

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Výběr a ověření reaktivity specifických protilátek a aptamerů pro vývoj HE4
senzoru

Diplomová práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Selection and Verification of the Reactivity of Specific Antibodies and Aptamers
for the Development of HE4 Sensor

Master thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ondřej Smrček**
Osobní číslo: **C23330**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Výběr a ověření reaktivity specifických protilátek a aptamerů pro vývoj HE4 senzoru**
Téma práce anglicky: **Selection and Verification of the Reactivity of Specific Antibodies and Aptamers for the Development of HE4 Sensor**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) Možné metody pro ověření reaktivity a afinity párů protilátka-antigen, aptamer-antigen – princip a uspořádání metod, výhod a nevýhody – dot-blot, povrchová plasmonová rezonance apod.
- 2) Uspořádání senzoru pro detekci HE4 s využitím kombinace specifických protilátek a aptamerů
- 3) Konkrétní příklady senzorů pro detekci HE4 proteinu – elektrochemické senzory, SPR senzory

Experimentální část:

- 1) Výběr komerčně dostupných specifických anti-HE4 protilátek a aptamerů – ověření čistoty a kvality pomocí SDS-PAGE
- 2) Ověření reaktivity vybraných specifických protilátek a aptamerů s antigenem HE4 pomocí blotovacích technik – dot-blot nebo western-blot s kolorimetrickou a chemiluminiscenční detekcí
- 3) Ověření reaktivity vybraných specifických protilátek a aptamerů s antigenem HE4 pomocí metody povrchové plasmonové rezonance (MP-SPR) – modifikace zlatých čipů pro imobilizaci protilátek a aptamerů, regenerace čipů, optimalizace podmínek vazby protilátek a aptamerů, ověření interakce s antigenem

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

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázích *Web of Science*, *NCBI*, *PubMed*, *Google Scholar*, atd. Další dle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Ondřej Morávek**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem *Výběr a ověření reaktivity specifických protilátek a aptamerů pro vývoj HE4 senzoru* jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 9.5.2025

Bc. Ondřej Smrček v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za milý přístup, bezproblémovou komunikaci a trpělivost při provádění experimentů a opravování této práce. Mé poděkování také patří Mgr. Ondřeji Morávkovi a Mgr. Dominiku Novákovi za přátelský přístup a nespočet poskytnutých rad při zavádění metody povrchové plasmonové rezonance. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé rodině a nejbližším přátelům za nepřetržitou podporu během celého studia.

ANOTACE

V teoretické části jsou shrnuty informace o lidském epididymálním proteinu HE4 a aptamerech. V další části jsou zmíněny příklady HE4 imunosenzorů a aptasenzorů a také metody pro ověření vazebné schopnosti a afinity aptamerů a protilátek, zejména povrchová plasmonová rezonance a techniky imuno-blotu, které byly využívány v rámci experimentální části diplomové práce pro ověření reaktivity dvou vybraných komerčních protilátek a dvou různě modifikovaných aptamerů. V poslední části jsou shrnuty dosažené výsledky testování vazebné schopnosti vybraných protilátek a aptamerů s proteinem HE4.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lidský epididymální protein 4, aptamery, protilátky, biosenzor, povrchová plasmonová rezonance, dot blot, afinita

TITLE

Selection and Verification of the Reactivity of Specific Antibodies and Aptamers for the Development of HE4 Sensor

ANNOTATION

The theoretical part summarizes information about the human epididymal protein HE4 and aptamers. In the next section, examples of HE4 immunosensors and aptasensors are mentioned, as well as methods to verify reactivity of aptamers and antibodies, in particular surface plasmon resonance and immunoblotting techniques, which were used in the experimental part of the thesis to determine the reactivity of two selected commercial antibodies and two aptamers differing in modification. The last part summarizes the results of testing the binding ability of the selected antibodies and aptamers with HE4 protein.

KEY WORDS

Human epididymal protein 4, aptamers, antibodies, biosensor, surface plasmon resonance, dot blot, affinity

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	13
ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 LIDSKÝ EPIDIDYMÁLNÍ PROTEIN 4 (HE4)	16
1.1.1 Struktura a vlastnosti HE4	16
1.1.2 Ovariální karcinom	17
1.1.3 Diagnostické využití HE4	17
1.2 APTAMERY – STRUKTURA A ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA	18
1.2.1.1 Typy aptamerů	20
1.2.2 Metoda SELEX	21
1.2.2.1 Modifikace aptamerů	22
1.3 ZÁKLADNÍ POPIS PROTILÁTEK A JEJICH TVORBA	23
1.4 VAZEBNÉ VLASTNOSTI APTAMERŮ A PROTILÁTEK A METODY JEJICH OVĚŘENÍ	24
1.4.1 Porovnání vlastností protilátek a aptamerů	25
1.4.2 Metody stanovení afinity a reaktivity protilátek a aptamerů	25
1.4.2.1 Povrchová plasmonová rezonance	26
1.4.2.2 Dot blot analýza	30
1.4.2.3 Afinitní chromatografie	32
1.4.2.4 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi	33
1.4.2.5 Radioimunoanalýza	34
1.4.2.6 Bio-layer interferometrie	35
1.4.2.7 Termoforéza v mikroměřítku	36
1.4.2.8 Isotermální titrační kalorimetrie	36
1.5 BIOSENZORY PRO DETEKCI HE4	37
1.5.1 Uspořádání biosenzoru	37
1.5.1.1 Konstrukce bioreceptoru a biokompatibilní vrstvy	38
1.5.2 Komerčně dostupné anti-HE4 protilátky a aptamery	40
1.6 PŘÍKLADY BIOSENZORŮ PRO DETEKCI HE4	40
1.6.1 Elektrochemické biosenzory pro detekci HE4	41
1.6.2 Optické biosenzory pro detekci HE4	44

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
2.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	49
2.2 POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA V PROSTŘEDÍ DODECYLSULFÁTU SODNÉHO	50
2.2.1 Použité reagensie a chemikálie	50
2.2.2 Použité roztoky	50
2.2.3 Postup	50
2.2.4 Barvení gelu roztokem amoniakálního stříbra	52
2.2.4.1 Použité chemikálie	52
2.2.4.2 Použité roztoky	52
2.2.4.3 Postup barvení.....	52
2.3 OVĚŘENÍ REAKTIVITY PÁRŮ PROTILÁTKA – ANTIGEN A APTAMER – ANTIGEN METODOU DOT BLOT	53
2.3.1 Použité reagensie a chemikálie	53
2.3.2 Použité roztoky	54
2.3.3 Postup – Sestavení aparatury a dávkování vzorků	54
2.4 MULTIPARAMETRICKÁ POVRCHOVÁ PLASMONOVÁ REZONANCE.....	56
2.4.1 Použité chemikálie.....	56
2.4.2 Použité roztoky a jejich příprava	57
2.4.3 Postup analýzy protilátek	58
2.4.4 Ověření funkčnosti Regenerable Avidin kit čipu.....	60
2.4.5 Postup analýzy aptamerů.....	61
2.4.6 Export a vyhodnocení záznamů sensogramů	63
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	64
3.1 OVĚŘENÍ ČISTOTY A KVALITY PROTILÁTEK METODOU SDS-PAGE	64
3.2 OVĚŘENÍ REAKTIVITY PROTILÁTEK A APTAMERŮ METODOU DOT BLOT	65
3.3 OVĚŘENÍ REAKTIVITY SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK A APTAMERŮ S HE4 METODOU POVRCHOVÉ PLASMONOVÉ REZONANCE	67
3.3.1 Porovnání tvorby samoskladné monovrstvy pomocí 3-MPA a 11-MUDA	69
3.3.2 Ověření reaktivity monoklonálních anti-HE4 protilátek 2B13 1.1. s HE4	71
3.3.3 Ověření reaktivity monoklonálních anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s HE4	72
3.3.3.1 Ověření reaktivity monoklonálních anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s denaturovaným HE4.....	74

3.3.4	Ověření funkčnosti biotinem-modifikovaného zlatého čipu	75
3.3.5	Ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů CTAp-M-582 s HE4	77
3.3.6	Ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů CTAp-SH s HE4	79
4	ZÁVĚR	81
	POUŽITÁ LITERATURA	83

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Seznam obrázků:

Obr. 1 - Sekundární a terciární struktura ssDNA GST-2.....	19
Obr. 2 - Schéma jednoho cyklu konvenční SELEX metody.....	22
Obr. 3 - Příklady modifikovaných struktur nukleotidových aptamerů	23
Obr. 4 - Princip vzniku povrchové plasmonové rezonance	27
Obr. 5 - Vzorový příklad sensogramu	29
Obr. 6 - Dot blot aparatura s 96 jamkami od společnosti Carl ROTH.....	31
Obr. 7 - Přehled všech čtyř základních uspořádání ELISA.....	34
Obr. 8 - Schéma biosenzoru	37
Obr. 9 - Ukázka realizace SPR biosenzoru pro vazbu anti-HE4 protilátky a HE4.....	39
Obr. 10 - Zobrazení jednotlivých kroků konstrukce biosenzoru.....	41
Obr. 11 - Schéma konstrukce bimetalického biosenzoru	42
Obr. 12 - Schéma elektrochemického senzoru s magnetickou částicí	43
Obr. 13 - Schéma imunoanalýzy pro detekci HE4.....	44
Obr. 14 - Schéma přípravy senzoru pro detekci HE4.....	45
Obr. 15 - Schéma konstrukce ratiometrického biosenzoru	47
Obr. 16 - Schéma dávkování vzorků na membránu pro každý aptamer a klon protilátky.	55
Obr. 17 - Výsledek SDS-PAGE pro ověření čistoty a kvality použitých proteinů.....	65
Obr. 18 - Výsledek dot blot analýzy pro ověření reaktivity anti-HE4 protilátek	66
Obr. 19 - Výsledek dot blot analýzy pro ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů.....	67
Obr. 20 - Ukázka kompletního sensogramu analýzy HE4	69
Obr. 21 - Schéma postupu tvorby SAM vrstvy a aktivace čipu pro imobilizaci protilátek...	70
Obr. 22 - Sensogramy pro porovnání tvorby 11-MUDA a 3-MPA SAM vrstvy ověřením vazby anti-HE4 protilátek.....	70
Obr. 23 - Vazebné křivky interakce protilátek anti-HE4 2B13 1.1. s nativním antigenem HE4	71
Obr. 24 - Vazebná křivka anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. na 11-MUDA.....	72
Obr. 25 - Vazebné křivky interakce anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s nativním antigenem HE4	73
Obr. 26 - Vazebné křivky interakce anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s nativním a denaturovaným antigenem HE4.....	74

Obr. 27 – SPR sensogramy pro ověření funkčnosti anti-HE4 aptamerů CTApM-582 a biotinem modifikovaného čipu	76
Obr. 28 - Vazebné křivky avidinu a anti-HE4 aptamerů CTApM-582	77
Obr. 29 - Vazebné křivky interakce anti-HE4 aptameru CTApM-582 s nativním antigenem HE4	78
Obr. 30 – Vazebné křivky interakce anti-HE4 aptamerů CTApSH s AuNPs	79
Obr. 31 - Vazebné křivky interakce anti-HE4 aptamerů CTApSH s nativním antigenem HE4	80

Seznam tabulek:

Tab. 1 - Porovnání základních vlastností aptamerů a protilátek	25
Tab. 2 - Roztoky a jejich objemy pro přípravu dělicího a zaostřovacího SDS-PAGE gelu	51

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AgNPs – Nanočástice stříbra

APTES - (3-aminopropyl)triethoxysilan

AuNPs – Nanočástice zlata

BLI – *Bio-layer* interferometrie

ČSKB ČLS JEP – Česká společnost klinické biochemie České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

DPV – Diferenčně pulsní voltametrie

ELISA – Enzymová imunoanalýza na pevné fázi

FTO – Fluorem-dopovaný oxid cínu

HE4 – Lidský epididymální protein 4

HRP – Křenová peroxidáza

IC₅₀ – 50 % maximální inhibiční koncentrace

IgG – Imunoglobulin G

ITK – Izotermální titrační kalorimetrie

ITO – Elektroda z oxidu titaničitého dopovaného indiem

K_D – Rovnovážní disociační konstanta

KSP – Kyselé syrovátkové proteiny

LOD – Limit detekce

LOQ – Limit kvantifikace

LRET – Luminiscenční rezonanční přenos energie

LSPR – Lokalizovaná povrchová plasmonová rezonance

MP-SPR – Multiparametrová povrchová plasmonová rezonance

MST – Termoforéza v mikroměřítku

OC – Ovariální karcinom

PCR – Polymerázová řetězová reakce

PEG – Polyethylenglykol

RIA – Radioimunoanalýza

SAM – Samoskladná monovrstva

SDS-PAGE – Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

SELEX – Systematická evoluce ligandů exponenciálním obohacováním

SPR – Povrchová plasmonová rezonance

Str-HRP – Streptavidin-křenová peroxidáza

SWV – Square wave voltametrie

WFDC – Whey four-disulfide core protein

3-MPA – 3-merkaptopropionová kyselina

11-MUDA – 11-merkaptoundekanová kyselina

ÚVOD

Lidský epididymální protein 4 (HE4) je glykoprotein, sloužící jako onkomarker, jehož nadměrný výskyt je běžně spojován s maligní formou rakoviny vaječníků. Při screeningu karcinomu ovarií dnes bývají standardně zjišťovány koncentrace HE4 a CA 125 kombinované pro výpočet algoritmu rizika výskytu zhoubného nádoru ovarií (ROMA), jenž bere i v úvahu momentální hormonální stav ženy, který může mít na hladinu obou markerů znatelný vliv. Díky včasné detekci HE4 je možné odhalit rakovinu i v presymptomatické fázi. HE4 je v současnosti rutinně stanovován imunoanalytickými metodami. Nicméně jsou již v literatuře popsány i biosenzory, které mají potenciál v širším screeningu rizikových pacientek.

Protilátky jsou dlouho považovány za zlatý standard při volbě rozpoznávacího prvku pro konstrukci biosenzoru. Jejich diagnostické využití je z hlediska specifity a selektivity enormní. Jejich možnými alternativami na poli diagnostiky jsou aptamery, syntetické DNA/RNA oligonukleotidy, které se vyznačují, díky jejich unikátnímu způsobu syntézy, nízkou variabilitou mezi šaržemi a díky jejich specifitě a selektivitě jsou široce uplatnitelné stejně jako protilátky. Jejich dosavadní komerční dostupnost není ale tak velká a jsou obvykle syntetizovány na zakázku. I přestože jejich potenciál není dosud plně využíván, je jejich uplatnění stále roste, zejména právě v oblasti vývoje biosenzorů.

Selektivita biosenzoru je dána povahou a kvalitou rozpoznávacího prvku, což může být enzym, buněčný receptor, protilátky či aptamery. Ty nejvhodnější rozpoznávací prvky jsou voleny na základě afinity vůči cílové molekule. Afinita, definující sílu vazby mezi dvěma biomolekulami, je posuzována stanovením rovnovážných (K_D), disociačních (K_d) a asociačních konstant (K_a). Mezi metody, které lze využít k posouzení afinity interakcí dvou biomolekul, se řadí povrchová plasmonová rezonance. Jedná se o optickou metodu, pomocí které je možné zkoumat vazebné interakce dvou ligandů v reálném okamžiku. Ke stanovení afinity lze dále využít imunoanalytické metody, jako je např. enzymová imunoanalýza na pevné fázi, radioimunoanalýza, dot blot, isotermální titrační kalorimetrie, afinitní chromatografie, a jiné.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lidský epididymální protein 4 (HE4)

Lidský epididymální protein 4 je poměrně krátce diagnosticky využívaným biomateriálem, který řadíme mezi nádorové markery. Může být produkován ve zvýšeném množství buď samotným nádorem anebo hostitelským organismem v odpovědi na jeho přítomnost. Nádorové markery lze obecně využít pro odhad agresivity nádoru, monitorování účinnosti jeho léčby, samotnou detekci v ranném stádiu či prognózu vývoje [1, 2].

Bylo prokázáno, že existuje souvislost mezi výskytem HE4 v abnormálně vysokých koncentracích a rakovinou vaječníků. Tento protein je využíván společně s biomarkerem CA 125 pro spolehlivou detekci ranného, často asymptomatického stadia tohoto závažného onemocnění [1, 3, 4].

1.1.1 Struktura a vlastnosti HE4

HE4 protein je 124 aminokyselin dlouhý glykoprotein, který se vyskytuje převážně ve formě homotrimeru propojeného disulfidickými vazbami. Každý z monomerů váží přibližně 14 kDa. Je zařazován do rodiny takzvaných *whey acidic four-disulfide core* proteinů (WFDC), díky které nese alternativní zkratku WFDC2 protein. Tato rodina je podskupinou širšího uskupení kyselých syrovátkových proteinů (KSP), pro které je typickou funkcí inhibice proteáz, což lze potvrdit u HE4 přítomností 15 genů pro tyto serinové inhibitory, které se nacházejí na jedné ze dvou bílkovinných podjednotek, jež obsahuje. Bylo prokázáno, že se podílí na inhibici širokého spektra serinových, cysteinových nebo aspartátových proteáz, což nasvědčuje, že by se mohl podílet na regulaci proteolytických funkcí v biologickém systému [5–8].

Geny kódující KSP a mimo jiné i HE4 byly prokázány na chromozomu 20q12–13.1. Jejich zvýšená exprese byla potvrzena u rakoviny prsu a vaječníků. Za normálních okolností je v lidském těle genová exprese HE4 prokazatelná v průdušnici, slinných žlázách, plicích, prostatě, štítné žláze, a v ledvinách [3, 9, 10].

Lidský epididymální protein 4 byl prvně objeven a izolován z lidského nadvarlete, konkrétně lumenu jeho vývodu. Bylo zjištěno, že v této tkáni se nachází celkem šest typů mRNA, podle kterých bylo syntetizováno šest různých cDNA, jež byly následně klonovány a vystavovány protilátkám proti syntetickým peptidovým epitopům. Touto metodou bylo identifikováno celkem 6 proteinů dnes označovaných HE1–HE6 [9, 11, 12].

1.1.2 Ovariální karcinom

Rakovina vaječníků, často přezdívana šeptající či tichá rakovina představuje celosvětově pátou nejčastější příčinu úmrtí žen. Dle průzkumů je celosvětově každý rok prokázáno přes 225 tisíc nových případů rakoviny vaječníků a s tím spojených přes 140 tisíc úmrtí. Závažnost tohoto onemocnění je umocňována faktem, že až 70 % případů této rakoviny je odhaleno až v pozdním, často metastatickém stádiu, na stupních III/IV z klasifikace vytvořené Mezinárodní federací gynekologů a porodníků, jelikož rané fáze jsou asymptomatické a bez zřejmých projevů. Ovariální karcinom je také nejčastější příčinou úmrtí způsobených gynekologickým onemocněním [3, 4, 6, 13].

Je známo hned několik podstatných faktorů, které mohou jak negativní, tak i pozitivní vliv na vznik a progresi rakoviny vaječníků. Nejvýznamnější s negativním dopadem zahrnují:

- Genetickou predispozici: Nejvýznamnější činitel, který je zaviněný genetickými mutacemi genů BRCA1 a BRCA2. Tento faktor byl identifikován u přibližně 20 % pacientek s více zmíněnou rakovinou [14, 15].
- Hormonální substituční terapii: Prokazatelné zvyšování rizika bylo odhaleno u postmenopauzálních žen. Estrogenová terapie může zvyšovat riziko vzniku rakoviny vaječníků o přibližně 22 %. U kombinované estrogen/progesteron terapie to může být až 10 % [14].
- Životní styl: Do této skupiny se řadí více běžné faktory jako je obezita, kouření nebo užívání nesteroidních antiflogistik [14].

Rakovina vaječníků může manifestovat jako benigní (nezhoubná) nebo maligní (zhoubná) forma, přičemž prevalence benigních onemocnění je vyšší u premenopauzálních žen (nad 90 %) než u těch postmenopauzálních (60 %) [6].

1.1.3 Diagnostické využití HE4

Jako nejběžnější diagnostický marker přítomnosti ovariálního karcinomu (OC) byl dříve využíván zejména onkogenní marker CA 125. V dnešní době je ale směřována pozornost na HE4, jelikož nabízí hned několik výhod oproti samotnému CA 125. Jednou z nich je schopnost rozlišení nezhoubné a zhoubné formy karcinomu. Tento protein navíc vykazuje vyšší specifitu a citlivost u časných stadií rakoviny, což je speciálně pro včasné zachycení OC zásadní [3, 14, 16].

Lidský epididymální protein 4 vykazuje ve srovnání s CA 125 nižší četnost falešně pozitivních výsledků, např. u výskytu endometriózy, zánětlivých onemocnění [17] či nezhoubných nádorů [18]. Dalším omezením CA 125 je fakt, že k nadměrné proliferaci markeru dochází u přibližně 50–60 % jedinců s ranným stádiem choroby a u až 20 % případů OC není CA 125 prokazatelný. HE4 prokazatelně vykazuje vyšší senzitivitu u žen mladších 50 let, naopak CA 125 je vhodnější volba pro ženy nad 50 let [19, 20].

HE4 jako samostatně využitý marker vykazuje u pacientek s OC či různými benigními, gynekologickými onemocněními specifitu 96 % při senzitivitě 67 % [1]. Další zdroj [16] uvádí, že tento marker samostatně vykazuje nejvyšší senzitivitu 72,9 % při specifitě 95 %. Dále pak při porovnání s jinými možně využitelnými markery (CA 125, atd.), vykazuje nejvyšší senzitivitu v ranném (62,4–82,7 %) i pozdním stádiu (74,6–92,5 %) onemocnění.

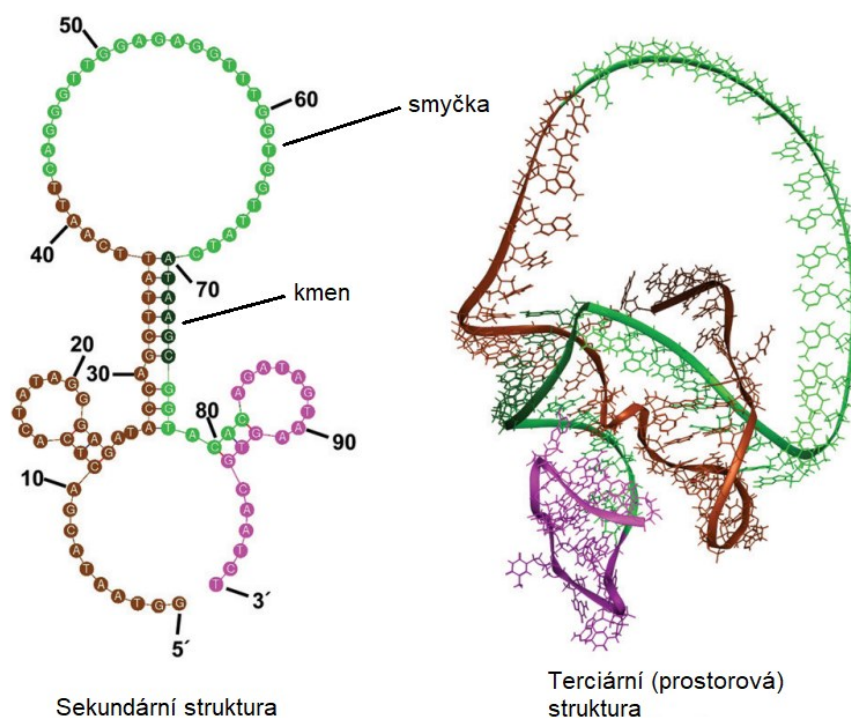
Dle doporučení České společnosti klinické biochemie České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (ČSKB ČLS JEP) [1] je vhodné použít k diagnóze maligního nádoru HE4 za předpokladu, že není prokazatelně zvýšená hladina CA 125, což představuje přibližně jednu třetinu případů. Specifické hodnoty nárůstu a poklesu HE4 lze využít k monitorování průběhu choroby, její progresu a účinnosti terapie.

1.2 Aptamery – struktura a základní charakteristika

Aptamery jsou poměrně novými biomolekulami, které jsou neustále vyvíjeny pro nové cílové struktury. I přestože jejich první syntéza byla uskutečněna roku 1990, využití těchto biomolekul nadále stoupá. Největší uplatnění nacházejí ve farmakologii jako transportéry léčiv nebo jako samotná terapeutika. V rámci diagnostiky je jejich rutinní využití dodnes omezené a jsou využívány hlavně ve výzkumu [21].

Aptamery jsou jednořetězcové nukleové kyseliny o délce obvykle 20–100 nukleotidů. Mohou být odvozené od DNA nebo RNA, rozlišují se tedy na dva podtypy. Mimo primární konformaci, která udává pořadí nukleotidů v řetězci, a sekundární konformaci, jenž popisuje lokální prostorové uspořádání řetězce, má každý aptamer unikátní terciární konformaci, která je přizpůsobena vazebnému cíli, tak že tvoří trojrozměrná vazebná místa (aptatopy), viz **Obr. 1**. Specifita jejich trojrozměrné struktury spočívá ve tvorbě vazebných kapes, štěrbin, smyček a dalších uspořádání [22–25]. Tyto molekuly jsou schopny se vázat na různé vazebné cíle od malých iontů [26], antibiotik [27], organických barviv [28] až po živé buňky či různé parazity [29], obdobně jako jejich analogy, protilátky. Vazby mezi aptamery a jejich ligandy jsou zprostředkovány mezimolekulárními interakcemi jako jsou například nekovalentní Van der

Waalsovy vazby, Coulombické interakce, vodíkové můstky nebo elektrostatické interakce. Mají také, jako běžné nukleové kyseliny, záporný náboj kvůli přítomnosti fosfátových skupin v molekule. Proto preferují interakce s kladně nabitými ligandy. Aptamery někdy musí při adaptaci na cílové molekuly přizpůsobit svoji prostorovou konformaci, aby byla zajištěna jejich vazebná schopnost [22–25].



Obr. 1 - Sekundární a terciární struktura ssDNA GST-2. Převzato a upraveno z [30]

Vazebná kapacita aptamerů je kvantifikována pomocí rovnovážné disociační konstanty (K_d), jejíž interval se běžně pohybuje v řádech $\mu\text{mol/L}$ – pmol/L . Hodnoty K_D se stanovují biofyzikálními metodami jako je například povrchová plasmonová rezonance nebo termoforéza v mikroměřítku [21, 23, 24].

Oligonukleotidové aptamery snadno podléhají hydrolýze, ke které dochází hlavně *in vivo* při terapeutickém využití. Částečným řešením tohoto problému je chemická modifikace aptamerů, viz kap. 1.2.2.1. Pokud bychom porovnali jednotlivé podtypy oligonukleotidových aptamerů, tak DNA jsou v porovnání s RNA pomalejší ve tvorbě prostorových vazebných míst. Dalším zásadním faktorem, který může ovlivňovat vazebné schopnosti aptamerů, je teplota. Výrazné výkyvy teplot mohou způsobit změny v sekundární a terciární struktuře molekuly. Určitý vliv může dále mít i pH a iontové síly [21–23]

Všechny aptamery, které jsou syntetické, jsou získávány *in vitro* metodou takzvané

systematické evoluce ligandů exponenciálním obohacováním (SELEX), z angl. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, viz kap. 1.2.2 [22, 23].

Vzhledem k vlastnostem oligonukleotidových aptamerů v *in vivo* prostředí, jsou v současnosti především využívány v biomedicínských zobrazovacích technikách a jako rozpoznávací prvek biosenzorů. Uplatnění nacházejí i jako terapeutika, ačkoliv jsou pro tyto účely favorizované aptamery peptidové [21–23].

1.2.1.1 Typy aptamerů

Peptidové aptamery

Peptidové (proteinové) aptamery byly poprvé vyvinuty roku 1996 Brentem a kol. [31] jako alternativa k oligonukleotidovým aptamerům. Jsou definovány jako jednoduché proteinové molekuly, u kterých je určitá sekvence peptidů (5-20 peptidových smyček) ukotvena na neutrálním proteinovém skeletu. Jejich proces syntézy a selekce je téměř identický k metodě SELEX. Jejich hlavní výhodou je *in vivo* stabilita a proto je možné je produkovat v bakteriálních buňkách či kvasinkách. Díky této a dalším vlastnostem, jako je například malá velikost, lepší rozpustnost, dobrá modifikovatelnost a schopnost rychlého skládání, jsou hlavně využívány buď jako transportéry účinných látek nebo jako samotná léčiva [24, 32].

Oligonukleotidové aptamery

Aptamery na bázi nukleových kyselin byly již popsány v předchozí kap. 1.2. Ty se podle nukleotidového složení řadí na RNA a DNA. Tyto aptamery mohou být dle morfologie buď monovalentní anebo se shlukovat do početnějších uskupení (multivalentní). Mezi oligonukleotidové aptamery se mimo jiné řadí riboswitch molekuly.

Riboswitch jsou molekuly nekódujících RNA, které ve své struktuře obsahují speciální vazebnou kapsu obsahující vždy jednu molekulu aptameru nesyntetického původu. Lze tedy o těchto molekulách hovořit jako o zdroji přirozeně se vyskytujících aptamerů. Tyto aptamery zde plní klíčovou roli jako vazebné molekuly. Riboswitch jsou výhradně využívány některými bakteriemi k detekci řady metabolitů a iontů, jenž mají zásadní dopad na genovou expresi, čímž mohou ovlivňovat finální fázi transkripce a iniciační fázi translace v proteosyntéze [33–35].

Multivalentní aptamery, poprvé navržené roku 1999 Shi a kol. [36], jsou strukturální jednotky tvořené dvěma či více aptamery, se stejným nebo odlišným motivem, najednou. Pokud jsou na základní strukturu aplikovány aptamery se stejným motivem, může být avidita vůči vazebnému cíli významně posílena. Naopak pokud jsou aplikovány molekuly s odlišnými

motivy, lze tuto strukturu využít k rozpoznávání vícero odlišných analytů najednou [37]. Multivalentní aptamery lze podle morfologické odlišnosti základní matrice rozdělit na 3 hlavní skupiny: sférické [38], jednovrstvé [39] a lineární [40].

Základem sférických aptamerů je duté či vyplněné jádro, na kterém jsou radiálně rozmístěné aptamery. Jádra jsou nejčastěji tvořena ze zlata [41] nebo stříbra [42], méně častější jsou ze syntetických polymerů [43] či různých oxidů kovů [44]. U jednovrstvých je základem planární vrstva tvořena buď z grafenu nebo z fosforenu. U lineárních aptamerů tvoří základní strukturu ohebný nebo rigidní skelet (ssDNA, dsDNA), na kterém jsou aptamery seřazeny v řadě za sebou [45].

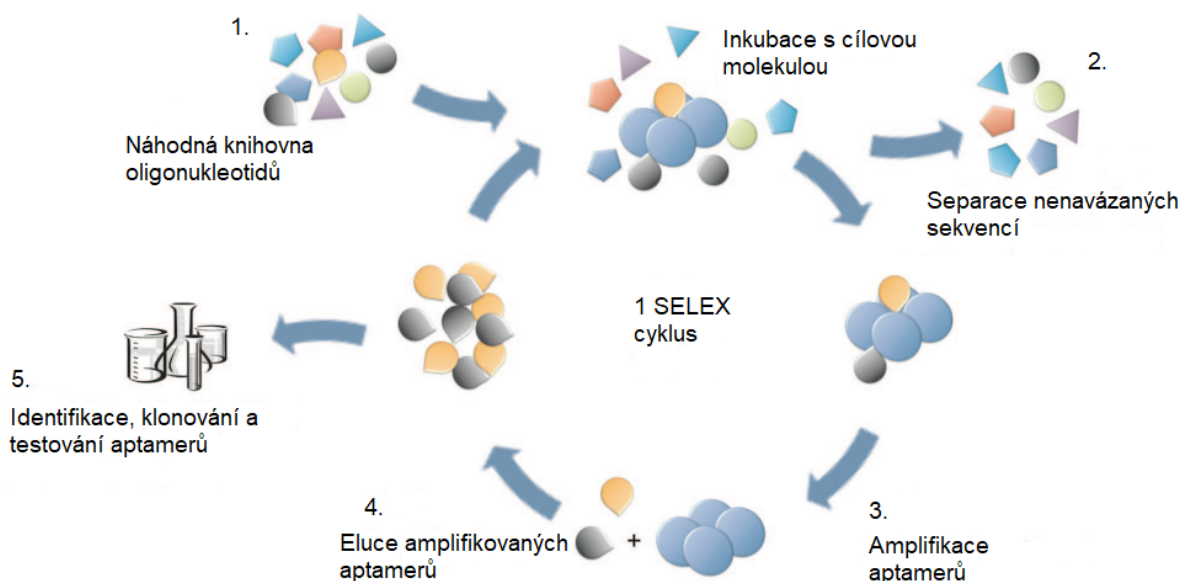
V praxi nacházejí největší uplatnění lineární a sférické aptamery, speciálně pak v diagnostice. Multivalentní aptamery se používají např. pro konstrukci biosenzorů (aptasenzory), které lze například využít v povrchové plasmonové rezonanci, cyklické voltametrii nebo elektrochemické impedanční spektroskopii. Nacházejí také uplatnění jako analytické sondy a nelze ani opomenout terapeutické využití [37, 45].

1.2.2 Metoda SELEX

Již dříve zmíněná systematická evoluce ligandů exponenciálním obohacováním byla roku 1990 současně navrhována 2 páry vědců Ellingtonem a Szostakem [46] a Tuerkem a Goldem [47]. Jedná se o vícefázový opakovaný proces afinitní selekce specifických oligonukleotidů namířených proti vybranému vazebnému cíli, což může být například kovový iont nebo až komplexní struktury jako bakterie nebo viry. Nejčastěji se ovšem zaměřuje na tvorbu aptamerů namířených proti různým proteinům [47, 48].

Jeden samotný cyklus SELEX lze rozdělit na 3 hlavní kroky. Prvním je inkubace cílové molekuly se souborem náhodně vygenerovaných oligonukleotidových sekvencí RNA nebo DNA, dlouhých obvykle 20-60 párů bází. Knihovna (soubor) běžně obsahuje kolem 10^{12} - 10^{15} různých nukleových kyselin, které jsou na obou koncích ohraničeny konstantními regiony. Jednotlivé nukleové kyseliny, imobilizované na nosiče jsou přidány k vybranému vazebnému cíli. Pokud jsou v souboru přítomny molekuly s kompatibilní vazebnou sekvencí, jsou na ně navázány. Po této fázi následuje druhý krok, jehož podstatou je separace vázaných molekul od zbylého, volného souboru. Tyto „očistěné“ oligonukleotidové aptamery jsou poté amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a připravovány na další cyklus SELEXu. Všechny tyto zmíněné kroky jsou opakovány do té doby, dokud není vygenerován dostatečně koncentrovaný aptamer namířený proti cílové molekule, viz **Obr. 2**. V praxi jsou

jednotlivé cykly opakovány obvykle 8–16 krát. Výsledný produkt je poté identifikován sekvenováním, klonováním a ověřením vazebných schopností [48–50].



Obr. 2 - Schéma jednoho cyklu konvenční SELEX metody. Převzato a upraveno z [50]

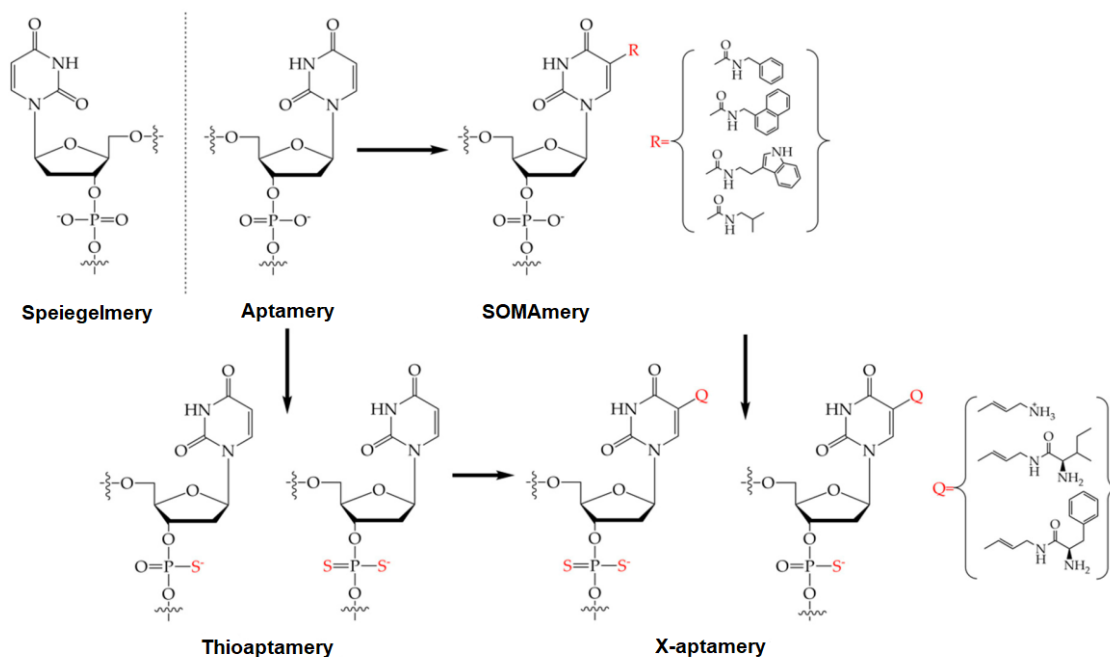
Konvenční metoda SELEX z roku 1990 je dnes již není využívána z důvodů velké časové náročnosti, nízké úspěšnosti a malé chemické diverzity nemodifikovaných aptamerů. Výsledkem snahy o neustálé vylepšení této metody jsou alternativní metody vycházející z původního SELEXu jako je například Cell-SELEX nebo Ex-SELEX, a další [49, 51, 52].

1.2.2.1 Modifikace aptamerů

Všechny vygenerované a selektované aptamery jsou běžně modifikovány za účelem vylepšení jedné nebo několika základních vlastností jako je afinita, selektivita, rezistence vůči nukleázám, tepelná stabilita, a pro účely farmakologie i biologická dostupnost či omezení rychlosti vylučování pomocí renální filtrace. Modifikace jsou prováděny pro zvýšení reaktivity aptamerů, které jsou v základu limitovány 5 dusíkatými bázemi [49, 53, 54].

Chemické modifikace zahrnují např. záměnu ribózového atomu kyslíku na pozici 4' a kyslíku ve fosfodiesterových vazbách za síru, cyklizaci molekuly nebo nejčastěji úpravu pozice 2' na ribózovém cyklu fluorem nebo aminovou funkční skupinou. Další možnou modifikací je konjugace aptamerů s nanočásticemi nebo léčivy, k čemuž je nutné umístit funkční skupiny na 3' a 5' konce oligonukleotidových řetězců, aby mohlo dojít k navázání. Bylo také prokázáno, že multivalentní aptamery dosahují vyšších diagnostických kvalit oproti monovalentním

protějškům. Zkracování konstantních regionů, také jinak neměnné sekvence nukleotidů, je také v některých případech využíváno [53, 54].



Obr. 3 - Příklady modifikovaných struktur nukleotidových aptamerů. Převzato a upraveno z [55]

Nejvíce využívané skupiny modifikovaných aptamerů jsou dnes tzv. Spiegelmery, SOMAmery, thioaptamery nebo nejnovější X-aptamery, viz **Obr. 3**. Spiegelmery jsou chirální, levotočivé molekuly aptamerů, které nacházejí hlavní uplatnění jako terapeutika díky totální rezistenci vůči nukleázám. SOMAmery jsou modifikovány tak, aby vykazovaly nízkou disociaci vůči vazebným cílům, což je využíváno u proteinů s vysokou afinitou a specifitou. Využití nacházejí jak v diagnostice, tak i v terapii. Thioaptamery jsou vytvářeny fosforothioátovou modifikací, při které dochází k substituci atomu kyslíku na fosfodiesterové kostře aptameru za atom síry. Vykazují jak zvýšenou odolnost vůči nukleázám, tak i vyšší vazebnou afinitu. Jsou spíše uplatňovány jako terapeutika. Poslední, X-aptamery mohou v molekule obsahovat navíc aminokyseliny, cukry, či různé funkční skupiny. Díky velké strukturální rozmanitosti jsou využívány jak v diagnostice, tak i jako terapeutika [55].

1.3 Základní popis protilátek a jejich tvorba

Protilátky jsou proteiny (imunoglobuliny) které vznikají v B-lymfocytech jako odpověď imunitního systému organismu na přítomnost patogenu. Mají dvě základní funkce. První je vazba na rozpoznané cílové molekuly a druhá je komunikace s ostatními složkami imunitního systému po navázání na antigen. Jsou to komplexní molekuly tvořené třemi, velikostně

podobnými částmi spojenými pantovou oblastí do tvaru Y. Každá část obsahuje 4 sekvence o přibližné délce 110 aminokyselin. Molekula imunoglobulinu se rozděluje na variabilní část (Fab region), ve které se nachází vazebné místo, paratop, který je specificky uzpůsoben pro vazbu antigenu, vůči kterému byl vytvořen. Druhá část, tvořící většinu molekuly, je označována jako konstantní (Fc region). Zajišťuje vazbu na receptory imunitních buněk, aktivaci komplementu a jejich transport. Na základě typu konstantního regionu se imunoglobuliny rozdělují na pět izotypů (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), z nichž nejzastoupenější jsou IgG. Imunoglobuliny G se skládají ze dvou těžkých (50 kDa, společně 100 kDa) a dvou lehkých (25 kDa, společně 50 kDa) polypeptidových řetězců vzájemně spojených k sobě disulfidovými vazbami [56].

Protilátky lze klasifikovat na polyklonální a monoklonální. Polyklonální látky jsou produkovány více různými klony B-lymfocytů a vykazují reaktivitu s více epitopy antigenů najednou [56]. Monoklonální protilátky jsou tvořeny jedním klonem B-lymfocytů a vážou se pouze na jeden specifický epitop antigenu. Jsou nejčastěji tvořeny hybridomovou technologií, kde je využíváno fúze imunizovaných B-lymfocytů s myelomovou buňkou [56, 57]. Další možnou metodou tvorby protilátek je rekombinantní technologie, kde jsou molekuly imunoglobulinů exprimovány v buněčných systémech, např. v *Escherichia coli* [58]. Existuje také metoda fágového displeje, ve které je vkládán gen pro specifický protein do bakteriofága [59] nebo metoda ribozomového displeje, ve které je vytvářen komplex proteinu a její mRNA s ribozomem, což je využíváno při identifikaci molekuly [60].

1.4 Vazebné vlastnosti aptamerů a protilátek a metody jejich ověření

Základem pro funkční afinitní biosenzor je správně vybraný rozpoznávací prvek, který je reprezentován protilátkami nebo aptamery. To, jak ochotně a rychle se může cílová molekula vázat, ovlivňuje afinita rozpoznávací molekuly, která definuje sílu vazebné interakce mezi dvěma členy. Je závislá na prostorovém uspořádání vazebných míst, velikosti kontaktní zóny a distribuci nabitých a hydrofobních skupin. Afinita je definována základními kinetickými parametry, tedy asociační (K_a) a disociační rovnovážnou konstantou (K_d), které popisují jak rychle vzniká a také zaniká komplex. Od afinity se odvíjí avidita, která představuje sumu afinit všech vazeb mezi dvěma vazebnými partnery. Dalšími podstatnými parametry popisujícími kvalitu molekuly je specifita a selektivita [61, 62].

1.4.1 Porovnání vlastností protilátek a aptamerů

Aptamery v mnoha aspektech diagnostického a terapeutického vykazují lepší vlastnosti než protilátky. Jsou stabilnější a vydrží dále uskladněné. Aptamery jsou díky *in vitro* technice přípravy metodou SELEX a jejich chemické podstatě mnohem lépe chemicky modifikovatelné a konjugovatelné např. s nanočásticemi. Obě skupiny látek jsou velikostně rozdílné. Protilátky dosahují velikosti 150–180 kDa, naopak aptamery jsou obvykle velikosti 5–15 kDa, což umožňuje navázání většího počtu molekul na povrchu senzoru. Na rozdíl od protilátek jsou aptamery reverzibilně denaturovatelné do původní prostorové konformace a tak lépe regenerovatelné. Na druhou stranu jsou více náchylné k enzymatické degradaci nukleázami *in vivo*. Protilátky se liší ve vlastnostech mezi šaržemi, což může představovat problémy v reprodukovatelnosti analýz [63–66].

Aptamery dosahují tak vysoké selektivity, že jsou schopné rozeznat u dvou proteinů posttranslační modifikace. Afinitní vlastnosti protilátek a aptamerů dosahují podobných hodnot. Disociační konstanty se pohybují v rozmezí nmol/L až pmol/L. Základní porovnání vlastností protilátek a aptamerů je shrnuto v **Tab. 1** [63–65].

Tab. 1 - Porovnání základních vlastností aptamerů a protilátek. Převzato z [21, 64, 65, 67]

	Aptamery	Protilátky
Velikost	5–15 kDa	150–180 kDa
Teplotní odolnost	Navrácení do původní konformace po zahřátí (70–95°C) a ochlazení	Po zahřátí nevratná denaturace
Specifita	Vysoká	Vysoká
Afinita (K_D)	nmol/L–pmol/L	nmol/L–pmol/L
Chemická konjugovatelnost	Jednoduchá (nanočástice, léčiva)	Obtížná, limitovaná
Chemická modifikovatelnost	Vysoká míra modifikovatelnosti	Limitovaná, složitá modifikovatelnost, snížení aktivity
Vazebné cíle	Velké rozpětí (ionty až bakterie)	Imunogenní molekuly
Minimální velikost cíle	60 Da	600 Da

Pozn. K_D – rovnovážná disociační konstanta, (k)Da – (kilo)dalton

1.4.2 Metody stanovení afinity a reaktivity protilátek a aptamerů

Hlavní pozornost je v této kapitole věnována metodě povrchové plasmonové rezonance a dot blotu, jelikož se jedná o techniky, které byly využity v experimentální části pro ověření reaktivity a vazebných vlastností specifických, komerčně vyrobených protilátek a aptamerů.

Dále jsou zmíněny další metody využitelné pro stejné účely, jako *bio-layer* interferometrie, termoforéza v mikroměřítku, isotermální titrační kalorimetrie, afinitní chromatografie, enzymová imunoanalýza na pevné fázi a jí podobná radioimunoanalýza.

1.4.2.1 Povrchová plasmonová rezonance

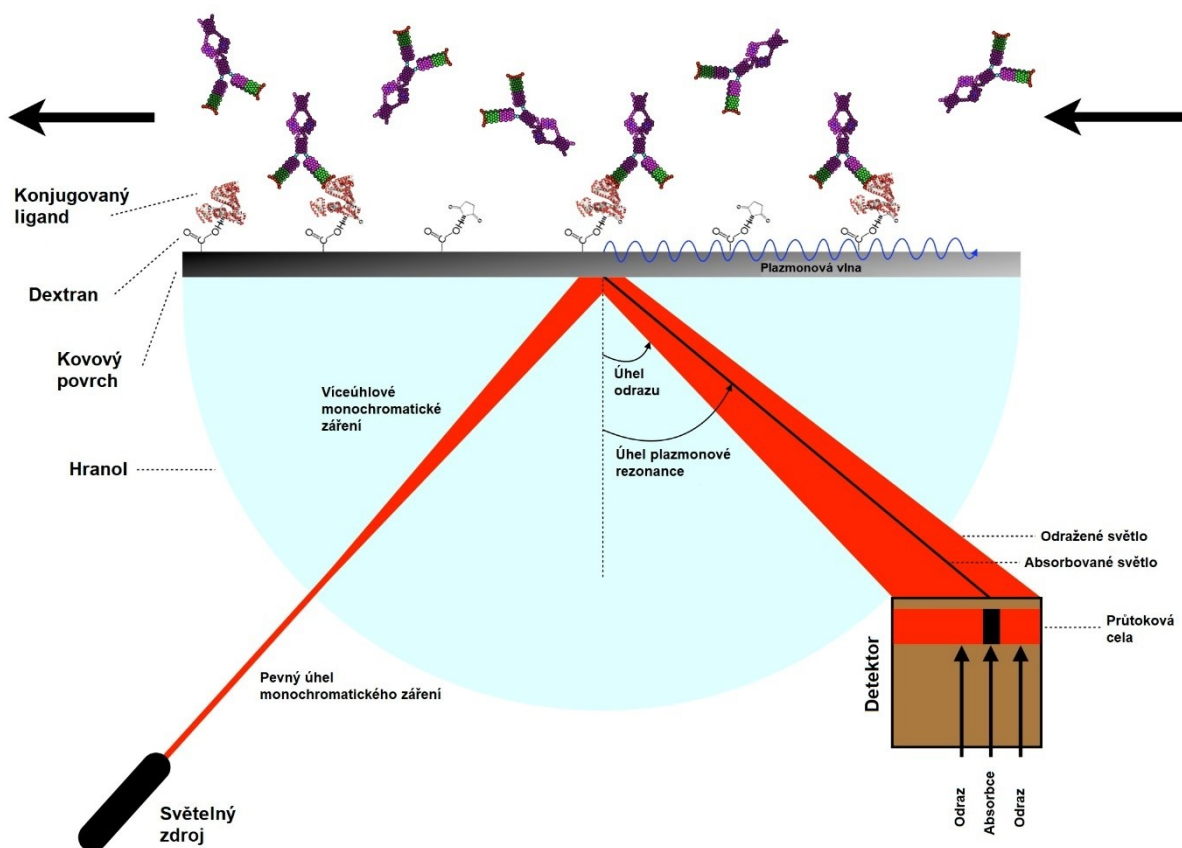
Povrchová plasmonová rezonance (SPR) je optická metoda, tzv. *label-free*, která je založená na měření refrakčního indexu polarizovaného světla, které dopadá na povrch senzoru a způsobuje na rozhraní kovu a dielektrické kapaliny oscilaci náboje. Základem každého SPR přístroje je optická jednotka, peristaltická pumpa, senzor (čip) a světlocitlivý senzor sloužící k převodu elektromagnetického záření na elektrický signál, z angl. *charge-coupled device* [68-70].

Princip povrchové plasmonové rezonance

Pokud je skrz hranol vysíláno p-polarizované záření, které dopadá na povrch senzoru pokrytého tenkou vrstvou kovu, dojde pod určitým sklonem k jejímu úplnému odražení. Pokud je úhel dopadu světla změněn, je možné pozorovat pokles v intenzitě jejího odražení. To je způsobené interakcí p-polarizovaného elektromagnetického záření s volnými elektrony kovu, což vede k jejich excitaci a oscilaci a tedy ke vzniku plasmonové rezonance na povrchu čipu. Specifický úhel, při kterém dochází ke maximální ztrátě v intenzitě reflektovaného záření o určité vlnové délce se nazývá SPR-dip a je závislý na optických vlastnostech obou stran kovové vrstvy. Pokud je na opačný povrch kovové vrstvy adsorbován hmotný objekt, např. protilátka nebo protein, může dojít ke změně indexu lomu a k posunu SPR-dipu [68].

Uspořádání přístroje

Senzor ve formě čipu, je centrem SPR přístroje, který vytváří pevnou přepážku mezi optickou jednotkou („suchá část“) a průtokovou celou („mokrý část“), která má za úkol dopravit analyt na povrch čipu, jak je schematicky znázorněno na **Obr. 4**. Základní deska čipu je ze skla, které je potaženo nanovrstvou kovových částic. V dnešní době je nejvyužívanější vrstva zlata nanášeného na čip ve formě sférických nanočástic (AuNPs). Uplatnění nachází také stříbro, které je obecně považováno za citlivější než zlato, jeho dlouhodobá stabilita je ovšem neuspokojivá kvůli náchylnosti k oxidaci [68, 70, 71]. Dalšími alternativami jsou nanočástice hliníku, platiny, mědi, chromu nebo niklu. Uplatnění nacházejí hlavně v elektrochemii. Kovové povrchy mohou být dále modifikovány vrstvou anorganických oxidů, např. vrstvou oxidu křemičitého, oxidu hlinitého nebo oxidu titaničitého [72]. Funkcionalizace může být nad rámec těchto modifikací dále upravována např. vrstvou karboxymethyl dextranu, biotinu, streptavidinu, proteinu G nebo PEG [72, 73].



Obr. 4 - Princip vzniku povrchové plasmonové rezonance. Převzato a přeloženo z [74]

SPR přístroje lze na základě typu optické jednotky rozdělit na tři typy. Jsou to systémy využívající buď hranoly, mřížky nebo optické vlnovody (optická vlákna). Nejčastější volbou jsou pro diagnostické účely optické systémy založené na hranolu s Kretschmannovou konfigurací [68, 70].

Vzorky jsou dávkovány do přístroje pomocí stříkaček přes septum do toku mobilní fáze. Součástí přístroje mohou také být pneumatické ventily nebo vzorkové smyčky v závislosti na výrobcu a typu přístroje. Vazebný roztok s nadávkovanými vzorky ze smyčky jde do průtočné cely s čipem. Dnes jsou už dostupné systémy s autosamplerem, který provede dávkování samostatně [68].

Příprava čipu a imobilizace rozpoznávacího prvku

SPR čip je senzorem, jehož kovový povrch lze modifikovat biologickým prvkem za účelem selektivní detekce specifických antigenů. K tomu se v praxi běžně využívají protilátky nebo aptamery (lze využít i antigeny). Vzhledem k nízké chemické reaktivitě zlata (v případě využití čistého AuNPs čipu) je ale ve většině případů potřeba tyto biomolekuly imobilizovat na propojovací vrstvě, která je ukotvena na povrchu nanočástic. Jedním ze způsobů jak toho dosáhnout je přípravou samoskladné monovrstvy, z angl. *self assembled monolayer* (SAM),

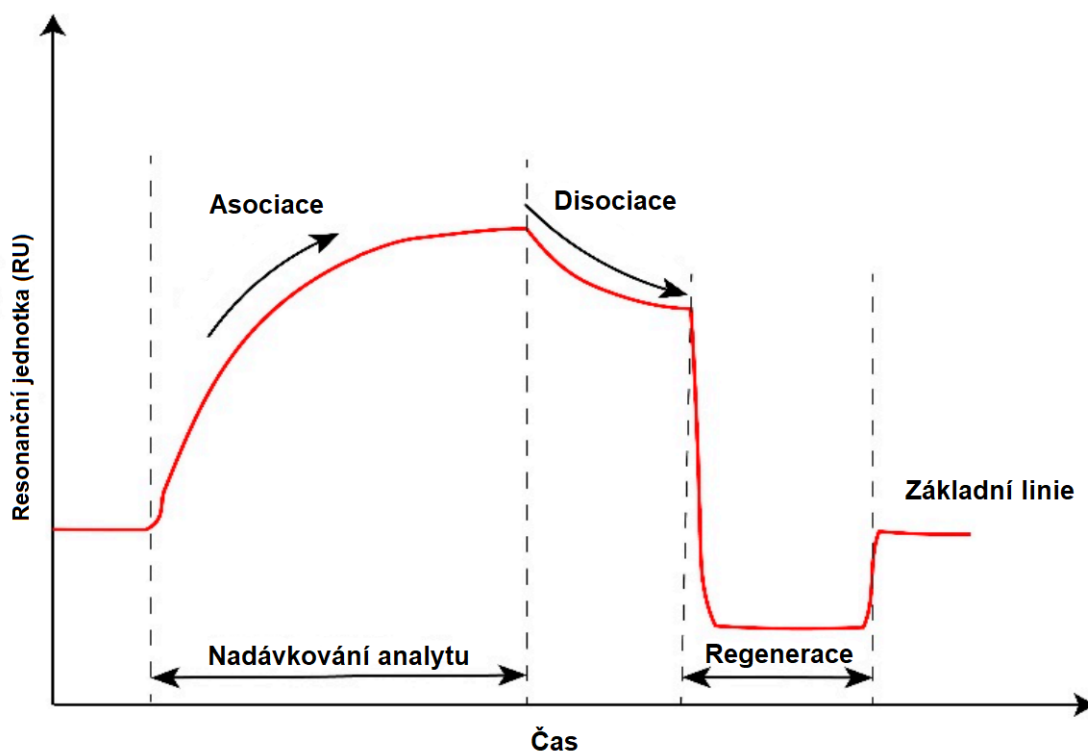
alkanů s thiolovými skupinami (3-MPA, 11-MUDA), (3-aminopropyl)triethoxysilanu (APTES) nebo hydrogelu, které vykazují dostatečnou vazebnou kapacitu, nízkou úroveň nespecifických vazebnosti a možnost orientované imobilizace. SAM je možné využít k navázání další vrstvy dextranové matrix, která poskytuje karboxylové funkční skupiny. Další, poměrně často využívanou alternativou je monovrstva grafenu, která vykazuje až pětinasobně vyšší citlivost oproti čistým AuNPs. Imobilizace rozpoznávacích prvků lze také dosáhnout prostřednictvím vazby streptavidin–biotin [70, 75–78].

Záznam a vyhodnocení výsledků

V případě navázání antigenu na protilátku nebo aptamer imobilizovaný na biosenzoru dochází k již zmíněné změně indexu lomu a tedy posunu SPR dipu, jehož okamžitá intenzita je přímo úměrná molární hmotnosti cílové molekuly a celkovému navázanému množství. Intenzita změny indexu lomu (posun SPR-dipu) je zaznamenávána v reálném čase jako sensogram, viz **Obr. 5**. Tato křivka představuje časový záznam změny rezonanční jednotky (RU), která popisuje posun úhlu minimálně odražené vlnové délky elektromagnetického záření (1000 RU odpovídá posunu o $0,1^\circ$). U analyzátoru MP-SPR NaviTM OTSO 200 od firmy BioNavis je úhlový rozsah v rozmezí $40\text{--}78^\circ$ [68, 75, 79, 80].

Typický průběh analýzy analytu ukazuje sensogram, viz **Obr. 5**, který rozděluje každou analýzu na 5 částí. Na začátku je stabilní základní linie odpovídající neměnnému povrchu čipu s imobilizovaným rozpoznávacím prvkem, dostatečně ekvilibrovaným vazebným roztokem. Tato základní rovina slouží jako indikátor přítomnosti případných nečistot nebo vzduchových bublin v systému. Před nadávkováním vzorku by měla být křivka stabilní. Druhá, asociační fáze, probíhá při nadávkování vzorku na čip. Exponenciálně vzrůstající křivka indikuje navazování analytu na rozpoznávací prvek, jenž je v tento moment větší než zpětný rozpad komplexu (disociace). Třetí fází je ustálený stav, tedy moment vzniku rovnovážné koncentrace komplexu. V momentě, kdy přes povrch senzoru přestane přicházet analyt a začne pouze proudit čistý vazebný roztok, nadchází čtvrtá, disociační fáze. Zde dochází k rozvolnění vazeb mezi molekulami rozpoznávacích prvků a analytu způsobené vymýváním vazebným roztokem. Poslední, pátou fází je regenerace povrchu čipu kyselinou nebo zásadou. Jejím účelem je kompletní odstranění všech molekul analytů navázaných na molekuly rozpoznávacích prvků. Volba správného roztoku pro regeneraci je závislá na charakteru vazby mezi rozpoznávacím prvkem a analytem. Nejčastěji jsou užívány roztoky s nízkým pH, např. 10 mmol/L HCl nebo glycinu, což u většiny proteinů způsobí částečné rozbalení a získá kladného náboje,

vedoucí k rozpadu vazby. Po dokončení by se měla nastolit původní základní linie a pak může být proveden další cyklus analýzy [81, 82].



Obr. 5 - Vzorový příklad sensogramu. Převzato a upraveno z [83]

SPR lze tedy použít pro studium interakcí biomolekul v reálném čase. Výsledkem vyhodnocení křivek sensogramů může být stanovení disociační, asociační a rovnovážné konstanty, které představují parametry interakční kinetiky. Povrchovou plasmonovou rezonanci lze také mimo jiné využít ke kvantifikaci cílové molekuly. Detekční limit běžného SPR přístroje se pohybuje v mezích ng/mL [68, 71].

Multiparametrická povrchová plasmonová rezonance (MP-SPR)

Multiparametrická SPR je speciálním typem povrchové plasmonové rezonance, která, stejně jako běžná SPR, umožňuje získat informace ohledně kinetických parametrů interakce analytu a vazebného prvku. Díky její goniometricky konfigurované optické sestavě může však analyzovat interakce molekul při několika vlnových délkách současně, kde jeden paprsek slouží jako měrný a druhý jako referenční. To napomáhá např. při zjišťování, jestli na čipu nedochází k nespecifické vazbě. Při vyhodnocování sensogramu je pro určitou vlnovou délku nutné odečíst referenční křivku pro zjištění množství navázaného analytu. Multiparametrická SPR může navíc poskytovat informace ohledně složení nanovrstvy čipu (refrakční index a tloušťka vrstvy) [84].

Výhody a nevýhody povrchové plasmonové rezonance

Hlavní výhodou SPR je absence značících molekul, kterých je například potřeba u běžných enzymatických nebo radiologických imunoanalýz. Inkubační, separační a detekční kroky jsou tím pádem jednodušší. Další výhodou *label-free* detekce je ten fakt, že jsou molekuly analytu zachovány v původní, nemodifikované formě, což umožňuje jejich opakované použití. SPR biosenzor vyžaduje pouze jeden biorekogniční prvek, což snižuje náklady na reagentie a zkracuje čas analýzy, i přesto je SPR poměrně časově náročnou metodou [85, 86].

Hlavní nevýhodou této analytické techniky je potřeba kompletní regenerace povrchu senzoru od SAM (pokud je využito) a imobilizovaných rozpoznávacích prvků. Toho může být dosaženo různými technikami a roztoky v závislosti na celkovém charakteru senzoru a vlastnostech vazeb [87].

1.4.2.2 Dot blot analýza

Dot blot je imunochemická metoda, založena na nanášení vzorků a detekci vzniklých komplexů na membráně jakožto pevné fázi. Jedná se o zjednodušenou variantu Western blotu, u které není uplatňována elektroforetická separace a blotování analytu z gelu na membránu. Metoda je založena na specifické vazebné interakci mezi antigenem a protilátkou (aptamerem) stejně jako v enzymové imunoanalýze na pevné fázi. Stejně jako v ELISA může být dot blot prováděn v přímém, nepřímém, ale i sendvičovém uspořádání v závislosti na charakteru stanovované biomolekuly, viz **Obr. 7**. Antigeny, které bývají zpravidla sorbovány na povrch membrány, jsou inkubovány s primárními protilátkami (aptamery), které jsou buď konjugovány se značkou anebo je využito sekundárních protilátek konjugovaných se značící molekulou. Dot blot může být využit pro kvalitativní či semi-kvantitativní účely [88–91].

Nejpoužívanějšími membránami jsou nitrocelulóзовé nebo polyvinylidenfluoridové (PVDF), méně častěji nylonové [90, 92]. Nitrocelulóзовé membrány mají vazebnou kapacitu 80–100 μg proteinu/ cm^2 a jsou vhodné pro detekci nízkomolekulárních proteinů (<25 kDa). Jsou nepoužitelné pro organické roztoky. PVDF membrány mají vazebnou kapacitu 150–200 μg proteinu/ cm^2 a jsou používány pro detekci proteinů s molekulovou hmotností nad 25 kDa. Mimo to vykazují v porovnání s nitrocelulóзовými membránami vyšší mechanickou pevnost a jsou vhodné pro organické roztoky [91, 93, 94]. Proces imobilizace rozpoznávacích prvků je řízen hydrofobním efektem a elektrostatickou přitažlivostí mezi molekulou a membránou [95].

Přítomnost sledovaných analytů je detekována kolorimetricky, fluorescenčně nebo luminiscenčně [92]. K tomu je nejčastěji volen enzym křenová peroxidáza [96], který katalyzuje H_2O_2 dependentní oxidaci chromogenního substrátu, např. diaminobenzidinu (DAB) [97], 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinu (TMB) nebo o-fenylendiamin dihydrochloridu (OPD) [98]. Dalším, často používaným enzymem, je alkalická fosfatáza, který katalyzuje přeměnu substrátů jako je např. p-nitrofenylfosfát nebo nitrotetrazoliová modř [99]. Jako alternativu k enzymům lze také využít kvantové tečky nebo nanočástice, např. AuNPs [92, 100]. Substráty jsou katalyzovanou reakcí měněny na barevné produkty. Intenzita zabarvení nebo emisního záření je úměrná množství komplexu na membráně. Membrána je po vhodně zvolené detekční metodě vyhodnocována denzitometricky [88].

Pro účely dot blot analýzy může být využíváno komerčně vyráběných plastových aparatur, které se běžně skládají ze tří částí a jsou spodní částí napojeny na vakuovou pumpu. Vrchní část má určitý počet kruhových jamek (běžně 24–96) pro pipetování vzorků. Mezi horní a prostřední část je umisťována membrána, viz **Obr. 6**. Spodní část slouží k odvodu napipetovaných kapalin prošlých skrz membránu. Alternativou dot blotu je slot blot, který využívá namísto kruhových komor protáhlé obdélníkové štěrbinu [89, 101].



Obr. 6 - Dot blot aparatura s 96 jamkami od společnosti Carl ROTH. Převzato z [102]

V porovnání s Western blotem je dot blot metodou, která je méně časově a materiálně náročná. Je také vhodná pro současnou aplikaci mnohonásobně většího množství vzorků než u Western

blotu, kde je množství značně limitováno počtem jamek v elektroforetickém gelu. Na druhou stranu, dot blot vykazuje vyšší šum pozadí a neposkytuje informace o velikosti a molární hmotnosti stanovovaných biomolekul [88, 103].

Metoda dot blot je i mimo kvalitativní a semi-kvantitativní analýzy využitelná pro stanovení afinity. To např. demonstrovali Svobodová a kol. (2013) [104], když využili metodu dot-ELISA ke stanovení afinity monoklonálních protilátek proti amyloidu beta (A β). Tato metoda se lišila od klasického dot blotu tím, že bylo mezi aplikacemi primárních a sekundárních protilátek využito sloučeniny thiokyanátu amonného (NH₄SCN) jako chaotropního činidla, které narušilo vazby antigenů s nízkoafinitivními protilátkami. Byla vytvořena taková kalibrační řada, díky které bylo možné získat hodnotu IC₅₀, což odpovídalo koncentraci NH₄SCN, při které docházelo k poklesu signálu o 50 % způsobeném disociací poloviny vzniklých komplexů. Analýza byla provedena na PVDF membráně a přítomnost vzniklých komplexů byla detekována kolorimetricky za využití enzymu křenové peroxidázy, který katalyzoval přeměnu substrátu DAB na fialový produkt. Afinitivní index monoklonálních anti-A β byl stanoven na 0,68 mol/L (0,68 mol/L NH₄SCN narušilo 50 % imunokomplexů).

Dalším příkladem je publikace od Li a kol. (2021) [105], ve které popisují využití techniky dot blot pro stanovení afinity DNA aptamerů proti S1 spike proteinu viru SARS-CoV-2. Pro analýzu použili najednou nitrocelulóзовou a nylonovou membránu s filtračním papírem. Jako formu detekce zvolili kolorimetrické (křenová peroxidáza) a radioizotopové (³²P) značení. Pomocí techniky dot blot byli schopni určit afinitu jednotlivých získaných aptamerů a vybrat dva nejvhodnější kandidáty, kteří vykazovali největší afinitu vůči S1 spike proteinu (MSA1 – 1,8 nmol/L a MSA5 – 2,7 nmol/L). Dot blot byl následně využit pro otestování afinity těchto dvou aptamerů vůči S1 proteinu v 50% roztoku lidských slin, ve kterém vykazovaly porovnatelné hodnoty (MSA1 – 2,3 nmol/L a MSA5 – 2,9 nmol/L). Ověřili tak nejen uplatnitelnost těchto aptamerů pro stanovení přítomnosti SARS-CoV-2, ale i využitelnost této metody pro stanovení afinity.

1.4.2.3 Afinitivní chromatografie

Afinitivní chromatografie je separační technika, která je využívána k oddělení biomolekul (enzymy, proteiny, protilátky, atd.) ze směsi v mobilní fázi na základě specifické interakce s rozpoznávacím prvkem přítomným ve stacionární fázi [106]. Campbell a kol. (1951) [107] byli prvními komu se podařilo touto metodou izolovat protilátky proti hovězímu sérovému albuminu. Pro účely analýzy mohou být jako rozpoznávací prvky použity např. protilátky,

aptamery nebo antigeny v závislosti na povaze analytu. Ty jsou imobilizovány na stacionární fázi jejíž základ tvoří matrice většinou z porézního materiálu (agaróza, celulóza, polyakrylamidu, oxid křemičitý). Je potřeba, aby stacionární fáze byla vůči mobilní fázi, s výjimkou analytu, zcela inertní, aby bylo zamezeno nescifickým vazbám a bylo zajištěno vázání pouze požadovaných molekul. Rozpoznávací prvky mohou být na stacionární fázi imobilizovány kovalentně za pomoci funkčních skupin (NH₂, SH, OH, COOH, atd.) nebo adsorpcí na povrch. Adsorpce může být specifická, např. vazba biotin-streptavidin, nebo nescifická, která je založena na Coulombických interakcích nebo vazbě přes vodíkové můstky [106].

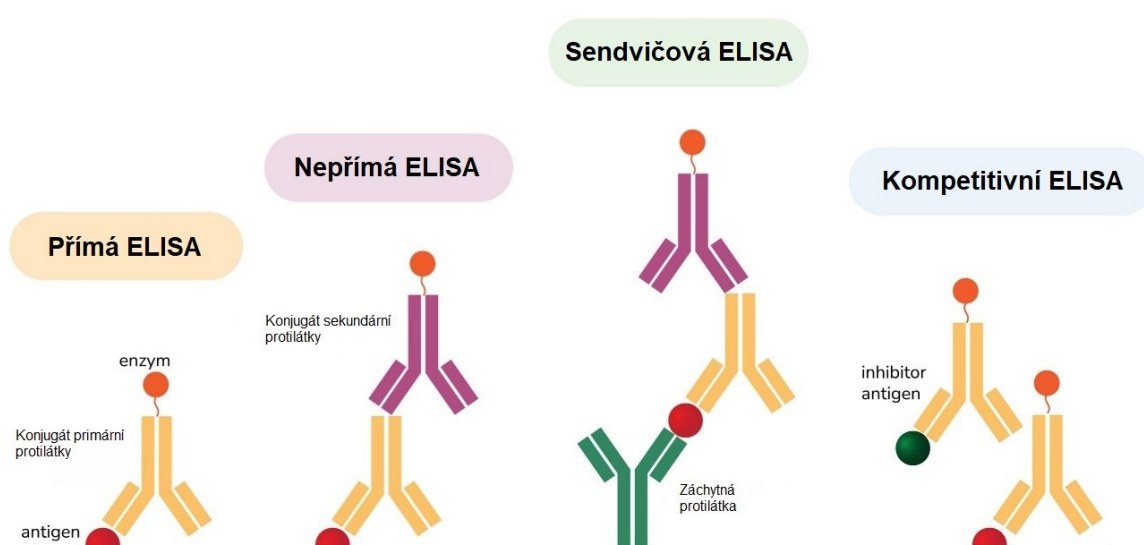
Tato metoda, dnes častěji ve formátu vysokoúčinné afinitní chromatografie, je mimo jiné využívána i ke stanovení afinity a rovnovážné konstanty interakce rozpoznávacího prvku a analytu. Pro tyto účely je afinitní chromatografie prováděna buď zónovou elucí, při které je dávkováno malé množství analytu do kolony, anebo frontální analýzou, při které je analyt kontinuálně přiváděn do kolony do doby nasycení vazebných míst na stacionární fázi. Vysokoúčinná afinitní chromatografie je například využívána ke studiu interakcí mezi proteiny a léčivy [108, 109].

1.4.2.4 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi

Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) je imunochemická metoda, která je běžně využívána pro kvalitativní a kvantitativní průkazy protilátek, antigenů, aptamerů (ELASA – enzymová imunoanalýza aptamerů na pevné fázi) a dalších biomolekul. Je založena na vzniku specifické vazby mezi ligandem, imobilizovaným na pevné fázi, a analytem, který je k němu přidáván. To, co je imobilizováno na pevném povrchu je dáno dle toho, jaké povahy je stanovovaná biomolekula. Jako pevná fáze je běžně mikrotitrační jamka z polystyrenu, polyvinylu nebo polypropyleny [110–112]. Pro detekci navázaných analytů je využíváno značících molekul, v tomto případě enzymů (křenová peroxidáza [96], alkalická fosfatáza [99], atd.), které jsou vázány na jednoho z vazebných partnerů vzniklého komplexu podle užití metody ELISA. Pro kolorimetrickou detekci jsou ke značeným komplexům přidávány chromogenní substráty, které reagují s příslušným enzymem a jejich přeměnou vznikají barevné produkty. Intenzita zabarvení výsledných roztoků je úměrná stoupající koncentraci [110–112].

ELISA se rozděluje na čtyři základní metody, viz **Obr. 7**. První, nejjednodušší je přímá ELISA, při které bývá běžně imobilizován antigen, na který je poté vázána stanovovaná protilátka s enzymem. Je ovšem možné imobilizovat i protilátku a na ni vázat značený antigen. Druhou

metodou je nepřímá ELISA, která je principiálně podobná přímé metodě. Je zde ale využíváno dvou protilátek, kde ta sekundární je vždy značená enzymem. Nepřímá ELISA vykazuje v porovnání s tou přímou větší citlivost. Další metodou je sendvičová, z angl. *sandwich* ELISA, u které bývá zpravidla imobilizována protilátka. Na tu se poté váže stanovovaný antigen, který je pak z druhé strany obklopen navázanou primární, případně sekundární protilátkou a enzymem. Čtvrtou metodou je kompetitivní ELISA, při které je využíváno soutěžení mezi značenou a neznačenou (vzorkovou) biomolekulou o vazebné místo na antigenu nebo protilátce. Čím více je vzorkové biomolekuly, tím méně se naváže té značené a výsledný signál je pak nižší [110–112].



Obr. 7 - Přehled všech čtyř základních uspořádání ELISA. Převzato a upraveno z [113]

Enzymová analýza na pevné fázi nachází také uplatnění při stanovení afinity. Metodu přímé a nepřímé kompetitivní ELISA využili Fischer a kol. (2024) [114] ke stanovení a porovnání rozdílů rovnovážných konstant. Využili interakce monoklonálních protilátek interagujících s peptidem FLAG. Pro detekci byl využit enzym křenuvá peroxidáza a substrát tetramethylbenzidin. Pro výpočet rovnovážných konstant každé metody bylo vytvořeno devět kalibračních křivek s hodnotami koncentrací antigenů, při kterých pokleslo množství signálu na 50 % (IC_{50}). Tyto koncentrace byly použity pro výpočet rovnovážných konstant. Koncentrace rovnovážné konstanty pro přímou ELISA vyšla 90 ± 37 nmol/L, pro nepřímou vyšla 93 ± 15 nmol/L.

1.4.2.5 Radioimunoanalýza

Radioimunoanalýza (RIA) je kompetitivní imunochemická metoda. Využívá značení

radioaktivními izotopy, nejčastěji ^{125}I a ^{131}I pro proteiny, dále ^3H nebo ^{14}C pro nízkomolekulární látky [115]. U RIA bývá zpravidla radionuklidem značen antigen. Podobně jako u kompetitivní ELISA, je zde využíváno značených a neznačených (vzorkových) antigenů, které mezi sebou soutěží o vazebná místa na imobilizovaných protilátkách, specifických pro dané antigeny. Čím více je neznačených antigenů, tím menší je výsledná naměřená radioaktivita. Pro zjištění koncentrace vzorku s neznačeným antigenem je využíváno metody kalibrační křivky. Pomocí které je následně porovnáván poměr navázaných/volných značených antigenů ve standardních a vzorkových roztocích. Volné a navázané antigeny jsou od sebe většinou oddělovány extrakcí za využití aktivního uhlí nebo částic oxidu křemičitého. Pro separaci lze využít i elektroforézu nebo chromatografii [115–118].

Metodu RIA lze také využít ke stanovení afinity, např. za pomoci Scatchardovy rovnice [115]. Friguet a kol. (1993) [117] využili metodu RIA ke stanovení asociačních konstant interakcí monoklonálních protilátek a volných nebo na ribozom navázaných 11,5 kDa N-terminálních peptidů produkovaných *Escherichia coli*. Jako značící molekula byl použit methionin s radionuklidem ^{35}S . K separaci volných antigenů od navázaných byla využita precipitace vazbou na dextranové částice. Asociační konstanty byly vypočítány pomocí Scatchardovy rovnice. Afinita pro volné 11,5 kDa peptidy byla stanovena na $6 \cdot 10^8 \pm 2 \cdot 10^8$ mol/L a pro ribozom vázané peptidy na $7 \cdot 10^8 \pm 2 \cdot 10^8$ mol/L.

Radioimunoanalýzu dále využili O'Connor a Gosling [116] ke stanovení afinity šesti různých monoklonálních protilátek proti progesteronu s progesteronem, který byl značen radionuklidem ^3H . K výpočtu byla taktéž využita Scatchardova rovnice, za pomoci které bylo stanoveno afinitní rozmezí $1,23 \cdot 10^8 - 2,82 \cdot 10^{10}$ mol/L pro všech šest protilátek.

1.4.2.6 Bio-layer interferometrie

Bio-layer interferometrie (BLI) je další z *label-free* optických metod založených na stanovení reaktivity biomolekul, např. protilátky a antigenu, v reálném čase. Metoda funguje na principu měření změny posunu vlnové délky světelného paprsku odraženého od vnitřního referenčního povrchu a speciálního, křemenného biosenzoru ve tvaru hrotu, který je pokryt vrstvou imobilizovaných rozpoznávacích prvků. Hrot senzoru je ponořován do roztoku analytu, obvykle v mikrotitrační destičce, a je sledován posun vlnové délky odraženého světla, která je úměrná změně složení povrchu biosenzoru způsobené asociací a disociací imunokomplexů. Touto metodou je, mimo disociační a asociační konstanty, také možné stanovit tloušťku biologické vrstvy senzoru a stabilitu vzniklého komplexu mezi vazebnými členy [119–121].

1.4.2.7 Termoforéza v mikroměřítku

Termoforéza v mikroměřítku (MST) je citlivou analytickou metodou, pomocí které lze studovat a kvantifikovat interakce biomolekul až v nanomolárních koncentracích. Tato metoda funguje na principu termoforézy, tj. Soretův efekt, který popisuje teplotní gradient (2–6°C) a jím způsobený, řízený pohyb částic, jehož průběh je závislý na molekulárních vlastnostech analytu, např. velikost, náboj, prostorové uspořádání nebo solvatace. Při zahřátí analytu značeného fluoroforem je sledován tzv. T-skok, tedy několikasekundový pohyb po směru teplotního gradientu do chladnější oblasti roztoku, který je způsobený změnou fyzikálně-chemických vlastností molekuly. V případě interakce analytu a rozpoznávacího prvku je možné pozorovat změnu v termoforetických vlastnostech, z čehož lze získat údaje o disociační a asociační konstantě. Teplotní gradient je nejčastěji vyvolán infračerveným laserem, který je odrážen přes interferenční filtr do několika mikrolitrové, skleněné kyvety, ve které se nachází roztok analytu. I přes to, že je MST metodou využívající molekulové značení, nabízí znatelnou výhodu oproti SPR nebo BLI v tom, že nevyžaduje imobilizaci cílových molekul a je zapotřebí pouze malých objemů roztoků [122–124].

1.4.2.8 Isotermální titrační kalorimetrie

Isotermální titrační kalorimetrie (ITK) je metoda, která měří změnu tepla vlivem biomolekulárních interakcí v roztoku za konstantní teploty. Při titraci jedné molekuly v roztoku roztokem druhé (rozpoznávací prvek a analyt) dochází k reakci a tvorbě vazby (vznik komplexu). V případě navázání dochází ke změně energetické hladiny nově vzniklé molekuly, což vede buď k uvolnění (exotermická reakce) nebo pohlcení (endotermická reakce) množství tepelné energie úměrné intenzitě reakce. V obou případech dochází k výkyvu z konstantně nastavené teploty a tato změna a její intenzita je zaznamenávána jako termogram, tj. závislost tepelné změny na čase. Ze získaného termogramu může být následně nelineární regresí generována vazebná isoterma, tedy křivka, která vyjadřuje stupeň saturace rozpoznávacího prvku analytem. ITK poskytuje důležité informace o vlastnostech makromolekulárních interakcí, např. vazebné stechiometrii, termodynamických parametrů (entalpie, entropie, Gibbsova energie) a mimo jiné konstantách asociace a disociace, ze kterých lze stanovit rovnovážnou konstantu. ITK umožňuje stanovení vazebných konstant řádově v nmol/L. Základní přístrojové uspořádání obvykle tvoří dvě titrační cely, kde jedna slouží pro titraci vzorku a druhá jako referenční. Titrační cely jsou napojeny na termočlánky, které zaznamenávají tepelné rozdíly mezi referenční a vzorkovou celou ve formě elektrického napětí.

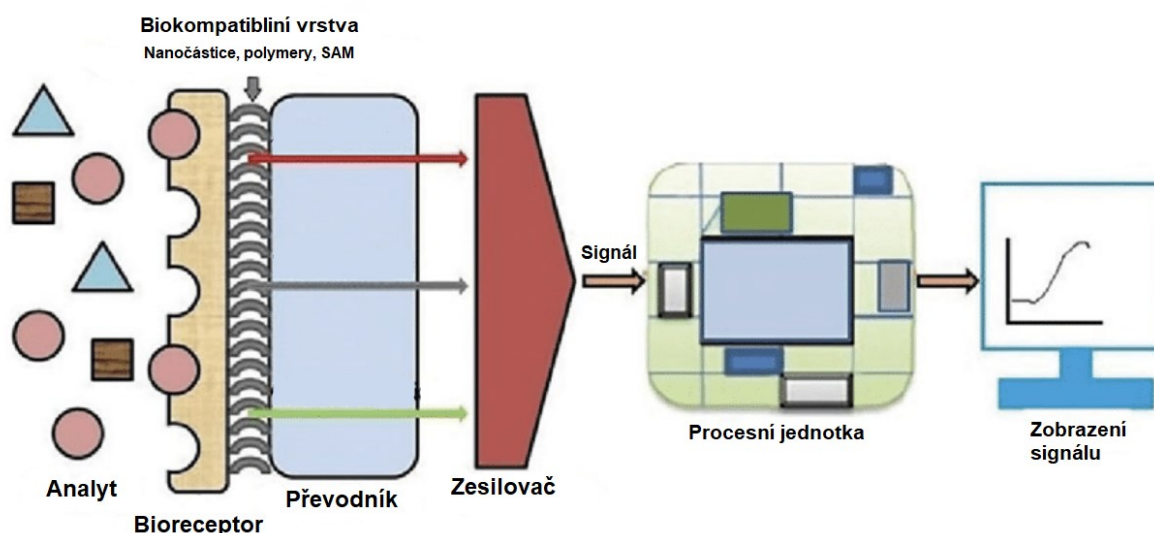
Největší výhodou této metody je absence chromoforů nebo fluoroforů. To, a pohybová nelimitovanost molekul zajišťují, že získané informace o vazebném průběhu jsou čistě objektivní [125–128].

1.5 Biosenzory pro detekci HE4

Jelikož je jedním z cílů experimentální části diplomové práce výběr a ověření reaktivity protilátek a aptamerů pro konstrukci HE4 biosenzoru, je další část věnována popisu uspořádání biosenzorů pro detekci HE4 a jsou uvedeny některé konkrétní příklady využitých biosenzorů, zejména elektrochemické a optické.

1.5.1 Uspořádání biosenzoru

Konvenční biosenzor je kompaktní analytické zařízení, které spojuje element biologického původu (bioreceptor), s fyzikálně-chemickým převodníkem a případně zesilovačem signálu. Funkcí bioreceptoru je vazba požadovaného analytu na povrchu biosenzoru. Navázání cílových molekul generuje signál úměrný jejich množství na senzoru, což posléze zaznamenává převodník. Tyto základní komponenty každého biosenzoru jsou napojeny na procesní jednotku, která zpracovává přijímaný signál a převádí ho do počítačové elektroniky ve formě záznamu, který lze dále vyhodnotit. Jednoduché schéma základního biosenzoru je uvedeno na **Obr. 8** [129, 130].



Obr. 8 - Schéma biosenzoru. Převzato a upraveno z [131]

Nejdůležitější část biosenzoru, bioreceptor, představuje rozpoznávací prvek, který vykazuje selektivitu vůči specifickým molekulám. Zprostředkovává vazbu analytu, v případě biosenzoru pro HE4 proteinu, na senzor. Tato biologická vrstva bývá běžně imobilizována na mezivrstvě

organického či anorganického původu, jenž je blíže specifikována v podkapitole 1.5.1.1. Biosenzory se na základě původu bioreceptoru dělí na 5 skupin. V souvislosti s detekcí HE4 jsou nejdůležitější imunosenzory, založené na interakci antigen-protilátka a aptasenzory, založené na interakci antigen-aptamer. Souhrnně jsou řazeny mezi tzv. afinitními senzory [129, 132]. Pro tvorbu biosenzoru lze využít jak monoklonální, tak i polyklonální protilátky [133]. Využitelné jsou i rekombinantní protilátky. U aptasenzorů jsou preferovány spíše deoxyribonukleové aptamery [132].

Převodník je část zařízení, která se rozděluje na několik typů na základě toho, v jaké formě daný signál detekuje. Nejpoužívanější jsou převodníky elektrochemické, které fungují na principu amperometrie, voltametrie, konduktometrie nebo potenciometrie. Dalšími jsou optické, většinou využívající značení (kolorimetrie, fluorimetrie, interferometrie), dále kalorimetrické, magnetické nebo hmotnostní, mezi které patří i povrchová plasmonová rezonance [129, 134].

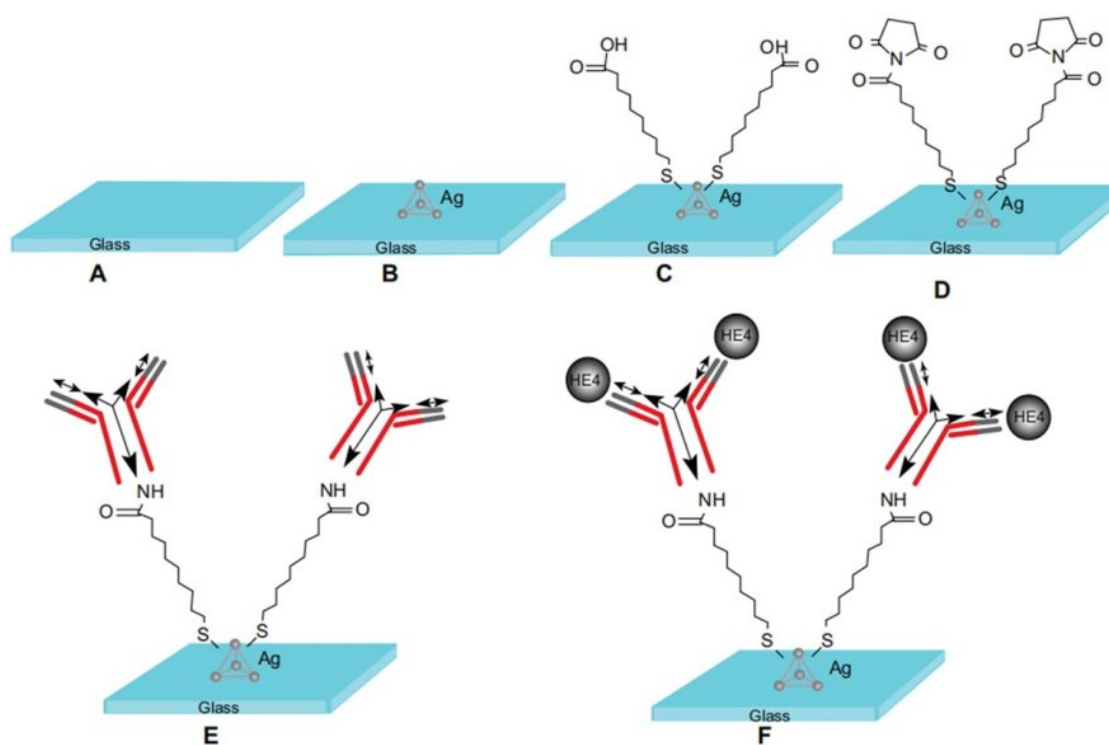
1.5.1.1 Konstrukce bioreceptoru a biokompatibilní vrstvy

Správná imobilizace protilátek nebo aptamerů, tj. záchytných sond, na povrchu senzoru je zásadní pro úspěšnost detekce molekul analytu (HE4) v nízkých koncentracích. To závisí na vlastnostech zvolené biokompatibilní vrstvy a metodě aktivace povrchu senzoru. U konstrukce biosenzoru je vždy kladen důraz na dosažení maximální možné senzitivity a selektivity [78, 135].

Základem každého senzoru je pevný povrch, např. elektroda, skleněný čip nebo nano/mikročástice. V současnosti je nejvíce favorizováno aplikování nanočástic na povrch senzoru (čipu, elektrody), což představuje základní platformu biokompatibilní vrstvy biosenzoru. Nanomateriály jsou účelně využívány pro zvýšení citlivosti a amplifikace signálu zvětšením povrchu senzoru. Tyto nanomateriály mohou být kategorizovány do 3 skupin na uhlíkové, např. grafen [136], dále kovové [41, 42] (zlato, stříbro, atd.) a poslední polovodičové (oxidy kovů [44], křemík [137], kvantové tečky [138]). Mohou být také morfologicky rozlišné (sférické částice [38], trubice [139], tyče [140], atd.). Uplatnění nacházejí také nanokompozity tří kovů, např. slitina stříbra, platiny a kobaltu [141].

Dalším krokem je zpřístupnění povrchu pro vazbu a imobilizaci rozpoznávacích prvků. Toho může být dosaženo adsorpcí (elektrostatické, hydrofobní interakce), kovalentní vazbou nebo specifickými interakcemi, např. vazba biotin-avidin nebo antigen-protilátka (aptamer). Pro účely SPR jsou často na povrch senzorů aplikovány organické molekuly, které

se samovolně na povrchu senzoru prostorově sjednotí a vytvoří SAM dosahující šířky několika nanometrů. Jejich vazba na nanomateriály je nejčastěji realizována přes thiolovou skupinu. SAM poskytuje na vnější straně povrchu funkční skupiny, které mohou být dále modifikovány, tak aby bylo možné zprostředkovat vazbu na molekuly rozpoznávacích prvků výše zmíněnými způsoby. Příkladem je aktivace karboxylových skupin 11-merkaptoundekaonové kyseliny prostřednictvím sloučeniny EDC/S-NHS, která umožňuje vazbu příslušných anti-HE4 protilátek nebo aptamerů na SAM přes amidové skupiny, jak je viditelné na **Obr. 9**, který zobrazuje jednotlivé kroky přípravy biosenzoru na skleněném čipu s nanočásticemi stříbra [135, 142–144].



Obr. 9 - Ukázka realizace SPR biosenzoru pro vazbu anti-HE4 protilátky a HE4. Převzato z [144]

Příprava elektrochemických senzorů pro imobilizaci rozpoznávacích prvků je podobná SPR. V mnoha případech je využíváno modifikací povrchu nanočásticemi kovu, oblíbenou volbou jsou nanočástice zlata [145]. Na AuNPs bývá obvykle aplikována přídatná vrstva. Ta může mít charakter samoskladné vrstvy, která může být tvořena např. thiolovanými alkany (3-MPA) [78]. Využitelné jsou i směsi dvou SAM, např. dithiobis(sukcinimidylpropionát) a tetradekanthiol [146]. Další volbou širší modifikace AuNPs může být vrstva grafitu [147] nebo uhlíkové nanotrubic [148].

Po imobilizaci požadované biomolekuly a patřičné blokaci nescifických vazebných míst je biosenzor připraven pro analýzu. Úspěšnost biosenzoru je závislá na schopnosti molekulárního rozpoznávání, které je založeno na kovalentních a nekovalentních vazebných interakcích mezi biomolekulou a analytem. Je rozlišováno statické rozpoznávání, podobné interakci na principu klíče a zámku (interakce 1:1) a dynamické rozpoznávání, jenž je založeno na interakci rozpoznávacího prvku a analytu, jenž může usnadňovat či ztěžovat vazbu druhého analytu ovlivňováním asociační konstanty komplexu [129].

1.5.2 Komerčně dostupné anti-HE4 protilátky a aptamery

Protilátek specifických k antigenu HE4 je na trhu dostupné relativně velké množství. Na webových stránkách společnosti Biocompare [149] je například k dispozici celkem 321 různých anti-HE4 protilátek od 23 různých výrobců, např. Sino Biological, Inc., RayBiotech nebo Novus Biologicals. K dostání jsou protilátky monoklonální, polyklonální i rekombinantní. Nejčastěji se jedná o imunoglobuliny G (IgG). Až přes 80 % má uvedenou reaktivitu proti lidskému HE4, zbytek je reaktivní vůči myšimu, krysímu nebo psímu HE4. Je k dispozici i široká škála konjugovaných protilátek, buď předem připravených anebo na požádání od výrobce. Dostupná je například konjugace s biotinem, křenovou peroxidázou a různými fluorescenčními značkami (fluorescein isothiokyanát, fykoerytrin, allofykocyanin, atd.). Většina imunoglobulinů je dle výrobců aplikovatelná pro Western Blot, ELISA nebo imunohistochemické analýzy.

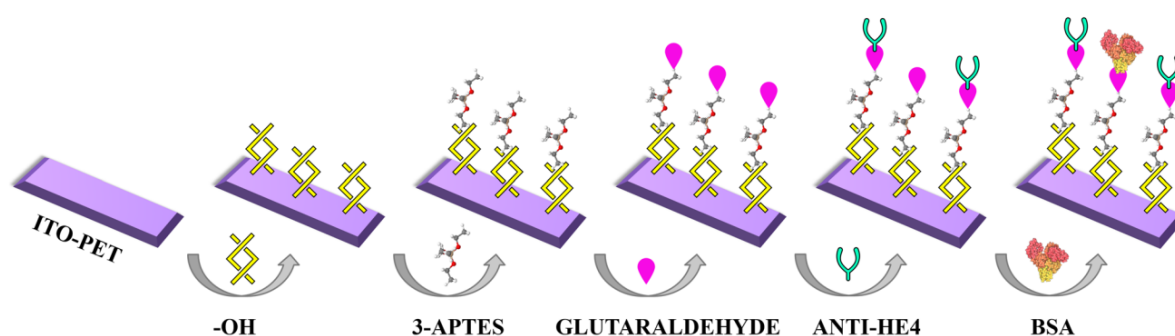
Oligonukleotidové aptamery pro detekci HE4 jsou v porovnání s protilátkami méně snadno dostupné. Společnost Creative Biolabs [150], nabízí 3 varianty DNA aptamerů o vazebné afinitě do 300 nebo 400 nmol/L. U všech jsou uvedeny specifikace pro vazebný pufr, ve němž byla provedena jejich tvorba metodou SELEX. Jsou také k dispozici modifikace na 5' i 3' konci oligonukleotidového řetězce, např. s biotinem, thiolovou skupinou, aminoskupinou nebo značené fluorescenčně 6-carboxyfluoresceinem či cyaninovými barvivy Cy3 a Cy5. Dalšími možnými výrobci, kteří se zabývají syntézou a modifikací oligonukleotidů a nukleových kyselin na zakázku, jsou např. Eurofins Genomics [151], Integrated DNA Technologies [152] či Biosearch Technologies [153].

1.6 Příklady biosenzorů pro detekci HE4

Pro účely stanovení HE4 *in vitro* a *in vivo* bylo do současnosti vyvinuto a využito nejvíce biosenzorů využívajících elektrochemické převodníky. Významnou část ale také představují optické senzory, speciálně pak SPR a chemiluminiscenční [134].

1.6.1 Elektrochemické biosenzory pro detekci HE4

Vural a kol. (2024) [77] vyvinuli *label-free* biosenzor pro detekci HE4 založený na elektrochemické impendanci spektroskopii. Jeho základem je pracovní elektroda z oxidu titaničitého dopovaného indiem (ITO) na vrstvě polyethylentereftalátu a referentní Ag/AgCl. Protilátky proti HE4 byly na elektrodě imobilizovány vazbou na glutaraldehyd, který byl zachycen na molekule 3-APTES. Molekuly 3-APTES byly vázány na povrch elektrody prostřednictvím OH skupin, viz. **Obr. 10**. Imunosenzor vykazoval vysokou linearitu v koncentračním rozmezí 1–3000 pg/mL. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly stanoveny na 0,094 pg/mL a 0,3134 pg/mL. Tento imunosenzor byl následně aplikován pro analýzu HE4 v lidském séru.



Obr. 10 - Zobrazení jednotlivých kroků konstrukce biosenzoru. Převzato z [77]

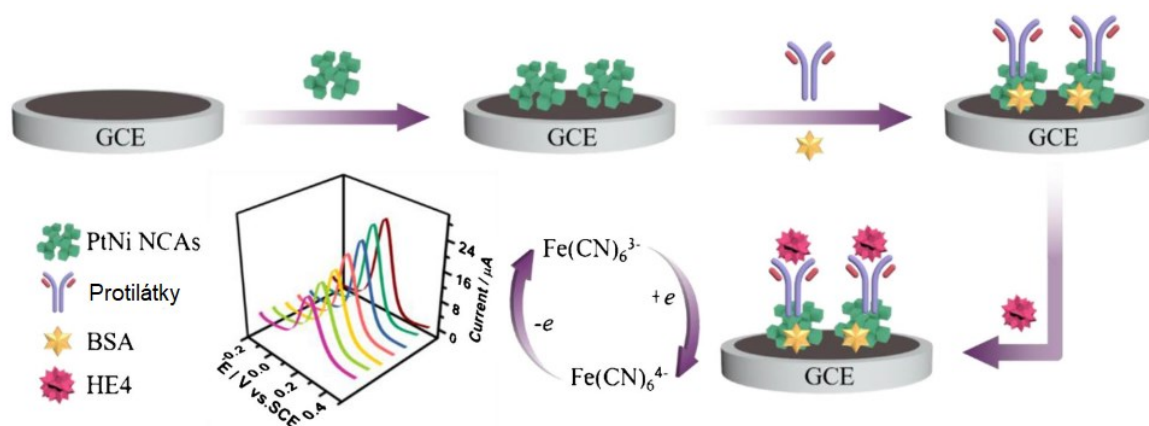
Další elektrochemický biosenzor, který byl vyvinut Lu a kol. (2012) [154] využívá diferenčně pulsní voltametrii pro stanovení HE4, který byl imobilizován na ITO elektrodě, jejíž povrch byl modifikován nanokompozitní vrstvou chitosanu–karbidu titanu a nanočásticemi zlata, na které byly imobilizovány primární protilátky. Pro detekci HE4 bylo využito replikace primerové DNA, imobilizované na sekundární biotinylované protilátce, dle mechanismu „valivého kruhu“. Tato strategie umožnila vytvořit imunosenzor jehož LOD činil 0,06 pmol/L a linearita se pohybovala v rozmezí 3–300 pmol/L. Díky jeho nadstandardní stabilitě lze uvažovat o využití v *point of care testing*.

Zhang a kol. (2023) [155] využili pro detekci HE4 elektrody ze skelného uhlíku s magnetickými nanoprutky ze slitiny oxidu železitého a železnato-železitého, které byly modifikované nanočásticemi zlata, na nichž byly imobilizovány anti-HE4 DNA aptamery prostřednictvím thiolových funkčních skupin. Metodou diferenčně pulsní voltametrie bylo zjištěno, že aptasenzor vykazuje lineární odezvu v rozmezí od 0,1 pg/mL do 1 ng/mL a LOD byl stanoven na 27,5 fg/mL. Díky aptamerům, jejichž disociační konstanta činila 0,39 $\mu\text{mol/L}$ byl

vytvořen biosenzor, který vykazoval vysokou selektivitu a citlivost, což umožňovalo detekovat HE4 i v přítomnosti interferujících látek (CA 125, IgG, IgE a neuron specifická enoláza).

Qu a kol. (2018) [156] zkonstruovali imunosenzor, který byl tvořen skleněnou elektrodou, potaženou fluorem-dopovaným oxidem cínu (FTO), na který byla nanášena dusíkem-dopovaná nanovrstva grafenu a AuNPs. Imunosenzor byl dále modifikován směsí enzymu fruktosyl-peptid oxidázy a BSA. Fruktosyl-peptid oxidáza byla na povrch elektrody kovalentně ukotvena za pomoci glutaraldehydu. HE4 byly zachytávány na připravené enzymatické vrstvě a kvantifikovány metodou cyklické voltametrie a elektrochemické impendanci spektroskopie s využitím tříelektrokové sestavy. Biosenzor vykazoval lineární odezvu v intervalu 10–65 $\mu\text{g/mL}$ s LOD stanoveném na 1,21 $\mu\text{g/mL}$.

Chen a kol. (2022) [157] použili elektrodu ze skelného uhlíku modifikovanou bimetalickou slitinou platiny a niklu a hexakynoželezitanem draselným, tvořící krychlické nanočástice, pro tvorbu *label-free* imunosenzoru detekující HE4 metodou diferenčně pulsní voltametrie, viz **Obr. 11**. Za optimálních podmínek senzor vykazoval lineární odezvu 0,001–100 ng/mL a LOD byl stanoven na 0,11 pg/mL . Imunosenzor byl vytvořen za účelem časné diagnózy epiteliální formy ovariálního karcinomu.

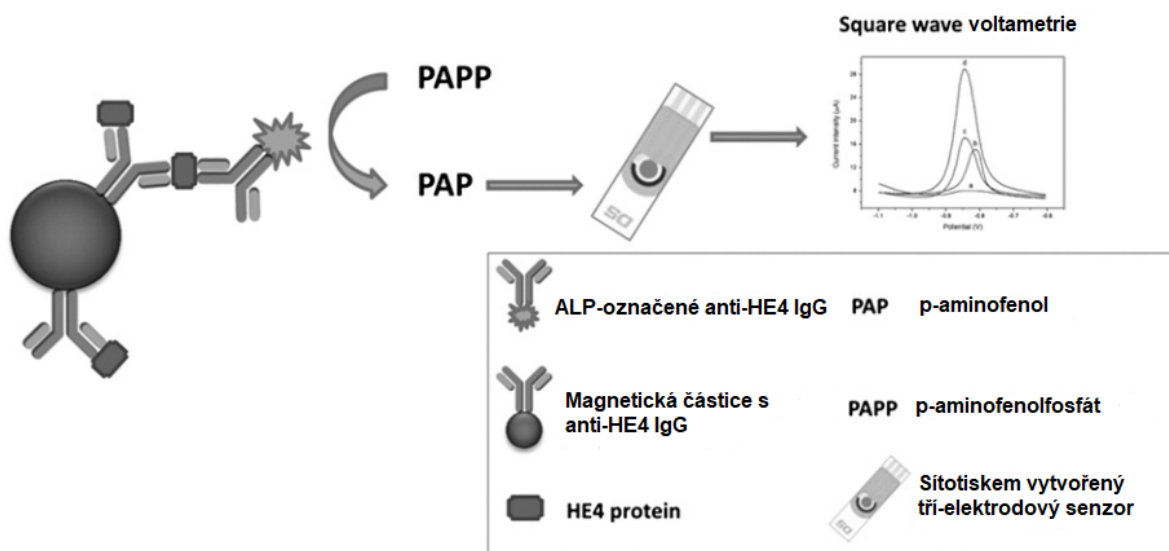


Obr. 11 - Schéma konstrukce bimetalického biosenzoru. Převzato a upraveno z [157]

Dalším *label-free* imunosenzorem, který byl vyvinut Kamac a kol. (2023) [158] je duální, sítotiskem vyrobená, uhlíková elektroda modifikovaná redukováným oxidem grafenu, polythioninem a zlatými nanočásticemi pro současnou detekci HE4 a CA 125. Jako rozpoznávací prvek pro HE4 byla zvolena monoklonální anti-HE4 protilátka. Pro stanovení bylo využito jak diferenčně pulsní (DPV), tak i square-wave voltametrie (SWV). Byly určeny dvě lineární rozmezí 1–100 pg/mL a 1–50 ng/mL . V lineárním rozmezí

1-100 pg/mL byly stanoveny hodnoty LOD pro HE4 na 0,058 pg/mL (DPV) a 0,164 pg/mL (SWV). Pro lineární rozmezí 1–50 ng/mL to bylo 1,32 ng/mL (DPV) a 2,22 ng/mL (SWV).

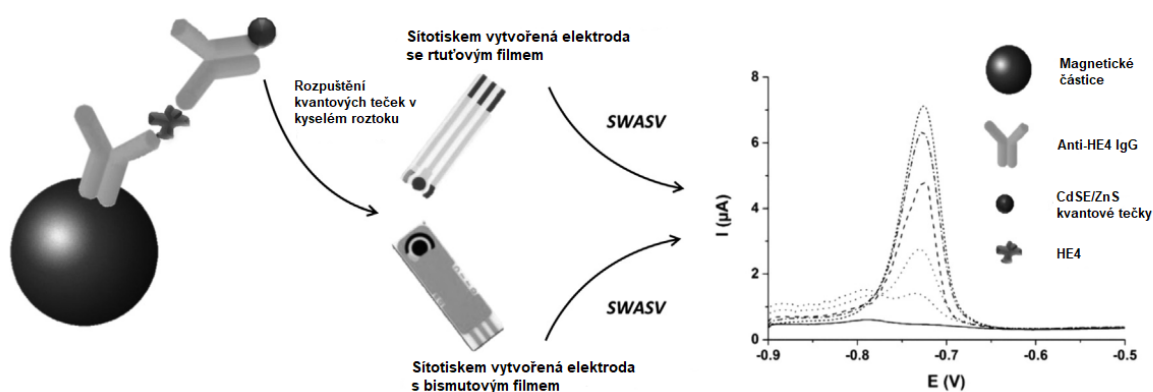
Čadková a kol. (2015) [159] vyvinuli imunosenzor, který využívá monoklonální látky imobilizované na magnetických mikročásticích na bázi oxidu železato-železitého, potažených oxidem křemičitým s karboxylovými funkčními skupinami na povrchu, viz **Obr. 12**. HE4, zachycené na primární protilátce, byly označeny polyklonálními anti-HE4 IgG označenými alkalickou fosfatázou. Alkalická fosfatáza enzymaticky převedla molekuly substrátu (*para*-nitrofenylfosfát) na elektrochemicky aktivní produkt, díky kterému bylo možné detekovat HE4 metodou square-wave voltametrie. Lineární závislost imunosenzoru byla pozorována do koncentrace 400 pmol/L. LOD byl stanoven na 6,8 fmol/L a LOQ na 23 fmol/L.



Obr. 12 - Schéma elektrochemického senzoru s magnetickou částicí. Převzato a upraveno z [159]

Druhý biosenzor, kterým je možné analyzovat více analytu najednou, byl vyvinut Kovářovou a kol. (2023) [160]. Primární protilátky proti HE4, AFP a CA 125 byly imobilizovány na karboxylovaných magnetických částicích. K částicím s protilátkami byly přidány příslušné analyty. Poté byly přimíchány tři směsi konjugátů tvořených ze sekundárních protilátek a elektrochemicky aktivních nanokompozitů. Pro detekci HE4 byly využity kvantové tečky z CdTe a pro CA 125 z PbS. Pro detekci AFP bylo využito AuNPs. Pro zvýšení citlivosti byly do všech kompozitů zabudovány nanočástice křemíku. Všechny tři směsi byly poté aplikovány na elektrodu. Přítomnost analytů byla stanovena metodou anodické/katodické rozpouštěcí square-wave voltametrie. Lineární odezvy u HE4 bylo dosaženo v intervalu 0,02–20 pmol/L. LOD a LOQ pro HE4 byly stanoveny na 5,07 pmol/L a 136,83 pmol/L.

Imunosenzor vyvinutý Čadkovou a kol. (2018) [161], využívá také sendvičovou imunoanalýzu monoklonálních i polyklonálních anti-HE4 protilátek se superparamagnetickými mikročásticemi, ke kterým byl po imobilizaci aplikován HE4. K této směsi byl poté přidán konjugát sekundárních protilátek s kvantovými tečkami tvořenými selenidem kademnatým a sulfidem zinečnatým, viz **Obr. 13**. Výsledná směs byla aplikována na uhlíkovou elektrodu modifikovanou vrstvou rtuti nebo bismutu. Přítomnost HE4 byla detekována metodou square-wave anodické stripovací voltametrie. Lineární odezva byla v rozmezí 20–40 pmol/L a LOD byl určen na 12 pmol/L.



Obr. 13 - Schéma imunoanalýzy pro detekci HE4. Převzato a upraveno z [161]

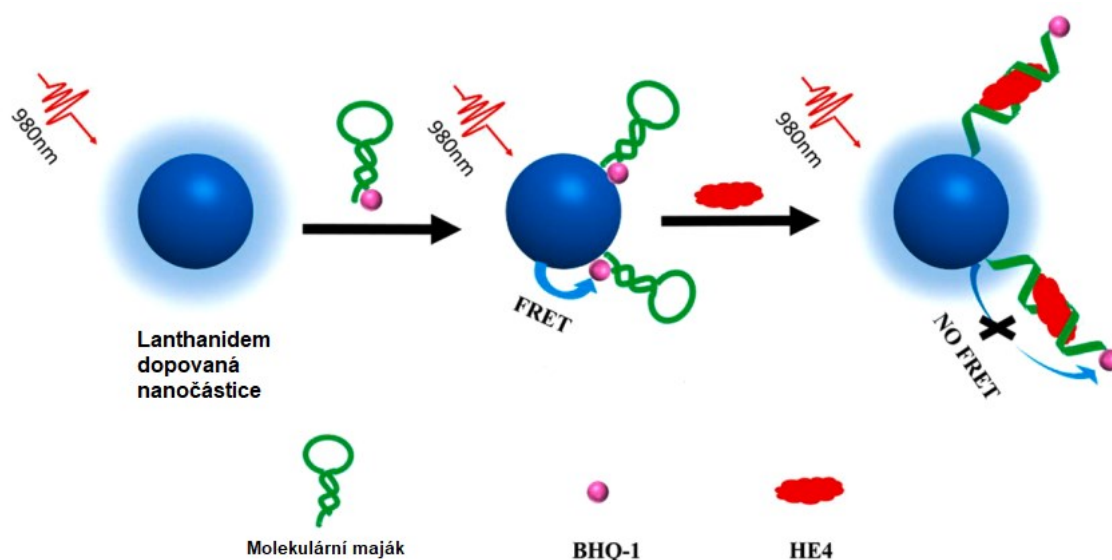
1.6.2 Optické biosenzory pro detekci HE4

Lee a kol. (2018) [162] využili pro detekci HE4 a dalších tří markerů (CA 125, HER2 a Eotaxin-1) Ramanova rozptylu světla. Protilátky proti HE4 byly imobilizovány na povrch senzoru tvořeného zlatými nanočásticemi hvězdicovitého tvaru. Dutiny mezi jednotlivými zlatými částicemi byly dále vyplňovány částicemi stříbra za účelem zvýšení výskytu hot spots, tedy míst, kde dochází k intenzivnímu zesílení elektromagnetického pole. Tyto oblasti slouží výhradně k amplifikaci signálu a tedy ke zvýšení citlivosti daného biosenzoru. Biosenzor, pomocí kterého bylo možné současně detekovat všechny výše zmíněné markery, vykazoval pro HE4 LOD 21 fmol/L.

Další optický biosenzor byl vyvinut Williamsem a kol. (2018) [163] a uplatňuje emisi (fotoluminiscenci) elektromagnetického záření v oblasti blízkého infračerveného spektra (800-1600 nm) pro detekci HE4 *in vivo*. Základem imunosenzoru byla jednostěnná uhlíková nanotrubička, která byla schopná emitovat záření o výše zmíněné vlnové délce, zároveň také fungovala jako polovodič. Na nanotrubičce byly zachyceny oligonukleotidy ssDNA, modifikované na 3' konci primárním aminem. Tato funkční skupina byla využita

pro imobilizaci kozích polyklonálních anti-HE4 IgG na nanotrubicí prostřednictvím karbodiimidu. Na protilátku byl poté vázán HE4. Imunosenzor vykazoval citlivost do 500 nmol/L a LOD byl stanoven na 10 nmol/L. Pro ověření použitelnosti *in vivo* byl senzor vložen do peritoneální dutiny myši a díky tomu bylo potvrzeno, na základě porovnání koncentrací HE4, že dokáže rozlišit high-grade serózní ovariální karcinom ze vzorku krevního séra a ascitu.

Dalším příkladem biosenzoru využívajícím luminiscenci je senzor využívající techniku luminiscenčního rezonančního přenosu energie (LRET). Anti-HE4 aptamer, jako rozpoznávací prvek, byl součástí molekulárního majáku (DNA ve tvaru vlasového sponu), který označoval dvě základní komponenty LRET aptasenzoru. Tím bylo organické barvivo BHQ-1, které figurovalo jako energetický akceptor, a dále lanthanidem-dopované vzestupně konvertující nanočástice (Tm^{3+}), které sloužily jako energetický donor. Nanočástice Tm^{3+} byly excitovány vnějším zdrojem záření a energie ve formě emisního záření byla přenesena na BHQ-1. Energetický akceptor finálně emitoval elektromagnetické záření, které bylo snímáno, viz **Obr. 14**. Lineární odezva aptasenzoru byla stanovena v rozmezí 0,4–7 ng/mL, LOD byl 0,021 ng/mL [164].



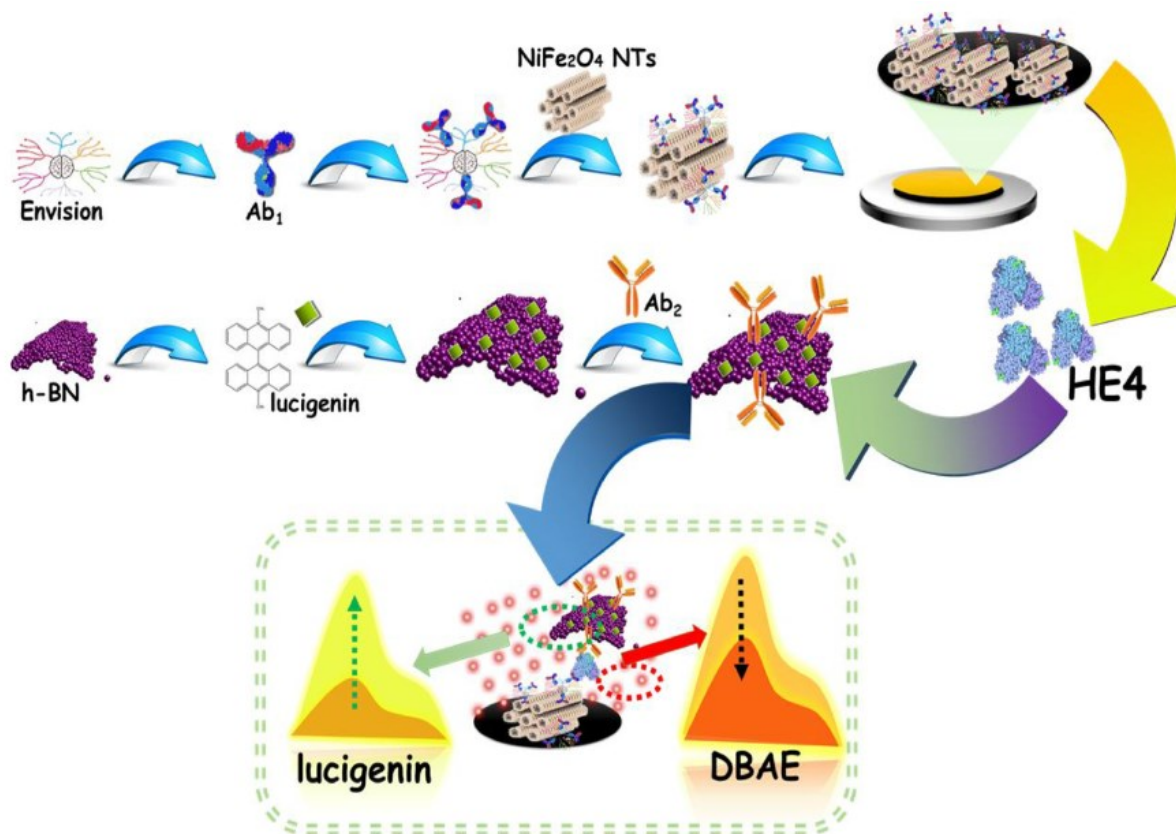
Obr. 14 - Schéma přípravy senzoru pro detekci HE4. Převzato a upraveno z [164]

Han a kol. (2021) [165] vyvinuli HE4 imunosenzor využívající optických vlastností uhlíkových teček a nanočástic stříbra (AgNPs) a jejich schopností zesílení fluorescence. Uhlíkové tečky dopované dusíkem/sírou sloužily jako fluorofor. HE4 molekuly byly zachytávány na komerční anti-HE4 protilátky imobilizované na komplexu uhlíkových teček a AgNPs. V případě úspěšné vazby HE4 byly uvedeny uhlíkové tečky a AgNPs do blízkého kontaktu, což

vyvolalo fluorescenci. Imunosenzor vykazoval LOD 2,3 pmol/L a lineární odezvy bylo dosaženo v intervalu 0,01–200 nmol/L.

Wu a kol. (2022) [166] úspěšně sestavili biosenzor na bázi mikrofluidního systému s fluorescenční detekcí pro simultánní stanovení čtyř markerů, CA 125, HE4, CEA a APF. Základem senzoru byly nanočástice oxidu grafenu na které se imobilizovaly protilátky proti všem analytům. Na protilátky byly poté zachyceny příslušné analyty a byly označeny konjugátem sekundární protilátky a fluorescenčního barviva allofykocyaninu. LOD byl stanoven pro HE4 na 1 pg/mL, stejně jako pro CEA a APF. LOD pro CA 125 vyšlo 0,01 U/mL.

Wang a kol. (2019) [139] vyvinuli elektrochemiluminiscenční ratiometrický biosenzor pro detekci HE4. Tato analytická sestava využívala 2-(dibutylamino)ethanolu a lucigeninu jako anodické a katodické, elektrochemiluminiscenční zářiče. Výchozí platformu senzoru tvořila skleněná nanotrubička modifikovaná oxidem nikelnatého-železným (NiFe_2O_4), která vykazovala skvělé katalytické vlastnosti, podporující tvorbu kyslíku vedoucí ke zvýšení citlivosti detekce. Na povrch NiFe_2O_4 byl navázán Envision komplex, obsahující křenovou peroxidázu a protilátky proti HE4. Na katodický zářič byla použita hexagonální nanovrstva nitridu boru pro zachycení Envision komplexu a lucigeninu. Na tento zářič byla později aplikována sekundární protilátka. Při setkání s HE4 docházelo ke vzniku sendvičového imunokomplexu, který přivádí nitrid boru s lucigeninem a sekundární protilátku k povrchu elektrody. Aplikace kladného potenciálu na anodu vyvolala luminiscenci, viz **Obr. 15**. Na katodu byl aplikován záporný potenciál, což vyvolalo emítaci záření. Oba signály byly poté využity k ratiometrickému výpočtu. HE4 byl kvantifikován výpočtem poměru signálů získaných z anody a katody. Linearita odezvy byla pozorována v koncentračním rozmezí 10 fg/mL až 10 ng/mL. LOD byl určen na 3,3 fg/mL.



Obr. 15 - Schéma konstrukce ratiometrického biosenzoru. Převzato z [139]

Duan a Xi (2020) [167] vyvinuli imunosenzor na principu lokalizované SPR (LSPR) pro *label-free* detekci HE4 ve vzorcích moči za účelem časně diagnostiky ovariálního karcinomu. Základem SPR čipu byly trojúhelníkovité nanočástice stříbra, na kterých byla vytvořena SAM z 11-MUDA. Samoskladná vrstva byla aktivována pomocí roztoku EDC/NHS. Na aktivované 11-MUDA byly poté imobilizovány myší monoklonální anti-HE4 protilátky, na které se pak vázal HE4. Imunosenzor vykazoval linearitu v intervalu 1–10000 pmol/L. LOD senzoru byl 1 pmol/L.

Další formou povrchové plasmonové rezonance je technika SPRI, jenž uplatňuje analýzu vazebných interakcí v nepřítomnosti vazebného roztoku a průtokové cely, na rozdíl od konvenční SPR. Biosenzor na této bázi zkonstruovali Szymanska a kol. (2021) [168] pro detekci HE4 v krevní plasmě. Rozpoznávacím prvkem byly králičí monoklonální anti-HE4 protilátky, kovalentně imobilizované na zlatém čipu přes molekuly cystaminu. Lineární odezvy senzoru bylo dosaženo v koncentračním rozmezí 2–120 pmol/L a LOD byl roven 2 pmol/L.

LSPR imunosenzor, který byl vytvořen Yuan a kol. (2012) [144], využívá čip s AgNPs zhotovený metodou nanosférové litografie. Myší monoklonální protilátky proti HE4 byly

imobilizovány na SAM z 11-MUDA, které byly uchyceny na AgNPs. Senzor vykazoval lineární odezvu mezi 10 až 10000 pmol/L. LOD byl identifikován na 4 pmol/L.

Další SPR biosenzor tohoto výběru byl zhotoven Szymanskou a kol. (2023) [169]. Jednalo se o vícenásobný SPRi senzor pro současnou detekci markerů CA 125, CEA, IL-6, HE4 a enzymu aromatázy. Pro každý z analytů byly použity specifické protilátky (pro HE4 králičí polyklonální anti-HE4) imobilizované na AuNPs s cystaminem aktivovaným EDC/NHS. HE4 vykazoval linearitu v rozmezí 0,088–5,28 ng/mL, LOD byl určen na 0,088 ng/mL.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a pomůcky

- Multiparametrický analyzátor povrchové plasmonové rezonance Navi™ 200 OTSO (BioNavis, Finsko)
- MP-SPR skleněný čip modifikovaný vrstvou AuNPs (BioNavis, Finsko)
- MP-SPR skleněný čip modifikovaný vrstvou AuNPs a biotinem (BioNavis, Finsko)
- Aparatura pro dot blot DHM 96 unit (Roth Selection, Nizozemí)
- Polyvinylidenfluoridová membrána Immun-Blot, velikost pórů 0,2 μm (Bio-Rad, USA)
- Nitrocelulózová membrána Immun-Blot, velikost pórů 0,2 μm (Bio-Rad, USA)
- Napájecí zdroj pro elektroforézu PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)
- Vakuová pumpa Millipore WP6211560 (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů G:Box F3 lfb (Syngene International Limited, USA)
- Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- Degasser DEGASi® BioCompact (Biotech Fluidics AB, Švédsko)
- Multikanálová peristaltická pumpa Masterflex® Ismatec® Reglo (Avantor®, USA)
- Analytické váhy Kern ABT (Kern, Německo)
- pH metr Orion 420A+ (Orion, USA)
- Stanice pro výrobu ultračisté vody Halios (NEPTEC GmbH, Německo)
- Třepačka PSU-20i (Biosan Ltd, Lotyšsko)
- Termoblok Grant-bio BTM (Grant Instruments, UK)
- Bio Vortex V1 (Biosan, Lotyšsko)
- Vortex WIZARD IR (Velp Scientifica, Itálie)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec DT 510H (Bandelin, Německo)
- Sterilizátor UV Clave™ (Benchmark Scientific, USA)
- Mikropipety s nastavitelným objemem (Eppendorf, Německo)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Německo)
- Injekční stříkačka Omnifix®-F Solo, 1 ml (B. Braun, Německo)
- Vakuový koncentrátor Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

2.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného

2.2.1 Použité reagensy a chemikálie

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- N, N-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS, Lachema, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, ČR)
- N, N, N, N-tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma-Aldrich, USA)
- Proteinový standard molekulových hmotností – Precision Plus ProteinTM Unstained Protein Standards, 10–250 kDa, (Bio-Rad, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl, Penta, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Laemmli sample buffer, 2x concentrated (Bio-Rad, USA)
- Monoklonální protilátky anti-HE4 2B13 1.1., konc. 5,2 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Monoklonální protilátky anti-HE4 3C24 1.3., konc. 2,5 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Monoklonální protilátky anti-HE4 3C24 1.4., konc. 3,3 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Lidské rekombinantní proteiny HE4, konc. 10 µg/20 µL (Sino Biological, Čína)

2.2.2 Použité roztoky

- Elektrodotový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3–8,6
- Roztok A: 29,2% akrylamid, 0,8% N, N-methylenbisakrylamid
- Roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8
- Roztok C: 1 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- Roztok D: 10% roztok SDS
- Roztok E: 10% roztok persíranu amonného
- 10 mM fosfátový pufr, pH 7,4
- Roztok 200 mM 2-merkaptoethanolu
- 6 M HCl

2.2.3 Postup

Skla pro přípravu gelů (tloušťka gelu 0,75 mm) byla důkladně očištěna vodou a ethanolem

a vyleštěna. Skla byla poté vložena do speciálního držáku a stabilně umístěna do stojanu tak, aby nedocházelo k úniku kapaliny z vnitřního prostoru. Do zkumavky byly pipetovány roztoky pro přípravu 12% dělicího gelu v pořadí: destilovaná voda, roztoky A, B, D, E, TEMED v objemech uvedených v **Tab. 2**. Směs byla krátce promíchána a nanášena do vnitřního prostoru mezi skla, tak, aby hladina sahala 1–1,5 cm pod horní okraj skel. Dělicí gel byl převrstven destilovanou vodou a gel polymeroval 20–30 minut. Poté byla voda z gelu odsáta filtračním papírem. V další zkumavce byly smíchány roztoky pro přípravu 5% zaostřovacího gelu v pořadí: destilovaná voda, roztoky A, C, D, E, TEMED v objemech uvedených v **Tab. 2**. Směs byla opět krátce promíchána a nanášena mezi skla na zpolymerovaný dělicí gel až po horní okraj. Hned poté byl mezi skla vložen speciální hřebínek pro vytvoření 10 jamek pro dávkování vzorků. Gel polymeroval cca 15–20 minut.

Tab. 2 - Roztoky a jejich objemy pro přípravu dělicího a zaostřovacího SDS-PAGE gelu

Pořadí dávkování	12% dělicí gel	5% zaostřovací gel
Destilovaná voda	1,68 ml	1,4 ml
Roztok A	2 ml	0,33 ml
Roztok B	1,25 ml	-
Roztok C	-	0,25 ml
Roztok D	0,05 ml	0,02 ml
Roztok E	0,1 ml	0,02 ml
TEMED	0,003 ml	0,002 ml

Po uplynutí výše uvedeného času byla skla s gelem vyjmuta ze stojanu a z držáku. Dále byl opatrně vyndán hřebínek tak, aby nedošlo k poškození jamek. Skla se zpolymerovaným gelem byla posléze umístěna do držáku v elektroforetické vaně. Elektroforetická vana byla naplněna elektrodovým pufrem po vymezenou hranici odpovídající počtu vložených gelů (max. 4), mezery mezi gely byly vyplněny a jamky gelu byly propláchnuty elektrodovým pufrem pomocí pipety.

Všechny vzorky byly připraveny v koncentraci 1 µg/10 µL s výjimkou denaturovaného HE4, který byl zakoncentrován na 1,5 µg/10 µL. Ten byl připraven smícháním 10 µl HE4, 5 µl 4% SDS a 5 µl 200 mM 2-merkaptioethanolu. Po 60 minutové inkubaci při teplotě 37 °C byl roztok doplněn 1 M PBS na objem 500 µl. Roztok byl poté zakoncentrován tak, aby mohlo být odebráno 10 µl obsahujících 1,5 µg HE4. Všechny vzorky byly poté smíchány se vzorkovým pufrem G (2x koncentrovaný Laemmlii buffer) v poměru 1:1, na celkový objem 20 µl. Vzorky

byly posléze promíchány a 3 minuty inkubovány v termobloku při teplotě 100 °C. Poté byly ochlazeny zpět na laboratorní teplotu.

Všechny vzorky byly aplikovány do jamek v objemu 20 µl. Proteinový standard molekulových hmotností byl nanášen v objemu 4 µl. Po nadávkování byla elektroforetická vana uzavřena víkem a byly nastaveny podmínky separace, kdy bylo nastaveno napětí 180 V a 30 mA na jeden gel. Separace probíhala cca 45–60 minut, dokud barevná linie vzorků nedoputovala cca 1 ml od spodního okraje skel. Gel byl po proběhlé separaci vyjmut z aparatury a přenesen do Petriho misky. Následovala vizualizace obarvením roztokem amoniakálního stříbra, viz kap. 2.2.4.

2.2.4 Barvení gelu roztokem amoniakálního stříbra

2.2.4.1 Použité chemikálie

- Dusičnan stříbrný (AgNO₃, Penta, ČR)
- Ethanol (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina octová (CH₃COOH, Lach-Ner, ČR)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, ČR)
- Hydroxid amonný (NH₄OH, Sigma-Aldrich, USA)
- Formaldehyd (CH₂O, Penta, ČR)
- Kyselina citrónová, bezvodá (Fluka, USA)
- 50% vodný roztok glutaraldehydu (Sigma-Aldrich, USA)

2.2.4.2 Použité roztoky

- Fixační roztok: 5% kyselina octová, 50% ethanol
- 10% roztok glutaraldehydu
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citronová, 0,04% formaldehyd
- Ustalovací roztok: 5% kyselina citronová
- Roztok amoniakálního stříbra: roztok obsahující 10 ml destilované vody, 120 µl 9 M NaOH a 700 µl NH₄OH byl titrován po kapkách roztokem 20% AgNO₃ do vzniku slabě hnědého zákalu. Poté byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 50 ml.

2.2.4.3 Postup barvení

Gel byl po přenesení ze skel do Petriho misky opláchnut v destilované vodě. Posléze byl ponořen do fixačního roztoku, ve kterém byl gel ponechán minimálně 15 minut za mírného třepání. Po fixaci byl gel opět rehydratován v destilované vodě 30 minut. Gel byl následně ponořen do roztoku 10% glutaraldehydu na 30 minut za neustálého míchání. Následovalo 6 cyklů promývání destilovanou vodou vždy po dobu 5 minut na třepáče. Poté byl gel

inkubován v roztoku amoniakálního stříbra 12 minut. Následně byl gel 2x propláchnut destilovanou vodou a ponořen do vyvolávacího roztoku, dokud nebyly dobře viditelné všechny linie proteinů a zároveň pozadí zůstalo čiré. Hned poté byl gel přenesen do ustalovacího roztoku, ve kterém mohl být uchován při teplotě 4 °C.

Pro vyhodnocení byl gel přenesen na ethanolem očištěnou desku a vyfocen ve stanici pro denzitometrické vyhodnocení gelů G:Box F3 lfb.

2.3 Ověření reaktivity párů protilátka – antigen a aptamer – antigen metodou dot blot

2.3.1 Použité reagenty a chemikálie

- Chlorid sodný (NaCl, Penta, ČR)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu draselného (KH₂PO₄·2H₂O, Lach-Ner, ČR)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Na₂HPO₄·12H₂O, Penta, ČR)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH₂PO₄·2H₂O, Lachema, ČR)
- Chlorid draselný (KCl, Penta, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Sigma-Aldrich, USA)
- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-(2-karboxyethyl)fosfin, hydrochlorid (TCEP, Sigma-Aldrich, USA)
- Zlaté nanočástice, průměr 10 nm (AuNPs, Sigma-Aldrich, USA)
- Streptavidin-HRP konjugát (Sigma-Aldrich, USA)
- Kozí anti-mouse IgG protilátky značené křenuvou peroxidázou (Sigma-Aldrich, USA)
- Monoklonální myší protilátky anti-HE4 2B13 1.1., konc. 5,2 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Monoklonální myší protilátky anti-HE4 3C24 1.3., konc. 2,5 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Monoklonální myší protilátky anti-HE4 3C24 1.4., konc. 3,3 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Thiolované anti-HE4 aptamery (CTApt-SH), konc. 49 nmol/mL (Creative Biolabs, USA)
- Biotinylované anti-HE4 aptamery (CTApt-M-582), konc. 49 nmol/mL (Creative Biolabs, USA)
- Rekombinantní lidský protein HE4, konc. 10 µg/20 µL (Sino Biological, Čína)
- Substrátový roztok pro chemiluminiscenční detekci Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA)

2.3.2 Použité roztoky

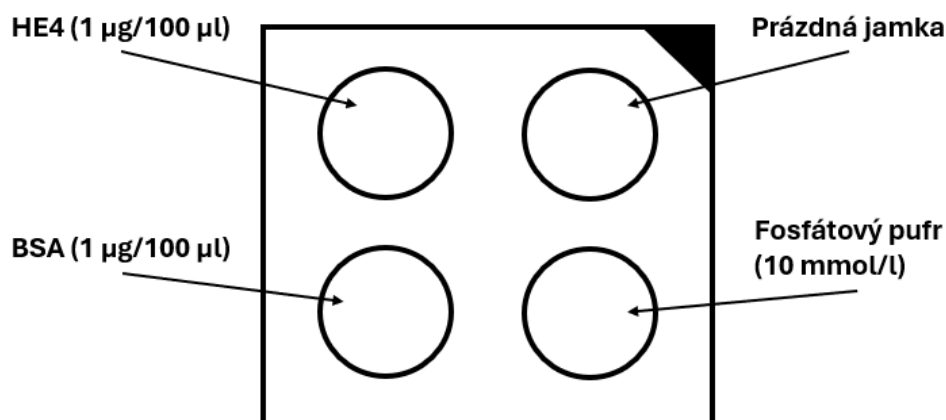
- 6 M HCl
- 10 mM citrátový pufr, pH 3
- 1 M PBS: 137 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 2,7 mM KCl, pH 7,4
- 1 M PBS-T: 0,05% Tween 20, pH 7,4
- Ekvilibrační a promývací roztok PBS-T: 0,05% Tween 20, pH 7,4
- Blokační roztok: 5% BSA v PBS-T
- Roztok pro ředění primárních protilátek: 0,25% BSA v PBS-T
- Vazebný pufr pro aptamery: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 5 mM KH₂PO₄.2H₂O, pH 8,3
- 10 mM fosfátový pufr, pH 7,4
- Roztok 100 mM TCEP pro redukci aptameru CTApT-SH

2.3.3 Postup – Sestavení aparatury a dávkování vzorků

Aparatura skládající se ze tří částí, viz **Obr. 6**, byla nejprve důkladně očištěna a osušena. Spodní část s vývodem byla připojena hadicí přes jímací nádobu k vakuové pumpě. Na spodní část byla nasazena část prostřední s 96 jamkami a obdélníkovým prostorem pro vložení membrány. Nitrocelulósová membrána o průměru pórů 0,2 μm byla vystřižena na specifické rozměry tohoto prostoru tak, aby zakrývala všech 96 jamek. Po smočení membrány v destilované vodě a ekvilibraci v PBS-T pufru (pro protilátky) nebo vazebném pufru pro aptamery byla membrána umístěna do prostřední části aparatury a uzavřena částí svrchní. Aparatura byla uzavřena pomocí 6 speciálních šroubů. Poté byla zapnuta vakuová vývěva a bylo zkontrolováno těsnění membrány.

Po sestavení aparatury a zapnutí vývěvy bylo do jamek pipetováno 100 μl roztoku PBS-T pro ověření správné průchodnosti membrány při analýze interakce protilátka–antigen. Při analýze interakce aptamer–antigen bylo pipetováno 100 μl vazebného pufru pro aptamery. Poté následovala aplikace 100 μl vzorků HE4 o koncentraci 1 μg/100 μL, připravených smícháním 2 μl roztoku HE4 (0,5 μg/μL) s 98 μl pufru PBS-T. Dále byly aplikovány roztoky 1 μg/100 μl BSA a 10 mM fosfátového pufru opět v objemu 100 μl. Místa aplikování jednotlivých roztoků jsou zobrazena na **Obr. 16**. Na místa s aplikovanými vzorky a kontrolními roztoky bylo následně aplikováno dalších 100 μl pufru PBS-T nebo vazebného pufru pro aptamery.

Poté byla vakuová pumpa vypnuta, aparatura rozložena, membrána vyjmuta a krátce ponechána schnout, max. 5 minut. Membrána byla posléze opatrně nastříhána na požadované rozměry čtverce dle schématu dávkování vzorků. U každého čtverce jamek byl ustříhnut horní pravý roh membrány, aby bylo zřejmé umístění aplikovaných roztoků. Jednotlivé membrány byly následně umístěny do Petriho misek.



Obr. 16 - Schéma dávkování vzorků na membránu pro každý aptamer a klon protilátky.

Každá membrána pro analýzu interakcí s protilátkami byla blokována 1 ml blokačního roztoku na třepače při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Membrány pro analýzu interakcí s aptamery byly blokovány 1 ml vazebného pufru pro aptamery za stejných podmínek. Po odstranění blokačních roztoků byly membrány třikrát rychle promyty 1 ml roztoku PBS-T při analýze s protilátkami, při analýze s aptamery byly membrány třikrát promyty vazebným pufrem. Následovala aplikace 1 ml roztoku testovaných primárních protilátek (anti-HE4 2B13 1.1., 3C24 1.3. a 3C24 1.4.) o koncentraci 1 µg/mL nebo 1 ml roztoku testovaných aptamerů (CTApt-SH a CTApt-M-582) o koncentraci 98 pmol/mL na membránu. Roztoky aptamerů byly před nadávkováním zahřáty na teplotu 95 °C na 5 minut, poté byly ochlazeny zpět na laboratorní teplotu. Membrány byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě a neustálého třepání. Poté byly roztoky protilátek či aptamerů odstraněny a membrány byly řádně promyty roztokem PBS-T nebo vazebného pufru pro aptamery během tří cyklů složených z jednoho rychlého promytí a 5 minutového promývání na třepače. Poté byl na membrány s protilátkami aplikován konjugát (sekundární *anti-mouse* protilátky značené křenovou peroxidázou) v ředění 1:1000. Na membránu s aptamerem CTApt-M-582 byl napipetován 1 ml konjugátu Str-HRP v ředění 1:250. Enzym křenová peroxidáza katalyzoval rozklad H₂O₂ na kyslík a vodu. Molekuly kyslíku oxidovaly luminol na chemiluminiscenční produkt. Na membránu s aptamerem CTApt-SH byl napipetován 1 ml roztoku zlatých nanočástic

v citrátovém pufru pH 3. Ty v případě vazby na protilátku nebo aptamer způsobují červené zabarvení vyvolané agregací AuNPs, jenž vede ke změně jejich optických vlastností. Všechny membrány byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě na třepačce. Po inkubaci byly důkladně promyty 3 cykly aplikací 1 ml PBS-T nebo vazebného pufru pro aptamery. Na každou membránu, kromě té s aptamerem CTapt-SH, byl poté napipetován substrátový roztok pro chemiluminiscenční detekci (Clarity Western ECL Substrate) v objemu 500 μ l na membránu. Po inkubaci 3 minuty ve tmě byly i tyto membrány přeneseny na očištěnou desku a umístěny do stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů a membrán G:Box F3 lfb a vyhodnoceny pro chemiluminiscenční detekci. Membrána s aptamerem CTapt-SH byla po promytí taktéž na desce umístěna do stanice G:Box F3 lfb a vyhodnocena pro kolorimetrickou detekci. Intenzity zabarvení/emisního záření jednotlivých spotů na všech membránách byly vyhodnoceny v programu ImageJ.

2.4 Multiparametrická povrchová plasmonová rezonance

2.4.1 Použité chemikálie

- Ethanol (Penta Chemicals, ČR)
- Isopropanol (Penta Chemicals, ČR)
- 3-merkaptopropionová kyselina (3-MPA, Sigma-Aldrich, USA)
- 11-merkaptoundekanová kyselina (11-MUDA, Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný (NaCl, Penta, ČR)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu draselného ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner, ČR)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Penta, ČR)
- Chlorid draselný (KCl, Penta, ČR)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Sigma-Aldrich, USA)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC, Thermo Fischer Scientific, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid, sodná sůl (S-NHS, Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanolamin (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES, Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl, Penta, ČR)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, ČR)
- Tris-(2-karboxyethyl)fosfin, hydrochlorid (TCEP, Sigma-Aldrich, USA)

- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma-Aldrich, USA)
- Avidin mutant, konc. 1 mg/mL (BioNavis, Finsko)
- Monoklonální myší protilátky anti-HE4 2B13 1.1., konc. 5,2 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Monoklonální myší protilátky anti-HE4 3C24 1.3., konc. 2,5 mg/mL (Hytest, Finsko)
- Thiolované anti-HE4 aptamery (CTApt-SH), konc. 49 nmol/mL (Creative Biolabs, USA)
- Biotinylované anti-HE4 aptamery (CTApt-M-582), konc. 49 nmol/mL (Creative Biolabs, USA)
- Rekombinantní lidský protein HE4, konc. 10 µg/20 µL (Sino Biological, Čína)
- Lyofilizovaný lidský IL-6 standard (Sigma-Aldrich, USA)
- Biotinylovaný lidský IL-6, konc. 12 ng/mL (Sigma-Aldrich, USA)

2.4.2 Použité roztoky a jejich příprava

- 6 M HCl
- 10 mM HCl
- 1 M NaOH
- Regenerační roztok 1 Regenerable Avidin kitu
- Regenerační roztok 2 Regenerable Avidin kitu
- 1 M PBS: 137 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 2,7 mM KCl, pH 7,4
- 1 M PBS-T: 0,05% Tween 20, pH 7,4
- Vazebný pufr pro aptamery: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 5 mM KH₂PO₄·2H₂O, pH 8,3
- Roztok 10 mM 3-merkaptopropionové kyseliny (3-MPA)
- Roztok 10 mM 11-merkaptoundekanové kyseliny (11-MUDA)
- Aktivační roztok 0,2 M EDC a 0,05 M S-NHS
- Blokační roztok 1 M ethanolaminu, pH 8,5
- Blokační roztok 1% BSA
- Roztok 10 mM MES, pH 6
- Roztok 50 mM TCEP pro kompletní regeneraci čipu po analýze
- Roztok 100 mM TCEP pro redukci aptameru CTApt-SH
- Roztok 200 mM 2-merkaptoethanolu
- Roztok 4% SDS

2.4.3 Postup analýzy protilátek

Příprava čipu

Komerčně vyráběný skleněný čip s nanovrstvou nemodifikovaného zlata ve formě nanočástic byl přes noc (přibližně 16–20 hodin) ponořen v Petriho misce do roztoku 10 mM 3-MPA nebo 10 mM 11-MUDA v ethanolu. Před vlastní analýzou byl čip opláchnut ultračistou vodou a 96% ethanolom, případně isopropanolem a poté byl řádně osušen. Poté byl čip správnou stranou vložen do plastového držáku a umístěn do cely MP-SPR přístroje.

Příprava přístroje

Všechny použité roztoky byly před analýzou odvzdušněny v ultrazvukové lázni. Analýza byla provedena na přístroji multiparametrické povrchové plasmonové rezonance Navi™ 200 OTSO, který byl ovládán programem MP-SPR Navi Control a jenž byl napojený na degasser a multikanálovou pumpu. Po vložení připraveného čipu s držákem do přístroje byla uzavřena průtoková cela. Hadičky vedoucí do šesticeštného ventilu byly zacvaknuty v držáku peristaltické pumpy a napojeny na ultračistou vodu. Poté byla uzavřena průtoková cela. Dále byl spuštěn degasser a pumpa s průtokem nastaveným na 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Přístroj byl promyt 10 minut s ventily střídavě v polohách „load“ i „inject“. Současně byly také promyty dávkovací smyčky a odpadní ventily nadávkováním 500 μl ultračisté vody do obou kanálů pomocí dávkovacích stříkaček. Tento postup byl zopakován s využitím 70% roztoku ethanolu a poté opět ultračistou vodou. Po dokončení promývacích cyklů byla aplikována mobilní fáze 1 M PBS nebo 1 M PBS-T, ve kterém byla provedena celá analýza. Přístroj, již se zapojeným čipem, byl 10 minut promýván zvolenou mobilní fází a po uplynutí této doby byl průtok pumpy snížen z 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ na 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Následovalo provedení samotné analýzy.

Analýza Anti-HE4 2B13 1.1. a 3C24 1.3. s nativním a denaturovaným HE4

Prvním krokem analýzy byla aktivace funkčních skupin 3-MPA nebo 11-MUDA aplikací roztoku EDC/S-NHS v objemu 500 μl do obou smyček při nastaveném průtoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dávkovací stříkačky byly plněny v poloze „inject“, poté byly ventily přepnuty do polohy „load“, ve které byl obsah stříkaček nadávkován do přístroje. Poté byly ventily přepnuty do polohy „inject“ a v programu MP-SPR Navi Control v okně „events“ byla vytvořena událost označující dávkování příslušného roztoku (tímto způsobem probíhalo každé dávkování u všech

analýz). Po 7 minutách bylo dávkování roztoku EDC/S-NHS ukončeno přepnutím smyček z polohy „inject“ do „load“. Po ustálení křivky byl snížen průtok na 10 µl/min. Následně bylo aplikováno do „vzorkového“ kanálu 500 µl roztoku protilátky anti-HE4 2B13 1.1. nebo 3C24 1.3. o koncentraci 10 µg/250 µL v 10 mM MES pufru. Do „referenčního“ kanálu bylo aplikováno 500 µl roztoku 10 mM MES pufru. Dávkování bylo prováděno přibližně 25-30 minut, až do dosažení rovnováhy vzniklého imunokomplexu (vazebná křivka již nestoupala). Po ukončení dávkování protilátek a ustálení křivky byl zvýšen průtok zpět na 20 µl/min. Poté byla provedena blokáce čipu aplikací 500 µl 1% roztoku BSA nebo 1 M ethanolaminu do obou kanálů na 5 minut.

Po opětovném ustálení křivky byly provedeny minimálně 2 cykly ekvibrace čipu aplikací zvolené mobilní fáze do obou kanálů na 10 minut při průtoku 20 µl/min. Jednotlivé dávky mobilní fáze byly vždy po 10 minutách a ustálení křivky prokládány regeneračním roztokem 10 mM HCl v obou kanálech na 2–3 minuty. Po posledním kole dávkování mobilní fáze a regenerace byla křivka nechána ustálit. Pak následovalo dávkování vzorků nativního nebo denaturovaného HE4.

Roztoky nativního či denaturovaného HE4 v koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1; 1,25; 1,5; 2 µg/mL byly v objemech 500 µl dákovány do obou smyček po dobu 10 minut při průtoku 20 µl/min. Jednotlivé koncentrace byly vždy po 10 minutách dávkování a ustálení křivky prokládány regeneračním roztokem 10 mM HCl na 2–3 minuty při stejném průtoku.

Ukončení analýzy a kompletní regenerace čipu

Po dokončení měření byl průtok navýšen z 20 µl/min na 200 µl/min a přístroj byl přibližně 10 minut promýván zvolenou mobilní fází. Ta byla poté vyměněna za ultračistou vodu a přístroj byl promýván 10 minut střídavě v obou polohách ventilů. Promývání bylo zopakováno se 70% roztokem ethanolu a poté opět s ultračistou vodou. Po dokončení promývání byly hadičky vyjmuty z kapaliny, degasser byl vypnut a veškeré zbytky kapalin byly vyhnány z přístroje vzduchem. Poté byla vypnuta pumpa a průtoková cela byla otevřena. Plastový držák s čipem byl vyměněn za držák s čipem slepým a přístroj byl kompletně vypnut.

Čip byl opláchnut ultračistou vodou a isopropanolem. Poté byl ponořen do roztoku 50 mM TCEP v Petriho misce přes noc (14–16 hodin). Po uplynutí doby byl čip osušen a pak vložen na 20 minut do UV sterilizátoru. Pak byl umístěn do skladovací nádoby, ve které byl uchováván dle pokynů výrobce čipu.

2.4.4 Ověření funkčnosti Regenerable Avidin kit čipu

Příprava čipu

Skleněný čip modifikovaný nanovrstvou sférických částic zlata a biotinem, který byl součástí komerčně dostupného Regenerable Avidin kitu, byl dlouhodobě skladován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před umístěním do plastového držáku a zasunutím do přístroje byl pouze opláchnut ultračistou vodou a řádně osušen.

Příprava přístroje

Všechny použité roztoky byly před analýzou odvzdušněny v ultrazvukové lázni. Analýza byla provedena na přístroji multiparametrické povrchové plasmonové rezonance Navi™ 200 OTSO, který byl ovládán programem MP-SPR Navi Control a jenž byl napojený na degasser a multikanálovou pumpu. Po vložení připraveného čipu s držákem do přístroje byla uzavřena průtoková cela. Hadičky vedoucí do šesticestného ventilu byly zacvaknuty v držáku multikanálové pumpy a napojeny na ultračistou vodu. Poté byla uzavřena průtoková cela. Dále byl spuštěn degasser a pumpa s průtokem nastaveným na $200\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$.

Přístroj byl promyt 10 minut s ventily střídavě v polohách „load“ i „inject“. Současně byly také promyty dávkovací smyčky a odpadní ventily nadávkováním $500\text{ }\mu\text{l}$ ultračisté vody do obou kanálů pomocí dávkovacích stříkaček. Tento postup byl zopakován s využitím 70% roztoku ethanolu a poté opět ultračistou vodou. Po dokončení promývacích cyklů byla aplikována mobilní fáze 1 M PBS pufu, ve kterém byla provedena celá analýza. Přístroj, již se zapojeným čipem, byl 10 minut promýván zvolenou mobilní fází a po uplynutí této doby byl průtok pumpy snížen z $200\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$ na $20\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$. Následovalo provedení samotné analýzy.

Provedení analýzy

Jako první krok byla aplikace regeneračního roztoku 1, který byl, stejně jako regenerační roztok 2 součástí Regenerable Avidin kitu. Oba roztoky byly připraveny dle návodu přiloženém v kitu. Obě stříkačky byly naplněny $500\text{ }\mu\text{l}$ regeneračního roztoku 1 a vloženy zpět do septa. Dávkování probíhalo 2 minuty při průtoku $20\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$. Po stabilizaci křivky bylo do obou smyček aplikováno $500\text{ }\mu\text{l}$ roztoku avidinu (také jako součást kitu) o koncentraci $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ a dávkování probíhalo cca 10 minut při stejném průtoku. Po opětovné stabilizaci křivky bylo nadávkováno $500\text{ }\mu\text{l}$ roztoku 10x zředěných biotinylovaných protilátek proti lidskému IL-6 do obou smyček na 10 minut. Po tomto kroku následovala aplikace $500\text{ }\mu\text{l}$ roztoku standardu IL-6 o koncentraci $12\text{ ng}/\text{mL}$. Standard byl dávkován do vzorkového ventilu, zatímco

do referenčního byl aplikován pouze 1 M PBS pufr (mobilní fáze). Analýza byla zakončena nadávkováním 500 μ l regeneračního roztoku 2 na 2 minuty do obou kanálů.

Ukončení analýzy a kompletní regenerace čipu

Po dokončení měření byl průtok navýšen z 20 μ l/min na 200 μ l/min a přístroj byl přibližně 10 minut promýván zvolenou mobilní fází (1 M PBS pufr). Ta byla poté vyměněna za ultračistou vodu a přístroj byl promýván 10 minut střídavě v obou polohách ventilů. Promývání bylo zopakováno se 70% roztokem ethanolu a poté opět s ultračistou vodou. Po dokončení promývání byly hadičky vyjmuty z kapaliny, degasser byl vypnut a veškeré zbytky kapalin byly vyhnány z přístroje vzduchem. Poté byla vypnuta pumpa a průtoková cela byla otevřena. Plastový držák s analytickým čipem byl vyměněn za držák s čipem slepým a přístroj byl kompletně vypnut.

Analytický čip byl po vyjmutí z držáku řádně opláchnut ultračistou vodou a osušen. Poté byl umístěn zpět do skladovací nádoby a dle pokynů výrobce skladován při teplotě -20 °C.

2.4.5 Postup analýzy aptamerů

Příprava čipu na analýzu

Pro analýzu CTapt-SH aptamerů byl použit skleněný čip modifikovaný vrstvou sférických nanočástic zlata. Před vložením do přístroje byl čip ponořen na 12–16 hodin do roztoku 50 mM TCEP. Poté byl opláchnut ultračistou vodou a isopropanolem a osušen.

Pro analýzu CTapt-M-582 aptamerů byl použit skleněný čip modifikovaný vrstvou sférických nanočástic zlata a biotinem, jenž byl součástí Regenerable Avidin kitu. Čip skladovaný při teplotě -20 °C byl pouze opláchnut ultračistou vodou a osušen. Poté byl umístěn do držáku a s ním zasunut do přístroje.

Příprava přístroje

Všechny použité roztoky byly před analýzou odvzdušněny v ultrazvukové lázni. Analýza byla provedena na přístroji multiparametrické povrchové plasmonové rezonance Navi™ 200 OTSO, který byl ovládán programem MP-SPR Navi Control a jenž byl napojený na degasser a multikanálovou pumpu. Po vložení připraveného čipu s držákem do přístroje byla uzavřena průtoková cela. Hadičky vedoucí do šesticestného ventilu byly zacvaknuty v držáku multikanálové pumpy a napojeny na ultračistou vodu. Poté byla uzavřena průtoková cela. Dále byl spuštěn degasser a pumpa s průtokem nastaveným na 200 μ l/min.

Přístroj byl promyt 10 minut s ventily střídavě v polohách „load“ i „inject“. Současně byly také promyty dávkovací smyčky a odpadní ventily nadávkováním 500 µl ultračisté vody do obou kanálů pomocí dávkovacích stříkaček. Tento postup byl zopakován s využitím 70% roztoku ethanolu a poté opět ultračistou vodou. Po dokončení promývacích cyklů byl přístroj napojen na mobilní fázi (vazebný pufr pro aptamery). Přístroj, již se zapojeným čipem, byl 10 minut promýván zvolenou mobilní fází a po uplynutí této doby byl průtok pumpy snížen z 200 µl/min na 20 µl/min. Následovalo provedení samotné analýzy.

Analýza CTapt-SH a CTapt-M-582 s nativním HE4

Při analýze aptamerů CTapt-M-582 bylo jako první aplikováno 500 µl regeneračního roztoku 1 do obou smyček na 2 minuty. Poté byla provedena aplikace 500 µl roztoku avidinu o koncentraci 50 µg/mL do obou kanálů na 10 minut. Po ustálení křivky byl průtok snížen z 20 µl/min. na 10 µl/min. a následně bylo do vzorkového kanálu aplikováno 500 µl roztoku aptamerů CTapt-M-582 o koncentraci 490 pmol/mL, do referenčního kanálu bylo nadávkováno 500 µl PBS-T pufru. Před aplikací do přístroje byly aptamery vloženy na 5 minut do termobloku zahřátém na teplotu 95 °C a poté byly zpět ochlazeny na laboratorní teplotu. Dávkování trvalo 25–30 minut, dokud nebylo na záznamu viditelné dosažení rovnováhy komplexu.

Při analýze aptamerů CTapt-SH byl po dokončení promývání nejdříve snížen průtok z 20 µl/min. na 10 µl/min. Poté bylo do vzorkového kanálu provedeno dávkování 500 µl aptameru CTapt-SH (490 pmol/mL) v roztoku 99 mM TCEP. Do referenčního kanálu bylo aplikováno 500 µl vazebného pufru pro aptamery. Roztoky aptamerů byly těsně před nadávkováním do přístroje taktéž vloženy na 5 minut do termobloku zahřátém na teplotu 95 °C. Po 5 minutách byly ochlazeny zpět na laboratorní teplotu. Dávkování probíhalo 25–30 minut do doby dosažení stavu rovnováhy komplexu.

Po stabilizaci křivky byl zvýšen průtok mobilní fáze z 10 µl/min. na 20 µl/min. Poté byly pro oba typy aptamerů provedeny min. 2 kola ekvilibrací čipu aplikací 500 µl zvolené mobilní fáze do obou kanálů na 10 minut. Po aplikaci mobilní fáze bylo vždy na 2–3 minuty dávkováno 500 µl regeneračního roztoku 10 mM HCl do obou kanálů. Po provedení ekvilibrace a ustálení křivky bylo dávkováno do obou kanálů 500 µl roztoku nativního HE4 v koncentracích 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1 µg/mL po dobu 10 minut. Po aplikaci každého vzorku HE4 a ustálení křivky bylo vždy na 2–3 minuty dávkováno 500 µl 10 mM HCl do obou kanálů.

Ukončení analýzy a kompletní regenerace čipu

Po dokončení měření byl průtok navýšen z 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ na 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ a přístroj byl přibližně 10 minut promýván mobilní fází (vazebný pufr pro aptamery). Ta byla poté vyměněna za ultračistou vodu a přístroj byl promýván 10 minut střídavě v obou polohách ventilů. Promývání bylo zopakováno se 70% roztokem ethanolu a poté opět s ultračistou vodou. Po dokončení promývání byly hadičky vyjmuty z kapaliny, degasser byl vypnut a veškeré zbytky kapalin byly vyhnány z přístroje vzduchem. Poté byla vypnuta pumpa a průtoková cela byla otevřena. Plastový držák s analytickým čipem byl vyměněn za držák s čipem slepým a přístroj byl kompletně vypnut.

Čip z Regenerable Avidin kitu byl opláchnut ultračistou vodou a důkladně osušen. Poté byl vložen do skladovací nádoby a byl dle pokynů výrobce skladován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skleněný čip s nemodifikovanou vrstvou sférických nanočástic zlata (pro CTApT-SH aptamery) byl na 14–16 hodin ponořen v Petriho misce do 50 mM roztoku TCEP. Poté byl čip opláchnut ultračistou vodou a isopropanolem a důkladně osušen. Nakonec byl na 20 minut vložen do UV sterilizátoru. Pak byl čip přenesen do skladovací nádoby, ve které byl uchováván dle pokynů výrobce.

2.4.6 Export a vyhodnocení záznamů sensogramů

Všechny záznamy sensogramů, které byly získány během analýz, byly exportovány z programu MP-SPR Data Viewer. Pro účely analýz interakcí protilátek a aptamerů s HE4 byly vždy využívány pouze křivky odpovídající záření o vlnové délce 670 nm, kde křivka 1 (modrá barva) představovala vzorkový kanál a křivka 3 (zelená barva) byla kanálem referenčním, od kterého se křivka 1 odečítala. Data jednotlivých vazebných křivek protilátek, aptamerů a HE4 se „slepými vzorky“ byly exportovány ve formě datových souborů v režimu odsazení od základní linie. Alternativně byla využívána funkce exportu kompletního záznamu do tabulky v Microsoft Excel 2016. Všechny datové soubory byly převáděny do programu Microsoft Excel 2016. Zde byla všechna exportovaná data využita pro tvorbu grafů (sensogramů).

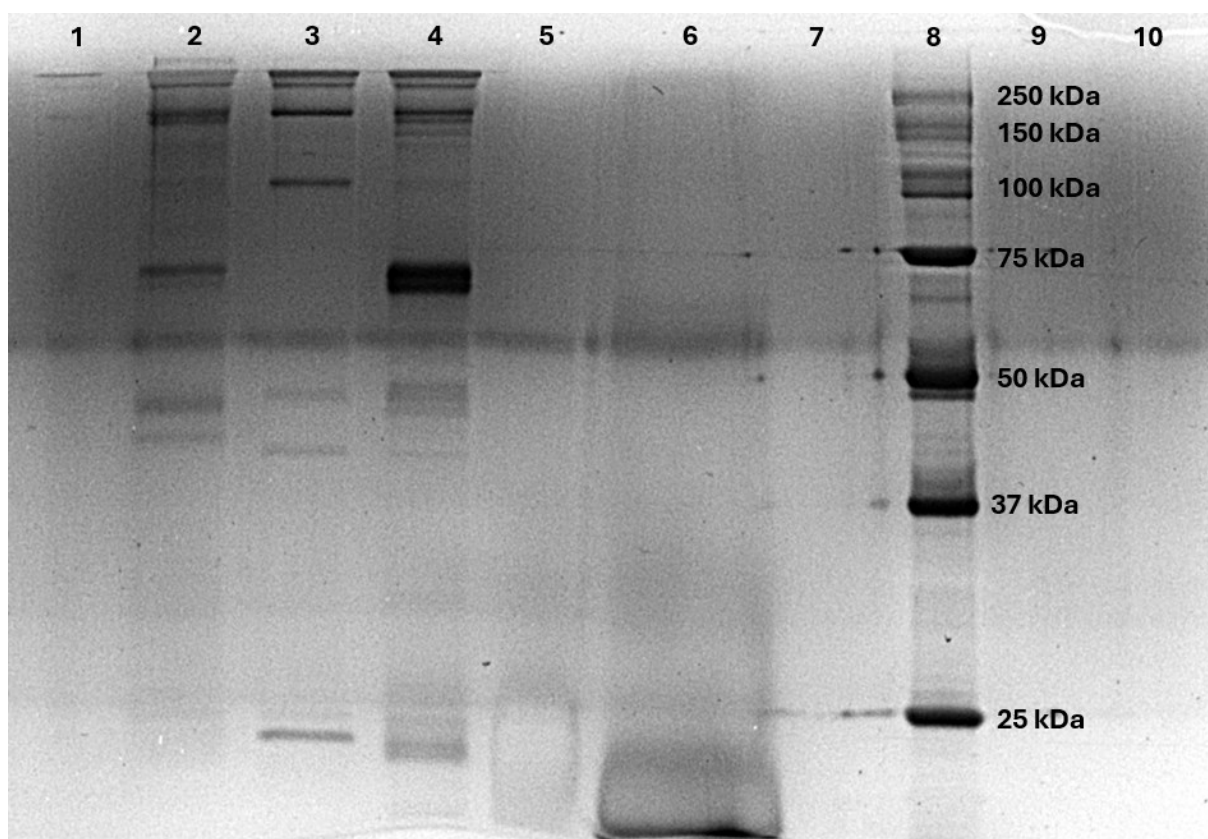
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo ověřit schopnost vybraných anti-HE4 protilátek a aptamerů vázat antigen, protein HE4. Cílem bylo vybrat kvalitní specifické protilátky a aptamery, které by následně mohly být využity při sestavení elektrochemického imunosenzoru pro detekci HE4. Výběr protilátek a aptamerů je klíčovým krokem při konstrukci senzoru a může významně ovlivnit jeho citlivost. Testovány byly komerčně dostupné myší monoklonální anti-HE4 protilátky dodávané firmou Hytest (Finsko), konkrétně klony 2B13 a 3C24. Kromě protilátek byly testovány i dva typy anti-HE4 DNA aptamerů s rozdílnou modifikací, konkrétně biotinylovaný CTapt-M-582 a CTapt-SH s thiolovou funkční skupinou. Aptamery jsou produkty firmy Creative Biolabs (USA). Reaktivita protilátek a aptamerů byla testována s rekombinantním lidským HE4 proteinem od firmy Sino Biological (Čína).

Pro ověření kvality a reaktivity protilátek a aptamerů byly zvoleny metody polyakrylamidové gelové elektroforézy, dot blotu a zejména multiparametrické povrchové plasmonové rezonance (MP-SPR). Metoda MP-SPR byla použita jako nová metoda pro ověření reaktivity protilátek a aptamerů, a její zavedení bylo hlavním cílem diplomové práce.

3.1 Ověření čistoty a kvality protilátek metodou SDS-PAGE

Pro ověření kvality a čistoty vybraných specifických anti-HE4 protilátek a rekombinantního proteinu HE4 byla použita diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného s vizualizací proteinů roztokem amoniakálního stříbra (postup viz kap. 2.2). Pro separaci byl použit 12% polyakrylamidový gel. Vzorky anti-HE4 protilátek a standardu HE4 byly na gel aplikovány v koncentraci 1 μg proteinu na jamku. Byly analyzovány oba dva klony vybraných protilátek 2B13 a 3C24. U protilátek 3C24 byly testovány dvě šarže (ozn. 1.3 a 1.4). Standard proteinu lidského HE4 byl analyzován v nativní (dávkován v množství 1 μg /jamku) a rozvolněné formě (dávkován v množství 1,5 μg /jamku). Pro rozvolnění proteinové struktury byl použit roztok 0,04% SDS s 2 mM 2-merkaptethanolem na objem 500 μl , který byl poté zakoncentrován, viz kap. 2.2. Primárním účelem elektroforetické analýzy bylo ověřit, zda jsou dodávané protilátky v dostatečné čistotě a molekuly kompletního imunoglobulinu, tedy odpovídající molekulové hmotnosti 150 kDa. Na **Obr. 17** je uveden výsledný gel pro ověření kvality protilátek a proteinu.



Obr. 17 - Výsledek SDS-PAGE pro ověření čistoty a kvality použitých proteinů. 12% gel, barvení roztokem amoniakálního stříbra. 1 – Prázdňá jamka, 2 – Monoklonální anti-HE4 2B13 1.1, 3 – Monoklonální anti-HE4 3C24 1.3, 4 – Monoklonální anti-HE4 3C24 1.4, 5 – Nativní HE4, 6 – Denaturované HE4, 7 – Prázdňá jamka, 8 – Standard molekulových hmotností, 9 – Prázdňá jamka, 10 – Prázdňá jamka.

Výsledek elektroforézy potvrzuje přítomnost kompletní molekuly IgG, v případě anti-HE4 3C24 šarže 1.4. byl viditelný proužek odpovídající molekulové hmotnosti 75 kDa, což odpovídá částečně rozvolněné molekule IgG, jednomu těžkému a lehkému řetězci spojenými disulfidovými můstky. Přestože i tato frakce protilátek má kompletní jedno vazebné místo schopné interakce s antigenem, nebyly tyto protilátky použity pro MP-SPR analýzu. U klonu anti-HE4 3C24 šarže 1.3. nebyly frakce 75 kDa významně viditelné, byl proto společně s anti-HE4 2B13 1.1. vybrán pro MP-SPR analýzu.

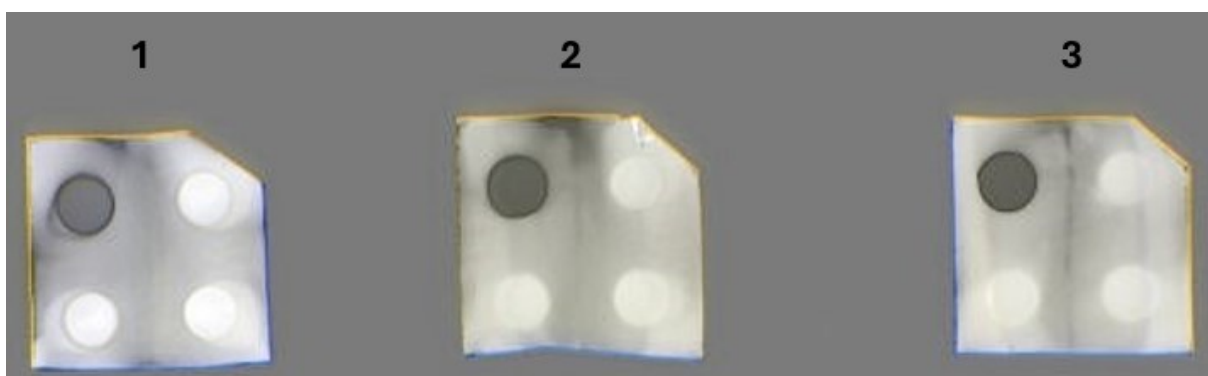
Dále byl analyzován standard nativního a denaturovaného HE4. Rozvolnění proteinu bylo provedeno proto, aby byla eliminována případná agregace nativního proteinu, která by mohla ovlivnit interakci s protilátkami. Obě formy HE4 proteinu byly použity pro MP-SPR analýzu. Pro ověření reaktivity metodou dot blot byl použit pouze nativní protein.

3.2 Ověření reaktivity protilátek a aptamerů metodou dot blot

U všech protilátek a aptamerů byla testována jejich reaktivita s nativním HE4 antigenem. Pro

analýzu byly použity dva typy membrán, nitrocelulózová (NC) a polyvinylidenfluoridová (PVDF). Nitrocelulózová membrána lépe sorbovala dávkované roztoky a nedocházelo k tak velkému rozmývání zón jak u PVDF membrány. Na membránu byl dávkován roztok antigenu HE4 o koncentraci 1 µg/100 µL a pro dávkování bylo použito zařízení Dot Blotter (Roth Selection, Nizozemí). Jako negativní kontrola byl použit hovězí sérový albumin (BSA, 3 µg/100 µL). Jako slepý vzorek byl použit 0,1 M fosfátový pufr. Schéma rozvržení jamek (str. 55) a podrobný postup analýzy je popsán v kap. 2.3.3.

Jako primární protilátky byly aplikovány roztoky myších anti-HE4 IgG 2B13 1.1., 3C24 1.3. a 3C24 1.4. a anti-HE4, a dále pak aptamery CTApt-SH a CTApt-M-582. Jako detekční protilátky byly v případě ověření reaktivity protilátek využity anti-mouse IgG protilátky značené křenovou peroxidázou (HRP). Pro vizualizaci membrán byla použita chemiluminiscenční detekce pomocí Clarity Western ECL substrátu (Bio-Rad, USA). Pro ověření reaktivity thiolovaných aptamerů CTApt-SH byla použita vizualizace pomocí nanočástic koloidního zlata o velikosti 10 nm v citrátovém pufru. Pro ověření reaktivity biotinylovaných aptamerů CTApt-M-582 byl použit konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou. Pro vizualizaci membrány byla opět použita chemiluminiscenční detekce pomocí Clarity Western ECL substrátu (Bio-Rad, USA). Kompletní postup metody je popsán v kap. 2.3.3. Výsledek dot blot analýzy (**Obr. 18**) potvrdil reaktivitu všech klonů protilátek s nativním HE4 proteinem.



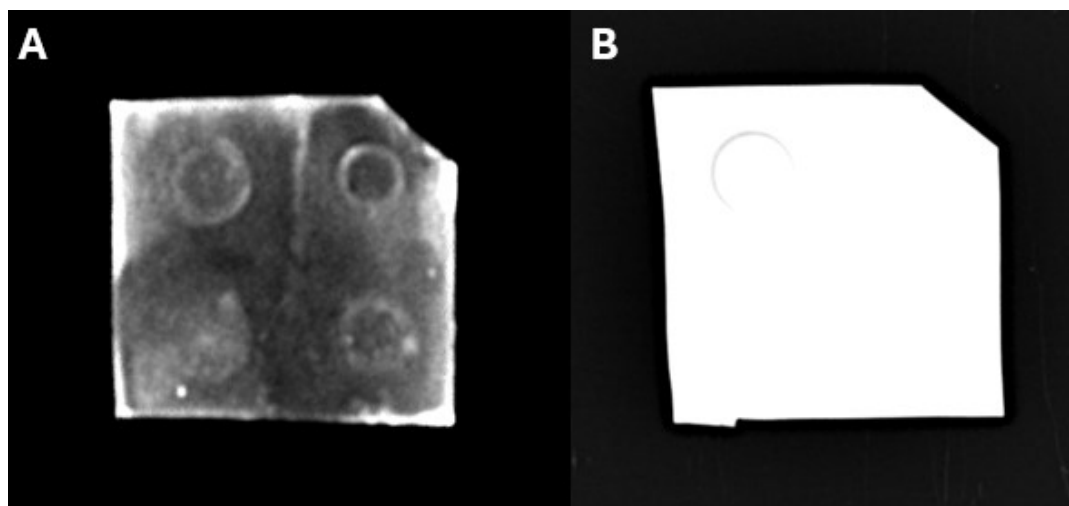
Obr. 18 – Výsledek dot blot analýzy pro ověření reaktivity anti-HE4 protilátek. 1 – Monoklonální anti-HE4 2B13 1.1., 2 – Monoklonální anti-HE4 3C24 1.4., 3 – Monoklonální anti-HE4 3C24 1.3.. Nitrocelulózová membrána, testované protilátky 1 µg/mL, konjugát anti-mouse IgG-HRP (ředění 1:1000), chemiluminiscenční detekce (Clarity Western ECL substrát).

Pozice se vzorkem HE4, které byly viditelně zbarvené, byly na všech membránách denzitometricky vyhodnoceny v softwaru ImageJ. Intenzita zbarvení byla vyjádřena v „mean gray value“. Čím více bylo dané místo tmavé, tím menší byla výsledná hodnota. Pro anti-HE4 2B13 1.1. byla hodnota mean gray value 117,19, pro anti-HE4 3C24 1.4. 95,26 a pro anti-HE4

3C24 1.3. 94,52. Z těchto hodnot vyplývá, že protilátky řady 3C24 se vázaly téměř stejně, zatímco u klonu 2B13 1.1. byla afinita nižší.

Na **Obr. 19A** je výsledek dot blot analýzy pro ověření reaktivity biotinylovaného anti-HE4 aptameru CTApM-582. Reaktivita aptameru CTApM-582 s HE4 nebyla za těchto zvolených podmínek metodou dot blot prokázána. Zabarvení membrány bylo způsobeno nedostatečným promytím membrány a dlouhou expozicí při detekci.

Na **Obr. 19B** je výsledek dot blot analýzy pro ověření reaktivity thiolovaného anti-HE4 aptameru CTAp-SH kolorimetrickou detekcí za využití zlatých nanočástic o průměru 10 nm, které v případě agregace na aptamery měly vlivem změny optických vlastností zabarvit místo aplikace HE4 proteinu do červena. Reaktivita tohoto aptameru taktéž nebyla za těchto zvolených podmínek touto metodou potvrzena.



Obr. 19 – Výsledek dot blot analýzy pro ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů. A – CTApM-582, konjugát Str-HRP (ředění 1:250), chemiluminiscenční detekce (Clarity Western ECL substrát), B - CTAp-SH, kolorimetrická detekce s 10 nm AuNPs. Nitrocelulósová membrána, testované aptamery 98 pmol/mL.

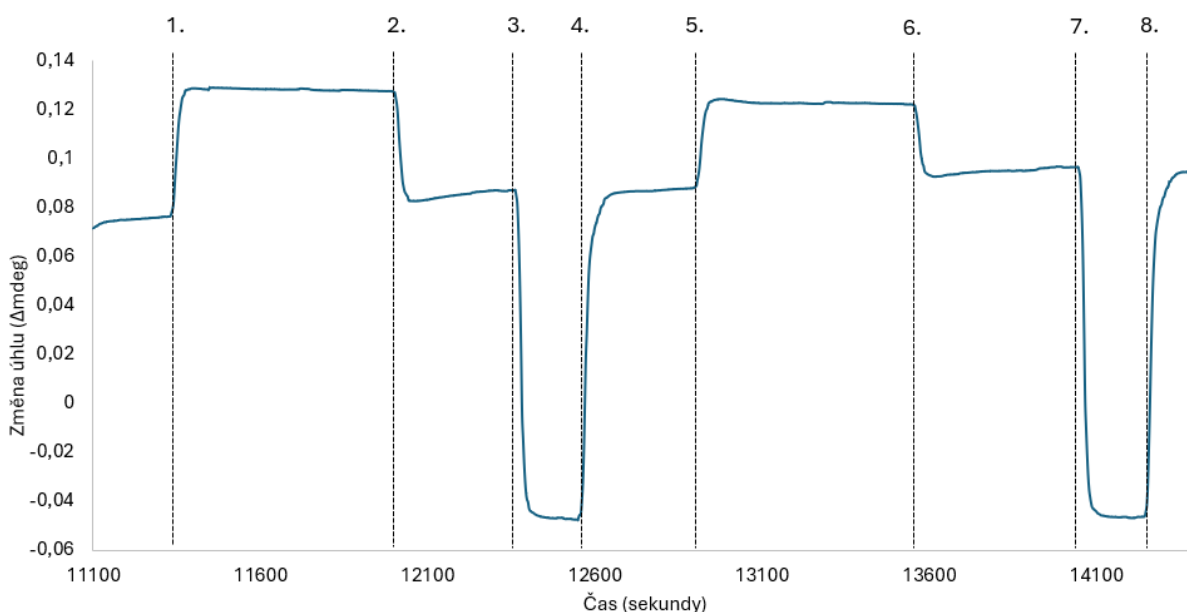
3.3 Ověření reaktivity specifických protilátek a aptamerů s HE4 metodou povrchové plasmonové rezonance

Studium interakce specifických protilátek a aptamerů s antigenem HE4 v reálném čase bylo provedeno metodou multiparametrické SPR (MP-SPR). Pro MP-SPR analýzu byly primárně využívány skleněné čipy modifikované vrstvou sférických nanočástic zlata od stejného výrobce jako analyzátor Navi™ 200 OTSO (BioNavis, Finsko), na kterém byly analýzy prováděny. Na zlaté čipy byly imobilizovány anti-HE4 protilátky přes karboxylové funkční skupiny po modifikaci čipu vytvořením samoskladné vrstvy. Thiolované aptamery CTAp-SH byly

imobilizovány prostřednictvím –SH funkčních skupin. Bylo také využito skleněných čipů modifikovaných vrstvou sférických nanočástic zlata, které byly modifikované biotinem přímo od výrobce (BioNavis, Finsko). Tyto čipy byly využity k imobilizaci anti-HE4 aptamerů CTapt-M-582 prostřednictvím vazby avidin–biotin.

Základní uspořádání experimentů pro analýzu anti-HE4 protilátek a thiolovaných aptamerů CTapt-SH vycházelo z publikace B. Holzerové a kol. [78]. Postup měření byl také upravován za využití informací dostupných na webových stránkách SPRPages [170]. Pro úpravu čipů s nemodifikovanou vrstvou sférických AuNPs a dalších kroků, které předcházely aplikaci antigenů HE4, byly využity informace z publikací Wang a kol. [171], Lupu a kol. [172] a Yuan a kol. [144] a podmínky a postup analýzy byl upraven pro analýzu interakce s proteinem HE4. Analýzy na čipu s vrstvou biotinem modifikované vrstvy sférických AuNPs byly prováděny dle návodu přiloženém v Regenerable Avidin kitu (BioNavis, Finsko). Kompletní postupy pro jednotlivé analýzy jsou uvedeny v kap. 2.4.

Výstupem každé proběhlé analýzy byly komplexní křivky (sensogramy), které představovaly závislost změny úhlu SPR dipu elektromagnetického záření (vlnové délky 670 a 785 nm) na čase. Každý kompletní záznam byl rozdělen do několika částí, odpovídající křivkám odpovídajících krokům aktivace čipu, imobilizace, blokace, vazby HE4 a regenerace protilátek a aptamerů. Na **Obr. 20** je uveden příklad kompletního sensogramu analýzy dvou vzorků HE4 ukazující charakteristický záznam všech dílčích kroků každé aplikace. Jako první bylo vždy provedeno dávkování vzorku (1.–2.). Po nadávkování, které trvalo vždy cca 10 minut, bylo dávkování ukončeno a čip byl promýván mobilní fází dokud se neustálila křivka (2.–3.), poté byla provedena krátká regenerace čipu (3.–4.). Po regeneraci a ustálení křivky (4.–5.) byl opakován další cyklus od aplikace vzorku (5.–6.), promytí (6.–7.) a regenerace (7.–8.).

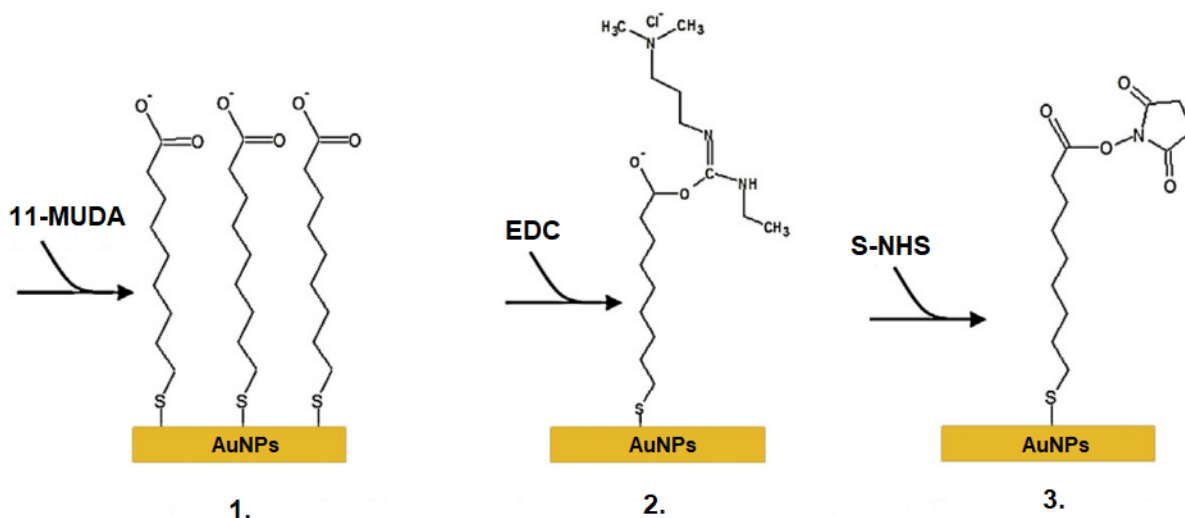


Obr. 20 – Ukázka kompletního sensogramu analýzy HE4. 1.– Dávkování vzorku, 2.– Promytí mobilní fází, 3.– Regenerace 10 mM HCl, 4.– Promytí mobilní fází, 5.– Dávkování vzorku, 6.– Promytí mobilní fází, 7.– Regenerace 10 mM HCl, 8.– Promytí mobilní fází.

MP-SPR analyzátor měří signál současně při dvou vlnových délkách (670 a 785 nm) ve dvou kanálech. Při probíhající analýze byla střídavě sledována křivka odpovídající signálu měrného kanálu, jenž byla vztažena k referenčnímu signálu. Odečtením dojde k rapidní změně vzhledu křivky. Pro vizualizaci jednotlivých kroků aplikací HE4, viz **Obr. 20**, bylo využito měrné křivky pro dávkování vzorku. Signál v měrném kanálu byl vztažen k signálu v referenčním kanálu pro vazby protilátek, aptamerů a HE4 pro všechny typy měření s výjimkou kompletního záznamu analýzy funkčnosti biotinem modifikovaného čipu, viz **Obr. 27A**.

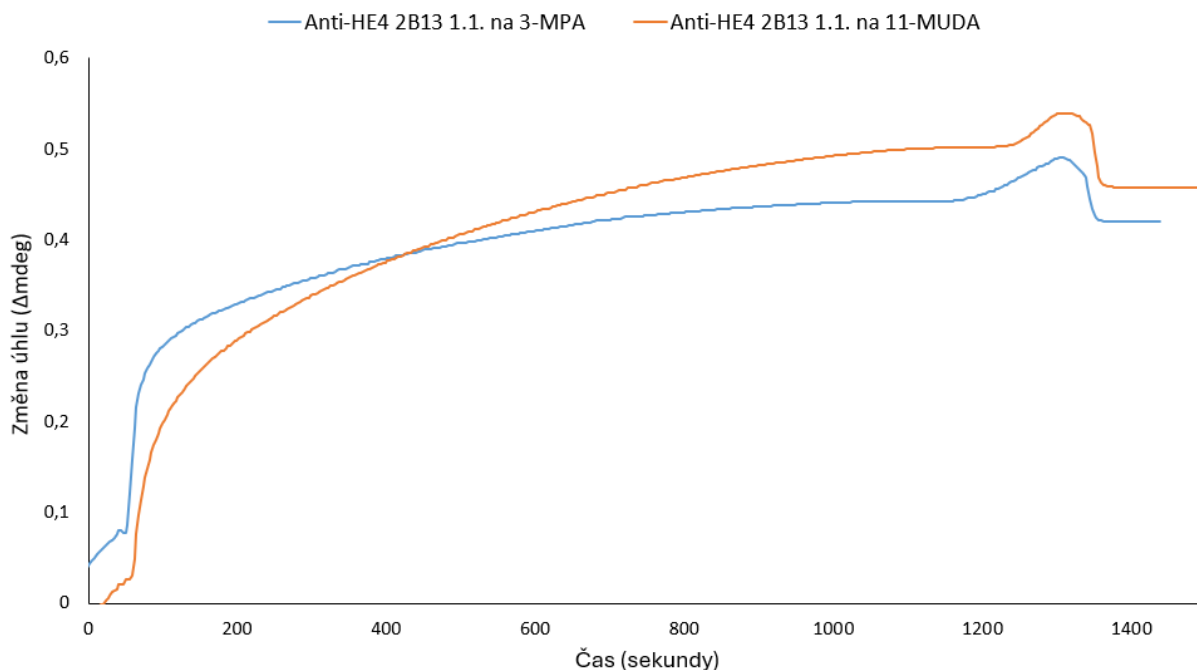
3.3.1 Porovnání tvorby samoskladné monovrstvy pomocí 3-MPA a 11-MUDA

Nemodifikovaný zlatý čip byl nejdříve modifikován karboxylovými funkčními skupinami látky tvořící na povrchu AuNPs samoskladnou vrstvu (SAM), viz kap. 2.4.3. Pro tyto účely byly vybrány a testovány dvě látky, 3-merkaptopropionová kyselina (3-MPA) a 11-merkaptoundekaonová kyselina (11-MUDA), které se pro účely SPR analýzy používají nejčastěji buď samostatně, nebo ve směsi [173–175]. V obou případech byly připraveny roztoky o koncentraci 50 mM, které byly inkubovány s čipem stejnou dobu (viz kap. 2.4.3). Molekuly 3-MPA nebo 11-MUDA se uspořádaně vážou thiolovou funkční skupinou na AuNPs a prostorově se uspořádávají tak, že jejich karboxylové skupiny jsou na vnější straně této samoskladné vrstvy. Aby bylo možné na molekulách SAM imobilizovat protilátky prostřednictvím amidové funkční skupiny, bylo nutné aktivovat zavedené karboxylové skupiny roztokem EDC/S-NHS jak je uvedeno na **Obr. 21**.



Obr. 21 — Schéma postupu tvorby SAM vrstvy a aktivace čipu pro imobilizaci protilátek. 1. – tvorba SAM z 11-MUDA, 2. – aktivace karboxylových skupin pomocí EDC, 3. – aplikace S-NHS pro tvorbu amin-reaktivních esterů. Převzato a upraveno z [176]

Na takto připravený aktivovaný čip bylo dávkováno stejné množství monoklonální anti-HE4 protilátky 2B13 1.1. (10 μg). Dávkování 3-MPA a 11-MUDA probíhalo za stejných podmínek. Na **Obr. 22** je uveden příklad záznamu vazby anti-HE4 protilátky klonu 2B13 1.1. na 3-MPA a 11-MUDA pro porovnání obou látek pro tvorbu SAM vrstvy.



Obr. 22 – Sensogramy pro porovnání tvorby 11-MUDA a 3-MPA SAM vrstvy ověřením vazby anti-HE4 protilátek. Mobilní fáze – PBS, průtok 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 10 $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$ anti-HE4 2B13 1.1, vlnová délka 670 nm.

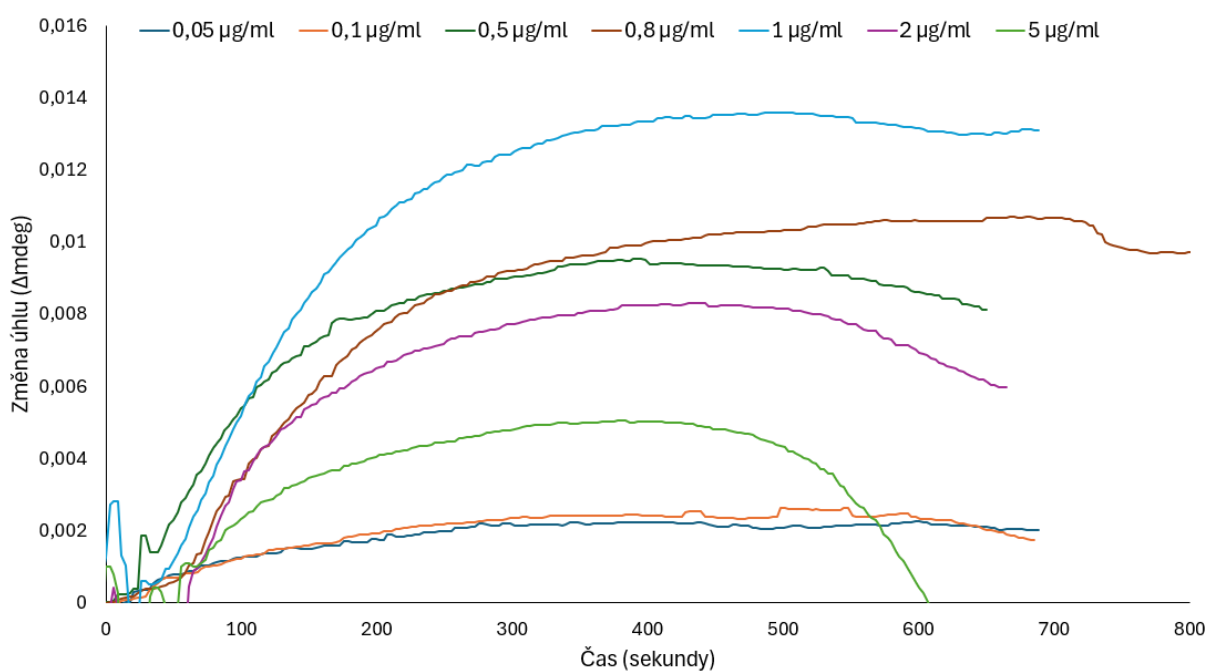
Ze záznamu vazby anti-HE4 protilátek 2B13 1.1. na 3-MPA a 11-MUDA SAM vrstvy je patrná srovnatelná účinnost obou látek pro tvorbu SAM vrstvy. V publikaci, kde Patel a kol. [168]

prováděli porovnávání vlastností SAM tvořených ze samotného 3-MPA, 11-MUDA a také různých poměrů směsi obou látek, zjistili, že 11-MUDA poskytuje oproti 3-MPA o 31 % větší povrchové pokrytí senzoru. SPR analýzou také zjistili, že na 11-MUDA se po aktivaci karboxylových skupin roztokem EDC/S-NHS v porovnání s 3-MPA vázalo větší množství proteinů. Přestože v našem případě jsou výsledky srovnatelné, bylo zvoleno, že pro všechny budoucí experimenty byla pro modifikaci čipu používána 11-MUDA. Z pohledu struktury má delší řetězec a je předpoklad nižších sterických zábran.

3.3.2 Ověření reaktivity monoklonálních anti-HE4 protilátek 2B13 1.1. s HE4

Pro ověření reaktivity anti-HE4 protilátek 2B13 1.1. byla vytvořena vrstva SAM z 11-MUDA, jejíž karboxylové skupiny byly aktivovány roztokem EDC/S-NHS, viz kap. 2.4.3. Poté byl aplikován roztok protilátek o koncentraci 10 $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$. Výsledný záznam vazebné křivky je uveden na **Obr. 22** (oranžová křivka). Rozdíl signálu před a po aplikaci, po vztažení k referenčnímu kanálu, vykazoval úhlový rozdíl přibližně 0,46, což potvrzuje úspěšnou imobilizaci protilátek na čip.

Následně byla provedena blokáce 1% roztokem BSA pro zamezení vazby antigenu na SAM a poté ekvilibrace mobilní fázi (1 M PBS pufr). Poté byl dávkován antigen HE4 postupně v rostoucí koncentraci od 0,05 do 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Jednotlivé vazebné křivky byly po vztažení k referenčnímu signálu zaznamenány a jsou uvedeny na **Obr. 23**.

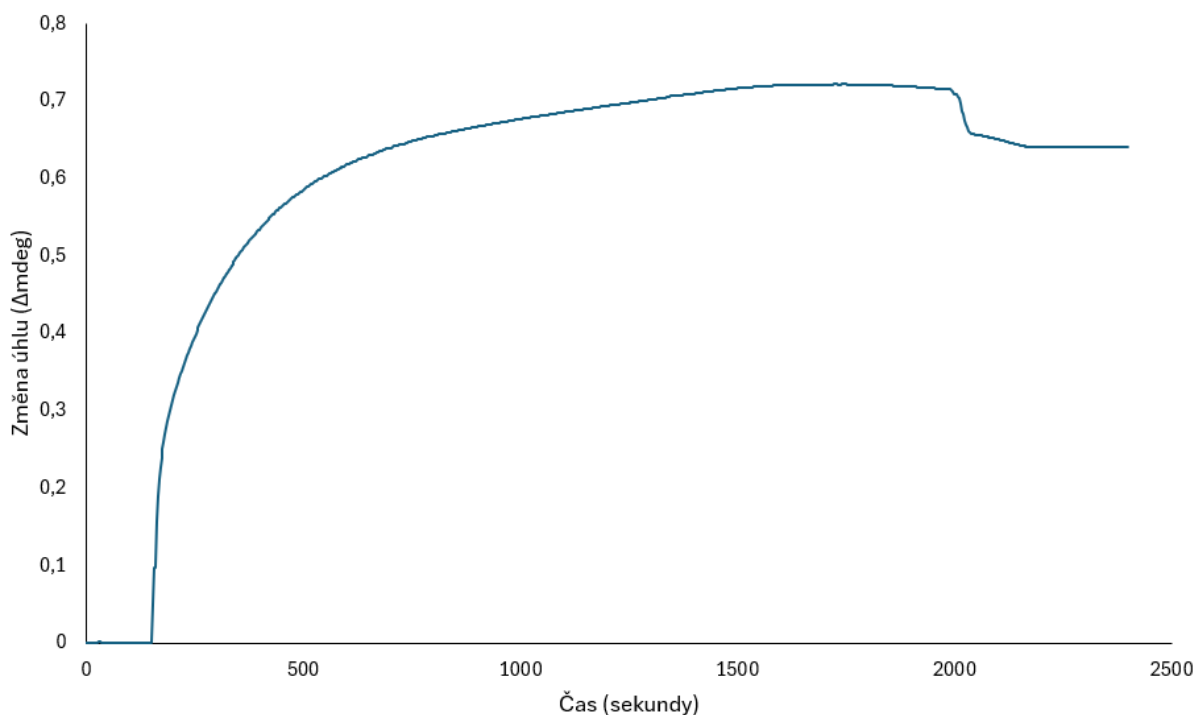


Obr. 23 - Vazebné křivky interakce protilátek anti-HE4 2B13 1.1. s nativním antigenem HE4. Koncentrace 0,05–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mobilní fáze – PBS, průtok 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, vlnová délka 670 nm.

SPR analýza pro ověření interakce anti-HE4 protilátek 2B13 1.1. s nativním antigenem HE4 byla prováděna opakovaně. Nicméně kvůli problémům se zavzdušněním systému byla vybrána pouze některá měření, která umožnila vyhodnocení záznamu (**Obr. 23**). Reaktivita anti-HE4 2B13 1.1. s nativním antigenem HE4 byla potvrzena. Byl pozorován vzrůstající trend vazebných křivek s rostoucí koncentrací dávkovaného antigenu do koncentrace 1 $\mu\text{g/mL}$, poté byl patrný pokles, jenž mohl být způsoben přesycením systému a možným sterickým stíněním přítomností velkého množství molekul HE4 v poměru k počtu molekul protilátek. Na základě těchto výsledků bylo určeno, že maximum koncentračního rozmezí HE4 bude pro následující analýzy 1,5–2 $\mu\text{g/mL}$.

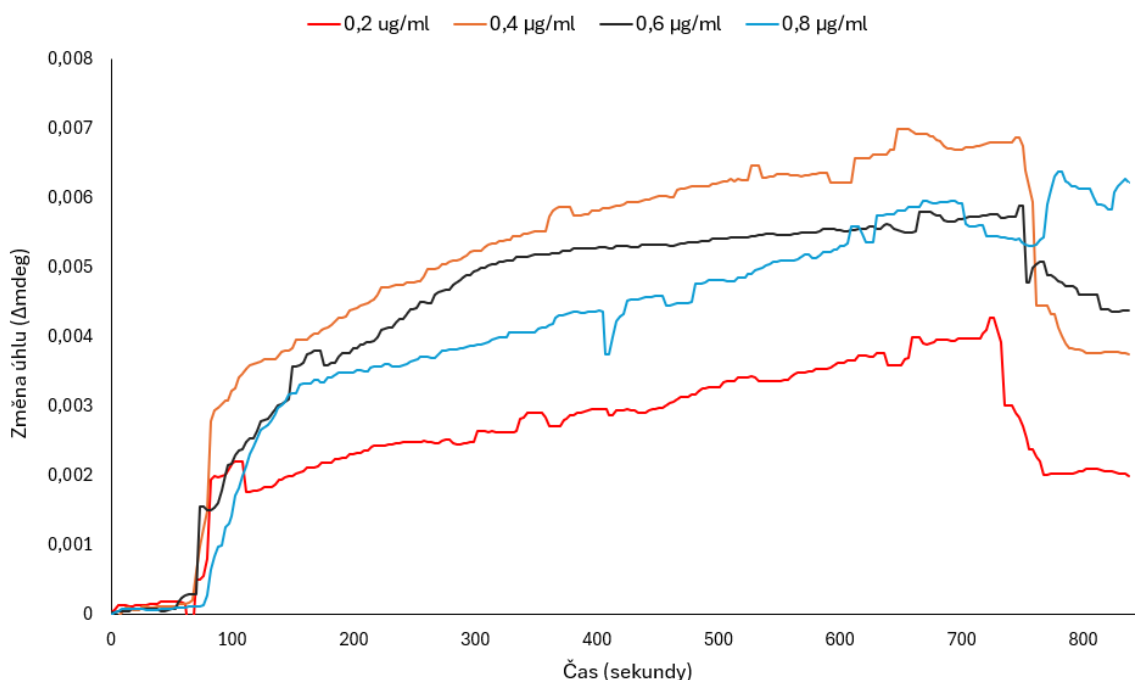
3.3.3 Ověření reaktivity monoklonálních anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s HE4

Stejně jako u analýzy HE4 s protilátkami anti-HE4 2B13 1.1. bylo provedeno měření s anti-HE4 protilátkami 3C24 1.3. za identických podmínek analýzy. Na čipu s AuNPs byla vytvořena SAM vrstva z 11-MUDA. Po aktivaci karboxylových skupin roztokem EDC/S-NHS, za stejných podmínek jako v předešlých experimentech, byl aplikován roztok protilátek o koncentraci 10 $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$. Měření vazby anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. na 11-MUDA bylo prováděno opakovaně. Příklad záznamu vazebné křivky je uveden na **Obr. 24**. Po vztažení signálu měrného kanálu k referenčnímu byl rozdíl úhlu před a po aplikaci protilátek ustálen na přibližné hodnotě 0,64 Δmdeg .



Obr. 24 - Vazebná křivka anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. na 11-MUDA. Mobilní fáze – PBS, průtok 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, 10 $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$ anti-HE4 3C24 1.3., vlnová délka 670 nm.

Po navázání protilátek byla následně opět provedena blokace zbylých reaktivních skupin a po ekvilibraci čipu mobilní fázi (1 M PBS pufr, průtok 20 $\mu\text{l}/\text{min}$) byl dávkován roztok nativního antigenu HE4 v koncentračním rozmezí 0,2–1,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Záznamy vazebných křivek nativního antigenu HE4 jsou na **Obr. 25**.



Obr. 25 - Vazebné křivky interakce anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s nativním antigenem HE4. Mobilní fáze – PBS, průtok 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, koncentrace 0,2–0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, vlnová délka 670 nm.

Na rozdíl od anti-HE4 protilátek 2B13 1.1. křivky s protilátkami 3C24 1.3. nevykazovaly hladký průběh a reaktivita anti-HE4 3C24 1.3. s nativním antigenem HE4 byla výrazně horší, což je vidět na hodnotě největšího vzestupu, který činil přibližně 0,007 Δmdeg , zatímco u 2B13 1.1. to bylo cca 0,014 Δmdeg . Nízká kvalita těchto vazebných křivek mohla tudíž souviset s těmito nízkými vzestupy, při kterých jsou zaznamenatelné jinak nepatrné interference, případně kolísání průtoku apod. Vazebné křivky nativního antigenu HE4 na protilátky 3C24 1.3. vykazovaly vzestupný trend s rostoucí koncentrací pouze do koncentrace HE4 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, po aplikaci vyšších koncentrací již docházelo k poklesu. Byly testovány i koncentrace nad 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, konkrétně 1; 1,25; 1,5; 1,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Výsledné křivky však nevykazovaly standardní průběh, nebylo možné je vyhodnotit, a proto zde nejsou uvedeny. V těchto experimentech byla použita zakoupená nová šarže proteinu HE4. Analýza s těmito protilátkami byla prováděna opakovaně, ovšem vždy se stejným nebo podobným výsledkem.

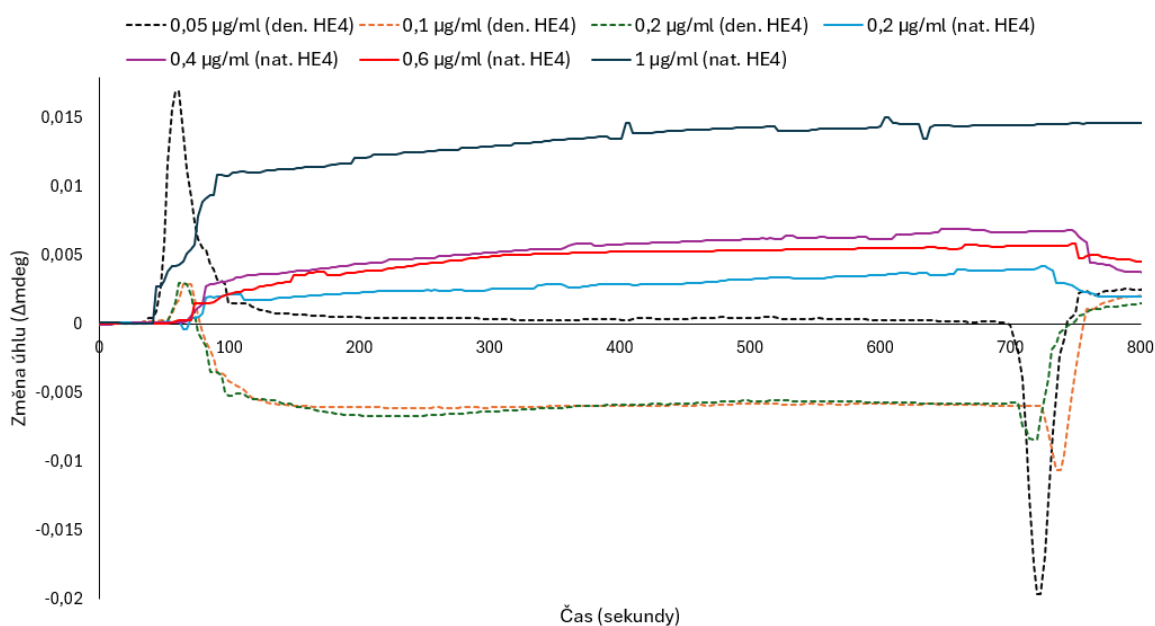
Vzhledem k výsledkům byl změněn pufr použitý pro vazbu antigenu, kdy byl použitý PBS pufr s přidávkem detergentu Tween 20 (PBS-T). Dále byl použit pro experimenty s protilátkami 3C24 nový zlatý čip, který byl modifikován stejným způsobem. Byl také zkoumán rozdíl

mezi blokadou čipu 1 M ethanolaminem a 1% roztokem BSA. Výsledkem těchto experimentů bylo získání nových vazebných křivek (0,2; 0,4; 0,6; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), jejichž maximální dosažené hodnoty Δmdeg byly srovnatelné s křivkami na **Obr. 25**. Tyto křivky jsou uvedeny na **Obr. 26**, kde jsou spojeny s křivkami získanými v dalším experimentu (viz kap. 3.3.3.1). Nelze tedy konstatovat, že by tyto změny v postupu analýzy měly zásadní vliv na zlepšení výsledků.

3.3.3.1 Ověření reaktivity monoklonálních anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s denaturovaným HE4

S ohledem na výše uvedené výsledky byla provedena také analýza s denaturovaným proteinem HE4. K tomuto experimentu nás vedl předpoklad, že nativní antigen HE4 může mít tendenci k nežádoucí agregaci molekul, a tím může být negativně ovlivněna vazba na protilátky. Tento problém byl řešen v jedné, dosud nezveřejněné práci imunochemické skupiny, kde bylo cílenou částečnou denaturací proteinu pentraxin 3 (PTX3) dosaženo lepších výsledků. Nativní protein HE4 byl proto denaturován působením roztoku SDS a 2-merkptoethanolu, dle postupu uvedeného v kap. 2.2.

Pro analýzu denaturovaného antigenu HE4 byl pro SPR analýzu modifikován čip stejným způsobem, jako v předešlých experimentech s následnou imobilizací anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. Po provedení blokace 1% BSA byly aplikovány roztoky denaturovaných antigenů HE4 v koncentračním rozmezí 0,05–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Porovnání výsledných křivek nativního a denaturovaného HE4 je uvedeno na **Obr. 26**. Křivky s denaturovanými HE4 jsou označeny přerušovanou čarou.



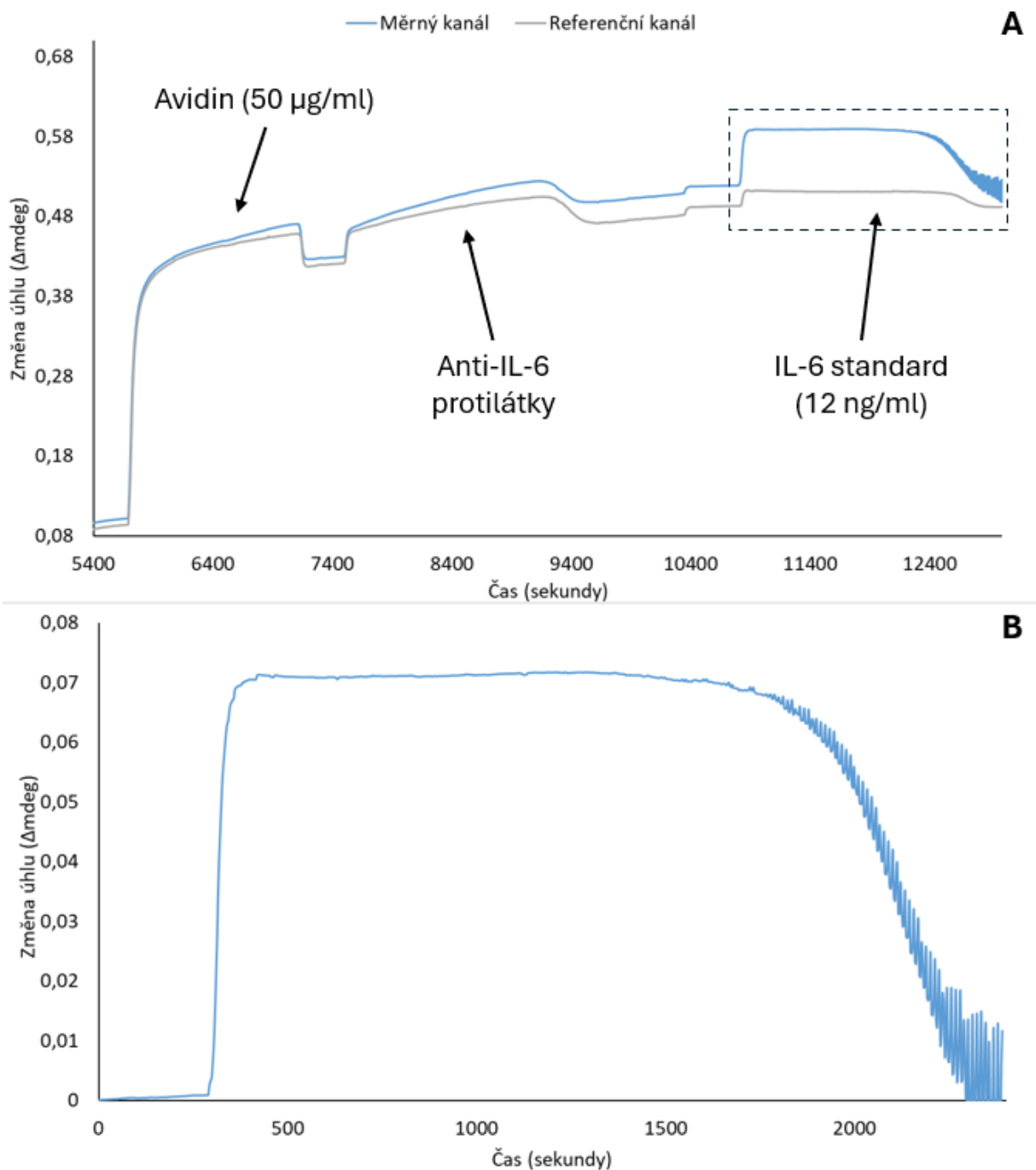
Obr. 26 – Vazebné křivky interakce anti-HE4 protilátek 3C24 1.3. s nativním a denaturovaným antigenem HE4. Mobilní fáze – PBS-T, průtok 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, koncentrace nat. HE4 0,2–1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, koncentrace den. HE4 0,05–0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, vlnová délka 670 nm.

Vazba nativního antigenu HE4 na anti-HE4 protilátky 3C24 1.3. vykazovala standardní průběh se vzestupem do koncentrace 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ s výjimkou koncentrace 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kde byl vzestup křivky větší než pro koncentraci 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Výsledky jsou srovnatelné s výsledky uvedenými na **Obr. 25**. Naopak křivky denaturovaného HE4 vykazovaly odlišný trend, kde na začátku dávkování většinou docházelo k mírnému vzestupu, ale ihned následoval rapidní pokles až do záporných hodnot. Po porovnání charakteru křivek denaturovaného HE4 s výsledky denaturovaného PTX3, u kterých denaturace přinesla pozitivní výsledky a potvrdila agregaci proteinů, v případě HE4 toto potvrzeno nebylo a lze konstatovat, že při porovnání obou testovaných protilátek, vykazují anti-HE4 protilátky 2B13 1.1. vyšší afinitu.

3.3.4 Ověření funkčnosti biotinem-modifikovaného zlatého čipu

Tento experiment byl prováděn v návaznosti na dot blot analýzu anti-HE4 aptamerů CTapt-M-582, jenž neposkytla hodnotitelné výsledky. Před samotnou analýzou CTapt-M-582 s nativním antigenem HE4 bylo zapotřebí ověřit, zda budou tyto aptamery a čip poskytovat viditelné výsledky s modelovým systémem, aby bylo ověřeno, zda se v případě neúspěšné analýzy jedná o neúspěšnou modifikaci čipu avidinem nebo je problém na straně aptamerů. Pro ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů CTapt-M-582 s nativním antigenem HE4 a modelovým systémem byl využit skleněný čip se sférickými AuNPs modifikovanými biotinem, který byl součástí kitu pro modifikaci čipu avidinem (Regenerable avidin kit), jenž je využíván pro imobilizaci rozpoznávacích prvků prostřednictvím vazby avidin–biotin (BioNavis, Finsko). Aby bylo ověřeno, zda je čip funkční a poskytuje spolehlivé výsledky, byla nejdříve provedena zkušební analýza se standardem IL-6 a protilátkami proti IL-6 (Sigma-Aldrich, USA) jejichž reaktivita je garantována výrobcem. Experiment byl proveden dle návodu přiloženém v kitu společně s čipem a zásobním roztokem avidinu.

Experiment byl zahájen aplikací roztoku avidinu o koncentraci 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na čip při průtoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na molekuly avidinu byly poté imobilizovány protilátky proti IL-6. Po dokončení vazby a dostatečném promytí mobilní fází (1 M PBS pufr, průtok 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.) byl zkušebně aplikován standard IL-6 o koncentraci 12 ng/mL při průtoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Podrobný postup měření lze nalézt v kap. 2.4.4. Kompletní záznam z analýzy je uveden na **Obr. 27A**. Na **Obr. 27B** je výřez (ohraňováno přerušovanou čarou) vazebné křivky standardu IL-6 vztažené k referenční křivce.

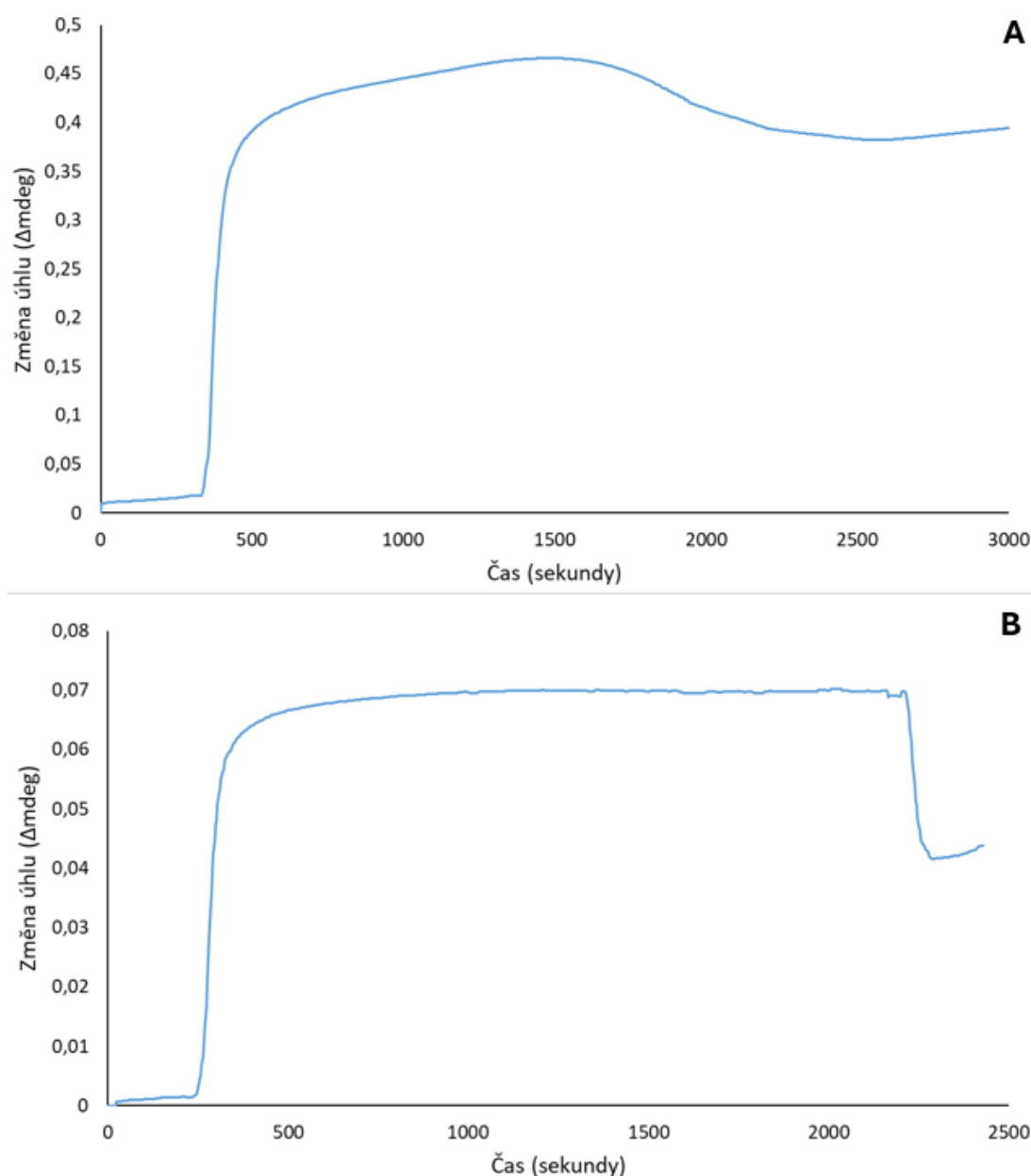


Obř. 27 – SPR sensogramy pro ověření funkčnosti anti-HE4 aptamerů CTApM-582 a biotinem modifikovaného čipu. A – Kompletní vazebná křivka analýzy, B – Výřez vazebné křivky anti-IL-6 protilátek s IL-6 standardem (12 ng/mL), mobilní fáze – PBS, průtok 20 μ l/min, vlnová délka – 670 nm (modrá křivka), 785 nm (šedá křivka).

Úhlový rozdíl před a po vazbě avidinu činil přibližně 0,3, což odpovídalo intervalu, který byl popsán v návodu (0,3–0,35 Δ mdeg). Po vazbě biotinylovaných anti-IL-6 protilátek byl úspěšně navázán IL-6 standard. Po potvrzení postupu modifikace čipu, imobilizace biotinylovaných protilátek a účinné vazbě antigenu IL-6 byl proveden experiment s biotinylovaným anti-HE4 aptamerem CTApM-582.

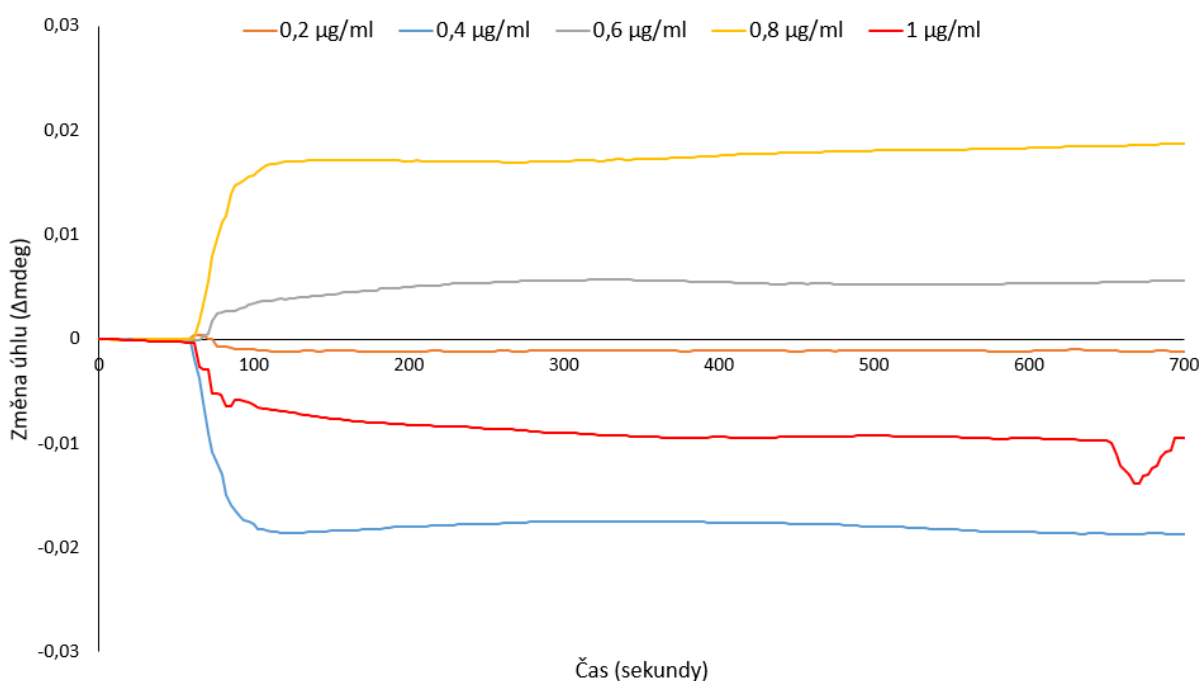
3.3.5 Ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů CTApM-582 s HE4

Analýza reaktivity nativního antigenu HE4 s biotinylovanými anti-HE4 aptamery CTApM-582 byla provedena na čipu modifikovaném pro analýzu stejným postupem jako pro modelový systém, viz kap. 3.3.4. Postup experimentu byl prováděn dle návodu přiloženém ve výše zmíněném kitu. Nejdříve bylo aplikováno 50 $\mu\text{g/mL}$ avidinu při průtoku 20 $\mu\text{l/min.}$, viz **Obr. 28A**. Poté byly na avidin imobilizovány anti-HE4 aptamery CTApM-582 (490 pmol/mL) prostřednictvím vazby avidin–biotin při průtoku 10 $\mu\text{l/min.}$, viz **Obr. 28B**.



Obr. 28 - Vazebné křivky avidinu a anti-HE4 aptamerů CTApM-582. A – Vazebná křivka avidinu, 50 $\mu\text{g/mL}$, průtok 20 $\mu\text{l/min.}$, B – Vazebná křivka interakce anti-HE4 aptameru CTApM-582 s avidinem, 490 pmol/mL , průtok 10 $\mu\text{l/min.}$ Mobilní fáze – vazebný pufr pro aptamery, vlnová délka - 670 nm.

Rozdíl úhlu před a po vazbě avidinu na čip činil přibližně 0,37 Δ mdeg, což bylo lehce nad interval specifikovaný v návodu (0,3–0,35 Δ mdeg) a také více než u zkušebnímu experimentu, viz kapitola 3.3.4., tudíž vazba byla úspěšná. Po ustálení křivky byly aplikovány aptamery, jejichž navázané množství na čipu odpovídalo úhlovému rozdílu před a po aplikaci 0,041 Δ mdeg. Toto množství je v porovnání s vazbou protilátek řádově nižší. Aptamery byly ovšem aplikovány, z důvodu omezeného množství, v koncentraci 490 pmol/mL, zatímco protilátky byly dávkovány v koncentraci 1 μ g/mL. Aptamery jsou ale běžně využívány v řádově menším množství v porovnání s protilátkami. Křivka potvrzuje vazbu aptameru na čip. Na imobilizované aptamery byl poté aplikován nativní antigen HE4 v rozmezí koncentrací 0,2–1 μ g/mL. Výsledný záznam vazebných křivek je uvedený na **Obr. 29**.



Obr. 29 - Vazebné křivky interakce anti-HE4 aptameru CTapt-M-582 s nativním antigenem HE4. Mobilní fáze – vazebný pufr pro aptamery, průtok – 20 μ l/min, koncentrace HE4 0,2–1 μ g/mL, vlnová délka – 670 nm.

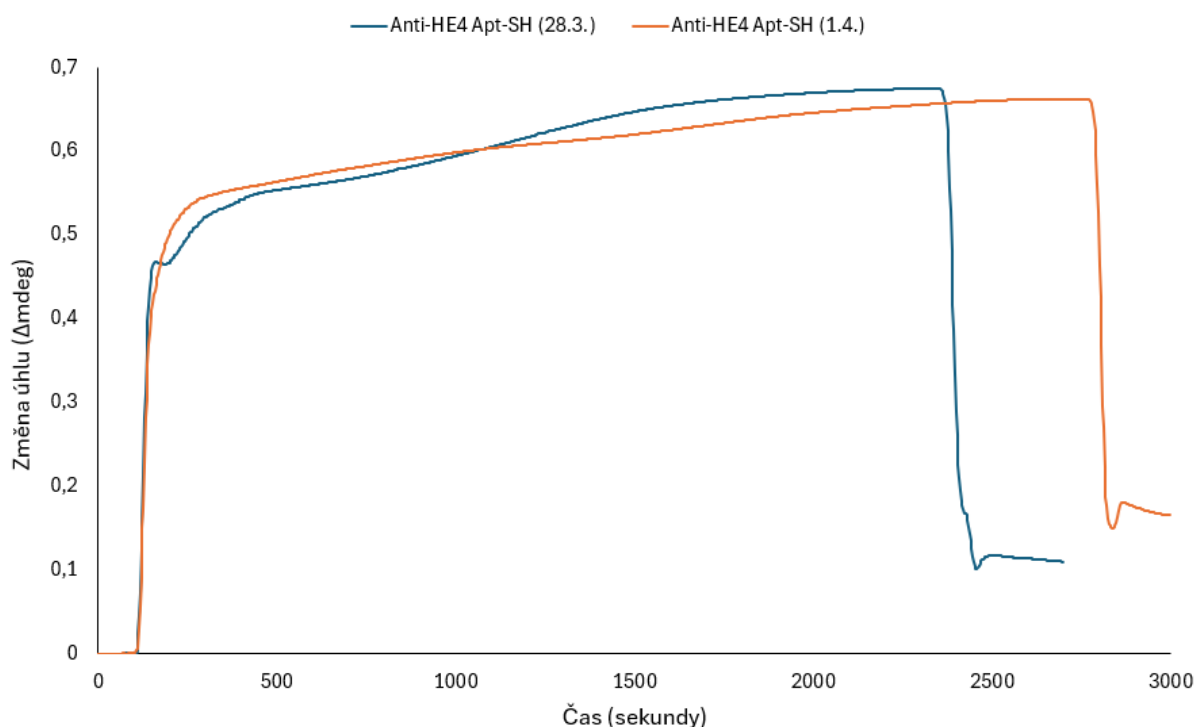
Všechny křivky vykazovaly, s výjimkou koncentrace 0,6 a 0,8 μ g/mL, pokles do záporných hodnot. Nebyl pozorován trend vzestupných křivek s rostoucí koncentrací antigenu HE4, tak jako v případě protilátek. Pro ověření výsledků byla provedena analýza za stejných podmínek opakovaně, nicméně bylo dosaženo podobných výsledků s výjimkou křivky 0,6 μ g/mL, u které byl tentokrát zaznamenán také pokles téměř identický křivce 1 μ g/mL.

Na základě informací nalezených v literatuře byla vyslovena hypotéza, zda by tento úkaz nemohl být způsoben náhlou změnou prostorové konformace imobilizovaných aptamerů při setkání s molekulami HE4, vedoucí ke vzniku tzv. „negativního komplexu“, což mohlo

způsobit negativní přírůstek ke změně refraktivního indexu. Tento fenomén není v praxi běžný, tuto hypotézu lze nicméně podložit několika příklady z literatury, kdy také docházelo k poklesu vazebných křivek do negativních hodnot při SPR analýzách s aptamery, v některých případech dokonce i s protilátkami [178, 179]. V našem případě ale tento fenomén nemůžeme potvrdit vzhledem k tomu, že trend křivek neodpovídá stoupající koncentraci, což bylo v publikaci od Bonnet a kol. (2021) [178] i Pons a kol. (2022) [179] jednoznačně viditelné. Reaktivitu anti-HE4 aptamerů CTapt-M-582 se ani MP-SPR analýzou za nastavených podmínek nepodařilo prokázat.

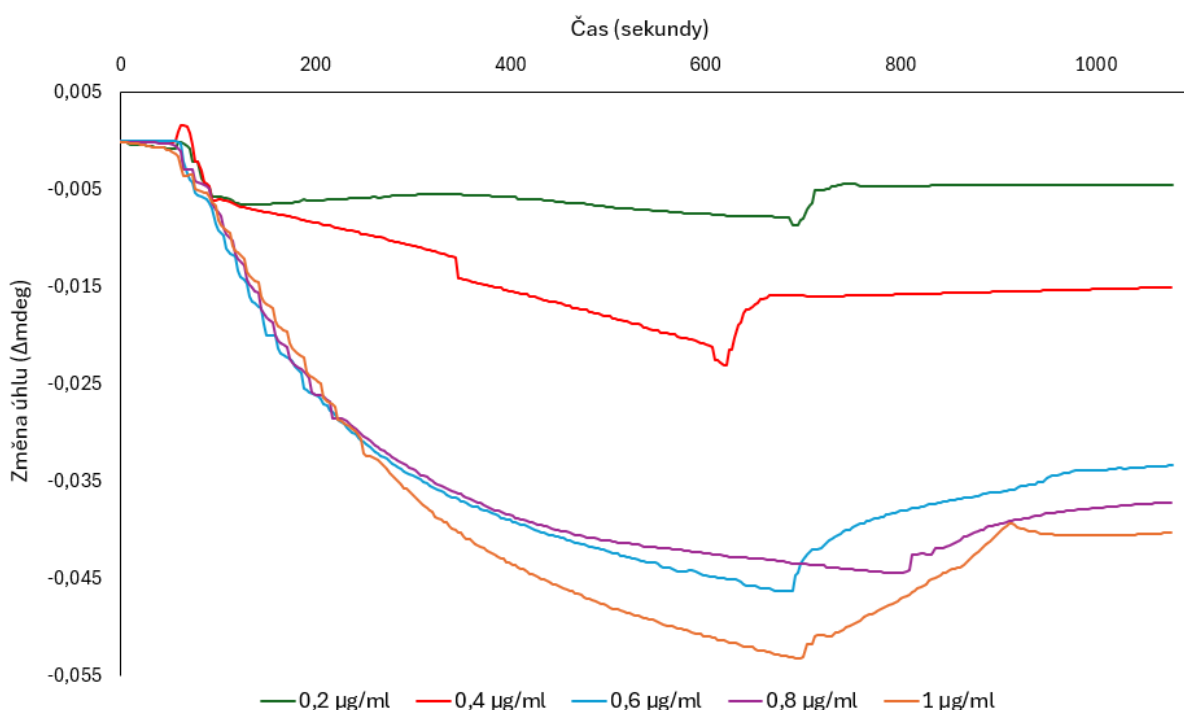
3.3.6 Ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů CTapt-SH s HE4

Pro ověření reaktivity anti-HE4 aptamerů CTapt-SH byl využit nemodifikovaný zlatý čip, na který byly aptamery, prostřednictvím vazby AuNPs a thiolových funkčních skupin, imobilizovány bez využití tvorby SAM z 11-MUDA. Kompletní postup je uveden v kap. 2.4.5. Před samotnou analýzou byl čip ponořen na 12–16 hodin do roztoku 50 mM TCEP, aby byl, dle doporučení výrobce (BioNavis, Finsko), povrch čipu zredukován. Jako první byly při průtoku 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. aplikovány anti-HE4 aptamery CTapt-SH o koncentraci 490 pmol/mL v redukčním roztoku 99 mM TCEP pro rozvolnění struktury. Záznam dvou nezávislých vazebných křivek thiolovaných aptamerů na AuNPs je na **Obr. 30**.



Obr. 30 – Vazebné křivky interakce anti-HE4 aptamerů CTapt-SH s AuNPs. Mobilní fáze – vazebný pufr pro aptamery, průtok – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, koncentrace 490 pmol/mL, vlnová délka – 670 nm.

I v případě thiolovaných anti-HE4 aptamerů CTAp_t-SH došlo k navázání na zlatý čip přes –SH skupiny. Rozdíl změny úhlu před a po dávkování činil u prvního měření (modrá křivka) přibližně 0,11 Δmdeg a u druhého měření (oranžová křivka) přibližně 0,165 Δmdeg. V porovnání s CTAp_t-M-582 bylo celkové navázané množství výrazně vyšší. To mohlo být způsobeno velkou vazebnou kapacitou čipu, která nebyla limitována vytvořenou SAM vrstvou nebo omezenou kapacitou interakce biotin–avidin. Po imobilizaci aptamerů proběhlo dávkování nativního HE4 antigenu v rozmezí koncentrací 0,2–1 μg/mL. Výsledné vazebné křivky jsou uvedeny na **Obr. 31**.



Obr. 31 - Vazebné křivky interakce anti-HE4 aptamerů CTAp_t-SH s nativním antigenem HE4. Mobilní fáze – vazebný pufr pro aptamery, průtok – 20 μl/min, koncentrace HE4 0,2–1 μg/mL, vlnová délka - 670 nm.

Na záznamu je viditelný klesající trend křivek opět do záporných hodnot, stejně jako u biotinylovaného anti-HE4 aptameru CTAp_t-M-582, v tomto případě však pro všechny koncentrace antigenu HE4. Na rozdíl od vazebných křivek nativního antigenu HE4 s anti-HE4 aptamerem CTAp_t-M-582 je zde také viditelný trend, kde s rostoucí koncentrací nativního antigenu HE4 křivka klesá postupně až do koncentrace 1 μg/mL. Je možné, že se i v tomto případě jedná o případ vzniku „negativního komplexu“ způsobeném náhlou změnou prostorové konformace aptamerů při setkání s nativním antigenem HE4 [178, 179], stejně jako bylo uvedeno v kap. 3.3.5. I přestože trend křivek odpovídá postupnému poklesu se zvyšující se koncentrací, reaktivitu anti-HE4 aptamerů CTAp_t-SH nemůžeme metodou MP-SPR při tomto nastavení podmínek jednoznačně potvrdit.

4 ZÁVĚR

Pro vytipování protilátek a aptamerů pro konstrukci biosenzoru, jenž detekuje HE4, byla jako první ověřena u vybraných monoklonálních anti-HE4 protilátek (anti-HE4 2B13 1.1., 3C24 1.3., 3C24 1.4.) a aptamerů (CTApt-SH, CTApt-M-582) jejich čistota a kvalita metodou polyakrylamidové gelové elektroforézy za přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Na základě výsledků, které ukázaly přítomnost významné frakce o velikosti 75 kDa, byly protilátky anti-HE4 3C24 1.4. vyloučeny z experimentů metodou MP-SPR. Dalším krokem bylo orientační ověření reaktivity párů protilátka–antigen a aptamer–antigen metodou dot blot. Bylo prokázáno, že všechny protilátky vykazují reaktivitu s HE4 antigenem. Klony 3C24 1.3. a 1.4. byly téměř shodné, zatímco klon 2B13 1.1. vykazoval o cca 21 % nižší intenzitu zabarvení. Analýza aptamerů metodou dot blot neprokázala vazbu HE4 na žádný ze dvou typů aptamerů.

Pomocí multiparametrické povrchové plasmonové rezonance byly provedeny analýzy interakcí párů protilátka–antigen a aptamer–antigen v reálném čase. Byl zaveden postup modifikace čipu vytvořením SAM vrstvy z 11-MUDA a avidinu. Dále byla zavedena metoda imobilizace anti-HE4 protilátek a aptamerů na čip. Ve všech výše uvedených případech došlo k úspěšné vazbě na čip. Analýzy reaktivity anti-HE4 protilátek poskytly jednoznačně pozitivní výsledky. Interakce protilátek klonu 2B13 1.1. s nativním antigenem HE4 vykazovaly vzestup přímo úměrný stoupající koncentraci do 1 $\mu\text{g/mL}$. Tyto protilátky vykazovaly nejvyšší afinitu vůči nativnímu antigenu HE4. Výsledky analýz interakcí protilátek klonu 3C24 1.3. s HE4 byly jednoznačně horší. Proto byla pro ověření provedena analýza interakce téhož klonu s denaturovaným antigenem HE4, jenž neprokázala, že zamezením agregace HE4 by mohla být vazba s protilátkami zpřístupněna. Analýza interakce anti-HE4 aptamerů CTApt-M-582 s HE4 byla ověřena za využití Regenerable Avidin kitu (BioNavis, Finsko). Všechny vzorky HE4 vykazovaly pokles do záporných hodnot. Analýza reaktivity anti-HE4 aptamerů CTApt-SH s nativním HE4 poskytovala vazebné křivky s podobnými poklesy do záporných hodnot.

Na základě výsledků poskytnutých MP-SPR analýzou, jenž byla v této práci zavedena, bylo zjištěno, že oba dva klony anti-HE4 protilátek vykazují reaktivitu vůči HE4. Klon protilátek 2B13 1.1. vykazoval vyšší afinitu a lze ho tedy z tohoto výběru považovat za vhodnější pro konstrukci HE4 biosenzoru. I přestože se za těchto nastavených podmínek nepodařilo prokázat reaktivitu žádného z aptamerů, zavedením metody MP-SPR byly získány důležité informace, které budou moci v budoucnu přispět k možnému úspěšnému ověření jejich reaktivity s HE4

antigenem. Pro budoucí analýzy anti-HE4 protilátek a aptamerů by bylo vhodné se i nadále zaměřit na optimalizaci parametrů stanovení a přípravy čipu, např. volba SAM. Směs SAM z 3-MPA a 11-MUDA v poměru 10:1 je obecně považována za lepší, co se týče vazebné kapacity, pokrytí čipu a zamezení nespecifických vazeb, než jednotlivé látky použité samostatně. Dále by bylo vhodné se zaměřit na optimalizaci doby ekvibrace povrchu čipu mobilní fází po imobilizaci rozpoznávacího prvku, jelikož při nedostatečném promytí povrchu může vlivem stálé přítomnosti nevymytých chemikálií docházet k pomalému posunu základní linie.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SPRINGER, D., VALÍK, D., KUČERA, R., ZDRAŽILOVÁ DUBSKÁ, L., KARLÍKOVÁ, M. et al. Doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k využití nádorových markerů v klinické praxi. Online. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2021, 29(4). Dostupné také z: https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2021/04/KBM-1_2021_tumormarkery-dopor.pdf.
- [2] NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). *Tumor Markers*. Online. National Cancer Institute (NIH). 2023. Dostupné také z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>.
- [3] HERTLEIN, L., STIEBER, P., KIRSCHENHOFER, A., FURST, S., MAYR, D. et al. Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases. Online. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2012, 50(12). Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0097>.
- [4] ZHANG, L., CHEN, Y. a WANG, K. Comparison of CA125, HE4, and ROMA index for ovarian cancer diagnosis. Online. *Current Problems in Cancer*. 2019, 43. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2018.06.001>.
- [5] VURAL, B., ÇALIŞKAN, M., KAMAÇ, M.B. a SEZGINTÜRK, M.K. A disposable and ultrasensitive immunosensor for the detection of HE4 in human serum samples. Online. *Chemical Papers*. 2024, 78. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11696-024-03359-9>.
- [6] DOCHEZ, V., CAILLON, H., VAUCEL, E., DIMET, J., WINER, N. et al. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. Online. *Journal of Ovarian Research*. 2019, 12(28). Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0503-7>.
- [7] BANDIERA, E., ROMANI, C., SPECCHIA, C., ZANOTTI, L., GALLI, C. et al. Serum human epididymis protein 4 (HE4) and Risk for Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as new diagnostic and prognostic tools for epithelial ovarian cancer management. Online. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2011, 20(12). Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0635>.
- [8] TIAN, H. a CHEN, L. Human Epididymis Protein 4 (HE4) as a promising biomarker and therapy target in fibrotic diseases: A review. Online. *Journal of Holistic Integrative Pharmacy*. 2024, 5. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhip.2024.12.001>.
- [9] MOORE, R.G., HILL, E.K., HORAN, T., YANO, N., KIM, K. et al. HE4 (WFDC2) gene overexpression promotes ovarian tumor growth. Online. *Scientific Reports*. 2014, 4. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep03574>.
- [10] CHEN, Y., MU, X., WANG, S., ZHAO, L., WU, Y. et al. WAP four-disulfide core domain protein 2 mediates the proliferation of human ovarian cancer cells through the

- regulation of growth- and apoptosis-associated genes. Online. *Oncology Reports*. 2013, 29(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/or.2012.2114>.
- [11] KIRCHHOFF, C. Molecular characterization of epididymal proteins. Online. *Reviews of Reproduction*. 1998, 3(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030086>.
- [12] BRENNAN, D.J., HACKETHAL, A., METCALF, A.M., COWARD, J., FERGUSON, K. et al. Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer — A population based study. Online. *Gynecologic Oncology*. 2014, 132(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.10.036>.
- [13] HO, G.-Y. a WEBBER, K. (ed.). *Ovarian Cancer: Updates in Tumour Biology and Therapeutics*. Online. IntechOpen, 2021. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.91528>.
- [14] MATULONIS, U.A., SOOD, A.K., FALLOWFIELD, L., HOWWITT, B.E., SEHOULI, J. et al. Ovarian cancer. Online. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016, 2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>.
- [15] SOUKUPOVÁ, J. Genetické testování u karcinomu ovaria. Online. *Onkologie*. 2022, 16(4). Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/xon.2022.037>.
- [16] LI, J., DOWDY, S., TIPTON, T., PODRATZ, K., LU, W.-G. et al. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. Online. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2009, 9(6). Dostupné z: <https://doi.org/10.1586/erm.09.39>.
- [17] MOORE, R.G., MILLER, M.C., STEINHOFF, M.M., SKATES, S.J., LU, K.H. et al. Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. Online. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2012, 206(4). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.12.029>.
- [18] ANASTASI, E., GRANATO, T., FALZARANO, R., STORELLI, P., TICINO, A. et al. The use of HE4, CA125 and CA72-4 biomarkers for differential diagnosis between ovarian endometrioma and epithelial ovarian cancer. Online. *Journal of Ovarian Research*. 2013, 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-44>.
- [19] MOORE, R.G., MILLER, M.C., EKLUND, E.E., LU, K.H., BAST JR., R.C. et al. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. Online. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2012, 206(4). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.12.028>.
- [20] BARR, C.E., FUNSTON, G., JEEVAN, D., SUNDAR, S., MOUNCE, L.T.A. et al. The Performance of HE4 Alone and in Combination with CA125 for the Detection of Ovarian Cancer in an Enriched Primary Care Population. Online. *Cancers*. 2022, 14(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers14092124>.
- [21] RÖTHLISBERGER, P. a HOLLENSTEIN, M. Aptamer chemistry. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, 134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.007>.

- [22] YANG, L.F., LING, M., KACHEROVSKY, N. a PUN, S.H. Aptamers 101: aptamer discovery and in vitro applications in biosensors and separations. Online. *Chemical Science*. 2023, 14(19). Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d3sc00439b>.
- [23] FAMULOK, M., HARTIG, J.S. a MAYER, G. Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy. Online. *Chemical Reviews*. 2007, 107(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr0306743>.
- [24] MASCINI, M., PALCHETTI, I. a TOMBELLI, S. Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects. Online. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011, 51(6). Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.201006630>.
- [25] KU, T.-H., ZHANG, T., LUO, H., YEN, T.M., CHEN, P.-W. et al. Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. Online. *Sensors*. 2015, 15(7). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s150716281>.
- [26] CIESIOLKA, J., GORSKI, J. a YARUS, M. Selection of an RNA domain that binds Zn²⁺. Online. *RNA*. 1995, 1(5). Dostupné také z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1482428/>.
- [27] FAMULOK, M. a HÜTTENHOFER, A. In vitro selection analysis of neomycin binding RNAs with a mutagenized pool of variants of the 16S rRNA decoding region. Online. *Biochemistry*. 1996, 35(14). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bi952479r>.
- [28] WILSON, C. a SZOSTAK, J.W. Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity. Online. *Chemistry and Biology*. 1998, 5(11). Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(98\)90289-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(98)90289-7).
- [29] PHILLIPS, J.A., LOPEZ-COLON, D., ZHU, Z., XU, Y. a TAN, W. Applications of aptamers in cancer cell biology. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2008, 621(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.031>.
- [30] SEKHON, S.S., UM, H., SHIN, W., LEE, S., MIN, J. et al. Aptabody–aptatope interactions in aptablotting assays. Online. *Nanoscale*. 2017, 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c7nr01827d>.
- [31] COLAS, P., COHEN, B., JESSEN, T., GRISHINA, I., MCCOY, J. et al. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. Online. *Nature*. 1996, 380(6574). Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/380548a0>.
- [32] REVERDATTO, S., BURZ, D.S. a SHEKHTMAN, A. Peptide Aptamers: Development and Applications. Online. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015, 15(12). Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1568026615666150413153143>.
- [33] BREAKER, R.R. Prospects for Riboswitch Discovery and Analysis. Online. *Molecular Cell*. 2011, 43(6). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.024>.

- [34] MCCOWN, P.J., CORBINO, K.A., STAV, S., SHERLOCK, M.E. a BREAKER, R.R. Riboswitch diversity and distribution. Online. *RNA Society*. 2017, 23(7). Dostupné z: <https://doi.org/10.1261/rna.061234.117>.
- [35] BREAKER, R.R. Riboswitches and the RNA world. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, 4(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>.
- [36] SHI, H., HOFFMAN, B.E. a LIS, J.T. RNA aptamers as effective protein antagonists in a multicellular organism. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, 96(18). Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10033>.
- [37] VOROBYEVA, M., VOROBYEV, P. a VENYAMINOVA, A. Multivalent Aptamers: Versatile Tools for Diagnostic and Therapeutic Applications. Online. *Molecules*. 2016, 21(12). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules21121613>.
- [38] SONG, Y., SHI, Y., HUANG, M., WANG, W., WANG, Y. et al. Bioinspired Engineering of a Multivalent Aptamer-Functionalized Nanointerface to Enhance the Capture and Release of Circulating Tumor Cells. Online. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019, 58(8). Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.201809337>.
- [39] GODONOGA, M., LIN, T.-Y., OSHIMA, A., SUMITOMO, K., TANG, M.S.L. et al. A DNA aptamer recognising a malaria protein biomarker can function as part of a DNA origami assembly. Online. *Scientific Reports*. 2016, 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep21266>.
- [40] ZHANG, Z., WANG, S., MA, J., ZHOU, T., WANG, F. et al. Rolling Circle Amplification-Based Polyvalent Molecular Beacon Probe-Assisted Signal Amplification Strategies for Sensitive Detection of B16 Cells. Online. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020, 6(5). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c00288>.
- [41] TAGHDISI, S.M., DANESH, N.M., LAVAEI, P., EMRANI, A.S., HASSANABAD, K.Y. et al. Double targeting, controlled release and reversible delivery of daunorubicin to cancer cells by polyvalent aptamers-modified gold nanoparticles. Online. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, 61. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.009>.
- [42] YAZDANPARAST, S., BENVIDI, A., BANAEI, M., NIKUKAR, H., TEZERJANI, M.D. et al. Dual-aptamer based electrochemical sandwich biosensor for MCF-7 human breast cancer cells using silver nanoparticle labels and a poly(glutamic acid)/MWNT nanocomposite. Online. *Microchimica Acta*. 2018, 185(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2918-z>.
- [43] TAGHAVI, S., RAMEZANI, M., ALIBOLANDI, M., ABNOUS, K. a TAGHDISI, S.M. Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for in vivo tumor-targeted drug delivery. Online. *Cancer Letters*. 2017, 400. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.04.008>.

- [44] LI, J., CHANG, K.-W., WANG, C.-H., YANG, C.-H., SHIESH, S.-C. et al. On-chip, aptamer-based sandwich assay for detection of glycosylated hemoglobins via magnetic beads. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, 79. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.029>.
- [45] WANG, Z., YANG, X., LEE, N.Z. a CAO, X. Multivalent Aptamer Approach: Designs, Strategies, and Applications. Online. *Micromachines*. 2022, 13(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi13030436>.
- [46] ELLINGTON, A.D. a SZOSTAK, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Online. *Nature*. 1990, 346(6287). Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- [47] TUERK, C. a GOLD, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. Online. *Science*. 1990, 249(4968). Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.
- [48] XU, Y., JIANG, X., ZHOU, Y., MA, M., WANG, M. et al. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Technologies and Aptamer-Based Applications: Recent Progress and Challenges in Precision Medicine of Infectious Diseases. Online. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9(704077). Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.704077>.
- [49] KOMAROVA, N. a KUZNETSOV, A. Inside the Black Box: What Makes SELEX Better? Online. *Molecules*. 2019, 24(19). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24193598>.
- [50] BLIND, M. a BLANK, M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. Online. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*. 2015, 4(e223). Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.74>.
- [51] KIMOTO, M., TAN, H.P., TAN, Y.S., MISLAN, N.A.B.M a HIRAO, I. Success probability of high-affinity DNA aptamer generation by genetic alphabet expansion. Online. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2023, 378(1871). Dostupné z: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.6328848.v2>.
- [52] ZHUO, Z., YU, Y., WANG, M., LI, J., ZHANG, Z. et al. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. Online. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(10). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>.
- [53] GAO, S., ZHENG, X., JIAO, B. a WANG, L. Post-SELEX optimization of aptamers. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9556-2>.
- [54] ODEH, F., NSAIRAT, H., ALSHAER, W., ISMAIL, M.A., ESAWI, E. et al. Aptamers Chemistry: Chemical Modifications and Conjugation Strategies. Online. *Molecules*. 2020, 25(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25010003>.

- [55] BOGNÁR, Z. a GYURSCÁNYI, R.E. Aptamers against Immunoglobulins: Design, Selection and Bioanalytical Applications. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(16). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21165748>.
- [56] JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M. a SCHLOMCHIK, M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Online. 5th edition. Garland Science, 2001. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>.
- [57] MILSTEIN, C. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. Online. *BioEssays*. 1999, 21(11). Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199911\)21:11%3C966::AID-BIES9%3E3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11%3C966::AID-BIES9%3E3.0.CO;2-Z).
- [58] FRENZEL, A., HUST, M. a SCHIRRMANN, T. Expression of Recombinant Antibodies. Online. *Frontiers in Immunology*. 2013, 4. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00217>.
- [59] SCHIRRMANN, T., MEYER, T., SCHÜTTE, M., FRENZEL, A. a HUST, M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. Online. *Molecules*. 2011, 16(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules16010412>.
- [60] HE, M. a TAUSSIG, M.J. Eukaryotic ribosome display with in situ DNA recovery. Online. *Nature Methods*. 2007, 4(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nmeth1001>.
- [61] GRAINGER, D.W. a KIRKPATRICK, C.J., DUCHEYNE, P., HEALY, K.E. a HUTMACHER, D.W. (ed.). *Comprehensive Biomaterials*. Online. Elsevier Science, 2011. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2009-1-28384-5>.
- [62] ŠTERN, P. Struktura protilátek a jejich reaktivita. Online. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2016, 24(1). Dostupné také z: <https://casopiskbm.cz/pdfs/kbm/2016/01/02.pdf>.
- [63] THIVIYANATHAN, V. a GORENSTEIN, D.G. Aptamers and the Next Generation of Diagnostic Reagents. Online. *Proteomics - Clinical Applications*. 2012, 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/prca.201200042>.
- [64] AGNELLO, L., CAMORANI, S., FEDELE, M. a CERCHIA, L. Aptamers and antibodies: rivals or allies in cancer targeted therapy? Online. *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*. 2021, 2. Dostupné z: <https://doi.org/10.37349/etat.2021.00035>.
- [65] TOH, S.Y., CITARTAN, M., GOPINATH, S.C.B. a TANG, T.-H. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 64. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.026>.
- [66] ARSHAVSKY-GRAHAM, S., URMANN, K., SALAMA, R., MASSAD-IVANIR, N., WALTER, J.-G. et al. Aptamers vs. antibodies as capture probes in optical porous silicon biosensors. Online. *Analyst*. 2020, 145(14). Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d0an00178c>.

- [67] NIMJEE, S.M., RUSCONI, C.P. a SULLENGER, B.A. APTAMERS: an emerging class of therapeutics. Online. *Annual Review of Medicine*. 2005, 56. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.062904.144915>.
- [68] SCHASFOORT, R.B.M. (ed.). *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Online. 2nd Edition. The Royal Society of Chemistry, 2017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/9781788010283>.
- [69] CHEN, W., LI, Z., CHENG, W., WU, T., LI, J. et al. Surface plasmon resonance biosensor for exosome detection based on reformative tyramine signal amplification activated by molecular aptamer beacon. Online. *Journal of Nanobiotechnology*. 2021, 19(450). Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01210-x>.
- [70] HOMOLA, J., YEE, S.S. a GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. Online. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1999, 54(1-2). Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00321-9).
- [71] FARKA, Z., JUŘÍK, T., KOVÁŘ, D., TRNKOVÁ, L. a SKLÁDAL, P. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges. Online. *Chemical Reviews*. 2017, 117. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00037>.
- [72] *Sensor slides*. Online. BioNavis. Dostupné také z: <https://bionavis.com/products/sensor-slides/#mp-spr-sensors>.
- [73] *SPR Sensor chips*. Online. XANTEC BIOANALYTICS GMBH. Xantec. Dostupné také z: https://www.xantec.com/products/spr_sensorchips/.
- [74] SABBAN, B. *Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its highaffinity FcεRI receptor*. PhD thesis. The University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology, 2011. Dostupné také z: https://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/2040/2/Sabban%2C_Sari.pdf.
- [75] CHANG, C.-C. Recent Advancements in Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensing Strategies. Online. *Biosensors*. 2021, 11(7). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios11070233>.
- [76] STEBUNOV, Y.V., ARSEININ, A.V. a VOLKOV, V.S. SPR analysis of antibody-antigen interactions using graphene oxide linking layers. Online. *Materials Today: Proceedings*. 2018, 5(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.06.047>.
- [77] VURAL, B., ÇALIŞKAN, M., KAMAÇ, M.B. a SEZGINTÜRK, M.K. A disposable and ultrasensitive immunosensor for the detection of HE4 in human serum samples. Online. *Chemical Papers*. 2024, 78. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11696-024-03359-9>.
- [78] HOLZER, B., MANOLI, K., DITARANTO, N., MACCHIA, E., TIWARI, A. et al. Characterization of Covalently Bound Anti-Human Immunoglobulins on Self-

- Assembled Monolayer Modified Gold Electrodes. Online. *Advanced Biosystems*. 2017, 1(11). Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adbi.201700055>.
- [79] FÄGERSTAM, L.G., FROSTELL, Å., KARLSSON, R., KULLMAN, M., LARSSON, A. et al. Detection of Antigen-Antibody Interactions by Surface Plasmon Resonance. Online. *Journal of Molecular Recognition*. 1990, 3(5/6). Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jmr.300030507>.
- [80] *MP-SPR Navi™ 200 OTSO*. Online. Scientific Solutions. 2016-2025. Dostupné také z: <https://scisol.com.au/product/spr-navi200/>.
- [81] WEI, J. *SPR Sensorgram Explained*. Online. AFFINITÉ INSTRUMENTS. Affinité Blogs. 2020. Dostupné také z: <https://www.affiniteinstruments.com/post/spr-sensorgram-explained>.
- [82] MARQUART, A. *Interaction kinetics*. Online. SPRpages. 2006-2020, 2023. Dostupné také z: <https://www.sprpages.nl/kinetics>.
- [83] KAMAL EDDIN, F.B. a FEN, Y.W. The Principle of Nanomaterials Based Surface Plasmon Resonance Biosensors and Its Potential for Dopamine Detection. Online. *Molecules*. 2020, 25(12). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25122769>.
- [84] KORHONEN, K., GRANQVIST, N., KETOLAINEN, J. a LAITINEN, R. Monitoring of drug release kinetics from thin polymer films by multi-parametric surface plasmon resonance. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, 494(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.071>.
- [85] BEEG, M., NOBILI, A., ORSINI, B., ROGAI, F., GILARDI, D. et al. A Surface Plasmon Resonance based assay to measure serum concentrations of therapeutic antibodies and anti-drug antibodies. Online. *Scientific Reports*. 2019, 9(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37950-4>.
- [86] ANDRYUKOV, B.G., , ZAPOROZHETS, T.S., BESEDNOVA, T.A. a ROMASHKO, R.V. Label-Free Biosensors for Laboratory-Based Diagnostics of Infections: Current Achievements and New Trends. Online. *Biosensors*. 2020, 10(11). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios10020011>.
- [87] DIXIT, C.K. Surface Regeneration of Gold-Coated Chip for Highly-Reproducible Surface Plasmon Resonance Immunoassays. Online. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*. 2014, 5(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000149>.
- [88] MASOODI, K.Z., LONE, S.M. a RASOOL, R.S. *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology*. Online. Academic Press, 2021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-01818-9>.
- [89] SVOBODOVÁ, Z., NOVOTNÝ, J., OSPALKOVÁ, B., SLOVÁKOVÁ, M., BÍLKOVÁ, Z. et al. Affiblot: a dot blot-based screening device for selection of reliable antibodies. Online. *Analytical Methods*. 2021, 13(35). Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d1ay00955a>.

- [90] CITARTAN, M. Aptamers as the powerhouse of dot blot assays. Online. *Talanta*. 2021, 232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122436>.
- [91] SURTI, P.V., KIM, M.W., PHAN, L.M.T., KAILASA, S.K., MUNGRAY, A.K. et al. Progress on dot-blot assay as a promising analytical tool: Detection from molecules to cells. Online. *Trends in Analytical Chemistry*. 2022, 157. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116736>.
- [92] MAČÁLA, J., MAKHNEVA, E., HLAVÁČEK, A., KOPECKÝ, M., GORRIS, H.H. et al. Upconversion Nanoparticle-Based Dot-Blot Immunoassay for Quantitative Biomarker Detection. Online. *Analytical Chemistry*. 2024, 96(25). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c00837>.
- [93] *How to Select the Best Western Blot Membrane*. Online. LICORbio. 2020. Dostupné také z: <https://www.licorbio.com/blog/how-to-select-the-best-Western-blot-membrane>.
- [94] *When to use nitrocellulose vs PVDF membranes*. Online. Azure Biosystems. 2024. Dostupné také z: <https://azurebiosystems.com/blog/nitrocellulose-vs-pvdf-membranes/>.
- [95] WANG, Y., LI, D., REN, W., LIU, Z., DONG, S. et al. Ultrasensitive colorimetric detection of protein by aptamer–Au nanoparticles conjugates based on a dot-blot assay. Online. *Chemical Communications*. 2008, 22. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b801055b>.
- [96] TANG, D., YUAN, R. a CHAI, Y. Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Clinical Immunoassay Using Thionine-Doped Magnetic Gold Nanospheres as Labels and Horseradish Peroxidase as Enhancer. Online. *Analytical Chemistry*. 2008, 80(5). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac702217m>.
- [97] RODIG, S.J. Detecting Horseradish Peroxidase-Labeled Cells. Online. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019, 2019(4). Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099713>.
- [98] DROZD, M., PIETRZAK, M., PARZUCHOWSKI, P.G. a MALINOWSKA, E. Pitfalls and capabilities of various hydrogen donors in evaluation of peroxidase-like activity of gold nanoparticles. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9976-z>.
- [99] ZHU, J., LI, T., HU, J. a WANG, E. A novel dot-blot DNAzyme-linked aptamer assay for protein detection. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 397. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3802-9>.
- [100] KHLEBTSOV, N.G. a DYKMAN, L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. Online. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2010, 111(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2009.07.012>.
- [101] STOTT, D.I. Immunoblotting and dot blotting. Online. *Journal of Immunological Methods*. 1989, 119(2). Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90394-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90394-3).

- [102] *Blotting unit, Dot Blotter*. Online. In: CARL ROTH GMBH. Carl ROTH. Dostupné také z: <https://www.carlroth.com/de/en/blotting-units/blotting-unit/p/t790.1>.
- [103] GRIFFIN, D.M. *Principles of Dot Blots*. Online. BenchSci. 31.října 2017. Dostupné také z: <https://blog.benchsci.com/dot-blot-principles>.
- [104] SVOBODOVÁ, Z., JANKOVIČOVÁ, B., HORÁK, D. a BÍLKOVÁ, Z. Dot-ELISA Affinity Test: An Easy, Low-Cost Method to Estimate Binding Activity of Monoclonal Antibodies. Online. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2013, 4(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000168>.
- [105] LI, J., ZHANG, Z., GU, J., STACEY, H.D., ANG, J.C. et al. Diverse high-affinity DNA aptamers for wild-type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 spike proteins from a pre-structured DNA library. Online. *Nucleic Acids Research*. 2021, 49(13). Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab574>.
- [106] MAGDELDIN, S. *Affinity Chromatography*. Online. IntechOpen, 2012. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/1959>.
- [107] CAMPBELL, D.H., LUESCHER, E. a LERMAN, L.S. Immunologic Adsorbents: I. Isolation of Antibody by Means of a Cellulose-Protein Antigen. Online. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1951, 37(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.37.9.575>.
- [108] OU, Y., QIAO, S., LI, T., ZHENG, X., ZHAO, X. et al. Affinity Chromatographic Method for Determining Drug–Protein Interaction with Enhanced Speed Than Typical Frontal Analysis. Online. *Langmuir*. 2023, 39(29). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c01340>.
- [109] ANGUIZOLA, J., JOSEPH, K.S., BARNABY, O.S., MATSUDA, R., ALVARADO, G. et al. Development of Affinity Microcolumns for Drug–Protein Binding Studies in Personalized Medicine: Interactions of Sulfonylurea Drugs with in vivo Glycated Human Serum Albumin. Online. *Analytical Chemistry*. 2013, 85(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac303734c>.
- [110] ALHAJJ, M., ZUBAIR, M. a FARHANA, A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Online. In: *Statpearls Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing, 2025. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>.
- [111] AYDIN, S., EMRE, E., UGUR, K., AYDIN, M.A., SAHIN, I. et al. An overview of ELISA: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids. Online. *Journal of International Medical Research*. 2025, 53(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/03000605251315913>.
- [112] AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Online. *Peptides*. 2015, 72. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.

- [113] *Guide To Detecting Proteins: ELISA: Types of ELISA*. Online. In: SURMODICS. 2025. Dostupné také z: <https://shop.surmodics.com/guide-to-detecting-proteins-elisa>.
- [114] FISCHER, J., KAUFMANN, J.O. a WELLER, M.G. Simple Determination of Affinity Constants of Antibodies by Competitive Immunoassays. Online. *Methods and Protocols*. 2024, 7(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mps7030049>.
- [115] GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: Review of Basic Principles. Online. *Seminars in Nuclear Medicine*. 1975, 5(2). Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0001-2998\(75\)80028-6](https://doi.org/10.1016/s0001-2998(75)80028-6).
- [116] O'CONNOR, T. a GOSLING, J.P. The dependence of radioimmunoassay detection limits on antibody affinity. Online. *Journal of Immunological Methods*. 1997, 208(2). Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00148-8](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00148-8).
- [117] FRIGUET, B., FEDOROV, A., SERGANOV, A.A., NAVON, A. a GOLDBERG, M.E. A Radioimmunoassay-Based Method for Measuring the True Affinity of a Monoclonal Antibody with Trace Amounts of Radioactive Antigen: Illustration with the Products of a Cell-Free Protein Synthesis System. Online. *Analytical Biochemistry*. 1993, 210(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1206>.
- [118] GRANGE, R.D., THOMPSON, J.P. a LAMBERT, D.G. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. Online. *British Journal of Anaesthesia*. 2014, 112(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/bja/aet293>.
- [119] MÜLLER-ESPARZA, H., OSORIO-VALERIANO, M., STEUBE, N., THANBICHLER, M. a RANDAU, L. Bio-Layer Interferometry Analysis of the Target Binding Activity of CRISPR-Cas Effector Complexes. Online. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020, 7. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00098>.
- [120] MUKHERJEE, M., APPAIAH, P., SISTLA, S., BK, B. a BHATT, P. Bio-Layer Interferometry-Based SELEX and Label-Free Detection of Patulin Using Generated Aptamer. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022, 70(20). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01591>.
- [121] NOY-PORAT, T., ALCALAY, R., MECHALY, A., PERETZ, E., MAKDASI, E. et al. Characterization of antibody-antigen interactions using biolayer interferometry. Online. *STAR Protocols*. 2021, 2(4). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100836>.
- [122] JERABEK-WILLEMSEN, M., ANDRÉ, T., WANNER, R., ROTH, H.M., DUHR, S. et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. Online. *Journal of Molecular Structure*. 2014, 1077. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>.
- [123] ASMARI, M., RATIH, R., ALHAZMI, H.A. a DEEB, S.E. Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction. Online. *Methods*. 2018, 146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.02.003>.

- [124] MOON, M.H., HILIMIRE, T.A., SANDERS, A.M. a SCHEENKLOTH, JR., J.S. Measuring RNA–Ligand Interactions with Microscale Thermophoresis. Online. *Biochemistry*. 2018, 57(31). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01141>.
- [125] SAPONARO, A. Isothermal Titration Calorimetry: A Biophysical Method to Characterize the Interaction between Label-free Biomolecules in Solution. Online. *Bio-protocol*. 2018, 8(15). Dostupné z: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2957>.
- [126] GROSSOEHME, N.E., SPUCHES, A.M. a WILCOX, D.E. Application of isothermal titration calorimetry in bioinorganic chemistry. Online. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2010, 15. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0693-3>.
- [127] FREIRE, E., MAYORGA, O.L. a STRAUME, M. Isothermal titration calorimetry. Online. *Analytical Chemistry*. 1990, 62(18). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac00217a002>.
- [128] FREYER, M.W. a LEWIS, E.A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. Online. *Methods in Cell Biology*. 2008, 84. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84004-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84004-0).
- [129] KARUNAKARAN, C., BHARGAVA, K. a BENJAMIN, R. (ed.). *Biosensors and Bioelectronics*. Online. Elsevier, 2015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03790-2>.
- [130] BHALLA, N., JOLLY, P., FORMISANO, N. a ESTRELA, P. Introduction to biosensors. Online. *Essays in Biochemistry*. 2016, 60(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [131] VERMA, N., HOODA, V., GAHLAUT, S., GOTHWAL, A. a HOODA, V. Enzymatic biosensors for the quantification of biogenic amines: a literature update. Online. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2019, 40(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1680600>.
- [132] PUROHIT, B., VERNEKAR, P.R., SHETTI, N.P. a CHANDRA, P. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. Online. *Sensors International*. 2020, 1. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>.
- [133] SHARMA, S., BYRNE, H. a O'KENNEDY, R.J. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. Online. *Essays in Biochemistry*. 2016, 60(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/EBC20150002>.
- [134] CHEN, M.-N., HAN, C.-Y., CHEN, Z., HAN, G.-C., FENG, X.-Z. et al. Review—Immunosensors for the Detection of Ovarian Cancer Tumor Marker Human Epididymal Protein 4. Online. *Journal of The Electrochemical Society*. 2025, 172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ada580>.

- [135] MALECKA, K., MIKULA, E. a FERAPONTOVA, E.E. Design Strategies for Electrochemical Aptasensors for Cancer Diagnostic Devices. Online. *Sensors*. 2021, 21(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s21030736>.
- [136] MAHATO, K., PUROHIT, B., KUMAR, A. a CHANDRA, P. Clinically comparable impedimetric immunosensor for serum alkaline phosphatase detection based on electrochemically engineered Au-nano-Dendroids and graphene oxide nanocomposite. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020, 148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111815>.
- [137] WANG, X., SONG, P., PENG, L., TONG, A. a XIANG, Y. Aggregation-Induced Emission Luminogen-Embedded Silica Nanoparticles Containing DNA Aptamers for Targeted Cell Imaging. Online. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015, 8(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09644>.
- [138] ZHANG, N., ZHANG, L., RUAN, Y.-F., ZHAO, W.-W., XU, J.-J. et al. Quantum-dots-based photoelectrochemical bioanalysis highlighted with recent examples. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017, 94. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.011>.
- [139] WANG, J., SONG, J., ZHENG, H., ZHENG, X., DAI, H. et al. Application of NiFe₂O₄ nanotubes as catalytically promoted sensing platform for ratiometric electrochemiluminescence analysis of ovarian cancer marker. Online. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, 288. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.099>.
- [140] MA, Z. a DING, T. Bioconjugates of Glucose Oxidase and Gold Nanorods Based on Electrostatic Interaction with Enhanced Thermostability. Online. *Nanoscale Research Letters*. 2009, 4(10). Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9385-8>.
- [141] FAN, L., YAN, Y., GUO, B., ZHAO, M., LIA, J. et al. Trimetallic hybrid nanodendrites and magnetic nanocomposites-based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of serum human epididymis protein 4. Online. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, 296. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126697>.
- [142] KIM, D.C. a KANG, D.J. Molecular Recognition and Specific Interactions for Biosensing Applications. Online. *Sensors*. 2008, 8(10). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s8106605>.
- [143] WANG, C., YAN, Q., LIU, H.-B., ZHOU, X.-H. a XIAO, S.-J. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. Online. *Langmuir*. 2011, 27(19). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la202267p>.
- [144] YUAN, J., DUAN, R., YANG, H., LUO, X. a XI, M. Detection of serum human epididymis secretory protein 4 in patients with ovarian cancer using a label-free biosensor based on localized surface plasmon resonance. Online. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, 7. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S32641>.

- [145] LI, Y., SCHLUENSENER, H.J. a XU, S. Gold nanoparticle-based biosensors. Online. *Gold Bulletin*. 2010, 43. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF03214964>.
- [146] PARK, B.-W., KIM, D.-S. a YOON, D.-Y. Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors. Online. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2011, 28. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11814-010-0349-6>.
- [147] LIU, S. a JU, H. Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003, 19(3). Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00172-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00172-6).
- [148] LIU, Z., SHEN, Z., THU, T., HOU, S., YING, L. et al. Organizing Single-Walled Carbon Nanotubes on Gold Using a Wet Chemical Self-Assembling Technique. Online. *Langmuir*. 2000, 16(8). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la9914110>.
- [149] *Anti-HE4 Antibody Products*. Online. Biocompare. 1999-2025. Dostupné také z: <https://www.biocompare.com/pfu/110447/soids/480318/Antibodies/HE4>.
- [150] *Anti-HE4 aptamers*. Online. Creative Biolabs. 2025. Dostupné také z: <https://www.creative-biolabs.com/complement-therapeutics/search?key=anti-HE4&ty=product>.
- [151] *All Options for DNA / RNA Oligonucleotides*. Online. Eurofins Genomics. 2024. Dostupné také z: <https://eurofinsgenomics.com/en/products/dnarna-synthesis/all-oligo-options.aspx>.
- [152] *Custom Oligo Synthesis & Reagents*. Online. Integrated DNA Technologies. 2024. Dostupné také z: <https://eu.idtdna.com/page/products/custom-dna-rna>.
- [153] *Custom oligo synthesis*. Online. Biosearch Technologies. 2000-2025. Dostupné také z: <https://www.biosearchtech.com/products/oligos-probes-and-primers>.
- [154] LU, L., LIU, B., ZHAO, Z., MA, C., LUO, P. et al. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for HE4 based on rolling circle amplification. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012, 33(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.01.004>.
- [155] ZHANG, Y., OUYANG, H., ZHANG, S., NI, Y., ZHU, Z. et al. Label-free electrochemical bioplatfrom based on Au-modified magnetic Fe₃O₄/α-Fe₂O₃ heteronanorods for sensitive quantification of ovarian cancer tumor marker. Online. *Microchemical Journal*. 2023, 189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108546>.
- [156] QU, J. a YU, F. Fabrication of a Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor for Human Epididymis Protein 4 (HE4) Detection. Online. *International Journal of Electrochemical Science*. 2018, 13(11). Dostupné z: <https://doi.org/10.20964/2018.11.73>.

- [157] CHEN, D.-N., JIANG, L.-Y., ZHANG, J.-X., TANG, C., WANG, A.-J. et al. Electrochemical label-free immunoassay of HE4 using 3D PtNi nanocubes assemblies as biosensing interfaces. Online. *Microchimica Acta*. 2022, 189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05553-6>.
- [158] KAMAC, M.B., ALTUN, M., YILMAZ, M. a SEZGINTURK, M.K. A label-free dual immunosensor for the simultaneous electrochemical determination of CA125 and HE4 biomarkers for the early diagnosis of ovarian cancer. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2023, 415. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04569-y>.
- [159] ČADKOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, V., METELKA, R., BÍLKOVÁ, Z. a KORECKÁ, L. Alkaline phosphatase labeled antibody-based electrochemical biosensor for sensitive HE4 tumor marker detection. Online. *Electrochemistry Communications*. 2015, 59. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2015.06.014>.
- [160] KOVAROVA, A., KASTRATI, G., PEKARKOVA, J., METELKA, R., DRBOHLAVOVA, J. et al. Biosensor with electrochemically active nanocomposites for signal amplification and simultaneous detection of three ovarian cancer biomarkers. Online. *Electrochimica Acta*. 2023, 469. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.143213>.
- [161] CADKOVA, M., KOVAROVA, A., DVORAKOVA, V., METELKA, R., BILKOVA, Z. et al. Electrochemical quantum dots-based magneto-immunoassay for detection of HE4 protein on metal film-modified screen-printed carbon electrodes. Online. *Talanta*. 2018, 182. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.054>.
- [162] LEE, C.-W. a TSENG, F.-G. Surface enhanced Raman scattering (SERS) based biomicrofluidics systems for trace protein analysis. Online. *Biomicrofluidics*. 2018, 12(1). Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.5012909>.
- [163] WILLIAMS, R.M., LEE, C., GALASSI, T.V., HARVEY, J.D., LEICHER, R. et al. Noninvasive ovarian cancer biomarker detection via an optical nanosensor implant. Online. *Science Advances*. 2018, 4(4). Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aag1090>.
- [164] MA, X., HUANG, G., YE, M., ZHANG, X., WANG, Y. et al. A homogeneous biosensor for Human Epididymis Protein 4 based on upconversion luminescence resonance energy transfer. Online. *Microchemical Journal*. 2021, 164. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106083>.
- [165] HAN, C., CHEN, R., WU, X., SHI, N., DUAN, T. et al. Fluorescence turn-on immunosensing of HE4 biomarker and ovarian cancer cells based on target-triggered metal-enhanced fluorescence of carbon dots. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2021, 1187. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339160>.
- [166] WU, Y., WANG, C., WANG, C., WANG, P., CHANG, X. et al. Multiple Biomarker Simultaneous Detection in Serum via a Nanomaterial-Functionalized Biosensor for

- Ovarian Tumor/Cancer Diagnosis. Online. *Micromachines*. 2022, 13(12). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi13122046>.
- [167] DUAN, R. a XI, M. A Novel Label-Free Biosensor for Detection of HE4 in Urine Based on Localized Surface Plasmon Resonance and Protein G Directional Fixed. Online. *Journal of Nanomaterials*. 2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2020/8613240>.
- [168] SZYMANSKA, B., LUKASZEWSKI, Z., ZELAZOWSKA-RUTKOWSKA, B., HERMANOWICZ-SZAMATOWICZ, K. a GORODKIEWICZ, E. An SPRi Biosensor for Determination of the Ovarian Cancer Marker HE4 in Human Plasma. Online. *Sensors*. 2021, 21(10). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s21103567>.
- [169] SZYMANSKA, B., LUKASZEWSKI, Z., HERMANOWICZ-SZAMATOWICZ, K. a GORODKIEWICZ, E. A Multiple-Array SPRi Biosensor as a Tool for Detection of Gynecological–Oncological Diseases. Online. *Biosensors*. 2023, 13(2). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios13020279>.
- [170] MARQUART, A. *SPRpages*. Online. 2006-2025. Dostupné také z: <https://www.sprpages.nl/>.
- [171] WANG, Y., LI, Z. a YU, H. Aptamer-Based Western Blot for Selective Protein Recognition. Online. *Frontiers in Chemistry*. 2020, 8. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.570528>.
- [172] LUPU, L.-M., WIEGAND, P., HOLDSCHICK, D., MIHOC, D., MAESER, S. et al. Identification and Affinity Determination of Protein-Antibody and Protein-Aptamer Epitopes by Biosensor-Mass Spectrometry Combination. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(23). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222312832>.
- [173] NARAYAN, T., KUMAR, S., KUMAR, S., AUGUSTINE, S., YADAV, B.K. et al. Protein functionalised self assembled monolayer based biosensor for colon cancer detection. Online. *Talanta*. 2019, 201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.039>.
- [174] LEE, J.W., SIM, S.J., CHO, S.M. a LEE, J. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. Online. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005, 20(7). Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.04.017>.
- [175] BOLDUC, O.R. a MASSON, J.-F. Monolayers of 3-Mercaptopropyl-amino Acid to Reduce the Nonspecific Adsorption of Serum Proteins on the Surface of Biosensors. Online. *Langmuir*. 2008, 24(20). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/la801861q>.
- [176] KIM, H.H., JEON, H.J., CHO, H.K., CHEONG, J.H., MOON, H.S. et al. Highly Sensitive Microcantilever Biosensors with Enhanced Sensitivity for Detection of Human Papilloma Virus Infection. Online. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015, 221. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.014>.

- [177] PATEL, N., DAVIES, M.C., HEATON, R.J., ROBERTS, C.J., TENDLER, S.J.B. et al. A scanning probe microscopy study of the physisorption and chemisorption of protein molecules onto carboxylate terminated self-assembled monolayers. Online. *Applied Physics A*. 1998, 66. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s003390051203>.
- [178] BONNET, H., COCHE-GUÉRENTE, L., DEFRANCQ, E., SPINELLI, N., VAN DER HEYDEN, A. et al. Negative SPR Signals during Low Molecular Weight Analyte Recognition. Online. *Analytical Chemistry*. 2021, 93(8). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00071>.
- [179] PONS, M., PERENON, M., BONNET, H., GILLON, E., VALLÉE, C. et al. Conformational transition in SPR experiments: impact of spacer length, immobilization mode and aptamer density on signal sign and amplitude. Online. *Analyst*. 2022, 19(147). Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d2an00824f>.