

Fakulta chemicko-technologická

Příprava a charakterizace reagensů pro imunochromatografický test

Bc. Veronika Teclová

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Teclová**
Osobní číslo: **C17456**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Příprava a charakterizace reagensů pro
imunochromatografický test**
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 :

Teoretická část:

1. Prostudujte recentní literaturu popisující princip imunochromatografických metod s důrazem na materiály, možnosti uspořádání jednotlivých částí testovacího proužku, možnosti značení specifických protilátek jako součást detekčního systému.
2. Charakterizujte vlastnosti těchto screeningových testů - přednosti x omezení.
3. Popište podrobně princip imunochromatografického testu pro VM a NM antigen.
4. Charakterizujte možnosti a uspořádání testu pro průkaz specifických protilátek vyskytujících se v séru nebo plazmě infikovaných pacientů. Vysvětlete přednosti a upozorněte na nedostatky dané techniky. Uveďte i oblasti, kde všude lze tuto techniku využít a kde se v současné době hojně používá.
5. Vypracujte teoretickou část na dané téma v délce 30 - 40 normovaných stran včetně obrázků a schémat, Při vyhledávání literárních údajů využijte všech dostupných databází NCBI, PubMed, Scopus, WOS atd. podle pokynů školitele.

Praktická část:

1. Analýza vybraných vzorků biol. materiálů pomocí komerčních testů všech kategorií - VML, NML, kvalitativní a kvantitativní testy. Zhodnotit způsob provedení a získané výsledky komentovat.
2. Navrhnout a optimalizovat protokol pro výrobu biotinylované formy antigenů pro průkaz polyklonálních infekčních protilátek. Jako modelový systém použít buněčný lyzát bakterií *Salmonella enteritidis*. K ověření funkcionalizace použít metodu SDS-PAGE.
3. Navrhnout a optimalizovat protokol pro značení sekundárních protilátek zlatými nanočásticemi. Jako modelový systém použít standardní IgG, králičí anti-hu IgG protilátky. K ověření funkcionalizace použít metodu SDS-PAGE a ECH detekci.
4. Ověřit reaktivitu připravených reagensů v rámci immunoanalytické reakce. Zhodnotit všechny získané výsledky a srovnat s údaji publikovanými v dostupné recentní literatuře.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:


Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

.....

Bc. Veronika Teclová

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení, rady, konzultaci výsledků a postupů při práci na mé diplomové práci. Dále děkuji všem členům laboratoře za jejich pomoc a pochopení. Velký dík patří mým rodičům za jejich podporu a umožnění studia.

ANOTACE

Diplomová práce je věnována problematice imunochromatografických testů. Jsou zde popsány jednotlivé typy imunochromatografických testů včetně popisu používaných materiálů a reagensů. V práci jsou také uvedeny konkrétní příklady imunochromatografických testů, které jsou využívány v klinické praxi. Experimentální část je věnována přípravě základních reagensů pro vlastní imunochromatografický test a ověření jejich funkčnosti.

KLÍČOVÁ SLOVA

Imunochromatografie, biotinylace, konjugát, zlaté nanočástice, *Salmonella* Enteritidis.

TITLE

Preparation and characterization of reagents for lateral flow assay.

ANNOTATION

The work is focused on the issue of lateral flow immunoassay. There are described individual types of lateral flow tests, including a description of materials and reagents. The work also mentioned the individual examples of lateral flow tests using in clinical practice. The experimental part is focused to the preparation of basic reagents for own lateral flow test and their functionality.

KEYWORDS

Lateral flow immunoassay, biotinylation, conjugate, gold nanoparticles, *Salmonella* Enteritidis.

OBSAH

	ÚVOD.....	15
1	TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1	Imunochromatografické testy.....	16
1.2	Princip imunochromatografického testu.....	17
1.2.1	Molekuly reagující v imunochromatografických testech.....	18
1.3	Komponenty testovacího proužku imunochromatografického testu.....	19
1.3.1	Membrána.....	19
1.3.2	Sací podložka pro kapalný vzorek.....	20
1.3.3	Sací podložka pro aplikaci konjugátu.....	21
1.3.4	Absorpční podložka.....	21
1.3.5	Testovací a kontrolní zóna.....	22
1.4	Detekční složky imunochromatografického testu.....	23
1.4.1	Protilátky.....	23
1.4.2	Aptamery.....	23
1.4.3	Detekční značky.....	25
1.4.4	Analytické parametry imunochromatografických testů.....	26
1.5	Uspořádání imunochromatografických testů.....	29
1.5.1	Sendvičové uspořádání imunochromatografických testů.....	29
1.5.2	Kompetitivní uspořádání imunochromatografických testů.....	33
1.6	Biologické materiály vyšetřované imunochromatografickými testy.....	36
1.6.1	Klinické materiály.....	36
1.6.2	Potraviny.....	38
1.7	Vyhodnocení imunochromatografických testů.....	39
1.7.1	Imunochromatografické testy s kvalitativním vyhodnocením.....	39

1.7.2	Imunochromatografické testy se semikvantitativním vyhodnocením	40
1.7.3	Imunochromatografické testy s kvantitativním vyhodnocením	41
1.8	Vybrané příklady vyvíjených imunochromatografických testů	42
1.8.1	Imunochromatografické testy pro stanovení vysokomolekulárních látek	42
1.8.2	Imunochromatografické testy pro stanovení nízkomolekulárních látek	44
1.8.3	Imunochromatografické testy pro stanovení specifických protilátek	45
1.9	Klady a zápory imunochromatografických testů	47
1.9.1	Klady imunochromatografických testů	47
1.9.2	Zápory imunochromatografických testů	47
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	49
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	50
3.1	Analýza vybraných analytů komerčně dostupnými imunochromatografickými testy	50
3.1.1	Vybrané příklady imunochromatografických testů pro stanovení vysokomolekulárních látek	50
3.1.2	Vybrané příklady imunochromatografických testů pro stanovení nízkomolekulárních látek	54
3.2	Laboratorní přístroje a vybavení	57
3.3	Seznam chemikálií, reagensů a biologických materiálů	59
3.4	Metodická část	62
3.4.1	SDS-PAGE elektroforéza	62
3.4.2	Dot-Blot analýzy reaktivity párových biomolekul	65
3.4.3	Izolace IgG ze séra	66
3.4.4	Příprava konjugátu AuNPs-IgG	67
3.4.5	Příprava buněčného lyzátu <i>Salmonella</i> Enteritidis	68
3.4.6	Stanovení celkového množství proteinů v lyzátu <i>Salmonella</i> Enteritidis BCA testem	68
3.4.7	Biotinylace lyzátu	70

4	VÝSLEDKY A DISKUSE	71
4.1	Navrhovaná schémata pro vytvoření vlastního imunochromatografického testu	71
4.2	Izolace IgG ze séra.....	73
4.3	Příprava konjugátu AuNPs-IgG	74
4.4	Biotinylace proteinů.....	84
4.4.1	Biotinylace IgG jako modelového proteinu	84
4.4.2	Biotinylace buněčného lyzátu <i>Salmonella</i> Enteritidis	86
4.5	Ověření reaktivity párových molekul reagujících v navrženém imunochromatografickém testu.....	94
5	ZÁVĚR	97
6	ZDROJE	98

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Schéma imunoglobulinu G s navázaným antigenem.	17
Obrázek 2: Základní komponenty imunochromatografického testu.	19
Obrázek 3: Schéma principu selekce aptamerů technologií SELEX.	24
Obrázek 4: Vyjádření meze detekce (a) a meze stanovitelnosti (b) ve vzorcích	27
Obrázek 5: Příklady utvářejících se sendvičů v imunochromatografických testech.....	29
Obrázek 6: Sendvičové uspořádání imunochromatografického testu pro stanovení vysokomolekulárních látek.....	30
Obrázek 7: Uspořádání imunochromatografického testu u stanovení specifických protilátek.....	31
Obrázek 8: Interakce mezi avidinem/streptavidinem a biotinem.....	32
Obrázek 9: Uspořádání imunochromatografického testu u stanovení specifických protilátek s využitím specifické vazby streptavidin-biotin.....	33
Obrázek 10: Kompetitivní uspořádání imunochromatografického testu –formát A.....	34
Obrázek 11: Kompetitivní uspořádání imunochromatografického testu – formát B.....	35
Obrázek 12: Vybrané příklady multiplexního uspořádání.....	40
Obrázek 13: Příklady semikvantitativního vyhodnocení imunochromatografických testů.	41
Obrázek 14: Schéma imunochromatografického testu pro průkaz hadích jedů v patientském séru.....	43
Obrázek 15: Schématické znázornění přípravy konjugátů pro imunochromatografický test pro určení zearlenou.	44
Obrázek 16: Graf vyhodnocení imunochromatografického testu mobilní aplikací.	46
Obrázek 17: Ukázka jednotlivých částí imunochromatografického testu.	50
Obrázek 18: Imunochromatografický test pro průkaz hCG v moči.....	51
Obrázek 19: Imunochromatografický test pro průkaz streptokoka A ze stěru..	52
Obrázek 20: Imunochromatografický test pro průkaz viru chřipky A, B ze stěru.	53
Obrázek 21: Imunochromatografický test pro průkaz protilátek proti <i>Borrelia</i> <i>burgdorferi</i> v séru.....	54
Obrázek 22: Imunochromatografický test pro průkaz kotininu v moči.	55
Obrázek 23: Imunochromatografický test pro průkaz ETG v moči.....	55

Obrázek 24: Multidrogový imunochromatografický test.	56
Obrázek 25: První návrh uspořádání imunochromatografického testu.	71
Obrázek 26: Druhý návrh uspořádání imunochromatografického testu.....	72
Obrázek 27: Třetí návrh uspořádání imunochromatografického testu.	72
Obrázek 28: Ověření účinnosti izolace IgG ze séra metodou SDS-PAGE elektroforézy	73
Obrázek 29: Ověření konjugace IgG zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG a koloidními zlatými nanočásticemi metodou SDS-PAGE elektroforézy. 75	75
Obrázek 30: Ověření konjugace IgG zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG metodou SDS-PAGE elektroforézy.....	76
Obrázek 31: Ověření konjugace IgG zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG metodou SDS-PAGE elektroforézy.....	76
Obrázek 32: Ukázka agregace zlatých nanočástic vytvořených po přidání AuNPs-CH ₃ CH ₂ COOH do PBS.	77
Obrázek 33: Ověření konjugace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy.....	78
Obrázek 34: Ověření konjugace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy.....	79
Obrázek 35: Ověření funkčnosti konjugátů AuNPs-PEG-IgG připravených v prostředí dH ₂ O-T a PBS-T metodou Dot-blot.	80
Obrázek 36: Ověření konjugace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy.....	81
Obrázek 37: Ověření funkčnosti konjugátů AuNPs-PEG-IgG připravených v dH ₂ O-T a PBS-T metodou Dot-blot.....	81
Obrázek 38: Ověření funkčnosti konjugátů AuNPs-PEG-IgG a AuNPs-CH ₃ CH ₂ COOH- IgG připravených v dH ₂ O-T a PBS-T metodou Dot-blot.	82
Obrázek 39: Ověření funkčnosti konjugátu AuNPs-PEG-IgG připraveného v dH ₂ O-T metodou Dot-blot.....	83
Obrázek 40: Ukázka imunochromatografického proužku gRAD OneDetection od firmy BioPorto Diagnostics A/S.	84
Obrázek 41: Ověření biotinylace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy.....	85
Obrázek 42: Ověření biotinylace IgG po vazbě na magnetický nosič metodou SDS-PAGE elektroforézy.....	86
Obrázek 43: Graf kalibrační závislosti koncentrace proteinů na absorbanci při 570 nm, měřeno metodou BCA testu.	87
Obrázek 44: Ředící řada buněčného lyzátu Salmonella Enteritidis, metoda SDS-PAGE elektroforéza.....	88

Obrázek 45: Ověření biotinylace lyzátu metodou SDS-PAGE elektroforézy	88
Obrázek 46: Ověření biotinylace lyzátu po vazbě na streptavidinem modifikované magnetické částice metodou SDS-PAGE elektroforézy	89
Obrázek 47: Ověření biotinylace lyzátu metodou Dot-blot. Reakce streptavidin-biotin.	90
Obrázek 48: Ověření biotinylace lyzátu metodou Dot-blot. Reakce streptavidin-biotin. po změně podmínek.	90
Obrázek 49: Ověření biotinylace lyzátu metodou Dot-blot. Reakce streptavidin-biotin. Nový roztok streptavidinu.	91
Obrázek 50: Ověření biotinylace modelových proteinů - IgG, BSA a lyzátu metodou SDS-PAGE elektroforézy	92
Obrázek 51: Ověření biotinylace modelového proteinu – trypsinu – metodou SDS-PAGE elektroforézy	92
Obrázek 52: Ověření biotinylace lyzátu metodou SDS-PAGE elektroforézy	93
Obrázek 53: Ověření reaktivity komerčních monoklonálních a polyklonálních anti-Salmonella IgG s buněčným lyzátem Salmonella Enteritidis, metoda Dot-Blot.....	94
Obrázek 54: Ověření reaktivity patientského séra pozitivního na anti-Salmonella IgG s buněčným lyzátem Salmonella Enteritidis, metoda Dot-Blot.	95
Obrázek 55: Ověření reaktivity patientského séra s anti-lidskými IgG králíčího původu, metoda Dot-Blot.	95
Obrázek 56: Ověření funkčnosti celého sendviče. Metoda Dot-Blot.....	96

Seznam tabulek

Tabulka 1: Výhody aptamerů oproti protilátkám v imunochromatografických testech.	24
Tabulka 2: Mez detekce vybraných detekčních značek používaných v imunochromatografických testech.	27
Tabulka 3: Příklady imunochromatografických testů používaných v klinické praxi.	42
Tabulka 4: Objemy roztoků pro vytvoření gelu na elektroforetickou separaci.	63
Tabulka 5: Dávkování fosfátového pufru a zásobního roztoku BSA pro vytvoření standardních roztoků o dané koncentraci v BCA testu.	69
Tabulka 6: Výsledky měření celkového množství proteinů v lyzátu <i>Salmonella</i> Enteritidis BCA testem.....	87

SEZNAM ZKRATEK

AuNPs – zlaté nanočástice

BCA – kyselina bicinchoninová (z angl. Bicinchoninic Acid)

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

BZO – benzodiazepin

ELISA – enzymová imunoanalýza na pevné fázi (z angl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

CRP – C-reaktivní protein

bp – pár bází

DNA- deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)

ETG – etylglukuronid

GP – glykoprotein

hCG – chorion gonadotropní hormon

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

HSS-Ab – protilátky proti proteinu hemoragického hadího jedu (z angl. Hemorrhagic Species-Specific Antibodies)

Ig – imunoglobulin

ICHT – imunochromatografický test

LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

LOD – mez detekce (z angl. Limit of Detection)

LOQ – mez stanovitelnosti (z angl. Limit of Quantification)

MM – marker molekulových hmotností

Mr – relativní molekulová hmotnost

NK – negativní kontrola

NSS-Ab – protilátky proti proteinu neurotoxického hadího jedu (z angl. Neurotoxic Species-Specific Antibodies)

NP – nukleoprotein

PBS – fosfátový pufr s přidavkem chloridu sodného (z angl. Phosphate Buffer Saline)

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

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

PEG – polyetylen glykol

PM – polystyrenové mikrosféry

PVDF – poly(vinyldifluorid)

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. Ribonucleic Acid)

rpm – otáčky za minutu

SDS – dodecylsírán sodný

SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným

SELEX (z angl. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)

TEMED – N,N,N'N'-tetramethylendiamin

Tris-HCl – tris(hydroxymetyl)aminometan hydrochlorid

QD – kvantové tečky (z angl. Quantum Dots)

VP24 – minoritní matricový protein

VP30 – transkripční a replikační protein

VP35 – polymerázový kofaktor

VP40 – matricový protein

ÚVOD

Analýza tělních tekutin je známá od dávného starověku. Již ve starověkém Egyptě lidé využívali moč pro průkaz těhotenství. V tomto starověkém těhotenském testu moč těhotné ženy pomohla vyklíčení semen pšenice a ječmene. V případě, kdy vyklíčila pšenice měla žena čekat holčičku, pokud vyklíčil ječmen měl to být chlapeček. Pokud semena nevyklíčila, žena nebyla těhotná. Vývoj metod k určení těhotenství upoutal zájem lékařů a vědců na dlouhá staletí.

Ve 20. letech 20. století vědci popsali hormon, který se vyskytuje pouze u těhotných žen, dnes známý jako chorion gonadotropní hormon. Na základě tohoto hormonu byly popsány první těhotenské testy, které byly nejprve založeny na principu aglutinace, později radioimunoanalýzy a enzymatické imunoanalýzy. Od roku 1927 se k potvrzení těhotenství používal test, který byl založený na injektování moče potenciálně těhotné ženy do nevyzrálé laboratorní myši. Pokud žena byla těhotná myš začala vykazovat typické znaky působení estrogenu např. růst prsních žláz [1]. Zatímco v České republice se těhotenství stále potvrzovalo na laboratorních myších v západní Evropě byl vytvořen první komerčně dostupný těhotenský imunochromatografický test, který se na trhu objevil v roce 1988. Tento test využíval jako detekční značku barvené latexové nanočástice a byl uspořádán, tak jako dnešní těhotenské testy [2].

Přesto, že jsou těhotenské testy nejvíce používanými zástupci imunochromatografických testů, existuje nespočet dalších imunochromatografických testů pro průkaz nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek. Příklady, popis, využití a mnoho dalších informací o imunochromatografických testech jsou na následujících stránkách teoretické části této práce. V rámci experimentální části diplomové práce byly připravovány reagentie pro imunochromatografické stanovení specifických protilátek proti *Salmonella* Enteritidis.

Salmonella je dnes běžným kontaminantem potravy a salmonelózy jsou aktuálně velmi častým onemocněním. Proto by byl imunochromatografický test pro průkaz salmonely rychlým diagnostickým nástrojem nejen pro lékaře, ale i pro laickou veřejnost.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Imunochromatografické testy

Imunochromatografické testy patří mezi specifické analytické metody, které jsou založeny na specifické interakci mezi protilátkou a antigenem. Testy založené na této metodě se vyznačují především svou nízkou cenou, jednoduchým použitím, rychle získanými výsledky i snadným vyhodnocením [3]. Je však nutné podotknout, že většina komerčních testů je pouze kvalitativní a výsledek podává pouze informaci, zda se stanovovaný analyt ve vzorku nachází či nikoli. V mnoha případech se však jedná o informaci rozhodující o dalším postupu diagnostiky a léčby.

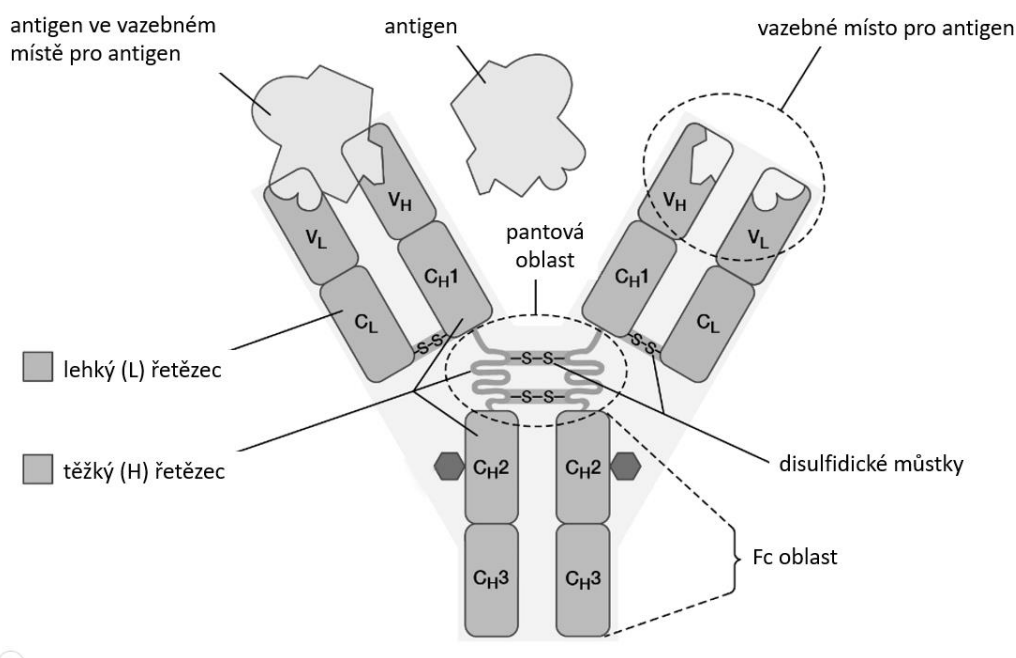
Imunochromatografické testy jsou nejčastěji vyráběny ve formě proužků a nabízí širokou škálu využití v klinické diagnostice [4], terapeutickém „monitoringu“ [5], zemědělství [6], veterinářské diagnostice [7] i potravinářském průmyslu [8]. Tyto testy jsou vhodné i pro environmentální analýzy [9] a analýzy vod [10]. Každý test je specifický.

Jednotlivé imunochromatografické testy se mohou lišit v mnoha parametrech. Tyto testy se liší například v uspořádání, kde rozlišujeme sendvičové a kompetitivní uspořádání. Typ uspořádání závisí hlavně na tom, zda jsou stanovovány protilátky, antigeny nebo hapteny. Existují testy, kde lze stanovit několik analytů současně tzv. multiplexní testy. Dále se testy liší použitým materiálem, způsobem aplikace vzorku i různými způsoby detekce [11]. Všechny tyto parametry jsou podrobně popsány v následujících kapitolách.

1.2 Princip imunochromatografického testu

Kapalný vzorek je nanášen na testovací proužek a kapilárními silami je kapalina unášena proužkem přes několik zón. V jednotlivých zónách jsou vázány molekuly, které mohou se vzorkem interagovat [12].

Základem je reakce antigenu se specifickou protilátkou, za vzniku imunokomplexu (viz Obrázek 1). Imunokomplex zachycený v jednotlivých zónách je vizualizován nejčastěji značenou protilátkou – konjugátem, který může být součástí imunokomplexu nebo se může na vzniklý imunokomplex vázat. Konjugátem nazýváme molekulu, nejčastěji protilátku, s detekční značkou. Příkladem detekční značky, která reakci vizualizuje mohou být např. nanočástice zlata [13], uhlíkové nanočástice [14] nebo barvené latexové nanočástice [15]. Tyto nanočástice mají svou barvu, díky které lze při nahromadění konjugátu v daných zónách okem pozorovat barevné linie. Existují ale i další detekční značky, které okem rozpoznatelný barevný signál nedávají, nejsou ale tak často používané, proto i v následujících kapitolách budeme vždy hovořit o barevných liniích pro označení nahromadění konjugátu, s jakoukoli detekční značkou. Kompletní výčet a popis vybraných detekčních značek je v kapitole 1.4.3.



Obrázek 1: Schéma imunoglobulinu G s navázaným antigenem upraveno dle [16].

1.2.1 Molekuly reagující v imunochromatografických testech

Antigen

Antigen je cizorodá látka, která má schopnost v savčím organismu vyvolat imunitní odpověď. Antigeny lze dělit na exoantigeny, které pochází z vnějšího prostředí a autoantigeny, ty jsou součástí organismu. Aby látka mohla být nazvána antigenem, musí splňovat určité vlastnosti. První vlastností je imunogenicita, schopnost vyvolat imunitní odpověď. Aby byl antigen imunogenní musí být chemicky heterogenní, fylogeneticky vzdálenou molekulou o velikosti větší než 10 KDa. Menší antigeny nejsou samy schopny vyvolat imunitní odpověď, potřebují se navázat na nosič – makromolekulu, která molekulovou hmotnost zvýší. Takové nekompletní antigeny se nazývají hapteny. Další vlastností antigenu je antigenicita, což je schopnost reagovat s produkty imunitní odpovědi, především se specifickými protilátkami, a vytvářet s nimi imunokomplex.

Antigen nereaguje s protilátkou celou svou molekulou, ale pouze strukturami na povrchu tzv. antigenními determinantami neboli epitopy. Jeden antigen obvykle obsahuje více epitopů, proti kterým existují specifické protilátky.

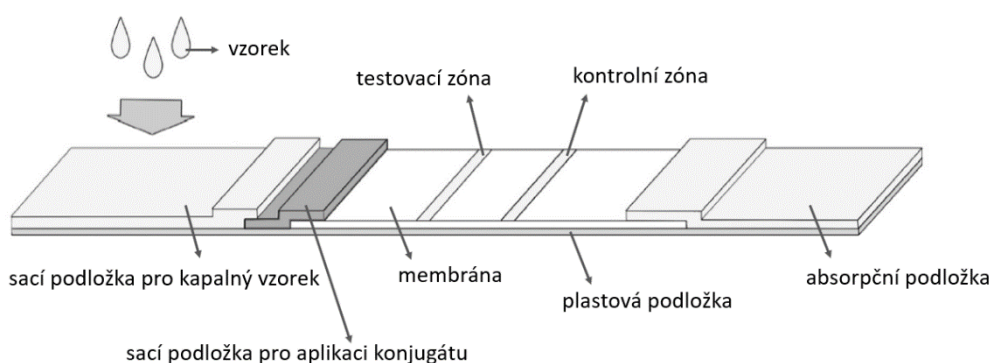
Protilátka

Protilátka neboli imunoglobulin je glykoprotein, tvořený plazmatickými buňkami po jejich aktivaci imunitním systémem při specifické humorální imunitní odpovědi na daný antigen. Protilátky lze dělit do pěti tříd, podle typu těžkého řetězce, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. V imunochromatografických testech jsou využívány především protilátky třídy IgG (viz Obrázek 1).

Rozlišujeme protilátky polyklonální a monoklonální. Polyklonální protilátky jsou namířeny proti různým epitopům antigenu, naopak monoklonální protilátky reagují pouze s jedním epitopem. V imunochromatografických testech se pro průkaz antigenu ukázaly výhodnější protilátky monoklonální, protože reagují specificky pouze s jednou antigenní determinantou. Tím je zabráněno křížovým reakcím a je snížen výskyt falešně pozitivních výsledků. Mnoho antigenních determinant, především u bakteriálních antigenů, si je podobných, proto může ke křížovým reakcím docházet.

1.3 Komponenty testovacího proužku imunochromatografického testu

Každý imunochromatografický test, který je ve formě proužku, je tvořen plastovou podložkou, na kterou jsou navrstveny další funkční části testu. Celý test je složen z mnoha komponent. Základem je membrána, na kterou nasedá sací podložka pro kapalný vzorek, sací podložka pro aplikaci konjugátu a absorpční podložka [13]. Všechny komponenty testu musí být vzájemně kompatibilní, správně navrstvené a spojené, tak aby kapalný vzorek bez problému procházel celým testovacím proužkem. [3]. Základní uspořádání (viz Obrázek 2) je společné pro mnoho testů, ale je konkrétně uzpůsobeno podle účelu a typu analytu. Lišit se může například odlišnou aplikací vzorku, způsobem analýzy nebo jiným vyhodnocením. Jednotlivé složky jsou podrobněji popsány níže.



Obrázek 2: Základní komponenty imunochromatografického testu upraveno dle [17].

1.3.1 Membrána

Membrána je vytvořena z materiálu s definovanou porozitou a nasáklivostí. Vlastnosti membrány jsou velmi důležité pro celkovou funkčnost testu. Hlavními parametry jsou kapilární tok a schopnost vázat proteiny. Nejčastěji používaným materiálem je nitrocelulóza [18, 19]. Dalším materiálem pro výrobu membrány je například modifikovaný nylon nebo polyestersulfon. Dané materiály se liší především vazebnými silami, kterými jsou interakce s proteiny uskutečňovány. U nitrocelulózkové membrány a membrány z modifikovaného nylonu je vazebný mechanismus zajištěn iontovými silami. Membrána z polyestersulfonu využívá sil hydrofobních [20]. Membrána musí být dostatečně hydrofilní a zaručit kontinuální tok vzorku [21].

Nitrocelulózová membrána

Nitrocelulóza je nejčastěji používaným materiálem pro výrobu imunochromatografických testů. Nicméně i přes její funkčnost a přívětivou cenu není úplně ideálním materiálem pro imunochromatografické testy. Úskalí spočívají v nedokonalé reprodukovatelnosti mezi jednotlivými testy, trvanlivosti a odolnosti vůči vnějším podmínkám, jako je vlhkost. Po chemické stránce se jedná o hydrofobní materiál, proto je nutná úprava přidáním povrchově aktivních látek. Povrchově aktivní látky povrch smáčí a membrána se stává hydrofilní, což je pro funkčnost a analýzu kapalných biologických materiálů stěžejní [11].

Kapilární tok závisí na porézności membrány. Dostupné jsou membrány s velikostí pórů od 0,05 do 12 μm . Vzhledem k nerovnoměrné distribuci pórů je ale vhodnější vybírat membránu podle doby průtoku, který je obvykle výrobcem udáván v sekundách na centimetr [22].

1.3.2 Sací podložka pro kapalný vzorek

Nejdůležitější úlohou sací podložky pro kapalný vzorek je nasátí dostatečného objemu vzorku v relativně krátkém čase a zajištění jeho rovnoměrné distribuce na sací podložku pro aplikaci konjugátu. Pro lepší průtok a kontrolu přesného množství kapaliny jsou obvykle podložky impregnovány solnými roztoky, pufrů, detergentů nebo proteinů. Tyto impregnační složky mohou také sloužit k zabránění sorpce analytu na podložku a brání zpětnému chodu kapaliny [21].

Další neméně důležitou úlohou sací podložky pro kapalný vzorek je filtrace vzorku. Vzhledem k tomu, že kapalný vzorek není před analýzou upravován, je vhodné některé kontaminující složky filtrovat. Například při testování plné krve, jsou krevní buňky zachyceny podložkou a dále pokračuje pouze kapalná část krve obsahující stanovovaný analyt [23].

Výběr materiálu sací podložky pro kapalný vzorek závisí na požadavcích pro danou analýzu. Nejčastěji používanými materiály je celulóza [24] skleněná vlákna [25] nebo viskóza [26].

1.3.3 Sací podložka pro aplikaci konjugátu

Sací podložka pro aplikaci konjugátu je část, která slouží k fixaci konjugátu. Konjugát je stěžejní pro vyhodnocení testu. Z tohoto důvodu je nutné, aby sací podložka pro aplikaci konjugátu zachovala definované množství konjugátu stabilní po celou dobu skladování testu. Zároveň musí být konjugát při styku s kapalným vzorkem okamžitě uvolněn [27].

Před aplikací daného konjugátu je podložka ošetřena povrchově aktivními látkami, blokovacím roztokem a sacharózou nebo jinými uhlohydráty. Uhlohydráty slouží jako konzervant a resolubilizační činidlo. Na takto ošetřenou a vysušenou podložku je možné dávkovat konjugát. Konjugát lze aplikovat ponořením proužku do roztoku konjugátu. Tato metoda ale nezaručí rovnoměrné rozložení konjugátu po podložce [28]. Nejvhodnějším způsobem je kvantitativní aerosolizace například dávkovačem AirJet Quanti od firmy *BioDot*. Tento přístroj je složen z několika dávkovačů, které pod tlakem vstříkují aerosol konjugátu na sací podložku pro aplikaci konjugátu. Každý dávkovač obsahuje dvě vstříkovací pumpy, které se střídají, čímž je zajištěn konstantní tlak. Pumpy dokážou odměřit přesné množství aerosolu, proto je konjugát nanesen v rovnoměrné vrstvě a je umožněna kontrola naneseného množství konjugátu [29].

Nejčastěji používaný materiál sací podložky pro aplikaci konjugátu je skleněné vlákno [30], polyester [25] nebo viskóza [11].

1.3.4 Absorpční podložka

Funkce absorpční podložky je zajištění absorpce a toku kapaliny membránou, po přechodu přes testovací a kontrolní zónu kapalinu jímat a zabránit zpětnému toku. Díky absorpční podložce lze aplikovat větší množství vzorku, než je nasákivost samotného proužku [31].

Materiál musí mít vysokou absorpční kapacitu. Objem vzorku obsahujícího hledaný analyt je významný faktor ovlivňující citlivost metody. Absorpční podložky jsou nejčastěji vyráběny z celulózových filtrů [3] nebo kombinací skleněných vláken a bavlny [32].

1.3.5 Testovací a kontrolní zóna

Testovací a kontrolní zóna jsou části membrány, kde jsou na membránu vázány specifické molekuly. Tyto molekuly reagují se stanovovaným analytem, v případě testovací zóny, nebo pouze s konjugátem, v případě kontrolní zóny. Nahromaděním konjugátu v těchto zónách jsou vytvořeny barevné linie vypovídající o výsledku testu.

1.4 Detekční složky imunochromatografického testu

Pro detekci stanovovaného analytu je v imunochromatografických testech klíčový konjugát. Konjugátem je nejčastěji specifická protilátka, která je konjugována detekční značkou. Nejnovější studie se pokouší nahrazovat drahé protilátky syntetickými aptamery [33].

Úkolem konjugátu je navázat se na stanovovaný analyt a vytvořit s ním komplex, který je poté zachycen v testovací zóně. Zároveň se konjugát musí navázat i na protilátky fixované v kontrolní zóně. Značky, kterými jsou protilátky nebo aptamery konjugovány pak vytvoří požadovaný vizuální signál.

1.4.1 Protilátky

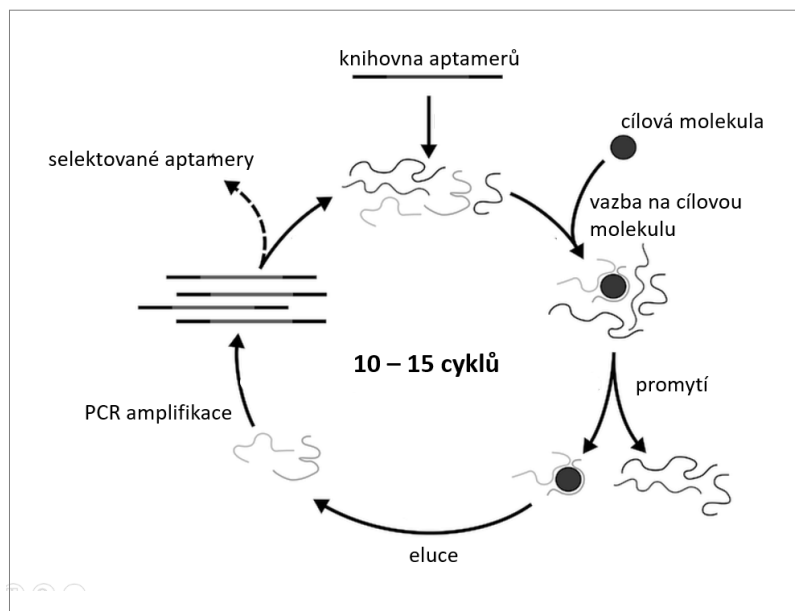
Protilátky, jako detekční molekuly byly v imunochromatografických testech používány již od jejich počátku. Výběr kvalitních protilátek je stěžejní nejen pro citlivost testu. Vývoj robustního testu vyžaduje vysoce specifické protilátky s vysokou afinitou ke stanovovanému cíli [11]. Protilátky reagující s analytem, se kterým vytvoří specifický imunokomplex, jsou nazývány primárními. Značené protilátky, které se váží na specifický imunokomplex protilátky a cílového analytu jsou nazývány konjugátem. Sekundární protilátky jsou v imunochromatografických testech takové, které jsou vázány v kontrolní zóně a reagují s nadbytkem konjugátu [27].

1.4.2 Aptamery

Aptamery jsou jednovláknové ligandy DNA nebo RNA o velikosti 10 až 100 bp, které se dokáží s vysokou specifitou vázat na různé struktury od iontů až po celé buňky. V imunochromatografickém testu tak můžou reagovat s cílovým analytem obdobně jako protilátky [34].

Aptamery jsou vyráběny synteticky a selektovány metodou SELEX. Technologie SELEX je nejčastěji založena na principu afinitní chromatografie a má několik základních kroků, které se v cyklu opakují. V prvním kroku se vytvořené aptamery přidají k cílovým molekulám, které jsou navázány na koloně. Na koloně se tedy zachytí pouze ty aptamery, které s cílovou molekulou reagují. V dalším kroku jsou navázané aptamery eluovány. Třetím krokem je amplifikace selektovaných aptamerů metodou PCR. PCR produkty

vstupují do dalšího cyklu, kde se opakují první tři kroky. Obvykle se opakuje 10 až 15 cyklů, kde je možné po prvních cyklech pozitivní selekce zařadit několik cyklů negativní selekce, která dále zvyšuje selektivitu daných aptamerů [35].



Obrázek 3: Schéma principu selekce aptamerů pomocí SELEX technologie upraveno dle [36].

Aptamery mají oproti protilátkám značné výhody. Jejich praktické využití za protilátkami ale stále zaostává [37]. Výhody aptamerů jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: Výhody aptamerů oproti protilátkám v imunochromatografických testech [38].

Aptamery	Protilátky
Vazba na jakékoli imunogenní i neimunogenní cíle.	Běžně se váží pouze na proteiny nebo hapteny.
Výroba a selekce in vitro za stanovených podmínek.	Výroba závisí na imunizaci zvířat.
Efektivní syntéza s nízkými náklady.	Časově náročná a nákladná výroba.
Stálost v šaržích.	U polyklonálních protilátek se liší jednotlivé šarže.
Dlouhodobá trvanlivost.	Trvanlivost obvykle 6 až 24 měsíců.
Snadná chemická modifikace.	Složitější postup imobilizace.
Stabilní při nízkých i vysokých teplotách.	Stabilní pouze v nižších teplotách.

1.4.3 Detekční značky

Nanočástice zlata a latexové nanočástice patří k nejpoužívanějším značkám, které zajišťují vizualizaci vytvořených imunokomplexů zachycených v testovací nebo kontrolní zóně [39,40]. Detekčních značek je ale velké množství. Dalšími příklady mohou být uhlíkové [14], latexové [15], selenové [17] nebo celulózové značky [41], které mezi tzv. přímé značky. Tyto značky je možné vyhodnotit okometricky. Pro vyhodnocení fluorescenčních značek [30], feromagnetických nanočástic [42] nebo kvantových teček [43] je nutné využít detektor. V případě, že je detekční značkou enzym [44], jsou nutné další analytické kroky, jako přidání substrátu, vedoucí ke zviditelnění výsledku.

Každá značka musí splňovat určité náležitosti. Nesmí měnit vlastnosti protilátky, na kterou je vázána, především vazebnou aktivitu a specifitu. Měla by být dlouhodobě chemicky stabilní a detekovatelná již ve velmi malých koncentracích [37].

Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice jsou vůbec nejoblíbenější značkou [13,45,46]. Oblíbenost získaly pravděpodobně kvůli svým jedinečným vlastnostem, mezi které patří: vysoká afinita k biomolekulám, dokonalý tvar částic, inertnost, snadná modifikace a okometrická detekce.

Zlaté nanočástice lze relativně levně vyrobit přímo v laboratoři redukcí kyseliny chlorzlatité [47]. Zlaté nanočástice jsou ale samozřejmě k dispozici od mnoha výrobců jako například *Sigma-Aldrich* nebo *Orion High Technologies*. Velkou výhodou je dostatečná intenzita barvy zlatých nanočástic, díky čemuž lze testy vyhodnotit pouhým okem bez využití detektorů. Zlaté nanočástice jsou dostupné v nepřeberném množství, co se týče velikosti i modifikace. V praxi nejpoužívanější je velikost 40 nm, v nabídce ale nalezneme velikosti již od 5 nm [48]. Existují nanočástice koloidního zlata nebo modifikované zlaté nanočástice, na které jsou navázány různé funkční skupiny například karboxyly, aminy, thioly, fosfíny, isothiokyanáty [49].

Latexové nanočástice

Latexové nanočástice byly používány k vizualizaci v imunochromatografických testech již od jejich počátku a jsou oblíbené dodnes [40]. Latexové částice jsou dostupné v mnoha

barevných verzích od modré až po oranžovou. Lze je snadno modifikovat karboxylovou skupinou, aminoskupinou nebo fluorescenčními barvivy. Na trhu jsou dostupné ve velikostech od 50 nm do 3 000 nm [50]. Oproti zlatým nanočásticím jsou latexové nanočástice podstatně levnější. Pro výrobu konjugátu je ale nutná vyšší koncentrace latexových částic než zlatých nanočástic. Výsledná cena pro výrobu konjugátu z latexových nanočástic je pak podobná jako u zlatých nanočástic [51].

Uhlíkové nanočástice

Stejně jako u zlata je velkou výhodou uhlíku jeho černá barva, která je dost intenzivní pro vyhodnocení pouhým okem [14]. Příprava těchto částic je možná ze sazí, uhlovodíků, dextrinů apod. nebo z přírodního uhlíku. První možnost je vcelku jednoduchá, nicméně saze jsou heterogenní směs a vyrobené částice nemají přesně definované složení. Syntéza z uhlovodíků a dalších sloučenin je poměrně drahá a složitá. Nejlepší metodou je výroba uhlíkových nanočástic z přírodního uhlíku ultrazvukem [22].

Kvantové tečky

Kvantové tečky jsou zástupcem detekčních značek, které nelze vyhodnotit pouhým okem, je nutný detektor. Kvantové tečky jsou polovodičové nanokrystaly, které mají schopnost fluorescence. Výhodou oproti klasickým organickým fluoroforům je jejich vysoká fotostabilita. Velikost kvantových teček je od 1 do 10 nm, mohou existovat samostatně nebo jsou uspořádány do klastrů [52]. Kvantové tečky lišící se svojí velikostí emitují záření jiné vlnové délky. Jejich unikátní optické vlastnosti vytváří z kvantových teček vysoce citlivou detekční značku. Kvantové tečky jsou zástupcem detekčních značek, které nelze vyhodnocovat pouhým okem. Pro vyhodnocení je nutný detektor, což přináší značnou nevýhodou. Další omezení přináší vysoká toxicita kvantových teček [53].

1.4.4 Analytické parametry imunochromatografických testů

Citlivost a mez detekce patří mezi klíčové analytické parametry imunochromatografického testu. Citlivost je závislá mimo jiné na afinitě použité protilátky ke stanovovanému analytu. Proto je nutné věnovat výběru protilátek velkou pozornost [11]. Svou roli také hraje typ použité značky. Podle použité značky je volen typ detekce. Většina komerčně dostupných imunochromatografických testů nevyužívá

detektory, detekce je možná okometricky, proto je nutné výběr značky s dostatečnou intenzitou signálu [54].

Mez detekce (LOD) vyjadřuje takovou koncentraci analytu, která ještě dává spolehlivě pozitivní výsledek. Mez stanovitelnosti (LOQ) je koncentrace analytu, kterou lze spolehlivě kvantitativně vyhodnotit. LOD i LOQ jsou závislé na chybě měření, která je vyjádřena šumem. Výpočty LOD a LOQ pro lineární kalibrační závislost jsou uvedeny níže.

(a)	(b)	
$LOD = \frac{3 \times h}{sm}$	$LOQ = \frac{10 \times h}{sm}$	
		<i>h</i> ... ustálená hodnota signálu šumu <i>sm</i> ... směrnice kalibrační závislosti

Obrázek 4: Vyjádření meze detekce (a) a meze stanovitelnosti (b) ve vzorcích [55].

Každá detekční značka má jinou mez detekce. Mezi jednotlivými testy se ale LOD stejné značky může také lišit, souvisí to opět s afinitou protilátky k analytu [55]. Příklady imunochromatografických testů s různými typy detekčních značek a jejich mez detekce jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: *Mez detekce vybraných detekčních značek používaných v imunochromatografických testech.*

ICHT prokazující	Detekční značka	LOD [ng·mL ⁻¹]	Zdroj
Fenyletanolamin A	Zlaté nanočástice	5	[56]
Metyl paraoxon	Feromagnetické částice Fe ₃ O ₄	1,7	[42]
Tiabendazol	Uhlíkové nanočástice	0,08	[14]
C-reaktivní protein	Kvantové tečky	0,3	[57]
Zearalenon	Polystyrenové mikrosféry	1	[58]
Melamin	Koloidní selen	50	[17]

Autoři Katis a kol. [59] uvedli novou možnost pro zvýšení citlivosti u imunochromatografického testu využívajícího zlaté nanočástice jako detekční značku. Zjistili, že zúžením testovacího proužku v testovací oblasti z klasických 5 mm

na 1 mm dojde k zakoncentrování molekul účastnících se reakce v testovací zóně a díky konjugátu vznikne intenzivnější zbarvení vytvořeného proužku. Tímto způsobem se zvýší mez detekce až na třicetinásobek, což je vhodné především pro analyty vyskytujících se v nízkých koncentracích.

Další možností zvýšení citlivosti testu je použití dvojitého konjugátu. Na příkladu zlatých nanočástic bude konjugát obsahovat dvě velikosti částic. První konjugát bude vypadat klasicky například myší protilátka proti analytu značená zlatými nanočásticemi. Na tento konjugát bude navázán další, tedy anti myší protilátka proti Fc oblasti konjugátu značená opět zlatými nanočásticemi, ale jiné velikosti. Tímto způsobem lze zvýšit citlivost až 10x. Další možností je využití vysoce rozvětvených komplexů nanočástic zlata, u kterých se ukázalo pětinasobné snížení detekčního limitu [60].

Při výrobě imunochromatografických testů, které vyžadují vyšší citlivost, výrobci přechází z detekce zlatými nanočásticemi na fluorescenční barviva. Fluorescenční značky ale nelze detekovat okometricky. Je tedy nutné využít detektor [61]. Detektory lze ale využít i u vyhodnocení testů s klasickým značením zlatými nebo jinými barevnými nanočásticemi.

Příkladem je detektor využívající tepelný kontrast. Využitím tohoto detektoru lze zvýšit citlivost testu 32x až 100x. Tepelný kontrast lze využít u všech imunochromatografických testů, jejichž konjugát obsahuje kov – typicky u zlatých nanočástic. Vzniklé proužky v testovací a kontrolní linii jsou v detektoru ozářeny laserem. Po ozáření kovové částice generují teplo, které je měřeno infračervenou kamerou [62].

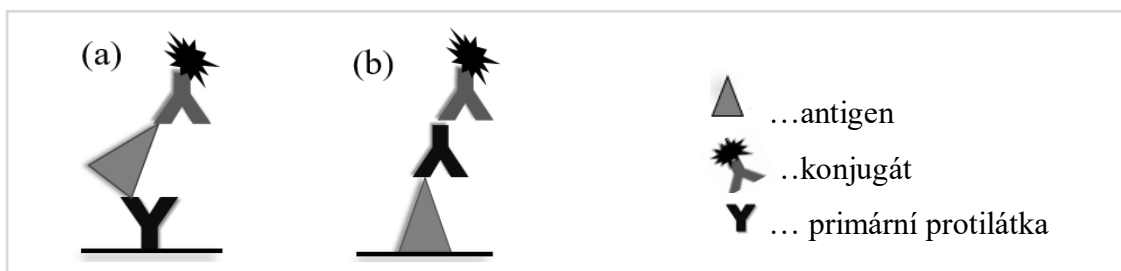
Detektory dokáží rozlišit takovou intenzitu barvy vzniklého proužku, kterou lidské oko již nezaznamená. Existují detektory, které naskenují imunochromatografický proužek se vzniklými liniemi v testovací a kontrolní zóně a následně vyhodnotí intenzitu vzniklé linie a porovná ji s databází standardních vzorků o daných koncentracích [63].

1.5 Uspořádání imunochromatografických testů

Imunochromatografické testy lze podle uspořádání dělit na sendvičové a kompetitivní. Uspořádání je dáno typem stanovovaného analytu, jeho fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

1.5.1 Sendvičové uspořádání imunochromatografických testů

Sendvičové uspořádání je založeno na stejném principu jako sendvičová ELISA. Název je odvozen od situace, kdy v případě pozitivního vzorku vzniká tzv. sendvič, který může vypadat následovně [64]. Primární protilátka navázaná v testovací zóně specificky váže antigen ze vzorku, který do testovací části doputuje již jako komplex s konjugátem fixovaným na konjugátové podložce (viz Obrázek 5a). Jiný sendvič lze pozorovat při stanovení protilátky. V testovací zóně je navázán antigen, na který se váže komplex protilátky ze vzorku a značené protilátky fixované na konjugátové podložce (viz Obrázek 5b).



Obrázek 5: Příklady utvářejících se sendvičů v imunochromatografických testech (a) u stanovení antigenu, (b) u stanovení protilátek.

Princip sendvičového uspořádání imunochromatografických testů

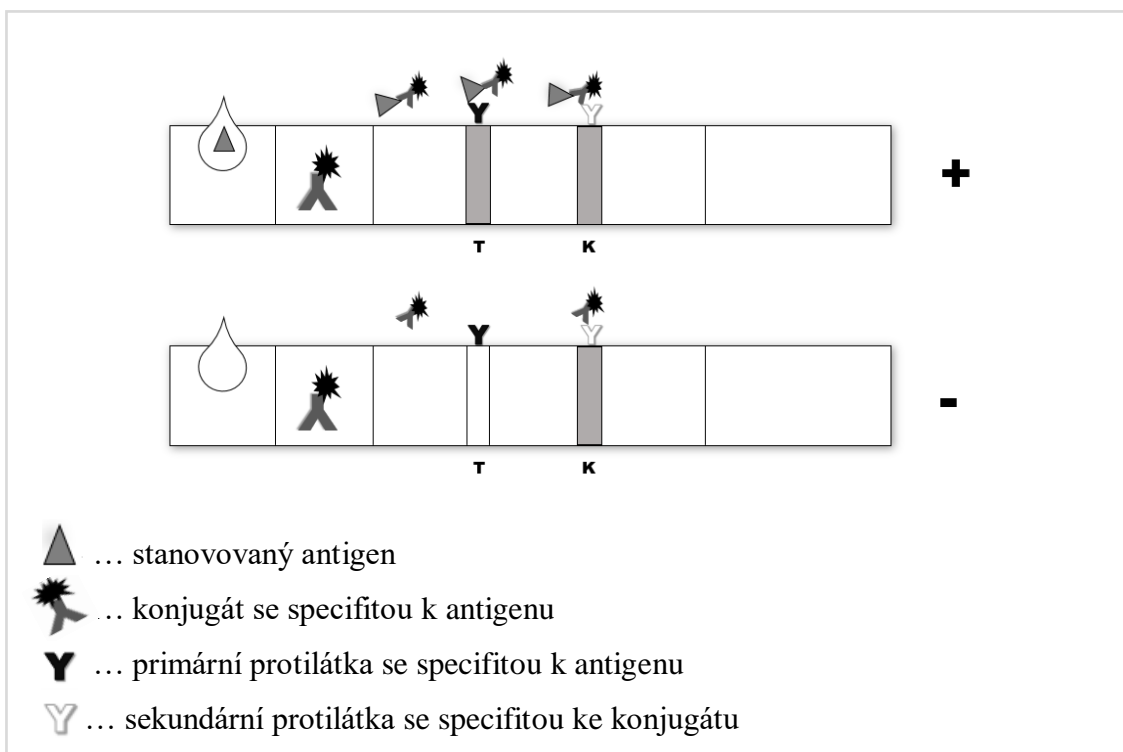
Sendvičové uspořádání je využíváno u látek, jejichž antigeny mají více antigenních determinant. Jedná se o vysokomolekulární látky, konkrétní příklady stanovení vysokomolekulárních látek jsou uvedeny v kapitole 1.8.1.

U sendvičového uspořádání stanovovaný analyt prochází zónou konjugátu, kde je na něj konjugát navázán. Vytvořený komplex vzlíná kapilárními silami dále po proužku do testovací zóny. V této zóně jsou navázány primární protilátky se specifitou proti stanovovanému analytu ve vzorku. V tomto okamžiku vzniká sendvič, a sice konjugát – antigen stanovovaného analytu – primární protilátka vázaná v testovací zóně (viz

Obrázek 5a). V testovací zóně dojde k zakoncentrování vzniklého sendviče a díky konjugátu lze pozorovat barevnou linii. Nadbytek vytvořeného sendviče nebo samotný konjugát je unášen dále do kontrolní zóny, kde je zachycen sekundárními protilátkami [27].

Barevná linie v kontrolní zóně je nezbytná u všech imunochromatografických testů. Potvrzuje, že analyt putoval celým testovacím proužkem až na konec. Pokud linie v kontrolní zóně nevznikne, test je neplatný a výsledek nelze odečítat.

V případě, že je vzorek pozitivní, objeví se barevná linie v testovací i v kontrolní zóně. Pokud je ale vzorek negativní na stanovovaný analyt, nevzniká v prvním kroku komplex analytu s konjugátem a v testovací zóně nemá co reagovat s primárními protilátkami. Primární protilátky vázané v testovací zóně jsou totiž specifické pouze k analytu [65].

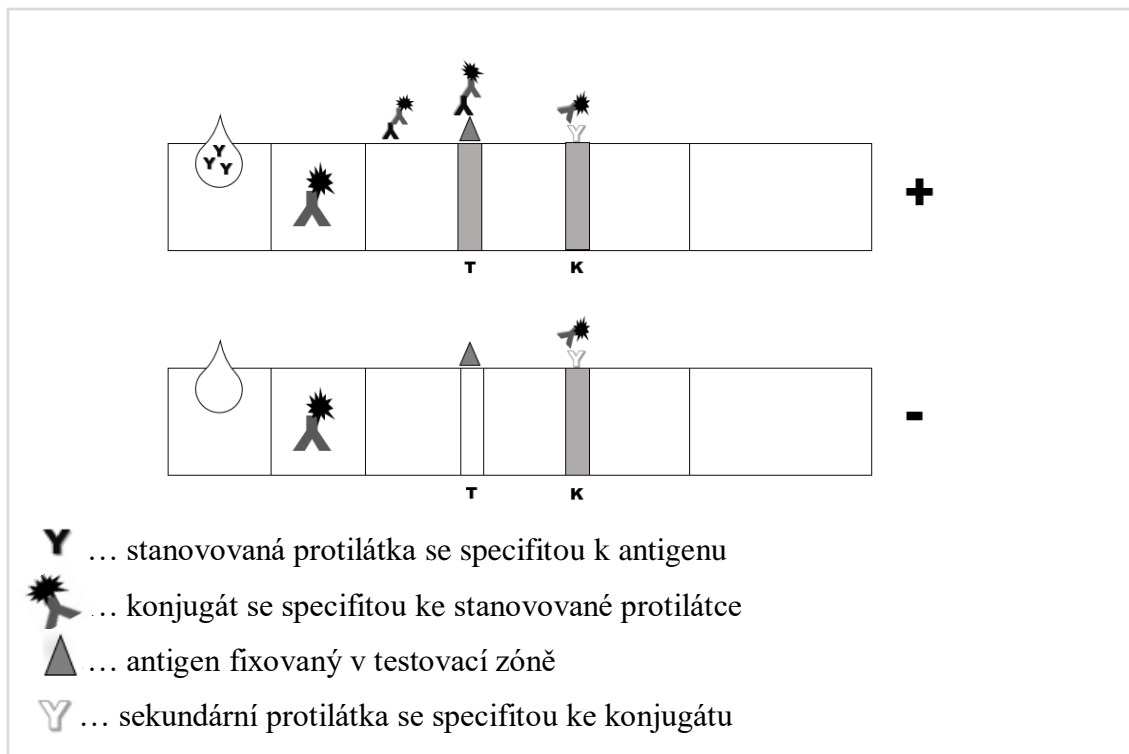


Obrázek 6: *Sendvičové uspořádání imunochromatografického testu pro stanovení vysokomolekulárních látek.*

Princip imunochromatografických testů pro průkaz specifických protilátek

Vzhledem k tomu, že protilátky patří mezi vysokomolekulární látky, jejich stanovení probíhá také sendvičovou metodou. Rozdíl je ve vzniklém sendviči. V případě

pozitivního vzorku putuje stanovovaná protilátka ze vzorku proužkem a v prvním kroku reaguje s konjugátem. Vzniklý komplex vzlíná k testovací zóně, kde komplex reaguje s antigenem, který je v testovací zóně zafixován. Vzniká sendvič antigen-stanovovaná protilátka-konjugát (viz Obrázek 5b). Nadbytek konjugátu pokračuje do kontrolní zóny, tam se naváže na sekundární protilátku. Vzniknou barevné linie v obou zónách, testovací i kontrolní. U negativního vzorku vzniká linie pouze v kontrolní zóně [66,67].



Obrázek 7: Uspořádání imunochromatografického testu u stanovení specifických protilátek.

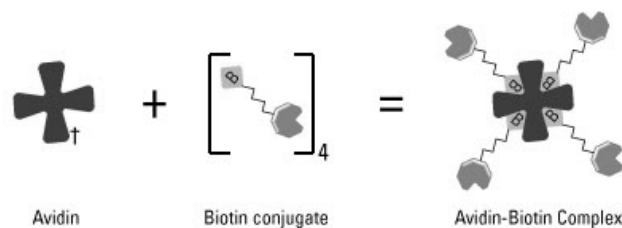
Při stanovení protilátek je také hojně využívána silná biospecifická vazba biotin-streptavidin. Vznik tohoto komplexu v kontrolní linii, odstraňuje komplikace s nadbytkem značených protilátek [39].

Vazba streptavidin – biotin

Obecně známá reakce avidin-biotin patří mezi nejsilnější nekovalentní vazby. Avidin je glykoprotein o čtyřech identických podjednotkách, který se nachází ve vaječném bílku. Streptavidin je protein avidinu velmi podobný, hlavním rozdílem je to, že streptavidin pochází z bakterie *Streptomyces avidinii*. Na každou podjednotku at' avidinu nebo streptavidinu se může navázat jedna molekula biotinu neboli vitamínu H [68].

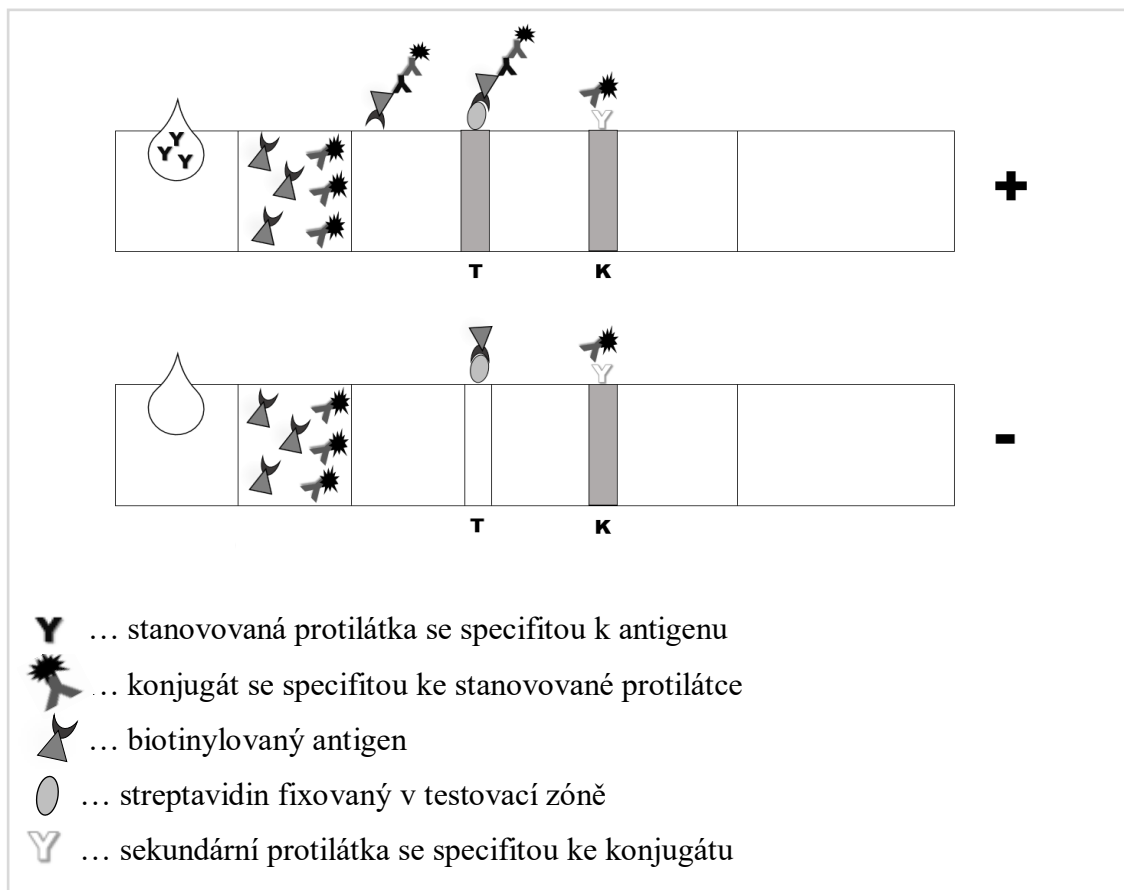
Vazba mezi streptavidinem a biotinem se řadí k nejsilnější nekovalentní vazbě vykazující disociační konstantu asi $1,3 \times 10^{-15}$. Interakci streptavidinu s biotinem lze přirovnat k interakcím mezi antigenem a protilátkou (viz kapitola 1.2). Už samotná struktura streptavidinu je rezistentní vůči denaturaci v extrémních teplotách, *pH*, v přítomnosti denaturačních činidel, detergentů, i proteolytických enzymů. Vazbou na biotin se tato rezistence ještě zvýší a vzniká velmi stabilní komplex. Další výhodou je také vysoká rychlost vzniku vazby mezi streptavidinem a biotinem. Streptavidin i avidin je možné konjugovat s jinými proteiny a stále si udrží svou vazebnou sílu pro biotin [69]

Nevýhodou je tendence streptavidinu vytvářet nespecifické vazby s jinými molekulami. Nespecifické interakce streptavidinu ale nejsou tak časté jako u avidinu. Proto je streptavidin pro většinu analýz vhodnější [70].



Obrázek 8: *Interakce mezi avidinem/streptavidinem a biotinem* upraveno dle [71].

Interakce streptavidin/avidin-biotin je hojně využívána v metodách ELISA, imunohistochemii, v blotovacích metodách, značení buněčných povrchů, při purifikaci proteinů i nukleových kyselin a také v nanobiotechnologiích [71]. V imunochromatografických testech se tato vazba využívá především ke zvýšení signálu odezvy. Streptavidin je obvykle fixován do testovací zóny a díky biotinylnaci protilátek případně antigenů, které vychytávají stanovovaný analyt dochází k rychlé a pevné vazbě v testovací zóně [60].



Obrázek 9: Uspořádání imunochromatografického testu u stanovení specifických protilátek s využitím specifické vazby streptavidin-biotin.

1.5.2 Kompetitivní uspořádání imunochromatografických testů

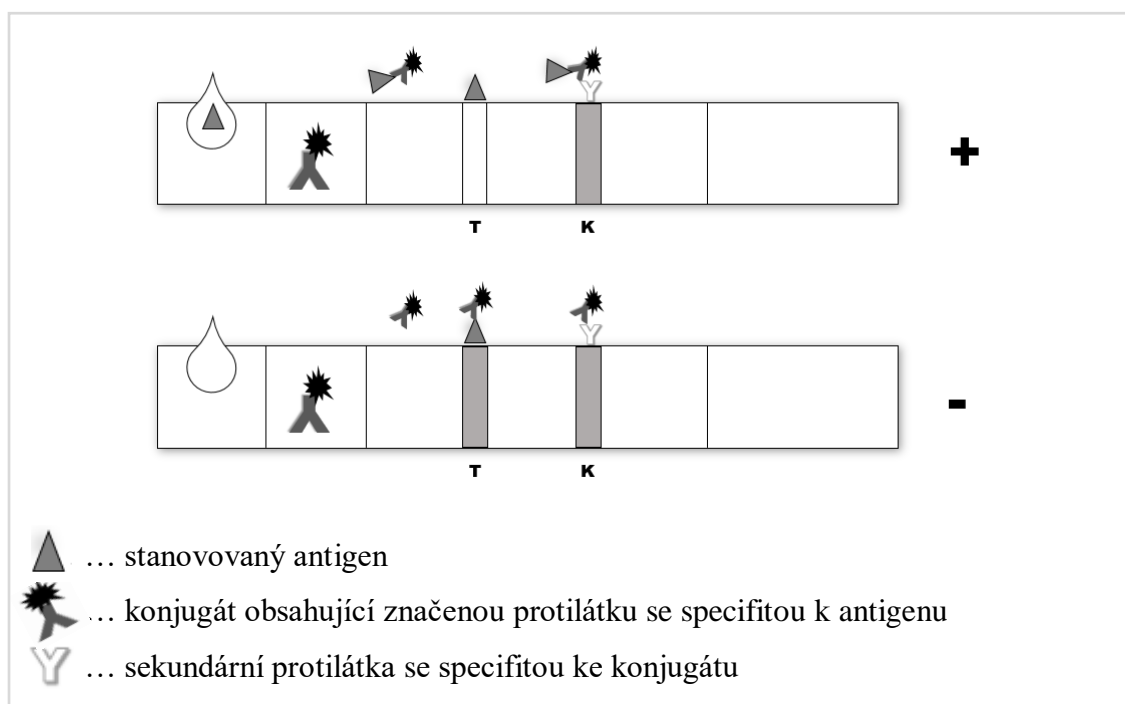
Jak název vypovídá, v tomto uspořádání analyty soutěží o vazebné místo na protilátce. Zpravidla se jedná o kompetici dvou antigenů. Jeden pochází ze stanovovaného vzorku a druhý je již fixován na testovacím proužku. Antigen, který nepochází ze vzorku je buď fixován v testovací zóně (viz formát A) nebo je značený detekční značkou, zastává tedy funkci konjugátu a je fixovaný na sací podložce pro konjugát (viz formát B). Antigen ze vzorku soutěží o vazebné místo na primární protilátce s antigenem fixovaným na testovacím proužku [72].

Toto uspořádání je vhodné pro nízkomolekulární látky, které nemají dostatek vazebných míst pro dvě protilátky najednou a nelze tedy použít sendvičové uspořádání. Příklady imunochromatografických testů stanovující nízkomolekulární látky jsou uvedeny v kapitole 1.8.2.

Princip kompetitivního uspořádání imunochromatografických testů

Formát A

První formát uspořádání má v testovací zóně fixovaný stejný antigen, který je obsažen ve vzorku. Pokud je vzorek pozitivní, tak v části sací podložky pro konjugát vytvoří antigen ze vzorku komplex s konjugátem, ale v testovací zóně se nemá komplex, jak na fixovaný antigen navázat, protože vazebné místo na konjugátu je již zaplněné. Proto v testovací zóně nevznikne barevná linie. Komplex antigen ze vzorku-konjugát pokračuje dále ke kontrolní zóně, kde jsou fixované sekundární protilátky schopné vázat konjugát. Zde je komplex zachycen společně s nadbytkem konjugátu a vzniká barevná linie. V situaci, kdy je vzorek negativní, v prvním kroku nevzniká komplex. Konjugát je samotný unášen kapalinou do testovací zóny, kde se reaguje s antigenem fixovaným v testovací zóně a vytváří barevnou linii. V kontrolní zóně je nadbytek konjugátu zachycen sekundárními protilátkami a vzniká druhá linie [73].



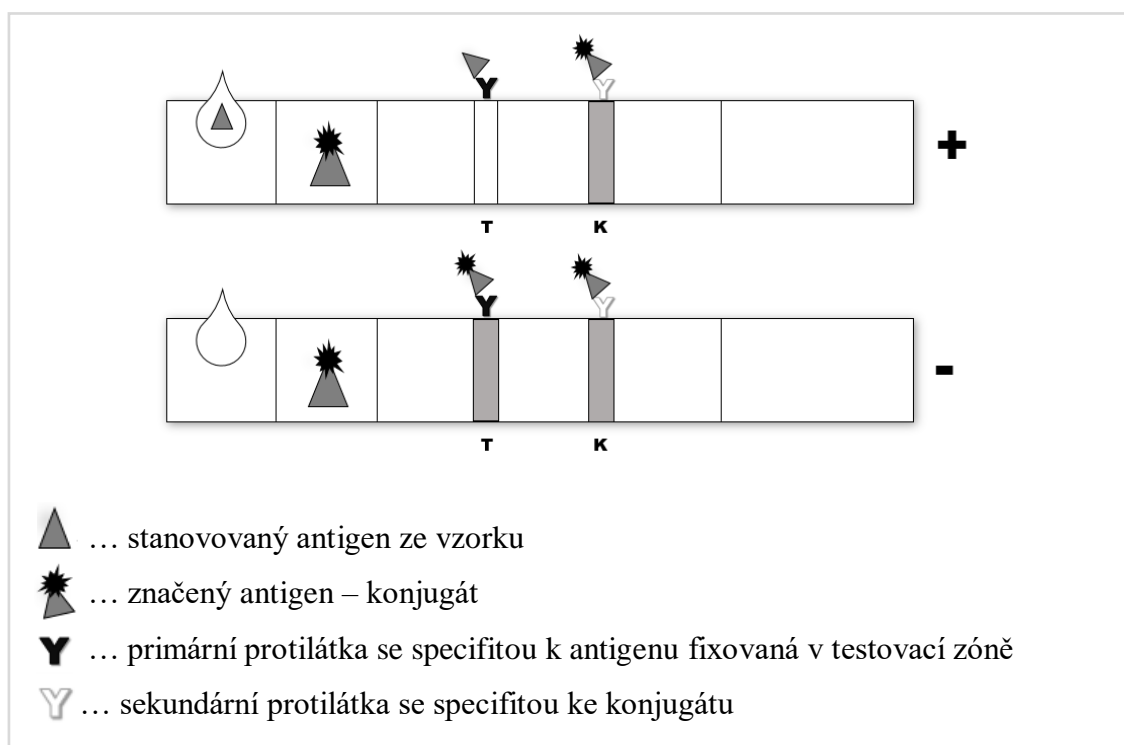
Obrázek 10: Kompetitivní uspořádání imunochromatografického testu –formát A.

Formát B

V druhém formátu kompetitivního uspořádání dochází ke kompetici mezi antigenem obsaženým ve stanovovaném analytu a značeným antigenem – konjugátem. Antigeny

soupeří o vazebné místo primární protilátky fixované v testovací zóně. Antigen z pozitivního vzorku obsadí vazebné místo na protilátce, a protože nemá žádnou detekční značku, nevzniká barevná linie. Zbylé antigeny pokračují do kontrolní zóny, kde se značený antigen vyváže na sekundární protilátky a vznikne barevná linie.

Pokud je vzorek negativní, nemá značený antigen s čím soutěžit a naváže se jak v testovací, tak v kontrolní zóně. Barevný proužek je viditelný v obou liniích [73].



Obrázek 11: *Kompetitivní uspořádání imunochromatografického testu – formát B.*

Vyhodnocení testů s kompetitivním uspořádáním je odlišné od testů sendvičových. Pokud je vzorek pozitivní znamená to, že antigen ze vzorku vyhraje soutěž o vazebné místo primární protilátky, na kterou se již nemůže navázat konjugát. Z toho důvodu je v testovací zóně barevná linie. U pozitivního vzorku tedy najdeme pouze jednu barevnou linii, a to v kontrolní zóně. Negativní vzorek má barevné linie dvě v zóně testovací i kontrolní. V případě, že se stanovovaný antigen ve vzorku nenachází, může se konjugát navázat na primární protilátku, proto vzniká barevná linie také v testovací zóně [74].

1.6 Biologické materiály vyšetřované imunochromatografickými testy

Imunochromatografickými testy lze stanovit širokou škálu analytů nacházejících se v různých biologických materiálech. Testovaný vzorek musí být vždy v kapalném stavu. To přináší výhodu, že vzorky, které jsou odebírány v kapalném stavu nemusí být před analýzou nijak upravovány. Jedinou úpravou může být ředění [14]. Na druhou stranu u vzorků v pevné fázi musí být do procesu zařazena preanalytická úprava vzorku, převod do fáze kapalné. Tímto procesem je nejčastěji extrakce [31]. Konkrétní postup extrakce je popsán v kapitole 1.6.1 podkapitola Tkáň nebo v kapitole 1.8.2.

Jednotlivé typy vzorků, včetně příkladů stanovovaných analytů v nich, jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

1.6.1 Klinické materiály

Krev

Jeden z nejčastějších typů vzorků pro imunochromatografická vyšetření v klinické praxi je krev. U domácích testů případně u testování v terénu je analyzována periferní krev [75], vhodnější jsou ale analýzy séra případně plazmy [33].

U plné krve dochází během postupu přes membránu k filtraci krevních elementů, a to nejen ve vzorkové podložce, ale i samotnou membránou. Nevýhodou je mnohem pomalejší průtok ve srovnání s plazmou. Z experimentu provedeným Li a kol. [76] byla stanovena doba průtoku plné krve membránou na 80 sekund. Oproti tomu plazma proužkem prošla za 11 sekund.

Pro imunochromatografické testy prakticky není důležité, zda je použita plazma nebo sérum. Většina odborných publikací ale uvádí použití séra [5,45,67]. Rozdíl mezi plazmou a sérem je především v typu odběru. Plazma je odebírána do zkumavek s antikoagulačními roztoky. Sérum je ze sražené krve, oproti plazmě tedy neobsahuje srážecí faktory.

Z krve lze imunochromatografickým testem stanovit C-reaktivní protein (CRP) [57], hormony [77], ale nejčastěji je využíván pro stanovení protilátek proti různým antigenům, alergenům [78] i toxinům [79].

Moč

Moč je další hlavní zástupce vzorků analyzovaných imunochromatografickými testy. Díky neinvazivnímu odběru je ideální pro domácí „screeningové“ testy, ve kterých je využíván nejčastěji. Typickým zástupcem imunochromatografického testu, kde je vzorkem moč, je těhotenský test, případně test pro stanovení drog [80]. Aplikace moče na proužek může probíhat dvojím způsobem. V prvním případě musí být vzorek odebrán do nádoby a následně nakapán v definovaném objemu na sací podložku pro vzorek [81]. Druhou možností jsou testovací proužky, které se přímo vloží do proudu moče [82]. Případně se testovací proužek do odebrané moči v nádobě na několik sekund ponoří [83].

V některých případech je moč stočena na centrifuze a testuje se pouze močový sediment. U stanovení bakteriálních polysacharidů je moč před centrifugací ještě smíchána s lyzačním pufrem [84].

Stěry slizničních povrchů

Při rychlé diagnostice dýchacích infekcí jako vzorky slouží nazofaryngeální stěry. Stěr se provádí vatovými tampony v oblasti nosohltanu a obou nosních dírek [85]. Stejně tak test pro průkaz chlamydií se provádí z vaginálního stěru [86]. Tampon se po odběru vloží do zkumavky s příslušnými reagensy, do kterých se získané antigeny z tamponu uvolní.

Tato metoda je využívána například pro určení streptokokových antigenů [87] nebo antigenů chřipkového viru [88].

Sliny

Dosud nejhojnější využití slin je při testování drog [89]. Aktuální výzkumy usilují o uznání slin jako alternativy ke krevním analýzám. Sliny obsahují mnoho proteinů, DNA i RNA, bakterie i viry, z nichž lze rozpoznat abnormality indikující onemocnění a podobně. Odběr slin je jednoduchý, rychlý a neinvazivní a lze jej bez problémů opakovat, a tak sledovat změnu stanovených analytů v čase [90].

Stolice

Typickým „screeningovým“ vyšetření stolice je test na okultní krvácení. Test je založen na detekci lidského hemoglobinu ve vzorku stolice. Odběr je prováděn speciální odběrovou tyčinkou do zkumavky s extrakčním pufrem. Po protřepání je kapalina aplikována na imunochromatografický proužek přímo ze sběrné zkumavky, která má integrované kapátko [91].

Ze stolice lze ale určit i jiné analyty například lipopolysacharid *Vibrio cholerae*, původce cholery [4].

Tkáň

V případě stanovení analytu z tkáně je nutné nejprve převést tkáň do kapalného vzorku. Preanalytická část zpracování vzorku tkáně je časově náročnější. V prvním kroku je tkáň homogenizována a v přítomnosti PBS pufru 10 minut povařena ve vodní lázni. Následně je směs přes noc inkubována při 37 °C s kyselinou chlorovodíkovou. Po inkubaci je přidán hydroxid sodný v PBS. Směs je centrifugována při 5000 rpm ve 4 °C 20 minut. Supernatant je po finální úpravě *pH* nanesen na testovací proužek [46].

Analýza tkáně je využívána identifikaci původu masa [92]. Nebo u veterinárních kontrol například při hledání růstových hormonů a antibiotik v mase [46].

1.6.2 Potraviny

Testování potravin a nápojů se zaměřuje především na rezidua pesticidů, herbicidů nebo toxinů a alergenů. Můžeme ale najít i testy, které odhalují falšování produktu. Takovým zástupcem je test na průkaz sójového proteinu [72]. Sójové mléko je relativně levné, a tak se často přidává do mléka kravského, čímž výrobce značně zvýší svůj zisk [93].

V oblasti zemědělství se také často stanovují viry, napadající dané rostliny. Příkladem může být stanovení protilátek proti viru listů vinné révy [94].

Vzorky potravin a plodin musí být před analýzou převedeny do kapalné formy. U testování nápojů a šťáv lze aplikovat vzorky přímo popřípadě je předředit vzorkovým pufrem [14].

1.7 Vyhodnocení imunochromatografických testů

Velká část z dostupných imunochromatografických testů je pouze kvalitativní. K dispozici jsou také první semikvantitativní testy, především pro stanovení CRP, které určí přibližné rozmezí koncentrace analytu ve vzorku. Aktuální výzkumy se zaměřují na nový vývoj semikvantitativních a kvantitativních imunochromatografických testů. Možnost kvantifikace analýzy má vysoký potenciál pro „screening“ a „monitoring“ napříč všemi diagnostickými obory.

1.7.1 Imunochromatografické testy s kvalitativním vyhodnocením

Kvalitativní testy podávají pouze informaci o tom, zda se stanovovaný analyt ve vzorku nachází či nikoli. Tato forma testů je jednoduchá a uživatelsky velmi přívětivá. Výsledek vyhodnotí i laik bez použití instrumentace. Výsledek se opírá pouze o to, zda se v testovací zóně objeví nebo neobjeví barevná linie. Součástí vyhodnocení je i odečet výsledku v kontrolní zóně. V kontrolní zóně musí barevná linie vzniknout vždy, jinak je test neplatný. Toto zdánlivě primitivní vyhodnocení má ale svá úskalí. Některé vzorky nemusí dát dostatečně silný signál, to znamená, že vytvořená linie může být velmi slabá a špatně rozeznatelná. V takovém případě může dojít k chybnému vyhodnocení testu, falešně pozitivnímu nebo falešně negativnímu výsledku [23].

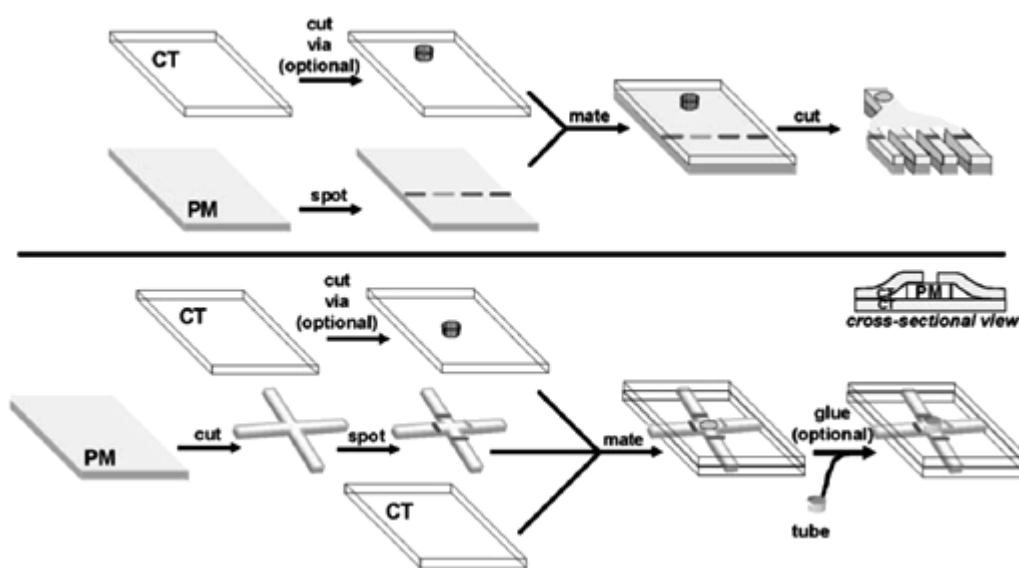
Kvalitativní testy v případě positivity obvykle vedou k dalšímu vyšetření nebo kvantitativnímu stanovení standardními metodami, na speciálních přístrojích a kvalifikovanými pracovníky [11]. Typickým příkladem je hojně využívaný domácí těhotenský test. Tento test si každá žena jednoduše udělá a vyhodnotí sama. V případě pozitivního výsledku ale vyhledá lékaře, který těhotenství potvrdí vyšetřením. Dalším příkladem je testování na přítomnost drog. Pozitivní „screening“ drog je vždy potvrzen laboratorně například plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Imunochromatografické testy pro průkaz drog jsou dnes často tzv. multiplexní. Takové multiplexní testy stanovují několik drog naráz.

Multiplexní uspořádání imunochromatografických testů

Multiplexní uspořádání umožňuje analýzu několika analytů z jednoho vzorku naráz. Principem se jedná o jedno z uspořádání popsanych v kapitole 1.5, sendvičové nebo kompetitivní, ale s větším počtem testovacích zón [44].

Proužek pro multiplex lze uspořádat do různých formátů. Je možné prodloužit proužek a dát několik testovacích zón za sebe. Nebo kombinovat několik jednotlivých proužků například do tvaru kříže nebo hvězdy. Výběr formátu závisí na počtu stanovovaných analytů [95].

Multiplexní testy jsou velmi výhodné vzhledem k malé spotřebě vzorku, úspoře času a snížení nákladů na výrobu testu. Velkou výhodou je i možnost analyzovat více analytů za stejných podmínek [96].



Obrázek 12: Vybrané příklady multiplexního uspořádání upraveno dle [95].

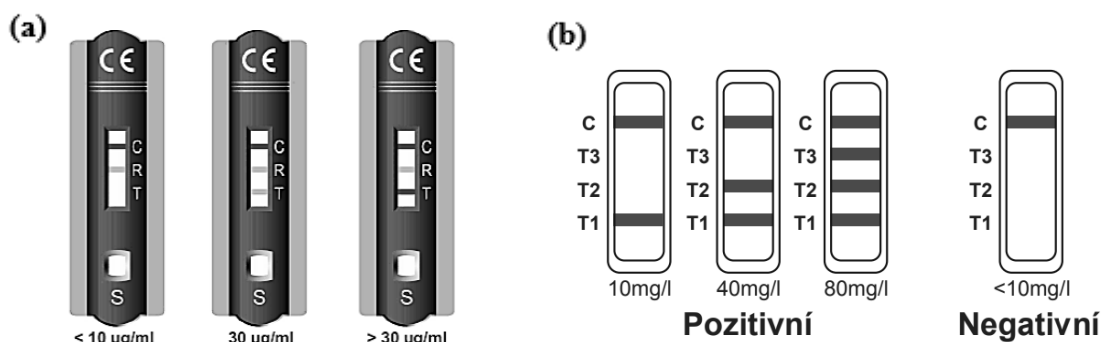
1.7.2 Imunochromatografické testy se semikvantitativním vyhodnocením

V případě semikvantitativního stanovení je intenzita vzniklého proužku v testovací linii porovnávána s referenční intenzitou daného standardu. Stejně jako u kvalitativního stanovení je výsledek odečítán pouhým okem. Proto je stanovená koncentrace stále pouze orientační. Existuje několik možností odečítání výsledku. U první možnosti je intenzita proužku v testovací zóně porovnávána s kolorimetrickou kartou. Na kartě je vytvořena koncentrační řada vytvořených standardů. Pro každou koncentraci má proužek jinou intenzitu zbarvení [66].

Další možností je test, který má referenční linii o dané koncentraci přímo nad testovací zónou (viz Obrázek 13a). Intenzita vzniklé linie v testovací zóně je pak okamžitě

porovnávána s referenční linií a odhadnuta koncentrace analytu ve vzorku, nižší, vyšší nebo rovna koncentraci referenční linie [97].

Typickým zástupcem komerčně dostupných testů se semikvantitativní detekcí je test pro určení CRP. Tyto testy mají většinou odlišný způsob odečítání výsledku, než bylo popsáno výše. Jedná se o způsob, kdy koncentrace CRP ve vzorku stoupá s počtem vzniklých barevných linií (viz Obrázek 13b) [98].



Obrázek 13: Příklady semikvantitativního vyhodnocení imunochromatografických testů. (a) Semikvantitativní vyhodnocení podle referenční linie vyobrazené v testovací zóně upraveno dle [97], (b) Semikvantitativní vyhodnocení podle počtu vytvořených linií v testovacích zónách upraveno dle [98].

1.7.3 Imunochromatografické testy s kvantitativním vyhodnocením

U kvantitativní analýzy je vzorek porovnáván s koncentrační řadou vytvořených standardů. Barevné linie v testovací zóně jsou vyhodnocovány detektory. Některé detektory mohou výsledek testu pouze naskenovat a denzitometrem změřit intenzitu vzniklé linie. Tento typ detektoru je nejjednodušší a je využíván u imunochromatografických testů, které lze vyhodnotit i orientačně pouhým okem [99].

Jiné detektory porovnávají vzniklé linie v testovací a kontrolní zóně podle jejich indexu lomu nebo absorpce světla. Další detektory měří teplo, které po ozáření vizualizační značky produkují, to je ale specifické pouze pro testy využívající vizualizační značku obsahující kov [62]. Speciální detektory jsou nutné pro měření fluorescenčních značek [30]. Zjištěný signál, ať už intenzita, absorbance, fluorescence, vzniklého proužku v testovací linii je porovnávána se známými standardy. Změřený signál je v závislosti na koncentraci vnesen do kalibrační křivky. Z rovnice lze poté vypočítat přesná koncentrace analytu ve vzorku.

1.8 Vybrané příklady vyvíjených imunochromatografických testů

Imunochromatografické testy jsou dnes již běžnou součástí diagnostiky v laboratořích, ordinacích lékařů, ale i v domácnostech. Imunochromatografický test pro průkaz chorion gonadotropního hormonu (hCG), tedy těhotenský test, si zajisté vyzkouší každá žena. Kromě tohoto typického příkladu, kde je nabídka od různých výrobců nejpestřejší, je ale na trhu mnoho dalších testů. Přehled dalších testů je uveden v Tabulce 3.

Následující kapitoly jsou zaměřené na imunochromatografické testy, které jsou aktuálně vyvíjeny ve výzkumných týmech. Tyto testy ukazují další možnosti využití, které teprve čekají na uvedení do praxe.

Tabulka 3: Příklady imunochromatografických testů používaných v klinické praxi.

ICHT pro průkaz	Biologický materiál	Zdroje
hCG (těhotenský test)	Krev, moč	[81,82,100]
Tyreotropního hormonu	Krev	[101]
Ferritinu (hladina železa)	Krev	[102]
Proteinu spermií (mužská plodnost)	Ejakulát	[103]
Lidského hemoglobinu (okultního krvácení)	Stolice	[91, 104]
C-reaktivního proteinu	Krev	[97,98]
Drog	Moč, sliny	[105,106]
Streptokoka A	Faryngeální stěr	[87]
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Vaginální stěr	[86]
Chřipkového viru	Faryngeální stěr	[88]
Protilátek IgM při infekční mononukleóze	Krev	[107]
Protilátek IgA proti transglutamináze	Krev	[108]
<i>Helicobacter pylori</i>	Krev	[109]
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Klíště, sérum	[110, 111]

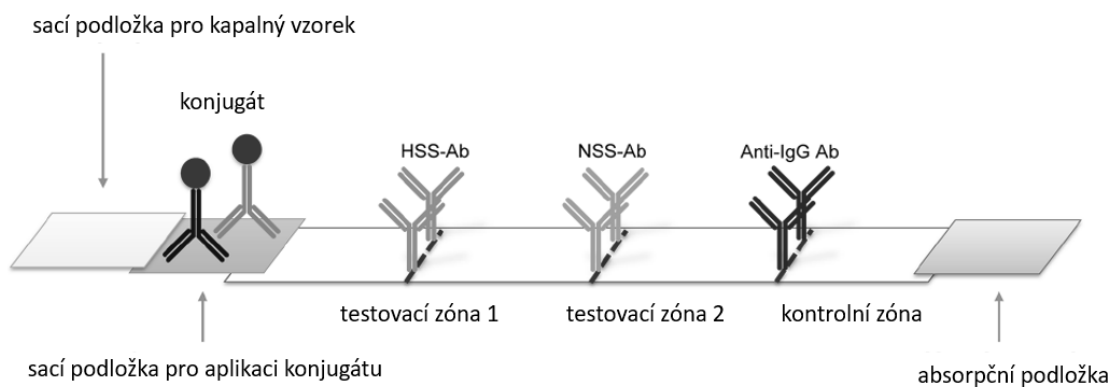
1.8.1 Imunochromatografické testy pro stanovení vysokomolekulárních látek

Test na rozlišení hemoragického a neurotoxického hadího jedu v patientském séru

Počet hadích uštknutí je celosvětově odhadováno na 5 milionů případů za rok, přičemž asi 2,7 milionů uštknutí je způsobeno jedovatými hady. Přibližně 5 % případů je smrtelných [112]. Typ protijedu je podáván podle druhu hada. Rozpoznání druhu hada závisí na popisu nebo fotografii podanou pacientem a tvaru rány od uštknutí. Přesné

rozlišení jedu je důležité pro podání správného protijedu, tím je zabráněno možným vedlejším účinkům i plýtváním drahých protijedů. Aktuálně nejpoužívanější metodou pro určení druhu hadího jedu je ELISA. Imunochromatografický test však umožňuje rychlejší výsledek v řádu minut a provedení přímo u pacienta, což hraje u takto akutních stavů velkou roli [113].

Imunochromatografický test rozpoznává uštknutí neurotoxickým nebo hemoragickým hadím jedem na základě typických proteinů, které hadí jed obsahuje. Do dvou testovacích zón na imunochromatografickém proužku jsou navázány specifické protilátky z používaných vakcín protijedů. Do první testovací zóny protilátky proti proteinu hemoragického (HSS-Ab) jedu do druhé proti neurotoxickému (NSS-Ab). Protilátky jsou purifikovány afinitní chromatografií s cílem snížit riziko křížové reaktivity s jinými proteiny hadího jedu [113].



Obrázek 14: *Schéma imunochromatografického testu pro průkaz hadích jedů v pacientském séru převzato z [113].*

Test je dobře použitelný pro rozpoznání proteinů neurotoxického jedu, kde vykazuje v porovnání s ELISA citlivost 100 % a detekční limit $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Určení hemoragického proteinu tak dobré výsledky nemá, ale je možné vyhodnotit protein jako hemoragický v případě, kdy je neurotoxický negativní a nastal lokální otok tkáně [113].

Pro uvedení do klinické praxe je nutné dále zlepšit citlivost a specifitu testu, a to především pro určení hemoragických proteinů.

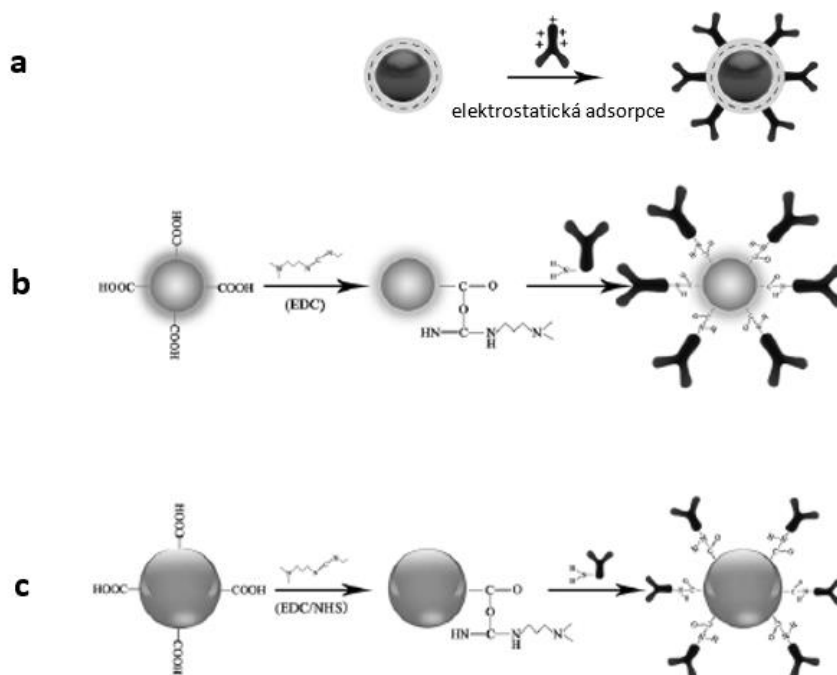
1.8.2 Imunochromatografické testy pro stanovení nízkomolekulárních látek

Stanovení zearalenonu ve vzorcích obilnin

Zearalenon je mykotoxin, který se při nevhodném skladování tvoří v obilovinách. Efekt působení na savce je estrogení. Způsobuje hyperestrogenismus a vede k poškození pohlavních orgánů a endokrinního systému [58]. Kvůli vysoké spotřebě obilovin a jejich produktů lidmi i hospodářskými zvířaty je nutné kontrolovat hladiny zearalenonu rutinně, především v krmivech. Limit doporučený Evropskou unií je $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ krmiva. Nejběžnější metodou pro kvantifikaci je přístrojově náročná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí LC-MS [114].

Vzhledem k rutinnímu použití u kontroly krmiv, je žádoucí mít rychlý a jednoduchý test, který potvrdí či vyvrátí přítomnost zearalenonu. Takovým testem je imunochromatografický test.

Li a kol. [58] vytvořili kompetitivní imunochromatografický test pro průkaz zearalenonu, na kterém zároveň porovnali tři druhy značení protilátek, a to značení zlatými nanočásticemi (AuNPs), kvantovými tečkami (QD) a polystyrenovými mikročásticemi (PM).



Obrázek 15: Schématické znázornění přípravy konjugátů pro imunochromatografický test pro určení zearalenonu. (a) IgG-AuNPs, (b) IgG-QD, (c) IgG-PM převzato z [58].

Na nitrocelulózovou membránu byl do testovací linie navázán antigen zearalenonu. Do kontrolní zóny anti-myší IgG kozího původu.

Před analýzou byla nutná úprava vzorků, a to tak, že k rozemletým vzorkům obilovin (pšenice, kukuřice, rýže) bylo přidáno 10 mL 50% roztoku metanol-PBS. Zkumavkou bylo 5 minut důkladně třepáno. Poté byl přidán ředící roztok pro vzorek a proběhla centrifugace 5 minut při 3214 g. Následně byl odebrán supernatant k analýze [58].

Limity detekce testu jsou u všech použitých značek nižší než maximální limit stanovený Evropskou unií. Pro zlaté nanočástice $60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, u kvantových teček i polystyrenových částic $6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [58].

1.8.3 Imunochromatografické testy pro stanovení specifických protilátek

Detekce specifických protilátek proti viru Ebola v lidském séru

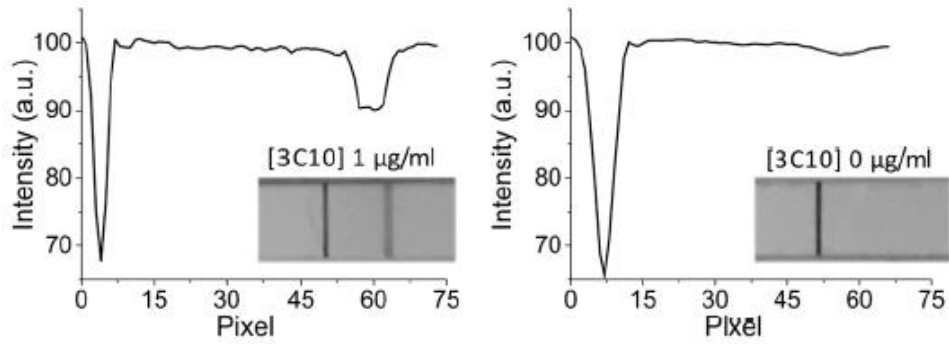
Ebola virus patří do rodu Filoviridae. Jeho RNA genom kóduje 7 strukturálních proteinů, a sice nukleoprotein (NP), polymerázový kofaktor (VP35), matricový protein (VP40), glykoprotein (GP), transkripční a replikační protein (VP30), minoritní matricový protein (VP24) a RNA polymeráza. Nejvíce exprimovaný na povrch viru je glykoprotein, který také indukuje primární imunitní odpověď hostitele [115].

Při vypuknutí epidemie v západní Africe v roce 2014 bylo nakaženo téměř 29 tisíc lidí, přičemž více než 11 tisíc zemřelo. Při této epidemii se potvrdilo, že je nutné najít rychlý diagnostický nástroj pro potvrzení diagnózy a určení epidemických faktorů [116].

Tradiční sérologická diagnostika protilátek proti viru Ebola probíhá testem ELISA. Autoři navrhli dva typy imunochromatografického proužku, monoplexní a multiplexní, díky kterým lze protilátky stanovit během několika minut. U monoplexního testu byla detekce protilátek proti viru Ebola založena pouze na reakci s glykoproteinem, který byl navázán v testovací zóně. Multiplexní test obsahoval tři testovací zóny, ve kterých byly navázány rekombinantní proteiny VP40, GP a NP. V kontrolní zóně byly použity lidské IgG. K vizualizaci byl použit konjugát anti-lidských IgG se zlatými nanočásticemi o velikosti 40 nm [99].

Byly testovány dvě skupiny vzorků. První skupina obsahovala vzorky, které byly dříve ověřené PCR a metodou ELISA. V druhé skupině byly neznámé vzorky [99].

Výsledky byly kvantifikovány jednoduchou mobilní aplikací, ve které byla intenzita vzniklých linií v testovacích zónách vyhodnocena podle standardů kvantifikovaných metodou ELISA [99].



Obrázek 16: Graf vyhodnocení imunochromatografického testu mobilní aplikací převzato z [99].

1.9 Klady a záporny imunochromatografických testů

1.9.1 Klady imunochromatografických testů

Imunochromatografické metody umožňují pracovat s velmi malým množstvím vzorku v řádech desítek μL . Pokud je odebraný vzorek v kapalném stavu nemusí být před analýzou nijak upravován. Vzhledem k tomu, že u většiny imunochromatografických testů je vzorkem moč nebo krev, může být vzorek aplikován přímo bez dalších úprav, což ušetří čas i reagentie. Imunochromatografickým testem lze stanovit rozmanitou škálu látek od látek nízkomolekulárních až po vysokomolekulární proteiny, nukleové kyseliny apod. Díky tomu je využití testu rozšířeno do mnoha odvětví [64].

Hlavní výhodou je jednoduchost provedení i vyhodnocení testu, není tedy nutné speciální proškolení personálu ani přístrojové vybavení. Po přečtení příbalové informace může test provést kdokoli. Formát imunochromatografického proužku umožňuje provedení analýzy mimo laboratoř. Není problém provádět analýzu v terénu, přímo u lůžka pacienta nebo dokonce doma. Spojením těchto výhod s přihlédnutím k nízké ceně se stávají imunochromatografické testy populární i jako domácí „screening“ [12].

V rámci provedení testu nejsou nutné promývací kroky obvyklé u ELISA testů, což šetří spotřebu reagentií i čas. Rychlá je také odezva. Výsledek je znám do několika minut, a to je zásadní u akutních stavů [31].

Existuje nespočet variant imunochromatografických testů. I přes diverzitu biologického materiálu je každý jednotlivý test vysoce specifický pouze pro stanovovaný analyt.

1.9.2 Záporny imunochromatografických testů

Imunochromatografické testy jsou testy tzv. „screeningové“ a především kvalitativní. Jejich úkolem je určit pozitivní nebo negativní výsledek analýzy. V posledních letech jsou ale čím dál větší nároky na přesnější výsledky a kvalitativní vyhodnocení není vždy dostačující. Novější generace testů umožňují semikvantitativní nebo dokonce kvantitativní stanovení. Kvantitativní testy je nutné vyhodnocovat speciálními detektory. Využití detektorů s sebou přináší vyšší finanční náročnost, ať už zakoupením detektorů nebo proškolením personálu. Zároveň se prodlužuje i doba analýzy. [33].

Dalším nedostatkem je citlivost testu. Imunochromatografické testy, které se vyhodnocují pouhým okem mají obvykle citlivost v řádech jednotek $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Pro některé analyty tato citlivost není dostatečná. Její zvýšení ale opět obnáší zvýšení ceny a ztrácí možnost vyhodnocení pouhým okem [31].

Další úskalí nastává u vzorků, které nejsou kapalného skupenství. V tomto případě pak musí samotnému testování na imunochromatografickém proužku předcházet preanalytická úprava vzorku, která obnáší převod vzorku do kapalné fáze.

U imunochromatografických testů s kvantitativním vyhodnocením jsou vyšší nároky na přesnost dávkování vzorku. To je další parametr, který omezuje použití takového testu v terénu, analýza se přesouvá do laboratoře do rukou odborně proškoleného personálu a ztrácí tak hlavní výhody imunochromatografických testů [12].

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce byla příprava reagensů vhodných pro sestavení imunochromatografického testu, konkrétně pro průkaz specifických protilátek proti *Salmonella* Enteritidis.

Díličními úkoly byla i) příprava konjugátu, specifických protilátek značených zlatými nanočásticemi; ii) příprava lyzátu bakteriálních buněk a biotinylace proteinové složky lyzátu, iii) ověření funkčnosti a reaktivity připravených reagensů pomocí komerčních polyklonálních anti-*Salmonella* protilátek a také pomocí séra infikovaných pacientů. Součástí práce bylo i provedení analýz vybranými komerčně dostupnými testy a zhodnocení dosažených výsledků. Protokoly pro přípravu reagensů zahrnovaly optimalizaci kroků nutných pro biotinylacii buněčného lyzátu bakterie *Salmonella* Enteritidis a pro přípravu konjugátu složeného z protilátek značených zlatými nanočásticemi.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Analýza vybraných analytů komerčně dostupnými imunochromatografickými testy

V rámci osvojení metody imunochromatografického testu, byly vyzkoušeny vybrané imunochromatografické testy využívané v klinické praxi. Většina provedených testů byla zakoupena od firmy *JK Trading* a jsou od výrobce *Ulti med Products*. Tyto testy jsou určeny pro ordinace lékařů případně pro laboratoře a jsou využívány jako pomůcka v diagnostice. Všechny imunochromatografické testy byly dodány ve stejném balení a ve formě stejné plastové kazety (viz Obrázek 17).



Obrázek 17: Ukázka jednotlivých částí imunochromatografického testu.

3.1.1 Vybrané příklady imunochromatografických testů pro stanovení vysokomolekulárních látek

Průkaz vysokomolekulárních látek je založen na principu, který byl popsán v kapitole 1.5.1. Jedná se o sendvičové uspořádání. Popis vybraných testů je uveden níže.

Imunochromatografický test pro průkaz lidského chorion gonadotropního hormonu (hCG)

Tento imunochromatografický test patří mezi první na trhu a využívá se pro průkaz těhotenství. Test je založen na detekci chorion gonadotropního hormonu v moči případně v séru. Existuje několik variant těhotenských testů. První variantou je testovací kazeta, do které je nutné vzorek moči nakapat přiloženým kapátkem. Další možností je samotný

imunochromatografický proužek, který se do odebrané moči na několik sekund ponoří. A uživatelsky nejpřívětivější je test v plastovém pouzdře, který se vloží přímo do proudu moče.

Všechny testy mají stejné uspořádání. Test je sestaven tak, že jsou v testovací zóně navázané specifické protilátky proti hCG, se kterými vytváří imunokomplex hCG, pokud je v moči přítomný. V kontrolní zóně jsou navázány protilátky, které zachytí konjugát, například králičí IgG proti kozím protilátkám. Konjugát vázaný v sací podložce pro konjugát je tvořen polyklonálními protilátkami značené nejčastěji částicemi koloidního zlata.

Reakce je spuštěna přidáním moče nebo séra do jamky pro vzorek. Kapalným vzorkem poté vzlíná působením kapilárních sil po proužku, reaguje s konjugátem. A dále prochází testovací a kontrolní zónou, kde může reagovat s navázanými molekulami a vytvářet barevné linie, díky koloidnímu zlatu. Pozitivní vzorek má barevné linie v testovací i kontrolní zóně. Negativní vzorek má barevnou linii pouze v zóně kontrolní. Jak název vypovídá kontrolní linie slouží jako kontrola správného provedení testu. Pokud barevná linie v kontrolní zóně chybí test není platný a výsledek nelze odečítat.

Před provedením testu je nutné testovací proužek uchovávaný v ledničce vytemperovat na pokojovou teplotu. A po vyjmutí z obalu použít do 1 hodiny. Poté se podle typu testu aplikuje vzorek moči nebo séra a pozoruje se vytvoření barevných linií. Výsledek se obvykle odečítá po 5 maximálně po 10 minutách.



Obrázek 18: Imunochromatografický test pro průkaz hCG v moči.
Zleva: nepoužitý test, pozitivní test, negativní test.

Imunochromatografický test pro průkaz streptokoka A ve faryngeálním střeu

Imunochromatografický test pro průkaz streptokoka A slouží jako „screeningový“ ukazatel probíhající angíny. Vzorek je odebrán z hrdla výtěrovým tamponem. Uspořádání testu je stejné jako u těhotenských testů akorát v tomto testu jsou v testovací zóně imobilizovány protilátky proti streptokoku A.

Provedení testu je podobné jako u těhotenského testu výše, jediným rozdílem je převedení vzorku z výtěrového tamponu do kapalného vzorku. Převedení do kapalně fáze probíhá přiloženými reagensy, jedná se o azid sodný a kyselinu octovou. Ponořením tamponu do těchto reagií se antigen z výtěrového tamponu uvolní do kapaliny a může být na imunochromatografickém proužku analyzován.

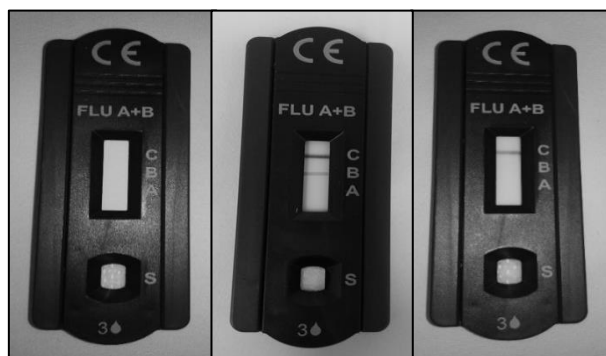


Obrázek 19: *Imunochromatografický test pro průkaz streptokoka A ze střeu.*
Zleva: nepoužitý test, pozitivní test, negativní test.

Imunochromatografický test pro průkaz chřipkových antigenů A, B v nasofaryngeálním střeu

Imunochromatografický test pro průkaz chřipkových antigenů slouží ke kvalitativnímu stanovení chřipkového viru. Je založen na detekci virových nukleoproteinů A a B. V testovací zóně jsou tedy navázané protilátky proti těmto nukleoproteinům.

Vzorek je odebírán vatovým tamponem, z kterého jsou virové nukleoproteiny extrahovány do přiloženého extrakčního pufru. Kapalně vzorek je pak aplikován na imunochromatografický proužek a analyzován.

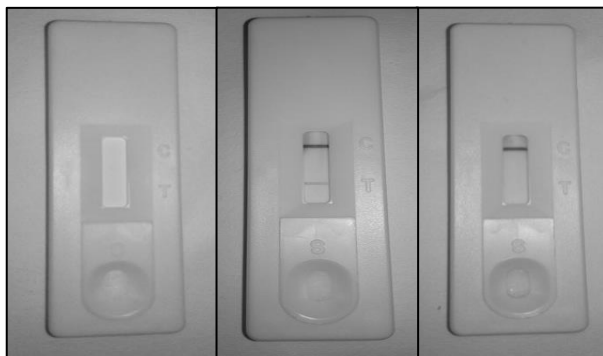


Obrázek 20: *Imunochromatografický test pro průkaz viru chřipky A, B ze stěru.*
Zleva: nepoužitý test, pozitivní test na nukleoprotein B, negativní test.

Imunochromatografický test pro průkaz protilátek proti *Borrelia burgdorferi* v séru

Borrelia burgdorferi patří mezi spirochety a je původcem lymeské boreliózy. Onemocnění je diagnostikováno na základě klinických příznaků a stanovení protilátek proti *Borrelia burgdorferi* v séru. Protilátky se začínají tvořit 3 až 6 týdnů od nákazy a tvoří se po dobu několika měsíců. V prvních šesti týdnech se tvoří protilátky třídy IgM od 8. týdne se začínají tvořit i protilátky třídy IgG. Tento test je vytvořen pro průkaz protilátek proti *Borrelia burgdorferi* všech tříd. V testovací zóně je imobilizován mix nativních a rekombinantních antigenů *Borrelia burgdorferi*.

Do jamky pro vzorek se dávkuje 20 μ L patientského séra, po 30 sekundách se přidají 2 kapky přiloženého pufru. Vzorek vzlíná na konjugátovou podložku, kde reaguje s konjugátem a dále pokračuje do testovací zóny. V případě pozitivního vzorku v testovací zóně vznikne barevný proužek, protože protilátka ze séra s navázaným konjugátem reaguje s antigenem imobilizovaným v této oblasti. Výsledek testu je odečítán po 10 maximálně po 20 minutách.



Obrázek 21: *Imunochromatografický test pro průkaz protilátek proti Borrelia burgdorferi v séru. Zleva: nepoužitý test, pozitivní test, negativní test.*

3.1.2 Vybrané příklady imunochromatografických testů pro stanovení nízkomolekulárních látek

Průkaz nízkomolekulárních látek je založen na principu kompetitivní vazby. Popis kompetitivního uspořádání je v kapitole 1.5.2.

Imunochromatografický test pro průkaz kotininu v moči

Kotinin je hlavní metabolit nikotinu. Nikotin i kotinin jsou rychle metabolizovány a vylučovány močí. Vzhledem k tomu, že kotinin je v moči stabilnější, než nikotin je ideální marker pro průkaz užívání nikotinu. Imunochromatografický test na průkaz kotininu v moči tedy informuje o tom, zda pacient v posledních dnech kouřil nebo používal náhražky kouření nikotin obsahující.

V testovací zóně imunochromatografického proužku je imobilizován kotinin. Konjugát je tvořen myšími monoklonálními protilátkami proti kotininu a detekčními nanočásticemi. V kontrolní zóně jsou vázány kozí protilátky proti myším IgG z konjugátu.

Test je pozitivní v případě, že se ve vzorku nachází kotinin v koncentraci vyšší $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Vzhledem ke kompetitivnímu uspořádání u pozitivního vzorku vzniká barevná linie pouze v kontrolní zóně. V případě negativního vzorku se objeví barevné linie dvě, v kontrolní i testovací zóně.



Obrázek 22: *Imunochromatografický test pro průkaz kotininu v moči.*
Zleva: nepoužitý test, pozitivní test, negativní test.

Imunochromatografický test pro průkaz Etyl- β -D-Glukuronidu v moči

Etylglukuronid (ETG) je metabolit etylalkoholu. Tento metabolit se vytváří po konzumaci alkoholických nápojů a je detekovatelný v moči ještě 80 hodin po požití. ETG je využíván jako ideální ukazatel požití alkoholu.

Imunochromatografický proužek je sestaven tak, že testovací zóna obsahuje ETG navázaný na protein. Na konjugátové podložce je imobilizován konjugát, který je tvořen myšími monoklonálními protilátkami proti ETG a detekčními nanočásticemi. V kontrolní zóně jsou vázány kozí protilátky proti myším IgG z konjugátu.

Jednu linii, a to v kontrolní zóně, tedy pozitivní výsledek testu nalezneme v případě, že se ve vzorku nachází ETG v koncentraci vyšší $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Při nižší koncentraci ETG je test negativní a objeví se dvě barevné linie.



Obrázek 23: *Imunochromatografický test pro průkaz ETG v moči.*
Zleva: nepoužitý test, pozitivní test, negativní test.

Imunochromatografický test pro průkaz drog v moči

Imunochromatografické testy jsou vyráběny buď jako klasické, monoplexní, imunochromatografické testy pro průkaz jedné drogy. Nebo existují multiplexní testy, které umožňují průkaz hned několika drog na jedné testovací kazetě.

Provedení testu je u monoplexních i multiplexních testů stejný, jen u multiplexních je několik testovacích zón. V každé testovací zóně je imobilizována protilátka proti jiné droze. Každý test také obsahuje konjugát se specifitou k hledané droze. V kontrolní zóně nalezneme sekundární protilátky proti konjugátu. Pozitivní vzorky, které obsahují drogu nebo drogy v hodnotě vyšší, než je hodnota „cut-off“ pro danou drogu, nevytvoří barevnou linii v testovací zóně. Pokud se droga ve vzorku nachází v množství pod danou „cut-off“ hodnotu, objeví se barevná linie také v testovací zóně, což značí negativitu. Multiplexní imunochromatografický test pro průkaz drog je zobrazen na Obrázku 24.



Obrázek 24: *Multidrogový imunochromatografický test.*
Zleva: test na všechny drogy negativní; test pozitivní na BZO.

3.2 Laboratorní přístroje a vybavení

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- aparatura pro elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA USA)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo), $r = 6,1\text{cm}$
- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ System s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- inkubátor Memmert INE 400 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Německo)
- koncentrátor Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrozkušavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- orbitální třepačka Multi-functional Orbital Shaker PSU-20i (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- spektrofotometr Nano-MD UV-Vis Bio Spectrophotometer s nástavcem NanoStick-D (SCINCO Co. Ltd., Seoul, Korea)
- stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- špičky GeLoader 20 μl (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- topné hnízdo Block heater Grant Bio BTM (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- třepačka Vortex mixer Wx (Velp Scientifica, Usmate, Itálie)
- ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)
- zdroj napětí Powerpac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- blotovací membrána Immun-Blot® PVDF membrane, porozita 0,2 μm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- membránová vakuová pumpa a kompresor model 22AN (KNF Neuberger, INC., Trenton, NJ, USA)

- dot-blot zařízení pro aplikaci vzorků 96-Well Dot-Blot Hybridisation Manifold (Scie-Plas Ltd., Cambridge, Velká Británie)
- Petriho čtvercové dělené destičky (100 mm) Sterillin (Sterilin Limited, Cambridge, Velká Británie)
- Petriho misky kulaté (50 mm) Sterillin (Sterilin Limited, Cambridge, Velká Británie)
- potravinová fólie Saran (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)
- spektrofotometr LabSystems Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- třepačka PMS-1000i Microplate Shaker (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)

3.3 Seznam chemikálií, reagensů a biologických materiálů

Chemikálie a reagensy

- 2-(N-morfolino)etansulfonová kyselina (MES; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2x Laemmli vzorkový pufr (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- amoniak (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- anti-lidské IgG králičího původu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- biotin hydrazid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- NHS-D-biotin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- citran sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4 ; Penta, Chrudim, ČR)
- dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Neratovice, ČR)
- dusičnan stříbrný (Penta, Chrudim, ČR)
- EDAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- etanol (Lachema, Neratovice, ČR)
- etanolamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- etylenglykol (Lachema, Neratovice, ČR)
- fosforečnan sodný (Na_3PO_4 ; Penta, Chrudim, ČR)
- glutaraldehyd 50% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Penta, Chrudim, ČR)
- hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- chlorid sodný (NaCl ; Lach:ner, Neratovice, ČR)
- IgG z lidského séra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- jodistan sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- koloidní zlato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- konjugát – anti-lidské IgG (celá molekula) – HRP, protilátky kozího původu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- konjugát – anti-myší IgG (celá molekula) – HRP, protilátky kozího původu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- konjugát – anti-králičí IgG (celá molekula) – HRP, protilátky kozího původu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina citronová (Penta, Chrudim, ČR)
- kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR)
- kyselina octová 99% (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- MES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- metanol (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- monoklonální anti – Salmonella IgG (My BioSource, San Diego, CA, USA)
- N, N, N, N-tetrametylenetylendiamin (TEMED; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N, N'-metylenbisakrylamid 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- octan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Opti-4CN™ Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- patientské sérum pozitivní na anti- Salmonella IgG (InterImun, Pardubice, ČR)
- persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- polyklonální anti-Salmonella IgG (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- standard molekulových hmotností (10–250 kDa) Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- sulfo-NHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- streptavidin původem z *Streptomyces avidinii* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- tris-(2-karboxyetyl)fosfin (T-CEP) (Life Technologies, USA)
- tris(hydroxymetyl)aminometan (Tris; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- zlaté nanočástice modifikované PEGem (Orion High Technologies, Madrid, ESP)
- zlaté nanočástice modifikované kyselinou propionovou (Orion High Technologies, Madrid, ESP)

Speciální biologické materiály

- buněčný lyzát *Salmonella* Enteritidis – vytvořený ze vzorku stěru pozitivního na *Salmonella* Enteritidis, vzorek byl poskytnut od pacienta, který podepsal informovaný souhlas (Fakultní nemocnice Hradec Králové, ČR)
- pacientské sérum s pozitivními anti-Salmonella IgG, vzorek byl poskytnut od pacienta, který podepsal informovaný souhlas (Fakultní nemocnice Hradec Králové, ČR)
- pacientské sérum s pozitivními Ig proti *Borrelia burgdorferi* – vzorek od dobrovolného dárce (Univerzita Pardubice, ČR)
- moč pozitivní na hCG – vzorek od dobrovolného dárce (Univerzita Pardubice, ČR)
- pozitivní kontroly u průkazu streptokoka A a antigenů chřipky byly součástí testovacího soupravy
- moč pozitivní na BZO a THC – vzorek byl poskytnut od pacienta, který podepsal informovaný souhlas (Nemocnice Havlíčkův Brod, ČR)
- moč pozitivní na kotinin a ETG – vzorek od dobrovolného dárce (Univerzita Pardubice, ČR)

3.4 Metodická část

3.4.1 SDS-PAGE elektroforéza

Roztoky

- Roztok A: 30% směs akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu
- Roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr, *pH* 8,8
- Roztok C: 1 M Tris-HCl pufr, *pH* 6,8
- Roztok D: 10% roztok SDS (dodecylsulfát sodný)
- Roztok E: 10% roztok persíranu amonného
- TEMED
- Elektrodotový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS
- Laemliho vzorkový pufr

Postup

V prvním kroku jsou připraveny gely pro elektroforetickou separaci. Gely se tvoří nalitím roztoku pro polyakrylamidový gel mezi připravená sklíčka. Sklíčka musí být očištěna lihem a umístěna do držáku, tak aby držela u sebe a vytvořila mezi sebou mezeru 0,75 mm. Držák se sklíčky je umístěn do stojanu, kde probíhá nalití a následná polymerace gelu.

Mezi sklíčka se aplikuje nejprve směs pro dělicí gel a poté směs pro zaostřovací gel. 10% dělicí gel se připraví smícháním destilované vody a jednotlivých roztoků v pořadí a objemech, které jsou uvedené v Tabulce 3. Naposledy je vždy přidáván roztok E a TEMED, které zahajují polymeraci. Takto připravený roztok se dávkuje pipetou mezi připravená sklíčka ve stojanu a převrství se destilovanou vodou. Polymerace trvá 20 – 30 minut.

Po dokončení polymerace se destilovaná voda odsaje filtračním papírem a přidá se směs pro 5% zaostřovací gel, který je připraven obdobně jako gel dělicí. Přesné roztoky pro přípravu zaostřovací gelu a jejich objemy jsou v Tabulce 4. Vytvořená směs je dávkována pipetou na dělicí gel a vloží se do něj hřebínek, který vytvoří 10 jamek. Gel polymeruje asi 15 minut.

Po zpolymerování zaostřovacího gelu je hřebínek vyjmut. Vytvořené gely mezi sklíčky jsou přeneseny z držáku do elektroforetické vany. V elektroforetické vaně jsou sklíčka

s gely umístěna do stojanu s elektrodami a zalita elektrodoým pufrem. Všechny jamky jsou pipetou propláchnuty elektrodoým pufrem. Poté je možné aplikovat vzorky.

Tabulka 4: *Objemy roztoků pro vytvoření gelu na elektroforetickou separaci.*

	10% dělicí gel [μL]	5% zaostřovací gel [μL]
destilovaná voda	2000	1400
roztok A	1650	330
roztok B	1250	-
roztok C	-	250
roztok D	50	20
roztok E	50	20
TEMED	2	2

Vzorky jsou ředěné Laemliho vzorkovým pufrem v poměru 1 : 1 a následně umístěny do topného hnízda, kde se vaří 3 minuty při 100 °C. Následně jsou vzorky aplikovány Hamiltonovou mikrostřičkačkou do jednotlivých jamek, a sice 15 μL vzorku do každé jamky.

Samotná elektroforetická separace probíhá po připojení elektroforetické vany ke zdroji. Na zdroji se nastaví konstantní napětí 180 V, proud podle počtu gelů, přičemž na 1 gel je potřeba proud 30 mA a doba separace. Separace probíhá asi 50 minut.

Po elektroforetické separaci je gel vyjmut a vizualizován barvením.

Barvení gelu Coomassie Brilliant Blue

Roztoky

- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% etanol
- Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Postup

Po proběhlé elektroforetické separaci a vyjmutí gelu z aparatury, je gel vložen do Petriho misky a fixován po dobu 30 minut ve fixačním roztoku. Poté je nutné gel znovu rehydratovat, a to po dobu 30 minut v destilované vodě. Následně je na gel nalit barvicí roztok Bio-Safe Coomassie. Jeden gel je nutné barvit asi ve 30 mL barvicího roztoku,

tak aby byl v roztoku ponořený. Barvení probíhá 1 hodinu, na třepačce, v digestoři. Po obarvení je nutné odbarvit pozadí gelu. Odbarvení probíhá v destilované vodě 1 – 2 hodiny, dokud není pozadí dostatečně odbarvené.

Barvení gelu dusičnanem stříbrným

Roztoky

- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% etanol
- 10% roztok glutaraldehydu
- Roztok amoniakálního stříbra
 - Roztok je nutné připravit těsně před použitím. Nejprve se do 10 mL destilované vody přidá 700 µL vodného roztoku amoniaku a 119,5 µL 9 M hydroxidu sodného. Tato směs je následně titrována 20% vodný roztok dusičnanu stříbrného do vzniku světle hnědého zákalu. Nakonec je roztok doplněn do 50 mL destilovanou vodou.
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citronová + 0,04% formaldehyd
- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová

Postup

Po proběhlé elektroforetické separaci a vyjmutí gelu z aparatury, je gel vložen do Petriho misky a propláchnut destilovanou vodou. Poté je gel fixován po dobu 30 minut nebo přes noc při 4 °C. Po fixaci se musí gel rehydratovat v destilované vodě po dobu 30 minut. K rehydratovanému gelu se přidá roztok 10% glutaraldehydu a inkubuje se 30 minut na třepačce. Dále je gel promýván destilovanou vodou 6x10 minut. Následuje přidání roztoku amoniakálního stříbra, přibližně 25 mL na jeden gel. V tomto roztoku je gel inkubován 12 minut. V dalším kroku je gel rychle promyt destilovanou vodou a zalit vyvolávacím roztokem, ve kterém je ponechán, dokud se nezobrazí marker v požadované intenzitě. Nakonec je gel ponořen do ustalovacího roztoku, v kterém je možné gel skladovat v lednici.

3.4.2 Dot-Blot analýzy reaktivity párových biomolekul

Roztoky

- PBS-T pufr *pH* 7,4
 - Pufr se připraví rozpuštěním 2,9 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂ PO₄, 0,8 g NaCl, 0,2 g KCl v 1 litru destilované vody. Dále se přidá 0,05% Tween 20 a upraví se *pH* na požadovanou hodnotu 7,4.
- Blokovací roztok: 5% BSA v PBS-T
- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,25% BSA v PBS-T

Postup

Nejprve je sestrojena aparatura pro Dot-Blot analýzu - 96-Well Dot-Blot Hybridisation Manifold, která je připojena na vakuovou pumpu. V dalším kroku je ekvilibrována PVDF membrána, a to ponořením do 100% metanolu na 3 minuty. Ekvilibrovaná membrána je přenesena na Dot-Blot aparaturu, přiklopena vrchní aparatury částí s jamkami a zajištěna šrouby. Po zajištění membrány je spuštěna vakuová pumpa. Poté je membrána ekvilibrována PBS-T pufr *pH* 7,4, a to multikanálovou pipetou, kterou je do každé jamky aplikováno 100 µL pufru. Celá membrána je takto promyta 2x. Následuje aplikace jednotlivých vzorků. Vzorky jsou pipetovány do daných jamek v objemu 100 µL. Poté, co jsou všechny vzorky nasáklé do membrány, je nutné jednotlivé jamky ještě jednou promýt PBS-T pufr *pH* 7,4. Po odsátí veškerého pufru je aparatura, za stálého chodu vakuové pumpy, rozebrána a membrána pinzetou přenesena na potravinovou folii, kde se za laboratorní teploty suší.

Suchá membrána je přenesena do Petriho misky a zalita blokačním roztokem. Blokace probíhá 1 hodinu na třepačce, za laboratorní teploty. Množství blokačního roztoku je závislé na velikosti Petriho misky. Po blokaci je membrána 3x rychle promyta PBS-T pufr *pH* 7,4 a následně inkubována s primární protilátkou 1 hodinu na třepačce, za laboratorní teploty. Po inkubaci nastává další promývací krok, kdy je membrána promyta PBS-T pufr *pH* 7,4 nejprve 3x rychle a poté 3x v pěti minutových intervalech. Dále je přidán konjugát, s kterým je membrána inkubována opět 1 hodinu na třepačce, za laboratorní teploty. Po dokončení inkubace je membrána promyta PBS-T pufr *pH* 7,4 stejně jako v předchozím promývacím kroku, tedy 3x rychle a 3x v pěti minutových intervalech. Pokud konjugát obsahuje detekční značky jako například zlaté nanočástice, výsledek lze

vyhodnotit okamžitě. V případě detekce enzymem např. křenovou peroxidázou je ještě nutné přidat substrátový roztok.

Kolorimetrická detekce Opti-4CN Substrate Kit

Opti-4CN Substrate Kit se skládá z dvou reagensí: Opti-4CN diluent concentrate a Opti-4CN substrate. Substrátový roztok je připraven smícháním ředícího roztoku a substrátu. Ředící roztok se připraví z 1 dílu Opti-4CN diluent concentrate a 9 dílů destilované vody. K takto vytvořenému roztoku je přidán Opti-4CN substrate v poměru 200 μ L na 10 mL ředícího roztoku.

Substrátový roztok je nalit na promytou membránu a inkubován 5 - 30 minut, dokud nedojde k požadované intenzitě zbarvení. Nakonec je membrána promyta destilovanou vodou.

3.4.3 Izolace IgG ze séra

Materiál a chemikálie

- Mikrokolona s Affi-gel protein A – kapacita 8 – 10 mg IgG/ mL nosiče (agaróza)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza – protein A kapacita 1,5 – 3 mg IgG/ mL nosiče
- 0,1M PBS o *pH* 7,5 – ekvilibrační pufr
- 0,1M glycinový pufr o *pH* 2,8 – eluční pufr
- 0,1M tris-HCl pufr o *pH* 9,5
- 0,1M kyselina citronová o *pH* 3 – regenerační pufr
- lidské sérum

Postup

Izolace IgG ze séra afinitní chromatografií na mikrokoloně s Affi-gel protein A

Prvním krokem je ekvilibrace kolony postupným přidáváním 10 mL 0,1M PBS o *pH* 7,5. Poté je nanesen 1 mL vzorku odsoleného séra a nastává samotná izolace. Při zatažení séra do kolony je odebírána vazebná frakce a dále je kolona promyta 6 x 1 mL PBS. Promytím jsou odstraněny ostatní proteiny a na koloně zůstávají nasorbované pouze požadované IgG. IgG se z kolony eluují postupným přidáváním 10 mL 0,1M glycinového pufru o *pH* 2,8. Jednotlivé eluční frakce se jímají do mikrozkupek po 0,5 mL (6x) a následně po 1 mL (7x). Do každé mikrozkupek s jednotlivou frakcí se přidá 25 μ L/0,5mL

0,1M tris-HCl pufru o *pH* 9,5. Po izolaci je kolona regenerována 5 mL 0,1M kyseliny citronové o *pH* 3 a nakonec převeden zpět do PBS, v kterém se skladuje.

Izolace IgG ze séra na magnetických částicích s imobilizovaným proteinem A

Před izolací je odebráno 0,5 mL magnetického nosiče, který je ekvilibrován 8 x 1 mL 0,1 M PBS o *pH* 7,5. Poté je přidáno 0,5 mL zředěného séra 1 : 1 v PBS a probíhá inkubace na rotátoru po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci je odebrána vazebná frakce a nosič je promyt 5 x 1 mL PBS. Dalším krokem je již eluce nasorbovaného IgG, a to 5 x 0,5 mL 0,1M glycinového pufru o *pH* 2,8. Po každé výměně glycinového pufru probíhá tří minutová inkubace na rotátoru, za laboratorní teploty, jednotlivé frakce se odebírají a ke každé frakci se přidá 25 μ L/0,5 mL 0,1M tris-HCl pufru o *pH* 9,5. Po izolaci je kolona regenerována 5 mL 0,1M kyseliny citronové o *pH* 3 a nakonec převeden zpět do PBS, v kterém se skladuje.

3.4.4 Příprava konjugátu AuNPs-IgG

Roztoky a chemikálie

- Destilovaná voda
- 0,05% Tween 20
- Zásobní roztok 0,5 mg EDAC ve 50 μ L destilované vody
- Funkcionalizované zlaté nanočástice – karboxylované PEG, 20nm, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Anti-lidské IgG králičího původu v deionizované vodě o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Postup

Ke 40 μ g zlatých nanočástic je přidáno 0,5 mg EDAC v 50 μ L roztoku destilované vody. Směs je řádně promíchána a následně inkubována 10 minut při laboratorní teplotě, za světla. Následně je směs stočena na centrifuze při 5000 rpm po dobu 15 minut. Tím zlaté nanočástice klesnou na dno a supernatant s nadbytkem EDAC je odstraněn. Následuje promývací krok – k sedimentu zlatých nanočástic je přidáno 100 μ L destilované vody, směs je promíchána a opět stočena při 5000 rpm po dobu 15 minut. Supernatant je opět odstraněn. Následně je přidáno 200 μ L destilované vody s 0,05% Tweenem 20. K takto zředěným zlatým nanočásticím je přidáno 10 μ g anti-lidských IgG králičího původu v 10 μ L destilované vody. Směs je inkubována 3 hodiny, na rotátoru při laboratorní teploty, za světla.

3.4.5 Příprava buněčného lyzátu *Salmonella Enteritidis*

Kolonie *Salmonella Enteritidis* se kličkou přenesou do zkumavky s 15 mL peptonové vody. Směs je promíchána na vortexu. Následně je zkumavka umístěna do autoklávu na 20 minut při teplotě 121 °C. Poté je nutné ověřit viabilitu buněk vyočkováním na pomnožovací půdu a inkubací po dobu 24 h v termostatu při 37 °C. Po ověření, že buňky *Salmonella* nejsou životaschopné je lyzát stočen na centrifuze při 3000 rpm 10 minut. Supernatant je odebrán k další práci.

3.4.6 Stanovení celkového množství proteinů v lyzátu *Salmonella Enteritidis* BCA testem

Materiál a chemikálie:

- Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Lyzát *Salmonella Enteritidis* ve fosfátovém pufru *pH* 7,2 koncentrace 1 mg·mL⁻¹
- fosfátový pufr *pH* 7,2
- roztok BSA o koncentraci 2 mg·mL⁻¹

Princip

BCA test využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA) jako detekční činidlo pro měďné ionty. Měďné ionty vznikají redukcí měďnatých iontů při reakci proteinu s činidlem obsahující CuSO₄ v alkalickém prostředí. Vzniklé měďné ionty dále reagují s BCA za vzniku fialového komplexu. Vyhodnocení probíhá spektrofotometricky při 562 nm.

Postup

K vyhodnocení množství proteinu v lyzátu *Salmonella Enteritidis* je nutné připravit kalibrační řadu standardů BSA. Standardy se připraví do zkumavek smícháním jednotlivých množství zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) a fosfátového pufru podle Tabulky 5.

Tabulka 5: *Dávkování fosfátového pufru a zásobního roztoku BSA pro vytvoření standardních roztoků o dané koncentraci v BCA testu.*

	Fosfátový pufr pH 7,2 [μL]	Zásobní roztok BSA o koncentraci 2 mg·mL⁻¹ [μL]	Výsledná koncentrace standardů [μg·mL⁻¹]
A	900	100	200
B	980	20	40
C	990	10	20
D	995	5	10
E	997,5	2,5	5
F	998,5	1,5	2,5
G	999,5	0,5	1
H	999,8	0,2	0,5
I	1000	0	0

Dále se připraví desítková ředící řada lyzátu, a to ředění 1x, 10x, 100x, 1000x a 10 000x. Do první zkumavky se napipetuje 1000 μL lyzátu, do všech ostatních 900 μL fosfátového pufru. Ředící řada je vytvořena tak, že se postupně přenáší 100 μL z první zkumavky do druhé, z druhé do třetí atd. Tímto způsobem je každá další zkumavka vždy 10x zředěna.

Dále je nutné si připravit pracovní roztok. Pracovní roztok se připraví smícháním jednotlivých reagensů, které testovací souprava obsahuje. Poměr míchání reagensů A, B a C je 25 : 24 : 1.

Takto připravené standardy a vzorky jsou napipetovány v doubletu do mikrotitrační destičky. Do každé jamky se pipetuje 150 μL standardu nebo vzorku. Dále je do každé jamky přidáno 150 μL pracovního roztoku. Destička se lehkým třepáním promíchá a inkubuje při 37 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci je mikrotitrační destička spektrofotometricky proměřena při 562 nm. Získané absorbance standardů jsou vyneseny do kalibrační křivky v závislosti na koncentraci. Podle rovnice kalibrační křivky a absorbancí vzorku se určí celkové množství proteinů v lyzátu.

3.4.7 Biotinylace lyzátu

Roztoky a chemikálie

- 0,05M uhličitanový pufr o *pH* 9
- Roztok NHS-D-biotin v DMSO
- Lyzát *Salmonella* Enteritidis v peptonové vodě o koncentraci 3,3 mg·mL⁻¹

Postup

330 µL buněného lyzátu *Salmonella* Enteritidis v peptonové vodě, což odpovídá 1 mg proteinů, bylo zředěno 660 µL 0,05 M uhličitanového pufru o *pH* 9. K takto zředěnému lyzátu se přidá 1 mg NHS-D-biotinu čerstvě rozpuštěného ve 100 µL DMSO. Celá směs o je inkubována na rotátoru po dobu 2 hodin, při laboratorní teplotě, za přítomnosti světla.

3.4.7.1 Ověření biotinylace lyzátu na magnetickém nosiči se streptavidinem

Postup

Do 1,5 mL zkumavky se odebere 100 µL, což odpovídá 1mg, magnetických částic SiMAG-Streptavidin. Částice musí být ekvilibrovány 0,1M fosfátovým pufrům o *pH* 8 s 0,15 M NaCl, a to tak, že se k magnetickým částicím přidá 1 mL fosfátového pufru, směs se zamíchá a následně je zkumavka umístěna do magnetického separátoru. Magnetický separátor přitáhne magnetické částice ke stěně zkumavky a zbylý supernatant je možné odsát pipetou do odpadu. Tento postup je opakován 3x.

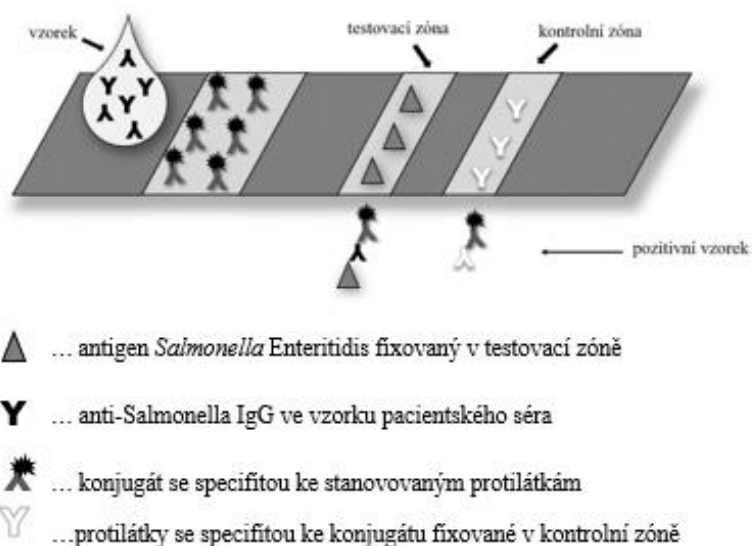
Po třetím promytí se k magnetickým částicím přidá 150 µL vzorku nabiotinylovaného lyzátu a celá směs se nechá inkubovat na rotátoru při laboratorní teplotě, po dobu 15 minut. Během inkubace je veškerý biotin vychytán vazbou na streptavidin na magnetické částice. V supernatantu zbydou pouze ty proteiny, které nejsou nabiotinylované. Supernatant je po inkubaci odebrán k analýze na SDS elektroforéze.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Navrhovaná schémata pro vytvoření vlastního imunochromatografického testu

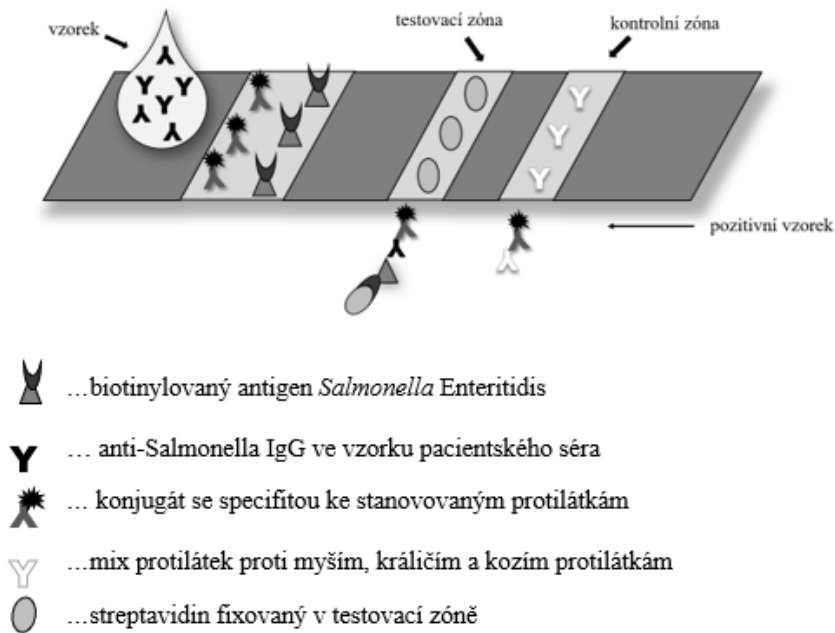
V rámci přípravy vlastního imunochromatografického testu byly navrženy tři návrhy uspořádání. Jednotlivá schémata uspořádání jsou zobrazena níže. V rámci diplomové práce byly připraveny reagentie, které lze využít pro všechny níže zmíněné varianty.

První návrh



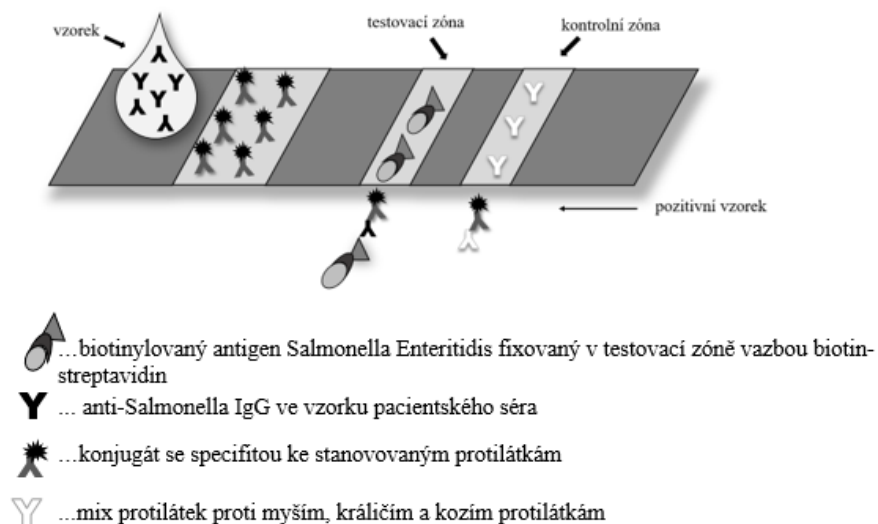
Obrázek 25: První návrh uspořádání imunochromatografického testu.

Druhý návrh



Obrázek 26: Druhý návrh uspořádání imunochromatografického testu.

Třetí návrh



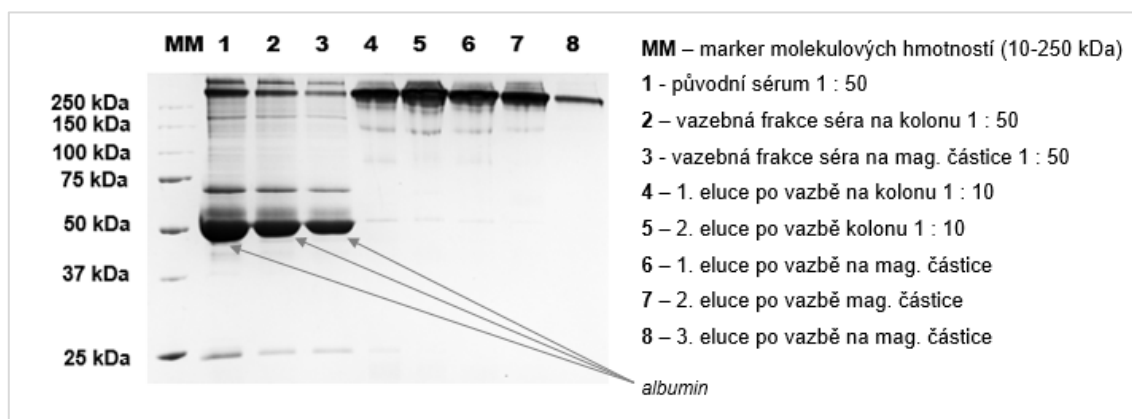
Obrázek 27: Třetí návrh uspořádání imunochromatografického testu.

4.2 Izolace IgG ze séra

V rámci přípravy funkční sestavy imunochromatografického testu bylo nutné zaměřit se na dílčí kroky, jakými je izolace imunoglobulinu G (IgG), jeho konjugace se zlatými nanočásticemi (viz kapitola 4.2 a 4.3), dále příprava antigenu (bakteriální lyzát po biotinylnaci) pro vychytávání specifických patientských protilátek (viz kapitola 4.4).

Pro přípravu konjugátu lze využít komerčně dostupné sérové polyklonální IgG např. od *Sigma-Aldrich* nebo protilátky purifikovat ze séra. Z tohoto důvodu byl v diplomové práci zařazen krok izolace IgG ze séra. Izolace IgG je nejčastěji prováděna proteinem A. Jedna z možností je imobilizace proteinu A na nosič v mikrokolonce, pak se jedná o metodu afinitní chromatografie. Nebo lze využít magnetické částice s imobilizovaným proteinem A, v tom případě hovoříme o magnetické separaci. Oba postupy jsou popsány v kapitole 3.4.3.

Získané vazebné a eluční frakce byly analyzovány metodou SDS-PAGE elektroforézy. Gel byl po elektroforetické separaci obarven Coomassie Brilliant Blue (viz Obrázek 28).



Obrázek 28: Ověření účinnosti izolace IgG ze séra metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu Coomassie Brilliant Blue.

Výsledek SDS-PAGE elektroforézy ukazuje vysokou účinnost izolace IgG, ať metodou afinitní chromatografie (viz Obrázek 28, jamka 4-5) nebo magnetickou separací (viz Obrázek 28, jamka 6-8). Jak je zřejmé z gelu, izolované IgG jsou vysoké čistoty a kvality, nerozpadají se a jsou vhodné k dalšímu použití. Abundantní albumin byl účinně odstraněn.

4.3 Příprava konjugátu AuNPs-IgG

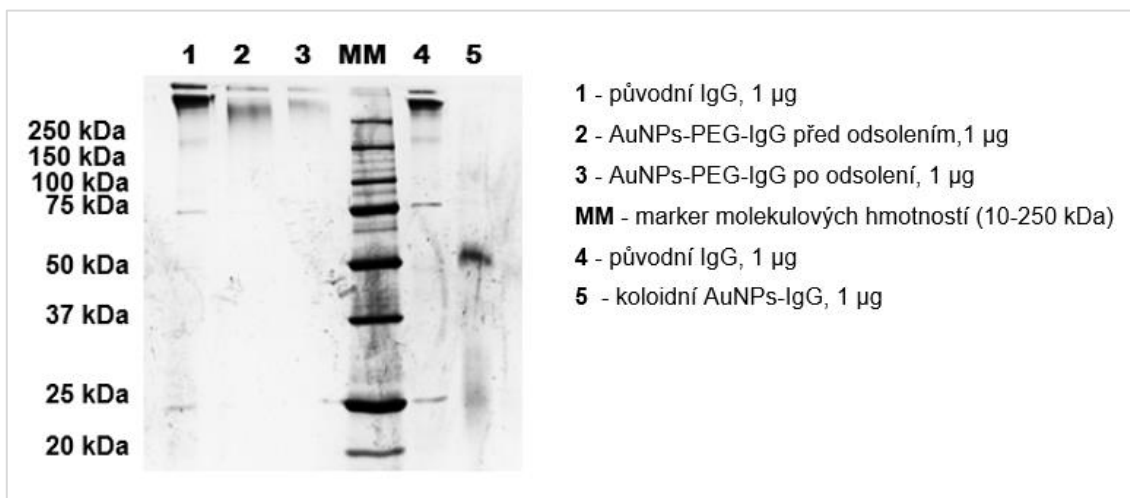
Pro imunochromatografický test je konjugát stěžejní. Jeho hlavním úkolem je detekce stanovovaného analytu. Konjugát je nejčastěji specifická protilátka třídy IgG s kovalentně navázanou detekční značkou. Tato značka umožňuje vyhodnocení imunochromatografického testu. Konjugát pro námi navržený imunochromatografický test byl složen z imunoglobulinu namířené proti lidským imunoglobulinům G (anti- lidský IgG) a vázanými zlatými nanočásticemi (AuNPs). K dispozici je mnoho typů AuNPs, které jsou nabízeny na trhu a jsou vhodné pro vazbu na IgG. V rámci této diplomové práce byly ověřeny tři z nich. Nejprve byl připravován konjugát IgG s nanočásticemi koloidního nemodifikovaného zlata (*Sigma-Aldrich*), poté se zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG (AuNPs-PEG, *Orion High Technologies*) nebo se zlatými nanočásticemi modifikovanými kyselinou propionovou (AuNPs- CH₃CH₂COOH, *Orion High Technologies*). Poslední 2 typy nanočástic obsahují stejnou karboxylovou skupinu vhodnou pro vazbu, v následujícím textu budou společně označovány jako AuNPs-COOH.

Konjugace IgG částicemi koloidního zlata

Při konjugaci IgG nanočásticemi koloidního zlata bylo nutné nejprve rozvolnit disulfidické vazby mezi cysteiny L a H řetězců v molekule IgG. Podle protokolu pro konjugaci IgG koloidním zlatem zavedeného v laboratoři bylo rozvolnění prováděno pomocí chemikálie T-CEP. Rozvolnění spočívalo ve smíchání 10 µL vodného roztoku IgG obsahujícího 10 µg IgG s 2,6 mg T-CEP v 90 µL destilované vody. Tato směs byla inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 45 minut, bez přístupu světla. Po inkubaci byly přidány nanočástice koloidního zlata v poměru 2 : 1 k IgG, což odpovídá 348 µL nanočástic koloidního zlata o velikosti 10 nm v citrátovém pufru. Následovala inkubace na rotátoru při 4 °C přes noc. Nanočástice koloidního zlata byly navázány na volné -SH skupiny, vzniklé rozvolněním disulfidických můstků IgG. Po inkubaci byla směs stočena na centrifuze při 8000 rpm po dobu 10 minut. Centrifugací klesne na dno volné koloidní zlato a v supernatantu zůstane již samotný konjugát.

Po ověření takto připraveného konjugátu na SDS-PAGE elektroforéze byl zřetelný rozpad IgG na lehké (25 kDa) a těžké řetězce (50 kDa) viz Obrázek 29 jamka 5. I přes opakované

experimenty, docházelo stále k rozpadu IgG, proto jsme v rámci dalších experimentů použili ke konjugaci IgG AuNPs modifikované karboxylovou skupinou.



Obrázek 29: Ověření konjugace IgG zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG a koloidními zlatými nanočásticemi metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

Konjugace IgG modifikovanými zlatými nanočásticemi typu AuNPs-COOH

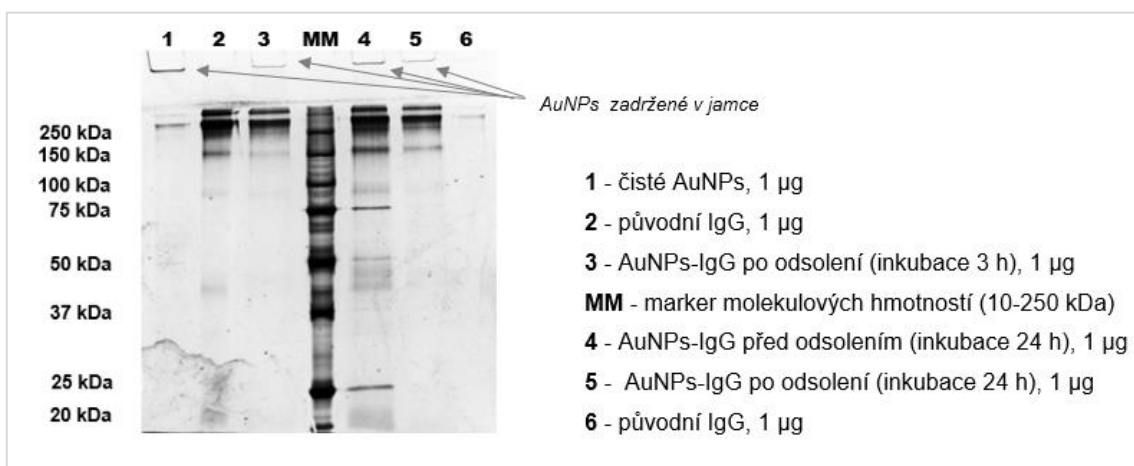
AuNPs, které jsou modifikovány kyselinou propionovou nebo PEG mají na svém povrchu volné karboxylové skupiny (-COOH). Volné karboxylové skupiny jsou při konjugaci aktivovány karbodiimidy jako např. EDAC, DCC nebo DIC. Mezi další aktivační činidla patří například NHS nebo sulfo-NHS. Tato aktivační činidla umožní reakci -COOH s aminoskupinou imobilizované IgG, tak jak uvádí Hermanson a kol. [70] ve své knize.

Podle mírně modifikovaného konjugačního protokolu byl konjugát AuNPs-COOH-IgG připravován následujícím způsobem. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 10 µg IgG ve 110 µL 0,1 M PBS o *pH* 7,5. Dále bylo přidáno 10 µL čerstvě rozpuštěného EDAC o koncentraci 15 mg·mL⁻¹ a 10 µL čerstvě rozpuštěného sulfo-NHS o koncentraci 2,5 mg·mL⁻¹. Okamžitě bylo přidáno 20 µL AuNPs-COOH o koncentraci 1 mg·mL⁻¹. Celá směs byla promíchána a inkubována 3 hodiny na rotátoru při laboratorní teplotě. V jedné z úprav jsme vyzkoušeli prodloužení inkubační doby na 24 hodin. Prodloužení inkubace, ale nemělo na konjugaci vliv, jak je vidět na Obrázku 30 a 31.

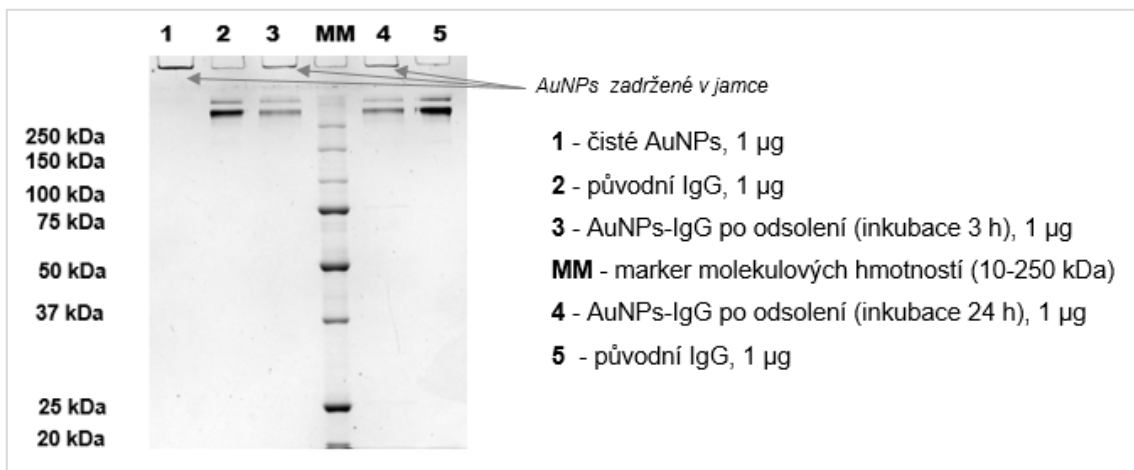
Po inkubaci byla směs odsolena na kolonkách AMICON 100K dle pokynů výrobce. Tyto kolonky zachytí pouze částice větší než 100 kDa, menší částice jako například zbytkový

EDAC a sulfo-NHS projdou kolonkou nezadrženy s mobilní fází. Získaný konjugát z kolonky byl naředěn PBS pufrem na konečný objem 200 μ L.

Podle konjugačního protokolu byla provedena konjugace IgG zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG. Během konjugace byly odebírány vzorky, které byly analyzovány metodou SDS-PAGE elektroforézy. Gely byly po elektroforetické separaci obarveny dusičnanem stříbrným (viz Obrázek 30) nebo Coomassie Brilliant Blue (viz Obrázek 31).



Obrázek 30: Ověření konjugace IgG zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.



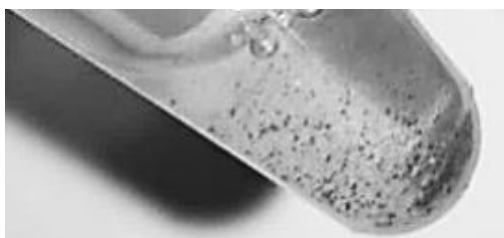
Obrázek 31: Ověření konjugace IgG zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu Coomassie Brilliant Blue.

Jednotlivé vzorky konjugátů byly na gelech porovnávány s čistými AuNPs (Obrázek 30, 31 jamka 1). Na Obrázku 30 i 31 lze vidět zachycení AuNPs již v horní části gelu, v aplikačních jamkách. Pravděpodobně se jedná o agregované nanočástice. Lze

se domnívat, že porézním materiálem gelu prochází pouze menší shluky a volné AuNPs s vyšší elektroforetickou mobilitou nebo AuNPs vázané na IgG. Na obou obrázcích lze také pozorovat velké ztráty IgG oproti původním vzorkům. K těmto ztrátám pravděpodobně dochází odsolováním na kolonkách AMICON 100K. IgG se na pravděpodobně na nosič nespecificky sorbuje a následné stočení nestačí k uvolnění těchto IgG. Z porovnání Obrázků 30 a 31 je patrné, že barvení Coomassie Brilliant Blue není dostatečně citlivé, aby zachytilo případné fragmentace nebo kontaminace (Obrázek 30 jamka 4), které jsou viditelné po obarvení dusičnanem stříbrným. Proto jsou následující gely vždy barveny pouze dusičnanem stříbrným.

Další komplikací byla lehká agregace již samotných AuNPs v roztoku PBS. Vytváření agregátů nanočástic není pro imunochromatografický test žádoucí. Agregáty nanočástic jsou příliš velké na to, aby dokázaly procházet porézním materiálem imunochromatografického proužku v rámci toku kapaliny. Proto bylo navrženo využití zlatých nanočástic modifikovaných kyselinou propionovou (AuNPs-CH₃CH₂COOH) s očekávanou vyšší stabilitou ve vodných roztocích.

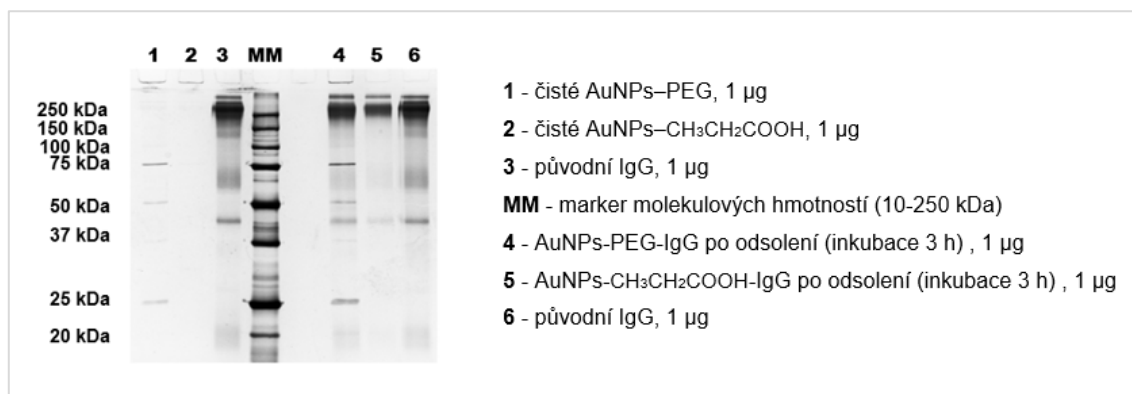
Podle stejného konjugačního protokolu byla provedena konjugace IgG AuNPs-CH₃CH₂COOH. AuNPs-CH₃CH₂COOH se ale také začaly okamžitě po přidání do pufru shlukovat do agregátů (viz Obrázek 32). Pokud by v tomto případě ke konjugaci došlo, vznikla by trojrozměrná struktura vzájemně provázaných molekul IgG a nanočástic. Po odsolení na kolonkách AMICON 100K byla viditelná sorpce všech AuNPs-CH₃CH₂COOH na kolonce. Odsolený roztok zůstal čirý, což značí že veškeré AuNPs zůstaly v kolonce. Oproti tomu konjugát AuNPs-PEG-IgG zůstává po odsolení narůžovělý, AuNPs jsou tedy v roztoku konjugátu viditelně přítomny.



Obrázek 32: Ukázka agregace zlatých nanočástic vytvořených po přidání AuNPs-CH₃CH₂COOH do PBS.

Metodou SDS-PAGE elektroforézy byl konjugát AuNPs-CH₃CH₂COOH-IgG porovnán s konjugátem z AuNPs-PEG-IgG. Gel byl po elektroforetické separaci obarven

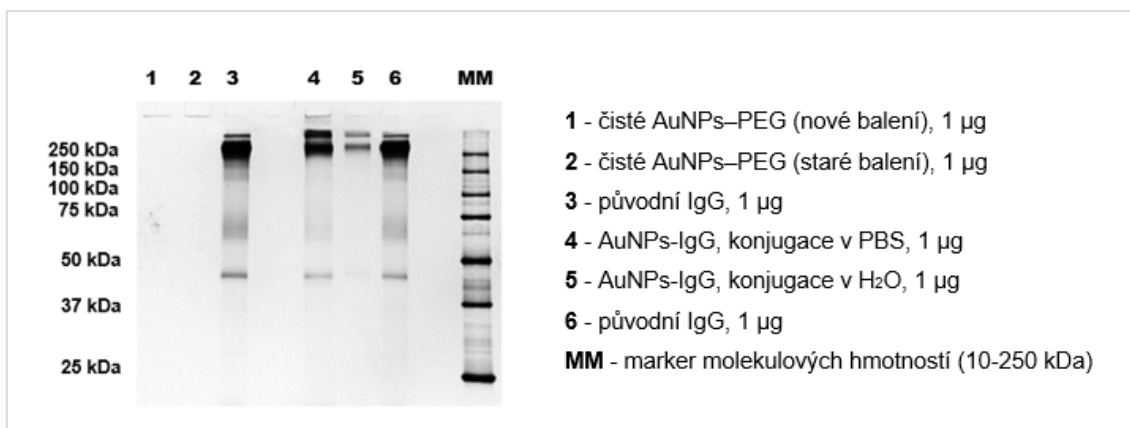
dusičnanem stříbrným (viz Obrázek 33). Na gelu je viditelná silná kontaminace jamky 1, 3 a 4 markerem molekulových hmotností. I přes kontaminace je vidět, že v jamce 5 nejsou zachyceny žádné AuNPs, vzhledem k tomu, že byl konjugát po odsolení bezbarvý lze soudit, že IgG viditelné na gelu jamky 5 nejsou konjugované. Konjugace pravděpodobně neproběhla kvůli agregované formě AuNPs-CH₃CH₂COOH.



Obrázek 33: *Ověření konjugace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.*

Pro vyšší koloidální stabilitu nanočástic AuNPs byly vyzkoušeny také jiné pufrы, PBS bylo nahrazeno například 0,1M MES pufr o *pH* 6, nebo 0,1M fosfátovým pufr o *pH* 7,3. Žádný pufr však nepřinesl zlepšení, AuNPs-COOH byly stabilní pouze v destilované vodě, proto byla v následujícím protokolu zavedena také konjugace v destilované vodě. Zároveň bylo upraveno pořadí přidávání reagentů a aktivačních činidel v rámci konjugačního protokolu a navýšeno množství AuNPs na dvojnásobek s využitím výhradně AuNPs-PEG .

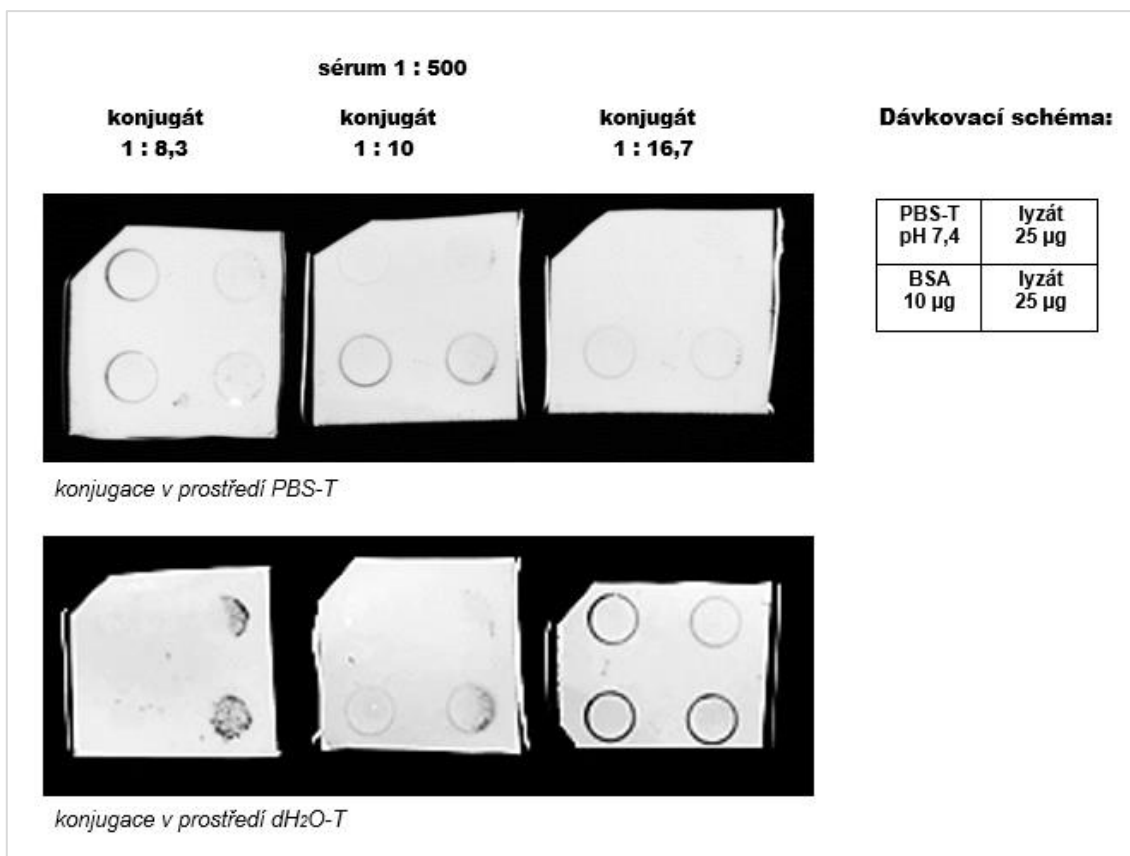
V nově upraveném konjugačním protokolu bylo nejprve aktivováno 40 µg zlatých nanočástic, ať v PBS nebo dH₂O, 50 µL vodného roztoku EDAC o koncentraci 10 mg·mL. Po deseti minutové inkubaci byla směs stočena na centrifuze při 5000 rpm po dobu 15 minut. Tím AuNPs klesly na dno a v supernatantu zůstal zbytkový EDAC, kterým byl odsát. Sediment AuNPs byl zředěn 150 µL PBS nebo dH₂O a následně bylo přidáno 10 µg IgG ve vodném roztoku. Inkubace proběhla stejně jako v předchozím protokolu. Vzhledem k velkým ztrátám při odsolování v předcházejících experimentech byl tento krok z protokolu vyřazen.



Obrázek 34: *Ověření konjugace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.*

Výsledky po konjugaci zlatých nanočástic s IgG pomocí optimalizovaného protokolu jsou zaznamenány na Obrázku 34. V jamce 5 je zřejmý velký úbytek IgG, v tomto případě se pravděpodobně jednalo o sorpci proteinu na stěnu mikrozkuhavky, proto byly při následujících konjugacích používány speciální Protein Lobind mikrozkuhavky (*Eppendorf*).

Funkčnost připravených konjugátů byla ověřena Dot-Blot analýzou, detailní postup provedení metody je v kapitole 3.4.2. Na membránu byl nanesen buněčný lyzát, na který se navázaly protilátky z patientského séra. Tyto protilátky byly poté označeny námi připraveným konjugátem. Jako negativní kontrola byl na membránu nanesen roztok BSA a PBS-T. Byl vyzkoušen jak konjugát připravený v PBS pufru, tak konjugát připravený v destilované vodě. Pro oba konjugáty byly vytvořeny 3 ředění, a sice 1 : 8,3; 1 : 10 a 1 : 16,7. Výsledek Dot-Blot analýzy na Obrázku 35 ukazuje slabě pozitivní reakci pouze u konjugátu připraveného v destilované vodě, při ředění 1 : 8,3, případně 1 : 10. Na jednotlivých bodech lze pozorovat nehomogenost konjugátu způsobenou agregací.

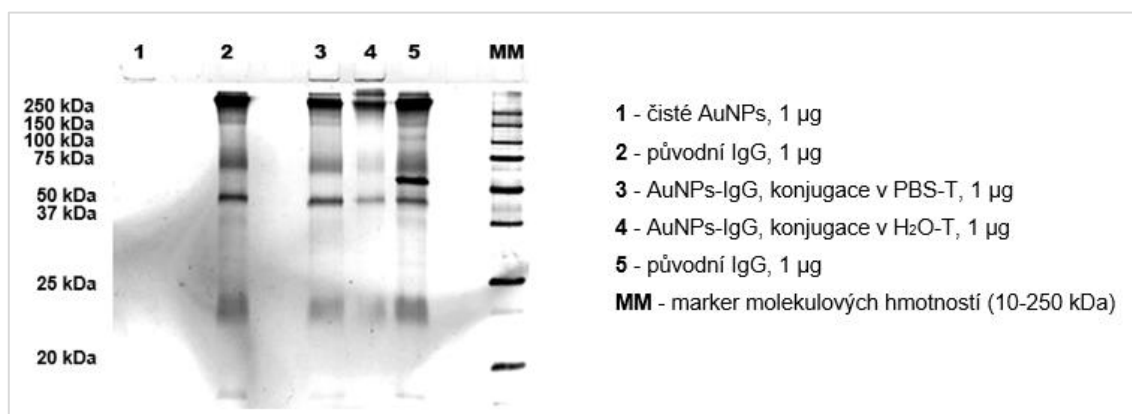


Obrázek 35: *Ověření funkčnosti konjugátů AuNPs-PEG-IgG připravených v prostředí dH₂O-T a PBS-T metodou Dot-blot. Výsledný sendvič na membráně: lyzát-sérum-konjugát.*

Na základě vyhodnocení výsledků, kdy jsme pozorovali agregaci konjugátu, byl do protokolu zařazen promývací krok. Domnívali jsme se, že by agregaci mohl způsobovat zbytkový EDAC. Proto byl po první centrifugaci sediment AuNPs promyt destilovanou vodou, celý roztok opět zcentrifugován a až s takto promytým sedimentem AuNPs se pracovalo dále, stejně jako je popsáno v upraveném konjugačním protokolu výše.

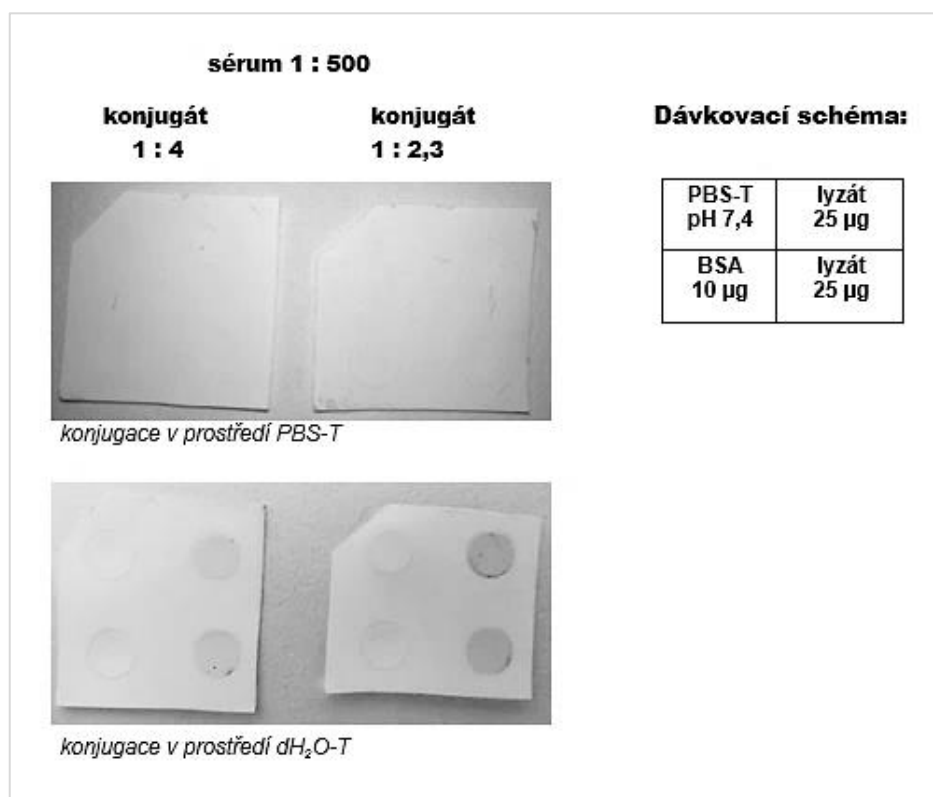
Promytí nepřineslo požadovaný výsledek. Další modifikací konjugačního protokolu bylo přidání 0,05% Tween 20 ke konjugační směsi, který by měl zabránit shlukování částic do trojrozměrných agregátů. Funkčnost konjugátů AuNPs-PEG-IgG připravené v PBS pufru s přidavkem 0,05 % Tween 20 (PBS-T) a v destilované vodě s přidavkem 0,05 % Tween 20 (dH₂O-T) byla ověřena Dot-Blot metodou (viz Obrázek 37) a jejich kvalita ještě potvrzena SDS-PAGE elektroforézou (viz Obrázek 36). Pro Dot-Blot analýzu byly konjugáty ředěny v poměru 1 : 4, což znamenalo přidání 100 µL konjugátu do PBS-T

o celkovém objemu 500 μL nebo v poměru 1 : 2, 33, to odpovídá smíchání 150 μL konjugátu a 350 μL PBS-T.



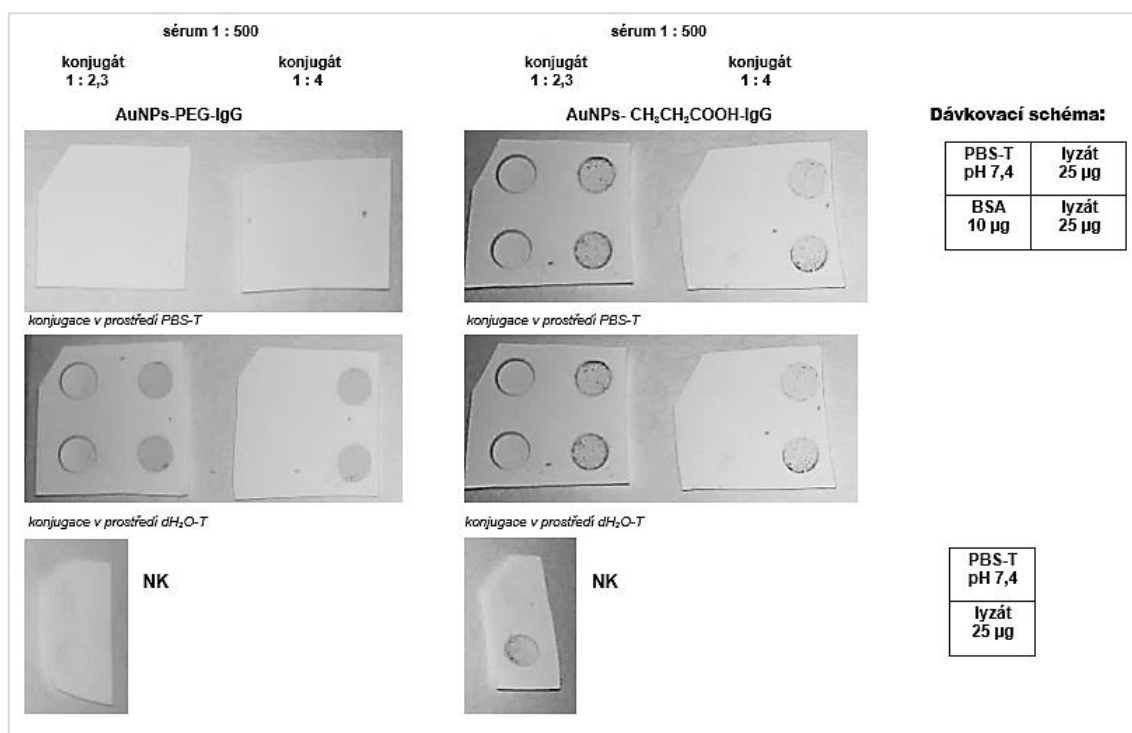
Obrázek 36: Ověření konjugace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

Výsledek Dot-Blot metody potvrdil pouze reaktivitu konjugátu připraveného v $\text{dH}_2\text{O-T}$, zároveň byl potvrzen účinek přísavku Tween 20, který viditelně snížil agregaci částic konjugátu (viz Obrázek 37).



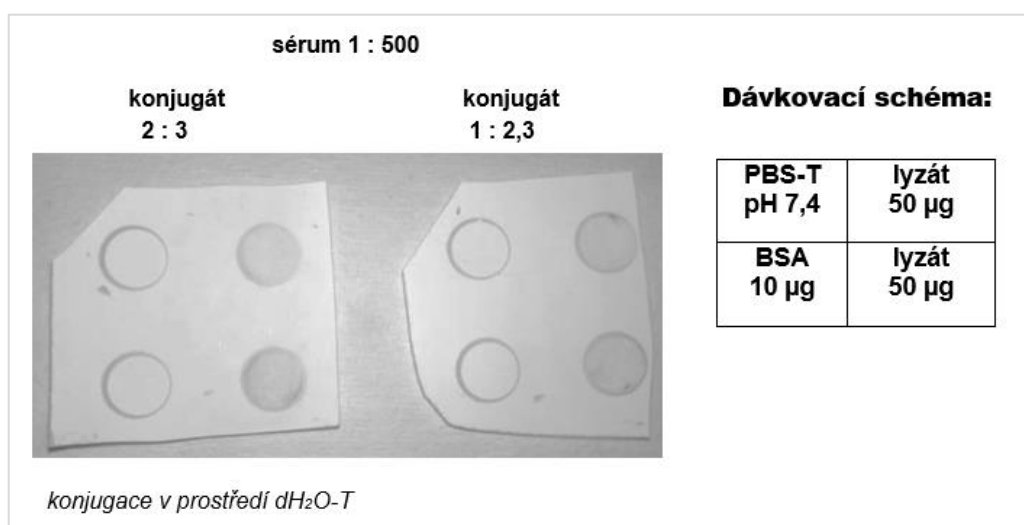
Obrázek 37: Ověření funkčnosti konjugátů AuNPs-PEG-IgG připravených v $\text{dH}_2\text{O-T}$ a PBS-T metodou Dot-blot. Výsledný sendvič na membráně: lyzát-sérum-konjugát.

Vzhledem k vyřešení agregace částic konjugátu byl znovu připraven konjugát jak s AuNPs-PEG, tak s AuNPs-CH₃CH₂COOH. Oba konjugáty byly připraveny v prostředí PBS-T i dH₂O-T. Funkčnost obou připravených konjugátů byla ověřena metodou Dot-Blot výše zavedeným postupem podle protokolu v kapitole 3.4.2. Zároveň byla vytvořena negativní kontrola, kde byly přidávány místo konjugátu pouze čisté AuNPs. Výsledky Dot-Blot analýzy (viz Obrázek 38) ukazují očekávaný výsledek u AuNPs-PEG-IgG, tedy funkčnost konjugátu v prostředí dH₂O-T, který potvrdil předchozí analýzy. AuNPs-CH₃CH₂COOH-IgG ukazují reaktivitu pro konjugát připravovaný v PBS-T i dH₂O-T. Protože negativní kontrola však v případě AuNPs-CH₃CH₂COOH ukazuje reaktivitu těchto volných nekonjugovaných částic s lyzátem a proteiny pacientského séra, nelze tyto výsledky hodnotit jako validní. Zato negativní kontrola AuNPs-PEG byla v pořádku. Protože byla reaktivita konjugátu s lidskými IgG zachycenými na povrchu bakteriálního lyzátu potvrzena, byly AuNPs-PEG vyhodnoceny jako nejvhodnější pro přípravu tohoto konjugátu.



Obrázek 38: Ověření funkčnosti konjugátů AuNPs-PEG-IgG a AuNPs-CH₃CH₂COOH-IgG připravených v dH₂O-T a PBS-T metodou Dot-blot. Výsledný sendvič na membráně: lyzát-sérum-konjugát.

Konjugát pro námi navrhnutý imunochromatografický test byl připraven podle konečného protokolu v prostředí destilované vody s přidavkem 0,05% Tween 20 (viz kapitola 3.4.4). Poměr konjugátu pro Dot-Blot analýzu byl nadále optimalizován (viz Obrázek 39). Pro Dot-Blot analýzy byl vyhodnocen nejlepší poměr konjugátu k PBS- T 1 : 2,3. Další navyšování množství konjugátu na poměr 2 : 3 v reakci nepřineslo lepší výsledky. Jak je vidět na Obrázku 38 i při navýšení množství lyzátu, bylo ředění konjugátu 1 : 2,3 dostatečné pro kvalitní označení imunokomplexu.



Obrázek 39: *Ověření funkčnosti konjugátu AuNPs-PEG-IgG připraveného v dH₂O-T metodou Dot-blot. Výsledný sendvič na membráně: lyzát-sérum-konjugát.*

4.4 Biotinylace proteinů

Náš imunochromatografický test byl navržen s využitím univerzálního imunochromatografického proužku „gRAD OneDetection“ od firmy *BioPorto Diagnostics A/S*. Tento univerzální imunochromatografický proužek má v oblasti testovací zóny fixovaný streptavidin. Proto námi navržený imunochromatografický test využívá v testovací zóně vysoce specifickou bioafinitní interakci streptavidinu s biotinem. Z tohoto důvodu musí být proteiny buněčného lyzátu *Salmonella Enteritidis* biotinylovány.



Obrázek 40: Ukázka imunochromatografického proužku *gRAD OneDetection* od firmy *BioPorto Diagnostics A/S*.

4.4.1 Biotinylace IgG jako modelového proteinu

Biotinylace byla nejprve provedena na molekule IgG jako na modelovém proteinu. Metoda biotinylace IgG byla v laboratoři již zavedena, avšak bylo nutné provést a ověřit optimalizaci dílčích kroků metody. Biotinylaci byla provedena dvěma způsoby, a sice jako místně specifickou biotinylací glykosidických struktur glykoproteinů, kde je využíván biotin hydrazid nebo nespecifickou biotinylací NHS-D-biotinem, kde se k vazbě využívá -COOH skupiny IgG.

Biotinylace glykosidických struktur glykoproteinů

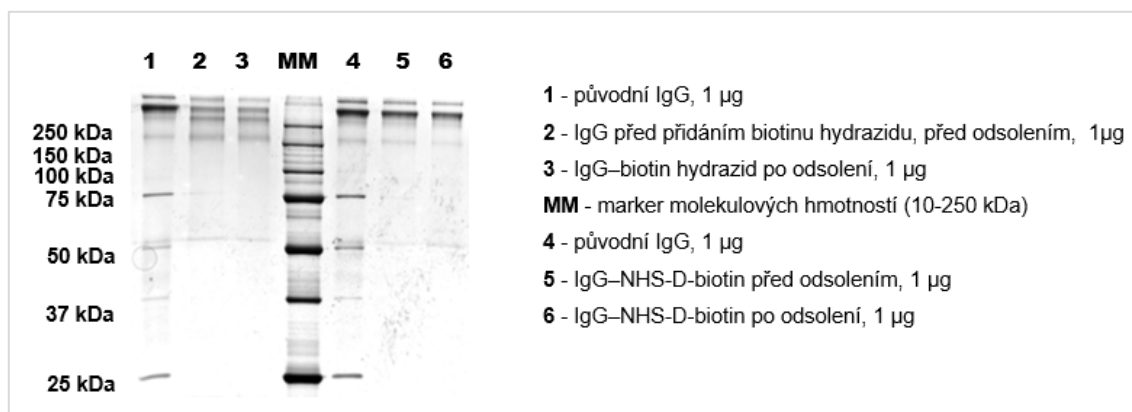
V první fázi bylo nutné oxidovat terminální monosacharidy glykosidických řetězců molekul protilátek. 20 μg IgG z lidského séra v roztoku bylo smícháno s 80 μL destilované vody. Dále bylo přidáno 150 μL 0,02 M jodistanu sodného. Směs byla inkubována na rotátoru, ve tmě, po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Následně byla oxidace zastavena přidáním 0,5 μL etylenglykolu, který zbylý reaktivní jodistan sodný neutralizoval. Přebytek jodistanu bylo nutné odsolit, a to na kolonkách AMICON 100K dle pokynů výrobce. Odsolené oxidované IgG byly poté naředěny na celkový objem

200 μL 0,1 M MES pufru o pH 6. Dále bylo přidáno 40 μg biotinu hydrazid v roztoku DMSO. Směs byla inkubována na rotátoru, přes noc, při 4 $^{\circ}\text{C}$.

Nespecifická biotinylace vazbou na karboxylové skupiny

180 μL 0,1 M MES pufru o pH 6 bylo smícháno s 20 μg protilátek IgG z lidského séra v roztoku. K takto zředěným protilátkám bylo přidáno 1,6 μg NHS-D-biotinu v DMSO. Celá směs o objemu přibližně 200 μL byla inkubována přes noc na rotátoru, při 4 $^{\circ}\text{C}$, bez přístupu světla. Poté byla reakce zastavena 3 μL 1M etanolaminu. Následně byla směs odsolena na kolonkách AMICON 100K dle pokynů výrobce.

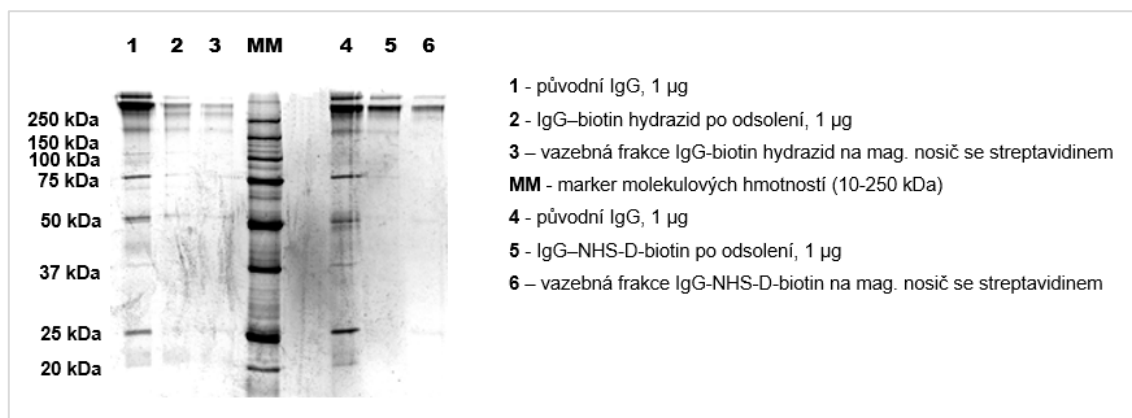
V průběhu biotinylace IgG oběma způsoby byly odebírány vzorky, které byly následně analyzovány metodou SDS-PAGE elektroforézy. Z výsledků SDS-PAGE elektroforézy nebylo možné biotinylaci IgG potvrdit. Očekávaný viditelný posun molekulové hmotnosti oproti nebiotinylovanému původnímu IgG nenastal (viz Obrázek 41).



Obrázek 41: Ověření biotinylace IgG metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

Pro ověření biotinylace cílové molekuly byl také použit magnetický nosič s imobilizovaným streptavidinem. Biotinylované molekuly IgG by se měly po inkubaci s tímto nosičem vychytávat na povrch částic a hladina IgG v supernatantu by měla výrazně klesnout, což by mělo být viditelné na gelu při analýze frakcí na SDS-PAGE elektroforéze. Postup byl shodný jako v kapitole 3.4.7.1. Po vazbě biotinylovaných IgG na magnetický nosič v roztoku vazebné frakce zůstaly pouze ty IgG, které nebyly biotinylované. V takovém případě po odebrání této frakce k analýze metodou SDS-PAGE elektroforézy, by měl být na obarveném gelu vidět úbytek nebo dokonce žádné IgG.

Výsledek ukazuje, že rozdíl mezi původním vzorkem (Obrázek 42 jamka 2, 5) a vazebnou frakcí (Obrázek 42 jamka 3, 6) není příliš velký a biotinylation tak nelze jednoznačně potvrdit. Porovnáním jamky 1 s jamkou 2 nebo jamky 4 s jamkou 5 (viz Obrázek 42) je na tomto gelu možné opětovně potvrdit výraznou ztrátu IgG vzniklou pravděpodobně odsolením na kolonkách AMICON 100K.



Obrázek 42: Ověření biotinylace IgG po vazbě na magnetický nosič metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

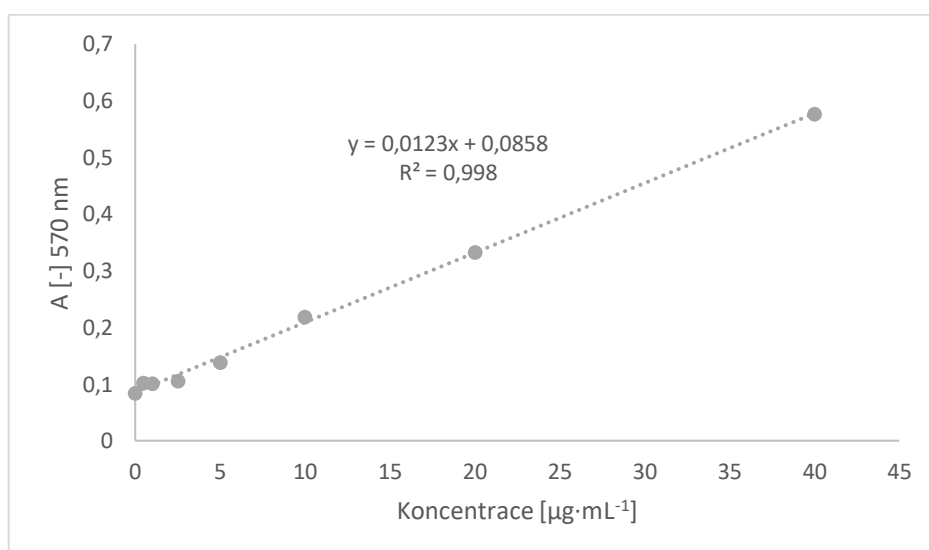
I přes omezené možnosti detekce biotinylovaných IgG bylo po zavedení výše zmíněných protokolů přistoupeno již k biotinylation vlastního antigenu, což byl lyzát bakteriálních buněk *Salmonella* Enteritidis. Ověření účinnosti biotinylace se poté provádělo metodou Dot-Blot (viz kapitola 4.5).

4.4.2 Biotinylace buněčného lyzátu *Salmonella* Enteritidis

Příprava buněčného lyzátu *Salmonella* Enteritidis je popsána v kapitole 3.4.5. Před samotnou biotinylation lyzátu bylo nutné zjistit koncentraci proteinů v lyzátu, což bylo provedeno BCA testem, jehož postup je uveden v kapitole 3.4.6. Výsledky měření jsou zobrazeny v Tabulce 6. V lyzátu bylo metodou BCA naměřeno $3,7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ proteinu.

Tabulka 6: Výsledky měření celkového množství proteinů v lyzátu *Salmonella Enteritidis* BCA testem

Kalibrační řada				Vzorek			
Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	A ₁ [-] 570 nm	A ₂ [-] 570 nm	Průměr A [-]570 nm	Ředění	A ₁ [-] 570 nm	A ₂ [-] 570 nm	Průměr A [-]570 nm
200	2,006	1,959	1,983	1x	2,16	2,195	2,178
40	0,58	0,573	0,577	10x	2,178	2,159	2,169
20	0,332	0,332	0,332	100x	0,542	0,537	0,539
10	0,224	0,213	0,219	1000x	0,155	0,155	0,155
5	0,139	0,138	0,139	10000x	0,091	0,093	0,092
2,5	0,107	0,103	0,105				
1	0,088	0,113	0,101				
0,5	0,091	0,113	0,102				
0	0,089	0,08	0,085				



Obrázek 43: Graf kalibrační závislosti koncentrace proteinů na absorbanci při 570 nm, měřeno metodou BCA testu.

Výpočet celkového množství proteinu v lyzátu z rovnice kalibrační křivky:

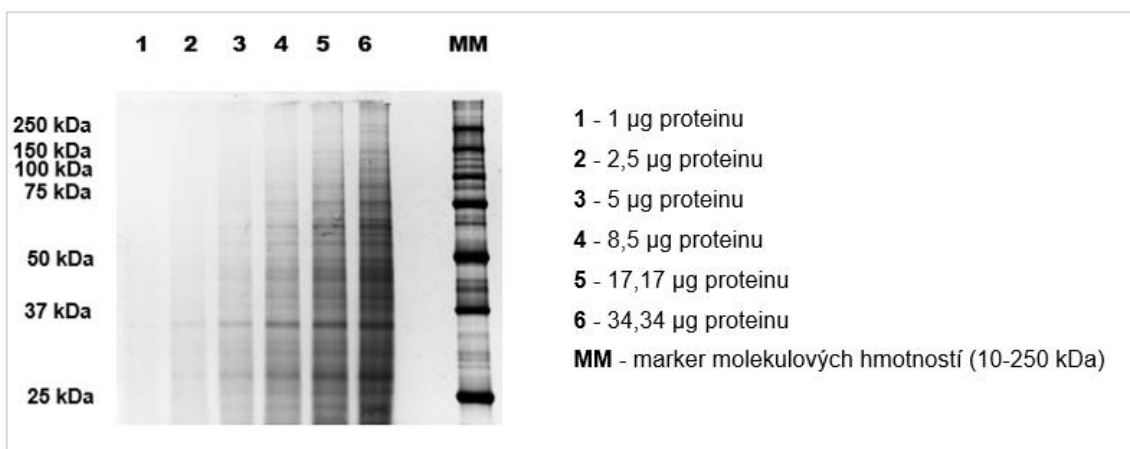
$$y = 0,0123x + 0,0858$$

$$0,539 = 0,0123x + 0,0858$$

$$x = 36,8862 \text{ (100x ředěno)} \rightarrow 3688,62 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 3,7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$$

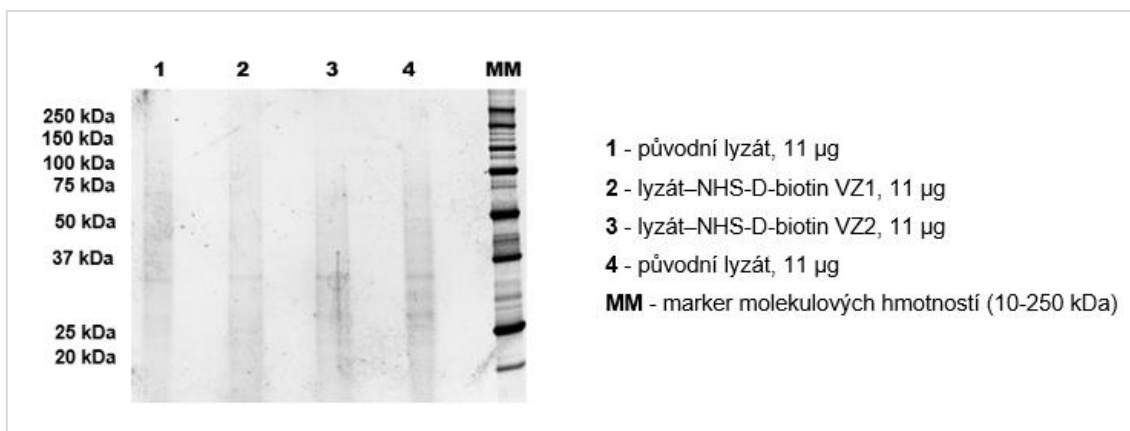
Dále byla vytvořena koncentrační řada lyzátu, která byla analyzována metodou SDS-PAGE elektroforézy (viz Obrázek 44). Chceme-li pomocí metody SDS-PAGE sledovat účinnost biotinylace, je nutné vhodně nastavit výchozí koncentraci proteinů

ve vzorku tak, aby bylo možné biotinylování na proteinech po obarvení gelu prokázat. Výsledky ukázaly, že vhodnou výchozí koncentrací je 8,5 µg proteinu na 10 µL vzorku.



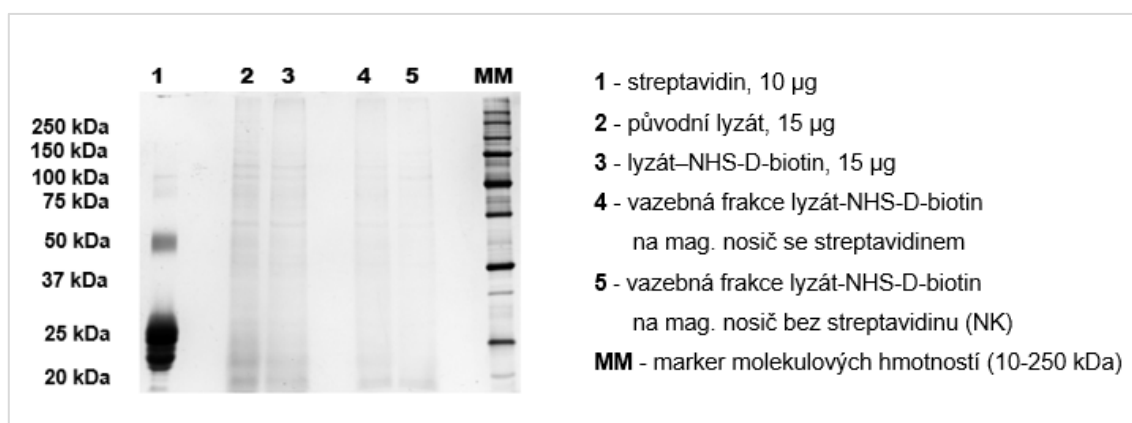
Obrázek 44: Ředící řada buněčného lyzátu *Salmonella Enteritidis*, metoda SDS-PAGE elektroforéza (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

Biotinylování lyzátu byla provedena podle protokolu pro biotinylování IgG (viz kapitola 4.4.1), ale bez odsolovacího kroku a s navýšeným množstvím proteinu ve výchozím vzorku, konkrétně bylo k 120 µL 0,1 M MES pufru o *pH* 6 přidáno 80 µL lyzátu ve fosfátovém pufru o *pH* 7,2, které obsahovaly 240 µg proteinů. K takto připravenému roztoku bylo přidáno 19,2 µg NHS-D-biotinu v DMSO. Celá směs byla inkubována přes noc na rotátoru, při 4 °C, bez přístupu světla. Poté byla reakce zastavena přidávkem 36 µL 1M etanolaminu. Takto biotinylované vzorky lyzátu byly analyzovány metodou SDS-PAGE elektroforézy (viz Obrázek 45).



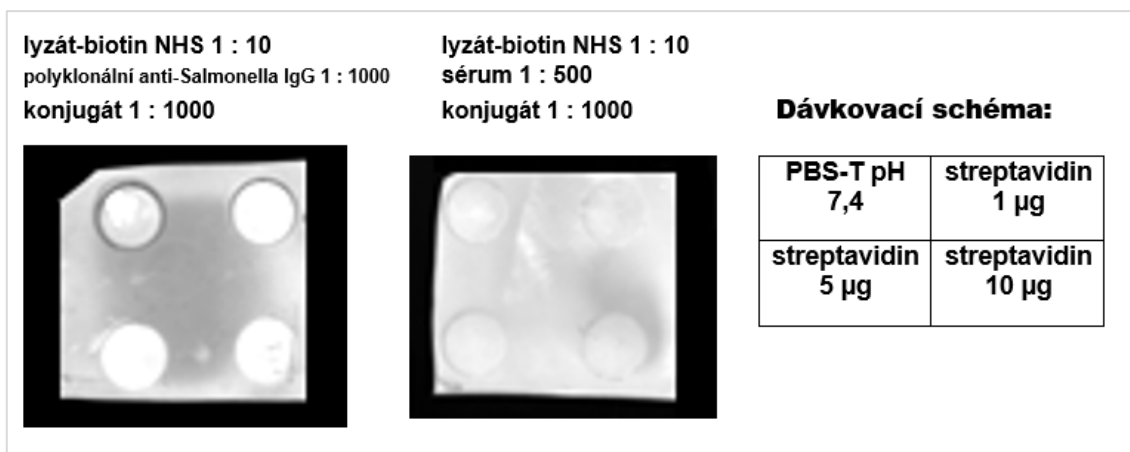
Obrázek 45: Ověření biotinylování lyzátu metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

I tato analýza byla na hraně citlivosti a biotinylace lyzátu nebylo možné dobře vyhodnotit. Proto byla biotinylace lyzátu ověřena na magnetickém nosiči s imobilizovaným streptavidinem. Toto ověření probíhalo stejně jako v předchozí kapitole u IgG a přesný postup je uveden v kapitole 3.4.7.1. Výsledný gel je zobrazen na Obrázku 46. Sice bylo v jamce 4 vidět lehký úbytek biotinylovaného lyzátu ve vazebné frakci oproti původnímu vzorku v jamce 3. Nicméně tento výsledek nebyl validní vzhledem k negativní kontrole v jamce 5. Negativní kontrola totiž ukazovala nespecifickou sorpci proteinů lyzátu na magnetický nosič.



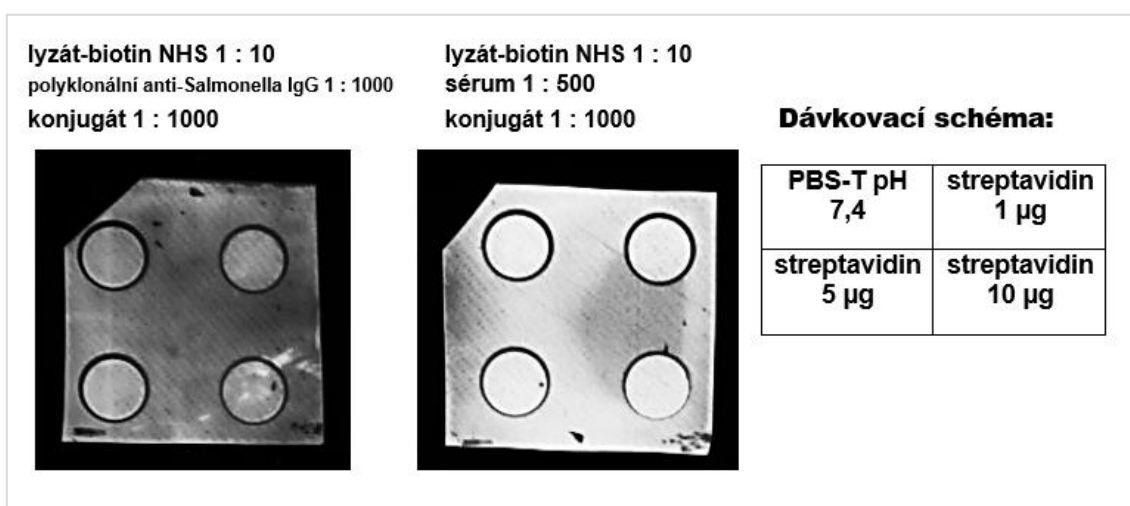
Obrázek 46: Ověření biotinylace lyzátu po vazbě na streptavidinem modifikované magnetické částice metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

Vzhledem k neprůkazným výsledkům byla zařazena nová metoda pro ověření biotinylace, a sice Dot-Blot analýza reaktivity párových biomolekul. Protokol pro provedení Dot-Blot analýzy je popsán v kapitole 3.4.2. V tomto případě byl na PVDF membránu nanesen vodný roztok streptavidinu v koncentraci 0,1 a 1 µg na jamku. Po hodinové blokaci byla membrána inkubována s biotinylovaným lyzátem po dobu 1 hodiny. Během inkubace by se měl veškerý lyzát přes biotin vyvázat na streptavidin fixovaný na membráně. Dále byl postup shodný s protokolem Dot-blot analýzy (viz kapitola 3.4.2). Primární protilátkou bylo sérum s pozitivními IgG se specifitou k salmonelovým antigenům nebo polyklonální anti-Salmonella IgG. K detekci byl využit konjugát anti-lidských IgG-HRP. Křenová peroxidáza konjugátu byla následně detekována pomocí testovací soupravy Opti-4CN™ Substrate Kit.



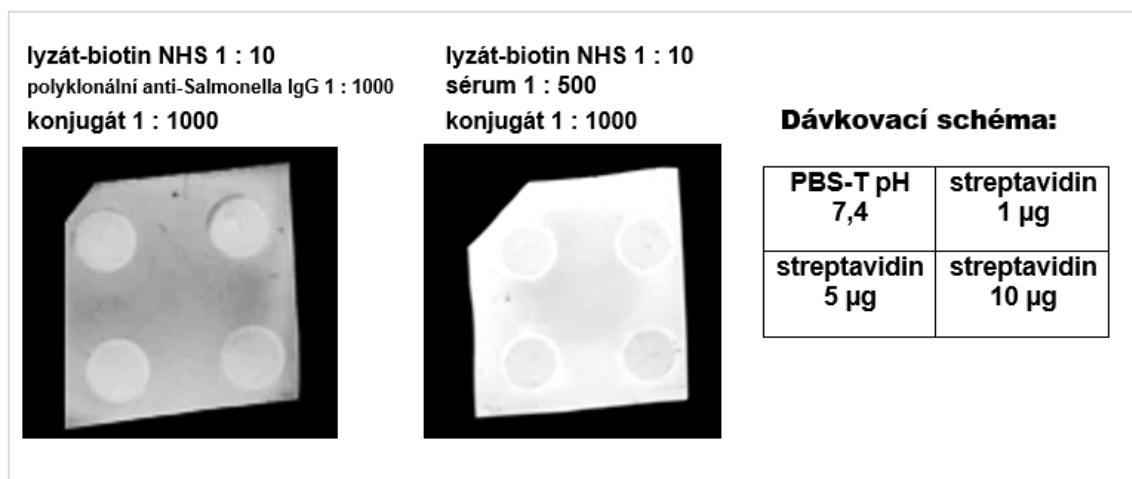
Obrázek 47: Ověření biotinylace lyzátu metodou Dot-blot. Reakce streptavidin-biotin. Kolorimetrická detekce testovací soupravou Opti-4CN Kit. Výsledný sendvič na membráně: streptavidin-biotinylovaný lyzát-sérum/anti-Salmonella IgG-konjugát.

Výsledek Dot-Blot analýzy na Obrázku 47 nepotvrzuje biotinylace lyzátu. Výsledek lze považovat za neplatný vzhledem k zabarvení celé membrány. Zabarvení může naznačovat špatné nastavení podmínek analýzy, nedostatečné množství streptavidinu a nebo vymytí streptavidinu z jamek na celou plochu membrány. Proto byl protokol pro ověření biotinylace pozměněn. Bylo navýšeno množství streptavidinu aplikovaného na membránu z 0,1 a 1 µg na 1, 5 a 10 µg. Dále byla zkrácena doba blokace z jedné hodiny na 30 minut.



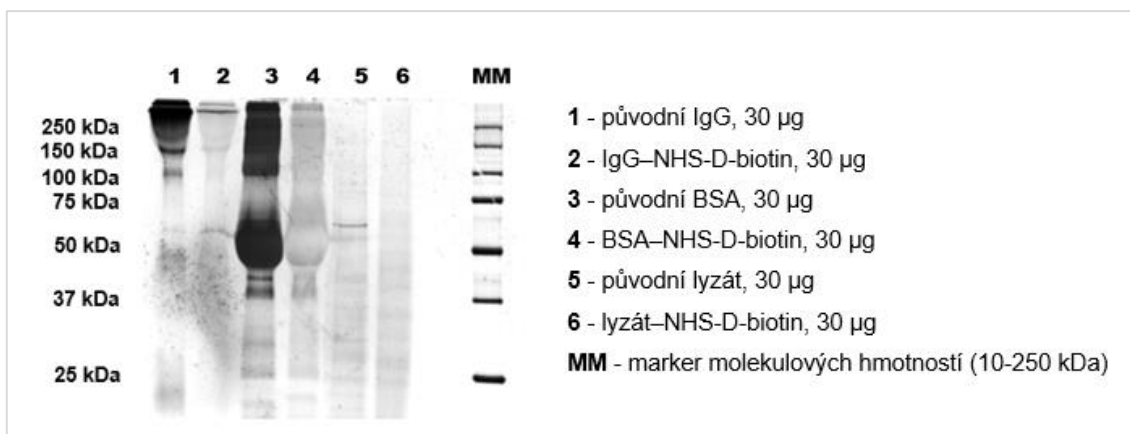
Obrázek 48: Ověření biotinylace lyzátu metodou Dot-blot. Reakce streptavidin-biotin. po změně podmínek. Kolorimetrická detekce testovací soupravou Opti-4CN Kit. Výsledný sendvič na membráně: streptavidin-biotinylovaný lyzát-sérum/anti-Salmonella IgG-konjugát.

Úprava podmínek nepřinesla zlepšení výsledku (viz Obrázek 48). Vzhledem k předpokladu vymývání streptavidinu z jamek byl zařazen krok sušení membrány při 42 °C po dobu 30 minut. Sušení by mělo zafixovat streptavidin v místě jamky. Zároveň byl připraven nový zásobní roztok streptavidinu, kde bylo spektrofotometricky ověřeno množství proteinu. Spektrofotometrická analýza potvrdila přítomnost streptavidinu ve vodném roztoku v koncentraci 4 mg·mL⁻¹. Ani tyto úpravy ale nepomohly dosáhnout lepších výsledků (viz Obrázek 49).



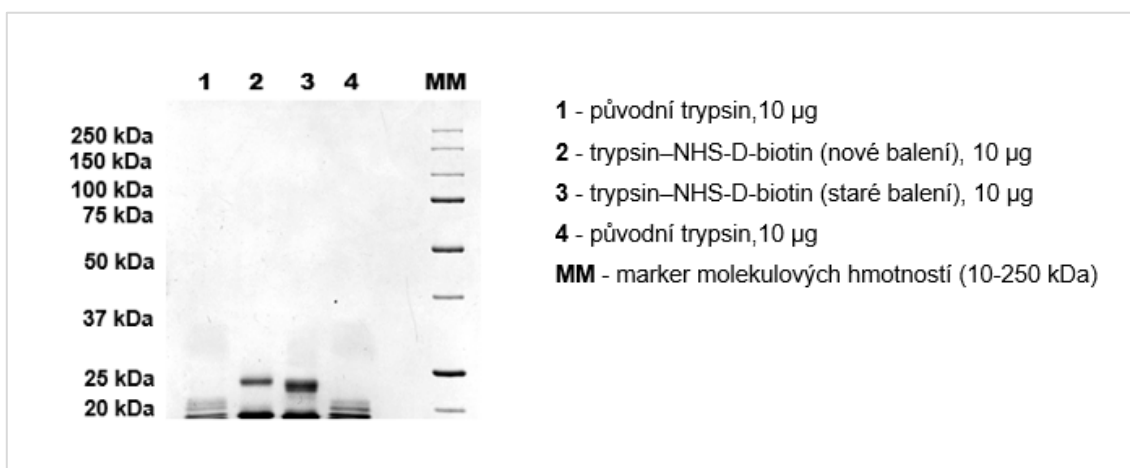
Obrázek 49: Ověření biotinylace lyzátu metodou Dot-blot. Reakce streptavidin-biotin. Nový roztok streptavidinu. Kolorimetrická detekce testovací soupravou Opti-4CN Kit. Výsledný sendvič na membráně: streptavidin-biotinylovaný lyzát-sérum/anti-Salmonella IgG-konjugát.

Protože průběh biotinylace lyzátu nebyl metodou Dot-Blot ani po několika úpravách protokolu analýzy ověřen, bylo přistoupeno k novým experimentům. V rámci těchto experimentů byly vyzkoušeny protokoly doporučené výrobcem nebo knihou Hermanson a kol. [70] pro biotinylací modelových proteinů. Jako modelový protein byl dočasně využit hovězí sérový albumin (BSA). V případě biotinylace BSA by při analýze metodou SDS-PAGE elektroforézy měl být na obarveném gelu viditelný posun molekulové hmotnosti. Obrázek 50 ukazuje lehké zvýšení molekulové hmotnosti biotinylovaného BSA oproti původnímu vzorku. Tento posun jsme však nepovažovali za natolik významný, aby ho bylo možné vyhodnotit jako úspěšnou biotinylací.



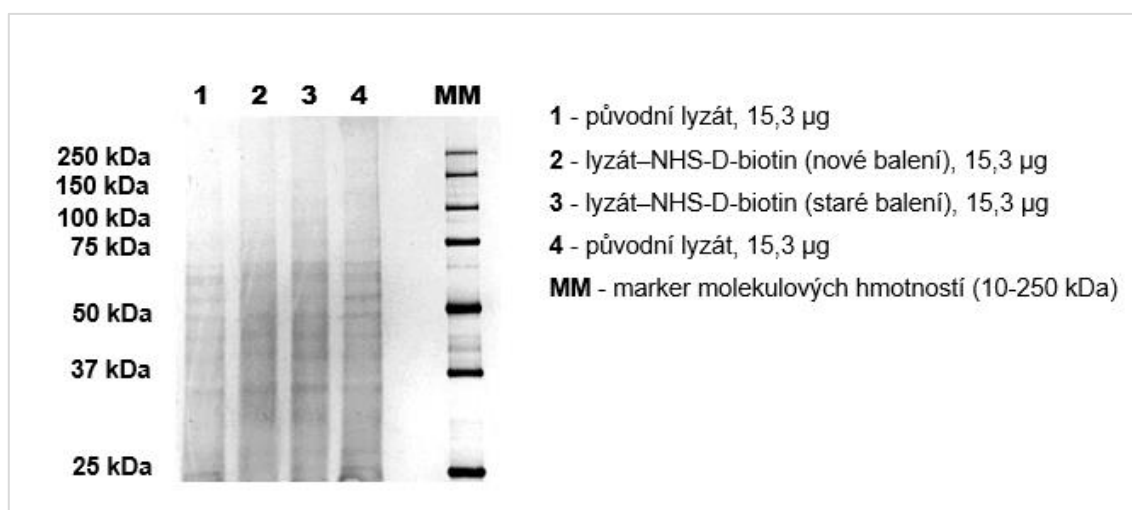
Obrázek 50: Ověření biotinylace modelových proteinů - IgG, BSA a lyzátu metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.

Vzhledem k tomu, že poměry proteinu k biotinu doporučené výrobcem nebo dle protokolu z knihy Hermanson et al. [70] nebyly ověřeny jako funkční pro biotinylací NHS-D-biotinem, rozhodli jsme se použít nový robustní protokol již dříve ověřený školitelem pro další modelový protein, konkrétně trypsin. V tomto protokolu se pracuje s roztokem proteinu o koncentraci 1 mg·mL, ke kterému se přidává 1 mg NHS-D-Biotinu rozpuštěného ve 100 µL DMSO, což odpovídá 10% celkového reakčního objemu. Obarvený gel po separaci proteinu metodou SDS-PAGE elektroforézy na Obrázku 51 ukazuje výrazný posun biotinylovaného trypsinu o 3,8 kDa v případě jamky 2 a o 3,2 kDa v případě jamky 3 oproti původnímu vzorku. Tento posun je již dostatečný pro potvrzení úspěšné biotinylace proteinu.



Obrázek 51: Ověření biotinylace modelového proteinu – trypsinu - metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu Coomassie Brilliant Blue.

Protokol pro biotinylnaci trypsinu byl použit i na biotinylnaci proteinů buněčného lyzátu bakterie *Salmonella* Enteritidis, detailní postup biotinylnace protokolu je uveden v kapitole 3.4.7. Lyzát biotinylovaný podle takto nastaveného protokolu byl analyzován metodou SDS-PAGE elektroforézy. Obarvený gel (viz Obrázek 52) opětované neukazuje výrazný posun molekulových hmotností. V tomto případě se jedná o heterogenní směs proteinů různých molekulových hmotností a určit posun v takovém případě není tak snadné. Domníváme se, že vazba biotinu na jednotlivé proteiny pak nezpůsobí, díky heterogenitě proteinů ve vzorku, tak masivní zvýšení molekulové hmotnosti jako u trypsinu.



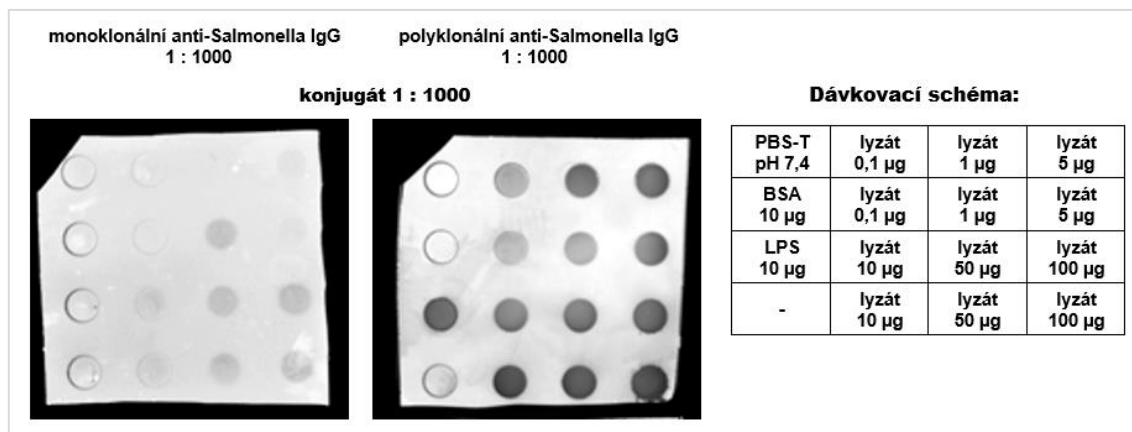
Obrázek 52: *Ověření biotinylnace lyzátu metodou SDS-PAGE elektroforézy (10% gel). Barvení gelu dusičnanem stříbrným.*

Biotinylnace lyzátu byla však ověřena metodou Dot-Blot, při které byl využit konjugát připravený v předešlé kapitole. Tato analýza biotinylnaci potvrdila. Výsledek je na Obrázku 56 v kapitole 4.5.

4.5 Ověření reaktivity párových molekul reagujících v navrženém imunochromatografickém testu

Námi navržený imunochromatografický test je založen na interakci biotinylovaného lyzátu s anti-Salmonella protilátkami ze séra infikovaných pacientů. Tento imunokomplex je označen konjugátem anti-lidských IgG značených zlatými nanočásticemi modifikovanými molekulou PEG. Takto vytvořený sendvič je zachycen v testovací zóně vysoce specifickou vazbou biotinu se streptavidinem, který je v testovací zóně fixován.

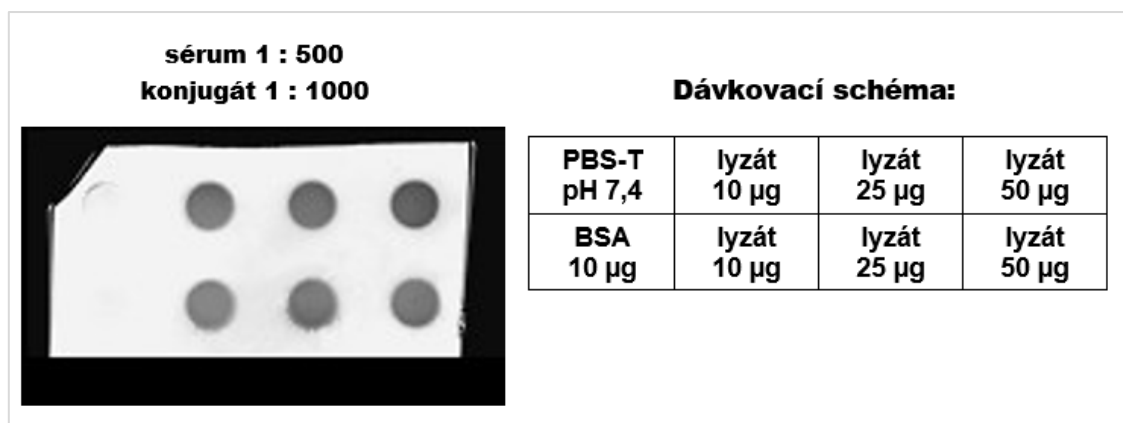
Reaktivita jednotlivých párových biomolekul byla potvrzena metodou Dot-Blot analýzy (postup viz kapitola 3.4.2). Nejprve byla ověřena reaktivita připraveného buněčného lyzátu *Salmonella* Enteritidis s komerčně dostupnými anti-Salmonella IgG. Pro zjištění nevhodnějšího množství lyzátu pro reakci s protilátkami byla vytvořena kalibrační řada od 0,1 µg do 100 µg proteinu lyzátu na jamku Dot-Blot aparatury. Výsledek Dot-Blot analýzy ukazuje dobrou reaktivitu lyzátu s polyklonálními anti-Salmonella IgG, s monoklonálními protilátkami lyzát příliš nereaguje (viz Obrázek 53).



Obrázek 53: Ověření reaktivity komerčních monoklonálních a polyklonálních anti-Salmonella IgG s buněčným lyzátem *Salmonella* Enteritidis, metoda Dot-Blot. Kolorimetrická detekce testovací soupravou Opti-4CN Kit. Výsledný sendvič na membráně: lyzát-anti-Salmonella IgG-konjugát.

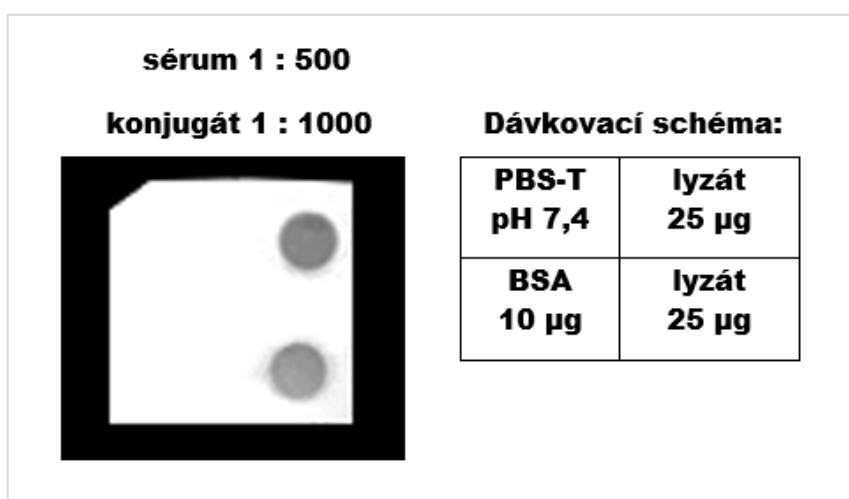
Následujícím krokem bylo ověření reaktivity připraveného buněčného lyzátu *Salmonella* Enteritidis s anti-Salmonella IgG pocházejících z patientského séra. Vzhledem k vysoké reaktivitě lyzátu s komerčními polyklonálními protilátkami byla vytvořena kalibrační řada pouze o třech bodech. Lyzát byl aplikován v koncentraci 10, 25 a 50 µg proteinu

lyzátu na jamku. Jak je vidět na Obrázku 54 lyzát s patientských sérem reaguje ve všech koncentracích. Pro další Dot-Blot analýzy bylo aplikováno 25 µg proteinu na jamku. Přítomnosti specifických anti-Salmonella IgG molekul v analyzovaném séru a jejich reaktivita s námi připraveným lyzátem byla experimentálně potvrzena.



Obrázek 54: *Ověření reaktivity patientského séra pozitivního na anti-Salmonella IgG s buněčným lyzátem Salmonella Enteritidis, metoda Dot-Blot. Kolorimetrická detekce testovací soupravou Opti-4CN Kit. Výsledný sendvič na membráně: lyzát-sérum-konjugát.*

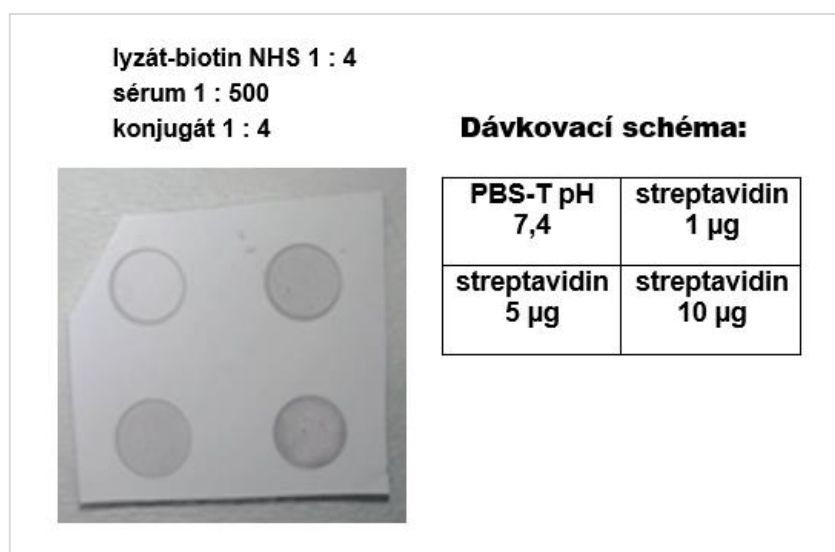
Dále byla ověřena reaktivita patientského séra s imunoglobuliny G namířeným proti lidským IgG, z kterých byl následně připraven konjugát. Patientské sérum bylo navázáno na bakteriální lyzát fixovaný v membráně. Reaktivita patientského séra s anti-lidskými IgG byla potvrzena (viz Obrázek 55).



Obrázek 55: *Ověření reaktivity patientského séra s anti-lidskými IgG králičího původu, metoda Dot-Blot. Kolorimetrická detekce testovací soupravou Opti-4CN Kit. Výsledný sendvič na membráně: lyzát-sérum-anti-lidské IgG-konjugát.*

Nakonec byl sestaven celý sendvič, v podobě, ve které by vznikl na imunochromatografickém proužku a reaktivita všech připravených reagensů byla ověřena metodou Dot-Blot. Na membránu byl nadávkován streptavidin, na který byl přes biotin navázán buněčný lyzát *Salmonella* Enteritidis připravený dle protokolu v kapitole 3.4.7. Dále bylo přidáno sérum pacienta infikovaného salmonelózou, protilátky ze séra reagovaly s proteiny bakteriálního lyzátu. Tento komplex byl na závěr označen námi připraveným konjugátem (viz kapitola 3.4.4). Výsledky Dot-Blot analýzy potvrdily funkčnost všech připravených reagensů (viz Obrázek 56). Zároveň byla potvrzena reaktivita ve všech použitých koncentracích streptavidinu 1, 5 a 10 µg na jamku. Použité množství streptavidinu tedy neovlivňuje intenzitu vzniklé skvrny, a tedy ani reaktivitu s biotinylovanými proteiny bakteriálního lyzátu.

Námi připravené reagenzie tak mohou být použity pro sestavení imunochromatografického testu podle jednoho z návrhů v kapitole 4.1.



Obrázek 56: Ověření funkčnosti celého sendviče. Metoda Dot-Blot. Výsledný sendvič na membráně: streptavidin-biotinylovaný lyzát-sérum-konjugát.

5 ZÁVĚR

Popularita imunochromatografických testů rok od roku vzrůstá. Námi navržený imunochromatografický test by se mohl stát jedním z komerčně dostupných testů, který by pomohl zjednodušit nejen diagnostiku salmonelóz, ale mohl by sloužit pro průkaz dalších protilátek, konkrétně třídy IgG u pacientů s podezřením na jakékoli infekční onemocnění.

V rámci diplomové práce byly navrženy a optimalizovány protokoly pro přípravu reagensů. Konkrétně konjugátu specifických protilátek třídy IgG namířeným proti lidským imunoglobulinům G s kovalentně navázanými zlatými nanočásticemi modifikovanými PEG a lyzátu bakteriálních buněk *Salmonella* Enteritidis, jehož proteinová složka byla biotinylována. Tyto reagensie jsou připraveny k finální kompletaci imunochromatografického testu podle námi navržených schémat s možností analýzy reálných vzorků. Cíle diplomové práce byly splněny.

6 ZDROJE

- [1] A Timeline of Pregnancy Testing. *Office of NIH History*. [online]. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://history.nih.gov/exhibits/thinblueline/timeline.html#1970>
- [2] Pregnancy test kit, England, 1988. [online]. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <http://collection.sciencemuseum.org.uk/objects/co96440/pregnancy-test-kit-england-1988-pregnancy-test>
- [3] KOCZULA K. M., GALLOTTA A. Lateral flow assays. *Essays In Biochemistry*. 2016, 60(1), 111-120. ISSN 0071-1365.
- [4] SAYEED M. A., ISLAM K., HOSSAIN M. et al. Development of a new dipstick (Cholkit) for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 in acute watery diarrheal stools. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018, 12(3). ISSN 1935-2735.
- [5] RASTON A. N. H., NGUYEN V., GU M. B. A new lateral flow strip assay (LFSA) using a pair of aptamers for the detection of Vaspin. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 93, 21-25. ISSN 0956-5663. WONG R., TSE H. *Lateral Flow Immunoassay*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. ISBN 978-1-58829-908-6.
- [6] ZHANG X., YU X., WEN K. et al. Multiplex Lateral Flow Immunoassays Based on Amorphous Carbon Nanoparticles for Detecting Three *Fusarium* Mycotoxins in Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(36), 8063-8071. ISSN 0021-8561. WARSINKE A. Point-of-care testing of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 393(5), 1393-1405. ISSN 1618-2642.
- [7] SHOME R., KALLESHAMURTHY T., SHOME B. R. et al. Lateral flow assay for brucellosis testing in multiple livestock species. *Journal of Microbiological Methods*. 2018, 148, 93-96. ISSN 0167-7012.
- [8] ZVEREVA E. A., ZHERDEV A. V., XU C., DZANTIEV B.B. Highly sensitive immunochromatographic assay for qualitative and quantitative control of beta-agonist salbutamol and its structural analogs in foods. *Food Control*. 2018, 86, 50-58. ISSN 0956-7135.
- [9] LÓPEZ_MARZO A. M., PONS J., BLAKE D. A., MERKOÇI A. High sensitive gold-nanoparticle based lateral flow Immunodevice for Cd²⁺ detection in drinking waters. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, 47, 190-198. ISSN 0956-5663.

- [10] KUANG H., XING CH., HAO CH., LIU L. et al. Rapid and Highly Sensitive Detection of Lead Ions in Drinking Water Based on a Strip Immunosensor. *Sensors*. 2013, 13(4), 4214-4224. ISSN 1424-8220.
- [11] WONG R., TSE H. Lateral Flow Immunoassay. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. ISBN 978-1-58829-908-6.
- [12] WARSINKE A. Point-of-care testing of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 393(5), 1393-1405. ISSN 1618-2642.
- [13] SCHENK F., WEBER P., VOGLER J. et al. Development of a paper-based lateral flow immunoassay for simultaneous detection of lipopolysaccharides of Salmonella serovars. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, 410(3), 863-868. ISSN 1618-2642.
- [14] BLAŽKOVÁ M., RAUCH P., FUKAL L. Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(9), 2122-2128. ISSN 0956-5663.
- [15] SASTRE P., GALLARDO C., MONEDERO A., RUIZ T. et al. Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Veterinary Research*. 2016, 12(1). ISSN 1746-6148
- [16] Antibody. *Encyclopædia Britannica* [online]. [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/antibody/images-videos/media/27783/17658>
- [17] WANG Z., ZHI D., ZHAO Y. et al. Lateral flow test strip based on colloidal selenium immunoassay for rapid detection of melamine in milk, milk powder, and animal feed. *International Journal of Nanomedicine*. 2014, 9, 1699–1707. ISSN 1178-2013.
- [18] WANG C., CHEN X., WU Y. et al. Lateral flow strip for visual detection of K-ras mutations based on allele-specific PCR. *Biotechnology Letters*. 2016, 38(10), 1709-1714. ISSN 0141-5492.
- [19] OH J., HA G., CHO J. et al. One-Step Immunochromatography Assay Kit for Detecting Antibodies to Canine Parvovirus. *Clinical And Vaccine Immunology*. 2006, 520–524. ISSN 1556-679X.
- [20] EMD Millipore, Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development. 2013. [online]. [cit.2018-11-16]. Dostupné z: https://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201306.12550.

- [21] *Innova Biosciences Guide*, Guide to Lateral Flow Immunoassays. [online]. [cit.2018-11-16]. Dostupné z: https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/download/pdf/IBS_A_guide_to_lateral_flow_immunoassays.pdf
- [22] GÖSELOVÁ S., BLAŽKOVÁ M., HOLUBOVÁ B. a kol. Imunodetekce v laterálním toku na membráně. *Chemické Listy*. 2014, 108, 114–119. ISSN 1213-7103.
- [23] VAN AMERONGEN A., VEEN J., ARENDS H. A., KOETS M. *Handbook of Immunoassay Technologies*. Elsevier. 2018, 157-182. ISBN 9780128117620.
- [24] RONG-HWA S., SHIAO-SHEK T., DER-JIANG CH., YAO-WEN H. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Food Chemistry*. 2010, 118(2), 462-466. ISSN 0308-8146.
- [25] LIN B., GUAN Z., SONG Y. et al. Lateral flow assay with pressure meter readout for rapid point-of-care detection of disease-associated protein. *Lab on a Chip*. 2018, 18(6), 965-970. ISSN 1473-0197.
- [26] BAHADIR E. B., SEZGINTÜRK M. K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 82, 286-306. ISSN 0165-9936.
- [27] SAJID M., KAWDE A., DAUD M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015, 19(6), 689-705. ISSN 1319-6103.
- [28] CHING K. H. *Methods in Molecular Biology*. Springer, 2015, 127-137. ISBN 978-1-4939-2741-8.
- [29] *BioDot* Dispensers. Operating Manual – Version 1.5. [online]. [cit. 2018-11-16]. Dostupné z: https://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/e/e3/Dispensers_Manual_v2_0.pdf
- [30] TAKALKAR S., BARYEH K., LIU G. Fluorescent carbon nanoparticle-based lateral flow biosensor for ultrasensitive detection of DNA. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, 98, 147-154. ISSN 0956-5663.
- [31] POSTHUMA-TRUMPIE G. A., KORF J., VAN AMERONGEN A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 393(2), 569-582. ISSN 1618-2642.
- [32] BLAŽKOVÁ M., RAUCH P., FUKAL L. Strip-based immunoassay for rapid detection of thiabendazole. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(9), 2122-2128. ISSN 0956-5663.

- [33]HSIEH H. V., DANTZLER J. L., WEIGL B. H. Analytical Tools to Improve Optimization Procedures for Lateral Flow Assays. *Diagnostics*. 2017, 7(2). ISSN 2075-4418.
- [34] FISCHER CH., WESSELS H., PASCHKE-KRATZIN A., FISCHER M. Aptamers: Universal capture units for lateral flow applications. *Analytical Biochemistry*. 2017, 522, 53-60. ISSN 0003-2697.
- [35] What is an Aptamer? – Aptamers and SELEX [online]. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <https://www.basepairbio.com/what-is-an-aptamer/>
- [36] SCHÜTZE T., WILHELM B., GREINER N. et al. Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE*. 2011, 6(12). ISSN 1932-6203.
- [37]CHEN A., YANG S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 71, 230-242. ISSN 0956-5663.
- [38]JAUSET-RUBIO M., SVOBODOVA A., MAIRAL T. et al. Aptamer Lateral Flow Assays for Ultrasensitive Detection of β -Conglutin Combining Recombinase Polymerase Amplification and Tailed Primers. *Analytical Chemistry*. 2016, 88(21), 10701-10709. ISSN 0003-2700.
- [39]GWYN S., MITCHELL A., DEAN D., MKOCHA H., HANDALI S. et al. Lateral flow-based antibody testing for Chlamydia trachomatis. *Journal of Immunological Methods*. 2016, 435, 27-31. ISSN 0022-1759.
- [40] LEE S., MEHTA S., ERICKSON D. Two-Color Lateral Flow Assay for Multiplex Detection of Causative Agents Behind Acute Febrile Illnesses. *Analytical Chemistry*. 2016, 88(17): 8359–8363. ISSN 0003-2700.
- [41]SAKURAI A., TAKAYAMA K., NOMURA N., YAMAMOTO N. et al. Multi-colored immunochromatography using nanobeads for rapid and sensitive typing of seasonal influenza viruses. *Journal of Virological Methods*. 2014, 209, 62-68. ISSN 01660934.
- [42] LIU CH., JIA Q., YANG CH. et al. Lateral Flow Immunochromatographic Assay for Sensitive Pesticide Detection by Using Fe₃O₄ Nanoparticle Aggregates as Color Reagents. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(17), 6778-6784. ISSN 0003-2700.
- [43] BORSE V., SRIVASTAVA R. Fluorescence lateral flow immunoassay based point-of-care nanodiagnostics for orthopedic implant-associated infection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, 280, 24-33. ISSN 0925-4005.
- [44] GAO H., HAN J., YANG S., WANG Z. et al. Highly sensitive multianalyte immunochromatographic test strip for rapid chemiluminescent detection of

- ractopamine and salbutamol. *Analytica Chimica Acta*. 2014, 839, 91-96. ISSN 0003-2670.
- [45] BIAGINI R. E., SAMMONS D. L., SMITH J. P. et al. Rapid, Sensitive, and Specific Lateral-Flow Immunochromatographic Device To Measure Anti-Anthrax Protective Antigen Immunoglobulin G in Serum and Whole Blood. *Clinical And Vaccine Immunology*. 2006, 541–546. ISSN 1556-679X.
- [46] XIE Y., ZHANG L., LE T. An immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in animal tissues. *Food and Agricultural Immunology*. 2017, 28(3), 403-413. ISSN 0954-0105.
- [47] KHAN A., RASHID R., MURTAZA G. ZAHRA A. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014, 13(7), 1169-1177. ISSN 1596-9827.
- [48] Gold nanoparticles. *BBI Solutions*, UK [online]. [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.bbisolutions.com/catalogsearch/result/?q=%20gold%20nanoparticles>
- [49] ŘEZNÍČKOVÁ A., NOVOTNÁ Z., KOLSKÁ Z. a kol. Příprava, funkcionalizace a roubování nanočástic ušlechtilých kovů na aktivovaný polymer. *Chemické listy*. 2014, 108, 865–874. ISSN 1213-7103.
- [50] Latex Beads. *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA [online]. [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/labware/labwareproducts.html?TablePage=17557640>
- [51] CLARKE H., 2018, *Abingdon Health*, York, UK [online]. [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://www.abingdonhealth.com/articles/lateral-flow-assay-labels-conjugation/>
- [52] HLAVÁČEK A., SKLÁDAL P. Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Chemické listy*. 2011, 105, 611-615. ISSN 1213-7103.
- [53] MAK W. CH., BENI V., TURNER A. P. F. Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 79, 297-305. ISSN 0165-9936.
- [54] ZHERDEV A. V., DZANTIEV B. B. Ways to Reach Lower Detection Limits of Lateral Flow Immunoassays. InTech, 2018. ISBN 978-1-78923-901-0.
- [55] POHANKA M. Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, 2, 60-63. ISSN 0372-7025.

- [56] JIANG W., ZENG L., LIU L., SONG S., KUANG H. Immunochromatographic strip for rapid detection of phenylethanolamine A. *Food and Agricultural Immunology*. 2018, 29(1), 182-192. ISSN 0954-0105.
- [57] WU, Ruili, Shuai ZHOU, Ting CHEN, Jinjie LI, Huaibin SHEN, Yujuan CHAI a Lin Song LI. Quantitative and rapid detection of C-reactive protein using quantum dot-based lateral flow test strip. *Analytica Chimica Acta*. 2018, 1008, 1-7. ISSN 0003-2670.
- [58] LI S., SHENG W., WEN W., GU Y., WANG Y., WANG S. Three kinds of lateral flow immunochromatographic assays based on the use of nanoparticle labels for fluorometric determination of zearalenone. *Microchimica Acta*. 2018, 185(4). ISSN 0026-3672.
- [59] KATIS I. N., HE P. J. W., EASON R. W., SONES C. L. Improved Sensitivity And Limit-of-detection of Lateral Flow Devices Using Spatial Constrictions of the Flow-path. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, 113, 95-100. ISSN 0956-5663.
- [60] LAMONT S. Increasing Sensitivity In Lateral Flow Tests. *BBI Solutions*. [online]. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: https://www.emdmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/MerckSite//Merck/en_US/Freestyle/DIV-Divisional/Events/pdfs/lateral-flowpresentations/increasing-sensitivity-in-lateral-flow.pdf
- [61] TARANOVA N.A., BERLINA A.N., ZHERDEV A.V., DZANTIEV B.B. Traffic Light's Immunochromatographic Test Based on Multicolor Quantum Dots for the Simultaneous Detection of Several Antibiotics in Milk. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 63, 255-261. ISSN 0956-5663.
- [62] QIN Z., CHAN W. C. W., BOULWARE D. R., AKKIN T., BUTLER E. K., BISCHOF J. C. Significantly Improved Analytical Sensitivity of Lateral Flow Immunoassays by Using Thermal Contrast. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, 51(18), 4358-4361. ISSN 1433-7851.
- [63] KIM W., LEE S., JEON S. Enhanced sensitivity of lateral flow immunoassays by using water-soluble nanofibers and silver-enhancement reactions. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, 273, 1323-1327. ISSN 0925-4005.
- [64] NGOM B., GUO Y., WANG X., BI D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 397(3), 1113-1135. ISSN 1618-2642.

- [65] BYZOVA N., VINOGRADOVA S., POROTIKOVA E., TEREKHOVA U. et al. Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus. *Biosensors*. 2018, 8(4). ISSN 2079-6374.
- [66] ENDO F., TABATA T., SADATO D. et al. Development of a simple and quick immunochromatography method for detection of anti-HPV-16/-18 antibodies. *PLOS ONE*. 2017, 12(2). ISSN 1932-6203.
- [67] YU J.E., OUH I., KANG H., LEE H. et al. An enhanced immunochromatographic strip test using colloidal gold nanoparticle-labeled dual-type N proteins for detection of antibodies to PRRS virus. *Journal of Veterinary Science*. 2018, 19(4). ISSN 1229-845X.
- [68] WEBER P. C., OHLENDORF H., WENDOLOSKI J. J., SALEMME F. R. Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science*. 1989, 243, 85-88. ISSN 1095-9203.
- [69] GRUBMULLER H., HEYMANN B., TAVAN P. Ligand Binding: Molecular Mechanics Calculation of the Streptavidin-Biotin Rupture Force. *Science*. 1996, 271, 997-999. ISSN 1095-9203.
- [70] HERMANSON G. T. *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press, 1996. ISBN 978-0-12-370501-3.
- [71] Streptavidin. *Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, USA [online]. [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/434301>
- [72] GAUTAM P. B., SHARMA R., LATA K., RAJPUT Y. S., MANN B. Construction of a lateral flow strip for detection of soymilk in milk. *Journal of Food Science and Technology*. 2017, 54(13), 4213-4219. ISSN 0022-1155.
- [73] GORDON J., PUGH CH. S. G. Lateral Flow Chromatographic Binding Assay Device. Patent Number: 4,956,302. *U.S. Patent* . 1990.
- [74] ZHANG X., YU X., WEN K. et al. Multiplex Lateral Flow Immunoassays Based on Amorphous Carbon Nanoparticles for Detecting Three Fusarium Mycotoxins in Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(36), 8063-8071. ISSN 0021-8561.
- [75] LIU J., WANG J., LI Z., MENG H. et al. A lateral flow assay for the determination of human tetanus antibody in whole blood by using gold nanoparticle labeled tetanus antigen. *Microchimica Acta*. 2018, 185(2). ISSN 0026-3672.

- [76] LI H., HAN D., HEGENER M. A., PAULETTI G. M., STECKL A. J. Flow reproducibility of whole blood and other bodily fluids in simplified no reaction lateral flow assay devices. *Biomicrofluidics*. 2017, 11(2). ISSN 1932-1058.
- [77] BUTLER S. A., KHANLIAN S. A., COLE L. A. Detection of Early Pregnancy Forms of Human Chorionic Gonadotropin by Home Pregnancy Test Devices. *Clinical Chemistry*. 2001, 47(12), 2131–2136. ISSN 1530-8561.
- [78] ROSS G. M. S., BREMER M. G. E. G., NIELEN M. W. F. Consumer-friendly food allergen detection: moving towards smartphone-based immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, 410(22), 5353-5371. ISSN 1618-2642.
- [79] LIU J., GAO S., KANG L. et al. An Ultrasensitive Gold Nanoparticle-based Lateral Flow Test for the Detection of Active Botulinum Neurotoxin Type A. *Nanoscale Research Letters*. 2017, 12(1). ISSN 1931-7573
- [80] WU J., DONG M., ZHANG CH., WANG Y. et al. Magnetic Lateral Flow Strip for the Detection of Cocaine in Urine by Naked Eyes and Smart Phone Camera. *Sensors*. 2017, 17(6). ISSN 1424-8220.
- [81] "DIAQUICK" kazeta Těhotenský test v moči. *DIALAB spol. s r.o.* [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: https://www.dialab.cz/static/_dokumenty/1/1/0/7/7/N-hCG-test-Z98404.pdf
- [82] Těhotenský test. *Dr. Max Pharma s.r.o.* [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/dr-max-lady-max-test-comfort>
- [83] Těhotenský test. *Green-Swan Pharmaceuticals a.s.* [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/gs-mamatest-10-tehotensky-test-2ks>
- [84] SHAW T., TELLAPRAGADA CH., KE V., AUCOIN D. P. et al. Performance evaluation of Active Melioidosis Detect-Lateral Flow Assay (AMD-LFA) for diagnosis of melioidosis in endemic settings with limited resources. *PLOS ONE*. 2018, 13(3). ISSN 1932-6203.
- [85] Rychlý test pro kvalitativní detekci antigenu chřipky A a B ve vzorcích nasofaryngeálních stěrů. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-diagnostika-ostatnich-infekci-594>
- [86] Rychlý test k prokázání infekce chlamydiemi. *Veroval*. [online]. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <https://veroval.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [87] Rychlý test pro kvalitativní detekci antigenu streptokoka A ve vzorcích výtěrů z krku. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-diagnostika-ostatnich-infekci-594>

- [88] BIONEXIA® Influenza A+B, *bioMérieux Clinical Diagnostics*. [online]. [cit. 2019-02-9]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/bionexiar-influenza-ab>
- [89] CARRIO A., SAMPEDRO C., SANCHEZ-LOPEZ J. et al. Automated Low-Cost Smartphone-Based Lateral Flow Saliva Test Reader for Drugs-of-Abuse Detection. *Sensors*. 2015, 15(11), 29569-29593. ISSN 1424-8220.
- [90] MIOČEVIĆ O., COLE C. R., LAUGHLIN M. J., BUCK R. L. et al. Quantitative Lateral Flow Assays for Salivary Biomarker Assessment: A Review. *Frontiers in Public Health*. 2017, 5. ISSN 2296-2565.
- [91] Rychlý test pro kvalitativní detekci okultního krvácení v lidské stolici. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-diagnostika-ostatnich-infekci-594>
- [92] MAGIATI M., MYRIDAKI V. M., CHRISTOPOULOS T. K., KALOGIANNI D. P. Lateral flow test for meat authentication with visual detection. *Food Chemistry*. 2019, 274, 803-807. ISSN 0308-8146.
- [93] SCHOLL P. F., FARRIS S. M., MOSSOBA M. M. Rapid Turbidimetric Detection of Milk Powder Adulteration with Plant Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62(7), 1498-1505. ISSN 0021-8561.
- [94] BYZOVA N. A., URUSOV A. E., ZHERDEV A. V. et al. Multiplex highly sensitive immunochromatographic assay based on the use of nonprocessed antisera. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, 410(7), 1903-1910. ISSN 1618-2642.
- [95] FENTON E. M., MASCARENAS M. R., LÓPEZ G. P., SIBBETT S. S. Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2009, 1(1), 124-129. ISSN 1944-8244.
- [96] HAUSHALTER K. J., VETCHA S., HAUSHALTER R. C. Multiplex Flow Assays. *ACS Omega*. 2016, 1(4), 586-599. ISSN 2470-1343.
- [97] C-reaktivní protein imunologický test. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-diagnostika-ostatnich-infekci-594>
- [98] Rychlý semikvantitativní CRP Test – kazety. *QUICKSEAL INTERNATIONAL, s.r.o.* [online]. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <https://www.quickseal.eu/produkty/detail-produktu/?kategorie=8&produkt=147>
- [99] BRANGEL P., SOBARZO A., PAROLO C. et al. A Serological Point-of-Care Test for the Detection of IgG Antibodies against Ebola Virus in Human Survivors. *ACS Nano*. 2018, 12(1), 63-73. ISSN 1936-0851.

- [100] hCG test pro detekci těhotenství. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-10].
Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-detekce-dalsich-markeru-610>
- [101] Rychlý test k prokázání snížené činnosti štítné žlázy. *Veroyal*. [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://veroyal.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [102] Rychlý test ke zjištění nízké hladiny železa. *Veroyal*. [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://veroyal.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [103] Rychlý test ke zjištění koncentrace spermií ve spermatu. *Veroyal*. [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://veroyal.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [104] Rychlý test ke zjištění okultního krvácení do stolice. *Veroyal*. [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://veroyal.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [105] Test na 6 drog ze slin THC OPI COC MET/XTC/AMP. *Dr. Max Pharma s.r.o.* [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/test-na-6-drog-ze-slin>
- [106] MULTI DrugControlMultiLine. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-multiparametry-571>
- [107] Mononukleóza test. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-diagnostika-ostatnich-infekci-594>
- [108] Nesnášenlivost lepku. Rychlý test ke zjištění celiakie. *Veroyal*. [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://veroyal.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [109] Rychlý test ke zjištění bakterie *Helicobacter pylori*. *Veroyal*. [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://veroyal.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [110] Rychlý test pro zjištění borélií z klíštěte. *Veroyal*. [online]. [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://veroyal.info/cs-cz/produkty/domaci-testy>
- [111] LYMETOP+. *Ulti med Products*. [online]. [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <http://www.jktrading.cz/stranka-diagnostika-ostatnich-infekci-594>
- [112] WHO, 2017. [online]. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.who.int/snakebites/disease/en/>
- [113] LIU CH., YU J., WANG P. et al. Development of sandwich ELISA and lateral flow strip assays for diagnosing clinically significant snakebite in Taiwan. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018, 12(12). ISSN 1935-2735.
- [114] LLORENT-MARTÍNEZ E.J., FERNÁNDEZ-POYATOS M.P., RUIZ-MEDINA A. Automated fluorimetric sensor for the determination of zearalenone mycotoxin in maize and cereals feedstuff. *Talanta*. 2019, 191, 89-93. ISSN 0039-9140.

- [115] HAN Z., BOSHRA H., SUNYER O. J. et al. Biochemical and Functional Characterization of the Ebola Virus VP24 Protein: Implications for a Role in Virus Assembly and Budding. *American Society for Microbiology*. 2003, 77(3), 1793-1800. ISSN 0044-7897.
- [116] HU J., JIANG Y., WU L. et al. Dual-Signal Readout Nanospheres for Rapid Point-of-Care Detection of Ebola Virus Glycoprotein. *Analytical Chemistry*. 2017, 89(24), 13105-13111. ISSN 0003-2700.