

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologických a biochemických věd

**Dotblotové techniky pro porovnání afinity protilátek určených
k imunoanalýze**

Bc. Barbora Ospálková

Diplomová práce

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences

**Dotblot techniques for affinity comparison of antibodies to be used
in immunoassays**

Bc. Barbora Ospálková

Theses

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Ospálková**
Osobní číslo: **C16454**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Dotblotové techniky pro porovnání afinity protilátek určených k imunoanalýze**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Teoretická část:
 - a) Protilátky (monoklonální vs. polyklonální, jejich struktura, techniky jejich přípravy/výroby)
 - b) ELISA (základní definice metody, princip stanovení, využití)
 - c) Blotovací techniky (princip, typy a rozdělení, se zaměřením na dotblot).
 - d) Současné využití dotblotu ve výzkumu (rešerše za posledních 5 let)
2. Praktická část:
 - a) Dotblot: Osvojení techniky, optimalizace protokolu na systému chymotrypsin - antichymotrypsinové prasečí sérum.
 - b) Afinitní dotblot (optimalizace koncentrací chaotropního činidla)
 - c) ELISA: konfirmační metoda pro stanovení avidity prasečího a beraního antichymotrypsinového séra
 - d) Zopakování dosažených výsledků na vyvíjeném mikrodotblotu
 - e) Aplikace protokolu na jiné systémy antigen-protilátka

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Zuzana Svobodová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

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 9. 5. 2018

Bc. Barbora Ospálková

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. a odborné konzultantce paní Mgr. Zuzaně Svobodové, Ph.D. za pomoc při sepsání této diplomové práce, cenné rady při zpracování výsledků a přátelský přístup. Velké díky patří i mojí rodině a blízkým, kteří mne celou dobu studia podporovali.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá testováním nově vyvíjeného zařízení pro porovnání vlastností protilátek s cílem vybrat mezi produkty dostupnými na trhu tu s nejvyšší specifitou a afinitou k danému antigenu. Jako modelový systém antigenu a protilátky byl použit chymotrypsin a anti-chymotrypsinové prasečí sérum, pro který byl nejprve vyvinut protokol pro klasický dotblot. Získaný protokol se následně použil u testovaného zařízení, které také pracuje na principu dotblotu. Při dalších experimentech se již přistoupilo k jiným systémům antigen – protilátka a porovnávaly se vlastnosti protilátek určené pro konkrétní aplikace.

KLÍČOVÁ SLOVA

dotblot, afinitní dotblot, protilátka, ELISA, antigen, chymotrypsin, bakterie, protein

ANNOTATION

The thesis deals with testing of the newly developed device for comparison of antibody properties with the aim to select the antibody with the highest specificity and affinity to the desired antigen between available products on the market. As a model system of antigen and antibody, the chymotrypsin and the anti-chymotrypsin swine serum were selected and thus the classic dotblot protocol was developed first. The final protocol was applied on the tested device that works also on dotblot principle. In further experiments, comparison properties of antibodies for specific applications on other antibody-antigen system was performed.

KEYWORDS

dotblot, affinity dotblot, antibody, ELISA, antigen, chymotrypsin, bacteria, protein

SEZNAM ZKRATEK

Ab – protilátka (z angl. Antibody)

Ag – antigen

AP – alkalická fosfatáza (z angl. Alkaline phosphatase)

ApoE – apolipoprotein E

BL – slepý vzorek (z angl. Blank)

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)

EIA – enzymatická imunoanalýza (z angl. Enzyme Immunoassay)

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EpCAM – adhezivní molekula epiteliálních buněk (z angl. Epithelial Cell Adhesion Molecule)

HGPRT – hypoxanthin-guanin-fosforibozyltransferáza

HRP – křenová peroxidáza (z angl. Horse Radish Peroxidase)

Ig – imunoglobulin

IgG – imunoglobulin třídy G

ITC – isothermální titrační kalorimetrie (z angl. Isothermal Titration Calorimetry)

OPD – *o*-fenyldiamin

PB – fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffer)

PBS-T – fosfátový pufr s přísávkem chloridu sodného a Tweenu 20 (z angl. Phosphate Buffer Saline-Tween)

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)

PNPP – *p*-nitrofenylfosfát

PVDF – polyvinydilen difluorid

SPR – povrchová plasmonová rezonance (z angl. Surface Plasmon Resonance)

TMB – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

OBSAH

ÚVOD	11
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1 Imunochemické metody.....	13
1.2 Protilátky.....	14
1.2.1 Polyklonální protilátky	16
1.2.2 Monoklonální protilátky.....	17
1.2.3 Srovnání monoklonálních a polyklonálních protilátek	19
1.3 Antigen.....	21
1.4 Metody stanovení afinity a avidity protilátek	22
1.4.1 Povrchová plasmonová resonance.....	22
1.4.2 Izotermální titrační kalorimetrie.....	24
1.4.3 Metody založené na stanovení rovnovážné konstanty	25
1.4.4 Metoda ELISA	27
1.4.4.1 Sendvičová ELISA metoda.....	27
1.4.4.2 Detekce u EIA metod.....	29
1.4.4.3 Stanovení avidity pomocí metody ELISA	30
1.5 Blotovací techniky	30
1.5.1 Western blot	32
1.5.2 Dotblot.....	33
1.5.2.1 Využití metody dotblot v posledních letech	36
1.5.2.2 Afinitní dotblot.....	38
2 Cíle diplomové práce	40
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1 Seznam chemikálií, přístrojů a pomůcek	41
3.1.1 Chemikálie	41
3.1.2 Speciální chemikálie	41
3.1.3 Přístroje a pomůcky.....	43
3.2 Použité metody	43

3.2.1	Dotblot.....	43
3.2.2	Afinitní dotblot.....	45
3.2.3	ELISA s chaotropním činidlem.....	46
3.2.4	Stanovení citlivosti a zkřížené reaktivity na prototypu 1 a 2	48
3.2.5	Porovnání vlastností protilátek na prototypu 2	50
3.2.6	Postup pro práci s bakteriálními buňkami na prototypu 2	52
4	Výsledky a diskuze.....	56
4.1	Porovnání protilátek proti chymotrypsinu	56
4.1.1	Optimalizace postupu pro dotblot	56
4.1.2	Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce pro dotblot	59
4.1.3	Optimalizace koncentrací chaotropního činidla pro afinitní dotblot.....	61
4.1.4	Porovnání kvality protilátek afinitním dotblotem	62
4.1.5	Ověření výsledků pomocí metody ELISA s chaotropním činidlem	65
4.1.6	Úvodní experimenty na prototypu 1.....	67
4.1.7	Optimalizace metody pro prototyp 2.....	68
4.1.8	Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce na prototypu 2.....	69
4.1.9	Porovnání avidit prasečího a beraního séra na prototypu 2	72
4.1.10	Optimalizace promývání u prototypu 2.....	74
4.2	Porovnání protilátek proti apolipoproteinu E na prototypu 2	76
4.2.1	Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce	76
4.2.2	Porovnání vybraných protilátek	79
4.2.3	Ověření výsledků z prototypu 2 afinitním dotblotem	81
4.3	Porovnání protilátek proti EpCAM na prototypu 2	83
4.3.1	Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce	83
4.3.2	Porovnání afinity tří monoklonálních protilátek	84
4.4	Porovnání protilátek proti bakteriálním antigenům na prototypu 2.....	87
4.4.1	Srovnání vlastností vybraných protilátek proti <i>Salmonella Typhimurium</i>	87
4.4.2	Srovnání vlastností vybraných protilátek proti <i>Listeria monocytogenes</i>	94
4.4.3	Srovnání vlastností vybraných protilátek proti <i>Escherichia coli</i>	99
5	Závěr.....	104
6	Seznam zdrojů.....	107
7	Zdroje obrázků	117

ÚVOD

Jedním ze základních kamenů vedoucím k úspěšnému dokončení mnoha biotechnologických a biomedicínských experimentů jsou kvalitní a specifické protilátky. Kvalita komerčně dodávaných protilátek se ovšem velmi liší výrobce od výrobce jak cenou, tak i jejich schopností specificky vázat antigen. Velice často se stává, že protilátky mohou vázat více proteinů než jen požadovaný antigen (zkřížená reaktivita), což je pozorováno u monoklonálních i polyklonálních protilátek. V horších případech, což se také nezdá stává, vážou všechno jiné než cílový antigen. U polyklonálních protilátek se navíc objevuje problém s variabilitou šarží. I když jsou připraveny imunizací stejného zvířete, produkováný koktejl protilátek je vždy trochu jiný, tedy dochází k zásadním nedostatkům v reprodukovatelnosti výsledků.

Důvodem, proč se kvalitě protilátek začalo věnovat tolik pozornosti je, že bylo spočítáno, kolik se vyplývá materiálu, času a peněz na výzkumech založených na nekvalitních protilátkách. Bylo zjištěno, že jenom v biomedicínském výzkumu napříč Spojenými státy americkými je to cca 350 milionů dolarů ročně. Dalším problémem je, že pouze asi 44 % publikací poskytuje dostatečně podrobné informace o použitých protilátkách (alespoň název výrobce), což znemožňuje zopakovat většinu experimentů. Značná část vědecké obce totiž důvěřuje tomu, co výrobce uvede na obalu a vlastním ověřením protilátek se již nezabývá. To může vést ke zkreslujícím až mylným závěrům celého výzkumu [1].

V rámci revize již provedených studií podle G. Bedleye (Tetra Logic Pharmaceuticals, Malvern, Pensylvánie) nebylo z důvodu použitých protilátek možné zopakovat výsledky 47 z 53 klíčových studií zabývajících se výzkumem rakoviny [1, 2]. Alarmující situace vedla ke vzniku různých iniciativ mapujících mnoha způsoby kvalitu protilátek. Jedním z nich je například portál antibodypedia.com (spravovaný The Human Protein Atlas), který shromažďuje validační údaje pro různé experimentální techniky o více než 1,8 milionech dostupných protilátek, podobně jako i antibodyregistry.org. Jako další můžeme jmenovat portál antibodies-online.com, který vytvořil projekt pro nezávislé laboratoře, které prováděly testování protilátek většinou na náklady výrobce v rámci 275 studií. Pomocí iniciativ se podařilo vytvořit tlak na společnosti prodávající protilátky. Například společnost Abgent (San Diego, Kalifornie) a její dceřiná společnost WuXi AppTec

(Šanghaj, Čína) po otestování všech svých protilátek, přestala vyrábět zhruba jednu třetinu [1].

Nabízí se otázka, jak zajistit standardizaci protilátek ve výzkumu. Podle tvrzení A. Bradburyho a A. Plückerthuna zveřejněného v Nature v roce 2015, pod které se podepsalo dalších 110 signatářů, je nutné protilátky používané ve výzkumu normalizovat [3]. Jednou z možností, jak se vyvarovat problémům s reprodukovatelností výsledků, je používat rekombinantní protilátky, které jsou definovány již na úrovni DNA a vykazují tak minimální variabilitu i mezi jednotlivými šaržemi. Rekombinantní protilátky by také mohly posloužit jako prvek standardizace protilátek na trhu. Dodavatelé a výzkumníci by je však museli optimalizovat pro specifické aplikace, což by bylo velmi časově a finančně náročné [3, 4].

Než k takové standardizaci dojde je nejvhodnější si protilátky pečlivě vybrat a ověřit si, zda jsou pro plánovaný experiment použitelné. Možností jak to provést je více např. metodou ELISA, westernblotting, povrchová plasmonová resonance nebo izotermální titrační kalorimetrie. Jelikož jejich provedení vyžaduje drahé přístrojové vybavení nebo jsou poměrně pracné, věnujeme se v této práci testování nově vyvíjeného zařízení, které by mohlo nabídnout alternativu ke stávajícím technikám.

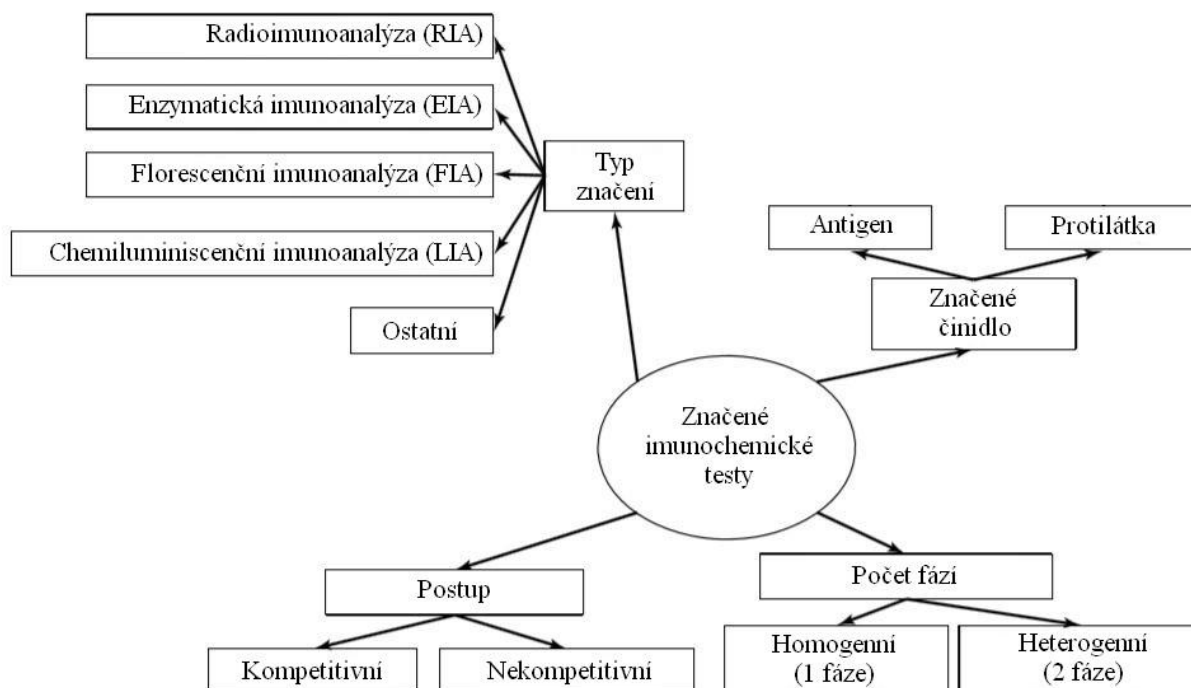
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Imunochemické metody

Imunochemické metody patří v dnešní době k nejčastěji využívaným metodám při analýze biologických vzorků. Jejich hlavními přednostmi je dostatečná citlivost a vysoká specifita stanovení, což z nich v kombinaci s jednoduchým a relativně rychlým provedením dělá metody vhodné k rutinní analýze. Ve většině případů je lze snadno automatizovat. Jejich provoz nevyžaduje složitou a destruktivní přípravu vzorku ani drahé přístrojové vybavení. Základem všech imunochemických metod je vysoce specifická a citlivá reakce mezi antigenem a protilátkou. [5, 6].

Imunochemická analýza byla vyvinuta v šedesátých letech 20. století. Poprvé byla využita v roce 1959 S. A. Bensonem a R. S. Yalowem pro stanovení hladiny inzulínu v lidské plazmě [7] a v roce 1960 R. P. Ekins aplikoval imunochemickou detekci na elektroforeticky rozdělený tyroxin z lidské plazmy [8]. Při prvních imunoanalýzách byla k detekci používána známá koncentrace radioizotopově značeného analytu a díky dobré detekovatelnosti radioizotopů byla dosažena vysoká citlivost stanovení. Od počátků využívání imunochemických metod došlo k několika významným zlepšením v oblastech: sestavení testu, použitých činidel a detekčních systémů [6]. Jako příklady lze uvést zavedení imunochemických analýz se značenými protilátkami [9, 10] nebo navázání protilátek na pevnou fázi [11]. K zásadním bodům ve vývoji těchto technik může být bez pochyby zařazena produkce monoklonálních protilátek pomocí hybridomové technologie, jejichž využitím v imunoanalýze byla dosažena ještě vyšší specifita a citlivost stanovení [12].

Imunochemické testy lze klasifikovat podle několika různých kritérií, jak popisuje schéma na obr. 1. Podle typu detekce mohou být imunochemické testy děleny na testy neznačené a na testy využívající k detekci značené činidlo. Metody detekce interakce antigenů a protilátek, které nevyužívají značených činidel, se staly podstatou velmi citlivých senzorů například snímač povrchové plasmonové resonance (kap. 1.4.1) nebo poněkud klasičtější imunonefelometrii a imunoturbidimetrii. U značených imunotestů může být značeným činidlem antigen nebo protilátka, což záleží na celkovém uspořádání testu. Jako značka se využívá látka, která vykazuje měřitelnou vlastnost, nejčastěji je to enzymatická aktivita nebo fluorescence a v současné době méně často využívaná radioaktivita. Značené imunochemické testy jsou využívány častěji než testy neznačené, nicméně trend se ubírá ve směru vývoje co nejjednodušších přímých stanovení [13].



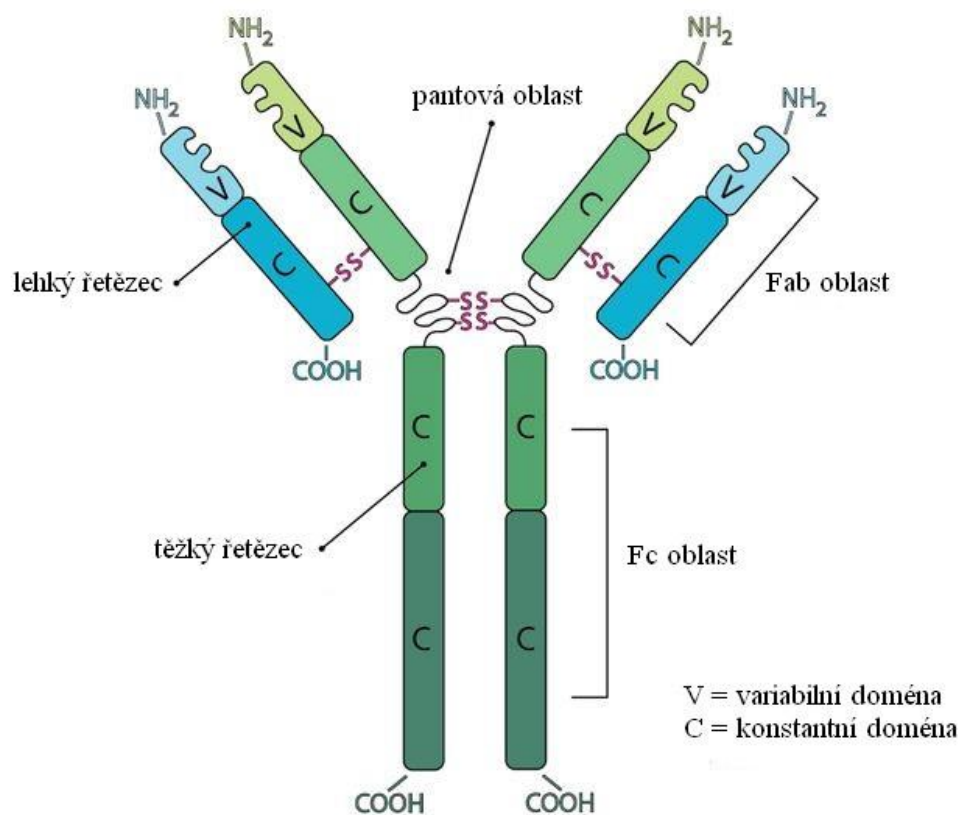
Obr. 1: Schéma klasifikace značených imunochemických testů ; Upraveno dle zdroj obrázku [1]

1.2 Protilátky

Protilátky, nazývané také jako imunoglobuliny (Ig), tvoří velkou skupinu glykoproteinů. Jejich hlavní charakteristickou vlastností je schopnost vázat se na antigeny vyskytující se například na buňkách různého původu. V těle jsou produkovány plazmatickými buňkami [5]. Molekuly jednotlivých imunoglobulinů jsou složeny z jedné nebo několika podjednotek tvaru Y (jejich počet závisí na třídě). Každá podjednotka se skládá ze dvou identických těžkých (označovány H) a dvou identických lehkých (označovány L) řetězců navzájem propojených disulfidickými můstky (viz obr. 2). Aminokyselinové složení aminoterminálních konců polypeptidových řetězců je velice rozmanité, a proto se tyto části označují jako variabilní oblasti Ig (V). Každý lehký řetězec obsahuje tedy jednu variabilní doménu a ještě jednu doménu konstantní, jejíž aminokyselinové složení je oproti variabilní relativně stálé. Těžké řetězce jsou složeny z jedné variabilní a tří konstantních domén. Variabilní domény těžkých a lehkých řetězců zprostředkovávají vazbu antigenu a toto uskupení se nazývá Fab fragment (antigen binding fragment). Interakci protilátek s imunitními buňkami zajišťuje oblast zvaná jako Fc fragment, která je tvořena konstantními částmi těžkých řetězců. Podle Fc oblasti jsou protilátky zařazeny do pěti základních tříd (IgG, IgM, IgA, IgD a IgE) někdy označovaných jako izotypy. Každý těžký řetězec má přibližně dvojnásobný počet

aminokyselin a dvakrát větší molekulovou hmotnost (50 kDa) než lehký řetězec (25 kDa). Celková molekulová hmotnost jednoho monomeru Ig je tedy 150 kDa [14, 15].

Interakce mezi protilátkou a příslušným antigenem je zprostředkována specifickými vazebnými místy. Vazebné místo protilátky je nazýváno paratop a vazebná místa na antigenu epitop. Jelikož má jedna monomerní molekula imunoglobulinu k dispozici dva paratopy, může tvořit vazbu se dvěma epitopy antigenu. Jako činidla v imunochemických testech se protilátky dle způsobu výroby dělí na monoklonální (kap. 1.2.2) a polyklonální protilátky (kap. 1.2.1) [15].



Obr. 2: Struktura molekuly imunoglobulinu; Upraveno dle zdroj obrázku [2]

1.2.1 Polyklonální protilátky

Imunitní odpověď organismu na antigen je přirozeně heterogenní a vzniká při ní mnoho druhů buněčných linií plazmatických buněk, které produkují protilátky proti stejnému antigenu, které mohou být namířeny proti jeho různým epitopům. Důsledkem této heterogenní reakce plazmatických buněk je vznik směsi protilátek různých tříd a podtříd s různou specifitou. Právě proto, že tato směs protilátek vznikla z několika klonů již zmíněných plazmatických buněk, jsou nazývány polyklonální. Tyto protilátky jsou získávány přímo ze séra imunizovaných zvířat a využívají se jako primární či sekundární protilátky v imunochemických testech [16].

Důležitým krokem pro přípravu polyklonálních protilátek je imunizace laboratorních zvířat požadovaným antigenem. Stejně jako v případě monoklonálních protilátek se imunizační dávka podává v průběhu několika týdnů. Dochází tak ke stimulaci B-lymfocytů k produkci velkého množství protilátek namířených proti danému antigenu. Vzniklé antisérum může být využito v surové formě nebo mohou být specifické protilátky izolovány pomocí afinitního čištění [17].

Laboratorní zvířata používaná pro produkci polyklonálních protilátek jsou nejčastěji krysy, králíci, prasata, kozy, ovce, morčata a myši. Pro chov laboratorních zvířat jsou stanovena přesná pravidla, jejichž dodržování je přísně kontrolováno a celý experiment musí být pečlivě dokumentován. Imunizační dávka antigenu je podávána subkutánně jako emulze v kompletním Freundově adjuvans nebo nekompletním Freundově adjuvans. Tvorba požadovaného množství polyklonálních protilátek závisí na druhu imunizovaného laboratorního zvířete. Požadované protilátky se získávají z jejich krve. U malých zvířat, jako jsou například myši nebo králíci, se provádí vykrvením. Získané množství krve je úměrné jejich velikosti. Pro vyšší produkci protilátek se tedy využívají zvířata většího vzrůstu (prase, ovce, koza atd.), od kterých se může opakovaně odebírat přibližně 500 ml krve přímo z krční žíly [6].

K purifikaci protilátek ze séra je možné využít různé separační metody. Jednou z nejvyužívanějších technik je separace pomocí kolonky naplněné nosičem (například sepharozou), na kterém je navázán protein A. Tento protein je získáván z buněčných stěn *Staphylococcus aureus* a váže protilátky přes Fc oblast. Separované protilátky zůstanou zachyceny na koloně, ze které jsou následně eluovány změnou pH [18]. Další metoda vhodná pro separaci polyklonálních protilátek je afinitní chromatografie [6].

1.2.2 Monoklonální protilátky

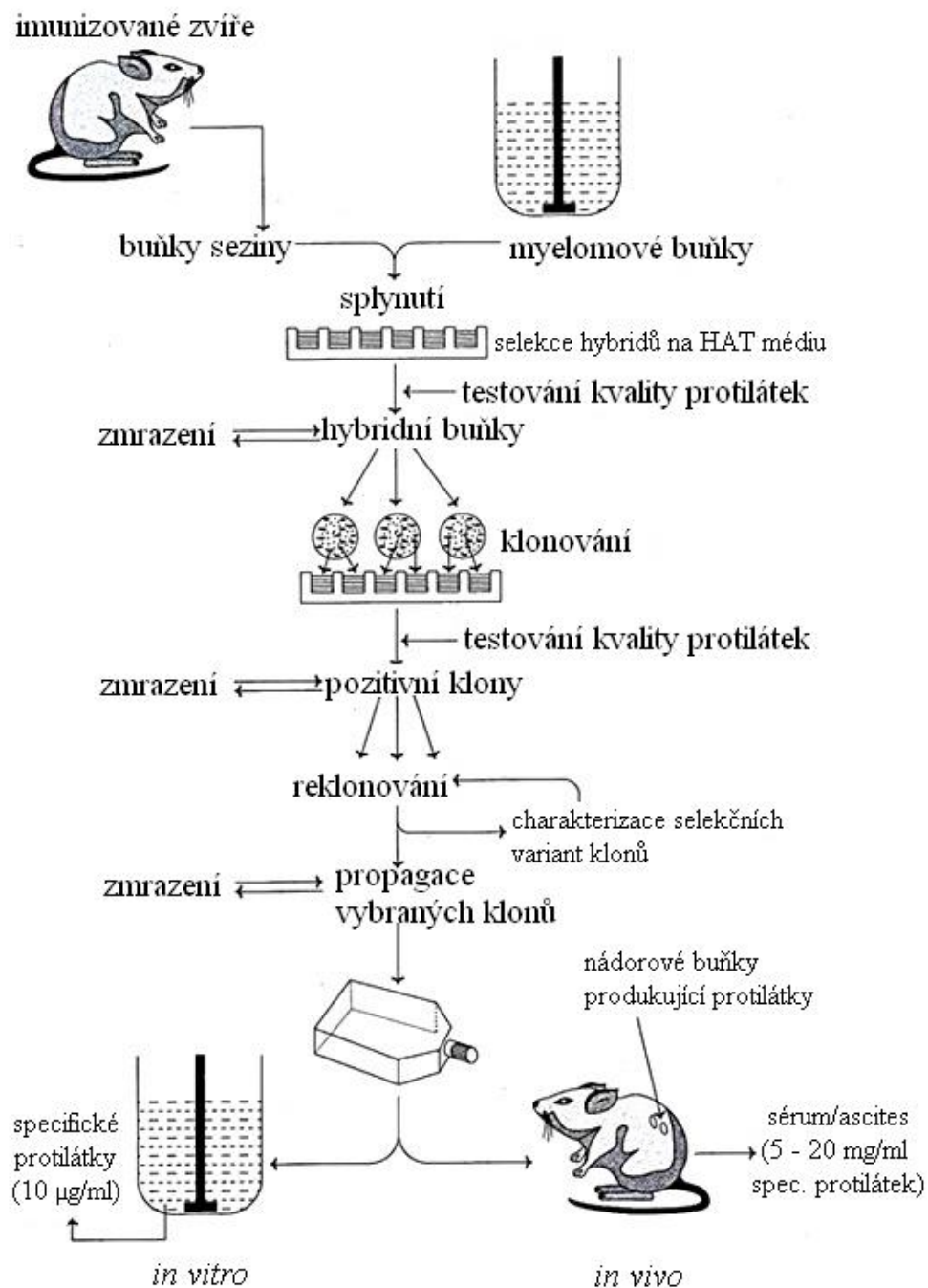
Monoklonální protilátky jsou produkty jednoho klonu hybridomových buněk. Hybridomové buňky vznikají splynutím slezinných B-lymfocytů, získaných od imunizovaných myši, a nádorových buněk myelomu. Touto fúzí jsou získávány imortalizované buňky produkující identické protilátky s vysokou specifitou proti zvolenému antigenu, které se nazývají monoklonální. Díky těmto vlastnostem se s výhodou využívají při izolacích nebo stanoveních různých antigenů. Monoklonální protilátky jsou na rozdíl od polyklonálních specifické pouze proti jedinému epitopu antigenu [19, 20].

Hybridomová technologie pro produkci monoklonálních protilátek (viz obr. 3) byla vyvinuta v roce 1975 G. Köhlerem a C. Milsteinem [12]. Klony myelomových buněk produkující protilátky s požadovanou specifitou mohou být kultivovány dvěma způsoby. Prvním je kultivace v živném médiu (*in vitro* technologie), kdy jsou protilátky produkovány přímo do média. V druhém případě jsou myelomové buňky vpraveny do peritoneální dutiny laboratorních zvířat (*in vivo* technologie) a protilátky se pak získávají z tvořící se ascitické tekutiny. Z laboratorních zvířat je k tomuto účelu možné využít myši nebo králíky. *In vivo* technologie získávání monoklonálních protilátek je mnohem jednodušší a levnější. V případě nadměrného nahromadění tekutiny nebo rozvoje agresivního nádoru, jako důsledku aplikace hybridomových buněk, jsou ale zvířata vystavena velkému stresu a bolesti. Z humánních důvodů se proto využívá především kultivace *in vitro*. Doposud nebyl nalezen žádný jiný způsob generování hybridomu, který by nevyžadoval použití zvířat [20].

Imunizace laboratorních zvířat se provádí intravenózním nebo intraperitoneálním podáním požadovaného antigenu, který se upravuje emulgací s inkompletním Freundovým adjuvans. Jedná se o emulzi minerálního oleje a vody, která zajistí pomalé uvolňování antigenu a tím i stimuluje dlouhotrvající protilátkovou odpověď. Imunizace se zpravidla provádí každé 2-3 týdny. Jakmile je dosažen dostatečný titer požadovaných protilátek, jsou zvířata usmrcena a je jim odebrána slezina (platí pouze pro *in vitro* produkci), která je zdrojem buněk pro následnou fúzi s myelomovými buňkami [21].

Pro zjištění množství produkováných protilátek se po několikátýdenní imunizaci provádí screeningové testování. Pomocí humánních technik jsou imunizovaným zvířatům odebrány vzorky krve, které jsou podrobeny analýze metodami, jako jsou například ELISA nebo průtoková cytometrie. Pokud je titer požadovaných protilátek dostatečně vysoký, může být provedena fúze. V případě nedostatečné produkce protilátek jsou myši podrobeny dalším

imunizačním dávkám, dokud není dosažena vyhovující hladina protilátek, která je stanovena opakovaným vzorkováním [22].



Obr. 3: Základní protokol pro získání monoklonálních protilátek z hybridních myelomových buněk; Upraveno dle zdroj obrázku [3]

Samotná buněčná fúze se provádí společným odstředěním čerstvě získaných slezinných B-lymfocytů a předem připravených myelomových buněk v polyethylenglykolu, který zajistí propojení buněčných membrán [20]. Myelomové buňky využívané pro účely produkce protilátek hybridomovou technologií nejsou schopny syntetizovat vlastní protilátky. Buňky jsou vybírány na základě inhibice mechanismu syntézy. Většina savčích buněk je schopna syntetizovat nukleotidy *de novo* nebo pomocí takzvané „záchranné cesty“. *De novo* syntéza vyžaduje přítomnost tetrahydrofolátu jako kofaktoru a může být blokována inhibítorem aminopterinem. V případě „záchranné cesty“ dochází k přímé přeměně purinů a pyrimidinů na požadovaný nukleotid. Klíčovým enzymem přeměny hypoxantinu a guaninu na inosinmonofosfát a guanosinmonofosfát je hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferáza (HGPRT). Konverzi thymidinu na thymidinmonofosfát, pak zajišťuje enzym thymidinkináza. Jakákoliv mutace v jednom z těchto dvou enzymů blokuje „záchrannou cestu syntézy nukleotidů“ [23].

Slezinné B-lymfocyty produkující protilátky mají omezenou životnost, naopak myelomové buňky jsou téměř nesmrtelné. Pro zajištění citlivosti myelomových buněk k selekčnímu HAT médiu obsahujícímu hypoxantin, aminopterin a thymidin, jsou tyto buňky týden před fúzí kultivovány s 8-azaguaninem. Aminopterin, obsažený v selekčním médiu, blokuje syntézu nukleotidů a buňky jsou tak donuceny využít pro syntézu nukleových kyselin alternativní cestu [20]. Na HAT médiu tedy budou dále růst pouze buňky fúzované. K eliminaci nefúzovaných slezinných nebo myelomových buněk dochází proto, že samotné B-lymfocyty na HAT médiu rostou velice pomalu nebo vůbec a myelomové buňky postrádají již zmíněný HGPRT enzym pro metabolismování hypoxantinu (purinů). Hybridomové buňky však od myelomových buněk získaly schopnost růstu *in vitro* a od slezinných B-lymfocytů zase geny pro HGPRT, mohou tedy růst na HAT médiu, což se úspěšně využívá pro jejich selekci [23]. Takto vykultivované buňky jsou rozděleny do jamek mikrotitrační destičky obsahujících buňky odvozené od savčích peritoneálních buněk, o kterých se předpokládá, že podporují růst hybridomových buněk produkcí růstových faktorů. Ve fázi hybridomů mohou být buňky zamrazeny a uchovány pro případné pozdější použití [20].

1.2.3 Srovnání monoklonálních a polyklonálních protilátek

Výhodou monoklonálních protilátek je fakt, že hybridomy využitě k jejich výrobě, jsou jejich stálým zdrojem, a proto všechny šarže produkovaných protilátek budou shodné.

Zvyšuje se tím standardizace experimentálních postupů a výsledků. Pokud jsou podmínky prováděných pokusů udržovány na konstantních hodnotách, jsou jejich výsledky vysoce reprodukovatelné. Na rozdíl od polyklonálních protilátek rozpoznávají monoklonální protilátky pouze jeden epitop na antigenu. Díky jejich vysoké specifitě k danému epitopu se snižuje síla signálu na pozadí na minimum. Taktéž možnost křížové reaktivity s dalšími proteiny je méně pravděpodobná. Vysoká specifita monoklonálních protilátek je s výhodou využívána k afinitnímu čištění směsi příbuzných molekul. Specifita monoklonálních protilátek má však i své nevýhody, jednou z nich je citlivost na poškození cílového epitopu, ta může být částečně kompenzována spojením dvou nebo více monoklonálních protilátek namířených proti stejnému epitopu. Také náklady na jejich přípravu jsou oproti polyklonálním protilátkám výrazně vyšší a celý proces je časově a technologicky náročnější [24, 25]

Jak už bylo uvedeno polyklonální protilátky rozpoznávají více epitopů jednoho antigenu, toho je možné využít pro kvalitativní stanovení proteinů s nízkou expresí. Protože na různých epitopech cílového antigenu bude navázáno více protilátek, dojde k zesílení signálu. Díky podobnému principu je dosahováno lepších výsledků i při využití polyklonálních protilátek k imunoprecipitaci. Proti monoklonálním protilátkám se vyznačují vyšší tolerancí k menším změnám ve struktuře antigenu, jako jsou například heterogenita, glykosylace nebo mírná denaturace. Mezi výhody polyklonálních protilátek patří bez pochyby i jejich relativně rychlá a finančně méně náročná výroba. Hlavními nevýhodami polyklonálních protilátek jsou: variabilita mezi jednotlivými šaržemi, velké množství nespecifických protilátek může v některých aplikacích tvořit nežádoucí signál na pozadí, vykazují zkříženou reaktivitu a je nevhodné je používat pro zkoumání specifických domén antigenu. Z etického hlediska je nutné podotknout, že pro produkci polyklonálních protilátek je nezbytné, aby celou dobu probíhala v těle imunizovaného zvířete. U hybridomové technologie může být použito pouze jedno zvíře na počátku pro získání vhodných klonů hybridomových buněk, které už mohou být dále opakovaně kultivovány *in vitro*, pomnožovány nebo dokonce zamrazeny v kapalném dusíku a dlouhá léta uchovávány [16, 25].

1.3 Antigen

Druhou část imunokomplexu vznikajícího při imunochemických stanoveních představuje antigen. Drtivá většina antigenů je proteinové povahy a můžeme je dělit podle několika kritérií: například podle původu na antigeny exogenní, endogenní nebo autoantigeny. Obecně lze tvrdit, že antigen je látka, která má schopnost specificky reagovat se složkami imunitního systému. Výsledkem reakce antigenu s protilátkou je již zmíněný imunokomplex. Další důležitou vlastností antigenu je jeho schopnost vyvolat imunitní odpověď. Tato vlastnost se nazývá imunogenicita antigenu a využívá se například při produkci detekčních protilátek využívaných k imunochemickému stanovení [5, 26]. Místo na molekule antigenu, které se přímo účastní vazby s paratopem protilátky se nazývá epitop (také antigenní determinanta). Jedná se o nejmenší strukturní oblast molekuly antigenu, která zapadá do vazebného místa na protilátce [27]. Epitop každého antigenu je vyjádřen jinou sekvencí aminokyselin. Je dokázáno, že v oblasti antigenní determinanty je vyšší koncentrace aminokyselin s aromatickým postranním řetězcem [28]. Aminokyseliny, nebo jejich funkční skupiny tvořící epitop antigenu, nejsou uspořádány lineárně vedle sebe, ale v terciální struktuře antigenu mají na jeho povrchu blízkou polohu. Z toho vyplývá, že poškození tohoto místa například denaturací může mít negativní dopad na tvorbu imunokomplexu a následně i na výsledky stanovení.

Vazba paratopu protilátky na epitop antigenu je zprostředkována několika nekovalentními vazbami, jakými jsou: vodíkové vazby, elektrostatické síly, hydrofobní interakce a Van der Waalsovy síly. Elektrostatické síly a vodíkové vazby mají díky jejich poměrně dlouhému dosahu význam především při rychlosti tvorby imunokomplexu. Síly s krátkým dosahem (Van der Waalsovy síly a hydrofobní vazebné interakce) zajišťují pevnost spojení a zabraňují disociaci komplexu. Epitop antigenu nasedá s vysokou afinitou do vazebného místa protilátky, které má tvar připomínající štěrbinu. Přímého kontaktu se mohou účastnit 4 až 17 obvykle nabitých aminokyselinových zbytků. Pokud je štěrbinu vazebného místa protilátky větší než odpovídající epitop, může dojít k vazbě této protilátky na jiný epitop podobné struktury s kompatibilními nabitými aminokyselinovými zbytky. Tento jev má za následek zkřížené reaktivity při provádění imunochemických testování [6]. I záměna pouze jedné aminokyseliny této sekvence může interakci antigenu a protilátky značně ovlivnit [5]

Sílu vazby mezi epitopem antigenu a jedním vazebným místem protilátky udává afinita. Je definována afinitní konstantou (K_A) a řídí se základními termodynamickými principy

jako obecně všechny reverzibilní biologické interakce. Hodnota K_A popisuje, kolik komplexů protilátka-antigen existuje v okamžiku dosažení rovnováhy. Čas potřebný k dosažení rovnováhy je závislý na rychlosti difúze. Protilátky s vysokou afinitou budou vázat větší množství antigenu za kratší čas než protilátky nízké afinity. Jelikož jsou monoklonální protilátky homogenní a selektivní pouze pro jediný epitop, může být jejich afinita přesně změřena. U polyklonálních protilátek může být stanovena pouze průměrná hodnota jejich afinity. Důvodem je jejich heterogenita, jedná se o směs protilátek s různými afinitami rozpoznávající několik epitopů antigenu [29].

Míru celkové stability vzniklého imunokomplexu udává avidita. Ta zahrnuje afinity všech paratopů protilátky k epitopům antigenu a je ovlivňována i vzájemným prostorovým uspořádáním interagujících molekul, zahrnuje tedy všechny faktory spojené s vazebnými interakcemi. Znalost avidity protilátek dobře odráží jejich biologickou důležitost a její znalost může významně přispět k porozumění mechanismů některých onemocnění [30].

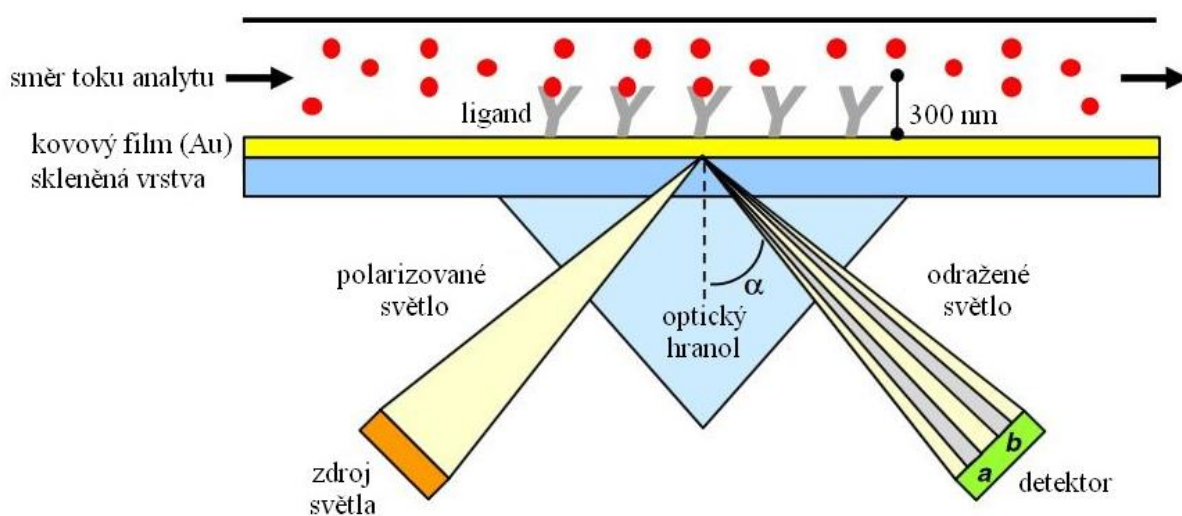
1.4 Metody stanovení afinity a avidity protilátek

Znalost afinity a avidity protilátek může být důležitým kritériem pro výběr vhodných diagnostických protilátek pro sestavení funkčního imunochemického testu. V současné době si za účelem stanovení avidity a afinity můžeme vybrat z několika moderních analytických metod, kterými bývá zpracováno velké množství různých vzorků za relativně krátkou dobu, jako je například metoda povrchové plasmonové rezonance (kap. 1.4.1) nebo izotermální titrační kalorimetrie (kap. 1.4.2). Tyto techniky vyžadují speciální přístrojové vybavení, jehož pořízení a provoz je velmi nákladný, jsou tedy vhodné spíše pro velké firmy nebo elitní výzkumná centra. Interakce antigenu s protilátkou může být posuzována také podle hodnoty disociační konstanty, techniky pro její stanovení jsou však zdlouhavé a v běžné praxi se neprovádějí. Pro potřeby běžných laboratoří je nejpoužívanější metodou stanovení afinity a avidity protilátek metoda ELISA. Zmíněné techniky jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

1.4.1 Povrchová plasmonová rezonance

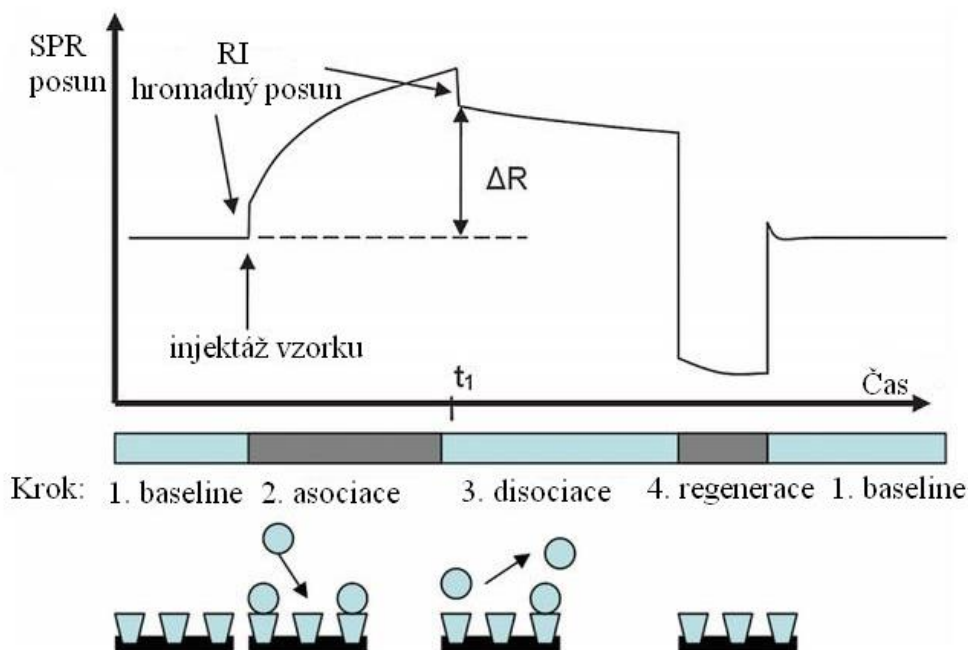
Povrchová plasmonová rezonance (SPR – surface plasmon resonance) patří mezi optické analytické techniky používané pro detekci molekulárních interakcí. Molekuly ligandu

jsou imobilizovány na tenkém kovovém filmu v biosenzoru, který je nejčastěji tvořen vrstvou zlata, stříbra nebo titanu. Pomocí mikrofluidního systému jsou přiváděny molekuly analytu, které interagují s imobilizovaným ligandem [31]. Přes optický hranol je ke kovové vrstvě nasměrováno polarizované světlo (laser), kde jsou v kritickém úhlu dopadajícího světla generovány povrchové plasmony. Absorpce světla se jeví jako pokles světelné intenzity. Velikost kritického úhlu je závislá na indexu lomu média proudícího celou senzorem a mění se, pokud molekuly analytu interagují s imobilizovaným ligandem [32]. Elektromagnetické pole dopadajícího světla proniká desítky nanometrů do povrchu, kde dochází ke stimulaci rezonanční oscilace valenčních elektronů daného materiálu. Tato oscilace snižuje intenzitu odraženého světla a v důsledku přenosu rezonanční energie mezi evanescentní vlnou a povrchovými plasmony dojde k emisi povrchové plasmonové rezonance. Podmínky rezonance jsou ovlivněny typem a množstvím molekul adsorbovaných na povrch, což umožňuje jeho charakterizaci. Plošný plasmon je projevem kolektivního kmitání valenčních elektronů pevné látky, které nastane po stimulaci dopadajícím světlem [33]. Konstrukci SPR senzoru schematicky znázorňuje obr. 4.



Obr. 4: Schématické znázornění senzoru pro SPR analýzu; Upraveno dle zdroj obrázku [4]

Metoda SPR poskytuje v reálném čase nejen informace o vazebné síle (afinitě) mezi zkoumanými makromolekulami, ale také o kinetice vzniku vazby. Jako výhoda oproti metodě ELISA může být vnímána detekce bez použití jakýchkoli značek. Díky SPR analýze je možné rychle a kvantitativně charakterizovat interakce mezi molekulami. Základní kroky každé SPR analýzy jsou znázorněny na obr. 5 [34].



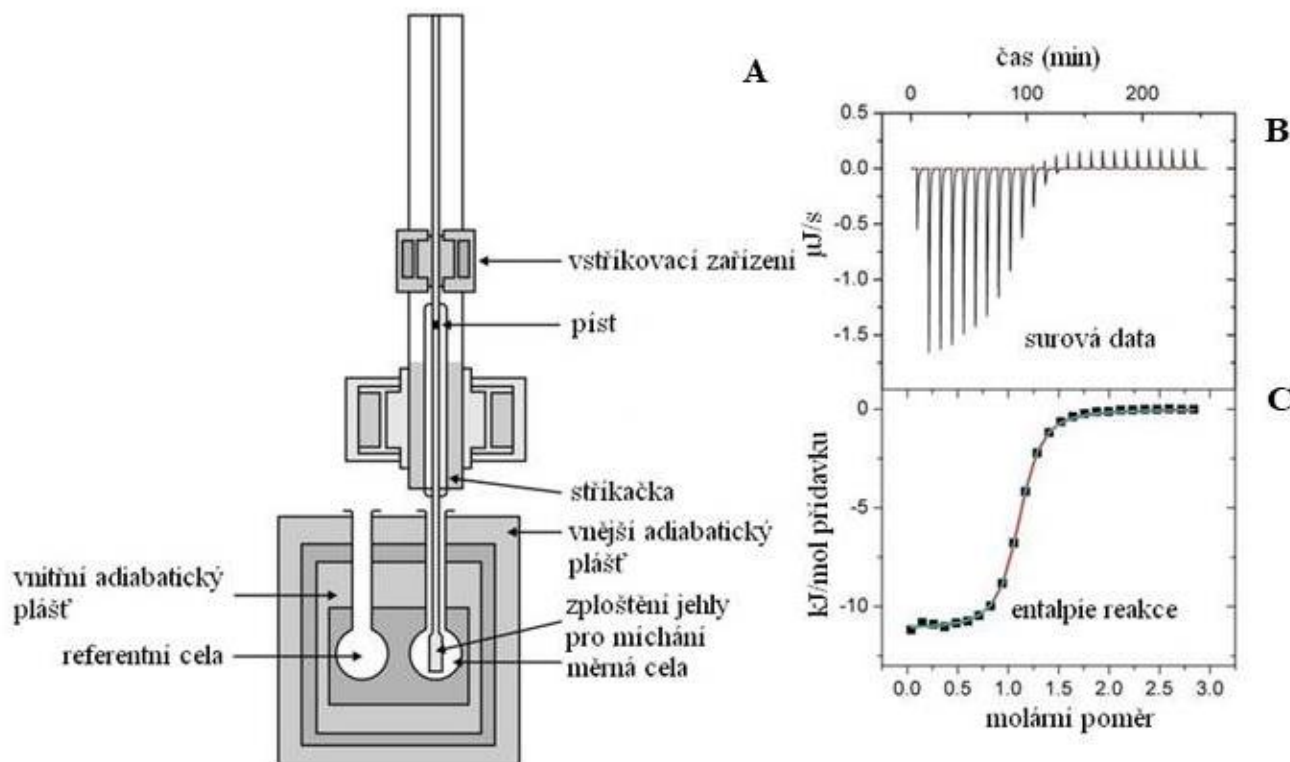
Obr. 5: Senzogram popisující fáze analýzy; Upraveno dle zdroj obrázku [5]

1.4.2 Izotermální titrační kalorimetrie

Jednou z technik, které lze použít pro analýzu molekulových interakcí, mezi které patří i reakce mezi antigenem a protilátkou, je izotermální titrační kalorimetrie (ITC – isothermal titration calorimetry). Tato technika je založena na zaznamenávání změn entalpie, které nastanou v důsledku vzniku vazeb mezi složkami analyzované směsi (například interakce mezi antigenem a protilátkou nebo ligandem a receptorem) [35]. Schéma aparatury využívané při ITC znázorňuje obr. 6.

Kalorimetr využívaný k tomuto měření se skládá ze dvou identických cel, vyrobených z chemicky inertního a vysoce tepelně vodivého materiálu. Obě cely jsou umístěny v adiabatickém plášti. K zaznamenávání teplotního rozdílu mezi referenční celou, naplněnou pouze pufrům nebo vodou, a měrnou celou se vzorkem slouží citlivé termočlánky. Před samotným dávkováním ligandu je na referenční celou aplikován konstantní výkon, který představuje zpětnou vazbu. Během experimentu jsou dávkovány přesně známé malé alikvoty roztoku jedné složky (ligandu) do kalorimetrické cely naplněné roztokem druhé vazebné složky (analytu), která je v nadbytku. Reakce obou složek vyvolá, podle termodynamické povahy reakce, vznik nebo úbytek tepla. Zaznamenává časová závislost příkonu potřebného k udržení stejných teplot mezi celami, jinak řečeno časová

závislost příkonu potřebného k udržení izotermálních podmínek. [35, 36]. Velkou nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje a vysoké provozní náklady jednotlivých analýz.



Obr. 6: Schématické znázornění izotermálního titračního kalorimetru (A) a charakteristický titrační experiment (B) s vyhodnocením (C); Upraveno dle zdroj obrázku [6]

1.4.3 Metody založené na stanovení rovnovážné konstanty

Míra interakce antigenu a protilátky může být posuzována i podle hodnoty rovnovážné konstanty. Pokud dojde k reverzibilní vazbě protilátky na antigen, platí Guldberg-Waagův zákon a je ustanovena rovnováha. Nejpoužívanějšími matematickými modely pro kvantitativní popis této rovnováhy je Scatchardova nebo Langmuirova závislost. Tyto modely se zaměřují na jednotlivá vazebná místa protilátky a za předpokladu, že afinita každého konkrétního vazebného místa protilátky pro antigen není ovlivněna obsazením ostatních míst, definují rovnovážnou (afinitní) konstantu. Afinitní konstanta protilátek se běžně vyskytuje v rozmezí od 10^5 mol.l^{-1} do $10^{11} \text{ mol.l}^{-1}$ a její hodnotu může ovlivňovat pH, teplota nebo například iontová síla roztoku. Pro její stanovení je potřeba určit molární koncentrace navázaného i nenavázaného antigenu a také celkovou koncentraci vazebných míst protilátky, kterou lze získat vynásobením molární koncentrace protilátky počtem jejich vazebných míst [6, 29].

Jednou z technik, kterou je možné stanovit afinitní konstantu je rovnovážná dialýza. Stanovení probíhá v dialyzační vaně předělené dialyzační membránou nepropustnou pro protilátky a zároveň propustnou pro nízkomolekulární antigeny a hapteny. Z jedné strany je membrána v kontaktu s roztokem obsahující pouze čisté protilátky a z druhé strany se značeným antigenem (nejčastěji se ke značení využívá radioaktivní izotop) nebo haptenem. Membrána umožňuje volnou difuzi antigenu po celém objemu dialyzační vany, kdežto protilátky zůstávají pouze v původním prostoru. Jakmile se antigeny dostanou do kontaktu s protilátkami, dojde k formování imunokomplexů. Ve chvíli, kdy je koncentrace nenavázaného antigenu v obou částech vany konstantní, ustanoví se rovnováha. Signál změřený v části vany původně obsahující protilátky odpovídá sumě koncentrací volného i navázaného antigenu a signál získaný z druhé části vany udává koncentraci pouze volného antigenu. Jelikož ustanovení rovnováhy může trvat i více než 16 hodin, je za hlavní nevýhodu této metody považována časová náročnost [29, 37]. Rychlejší metodou, která také k separaci navázaných a nenavázaných komponent využívá semipermeabilní membránu, je membránová filtrace. V případě této techniky je prostup roztoků přes membránu urychlen pomocí tlaku zajištěného čerpadlem, pro menší objemy je možné využít i odstředivou sílu. Na rozdíl od výše zmíněné rovnovážné dialýzy je membránovou filtrací možné využít, v případě dostatečně rozdílné molekulární hmotnosti reagujících molekul, i k analýze interakcí mezi vysokomolekulárním antigenem a příslušnou protilátkou [29].

K analýze molekulových interakcí lze využít i rozdílných absorpčních vlastností volných protilátek a protilátek s navázaným antigenem. Na základě těchto vlastností pracuje i spektrofotometrická metoda zhášení fluorescence. Obecně platí, že molekuly absorbují světlo o určité vlnové délce a získanou energii vyzáří v podobě světla o vyšší vlnové délce. Pokud jsou čisté proteiny (protilátky) ozářeny vlnovou délkou v rozmezí 280 – 295 nm (UV oblast), emitují světlo v oblasti vlnových délek 330 – 350 nm. V případě, že je na protilátce navázána neflourescenční molekula (antigen nebo haptén) dojde k přenosu absorbované energie i na ni a celková fluorescence protilátky klesne [29, 38].

Nejstarší separační metodou protilátek je precipitace síranem amonným. Základní princip vychází z faktu, že protilátky a jimi tvořené imunitní komplexy tvoří precipitát v 50 % roztoku síranu amonného. Pro tento experiment se využívají antigeny (nebo hapteny) značené radioizotopem. Radioaktivní signál změřený u precipitátu pak odpovídá množství navázaného antigenu a radioaktivita supernatantu indikuje množství volného antigenu. V některých případech je možné množství navázaného a nenavázaného antigenu stanovit také pomocí gelové nebo afinitní chromatografie [29].

1.4.4 Metoda ELISA

Metoda ELISA se řadí mezi enzymatické imunochemické metody (EIA – enzyme-immunoassay). V současnosti existuje mnoho různých podtypů EIA metod, které jsou podobně jako imunochemické metody, klasifikovány podle různých kritérií (viz kap. 1.1): podle typu stanovované komponenty (antigen nebo protilátka), podle typu reakce (kompetitivní nebo nekompetitivní) nebo podle počtu fází reakční směsi, kdy jsou tyto metody děleny na homogenní a heterogenní [29]. Klasifikaci enzymatických imunochemických technik shrnuje následující tabulka [13, 29, 39, 40].

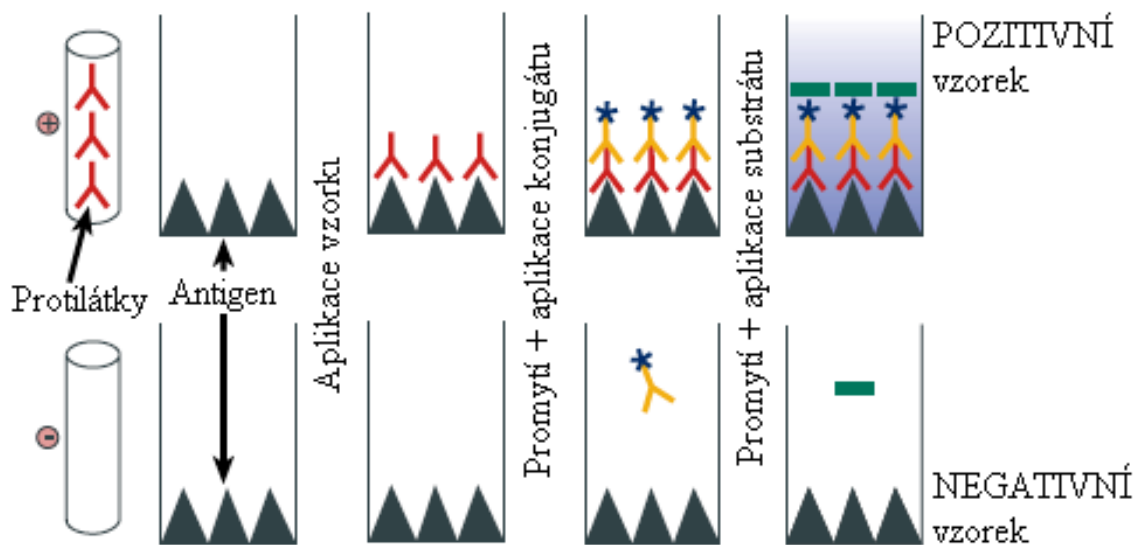
Tabulka 1: Klasifikace heterogenních imunochemických technik; Upraveno dle zdroj [13]

Kompetitivní	Přímé metody vázající antigen	Stanovení antigenů (haptenuů)
	Přímé metody vázající protilátku	Stanovení antigenů (makromolekulárních)
	Nepřímé metody vázající protilátku	
Nekompetitivní (sendvičové)	Přímé metody vázající antigen	Stanovení protilátek
	Nepřímé metody vázající antigen	
	Metody s imobilizovaným antigenem	Stanovení protilátek
	Metody s imobilizovanou protilátkou	

1.4.4.1 Sendvičová ELISA metoda

Základním principem metody ELISA je postupná tvorba imunokomplexu, jehož uspořádání závisí na tom, zda je stanovovaným analytem antigen nebo protilátka. V případě stanovení množství protilátek ve vzorku je k povrchu pevné fáze ukotvený příslušný antigen. Pokud je analytem antigen, je k povrchu imobilizována specifická protilátka. Nevyužitý povrch je blokován (např. hovězím sérovým albuminem) a následně se dává vhodně naředěný roztok vzorku. Během doby inkubace dojde k vytvoření vazby mezi molekulami ze vzorku a molekulami ukotvenými na povrchu jamek. Přebytek nenavázaných protilátek nebo antigenů je odmyt a v případě stanovení protilátek následuje inkubace s vhodně zvoleným a naředěným enzymaticky značeným konjugátem. Pro stanovení antigenů může být nejprve aplikována neznačená primární protilátka a až následně konjugát. Po uplynutí doby inkubace je nenavázaný konjugát také odmyt. Vzniklé imunokomplexy jsou zviditelněny přidáním směsi vhodného substrátu a chromogenu [39]. Pro stanovení platí,

že spektrofotometricky zaznamenaný signál je úměrný množství stanovovaného antigenu ve vzorku. To, že je stanoven obsah pouze sledovaného analytu, je zajištěno právě zařazením promývacích kroků. Imunokomplexy vzniklé reakcí nízko-afinitních protilátek jsou promytím rozrušeny a výsledný signál je tedy tvořen imunokomplexy tvořených výhradně vysoce afinitními protilátkami a stanovovaným analytem [41]. Postup stanovení protilátek ze vzorku sendvičovou ELISA metodou znázorňuje obr. 7.



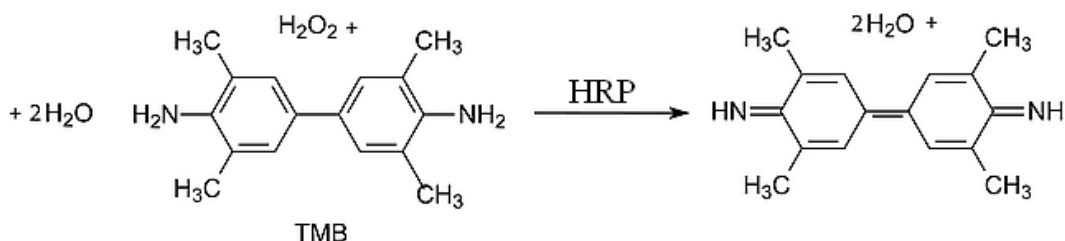
Obr. 7: Schéma provedení postupu sendvičové ELISA metody pro stanovení protilátek; Upraveno dle zdroj obrázku [7]

Metoda ELISA našla v rutinní analýze hojně využití pro stanovení velkého množství biologických markerů [40, 42]. Tento test je vhodný pro stanovení virových infekcí jako je například infekce virem lidské imunodeficiency (HIV), který ke stanovení přítomnosti viru využívá specifické protilátky proti kapsulárnímu virovému antigenu označovaného p24 [43]. Jako další příklad využití této metody při stanovení virové infekce může být zmíněn třeba průkaz viru hepatitidy typu C (HCV) pomocí stanovení přítomnosti protilátek anti-HCV v séru [44]. Velmi často je pomocí ELISA testu stanovována přítomnost protilátek, vyskytujících se v důsledku různého typu alergických onemocnění [45], s čímž také souvisí i využití pro stanovení různých alergenů nejen v potravinách [46–48]. Podobným způsobem jako u alergií mohou být stanoveny i autoprotilátky u pacientů trpících některými autoimunitními chorobami [49]. V neposlední řadě je ELISA využívána i ve veterinární medicíně nebo v mikrobiologii [50, 51].

1.4.4.2 Detekce u EIA metod

Jak již bylo zmíněno, nepoužívanějším způsobem detekce u testů ELISA je stanovení pomocí enzymaticky značeného konjugátu, jedná se o protilátku konjugovanou s enzymem (tzv. sekundární protilátka). Dříve byly k detekci využívány radioizotopy (poprvé popsáno v práci R. S. Yalow a S. Bersona v roce 1959) [7]. Používání radioizotopů má však, mimo zdravotní rizika, i další nevýhody. Jednou z nich je například ztráta aktivity v průběhu času, detekční protilátky tak musí být opakovaně značeny a testovány. K provedení analýzy je také nutné drahé speciální vybavení a vhodná likvidace veškerého odpadu, čímž se velmi snižuje dostupnost radioizotopové detekce pro rutinní použití [52].

Pro zviditelnění enzymatické reakce je nutné do reakční směsi přidat vhodný substrát (volí se podle specifity k použitému enzymu). Jedná se o chemickou sloučeninu, se kterou enzym specificky reaguje za vzniku produktů, které sami o sobě mohou v některých případech vést ke změně zbarvení reakční směsi. Mnohem častěji se do reakce přidává vhodný chromogen, který následně reaguje se zreagovaným substrátem za vzniku barevné sloučeniny [40]. Nejčastěji využívané enzymy k tomuto účelu jsou křenová peroxidáza (HRP) a alkalická fosfatáza (AP) [53]. Pro HRP se chromogen využívá 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), jehož přeměna na barevný produkt je znázorněna na obr. 8, nebo *o*-fenyldiamin (OPD) a pro AP nejčastěji *p*-nitrofenylfosfát (PNPP). Alkalická fosfatáza má však poměrně velkou molekulou (140 kDa), proto může být s jednou molekulou protilátky konjugována jedna, nanejvýš dvě, molekuly enzymu. Tím je také omezeno množství signálu, které může být generováno. Pokud není AP správně uchovávána, ztrácí svoji stabilitu. Křenová peroxidáza je využívána ke značení protilátek častěji než AP. Díky její malé molekule (40 kDa) může být konjugováno více molekul HRP s jednou molekulou protilátky, což vede k amplifikaci signálu. Ten se měří pomocí spektrofotometru v UV-VIS oblasti. Při fluorescenční detekci se využívají substráty, které se při enzymem katalyzované reakci přemění na fluoreskující produkt. K měření fluorescence je potřeba fotometr s příslušnými budíciemi a emisními filtry. Většina chemiluminiscenčních substrátů je určena pro HRP, kdy je jako chromogen použit luminol a substrát peroxid vodíku. Po reakci HRP s peroxidem vodíku je luminol oxidován a nachází se v excitovaném stavu, při přechodu na základní stav pak dochází k emisi záření. Po vyčerpání substrátu emise záření ustane. Platí, že chemiluminiscenční detekce je citlivější než detekce kolorimetrická [6, 39]. Další, méně často využívané enzymy, jsou například β -D-galaktosidáza [54], acetylcholinesteráza [55], glukooxidáza, ureáza, β -laktamáza nebo kataláza [6].



Obr. 8: Schéma vzniku barevného produktu z TMB za katalýzy HRP; Upraveno dle zdroj obrázku [8]

1.4.4.3 Stanovení avidity pomocí metody ELISA

Pro stanovení avidity, vyjadřující celkovou sílu všech vazeb protilátky na antigen, lze využít modifikaci sendvičového ELISA testu. Od klasického uspořádání se tento postup liší v tom, že se před přidáním konjugátu nechá vytvořený imunokomplex antigenu a primární protilátky po krátkou dobu inkubovat s chaotropním činidlem [56]. Látky s chaotropními vlastnostmi destabilizují nekovalentní vazebné interakce a způsobují tak narušení struktury biomolekul (př.: imunokomplexů, proteinů a nukleových kyselin) [57]. Mezi nejhojněji používaná chaotropní činidla k tomuto účelu patří například NH_4SCN [58], močovina [59] nebo diethylamin (DEA) [60]. Imunokomplex je vystaven rostoucímu gradientu chaotropního činidla. Hledá se koncentrace, která snižuje vazbu protilátky a antigenu o 50 % a se nazývá aviditní index [56]. Jeho hodnotu lze odečíst z grafu lineární závislosti dekadického logaritmu procenta vazby na molárních koncentracích použitého chaotropního činidla. Hodnotu procenta vazby lze vypočítat jako podíl optické denzity vzorku s použitím chaotropního činidla a optické denzity vzorku bez chaotropního činidla vynásobeného stem [58].

1.5 Blotovací techniky

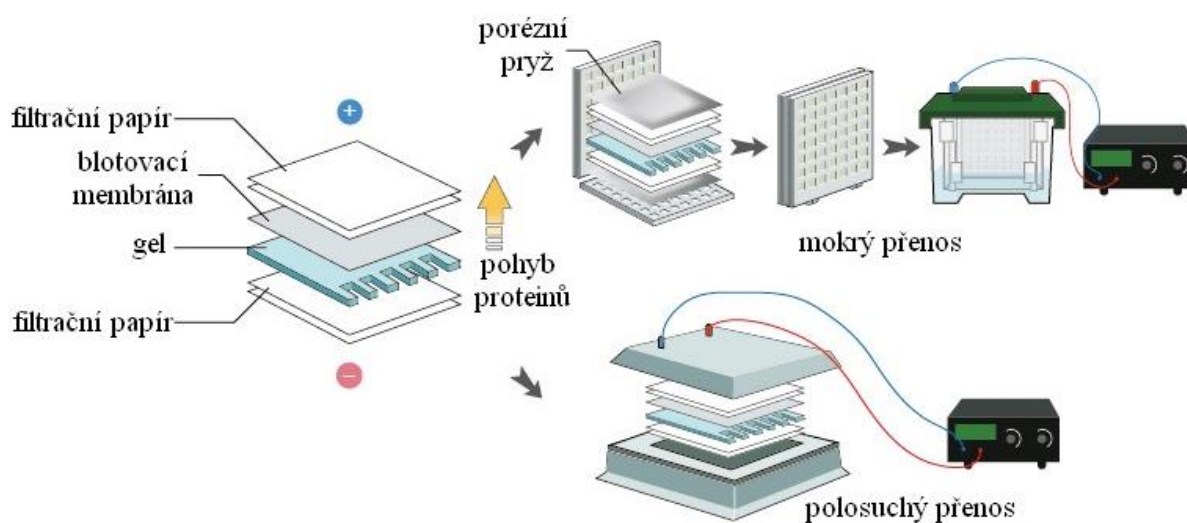
Blotovací techniky vycházejí z gelové elektroforézy s následným přenosem rozdělených makromolekul na membránu, na které z pravidla probíhá imunochemická detekce. Z počátku bylo hlavním cílem elektroforetického dělení vizuálně sledovat homogenitu vzorku nebo jeho přítomnost samotnou, která je vyjádřena zviditelněním proužku v oblasti jeho předpokládané molekulové hmotnosti [61]. Během zdokonalování celé metody bylo zjištěno, že jednorozměrná elektroforetická analýza postačuje pro stanovení poměrně jednoduchých vzorků, jako jsou například proteiny virového původu [62]. Pro analýzu více komplexních systémů byly potřeba metody s vyšší rozlišovací schopností a byla vyvinuta technika

dvourozměrné gelové elektroforézy. Ta umožňuje analyzovat velmi komplexní směsi bílkovin, které jsou v první fázi rozděleny podle příslušného izoelektrického bodu a ve druhé fázi pak podle odpovídající molekulové hmotnosti pomocí elektroforézy v prostředí dodecilsulfátu sodného (SDS-PAGE) [63]. I přes vývoj techniky s vysokým rozlišením bylo v některých případech obtížné jednoznačně přiřadit skvrnu na gelu k určité složce vzorku. Pokud během analýzy dochází k denaturaci analyzovaných proteinů, je identifikace o to obtížnější. Existuje několik technik, jak je možné protein specificky identifikovat. Tyto metody jsou poměrně pracné, časově náročné a velmi často vyžadují relativně velká množství drahých činidel, jako jsou například specifické detekční protilátky [61].

Přímá detekce součástí vzorku rozděleného gelovou elektroforézou pomocí specifických protilátek nepřináší uspokojivé výsledky. Jedním z důvodů je ztráta rozlišení způsobená difuzí proužků díky dlouhým inkubačním dobám. Dalším omezením imunodetekce je také použitelnost pouze pro agarózové gely. U polyakrylamidových gelů nemohou protilátky, vzhledem k velikosti póru gelu, dobře pronikat ke vzorku. Představení metod přenosu elektroforeticky separovaných proteinů z gelu na membránu, kde jsou snadno přístupné makromolekulárním sondám, mezi které patří i značené protilátky, znamenalo tedy bezpochyby velký posun v analýze proteinů [64]. Jako první přišel s myšlenku přenosu separovaných molekul za gelu na membránu v roce 1975 E. M. Southern, který využíval přenos DNA fragmentů na nitrocelulóзовou membránu, na které následně probíhá detekce. Výsledný vzor proužků na membráně je totožný s původním vzorem na gelu [65]. Pro tuto techniku analýzy DNA se později vžil název Southern blotting. Analogickým postupem lze z gelu na membránu přenést i odseparované molekuly RNA (metoda zvaná Northern blotting) nebo proteinů (Western blotting) [61].

1.5.1 Western blot

Jak už bylo zmíněno v předchozím testu, metoda Western blottingu se zabývá přenosem proteinů po separaci gelovou elektroforézou z gelu na membránu. Nejjednodušší způsob takového přenosu, využívající difuzi, byl popsán v roce 1980 B. Bowenem. Jde však o zdlouhavý postup, který je optimální především pro agarózové gely. Mnohem častěji se proto používá efektivnější metoda přenosu elektroblotting (viz obr. 9). Ten se využívá především pro polyakrylamidové gely a lze jím dosáhnout úplného přenosu. Na jednu stranu gelu je umístěna vlhká membrána a vše je vloženo mezi vrstvy porézní pryže nebo chromatického papíru nasycené přenosovým pufrém. Tyto vrstvy jsou vloženy mezi dvě deskové elektrody tak, aby se membrána nacházela mezi gelem a kladně nabitou katodou. Vše je poté vloženo do vany s pufrém v horizontálním nebo vertikálním uspořádáním. Při průchodu jednosměrného elektrického proudu se pak proteiny (rozdělené elektroforézou v přítomnosti SDS) pohybují směrem ke katodě a jsou zachycovány na přiložené membránu [61, 66, 67].



Obr. 9: Aparatura pro přenos proteinů z gelu na membránu pomocí elektrického proudu; Upraveno dle zdroj obrázku [9]

Pro účely western blottingu je často využívána membrána vyrobená z nitrocelulózy, která váže proteiny na základě hydrofobních interakcí. Její nevýhodou je křehkost a lámavost, proto se často využívá membrána vyrobená z inertního podpůrného nosiče potažená vrstvou nitrocelulózy [61, 68, 69]. Jako další příklad membrány používané k blotování proteinu můžeme uvést PVDF membránu (polyvinylidén difluorid), která je podrobněji popsána

v následující kapitole. Jakmile jsou proteiny zachyceny na membráně, následuje detekce. Nejčastěji se k detekci využívá vazba specifických značených protilátek analogicky jako u metody ELISA (kap. 1.4.4) [69].

1.5.2 Dotblot

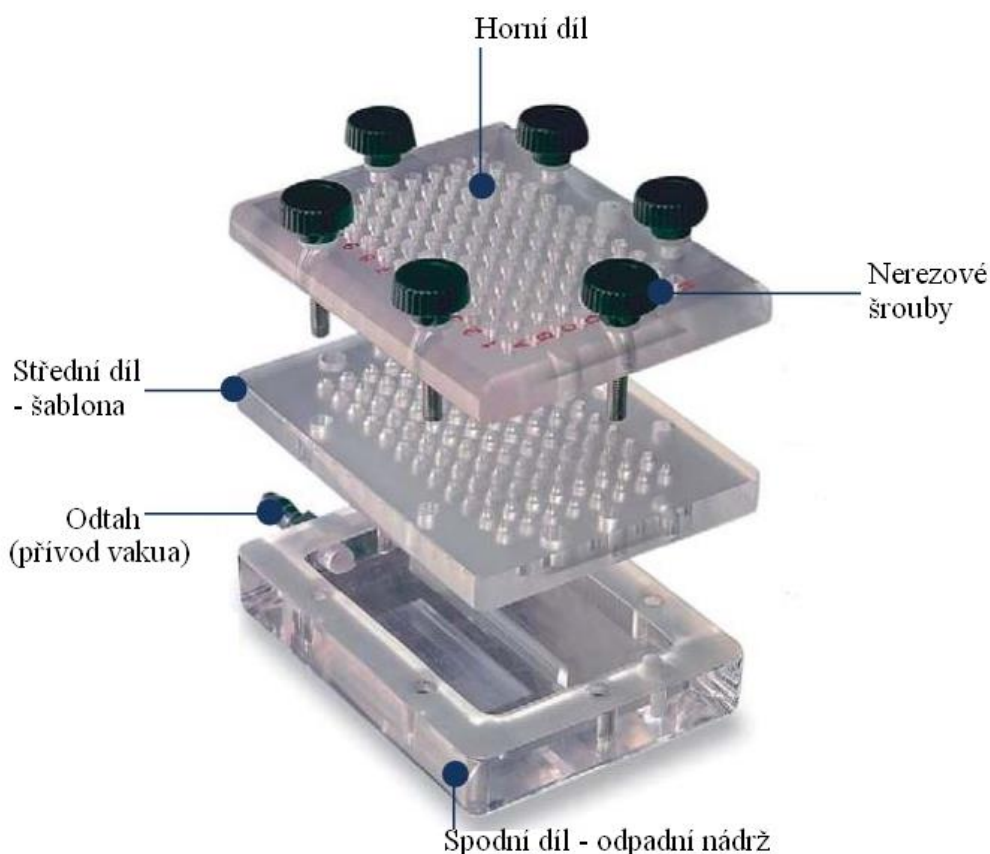
Metoda dotblot je jednoduchá semikvantitativní metoda, která vznikla zjednodušením Western blotu. Jak už bylo zmíněno, u Western blotu dochází nejprve k rozdělení vzorku gelovou elektroforézou a teprve poté se analyty přenáší na membránu, na které následně probíhá detekce. [70]. U dotblotu k elektroforetickému dělení nedochází a vzorek je nanášen přímo na membránu. Dochází k výraznému zkrácení času potřebného pro analýzu a k úspoře objemu vzorku oproti ostatním blotovacím technikám. Roztok obsahující antigen se nanáší pipetou přes šablonu s jamkami ve tvaru koleček (dotblotovou aparaturu) přímo na membránu (pevnou fázi) a po zapnutí vakua je roztok vtažen přes membránu do retenční komory. Antigen zůstává zachycen na povrchu membrány a to bez použití fixujících látek, jako je například glutaraldehyd. Detekce molekul zachycených na membráně se provádí stejně jako u Western blotu. Po blokaci membrány následuje inkubace s primární protilátkou, poté se sekundární protilátkou značenou nejčastěji enzymem. Následuje kolorimetrická detekce a denzitometrické vyhodnocení naměřeného signálu [71].

Dotblot analýzou získáme informace o přítomnosti sledovaného antigenu ve vzorku, nikoliv však o velikosti jeho molekuly. Odhad množství antigenu se provádí pomocí standardů o známé koncentraci. Ke kvantifikaci je využíváno měření denzity zbarvení jednotlivých skvrn, které nedosahuje tak vysoké přesnosti jako jiné běžně využívané detekční techniky (například spektrofotometrie). I přes nižší přesnost je však dotblot oblíbenou screeningovou metodou v medicínských a výzkumných laboratořích, zejména díky jednoduché manipulaci s membránou a možností zpracování velkého množství vzorků v průběhu jedné analýzy [70]. Nejčastěji se tato metoda využívá k analýze proteinů, ale lze ji využít i k analýze nukleových kyselin [72]. Dotblot dosahuje stejné, v některých případech i vyšší, citlivosti než ELISA a může pracovat s širokým rozmezím poměrů antigen-protilátka. Jednou z výhod je snadná interpretace výsledků bez potřeby drahého přístrojového vybavení jako je například čtečka mikrotitračních destiček [73].

Při dotblotu může být roztok vzorku nanášen na membránu buďto pomocí mikrofiltrace, jak bylo zmíněno výše, nebo manuálně za použití pipety. Přímé nanášení vzorků na membránu pipetou se využívá výhradně při velmi malých objemech.

Sofistikovanějším způsobem je využití aparatury napojené na vakuovou pumpu, kdy je nanesený objem vzorku přefiltrován přes membránu pomocí podtlaku. Při tomto postupu je nutné nanášet větší množství vzorku než u předchozího. Naproti tomu je dosaženo vyšší reprodukovatelnosti analýzy a poměrně pohodlně je možné nanést větší počet různých vzorků za krátký čas [74]. Zařízení určené k nanášení zkoumaného vzorku na membránu může mít více podob i velikostí, to záleží na výrobcu. Jamky pro nanášení vzorku jsou obvykle kulaté, ale mohou mít i oválný tvar. Jednotlivá zařízení se mohou lišit nejen uspořádáním jamek (9 x 3; 8 x 12 apod.), ale i jejich počtem, velikostí nebo kapacitou. Na obr. 10 je zobrazeno zařízení od firmy Scie-Plas (Cambridge, UK), které je vyrobeno z akrylátu o vysoké hustotě a skládá se ze tří základních částí spojených dohromady pomocí šesti šroubů.

Vlastnosti membrány mají velký vliv na proces nanášení vzorku. Výběr správné membrány je tedy jedním ze zásadních kroků celé analýzy. Důležitým aspektem je porozita membrány. Klasicky jsou k dostání membrány o velikosti pórů 0,45 μm nebo 0,2 μm . Podle použitého materiálu rozdělujeme dva základní typy membrán, nitrocelulóзовou a PVDF [70]. PVDF membrány, oproti nitrocelulóзовým, lépe zadržují proteiny, jsou zdatelně mechanicky odolnější a vykazují vyšší vazebnou kapacitu (nitrocelulóза: 80 – 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, PVDF: 100 - 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) [75]. Před samotným nanesením vzorku musí být PVDF membrána smočena 100% metanolem a následně alespoň jednou vzorkovým pufrem bez metanolu [74]. Důvodem pro toto opatření je, že PVDF je polymer s hydrofobními vlastnostmi a bez smočení v alkoholu by nebylo možné na membránu nanášet roztoky ve vzorkových pufrech na bázi vody. Ukotvení proteinů na membráně je zajištěno interakcí postranních hydrofobních skupin některých aminokyselin s hydrofobními skupinami polymeru [75]. Membrána se vkládá mezi horní a střední díl aparatury, která je znázorněna na obr. 10. Sešroubováním celé aparatury je zabezpečena těsnost a přesná poloha všech dílů a nedochází tak ke smísení obsahů jednotlivých jamek (vzorků). Na horním dílu je umístěno 96 jamek, do kterých je možné dávkovat roztok antigenu (doporučený objem vzorku je 100 μl na jamku). Tento díl je kompatibilní s vícekanálovou pipetou a výsledné skvrny mají průměr 3 mm. Dávkované roztoky jsou protahovány přes kanálky skrze umístěnou membránu a zbytky jsou sbírány ve spodním díle, na který je připojeno vakuum [76].



Obrázek 10: Stavba aparatury na dotblot, Upraveno dle zdroj obrázku [10]

Pro detekci imobilizovaných antigenů na membráně se při dotblotu, stejně jako u metody ELISA, využívají specifické značené protilátky. V některých pramenech je tato technika nazývána dotblot ELISA. Celý proces detekce tedy probíhá analogicky jako u metody ELISA pouze s tím rozdílem, že antigen je imobilizován na membráně a ne na plastovém povrchu jamek mikrotitrační destičky. Membrána se zachyceným analytem je nejprve inkubována s vhodně naředěnou primární protilátkou [75, 77]. Neobsazená vazebná místa na membráně je nutné zablokovat, aby se zabránilo nespecifické vazbě detekčních protilátek. K tomuto účelu se nejčastěji využívá roztok hovězího sérového albuminu (BSA), sušeného mléka nebo kaseinu. Nejdůležitější kritérium, které musí splňovat vybraný blokační protein je, že nesmí zkříženě reagovat s detekčními protilátkami. Někdy může při blokaci dojít k zablokování i stanovovaných antigenů, což je nežádoucí a pro správnou detekci je nutné antigeny znovu odhalit pomocí roztoku neiontových detergentů (například: Triton X-100 nebo Tween 20). Tato činidla ale mohou způsobit ztrátu sledovaného antigenu elucí z membrány, v případech některých proteinů mohou ztráty dosahovat 80 až 90 %. Blokační činidlo a podmínky blokace je tedy vždy nutné optimalizovat podle typu použité membrány, stanovovaného antigenu a citlivosti detekčního systému [64]. Ke zviditelnění vzniklého

imunokomplexu (analyt-primární protilátka) se používá značený konjugát se specifitou k použité primární protilátce. Pokud je k detekci využíván konjugát značený enzymem, je barevná reakce vyvolána přidáním vhodného substrátu a chromogenu. Důležitým bodem celého postupu jsou promývací kroky, které se vkládají vždy mezi jednotlivé inkubace. Celý proces je závislý na několika různých faktorech, a proto je pro konkrétní vzorky nutné je optimalizovat [75, 77].

Pro detekci bílkovin navázaných na membránu mohou být mimo protilátky značené enzymy použity například i organická barviva (amido čern), fluorescenční značky (fluoreskamin, kumarin) i koloidní částice kovů (zlato, stříbro, měď, železo). Při detekci pomocí kovových částic se využívá jejich schopnosti vázat se na bílkovinné částice a zároveň tvořit barevné komplexy s některými chelatotvornými činidly [61].

1.5.2.1 Využití metody dotblot v posledních letech

Jak už bylo zmíněno v předchozím textu, metoda dotblot je využívána především při screeningu, k čemuž výrazně přispívá její snadné provedení, ne příliš nákladná instrumentace a možnost relativně rychlého zpracování velkého počtu vzorků. Díky těmto výhodám našel dotblot uplatnění i v jiných než klinických laboratořích, příklady tohoto využití jsou popsány v následujícím textu.

V oblasti jižní a jihovýchodní Asie byla tato metoda v roce 2017 využita M. S. H. Sumem a kol. ke screeningu virové nákazy rýže, která vede ke značnému snížení produkce této plodiny. Běžně se tato infekce stanovuje posuzováním symptomů, což poměrně často vede ke špatnému určení choroby nebo k záměně s nepatogenními poruchami, takové určení není tedy dostatečně spolehlivé. Naopak velice spolehlivě je přítomnost patogenních virů prokázána pomocí metod molekulární biologie (například RT-PCR), které ale nejsou z časových a ekonomických důvodů nejvýhodnější pro zpracování velkého množství vzorků. Výsledky studie popisují velmi dobrou shodu získaných výsledků metodou dotblot ve srovnání s PCR a navrhuje možnost využití dotblotu, jako rychlého testu k vyčlenění nakažených vzorků, které mohou být dále analyzovány [78].

Metoda dotblot má své uplatnění i při zjišťování bakteriální kontaminace potravin. M. Singh a kol. z Indie vyvinuly v roce 2017 test na principu dotblotu pro screening stafylokokového enterotoxinu-A v různých potravinářských matricích. I v tomto případě bylo dosaženo vysoké specifity a citlivosti ve srovnání s metodou PCR. Testování bylo prokazatelně rychlejší než doposud používaná metoda ELISA [79]. Možnost dalšího využití

této metody v potravinářství může demonstrovat i italská studie z roku 2013 F. Cecchiniho a kol., která popisuje dotblot test pro rychlé stanovení *Brettanomyces bruxellensis* v červeném víně. Jedná se o kvasinku, která působí kažení vína. Znovu bylo dosaženo shody s referenční metodou PCR [80].

Případ využití dotblotu pro analýzu bílkovin ve vzorcích, které nemají primárně biologickou povahu, dobře demonstuje široký mezioborový potenciál této metody. Příkladem je stanovení obsahu kaseinu ve vzorcích barev z uměleckých děl, které popsala ve své práci v roce 2017 C. Cattó a kol. Nejčastěji se pro analýzu bílkovin v uměleckých dílech využívají chromatografické nebo spektroskopické metody. Nevýhody těchto metod tkví především v nutné komplexní úpravě vzorku před analýzou, drahé vybavení a v neposlední řadě i vysokou úroveň znalostí. Tyto instrumentálně analytické metody také neposkytují informaci o biologickém původu bílkoviny. Při použití imunochemické detekce bylo možné provést analýzu komplexního vzorku, který byl před samotnou analýzou pouze minimálně upraven. Interpretace výsledků byla také velmi jednoduchá. Dokonce byly odstraněny problémy s detekcí kvůli strukturálním změnám bílkovin, které vznikají jejich stárnutím [81].

Jako příklad neobvyklého využití dotblotu v klinické diagnostice může být uvedena studie z roku 2013 P. Rodriguez-Rodrigueze a kol., jejíž autoři zavedli tuto metodu pro stanovení a kvantifikaci kolagenu ve vzorcích kolagenu ve tkáňových homogenizátech získaných z potkanů nebo částečně hydrolyzovaného kolagenu získaného extrakcí hydroxidem sodným. Také se jim podařilo detekovat rozdíly v obsahu kolagenu ve vzorcích získaných od potkanů trpících hypertenzí se vzorky zvířat s normálním tlakem krve. Ke stanovení byl použit analogický postup jako při klasickém dotblotu. Kolagen ze vzorků byl imobilizován na PVDF membráně, na které probíhala detekce. V tomto případě nebyly ke zviditelnění analytu použity specifické protilátky, ale specifické barvivo Siriusová červeň, které je pro stanovení kolagenu běžně využíváno. Ve srovnání s klasickou metodou, založenou na detekci hydroxyprolinu, tento postup vyžaduje mnohem menší objemy vzorku, minimální objemy činidel a je časově méně náročný. Výsledky obou metod byly srovnatelné [82].

V roce 2014 byla dotblotová technika doporučena pro screening časného stádia syfilis skupinou vědců tvořenou M. B. Rayevem, M. S. Bochkovou a P. V. Khramtsovem. Jako antigen imobilizovaný na membráně, byl použit protein p17 z původce tohoto onemocnění *Tremonema pallidum* a byla vyšetřována přítomnost protilátek proti tomuto proteinu v patientském séru. U tohoto systému byla zjištěna vyšší citlivost stanovení pro časný stádium syfilis než u tradičně využívaného precipitačního stanovení přítomnosti

protilátek v séru, kdy se jako antigen využívá kardiolipin [83]. Podobných výsledků bylo dosaženo i v práci S. A. Patila a kol. (2013) při testování přítomnosti protilátek proti *Mycobacterium tuberculosis* v cerebrospinální tekutině u nemocných s tuberkulosní meningitidou. Mykobakteriální antigeny byly v tomto případě získány usmrcením kmene *Mycobacterium tuberculosis* ozařováním a následnou homogenizací buněk sonikací [84]. Obě studie byly zaměřeny především na vývoj jednoduché, rychlé a robustní metody, která by mohla být bez problému prováděna v omezených laboratorních podmínkách s nutností minimálních znalostí vyšetřujícího personálu v rozvojových zemích s vysokým výskytem těchto onemocnění.

Formát dotblot analýzy může být využit i v oblasti molekulárně-biologické diagnostiky. V základním uspořádání jsou na membránu navázány produkty PCR amplifikace, které poté hybridizují se specifickými značenými sondami. V případech velkého počtu vyšetřovaných alel nemusí docházet ke správnému navazování sond. Pro tento případ je vhodné na membránu imobilizovat jednotlivé značené oligonukleotidové sondy, které jsou následně inkubovány s vyšetřovaným PCR produktem [85]. Toto uspořádání je nazýváno reverzní dotblot a je s výhodou využíváno pro genotypizaci chorob způsobených rozmanitým spektrem mutací jako je cystická fibróza nebo talasemie [86].

1.5.2.2 Afinitní dotblot

V případě, kdy nepotřebujeme znát číselnou hodnotu afinitní konstanty používaných protilátek, ale chceme si jen ověřit, které klony protilátek skutečně reagují s vybraným antigenem, je možné využít techniky afinitního dotblotu. Tato metoda je založena na principu dotblotu kombinovaného s modifikovaným ELISA testem využívajícího chaotropní činidlo pro stanovení aviditního a nebo afinitního indexu protilátek. Na blotovací membráně (například PVDF), která představuje pevnou fázi, dochází k postupné tvorbě imunokomplexů. Vzorky jsou na membránu nanášeny za pomoci vaku a aparatury stejně, jak již bylo popsáno v kapitole 1.5.2. Membrána s nanesenými vzorky je nejprve zablokována, nejčastěji za použití roztoku BSA a následně je inkubována s roztokem vhodně naředěné testované protilátky nebo s vhodně naředěným testovaným sérem. Během tohoto kroku dojde k vytvoření imunokomplexů, které jsou následně inkubovány s řadou roztoků chaotropního činidla (thiokyanátu amonného) o vzrůstající molaritě (v rozmezí molarit 0 až 2 mol.l⁻¹). Míra odolnosti imunokomplexů vůči působení chaotropního činidla koreluje s afinitním nebo aviditním indexem testovaných protilátek. Platí tedy, že čím vyšší koncentraci roztoku

chaotropního činidla přítomné imunokomplexy odolaly, tím vyšší je aviditní (afinitní) index testovaných protilátek. K detekci přítomnosti imunokomplexů se využívá navázání enzymaticky značeného konjugátu a po přidání směsi substrátu s chromogenem dojde ke zbarvení skvrn s imunokomplexy [87].

Poprvé byla tato metoda využita v roce 2013 Z. Svobodovou a kol. pro srovnání avidit osmi klonů komerčně dostupných monoklonálních protilátek se specifitou proti adhezivní molekule epiteliálních buněk (EpCAM - epithelial cell adhesion molecule). Vybrané protilátky, vyhovující požadavkům, byly následně využity pro přípravu magnetického imunosorbentu pro zachycení cirkulujících nádorových buněk [87]. V následujícím roce B. Jankovičová a kol. použila metodu afinitního dotblotu k ověření čtyř komerčně dodávaných monoklonálních protilátek proti Tau proteinu. Tyto protilátky byly, podobně jako v předchozím případě, využity k přípravě magnetického imunosorbentu, který sloužil k separaci Tau proteinu ze séra a mozkomíšního moku [88]. Imunomagnetickou separací bakteriálních buněk ze vzorku ve své práci z roku 2013 popsala J. Kučerová a kol. V práci byla dotblot metoda použita k výběru vhodných protilátek a také ke zjištění zkřížené reaktivity s jinými bakteriemi [89].

2 Cíle diplomové práce

Hlavním cílem této diplomové práce je otestovat prototyp zařízení pro paralelní porovnání vlastností protilátek, zejména z hlediska afinity/avidity, koncentrace, specifické vazby na antigen a zkřížené reaktivity. Očekáváme, že testované zařízení přinese oproti standardně prováděné dotblot analýze, ze které vychází, výhody vedoucí k celkovému urychlení a zjednodušení práce.

Pro získání optimálního pracovního postupu, ředění detekčních protilátek a koncentrací chaotropního činidla bude nejprve provedeno testování na zvoleném modelovém systému chymotrypsin a anti-chymotrypsinové prasečí sérum metodou dotblot. Provede se otestování prototypu s barevným roztokem methylované, abychom vyloučili protékání aparatury a mísení obsahu jednotlivých jamek mezi sebou. Teprve poté bude zařízení použito pro práci s modelovým systémem. Výsledky získané na novém prototypu budou následně ověřeny pomocí standardních metod afinitního dotblotu a ELISA metodou. Poté plánujeme přejít od modelového systému k práci s dalšími systémy Ag a Ab. K dispozici jsou protilátky proti rekombinantním proteinům ApoE a EpCAM a protilátky proti různým bakteriálním antigenům vyskytujícím se na povrchu *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* či *Escherichia coli*.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam chemikálií, přístrojů a pomůcek

3.1.1 Chemikálie:

- Chlorid sodný (NaCl; Lachema, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl; Penta, Chrudim, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄; Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Na₂HPO₄ × 12 H₂O; Penta, Chrudim, ČR)
- Uhličitan sodný dekahydrát (Na₂CO₃ × 10 H₂O; Lachema, Neratovice, ČR)
- Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃; Penta, Chrudim, ČR)
- Peroxid vodíku (H₂O₂; Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina sírová (H₂SO₄; Lachema, Neratovice, ČR)
- Thiokyanatan amonný (NH₄SCN; Penta, Chrudim, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glutaraldehyd solution (50% v H₂O; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA ≥ 96%, Cat: A7906; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- *O*-phenylendiamin (≥ 98%, Cat: P9029; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Metanol (Penta, Chrudim, ČR)

3.1.2 Speciální chemikálie:

- α-chymotrypsin, z hovězího pankreatu (Cat: C4129; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lidský ApoE 3 (Cat: ABIN573259; BioVision, Milpitas, CA, USA)
- Rekombinantní lidský EpCAM (Cat: 10694-H08H; Sino Biological, Peking, Čína)
- Hyperimunní prasečí sérum, anti-chymotrypsin IgG
- Hyperimunní beraní sérum anti-chymotrypsin IgG
- Monoklonální myší anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)
- Polyklonální králičí anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)
- HEA 125, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: BK61004-N; Progen, Heidelberg, Německo)

- C10, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: B1610; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)
- 323/A3, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: A0510; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)
- Králičí protilátky anti-*Salmonella* sp. (Cat: 0701; ViroStat, Portland, ME, USA)
- Protilátky anti-*Salmonella* sp. (Cat: 6321; ViroStat, Portland, ME, USA)
- Kozí protilátky anti-*Salmonella* CSA-1, afinitně čištěné (Cat: 01-91-99; KPL, Gaithersburg, MD, USA)
- Myší monoklonální protilátky anti-*Salmonella* (Cat: MBS531315; MyBioSource, San Diego, CA, USA)
- Protilátky anti-*Salmonella* HRP (Cat: MBS 536004; MyBioSource, San Diego, CA, USA)
- Protilátky anti-*Listeria monocytogenes* (Cat: PA1-30487; Invitrogen, Rockford, IL, USA)
- Králičí protilátky anti-*Listeria* spp. (Cat: 4201; ViroStat, Portland, ME, USA)
- Monoklonální protilátky anti-*L. monocytogenes* (Cat: 3L1MabLZH1; HyTest Ltd., Turku, Finsko)
- Králičí protilátky anti-*Escherichia coli* (Cat: 1001; ViroStat, Portland, ME, USA)
- Polyklonální protilátky anti-*E. coli* serotyp O157 (Cat: PA1-30486; Invitrogen, Rockford, IL, USA)
- Králičí anti-prasečí IgG – značené HRP (Cat: A5670, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Anti-ovčí IgG – značené HRP, (Cat: A0510, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-myší IgG – značené HRP (Cat: A5278; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-králičí IgG – značené HRP (Cat: A8275, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Králičí anti-kozí IgG – značené HRP (Cat: A5420; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Opti-4CNTM Substrate Kit (Cat: 170-8235; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

3.1.3 Přístroje a pomůcky:

- pH metr BOECO BT-600 (BOECO, Hamburg, Německo)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbHG, Göttingen, Německo)
- Stanice na výrobu redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Termostat Biological Thermostat BT 120 M (Laboratorní přístroje Praha, Praha, ČR)
- Vertikální spektrofotometr na měření mikrotitračních destiček Labsystem s Multiscan RC a software Genesis (Labexchange, Burladingen, Německo)
- Immun-Blot™ PVDF Membrane for Protein Blotting, 0,2 μm, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Aparatura Dot-Blot Hybridization Manifold 96 unit (Scie-Plas Ltd., Cambridge, UK)
- Membránová vakuová pumpa a kompresor model 22AN (KNF Neuberger, Inc., Trenton, NJ, USA)
- Orbitální třepačka Grant Bio PMS 1000 Microplate Shaker (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- Fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ Systém s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Prototyp 1 a 2

3.2 Použité metody

3.2.1 Dotblot

Použité chemikálie:

- Chlorid sodný (NaCl; Lachema, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl; Penta, Chrudim, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄; Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Na₂HPO₄ × 12 H₂O; Penta, Chrudim, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA ≥ 96%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Metanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Denaturovaný líh

Použité roztoky:

- Roztok pro ředění konjugátů a promývací roztok: PBS-T pH 7,4 (PB + 0,05% Tween 20 (v/v) + 0,4% NaCl (w/v))
- Roztok pro ředění antigenů a ekvilibrační roztok: fosfátový pufr (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹)
- Blokační roztok: 5% BSA v PBS-T (pH 7,4)
- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,25% BSA v PBS-T (pH 7,4)
- Detekční roztok: Opti-4CN™ Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) obsahující Opti-4CN substrate a Opti-4CN diluent concentrate

Používané antigeny: α -chymotrypsin, z hovězího pankreatu (Cat: C4129; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Testovaná primární protilátka: hyperimunní prasečí sérum, anti-chymotrypsin IgG

Použitý konjugát: Králičí anti-prasečí IgG – značené HRP (Cat: A5670, Sigma-Aldrich, St. Louis,

Postup:

PVDF membrána je ostřížena tak, aby úplně zakrývala všechny jamky na středním dílu aparatury znázorněné na obrázku 10. Po dosažení požadovaného tvaru je membrána ponechána 3 minuty ekvilibrovat v metanolu. Po uplynutí doby ekvibrace je přenesena na aparaturu pro dotblot a upevněna mezi střední a horní díl aparatury. Celá aparatura je dobře utažena pomocí šroubů. Následně je k aparatuře, přes vývod ve spodní části, připojena vakuová pumpa. Za chodu vakua jsou jamky ekvilibrovány 100 μ l fosfátového pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹). Po úplném odsátí roztoku ze všech jamek je dávkováno 100 μ l roztoku antigenu, vhodně naředěného ve fosfátovém pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹) dle dávkovacího schématu. Po úplném odsátí nadávkovaných roztoků se za chodu vakua povolí šrouby aparatury a odklopí se horní díl. Poté je možno opatrně pomocí pinzety uchopit membránu a položit ji na savý ubrousek, kde ji necháme při laboratorní teplotě uschnout. Teprve poté vypneme vakuum. Jakmile je membrána úplně suchá (do podoby křídového papíru) je možné ji podle potřeby rozstříhat na menší části. Následuje blokace, kdy je membrána umístěna na Petriho misku (velikosti dle potřeby), převrstvena blokačním roztokem. Inkubace trvá 1 h při laboratorní teplotě na orbitální třepačce. Po uplynutí doby inkubace se blokační roztok slije a membrána je 3 \times promyta dostatečným množstvím PBS-T (pH 7,4). Následně je na membránu aplikován roztok primární protilátky ředěné 1:1000; 1:2000; 1:3000 a 1:5000 roztokem pro ředění primárních protilátek a 1 h inkubována při laboratorní teplotě na orbitální

třepače. Roztok primární protilátky se slije a membrána je tentokrát promyta 3× promývacím roztokem (stejně jako při promytí po blokaci) a potom 3× 5 min na orbitální třepače. Následuje hodinová inkubace s konjugátem ředěným 1:8000 PBS-T (pH 7,4), po jejímž uplynutí je provedeno stejné promytí jako po primární protilátce. Pro zviditelnění imunokomplexů na povrchu membrány je připraven detekční roztok, který je složen z ředícího roztoku připraveného z 1 dílu Opti-4CN diluent concentrate a 9 dílů redestilované vody. K ředícímu roztoku je bezprostředně před aplikací na membránu přidáno poměrné množství Opti-4CN substrate (v poměru 0,2 ml Opti-4CN substrate na 10 ml ředícího roztoku). Po přelití membrány detekčním roztokem se membrána nechá 5-15 min inkubovat (při laboratorní teplotě na orbitální třepače) dokud není dosaženo požadovaného šedo-fialového zbarvení skvrn. Po opláchnutí destilovanou vodou se membrána nechá uschnout a je vyfocena za pomoci fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS System přes software Image Lab™, kde je provedeno i denzitometrické vyhodnocení.

3.2.2 Afinitní dotblot

Metoda afinitního dotblotu vychází z metody dotblot, jejíž postup, použité roztoky a chemikálie jsou uvedeny v kapitole 3.2.1. Zde jsou uvedeny pouze roztoky nebo chemikálie, které jsou navíc.

Použité chaotorpní činidlo: thiokyanatan amonný (NH₄SCN; Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky: roztoky NH₄SCN o koncentracích: 0,5; 1; 1,5; 2; 3 a 4 ve fosfátovém pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹)

Používané antigeny:

- α-chymotrypsin, z hovězího pankreatu (Cat: C4129; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lidský ApoE 3 (Cat: ABIN573259; BioVision, Milpitas, CA, USA)

Testované primární protilátky:

- Hyperimunní prasečí sérum, anti-chymotrypsin IgG
- Hyperimunní beraní sérum anti-chymotrypsin IgG
- Monoklonální myší anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)
- Polyklonální králičí anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)

Použité konjugáty:

- Králičí anti-prasečí IgG – značené HRP (Cat: A5670, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Anti-ovčí IgG – značené HRP, (Cat: A0510, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-myší IgG – značené HRP (Cat: A5278; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-králičí IgG – značené HRP (Cat: A8275, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

Při afinitním dotblotu je postupováno stejně jako u metody dotblot pouze s tím rozdílem, že po promytí po primární protilátce je PVDF membrána vystavena působení různých koncentrací chaotropního činidla a až poté probíhá inkubace s konjugátem.

Jakmile je membrána po inkubaci s primární protilátkou promyta, je rozstříhána na malé čtverce (co čtverec to jamka). Každý kousek membrány se umístí do samostatné komory dělené misky, kde probíhá inkubace s NH_4SCN (5 min, laboratorní teplota, orbitální třepačka). Při dávkování jednotlivých roztoků chaotropního činidla NH_4SCN na membrány je potřeba postupovat svižně, aby se minimalizovaly časové prodlevy a stanovení bylo co nejpřesnější. Po uplynutí doby inkubace je postupováno v odsávání roztoků NH_4SCN ve stejném sledu, jako byl dávkován. Následuje promytí membrán dostatečným množstvím PBS-T (pH 7,4) 3× rychle po sobě a ještě 3× s 5 minutovými dobami inkubace. Další postup je totožný jako u metody dotblot. Po inkubaci s konjugátem a promytí následuje detekce (kap. 3.2.1).

3.2.3 ELISA s chaotropním činidlem

Použité chemikálie:

- Chlorid sodný (NaCl ; Lachema, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl ; Penta, Chrudim, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 ; Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; Penta, Chrudim, ČR)
- Uhličitan sodný dekahydrát ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$; Lachema, Neratovice, ČR)
- Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3 ; Penta, Chrudim, ČR)

- Peroxid vodíku (H_2O_2 ; Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina sírová (H_2SO_4 ; Lachema, Neratovice, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glutaraldehyd solution (50% v H_2O , Lot: BCBS2471V; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA \geq 96%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- *O*-phenylendiamin (\geq 98%, Cat: P9029; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Metanol (Penta, Chrudim, ČR)

Použité chaotorpní činidlo: thiokyanatan amonný (NH_4SCN ; Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- PBS pH 7,4 (PB + 0,4% NaCl (w/v))
- Sodnodraselný fosfátový pufr (pH 6,2; $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)
- Promývací roztok: destilovaná voda
- 2,5% glutaraldehyd v uhličitanovém pufru pH 9,49
- Blokační roztok: 1% BSA v PBS (pH 7,4)
- Roztok pro ředění sér: PBS (pH 7,4) s 0,05% Tween 20 a 0,1% BSA
- Roztoky NH_4SCN v sodnodraselném fosfátovém pufru (pH 6,2; $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) o koncentracích: 0,5; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5; 3 a $3,5 \text{ mol.l}^{-1}$
- Roztok pro ředění konjugátu: uhličitanový pufr (pH 9,49) s 0,05% Tween 20 a 0,1% BSA
- Substrátový roztok: sodnodraselný fosfátový pufr (pH 6,2) s H_2O_2 (5 μl 30% H_2O_2 na 10 ml roztoku) + 5 mg *o*-phenylendiamin (na 10 ml roztoku)
- Roztok H_2SO_4 o koncentraci 1 mol.l^{-1}

Postup:

Do každé jamky mikrotitrační destičky typu P je napipetováno 150 μl 2,5% roztoku glutaraldehydu v uhličitanovém pufru (pH 9,49) a destička se 2 h inkubuje při laboratorní teplotě. Poté je obsah jamek vyklepnut a podle zvoleného dávkovacího schématu je dávkováno 150 μl roztoku antigenu na jamku. Inkubace probíhá při 4 °C minimálně 20 h (maximálně však 5 dní). Po navázání antigenu je destička vyklepnuta a 3 \times promyta destilovanou vodou. Nezaregované aldehydické skupiny na povrchu jamek mikrotitrační destičky jsou blokovány napipetováním 150 μl blokačního roztoku na jamku. Blokace probíhá po dobu 1 h při teplotě 37 °C. Po blokaci je destička vyklepnuta a podle zvoleného

dávkovacího schématu jsou do jamek nadávkována vhodně naředěná testovaná séra v objemu 100 μl na jamku. Znovu následuje inkubace 1 h při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby inkubace je obsah destičky vyklepnut a jamky jsou 1 \times promyty destilovanou vodou. Podle dávkovacího schématu je do jamek postupně vícekanálovou pipetou nadávkováno 100 μl roztoků chaotropního činidla NH_4SCN v sodnodraselném fosfátovém pufru (pH 6,2; 0,1 mol.l^{-1}) o zvolených koncentracích. U tohoto kroku je při pipetování nutné postupovat rychle, aby se minimalizovaly prodlevy mezi dávkováním různých koncentrací chaotropního činidla. Po inkubaci 15 min při teplotě 37 °C je obsah jamek znovu vyklepnut a destička je 5 \times promyta destilovanou vodou. Do všech jamek je napipetováno 100 μl zvoleného a vhodně naředěného konjugátu (roztokem pro ředění konjugátu) a destička je ponechána inkubovat 1 h při 37 °C. Po inkubaci je obsah destičky vyklepnut a jamky jsou 5 \times promyty destilovanou vodou. Těsně před aplikací je připraven substrátový roztok, který je po 100 μl napipetován do jamek. Barevná reakce probíhá 15 min ve tmě při teplotě 37 °C. Reakce je zastavena přidáním 50 μl roztoku H_2SO_4 o koncentraci 1 mol.l^{-1} . Na spektrofotometru pro čtení mikrotitračních destiček jsou změřeny absorbance obsahů jamek při 492 nm. Naměřená data jsou vyhodnocena a graficky zpracována.

3.2.4 Stanovení citlivosti a zkřížené reaktivity na prototypu 1 a 2

Použité chemikálie:

- Chlorid sodný (NaCl ; Lachema, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl ; Penta, Chrudim, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 ; Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; Penta, Chrudim, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA $\geq 96\%$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Metanol (Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky:

- Roztok pro ředění konjugátů a promývací roztok: PBS-T pH 7,4 (PB + 0,05% Tween 20 (v/v) + 0,4% NaCl (w/v))
- Roztok pro ředění antigenů a ekvilibrační roztok: fosfátový pufr pH 7,3 (10 mmol.l^{-1})
- Blokační roztok: 5% BSA v PBS-T (pH 7,4)

- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,25% BSA v PBS-T (pH 7,4)
- Detekční roztok: Opti-4CN™ Substrate Kit (Lot: 170-8235; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) obsahující Opti-4CN substrate a Opti-4CN diluent concentrate

Používané antigeny:

- α -chymotrypsin, z hovězího pankreatu (Cat: C4129; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lidský ApoE 3 (Cat: ABIN573259; BioVision, Milpitas, CA, USA)
- Rekombinantní lidský EpCAM (Cat: 10694-H08H; Sino Biological, Peking, Čína)

Testované primární protilátky:

- Hyperimunní prasečí sérum, anti-chymotrypsin IgG
- Hyperimunní beraní sérum anti-chymotrypsin IgG
- Monoklonální myší anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)
- Polyklonální králičí anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)
- HEA 125, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: BK61004-N; Progen, Heidelberg, Německo)
- C10, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: B1610; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)
- 323/A3, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: A0510; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)

Použité konjugáty:

- Králičí anti-prasečí IgG – značené HRP (Cat: A5670, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Anti-ovčí IgG – značené HRP, (Cat: A0510, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-myší IgG – značené HRP (Cat: A5278; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-králičí IgG – značené HRP (Cat: A8275, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

PVDF membrána se zastříhne na požadovaný tvar a ponechá se ekvilibrovat 3 min v metanolu. Poté je umístěna do aparatury, kde probíhá téměř celá analýza kromě posledního

detekčního kroku. Ekvilibrace membrány fosfátovým pufrům (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹) se provádí nadávkováním 1 ml pufru na 5 jamek se zapnutým spodním odtahem. Při zapnutém spodním odtahu je také dávkováno 2× 50 µl zvoleného roztoku antigenu do každé jamky. Po odtažení roztoků ze všech jamek je vypnuto vakuum a je nadávkován blokační roztok (1 ml na jednu řadu jamek). Inkubace probíhá 1 h při laboratorní teplotě. Blokační roztok je odtažen zapnutím vakua horním odtahem přes mikrofluidní kanály. Membrána je 3× promyta PBS-T pufrům (pH 7,4) postupným dávkováním a odsáváním 1 ml pufru na jednu řadu. Při vypnutém vakuu je nadávkován roztok vhodně naředěné primární protilátky (v množství 1 ml na jednu řadu), inkubace probíhá 1 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace je roztok odtažen horním odtahem a následuje promytí PBS-T pufrům (pH 7,4) 3× rychle po sobě a ještě 3× s 5 minutovými dobami inkubace. Roztok zvoleného a vhodně naředěného konjugátu je dávkován při vypnutém vakuu (v množství 1 ml na jednu řadu). Po 1 h inkubace za laboratorní teploty je roztok konjugátu odsát horním odtahem a membrána je promyta stejným způsobem jako po primární protilátce. Za chodu vakua je membrána vyjmuta z aparatury, položena na savý ubrousek pro odstranění zbytků roztoku a přenesena na Petriho misku, kde probíhá detekce pomocí Opti-4CNTM Substrate Kit (příprava detekčního roztoku byla popsána v kap. 3.2.1). Membrána převrstvena detekčním roztokem je vyvíjena 5 až 15 min při laboratorní teplotě na orbitální třepače dokud skvrny nemají požadované šedo-fialové zbarvení. Pro odstranění zbytků detekčního roztoku je membrána opláchnuta destilovanou vodou a po úplném vyschnutí je vyfocena ve fotografovací stanici ChemiDocTM XRS Systém za pomoci softwaru Image LabTM, kde je provedeno i denzitometrické vyhodnocení analogicky jako u metody dotblot.

V průběhu testování zařízení se systémem chymotrypsin a anti-chymotrypsinové protilátky bylo zjištěno, že promytí může být zkráceno. Membrána je po blokaci promyta dávkováním 1 ml PBS-T (pH 7,4) na 5 jamek 3× ihned za sebou, po primární protilátce 6× ihned za sebou a po konjugátu také 6× za sebou (se stejným dávkováním jako po blokaci). Po vyjmutí z aparatury je pak membrána na Petriho misce převrstvena dostatečným množstvím PBS-T (pH 7,4) a 5 min promývána za laboratorní teploty na orbitální třepače.

3.2.5 Porovnání vlastností protilátek na prototypu 2

Pro porovnání afinity/avidity protilátek se využívá stanovení v afinitním uspořádání, které vychází z postupu uvedeného v kap. 3.2.4.

Použité chaotropní činidlo: thiokyanatan amonný (NH₄SCN; Penta, Chrudim, ČR)

Použité roztoky: roztoky NH₄SCN ve fosfátovém pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹) o koncentracích: 0,5; 1; 1,5 a 2 mol.l⁻¹

Používané antigeny:

- α -chymotrypsin, z hovězího pankreatu (Cat: C4129; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lidský ApoE 3 (Cat: ABIN573259; BioVision, Milpitas, CA, USA)
- Rekombinantní lidský EpCAM (Cat: 10694-H08H; Sino Biological, Peking, Čína)

Testované primární protilátky:

- Hyperimunní prasečí sérum, anti-chymotrypsin IgG
- Hyperimunní beraní sérum anti-chymotrypsin IgG
- Monoklonální myší anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)
- Polyklonální králičí anti-ApoE3 IgG (Moravian Biotechnology, Brno, ČR)
- HEA 125, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: BK61004-N; Progen, Heidelberg, Německo)
- C10, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: B1610; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)
- 323/A3, monoklonální myší anti-EpCAM IgG1 (Cat: A0510; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)

Použité konjugáty:

- Králičí anti-prasečí IgG – značené HRP (Cat: A5670, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Anti-ovčí IgG – značené HRP, (Cat: A0510, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-myší IgG – značené HRP (Cat: A5278; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-králičí IgG – značené HRP (Cat: A8275, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

Pracovní postup porovnání avidity/afinity protilátek je analogický jako postup, který je popsán v kap. 3.2.4. Podobně jako u metody afinitní dot blot (kap. 3.2.2) je zde po promytí po inkubaci s primární protilátkou zařazena 5 minutová inkubace se zvolenou koncentrační řadou roztoků NH_4SCN (dávkuje se 1 ml jednotlivých roztoků chaotropního činidla na jednu řadu). Pro aplikaci roztoků chaotropního činidla je nutné za chodu vakua přenastavit horní dávkovací díl aparatury, při dávkování roztoků je však vakuum vypnuto. Po uplynutí inkubační doby jsou roztoky odsáty horním odtahem přes mikrofluidní kanálky a je provedeno promytí dávkováním 1 ml PBS-T (pH 7,4) na jednu řadu $5\times$ ihned za sebou. Před aplikací roztoku konjugátu je nutné horní dávkovací díl při zapnutém vakuu upravit zpět. Následná inkubace s konjugátem a detekce probíhá stejně, jako je popsáno v kapitole 3.2.4.

3.2.6 Postup pro práci s bakteriálními buňkami na prototypu 2**Použité chemikálie:**

- Chlorid sodný (NaCl ; Lachema, Neratovice, ČR)
- Chlorid draselný (KCl ; Penta, Chrudim, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 ; Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; Penta, Chrudim, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin, frakce V ($\text{BSA} \geq 96\%$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Metanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ajatin PLUS (1% roztok; Profarma-Produkt, Jablonec nad Nisou, ČR)

Použité roztoky:

- Roztok pro ředění konjugátů a promývací roztok: PBS-T pH 7,4 (PB + 0,05% Tween 20 (v/v) + 0,4% NaCl (w/v))
- Roztok pro přípravu suspenze bakteriálních buněk: PBS pufr (pH 7,4)
- Blokační roztok: 5% BSA v PBS-T (pH 7,4)
- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,25% BSA v PBS-T (pH 7,4)
- Roztok pro ředění NH_4SCN : fosfátový pufr (pH 7,3; 10mmol.l^{-1})

- Roztoky NH₄SCN ve fosfátovém pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹) o koncentracích: 0,5; 1 a 1,5 mol.l⁻¹
- Detekční roztok: Opti-4CN™ Substrate Kit (Lot: 170-8235; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) obsahující Opti-4CN substrate a Opti-4CN diluent concentrate
- 20% roztok denaturovaného lihu

Používané mikroorganismy:

- *Salmonella* Typhimurium
- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- *Bacillus cereus*

Testované primární protilátky:

- Králičí protilátky anti-*Salmonella* sp. (Cat: 0701; ViroStat, Portland, ME, USA)
 - polyklonální Ab; produkční organismus: králik; specifita k: O a H Ag *Salmonella* sp.; skladováno v: lednice (2014)
- Protilátky anti-*Salmonella* sp. (Cat: 6321; ViroStat, Portland, ME, USA)
 - monoklonální Ab; produkční organismus: myš; specifita k: flagelární protein *Salmonella* sp.; skladováno v: lednice (2014)
- Kozí protilátky anti-*Salmonella* CSA-1, afinitně čištěné (Cat: 01-91-99; KPL, Gaithersburg, MD, USA)
 - polyklonální Ab; produkční organismus: koza; specifita k: společné strukturální Ag (CSA) *Salmonella* sp., sérotypy skupiny A, B, C, D, E; skladováno v: lednice (2018)
- Myší monoklonální protilátky anti-*Salmonella* (Cat: MBS531315; MyBioSource, San Diego, CA, USA)
 - monoklonální Ab; produkční organismus: myš; specifita k: *Salmonellae*; skladováno v: mrazák (2015)
- Protilátky anti-*Salmonella* HRP (Cat: MBS 536004; MyBioSource, San Diego, CA, USA)
 - polyklonální Ab; produkční organismus: králik; specifita k: O a H Ag *Salmonella* sp.; skladováno v: mrazák (2013)
- Protilátky anti-*Listeria monocytogenes* (Cat: PA1-30487; Invitrogen, Rockford, IL, USA)

- polyklonální Ab; produkční organismus: králík; specifita k: *Listeria monocytogenes*; skladováno v: lednice (2017)
- Králičí protilátky anti-*Listeria* spp. (Cat: 4201; ViroStat, Portland, ME, USA)
 - polyklonální Ab; produkční organismus: králík; specifita k: celé buňky *Listeria monocytogenes*; skladováno v: lednice (2017)
- Monoklonální protilátky anti-*L. monocytogenes* (Cat: 3L1MabLZH1; HyTest Ltd., Turku, Finsko)
 - monoklonální Ab; produkční organismus: myš; specifita k: frakce vnější membrány a celé buňky *Listeria monocytogenes*; skladováno v: lednice (2017)
- Králičí protilátky anti-*Escherichia coli* (Cat: 1001; ViroStat, Portland, ME, USA)
 - polyklonální Ab; produkční organismus: králík; specifita k: O a K antigenní sérotypy *Escherichia coli*; skladováno v: lednice (2017)
- Polyklonální protilátky anti-*E. coli* serotyp O157 (Cat: PA1-30486; Invitrogen, Rockford, IL, USA)
 - polyklonální Ab; produkční organismus: koza; specifita k: *Escherichia coli* O157; skladováno v: mrazák (2017)

Použité konjugáty:

- Anti-ovčí IgG – značené HRP, (Cat: A0510, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-myší IgG – značené HRP (Cat: A5278; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kozí anti-králičí IgG – značené HRP (Cat: A8275, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Králičí anti-kozí IgG – značené HRP (Cat: A5420; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité chaotropní činidlo: thiokyanatan amonný (NH₄SCN; Penta, Chrudim, ČR)

Postup:

Nejprve je nutné připravit suspenzi bakteriálních buněk z jednodenní kultury zvoleného mikroorganismu v PBS pufru (pH 7,4) tak, aby podle MacFarlandovy zákalové stupnice odpovídala bodu 1,5. Tato suspenze je před nanesením na membránu podle potřeby naředěna PBS pufrem (pH 7,4). PVDF membrána je ostřížena na požadovaný tvar a je ponechána ekvilibrovat 3 min v metanolu. Poté je umístěna do aparatury prototypu 2,

a je provedena ekvilibrace membrány PBS pufrem (pH 7,4) nadávkováním 1 ml pufru na jednu řadu se zapnutým spodním odtahem. Po ekvilibraci je při zapnutém spodním odtahu dávkováno do každé jamky $2 \times 50 \mu\text{l}$ naředěné suspenze mikrobiálních buněk. Po úplném odsátí suspenze ze všech jamek je vypnuto vakuum a je nadávkován blokační roztok (1 ml na jednu řadu). Inkubace probíhá 1 h při laboratorní teplotě. Blokační roztok je odtažen zapnutím vakua horním odtahem přes mikrofluidní kanály. Membrána je $3 \times$ promyta PBS-T pufrem (pH 7,4) postupným dávkováním a odsáváním 1 ml pufru na jednu řadu. Při vypnutém vakuu je nadávkován roztok vhodně naředěné primární protilátky (v množství 1 ml na 5 jamek) a membrána je ponechána inkubovat 1 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace je roztok odtažen horním odtahem a následuje promytí PBS-T pufrem pH 7,4 $6 \times$ rychle po sobě. Roztoky vhodně naředěných konjugátů jsou dávkovány při vypnutém vakuu (v množství 1 ml na 5 jamek). Po 1 h inkubace za laboratorní teploty jsou roztoky konjugátů odsáty horním odtahem a membrána je promyta stejným způsobem jako po primární protilátce (tedy $6 \times$ PBS-T pufrem, 1 ml na jednu řadu). Za chodu vakua je membrána vyjmuta z aparatury na Petriho misku, kde je ještě jednou 5 min promývána PBS-T pufrem (pH 7,4) při laboratorní teplotě na orbitální třepače. Po promytí je na membránu aplikován detekční roztok složený z Opti-4CNTM Substrate Kit a redestilované vody, jehož příprava byla popsána v kap. 3.2.1. Membrána převrstvena detekčním roztokem je inkubována 5-15 min při laboratorní teplotě na orbitální třepače až dojde k požadovanému šedo-fialovému zbarvení. Pro odstranění zbytků detekčního roztoku je membrána opláchnuta destilovanou vodou a po úplném vyschnutí je vyfocena ve fotografovací stanici ChemiDocTM XRS Systém přes software Image LabTM, kde je provedeno i denzitometrické vyhodnocení. Po ukončení práce jsou všechny nespoteřované suspenze buněk desinfikovány přidáním dostatečného množství 1% roztoku Ajatinu a společně s infikovaným spotřebním materiálem speciálně zlikvidovány podle zásad zacházení s biologickým odpadem. V průběhu práce je nutné dbát na dodržování zásad správné laboratorní praxe a po ukončení práce jsou všechny povrchy a pomůcky řádně vydesinfikovány. Velký důraz je kladen i na dostatečnou desinfekci používaného zařízení. K desinfekci odvodných kanálků a hadiček použit 20% roztok denaturovaného lihu. Pro porovnání afinity nebo avidity testovaných protilátek je použit postup, který již byl popsán v kap. 3.2.5.

4 Výsledky a diskuze

Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, správný výběr protilátky je jedním z klíčových bodů úspěšného vědeckého experimentu. Zejména při rozsáhlých biotechnologických či biomedicínských projektech je opakovatelnost experimentů zcela zásadní a dle posledních poznatků na nich již řada projektů narazila. Než dojde k nápravě a standardizaci prodeje protilátek, je více než vhodné, zkusit otestovat produkty od několika výrobců a vybrat si protilátku s požadovanými parametry.

Níže uvedené výsledky popisují kroky směřující k vývoji metody pro testovaný prototyp, dále aby si ověřili správnost získaných výsledků a abychom je otestovali na různých systémech antigenu a protilátky. Vývoj prototypu probíhal od roku 2015 ve spolupráci Katedry biologických a biochemických věd (UPCE) a Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně. Z důvodu možného podávání patentu na prototyp zde nejsou uvedeny podrobnosti týkající se konstrukce zařízení.

4.1 Porovnání protilátek proti chymotrypsinu

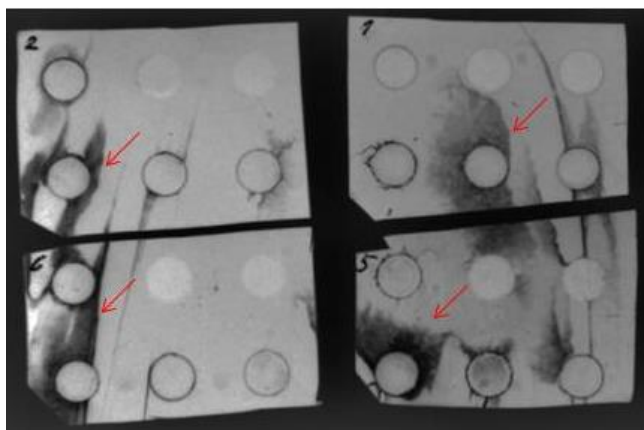
Práce byla zahájena optimalizací pracovního postupu pro dotblot na systému chymotrypsin anti-chymotrypsinové prasečí sérum, aby se získaný protokol následně mohl použít při experimentech na novém prototypu. Jednotlivé dílčí kroky, které vedly k výsledku, jsou uvedeny v kapitole 4.1.1 až 4.1.10.

4.1.1 Optimalizace postupu pro dotblot

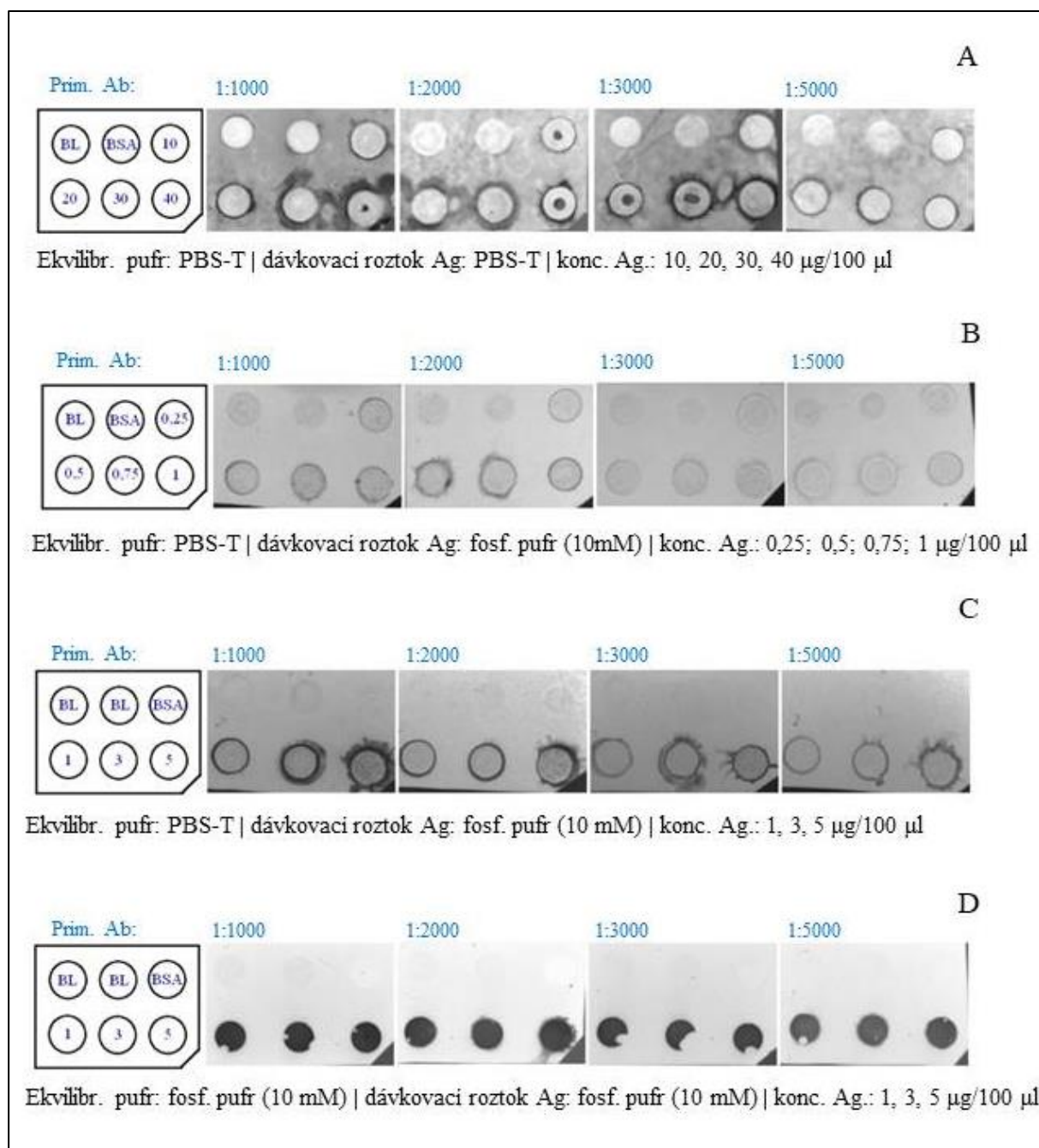
Jak již bylo zmíněno při optimalizaci pracovního postupu metody dotblot pro stanovení chymotrypsinu se vycházelo z běžně využívaného postupu pro dotblot. U zvoleného modelového systému však bylo potřeba změnit několik kroků v zavedeném postupu, abychom na membráně po detekci dosáhly sytě zbarvených šedofialových skvrn. Při použití zavedeného postupu se objevovaly skvrny antigenu především mimo detekční oblast (viz obr. 12A).

Pro dosažení požadovaného výsledku jsme museli provést postupné změny některých parametrů stanovení. Nejprve jsme změnili dávkovací pufr pro antigen z původního PBS-T (pH 7,4) na fosfátový pufr (pH 7,3, 10 mmol.l⁻¹) a snížili koncentrace antigenu. Výsledné membrány jsou zobrazeny na obr. 12B. Tmavé mapy rozpitého antigenu na membráně byly

viditelné v menší míře než v případě původního postupu (obr. 12A). V detekční oblasti, již byly viditelné náznaky skvrn s homogenním zbarvením. Na jejich okrajích se však stále vyskytovaly tmavé, rozpíjející se prstence. Při několikanásobném zvýšení koncentrace antigenu měly získané skvrny podobně světlé zbarvení jako ty předchozí (z porovnání obr. 12B a 12C), naopak rozpíjející se okraje detekčních oblastí byly výraznější. Také jsme zjistili, že se tmavé skvrny antigenu ve větší míře objevují i na rubové straně membrány, která by ve standardním případě neměla být pro antigen propustná (viz obr. 11). Rozhodli jsme se tedy pro úplné vyloučení Tweenu 20 z procesu nanášení antigenu na membránu. Nakonec byl fosfátový pufr (pH 7,3, 10 mmol.l⁻¹) použit nejen jako roztok pro ředění antigenu, ale také jako ekvilibrační roztok. Oproti předchozím pokusům jsme nechali membránu po vytažení z aparatury uschnout na savém materiálu (například papírové ubrousky nebo filtrační papír). Výsledky tohoto experimentu jsou znázorněny na obrázku 12D. Byly získány skvrny s homogenním zbarvením a ostrými okraji, které bylo možné denzitometricky vyhodnotit (viz obr. 12D). Výsledný postup (popsaný v kap. 3.2.1) byl použit u dalších stanovení.



Obr. 11: Rubová strana PVDF membrány při stanovení chymotrypsinu metodou dotblot. Šipkou jsou označeny tmavé skvrny způsobené průsakem Ag přes membránu.; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad).

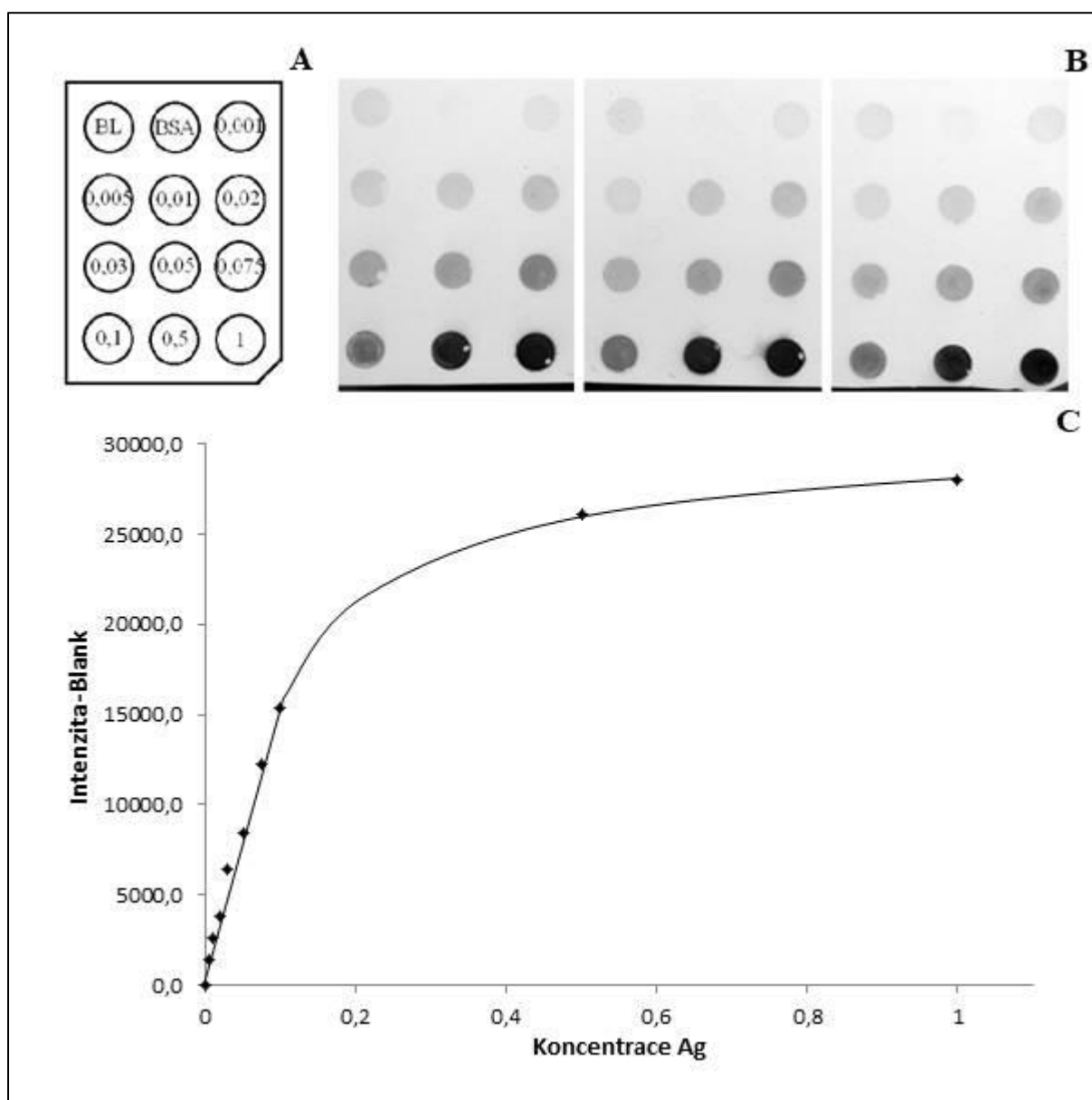


Obr. 12: Znárodnění výsledků optimalizace parametrů pracovního postupu pro stanovení chymotrypsinu metodou dotblot (ekvilibrační pufr, dávkovací roztok Ag, koncentrace Ag, koncentrace primární Ab); A. Výsledné PVDF membrány po použití PBS-T pufru (pH 7,4) k ekvilibraci i k nanášení Ag. V detekční oblasti není viditelné téměř žádné zbarvení. Vysoká intenzita zbarvení pozadí a okolí detekční oblasti.; B. Výsledné PVDF membrány po použití PBS-T pufru (pH 7,4) k ekvilibraci a fosfátového pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹) pro dávkování Ag. Viditelný nižší signál na pozadí, než v případě A. V dávkovací oblasti jsou viditelné náznaky skvrn. Patrné mírné rozpětí v okolí detekční oblasti.; C. Výsledné PVDF membrány s použitím vyšší konc. Ag než v případě B (jinak stejné podmínky jako B.). Signál na pozadí i míra rozpíjení Ag v okolí detekční oblasti je zřetelně výraznější než v případě B.; D. Výsledné PVDF membrány po použití fosfátového pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹) pro ekvilibraci i dávkování Ag (stejná konc. Ag jako v případě C.). Získané skvrny mají homogenní zbarvení a ostré okraje, také je viditelná nižší intenzita pozadí než v případě C.; V případech A, B a C byla PVDF membrána po vyjmutí z aparatury položena na uschnutí na potravinovou fólii, v případě D na savý papír.; Ředění konjugátu: 1:8000, Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

4.1.2 Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce pro dotblot

Citlivost kolorimetrické detekce chymotrypsinu byla testována na koncentrační řadě chymotrypsinu metodou dotblot. Jako slepý vzorek byl dávkován čistý fosfátový pufr (pH 7,4; 10 mmol.l⁻¹) a jako negativní kontrola byl použit roztok BSA ve fosfátovém pufru (pH 7,4; 10 mmol.l⁻¹) o koncentraci 3 µg/100 µl. Každý bod řady byl na membránu nanesen v triplicátu podle uvedeného dávkovacího schématu (obr. 13A). Získané skvrny byly denzitometricky vyhodnoceny a od naměřených intenzit byla odečtena hodnota slepého vzorku.

Získaná grafická závislost intenzity zbarvení skvrn na koncentraci antigenu je znázorněna na obr. 13C. Z průběhu křivky je viditelné, že až do koncentrace chymotrypsinu 0,1 µg/100 µl vykazuje lineární charakter. U vyšších koncentrací antigenu dochází k tzv. plató efektu, který je způsobený přehlcením vazebné kapacity membrány. Mez detekce této metody se nachází v rozmezí koncentrací chymotrypsinu 0,001 až 0,005 µg/100 µl. Pro afinitní dotblot byl z této koncentrační řady vybrán bod z lineární oblasti, u kterého byla neměřena dostatečná intenzita na to, aby bylo možné pozorovat úbytek signálu při odmývání protilátek působením chaotropního činidla. Těmto parametrům pro optimalizaci pracovního postupu nejlépe odpovídala koncentrace chymotrypsinu 0,02 µg/100 µl.

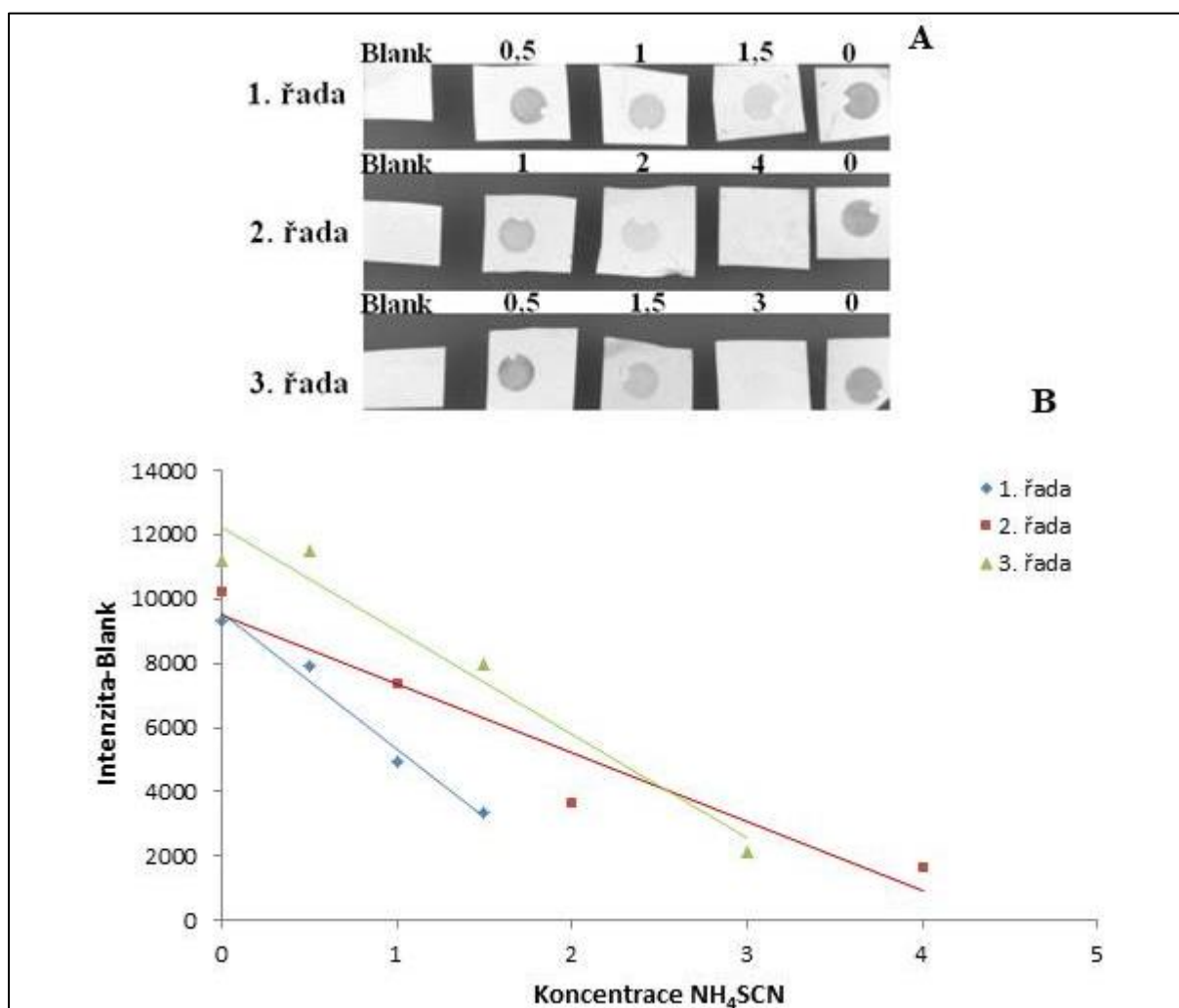


Obr. 13: Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce chymotrypsinu metodou dotblot na PVDF membráně; A. Dávkovací schéma, $c(\text{Ag})$ v $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, BL – slepý vzorek, BSA – negativní kontrola; B. Výsledné PVDF membrány (v triplicátu) – Zbarvení získaných skvrn je homogenní a se vzrůstající konc. Ag roste i jejich intenzita.; C. Grafická závislost intenzity zbarvení skvrn na koncentraci Ag – Lineární oblast závislosti se nachází v rozmezí koncentrací chymotrypsinu 0,001 až 0,1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. V oblasti vysokých $c(\text{Ag})$ je viditelný plató efekt.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

4.1.3 Optimalizace koncentrací chaotropního činidla pro afinitní dotblot

Pro následující experiment jsme použili koncentrace chymotrypsinu 0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:2000 a ředění konjugátu bylo 1:8000.

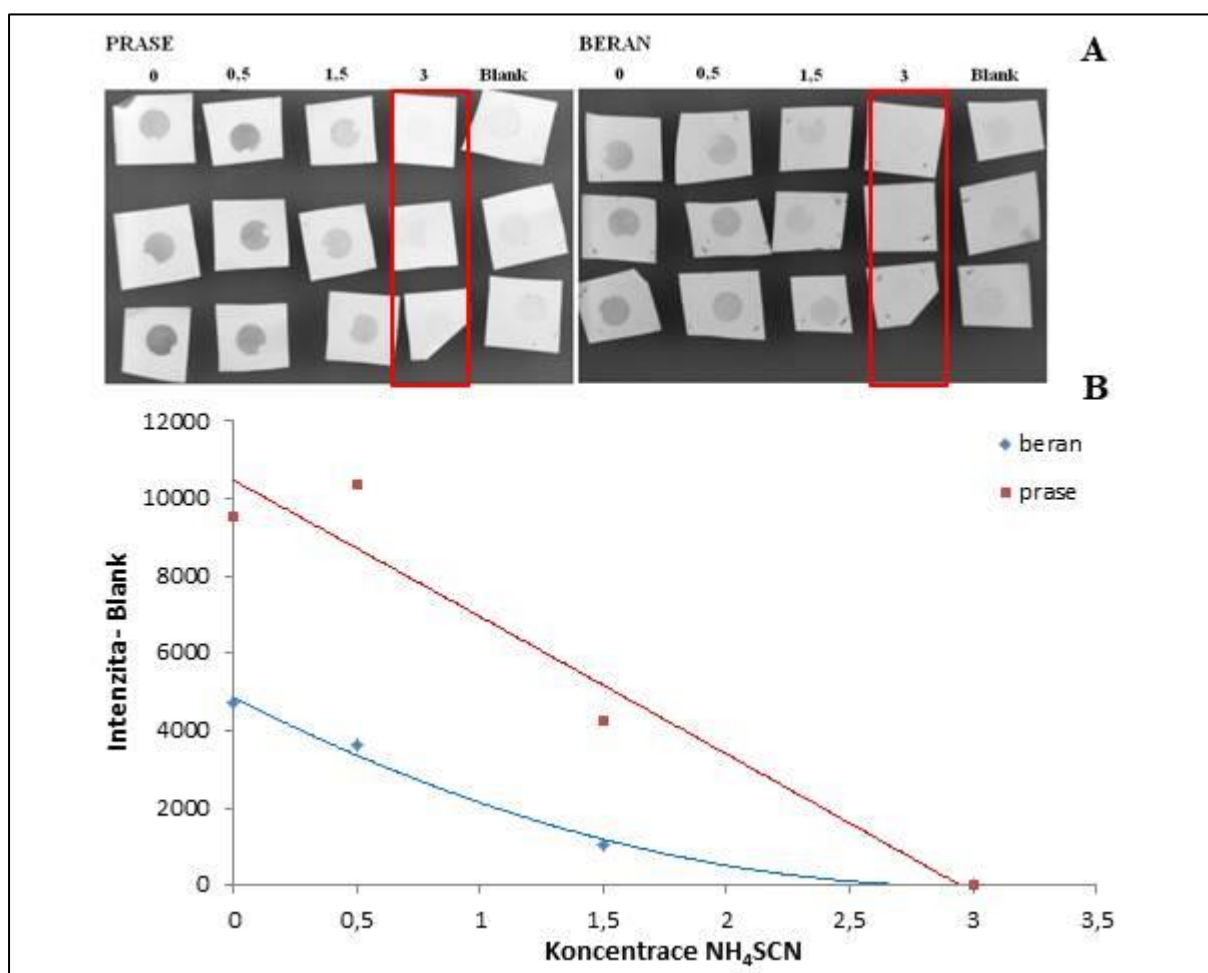
Byly testovány tři koncentrační řady NH_4SCN (viz obr. 14) rozpuštěného ve fosfátovém pufru (pH 7,3; 10 mmol.l^{-1}). Každá koncentrační řada odmývala imunokomplex s jinou rychlostí. Z výsledků na obr. 14B je patrné, že závislost intenzity zbarvení na koncentraci chaotropního činidla klesala nejpomaleji u 2. řady. Lépe na tom byly řady 1 a 3, u kterých byla rychlost klesání závislosti srovnatelná. Jako vhodnější však byla vybrána 3. řada (o koncentracích NH_4SCN 0,5; 1,5 a 3. mol.l^{-1}), která zahrnovala větší rozmezí koncentrací NH_4SCN .



Obr. 14: Výsledky optimalizace koncentrační řady chaotropního činidla metodou afinitního dotblotu; A. Výsledné PVDF membrány – Koncentrace NH_4SCN jsou uvedeny v mol.l^{-1} .; B. Grafické závislosti intenzity zbarvení na koncentraci NH_4SCN pro jednotlivé řady – Nejpomaleji klesá závislost 2. řady. Strmost klesání zbylých dvou řad je velmi podobná.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

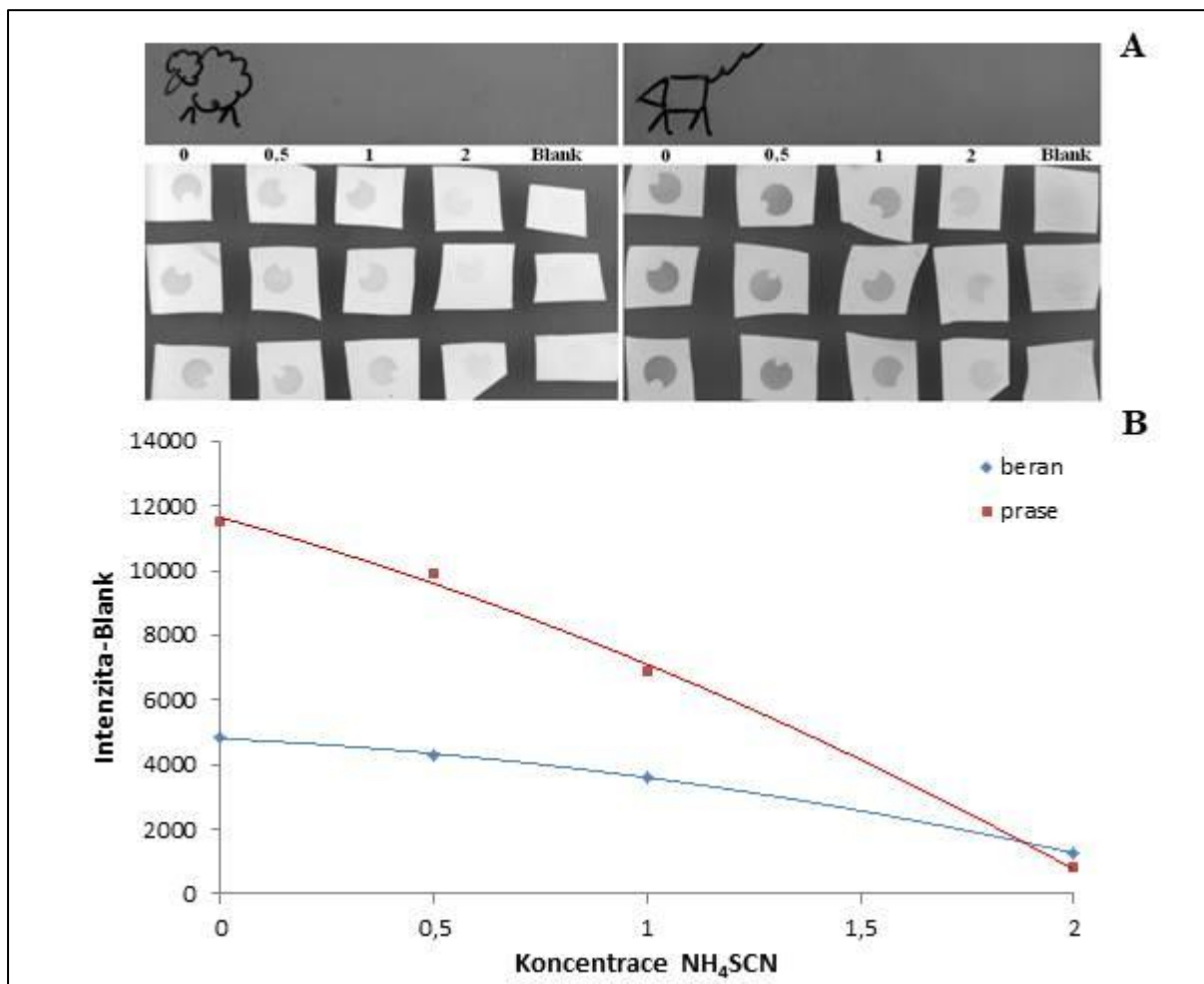
4.1.4 Porovnání kvality protilátek afinitním dotblotem

Podle postupu popsaného v kapitole 3.2.2, byla provedena analýza avidity hyperimunního prasečího a beraního séra se specifitou proti chymotrypsinu. Koncentrace antigenu zůstala stejná (0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$), testovaná séra (primární Ab) byla ředěna v poměru 1:2000 a konjugáty 1:8000, koncentrace chaotropního činidla NH_4SCN byly 0,5; 1,5 a 3 mol.l^{-1} . Stanovení bylo provedeno v triplikátu (obr. 15A). Získané skvrny byly denzitometricky vyhodnoceny, hodnoty pro odpovídající koncentrace byly zprůměrovány a z dat byla vynesena závislost intenzity zbarvení skvrn (po odečtení hodnoty blanku) na koncentraci chaotropního činidla (viz obr. 15B). Z fotografie membrán i z vynesení grafu je patrné, že skvrny ošetřené beraním sérem mají oproti prasečímu světlejší intenzitu zbarvení.



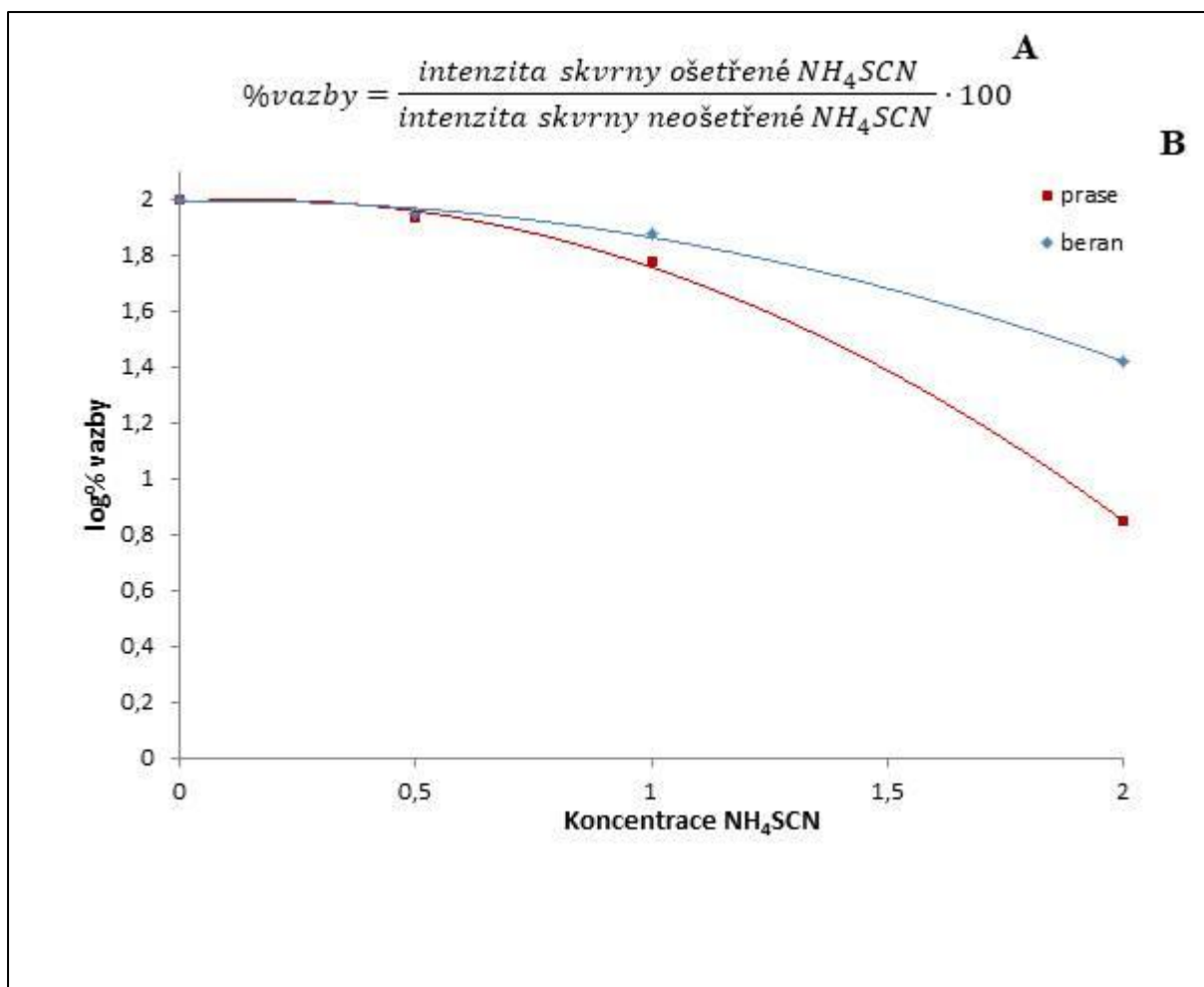
Obr. 15: Výsledky srovnání avidity prasečího a beraního séra metodou afinitního dotblotu; A. Výsledné PVDF membrány – Koncentrace NH_4SCN jsou uvedeny v mol.l^{-1} . Skvrny ošetřené beraním sérem mají nižší intenzitu než skvrny ošetřené sérem prasečím. Zároveň mají skvrny obou sér po ošetření NH_4SCN o koncentraci 3 mol.l^{-1} nižší intenzitu než slepý vzorek (označeno červeně); B. Grafické závislosti intenzity zbarvení na koncentraci NH_4SCN pro obě séra – Strmější klesla závislost prasečího séra.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí a beraní sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

Naměřená intenzita spot ošetřených roztokem NH_4SCN o koncentraci 3 mol.l^{-1} byla nižší než intenzita slepého vzorku, proto byl celý experiment zopakován ještě jednou s koncentracemi chaotropního činidla 0,5; 1 a 2 mol.l^{-1} . Koncentrace chymotrypsinu, ředění sér i ředění konjugátů zůstalo stejné. Data byla zpracována analogicky jako v předchozím stanovení a získané výsledky vykazovaly podobnou závislost jako výsledky předešlé (viz obr. 16).



Obr. 16: Výsledky srovnání avidity prasečího a beraního séra metodou afinitního dotblotu; A. Výsledné PVDF membrány – Koncentrace NH_4SCN jsou uvedeny v mol.l^{-1} .; B. Grafické závislosti intenzity zbarvení na koncentraci NH_4SCN pro obě séra – Stejně jako v předchozím stanovení strměji klesala závislost pro prasečí sérum.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí a beraní sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

Pro každou koncentraci chaotropního činidla bylo také spočítáno procento vazby obou sér, jehož zlogaritmovaná hodnota byla vynesena do grafické závislosti (viz obr. 17). Z jejího průběhu je zřejmé, že prasečí sérum odolávalo zvyšující se koncentraci chaotropního činidla o něco hůře než sérum beraní.



Obr. 17: Výsledky srovnání avidity prasečího a beraního séra metodou afinitního dotblotu; A. Vztah pro výpočet procenta vazby protilátek; B. Závislost logaritmu procenta vazby testovaných sér na koncentraci NH_4SCN (uvedeno v mol.l^{-1}) – Vynesená křivka pro prasečí sérum klesá méně strměji než křivka pro sérum beraní.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí a beraní sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000

Pokud porovnáme výsledky obou sér, tak z intenzit zbarvení skvrn je zřejmé, že prasečí sérum obsahuje větší množství anti-chymotrypsinových protilátek než sérum získané imunizací berana. Jak závislost vynesená z naměřených intenzit zbarvení spot, tak i z logaritmů procent vazby prasečího séra, vykazuje oproti beranímu séru více klesající závislost. Zdá se, že protilátky obsažené v prasečím séru mají tedy nižší aviditu než protilátky beraní.

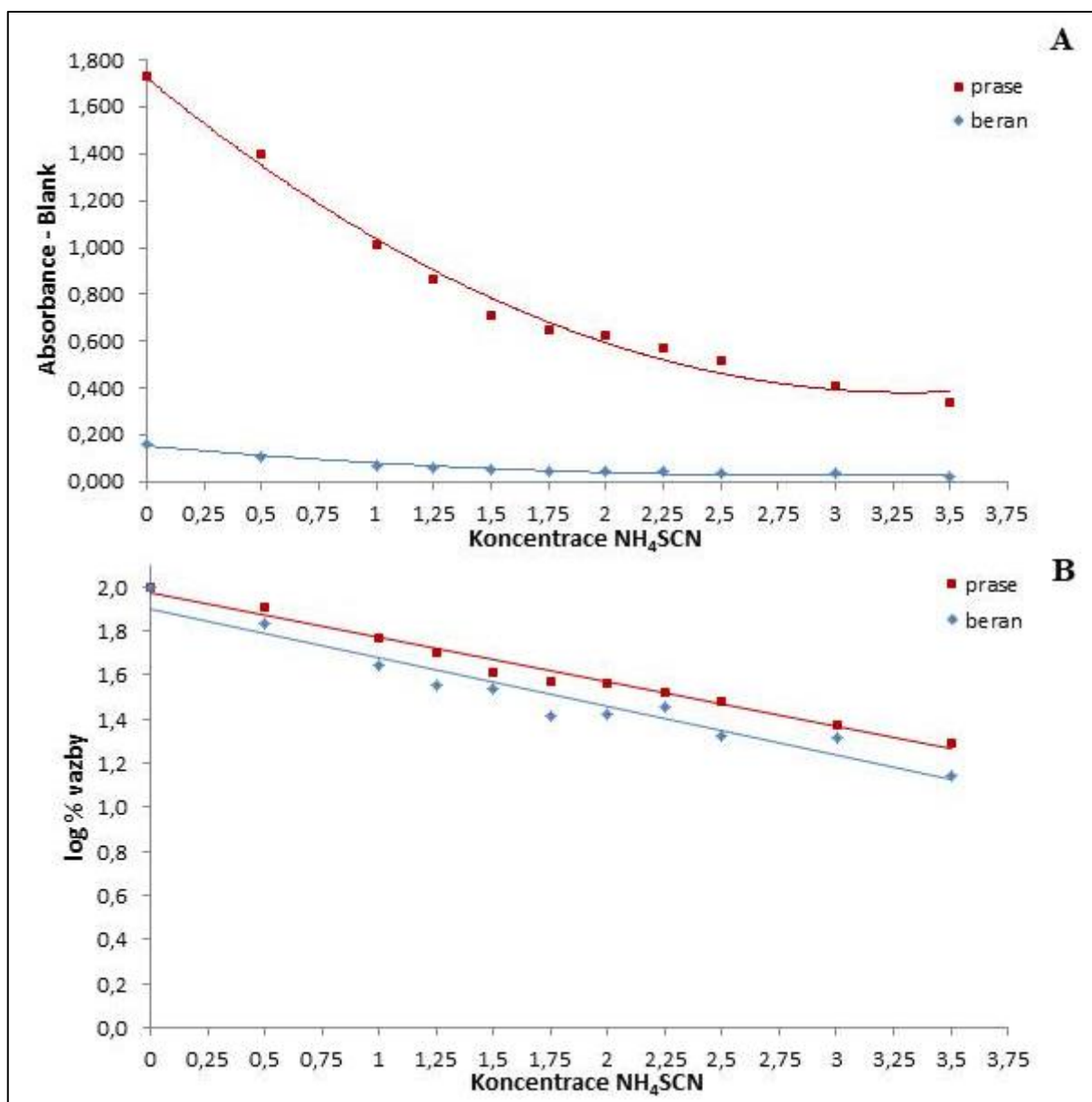
4.1.5 Ověření výsledků pomocí metody ELISA s chaotropním činidlem

Pro potvrzení výsledků porovnání avidity testovaného prasečího a beraního séra získaných metodou dotblot byla jako ověřovací metoda zvolena metoda ELISA s chaotropním činidlem. Na povrch jamek mikrotitrační destičky byl imobilizován antigen (chymotrypsin) o koncentraci 4 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Zvolená koncentrační řada roztoků chaotropního činidla (NH_4SCN) obsahovala body o této koncentraci: 0,5; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5; 3 a 3,5 mol.l^{-1} . Pro každé sérum byly body vyneseny v triplikátu. Na spektrofotometru pro měření mikrotitračních destiček byly změřeny absorbance jednotlivých jamek při 492 nm. Odpovídající si hodnoty byly zprůměrovány a byly od nich odečteny hodnoty slepého vzorku. Ze získaných dat byla vynesena závislost absorbance na koncentraci chaotropního činidla (obr. 18A). Také bylo spočítáno procento vazby podle vzorce uvedeného na obr. 17, jehož dekadický logaritmus byl v závislosti na koncentraci NH_4SCN taktéž vynesen do grafu (viz obr. 18B).

Zejména z grafu zobrazující závislost naměřených absorbancí je viditelné, že výsledky získané metodou ELISA korelují s výsledky získanými metodou dotblot. Jamky ošetřené prasečím sérem dávají vyšší odezvu než jamky po aplikaci beraního séra, což s největší pravděpodobností poukazuje na vyšší obsah anti-chymotrypsinových protilátek v prasečím séru. Beraní sérum však oproti prasečímu vykazuje pomaleji klesající závislost absorbance proti koncentraci NH_4SCN a zřejmě má tedy větší aviditu k antigenu. Z grafu znázorňujícího závislost koncentrace logaritmu procenta vazby na koncentraci chaotropního činidla (obr.18B) nelze jednoznačně určit, které sérum má podle tohoto stanovení vyšší aviditu k antigenu, závislosti pro obě séra jsou si velmi podobné.

Pro zjištění zda je možné metodou ELISA detekovat i tak nízkou koncentraci chymotrypsinu, jaká byla používána u metody dotblot, byl na povrch dvanácti jamek navázán chymotrypsin v koncentraci 0,02 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ vždy v šesti opakováních pro každé sérum. Tyto jamky byly ošetřeny příslušnou kombinací séra a konjugátu, obojí ve stejném ředění jako zbytek mikrotitrační destičky. Jamky nebyly vystaveny účinkům chaotropního činidla, místo něj byl dávkován sodnodraselný fosfátový pufr (pH 6,2; 0,1 mol.l^{-1}). Naměřené hodnoty absorbance jamek po detekci byly zprůměrovány a výsledná absorbance naměřená u jamek ošetřených prasečím sérem byla 0,118 a u těch beraním sérem 0,098 (měřeno při 492 nm), tedy pod absorbancí slepého vzorku, jenž byla pro prasečí sérum 0,256 a pro beraní 0,260. Po porovnání průměrné absorbance jamek s Ag a absorbance slepého vzorku pro každé sérum bylo jasné, že tak nízké koncentrace chymotrypsinu není možné za použitých podmínek

metodou ELISA přesně stanovit. Metodou dotblot lze stejný experiment provést s 200× nižší koncentrací chymotrypsinu než je tomu u metody ELISA, je tedy mnohem citlivější a časově méně náročná. Metoda ELISA totiž vyžaduje přípravu ve dvou dnech, kdy je nejprve nutná aktivace povrchů jamek mikrotitrační destičky, na které je pak navázán požadovaný antigen. Až po uplynutí minimálně 20 hodinové inkubační doby je teprve možné, na takto připraveném povrchu destičky, provést analýzu vybraných protilátek. Metodou afinitního dotblotu však můžeme získat výsledky zhruba do 4 h od počátku analýzy.



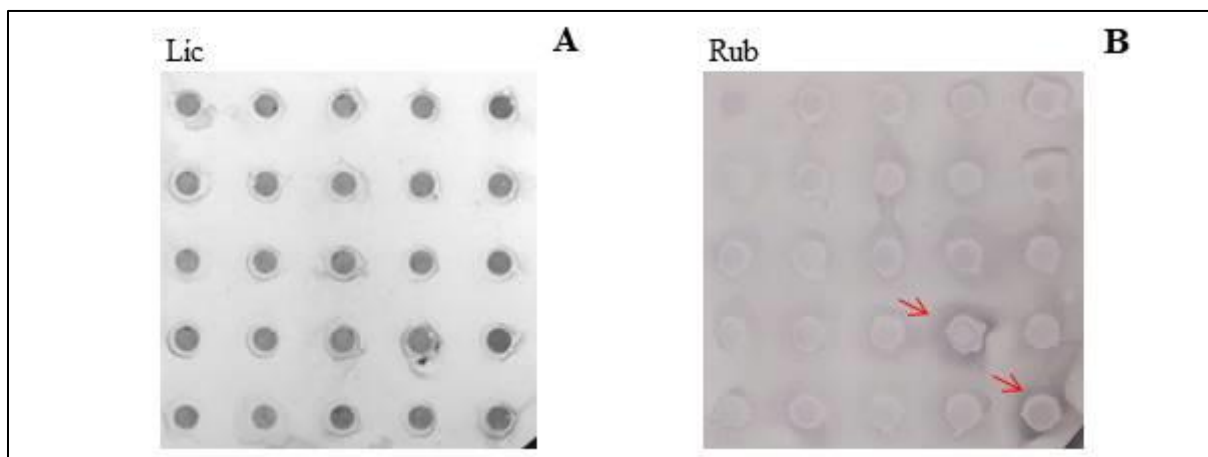
Obr. 18: Grafy stanovení avidity vyšetřovaných sér metodou ELISA s chaotropním činidlem; A. Závislost naměřené absorbance na koncentraci NH_4SCN (uvedeno v mol.l⁻¹) – Graf pro prasečí sérum vykazuje více klesající tendenci než graf pro sérum beraní., B. Závislost dekadického logaritmu procent vazby na koncentraci NH_4SCN – Závislosti pro obě séra mají velmi podobný průběh a strmost klesání přímek.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí a beraní sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000

Zda je vhodnější použít beraní či prasečí sérum pro detekci chymotrypsinu by záleželo na dalším použití protilátek, tedy v jaké aplikaci by se daná protilátka používala. V prasečím séru je vyšší titr protilátek, sice s nižší aviditou než mají protilátky beraní, ale výtěžnost při jejich purifikaci bude vysoká. Avidita těchto protilátek pro aplikaci, jako je například ELISA, je však zcela postačující. Beraní protilátky mají vyšší aviditu, ale zase je jich v séru méně, při purifikaci tedy bude nižší výtěžnost. Pokud by ale byly požadovány vysokoafinitní protilátky, bylo by lepší použít protilátky beraní.

4.1.6 Úvodní experimenty na prototypu 1

Jak již bylo zmíněno, testované zařízení pracuje na principu klasické dotblot analýzy. Díky tomu mohl být použit pro testování stejný postup a podmínky stanovení jako v kapitole 3.2.1 (pouze s malými změnami). Nejprve však bylo nutné ověřit samotnou funkčnost prototypu. Ověřovala se zejména těsnost celé aparatury. Pozorovalo se, zda dochází ke správnému odsávání dávkovaných roztoků a také jestli nedochází k mísení roztoků mezi jednotlivými jamkami. Za tímto účelem jsme provedli několik experimentů, při kterých jsme do aparatury dávkovali barevný roztok methylované. Zjistili jsme, že dochází k protékání mezi jamkami zařízení. V jiných ohledech však zařízení splňovalo své funkce, proto jsme na něm provedli první experimenty s protilátkami. Použili jsme koncentraci chymotrypsinu 0,025 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Po kolorimetrické detekci měly všechny skvrny na membráně srovnatelnou intenzitu zbarvení. Výsledky tohoto pokusu sice potvrdily protékání jamek, na druhou stranu bylo poprvé prokázáno, že na novém zařízení je možné provést všechny kroky jako u standardního dotblotu, nedochází k nescifické sorpci a lze tak získat požadované skvrny na membráně. Celý experiment byl znovu zopakován, tentokrát pouze s jednou koncentrací chymotrypsinu (0,025 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$), výsledná membrána je zobrazena na obr. 19.

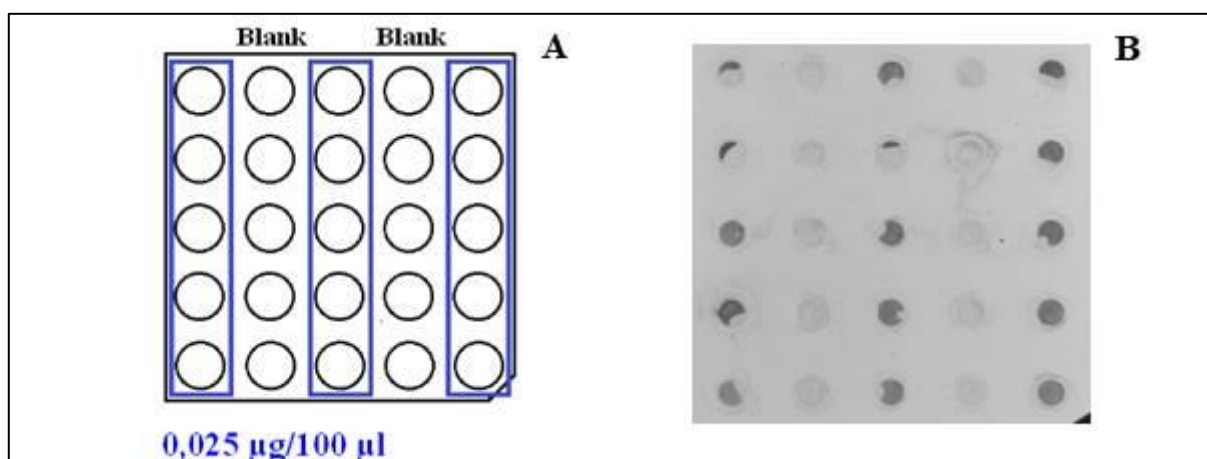
Všechny získané skvrny měly srovnatelně tmavé zbarvení. V okolí skvrn a na rubové straně membrány byly viditelné tmavé mapy, které byly způsobeny nescifickou sorbcí (eliminace tohoto jevu je popsána v kapitole 4.1.8). Těmito pokusy bylo potvrzeno, že pomocí nového zařízení je možné provést stanovení antigenů.



Obr. 19: Stanovení chymotrypsinu pomocí prototypu 1; A. Fotografie lícové strany výsledné PVDF membrány – Do všech jamek byl dávkován roztok o $c(\text{Ag})$ $0,025 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Všechny skvrny mají srovnatelnou intenzitu zbarvení. Téměř kolem všech skvrn je viditelný tmavý prstenec způsobený nespecifickou sorbcí.; B. Fotografie rubové strany PVDF membrány – Na rubové straně PVDF membrány se v důsledku nespecifické sorbce vyskytují tmavé mapy (označeno šipkami).; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

4.1.7 Optimalizace metody pro prototyp 2

Na základě předchozích výsledků a testování, jsme nechali vyrobit prototyp nový, který po otestování s barevnými roztoky splňoval požadované parametry, abychom na něm mohli otestovat protokol pro modelový systém s chymotrypsinem. Roztok chymotrypsinu o koncentraci $0,025 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ byl dávkován střídavě s fosfátovým pufrům ($\text{pH } 7,3$; 10 mmol.l^{-1}), který sloužil jako slepý vzorek (viz obr. 20A). Jako primární protilátka bylo znovu použito hyperimunní prasečí sérum. Ředění séra i konjugátu zůstalo stejné. Fotografie výsledné membrány je znázorněna na obr. 20B. Podle očekávání je intenzita skvrn, ošetřených antigenem stejná. Jak je vidět, některé skvrny nejsou kulaté, ale mají srpkovitý tvar. Zjistili jsme, že je to způsobeno vznikem bublin při dávkování vzorku na membránu. Kolem některých skvrn a na rubové straně membrány se znovu objevily známky nespecifické sorbce (její eliminace je popsána v kapitole 4.1.8).



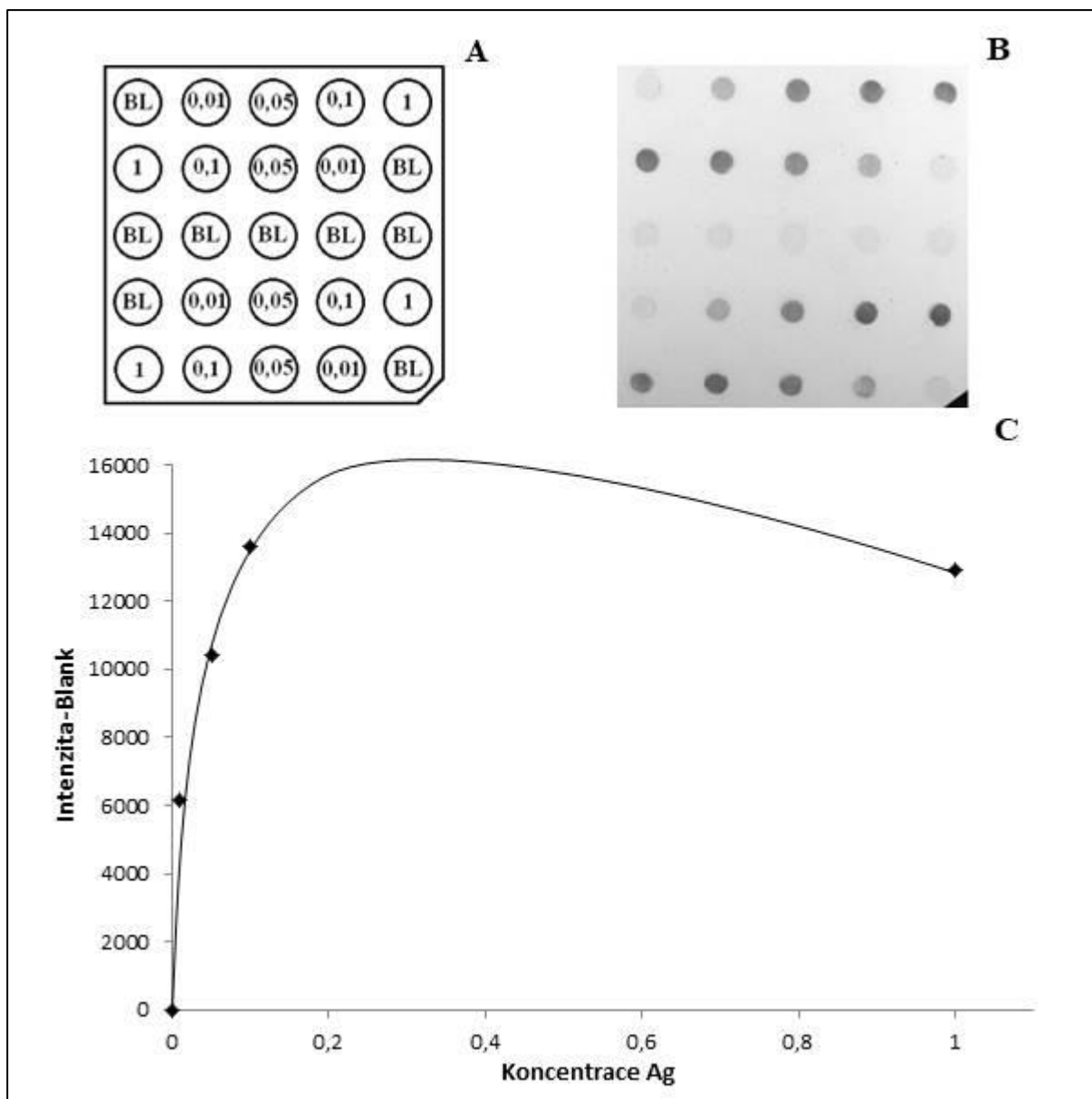
Obr. 20: Stanovení chymotrypsinu pomocí prototypu 2; A. Dávkovací schéma; B. Výsledná PVDF membrána – Skvrny, na které byl dávkován Ag, mají stejné zbarvení. Srpkovitý tvar některých skvrn byl způsoben tvorbou bublin při dávkování.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

4.1.8 Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce na prototypu 2

Stejně jako u klasického dotblotu byla i při experimentech s použitím nového zařízení stanovena citlivost používané kolorimetrické detekce. Na PVDF membránu byla nenesena koncentrační řada chymotrypsinu rozpuštěného ve fosfátovém pufru (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹), která obsahovala tyto koncentrace: 0,01; 0,05; 0,1 a 1 µg/100 µl (viz dávkovací schéma obr. 21A). Jako primární protilátka bylo použito hyperimunní prasečí sérum ředěné 1:2000, ředění konjugátu bylo 1:8000. V rámci jednoho pokusu byla tato koncentrační řada aplikována na membránu celkem čtyřikrát v uspořádání tak, že v lichých řádcích byla dávkována od nejvyšší k nejnižší koncentraci a v sudých naopak, aby se ověřilo, že nedochází k mísení obsahů jamek a k důkazu těsnosti celé aparatury. S cílem zabránit vzniku tmavých prstenců kolem skvrn a lepšímu zafixování dávkovaného antigenu na membránu, nebylo jako doposud dávkováno 100 µl roztoku antigenu, ale 2× 50 µl do každé jamky, tak jak je uvedeno v kapitole 3.2.4. Ve snaze eliminovat nespecifickou sorpci detekčních protilátek jsme provedli změnu i ve způsobu promytí před detekcí. Membrána byla nejprve jako obvykle 3× rychle promyta dávkováním 1 ml PBS-T pufru (pH 7,4) na jednu řadu jamek, následně byla vytažena z aparatury a ještě 3× promyta v Petriho misce na orbitální třepačce s 5 minutovými dobami inkubace. Fotografie výsledné membrány je na obr. 21B.

Odpovídající si intenzity zbarvení byly zprůměrovány, od získaných hodnot byla odečtena průměrná hodnota intenzity slepých vzorků a vše bylo vyneseno v závislosti na koncentraci antigenu do grafu (viz obr. 21C). V oblasti vysokých koncentrací

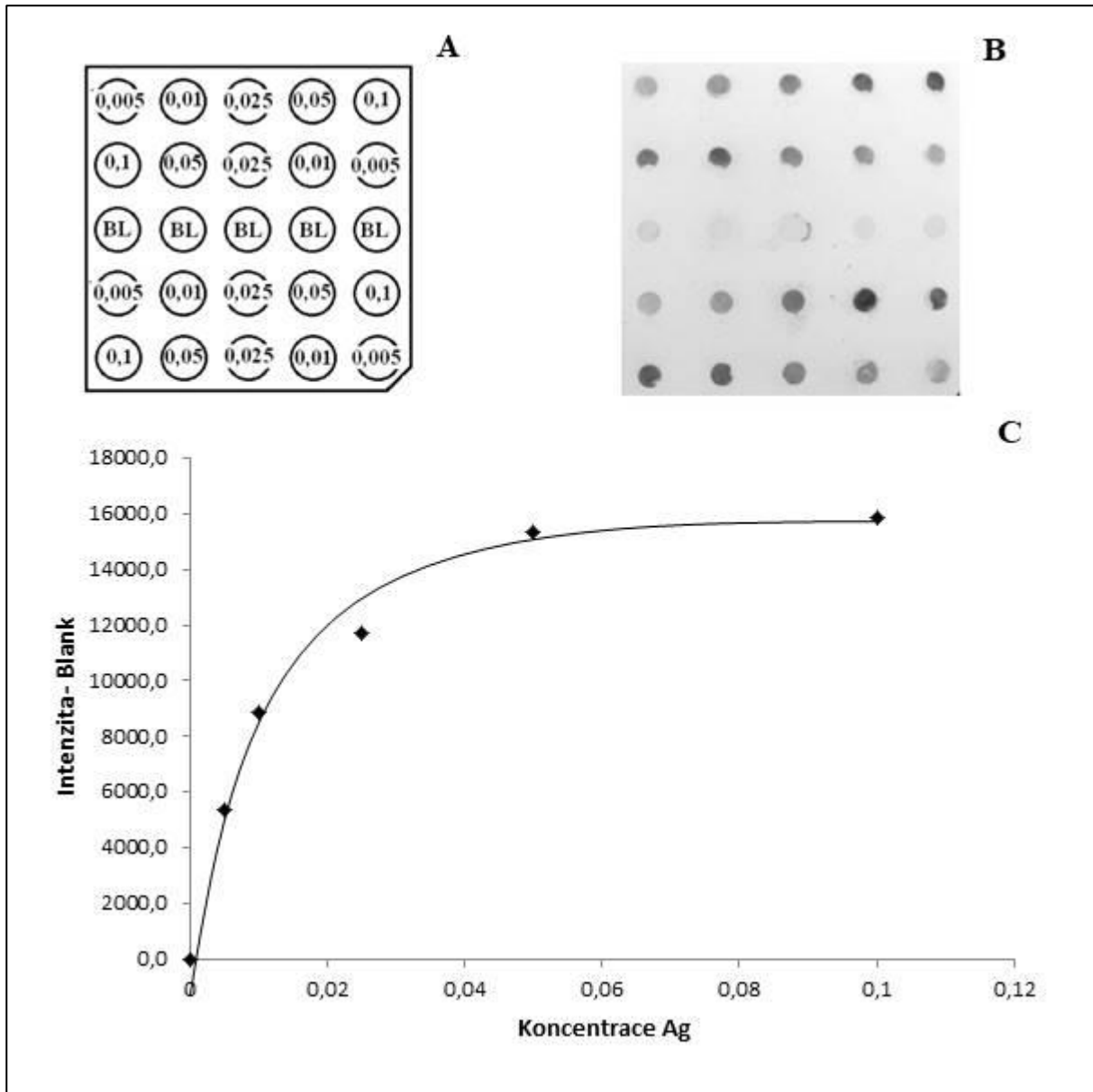
chymotrypsinu dochází k plató efektu, při kterém s rostoucí koncentrací naměřená intenzita již neroste.



Obr. 21: Výsledky stanovení citlivosti kolorimetrické detekce chymotrypsinu na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – c(Ag) jsou uvedeny v $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; B. Výsledná PVDF membrána – Získané skvrny mají klesající intenzitu. Na pozadí membrány nejsou viditelné žádné známky nespecifické sorbce.; C. Grafická závislost intenzity zbarvení na koncentraci Ag – Intenzita naměřená u nejnižšího bodu řady je mnohem vyšší než intenzita naměřená u slepých vzorků. V oblasti vysokých c(Ag) je viditelný plató efekt.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekci Opti-4CN (Bio-Rad)

Bod o nejnižší koncentraci $0,01 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ měl poměrně tmavé zbarvení detekční oblasti, proto jsme se rozhodli změnit koncentrační řadu na: 0,005; 0,01; 0,0250; 0,05 a $0,1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Výsledná data byla zpracována analogicky jako v předchozím stanovení. Z výsledků znázorněných na obr. 22 je zřejmé, že dolní hranice detekce tohoto stanovení

chymotrypsinu se tedy nachází v oblasti koncentrací nižších než 0,005 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, tedy patrně kolem hranice 1 $\text{ng}/100 \mu\text{l}$.



Obr. 22: Výsledky stanovení citlivosti kolorimetrické detekce chymotrypsinu na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – $c(\text{Ag})$ jsou uvedeny v $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; B. Výsledná PVDF membrána – Intenzita zbarvení získaných skvrn klesala klesající $c(\text{Ag})$; C. Grafická závislost intenzity zbarvení skvrn na $c(\text{Ag})$ – Intenzita naměřená u nejnižšího bodu řady je ztelně vyšší než intenzita slepých vzorků. V oblasti vysokých $c(\text{Ag})$ je viditelný plató efekt.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátu: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

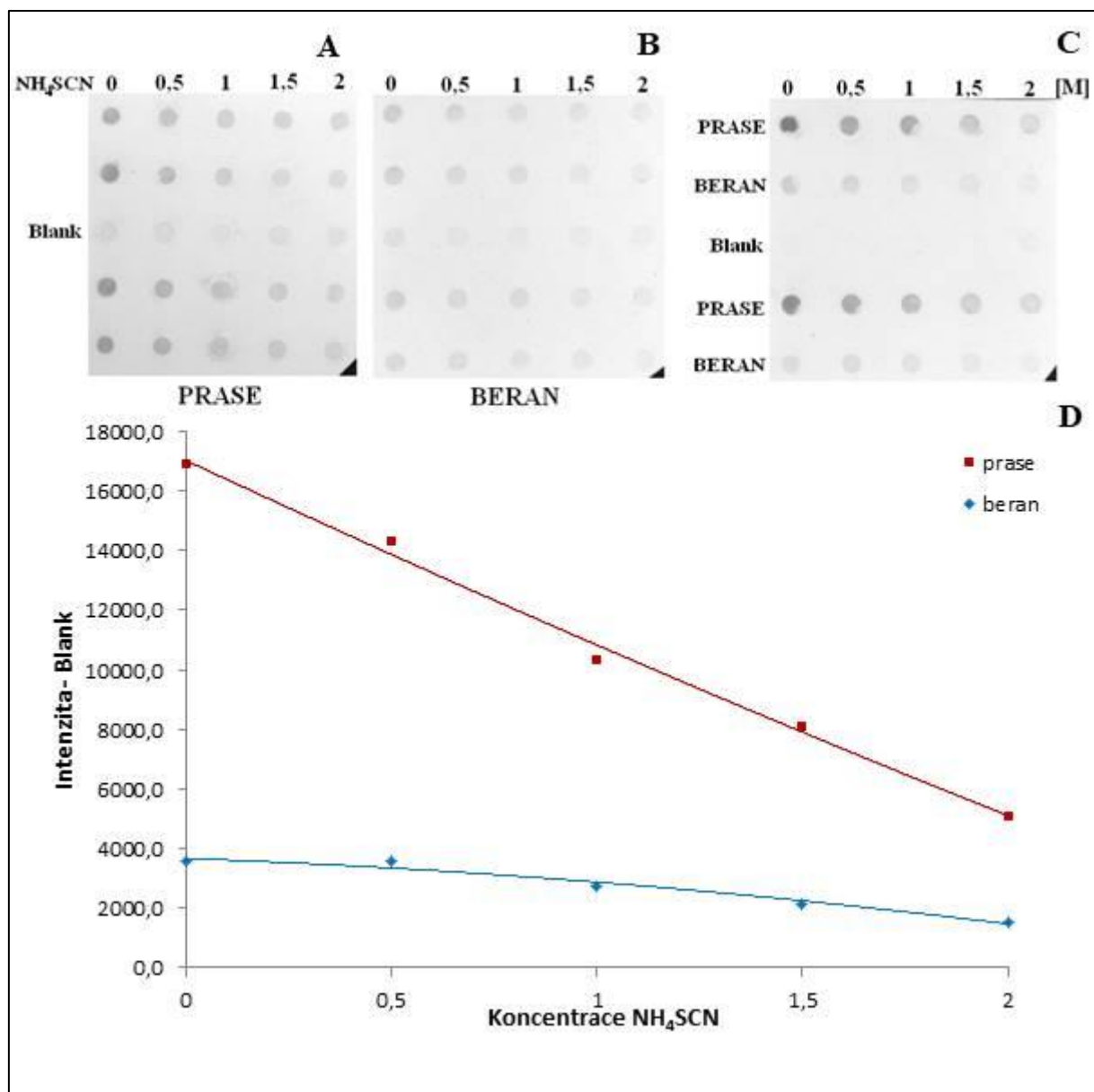
Výše zmíněnými změnami v postupu bylo dosaženo doposud nejlepších výsledků. Zcela bylo odstraněno rozmývání antigenu do okolí skvrn, také už se na membráně nevyskytují tmavé mapy způsobené nespecifickou sorbcí. Intenzity zbarvení skvrn se stejnou

koncentrací chymotrypsinu byly stejné, čímž tedy bylo znovu potvrzeno, že nový prototyp pracuje tak, jak je požadováno.

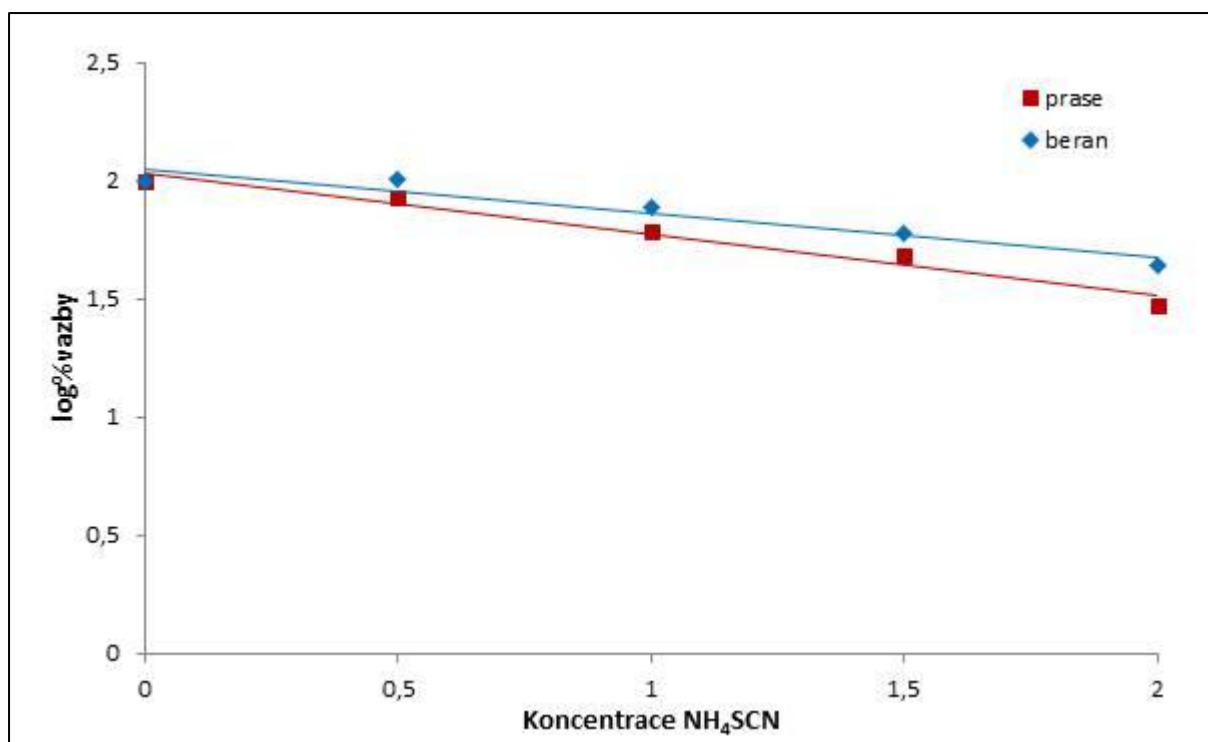
4.1.9 Porovnání avidit prasečího a beraního séra na prototypu 2

Vzhledem k výsledkům z předchozího pokusu, byla jako vhodná koncentrace chymotrypsinu pro testování avidity beraního a prasečího hyperimunního séra zvolena 0,02 µg/100 µl. Při analýze bylo postupováno tak, jak je uvedeno v kapitole 3.2.5. Obě séra byla ředěna jako obvykle v poměru 1:2000, příslušné konjugáty byly ředěny 1:8000 a řada roztoků chaotropního činidla NH₄SCN zahrnovala tyto koncentrace: 0,5; 1; 1,5; 2 mol.l⁻¹. Stanovení bylo provedeno v několika opakováních. Nejprve byla testována obě séra odděleně, každé na jiné membráně a v jiném dni, a až následně bylo provedeno testování obou sér v rámci jednoho pokusu během jednoho dne. Fotografie membrán a grafická vyhodnocení získaných dat jsou zobrazeny na obr. 23 a 24.

Při testování sér odděleně i současně bylo dosaženo stejných výsledků. Podobně jako u metody afinitního dotblotu byla intenzita skvrn ošetřených beraním sérem nižší než intenzita skvrn po aplikaci prasečího séra, což koreluje s výsledky předchozího testování na klasickém dotblotu a pomocí ELISA metody. Závislost intenzity zbarvení skvrn na koncentraci chaotropního činidla prasečího séra klesá rychleji než u séra beraního. I závislost dekadického logaritmu procent vazby na koncentraci NH₄SCN vykazuje u beraního séra nepatrně méně klesající tendenci. Výsledky porovnání avidit sér pomocí nového zařízení odpovídají výsledkům získaných jak testováním metodou afinitního dotblotu, tak i metodou ELISA s chaotropním činidlem.



Obr. 23: Výsledky porovnání avidity beraního a prasečího anti-chymotrypsinového séra na prototypu 2; A. Fotografie výsledné PVDF membrány – prasečí sérum; B. Fotografie výsledné membrány – beraní sérum; C. Fotografie výsledné membrány – prasečí a beraní sérum zároveň.; D. Grafická závislost naměřené intenzity zbarvení na koncentraci NH_4SCN , použité koncentrace NH_4SCN jsou uvedeny v mol.l^{-1} ; Více klesající závislost byla zjištěna u prasečího séra. Stejných výsledků bylo dosaženo, jak při testování sér zvlášť tak i na jedné membráně. Intenzita spot po aplikace beraního séra je nižší než u skvrn ošetřených sérem prasečím. Se vzrůstající koncentrací NH_4SCN je u obou sér viditelný pokles intenzit zbarvení.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí a beraní sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátů: 1:8000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)



Obr. 24: Grafické znázornění závislosti logaritmu procent vazby na koncentraci chaotropního činidla při srovnání avidity beraního a prasečího séra na prototypu 2 – Získané závislosti pro obě séra jsou velmi podobné, nepatrně méně klesající závislost však vykazuje beraní sérum.

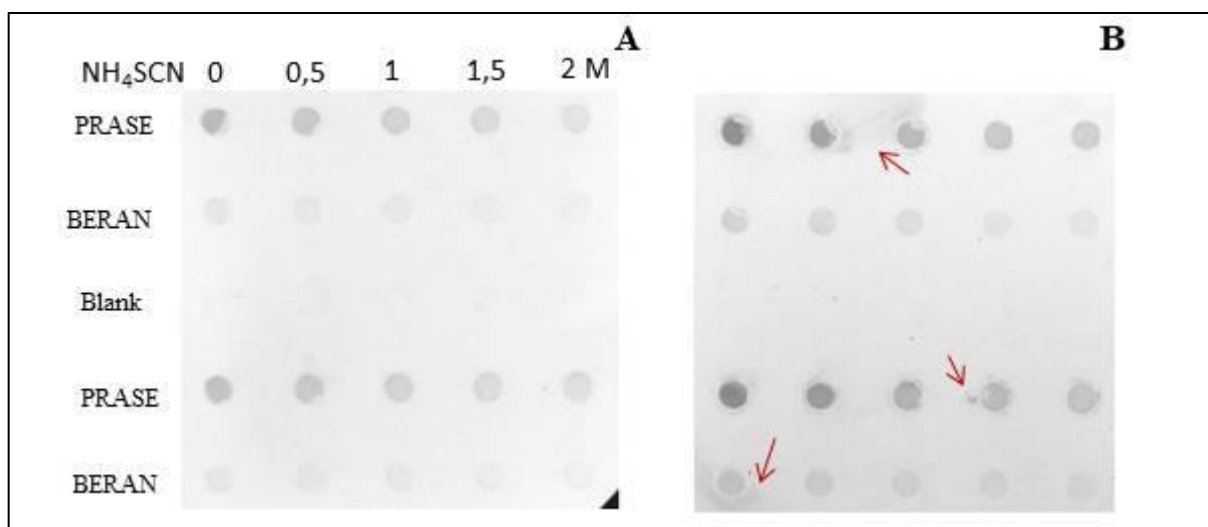
4.1.10 Optimalizace promývání u prototypu 2

Jedním z důvodů vyvoje nového zařízení na dotblot je zjednodušení práce a zkrácení doby analýzy. Proto jsme provedli řadu pokusů (ve stejném uspořádání jako bylo provedeno porovnání avidit beraního a prasečího sér na jedné membráně), při kterých byly postupně zkracovány promývací kroky. Jako modelový systém bylo použito porovnání avidity prasečího a beraního séra na jedné membráně v totožném uspořádání jako v kapitole 4.1.9.

Nejprve jsme nahradili dlouhé promývání po aplikaci primární protilátky (z původního 3× 1 ml PBS-T pH 7,4 / řadu rychle za sebou a následně ještě 3× 1 ml / řadu po 5 minutách) na 6× rychle za sebou. Promytí po inkubaci s NH₄SCN zůstalo zachováno (tedy 5× rychle po NH₄SCN). Po konjugátu byla membrána 3× promyta nadávkováním 1 ml PBS-T na řadu, následně vytažena z aparatury a 3× 5 minut promývána PBS-T v Petriho misce na orbitální třepače. Po detekci jsme na získané membráně (obr. 25A) nezpozorovali žádné známky rozpíjení ani nespecifické sorbce.

Ve snaze dosáhnout maximální úspory času při stanovení jsme v dalším experimentu vynechali promytí v Petriho misce na orbitální třepače a membránu jsme po vytažení z aparatury pouze opláchli PBS-T. Fotografie membrány po kolorimetrické detekci

je uvedena na obr. 25B. Kolem některých skvrn jsou patrné tmavé prstence způsobené nespecifickou sorbcí detekčních protilátek, i taková membrána je ale bez problému hodnotitelná.



Obr. 25: Výsledky zkracování promývání na prototypu 2: A. Fotografie výsledné PVDF membrány po prvním zkrácení promytí – pro mytí po prim. Ab 6× rychle a po konjugátu 3× rychle a 3× po 5 min mimo zařízení PBS-T pufrem (pH 7,4); B. Fotografie výsledné PVDF membrány po dalším zkrácení promytí – promytí po pro mytí po prim. Ab 6× rychle a po konjugátu 3× rychle PBS-T pufrem (pH 7,4) a následně opláchnutí membrány PBS-T pufrem (pH 7,4) po vytažení z aparatury.; U membrány zobrazené na obr. B jsou viditelné známky nespecifické sorbce (označeno šipkami). Membrána na obr. A je čistá a oproti obr. B má znatelně nižší intenzitu pozadí.; Prim. Ab: anti-chymotrypsinové prasečí a beraní sérum ředěné 1:2000; Ředění konjugátů: 1:8000; c(NH₄SCN): 0,5; 1; 1,5 a 2 mol.l⁻¹; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

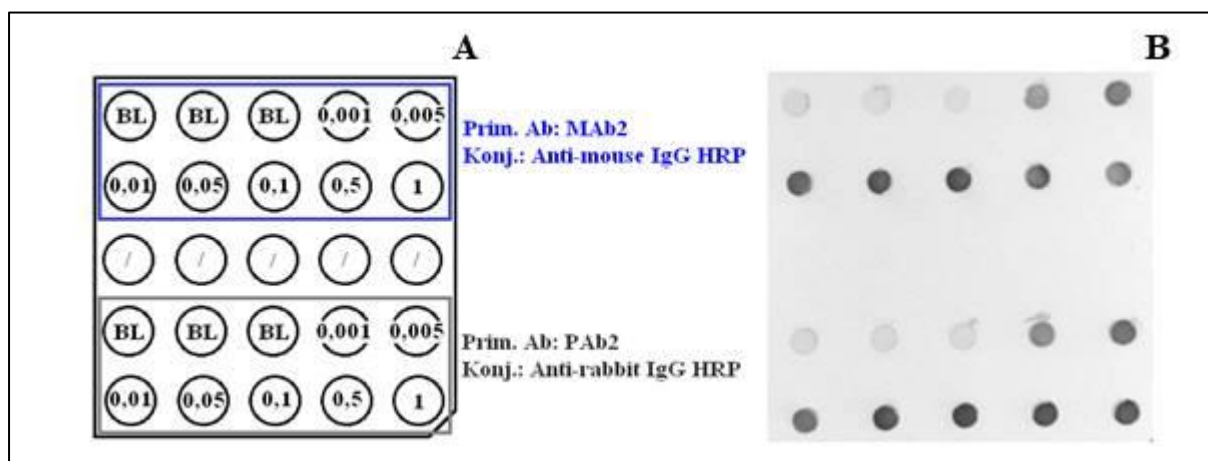
Zjistili jsme, že pro úplné omytí zbytků detekčních roztoků stačí provést promývání podle výše popsaného postupu a po vyjmutí z aparatury membránu pouze jednou 5 min promýt v Petriho misce na orbitální třepačce. Celková doba promytí při použití původního protokolu je asi 35 min (v případě afinitního uspořádání pak asi 55 min). Popsanými změnami jsme dosáhli zkrácení doby analýzy o téměř 20 min a v případě afinitního uspořádání o 30 min, což společně s faktem, že celá analýza (vyjma detekce) probíhá v zařízení a odpadá tedy manipulace s membránou během stanovení, výrazně urychluje a uživatelsky zpříjemňuje celou práci.

4.2 Porovnání protilátek proti apolipoproteinu E na prototypu 2

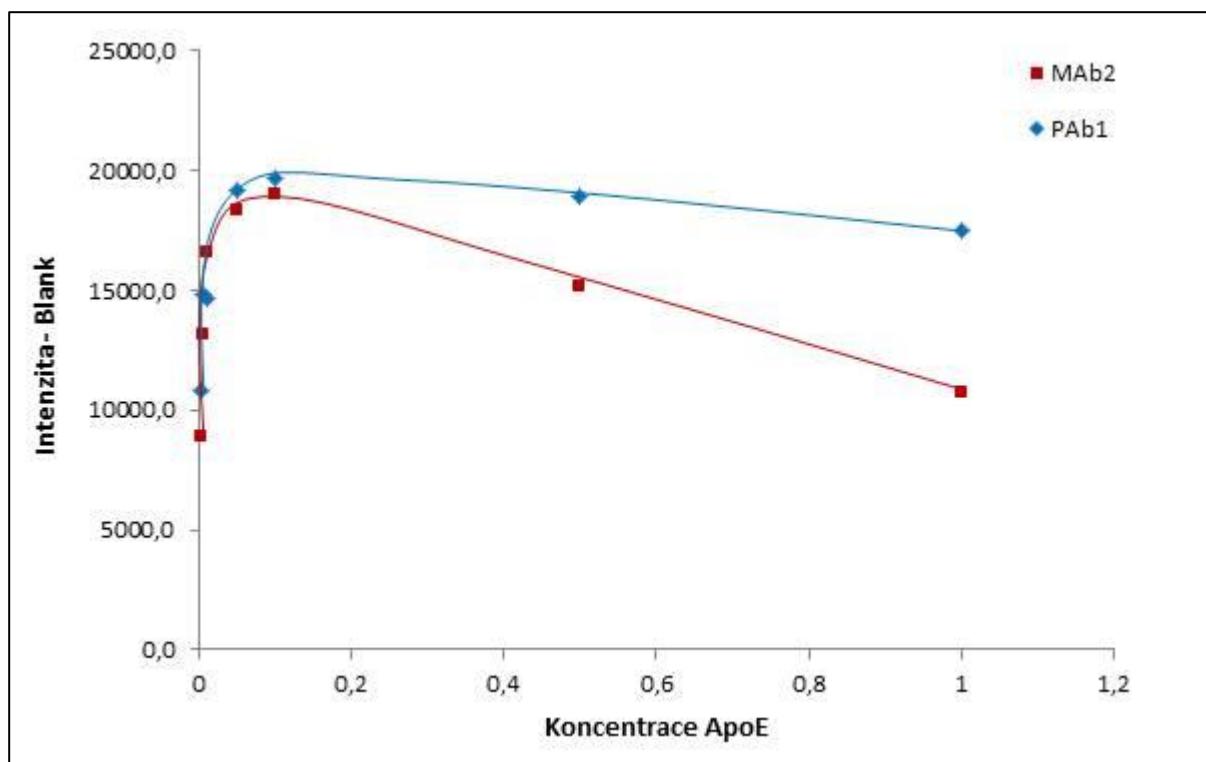
Po ověření funkčnosti vyvíjeného zařízení a optimalizaci pracovního postupu na systému chymotrypsinu a anti-chymotrypsinových protilátek, bylo na zařízení provedeno testování dalších protilátek namířených proti jiným antigenům. Jako první byly srovnány dvě protilátky proti apolipoproteinu E (ApoE).

4.2.1 Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce

Analogicky jako u systému s chymotrypsinem byla citlivost detekce stanovení testována pomocí zvolené koncentrační řady roztoků antigenů, která zahrnovala tyto koncentrace: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Jako slepý vzorek byl použit fosfátový pufr (pH 7,3; 10 mmol.l^{-1}). Pro testování byly vybrány tyto primární protilátky: polyklonální králičí anti-ApoE3 IgG (PAb1) a monoklonální myší anti-ApoE3 IgG (MAb2), obě od firmy Moravian Biotechnology v ředění 1:1000 (tedy o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Konjugáty jsme ředili v poměru 1:5000. Po provedení kolorimetrické detekce byla membrána vyfocena a denzitometricky vyhodnocena. Od naměřených intenzit zbarvení skvrn byla odečtena průměrná hodnota příslušného slepého vzorku a z dat jsme vynesli závislost denzity skvrn na koncentraci ApoE. Fotografie membrány a její grafické vyhodnocení jsou zobrazeny na obr. 26 a 27.



Obr. 26: Výsledky stanovení citlivosti kolorimetrické detekce ApoE na prototypu 2; A. Dávkovací schéma roztoků antigenů – c(Ag) uvedena v $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; B. Výsledná PVDF membrána – V oblasti vyšších koncentrací ApoE intenzita skvrn roste pomaleji.; Ředění prim. Ab 1:1000; Ředění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

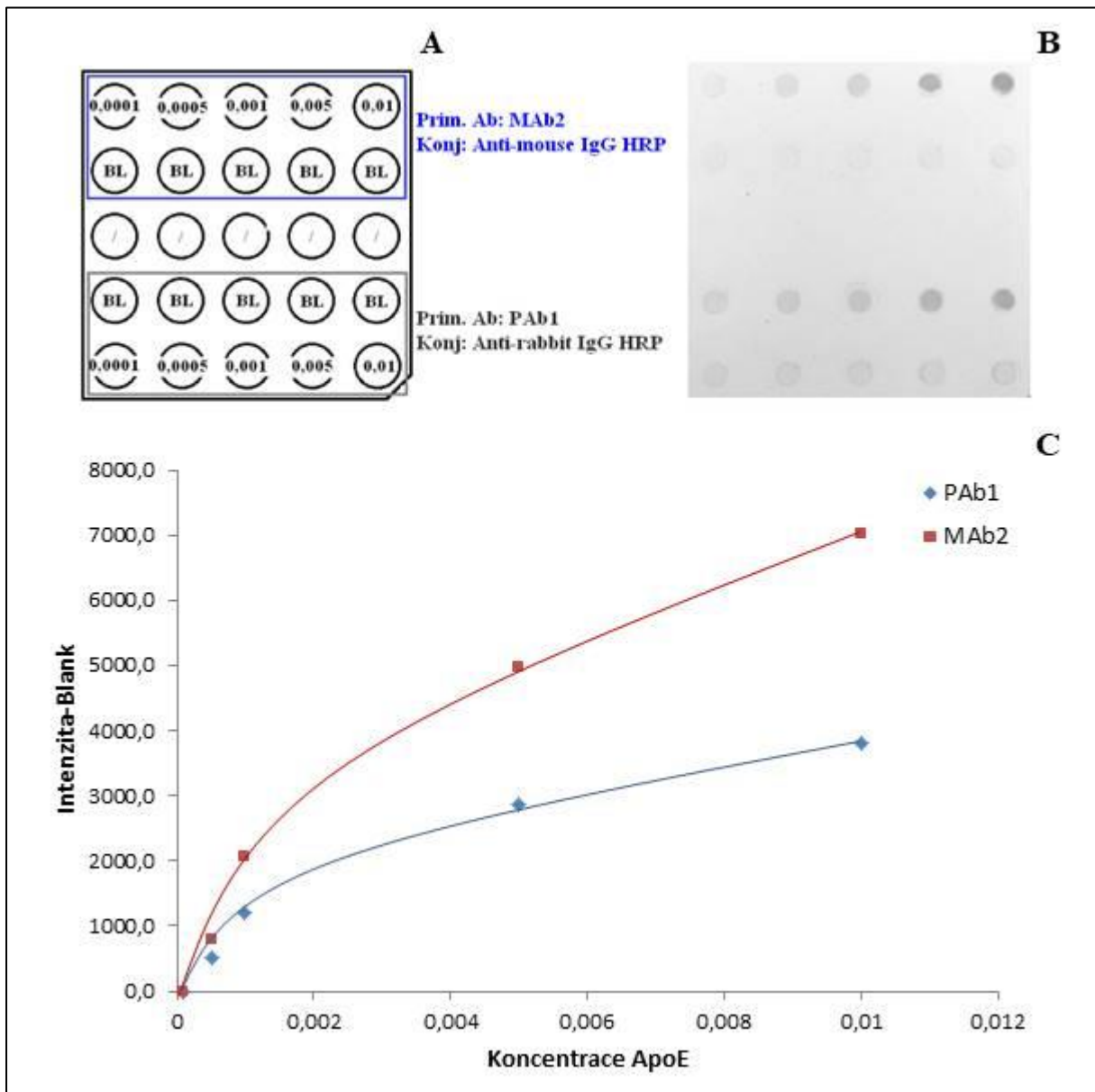


Obr. 27: Výsledky stanovení citlivosti kolorimetrické detekce ApoE na prototypu 2: Graf závislosti naměřené intenzity získaných skvrn na koncentraci ApoE (v µg/100 µl) – Intenzita naměřená u nejnižších c(Ag) řady byla u obou testovaných protilátek mnohem vyšší než intenzita slepých vzorků. V oblasti vyšších koncentrací u obou protilátek dochází k plató efektu.; Ředění prim. Ab 1:1000; Ředění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

Z grafické závislosti (obr. 27) je zřejmé, že při zvolené koncentrační řadě antigenu nebylo dosaženo dolní hranice detekce metody. Jak je patrné z tvaru křivek, v oblasti vysokých koncentrací nedochází ke kvantitativnímu navázání antigenu na povrch membrány a naměřené intenzity odpovídajících skvrn nekorelují se skutečnou koncentrací antigenu. Pro určení citlivosti metody tedy byla zvolena nová koncentrační řada ApoE, která zahrnovala nižší koncentrace antigenu (0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005 a 0,01 µg/100 µl). Změna byla provedena také v ředění primárních protilátek, ty byly na rozdíl od předchozího pokusu ředěny v poměru 1:3000 (koncentrace protilátek tedy byla 0,3 µg/1ml). Ředění konjugátu zůstalo stejné jako u předchozího stanovení 1:5000. Naměřené intenzity zbarvení skvrn byly graficky zpracovány. Fotografie membrány a grafické závislosti intenzity skvrn na koncentraci antigenu obou testovaných protilátek jsou znázorněny na obr. 28.

U bodů o nejnižší koncentraci ApoE (0,0001 µg/100 µl) byla u obou protilátek naměřena intenzita zbarvení nižší než intenzita slepého vzorku. Předpokládáme tedy, že dolní mez stanovení při použitých ředění detekčních protilátek leží v intervalu koncentrací antigenu od 0,0001 do 0,0005 µg/100 µl. Slepé vzorky ošetřené polyklonální králičí protilátkou (PAb1)

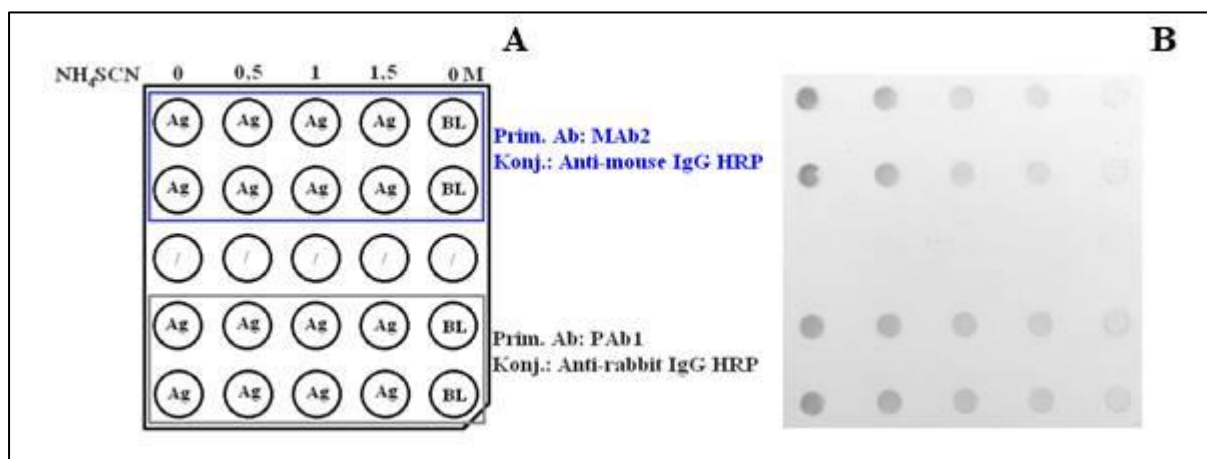
měly tmavší zbarvení než ty ošetřené monoklonální myší protilátkou (MAb2). Z toho vyplývá, že PAb1 vykazuje vyšší míru nespecifické sorbce než MAb2.



Obr. 28: Výsledky stanovení citlivosti kolorimetrické detekce ApoE na prototypu 2; A. Dávkovací schéma roztoků antigenu – c(Ag) uvedeny v µg/100 µl; B. Výsledná PVDF membrána – Intenzita skvrn s nejnižší c(Ag) byla u obou protilátek nižší než hodnota slepého vzorku. I přesto, že intenzity skvrn u PAb1 se na první pohled zdají tmavší než u MAb2, konečná intenzita PAb1 byla po odečtení hodnot slepých vzorků nižší (viz obr. C).; C. Graf závislosti naměřené intenzity skvrn na koncentraci ApoE – V oblasti vysokých c(Ag) se u obou protilátek projevuje plató efekt.; Ředění prim. Ab 1:3000; Ředění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

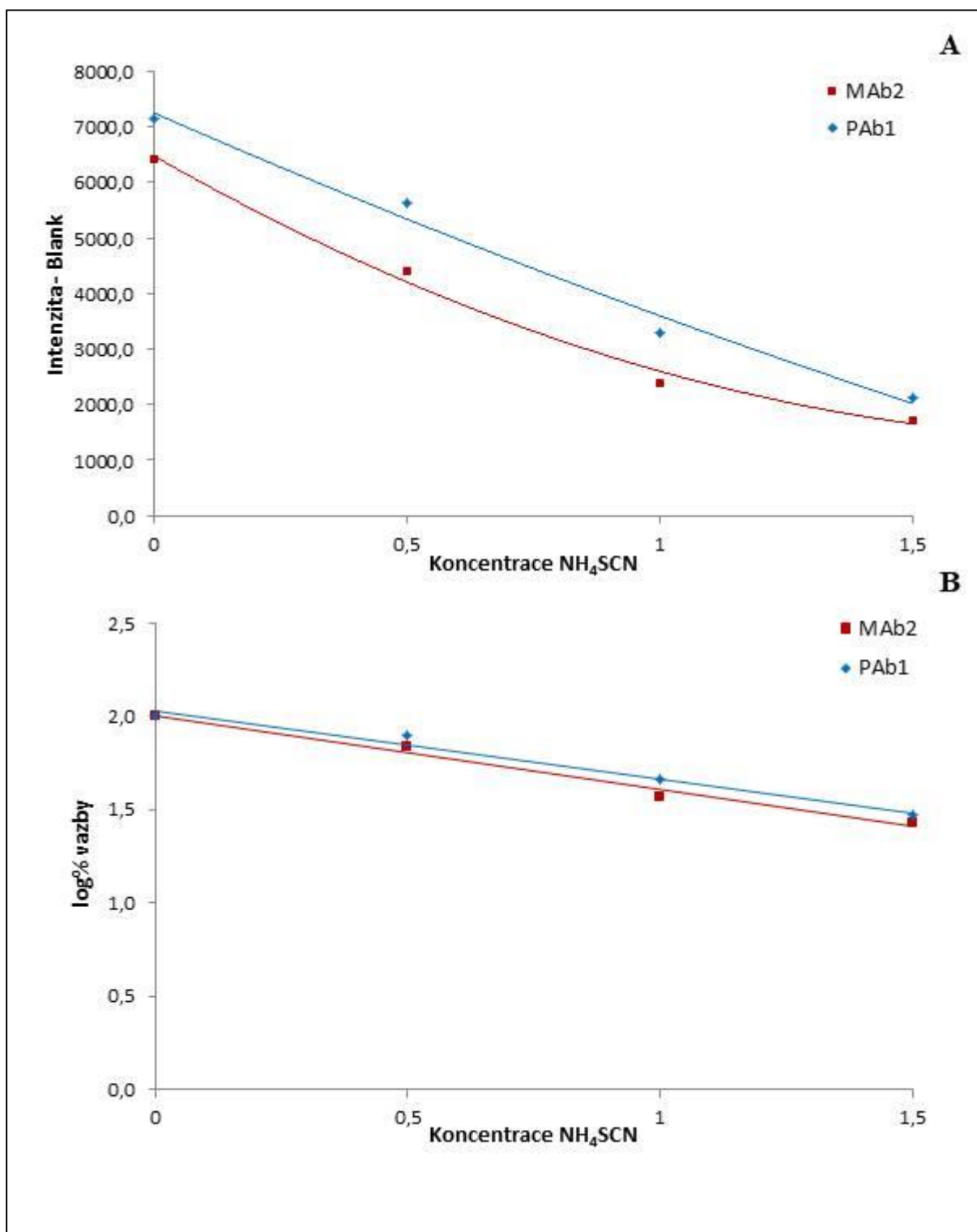
4.2.2 Porovnání vybraných protilátek

Pro porovnáním avidity vybrané polyklonální králičí protilátky anti-ApoE3 IgG (PAb1) a afinity monoklonální myší anti-ApoE3 IgG (MAb2) jsme jako vhodnou koncentraci ApoE, vzhledem k výsledkům ze stanovení meze detekce metody, zvolili 0,01 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Jako slepý vzorek byl použit fosfátový pufr (pH 7,3; 10 mmol.l^{-1}). Obě primární protilátky byly ředěny v poměru 1:3000. Sada roztoků chaotropního činidla NH_4SCN se skládal z roztoků o těchto koncentracích: 0,5; 1 a 1,5 mol.l^{-1} (dávkovací schéma viz obr. 29A). Konjugáty byly ředěny 1:5000. Po denzitometrickém vyhodnocení získaných skvrn byla od naměřených dat odečtena průměrná hodnota příslušného slepého vzorku (fotografie výsledné membrány viz obr. 29B).



Obr. 29: Výsledky srovnání avidity PAb1 a afinity MAb2 na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – použité $c(\text{Ag})$ 0,01 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ jsou uvedeny v mol.l^{-1} ; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Intenzita výsledných skvrn klesá se vzrůstající koncentrací NH_4SCN ; Redění prim. Ab 1:3000, Redění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

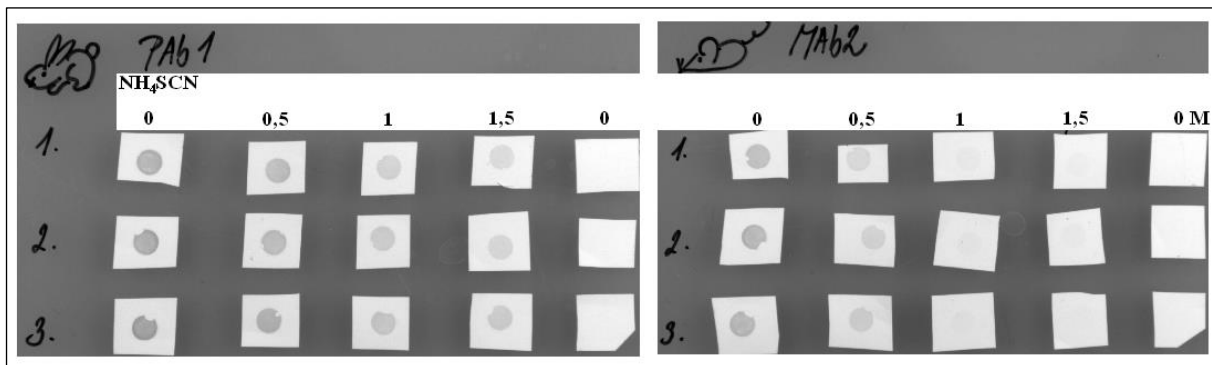
Stanovení bylo provedeno celkem čtyřikrát. Z průměrných hodnot pro jednotlivé koncentrace NH_4SCN vypočítaných ze všech opakování byl sestaven graf závislosti intenzit zbarvení na koncentraci chaotropního činidla (viz obr. 30A). Ze stejných hodnot byla také vypočítána procenta vazby, která byla po zlogaritmování také vynesena do grafu v závislosti na koncentraci chaotropního činidla (viz obr. 30B). Z vynesených závislostí je viditelná značná podobnost obou vyšetřovaných protilátek. U PAb1 byla naměřena vyšší intenzita zbarvení skvrn a také vyšší hodnota slepého vzorku než u MAb2. Vyšší specifity lze tedy dosáhnout s myšími monoklonálními protilátkami.



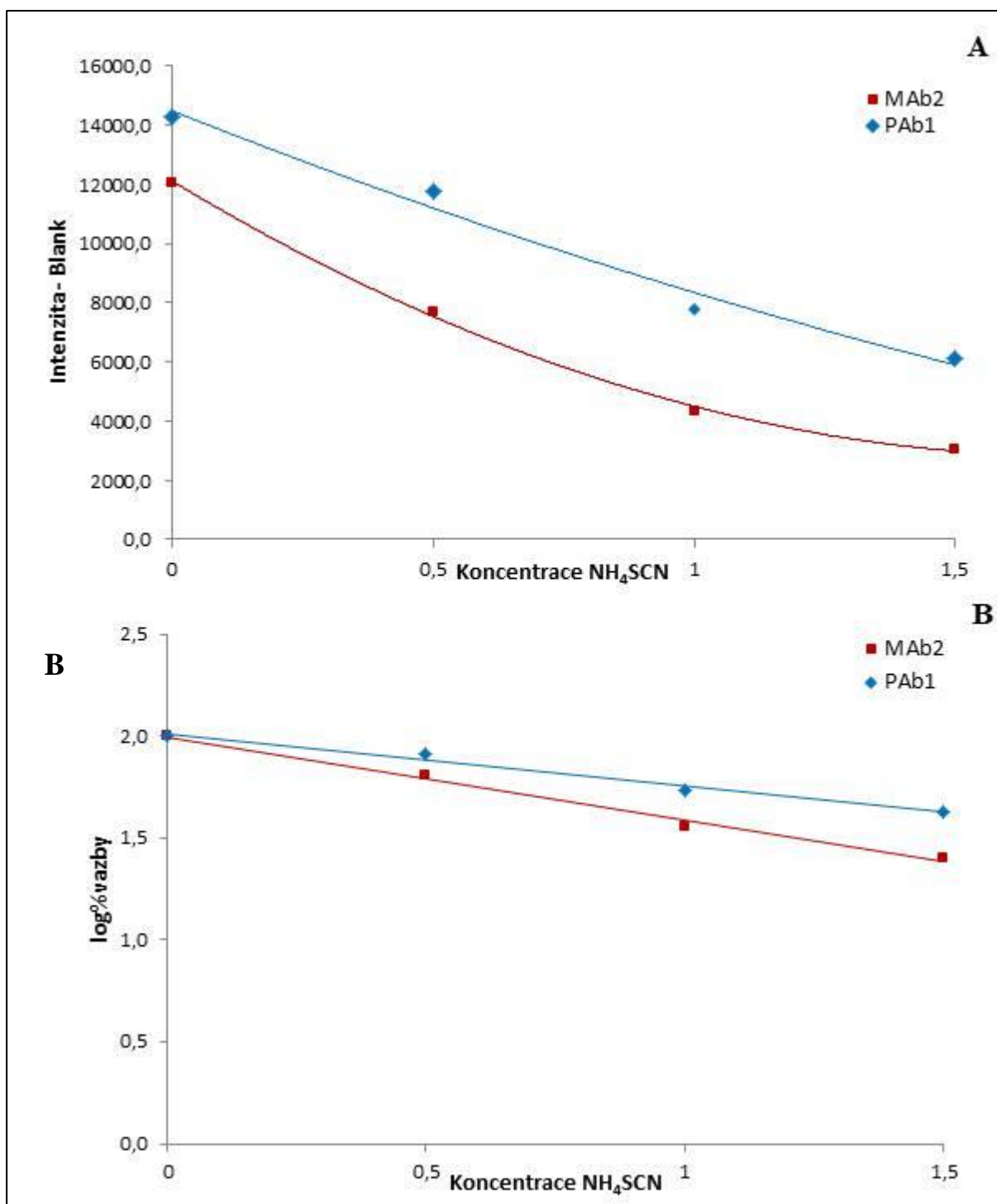
Obr. 30: Grafické znázornění výsledků porovnání avidity PAb1 a afinity MAb2 na prototypu 2; A. Grafická závislost intenzity zbarvení skvrn na koncentraci NH_4SCN – Křivky obou protilátek mají klesající tendenci. U PAb1 byly oproti MAb2 naměřeny vyšší intenzity zbarvení skvrn.; B. Závislost logaritmu procent vazby na koncentraci NH_4SCN – Jak je viditelné z průběhu křivek je avidita PAb1 srovnatelná s afinitou MAb2.; Koncentrace NH_4SCN jsou uvedeny v mol.l^{-1} ; Ředění prim. Ab 1:3000; Ředění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

4.2.3 Ověření výsledků z prototypu 2 afinitním dotblotem

Pro ověření výsledků srovnání avidity PAb1 a afinity MAb2, které byly získány pomocí testovaného zařízení, bylo provedeno srovnání avidity/afinity ve stejném uspořádání i metodou klasického dotblotu s chaotropním činidlem. ApoE byl nanesen na membránu v koncentraci 0,01 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Jako slepý vzorek byl použit fosfátový pufr (pH 7,3; 10 mmol.l^{-1}). Testované protilátky byly ředěny v poměru 1:3000 a konjugáty byly 1:5000. Použité koncentrace chaotropního činidla NH_4SCN byly 0,5; 1 a 1,5 mol.l^{-1} . Pro každou protilátku jsme stanovení provedli v triplicátu (fotografie výsledných membrán jsou na obr. 31). Po detekci bylo provedeno denzitometrické vyhodnocení, od dat byly odečteny průměrné hodnoty odpovídajících slepých vzorků a byly sestaveny grafické závislosti intenzit zbarvení skvrn a dekadických logaritmů procent vazby na koncentraci NH_4SCN (viz obr. 32A a 32B). Výsledné závislosti mají podobný průběh jako ty, které byly získány pomocí testovaného prototypu. U skvrn ošetřených PAb1 byly stejně jako u předchozí metody naměřeny vyšší hodnoty slepých vzorků. Tímto pokusem jsme ověřili správnost dat získaných při použití prototypu 2 a také vzájemnou podobnost obou testovaných protilátek.



Obr. 31: Výsledné PVDF membrány srovnání avidity PAb1 a afinity MAb2 metodou afinitního dotblotu – Skvrny odpovídající MAb2 mají nižší intenzitu než ty odpovídající PAb1.; Koncentrace NH_4SCN jsou uvedeny v mol.l^{-1} ; Ředění prim. Ab 1:3000; Ředění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)



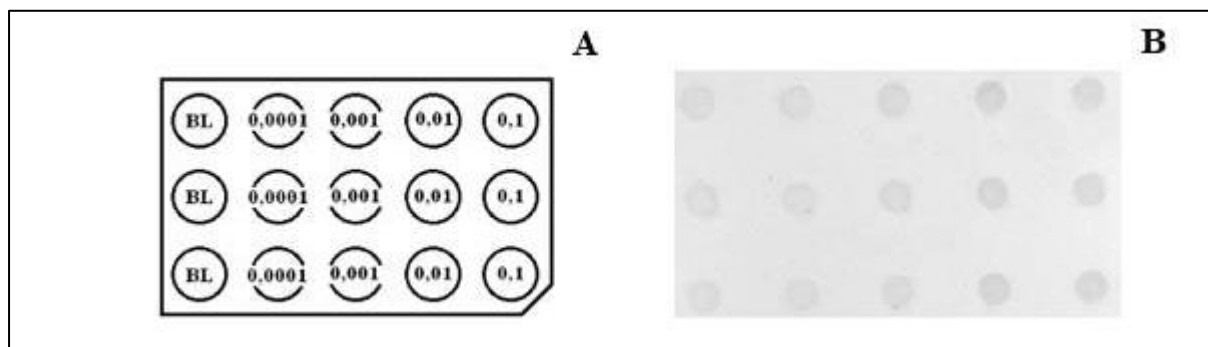
Obr. 32: Grafické znázornění výsledků srovnání avidity PAb1 a afinity MAb2 metodou afinitní dotblot; A. Závislost intenzity zbarvení skvrn na koncentraci NH_4SCN ; B. Závislost logaritmu procenta vazby na koncentraci NH_4SCN – V obou případech klesá závislost pro MAb2 oproti PAb1 rychleji.; Koncentrace NH_4SCN jsou uvedeny v mol.l⁻¹.; Ředění prim. Ab 1:3000, Ředění konjugátů 1:5000

4.3 Porovnání protilátek proti EpCAM na prototypu 2

Další protilátky, jejichž parametry byly porovnávány na vyvíjeném prototypu, jsou namířeny proti adhezivní molekule epiteliálních buněk (EpCAM), jednalo se o klony monoklonálních protilátek HEA 125 (Progen), C10 (Santa Cruz Biotechnology) a 323/A3 (Santa Cruz Biotechnology).

4.3.1 Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce

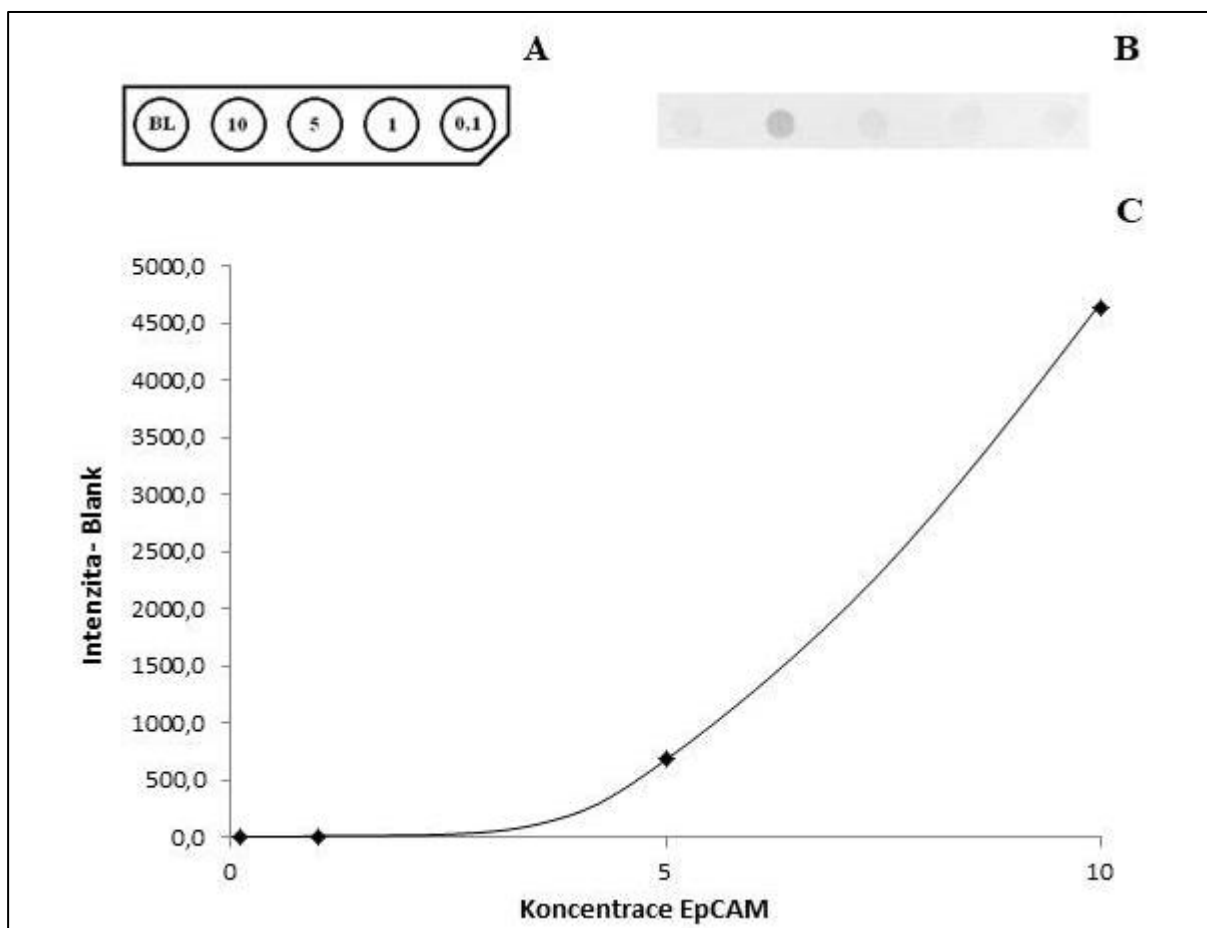
Pro stanovení citlivosti detekce EpCAM pomocí testovaného zařízení byla zvolena řada roztoků antigenu o těchto koncentracích: 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Jako slepý vzorek byl dávkován fosfátový pufr (pH 7,3; 10 mmol.l^{-1}). S ohledem na cenu rekombinantního Ag a jeho spotřebu, bylo stanovení provedeno pouze jednou. Jako primární protilátku jsme použili myší monoklonální protilátku HEA 125 (Progen), která byla ředěna v poměru 1:3000 (koncentrace protilátky tedy byla 0,3 $\mu\text{g}/1\text{ml}$). Konjugát byl ředěn v poměru 1:5000. Po provedení kolorimetrické detekce byla membrána usušena a vyfocena (viz obr. 33B). Po zhodnocení výsledků jsme zjistili, že skvrny na membráně jsou velice světlé a téměř nehodnotitelné.



Obr. 33: Stanovení citlivosti kolorimetrické detekce EpCAM na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – c(Ag) v $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; B. Výsledná PVDF membrána – Získané skvrny jsou velmi světlé.; Prim. Ab: HEA 125 IgG1 (Progen); Ředění 1:3000; Ředění konjugátu: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

Za účelem určení vhodné koncentrace EpCAM pro následné stanovení afinity testovaných protilátek, byla koncentrační řada upravena na tyto hodnoty: 0,1; 1; 5; 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Jelikož jsou tyto koncentrace velmi vysoké, bylo z důvodu šetření materiálem stanovení provedeno pouze v jednom opakování. Primární protilátka HEA 125 (Progen) byla použita ve vyšší koncentraci 1:2000 (koncentrace Ab byla tedy 2 $\mu\text{g}/1\text{ml}$). Ředění konjugátu

zůstalo stejné 1:5000. Po detekci byla membrána vyfocena (viz obr. 34B) a bylo provedeno denzitometrické vyhodnocení. Od naměřených intenzit zbarvení skvrn byla odečtena hodnota intenzity slepého vzorku a z dat byla vynesena závislost intenzit na koncentraci EpCAM (viz obr. 34C). Z grafu vyplývá, že intenzita zbarvení se vzrůstající koncentrací antigenu roste velmi pomalu. Dostatečně vysoká hodnota intenzity zbarvení, vhodná pro účely porovnání afinit protilátek, byla naměřena až u koncentrace EpCAM 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$.



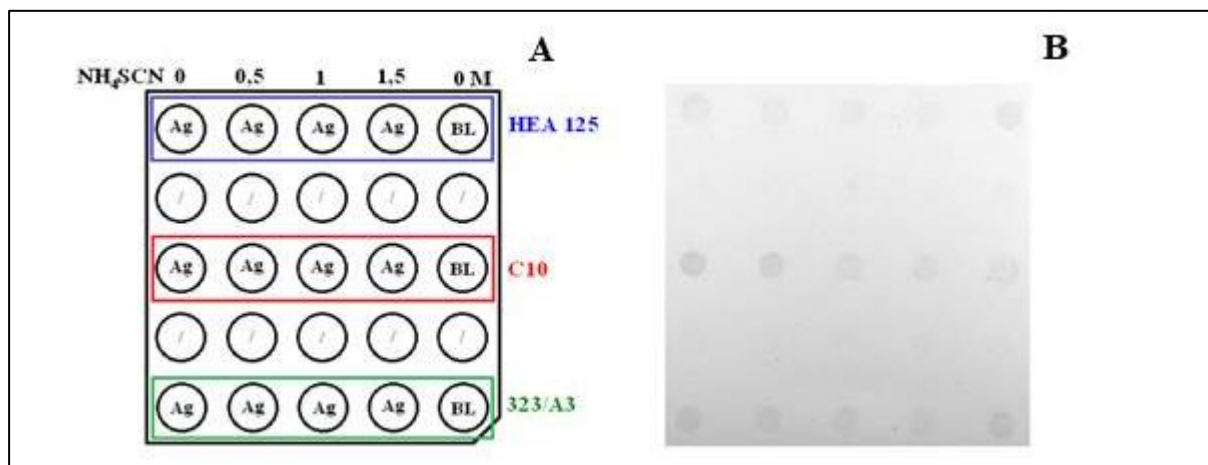
Obr. 34: Výsledky stanovení citlivosti detekce EpCAM na prototypu 2; A. Dávkovací schéma EpCAM – c(Ag) v $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – I přes velké navýšení c(Ag) byla většina skvrn velmi světlá. Dostatečně tmavého zbarvení bylo dosaženo pouze u skvrny s c(Ag) 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$.; C. Grafická závislost naměřené intenzity zbarvení skvrn na koncentraci antigenu – Z průběhu křivky je viditelné, že v oblasti nízkých c(Ag) nedochází k téměř žádnému vzestupu intenzit zbarvení.; Prim. Ab: HEA 125 IgG1 (Progen); Ředění 1:2000; Ředění konjugátu: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

4.3.2 Porovnání afinity tří monoklonálních protilátek

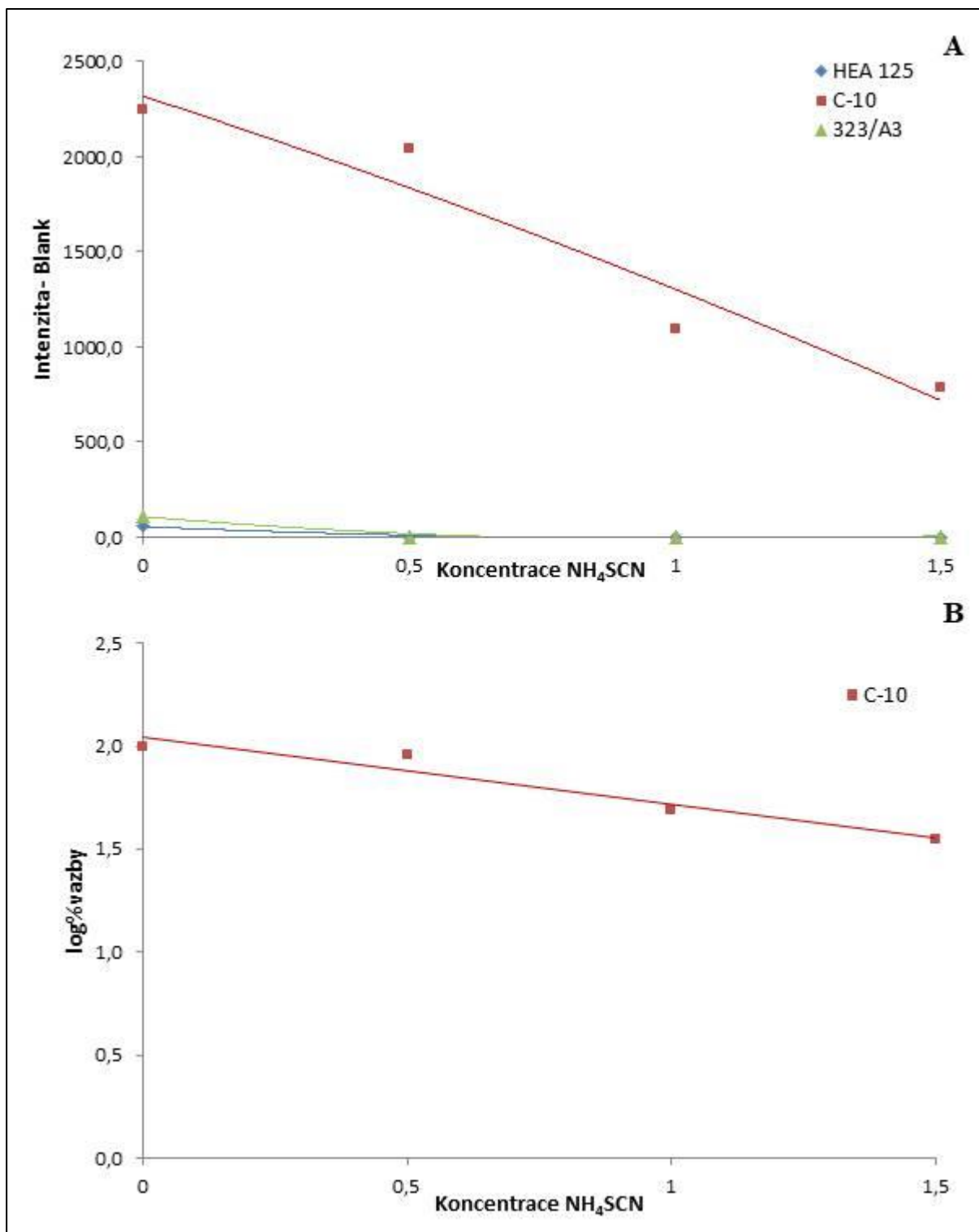
Za pomoci prototypu 2 bylo provedeno porovnání afinity tří vybraných myších monoklonálních protilátek klonů HEA 125 (Progen), C10 (Santa Cruz Biotechnology) a 323/A3 (Santa Cruz Biotechnology). Z výsledků předchozího pokusu stanovení citlivosti metody byla jako vhodná koncentrace antigenu EpCAM určena 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Provedení

stanovení ve více opakováních s tak vysokou koncentrací antigenu by bylo velmi nákladné a v našem případě z důvodu nedostatku EpCAM nebylo možné. Proto byla každá protilátka testována pouze v jednom opakování. Všechny primární protilátky byly ředěny v poměru 1:2000. Jako slepý vzorek byl použit fosfátový pufr (pH 7,3; 10 mmol.l⁻¹). Použitý konjugát byl ředěn v poměru 1:5000. Zvolená koncentrační řada chaotropního činidla NH₄SCN zahrnovala tyto koncentrace: 0,5; 1; a 1,5 mol.l⁻¹. Po usušení byla výsledná membrána vyfocena (viz obr. 35B) a denzitometricky vyhodnocena. Od naměřených intenzit zbarvení jednotlivých skvrn byla odečtena hodnota intenzity příslušného slepého vzorku a byly sestaveny závislosti intenzit na koncentraci NH₄SCN (36A).

Dostatečně tmavého zbarvení skvrn bylo dosaženo pouze u klonu Ab C10 (Santa Cruz Biotechnology), pouze pro tuto protilátku tedy byla vypočítána procenta vazby a jejichž dekadický logaritmus byl vynesena v závislosti na koncentraci NH₄SCN do grafu (obr. 36B).



Obr. 35: Výsledky porovnání afinity monoklonálních protilátek proti EpCAM na prototypu 2; A. Dávkovací schéma - koncentrace NH₄SCN jsou uvedeny v mol.l⁻¹; B. Výsledná PVDF membrána – Intenzita zbarvení skvrn se vzrůstající c(NH₄SCN) u všech testovaných Ab klesá. Dostatečně tmavé zbarvení mají pouze skvrny odpovídající klonu C10 (Santa Cruz Biotechnology). Skvrny ostatních protilátek byly nehodnotitelné.; c(Ag) - 10 µg/100 µl; Ředění prim. Ab: 1:2000; Ředění konjugátu: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)



Obr. 36: Grafické znázornění výsledků porovnání afinity monoklonálních protilátek proti EpCAM na prototypu 2; A. Závislost intenzity zbarvení skvrn na $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ – Intenzita zbarvení skvrn pro protilátky klonů HEA 125 a 323/A3 je oproti klonu C10 téměř nulová a to i v případě skvrn, které nebyly ošetřeny chaotropním činidlem.; B. Závislost logaritmu procenta vazby na $c(\text{NH}_4\text{SCN})$; $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ jsou uvedeny v mol.l^{-1} .

Výsledky naznačují, že ze všech tří testovaných protilátek se dostatečně váže pouze klon C10 (Santa Cruz Biotechnology). Pro ověření správnosti výsledků by bylo vhodné stanovení afinity ještě zopakovat. Dále je nutné vzít v potaz i stáří a skladování protilátek, jejichž funkce mohla být těmito faktory značně ovlivněna. S ohledem na cenu antigenu a protilátek však již bylo od dalších experimentů upuštěno a je možné, že čerstvé by reagovaly zcela jinak. Nicméně pokud porovnáváme tyto konkrétní klony, jediný použitelný je klon C10 od (Santa Cruz Biotechnology).

4.4 Porovnání protilátek proti bakteriálním antigenům na prototypu 2

Jednou z velkých výhod použití membrány pro zafixování antigenu je, že antigen může být v různé formě, ať už rekombinantní či purifikovaný protein, buněčný lyzát, neupravený vzorek např. séra nebo suspenze buněk (eukaryotických či prokaryotických). V této diplomové práci jsme použili suspenze bakteriálních buněk jako přirozený zdroj antigenu pro paralelní porovnání vlastností protilátek proti různým patogenům vyskytujícím se v kravském mléce. Jednalo se o pět protilátek proti *Salmonella* Typhimurium, tři protilátky proti *Listeria monocytogenes* a dvě proti *Escherichia coli*. U všech protilátek byla nejprve určena optimální koncentrace bakteriálních buněk, pak se provedlo paralelní porovnání vlastností protilátek a následně se testovala zkřížená reaktivita vybraných protilátek s jinými bakteriálními kmeny. Následovalo zhodnocení, které protilátky jsou pro další aplikaci nejvhodnější. Zakoupené protilátky se používají pro imunomagnetické vychytávání bakteriálních buněk z mléka v rámci projektu LOVEFOOD2.

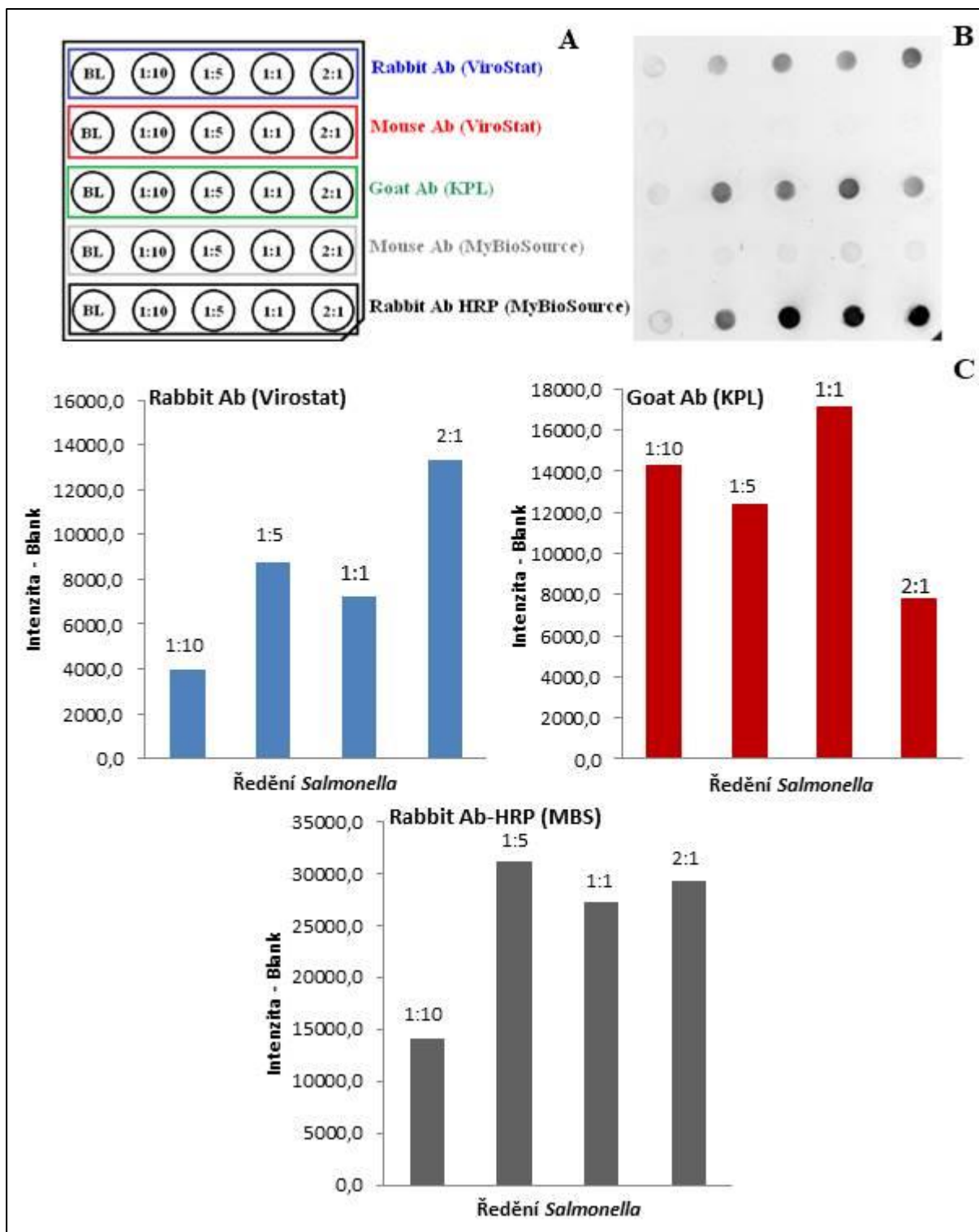
4.4.1 Srovnání vlastností vybraných protilátek proti *Salmonella* Typhimurium

Nejprve jsme provedli stanovení optimální koncentrace bakteriálních buněk na prototypu 2. Suspenze buněk (1,5 MacFarlanda v PBS pufru pH 7,4) *Salmonella* Typhimurium byla ředěna PBS pufrům v těchto poměrech: 1:10; 1:5; 1:1 a 2:1. Tyto roztoky byly, společně se slepými vzorky (PBS pufr pH 7,4), naneseny na membránu podle dávkovacího schématu znázorněného na obr. 37A. Bylo testováno těchto pět protilátek: polyklonální králičí protilátky (ViroStat), monoklonální myší protilátky (ViroStat), koží polyklonální protilátky (KPL), monoklonální myší protilátky (MyBioSource) a králičí polyklonální protilátky značené HRP (MyBioSource). Všechny protilátky byly naředěny tak,

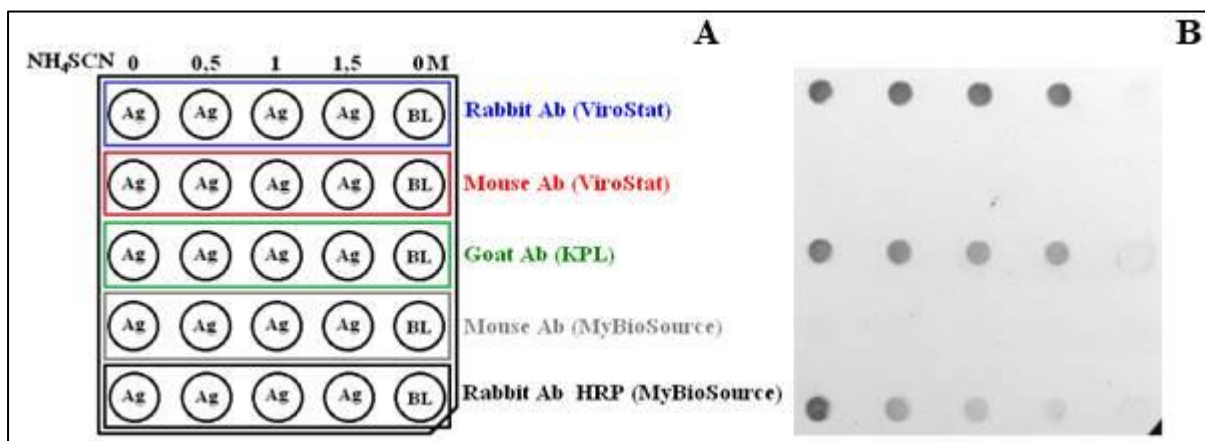
aby jejich koncentrace byla 1 µg/ml (tedy v poměru 1:1000). Použité konjugáty byly ředěny PBS-T pufrům v poměru 1:5000. Primární králičí protilátka od firmy MyBioSource byla už značená HRP, proto byl do jamek ošetřených touto protilátkou místo konjugátu dávkován pouze čistý PBS-T pufr. Po detekci byla membrána vysušena, vyfocena a bylo provedeno denzitometrické vyhodnocení. Od naměřených intenzit zbarvení skvrn byla odečtena odpovídající hodnota slepého vzorku a z výsledných dat byly sestaveny grafy závislosti intenzity zbarvení na množství bakteriálních buněk (viz obr. 37C).

Intenzita obou testovaných monoklonálních myších protilátek byla téměř nulová, proto nebyly pro tyto protilátky závislosti sestaveny. U značené králičí protilátky od firmy MyBioSource byla naměřena velmi vysoká intenzita zbarvení spot už při ředění suspenze buněk 1:5, při vyšších koncentracích buněk začala intenzita zbarvení skvrn klesat a nereprezentovala tak skutečné množství buněk. Vzhledem k těmto skutečnostem bylo pro srovnání avidity a afinity pěti testovaných protilátek zvoleno ředění suspenze buněk v poměru 1:5 (tedy 1 díl suspenze a 5 dílů PBS pufru pH 7,4), při kterém vykazovaly dostatečně tmavé zbarvení i skvrny ošetřené polyklonální primární protilátkou od firmy ViroStat i polyklonální kozí protilátky od firmy KPL.

Následně jsme provedli porovnání vlastností testovaných protilátek pomocí afinitního uspořádání na prototypu 2. Pro tento pokus bylo použito zjištěné optimální ředění suspenze bakteriálních buněk (1:5), všechny protilátky byla ředěny na koncentraci 1 µg/ml (tedy v poměru 1:1000) a i ředění konjugátů zůstalo stejné (1:5000). Zvolená řada roztoků chaotropního činidla NH₄SCN byla složena z těchto koncentrací: 0,5; 1 a 1,5 mol.l⁻¹. Po kolorimetrické detekci byla membrána usušena, vyfocena (viz obr. 38B) a denzitometricky vyhodnocena. Od získaných intenzit zbarvení skvrn byla odečtena hodnota odpovídajícího slepého vzorku. Stanovení bylo provedeno celkem třikrát. Z průměrných hodnot dat získaných v jednotlivých opakováních byly sestaveny závislosti intenzit zbarvení a logaritmů procent vazby na koncentraci NH₄SCN (viz obr. 39).



Obr. 37: Výsledky určení optimální koncentrace bakteriálních buněk *Salmonella* Typhimurium na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – poměry ředění suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda); B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Zbarvení skvrny ošetřených myšími protilátkami ViroStat a MyBioSource je velmi světlé., C. Grafy závislosti intenzity zbarvení skvrn na koncentraci bakteriálních buněk pro kozí protilátku KPL a králičí protilátku ViroStat a MyBioSource.; Ředění prim. Ab: 1:1000; Ředění konjugátů: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

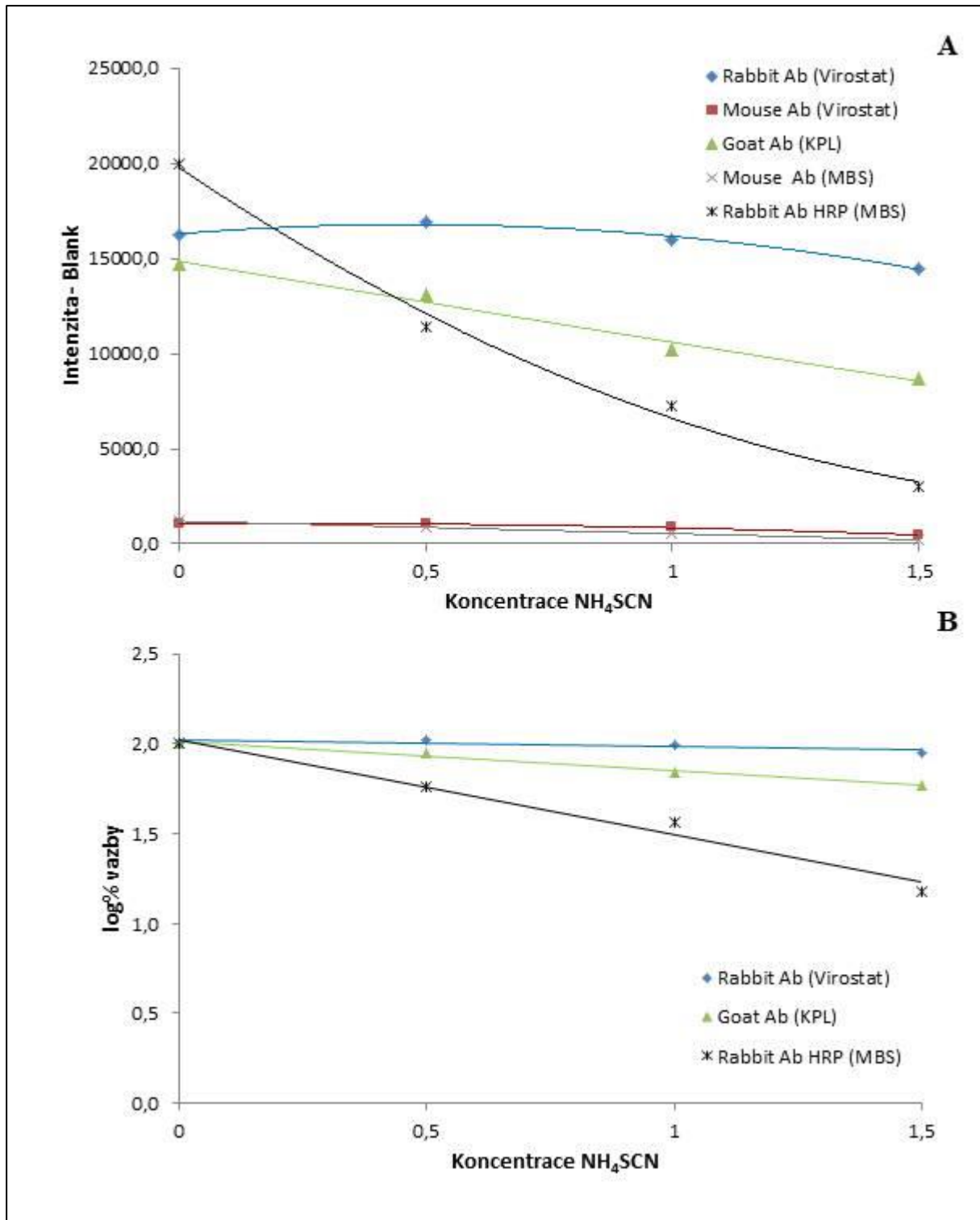


Obr. 38: Výsledky porovnání afinity protilátek proti *Salmonella* Typhimurium na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ jsou uvedeny v mol.l^{-1} ; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Intenzita zbarvení skvrn se vzrůstající $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ klesá. V detekčních oblastech myších protilátek ViroStat a MyBioSource nejsou viditelné téměř žádné skvrny.; Ředění suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda): 1:5; Ředění prim. Ab 1:1000; Ředění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

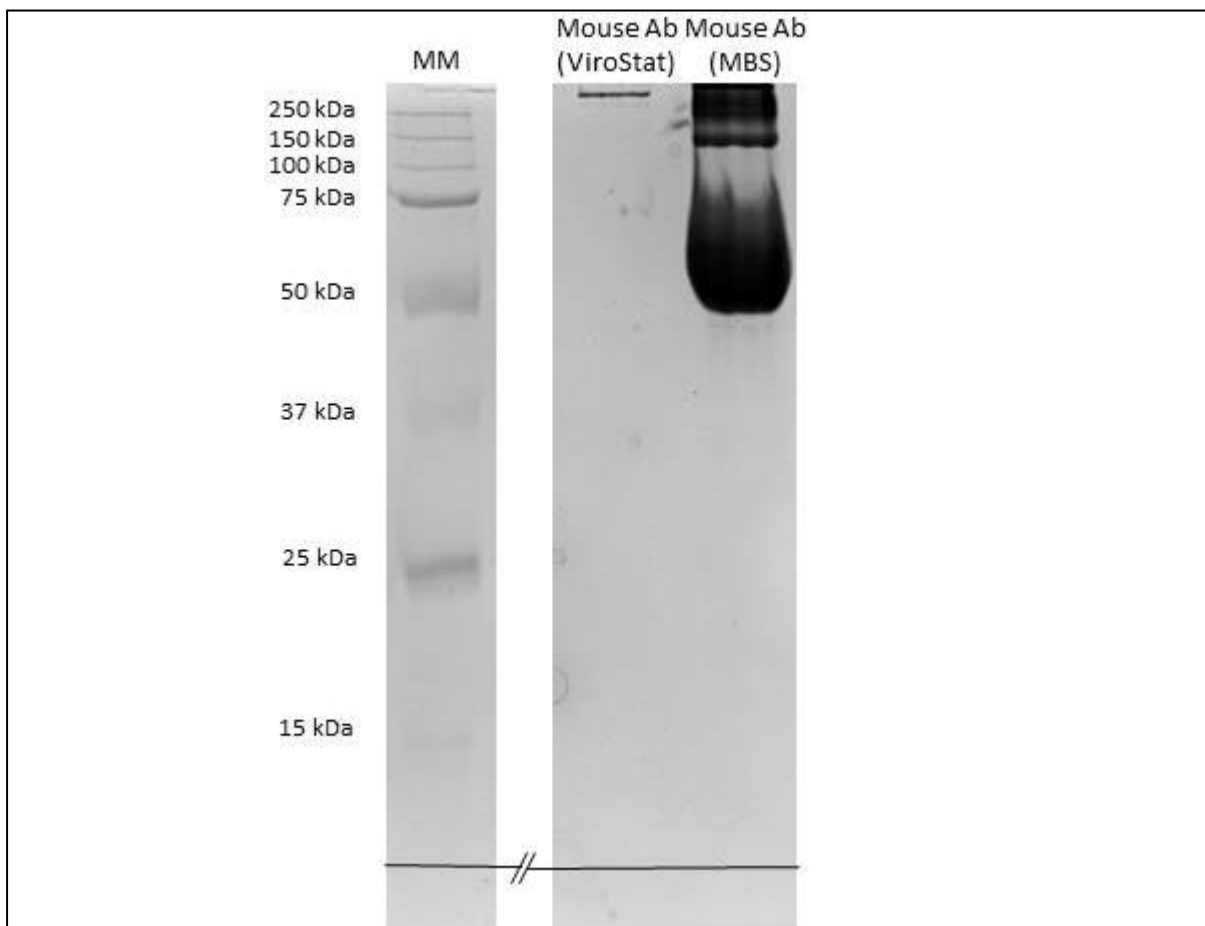
Z grafického vyhodnocení naměřených intenzit zbarvení skvrn (obr. 39A) je zřejmé, že intenzity skvrn ošetřených myšími monoklonálními protilátkami (od firem ViroStat a MyBioSource) jsou mnohem nižší než u skvrn ošetřených polyklonálními protilátkami a to do té míry, že nemělo smysl provádět s nimi vyhodnocení. Pro ověření stavu těchto protilátek byla provedena elektroforéza na 12% polyakrylamidovém gelu s dodecyl sulfátem sodným (1 $\mu\text{g}/\text{jamku}$). Na výsledné fotografii gelu (obr. 40) je proužek u protilátky od firmy ViroStat v oblasti znázorňující celé molekuly IgG (150 kDa), oproti očekávání u dávkované koncentrace, téměř neviditelný. U protilátky od firmy MyBioSource je sice o poznání vyšší koncentrace molekul IgG, na gelu se ale objevují tmavé proužky i v oblastech 50 kDa, které pravděpodobně odpovídají těžkým řetězcům IgG. Důvody proč protilátky ve vzorku nejsou, či jsou částečně rozpadlé, může být více (nekvalitní šarže od výrobce, nevhodné skladování Ab před odesláním, při transportu či po převzetí protilátek).

Zhodnocením ostatních polyklonálních protilátek z hlediska závislosti intenzit zbarvení na koncentraci chaotropního činidla bylo zjištěno, že nejméně klesající závislost vykazují králičí protilátky (ViroStat), následně kozí protilátky (KPL) a nejvíce klesá intenzita zbarvení u značených králičích protilátek, ačkoliv signál u vzorku bez přídavku chaotropního činidla byl nejvyšší (MyBioSource). Z grafů závislosti logaritmu procent vazby na koncentraci NH_4SCN je viditelné, že největší aviditu k buňkám *Salmonella* Typhimurium vykazují králičí protilátky (ViroStat), jejichž vazba nebyla působením chaotropního činidla téměř ovlivněna. O něco hůře, i když stále velmi dobře, odolávaly působení NH_4SCN kozí

protilátky (KPL) a nejvíce byla NH_4SCN ovlivněna vazba značených králíčích protilátek HRP (MyBioSource).

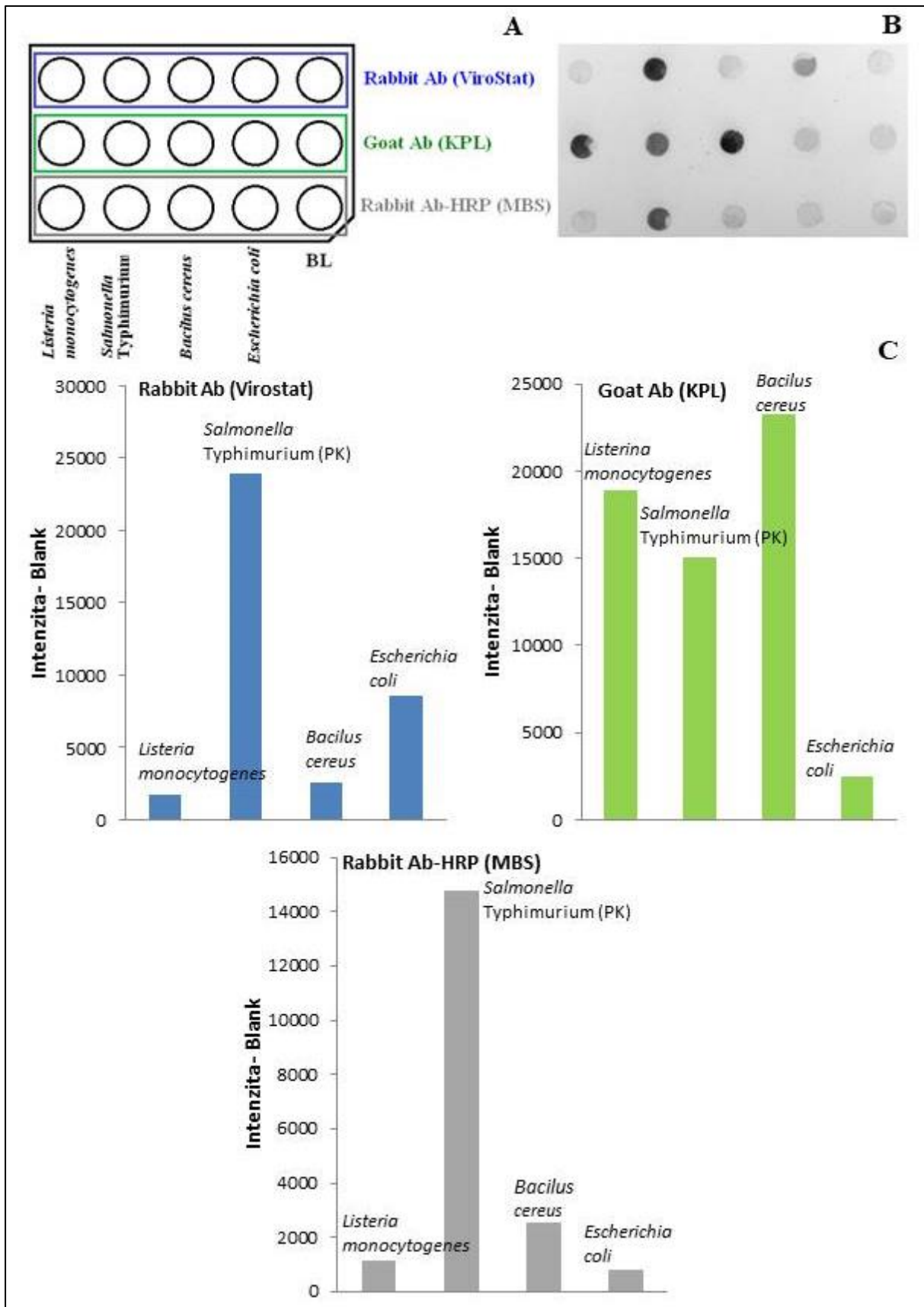


Obr. 39: Grafické znázornění výsledků porovnání afinity a avidity protilátek proti *Salmonella* Typhimurium na prototypu 2; A. Závislost intenzity zbarvení skvrn na $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ – Intenzity odpovídající myším monoklonálním protilátkám ViroStat a MyBioSource jsou oproti ostatním velmi nízké.; B. Závislost logaritmu procent vazby na $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ – Z průběhu křivek je vidět, že nejvyšší afinitu mají králíčí Ab ViroStat o něco menší kozí Ab KPL a nejnižší králíčí značené Ab MyBioSource.



Obr. 40: Fotografie polyakrylamidového gelu SDS elektroforézy myších monoklonálních protilátek od firem ViroStat a MyBioSource – V oblasti 150 kDa není, na rozdíl od Ab MyBioSource, u Ab ViroStat viditelný proužek znázorňující celé molekuly IgG. U Ab MyBioSource je navíc, v rozmezí molekulových hmotností 50 – 75 kDa pruh, který odpovídá rozpadlým molekulám IgG. I přesto, že byly obě testované protilátky ředěny stejně, skutečná koncentrace IgG je u Ab MyBioSource mnohem vyšší.; SDS PAGE elektroforéza: 12% dělicí gel a 5% zaostřovací gel; MM – molekulový marker; barveno AgNO₃

Pro otestování, zda vybrané králičí protilátky (ViroStat a MyBioSource) a kozí protilátka (KPL) reagují pouze s antigeny na povrchu buněk *Salmonella* Typhimurium, jsme u nich provedli zkoušku křížové reaktivity. Na membránu jsme tedy, mimo buněk *Salmonella* Typhimurium (PK), nanесли ještě buňky *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Escherichia coli*, které sloužily jako kontrola křížové reaktivity. Stejně jako při ostatních stanoveních jsme nejprve připravili suspenzi buněk (1,5 MacFarlanda) všech použitých druhů mikroorganismů, kterou jsme následně naředili PBS pufrem (pH 7,4) v poměru 1:5. Na membránu byly testované protilátky naneseny tak, jak je znázorněno na dávkovacím schématu na obr. 41A. Po kolorimetrické detekci byly získané skvrny denzitometricky vyhodnoceny a z dat byly sestaveny grafy (viz obr. 41C).



Obr. 41: Výsledky testování křížové reaktivity protilátek proti *Salmonella* Typhimuriu na prototypu 2; A. Dávkovací schéma - suspenze všech bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda) byla ředěna v poměru 1:5; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Pozitivní kontrola (PK) se nachází ve druhém sloupci., C. Grafy naměřených intenzit zbarvení po reakci testovaných Ab s vybranými kmeny bakterií.; U králíčích Ab (ViroStat) je vidět mírná zkřížená reakce s *E. coli* a u kozích Ab (KPL) silná zkř. reaktivita s *L. monocytogenes* a *B. cereus*.; Ředění prim. Ab: 1:1000; Ředění konjugátů: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

Z hlediska křížové reaktivity dopadly nejlépe značené králičí protilátky (MyBioSource), u kterých byla naměřena intenzita zbarvení skvrny odpovídající *Salmonella* Typhimurium nejtmaší. U všech ostatních bakteriálních kmenů bylo v případě této protilátky zbarvení výrazně nižší. Králičí protilátky (ViroStat) vykazovaly pouze mírnou zkříženou reaktivitu i s *Escherichia coli*. Na opak zkřížená reaktivita ve vysoké míře byla pozorována v případě kozích protilátek (KPL), u kterých naměřená intenzita u *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus* dokonce převyšovala intenzitu naměřenou u skvrn se *Salmonella* Typhimurium.

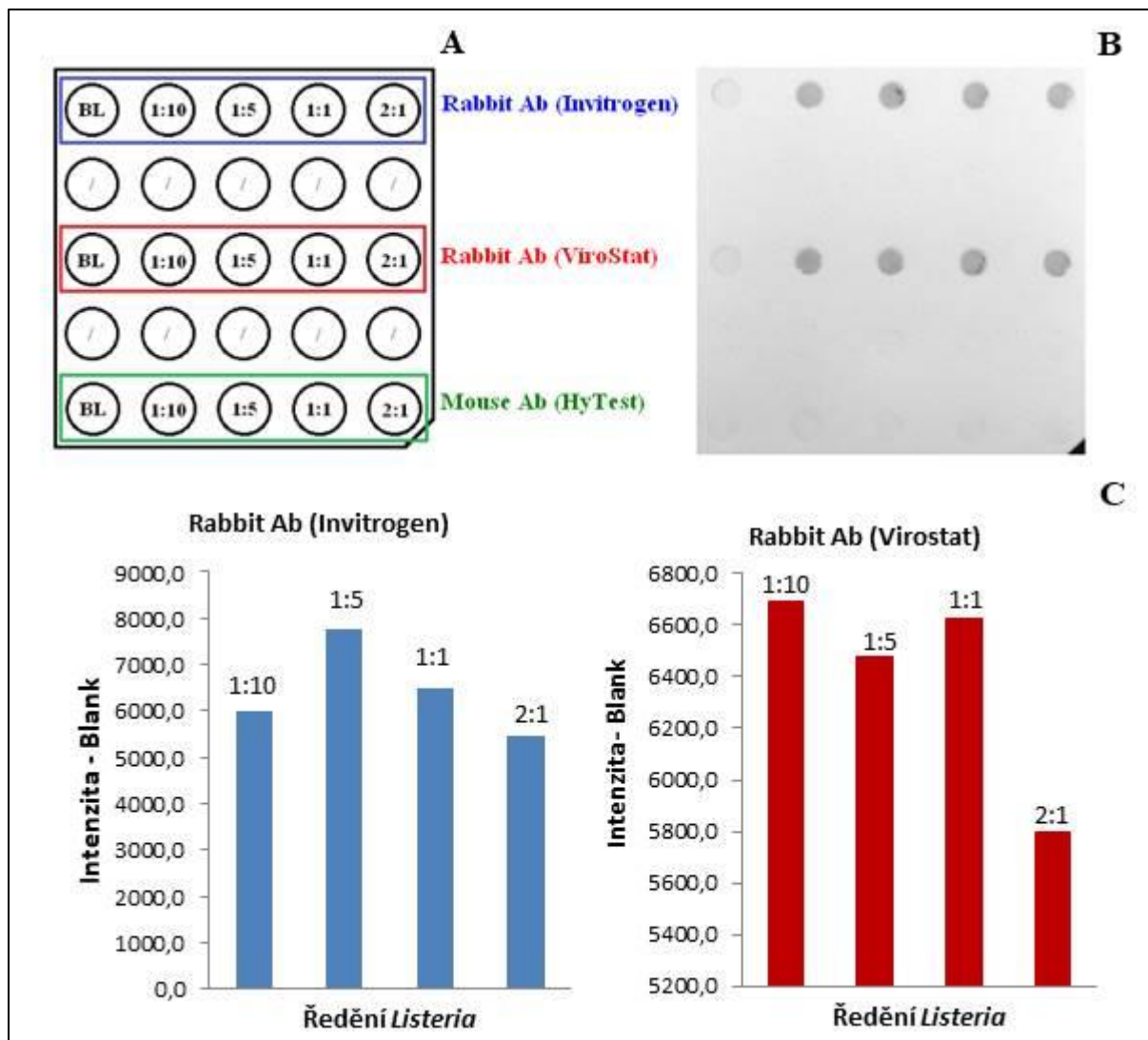
Pro další využití, například k vazbě na magnetické nosiče, bychom s ohledem na výsledky provedených experimentů (vysoké aviditě, nižší ceně a mírné zkřížené reaktivitě) doporučili spíše králičí polyklonální protilátky od firmy ViroStat než kozí polyklonální protilátky KPL, ačkoliv jejich avidita k antigenu byla srovnatelná s králičími [90, 91].

4.4.2 Srovnání vlastností vybraných protilátek proti *Listeria monocytogenes*

Jako další v pořadí byly, s využitím imobilizace bakteriálních buněk na membráně, testovány dvojce polyklonální králičí protilátky od firem Invitrogen a ViroStat a jedny monoklonální myší protilátky od firmy HyTest všechny se specifitou proti *Listeria monocytogenes*. Analogicky jako u porovnání vlastností protilátek proti *Salmonella* Typhimurium (kap. 4.4.1) bylo nejprve stanoveno optimální ředění suspenze buněk. Suspenze bakteriálních buněk v PBS pufru (pH 7,4), která odpovídala bodu 1,5 MacFarlandovy zákalové stupnice, byla naředěna stejným pufrem v poměrech 1:10, 1:5, 1:1 a 2:1. Tyto roztoky byly společně s čistým PBS pufrem (pH 7,4), jako slepým vzorkem, nanášeny na membránu podle dávkovacího schéma zobrazeného na obr. 42A. Všechny primární protilátky byly ředěny na koncentraci 1 µg/ml (tedy 1:1000) a konjugáty v poměru 1:5000. Po detekci byla membrána vysušena, vyfocena (obr. 42B) a bylo provedeno denzitometrické vyhodnocení získaných skvrn. Od naměřených hodnot intenzit byly odečteny hodnoty odpovídajících slepých vzorků a z konečných dat byl sestaven graf se závislostmi intenzit zbarvení skvrn na koncentraci bakteriálních buněk pro každou protilátku (obr. 42C).

Z fotografie membrány a vynesných grafických závislostí je viditelné, že intenzita zbarvení skvrn po aplikaci monoklonální myší protilátka (HyTest) je velmi podobná hodnotě slepého vzorku. Pro tuto protilátku tedy nemělo smysl sestavovat výše zmíněnou závislost. Na její kvalitě se pravděpodobně odrazily podmínky jejího skladování. Pro srovnání avidity

polyklonálních protilátek bylo jako optimální vybráno ředění suspenze bakteriálních buněk 1:5, kdy byla u obou protilátek ViroStat naměřená dostatečně vysoká intenzita, která mohla být použita pro porovnání jejich avidity/afinity. U menších ředění výchozí suspenze buněk docházelo u obou králičích protilátek k plató efektu.

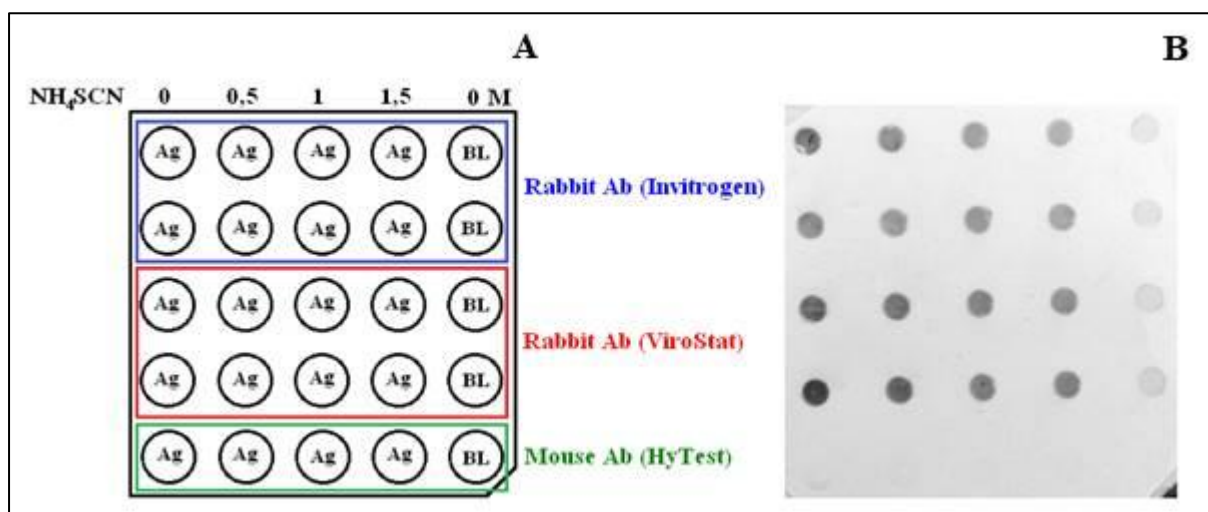


Obr. 42: Výsledky stanovení optimální koncentrace bakteriálních buněk *Listeria monocytogenes* na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – poměr ředění suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda); B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Zbarvení skvrn ošetřených myší protilátkou HyTest je velmi světlé.; C. Grafy závislosti intenzity zbarvení skvrn na koncentraci bakteriálních buněk pro králičí protilátky Invitrogen a ViroStat.; Ředění prim. Ab: 1:1000; Ředění konjugátů: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

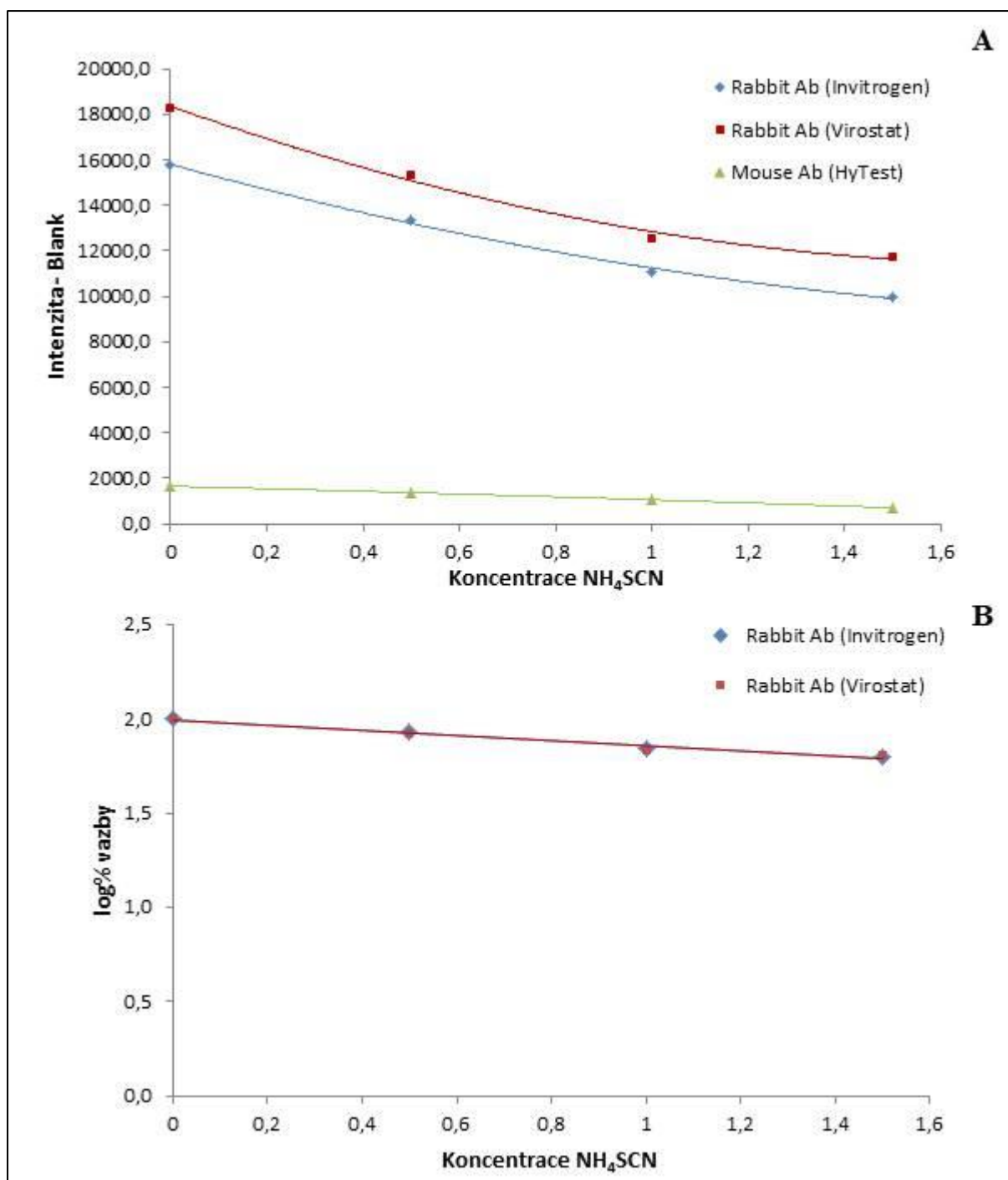
Zjištěné optimální ředění suspenze buněk bylo následně použito při srovnávání avidity a afinity testovaných protilátek. Všechny primární protilátky byly ředěny na koncentraci 1 µg/ml, konjugáty byly ředěny v poměru 1:5000 a použitá koncentrační řada chaotropního činidla zahrnovala tyto koncentrace NH₄SCN: 0,5; 1 a 1,5 mol.l⁻¹. Dávkování všech roztoků je popsáno na dávkovacím schématu (obr. 43A). Po kolorimetrické detekci byla membrána

usušena a vyfocena (obr. 43B) a následně denzitometricky vyhodnocena. Pro obě králičí polyklonální protilátky bylo stanovení provedeno v duplikátu. Myší protilátky byly na membránu dávkovány pouze v jednom opakování z důvodu velmi nízkých intenzit zbarvení skvrn naměřených při stanovení optimální koncentrace bakteriálních buněk. Celý pokus byl dvakrát opakován a z průměrných hodnot byly sestaveny závislosti intenzit a logaritmu procenta vazby na koncentraci NH_4SCN (obr. 44A a 44B).

Podle grafu závislosti intenzit skvrn na koncentraci NH_4SCN je zřejmé, že nejvyšší intenzity dosahují skvrny ošetřené králičí polyklonální protilátkou od firmy ViroStat, o něco světlejší zbarvení měly skvrny po aplikaci králičí polyklonální protilátky firmy Invitrogen. Odezva myších monoklonálních protilátek HyTest byla opakovaně velmi nízká, stejně jako při stanovení optimálního ředění suspenze buněk. Ze zobrazeného grafu závislosti logaritmu procent vazby obou polyklonálních protilátek je jasné, že jejich avidita k antigenům na povrchu buněk *Listeria monocytogenes* je stejná.

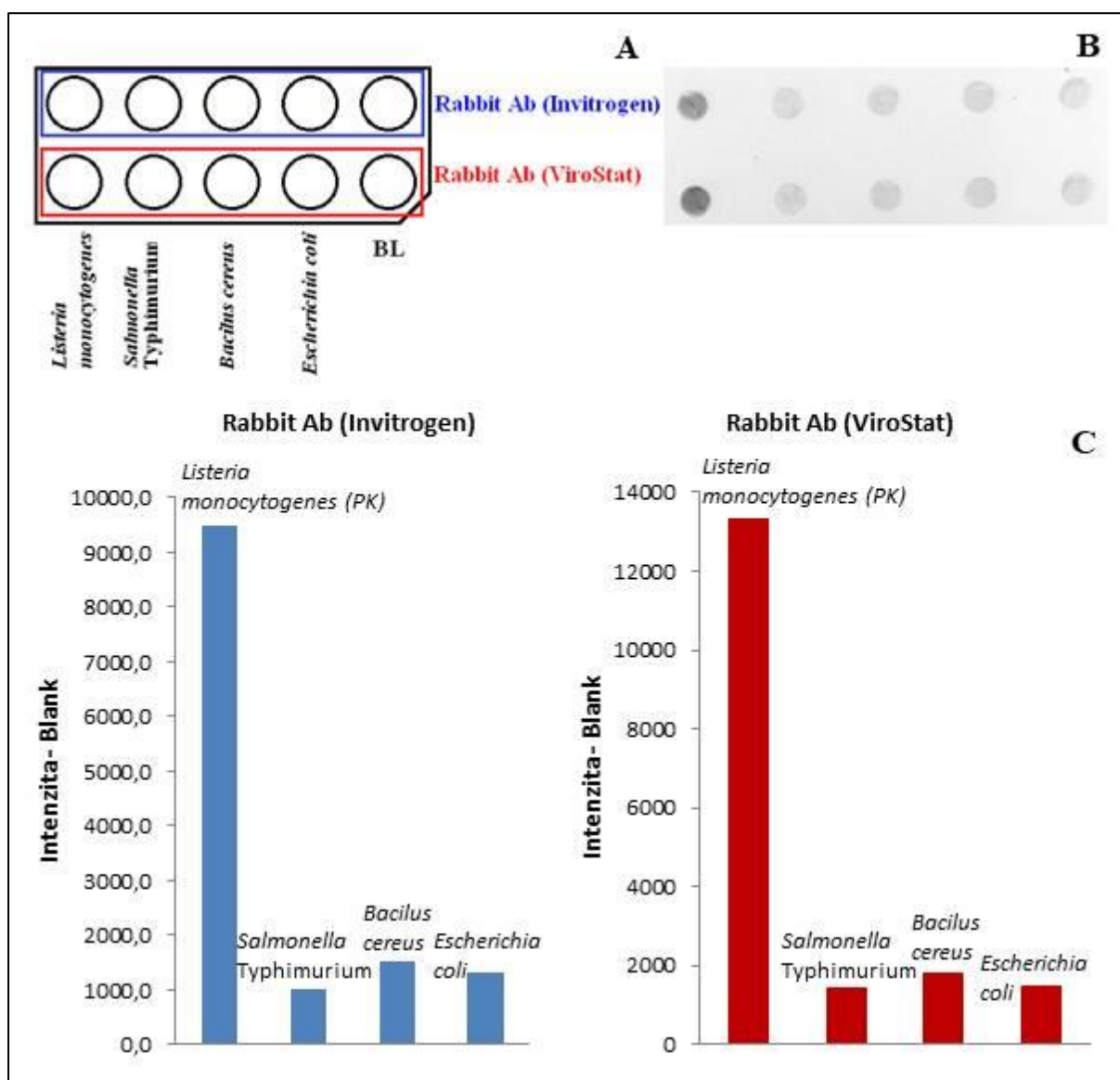


Obr. 43: Výsledky porovnání avidity a afinity protilátek proti *Listeria monocytogenes* na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ jsou uvedeny v mol.l^{-1} ; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Intenzita zbarvení skvrn se vzrůstající $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ klesá. Skvrny po aplikaci myší Ab (HyTest) jsou téměř neviditelné.; Ředění suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda): 1:5; Ředění prim. Ab: 1:1000; Ředění konjugátů: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)



Obr. 44: Grafické znázornění výsledků porovnání afinity a avidity protilátek proti *Listeria monocytogenes* na prototypu 2; A. Závislost intenzity zbarvení skvrn na $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ – Intenzity zbarvení naměřené u skvrn po aplikaci myší protilátky HyTest jsou mnohem nižší než hodnoty intenzit naměřené u ostatních skvrn.; B. Závislost logaritmu procent vazby na $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ – Křivky vynesené pro obě testované králičí protilátky se překrývají.

Podobně jako u protilátek proti *Salmonella* Typhimurium jsme testovali také zkříženou reaktivitu u obou králíčích protilátek proti *Listeria monocytogenes* s kmeny bakterií: *Salmonella* Typhimurium, *Bacillus cereus* a *Escherichia coli*. Připravené suspenze bakteriálních buněk všech kmenů (1,5 MacFarlanda) jsme naředili v poměru 1:5 PBS pufr (pH 7,4) a podle dávkovacího schématu (obr. 45A) jsme je nanесли na membránu. Po kolorimetrické detekci byly získané skvrny denzitometricky vyhodnoceny a pro každou protilátku byl sestaven graf, který znázorňuje velikost naměřené intenzity zbarvení skvrn u každého bakteriálního kmene (obr. 45C).



Obr. 45: Výsledky testování křížové reaktivity protilátek proti *Listeria monocytogenes* na prototypu 2; A. Dávkovací schéma - suspenze všech bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda) byla ředěna v poměru 1:5; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Pozitivní kontrola (PK) se nachází v prvním sloupci.; C. Grafy naměřených intenzit zbarvení po reakci testovaných Ab s vybranými kmeny bakterií – U obou testovaných protilátek nebyla odhalena nijak výrazná zkřížená reaktivita s vybranými bakteriálními kmeny. Výsledky získané u obou protilátek jsou si velice podobné.; Ředění prim. Ab 1:1000; Ředění konjugátů: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

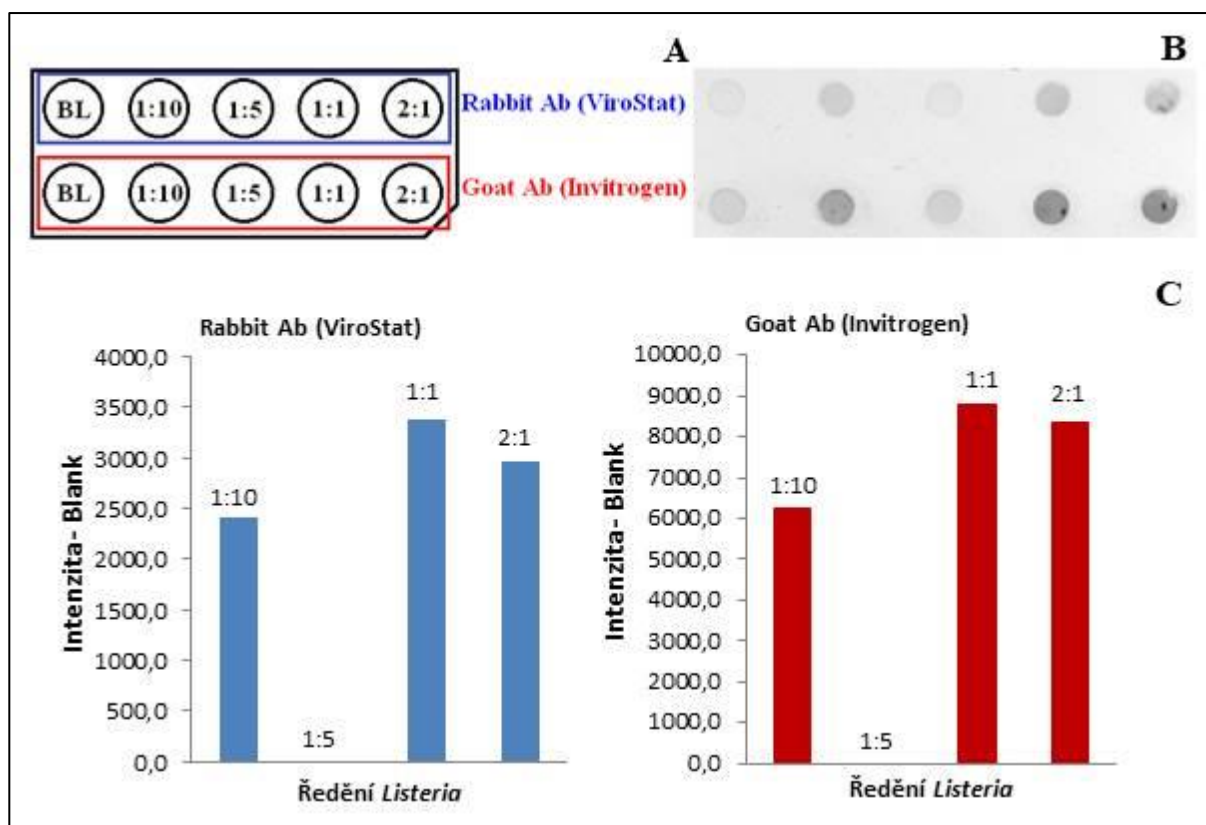
Intenzita skvrn naměřená u obou testovaných protilátek v detekční oblasti *Listeria monocytogenes* byla mnohem vyšší než intenzita zbarvení detekčních oblastí u ostatních bakterií. Můžeme tedy říci, že obě testované protilátky s použitými bakteriálními kmeny nevykazují nijak zvlášť vysokou zkříženou reaktivitu. Znovu se tedy potvrdila velká podobnost těchto protilátek, což dokazují i výsledky srovnání jejich avidit.

Pro další použití, vzhledem k dosaženým výsledkům testování, by byly bez pochyby vhodné polyklonální protilátky od obou firem (ViroStat i Invitrogen). S ohledem na výrazně nižší cenu králíčích protilátek ViroStat, bychom ale doporučovali právě je [92, 93].

4.4.3 Srovnání vlastností vybraných protilátek proti *Escherichia coli*

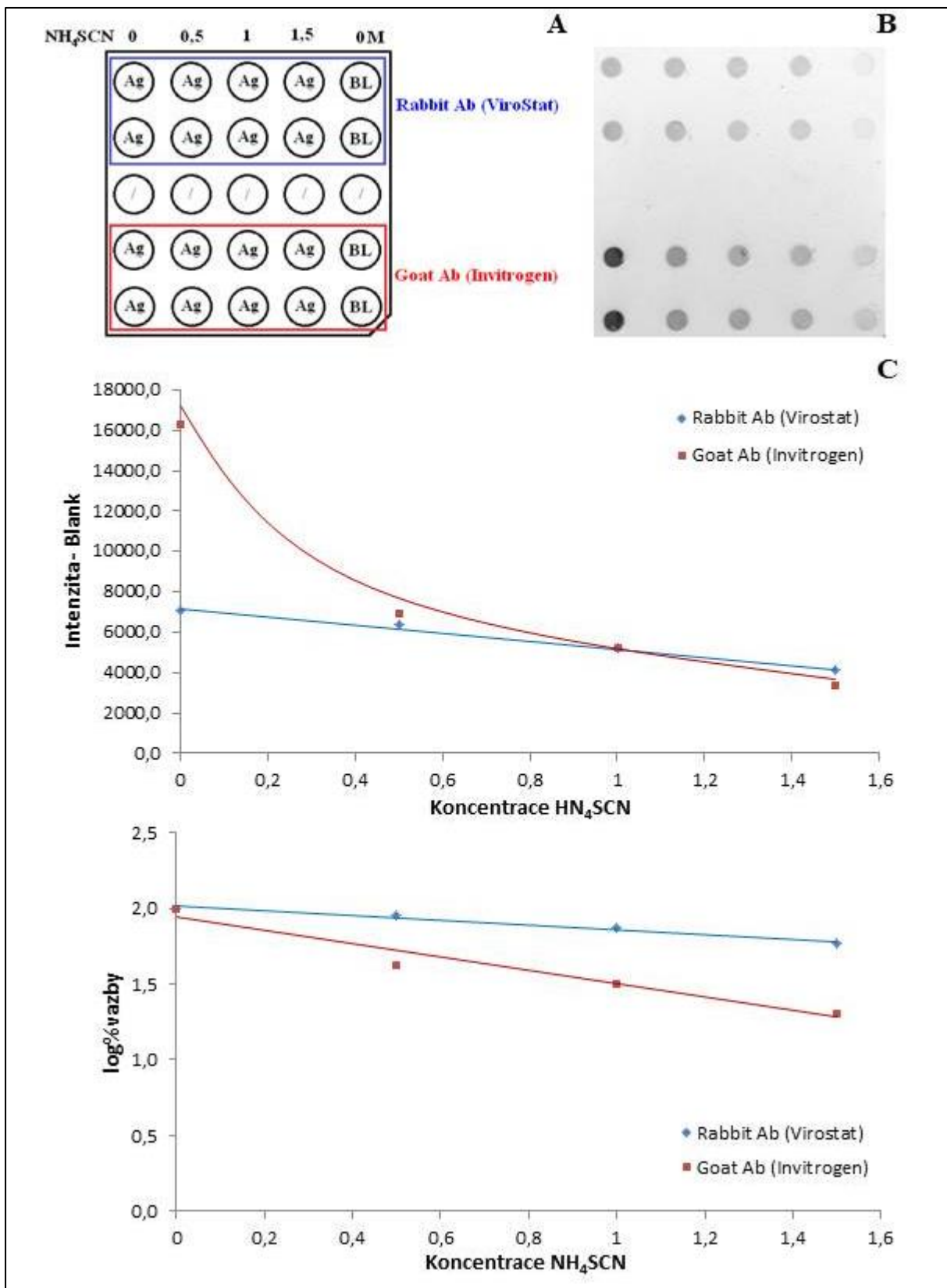
Na závěr bylo na prototypu 2 provedeno srovnání vlastností dvou polyklonálních protilátek se specifitou proti *Escherichia coli* (králíčí od firmy ViroStat a kozí od firmy Invitrogen). Postupovali jsme stejně, jako u předchozích experimentů s bakteriálními buňkami (kap. 4.4.1 a 4.4.2). Nejprve jsme stanovili optimální ředění připravené suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda). Tu jsme naředili PBS puftrem (pH 7,4) v poměrech 1:10, 1:5, 1:1 a 2:1 a společně s čistým PBS puftrem (pH 7,4), jako slepým vzorkem, jsme tyto roztoky nanесли na membránu podle dávkovacího schéma zobrazeného na obr. 46A. Obě primární protilátky byly ředěny na koncentraci 1 µg/ml (tedy 1:1000) a ředění konjugátů bylo 1:5000. Po detekci byla membrána usušena, vyfocena (obr. 48B) a bylo provedeno denzitometrické vyhodnocení získaných skvrn. Po odečtení příslušných hodnot slepých vzorků od naměřených intenzit, byl pro každou protilátku sestaven graf závislost intenzity zbarvení skvrn na koncentraci bakteriálních buněk (obr. 46C).

Z fotografie výsledné membrány a zobrazených grafů je vidět, že nejvyšší intenzita zbarvení spot byla v případě obou testovaných protilátek naměřena při ředění suspenze bakteriálních buněk 1:1. Toto ředění jsme tedy vybrali jako nejvhodnější pro srovnání avidit testovaných protilátek i pro stanovení jejich zkřížené reaktivity.



Obr. 46: Výsledky stanovení optimální koncentrace bakteriálních buněk *Escherichia coli* na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – poměry ředění suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda); B. Fotografie výsledné PVDF membrány – U obou testovaných protilátek byla nejvyšší intenzita zbarvení skvrn naměřena u ředění suspenze bakteriálních buněk 1:1. Intenzity skvrn naměřené u ředění 1:5 byly u obou protilátek nižší než hodnota slepého vzorku.; Ředění prim. Ab 1:1000; Ředění konjugátů: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

Pro srovnání avidit, byly obě testované polyklonální protilátky ředěny jako ve většině experimentů na koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$, ředění konjugátů také zůstalo stejné (1:5000). Použili jsme tyto koncentrace NH_4SCN : 0,5; 1 a 1,5 mol.l^{-1} . Dávkování všech roztoků je popsáno na dávkovacím schématu (obr. 47A). Po kolorimetrické detekci byla membrána vyfocena a provedli jsme denzitometrické vyhodnocení získaných skvrn. Od naměřených dat byla odečtena hodnota příslušného slepého vzorku a odpovídající si hodnoty byly zprůměrovány (experiment byl proveden ve třech opakováních). Následně byly sestaveny závislosti intenzity zbarvení skvrn a také dekadického logaritmu procenta vazby na koncentraci NH_4SCN (obr. 47C).



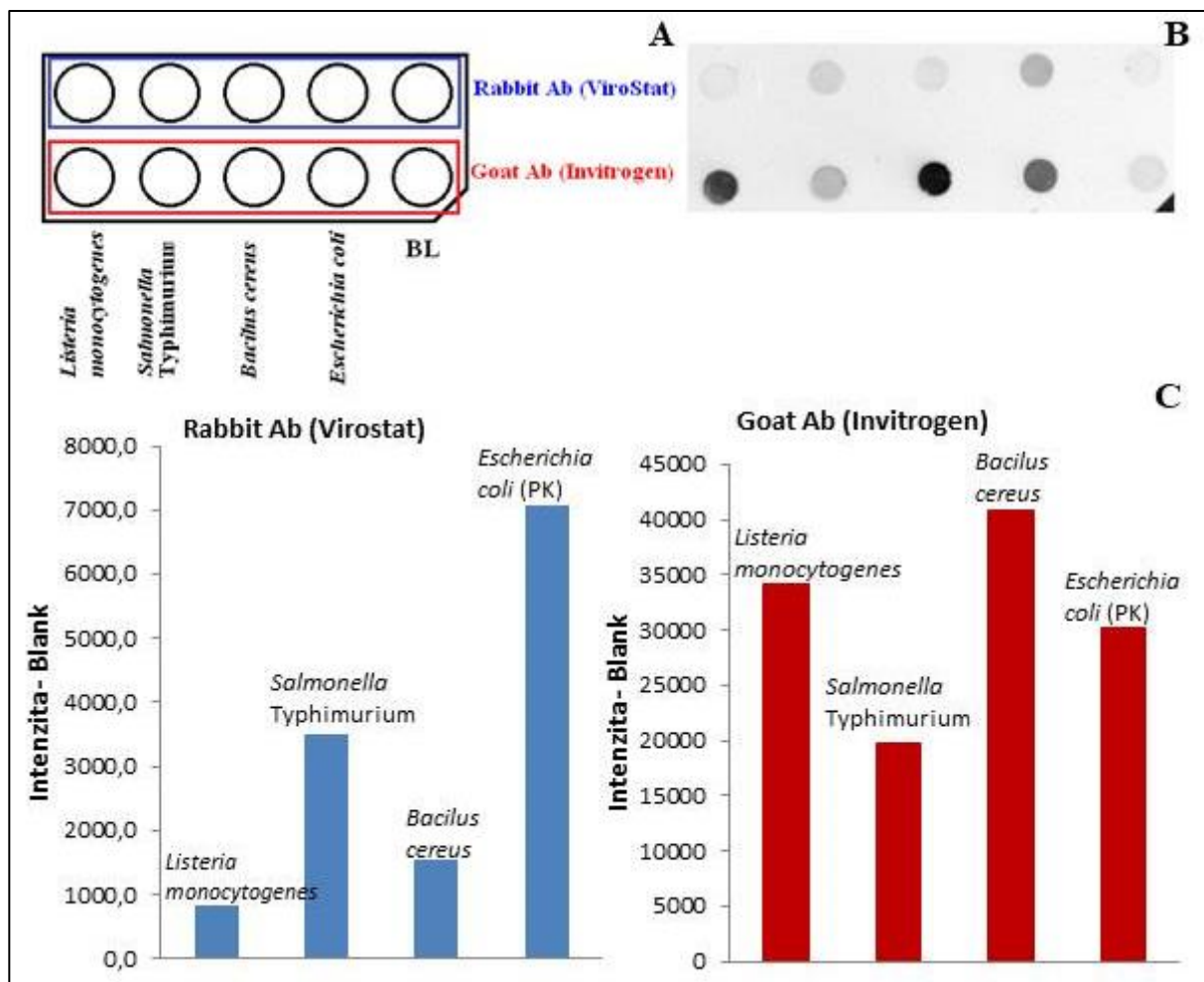
Obr. 47: Výsledky porovnání avidity protilátek proti *Escherichia coli* na prototypu 2; A. Dávkovací schéma – $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ jsou uvedeny v mol.l^{-1} ; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Intenzita zbarvení skvrn klesá se vzrůstající $c(\text{NH}_4\text{SCN})$; C. Grafické závislosti intenzity zbarvení skvrn a dekadického logaritmu procenta vazby na $c(\text{NH}_4\text{SCN})$ – V případě obou zobrazených závislostí klesá rychleji závislost pro kozí protilátku (Invitrogen) než závislosti pro králíčí protilátku (ViroStat); Ředění suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda): 1:1; Ředění prim. Ab 1:1000; Ředění konjugátů 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

Z fotografie výsledné membrány a zobrazených grafů je jasně vidět, že intenzita zbarvení skvrn u kozí protilátky (Invitrogen) rychle klesá se zvyšující se koncentrací chaotropního činidla. Naopak intenzita skvrn po aplikaci králičí protilátky (ViroStat) klesá jen nepatrně. Podobně je tomu také u závislosti dekadického logaritmu procenta vazby na koncentraci chaotropního činidla, kdy křivka znázorňující kozí protilátky (Invitrogen) klesá zřetelně rychleji než křivka pro králičí protilátky (ViroStat). Z výsledků tedy vyplývá, že je vazba králičích protilátek (ViroStat) pevnější.

Cílem posledního experimentu bylo otestovat křížovou reaktivitu obou protilátek s bakteriálními kmeny *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* a *Bacillus cereus*. Všechny připravené suspenze bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda) jsme naředili v poměru 1:1 PBS pufrům (pH 7,4) a podle dávkovacího schématu jsme je nanесли na membránu (obr. 48A). Po kolorimetrické detekci a denzitometrickém vyhodnocení byl pro každou protilátku ze získaných dat sestaven graf znázorňující intenzitu zbarvení skvrn (obr. 48C).

Z výsledků je vidět, že jak králičí protilátky (ViroStat) tak i kozí protilátky (Invitrogen) vykazují středně silnou zkříženou reaktivitu s kmenem *Salmonella Typhimurium*. U kozích protilátek (Invitrogen), však byla navíc prokázána i velmi silná reakce s kmeny *Bacillus cereus* a *Listeria monocytogenes*. Intenzita naměřená v detekční oblasti odpovídající těmto kmenům byla dokonce vyšší než intenzita naměřená u kmene *Escherichia coli*, proti kterému mají být protilátky primárně naměřeny.

Všechny výsledky testování protilátek proti *Escherichia coli* naznačují, že pro další použití by byly vhodnější králičí protilátky (ViroStat), u kterých byla sice naměřena nižší intenzita zbarvení skvrn, ale z hlediska avidity a křížové reaktivity dosahují lepších výsledků.



Obr. 48: Výsledky testování křížové reaktivity protilátek proti *Escherichia coli* na prototypu 2, A. Dávkovací schéma - suspenze všech bakteriálních buněk (1,5 MacFarlanda) byla ředěna v poměru 1:1; B. Fotografie výsledné PVDF membrány – Pozitivní kontrola (PK) se nachází ve čtvrtém sloupci.; C. Grafy naměřených intenzit zbarvení po reakci testovaných Ab s vybranými kmeny bakterií. – U králičí protilátky ViroStat byla odhalena středně silná zkřížená reaktivita pouze s kmenem *Salmonella Typhimurium*, kozí protilátka Invitrogen reagovala se všemi testovanými kmeny (s *Bacillus cereus* a *Listeria monocytogenes* silně a se *Salmonella Typhimurium* středně silně).; Ředění prim. Ab: 1:1000; Ředění konjugátů: 1:5000; Detekce: Opti-4CN (Bio-Rad)

5 Závěr

Hlavním záměrem této práce bylo otestovat nové zařízení, zavést pro něj optimální pracovní postup a nakonec provést srovnání protilátek od různých výrobců s deklarovanou specifitou proti určitému antigenu s cílem určit ty nejvhodnější pro následnou aplikaci.

Jako první byla provedena optimalizace postupu pro klasický dotblot na modelovém systému chymotrypsin a anti-chymotrypsinové prasečí sérum. Postupnou úpravou podmínek stanovení jsme odstranili všechny nežádoucí jevy, jako bylo rozpíjení antigenu mimo detekční oblast, vysoký signál na pozadí nebo narušení vazby antigenu na membránu účinkem Tweenu 20. Pomocí optimálního pracovního postupu jsme na klasickém dotblotu provedli ještě testování citlivosti kolorimetrické detekce chymotrypsinu. Zjištěná mez detekce se pohybovala v rozmezí koncentrací antigenu 0,001 až 0,005 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Z výsledků srovnání vlastností prasečího a beraního anti-chymotrypsinového séra pomocí afinitního dotblotu vyplynulo, že prasečí sérum obsahuje větší množství protilátek, které ale mají oproti těm beraním nižší aviditu. Správnost výsledků tohoto stanovení jsme ověřili metodou ELISA a chaotropním činidlem. Zjistili jsme, že metodou dotblotu může být stanovena asi 200 \times nižší koncentrace chymotrypsinu než metodou ELISA. Další výhodou dotblotu je bezpochyby i relativně krátká doba analýzy. Podle zručnosti analytika je možné získat výsledky už do 4 h od začátku analýzy (v případě metody ELISA je nutné z důvodu dlouhé inkubace při navazování antigenu na povrch mikrotitrační destičky stanovení provádět ve dvou dnech). Cílem této série pokusů bylo sestavit pracovní postup, který se pak pouze s malými změnami přenesl na testovaný prototyp.

V rámci této diplomové práce byly postupně testovány dva prototypy zařízení. Ještě před aplikací ověřeného postupu, byla testována těsnost nové aparatury. Za tímto účelem byla provedena řada experimentů, kdy byl na membránu místo roztoku antigenu nanášen barevný roztok methylované a sledovalo se, jestli nedochází k protékání mezi jednotlivými jamkami. U prvního prototypu byly odhaleny netěsnosti zejména odvodných kanálek, i přesto však byl proveden experiment s modelovým systémem Ag-Ab (chymotrypsin a anti-chymotrypsinové prasečí sérum), jehož výsledky potvrdily, že za pomoci nového zařízení lze provést navázání všech částí imunokomplexu přímo v aparatuře. Na základě vyzorovaných nedostatků prototypu 1 jsme nechali vyrobit prototyp nový, u kterého už nebyly zjištěny žádné problémy s protékáním. Přistoupili jsme tedy k experimentům, které se zabývaly srovnáním vlastností protilátek namířených proti různým antigenům. U každého systému jsme nejprve provedli stanovení citlivosti

detekce, na jejímž základě jsme vybrali nejvhodnější koncentraci Ag pro testování na prototypu 2.

Jako první jsme srovnávali vlastnosti beraního a prasečího anti-chymotrypsinového séra. Stejně jako při testování těchto sér metodou afinitního dotblotu, vykazovaly beraní protilátky vyšší aviditu, ale ve srovnání s prasečími jich v séru bylo menší množství. Během testování anti-chymotrypsinových sér jsme také provedli optimalizaci promývání, které bylo oproti klasicky využívané metodě dotblot výrazně zkráceno. Všechna promytí s 5 min inkubacemi byla postupně nahrazena stejným počtem krátkých promytí a po vytažení z aparatury, ještě před aplikací detekčního roztoku, bylo zavedeno 5 minutové promytí membrány na Petriho misce a orbitální třepače. Tímto jsme docílili zkrácení doby promývání téměř o polovinu.

Jako další jsme testovali dvojici protilátek proti ApoE: polyklonální králíčí anti-ApoE3 IgG a monoklonální myší anti-ApoE3 IgG od firmy Moravian Biotechnology. Z hlediska porovnání avidity/afinity byly u obou protilátek zjištěny srovnatelné vlastnosti. U polyklonální králíčí protilátky však byla opakovaně naměřena vyšší intenzita zbarvení slepého vzorku než u testované monoklonální protilátky. Z tohoto důvodu bychom pro další využití doporučili právě myší monoklonální protilátku anti-ApoE3 IgG.

Při srovnání trojice monoklonálních protilátek se specifitou k EpCAM (HEA 125 IgG1, Progen; EpCAM (C10) IgG1, Santa Cruz Biotechnology; EpCAM (323/A3) IgG1, Santa Cruz Biotechnology) jsme museli na membránu nanést velmi vysoké koncentrace Ag než u předchozích stanovení (asi 1000× více než u porovnání protilátek proti ApoE). S ohledem na vysokou cenu rekombinantního EpCAM antigenu jsme stanovení provedli pouze jednou. Nejlepší výsledky byly získány u monoklonální protilátky klonu C10 (Santa Cruz Biotechnology).

Po ukončení testování protilátek proti proteinovým antigenům jsme ještě provedli řadu experimentů, které se zabývaly testováním protilátek proti Ag na povrchu bakteriálních buněk. S využitím nového zařízení jsme provedli srovnání pěti protilátek proti *Salmonella* Typhimurium (králíčí a myší Ab Virostat; kozí Ab KPL; králíčí značené HRP a myší Ab MyBioSource), tří protilátek proti *Listeria monocytogenes* (králíčí Ab Invitrogen a ViroStat; myší Ab HyTest) a dvou protilátek proti *Escherichia coli* (králíčí Ab Invitrogen a ViroStat). Tato testování byla provedena zejména za účelem vybrat vždy tu nejvhodnější pro další aplikace. Při výběru jsme zohledňovali s jakou specifitou a aviditou/afinitou dané protilátky váží antigen a zda nevykazují zkříženou reaktivitu s jinými kmeny bakterií. Nemalou roli však také hrála cena protilátek.

Z testovaných protilátek proti buňkám *Salmonella* Typhimurium jsme dosáhli hodnotitelných výsledků pouze u tří z pěti testovaných (králíčí Ab ViroStat, kozí Ab KPL a králíčí značené HRP MyBioSource). Jako nejvhodnější bychom doporučili králíčí polyklonální protilátky od firmy ViroStat, které měly ze všech testovaných protilátek nejvyšší aviditu k antigenu a byla u nich zjištěna pouze mírná zkřížená reaktivita s *Escherichia coli*. SDS elektroforézou v polykrylamidovém gelu byl u zbývajících dvojice protilátek prokázán buď rozpad IgG molekul (myší monoklonální Ab ViroStat) nebo velmi malá koncentrace IgG (myší monoklonální Ab MyBioSource). Na kvalitě těchto protilátek se pravděpodobně podepsal i způsob skladování a prošlá doba expirace. Ze tří testovaných protilátek proti *Listeria monocytogenes* (dvoje králíčí polyklonální a jedny myší monoklonální) byly naměřeny dobré výsledky pouze u králíčích protilátek Invitrogen a ViroStat. Tyto protilátky byly z hlediska avidity téměř totožné a ani jedny nevykazovaly nijak výraznou zkříženou reaktivitu s vybranými kmeny bakterií. Vzhledem k nižší ceně bychom však použili protilátky od firmy ViroStat. Z výsledků získaných při testování protilátek proti *Escherichia coli* jsme usoudili, že vhodnější pro další použití by byly králíčí polyklonální protilátky (ViroStat). Oproti druhým testovaným protilátkám (kozí protilátky Invitrogen) vykazovaly vyšší aviditu a středně silnou zkříženou reaktivitu pouze se *Salmonella* Typhimurium.

Pomocí testovaného prototypu jsme dosáhli urychlení a celkového zpříjemnění práce. Až po detekci jsou všechny kroky analýzy prováděny přímo v aparatuře. To přináší výhodu, že již není nutné membránu stříhat a lze se vyhnout zdlouhavé manipulaci při promývání a inkubaci jednotlivých čtverečků s reagensy, zejména při provádění porovnání afinity/avidity protilátek. Během testování zkřížených reaktivit protilátek bylo několikrát ověřeno, že je možné pohodlně provádět analýzu několika různých protilátek a několika různých antigenů v jeden čas na jedné membráně. Použití testovaného prototypu je z pohledu dávkování roztoků chaotropního činidla přesnější než metoda afinitní dot blot, jelikož dochází k odsávání roztoků ze všech jamek najednou. Věříme, že zařízení může najít své nezastupitelné místo ve výzkumných laboratořích, kde se pracuje s protilátkami a klade se zřetel na jejich správný výběr a ověření jejich funkčnosti.

6 SEZNAM ZDROJŮ

- [1] BAKER, M. Blamet it on the antibodies. *Nature*. 2015, **521**(7552), 274-276.
- [2] BEGLEY, C. G. a L. M. ELLIS. Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*. 2012, **483**(7391), 531-533.
- [3] BRADBURY, A. a A. PLUECKTHUN. Standardize antibodies used in research. *Nature*. 2015, **518**(7537), 27-29.
- [4] FREEDMAN, L. P. Antibodies: validate recombinants too. *Nature*. 2015, **518**(7540), 483-483.
- [5] KOIVUNEN, M. E. a R. L. KROGSRUD. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine*. Chicago, USA: Amer. Soc. Clinical Pathology, 2006, **37**(8), 490-497. ISSN 0007-5027.
- [6] DIAMANDIS, E. P. a T. K. CHRISTOPOULOS. *Immunoassay*. San Diego, California: Academic Press, 1996. ISBN 0-12-214730-8.
- [7] YALOW, R. S. a S. A. BERSON. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*. 1959, **184**(4699), 1648-1649. ISSN 0028-0836.
- [8] EKINS, R. P. THE Estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clinica Chimica Acta*. 1960, **5**(4), 453-459. ISSN 0009-8981.
- [9] WIDE, L., H. BENNICH a S. G. JOHANSSON. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet*. 1967, **2**(7526), 1105. ISSN 0140-6736.
- [10] MILES, L. E. M. a C. N. HALES. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature*. 1968, **219**(5150), 186. ISSN 0028-0836.
- [11] CATT, K., H. D. NIALL a G. W. TREGEAR. Solid-Phase Radioimmunoassay of Human Growth Hormone. *Biochemical Journal*. 1966, **100**(3), C31. ISSN 0264-6021.
- [12] KÖHLER, G. a C. MILSTEIN. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, **256**(5517), 495-497. ISSN 0028-0836.

- [13] GÓMEZ-HEN, A. a M. P. AGUILAR-CABALLOS. Trends in Immunoassay Techniques. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. Larkspur, USA: Wiley, 2010 [cit. 2018-02-09]. ISBN 9780470027318.
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a9180/abstract>
- [14] HONEGGER, A. Engineering antibodies for stability and efficient folding. *Therapeutic Antibodies*. , 47-68. ISSN 0171-2004.
- [15] SCHROEDER, H. W. a L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010, **125**(2), S41-S52. ISSN 0091-6749.
- [16] ASAI, D. *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*. Volume 37. San Diego, California: Academic Press, 1993. ISBN 0-12-564137-0.
- [17] Antibody production. *Abcam* [online]. Cambridge, MA, USA: Abcam, 2018 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <http://www.abcam.com/protocols/antibody-production>
- [18] LAGONE, J. J. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *Journal of Immunological Methods*. 1982, **55**(3), 277-296. ISSN 0022-1759.
- [19] PAROLA, C., S. T. a D. Integrating high-throughput screening and sequencing for monoclonal antibody discovery and engineering. *Immunology*. 2018, **153**(1), 31-41. ISSN 0019-2805.
- [20] *Monoclonal Antibody Production: A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies*. Washington, DC: National Academi Press, 1999. ISBN 0-309-51904-7.
- [21] Freund's Adjuvant, Incomplete. *Sigma-Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany: Merck, 2018 [cit. 2018-02-10]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f5506?lang=en&ion=CZ>
- [22] GODING, J. W. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Third edition. Manchester: Academic Press, 1996. ISBN 0-12-287023-9.
- [23] KING, D. J. *Applications And Engineering Of Monoclonal Antibodies*. CRC Press, 1998. ISBN 0-7484-0422-8.

- [24] ZOLLA, H. *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987. ISBN 978-0-8493-6476-1.
- [25] LIPMAN, N. S., L. R. JACKSON, L. J. TRUDEL a F. WEIS-GARCIA. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*. 2005, **46**(3), 258–268.
- [26] SRIVASTAVA, T. a S. SINHA. *Immunology: Antigen*. India Institute of Medical Sciences, Department of Biochemistry. New Delhi.
Dostupné z: <http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/534/1/Antigens.pdf>
- [27] CRUSE, J. M. a R. E. LEWIS. *Atlas of immunology*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, 2004. ISBN 978-1-4200-3994-8.
- [28] HEIDELBERGER, M. The structure of natural and syntetic antigens. *Science*. 1936, **84**(2188), 498-501.
- [29] FERENČÍK, M. *Handbook of Immunochemistry*. London, UK: Springer, 1993. ISBN 978-94-010-4678-7.
- [30] LOPATIN, D. E., D. LABELLE a S. W. LEE. Measurement of relative avidity of antibodies reactive with Porphyromonas-(Bacteroides)-gingivalis in the sera of subjects having adult Periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. USA, 1991, **26**(3), 167-175. ISSN 0022-3484.
- [31] DRESCHER, D. G., N. A. a M. J. Surface Plasmon Resonance (SPR) Analysis of Binding Interactions of Proteins in Inner-Ear Sensory Epithelia. *Methods Mol Biol*. 2009, (493), 323-343. ISSN 978-1-934115-62-6.
- [32] PATCHING, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein – ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2014, **1838**(1), 43-55. ISSN 0005-2736.
- [33] YUSHANOV, S. P., L.T. GRITTER, J. S. CROMPTON a K. C. KOPPENHOEF. *Surface Plasmon Resonance*. Boston: COMSOL, 2012.
- [34] CANOVI, M., J. LUCCHETTI, M. LUCCHETTI, F. RE, D. MOSCATELLI, P. BIGINI, M. SALMONA a M. GOBBI. Applications of Surface Plasmon Resonance

- (SPR) for the Characterization of Nanoparticles Developed for Biomedical Purposes. *Sensors*. 2012, **12**(12), 16420-16432. ISSN 1424-8220.
- [35] SHEEHAN, D. *Physical Biochemistry: Principles and Applications*. 2nd Edition. Chichester, UK: Wiley, 2009. ISBN 978-0-470-85603-1.
- [36] LADBURY, J. E. a M. L. DOYLE. *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. Chichester, England: Wiley, 2004. ISBN 0-470-84968-1.
- [37] SINHA, J. K. a S. BHATTACHARYA. *A Text Book of Immunology*. Kolkata: Academic Publishers, 2006. ISBN 81-89781-09-X.
- [38] WOLFBEIS, O. S. *Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications*. Berlin: Springer-Verlag, 1993. ISBN 13:978-3-642-77374-7.
- [39] CROWTHER, J. R. *The ELISA Guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2001. ISBN 0-89603-728-2.
- [40] WILD, D. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. 4th Edition. Great Britain: Elsevier Science, 2013. ISBN 978-0-08-0970387-0.
- [41] GAN, S. D. a K. R. PATEL. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal Of Investigative Dermatology*. New York: Nature Publishing Group, 2013, **133**(9), E10-E12. ISSN 0022-202X.
- [42] ROSNER, M. H., J. A. GRASSMAN a R. A. HAAS. Immunochemical techniques in biological monitoring. *Enviromental Health Perspectives*. 1991, **94**, 131-134. ISSN 0091-6765.
- [43] IQBAL, H. S., S. SOLOMON, K. G. MURUGAVEL, S. S. SOLOMON a P. BALAKRISHNAN. Evaluation of two indigenous rapid and two ELISA assays for the diagnosis of HIV infection India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2012, **30**(4), 397-402. ISSN 0255-0857.
- [44] ROUET, F., L. DELEPLANCQUE, B. B. MBOUMBA, et al. Usefulness of a Fourth Generation ELISA Assay for the Reliable Identification of HCV Infection in HIV-Positive Adults from Gabon (Central Africa). *Plos one*. 2015, **10**(1). ISSN 1932-6203.

- [45] KATO, H., T. SUGITA, Y. ISHIBASHI a A. NISHIKAWA. Detection and quantification of specific IgE antibodies against eight *Malassezia* species in sera of patients with atopic dermatitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiology and Immunology*. 2006, **50**(11), 851-856. ISSN 0385-5600.
- [46] SCHUBERT-ULLRICH, P., J. RUDOLF, P. ANSARI, B. GALLER, M. FUEHRER, A. MOLINELLI a S. BAUMGARTNER. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **395**(1), 69-81. ISSN 1618-2642.
- [47] WEBER, D., C. CLEROUX a S. B. GODEFROY. Emerging analytical methods to determine gluten markers in processed foods-method development in support of standard setting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **395**(1), 111-117. ISSN 1618-2642.
- [48] IQBA, A., F. SHAH, M. HAMAYUN, A. AHMAD, A. HUSSAIN, M. WAQAS, S. M. KANG a I. J. LEE. Allergens of *Arachis hypogaea* and the effect of processing on their detection by ELISA. *Food & Nutrition Research*. 2016, **60**. ISSN 1654-6628.
- [49] BHOL, K., K. NATARAJAN, N. NAGARWALLA, A. MOHIMEN, V. AOKI a A. R. AHMED. Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: A model for autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*. 1995, **92**(11), 5239-5243. ISSN 0027-8424.
- [50] FARZAN, A., R. M. FRIENDSHIP a C. E. DEWEY. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. *Epidemiology and Infection*. 2007, **135**(2), 238-244. ISSN 0950-2688.
- [51] AMPHLETT, M., D. J. SMITH a R. E. WARREN. An assessment of the Kemble Star700 sample processor for the automation of complement fixation and ELISA tests in a microbiology laboratory. *Journal of Medical Microbiology*. 1991, **35**(4), 249-254. ISSN 0022-2615.
- [52] YOULKEN, R. H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A Practical Tool for Rapid Diagnosis of Viruses and Other Infectious Agents. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1980, **53**(1), 85-92. DOI: 0044-0086.

- [53] SCHUURS, A. H. W. a B. K. VANWEEME. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *Febs Letters*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science BV, 1971, **15**(3). ISSN 0014-5793.
- [54] FREYTAG, J. W., H. P. LAU a J. J. WADSLEY. Affinity-Column-Mediated Immunoassays: Influence of Affinity- Column Ligand and Valency of Antibody-Enzyme Conjugates. *Clinical Chemistry*. 1984, **30**(9), 1494-1498.
- [55] BERESINI, M. H., S. DAVALIAN, S. ALEXANDER, et al. Evaluation of EMIT Cyclosporine Assay for Use with Whole Blood. *Clinical Chemistry*. 1993, **39**(11), 2235-2241.
- [56] HARRIS, S. L., H. TSAO, L. ASHTON, D. GOLDBLATT a P. FERNSTEN. Avidity of the immunoglobulin G response to a *Neisseria meningitidis* group C polysaccharide conjugate vaccine as measured by inhibition and chaotropic enzyme-linked immunosorbent assays. *Clinical and Vaccine Immunology*. Washington, USA: Amer Soc Microbiology, 2007, **14**(4), 397-403. ISSN 1556-6811.
- [57] BHAGANNA, P., R. J. M. VOLKERS, A. N. W. BELL, K. KLUGE, D. J. TIMSON, J. W. MCGRATH, H. J. RUIJSSENAARS a J. E. HALLSWORTH. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. *Microbial Biotechnology*. England, 2010, **3**(6), 701-716. ISSN 1751-7907.
- [58] PULLEN, G. R., M. G. FITZGERALD a C. S. HOSKING. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *Journal of Immunological Methods*. 1986, **86**(1), 83-87. ISSN 0022-1759.
- [59] GASSMANN, C. a G. BAUER. Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections. *Journal of Medical Virology*. 1997, **51**(3), 242-251. ISSN 0146-6615.
- [60] DEVEY, M. E., K. BLEASDALE, S. LEE a S. RATH. Determination of the functional affinity of IgG1 and IgG4 antibodies to tetanus toxoid by isotype-specific solid-phase assays. *Journal of Immunological Methods*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1988, **106**(1), 119-125. ISSN 0022-1759.

- [61] KURIEN, B. T. a R. H. SCOFIELD. Protein blotting: a review. *Journal of Immunological Methods*. 0022-1759, 2003, **274**(1-2), 1-15.
- [62] HELLING, R. B., H. M. GOODMAN a H. V. BOYER. Analysis of endonuclease R single-bond EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *Journal of Virology*. 1974, **14**(5), 1235-1244. ISSN 0022-538X.
- [63] WEILAND, F., C. M. ZAMMIT, F. REITH a P. HOFFMANN. High resolution two-dimensional electrophoresis of native proteins. *Electrophoresis*. 2014, **35**(12-13), 1893-1902. ISSN 0173-0835.
- [64] STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. *Journal of Immunological Methods*. 1989, **119**(2), 153-187. ISSN 0022-1759.
- [65] SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 1975, **98**(3), 503. ISSN 0022-2836.
- [66] AEBERSOLD, R. H., D. B. TEPLow, L. E. HOOD a S. B. H. KENT. Electroblotting onto activated glass - high-efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence-analysis. *Journal of Biological Chemistry*. 1986, **261**(9), 4229-4238. ISSN 0021-9258.
- [67] JENSEN, E. C. The Basics of Western Blotting. *Anatomical Records-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012, **295**(3), 369-371. ISSN 1932-8486.
- [68] Nitrocellulose Membrane, 0.45 µm. Bio-Rad [online]. Bio-Rad Laboratories, 2018 [cit. 2018-02-28].
Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-at/product/nitrocellulose-membrane-0-45-um?ID=9b5b2069-356c-447b-a0fd-cae196945394&ID%253D9b5b2069-356c-447b-a0fd-cae196945394>
- [69] Blotting Membranes and Papers. Bio-Rad [online]. Bio-Rad Laboratories, 2018 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-at/applications-technologies/blotting-membranes-papers?ID=LUSPSJ8UU#2>

- [70] GOERS, J. *Immunochemical Techniques: Laboratory Manual*. San Diego, California: Academic Press, 1993. ISBN 0-12-287048-4.
- [71] STERNBERG, J. a P. JEPPESEN. Dot-Blotting a novel screening assay for antibodies in hybridoma cultures. *Journal of Immunological Methods*. 1983, **64**(1-2), 39-43. ISSN 0022-1759.
- [72] VLČNOVSKÁ, M., K. ŠMERKOVÁ, M. VACULOVICHOVÁ, S. KŘÍŽKOVÁ a R. KIZEK. Detekce nukleových kyselin pomocí dot-blot. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014, **1**, 55-58.
- [73] FOLITSE, R., D. A. HALVORSON a V. SIVANANDAN. A dot immunoblotting assay (dot blot ELISA) for early detection of Newcastle disease antibodies in chickens. *Avian Diseases*. 1998, **42**(1), 14-19. ISSN 0005-2086.
- [74] *Protein Blotting Guide*. Bio-Rad Laboratories. [online]. [cit. 2017-10-26]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf
- [75] *Protein Blotting Handbook: Tips and Tricks*. Sixth Edition. Darmstadt, Germany: EMD Millipore is a division of Merck, 2012. [online]. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: https://www.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/guides/emd-millipore-protein-blotting-handbook-guide.pdf
- [76] Dot and Slot Blotters: Fast sample-to-membrane hybridisation guaranteed for immediate screening. *Scie-Plast* [online]. 2018 [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: http://www.scie-plas.com/Electrophoresis/Blotting_Units/Dot_and_Slot_Blotters.html
- [77] STOTT, D. I. Immunoblotting, dot-blotting, and ELISPOT assays: Methods and applications (Reprinted from *Immunochemistry*, pg 925-948, 1994). *Journal of Immunoassay*. 2000, **21**(2-3), 273-296. ISSN 0197-1522.
- [78] SUM, M. S. H., S. F. YEE, L. ENG, E. POILI a J. LAMDIN. Development of an Indirect ELISA and Dot-Blot Assay for serological detection of Rice Tungro Disease. *Biomed Research International*. 2017. ISSN 2314-6133.

- [79] SINGH, M., R. K. AGRAWAL, B. R. SINGH, S. K. MENDIRATTA, R. K. AGARWAL, M. K. SINGH a D. KUMAR. Development and evaluation of simple Dot-Blot assays for rapid detection of Staphylococcal Enterotoxin-A in food. *Indian Journal of Microbiology*. 2017, **57**(4), 507-511. ISSN 0046-8991.
- [80] CECCHINI, F., L. IACUMIN, M. FONTANOT, P. COMUZZO, G. COMI a M. MANZANO. Dot blot and PCR for *Brettanomyces bruxellensis* detection in red wine. *Food Control*. 2013, **34**(1), 40-46. ISSN 0956-7135.
- [81] CATTO, C., M. GAMBINO, F. CAPPITELLI, D. DUCE, I. BONADUCE a F. FORLANI. Sidestepping the challenge of casein quantification in ancient paintings by dot-blot immunoassay. *Microchemical Journal*. 2017, **134**, 362-369. ISSN 0026-265X.
- [82] RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P., S. M. ARRIBAS, A. L. LOPEZ DE PABLO, M. GONZALEZ, F. ABDERRAHIM a L. CONDEZO-HOYOS. A simple dot-blot-Sirius red-based assay for collagen quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, **405**(21), 6863-6871. ISSN 1618-2642.
- [83] RAYEV, M. B., M. S. BOCHKOVA a P. V. KHRAMTSOV. Dot Blot Assay of Antibodies to *Treponema pallidum*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2014, **457**(1), 149-151. ISSN 1607-6729.
- [84] PATIL, S. A., A. K. KAVITHA, A. P. MADHUSUDAN a M. NETRAVATHI. Comparative evaluation of ELISA and Dot-Blot for the diagnosis of tuberculous meningitis. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*. 2013, **34**(4), 404-413. ISSN 1532-1819.
- [85] ZHANG, Y., M. Y. COYNE, S. G. WILL, Ch. LEVENSON a E. S. KAWASAKI. Single-base mutational analysis of cancer and genetic-diseases using membrane-bound modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 1991, **19**(14), 3929-3933. ISSN 0305-1048.
- [86] LAPPIN, S., J. CAHLIK a B. GOLD. Robot printing of reverse dot blot arrays for human mutation detection. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2001, **3**(4), 178-188. ISSN 1525-1578.

- [87] SVOBODOVA, Z., B. JANKOVICOVA, D. HORAK a Z. BILKOVA. Dot-ELISA Affinity Test: An Easy, Low-Cost Method to Estimate Binding Activity of Monoclonal Antibodies. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*. 2013, **4**(3). ISSN 2155-9872.
- [88] JANKOVIČOVÁ, B., L. HROMÁDKOVÁ, R. KUPČÍK, J. KAŠPAROVÁ, D. ŘÍPOVÁ a Z. BÍLKOVÁ. Quality evaluation of monoclonal antibodies suitable for immunomagnetic purification of native Tau protein. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A*. 2014, **20**, 147 - 163. ISSN 1211 - 5541.
- [89] KUČEROVÁ, J., L. HOLUBOVÁ, B. JANKOVIČOVÁ, V. DVOŘÁKOVÁ, P. MOŤKOVÁ a Z. BÍLKOVÁ. Quality evaluation of commercial anti-Salmonella antibodies for immunomagnetic separation using whole-cell dot blot. *Scientific papers of the University of Pardubice. Series A*. 2013, **19**. ISSN 1211-5541.
- [90] BacTrace® Anti-Salmonella CSA-1 Antibody. SeraCare [online]. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.seracare.com/products/kpl-antibodies-and-conjugates/anti-bacteria-primary-antibodies/bactrace--anti-salmonella-csa-1-antibody/>
- [91] Salmonella sp.** — ViroStat. *ViroStat* [online]. Portland, ME, USA: Virostat, 2018 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.virostat-inc.com/products1/salmonella-sp>
- [92] Listeria monocytogenes Polyclonal Antibody. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Listeria-monocytogenes-Antibody-Polyclonal/PA1-30487>
- [93] Listeria sp.** — ViroStat. *ViroStat* [online]. Portland, ME, USA: Virostat, 2018 [cit. 2018-04-04]. Dostupné z: <https://www.virostat-inc.com/products1/listeria-sp>

7 ZDROJE OBRÁZKŮ

- [1] GÓMEZ-HEN, A. a M. P. AGUILAR-CABALLOS. Trends in Immunoassay Techniques. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. Larkspur, USA: Wiley, 2010 [cit. 2018-02-09]. ISBN 9780470027318.
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a9180/abstract>
- [2] Guide to the structure and classification of antibodies: Antibody structure. *Bio X Cell* [online]. West Lebanon, NH, USA: Bio X Cell, 2018 [cit. 2018-04-06].
Dostupné z: <https://bxccl.com/antibody-structure/>
- [3] SATYANARAYANA, U. a U. CHAKRAPANI. *Biochemistry*. Fourth Revised Edition. New Delhi, India: Elsevier, 2013. ISBN 978-81-312-3601-7.
- [4] PATCHING, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein – ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2014, **1838**(1), 43-55. ISSN 0005-2736.
- [5] SCHASFOORT, R. B. M. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. 2nd edition. London, UK: The Royal Society of Chemistry, 2017. ISBN 978-1-78262-730-2.
- [6] HEGYI, G., J. KARDOS, M. KOVÁCS, et al. *Introduction to Practical Biochemistry*. Hungary: Eötvös Loránd University, 2013.
Dostupné z:
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/index.html>
- [7] ELISA Technology. *Vet Food Agro Diagnostics / Quality Diagnostic Testing* [online]. Selangor: Vet Food Agro Diagnostics (M) Sdn Bhd, 2018 [cit. 2018-04-06].
Dostupné z: <http://www.vfad.com.my/elisa/>
- [8] 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA. *Czech Republic / Sigma-Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany: Merck, 2018 [cit. 2018-04-06].
Dostupné z:
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t0440?lang=en&ion=CZ&gclid=EAIaIQobChMI2Layz8ef1gIVzgrTCh12dgioEAAYASAAEgKt-vD_BwE

- [9] *Western blot dry transfer* [online]. [cit. 2018-04-06].
Dostupné z: <https://angel.co/projects/452711-western-blot-dry-transfer>
- [10] Dot and Slot Blotters: Fast sample-to-membrane hybridisation guaranteed for immediate screening. *SCIE-PLAS* [online]. Cambridge, UK: SCIE-PLAS, 2018 [cit. 2018-04-06].
Dostupné z:
http://www.scie-plas.com/Electrophoresis/Blotting_Units/Dot_and_Slot_Blotters.html