN, JEROME J. A. HENDRIKS, NIELS HELLINGS, EVI THEUNISSEN, JORIS VANDERLOCHT, LEEN DE RYCK, JAN GELAN, PIET STINISSEN, PETER ADRIAENSENS: Visualisation of the kinetics of macrophage infiltration during experimental autoimmune encephalomyelitis by magnetic resonance imaging. *Journal of neuroimmunology*, 2008, 195(1-2), 1-6
54. TUENG T. SHEN, ALEXEI BOGDANOV Jr., ANNA BOGDANOVA, KIRTLAND POSS, THOMAS J. BRADY, RALPH WEISSLER: Magnetically labeled secretin retains receptor affinity to pancreas acinar cells. *Bioconjugate chemistry*, 1996, 7(3), 311-316
55. JEFF W.M. BULTE, TREVOR DOUGLAS, BRIAN WITWER, SU-CHUN ZHANG, ERICA STRABLE, BOBBI K. LEWIS, HOLLY ZYWICKE, BRAD MILLER, PETER VAN GELDEREN, BRUCE M. MOSKOWITZ, IAN D. DUNCAN, JOSEPH A. FRANK: Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. 2001, 19, 1141-1147
56. S. MORNET, S. VASSEUR, F. GRASSET, P. VEVERKA, G. GOGGIO, A. DEMOURGUES, J. PORTIER, E. POLLERT, E. DUGUET: Magnetic particle design for medical applications. *Progress in Solid State Chemistry*, 2006, 34(2-4), 237-247
57. E. POLLERT: Magnetická fluidní hypertermie. Přednáška- 29. 1. 2009
58. J.- K. YANG, J. – H. YN, J. KIM, Y. – H. CHOA: Preparation of superparamagnetic nanocomposite particles for hyperthermia therapy application. *Materials Science and Engineering A*, 2007, 449, 477-479
59. JON DOBSON: Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug development research*, 2006, 67(1), 55 – 60
60. GLORIA J. KIM, SHUMING NIE: Targeted cancer nanotherapy. *Materials today*, 2005, 8(8), 28-33

61. M. N. RHYNER, A. M. SMITH, X. GAO, H. MAO, L. YANG, S. NIE: Quantum dots and multifunctional nanoparticles: new contrast agents for tumor imaging. *Nanomed*, 2006, 1(2), 209-217
62. SRINIVASA RAGHAVAN: Tiny containers that make and pack themselves, [http://www.chbe.umd.edu/research/complex\\_fluids.html](http://www.chbe.umd.edu/research/complex_fluids.html); 16. 12. 2008
63. BAPPADITYA SAMANTA, HAOHENG YAN, NICHOLAS O. FISCHER, JING SHI, D. JOSEPH JERRY, VINCENT M. ROTELLO: Protein-passivated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 2008, 18(11), 1204-1208
64. NORIYASU KAWAI, AKIRA ITO, YOKO NAKAHARA, MITSURU FUTAKUCHI, TOMOYUKI SHIRAI, HIROYUKI HONDA, TAKESHI KOBAYASHI, KENJIRO KOHRI: Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic liposomes and immune-response induction in transplanted syngeneic rats. *The prostate*, 2005, 64(4), 373-381
65. ANDREAS JORDAN, REGINA SCHOLZ, KLAUS MAIER-HAUFF, FRANK K. H. VAN LANDEGHEM, NORBERT WALDOEFNER, ULF TEICHGRAEBER, JENS PINKERNELLE, HARALD BRUHN, FABIAN NEUMANN, BURGHARD THIESEN, ANDREAS VON DEIMLING, ROLAND FELIX: The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *Journal of Neuro-oncology*, 2006, č. 78, s. 7-14
66. A.H. TALASAZ, A.A. POWELL, D. E. HUBER, J. G. BERBEE, K. H. ROH, W. YU, W. XIAO, M. M. DAVIS, R. F. PEASE, M. N. MINDRINOS, S. S. JEFFREY, R. W. DAVIS: Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Lab*, 2009, 106(10):3970-3975
67. S. KASIMIR-BAUER, C. OBERHOFF, A. E. SCHINDLER, S. SEEBER: Summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary

and metastatic breast cancer: methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocols. *International journal of oncology*, 2002, 20(5), 1027-1034

68. SABINE RIETHDORF, HERBERT FRITSCHKE, VOLKMAR MÜLLER, THOMAS RAU, CHRISTIAN SCHINDLBECK, BRIGITTE RACK, WOLFGANG JANNI, CORNELIA COITH, KATRIN BECK, FRITZ JÄNICKE, SUMMER JACKSON, TERRIE GORNET, MASSIMO CRISTOFANILLI, KLAUS PANTEL: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch System. *Clin cancer res*, 2007, 13(3), 920-928
69. VRATISLAV ŠŤOVÍČEK: Proteomika a proteinové aplikace, [www.natur.cuni.cz/molbio/metody](http://www.natur.cuni.cz/molbio/metody) - 4. 5. 2009
70. JIŘINA BARTŮŇKOVÁ, MILAN PAULÍK: Vyšetřovací metody v imunologii. GRADA, 2005