

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Testování nosiče z polymerních nanovláken pro imunochromatografický test

Bc. Jana Bartušková

Diplomová práce

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Bartušková**
Osobní číslo: **C20466**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Testování nosiče z polymerních nanovláken pro imunochromatografický test**
Téma práce anglicky: **Testing Of Polymer Nanofiber Carriers For Immunochromatographic Test**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Teoretická část bude obsahovat přehled polymerních nanovláken pro biomedicínu a diagnostiku, stručný popis přípravy, fyzikálně-chemickou charakteristiku. U vybraných polymerních nanovláken zmapujte v literatuře možné způsoby vazeb proteinů/protilátek. Zaměřte se na – PVDF, acetylcelulóza, polyamid. Imunochemický princip imunochromatografických rychlostestů (lateral flow, rapid test), používané materiály. Typy vazby antigenů a protilátek na membránu v imunochromatografických testech.

Experimentální část:

1. Cílem je připravit bioaktivní nosič protilátek a antigenů jako v imunochromatografických testech, s ověřeným množstvím vázané látky a s výhodami nanorozměrných materiálů. Práce probíhá ve spolupráci s Elmarco, s.r.o., Liberec.
 2. Detekce efektivity vazby proteinů/peptidů pomocí analytických a imunochemických metod jako je BCA, SDS PAGE elektroforéza, protein-specifické metody.
 3. Navrhněte imunochemické ověření bioaktivního nosiče.
 4. Srovnání dosažených výsledků mezi materiály.
-

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy. Další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Martina Špačková**
Elmarco, s.r.o., Liberec
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

LS.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Testování nosiče z polymerních nanovláken pro imunochromatografický test 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4.5.2023

Bc. Jana Bartušková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Martině Špačkové za ochotu, vstřícný přístup a čas, který mi věnovaly při konzultacích a v celém průběhu psaní této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na testování nosičů z polymerních nanovláken pro oblast imunochromatografických testů. V teoretické části je stručně popsána výroba nanovláken, další kapitoly jsou zaměřeny na popis vlastností vybraných materiálů, jako jsou: polyamid 6, acetylcelulóza, polyvinylidenfluorid a chitosan. Dále navazuje pasáž zaměřující se na principy imunochromatografických testů. Teoretická část je zakončena kapitolou věnující se způsobům vazeb protilátek a proteinů na nanomateriály. Experimentální část obsahuje postupy optimalizace podmínek adsorpce ovalbuminu, karbodiimidovou kovalentní vazebnou interakci, detekci navázaného proteinu metodami BCA testu a SDS PAGE elektroforézou. Ověření vazby pomocí specifické protilátky proběhlo imunochemickým principem dot blotu. Na závěr jsou dosažené výsledky jednotlivých testovaných nanomateriálů srovnány mezi sebou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polymerní nanovlákná, imunochromatografický test, adsorpce, ovalbumin, polyamid 6, acetylcelulóza, polyvinylidenfluorid, chitosan

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on the testing of polymer nanofiber carriers for the field of immunochromatographic tests. In the theoretical part, the production of nanofibers is briefly described, other chapters are focused on the description of the properties of selected materials, such as: polyamide 6, acetyl cellulose, polyvinylidene fluoride and chitosan. It is followed by a passage focusing on the principles of immunochromatographic tests. The theoretical part ends with a chapter devoted to the methods of binding antibodies and proteins to nanomaterials. The experimental part includes procedures for optimizing ovalbumin adsorption conditions, carbodiimide covalent binding interaction, detection of bound protein by BCA test methods and SDS PAGE electrophoresis. Binding was verified using a specific antibody using the dot blot immunochemical principle. Finally, the results of the individual tested nanomaterials are compared with each other.

KEYWORDS

Polymer nanofibers, immunochromatographic assay, adsorption, ovalbumine, polyamide 6, acetyl cellulose, polyvinylidene fluoride, chitosan.

OBSAH

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Nanovláknna	16
1.1.1 Metody přípravy nanovláken	16
1.2 Vlastnosti vybraných polymerních materiálů	19
1.2.1 Polyamid 6	19
1.2.2 Acetylcelulóza	19
1.2.3 Polyvinylidenfluorid	20
1.2.4 Chitosan	21
1.2.5 Vlastnosti membrán vyrobených z polymerních materiálů	22
1.3 Imunochromatografické testy	22
1.3.1 Látky reagující v imunochromatografickém testu	24
1.3.2 Princip imunochromatografického testu	27
1.3.3 Uspořádání imunochromatografického testu	27
1.3.4 Jednotlivé součásti imunochromatografického testu	30
1.4 Způsoby vazby protilátek a proteinů na nanomateriály	34
1.4.1 Fyzikální adsorpce	35
1.4.2 Iontová adsorpce	36
1.4.3 Vazba (strept)avidin-biotin a avidin-biotin	36
1.4.4 Kovalentní vazby	36
1.4.5 Karbodiimidová vazebná interakce	37
1.4.6 Maleinimidová kopulační reakce	37
1.4.7 Metoda MeCAT	38
2 CÍLE PRÁCE	39
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40

3.1	Přístroje a zařízení.....	40
3.2	Laboratorní pomůcky	40
3.3	Použité chemikálie	41
3.4	Použité protilátky a antigeny.....	41
3.5	Testovaná nanovlákná	42
3.6	Stanovení koncentrace proteinu ovalbuminu metodou microBCA	47
3.6.1	Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu	47
3.6.2	Stanovení koncentrace ovalbuminu na nanovlákně	48
3.7	Hodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu	49
3.8	Imobilizace ovalbuminu karbodiimidovou metodou na nanovlákná	49
3.9	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	50
3.10	Analýza proteinů metodou dot blot.....	53
3.11	Denzitometrické vyhodnocení proteinů v gelu a na membráně.....	55
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	56
4.1	Adsorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná	56
4.1.1	Optimalizace podmínek adsorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná	57
4.2	Imobilizace ovalbuminu na chitosanová nanovlákná karbodiimidovou metodou	60
4.3	Porovnání adsorpce ovalbuminu u různých nanovláken.....	64
4.4	Imunochemická detekce metodou dot blot	65
4.4.1	Optimalizace ředění primární protilátky a sekundární protilátky.....	66
4.4.2	Dot blot analýza na ostatních membránách.....	69
4.4.3	Ověření optimálních podmínek na PVDF (Immuno-Blot™) membráně.....	69
4.4.4	Dot blot analýza na PVDF (Solef 1015) membráně.....	70
	ZÁVĚR	73
	POUŽITÁ LITERATURA.....	74

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: Proces elektrostatického zvlákňování	17
Obrázek 2: Princip zvlákňování.....	18
Obrázek 3: Imunochromatografický test	24
Obrázek 4: Typy protilátek pro reakce s antigenem	25
Obrázek 5: Kompetitivní uspořádání imunochromatografického testu	29
Obrázek 6: Sendvičové uspořádání imunochromatografického testu.....	30
Obrázek 7: Chemická struktura nitrocelulózy	32
Obrázek 8: TEM obrazy AuNP (A) a AuNP potažené Streptavidinem (B)	33
Obrázek 9: Fyzikální adsorpce protilátek na nanočástici	35
Obrázek 10: Karbodiimidová vazebná interakce.....	37
Obrázek 11: Schéma maleinimidové kopulační reakce	37
Obrázek 12: Schéma MeCAT metody.....	38
Obrázek 13: Vlákna chitosanu	42
Obrázek 14: Vlákna acetylcelulózy	43
Obrázek 15: Vlákna polyamidu PA6	44
Obrázek 16: Vlákna PVDF	45
Obrázek 17: Vlákna Solef 1015	46
Obrázek 18: SDS-PAGE elektroforéza ovalbuminu	63
Obrázek 19: Výsledek dot blotu při ředění anti-králičí IgG protilátky.....	67
Obrázek 20: Optimalizace ředění primární anti-ovalbuminové králičí protilátky.....	68
Obrázek 21: Dávkování antigenu ovalbuminu v $\mu\text{g/ml}$	70
Obrázek 22: Podle schématu A byl dávkován antigen ovalbumin v $\mu\text{g/ml}$	71

Tabulka 1: Srovnání vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek	27
Tabulka 2: Příklady stanovovaných analytů LFA testy	28
Tabulka 3: Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu	47
Tabulka 4: Pipetované objemy roztoků pro přípravu polyakrylamidových gelů	51
Tabulka 5: Kalibrační řada ovalbuminu pro microBCA test, provedena v dubletu	57
Tabulka 6: Časové a teplotní podmínky inkubace ovalbuminu s chitosanovými nanovláčky	58

Graf 1: Kalibrační křivka koncentrace ovalbuminu stanovení metodou BCA.....	58
Graf 2: Porovnání účinností adsorpce ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml na chitosanová nanovlákná (Nanovia s.r.o.) za různých teplotních a časových podmínek, provedeno v tripletu	59
Graf 3: Kalibrační křivka zásobního roztoku proteinu ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml	61
Graf 4: Srovnání účinnosti karbodiimidové vazby ovalbuminu	61
Graf 5: Srovnání účinnosti adsorpce ovalbuminu (0,1 mg/ml) na PVDF (Immuno-Blot™) a vzorky nanovláken z PVDF (KynarFlex), PVDF (Solef 1015), PA6 (B24), Acetylcelulózy (CA) a modelových nanovláken z chitosanu provedeno v tripletu	64
Graf 6: Intenzita signálu pro ředění primární anti-králičí protilátky 1:250	68
Graf 7: Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení PVDF (Immuno-Blot™) membrány.	70
Graf 8: Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení PVDF (Solef 1015) membrány	71

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Ab	Protilátka (Antibody)
Atg	Antigen
AuNP	Zlaté nanočástice (Gold nanoparticles)
CA	Acetylcelulóza
CNP	Uhlíkové nanočástice (Carbon nanoparticles)
DMF	N, N-dimethylformamid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
Hcg	Lidský choriový gonadotropin (Human chorionic gonadotropin)
HRP	Křenuv peroxidáza (Horseradish peroxidase)
LFA	Laterální průtokový imunochromatografický test (Lateral flow test)
MeCAT	Technologie absolutní kvantifikace proteinů (Absolute protein quantification technology)
MEK	Methyl-ethylketon
NC	Nitrocelulóza
NF	Nanovlákná (Nanofibers)
NHS	N-hydroxysukcinimid
PA6	Polyamid 6
POCT	Testování v místě péče o pacienta (Point of care testing)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QD	Kvantové tečky (Quantum dots)
SCN-DOTA	Bifunkční chelatační činidlo (Bifunctional chelating agent)

SDS PAGE

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

TFA

Kyselina trifluoroctová (Trifluoroacetic acid)

ÚVOD

Polymerní materiály elektrostaticky zvlákněné do nanovlákněných membrán, jako jsou polyamid, polyvinylidenfluorid či acetylcelulóza, lze využít v biomedicině pro výrobu membrány imunochromatografického testu. Běžně je pro výrobu membrány v tomto typu testů využívána nitrocelulóza. Tato práce se zaměřuje na testování možného nahrazení nitrocelulózy jinými nanovlákněnými polymerními materiály. Výhodami nanovlákněných membrán jsou vysoký poměr povrchu k objemu, jejich porézní struktura a s ní spojená možnost ovlivnění průtokové rychlosti a možnosti vazby proteinů na jejich povrch. Nanovláknena lze z polymerů a tavenin připravit různými metodami, ale s ohledem na zpracovávaná nanovláknena je tato práce zaměřena na metodu elektrostatického zvláknění. Pokročilou metodou přípravy je Nanospider, technika patentovaná firmou Elmarco Liberec. Tato technika využívá vysokého elektrického napětí a nanovláknena se zde formují z tenké vrstvy polymeru.

Imunochromatografický test, tzv. laterální průtokový imunochromatografický test (LFA) lze využít v místě péče o pacienta (POCT), pro rychlé, kvalitativní stanovení různých analytů. Takto je možné stanovit např. lidský choriový gonadotropin (hCG), drogy, SARS COV-2, viry chřipky, bakterie a další. Biologický materiál vhodný pro imunochromatografický test je vzorek krve, moče nebo slin. Rozlišujeme dva základní typy uspořádání sendvičové a kompetitivní. Testovací proužek obsahuje tyto součásti: vzorkovací podložku, konjugační zónu, testovací a kontrolní část, membránu, absorpční podložku a pomocnou zadní vrstvu. Tato práce se zaměřuje na testování vazby proteinů na nanovláknennou membránu.

Procesu vazby biomolekul na povrch (nano)materiálů se účastní různé vazebné interakce. Tyto interakce můžeme rozdělit do několika skupin. Fyzikální adsorpce se účastní Van der Waalovy síly, vodíkové můstky a elektrostatické síly. Vazba (strept)avidin-biotin využívá specifické vazby biotinu na streptavidin a avidin. Mezi často používané kovalentní vazby patří karbodiimidová a glutaraldehydová vazebná interakce. Dále je zde popisována maleinimidová kopulační reakce a metoda MeCAT, založená na konjugaci protilátek s cheláty lanthanoidů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Nanovlákná

Nanovláknó (NF) je definováno, jako vláknó s průměrem menším než 1 μm (Ramakrishna et al., 2005). Komise Evropské unie č.96/2011 uvádí, že mezi nanomateriály lze zařadit takové materiály, které mají minimálně jeden rozměr mezi 1 a 100 nm. Nanovlákná mohou být vyrobena z polymerních materiálů, které jsou přírodního nebo syntetického původu. Využívána je i možnost kombinací obou uvedených možností (Hu et al., 2014). Vlastnosti NF se mezi sebou liší poměrem povrchu k objemu, morfologií, pórovitostí a tvarem. Tyto vlastnosti jde modifikovat a měnit tak, aby se upravily pro zamýšlenou aplikaci (Xu et al., 2022).

Mezi přírodní polymery se řadí polysacharidy. Ze skupiny polysacharidů mají nevhodnější vlastnosti pro zvláknění chitosan, celulóza, popřípadě alginátové deriváty. Mezi synteticky vyrobené polymery řadíme např. polyamid, polyvinylidenfluorid (PVDF) či polyethylenoxid (Chaghamarani et al., 2021). Nanovlákná vykazují vysoký poměr povrchu k objemu. Jde o porézní struktury. Velikost pórů lze ovlivnit procesy výroby. Jsou ideálním materiálem pro využití v různých aplikacích, jako je filtrace, biosenzory nebo funkční materiály (Cai et al., 2012). V oblasti tkáňového inženýrství jsou biokompatibilní nanovlákná využívána jako nosné struktury, tzv. „scaffoldy“. V medicíně mohou být použity jako materiál pro krytí ran nebo pro doručování léčiv (Baranwal et al., 2022).

1.1.1 Metody přípravy nanovláken

Mezi techniky zpracování nanovláken se řadí molekulární samouspořádání vláken nebo tepelně indukovaná separace fází. Technika elektrostatického zvláknování je jediný způsob, který umožňuje výrobu kontinuálních polymerních nanovláken. Mezi ovlivnitelné vlastnosti patří plocha povrchu, průměr nanovlákná, poréznost nanovláknenné vrstvy a také hustota (Nanopharma et al., 2022).

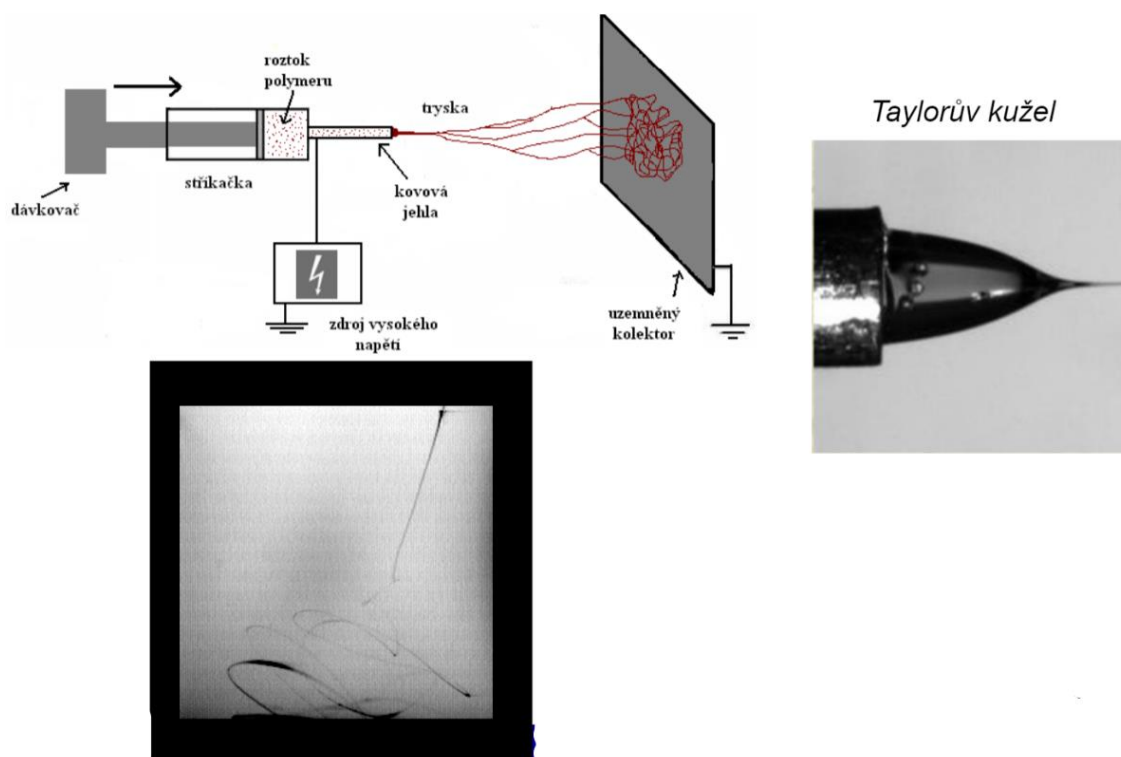
Elektrostatické zvláknování

Elektrostatické zvláknování je technika, která využívá polymerní roztoky a silné elektrické pole k výrobě nanovlákná (Jirsák et al., 2005). Jedná se o metodu výroby ultra jemných vláken, nabíjením a vytlačováním taveniny nebo roztoku polymeru (Zhong et al., 2016). K přípravě lze využít polymerní roztoky nebo polymerní taveniny. Nanovlákná

vyrobená touto metodou disponují vhodnými vlastnostmi jako jsou: velmi velký povrch v poměru k objemu s vysokým počtem pórů o malé velikosti (Nanopharma et al., 2022). Technologii elektrostatického zvlákňování můžeme rozdělit do dvou odvětví. Prvním z nich je zvlákňování z jehly nebo kapiláry. V tomto případě se výrobní rychlost pohybuje v řádu jednotek gramů polymeru za hodinu. Druhou možností je zvlákňování založené na bez jehlovém zvlákňování, kde se jedná o samo organizaci polymerních trysek z povrchu kapaliny.

Elektrostatické zvlákňování je ovlivněno širokou škálou faktorů jako jsou: napětí, vzdálenost zvlákňovací a sběrné elektrody, typ kolektoru, vlastnosti roztoku, které zahrnují viskozitu, pH, vodivost a povrchové napětí roztoků. Klíčovými parametry jsou především viskozita a povrchové napětí. Viskozita se zvyšuje s koncentrací polymeru a s jeho molekulovou hmotností (Mendes et al., 2017).

Standardní uspořádání aparatury při jehlovém elektrostatickém zvlákňování se skládá ze stříkačky naplněné polymerním roztokem. Tato stříkačka je připojena ke zvlákňovací trysce. Většinou jí je injekční jehla s tupým hrotem. Dále aparatura obsahuje dávkovač, zdroj vysokého napětí a uzemněný kolektor, jak je znázorněno na obrázku 1. Celé nastavení lze umístit do svislé nebo vodorovné polohy (Kenry et al., 2017).

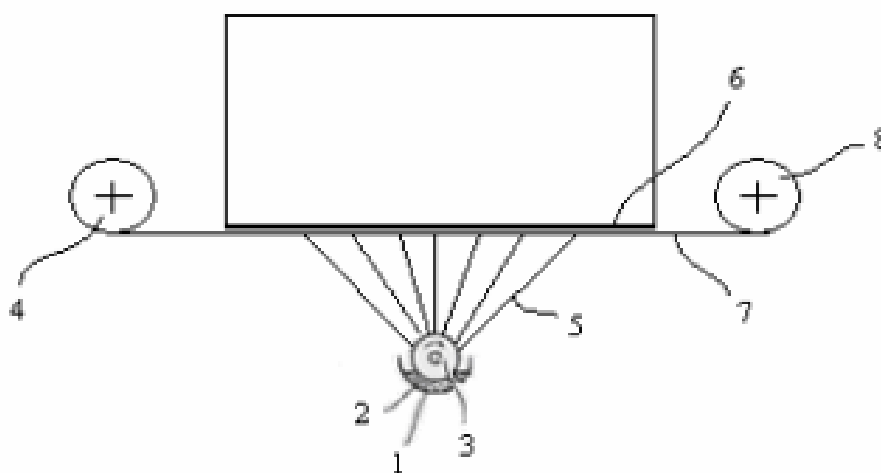


Obrázek 1: Proces elektrostatického zvlákňování (převzato a upraveno z Košťáková et al., 2015)

Při zvláknění dochází k elektrohydrolytickému procesu. Kapalina je vytlačována ze zvláknovací trysky za vzniku závěsné kapky vlivem povrchového napětí. Mezi povrchovými náboji dochází k elektrostatickému odpuzování (Xue 2019). Vzájemné odpuzování nábojů vytváří sílu, která působí proti povrchovému napětí. Roztok polymeru proudí ve směru elektrického pole. Další zvýšení elektrického pole způsobí, že se kapka kulovitě tvaru deformuje a zaujme kuželovitý tvar, vzniká tzv. Taylorův kužel. Stabilní proud náboje se vytváří pouze za předpokladu dostatečné kohezní síly polymeru. Během procesu vnitřní a vnější síly náboje způsobí šlehání proudu kapaliny ve směru kolektoru. Šlehavý pohyb umožňuje, že může dojít k natahování polymerních řetězců v roztoku a jejich klouzání kolem sebe, díky čemuž vzniká nanovláknno (Haider et al., 2018).

Nanospider

Nanospider je modifikace elektrostatického zvláknování, která umožňuje použití vysokého napětí až 80 kV (El Neveky et al., 2012). Technologie Nanospider™ vyvinutá týmy z Technické univerzity Liberec v čele s profesorem Jirsákem a ve spolupráci s firmou Elmarco, získala patent v roce 2005. Oproti elektrostatickému zvláknování má výhodu v tom, že ke zvláknování dochází přímo z volné hladiny roztoku polymeru. Odpadá zde potřeba kapilár a trysek (Jirsák et al., 2005). Obrázek 2 představuje schéma zvláknování metodou Nanospider.



Obrázek 2: Princip zvláknování Nanospider: 1 – nádoba obsahující polymerní roztok ke zvláknění, 2 – roztok polymeru, 3 – rotační válec, 4 – příváděcí válec, 5 – proudy roztoku polymeru, 6 – protielektroda, 7 – podkladový materiál, 8 – navíjecí válec (převzato z Jirsák et al., 2005)

Hlavní součástí celé aparatury je rotující válec, který je smáčen v roztoku polymeru. Válec je napojen na zdroj vysokého napětí, díky němuž může být polymerní roztok vynášen z nádoby. Působením silného elektrostatického pole vzniká na hladině roztoku polymeru mnoho Taylorových kuželů. V okamžiku, kdy dojde k překonání povrchového napětí kapaliny, dojde k vytrysknutí roztoku k protielektrodě. Podkladovým materiálem pro vzniklá nanovlákna může být pečící papír nebo Spun-bond. Spun-bond je netkaná textilie. V posledním kroku jsou nanovlákna navíjena na navíjecí válec (Jirsák et al., 2005).

1.2 Vlastnosti vybraných polymerních materiálů

Mezi vybrané polymerní materiály byly zvoleny dva organické polymery a dva biopolymery. Do skupiny organických polymerů se řadí polyvinylidenfluorid a polyamid 6. Do skupiny biopolymerů lze zařadit chitosan a acetylcelulózu. Organické polymery vynikají vlastnostmi jako je velký specifický povrch, rigidní struktura a chemická stabilita. Biopolymery jsou přírodní polymery produkované buňkami živých organismů. Mimo mnoho zásadních rolí v organismech je lze uplatnit i v jiných oblastech, jako je například potravinářský průmysl, biomedicínské inženýrství nebo farmacie (Baranwal et al., 2022).

1.2.1 Polyamid 6

Polyamid 6 (PA6) obsahuje amidovou skupinu $-\text{CO}-\text{NH}-$, která se pravidelně střídá s větším počtem methylenových skupin $-\text{CH}_2-$ v lineárním řetězci. Tvoří polyamidová vlákna nylon, silon. Předními vlastnostmi PA6 jsou jeho chemická stálost vůči chemickým činidlům, malá hmotnost a relativně velký objem. Taje při 215-220 °C na nízko viskózní kapalinu. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje mezi 12000-15000 kg/mol (Allcook et al., 2006). Surovinami pro výrobu PA6 jsou hexametyléndiamin a kyselina adipová. Je hydrofilní, molekuly vody se přes vodíkové můstky vážou k peptidické vazbě uvnitř řetězce PA6. Amorfní část molekuly je zodpovědná za jeho elastické vlastnosti. Rozpouští se v kyselině chlorovodíkové nebo kyselině mravenčí. Při delším vystavení UV záření žloutne. Tenkovrstvé membrány polyamidu se používají pro dekontaminaci pitné vody, odsolování vody nebo pro opětovné využití odpadních vod (Zhang et al., 2019).

1.2.2 Acetylcelulóza

Acetylcelulóza (CA) je polydisperzní lineární biopolymer, skládající se z poly- β -(1,4)-D-glukozových jednotek a acetylů CH_3CO . Celulóza má velmi silné intramolekulární vodíkové vazby. CA je nerozpustná v běžných rozpouštědlech. Rozpouští se ve směsi dimethylsulfoxidu

s paraformaldehydem nebo v N-methylmorfolinu. Pro CA je vhodné výhradně elektrostatické zvlákňování. Acetylcelulózová vlákna lze připravit z roztoku aceton/dimethyl-acetamidu nebo aceton/dimethylformamidu. Výhodná je její odolnost vůči mastnotě, aromatickým uhlovodíkům a běžným rozpouštědlům. Je nerozpustná ve vodě, nasákavost vodou se pohybuje okolo 3-4,5 %. Disponuje rovněž vynikající optickou čistotou (Petráš et al., 2009). CA má homogenní mikroporézní strukturu, je méně hydrofilní než papírová vlákna (Stringer et al., 2005). Membrány vyrobené z CA jsou hydrofilní a mají nízký povrchový náboj. Nevýhodou pro biologické aplikace je jejich nízká schopnost vázat proteiny, naopak výhodná je jejich tepelná stabilita a biodegradabilita (Li et al., 2017). Byla prokázána účinnost acetylcelulózy v zachycení a následného dodávání různých terapeutických léčiv (Felgueiras 2020).

1.2.3 Polyvinylidenfluorid

Základní stavební jednotkou PVDF je monomer $-\text{CH}_2\text{-CF}_2-$. Získává se polymerací vinylidendifluoridu. Má vysokou molární hmotnost 60-70 kg/mol. Nejčastěji se vyrábí radikálovou polymerací 1,1 difluorethylenu. Syntéza PVDF probíhá obvykle ve vodě s peroxidovými sloučeninami, které působí jako katalyzátory procesu polymerace. Makromolekuly PVDF obsahují: 59,4 hm % fluoru a 3 hm % vodíku (Zhaoliang et al., 2014). Výhodou může být jeho hydrofobní povaha, tepelná stabilita a vysoká chemická odolnost. Teplota varu PVDF je 170 °C. PVDF se síťuje při vystavení ionizačnímu záření. Vhodnými rozpouštědly jsou aceton, N, N-dimethylformamid (DMF), methyl-ethylketon (MEK). Pro zvlákňování je využíváno elektrostatické zvlákňování z tyčky, elektrostatické zvlákňování z jehly nebo Nanospider (Ramesh et al., 2013). PVDF má vazebnou kapacitu pro proteiny 170-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Molekuly proteinu se na PVDF váží pomocí hydrofobních a dipólových interakcí. Je vhodný pro detekci proteinů s vyšší molekulovou hmotností (Baker et al., 2014). Lze jej využít v biologických aplikacích, jelikož je netoxický, biologicky inertní, nerozložitelný a odolný vůči bakteriím. Odolnost PVDF vůči bakteriím byla využita pro výrobu titanových nanotrubiček pro čištění vzduchu s bakteriální kontaminací. Může být využit i v medicíně, ve formě monofilních stehů, které vykazují nižší počet zánětlivých reakcí než při využití jiných materiálů (Schellenberg et al., 2014).

PVDF membrány mohou být jak hydrofilní, tak hydrofobní, v závislosti na chemických přísadách a výrobních postupech. Výrobní postupy mohou změnit fyzikálně-chemické i mikrostrukturální vlastnosti membrány. Hydrofilní membrány jsou chemicky i tepelně velmi odolné. Pro laterální průtokové imunochromatografické testy, ale nejsou příliš vhodné, jelikož

mají nízkou schopnost vázat proteiny. Hydrofobní membrány vyrobené z PVDF mají poměrně vysokou schopnost vazby proteinů, a to je činí vhodnějšími pro využití v LFA testech (Li et al., 2017).

1.2.4 Chitosan

Chitosan se řadí mezi přírodní polysacharidy složené z 2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosy a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy, spojených β (1—4) glykosidickou vazbou. Jeho produkce pochází z největší části z alkalické deacetylace chitinu. Chitosan má na rozdíl od chitinu volné aminoskupiny, což zvyšuje jeho reaktivitu a v neposlední řadě také rozpustnost. Rozpouští se v organických kyselinách a částečně v dimethylsulfoxidu. Rozpouštědlo vhodné ke zvláknění chitosanu musí být dostatečně těkavé, jelikož se během procesu odpařuje. Takovým rozpouštědlem může být kyselina octová, jejíž koncentrace přesahuje 30 %. Díky tomu, dojde ke snížení povrchového napětí a zvýšení hustoty náboje, potřebného pro tvorbu nanovláken (Mendes et al., 2017).

V roztoku se chová jako polykation. Reaktivními centry jsou aminoskupina $-NH_2$ a hydroxy skupina $-OH$. Chitosan je slabě bazický, nerozpustný v neutrálním a alkalickém prostředí. Má pevnou krystalickou strukturu, způsobenou inter- a intra- molekulárními vodíkovými vazbami. Důležitou vlastností je jeho přilnavost k negativně nabitým povrchům. Vyrábí se z lastur mořských korýšů a mušlí přidáním 3-5% NaOH při 80-90 °C, tímto krokem dojde k rozpuštění proteinů. Anorganické složky jsou odstraněny přidáním 3-5% kyseliny chlorovodíkové. Následuje alkalická deacetylace 40-45% vodným roztokem NaOH při 90-120 °C po dobu 4-5 hodin (GieGan et al., 2021).

Vyniká souborem biologických vlastností, jako jsou netoxičita, biokompatibilita, biologická rozložitelnost, mimo jiné i antibakteriální a antimykotické účinky (Mendes et al., 2017). Čistý chitosan lze jen obtížně zvláknit. NH_2 skupiny, které ve své struktuře obsahuje, mají tendenci protonizovat, a znemožňovat tak proces elektrostatického zvláknování. Bylo zjištěno, že soudržných NF chitosanu, lze dosáhnout přidáním trifluoroctové kyseliny (TFA). TFA usnadňuje proces zvláknění chitosanu tím, že tvoří s aminoskupinami soli. Tyto soli zabráňují mezimolekulárním interakcím (Růžičková et al., 2004).

1.2.5 Vlastnosti membrán vyrobených z polymerních materiálů

Membrány vyrobené z polymerních materiálů v obecném měřítku mají menší velikost pórů od 0,1 do 5 μm . Membrány s laterálním prouděním disponují velikostí pórů od 7 do 15 μm . Menší velikost pórů je vhodnější pro transportování bílkovin. Pro využití v LFA je omezující transport plné krve, protože průměrná velikost erytrocytu je 7,4 μm (Fontanova et al., 2015). Membrány se mezi sebou liší schopnostmi vázat proteiny. Tyto schopnosti jsou ovlivněny povrchovou plochou polymeru dostupnou pro imobilizaci. Plocha povrchu závisí na pórovitosti a zároveň, velikosti jednotlivých pórů. Důležitým faktorem je rovněž tloušťka membrány (Liu et al., 2021).

V izoelektrickém bodu proteinu je odpuzování mezi membránou a proteinem na nejnižší úrovni, a proto může být v této fázi navázán na membránu nejnanežněji. Membrána by měla mít hydrofilní vlastnosti a konzistentní průtokové charakteristiky. Hydrofilitu může původně hydrofobní materiál získat pomocí povrchově aktivních látek, během procesu výroby. Velikost pórů membrány odpovídá rychlosti průtoku kapaliny, se zvětšující se velikostí pórů se průtok zrychluje a naopak. Rychlost nasávání vzorku je výrobcem definována jako čas v sekundách potřebný k tomu, aby čelo tekutiny prošlo membránou o šířce 4 cm. Rychlost vztlínání je zásadním faktorem pro kinetiku LFA testu a má dopad na výkon a citlivost testu (Talha et al., 2021).

1.3 Imunochromatografické testy

Imunochromatografické testy slouží k rychlému kvalitativnímu prokázání, zda se určitý analyt ve vzorku nachází, či nikoliv. Jsou založeny na principu imunochemických metod, a to specifické reakci mezi antigenem (Atg) a protilátkou (Ab). Mezi imunochemické metody patří např. ELISA, western-blot a dot blot.

ELISA

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je založena na velmi specifické vazbě Atg s Ab. Typickými vlastnostmi pro metodu ELISA je značení detekčních protilátek pomocí enzymů, které katalyzují přeměnu bezbarvého substrátu za vzniku barevného produktu. Nejčastějším dostupným substrátem je křenová peroxidáza (HRP) a alkalická fosfatáza. Testy ELISA se provádějí typicky v 96 jamkových destičkách potažených antigenem nebo protilátkou, dle typu stanovení. Primární detekční protilátka je specifická protilátka, která se váže pouze na požadovaný Atg, zatímco sekundární detekční protilátka je protilátka

konjugovaná s enzymem, která se váže na primární protilátku, která není konjugovaná s enzymem. Dalším krokem je blokace, ke které se nejčastěji využívá přidání hovězího sérového albuminu. Přidáním substrátu do reakce dojde ke změně barvy roztoku z původně bezbarvého na barevný. Mezi každým z výše uvedených kroků je potřebné promýt mikrotitrační destičky. Díky promývacímu pufru se odstraní nenavázaný materiál. Po změření výsledků absorbance na spektrofotometru je vynesena standardní křivka z dat sériových ředění z koncentrací na ose x za použití logaritmické stupnice a absorbance na ose y za použití lineární stupnice (Gelkop et al., 2018).

Dot blot

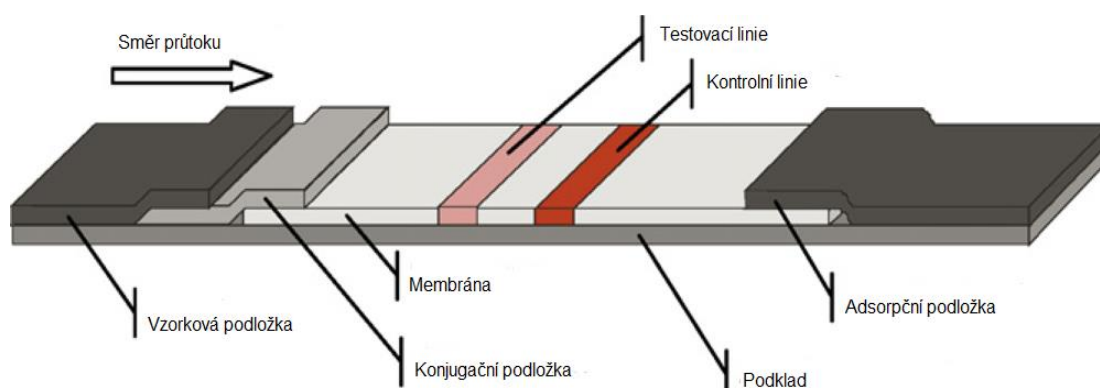
Dot blot patří mezi jednoduché, ale důležité biologické metody, které se běžně uplatňují ve výzkumných laboratořích, a především v diagnostice. Opírá se o princip jako již výše zmíněná ELISA, na specifických vazbách antigenu s protilátkou. Při dot blotu nemusí být prováděna gelová elektroforéza, což značí velkou časovou úsporu a hlavní výhodou této metody je možnost užití poměrně malého množství biologického vzorku. Metoda využívá suchou nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu. Po aplikaci vzorku membrána blokuje nespecifickou vazbu za pomoci blokovacího pufru. Poté následuje inkubace s primární specifickou protilátkou. Vizualizaci a kvantifikaci cílového proteinu umožňuje inkubace se sekundární protilátkou. Nevýhodou metody je neodlišení proteinů dle velikosti, s čímž souvisí obtížná detekce rozpoznání falešně pozitivních proteinů, například nespecifická vazba na peptidové fragmenty. Nejčastěji se používá pro identifikaci a imunodetekci především proteinů a nukleových kyselin, které mohou být markery nejrůznějších onemocnění (Vlčnovská et al., 2014).

Western blot

Western blot je důležitou technikou používanou v buněčné a molekulární biologii. Pomocí western blotu je možné identifikovat specifické proteiny ze složité směsi proteinů extrahovaných z buněk. Mezi vlastnosti metody patří separace podle velikosti proteinů, přenos na pevný podklad a označení cílového proteinu pomocí primární a sekundární protilátky k výsledné vizualizaci. Tyto výsledky se pak přenesou na membránu, kde jsou značeny proužkem pro každý protein zvlášť. Nenavázaná protilátka se vymyje a zůstane pouze protilátka navázaná. Protože se protilátky vážou pouze na sledovaný protein, měl by být viditelný pouze jeden pruh. Tloušťka pásu odpovídá množství přítomného proteinu (Mahmood et al., 2012).

LFA testy

Oblíbenost LFA testů v poslední době roste především kvůli nízkým nákladům na vývoj a výrobu a rychlosti provedení, která se pohybuje mezi 5-30 minutami pro průkaz analytu. Pomocí imunochromatografického testu lze testovat různé biologické vzorky, včetně moči, slin, potu, séra, plazmy a dalších tekutin. U těchto testů rozlišováno sendvičové a kompetitivní uspořádání. Typ uspořádání je zvolen podle toho, jestli jde o stanovení protilátky nebo antigenu a podle molekulové hmotnosti analytu (Koczula et al., 2016). Obecné schéma LFA testu představuje obrázek 3.



Obrázek 3: Imunochromatografický test (převzato a upraveno z Koczula et al., 2016)

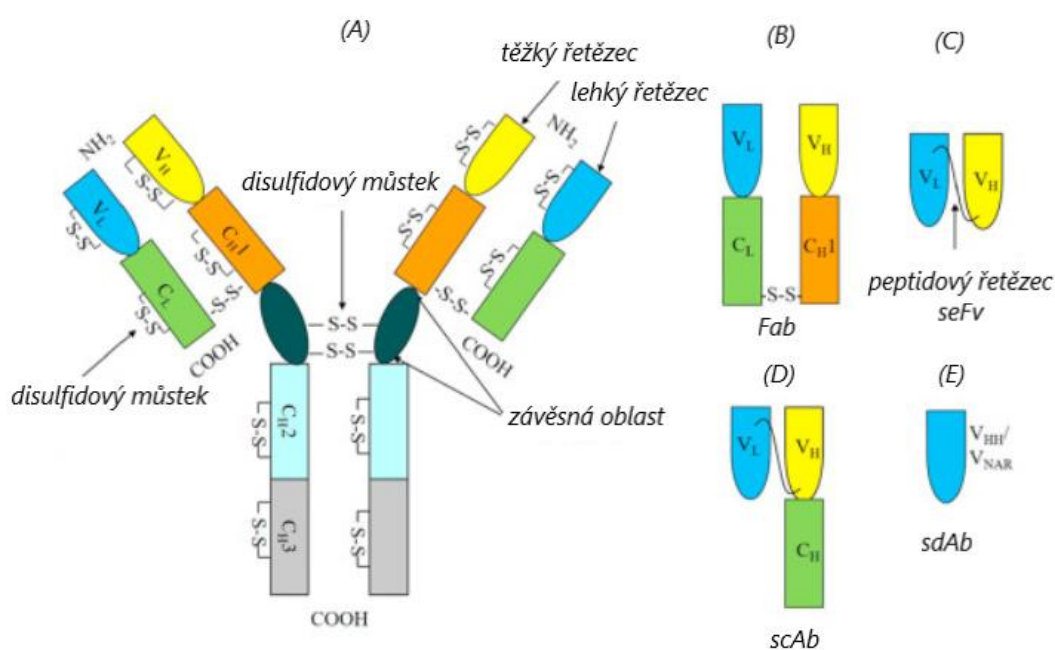
1.3.1 Látky reagující v imunochromatografickém testu

Antigen

Antigeny (Atg) jsou látky, které imunitní systém rozpozná a reaguje na ně. Nejčastějšími antigeny jsou cizorodé látky z vnějšího prostředí tzv. exoantigeny, většinou infekční mikroorganismy a jejich produkty. Antigeny pocházející ze samotného organismu, se nazývají autoantigeny. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní polysacharidy, ale také lipidy a lipoproteiny (Hořejší, Bartůňková et al., 2005). Jejich přítomnost v organismu stimuluje tvorbu protilátek, tedy navozuje imunitní odpověď. Vzhledem ke své reakci může být antigen kompletní nebo nekompletní. Jestliže se jedná o kompletní antigen, označujeme jej jako imunogen. Nekompletní antigen se nazývá haptén. Imunogeny se skládají z makromolekulárního nosiče a nízkomolekulárních determinantních skupin tzv. epitopů. Epitopy jsou tvořeny 5-8 aminokyselinami nebo monosacharidovými jednotkami (Šafarčík et al., 2006).

Protilátka

Protilátky (Ab) jsou glykoproteiny produkované vyššími organismy jako součást imunitní odpovědi. Nazýváme je imunoglobuliny, které zahrnují několik tříd: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Všechny třídy imunoglobulinů mají podobnou strukturu, skládají se ze dvou lehkých řetězců (L) a ze dvou těžkých řetězců (H), jak je znázorněno na obrázku 4. Řetězce jsou mezi sebou provázány disulfidovými vazbami. Protilátky můžeme rozlišovat na monoklonální a polyklonální. Základní IgG struktura se skládá ze dvou lehkých řetězců a dvou těžkých řetězců. Fab část sestává z úplného lehkého řetězce protilátky, spojeného s druhou doménou protilátky obsahující oblasti, variabilní oblast těžkého řetězce protilátky a konstantní domény. Variabilní oblast těžkého řetězce a konstantní doména 1 jsou spojeny disulfidovou vazbou s variabilní oblastí lehkého řetězce protilátky a konstantní oblastí lehkého řetězce protilátky. Část scFv se skládá z variabilních oblastí protilátky lehkého řetězce a těžkého řetězce, které jsou propojeny krátkým peptidovým řetězcem. Oblast scAb se skládá z úseku scFv fúzaného s konstantní doménou. Sekce sdAb se skládá z jediné monomerní variabilní protilátkové domény (Hui Ma et al., 2020).



Obrázek 4: Typy protilátek pro reakce s antigenem: IgG struktura (A), Fab část (B), část scFv (C), oblast scAb (D), sekce sdAb (E) (převzato a upraveno z Hui Ma et al., 2020)

Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky mohou být namířeny proti více epitopům, jednoho i více antigenů. Jestliže byl při imunizaci použit jeden antigen, vznikne monospecifické antisérum. Pokud bylo při imunizaci použito více antigenů, vznikne polyspecifické antisérum, obsahující imunoglobuliny proti více antigenům (Stills et al., 2012).

Výroba polyklonálních Ab začíná výběrem vhodného antigenu, nutná je jeho vysoká čistota. Přechištění lze provést pomocí elektroforézy nebo chromatograficky. Solubilní antigeny nedostatečně aktivují imunitní systém. Zvýšení afinity antigenu k buňkám imunitního systému, lze provést využitím adjuvancia. Nejvíce využívaným, a zároveň nejznámějším adjuvans, je Freundovo adjuvans. Obsahuje směs minerálních olejů, vosků a neživých bakterií. Tato směs zvyšuje imunitní reakci na podaný antigen (Šafarčík et al., 2006). Antigen bývá aplikován nejčastěji subkutánně nebo intradermálně. Po aplikaci do těla zvířete je antigen vychytáván ve spádových lymfatických uzlinách. Doba imunizace, která je potřebná k tvorbě protilátek, se pohybuje v řádech 2-6 měsíců. Během ní vzniká v krevním séru zvířete směs protilátek, proti různým antigenním determinantám použitého antigenu. Po odběru následuje přechištění a kvantifikace Ab. K tomuto procesu, lze využít specifické metody pro izolaci Ab, vůči konkrétnímu antigenu. Těmi mohou být imunoadsorpce nebo afinitní chromatografie. V případě, pokud je izolace prováděna s cílem na určitou třídu Ab, jsou využívány nescifické metody, mezi které patří ionexová elektroforéza nebo gelová chromatografie, či precipitace síranem amonným.

Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky se získávají z jednoho klonu plazmatických buněk, které jsou odvozeny od B-lymfocytů. Příprava těchto protilátek probíhá v laboratorních podmínkách, za využití hybridomové technologie. Monoklonální protilátky jsou takové protilátky, které působí proti jednomu epitopu určitého antigenu. Mají stejnou primární strukturu a stejné specifické vazebné místo (Dowd et al., 2009). Srovnání vlastností monoklonálních a polyklonálních protilátek se nachází v tabulce 1.

Tabulka 1: Srovnání vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek (převzato a upraveno z Dowd et al., 2009)

Polyklonální	Monoklonální
Snazší výroba	Náročnější výroba
Levnější	Výrazně dražší
Vyšší senzitivita	Nižší senzitivita
Nižší specifita	Vyšší specifita
Vyšší pravděpodobnost zkřížené reaktivity	Nízká pravděpodobnost zkřížené reaktivity

Aptamery

Aptamery jsou molekuly jednovláknové DNA (ssDNA) nebo jednovláknové RNA (ssRNA), které se skládají do komplexní 2D nebo 3D struktury. Vážou se na svůj cíl s vysokou afinitou a selektivitou (Miller et al., 2022). Mají několik výhod oproti protilátkám. Vynikají především vysokou stabilitou, vytváří se *in vitro* a kapacita syntézy může probíhat ve velkém měřítku (Huang et al., 2021).

1.3.2 Princip imunochromatografického testu

Principem imunochromatografického testu je chromatografická separace látek a imunokomplexů na pevné fázi, nasycené kapalinou. Funkci pevné fáze zastává nitrocelulósová membrána. Vzorek, jímž může být například sérum, obsahující hledaný antigen, který má být detekován, nadávkuje se na vzorkovací podložku. Tekutina začne vzlínat a vzorek migruje do konjugované podložky. Konjugovaná podložka obsahuje konjugované protilátky, namířené proti určitému antigenu. Tyto protilátky mohou být konjugovány pomocí značky např. koloidními částicemi zlata, která je navázaná na jednu ze spolu reagujících složek (Daussant et al., 2007).

1.3.3 Uspořádání imunochromatografického testu

Lze rozlišit dva základní typy uspořádání testů – sendvičové a kompetitivní. Sendvičové uspořádání je vhodné pro vysokomolekulární látky, nebo pro látky s různým počtem antigenních determinant. Tento typ uspořádání využívá dvě různé protilátky se specifitou proti antigenu, umístěným v konjugační části testu. Kompetitivní uspořádání je naopak vhodné pro

vyšetřování nízkomolekulárních látek ve vzorku, nebo pro látky s jedním typem epitopu na povrchu molekuly (Jaisankar et al., 2022). Příklady analytů stanovovaných LFA testy v sendvičovém nebo kompetitivním uspořádání jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Příklady stanovovaných analytů LFA testy

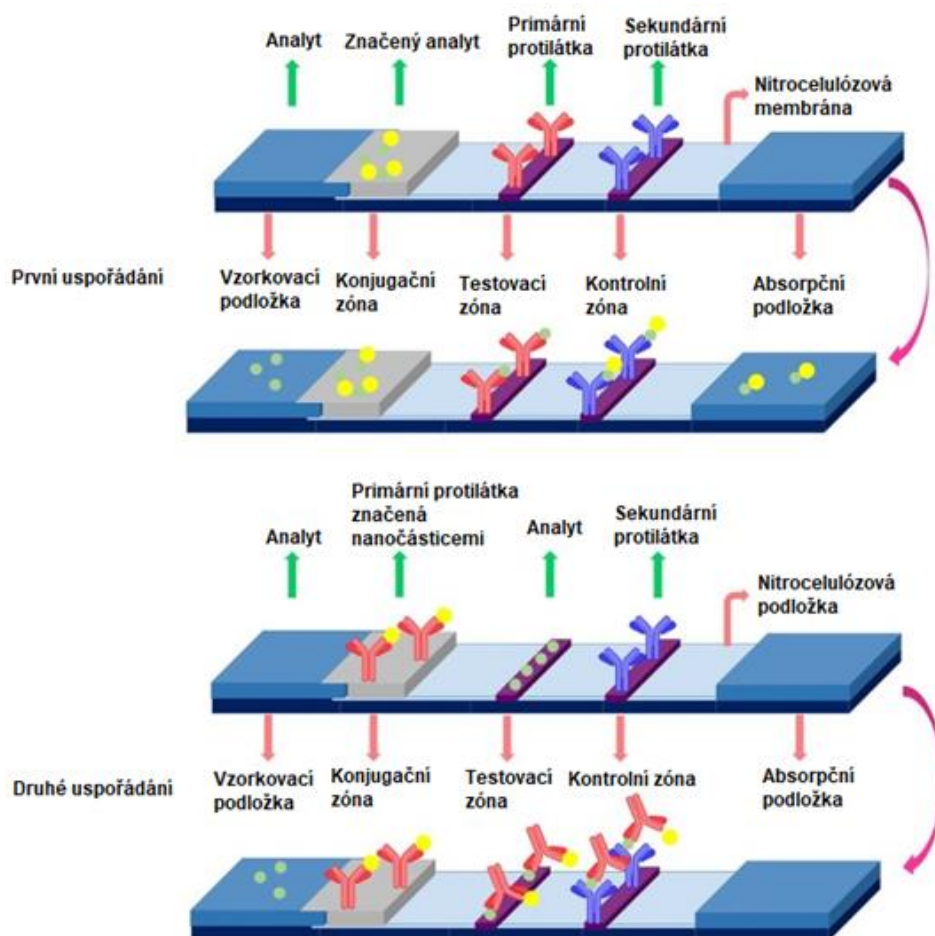
Analyt	Biorozpoznávací prvek	Uspořádání	Detekční limit	Čas analýzy (min)	Zdroj
Troponin I	Ab	sendvičové	0,1 ng/ml	10	(Choi et al., 2010)
Virus chřipky A	Ab	sendvičové	102 kopií	10	(Kim et al., 2014)
<i>E. coli</i> O157:H7	aptamer	sendvičové	10 CFU/ml	5	(Wu et al., 2015)
CRP	Ab	sendvičové	0,67 ng/ml	10	(Oh et al., 2014)
Lidské IgG	Ab	sendvičové	200 pg/ml	15	(Parolo et al., 2013)
Ofloxacin	Ab	kompetitivní	30 ng/ml	10	(Byzova et al., 2014)
PSA	Ab	sendvičové	0,1 ng/ml	20	(Rodríguez et al., 2016)
Estradiol	Ab	kompetitivní	37,14 pg/ml	8	(Yang et al., 2015)

Kompetitivní uspořádání

Kompetitivní uspořádání nachází uplatnění při testování analytů s nižší molekulovou hmotností. V zóně pro konjugát se v případě prvního uspořádání nachází standardní označený antigen. Tento antigen, soutěží se značeným analytem obsaženým v kapalném vzorku, o vazebná místa na primárních protilátkách umístěných v testovací zóně testu, jak je znázorněno na obrázku 5 v prvním uspořádání. Sekundární protilátky ukotvené v kontrolní linii, vytváří

komplex pouze se značeným antigenem. Jestliže je stanovovaný vzorek pozitivní, tudíž obsahuje hledaný antigen, vytvoří se barevný proužek jen v kontrolní linii. Pokud je vzorek negativní, objeví se zbarvení v kontrolní i testovací zóně proužku (Jaisankar et al., 2022).

U druhého typu uspořádání kompetitivního testu, jsou v místě nanášení vzorku, přítomny značené Ab, které mají specifitu proti prokazovanému analytu. Pokud je ve vyšetřovaném analytu antigen, a jedná se tedy o pozitivní vzorek, vytvoří s Ab imunokomplexy, které se dále pohybují do testovací zóny s fixovaným standardním antigenem. Jestliže je veškeré množství značených Ab vyvázáno s Atg ze vzorku v imunokomplexech, Ab se nemohou zachytit v žádné testovací zóně. V testovací zóně se neobjeví okem viditelná linie a to znamená, že vzorek byl pozitivní. Imunokomplexy jsou unášeny proudem kapaliny, dále membránou a prochází kontrolní zónou, kde je fixována anti-IgG protilátka. Zde se procházející imunokomplexy naváží na tuto sekundární protilátku a vznikne barevná linie. Vzniklý proužek znamená, že test byl proveden správně a výsledek je validní (Daussant et al., 2014).

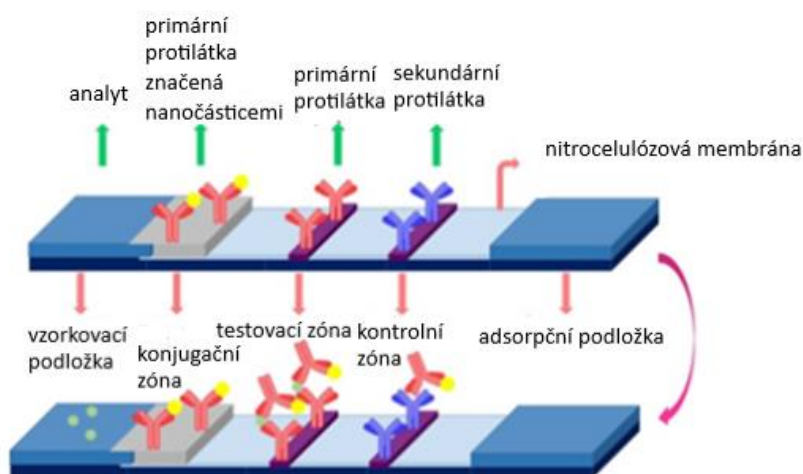


Obrázek 5: Kompetitivní uspořádání imunochromatografického testu (převzato a upraveno z Behadir et al., 2016)

Sendvičové uspořádání

V případě sendvičového uspořádání imunochromatografického testu používáme dvě sady protilátek. Metoda je hojně využívána k detekci antigenů s velkou molekulovou hmotností, které mají více antigenních determinant (Bahandir et al., 2016). Takto můžeme stanovit např. analyt hCG, což je lidský choriový gonadotropin, poukazující na časné stádium těhotenství. Molekulová hmotnost hCG se pohybuje okolo 36 000 M (LA Cole et al., 2010).

Tento systém používá dvě různé protilátky se specifitou proti antigenu, který se nachází v konjugační zóně, toto je patrné z obrázku 6. V případě pozitivního vzorku, Ab vytváří s Atg imunokomplexy, které jsou unášeny vztlínající se kapalinou dále. V testovací zóně jsou antigeny v imunokomplexu zachyceny na proužku fixovaných Ab, také se specifitou proti Atg. Vyvázáním imunokomplexu v testovací zóně se značka, př. nanočástice s navázaným koloidním zlatem, nesená konjugovanou protilátkou, zakoncentruje a v zóně vznikne viditelný červený proužek. Proužek v testovací zóně vypovídá o pozitivním výsledku. Přebytný imunokomplex se pohybuje dál do kontrolní zóny, a zde je zachycen na proužku fixovaných anti-IgG Ab. Proužek v kontrolní zóně dokazuje, že test byl proveden správně a je validní (Horlock et al., 2023). Sendvičové uspořádání LFA testu představuje obrázek 6.



Obrázek 6: Sendvičové uspořádání imunochromatografického testu (převzato a upraveno z Bahandir et al., 2016)

1.3.4 Jednotlivé součásti imunochromatografického testu

Laterální průtokový imunochromatografický test, je rychlá diagnostická technologie, vyvinutá z ELISA testu. Mezi její přednosti řadíme, jednoduché provedení testu, nízkou cenu a krátkou dobu detekce. Testovací proužek LFA obsahuje tyto součásti: vzorkovací podložku,

konjugační zónu, testovací a kontrolní část, nitrocelulóзовou membránu, absorpční podložku a pomocnou zadní vrstvu (Guo et al., 2021).

Vzorkovací podložka

Vzorkovací podložka slouží pro aplikaci vzorku. Podložka může být vyrobena z celulózy nebo skleněných vláken. Vzorek se nanáší pomocí kapátka na tuto podložku. Funkcí podložky je transport vzorku k dalším součástem testovacího proužku. Podložka by měla být schopna vzorek přepravit kontinuálním a homogenním způsobem (Sajid et al., 2015). Důležitou rolí vzorkovací podložky je rovnoměrné rozložení vzorku a jeho nasměrování na konjugační zónu. Podložka je obvykle impregnována pufovacími solemi, proteiny a povrchově aktivními látkami, aby byla řízena rychlost průtoku vzorku a vzorek byl vhodný pro interakci s detekčním systémem (Koczula et al., 2016). Aplikací podložky mohou být navrženy i k předúpravě vzorku před jeho přepravou. Tato předúprava může zahrnovat úpravu pH vzorku, odstranění interferujících částí nebo separaci složek vzorku (Sajid et al., 2015).

Konjugační zóna

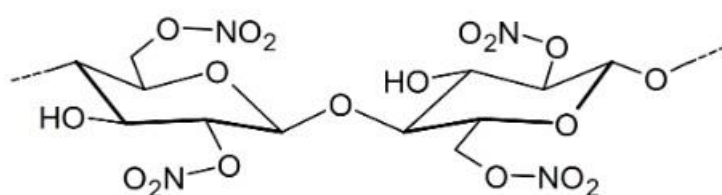
Obsahuje protilátky pro cílový analyt konjugované s barevnými částicemi. Nejčastěji se jedná o částice koloidního zlata nebo latexové mikrokuličky. Konjugační zóna je místem, kde jsou distribuovány značené biorozpoznávací molekuly. Podložka by měla při kontaktu s pohybujícím se vzorkem, uvolnit označený konjugát. Označený konjugát by měl zůstat stabilní po celou dobu životnosti proužku (Sajid et al., 2015).

Membrána

Membrána vyrobená ve většině běžných LFA testů z nitrocelulózy je největší podložkou v diagnostickém proužku testu. Významně ovlivňuje citlivost testů. Testovací a kontrolní linie jsou obvykle umístěny na této membráně. Hlavní funkcí membrány je poskytovat podporu a vazbu pro záchytné sondy během průtoku vzorku a detekčního konjugátu přes membránu do reakční zóny. K dosažení takového cíle, musí mít membrána stejnoměrně vysokou absorpční kapacitu, určitou pórovitost a vlhkost, pro zajištění kapilárního toku kapalných vzorků (Zhao et al., 2018).

Nitrocelulóza (NC) je vyráběna částečnou nitrací celulózy její chemická struktura je patrná z obrázku 7. Proces nitrace posiluje porézní vlastnosti celulózy a mění tak celulózu z hydrofilní na hydrofobní materiál. Může být zvlákněna z roztoku, který obsahuje určité

procento nitrocelulózy, aceton a N,N-dimethylacetamid (Wang et al., 2020). Nitrocelulózkové membrány jsou porézní. Pórovitost je jednou z klíčových vlastností v LFA testech. Významně ovlivňuje rychlost kapilárního průtoku (Hu et al., 2014). Větší průměr pórů je výhodný pro dodání většího množství reaktantu do testovací linie pro vazebnou interakci na testovací linii, zatímco menší průměr pórů sníží celkovou akumulaci reaktantu. Nitrocelulóza má vazebnou kapacitu pro proteiny 80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Molekuly proteinů se váží na nitrocelulózkové membrány prostřednictvím hydrofobních interakcí. Vodíkové vazby jsou tvořeny mezi nitroskupinami membrány a aminokyselinovými postranními řetězci proteinů. Nitrocelulózková membrána je vhodná pro detekci proteinů s nižší molekulovou hmotností (Baker et al., 2014).



Obrázek 7: Chemická struktura nitrocelulózy (převzato z Polymer Database)

Parametr kapilárního průtoku je nezbytné vzít v potaz při výběru membrány. Rychlejší průtok, ale nižší vazebnou kapacitu pro protein mají membrány s větší velikostí pórů. Naopak pomalejší průtok, umožňuje delší inkubační dobu mezi záchytným činidlem, cílovým analytem, značkou detektoru a signálem. Cílový analyt se nepřetržitě dynamicky pohybuje membránou, a je zde jen krátká doba, aby se složky na sebe navzájem navázaly. Pomalejší průtok může mít tedy efektivnější cílovou koncentraci, což má za následek vyšší citlivost testu. U neřaděných vzorků, jako jsou např. plná krev či sliny, je prospěšnější využít membrány s rychlejším průtokem a větší velikostí pórů (Soh et al., 2020).

Testovací linie (T) a kontrolní linie (C)

Membrány jsou ošetřeny povrchově aktivními látkami před aplikací bioreceptorů (protilátky, značené protilátky) linie T a C (Mansfield et al., 2005). Je-li rychlost kapilárního průtoku vyšší, množství kapaliny dávkované na membránu je rovněž vyšší, což vede ke vzniku širší pruhové linie. Pro dosažení efektivních výsledků, by měla být linka užší. V sendvičových LFA mohou být koncentrace bioreceptorů vyšší než 1 mg/ml, zatímco u kompetitivního uspořádání LFA se koncentrace pohybují okolo 0,1-1 mg/ml. Linie C je vždy umístěna za linií T ve vzdálenosti 4 mm, aby byla zajištěna platnost testu (Jaisankar et al., 2022).

Pomocná zadní vrstva

Všechny jednotlivé součásti testu jsou upevněny v nosné destičce. Používá se jako podpora pro lepší manipulaci a odečítání výsledků.

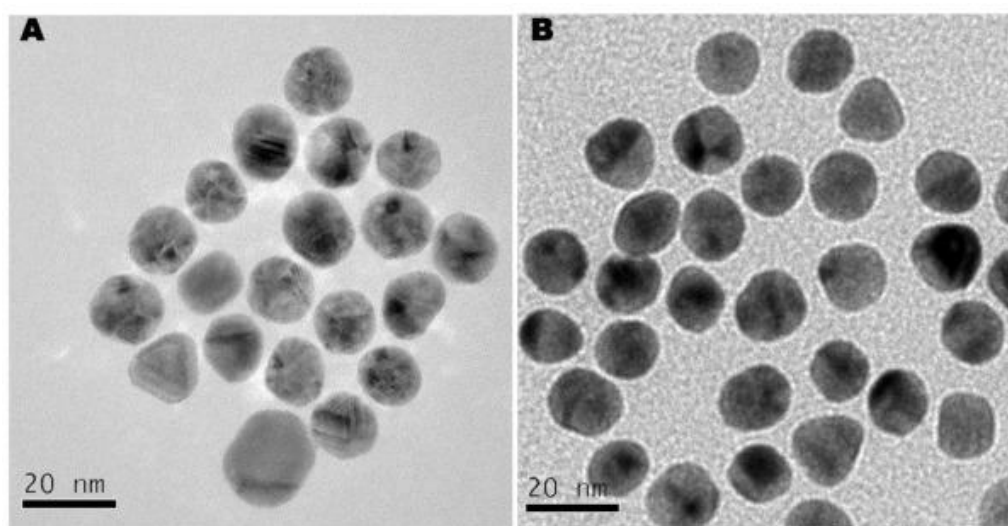
Adsorpční podložka

Adsorpční podložka napomáhá udržovat průtok kapaliny přes membránu a zastavuje zpětný tok vzorku. Funguje jako zásobník odpadu na konci proužku.

Značky

Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice (AuNP) s průměrnou velikostí 1 až 100 nm, o velikosti 20 nm, které představuje obrázek 8, jsou nejvíce používány pro značení protilátek nebo aptamerů v LFA testech. Jejich předností je vynikající chemická stabilita, snadná modifikace, a především možnost okometrické detekce (Zhao et al., 2018). Zlaté nanočástice lze vyrobit v laboratorních podmínkách redukcí kyseliny chlorzlatité (Khan et al., 2014). Ve srovnání s nanočásticemi oxidů kovů jsou netoxické pro buňky, což potvrdilo více *in vitro* studií (Li et al., 2014).



Obrázek 8: TEM obrazy AuNP (A) a AuNP potažené Streptavidinem (B) (Fu et al., 2021)

Kvantové tečky

Popularita kvantových teček (QD) je do značné míry těžší z rozvoje nanotechnologií. Jde o fluorescenční značky mikroskopických preparátů, lze jimi odlišit i různé buněčné

struktury (Giemans et al., 2006). Komerční dostupnost kvantových teček je zatím poměrně omezená. Jejich hlavní přínos očekáváme u multianalytových formátů stanovení (Hlaváček et al., 2011). Povrch kvantových teček obsahuje karboxylové nebo aminové skupiny, aby vytvořily konjugáty s proteiny, musí být aktivovány vhodnými činidly, jako je např. karbodiimid (Bahadir et al., 2016).

Uhlíkové nanočástice

Uhlíkové nanočástice (CNP), také nazývané koloidní uhlík nebo saze, patří mezi barevné částicové markery, které lze vizuálně detekovat kvalitativním nebo semikvantitativním způsobem. Mezi přednosti využití uhlíkových nanočástic řadíme snadnou přípravu, vysokou stabilitu a netoxičnost (Posthuma-Trumpie et al., 2012).

Lanthanoid

Chelátové značky s lanthanoidy, mezi které patří Eu (III), Tb (III), Sm (III) a Dy (III), byly využity v LFA testech pro zvýšení detekčního limitu. Principem testu byla fluorescenční reakce. V porovnání s AuNP jsou tyto molekuly přibližně stejně velké. Výhodou je dlouhá životnost jejich fluorescence, nízké emisní spektrum a dobrá fotostabilita (Sadeghi et al., 2021).

Lipozomy

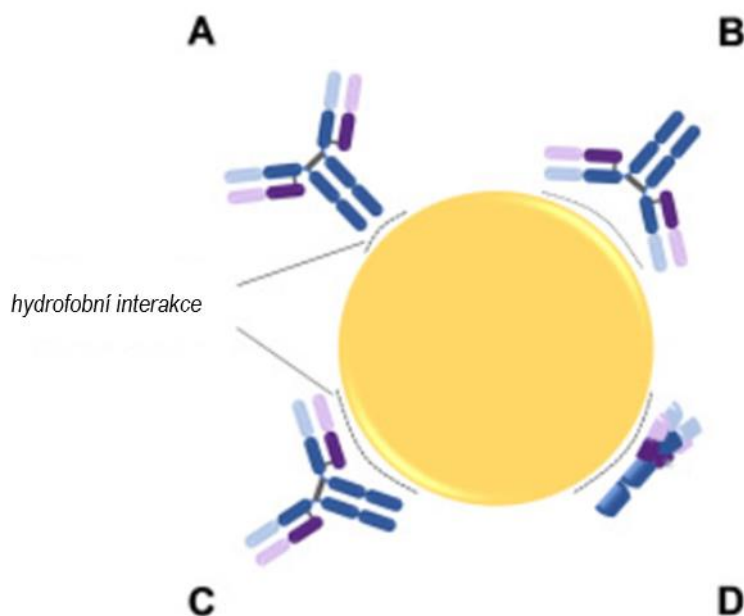
Lipozomy mají kulovitý tvar, jedná se o umělá vezikula složená z jedné nebo více fosfolipidových dvojvrstev. Vlastnosti lipozomů se liší, záleží na složení lipidů, povrchovém náboji, jejich velikosti a zvolené metodě jejich přípravy. Pro vývoj lipozomové značky je uvnitř dutin této částice zachycen červený marker barviva sulforhodaminu B. Lipozom je schopen zapouzdřit molekuly barviva (Sadeghi et al., 2021).

1.4 Způsoby vazby protilátek a proteinů na nanomateriály

Biomolekuly interagující s povrchy nanomateriálů mají mnoho různých vazebných míst. Interagovat mohou prostřednictvím specifické nebo nespecifické adsorpce (Arsalan et al., 2018). Imobilizační mechanismy mohou být rozděleny na kovalentní vazby, nekovalentní vazby, vazby ligant-receptor. Mezi nekovalentní interakce patří fyzikální adsorpce, kovalentní vazby, kam můžeme zařadit např. připojení NF pomocí aminových skupin. Příkladem poslední zmíněné skupiny vazeb ligant-receptor může být interakce streptavidinu s biotinem (Auria-Soro et al., 2019).

1.4.1 Fyzikální adsorpce

Procesu adsorpce biomolekul na povrch nanomateriálu se účastní Van der Waalovy síly, vodíkové vazby, elektrostatické, hydrofobní a solvatační interakce (Auria-Soro et al., 2019). Je považována za nejjednodušší způsob imobilizace biomolekul. Výhody této metody spočívají v tom, že nepoužívá činidla a je nedestruktivní povahy. Nepoškozuje ani nanovlákná ani biomolekuly. Jelikož jsou biomolekuly spojeny s povrchem nanomateriálu pouze slabými interakcemi, mohou být snadno desorbovány (Wang et al., 2009). Hlavní faktor ovlivňující vazbu antigen-protilátka souvisí s hustotou shlukování povrchu. Kromě náhodné orientace a nízké hustoty vazby je nevýhodou především nízká pevnost vazby (Lu et al., 2006). Fyzikálně adsorbované proteiny mohou být v průběhu testu odstraněny promývacími detergenty nebo některými pufrů. Výhodu můžeme sledovat v univerzálnosti metody a skutečnosti, že není nutné chemicky modifikovat Ab ani aktivovat funkční skupiny NF (Torcello-Gomez et al., 2011). Na obrázku 9 lze vidět čtyři různé orientace proteinu na povrch nanočástic. Připojení protilátky k nanočástici Fc částí (A), Fab částí (B), „boční stranou“ pomocí jedné Fc a jedné Fab části (C), nebo způsobem, kdy všechny tři fragmenty „leží“ (D), což umožňuje zachování funkčnosti protilátky (Montenegro et al., 2013).



Obrázek 9: Fyzikální adsorpce protilátek na nanočástici: Fc částí (A), Fab částí (B), „boční stranou“ (C) a „vleže“, kde všechny tři fragmenty „leží“ (D). (upraveno dle Marques et al., 2020; Montenegro et al., 2013)

1.4.2 Iontová adsorpce

Iontová adsorpce je vícebodový proces. Rychlost jejího průběhu závisí na počtu nabitých skupin přítomných na povrchu Ab. Molekula Ab je asymetrická a oblast s největším počtem nábojů se nachází v orientaci na plochu, ve které místa rozpoznávající antigen zůstávají blízko povrchu NF. Tímto způsobem je zachována schopnost vázat Atg (Montenegro et al., 2013). Iontová adsorpce je závislá na hodnotě pH a iontové síle použitého pufru. Nevýhodou může být nespecifická adsorpce matricových proteinů (Voort et al., 2004).

1.4.3 Vazba (strept)avidin-biotin a avidin-biotin

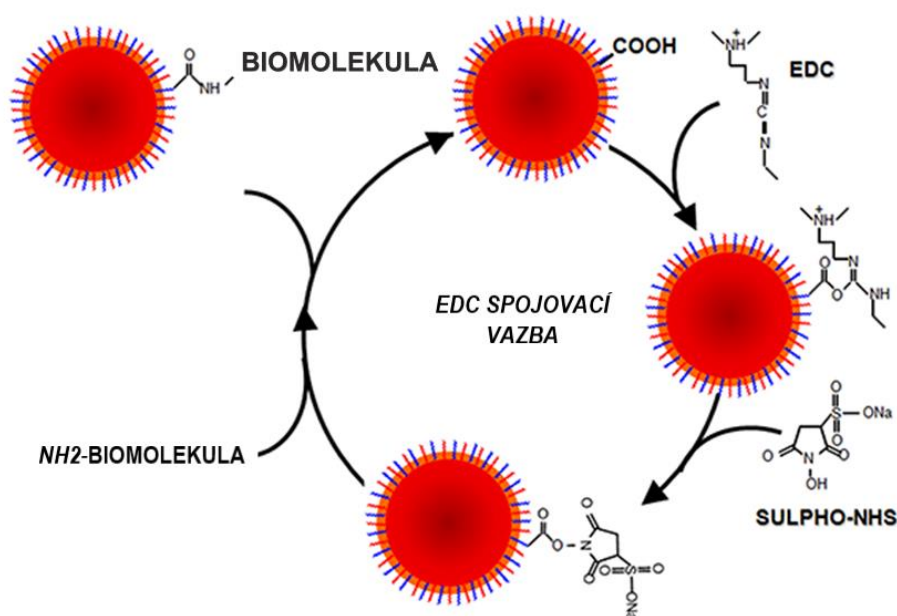
Bioafinitní imobilizační reakce je založena na specifické vazbě biotinu na avidin a streptavidin. Jedná se o nejsilnější nekovalentní vazbu. Nevýhodou použití vazby biotin-streptavidin může být jeho sklon k tvorbě nespecifické vazby s jinými sloučeninami, kvůli jeho vysokému obsahu sacharidů a vysokému izoelektrickému bodu (Smith et al., 2008). Avidin je glykoprotein obsahující čtyři identické podjednotky. Každá z podjednotek obsahuje jedno vazebné místo pro biotin. Tento protein má vysoce bazickou povahu. Jeho struktura je odolná vůči denaturaci i extrémním podmínkám. Rozdíl mezi streptavidinem a avidinem se nachází, mimo jiné, v bakteriálním původu streptavidinu. Pochází z bakterie *Streptomyces avidinii*. Dalším rozdílem je hodnota izoelektrického bodu. U avidinu se pohybuje mezi 5-6, zatímco u streptavidinu dosahuje hodnoty 10. Výhodou streptavidinu je nižší možnost vzniku nespecifických vazebných interakcí. Jelikož se nejedná o glykoprotein, nemůže se vázat na volné sacharidové receptory (Hermanson et al., 2013).

1.4.4 Kovalentní vazby

Mezi funkční skupiny cílené pro biokonjugaci patří primární aminy, sulfhydryly, karbonyly, sacharidy a karboxylové kyseliny. Nejběžnějšími způsoby kovalentního připojení proteinů k povrchům zajišťuje použití aminových skupin lysinových zbytků, karboxylové skupiny kyseliny asparagové a glutamové či thiolových skupin cysteinových zbytků (Gubala et al., 2012). Při imobilizaci vznikají stabilní komplexy mezi funkčními skupinami substrátu a funkčními skupinami biomolekuly. Mezi funkční skupiny, které se mohou zúčastnit reakce patří: amino, karboxylová, thiolová, imidazolová, indolová a hydroxylová skupina. Proces vazby biomolekuly na NF substrát může probíhat dvěma způsoby. Prvním z nich je přímá reakce na substrát. Druhou možností je aktivace povrchu pomocí síťovacích činidel (Smith et al., 2020).

1.4.5 Karbodiimidová vazebná interakce

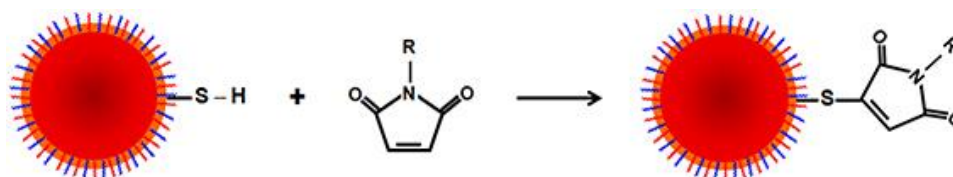
Vazba je využívána k párování karboxylových skupin s primárními aminy. Jako síťovací činidlo je používáno 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid (EDC). V přítomnosti N-hydroxysulfosukcinimidu (Sulfo-NHS) lze EDC využít k přeměně karboxylové skupiny na amin-reaktivní ester sulfo-NHS. Po přidání Sulfo-NHS dojde ke stabilizaci amin-reaktivního meziprojektu tím, že jej přemění na amin-reaktivní ester Sulfo-NHS, čímž se zvýší účinnost vazebných reakcí zprostředkovaných pomocí EDC (Conde et al., 2014). Graficky je vazebná interakce znázorněna na obrázku 10.



Obrázek 10: Karbodiimidová vazebná interakce (Margues et al., 2020)

1.4.6 Maleinimidová kopulační reakce

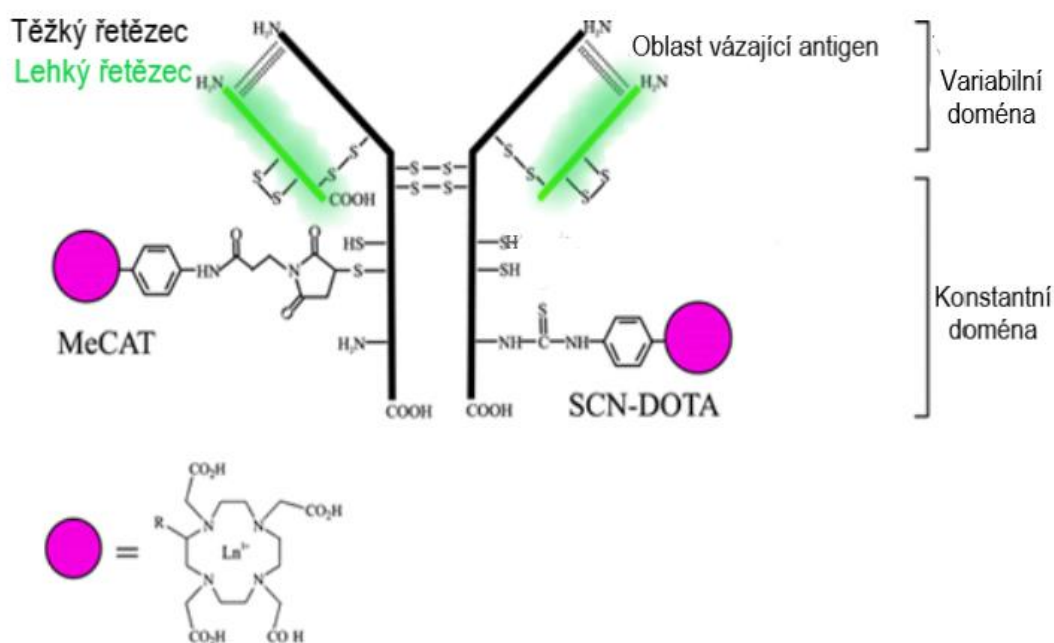
Maleinimid reaguje s volnou sulfhydrylovou skupinou a vytváří s ní stabilní thioetherovou vazbu při fyziologickém pH. Tento typ vazebné reakce je užitečný pro biokonjugaci proteinů s –SH skupinou a pro připojení dvou thiolů za vzniku disulfidové vazby, jak je zobrazeno na obrázku 11.



Obrázek 11: Schéma maleinimidové kopulační reakce (Margues et al., 2020)

1.4.7 Metoda MeCAT

Tato metoda je založená na konjugaci protilátek s cheláty lanthanoidů. Využívá maleinimidový linker, který se kovalentně naváže na sulfhydrylové zbytky po částečné redukci disulfidových můstků protilátky cysteinu. Důležité je snížit počet disulfidových můstků Ab, aby se vytvořila reakční místa pro maleimidovou skupinu, aniž by došlo k ovlivnění vazebné schopnosti protilátky (Waentiget al., 2012). Na obrázku 12 se SCN-DOTA kovalentně váže na aminoskupiny lyzinových zbytků při alkalickém pH. Pro navázání Ab nejsou zapotřebí předchozí redukční úpravy, ale pro navázání na Ab jsou nutné dlouhé reakční doby (Waentig et al., 2009).



Obrázek 12: Schéma MeCAT metody (upraveno dle Waentig et al., 2012)

2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo připravit bioaktivní nosič z nanovláknenných membrán např. PVDF, acetylcelulózy, polyamidu a chitosanu, s využitím pro oblast imunochromatografických testů. Jako modelový antigen bylo naplánováno využít protein ovalbumin. Pro navázání proteinu na nanovláknenné membrány byly využity metoda adsorpce a karbodiimidová metoda. Dílčím cílem bylo také ověřit míru vazby/navázání modelového proteinu microBCA testem v případě adsorpce a SDS PAGE elektroforézou v případě karbodiimidové vazby. Pro imunochemické ověření bioaktivního nosiče byla zvolena metoda dot blot. Závěrem byly dosažené výsledky materiálů srovnány mezi sebou. Práce probíhala ve spolupráci s firmou Elmarco s.r.o. Liberec, která vyrobila a dodala nanovláknna.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

- analytické váhy Kern ABT-2205DM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA USA)
- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS + Systém s Image Lab softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- fotografovací stanice G: BOX se softwarem GeneTools from SynGene (SynGene, Cambridge, Velká Británie)
- magnetické míchadlo Big Squid (IKA-WERKE, Německo)
- magnetické míchadlo LAVAT MM4 (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika)
- rotátor Biosan Bio-RS-24 (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- pH metr model Orion 420 A (Orion Pacific Pty Ltd, Denistone East, Austrálie)
- stanice pro produkci deionizované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- spektrofotometr Labsystems Multiscan RC (Labsystems Diagnostics Oy, Helsinki Vantaa, Finsko)
- termostat INCU-Line (VWR International Ltd, Lutterworth, Leicestershire, Velká Británie)
- aparatura dot blot Hybridization Manifold 96 unit (Scie-Plas Ltd., Cambridge, Velká Británie)
- membránová vakuová pumpa a kompresor model 22AN (KNF Neuberger, Inc., Tereton, NJ USA)
- orbitální třepačka Grant Bio PMS 1000 Microplate Shaker (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)

3.2 Laboratorní pomůcky

- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, odměrné nádoby), mikrozkuhavky Eppendorf, plastové pinzety, pipety Eppendorf a Biohit, mikrotitrační destičky
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)

- PVDF membrány Immun-Blot™ 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Mini-PROTEAN® podložní skla 0,75 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Mini-PROTEAN® krycí skla Short Plates (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- plastová kolona Bio-Spin objem 1,2 ml (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Affi-Gel Protein A Gel pro tvorbu nosiče v koloně (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

3.3 Použité chemikálie

- akrylamid (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- TRIS: Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- SDS: Dodecylsulfát sodný (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- persíran amonný (Lachema a.s., Brno, Česká republika)
- TEMED: N, N, N, N-tetramethylenethyldiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- chlorid draselný (Penta, Chrudim, Česká republika)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- dodekahydrát dydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- metanol (Penta, Chrudim ČR)
- detekční roztok Opti-4CNTM Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 36% chlorid sodný (Penta, Chrudim, Česká republika)

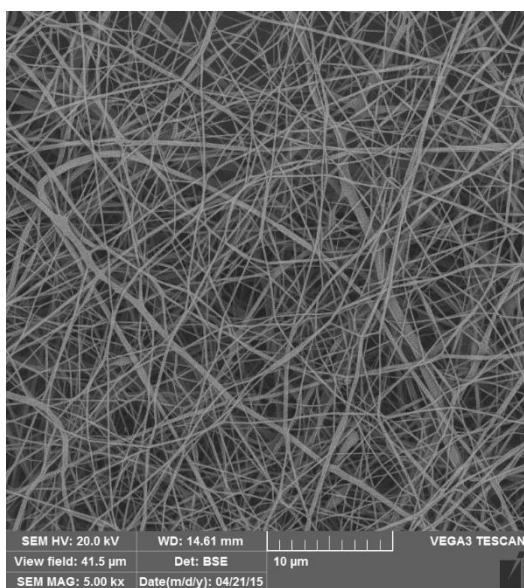
3.4 Použité protilátky a antigeny

- ovalbumin – albumin z vaječných bílků (cas: 90006-59-1 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hovězí sérový albumin, frakce V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- králičí anti-ovalbumin (cas: ABS818Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- anti-králičí IgG/HRP (cas: A 8275 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.5 Testovaná nanovláknna

Chitosanová nanovláknna (Nanovia s.r.o.)

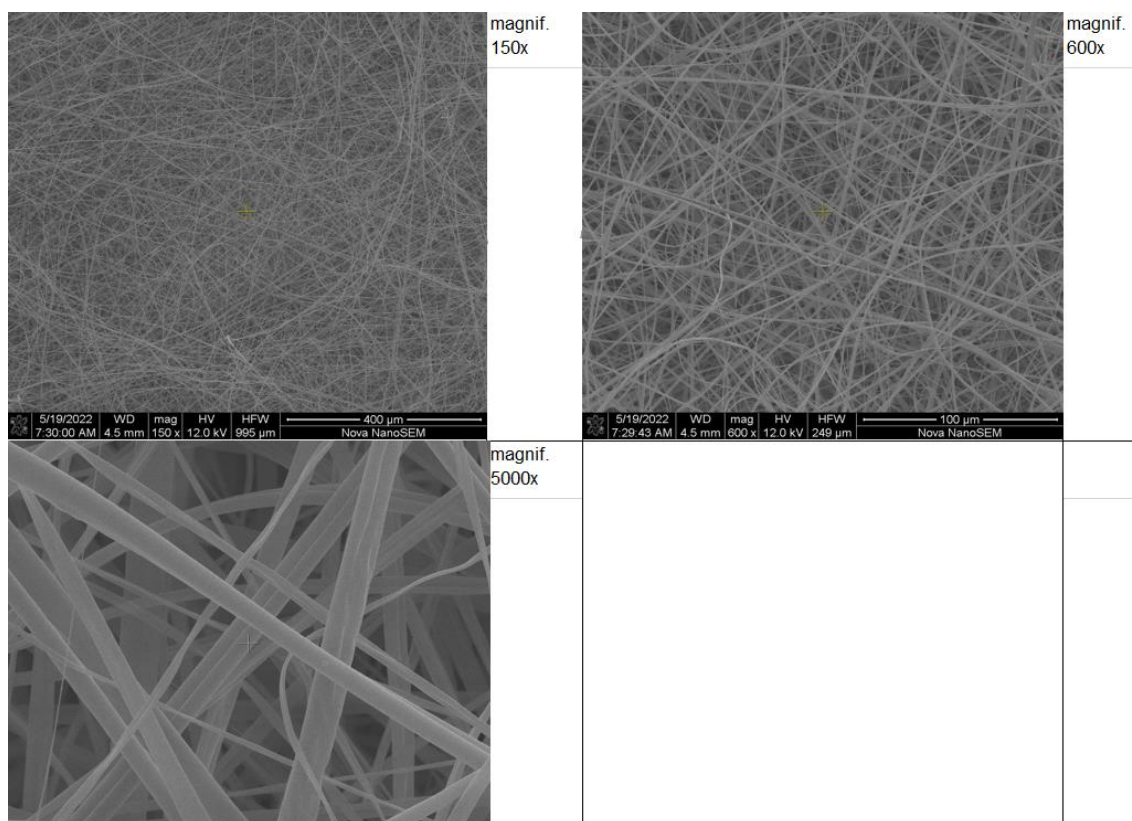
- datum přípravy: 2013
- plošná hmotnost vzorku: 20 g/m²
- podkladový materiál: Spun-bond z polypropylenu (30 g/m²) (Pegas nonwovens, Znojmo)
- SEM analýza je zobrazena na obrázku 13



Obrázek 13: Vlákna chitosanu, elektronová mikroskopie (SEM MAG), zvětšeno 5000x

Acetylcelulózová nanovlákna (Elmarco s.r.o. Liberec)

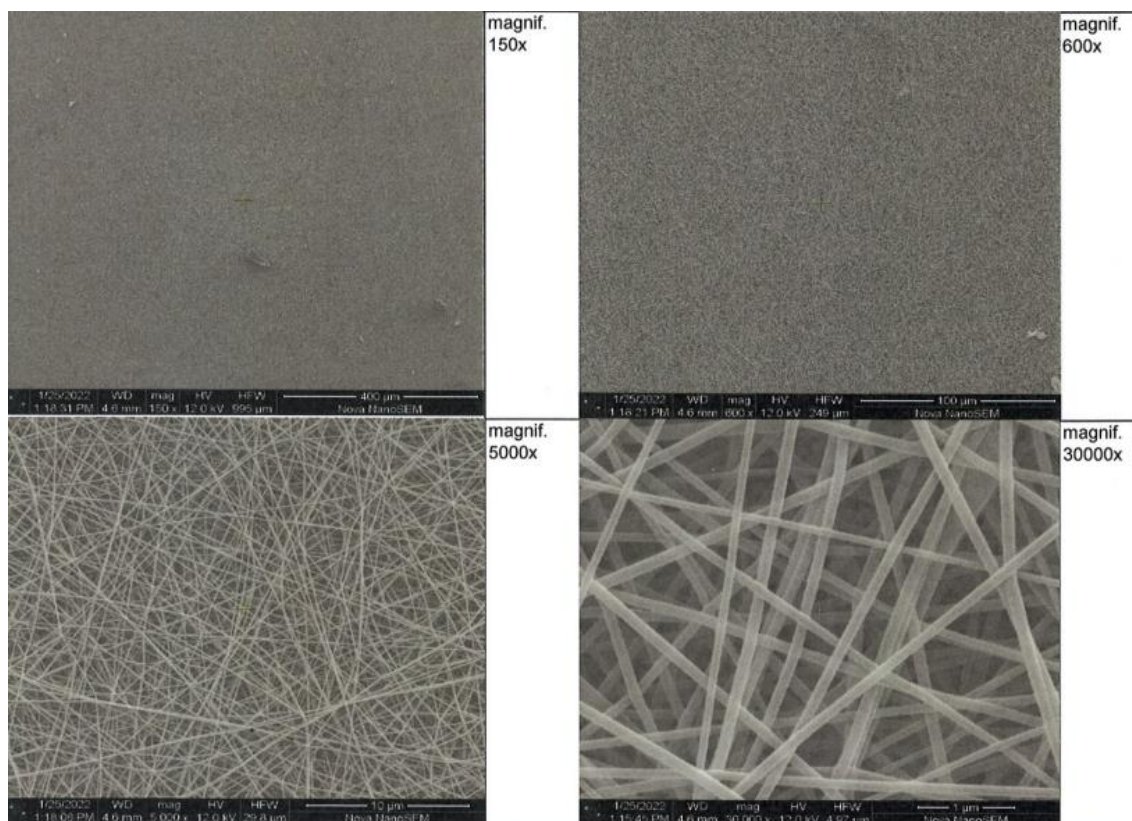
- datum přípravy: 5/2022
- plošná hmotnost vzorku: 11,34 g/m²
- průměr vláken: 738 ±473 nm
- podkladový materiál: pečící papír (80 g/m²) (Branopac, Veselí nad Moravou)
- SEM analýza je patrná z obrázku 14



Obrázek 14: Vlákna acetylcelulózy, elektronová mikroskopie (SEM FEI Nova NanoSEM 230), zvětšeno 150x, 600x, 5000x

Polyamidová nanovláknna PA6 (B24) (Elmarco s.r.o. Liberec)

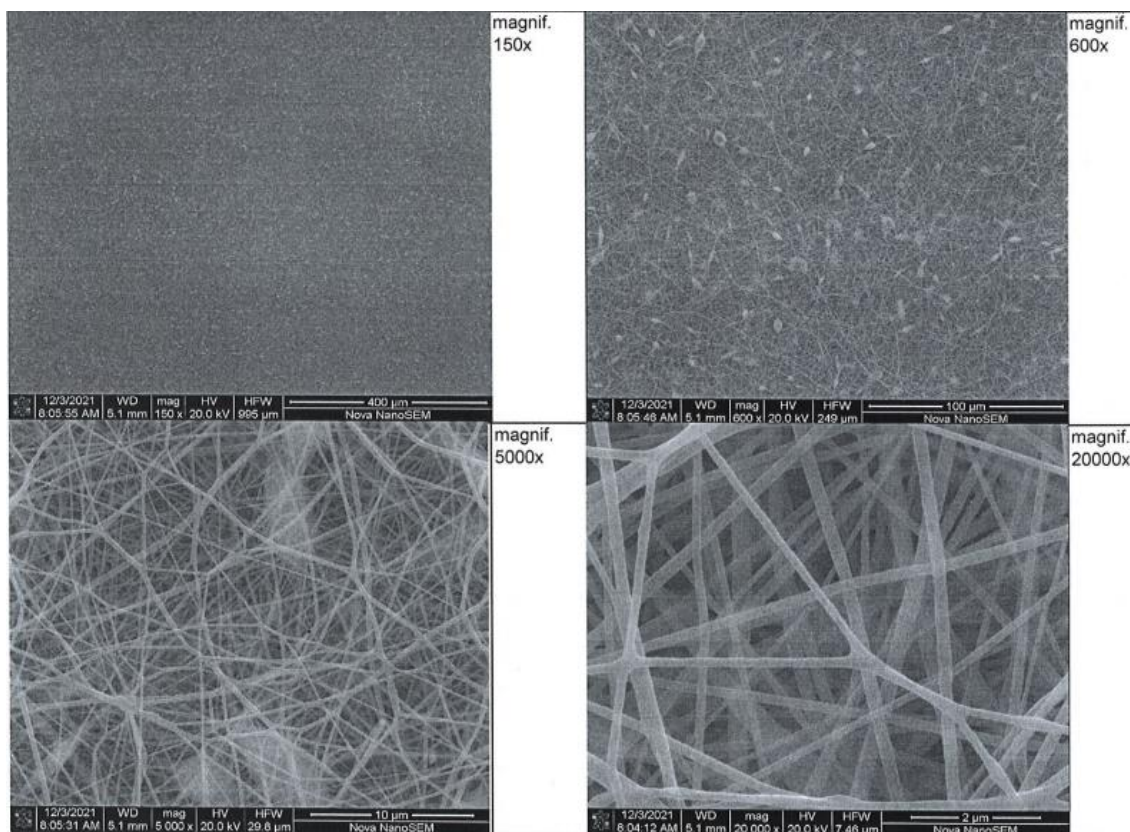
- datum přípravy: 3/2021
- plošná hmotnost vzorku: 9,91 g/m²
- průměr vláken: 103 ±17,9 nm
- podkladový materiál: pečící papír (80 g/m²) (Branopac, Veselí nad Moravou)
- SEM analýza je patrná z obrázku 15



Obrázek 15: Vlákna polyamidu PA6, elektronová mikroskopie (SEM FEI Nova NanoSEM 230), zvětšeno 150x, 600x, 30000x

PVDF nanovlákna PVDF (KynarFlex 2800) (Elmarco s.r.o. Liberec)

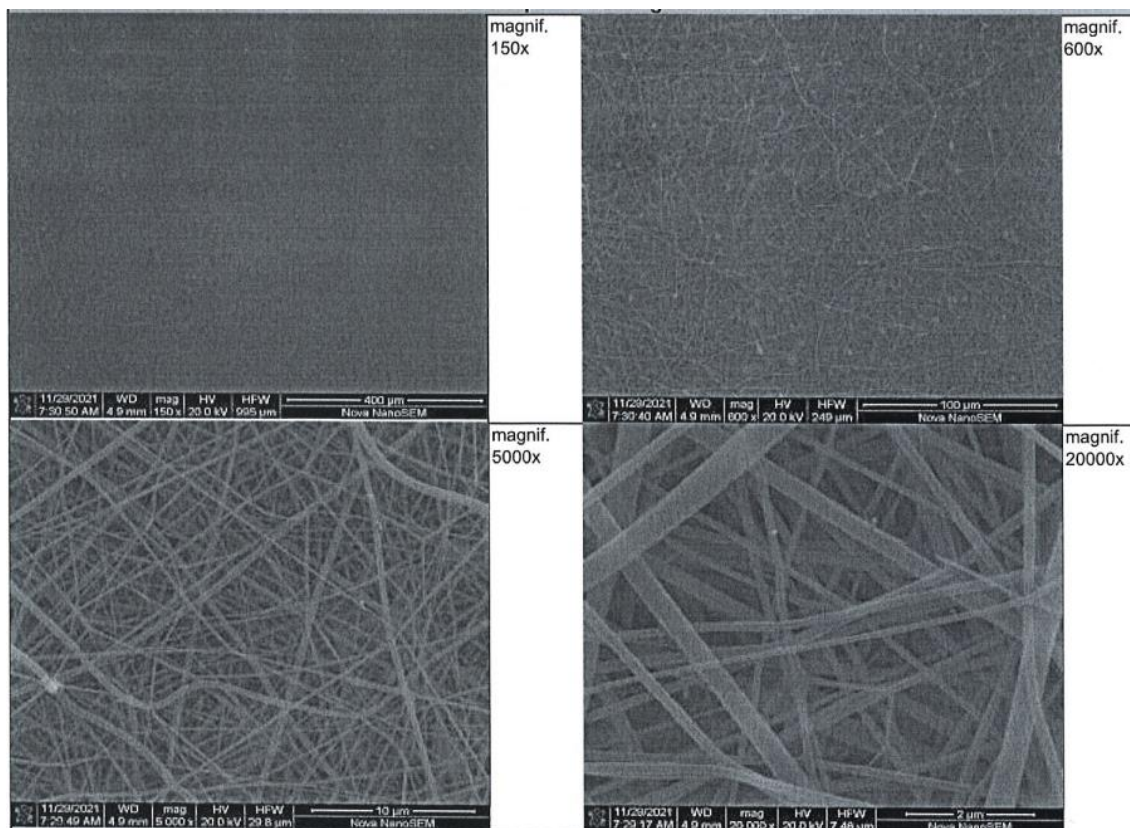
- datum přípravy: 2/2021
- plošná hmotnost vzorku: 10,1 g/m²
- průměr vláken: 122,4 ± 34,6 nm
- podkladový materiál: pečící papír (80 g/m²) (Branopac, Veselí nad Moravou)
- SEM analýza je patrná z obrázku 16



Obrázek 16: Vlákna PVDF, elektronová mikroskopie (SEM FEI Nova NanoSEM 230), zvětšeno 150x, 600x, 5000x, 20000x

PVDF nanovláknna PVDF (Solef 1015) (Elmarco s.r.o. Liberec)

- datum přípravy: 1/2021
- plošná hmotnost vzorku: 10,80 g/m²
- průměr vláken: 128 ± 51,5 nm
- podkladový materiál: pečící papír (80 g/m²) (Branopac, Veselí nad Moravou)
- SEM analýza je patrná z obrázku 17



Obrázek 17: Vlákna Solef 1015, elektronová mikroskopie (SEM FEI Nova NanoSEM 230), zvětšeno 150x, 600x, 5000x, 20000x

3.6 Stanovení koncentrace proteinu ovalbuminu metodou microBCA

Princip BCA metody spočívá v redukci Cu^{2+} iontu na Cu^+ iont peptidovou vazbou ovalbuminu a následnou chelatací Cu^+ iontu pomocí sodné soli kyseliny bicinchoninové. Vzniká purpurový komplex, jehož absorbance byla měřena spektrofotometricky při 570 nm. Tento postup byl převzat z Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit.

3.6.1 Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu

Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml byl připraven navážením 10 mg ovalbuminu a 5 ml fosfátového pufru pH =7,3. Koncentrace byla provedena v tripletu. Ze zásobního roztoku ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml byla připravena kalibrační řada o koncentracích: 200, 150, 100, 40, 20, 10, 5 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ovalbuminu, jak je znázorněno v tabulce 3.

Tabulka 3: Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu

Zkumavky	Fosfátový pufr pH 7,3 (μl)	Ovalbumin (c= 2 mg/ml) (μl)	Výsledná koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
A	900	100	200
B	925	75	150
C	950	50	100
D	980	20	40
E	990	10	20
F	995	5	10
G	998	2,5	5
H	999	1,25	2,5
I-blank	1000	0	0

Vzorky s proteiny a připravené roztoky z kalibrační závislosti byly pipetovány v tripletu do mikrotitrační destičky vždy po 150 μl . Ke každému vzorku bylo přidáno 150 μl BCA reagentie, tato reagentie byla připravena smísením 25 dílů roztoku A, 24 dílů roztoku B a 1 dílu

roztoku C. Pro přípravu 5 ml BCA reagentie bylo pipetováno 2500 μ l roztoku A, 2400 μ l roztoku B a 100 μ l roztoku C. Takto připravená mikrotitrační destička byla inkubována v termostatu 2 hodiny při 37 °C.

3.6.2 Stanovení koncentrace ovalbuminu na nanovlákně

Pomůcky a přístroje:

- analytické váhy, mikrozkuřavky, pinzeta, rotátor, termostat, spektrofotometr

Použité roztoky:

- 0,1M fosfátový pufr pH 7,3
- zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,3

Použitá vlákna:

- chitosanová nanovlákně (Nanovia s.r.o.)

Postup:

Vzorky nanovláken o rozměru 1,5 x 1,5 cm byly zvaženy na analytických vahách. Dále byl připraven 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 a zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml. Nanovlákně byla přenesena pomocí pinzety do mikrozkuřavek. Nanovlákně v mikrozkuřavkách byla promyta roztokem 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Následovala inkubace 2 hodiny při teplotě 37 °C. V supernatantech byla metodou BCA stanovena koncentrace ovalbuminu. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ l supernatantu a 150 μ l BCA činidla. Ke 150 μ l zásobního roztoku ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml bylo přidáno 150 μ l BCA činidla. Ke vzorkům nanovláken bylo přidáno 150 μ l pufru a 150 μ l BCA činidla. NF zůstaly i nadále v mikrozkuřavkách. Inkubace probíhala 2 hodiny při 37 °C v termostatu za mírného otáčení. Po inkubaci byly napipetovány supernatanty z mikrozkuřavek s nanovlákně do mikrotitrační desky a změřena výsledná absorbance při vlnové délce 570 nm na spektrofotometru.

3.7 Hodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu

Výpočet účinnosti adsorpce byl proveden pro všechny testované vzorky nanovláken pomocí níže zmíněné rovnice 1 a vyjadřuje nepřímý způsob hodnocení. Koncentrace proteinu byly vypočítány z výsledků microBCA testu. Od počáteční koncentrace vloženého proteinu byla odečtena koncentrace nenavázaného proteinu v supernatantu a tento rozdíl byl vydělen celkovým množstvím vloženého proteinu. Tento vztah vyjadřuje účinnost adsorpce v %.

$$\text{Účinnost adsorpce [\%]} = \frac{\text{celkový vložený protein [\mu\text{g/ml}] - nenavázaný protein po vazbě [\mu\text{g/ml}]}{\text{celkový vložený protein [\mu\text{g/ml}]} } 100$$

Rovnice 1: Výpočet účinnosti adsorpce v %

3.8 Imobilizace ovalbuminu karbodiimidovou metodou na nanovlákná

Pomůcky:

- mikrozkušavky, filtrační papír, automatické pipety, špičky, rotátor

Roztoky:

- 0,1M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1M fosfátový pufr pH 7,3 s 1M NaCl
- zvážené vzorky nanovláken o rozměru 1,5 x 1,5 cm
- navážka ovalbuminu v 500 μl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3 rozpouštěn 5 minut za mírného otáčení při laboratorní teplotě
- roztok EDC: 7,5 mg EDC v 200 μl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3 – rozpouštěn až těsně před aplikací
- roztok sulfo-NHS: 1,25 mg sulfo-NHS v 200 μl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3 rozpouštěn až těsně před aplikací

Postup:

Zvážené vzorky nanovláken o rozměru 1,5 x 1,5 cm byly promyty 0,1M fosfátovým pufrům pH 7,3, tento proces byl třikrát zopakován. Následně byl odsán supernatant. K promytným nanovláknům do mikrozkušavky bylo napipetováno 500 μl roztoku ovalbuminu k tomuto roztoku bylo přidáno 200 μl roztoku EDC a 200 μl roztoku sulfo-NHS. Reakční směs byla doplněna 100 μl 0,1M fosfátového pufru pH 7,3. Inkubace probíhala 2 hodiny při laboratorní teplotě na rotátoru. Před inkubací bylo nutné zkontrolovat, že vlákno je ve vznosu.

3.9 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Pomůcky:

- Mini-PROTEAN Tetra Cell aparatura pro vertikální gelovou elektroforézu, PowerPac™ Basic Power Supply zdroj napětí pro elektroforézu, 0,75 mm skla na polyakrylamidové gely (SDS PAGE), parafilm, mikroskopavky, filtrační papír, automatické pipety, špičky

Roztoky:

- Roztok A: 30% směs akrylamidu a bisakrylamidu
8,77 g akrylamidu a 0,24 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno v 15 ml destilované vody. Bylo ponecháno nabobtnat 30 minut a objem byl doplněn na 30 ml.
- Roztok B: 1,5M Tris-HCl pufr pH 8,8
Bylo naváženo 5,4499 g Tris a přidáno 40 ml destilované vody. Pomocí 1,55 ml 6M HCl byla upravena hodnota pH na 8,8.
- Roztok C: 1M Tris-HCl pufr pH 6,8
Bylo naváženo 4,8664 g Tris a přidáno 40 ml destilované vody. Pomocí 1,55 ml 6M HCl byla upravena hodnota pH na 6,8.
- Roztok D: 10% roztok SDS
Bylo naváženo 1,0176 g SDS a doplněno na objem 10 ml destilovanou vodou.
- Roztok E: 10% roztok persíranu amonného
Bylo naváženo 0,11 g na 1 ml destilované vody. Tento roztok bylo zapotřebí připravovat vždy čerstvý těsně před použitím.
- Roztok F: 100 mM Tris/HCl pufr, pH 6,8 s 4% SDS, 200 mM merkptoethanolem, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří
- Roztok G: 100 mM Tris/HCl pufr, pH 6,8 s 4% SDS, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří

Pro přípravu polyakrylamidových gelů byly pipetovány objemy připravených roztoků dle tabulky 4. Jako poslední byl vždy dávkován Roztok E, jelikož iniciuje vlastní polymeraci. Proces polymerace trvá přibližně 30 minut. Gel byl následně převrstven zaostřovacím gelem. Zároveň byla vložena šablona pro aplikaci vzorků mezi skla, která obsahovala 10 jamek.

Tabulka 4: Pipetované objemy roztoků pro přípravu polyakrylamidových gelů

	Zaostřovací gel 5% (ml)	Dělicí gel 12% (ml)
Destilovaná voda	1,4	1,68
Roztok A	0,33	2
Roztok B	-	1,25
Roztok C	0,25	-
Roztok D	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002
Roztok E	0,02	0,05

Elektrodový pufr:

- Elektrodový pufr 0,025M Tris, 0,192M glycin s 0,1% SDS pH 8,3-8,6

Bylo naváženo 3,0378 g Tris, 14,4349 g glycinu a 0,995 g SDS. Následně bylo doplněno na objem 1000 ml destilovanou vodou.

Molekulový standard:

- Komerční Marker Priesion Plus Protein™ Unstained Standards, Soubor deseti proteinů o molekulové hmotnosti od 10 do 250 kDa.

Postup:

Očištěná skla etanolem byla vložena do aparatury a byla přidána krycí skla. Po délce dolní hrany byl natažen parafilm. Další část práce probíhala v digestoři. Začínala přípravou dělicího gelu. Takto připravený roztok byl opatrně promíchán a co nejrychleji byl napipetován mezi skla do výšky 2-2,5 cm od vrchního okraje menšího skla. Po napipetování byl gel převrstven destilovanou vodou. Gel byl ponechán zpolymerovat 20-30 minut. Došlo

k vytvoření rozhraní mezi gelem a vodou. Přebytečná voda byla odsána filtračním papírem. Nadávkován byl po druhou rysku a byl vložen hřebínek. Gel byl ponechán zpolymerovat 15-20 minut. Po uplynutí této doby byl hřebínek vytažen. Vzniklé jamky byly propláchnuty třikrát elektrodoým pufrem. Následovalo umístění gelu do elektroforetické aparatury. K připraveným vzorkům byl přidán roztok G v poměru 1:1 a povařil se v termobloku po dobu 3 minut a teplotě 100 °C. Takto připravené vzorky byly nadávkovány do jamek gelu po 15 μ l a 3 μ l roztoku markeru. Do elektroforetické vany byl dolit elektrodoý pufr po vyznačené rysky a vana byla uzavřena víkem. Vana byla připojena ke zdroji elektrického napětí a byly nastaveny podmínky 30 mA a 180 V. Doba trvání elektroforézy byla 60 minut. Po skončení byl gel opatrně přesunut pomocí destilované vody do Petriho misky.

Barvení gelu:

- Fixační roztok: 5% kyselina octová, 50% ethanol

Ke 450 ml destilované vody bylo přidáno 500 ml ethanolu a 58 ml 99% kyseliny octové

- Barvicí roztok: komerční roztok Bio-SafeTM Coomassie Stain

Postup:

Před barvením byl gel propláchnut třikrát destilovanou vodou. Poté byl převeden do fixačního roztoku. Gel se ve fixačním roztoku ponechal 30 minut na třepačce. Následovala třicetiminutová rehydratace destilovanou vodou. Byl přidán barvicí roztok Coomassie Brilliant blue. Jednalo se o komerční roztok Bio-SafeTM Coomassie Stain. Barvení probíhalo 1 hodinu. Barevný roztok byl slit a byla přidána destilovaná voda dle potřeby do odbarvení pozadí gelu.

3.10 Analýza proteinů metodou dot blot

Principem je imunodetekce pro identifikaci specifického proteinu. Protein je nejdříve imobilizován na membránu. Po imobilizaci je pomocí blokovacího roztoku membrána zablokována, aby bylo zabráněno vzniku nespecifických vazeb. Následuje inkubace imobilizovaného proteinu na membráně společně s primární protilátkou, která je specifická pro protein. Vizualizace je provedena díky sekundární protilátce, která nese značku. Značka umožní vizualizaci proteinu. V tomto případě je značkou křenuvá peroxidáza. Enzym HRP působí na substrát peroxid vodíku, který působí na luminol a uvolňuje světelný signál. Intenzita světelného signálu byla stanovena denzitometricky pomocí softwaru GeneTools. Optimalizovaný postup byl převzat z diplomové práce Ospálkové B. (2018).

Pomůcky:

- PVDF membrána Immuno-Blot™, dot blot DHM 96 jamek, Petriho misky, filtrační papír.

Přístrojové vybavení:

- vakuový koncentrátor pro dot blot
- membránová vakuová pumpa a kompresor model 22AN
- orbitální třepačka Grant Bio PMS 1000

Roztoky:

- roztok pro ředění antigenů a ekvilibrační roztok: fosfátový pufr pH 7,3 10 mmol/l
- blokační roztok: 5% sušené mléko v PBST
- detekční roztok: Clarity Max 1:1
- promývací roztok PBST pH 7,4 o objemu 500 ml

složení: chlorid sodný - 4 g

dihydrogenfosforečnan draselný - 0,1 g

hydrogenfosforečnan sodný x 12 H₂O - 1,45 g

chlorid draselný - 0,1 g

destilovaná voda - 500 ml

Tween 20 - 4 ml

Používaný antigen:

- ovalbumin – zásobní roztok 100 µg/ml ve fosfátovém pufru pH 7,3

Používané protilátky:

- králičí anti-ovalbumin 1 mg/ml 1:250
- králičí anti-ovalbumin 1 mg/ml, anti-králičí IgG/HRP 1:8000 (konjugát)

Postup:

PVDF membrána byla ekvilibrována methanolem 3 minuty. Následovalo přenesení membrány na dot blot aparaturu pinzetou a zapojení vakuové pumpy. Navazovala ekvilibrace membrány fosfátovým pufrům pH 7,3. Po úplném odsátí roztoků ze všech jamek bylo dávkováno 100 µl roztoku antigenu vhodně naředěného ve fosfátovém pufru pH 7,3. Za chodu vakua byly povoleny všechny šrouby a vrchní díl aparatury byl odklopen. Membrána byla vyjmuta pomocí pinzety a byla usušena na filtračním papíře. Jakmile byla membrána usušena do podoby křídového papíru, mohla být rozstříhána na menší části. Rozstříhaná membrána byla umístěna do Petriho misek a byl přidán blokační roztok 5% sušené mléko v PBST. Dále byla ponechána na orbitální třepačce 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl slit blokační roztok a membrány byly promyty třikrát roztokem PBST pH 7,4. Dále byl na membrány aplikován roztok primární protilátky. Inkubace s primární protilátkou probíhala rovněž na orbitální třepačce, při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byl slit roztok s primární protilátkou a membrány byly znovu promyty roztokem PBST pH 7,4 a to třikrát. Byl přidán konjugát ředěný 1:8000 5% sušeným mlékem v PBST. Inkubace probíhala viz předchozí kroky. V posledním kroku byly membrány promyty třikrát roztokem PBST po dobu 5 minut. Nakonec byl přidán detekční roztok Clarity v poměru 1:1, inkubace probíhala 5 minut.

3.11 Denzitometrické vyhodnocení proteinů v gelu a na membráně

Přístrojové vybavení:

- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS + Systém s GeneTools softwarem
- fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS + Systém s Image Lab softwarem

Postup pro hodnocení gelu:

Výsledný gel po ukončení SDS PAGE elektroforézy byl vyfocen na stanici ChemiDoc™ XRS a vyhodnocen v software ImageLab. Vyhodnocení probíhalo ve frakci 25 kDa. Nejdříve byl hodnocen zásobní roztok ovalbuminu 0,1 mg/ml, ten byl započten jako 100 %. V dalších frakcích pak byly hodnoceny vzorek 1 a 2.

Postup pro hodnocení membrány:

Výsledná dot blot membrána byla vyfocena na stanici ChemiDoc™ XRS a vyhodnocen v software GeneTools. Jednotlivé spoty byly označeny stejným kruhovým vzorem a byla změřena intenzita jednotlivých spotů. Výsledky byly zaneseny do grafu jako závislost intenzity zbarvení spotů na koncentraci vloženého antigenu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

LFA testy jsou považovány za levnou a rychlou metodu detekce, která je široce využívána pro screening různých onemocnění. Zlepšení citlivosti v této oblasti testů je stále diskutovaným tématem. Právě membrána je jednou z nejdůležitějších součástí LFA testu. Nanovlákná vyrobená metodou elektrostatického zvláknění se ukázala jako slibný materiál v různých biomedicínských aplikacích. Jejich výhodami pro oblast LFA testů jsou snadná modifikace, poměrně nízké náklady na výrobu, dále porozita těchto materiálů a s ní spojená možnost ovlivnění průtokové rychlosti. Tato práce se zaměřuje na možnosti výběru vhodných nanovláknenných membrán pro potencionální nahrazení nitrocelulóзовé membrány v LFA testech. Jako modelový antigen byl využit protein ovalbumin. Detekce efektivitu vazby ovalbuminu na nanovlákná adsorpcí, jejíž podmínky byly optimalizovány, byla prováděna pomocí BCA metody. Optimalizace podmínek zahrnovala korekci teploty, času inkubace nanovlákn s ovalbuminem a regulaci koncentrace ovalbuminu na vazbu na nanovlákná. Jako modelová nanovlákná byla použita chitosanová nanovlákná (Nanovia s.r.o.). Detekce byla prováděna nepřímou metodou, a to výpočtem účinnosti vazby z rozdílu koncentrací proteinu ze zásobního roztoku a v supernatantu po vazbě. V případě kovalentní vazby nebylo možné využít nepřímou metodu detekce vzhledem k interferencím s microBCA kitem, proto byla využita možnost detekce ovalbuminu v supernatantech SDS PAGE elektroforézou s denzitometrickým vyhodnocením. Dosažené výsledky obou typů vazeb byly srovnány mezi sebou. K posouzení účinnosti vazby proteinu pomocí specifické protilátky na nanovlákná byla využita metoda dot blot s imunochemickým principem detekce. V metodě bylo optimalizováno ředění králičí anti-ovalbuminové protilátky a ředění konjugátu proti králičímu IgG značené HRP. K vyhodnocení byla využita denzitometrická analýza.

4.1 Adsorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná

Pro optimalizaci metody adsorpce byl zvolen jako modelový protein ovalbumin, jehož izoelektrický bod (pI) se pohybuje v rozpětí 4,5-4,9. Molekulová hmotnost ovalbuminu činí 42,7 kDa. Vazba proteinu ovalbuminu probíhala na chitosanová nanovlákná (Nanovia s.r.o.). Tato vlákna byla v tomto experimentu použita jako modelový materiál. Cílem tohoto experimentu bylo optimalizovat podmínky adsorpce ovalbuminu na nanovlákná z chitosanu. Adsorpce je metoda reverzibilní, při níž se uplatňují pouze nízkoenergetické interakce.

4.1.1 Optimalizace podmínek adsorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná

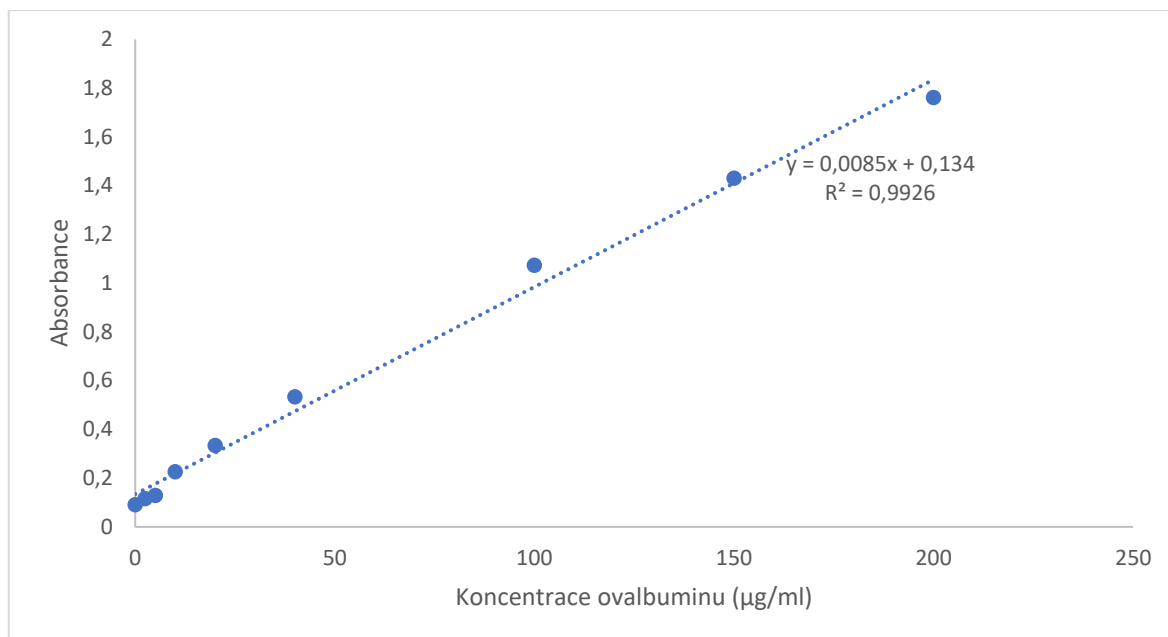
Vzorky chitosanových nanovláken v tripletu o velikosti 1,5x 1,5 cm byly zváženy na analytických vahách. Hmotnost nanovláken se pohybovala v rozmezí $4,79 \pm 0,27$ mg. Byl použit zásobní roztok ovalbuminu pro kalibraci o koncentraci 2 mg/ml. Zásobní roztok o koncentraci 0,1 mg/ml byl připraven ředěním ze zásobního roztoku pro kalibraci. Adsorpce probíhala v prostředí fosfátového pufru pH 7,3. Detekce byla provedena pomocí microBCA testu. Vlnová délka pro měření na spektrofotometru byla 570 nm.

Koncentrace ovalbuminu navázaného na NF chitosanu (Nanovia s.r.o.) byla stanovena metodou microBCA testu viz kapitola 3.6. Pro výpočet koncentrace ovalbuminu byla použita kalibrační křivka závislosti absorbance vzniklého barevného produktu na koncentraci ovalbuminu ve vzorku, která byla sestrojena podle kalibrační řady z tabulky 5. Jako slepý vzorek byly využity NF bez proteinu v 0,1 M roztoku fosfátového pufru pH 7,3.

Tabulka 5: Kalibrační řada ovalbuminu pro microBCA test, provedena v dubletu

Označení	1 Absorbance	2 Absorbance	Průměr ± SD	Koncentrace ovalbuminu (µg/ml)
A	1,762	1,787	1,775±0,01	200
B	1,431	1,466	1,449±0,02	150
C	1,073	1,125	1,099±0,03	100
D	0,533	0,557	0,545±0,01	40
E	0,333	0,353	0,343±0,01	20
F	0,226	0,216	0,221±0,01	10
G	0,129	0,187	0,158±0,03	5
H	0,115	0,126	0,121±0,01	2,5
I BLANK	0,091	0,084	0,088±0,00	0

Rovnice regrese byla vypočtena na $y=0,0085x + 0,134$ s hodnotou faktoru spolehlivosti $R^2= 0,9926$ z grafu 1.



Graf 1: Kalibrační křivka koncentrace ovalbuminu stanovení metodou BCA

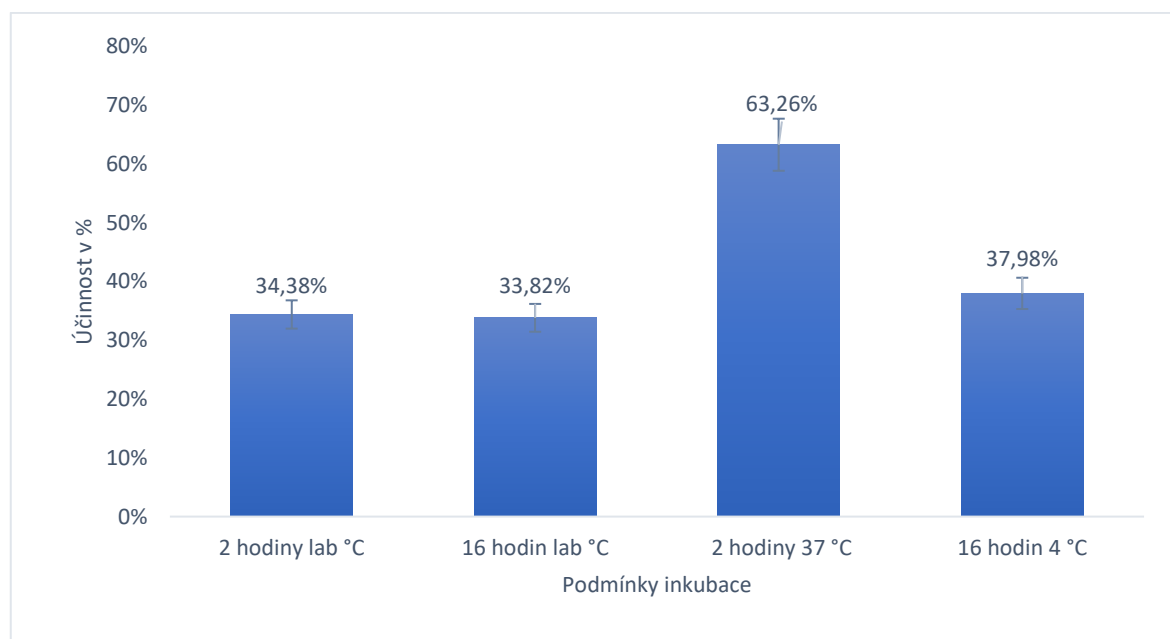
Pro experiment byly vybrány dva časy inkubace a tři různé teplotní stupně, což je patrné z tabulky 6. První možností byla laboratorní teplota. Druhou možností byla inkubace při teplotě 37 °C. Při této teplotě probíhala inkubace vzorků v termostatu. Poslední možností byla inkubace vzorků za snížené teploty při 4 °C. Časové rozmezí inkubace se pohybovalo v rozmezí 2-16 hodin. Inkubace probíhala vždy za mírného otáčení. Cílem bylo optimalizovat časové a teplotní podmínky tak, aby došlo k adsorpci ovalbuminu na chitosanová nanovlákná s co nejvyšší účinností.

Tabulka 6: Časové a teplotní podmínky inkubace ovalbuminu s chitosanovými nanovlákná

Čas	Teplota
2 hodiny	laboratorní teplota
2 hodiny	37 °C
16 hodin	laboratorní teplota
16 hodin	4 °C

Nepřímým hodnocením, tedy stanovením supernatantů nanovláken, od počátečního množství vloženého proteinu byla odečtena hodnota nenavázaného proteinu po vazbě v supernatantu nanovláken a tento rozdíl byl vydělen celkovým množstvím vloženého proteinu tj účinnost adsorpce. Účinnost adsorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná se pohybovala

v rozmezí 33,82-63,26 %. Nejlépe se ovalbumin adsorboval na chitosanová nanovlákná při inkubaci za zvýšené teploty 37 °C v termostatu po dobu 2 hodin. Při zvýšení teploty na 37 °C se ovalbumin adsorboval na chitosanová nanovlákná výrazně více i při kratším časovém intervalu 2 hodiny. Ve studii Khalifehzadeh et al. (2019) probíhala rovněž adsorpce proteinu na povrch nanovláken s kratšími intervaly průběhu adsorpce. Adsorpční časy proteinu na nanovlákná se v této studii pohybovaly mezi 1-3 hodinami. Možnost zkrácení doby inkubace z 16 hodin na 2 hodiny je z našeho pohledu výhodná pro rychlejší průběh dalších experimentů. Grafické porovnání jednotlivých podmínek experimentů představuje graf 2.



Graf 2: Porovnání účinností adsorpce ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml na chitosanová nanovlákná (Nanovia s.r.o.) za různých teplotních a časových podmínek, provedeno v tripletu

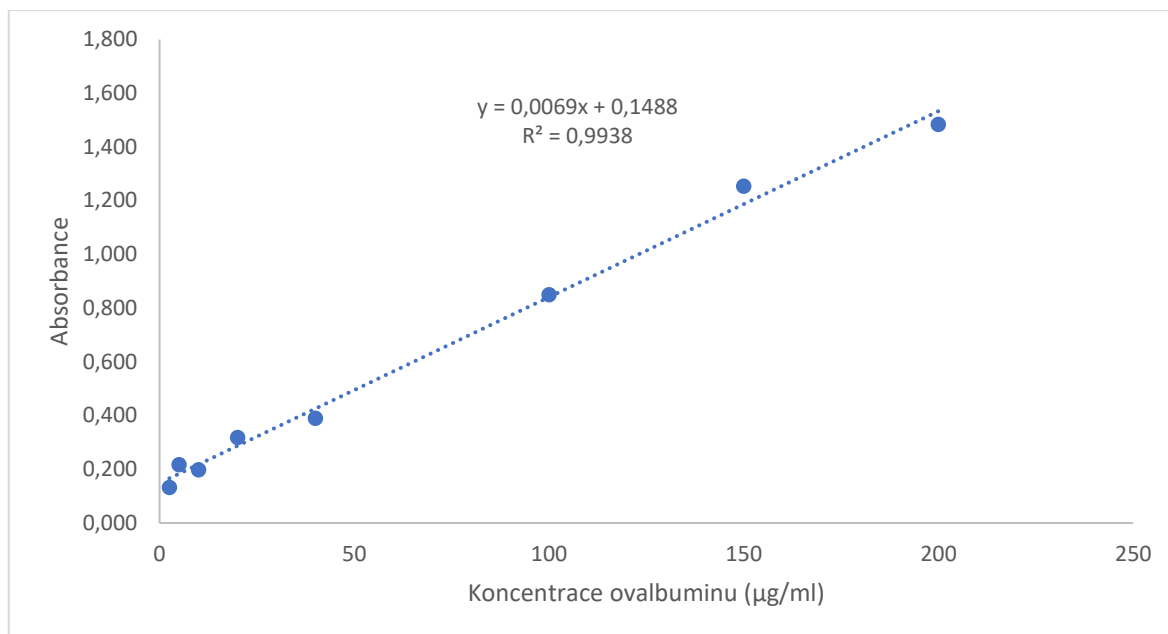
Podobný experiment provedly i dvě další práce. Adsorpcí ovalbuminu na chitosanové nanočástice se zabývaly diplomové práce Bolkové A. (2021) a Behančínové P. (2019), kdy první zmíněná uvedla, že imobilizovala 0,5 mg ovalbuminu na různé chitosanové částice po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Výsledná účinnost vazby na částice metodou adsorpce se pohybovala mezi 30,99-44,38 %. V tomto experimentu byla výsledná účinnost vazby 0,1 mg/ml ovalbuminu na nanovlákná po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě vypočtena na 34,38 %. Tato účinnost koreluje s dosaženými výsledky zmíněné práce, ale je třeba vzít v potaz, fakt že mezi experimenty jsou zásadní rozdíly v použití chitosanových nanočástic. Liší se rovněž vyšší koncentrací ovalbuminu. Druhá zmíněná uvedla, že nepřímým hodnocením účinnosti adsorpce se sorbovalo 23,7 % ovalbuminu na stejné nanočástice jako u Bolkové. Váňová V. (2018) ve své diplomové práci uvádí, že na chitosanová nanovlákná o plošné

hmotnosti 10 g/m^2 se po inkubaci 2 hodiny s $0,1 \text{ mg/ml}$ roztokem ovalbuminu adsorboval nepřímou metodou s účinností 54 %. Rozdíl shledávám v plošné hmotnosti nanovláken v našem experimentu byla použita nanovlákná o vyšší plošné hmotnosti 20 g/m^2 a výsledná účinnost byla rovněž vypočtena nepřímou metodou vyšší a to 63,26 %. Autorka neuvedla, při jaké teplotě inkubace probíhala.

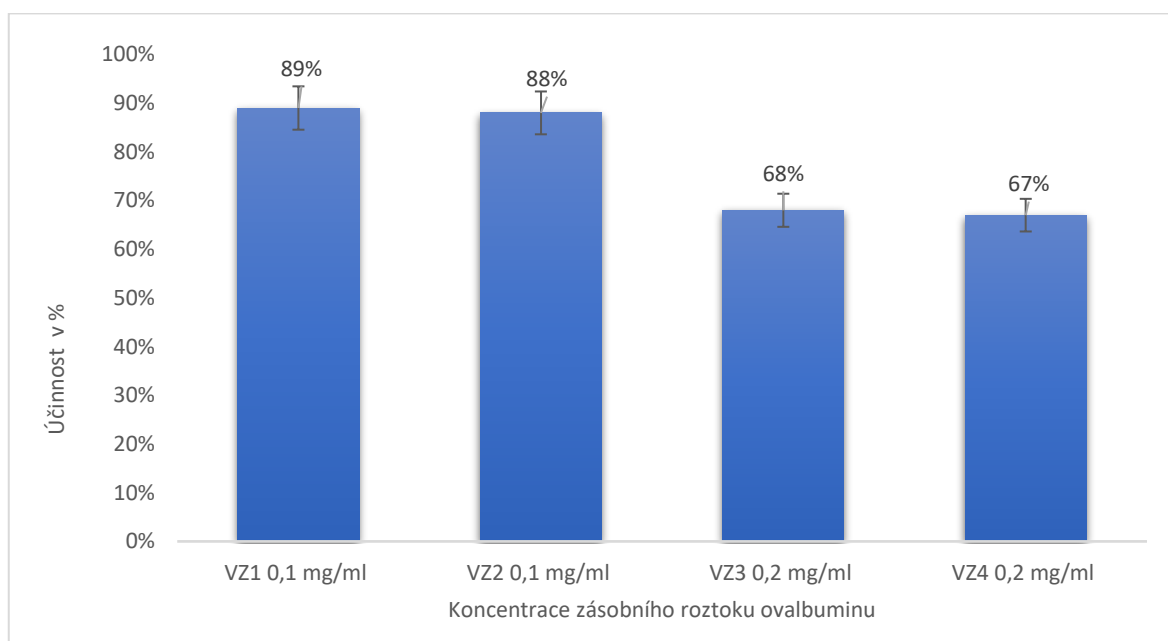
4.2 Imobilizace ovalbuminu na chitosanová nanovlákná karbodiimidovou metodou

Cílem tohoto experimentu bylo imobilizovat ovalbumin na chitosanová nanovlákná karbodiimidovou metodou a srovnat jeho výsledky s předchozími výsledky adsorpce ovalbuminu na tyto nanovlákná. V této práci byla využita jedнокroková metoda vazby. Při karbodiimidové metodě chitosan poskytuje aminovou skupinu a enzym karboxylovou skupinu. Nejdříve se vytváří meziprodukt O-acylisomočovina. Tento produkt reaguje s aminem a vzniká amidová vazba. Ke zprostředkování vazby byl v tomto případě využit N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid (EDC) a N-hydroxysukcinimid (NHS).

Chitosanová nanovlákná o plošné hmotnosti 20 g/m^2 a rozměrech $1,5 \times 1,5 \text{ cm}$ byla inkubována po dobu 2 hodin při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ s $0,1 \text{ mg/ml}$ roztokem ovalbuminu a nebo s $0,2 \text{ mg/ml}$ roztokem ovalbuminu, za mírného otáčení. Stanovení koncentrace ovalbuminu navázaného přímo na nanovlákněch proběhlo pomocí microBCA testu, kalibrační závislost absorbance vzniklého barevného produktu na koncentraci ovalbuminu v zásobním roztoku. Zásobní roztok ovalbuminu pro kalibraci měl koncentraci 2 mg/ml . Rovnice kalibrace pro výpočet účinnosti karbodiimidové vazby je uvedena v grafu 3. Porovnání účinností karbodiimidové vazby po imobilizaci ovalbuminu o koncentraci $0,1 \text{ mg/ml}$ a $0,2 \text{ mg/ml}$ jsou uvedeny v grafu 4. Účinnost imobilizace byla vypočítána přímo na nanovlákněch pomocí microBCA testu z rovnice kalibrace.



Graf 3: Kalibrační křivka zásobního roztoku proteinu ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml



Graf 4: Srovnání účinnosti karbodiimidové vazby ovalbuminu o koncentracích 0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml na chitosanová nanovlákná v tripletu, metoda detekce proteinu přímo na nanovláčknech

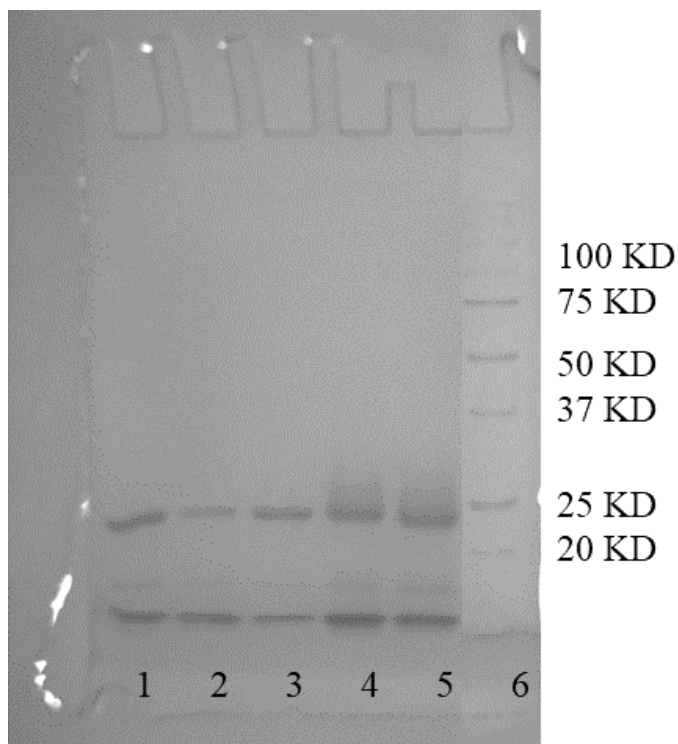
Z grafu 4 je patrné, že účinněji bylo imobilizováno menší množství proteinu v zásobním roztoku. Ze vzorku 1 89 % a ze vzorku 2 88 %. V porovnání se vzorky 3 a 4 po inkubaci s 0,2 mg/ml ovalbuminu, kde se účinnost vazby pohybovala mezi 68 % a 67 %. Vazba ovalbuminu v zásobním roztoku o koncentraci 0,1 mg/ml na nanovlákná byla tedy téměř o 20 % účinnější, než vazba stejného roztoku proteinu o koncentraci 0,2 mg/ml. V případě tohoto experimentu měla zřejmě vliv určitá interference NHS v proteinovém testu microBCA. NHS je

běžně používané činidlo biokonjugaci a analytické chemii, ale jak uvedla studie (Vashist et al., 2011) předpokládá se, že interference NHS byla způsobena redukcí Cu^{2+} v činidle B soupravy microBCA kitu. Činidlo B obsahuje 4% síran měďnatý. Jistý vliv na zvýšení účinnosti mohly mít i nespecifické vazebné interakce k nanovláknům. Proto byla provedena detekce jiným způsobem, a to nepřímým výpočtem koncentrace ovalbuminu v supernatantech.

Jako účinnější koncentrace ovalbuminu pro kovalentní vazbu na chitosanová nanovlákná byla vybrána nižší koncentrace tedy 0,1 mg/ml ovalbuminu. Jiný způsob ověření optimální koncentrace ovalbuminu pro vazbu na nanovlákná proběhl nepřímo ze supernatantů po vazbě. Byla využita metoda SDS PAGE elektroforézy s denzitometrickým vyhodnocením v softwaru ImageLabTM podle postupu uvedeného v kapitole 3.11.

SDS PAGE elektroforéza

Pro vyhodnocení vazby ovalbuminu pomocí SDS PAGE elektroforézy byl připraven 12% polyakrylamidový gel podle návodu, - viz kapitola 3.9. Do první jamky byl nanesen zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml a objemu 15 μl . Do dalších dvou jamek byly napipetovány supernatanty vzorků 1 a 2 také o objemu 15 μl . Do 4. a 5. jamky byla napipetována první promývací frakce po 15 μl a v poslední jamce se nachází 3 μl molekulového markeru. Výsledný gel byl obarven komerčním kitem barviva Coomasie Brilliant blue. Jednalo se o komerční roztok Bio-SafeTM Coomassie Stain. Po obarvení byl výsledný gel vyfocen pomocí softwaru ImageLabTM detekční stanice ChemiDoc TMXRS+System. Hodnocena byla frakce 25 KD. Výsledek je uveden na obrázku 18.



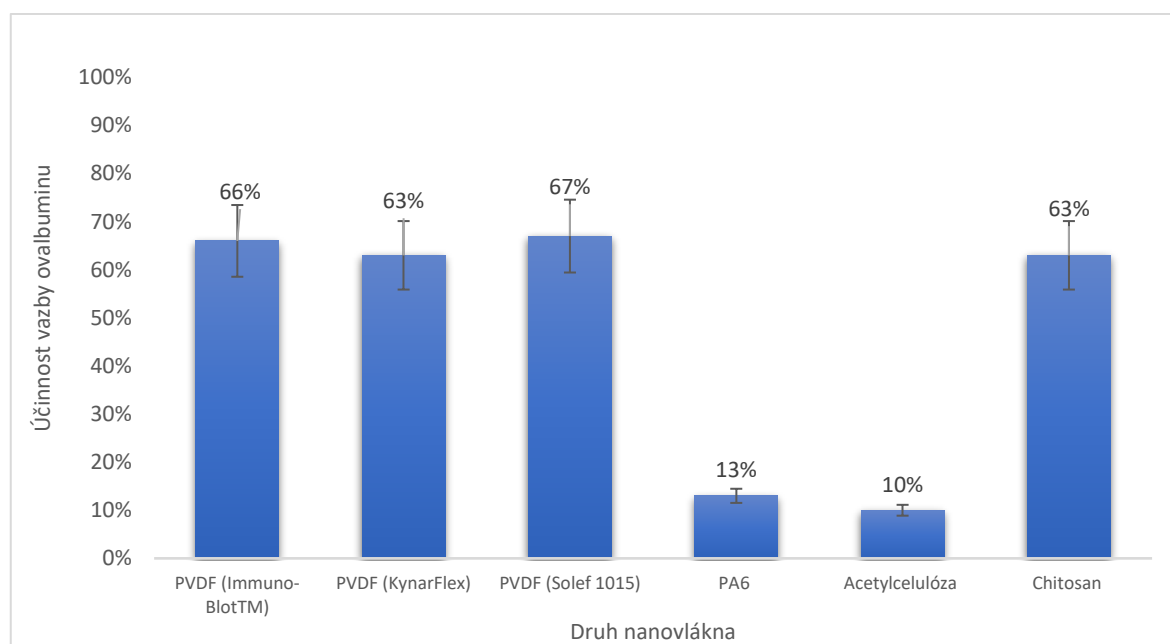
Obrázek 18: SDS-PAGE elektroforéza ovalbuminu 0,1 mg/ml imobilizovaného na chitosanová nanovlákná (Nanovia s.r.o.) karbodiimidovou metodou. 1 – zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml, 2 – supernatant vzorku 1, 3 – supernatant vzorku 2, 4 – promývací frakce vzorku 1, 5 – promývací frakce vzorku 2, 6 – molekulový marker 10-250 kDa

Denzitometrickým vyhodnocením gelu softwarem ImageLab bylo zjištěno, že účinnost karbodiimidové kovalentní vazby je v případě prvního vzorku 38 % a v případě druhého vzorku 20 %. Z výsledku SDS-PAGE elektroforézy a denzitometrického vyhodnocení lze usoudit snížení množství ovalbuminu v supernatantech oproti zásobnímu roztoku ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml. Tudíž lze předpokládat, že imobilizace ovalbuminu na chitosanová nanovlákná proběhla z 29 %.

Při adsorpci 0,1 mg/ml ovalbuminu na chitosanová nanovlákná bylo dosaženo při stejných podmínkách inkubace, tedy 2 hodiny při 37 °C účinnosti vazby 63,26 %. V případě kovalentní karbodiimidové metody byla stanovena účinnost vazby ovalbuminu na chitosanová nanovlákná na 29 %. Z toho vyplývá, že v dalších experimentech s dalšími nanovláknami byla použita již výhradně metoda adsorpce, jelikož se za daných podmínek jevila jako účinnější. V porovnání se studií Srbová et al. (2016), kde byl karbodiimidovou metodou a metodou adsorpce na chitosanová vlákna navázán hovězí trypsin (3 mg), jsme došli k odlišným výsledkům. Trypsin se z důvodu mnohem vyšší původní koncentrace trypsinu účinněji navázal kovalentní vazbou.

4.3 Porovnání adsorpce ovalbuminu u různých nanovláken

Cílem tohoto experimentu bylo porovnat účinnost vazby ovalbuminu na další dostupná nanovlákná PVDF, PA6 a acetylcelulózu, za již optimalizovaných podmínek. Současně byla do testu zařazena komerční PVDF(Immuno-Blot™) membrána pro srovnání účinnosti navázání ovalbuminu na komerčně dostupný materiál. Vzorky nanovláken o rozměru 1,5 x 1,5 cm byly zváženy na analytických vahách. Dále byl připraven 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 a zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 0,1 mg/ml. Nanovlákná v mikrozkušnicích byla promyta roztokem 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Následovala inkubace 2 hodiny při 37 °C. Dále bylo pokračováno stejně jako v postupu popsáném v kapitole 3.7. Výsledná absorbance byla změřena při vlnové délce 570 nm na spektrofotometru. Jako slepý vzorek byly využity NF bez proteinu v 0,1 M roztoku fosfátového pufru pH 7,3. Dosažené účinnosti adsorpce 0,1 mg/ml ovalbuminu na jednotlivá NF lze vidět v grafu 5.



Graf 5: Srovnání účinnosti adsorpce ovalbuminu (0,1 mg/ml) na PVDF (Immuno-Blot™) a vzorky nanovláken z PVDF (KynarFlex), PVDF (Solef 1015), PA6 (B24), Acetylcelulózy (CA) a modelových nanovláken z chitosanu provedeno v tripletu

Hodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu na jednotlivá nanovlákná

Hodnoty účinnosti byly vypočítány nepřímým způsobem pomocí microBCA testu ze supernatantů po adsorpci. Od počátečního množství vloženého proteinu byla odečtena hodnota nenavázaného proteinu po vazbě v supernatantu nanovláken a tento rozdíl byl vydělen celkovým množstvím vloženého proteinu, tento vztah vyjadřuje účinnost adsorpce v %. Pro

PVDF membránu (Immuno Blot™) byla vypočtena účinnost vazby 0,1 mg/ml ovalbuminu na 66 %. Pro PVDF membránu (KynarFLex 2800) byla tato hodnota stanovena na 63 % a podobně vysoké procento účinnosti vazby vykazovala i třetí PVDF (Solef 1015) membrána a to 67 %. PVDF (Solef 1015) membrána tedy vykazovala nejvyšší účinnost adsorpce ovalbuminu ze všech testovaných membrán. Vysokého procenta účinnosti adsorpce ovalbuminu dosáhla i chitosanová membrána, která byla použita v předchozích testech jako modelový materiál. Naopak nízké výsledky účinnosti vykazovala membrána z polyamidu PA6 (B24), kde byla vypočtena hodnota účinnosti adsorpce ovalbuminu na 13 %. Vůbec nejnižšího výsledku dosáhla acetylcelulózová (CA) membrána, kde se účinnost adsorpce 0,1 mg/ml ovalbuminu pohybovala pouze na 10 %.

PVDF membrány Solef 1015 a KynarFlex 2800 prokázaly srovnatelně vysokou účinnost vazby ovalbuminu, jako komerční PVDF (Immuno-Blot™) membrána. Studie Gürel-Gökmen et al. (2021) uvádí, že výrobou elektrostaticky zvlákněných membrán z PVDF ve vývoji LFA testů dosáhli vyšší specifity povrchové plochy, nižší průtokové rychlosti a vyšší kapacity proteinového zatížení tedy množství navázaného proteinu než při použití běžně dostupných PVDF membrán.

V práci Xiang et al. (2021) byl studován vliv molekulové hmotnosti proteinů na účinnost vazby na membránu z PVDF a z nitrocelulózy. Pro proteiny s nízkou molekulovou hmotností v rozmezí 17-30 kDa vykazovala nitrocelulózová membrána vyšší schopnost vazby než PVDF membrána. U proteinů se střední molekulovou hmotností (50-80 kDa), nebyl prokázán významný rozdíl v účinnosti vazby mezi PVDF a NC membránou. U vysokomolekulárních proteinů o molekulové hmotnosti 150-170 kDa byla prokázána vyšší účinnost vazby u PVDF membrány než u NC membrány. Závěrem mohli konstatovat, že se zvyšující se molekulovou hmotností použitého proteinu je vhodnější použití PVDF membrány než NC membrány.

4.4 Imunochemická detekce metodou dot blot

V předchozích experimentech byla studována účinnost vazby modelového proteinu na různé typy nanovláken. Cílem následujících experimentů je připravit bioaktivní nosič s vybranou nanovláknou membránou pro oblast imunochromatografických testů. PVDF membrány v předchozím experimentu vykazovaly nejvyšší účinnosti vazby ovalbuminu. Proto byly použity i v tomto experimentu. Nejdříve byla provedena optimalizace a ověření metody na komerčně dostupné PVDF (Immuno-Blot™) membráně a následně byla vybrána PVDF

(Solef 1015) membrána, na kterou se ovalbumin adsorboval s nejvyšší účinností 67 %. Ve většině komerčně dostupných LFA testech je běžné využití nitrocelulózy. Molekuly proteinů se váží na nitrocelulóзовé membrány prostřednictvím hydrofobních interakcí. Vodíkové vazby jsou tvořeny mezi nitroskupinami membrány a aminokyselinovými postranními řetězci proteinů. V našich experimentech byla dostupná vlákna acetylcelulózy, jejíž vlastnosti se od nitrocelulózy liší. Acetylcelulóza nevykazovala dobré výsledky. Účinnost adsorpce ovalbuminu se pohybovala pouze okolo 10 %. Nitrocelulóza používaná pro LFA testy obsahuje 12-13,5 % dusíku stejná se používá pro výrobu bezdymého střelného prachu, zatímco acetylcelulóza, která se získává esterifikací hydroxylových skupin celulózy nachází své využití ve výrobě umělého hedvábí. Při rozpuštění ve směsi voda-propanol-chloroform se používá pro výrobu celofánu.

K imunochemickému ověření připraveného bioaktivního nosiče byla zvolena metoda dot blot, která využívá specifickou vazbu s králičími anti-ovalbuminovými protilátkami. Následná detekce probíhá prostřednictvím konjugátu proti králičímu IgG značeného HRP. Dot blot je jednodušší modifikací western blotu, kde odpadá nutnost využití SDS PAGE elektroforézy. V tomto experimentu byly vzniklé skvrny (spoty) na nanovlákně membráně vyhodnocené denzitometricky pomocí detekční stanice ChemiDoc™ XRS se softwarem GeneTools.

4.4.1 Optimalizace ředění primární protilátky a sekundární protilátky

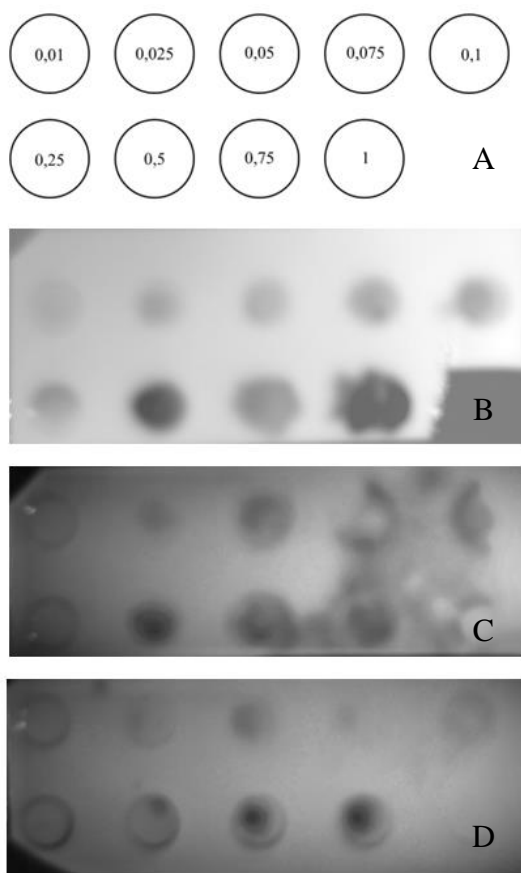
Cílem tohoto experimentu byla optimalizace ředění anti-ovalbuminové králičí protilátky na ovalbumin adsorbovaný na PVDF (Immuno-Blot™) membráně. Druhým dílčím cílem bylo optimalizovat množství anti-králičí IgG protilátky značené křenovou peroxidázou.

Anti-králičí IgG protilátka značená HRP byla nejdříve použita ředěna 1:10000 5% sušeným mlékem, dle doporučení výrobce. To je znázorněno na obrázku 19. Spoty nebyly vůbec patrné. Toto ředění se v prvních pokusech ukázalo jako nedostačující ani pro vyšší koncentrace adsorbovaného ovalbuminu, a proto bylo sníženo její ředění na 1:8000 5% sušeným mlékem.

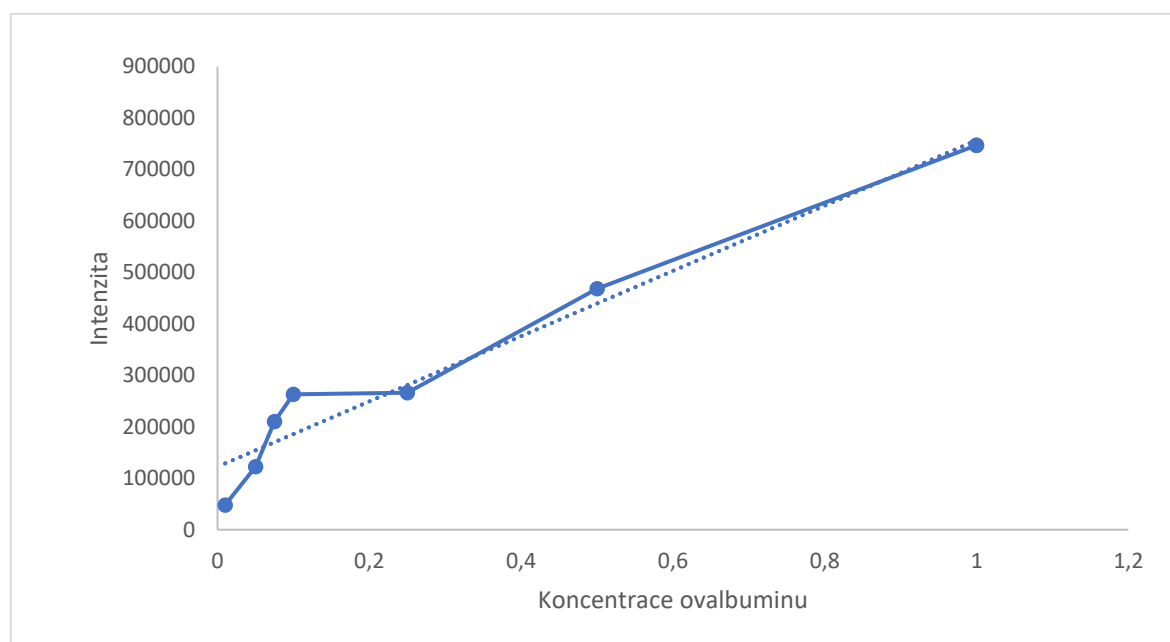


Obrázek 19: Výsledek dot blotu při ředění anti-králičí IgG protilátky značené HRP 1:10000 5% sušeným mlékem, spoty nejsou vůbec patrné

PVDF (Immuno-Blot™) membrána byla ekvilibrována roztokem methanolu a dále roztokem fosfátového pufru pH 7,3. V dalším kroku byl nadávkován roztok antigenu (ovalbuminu) o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ podle schématu na obrázku 20 A. Po usušení a přidání blokačního roztoku dle postupu viz kapitola 3.11. byla dále aplikována anti-ovalbuminová králičí protilátka ve třech různých ředěních: 1:250, 1:500 a 1:1000. Sekundární protilátka anti-králičí IgG konjugována s HRP, která váže protilátku specifickou (anti-králičí ovalbumin) pro sledovaný protein v tomto případě ovalbumin ředěna 1:8000 5% sušeným mlékem. Enzym HRP působí na substrát, kterým je peroxid vodíku, který působí na luminol a ten uvolňuje světelný signál. Výsledné membrány jsou zobrazeny na obrázku 20 B, C, D. Na grafu 6 je zobrazena intenzita signálu po ředění primární anti-králičí protilátky 1:250, která vzrůstá se vzrůstající koncentrací antigenu.



Obrázek 20: Optimalizace ředění primární anti-ovalbuminové králičí protilátky, podle schématu A byl dávkován antigen ovalbumin v $\mu\text{g/ml}$, primární anti-králičí protilátka ředěná 1:250 B, primární anti-králičí protilátka ředěná 1:500 C, primární anti-králičí protilátka ředěná 1:1000 D



Graf 6: Intenzita signálu pro ředění primární anti-králičí protilátky 1:250

Výsledné membrány s ředěním primární anti-králičí protilátky 1:500 a 1:1000 nebyly dostatečně citlivé a homogenní v poskytnutém signálu, nezobrazily všechny spoty, jelikož v prvních spotech nebyl poskytnut žádný nebo jen minimální signál. Ředění protilátky 1:250 poskytovalo dostatečný signál ve všech spotech. Nejvhodnějším ředěním primární protilátky bylo také po denzitometrickém vyhodnocení zvoleno 1:250 a bylo použito v dalších experimentech.

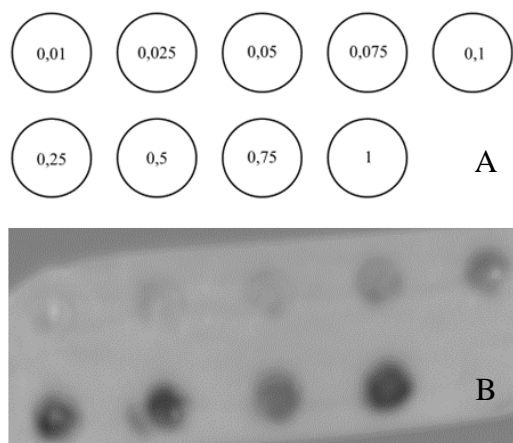
4.4.2 Dot blot analýza na ostatních membránách

Membrány z acetylcelulózy, polyamidu a chitosanu nebyly pro dot blot využity vzhledem k jejich nevhodným mechanickým vlastnostem. Membrána z chitosanu byla příliš křehká, kvůli malé pevnosti v tahu a nízké odolnosti vůči přetržení. Tyto charakteristiky popisuje ve své práci i Antonio et al. (2022). V tomto pokusu došlo k přetržení chitosanové membrány po ekvilibraci methanolem a zapojení vakuové pumpy.

Acetylcelulózová membrána se po ekvilibraci methanolem razantně zmenšila a již s ní nebylo možné dále pracovat. Polyamidová membrána se chovala podobně jako membrána z acetylcelulózy. Manipulace s ní byla problémová, po odstranění podkladu se navíc lepila k sobě. Tyto dvě membrány v předchozích pokusech navíc prokázaly nízkou vaznost pro ovalbumin, i z tohoto důvodu byly pro dot blot vybrány membrány vyrobené z PVDF, které vykazovaly mnohem vyšší účinnost vazby tohoto proteinu.

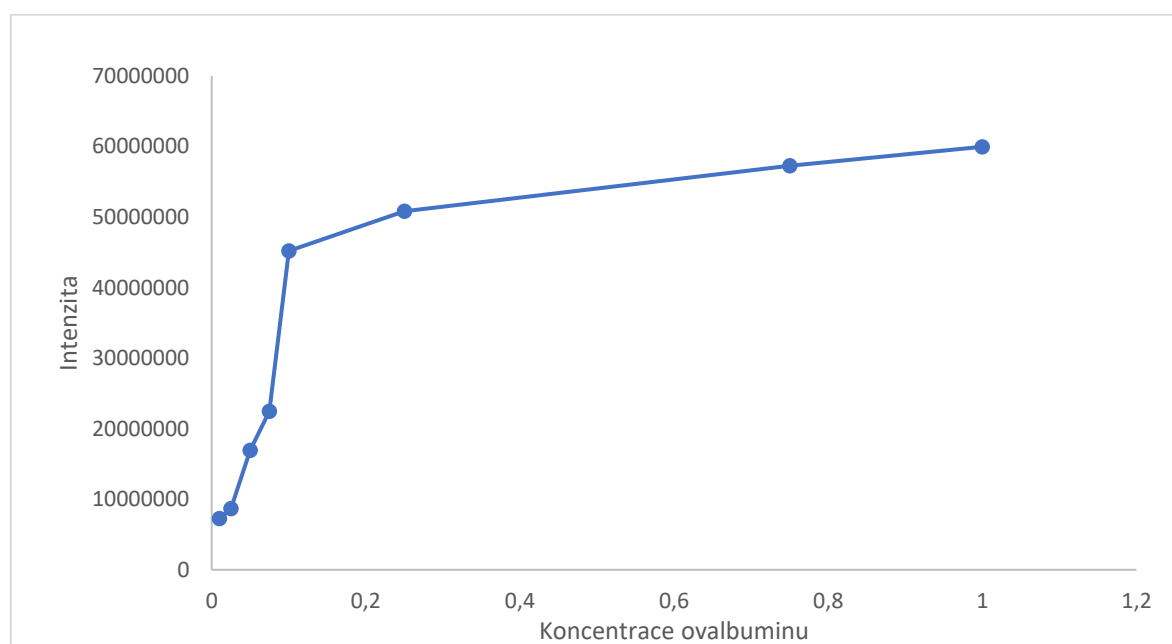
4.4.3 Ověření optimálních podmínek na PVDF (Immuno-Blot™) membráně

Následující dot blot analýza na PVDF (Immuno-Blot™) membráně byla provedena za stejných podmínek a podle stejných postupů s využitím již optimalizovaného ředění primární protilátky 1:250, podle schématu na obrázku 21 A. PVDF (Immuno-Blot™) membrána je komerční membrána od firmy BIO-RAD pro dot blot.



Obrázek 21: Dávkování antigenu ovalbuminu v $\mu\text{g/ml}$ podle schématu A, primární anti-králičí protilátka ředěná 1:250 navázaná na antigen (ovalbumin), konjugát anti-králičí IgG ředěno 1:8000, na PVDF (Immuno-Blot™) membráně B

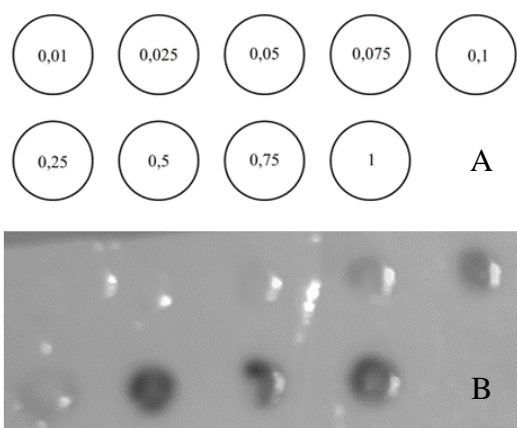
Na grafu 7 je patrný rychlejší nelineární trend u menších koncentrací antigenu stejně jako u prvního experimentu při optimalizaci množství primární protilátky.



Graf 7: Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení PVDF (Immuno-Blot™) membrány, se vzrůstající koncentrací antigenu vzrůstá i intenzita vzniklých spotů.

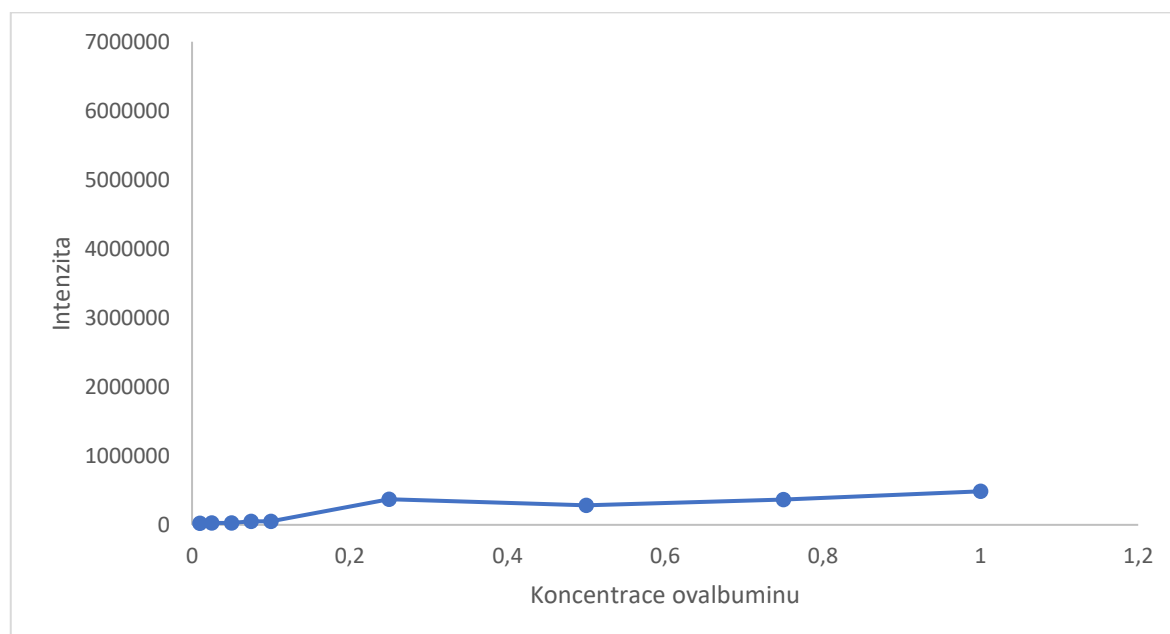
4.4.4 Dot blot analýza na PVDF (Solef 1015) membráně

Další dot blot analýza s nanovláknennou PVDF (Solef 1015) membránou byla provedena se stejnými optimalizovanými podmínkami a podle stejných postupů jako u předchozího experimentu podle schématu na obrázku 22 A.



Obrázek 22: Podle schématu A byl dávkován antigen ovalbumin v $\mu\text{g/ml}$, primární anti-králičí protilátka ředěná 1:250 navázaná na antigen (ovalbumin), konjugát anti-králičí IgG ředěno 1:8000, na PVDF (Solef 1015) membráně

Zatímco na membránu PVDF (Solef 1015) se antigen navázal ve výrazně nižším množství, je patrný velmi nízký signál antigenu, který se se zvyšující koncentrací antigenu nelineárně zvyšuje, jak je patrné z grafu 8.



Graf 8: Grafické znázornění denzitometrického vyhodnocení PVDF (Solef 1015) membrány, se vzrůstající koncentrací antigenů vzrůstala velmi mírně i intenzita vzniklých spotů

Při porovnání výsledků obou membrán lze z intenzit zbarvení spotů vynesných v závislosti na koncentraci použitého antigenů (ovalbuminu) usoudit, že na PVDF (Immuno-Blot™) membránu se Atg vázal v dostatečném množství už při nízkých koncentracích a intenzita se s přibývajícím množstvím antigenů nelineárně zvyšovala.

Ve studii Kinoshita-Kikuta et al. (2020) použili ovalbumin stejného dodavatele (Sigma-Aldrich), který nanесли na PVDF membránu v množství 1-2000 ng. Dávkované množství antigenu na jeden spot bylo v jejich případě 2 μ l, v našem případě bylo dávkováno 100 μ l tj. 1000 ng antigenu (ovalbuminu). Podle článku byl signál na dot blotu detekovatelný do 62,5 ng ovalbuminu. Se snižujícím se množstvím vloženého proteinu ovalbuminu v uvedené studii klesala úměrně i intenzita signálu. V této studii využili nově vyvíjené fluorescenční barvivo Phos-tag Aqua pro zviditelnění intenzity signálu spotů. V našem experimentu bylo použito komerční barvivo Clarity Max, které je kompatibilní se sekundárními protilátkami konjugátu značenými HRP.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo připravit bioaktivní nosič z nanovláčkových membrán pro oblast využití v LFA testech s výhodami nanorozměrných materiálů. Jako modelový antigen byl zvolen ovalbumin, což je protein izolovaný z vaječného bílku. Nejdříve byly optimalizovány podmínky adsorpce ovalbuminu na modelová chitosanová nanovláčková dodaná firmou Nanovia s.r.o. Doba adsorpce byla optimalizována na 2 hodiny, teplota na 37 °C a množství vkládaného proteinu na 0,1 mg/ml ovalbuminu.

Pro vazbu ovalbuminu na NF byly využity dva způsoby, a to metoda adsorpce, při níž se uplatňují Van der Waalovy síly, vodíkové vazby a hydrofobní interakce a karbodiimidová kovalentní vazba. Ověření účinnosti navázání modelového antigenu (ovalbuminu) proběhlo s využitím microBCA testu a nepřímou metodou ze supernatantů, v případě adsorpce. Účinnost karbodiimidové metody vazby byla ověřena metodou SDS PAGE elektroforézy s denzitometrickým vyhodnocením v softwaru ImageLab. Z provedených experimentů vyplynulo, že metoda adsorpce ovalbuminu (0,1 mg/ml) na chitosanová NF vykazovala účinnost vazby 63 %, zatímco karbodiimidová metoda dosáhla při stejné koncentraci ovalbuminu nejvyššího výsledku účinnosti 38 %.

V průběhu dalších experimentů s PVDF (Immuno-Blot™), PVDF (KynarFlex 2800), PA6 (B24), PVDF (Solef 1015) a acetylcelulóзовou membránou byla využita metoda adsorpce ovalbuminu. Vyhodnocením účinnosti vazby ovalbuminu na jednotlivé membrány byly nejlepší výsledky dosaženy u PVDF (KynarFlex 2800) a PVDF (Solef 1015) membránami. Účinnost vazby byla vypočítána u první zmíněné na 63 % a u druhé jmenované na 67 %. Pro srovnání komerční PVDF (Immuno-Blot™) membrána dosahuje účinnosti 66 %.

Pro imunochemické ověření vazby byla navržena a optimalizována metoda dot blot s nanovláčkovou membránou. V metodě byla nejprve optimalizována ředění primární (1:250) i sekundární protilátky (1:8000) s použitím komerční PVDF (Immuno-Blot™) membrány. Dot blot analýza byla nejdříve s komerční PVDF (Immuno-Blot™) membránou denzitometricky vyhodnocena. Následovaly další analýzy s nanovláčkovými membránami, z nichž nejlepšího výsledku dosáhla uvedená PVDF (Solef 1015) membrána. Přestože byla specifická protilátka na membránu navázána, nedosáhla takové odezvy, jako s komerční PVDF (Immuno-Blot™) membránou. Experiment by bylo vhodné vícekrát zopakovat pro vytvoření dalších úprav protokolu.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Allcock, L.H.: A Perspective of Polyphosphazene, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2006, 4, doi.10.1007/s10904-006-9052-9.
2. Arsalan A., Younus H.: Enzymes and nanoparticles, modulation of enzymatic activity via nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules.*, 2018, 118, doi.10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030.
3. Auría-Soro C., Nesma T., Juanes-Velasco P., Landeira-Viñuela A., et al.: Interactions of nanoparticles and biosystems: Microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine, *Nanomaterials (Basel)*, 2019, 9, 1365, doi.10.3390/nano9101365.
4. Bahadır E.B., Sezginturek M.K.: Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 82, 286-306, doi.10.1016/j.trac.2016.06.006.
5. Baker R.S.: PVDF or Nitrocelulose, *G-Biosciences*, 2014, 1-9.
6. Baranwal J., Barse B., Fais A., Delogu G.L., et al.: Biopolymer: A Sustainable Material for food and medical applications, *Polymers (Basel)*, 2022, 14, 983, doi.10.3390/polym14050983.
7. Behančínová P.: Vývoj chitosanových materiálů s ligandem pro regenerativní medicínu, 2019, Diplomová práce, Univerzita Pardubice.
8. Bolková A.: Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici, 2021, Diplomová práce, Univerzita Pardubice.
9. Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., et al.: Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in animal original foodstuffs using native antisera labeled by colloidal gold, *Talanta*, 2014, 119, 125-132, doi.10.1016/j.talanta.2013.10.054.
10. Cai Y., Wei Q., Huang F.: Processing of composite functional nanofibers, *Woodhead Publishing Series in Textiles*, 2012, 38-54, doi.10.3389/fbioe.2020.00885.
11. Cole L.A.: Biological functions of hCG and hCG-related molecules, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2010, 8-102, doi.org/10.1186/1477-7827-8-102.

12. Cui Z., Driolia E., Lee M.O.: Recent progress in fluoropolymers for membranes, *Progress in Polymer Science*, 2014,164-198, 10.1016/j.progpolymsci.2013.07.008.
13. Dowd E.S., Halonen M.J., Maier M.J.: *Immunological methods*, Amsterdam Academic Press, 2009, 225-241, doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00012-2.
14. Elmarco dostupné z: www.elmarco.cz, staženo:15.2.2023.
15. Fontananova E., Bahattab M.A., Aljil S.A., Alonardy M.: From hydrophobic to hydrophilic polyvinilidenfluoride (PVDF) membranes by gaining new insight into materials properties, *RSC Advances*, 2015, 1-13, doi.org/10.1039/C5RA08388E.
16. Fu Q., Yuan L., Can F., Zang L., et al.: Lateral flow strip biosensor based on streptavidin-coated gold nanoparticles with recombinase polymerase amplification for the quantitative point-of-care testing of Salmonella, *Microchemical Journal*, 2021, 171, 106-859, doi.org/10.1016/j.microc.2021.106859.
17. Gelkop S., Sobarzo A., Brangel P., Vincke C., et al.: Development and validation of a novel nanobody-based competitive ELISA for detection of foot-and-mouth disease 3ABC antibodies in cattle, *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5-250, doi.org/10.3389/fvets.2018.00250.
18. Gie-Gan P.: Water resistance and biodegradation properties of conventionally-heated and microwave-cured cross-linked cellulose nanocrystal/chitosan composite films, *Polymer Degradation and Stability, Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2021, 133, doi.10.1016/j.polymdegradstab.2021.109563.
19. Giepmans B.N., Adams S.R., Ellisman M.H., Tsien R.Y., et al: The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function, *Science*, 2006, 312, doi.10.1126/science.1124618.
20. Goryacheva I.Y., Lenain P., Saeger S.D.: Nanosized labels for rapid immunotests, *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 46, 30-43, doi.10.1016/j.trac.2013.01.013.
21. Gubala V., Harrisová L., Ricco A.J., Tan M.X et al.: Point of Care Diagnostics: Status and Future, *Analytical Chemistry*, 2012, 487-515, doi.10.1021/ac2030199.

22. Guo I., Chen S., Guo J., Ma X., et al.: Nanomaterial Labels in Lateral Flow Immunoassays for Point-of-Care-Testing, *Journal of Materials Science & Technology*, 2021, 60, 90-104, doi.10.1016/j.jmst.2020.06.003.
23. Haider A., Haider S., Kang I.K.: A Competitive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arabian Journal of Chemistry*, 2018, 11, 1165-1188, doi.10.1016/J.ARABJC.2015.11.015.
24. Hlaváček A., Skládal P.: Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii, *Chemické listy*, 2011, 105, 611-615.
25. Horlock C.: Bitesized imunology: Experimental techniques ELISA. Dostupné z: www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay, staženo: 23.3.2023.
26. Hu J., Wang S., Wang L., Li F., et al.: Advances in paper-based point-of-care diagnostic, *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 585-597, doi.10.1016/j.bios.2013.10.075.
27. Hu X., Liu S., Zhou G., Huang Y., Xie Z., et al.: Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications, *Journal Controlled Release*, 2014, 185, 12-21, doi.10.1016/j.jconrel.2014.04.018.
28. Huang, L., Tian S., Zhao W., Liu, K. et al.: Aptamer-Based lateral flow assay on-Site *Biosensors, Biosensors and Bioelektronics*, 2021, 186, doi.10.1016/j.bios.2021.113279.
29. Chaghmarani G.A., Taherina Z., Heidarneszhad Z., Moradi Z., et al.: Application of nanofibers based on natural materials as catalyst in organic reactions, *Journal of industrial and engineering chemistry*, 2021, 94, 1-61, doi.org/10.1016/j.jiec.2020.10.028.
30. Choi D.H., Lee S.K., Oh Y.K., Bae B.W., et al.: A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin, *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25, 1999-2002, doi.10.1016/j.bios.2010.01.019.

31. Jaisankar A., Krishnan S., Rangasamy S.: Recent developments of aptamer-based lateral flow assays for point-of-care (POC) diagnostics, *Analytical Biochemistry*, 2022, 655, doi.10.1016/j.ab.2022.114874.
32. Jia P., Zedong L., Wang X., Feng X., et al.: Performance improvement of lateral flow assay using heterogeneous nitrocellulose membrane with nonuniform pore size, *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 2023, 143, doi.10.1146/annurev-anchem-061417-125737.
33. Keury Ch.: Nanofiber technology: Current status and emerging developments, *Progress in Polymer Science*, 2017, 70, 1-17, doi.10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2017.03.002.
34. Khalifehzadeh R., Razieh B., Ratner D.: Trifluoromethyl for blood contact applications, *Biomaterials Science*, 2019, 7, 3764-3778, doi.10.1039/C9BM00353C.
35. Khan A., Rashid R., Murtaza G., Zahra A.: Gold nanoparticles: Synthesis and applications in Drug Delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, 7-13, doi.10.4314/tjpr.v13i7.23.
36. Kim Y.T., Jung J.H., Choi Y.K., Seo T.S.: A packaged paperfluidic-based microdevice for detecting gene expression of influenza A virus, *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 61, 485-490, doi.10.1016/j.bios.2014.06.006.
37. Kinoshita-Kikuta E., Ahayama K., Kinoshita E., Koike T, et al.: A dot blot staining method for detecting phosphoproteins with a Phos-tag Aqua fluorescent dye, *Journal of Electrophoresis*, 2020, 64, doi.102198/jelectroph.64.7.
38. Koczula K.M., Gallotta A.: Lateral flow assays, *Essays Biochemistry*, 2016, 60, 111-120, doi.10.1042/EBC20150012.
39. Košťálová E.: Elektrostatické zvláknování: Výroba polymerních nanovláken a jejich využití v kompozitních materiálech, *Ústav teoretické a aplikované mechaniky AVČR*, 2015, 1-25.
40. Li H., Han D., Hegener M.A., Pauletti G.M., et al.: Reproducibility of whole blood and other body fluid flow in simplified non-reaction lateral flow devices, *Biomicrofluidics*, 2017, 7-11, doi.10.1063/1.4979815.

41. Li N., Zhao P., Astruc D.: Anisotropic gold nanoparticles synthesis, properties, applications and toxicity, *Angewandte chemie international edition*, 2014, 53, 1756-1789, doi.10.1002/anie.201300441.
42. Lipman N.S., Jackson R.L., Trudel J.L., Weis-Garcia F.: Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources, *ILAR Journal*, 2005, 3, 258–268, doi.10.1093/ilar.46.3.258.
43. Liu Y., Zhan L., Qin Z., Sackrison J., et al.: Ultrasensitive and highly specific lateral flow assays for point of care diagnostic, *American Chemical Society*, 2021, 3593-3611, doi.org/10.1021/acsnano.0c10035.
44. Lu J.R., Xu H., Williams D.E.: Effect of Surface Packing Density of Interfacially Adsorbed Monoclonal Antibody on the Binding of Hormonal Antigen Human Chorionic Gonadotrophin, *Journal Physical Chemistry*, 2006, 110, 1907-1914, doi.10.1021/jp0538161.
45. Mahmood T., Yang P.: Western blot: technique, theory, and trouble shooting, *Medical Sciences*, 2012, 429-434, doi.10.4103/1947-2714.100998.
46. Mansfield M.A., Wong R.C., Tse H.Y.: The Use of nitrocellulose membranes in Lateral-Flow Assays, *drugs of abuse: Body Fluid Testing*, Humana Press, Totowa, 2005, 71-85, doi.10.1007/978-1-59259-951-6_4.
47. Mendes A.C., Stephansen K., Chronakis I.S.: Electrospinning of food proteins and polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 2017, 68, 53-68, doi.10.1016/j.foodhyd.2016.10.022.
48. Miller A., Rao, Abhijit S., Nelakanti, Sujana R. et al.: Systematic review of aptamer sequence reporting in the literature reveals widespread unexplained sequence alterations, *Analytical chemistry*, 2022, 7731-7737, doi.10.1021/acs.analchem.1c04407.
49. Montenegro J.M., Grazu V., Sukhanova A., Agawal S., et al.: Controlled antibody (bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery, *Advanced Drug Delivery*, 2013, 65, 677-688, doi.10.1016/j.addr.2012.12.003.

50. Nanopharma.cz/cs produkty a technologie/technologie dostupné z: www.nanopharma.cz, staženo:15.2.2023.
51. Neppallia R., Wanjaleb S., Birajdarb M., Causina V, et al.: The effect of clay and of electrospinning on the polymorphism, structure and morphology of poly (vinylidene fluoride), *European Polymer Journal*, 2013, 90-99, doi.10.1016/j.eurpolymj.2012.09.023.
52. Neveky E.L., Al-Dejab M.H., Kenany S.S.: Fabrication of electrospun antimicrobial nanofibers containing metronidazole, using nanospider technology, *Fibers Polymers*, 2012, 13, 709-717, doi. 10.1007/s12221-012-0709-4.
53. Oh Y.K., Joung H., Han Y.S., Suk H., et al.: A three-line lateralflow assay strip for the measurement of C-reactive protein covering a broad physiological concentration range in human sera, *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 61, 285-289, doi. 10.1016/j.bios.2014.04.032.
54. Ospálková B.: Dotblotové techniky pro porovnání afinity protilátek určených k imunoanalýze, 2018, Diplomová práce, Univerzita Pardubice.
55. Parolo C., Escosura-Muniz A., Merkoçi.: Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 40, 412-416, doi: 10.1016/j.bios.2012.06.049.
56. Petráš D., Kimmer D., Soukup K., Klusoň P.: Bezpečná nanovlákná. Spur a.s. Ústav chemických procesů Akademie věd ČR, *Chem Listy* 2009, 103, 1009-1016, ISSN 0009-2770.
57. Posthuma-Trumpie G.A, Wickers J.H., Koets M., Berendsen L.B., et al.: Amorphous carbon nanoparticles a versatile label for rapid diagnostic, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402, 593-600, doi.10.1007/s00216-011-5340-5.
58. Ramakrishna S., Fujihara K, Teo W.: An Introduction to electrospinning and nanofibers, Word Scientific Publishing, 2005, 3, doi.10.1142/9789812567611_0003.
59. Rodríguez M.O., Covián L.B., García A.C., Blanco-López M.C.: Silver and gold enhancement methods for lateralflow immunoassays, *Talanta*, 2016, 148, 272-278, doi. Doi.10.1016/j.talanta.2015.10.068.

60. Ružičková J.: Elektrostatické zvlákňování nanovláken, Technická Univerzita Liberec, 2004, 1, ISBN 80-7083-867-1.
61. Sadeghi P., Sohrabi H., Hejazi M., Jahanban-Esfahlan A., et al.: Lateral flow assays as an alternative medical diagnosis method for detection of virus species: The interwine of nanotechnology with sensing strategies, Trends Analytical Chemistry, 2021,145, doi.10.1016/j.trac.2021.116460.
62. Sajid M., Karode A.N., Daud M.: Designs, formats and applications of lateral flow assay, Journal of Saudi Chemical Society, 2015, 19, 689-705, doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001.
63. Schellenberg A., Ross R., Abagnale G., Joussen S., Schuster P., et al.: 3D nonwoven polyvinylidene fluoride scaffold: fiber cross-section and texturing patterns influence mesenchymal stromal cell growth, PLoS One, 2014, 9-11, doi.10.1371/journal.pone.0094353.
64. Smith C. L., Mika J.S., Nguyen G.H.: Immobilisation of DNA on Chips II. Topics in Current Chemistry, Elsevier, 2008, 261, 1202-1216, doi.10.1007/978-81-322-2283-5.
65. Smith S., Goodge K., Delaney M., Struzyk A., et al.: Comprehensive overview of covalent immobilization of biomolecules on electrospun nanofibers, Nanomaterials, 2020, 10, 2142, doi.10.3390/nano10112142.
66. Soh J.H., Chan H.M., Ying J.: Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device, Journal Nano Today, 2020, 30, doi.10.1016/j.nantod.2019.100831.
67. Stills H.F.: Polyclonal antibody production, American College of Laboratory Animal Medicine, 2012, 11, 259-274, doi.10.1002/0471142727.mb1112s81.
68. Stojanov S., Berlec A.: Electrospun nanofibers as carriers of microorganisms, stem cells, proteins, and nucleic acids in therapeutic and other applications, Bioengineering and biotechnology, 2020, 8, doi.org/10.3389/fbioe.2020.00130.
69. Šafarčík K., Bartoš V., Karlíková M.: Principy imunoanalytických metod, Univerzita Karlova, 2006.

70. Talha S.M.: Sensitive and quantitative lateral flow tests, Turun Yliopisto of Turku, 2021, 4-92, doi.10.3390/diagnostika11101760.
71. Torcello-Gomez A., Santander-Ortega M., Peula Garcia J., Maldonado-Valderrama J., et al.: Adsorption of antibody onto Pluronic F68-covered nanoparticles: link with surface properties, *Soft Matter*, 2011, 7, 8450-8461, doi.10.1039/C1SM05570D.
72. Váňová V.: Nosičové systémy na bázi chitosanu pro medicínské aplikace, 2018, Diplomová práce, Univerzita Pardubice.
73. Vashist S.K., Zhang B.B., Zheng D., Al-Rubeank, et al.: Sulfo-N-hydroxysuccinimide interferens with bicinchoninic acid protein assay, *Journal of Analytical Biochemistry*, 2011, 917, 156-158, doi.10.1016/j.ab.2011.05.045.
74. Vlčnovská M., Šmerková K., Vaculovičová M., Křížová K., et al.: Detection of nucleic acids by dot blot, *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 2014, 55-58, doi.10.1385/0-89603-369-4:165.
75. Voort D., Pelsers M., Korf J., Hermens W., et al.: A continuous displacement immunoassay for human heart-type fatty acid-binding protein in plasma, *Journal of Immunological Methods*, 2004, 295, 1-8, doi.10.1016/j.jim.2004.08.012.
76. Waentig L., Jakubowski N., Hardt S., Schuler Ch., et al.: Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western Blot Immunoassay combined with detection by laser ablation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2012, 27, 1311-1320, doi.10.1039/c2ja30068k.
77. Waentig L., Roos P.H., Jakubowski N.: Labelling of antibodies and detection by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24, 924-933, doi.org/10.1039/B905224K.
78. 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. *Int Journal of Nanomedicine*, 2014, 9, 1699-1707, doi.10.2147/IJN.S58942.
79. Wang Z.G., Was L.S., Liu Z.M., Huang X.J., et al.: Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers, *Journal of Molecular Catalysis and Enzymatic*, 2009, 56, 189-195, doi.10.1016/j.molcatb.2008.05.005.

80. Wang, X., Yang, D., Jia, ST. et al.: Electrospun nitrocellulose membrane for immunochromatographic test strip with high sensitivity, *Microchim Acta*, 2020, 187, 644, doi: 10.1007/s00604-020-04626-8.
81. Wu W., Zhao S., Mao Y., Fang Z., et al.: A sensitive lateral flow biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 detection based on aptamer mediated strand displacement amplification, *Analytica. Chimica. Acta*, 2015, 861, 62-68, doi.10.1016/j.aca.2014.12.041.
82. Xiang Y., Zheng Y., Liu S., Liu G. Et al.: Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes, *Scientific Reports*, 2021, 11, doi.org/10.1038/s41598-21-91521-8.
83. Xu T., Ji G., Li G., Zhou A., et al.: Preparation and Applications of Electrospun, Nanofibres for Wearable Biosensors, 2022, 12, 177, doi.org/10.3390/bios12030177.
84. Xue J., Wu T., Dai Y., Xia Y.: Electrospinning and Electrospun nanofibers: Methods, Materials and Applications, 2019, 119, 5298-5415, doi.10.1021/acs.chemrev.8b00593.
85. Yang X., Wang F., Song C., Wu S., et al.: Establishment of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of estradiol in milk samples, *LWT Food Science and Technology*, 2015, 64, 88-94, doi.10.1016/j.lwt.2015.04.022.
86. Zhang Z., Shi X., Wang R., Xiao A., et al.: Ultra-permeable polyamide membranes harvested by covalent organic framework nanofiber scaffolds: a two-in-one strategy, *Chemical Science*, 2019, 39, doi.10.1039/c9sc03088c.
87. Zhao H., Wang S., Zhang S., Liu J., Dong Y. et al.: State of the art: Lateral flow assay (LFA) biosensor for on-site rapid detection, *Chinese Chemical Letters*, 2018, 29, 1567-1577, doi.10.1039/c9sc03088c.
88. Zhong W.: Nanofibres for medical textiles, Woodhead Publishing, 2016, 57-70, doi. 10.1002/mabi.202100021.