

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Automatizovaná příprava anti-COVID magnetického imunosorbentu

Bc. LUCIE KŘÍŽOVÁ

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Zuzana Svobodová, Ph.D.

Konzultant: Dr. Burkhard Horstkotte

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Zuzaně Svobodové, PhD. A také mému konzultantovi Dr. Burkhardu Horstkottovi a celé katedře analytické chemie, za pomoc, cenné rady a připomínky, kterými přispěli k vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Nikole Mannové a celému týmu katedry biologických a biochemických věd z fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice za otestování vytvořených imunisorbentů s patientskými vzorky na PCR. Moc děkuji také i své rodině za podporu během celého mého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15. 8. 2022

Bc. Křížová Lucie

Obsah

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
ÚVOD	8
ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
1. Koronaviry	10
1.1 SARS-COV-2	12
1.1.1 Struktura:	12
1.1.2 Patogeneze	18
1.1.3 Varianty	19
1.1.4 Diagnostika	22
1.1.5 Léčba	24
2. Magnetické částice	25
2.1 Imobilizace biomolekul na magnetické částice	27
3. Affiblot	29
4. Lab-In-Syringe	30
5. Experimentální část	33
5.1 Seznam použitých přístrojů a pomůcek	33
5.2 Seznam použitých chemikálií	34
5.3 Seznam použitých částic	35
5.4 Seznam použitých protilátek	35
5.5 Vazba protilátek na magnetické částice vsádkovou metodou	36
5.6 Hodnocení vazby protilátek na magnetické částice metodou affiblot	38
5.7 Lab-In-Syringe	39
5.8 Automatizovaná vazba IgG na magnetické částice v systému LIS	44
5.9 Polymerázová řetězcová reakce	45

6.	Výsledky a diskuze	46
6.1	Vazba protilátek na magnetické částice vsádkovou metodou.....	46
6.2	Optimalizace LIS	47
6.3	Program automatizované vazby IgG na magnetické částice v systému LIS	53
6.4	Ověření funkčnosti programu LIS.....	59
6.5	Imobilizace protilátek na magnetický nosič v LIS.....	62
6.6	Polymerázová řetězová reakce	63
7.	ZÁVĚR	64
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	67
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
10.	SEZNAM TABULEK	69
11.	POUŽITÁ LETERATURA.....	70
12.	PŘÍLOHY	80

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce je automatizace manuální přípravy anti-COVID-19 magnetického imunosorbentu.

Teoretická část práce je zaměřena na řešení zpracování informací o viru SARS-CoV-2, způsobujícího onemocnění COVID-19. Je zde popsána základní charakteristika nemoci, její původ, klinický obraz, metody pro zjištění viru SARS-CoV-2 v lidském organismu a léčba. Dále práce pojednává o principu metody LIS a jsou zde definovány způsoby její využití v jiných oblastech analýzy.

Experimentální část popisuje, jakým způsobem byla manuálně náročná vsádková metoda pro imobilizaci protilátky na magnetické částice převedena na automatizovanou metodu v systému Lab-In-Syringe (LIS). Při vývoji převodu vsádkové metody do LIS byla provedena řada experimentů, optimalizací a hledání analogií, aby došlo k plné automatizaci metody s minimálním zapojením operátora. Pomocí zařízení, jsme připravili anti-COVID-19 imunosorbenty, které byly následně otestovány pomocí PCR metody na patientských vzorcích v laboratoři Univerzity Pardubice se stupněm ochrany BSL 3.

Klíčová slova: COVID-19, SARS-CoV-2, magnetické částice, Lab-In-Syringe, LIS

ABSTRACT

The target of the diploma thesis is the automation of the manual preparation of anti-COVID-19 magnetic immunosorbent.

The theoretical part of the work is focused on the research processing of information about the SARS-CoV-2 virus causing the disease COVID-19. The basic characteristics of the disease, its causative agent, clinical picture, methods for detecting the SARS-CoV-2 virus in the human body and treatment are described here. Furthermore, the principle of the LIS method is described here and the methods of its use in other areas of analysis are described here.

The experimental part describes how the manually demanding batch method for antibody immobilization on magnetic particles was converted to an automated method in the Lab-In-Syringe (LIS) system. To converting the batch method to LIS, was done series of experiments, optimizations and searches for analogies were carried out in order to fully automate the method with minimal operator involvement. Using the device, we prepared anti-COVID-19 immunosorbents, which were subsequently tested using the PCR method on patient samples in the laboratory of the University of Pardubice with BSL 3 protection level.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, magnetic particles, Lab-In-Syringe, LIS

ÚVOD

Název onemocnění COVID-19 vznikl zkrácením anglického názvu a přidáním roku jeho objevení „Coronavirus Disease 2019“. Toto respirační onemocnění označované také jako těžký akutní respirační syndrom 2 způsobuje virus nazvaný SARS-CoV-2. COVID-19 způsobuje infekce převážně horních cest dýchacích a může se rozvinout až v závažnou pneumonii [1,2].

Klinické příznaky COVID-19 jsou různé, od asymptomatických stavů až po syndrom akutní respirační tísně a multiorgánového selhání. Mezi běžné klinické příznaky patří horečka, kašel, bolest v krku, bolest hlavy, únava, myalgie a dušnost.

Možností diagnostiky COVID-19 je hodně. Používají se screeningové testy, konfirmační testy a vysoce specifické referenční testy, které jsou založené na detekci nukleových kyselin. Dále sérologické a imunologické testy, point of care testy (POC), detekce neutralizačních protilátek a metody detekce antigenu. Jako vzorky se využívají výtěr z krku, výtěr z nosohltanu, sliny, které se získávají plynáním nebo kloktáním, sputum, endotracheální aspiráty a bronchoalveolární laváž. Virus může být také detekován ve stolici a v těžkých případech i v krvi. Ostatní laboratorní vyšetření jsou obvykle nespecifická [1,2].

Léčba je v podstatě podpůrná a symptomatická. Je možná také pomocí antivirotik jako je ribavirin či lopinavirritonavir, které byly použity již u SARS a MERS. Novou možností léčby z řad antivirotik je léčivo zvané Paxlovid, tento lék se podává pacientům s onemocněním COVID-19, kteří spadají do tzv, rizikových skupin a je tak velká pravděpodobnost hospitalizace. Další možností je prevence, a to v podobě vakcinace [1].

Jednou z možností izolace viru z biologických vzorků za účelem výzkumu je pomocí magnetického imunosorbentu s navázanou specifickou protilátkou. Právě vývojem metody pro přípravu anti-COVID19 imunosorbentu je zaměřena tato DP.

ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je automatizace manuální přípravy anti-COVID-19 magnetického imunosorbentu, kdy se pomocí magnetického separátoru a rotátoru navazují protilátky na magnetické částice. Takto připravený magnetický imunosorbent může sloužit například k průkazu antigenu, což je v našem případě spikeový protein nacházející se na povrchu viru SARS-CoV-2. Automatizace metody proběhla za použití systému Lab-In-Syringe (LIS).

..

1. KORONAVIRY

Koronaviry (coronavirus, CoV) jsou RNA obalené viry patřící do řádu Nidovirales. Viriony mají v elektronovém mikroskopu vzhled koruny (latinsky corona). Jsou různorodou skupinou virů infikujících různé druhy zvířat i člověka, u kterého mohou způsobit mírné až těžké respirační onemocnění. Koronaviry můžeme rozdělit do dvou skupin, a to α a β (Tab. 1). První α – koronaviry objevené v souvislosti s lidským onemocněním byly označeny jako HCoV-229E a HCoV-NL63. U β – koronavirů to byly HCoV-OC43 a HCoV-HKU1. Tyto druhy koronavirů způsobují u lidí pouze mírné příznaky, jakými jsou například rýma a kašel. V roce 2002 a 2012, se objevily dva vysoce patogenní koronaviry se zoonotickým původem, koronavirus způsobující těžký akutní respirační syndrom (SARS-CoV) a blízkovýchodní koronavirový respirační syndrom (MERS-CoV), které způsobily u lidí smrtelné respirační onemocnění. Na konci roku 2019 byl objeven nový typ koronaviru, označený jako SARS-CoV-2, který způsobil vypuknutí neobvyklého virového zápalu plic. Tento typ způsobuje vysoce nakažlivé onemocnění, pojmenované jako COVID-19. Virus SARS-CoV-2 výrazně překonal své předchůdce SARS a MERS z hlediska počtu nakažených i zemřelých a také z hlediska počtu a rozsahu epidemických oblastí, protože způsobil celosvětovou pandemii onemocnění COVID-19 (Tab. 2) [2,3,4].

Tabulka 1 Koronaviry přenosné na člověka [4].

Název viru	Klasifikace
HCoV-229E	α -koronavirus
HCoV-NL63	α -koronavirus
HCoV-OC43	β -koronavirus
HCoV-HKU1	β -koronavirus
SARS-CoV	β -koronavirus
MERS-CoV	β -koronavirus
SARS-CoV-2	β -koronavirus

Tabulka 2 Srovnání onemocnění SARS, MERS a COVID-19 [5].

	SARS	MERS	COVID - 19
Patogen	SARS-CoV	MERS-CoV	SARS-CoV-2
Průměrná inkubační doba	4,6 dne	5,2 dne	6,4 dne
Klinický obraz	<p>1. Přetrvávající horečka, zimnice, myalgie, suchý kašel, bolest hlavy, malátnost a dušnost</p> <p>2. Bolest v krku, rinorea, nevolnost a zvracení, vodnatý průjem</p> <p>3. <u>Těžké případy:</u> zrychlené dýchání, dušnost nebo zjevná respirační tíseň</p> <p>4. Orgánové selhání</p>	<p>1. Horečka, kašel, zimnice, bolesti hrdla, myalgie, artralgie a následná dušnost a rychlá progresse k zápalu plic během prvního dne</p> <p>2. Gastrointestinální příznaky, včetně průjmu, zvracení a břišní bolesti</p> <p>3. <u>Těžké případy:</u> ARDS, akutní selhání ledvin i selhání více orgánů</p>	<p>1. Horečka, suchý kašel, myalgie, únava, dušnost</p> <p>2. Mnohočetné selhání orgánů, včetně poškození ledvin, poškození jater, a poškození testikulární tkáně.</p> <p>3. <u>Mírné případy:</u> nízká horečka, mírná únava</p> <p>4. <u>Těžké případy:</u> dušnost popřípadě hypoxémie</p> <p>5. <u>Kritické případy:</u> ARDS, dušnost, břišní bolesti a anorexie</p>
Laboratorní nálezy	<p>1. Lymfopenie, DIC, zvýšená LDH, a CK.</p> <p>2. Počty CD4 a CD8 T-lymfocytů nízké</p> <p>3. Trombocytopenie, prodloužená APTT, zvýšený D-dimer a ALT</p>	<p>1. Leukopenie, zvýšené LDH, AST, trombocytopenie, a lymfopenie.</p> <p>2. <u>Několik případů:</u> virová RNA v krvi, moči a stolici</p> <p>3. Zvýšené jaterní enzymy</p>	<p>1. Lymfopenie, prodloužená PT, zvýšené hladiny LDH, AST, ALT, urey a kreatininu v krvi</p> <p>2. výšené CRP a sedimentace erytrocytů</p> <p>3. <u>Těžké případy:</u> Zvýšené D-dimery, těžší lymfopenie</p> <p>4. <u>Kritické případy:</u> Vysoké zánětlivé markery</p> <p>5. <u>Nepřeživší:</u> Velmi vysoká hodnota počtu neutrofilů, vysoké D-dime a hladina urey a kreatininu v krvi</p>
Počet případů ve světě	8273	2 494	450 678 189
Počet úmrtí	775	858	6 039 122
Letalita	9,4 % (2004)	34,4 % (2019)	1,3 % (2022)

1.1 SARS-COV-2

Taxonomie SARS-CoV-2:

Řád: *Nidovirales*

Čeleď: *Coronaviridae*

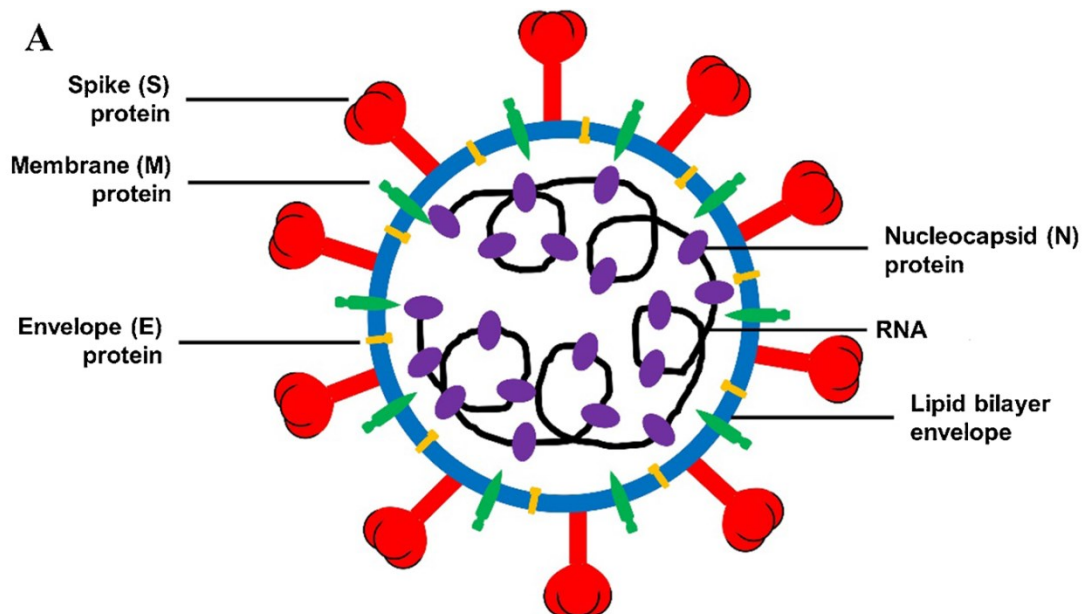
Podčeleď: *Orthocoronavirinae*

Rod: *Betacoronavirus*

Podrod: *Sarbecovirus*

1.1.1 Struktura:

SARS-CoV-2 je vir, tvořený pozitivní jednovláknovou RNA (+ssRNA), obsahuje čtyři strukturální proteiny, a to nukleokapsidový protein (N), membránový protein (M), obálkový protein (E) a spike protein (S) (Obr. 1). M protein je nejhojnější strukturální protein a definuje tvar virového obalu. M protein existuje jako dimer a může tak přijmout dvě různé konformace, které umožňují zakřivení membrány a vazbu nukleokapsidu. Proteiny M, N a E společně tvoří virový obal. Dále obsahuje šest funkčních čtecích rámců (ORF), které jsou uspořádány v pořadí od 5' konce po 3' konec. Ze čtyř strukturálních genů sdílí SARS-CoV-2 více než 90 % aminokyselin se SARS-CoV. Výjimku tvoří gen pro S protein, který je delší než u SARS-CoV. Místo 1 255 aminokyselin jich má 1273. Dále SARS-CoV-2 obsahuje 16 nestructurálních genů a většina z těchto proteinů má z 85 % shodnou strukturu s nestructurálními proteiny SARS-CoV [6,7,8,9].



Obrázek 1 Struktura SARS-CoV-2 [10].

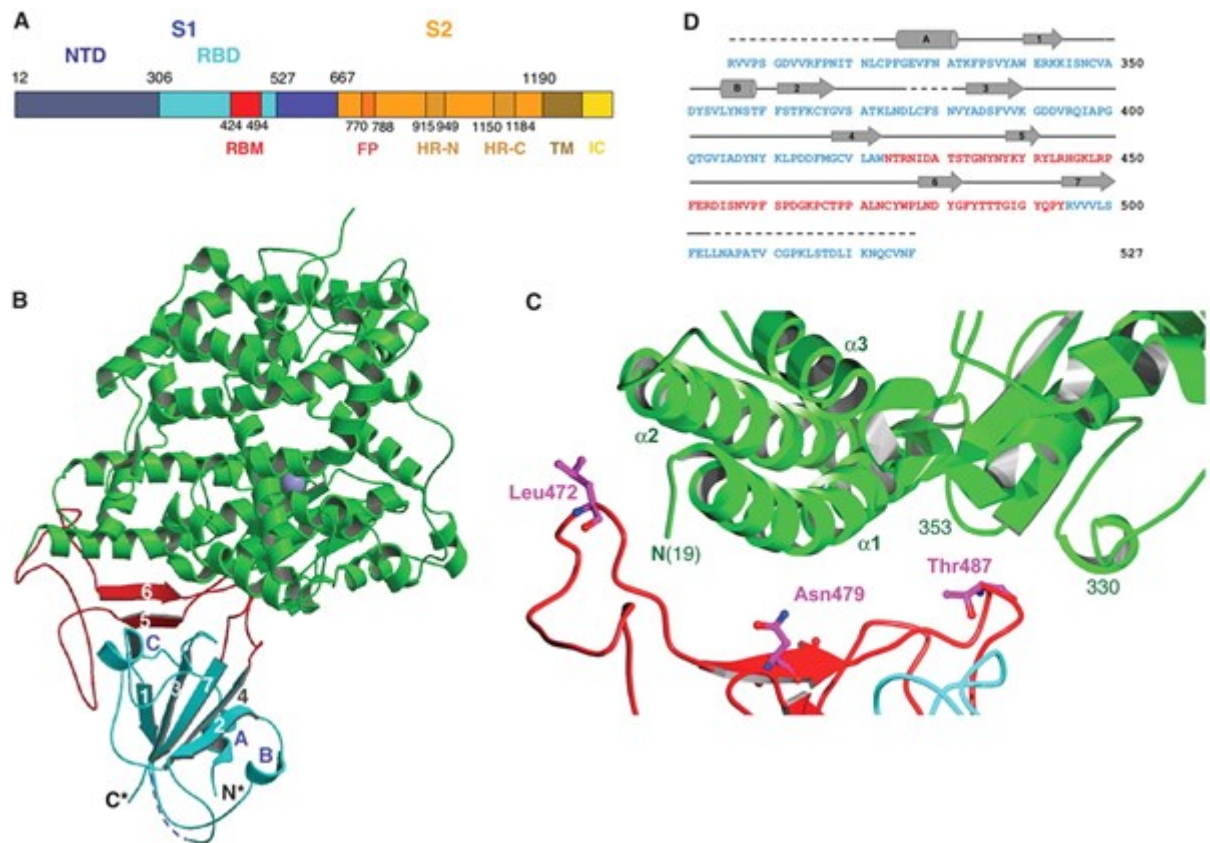
Strukturální proteiny:

M protein (25–30 kDa) se třemi transmembránovými doménami je nejhojněji zastoupený strukturální protein a definuje tvar virového obalu. Má krátký N-konec, který míří vně obalu (ektodoména) a mnohem delší C-terminální konec, který sahá 6–8 nm do virové částice (endodoména). M protein existuje jako dimer a může přijmout dvě různé konformace, které umožňují zakřivení membrány a také vazbu na nukleokapsid. Interakce S a M proteinu je nezbytná pro správnou funkci S proteinu. Vazba M na N protein stabilizuje nukleokapsid. M protein společně s E proteinem tvoří virový obal a jejich vzájemné působení hraje důležitou roli při uvolňování virových částic [6,7,8].

E protein (8–12 kDa) je nejmenší ze strukturálních proteinů. Tento transmembránový protein má aktivitu iontového kanálu. Během replikačního cyklu je protein E hojně exprimován uvnitř infikované buňky, ale pouze malá část je začleněna do virového obalu. E protein má významnou funkci hlavně při dozrání viru [6,7,8,9].

N protein je důležitý strukturní protein. Je jediný, jenž se váže na RNA, kterou balí do spirály. Během sestavování virionů interaguje s jinými strukturálními proteiny. Je produkován ve velkém množství během infekce a je vysoce imunogenní. Skládá se ze dvou samostatných domén - N-terminální domény (NTD) a C-terminální domény (CTD). Optimální vazba RNA vyžaduje příspěvek z obou těchto domén. Je také zapojen do shromažďování virů a pučení, což vede k úplné tvorbě virionů [6,7,8,9].

S protein, známý také jako spike protein neboli hrotový protein je glykoprotein tvořící homotrimer, vyčnívající z virového povrchu. Zprostředkovává vstup viru SARS-CoV-2 do hostitelských buněk. Skládá se ze tří oblastí, a to intracelulární domény, transmembránové oblasti a ektodomény. Ektodoména je složená ze dvou podjednotek S (S1/S2). S1 podjednotka je složena z N-koncové domény (NTD) a C-koncové domény, známé jako receptor vázající domény (RBD). Funkcí podjednotky S1 je rozpoznání a navázání se na receptor v hostitelské buňce. S2 podjednotka je složena z fúzního peptidu (FP), sedmičlenné repetice 1 (HR1), centrální šroubovice (CH), konektorové domény (CD), sedmičlenné repetice 2 (HR2), transmembránové domény (TM) a cytoplazmatického konce (CT). Funkcí S2 podjednotky je fúze virové membrány s membránou hostitelské buňky. HR1 a HR2 tvoří dohromady šestišroubovici, která je rozhodující pro fúzi membrán (Obr.2). Tyto dvě repetice jsou u SARS-CoV-2 stabilnější než u SARS-CoV a to je s největší pravděpodobností důvod vyšší infekčnosti SARS-CoV-2. CT tvoří pomyslnou kotvu, která je důležitá pro dostatečné přiblížení virové a hostitelské buňky. Na spike proteinu se nacházejí dvě štěpná místa. Prvním místem je pomezí podjednotek S1 a S2, které jsou spolu nekovalentně vázány. Toto místo je štěpeno furinem. Druhé místo štěpení se nachází na S2 podjednotce a je štěpeno enzymem TMPRSS2. Toto štěpení nastává při dostatečném přiblížení viru k hostitelské buňce. Spike protein má schopnost přecházet mezi dvěma stavy, uzavřeným a otevřeným. Při otevřeném stavu je RBD doména vzpřímená a vyčnívá z povrchu viru, což usnadňuje navázání na angiotenzin konvertující enzym 2 (ACE2) receptor [6,7,9,11,12,13,14].



Obrázek 2 Spike protein SARS-CoV-2 [15].

Nestrukturální proteiny (NSPs):

Kromě strukturálních proteinů, které se podílejí na stavbě viru, jsou v RNA zakódovány i tzv. nestrukturální proteiny. Ty napomáhají RNA-dependentní RNA polymeráze a starají se tak o správný a přesný průběh replikace RNA viru [11,16,17].

Nsp1 je s membránou asociovaný translační inhibitor, který ukotvuje replikační komplex k buněčné membráně. Nsp1 tvoří komplex s 40S ribozomální podjednotkou, která degraduje hostitelské mRNA vyvoláním endonukleolytického štěpení v blízkosti 5' - nepřekládané oblasti, a tím inhibuje hostitelskou translaci. Potlačení exprese mRNA hostitelské buňky podporuje efektivní expresi virových genů v infikovaných buňkách a únik od imunitní reakce [16,17,18].

Nsp2 hraje zásadní roli v modulaci signální dráhy přežití hostitelské buňky prostřednictvím interakce s prohibitiny (PHB1 a PHB2). Prohibitiny jsou exprimovány a přítomny v několika buněčných kompartmentech jako jsou například mitochondrie. Zachovávají funkční integritu a obranu buněk před různými stresy [16,17,19].

Nsp3, proteáza podobná papainu (PL-PRO) je největší cystinová proteáza s proteolytickou jádrovou doménou. Přednostně štěpí proteiny stimulované interferonem podobným ubikvitinu 15 (ISG15). Toto štěpení ISG15 z interferon regulujícího faktoru 3 (IRF3) oslabuje odpověď interferonu I. typu, což vede k potlačení protivirové imunity hostitelské buňky. Funkcí je tedy uvolňování nsp1 a nsp2 z polyproteinu, interakce s jinými virovými nsp a také s RNA za vzniku replikačního/transkripčního komplexu. Odstraňuje také značky ze starých proteinů určených k destrukci [17,18,19].

Nsp4, protein pomáhá sestavit membránu viru, interaguje s Nsp3 a dalšími proteiny a hraje významnou roli v replikaci SARS-CoV-2 [16,18,19].

Nsp5, proteáza podobná chymotrypsinu nebo 3C-like proteáza (3CLpro), je to klíčový enzym, zodpovědný za odštěpení jednotlivých proteinů, důležitých pro virovou replikaci a transkripci SARS-CoV-2, z polyproteinů pp1a a pp1ab viru. Této jedinečnosti bylo využito při vývoji antivirových léčiv proti COVID-19, kdy je tento enzym blokován specifickým inhibitorem [16,17,18,19].

Nsp6 se váže se sigma receptorem endoplazmatického retikula hostitele a iniciuje indukci autofagozomů. Nsp3, Nsp4 a Nsp6 všechny dohromady mají schopnost indukovat dvoumembránové vezikuly, ve kterých Nsp3 a Nsp4 jsou schopny párovat membrány a Nsp6 má schopnost membránové proliferace [16,17,19].

Nsp7 se váže na **Nsp8** a společně vytvářejí hexadekamer známý jako primázový (replikační) komplex. Poté interaguje s RNA-dependentní RNA polymerázou (Nsp12) a tvoří hetero-oligomerní komplex (Nsp12-Nsp7/Nsp8), jenž se účastní vlastní replikace SARS-CoV-2. Nsp8 má adhesiny, nezbytné pro adhezi viru. Nsp7 má aktivitu RNA polymerázy nezávislé na primeru a Nsp8 má primázovou aktivitu [16,18,19].

Nsp9 působí jako jednovláknový protein vázající RNA a zprostředkovává jak virovou replikaci, tak virulenci. RNA se váže přes oligosacharid, jenž je jedinečný pro tuto třídu β -CoV a podporuje replikaci viru [16,17,19].

Nsp10, nezbytný kofaktor, který aktivuje guanin-N7-methyltransferázu (Nsp14) a 2'-O-ribóza methyltransferázu (Nsp16) a podílí se na methylovaní mRNA, sestřihu, polyadenylaci a jaderném exportu virové mRNA [16,18,19].

Nsp11, nejkratší peptid (13 aminokyselin) exprimovaný na konci orf1a polyproteinu genomu replikázy SARS-CoV-2 [16,18,19].

Nsp12, RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp), je primárně zodpovědná za replikaci a transkripci genomu SARS-CoV-2. Nsp12 má ssRNA a ssDNA-dependentní polymerázovou aktivitu, jež se podílí na posttranskripční modifikaci. Interaguje s komplexem Nsp7/Nsp8 za vzniku primárního (replikačního) komplexu [13,14,15,16].

Nsp13, HPLCikáza (Hel) nebo nukleosid-trifosfatáza (NTPase) je multifunkční protein. Má významnou roli při replikaci RNA SARS-CoV-2. Helikázová aktivita závisí na hořčíku a může vykazovat různé vlastnosti při odvíjení RNA. Funkcí je odvíjení dsRNA nebo DNA ve směru 5'→3' [16,17,18].

Nsp14, bifunkční replikázová podjednotka s exoribonukleázovou aktivitou se podílí se na korekci případných chyb při replikaci. Tato aktivita působí ve směru 3'→5' na ssRNA i dsRNA. Nsp10 interaguje s Nsp14 a Nsp16 za účelem vytvoření dodekameru pro vylepšení jejich enzymové aktivity a hraje klíčovou roli v syntéze RNA a replikaci. N - koncová část Nsp14 interaguje s ATP-dependentní RNA helikázou (DDX1) v C-terminální oblasti, která zlepšuje replikační proces [16,17,18,19].

Nsp15, Mn^{2+} -dependentní nidovirový uridylát-specifická endoribonukleáza (NendoU), která zanechává 2'-3'-cyklus fosfatázy 5' ke štěpení vazby a provádí různé vitální funkce, spojené se zpracováním RNA. Nsp15 působí jako antagonistu interferonu (IFN) a inhibuje produkci interferonu- β . Navíc komplex Nsp7/Nsp8 zvyšuje endoribonukleázovou aktivitu Nsp15 [17,18,19].

Nsp16, 2' O-ribóza methyltransferáza usnadňuje metylaci mRNA čepičky 2' O- ribózy na 5'-čepičku mRNA za vzniku N7-methyl guanosinové čepičky a hraje důležitou roli při methylovaní virové mRNA, která je nezbytná pro vyhnutí se imunitnímu systému a nukleoproteázám. Enzymatická aktivita Nsp16 se zvyšuje interakcí s Nsp10 a je zásadní pro virovou replikaci a transkripci v hostitelských buňkách [16,17,18,19].

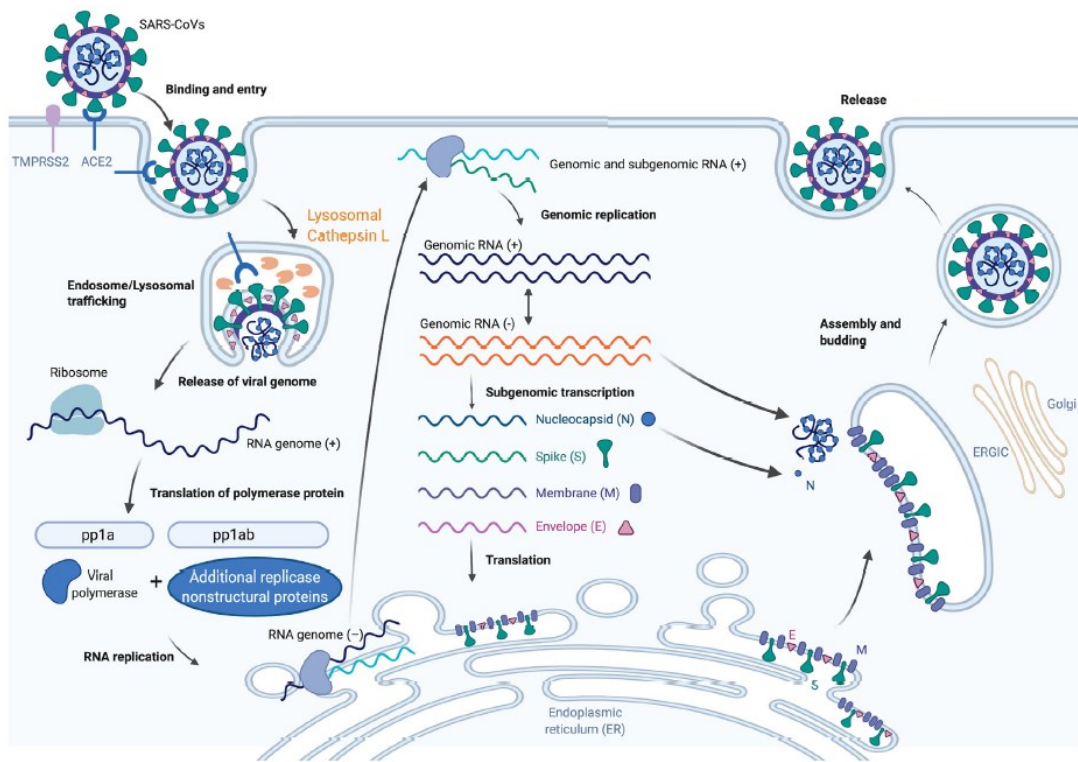
1.1.2 Patogeneze

Patogeneze SARS-CoV-2 není ještě zcela prozkoumána. Předpokládá se, že využívá mechanismy vstupu do buňky obdobné jako v případě původců SARS a MERS. Vstupní branou Sars-Cov-2 do buňky je receptor pro ACE2, stejně jako tomu je v případě SARS-CoV. ACE2 je typ exopeptidázy exprimovaná na povrchu různých buněk lidského těla, jako je například plicní epitel, epitel v tenkém střevě a endotelu [2,20,21].

Vir se dostává do buněk pomocí spike proteinu (Obr. 2). Pro jeho správnou funkci je nutné rozdělení podjednotek S1 a S2 a to štěpením pomocí enzymů. Místo rozštěpení podjednotek je nazýváno štěpné místo proteázy S1/S2 a je tvořeno insercí 12 bází, které tvoří funkční polybazické místo pro vlastní štěpení. Štěpení probíhá za pomoci proteázy podobné furinu. Průnik viru do hostitele je umožněn prostřednictvím interakce RBD S1 podjednotky s ACE2 receptorem na povrchu hostitelské buňky. Pomocí RBD S2 podjednotky dochází k fúzi membrány viru a buňky hostitele. Důležitou roli pro správné spojení membrán hrají lysozomální proteázy katepsiny a transmembránová serinová proteáza 2 (TMPRSS2) (Obr. 3) [2,9,21].

Po vniku viru do hostitelské buňky dochází k uvolnění jeho genomu do cytoplazmy, ze které se dostává do hrubého endoplazmatického retikula, kde následně dochází k translaci a replikaci virové genetické informace. Vytvořené povrchové glykoproteiny obalí membrána z endoplazmatického retikula. Dále se vytváří nukleokapsid, a to spojením N proteinu a virového genomu. Takto vytvořené viriony poté vyzrávají v tzv. endoplasmatic reticulum – Golgi intermediate compartment zkráceně ERGIC. Tento kompartment je vezikulo-tubulární shluk, který se nachází v meziprostoru endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Následuje fúze vyzrálého

Virionu s cytoplazmatickou membránou a vypuštění viru ven z buňky pomocí exocytózy (Obr. 3) [2,9,20,21].



Obrázek 3 Patogeneze SARS-CoV-2 [2].

1.1.3 Varianty

SARS-CoV-2 je velice náchylný k mutacím. Obecně se uvádí, že míra mutací u RNA virů je poměrně vysoká. Variant SARS-CoV-2 je popsáno již mnoho, avšak nejvíce známých a obávaných je pět, a to alfa, beta, gama, delta a omicron (Tab. 3). Mezi další zkoumané varianty patří například epsilon, zeta, eta, theta, iota, kappa, lambda a mu [22,23].

Alfa varianta je také známá pod názvem britská mutace, jelikož k prvnímu záchytu došlo ve Velké Británii. Jedná se o variantu, ve které dochází k záměně 14 aminokyselin v proteinech viru. Největší význam má mutace označená jako N501Y. Jedná se o záměnu asparaginu za tyrosin na RBD spike proteinu. Tato konkrétní mutace může za zvýšenou afinitu k ACE2 receptoru [4,22,23,24].

Beta varianta, nebo také jihoafrická mutace, byla poprvé zachycena v Jihoafrické republice. Nejvýznamnějšími mutacemi jsou K417N a E484K, které pomáhají viru vyhnout se imunitní odpovědi hostitele [22,23].

Gama varianta nazývána také brazilskou mutací byla poprvé zachycena v Tokiu u turistů přijíždějících z Brazílie. Tato varianta obsahuje celkem 17 mutací, většinou se jedná o záměny aminokyselin ve spike proteinu. Významné jsou hlavně mutace K417T, E484K, N501Y, D614G a H655Y, které značně zvyšují infekčnost viru [22,24].

Delta varianta neboli indická mutace byla poprvé zachycena v Indii. Varianta se také označuje jako dvojitá mutace, jelikož obsahuje mutace E484Q a L452R, díky kterým dochází k vyšší infekčnosti i vyšší odolnosti vůči protilátkám. Další charakteristické mutace se nacházejí ve spike proteinu a jedná se zejména o T19R, del 157-158, L452R, T478K, D614G, P681R a D950N [25].

Varianta omicron byla poprvé detekována v Jižní Africe. Obsahuje přibližně 30 mutací v oblasti spike proteinu. Tato varianta je až 2,8x nakažlivější než varianta delta. Nicméně obsahuje 2 mutace, které by mohly vést k oslabení viru, jedná se o K417N a E484A [23,26].

Klinické příznaky COVID-19 jsou různé, od asymptomatických stavů až po syndrom akutní respirační tísně a multiorganového selhání.

Typickými klinickými příznaky jsou horečka, kašel, bolest v krku, bolest hlavy, únava, myalgie a dušnost. Většina těchto příznaků je k nerozeznání od ostatních respiračních onemocnění. U jisté podskupiny pacientů může nemoc přejít až do pneumonie, respiračního selhání a může následovat smrt. Tato progresse je spojena s extrémním vzestupem zánětlivých cytokinů včetně interleukinu (IL) 2, IL7, IL10, faktoru stimulujícího granulocytární kolonie, IP10, monocytárního chemotaktického proteinu 1, makrofágového zánětlivého proteinu 1 α , tumor nekrotizujícího faktoru α a vytvořením tzv. cytokinové bouře [2,27,28,29].

Mezi příznaky s minimálním výskytem řadíme nechutenství, průjem, hemoptýzu, rýmu, poškození jater, poškození ledvin, nevolnost a zvracení. SARS-CoV-2 má také mírný neuroinvasivní potenciál. Napadá především čichový nerv a čichový bulbus nebo také sensorická vlákna nervus vagus, který z mozkového kmene inervuje dýchací cesty, včetně hrtanu, průdušnice a plic [2,27,28].

Těžký průběh začíná chřipkovými příznaky, po 6 dnech přichází dušnost a po dalších 8 dnech následuje hospitalizace. V dalších dnech bývá nutností tracheální intubace. Syndrom akutní dechové tísně (ARDS) je jednou z nejzávažnějších komplikací pacientů s COVID-19. Je spojen s prodlouženou hospitalizací a vysokou mortalitou, zvláště pokud se u pacientů rozvine multiorgánové selhání organismu. Mezi kardiovaskulární komplikace, které se u onemocnění nejčastěji vyskytují, patří například arytmie, hypoxemická kardiomyopatie a akutní srdeční selhání. V neposlední řadě dochází často k trombotickým komplikacím [2,27,28].

K dalším klinickým příznakům se řadí takzvaný post-covidový syndrom. Takto je označován stav, kdy po ukončení onemocnění přetrvávají fyzické i kognitivní příznaky. Tento syndrom vzniká jako následek systémové zánětlivé reakce a následné kompenzační protizánětlivé reakce a může vést k cytokinové bouři. Tento proces, který je imunitní odezvou na přítomnost viru může mít však za následek poškození plic, vznik akutní respirační tísně, koagulopatie či imunosuprese. Na screeningových vyšetřeních může být také patrná různě velká plicní i vaskulární fibróza. Mezi klasické post-covidové příznaky patří dušnost, únava a slabost přetrvávající i několik měsíců [30,31,32].

Tabulka 3 Varianty SARS-CoV-2 a jejich klinické příznaky [4].

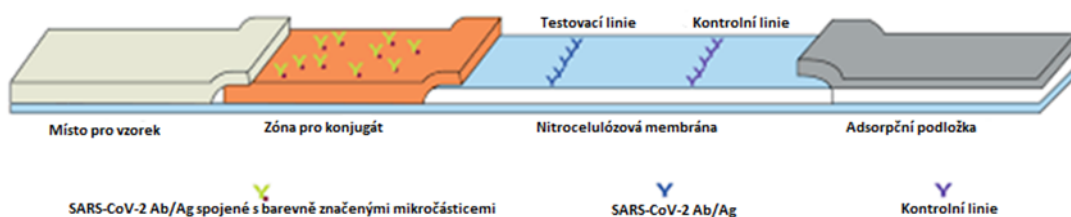
Varianta SARS-CoV-2	Klinické příznaky
Alfa	Horečka, suchý kašel, dyspnoe, myaglie, únava, diarea, ztráta chuti a čichu, pneumonie, selhání orgánů
Gama	Horečka, suchý kašel, dyspnoe, myaglie, únava, diarea, ztráta chuti a čichu, pneumonie, selhání orgánů
Delta	Horečka, suchý kašel, dyspnoe, myaglie, únava, diarea, ztráta chuti a čichu, pneumonie, selhání orgánů
Omicron	Horečka, suchý kašel, dyspnoe, myaglie, únava, diarea, pneumonie

1.1.4 Diagnostika

K základním testům, využívaným pro diagnostiku onemocnění COVID-19 patří PCR a průkaz antigenu v krvi nebo jiných tělních tekutinách. Jak je již uvedeno v úvodu, variant testů je mnoho. Mezi nejčastěji používané patří testy založené na detekci nukleových kyselin pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), sérologické a imunologické testy, metody detekce vazebných protilátek anebo antigenu a point of care testy (POC). Vzorky používané k diagnostice, jsou především stěry z krku, nosu a sliny, dále je možné využít i sérum, plasmu či plnou krev [1,2].

Diagnostické testy se dají rozdělit na takzvané screeningové a validační metody. Screeningové metody jsou převážně kvalitativní a potvrdí či vyvrátí přítomnost například antigenu či protilátky. Validační metody jsou pak převážně kvantitativní, takže dokážou určit i virovou nálož nebo přesný titer protilátek. Mezi screeningové metody patří POC a testy na zjištění antigenu či protilátek prováděné pomocí laterální imunochromatografie. Hlavní validační metodou je PCR, ale využívány jsou i imunologické testy, jako je například enzym linked immunosorbent assay (ELISA) [33].

Nejběžnějšími screeningovými metodami jsou testy na antigen či protilátky fungující na principu laterální imunochromatografie. Samotná testovací destička se skládá z několika zón tvořených porézním materiálem či membránou viz. Obr. 4. Vzorek s analytem se nanese do místa pro vzorek, obvykle několik kapek, slouží současně jako mobilní fáze, která unáší analyt do dalších testovacích zón. [30] Poté vzorek putuje přes zónu s konjugátem, kde interaguje s analytem a vzniká imunokomplex konjugát-analyt. Tento imunokomplex se dostává na nitrocelulóзовou membránu, kde se nachází testovací a kontrolní linie. Testovací linie obsahuje imobilizované protilátky/antigeny zachycující imunokomplex. Kontrolní linie detekuje obvykle konjugát jako takový ať už v imunokomplexu či volný. Na konci destičky se nachází adsorpční podložka, která urychluje postup vzorku přes membránu. Výsledkem je vždy minimálně jeden barevný proužek (kontrolní linie). V případě přítomnosti protilátky či antigenu ve vzorku jsou výsledkem dva barevné proužky (testovací a kontrolní linie) [34].



Obrázek 4 Schéma testu na principu laterální imunochromatografie [35].

PCR je základní metodou konfirmace screeningových testů. Při této metodě dochází k množení specifického úseku virové nukleové kyseliny in vitro. Sekvence RNA,

nacházející se v reakčním roztoku, působí jako templát pro reverzní transkriptázu. Výsledná jednovláknová DNA pak slouží jako templát pro PCR. Primery proti známým kódujícím oblastem mRNA optimalizují reakci pro konkrétní požadovaný transkript. V případě SARS-CoV-2 je hned několik primerů, které lze využít. Existují primery namířené na N gen, na spike protein, na ORF 1ab, Nsp 14, nCoV_IP2, nCoV_IP4, na protein E. Principiálně se jedná defacto o proces replikace DNA tak, jak probíhá in vivo. Celá reakce se skládá ze tří kroků:

1. **Denaturace** – v tomto kroku dochází k rozvolnění dvoušroubovice DNA, probíhá za teploty zhruba 90 °C a trvá přibližně 20–45 sekund.
2. **Annealing** – v této fázi reakce dochází k navazování specifických primerů k jednotlivým vláknům DNA, teplota tohoto kroku je přibližně 40–60 °C a trvá zhruba 30 – 90 sekund.
3. **Extenze/elongace** – krok, ve kterém nastává vlastní polymerace a syntéza nových řetězců, teplota je zde přibližně 72 °C a tento krok je dlouhý přibližně 45–90 sekund.

Tyto tři kroky se několikrát opakují, jedná se přibližně o 30–40 cyklů, a výsledkem je zhruba 10^9 kopií původního segmentu. Možností analýzy konečného produktu je hned několik, například hybridizace značená sondou, sekvenování, elektroforéza (ELFO). Existuje také takzvané RT-PCR, které nám umožňuje získávat informace o množství produktu v reálném čase [36,37,38].

1.1.5 Léčba

Léčba onemocnění COVID-19 spočívá v léčbě jednotlivých symptomů. U pacientů s mírným průběhem je třeba dbát na dostatečný přísun tekutin a doporučuje se užívání léků, jako je paralen, ibuprofen nebo acylpyrin a klid na lůžku [2,9,22].

V případě závažnějších průběhů je většinou nutné podávat pacientům kyslík, a to v podobě obličejové masky, nízkoprůtokové nebo vysokoprůtokové nosní kanyly nebo neinvazivní plicní ventilace. U valné většiny pacientů s těžkým průběhem dochází i k nasazování antivirotik, primárně určených k léčbě jiných virových onemocnění.

Využívá se například remdesivir, favipiravir, umifenovir a kaletra. Dále mají potenciál léky, jako je chlorchinin, hydroxychlorchinin, tocilizumab a sarilumab. Předpokládá se, že nápomocné může být i podávání interferonu a také podávání monoklonálních protilátek, případně podávání plasmy od dárce, který prodělal COVID-19 [2,9,22].

Novinkou na trhu je lék vytvořený firmou Pfitzer, který se nazývá Paxlovid. Skládá se z inhibitoru proteázy druhé generace nirmatrelviru a farmaceutického zesilovače ritonaviru. Doporučuje se k léčbě mírného až středně těžkého COVID-19. V předregistračních studiích vyšlo najevo, že včasné podání Paxlovidu snižuje hospitalizace až o 89 %. V prosinci 2021 vydala Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) stanovisko o možnosti nouzového použití tohoto léku k léčbě dospělých pacientů s COVID-19. Od ledna roku 2022 je Paxlovid podmíněčně registrován agenturou EMA v Evropské unii [39,40,41].

Hlavním cílem léčby je však prevence, mezi níž patří očkování. Nyní je na trhu již několik druhů vakcín, a to vakcíny typu RNA od firem Pfizer/BioNTech, Moderna, nereplikujícího se virového vektoru od firem Johnson & Johnson a Astrazeneca a nebo nejnovější typ vakcíny, obsahující spike protein vyrobený in vitro od firmy Novavax. Podmínečné registrace vakcín v Evropské unii (EU) zahájila firma Pfizer/BioNTech s vakcínou Comirnaty, registrovanou 21. 12. 2020, jako další se připojila firma Moderna s Spikevax, která byla registrována 6. 1. 2021. Následovala registrace vakcíny Vaxzevria od firmy Astrazeneca, a to 29. 1. 2021, k ní se 11. 3. 2021 připojila firma Johnson & Johnson se svou vakcínou Janssen. Zatím poslední registrovanou vakcínou v EU je Nuvaxovid od firmy Novovax, jež byla registrovaná 20. 12. 2021 [42,43,44,45].

2. MAGNETICKÉ ČÁSTICE

Magnetické částice jsou vyráběny z magnetických prvků, a to především ze železa, kobaltu a niklu nebo jejich sloučenin. Příkladem takovéto sloučeniny jsou například feromagnetické spinely jako $MgFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ a $CoFe_2O_4$ nebo slitiny jako CoPt nebo FePt. Mezi nejvíce využívané materiály k výrobě těchto částic patří hlavně oxidy železa, a to třeba magnetit Fe_3O_4 , maghemit γFe_2O_3 a hematit αFe_2O_3 .

Superparamagnetické částice vyrobené z oxidů železa se nazývají zkráceně SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) [46].

Superparamagnetismus je forma magnetismu, která se objevuje v malých feromagnetických nebo ferimagnetických mikro- či nanočásticích. V dostatečně malých částicích může magnetizace náhodně měnit směr pod vlivem teploty. Typická doba mezi dvěma flipy se nazývá Neelova relaxační doba. V nepřítomnosti vnějšího magnetického pole, kdy je čas použitý k měření magnetizace nanočástic mnohem delší než Neelova relaxační doba, se jejich průměrná hodnota magnetizace zdá být nulová, částice se nacházejí v tzv. superparamagnetickém stavu. V tomto stavu je vnější magnetické pole schopno magnetizovat částice podobně jako paramagnet. Jejich magnetická susceptibilita je však mnohem větší než u paramagnetu [47,48].

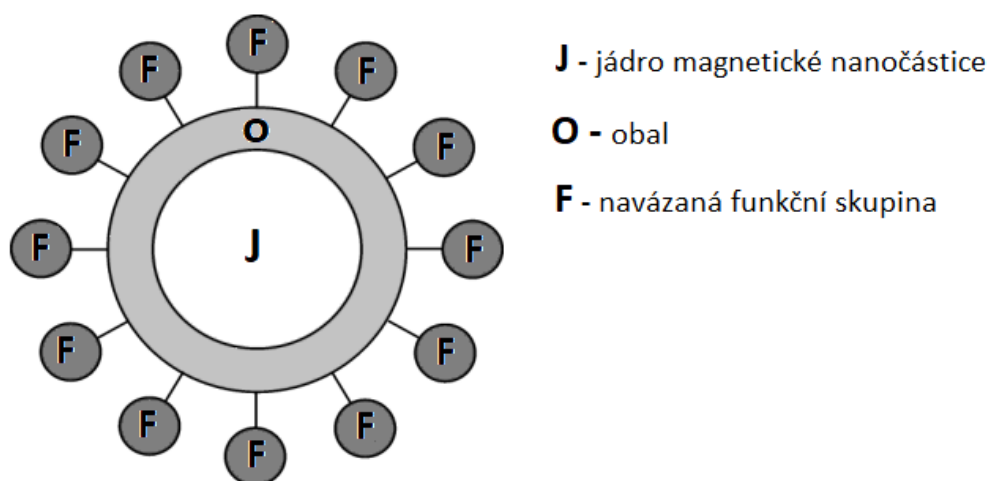
Mezi hlavní důvody, kvůli kterým jsou částice ve výzkumu využívány a vyhledávány patří relativně snadná příprava, vysoká stabilita a výjimečné elektrické, tepelné a magnetické vlastnosti. Obecně největší výhodou je snadná manipulace pomocí vnějšího magnetického pole. Dále je velkým plusem jejich velký specifický povrch, na který je možno navázat velké množství různých ligandů, což z nich dělá efektivní nosiče pro rychlou a účinnou imobilizaci a separaci biologických látek [49,50].

Existuje široká škála možností syntézy nanočástic, kam patří například syntéza ve vodném roztoku, nepolárním organickém rozpouštědle nebo syntéza suchou cestou. Lze sem také zahrnout koprecipitaci solí železa, tepelný rozklad či redukce, syntéza micel, hydrotermální syntézu, termolýzu prekurzorů nebo syntézu pomocí elektrospreje [47,49,51].

Pro biomedicínské účely je nutné holé jádro magnetické částice obalit povrchovým ochranným obalem, jelikož bez něj by částice měly sklon tvořit shluky a tím by se zhoršovaly jejich vlastnosti. Obalový materiál musí mít vysokou afinitu k železitému jádru a zároveň nesmí být imunogenní ani antigenní. K obalování se využívají nejrůznější sloučeniny, jako jsou například polymery, polysacharidy, proteiny, anorganické matrice, organické kyseliny, dendrimery, ligandy a povrchově aktivní látky. Potažení částic obalem zvyšuje jejich biokompatibilitu, stabilitu ve vodných

a fyziologických mediích a také zvyšuje mechanickou a chemickou stabilitu nanočástic. Kromě toho lze obal využít k sekundárnímu navázání nukleových kyselin, proteinů, peptidů, fosfolipidů, enzymů, polysacharidů, fluorochromů a dalších přes povrchové funkční skupiny (Obr. 5) [47,49,51].

Magnetické částice jsou využívány především jako nosiče různorodých látek (například ve vakcínách či lécích) nebo pro imobilizaci a rychlou magnetickou separaci biomolekul jako jsou například protilátky, proteiny a enzymy. Do budoucna mají tyto částice velký potenciál využití [46,47,51].



Obrázek 5 Struktura magnetických nanočástic [52].

2.1 Imobilizace biomolekul na magnetické částice

Možnost imobilizace biologicky aktivních látek je velice široká, existuje již spousta nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek, které byly již úspěšně navázány na magnetické částice. Existuje řada metod, jak lze imobilizaci provést. Lze je rozlišit například podle metody vazby na nekovalentní a kovalentní imobilizaci [49,53].

Nejčastějším postupem je imobilizace pomocí kovalentních vazeb. Pro kovalentní vazbu je třeba, aby magnetické částice na svém povrchu měly navázány funkční skupiny. Povrch částic většinou tvoří různé biopolymery, které mohou zlepšit jejich fyzikální,

chemické a biologické vlastnosti. Jejich povrch lze dále modifikovat a navázat na ně různé funkční skupiny jako například aminoskupiny, hydroxylovou, karboxylovou, thilovou, izokyanátovou, acylazidovou, aldehydovou, karboimidovou, anhydridovou, epoxidovou, hydrazidovou, alkylhalogenidovou, oxiranovou skupinu či estery NHS a mnohé další. Před vazbou je většinou třeba funkční skupiny aktivovat vhodným činidlem. Tím dojde k aktivaci funkční skupiny pro možnost navázání biomolekuly. Například při modifikaci karboxylovými skupinami se jako aktivační činidla používají karbodiimidy, díky kterým lze uskutečnit reakci mezi karboxylovou skupinou magnetických částic a aminoskupinou imobilizovaní biomolekuly. Nejčastěji se využívá 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimidu zkráceně EDC či EDAC. Pokud se jedná o imobilizaci proteinů, pak se využívá N-hydroxysulfosukcinimid sodný zkráceně sulfo-NHS. Výhodná je kombinace činidel EDC a sulfo-NHS, jelikož sulfo-NHS zvyšuje rozpustnost a stabilitu vzniklého produktu. Výběr činidel, případně jejich kombinace je důležitá pro správnou imobilizaci zprostředkovanou kovalentními vazbami [49,53].

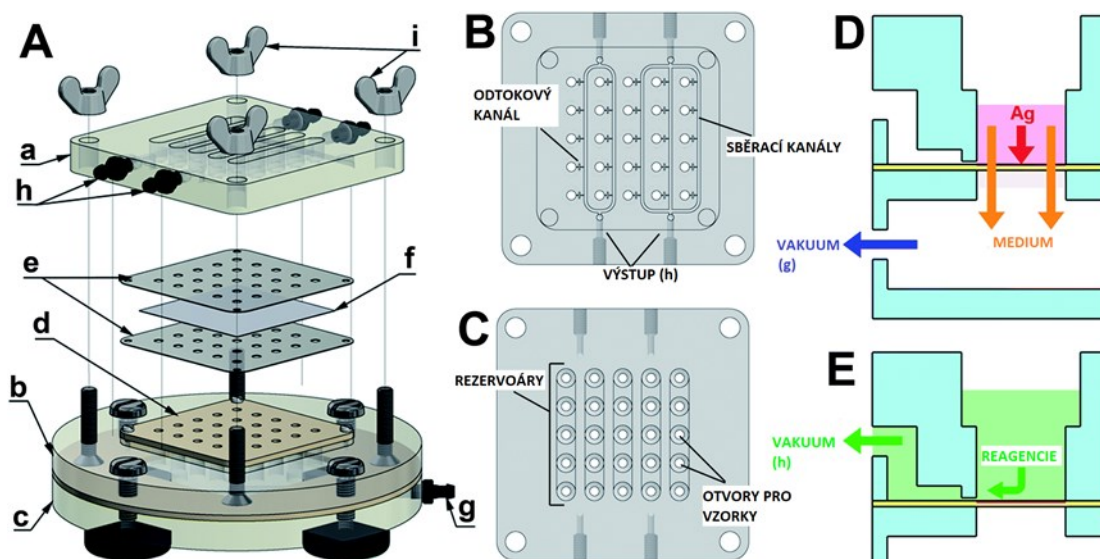
Další možností je využití nekovalentních vazeb, slabých vazebných interakcí, například u částic s imobilizovaným avidinem či streptavidinem. Tyto dvě látky mají vysokou afinitu k biotinu neboli vitamínu B7/H. Častější využití mají částice s navázaným streptavidinem, tento protein se izoluje z bakterií *Streptomyces avidinii*. Před samotnou vazbou je třeba biotinylovat ligand, tedy kovalentně připojit molekulu biotinu k ligandu, aby se mohl připojit k avidinu. Využívá se zde silná nekovalentní vazba mezi biotinem imobilizovaným na biologickou látku a streptavidinem či avidinem na částicích. Vytvořený komplex je velmi pevný a odolný i vůči náročným reakčním podmínkám. Dalším příkladem je nekovalentní vazba, ta může být přímá fyzikální sorpce nebo zabudování biologických látek do magnetické gelové matrice [49].

Imobilizovat biologicky aktivní látky na magnetické částice lze také použitím magnetoliposomů. Tento způsob se využívají zejména při imobilizaci membránově vázaných enzymů. Toto spojení zvyšuje aktivitu a stabilitu imobilizovaného enzymu [49].

3. AFFIBLOT

Affiblot je zařízení o velikosti dlaně napojené na vakuum, pracující na bázi dotblotu (Obr. 6). Jedná se o zařízení určené pro screening afinitních bioreagencií. Lze na něm provádět porovnání až pěti protilátek od různých výrobců, s ohledem na afinitu a na zkříženou reaktivitu protilátek. Výhoda této metody je v její jednoduchosti. Umožňuje snadnou depozici antigenu na vyměnitelnou blotovací membránu, rychlou aplikaci a odtah použitých roztoků. Na rozdíl od klasického dotblotu, kde se zařízení použije pouze pro nanesení antigenu, probíhá celá procedura včetně promývání a výměny reagencií uvnitř zařízení [54].

Tyto vlastnosti jsou zajištěny inovativně vyrobeným víkem affiblotu, které má na horní straně přidané zásobníky na reagenty a ze spodní strany zase mikrokanálky pro odtah kapaliny z jamky. Jeden zásobník je společný vždy pro 5 jamek v řadě, proto je možné v každé řadě testovat jinou primární protilátku a jinou sekundární protilátku, která může pocházet z různých zvířecích hostitelů. Dále není potřeba vyjímat membránu ze zařízení, řezat ji a ošetřovat samostatně v nádobě. Odvodné kanálky na spodní straně umožňují odvádění reagencií přímo do odpadu pomocí vakuové pumpy. V případě testování afinity protilátek je možné otočit víkem o 90° a nanést chaotropní reagenty v kolmém směru, což je u této metody klíčové. Samozřejmě je možné použít affiblot jako klasický dotblot s tím, že zařízení je rychlejší a uživatelsky jednodušší než klasický dotblot [54].



Obrázek 6 Aparatura affiblotu [54].

(A) - konstrukce zařízení a její součásti - (a) víko affiblotu, (b) střední díl, (c) spodní díl s komorou pro odvod kapaliny, (d) membránové těsnění, (e) PE fólie, (f) membrána, (g) výstup ze spodního dílu, (h) boční výstup pro odtah kapaliny přes mikrokanálky, (i) křídlové matice, (B) spodní strana víka, (C) horní strana víka se zásobníky (rezervoáry) na kapalinu o objemu až 1 ml, (D) aplikace antigenu na membránu, kapalina prochází membránou, antigen se zachytí na membráně a kapalina se shromažďuje ve vakuové komoře pod ní (vakuum z výstupu (g)), (E) roztok z jamek je odváděn pomocí systému mikrokanálek do vývodů (h) pomocí vakua

4. LAB-IN-SYRINGE

Metoda Lab-in-Syringe (LIS) byla poprvé popsána před deseti lety skupinou tvořenou Dr. Mayaou, Dr. Horstkottem, Dr. Estelou a prof. Cerdou. Tato metoda spojuje sekvenční injekční analýzu s platformou Lab-on-Valve (LOV). Jedná se o plně automatizovanou metodu předúpravy vzorků. Skupina Dr. Mayae uskutečnila svůj experiment při stanovení rhodaminu B, které zahrnovalo mikroextrakci typu kapalina-kapalina (DLLME) právě v systému LIS. Experimentem bylo prokázáno, že LIS je vhodnou metodou pro automatizované úpravy vzorků především pomocí mikroextrakce [55,56].

System vychází především z modelu sekvenční injekční analýzy (SIA). Jako nádobu pro průběh reakcí využívá stříkačku s pístem, který je automatizován pomocí pumpy ovládané přes počítačový software. Stříkačka je vyměnitelná a je možné

používat různé velikosti/objemy stříkačky, respektive reagensí. Systém LIS se skládá z pumpy napojené na píst stříkačky, jejíž ústí je připojeno k vícecestnému ventilu sloužícímu k přivádění reagensí a odvádění odpadu ze stříkačky. Stříkačka má uvnitř magnetické míchadlo, které se uvnitř stříkačky otáčí vlivem působení dvou magnetů umístěných vně stříkačky na plastovém prstenci. Prstenec je připojený gumičkou k otočnému motoru řízenému pomocí relé a jeho otáčení způsobuje i otáčení magnetického míchadla uvnitř stříkačky [55,56].

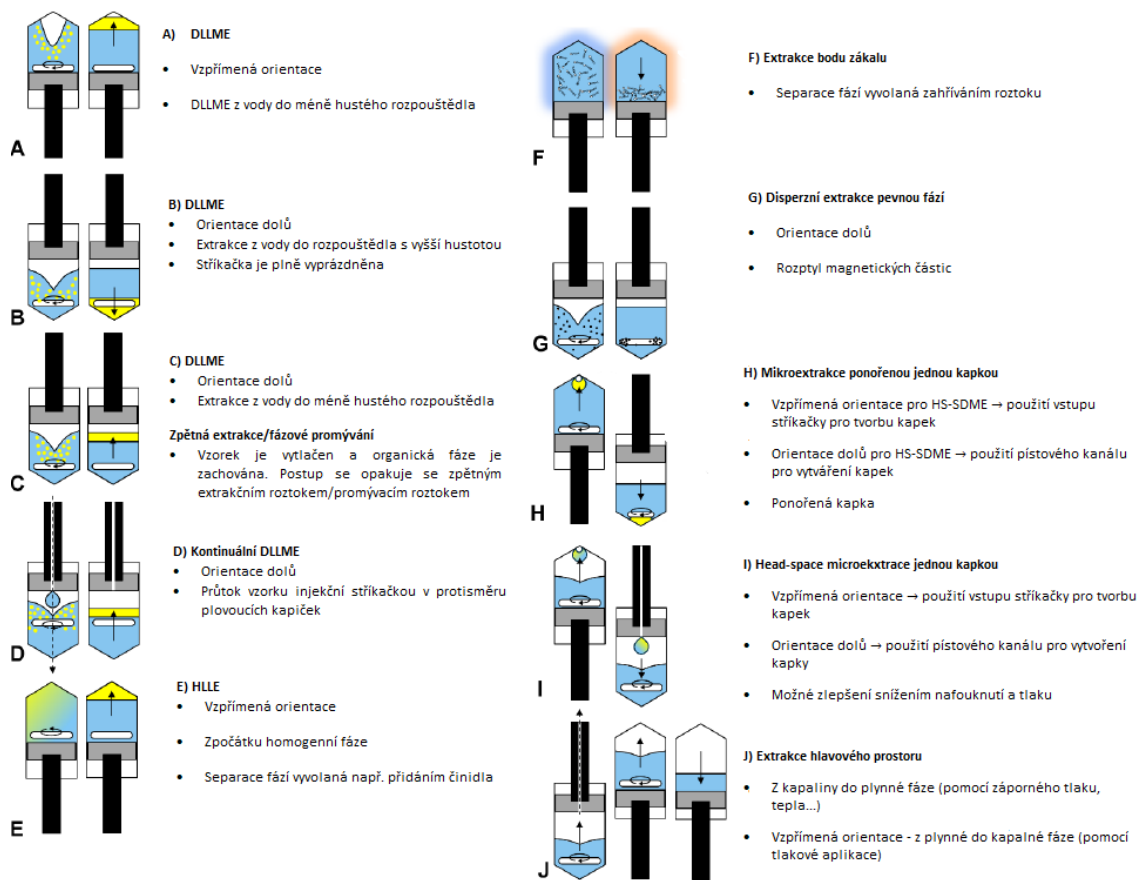
Stříkačku lze využít ve dvou orientacích, a to otočenou pístem nahoru (vzpřímená orientace) či dolů, podle potřeby analýzy. Před vlastním použitím LIS je důležité promyslet, která orientace bude výhodnější. Popis orientací a možností jejich využití je vidět na Obr. 6 [55,56].

Výhodou LIS je možnost miniaturizace celého systému, přizpůsobivost velikosti stříkačky a automatizace, která zajišťuje vyšší robustnost a reprodukovatelnost metody. Stříkačka je vlastně mísicí, reakční a extrakční komorou, která je dobře utěsněna a nedochází tak k odpařování rozpouštědel a kontaktu uživatele s chemikáliemi. Další výhodou je umístění míchadla v uzavřené komoře, čímž je možné využít vyšší rychlost otáčení, aniž by došlo k rozstříku chemikálií do okolí. Systém je také snadno spojitelný s dalšími detekčními systémy, např. fotometrickými detektory, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), hmotnostní spektrometrií (MS) apod [55,56].

Mezi omezení metody se řadí větší mrtvý objem stříkačky, problematičtější může být případné chlazení či ohřívání reakční směsi uvnitř stříkačky a dále nelze reprodukovatelně provést koncentrační gradient [55,56].

Metoda byla použita pro analýzu rhodaminu B ve vodě a nealkoholických nápojích, dále u stanovení fluorochinolonů v environmentálních vodách, amoniaku v odpadních vodách, sulfoamidů v moči a také v modelovém stanovení olova v pitné vodě. Dále byl tento systém použit při modelové analýze povrchových vod, kde byly jako analyty využity benzen, toluen, ethylbenzen a xylen. V neposlední řadě byla LIS využita k extrakci

nesteroidních protizánětlivých léků, jakými byly ketoprofen, naproxen, fluroiprofen, diklofenak a ibuprofen [57,58,59,60,61].



Obrázek 7 Systém LIS: Možnosti orientace stříkačky a aplikace [56].

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Seznam použitých přístrojů a pomůcek

- Analytická váha AS 60/220.X2 (Radwag Wagi Elektroniczne, Radom, Poland)
- Affiblot (patentovaný prototyp, Ústav analytické chemie AV ČR, Brno)
- ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Systém Lab-In-Syringe
 - Pumpa Cavro XC12 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
 - Injekční stříkačka (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- Magnetické míchadlo MSH-300 (Biosan, Riga, Latvia)
- pH metr BT-675 (Boeco, Hamburg, Germany)
- Pipety eppendorf research plus (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Říčany u Prahy, ČR)
- Rotátor multi Bio RS-24 (Biosan, Riga, Latvia)
- Magnetický separátor (3D tisk, FAF CUNI KACH Dr. Horstkotte)
- Spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Třepačka 3D Sunflower Mini-Shaker (Biosan, Riga, Latvia)
- Vakuová pumpa VWR PH20405-B6 (Avantor, Radnor, PA, USA)
- Vortex lab dancer S000 (IKA, Staufen, Germany)
- Vortex V-1 plus, verze V3AW (Biosan, Riga, Latvia)

5.2 Seznam použitých chemikálií

- 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina (MES) (kat. 145224-94-8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Azid sodný (Chemapol Limited, London, UK)
- EliGene Viral DNA/RNA Isolation Kit, (kat. 3232-100, Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (kat. PM-T1727/100, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný (LACHEMA o.p., Chemapol, Brno, ČR)
- Immun-Blot PVDF Membranes for protein Blotting , 26 cm x 3,3 m x 0,2 µm (kat. 1620177, BIO-RAD, Hercules, CA, USA)
- Methanol P.A (kat. 67-56-1, Iso Reagent, Lach – Ner s.r.o, Neratovice, ČR)
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarboiimid (EDAC) (kat. 25952-53-8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (S-NHS) (kat. 106627-54-7, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Opti-4-CN detekční kit (kat. 1708235, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) tablets (kat. P4417-50TAB, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)
- Redestilovaná voda
- Tween 20 (kat. 39796.01, SERVA elektroforesis GmbH, Heidelberg, Germany)

5.3 Seznam použitých částic

- PGMA (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha, ČR)
- HEMA (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha, ČR)
- Sera-Mag (kat. 65152105050250, ThermoFisher scientific, Indianapolis, IN, USA)
- Sera-Mag (kat. 24152105050250, Cytivia, Buckingham, UK)

5.4 Seznam použitých protilátek

- Anti-*Campylobacter jejuni* (kat. 3CJ2, HyTest, Turku, Finland)
- Polyklonální anti-myšší IgG (kat. 12-349, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Monoklonální anti-spike SARS-CoV-2 (kat. 3CV2, RBD 1125, HyTest, Turku, Finland)
- Monoklonální anti-spike SARS-CoV-2 (kat. 3CV2, RBD 1106, HyTest, Turku, Finland)
- Monoklonální myšší anti-ApoE (Moravian - Biotechnology, Brno, ČR, vyrobeno na zakázku)

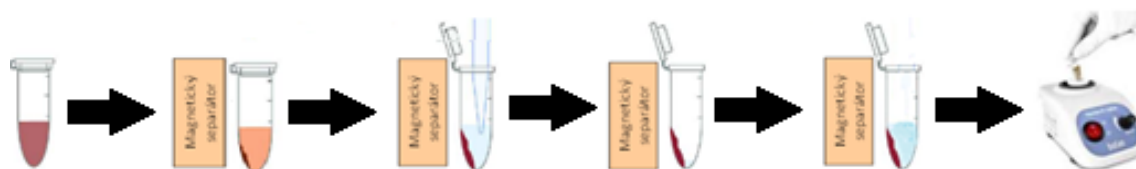
5.5 Vazba protilátek na magnetické částice vsádkovou metodou

Použité roztoky:

- MES
- EDC a sulfo-NHS
- PBS

V rámci úvodních optimalizací se používaly troje částice, a to PGMA, HEMA a Sera-Mag. Odebrán byl 1 mg částic do eppendorf zkumavek o objemu 2 ml, což se rovnalo objemu 29 μ l PGMA, 28 μ l HEMA a 20 μ l Sera-Mag.

Počátečním krokem bylo důkladné promytí částic pomocí MES pufru (Obr. 8). K odebranému množství částic se přidal 1 ml MES pufru a roztok se řádně protřepal či promíchal na vortexu. Poté se zkumavka zasadila do magnetického separátoru s neodymovými magnety a počkalo se, až se částice přitáhnou k magnetu, který se nachází ve stěně separátoru. Poté se roztok bez částic odebral a dal do odpadu. Tento postup se opakoval celkem 5x pro důkladné promytí částic.

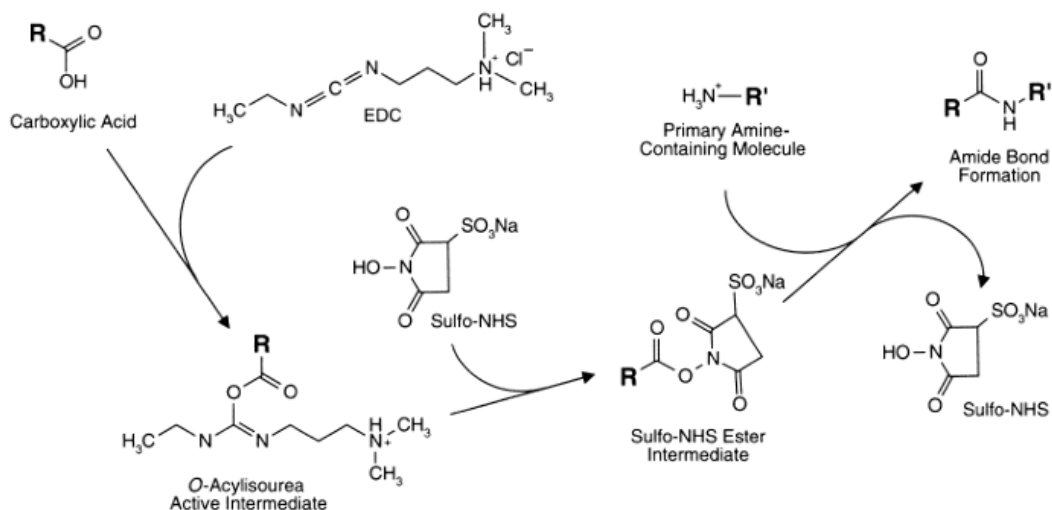


Obrázek 8 Promývání magnetických částic pomocí magnetického separátoru

Mezi jednotlivými separacemi částic na magnetickém separátoru, bylo naváženo potřebné množství aktivačního činidla EDC a sulfo-NHS. Pro každý alikvot částic 1 mg bylo naváženo 7,5 mg EDC a 1,25 mg sulfo-NHS.

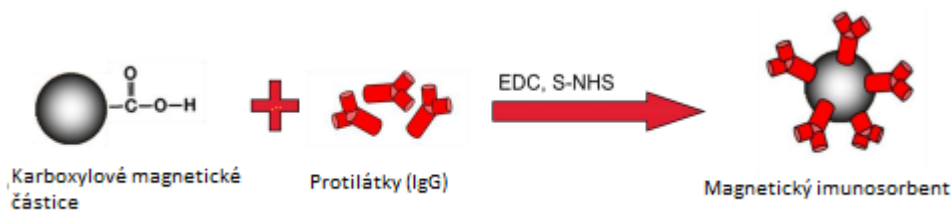
Po promytí částic byl odebrán roztok a částice ponechány přitažené k separátoru. Poté se rozpustilo navážené množství EDC a S-NHS v 1 ml MES pufru a roztok byl okamžitě přidán k částicím, které byly ihned resuspendovány, aby mohla začít aktivace funkčních skupin na jejich povrchu. Proces probíhal na rotátoru po dobu 10 minut.

Během aktivace magnetických částic (Obr. 9) byly připraveny protilátky. Z původního roztoku protilátek bylo odebráno 25 µg protilátek a přidal se k němu 1 ml MES pufru (pro jednotlivé částice je třeba udělat duplikát – 1x pro částice a 1x pro uchování původního roztoku protilátky pro další analýzy, PV). Po skončení inkubace byl aktivační roztok odebrán a k částicím se přidaly protilátky. Následovala cca 3h inkubace na rotátoru.



Obrázek 9 Schéma aktivace karboxylových magnetických částic karbodiimidovou metodou [53].

Po inkubaci byl odebrán supernatant (označován jako vazebná frakce, VF), který byl uschován pro další analýzu. Částice byly 3x řádně promyty MES puftrem. První promývací frakce (P) byla také uschována. Posledním krokem bylo promytí vzniklého imunosorbentu PBS puftrem a následné uložení imunosorbentu v PBS s 0,1% BSA a s přidavkem azidu sodného. Vzniklý imunosorbent (Obr. 10) byl skladován v lednici do doby, než byl potřebný pro další experimenty. Odebrané frakce (původní vzorek, vazebná a promývací frakce) byly skladovány v mrazáku do doby, než byly analyzovány na Affiblotu.



Obrázek 10 Schéma vzniku magnetického imunosorbentu

5.6 Hodnocení vazby protilátek na magnetické částice metodou affiblot

Použité roztoky:

- PBS pufr byl připraven rozpuštěním 1 tablety PBS ve 200 ml ultračisté vody (MQ).
- PBST bylo připraveno přidáním 100 μ l Tweenu do 200 ml PBS.
- Blokační pufr byl připraven rozpuštěním 250 mg BSA v 5 ml PBS.
- 0,1% BSA bylo připraveno rozpuštěním 100 mg BSA ve 100 ml PBST.
 - Barvicí roztok pro kolorimetrickou detekci Opti-4CN substrate kit byl připraven rozpuštěním 500 μ l komerčně dodávaného koncentrátu pufru ve 4,5 ml MQ a následným přidáním 100 μ l opti-4CN substrátu.

Nejprve byla provedena aktivace PVDF membrány ponořením do metanolu na cca 2 min. Mezitím byla sestavena aparatura affiblotu, do které se mezi dvě polyethylenové folie vložila aktivovaná PVDF membrána a spodní část affiblotu, pak byla připojena k vakuu. Následně byla provedena ekvilibrace membrány, kdy do všech rezervoárů affiblotu bylo nanášeno po 1 ml PBS. Poté bylo zapnuto vakuum a pufr protekl přes otvory v affiblotu do spodního dílu se zásobníkem. Následně proběhlo nadávkování vzorků tak, že se napipetovalo 100 μ l vzorku do každé jamky, a to při spuštěném vakuu. Po napipetování vzorků byla provedena blokace membrány, kdy se přidával 1 ml blokačního pufru do každého rezervoáru. Inkubace probíhala 1 h při RT a vypnutém vakuu.

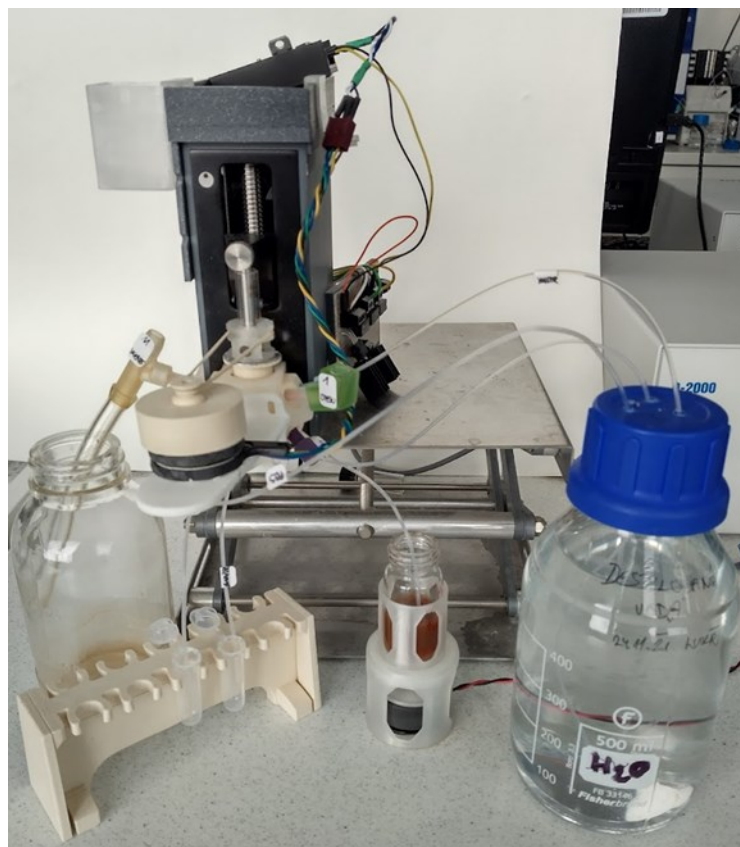
Po hodinové inkubaci byl blokační pufr odsát pomocí horních odvodných kanálků ve víku affiblotu. Poté následovalo 1x promytí PBST při spuštěném vakuu. Dalším krokem

byla příprava roztoku konjugátu neboli sekundární protilátky, a jeho následné nadávkování do rezervoárů zařízení. Následovala inkubace 1 h při RT a vypnutém vakuu.

Poté bylo provedeno 5x promytí pomocí PBS při zapnutém vakuu pomocí horních kanálků. Dalším krokem bylo rozebrání aparatury a vyjmutí membrány. Pro pozdější určení pozice vzorků byl na membráně odstřižen horní pravý roh. Následně byla membrána ponořena do vaničky s PBST a ponechána 5 minut na třepačce. Pro obarvení membrány byl použit komerčně dodávaný Opti-4CN detekční kit. Po 5 minutách byla membrána přemístěna do vaničky s kolorimetrickým činidlem. Po pětiminutové inkubaci na třepačce byla membrána opatrně opláchnuta MQ a vysušena. Intenzita skvrn (denzita) na membráně byla změřena na přístroji ChemiDoc MP imaging systém a zpracována pomocí softwaru FIALab, kde byla provedena kvantifikace intenzit skvrn.

5.7 Lab-In-Syringe

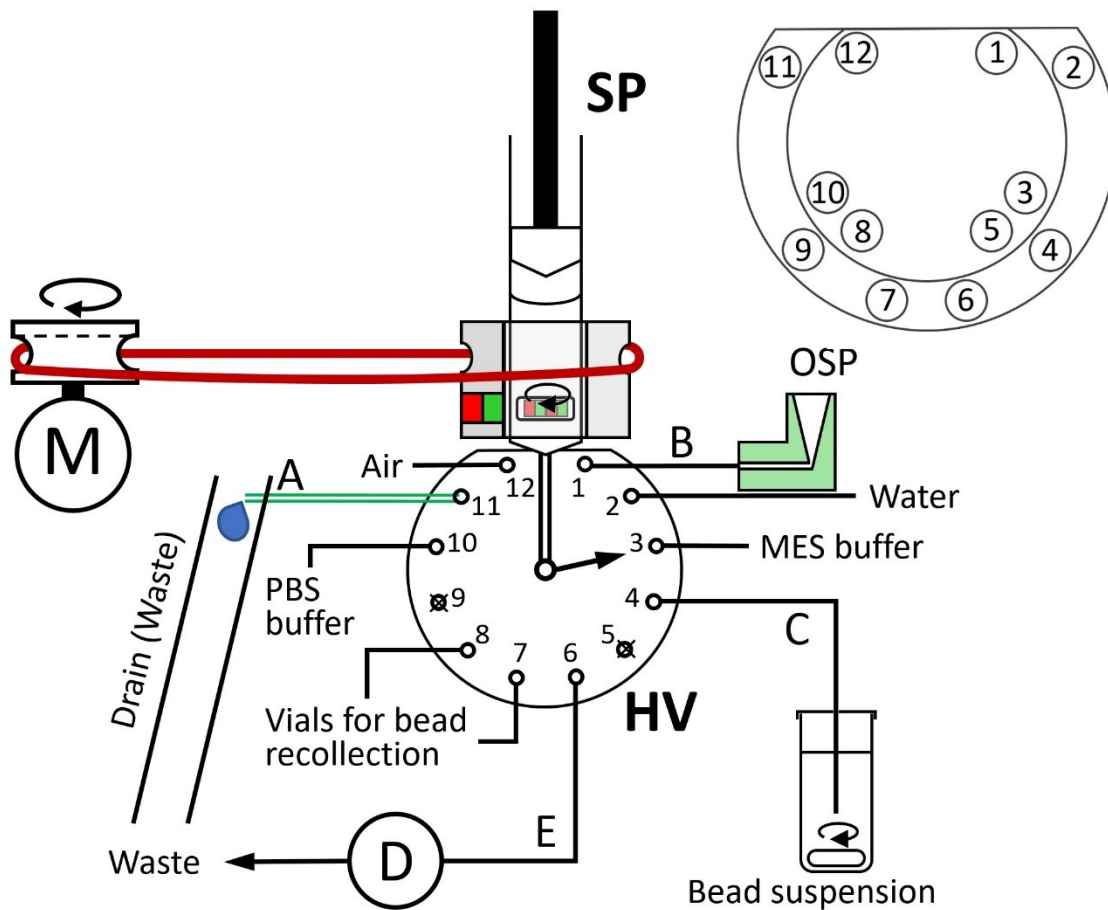
Systém Lab-In-Syringe, používaný pro automatizaci imobilizace protilátek na magnetické částice, je znázorněn na Obr. 11 s vyznačenými rozměry všech hadiček. Všechny hadičky byly vyrobeny z ohebného polytetrafluorethylenu (PTFE) o vnitřním průměru 0,5 mm. Systém sestával z pumpy Cavro XC12 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko), která byla orientována směrem dolů, takže při nasávání kapaliny se píst pohyboval nahoru a při vypuzování dolů směrem k desce stolu. Píst se pohyboval uvnitř 1ml injekční stříkačky (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) o délce pístu 3 cm. Ústí injekční stříkačky bylo napojeno na dvanácticestný ventil s keramickou hlavou (HV).



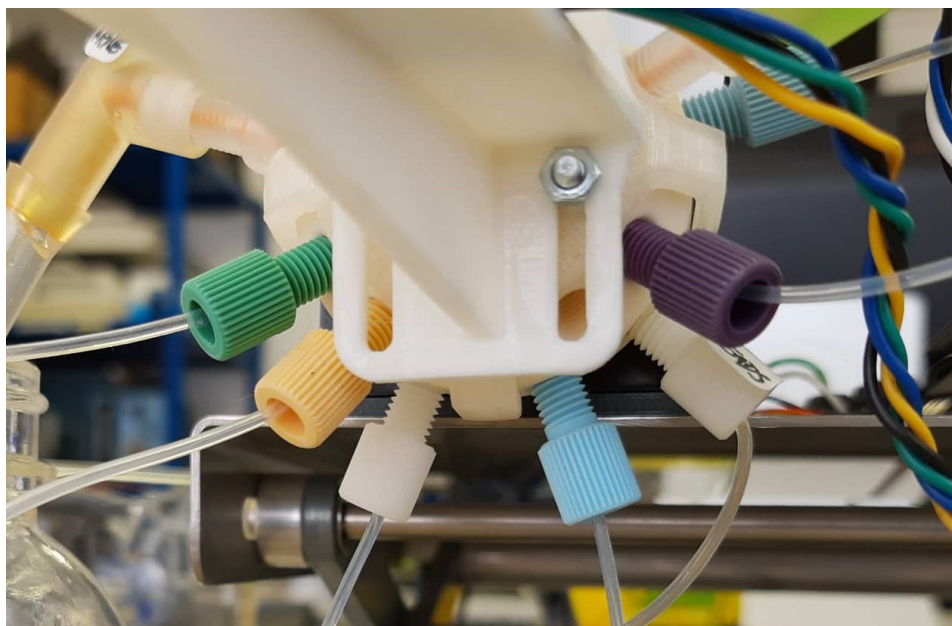
Obrázek 11 Lab-In-Syringe

Dvanácticestný ventil (Obr. 12) byl použit k nasávání a vypouštění různých kapalin či suspenzí pomocí hadiček nebo pomocí open interface jako tomu bylo u portu 1. Open interface je plastová 3D tiskem vyrobená komponenta s volně přístupnou jamkou, na jejímž dně je kanálek napojující se na vícecestný ventil. Port byl využíván k dávkování aktivačních činidel sulfo-NHS, EDC a protilátky, je zde minimální mrtvý objem. Z ostatních portů vícecestného ventilu vedly trubičky o obvyklé délce 10 až 30 cm do zásobníků s destilovanou vodou, MES a PBS pufrům. Port 2 byl napojen na destilovanou vodu, využívanou k poslední fázi promývání systému LIS. Pomocí portu 3 byl do systému přiváděn MES pufr. Port 4 byl hadičkou napojen k suspenzi magnetických částic ve vznosu zajištěném magnetickým minimíhadlem vyrobeném pomocí 3D tisku opatřený motorkem zajišťující pohyb magnetického míchadla. Porty 7 a 8 byly využity pro odběr vzorků. Pomocí portu 10 byl nasáván PBS pufr. Port 11 vedl do odpadu a byl využíván také k aspiraci vzduchu. Vedla z něj krátká pevná trubička

z polyetherketonu (PEEK) o délce asi 4 cm (0,8 mm vnitřní průměr), propichující širší trubici ze silikonové pryže (vnitřní průměr 6 mm), která sloužila jako odtoková trubice. Port 12 sloužil taktěž k nasávání vzduchu. Porty 5, 6, 9 nebyly využívány.



Obrázek 12 Schéma systému LIS s popisem vícecestného ventilu

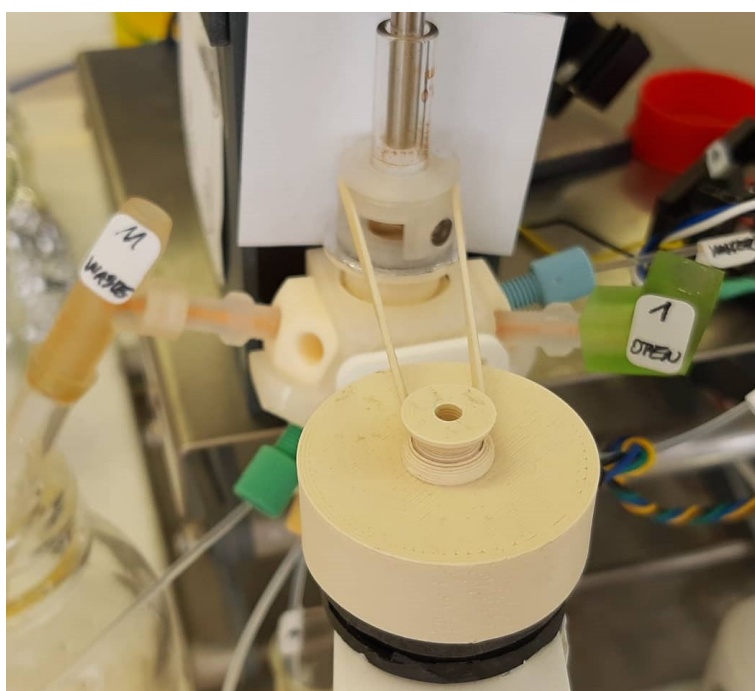


Obrázek 13 Detail vícecestného ventilu

Pro umožnění míchání roztoku uvnitř stříkačky byla vyrobena magnetická míchací tyčinka, která se vejde do 1ml stříkačky (Obr. 13). Otáčení tyčinky bylo zprostředkováno působením magnetu z vnější strany stříkačky navlečením PP prstence vyrobeného 3D FDM tiskem obsahující 2 neodymové magnety o délce 2 mm a průměru 2 mm. Prstenec poháněl přes pryžový kroužek a sadu řemenic vyrobených FDM a napojených na stejnosměrný motor, který byl vybaven počítačovým ventilátorem s modulací šířky pulzu. K umístění motoru byl použit 3D FDM tištěný držák, který byl namontován na vícecestný ventil (Obr. 14). Míchací motor byl řízen reléově přes pomocný napájecí kolík pumpy a jeho rychlost reguloval jednoduchý ovládací panel. Při otáčení výsledné rotující magnetické pole nutilo míchadlo uvnitř stříkačky, aby se otáčelo. Princip míchání suspenze částic byl postaven na vzniku odstředivé síly, která je schopna překročit magnetickou sílu, kterou jsou částice vázány na neodymový magnet.



Obrázek 14 Foto minimíchadla ve srovnání s jednokorunovou mincí



Obrázek 15 Detail míchacího systému

Celý systém LIS byl řízen pomocí počítače. Veškeré kroky, které zapojená zařízení prováděla, byly programovány v programu FIALab.

5.8 Automatizovaná vazba IgG na magnetické částice v systému LIS

Celý program pro imobilizaci protilátek na magnetické částice začíná čištěním celého systému LIS, aby se předešlo kontaminaci z minulých experimentů. Byla nasávána destilovaná voda, 150 μl ze všech portů rychlostí 200 $\mu\text{l/s}$. Po naplnění stříkačky bylo zpuštěné míchání a voda byla vypuštěna do odpadu.

Dalším krokem je vyčištění hadičky pro přivádění magnetických částic, což je důležité pro aspiraci přesného objemu, pomocí vzduchu, který je nasán portem 12. Nasáto bylo přesně 100 μl vzduchu rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$, vzduch byl pak vypuštěn portem 4, čímž došlo k vyčištění hadičky od přebytku magnetických částic. Po tom to kroku došlo k nasátí magnetických částic dovnitř stříkačky. Aspirováno bylo 453 μl magnetických částic ze zásobního roztoku. 400 μl byl námi požadovaný objem částic a 53 μl byl zjištěný mrtvý objem hadičky a vícecestného ventilu.

Po tomto kroku bylo nutné částice promýt MES pufrem a to objemem 300 μl . Po aspiraci MES bylo zpuštěno míchání po dobu 15 s. Po řádném promíchání byla nastavena čekací doba 60 s potřebná k dostatečné sedimentaci částic. Následovalo vypouštění promývacího roztoku rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$.

Následovala aktivace částic pomocí sulfo-NHS a EDC. Obě látky byly rozpuštěny mimo systém LIS. 3,75 mg EDC bylo rozpuštěno ve 100 μl MES a 1,25 mg sulfo-NHS ve 300 μl MES. Poté byl celý objem EDC a 100 μl sulfo-NHS přeneseno do portu 1 nazývaného open interface, odkud byly nasáty do stříkačky. Po aspiraci aktivačních činidel portem 1 následovala 10 min inkubace za přerušovaného míchání. Při přerušovaném míchání dochází ke vznosu částic podobu 3 s a následuje 12 s pauza.

Po uplynutí doby inkubace, se odstranil roztok a částice byly opět promyty, tentokrát objemem 400 μl MES.

Následovalo přidání protilátky, která byla připravena odebráním 13,9 μl protilátky a rozpuštěné v 86,1 μl MES. Celý objem byl napipetován opět do portu 1, odkud byl aspirován do stříkačky. Poté byla provedena inkubace a to 10, 30 nebo 60 minut.

Po uplynutí doby inkubace byla odebrána vazebná frakce, která byla vypuštěna portem 7. Následně byly částice promyty a byla odebrána frakce promývací opět pomocí portu 7. Při tomto kroku LIS zobrazoval zprávy s požadavkem na novou zkumavku.

Posledním krokem bylo vypuštění vytvořeného imunisorbentu ven ze stříkačky. Vypuštění probíhalo pomocí aspirace 400 μ l PBS rychlostí 100 μ l/s a následného vypouštění za stálého míchání objemu stříkačky. Tento krok byl opakován celkem 5x, aby došlo k vyplavení veškerého imunisorbentu ven z LIS.

5.9 Polymerázová řetězcová reakce

Pro PCR byly použity částice Sera-Mag s anti-spike protilátkami (Ab) (1 mg/25 μ g Ab).

Vytvořený imunisorbent byl v rámci spolupráce s Univerzitou Pardubice otestován proškolenými pracovníky katedry biologických a biochemických věd fakulty chemicko-technologické.

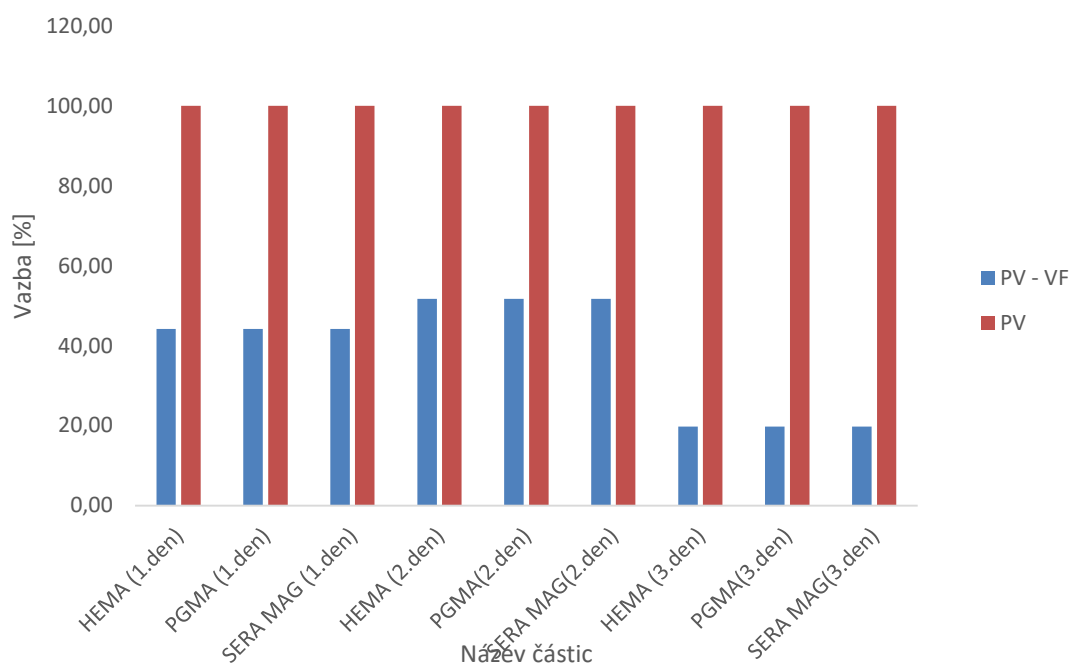
Bylo odebráno 2x 100 μ g imunisorbentu. Tento alikvot částic byl 3x promyt 1 ml PBS pufru o pH 7,4. Následně se k alikvotu přidalo 200 μ l vzorku pozitivního na SARS-CoV-2. Následovala inkubace, která trvala 5 a 10 minut za stálého manuálního míchání. Po uplynutí inkubace bylo odpipetováno transportní medium a částice byly opět 3x promyty 1 ml PBS pufru o pH 7,4.

Následovala lyze virových částic. K alikvotu bylo přidáno 200 μ l lyzačního činidla (komerční činidlo z kitu EliGene Viral DNA/RNA Isolation Kit, Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR). Poté byl alikvot řádně promíchán na vortexu. Následně byla provedena 10 min inkubace s opakovaným promícháváním na vortexu. Po uplynutí inkubační doby byl odebrán supernatant, jenž byl převeden do čistých zkumavek. K supernatantu bylo opět přidáno 200 μ l komerčního lyzačního činidla, čímž byl objem doplněn na 400 μ l. Celý tento objem byl následně přenesen na kolonku termocyklieru. Izolace virové RNA probíhala na kolonce z komerčního kitu (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR).

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Vazba protilátek na magnetické částice vsádkovou metodou

Při tomto experimentu bylo cílem naučit se manuální metodu imobilizace protilátek na magnetický nosič a zároveň poznat práci s magnetickými částicemi. Tři po sobě jdoucí dny byla zopakována vsádková vazba protilátky na tři různé magnetické nosiče – HEMA, PGMA a SeraMag pomocí magnetického separátoru, vortexu a rotátoru. Vazba probíhala vždy stejným postupem, viz podkapitola 4.6. Použity byly protilátky anti *Campylobacter jejuni* v množství 25 µg na jedny 1 mg magnetických částic. Vytvořené triplikáty byly dány na dotblotovou membránu a kolorimetricky analyzovány na přístroji ChemiDoc. Při analýze se zjišťovalo, jaká je schopnost vazby protilátek a jaká je kvantifikace a opakovatelnost metody. V různé dny byla různá úspěšnost vazby 20-60 %, což mohlo být způsobeno určitou nezkušeností s touto metodou. Na základě těchto výsledků bylo v následujících experimentech použito 12,54 µg Ab.



Obrázek 16 Graf výsledků vsádkové metody

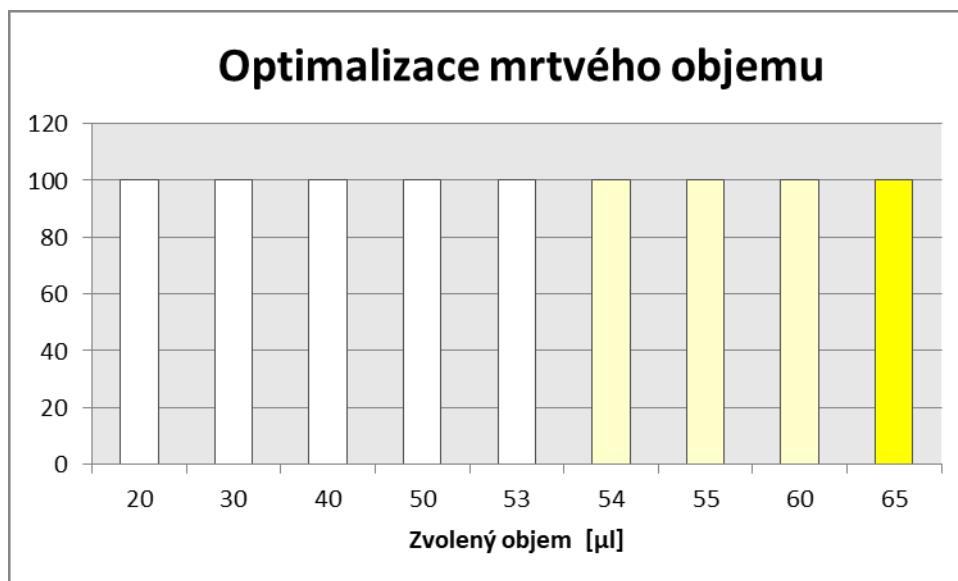
6.2 Optimalizace LIS

Před zahájením samotné vazby protilátek na magnetické nosiče v systému Lab-In-Syringe (dále jen LIS) bylo třeba optimalizovat řadu parametrů. Bylo třeba promyslet, jakým způsobem převést vsádkovou metodu do prostředí LIS, protože zde byla určitá úskalí například jak dostat částice a veškeré reagenty do LIS, kolik částic bude potřeba, jak velké budou případné ztráty při promývání částic a při inkubaci a jak zkrátit časovou potřebu inkubace.

Pro optimalizaci byl zprvu používán pouze PBS pufr a magnetické částice Sera-Mag. Optimalizace se týkala mrtvého objemu, především hadičky čerpající magnetické částice ze zásobního roztoku, chování částic uvnitř stříkačky, doby, během které se částice kvantitativně přitáhly k magnetu. Dále se optimalizovala rychlost průtoků – prvním byl průtok potřebný při promývání částic a druhým byl průtok potřebný pro vypouštění kapaliny ve stříkačce, aniž by se vyplavily částice. Dále byl optimalizován objem, který naopak pomáhal na konci metody dostat hotový imunosorbent ze stříkačky.

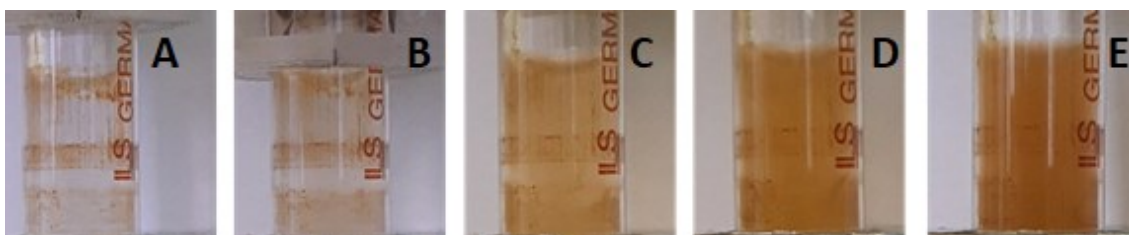
Pro možnost správného promytí a vymytí magnetických částic bylo třeba optimalizovat rychlost otáčení magnetického míchadla. Důležitá byla rychlost, která dostala částice do vznosu, ale nebyla tak rychlá, aby se částice navzájem poškodily. Posledními kroky optimalizace se stala doba inkubace magnetických částic s protilátkou a metoda přerušovaného míchání.

Při práci s magnetickým nosičem je třeba vždy přesně znát množství magnetického nosiče i imobilizovaného ligandu. Jejich vzájemný poměr je důležitý pro následující analýzy, aby byly dosažené výsledky reprodukovatelné. Je zapotřebí věnovat maximální pozornost při odběru částic, ať už vsádkovým způsobem či hadičkou z roztoku suspenze ve vznosu u LIS. Pokud by odběr nebyl standardizovaný, docházelo by k nereprodukovatelným výsledkům. Pokud se například zásobní suspenze částic nedostatečně rozmíchá a částice zůstanou přisedlé u dna, odebere se menší množství částic, než bylo v plánu, a naopak v zásobní roztok se zahušťuje každým odběrem, výsledky jsou pak nereprodukovatelné. Proto bylo prvním krokem optimalizace zjištění mrtvého objemu hadičky přivádějící magnetické částice ze zásobního roztoku, aby se zajistilo konstantní dávkování vzorku do stříkačky. Tímto parametrem je objem trubičky, případně i kanálků v hlavici vícecestného ventilu. Mrtvý objem jsme zjistili jednoduchým experimentem, kdy se do stříkačky aspirovalo 400 μl vody. Poté byly ze zásobního roztoku aspirovány rostoucí objemy fluoresceinu. Nejprve po desítkách μl , po překročení mrtvého objemu se zpětně upřesňovalo po jednotkách μl . Je známo, že již přídavek 1 μl stačí ke změně zbarvení vody ve stříkačce. Analýza mrtvého objemu byla tedy hodnocena okometricky. Výsledky přídavek fluoresceinu přes hadičku určenou pro magnetické částice je znázorněn graficky na Obr. 11. Objem 53 μl byl poslední objem zajišťující čirý roztok ve zkumavce, tedy byl identifikován jako mrtvý objem hlavice a trubičky. Při aspiraci částic, například 200 μl , bylo potřeba tento objem přičíst, abychom dosáhli aspirace požadovaného objemu částic.



Obrázek 17 Graf optimalizace mrtvého objemu

Další optimalizace se týkala rychlosti točení magnetického míchadla. Pokud míchadlo stojí, částice se k němu snaží magnetickými silami přitáhnout a zůstanou tam, dokud se míchadlo nezačne opět točit dostatečně velkou rychlostí, která odstředivou silou překoná magnetické síly a částice se neuvolní zpět do roztoku. Tento parametr je důležitý, protože v určitých krocích vazby protilátek na magnetické částice je potřeba mít částice ve vznosu. Správná rychlost nesmí být ani příliš vysoká, aby nedocházelo k mechanickému poškození magnetických částic, nesmí být ale ani příliš pomalá, aby došlo ke vznosu všech částic uvnitř stříkačky. Experiment byl proveden tak, že na magnetický prsten umístěný okolo stříkačky byl nalepen reflexní štítek a pomocí laserového tachometru byla změřena přesná rychlost otáčení míchadla. Byly testovány různé rychlosti v pracovním rozmezí magnetického míchadla od 400 do 1500 otáček za minutu (r.p.m) a obsah stříkačky byl vždy zaznamenán fotoaparátem. Na obrázku 12 je patrné, že s rostoucí rychlostí rostlo i množství částic ve vznosu. Od rychlosti 1500 výše se množství částic ve vznosu již neměnilo, bylo na maximální hodnotě, tedy po zhodnocení výsledků bylo rozhodnuto, že neoptimálnější rychlostí je 1500 r.p.m.



Obrázek 18 Optimalizace rychlosti otáčení magnetického míchadla A – fotografie před začátkem otáčení magnetického míchadla, B – rychlost otáčení 440 r.p.m, C – rychlost otáčení 750 r.p.m, D – rychlost otáčení 1100 r.p.m, E – rychlost otáčení 1500 r.p.m

Třetím krokem byla optimalizace různých průtoků a objemů. Optimalizace průtoků byla důležitá pro správné zvládnutí jednotlivých kroků vazby protilátek v LIS. Prvním optimalizovaným průtokem byl ten, který odváděl promývací roztok při promývání magnetických částic. Při tomto průtoku je důležité dbát na to, aby nedošlo k úniku částic. Při promývání jsou částice ve vznosu, pro vypuštění promývacího roztoku je důležité dát částicím dostatek času, aby sedimentovaly a byly přitaženy k magnetu. Při vsádkové metodě je využíván magnetický separátor pro promytí a okometricky je hodnocena správná doba na odsátí roztoku pomocí pipety. Při automatizovaném promývání se čas sedimentace experimentálně stanovil na 1 minutu, nicméně aby se předešlo ztrátám, byl průtok odtoku roztoku stanoven na co nejnižší hodnotu. Bylo třeba, aby odsávání roztoku netrvalo příliš dlouho a zároveň, aby nebylo příliš rychlé. Průtok pro vyprázdnění stříkačky nebylo možné optimalizovat pomocí spektrometrické analýzy, jelikož veškeré odebrané vzorky vykazovaly nulovou absorbanci. Zkoušeny byly průtoky o rychlosti 10 $\mu\text{l/s}$, 8 $\mu\text{l/s}$ a 5 $\mu\text{l/s}$. Jelikož časový rozdíl těchto průtoků nebyl příliš rozdílný, zvolil se jako optimální průtok ten, který zaručoval minimální ztráty magnetického nosiče ze systému LIS. Optimální rychlostí bylo tedy zvoleno 5 $\mu\text{l/s}$.

Dalším průtokem vyžadujícím optimalizaci byl průtok pro získání hotového imunisorbentu z LIS. V tomto kroku bylo důležité mít co největší průtokovou rychlost, aby částice neměly čas se přitáhnout k magnetickému minimíhadlu a dostaly se tak

účinně a v co největším množství ven. Tento průtok byl nazýván jako průtok pro získání imunosorbentu. Pomocí výpočtů směrodatných odchylek a výtěžnosti částic ze systému jsme dospěli k závěru, že optimální rychlost průtoku pro vytlačení magnetického nosiče ze stříkačky je 400 $\mu\text{l/s}$.

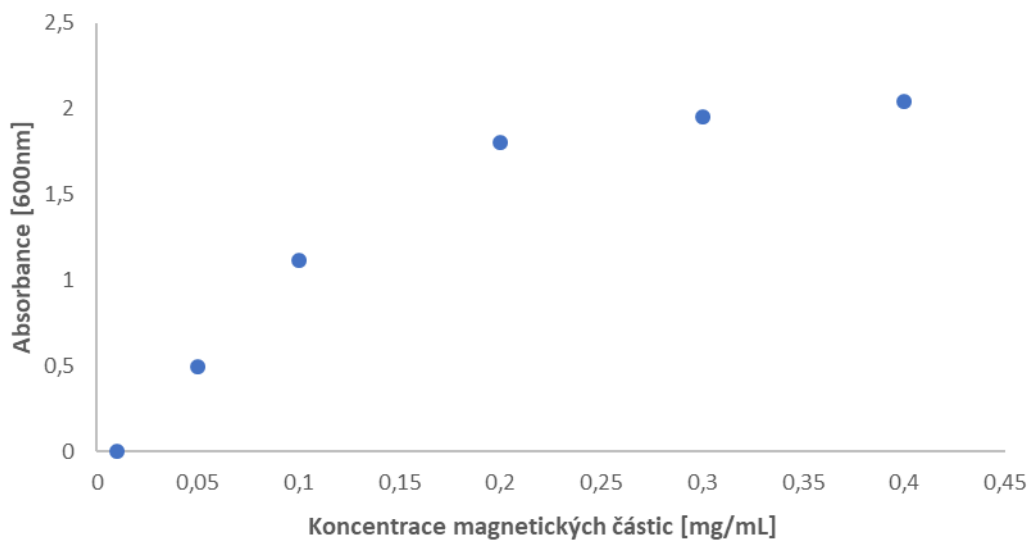
Tabulka 4 Výsledky absorbance při vypuzování magnetických částic z LIS pomocí průtoku vyprazdňujícího LIS

FLOWRATE ($\mu\text{l/s}$)	Absorbance (600 nm)			PRŮMĚR	VÝTĚŽNOST (%)
	1	2	3		
200	0,712	0,877	0,804	$0,798 \pm 0,058$	88,4
300	0,801	0,745	0,753	$0,766 \pm 0,021$	84,8
400	0,782	0,827	0,818	$0,812 \pm 0,017$	89,9

Současně byl optimalizován i objem vymývacího roztoku. Pro úspěšné získání imunosorbentu z LIS, byl tento krok ve vytvořeném programu opakován celkem 5x, aby došlo k jeho kvantitativnímu převedení do eppendorf zkumavky a zakonzervování imunosorbentu do další analýzy. Experimenty probíhaly tak, že byly měněny jednotlivé parametry a zachytával se vzorek roztoku/částic odvedený ze stříkačky, měřila se u něj absorbance a porovnávala se se vzorkem odebraným ze zásobního roztoku, který však neprošel LIS, a zjišťovali jsme případné ztráty částic v systému projevující se snížením absorbance vůči kontrole. Před analýzou vlastních vzorků bylo proměřeno celé absorpční spektrum ve vzorku magnetických částic o koncentraci 0,1 mg/ml. Absorpční maximum částic bylo zjištěno při 600 nm a hodnota absorbance byla 0,903. Z Tab. 4 je patrné, že nejlepších výsledků bylo dosaženo s objemem 400 μl .

Tabulka 5 Výsledky absorbance při vypuzování magnetických částic z LIS pomocí vymývacího objemu

Opakování	CleanVolume (μL)	Absorbance (600 nm)			Průměr	Výtěžnost (%)
		1	2	3		
A	300	0,780	0,788	0,799	$0,789 \pm 0,008$	87,4
B	400	0,793	0,782	0,803	$0,793 \pm 0,009$	87,8
C	500	0,742	0,78	0,754	$0,759 \pm 0,016$	84,1



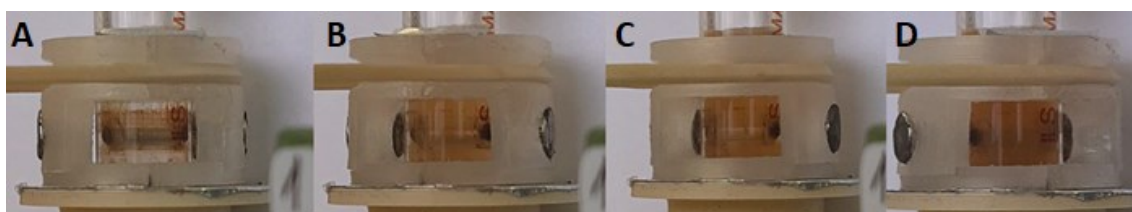
Obrázek 19 Kalibrační křivka závislosti koncentrace magnetických částic na vlnové délce



Obrázek 20 Kalibrační řada magnetických částic na magnetickém separátoru

Posledním krokem, který bylo zapotřebí vymyslet a zoptimalizovat, aby fungoval v prostředí LIS, byla náhrada 3h inkubace částic s protilátkou u vsádkového uspořádání, které probíhá za otáčení na rotátoru. V prostředí LIS jde o takzvané přerušované točení. Tato metoda v LIS nahradila rotátor používaný při vsádkové metodě

vazby protilátek na magnetické částice. V tomto kroku bylo nutné nastavit dobu točení magnetického míchadla a čas přerušení točení. Bylo nutné nastavit tento parametr tak, aby nedošlo k sebemenší sedimentaci částic a zároveň aby nebylo možné, že se míchadlo otáčelo kontinuálně po delší dobu. Při neustálém točení po delší dobu by mohlo docházet k poškození magnetických částic způsobené jejich vzájemným třením a narážením o sebe. Analýza vhodnosti časů byla prováděna opět okometricky.



Obrázek 21 Optimalizace přerušovaného točení, A – Fotografie před začátkem točení, B – Přerušované točení doba čekání + doba otáčení $\rightarrow 0\text{ s} + 15\text{ s}$, C – Přerušované točení doba čekání + doba otáčení $\rightarrow 1\text{ s} + 14\text{ s}$, D – Přerušované točení doba čekání + doba otáčení $\rightarrow 3\text{ s} + 12\text{ s}$

Po vizuálním porovnání snímků z této optimalizace byla zvolena za neoptimálnější kombinace časů pro přerušované točení 3 sekundy točení magnetického míchadla a 12 sekund čekání/klidu.

6.3 Program automatizované vazby IgG na magnetické částice v systému LIS

Při převodu vsádkové metody do LIS bylo potřeba naprogramovat jednotlivé kroky v programu FIALab. Tento program slouží k ovládání celé LIS. Na začátku byly nadefinované jednotlivé porty, aby pumpa přesně věděla, kde daný port je a pod jakým číslem. Dále bylo třeba nadefinovat do programu, kde se nachází jaký roztok, aby bylo jednoznačné, co se bude nasávat do stříkačky. Během programování se postupně zapisovaly jednotlivé kroky, které obsahovaly čísla portů pro nasátí a vypuštění, přesnou rychlost nasávání a objem. Dále se programovalo zapínání a vypínání míchání a zprávy pro operátora, aby například vložil novou zkumavku nebo dal hadičku do zásobního roztoku apod. Jednotlivé kroky v programu byly nejdříve vyzkoušeny s pufry,

než se přešlo na práci s částicemi, a to z důvodů vycytání všech drobných chyb. Následně i kompletní imobilizace byla spouštěna pouze s pufry, nikoliv s reagentiemi, drahými protilátkami a magnetickými částicemi. Po ověření funkcí jednotlivých komponent LIS a chodu celého procesu se přešlo k použití částic. Celý program byl následně několikrát spouštěn pouze s pufry a magnetickými částicemi, opět z důvodu ověření funkce programu. Těmito pokusy se předcházelo zbytečnému spotřebování drahých reagentů.

Program pro imobilizaci protilátek na magnetické částice začíná čištěním celého systému LIS, aby se předešlo kontaminaci z minulých experimentů.

```

' Empty Syringe
SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel if needed
If OptionCleanChannel = 1
' Aspirate Solution
SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If
' Clean Syringe
CleanVol = 300
CleanTimes = 2
CleanPos = 2

' This procedure is for cleaning the syringe pump with
a variable volume with a variable solution variable
times
Loop Start (#) CleanTimes
SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

If CleanPos = 2
SyringePump Command (?) O2R
End If
If CleanPos = 3
SyringePump Command (?) O3R
End If
If CleanPos = 4
SyringePump Command (?) O4R
End If
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) CleanVol
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J0R
Loop End

```

Dalším krokem bylo zajištění konstantního odběru částic ze zásobního roztoku. Zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml byl umístěn na minimíhadle a magnetické míchadlo uvádělo částice do vzhledu, čímž byla zajištěna homogenita roztoku odebíraných částic. Vyčištění hadičky pro přivádění magnetických částic, což je důležité pro aspiraci přesného objemu. Z experimentů je znám mrtvý objem kapaliny, než se dostane do stříkačky. Součtem s objemem požadovaného množství částic

můžeme dosáhnout robustního odběru částic, ovšem za předpokladu, že je prázdná přívodná hadička pro částice, jinak by byly resuspendovány v jiném objemu. Je proto třeba hadičku po úvodním čištění vyprázdnit pomocí vzduchu, který je nasát portem 12 a vypuštěn portem 4. Po tomto kroku došlo k vlastnímu nasátí požadovaného množství magnetických částic dovnitř stříkačky. Tímto postupem se nám podařilo robustním způsobem zajistit konstantní odběr části, který je u manuální vsádkové metody odkázán na zkušenosti a pečlivost operátora a je snadné zanést chybu. Při automatizovaném postupu jsou tato rizika minimalizována a lze tedy dosáhnout lepší opakovatelnosti.

```
' Cleaning tube for beads

' Aspirate Air
SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube
SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Dispense (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air
SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Get Beads
Message put tube into beads solution

' Aspiration of suspension
SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50
SyringePump Aspirate (microliter) 453
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec)
```

Promytí částic pomocí MES pufru mohlo být provedeno pouze 1x objemem 300 µl, místo 3x 1 ml u vsádkové metody. Tento krok byl při automatizaci urychlen a zkrácen. Byly zde použity parametry z optimalizace promývání částic, kdy se dbalo, aby částice neunikaly ze systému, ale kvantitativně se přitáhly k magnetu. Navíc, díky bublině ve špičce stříkačky dochází vždy k úplnému vypuštění kapaliny, tedy kapalina nezůstává ve víčku a na dně eppendorf zkumavky jako u vsádkové metody. To umožňuje v LIS snížení počtu opakování promývání a zcela uniformní časovou dotaci

na přitáhnutí částic k magnetu, protože je při tomto kroku opět vyloučen lidský faktor. U vsádkové metody je časová dotace určená pro kvantitativní přitažení částic k magnetu závislá opět na zkušenosti operátora.

```
' Wash Beads with MES - 3
SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 300
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet
SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60

' Empty syringe
SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1
```

Následovala aktivace částic pomocí sulfo-NHS a EDC. Při tomto kroku byl nutný zásah operátora, který musel rozpustit sulfo-NHS ve 300 μ l a EDC ve 100 μ l MES. Dále musel napipetovat 100 μ l sulfo-NHS i EDC do otevřeného portu 1, odkud byly aktivátory nasáty přímo do stříkačky. Aby program nepokračoval bez přidání těchto reagensů, byly zde vloženy zprávy upozorňující na nutnost přidání aktivátorů. Upozornění bylo třeba odsouhlasit, aby se program rozeběhl dál. Po aspiraci aktivátorů portem 1 byla zahájena 10 min inkubace.

```
Message EDC + SNHS to open port
interface
' Addition of reagent 1 - EDC + SNHS
SyringePump Command (?) O1R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 1
SyringePump Command (?) J0R

Message Buffer to open port interface
' Addition of reagent 2 - PBS
SyringePump Command (?) O1R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec)

' Incubation - Repeat = 4 * Minutes
Loop Start (40)
SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 3
SyringePump Command (?) J0R
Delay (sec) 12
Loop End
```


Po uplynutí doby inkubace byl roztok vypuštěn a částice byly 1x promyty stejně jako u vsádkové metody.

Následovalo přidání protilátky opět pomocí otevřeného portu 1. Poté byla provedena inkubace. Byly zkoušeny inkubace 1, 10, 30, 60 a 180 minut. Zde byla nutnost optimalizace míchání, jelikož při vsádkové metodě byly částice ve vznosu celé 3 hodiny, kdy se otáčely na rotátoru v eppendorf zkumavce. U LIS bylo třeba vymyslet jiný způsob, protože jinak by míchadlo ve stříkačce mechanicky poškodilo částice. Proto bylo zavedeno takzvané přerušované míchání, které spočívalo v míchání po dobu 3s a vypnutí na dobu 12s. Celý tento krok se opakoval tak dlouho, jak bylo potřeba pro inkubaci, tedy 36 opakování pro 10 minut, 108 pro 30 minut, 216 pro 1 hodinu a 720 pro 3 hodiny. Oproti vsádkové metodě je zde výhoda výrazného zkrácení doby inkubace, a to z cca 3 hodin na maximálně 1 hodinu.

```
' Aspirate Antibodies
SyringePump Command (?) O1R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 1
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate MES buffer
SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400
SyringePump Delay Until Done

' Incubation - Repeat = 30 minutes, 1 hour or 3 hours
Loop Start (1)
SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 3
SyringePump Command (?) J0R
Delay (sec) 12
Loop End
```

Po uplynutí doby inkubace byla odebrána vazebná frakce obsahující případně nevyvázané protilátky pro další analýzu. Následně byly částice promyty a byla odebrána frakce promývací (P). Při tomto kroku byla v LIS naprogramována zpráva se sdělením o vložení čisté eppendorfky a to v případě vazebné i promývací frakce. Po odsouhlasení operátorem program pokračuje.

```

' Empty syringe
Message new eppendorf
SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Wash Beads with MES - 3
SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet
SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60

' Empty syringe
Message new eppendorf
SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

```

Posledním krokem bylo kvantitativní převedení vyrobeného imunosorbentu do eppendorf zkumavky. Imunosorbent byl vyplaven v objemu 2 ml a poté ručně převeden na objem 1 ml. Skladován byl v PBS s přidavkem azidu sodného. Tento krok byl pečlivě optimalizován, aby nedocházelo jednak ke ztrátám imunosorbentu, akumulaci částic ve stříkačce a následné kontaminaci. K vyhodnocování bylo použito měření pomocí spektrofotometru ve viditelném spektru.

```

'Aspirate PBS
Loop Start (5)
SyringePump Command (?) O10R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400
SyringePump Delay Until Done

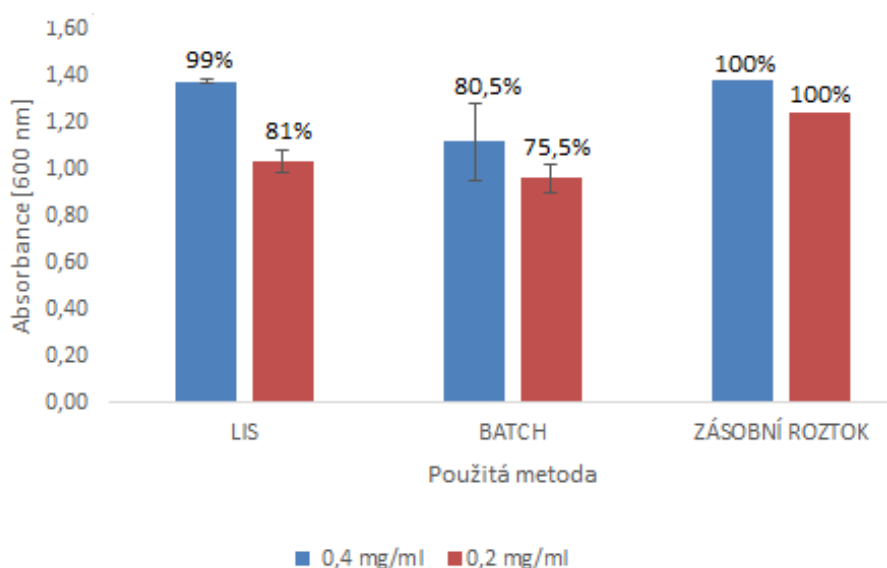
' Empty Syringe
SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 5
SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 400
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J0R
Loop End

```

6.4 Ověření funkčnosti programu LIS

Před samotným začátkem vazby protilátek na magnetické částice metodou LIS bylo nutné vyzkoušet, zda vytvořený program funguje, jak má, a kolik částic bude získáno zpět. Dále bylo nutné optimalizovat, s jakým množstvím částic se bude lépe pracovat. Poprvé byl program spuštěn celý pouze s pufrý bez přidání aktivátorů a protilátek. Program byl takto spuštěn celkem 3x. Během těchto opakování byly postupně vychytány drobné zádrhele a nedostatky, jako například počet opakování při získávání částic ven ze stříkačky, kdy byl zvýšen ze 3 na 5 nebo kdy spustit točení magnetického míchadla při kroku získávání částic ze stříkačky.

Poté bylo optimalizováno množství částic, se kterým se bude pracovat. S ohledem na pracovní rozmezí koncentrace částic při spektrofotometrii (600 nm) a také schopnosti magnetu udržet částice u sebe v LIS byly použity k otestování dvě množství částic – 0,2 a 0,4 mg. Paralelně byly v triplicátu provedeny obě metody na obou množstvích částic, vzorky byly proměřeny na spektrofotometru při 600 nm a výsledky byly porovnány s kontrolou zásobního roztoku částic, který neprošel žádnou z uvedených metod, byl pouze 3x vsádkově promyt.



Obrázek 22 Graf výsledků absorbance při práci s částicemi vsádkovou metodou a LIS s koncentrací částic 0,4 mg/ml a 0,2 mg/ml

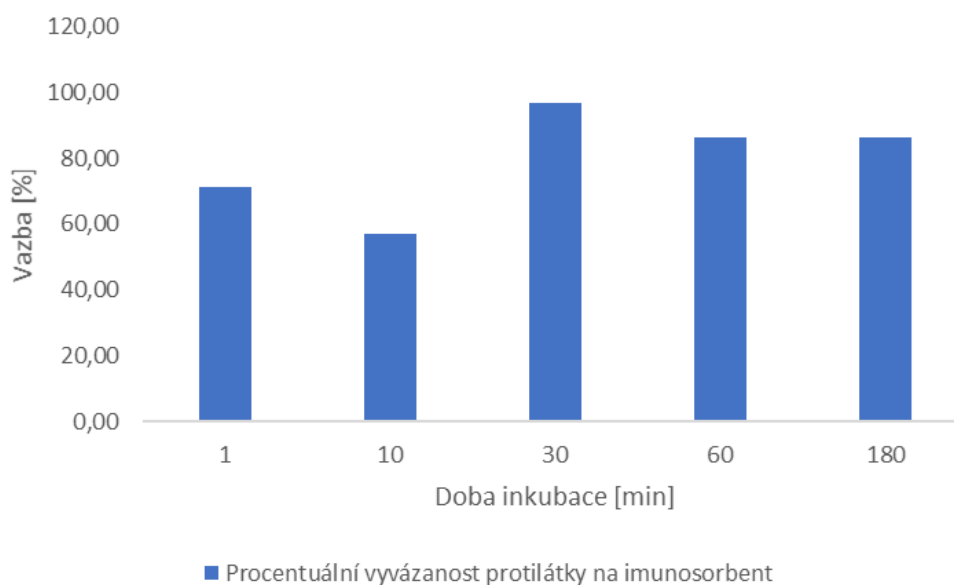
Závěrečným zjištěním tohoto experimentu bylo, že u obou metod dochází k určitým ztrátám částic, k jejich odmytí při jednotlivých krocích. Ovšem u každé metody a množství částic s rozdílnou intenzitou jak je vidět v tabulce 6. Při vsádkové metodě dochází k větším ztrátám částic, a to hlavně v důsledku řady kroků, které jsou závislé na zkušenosti, zručnosti a přesnosti operátora. Z výsledků bylo možné vyčíst, že i při použití LIS dochází k určitým ztrátám částic, avšak množství je menší, než je tomu při vsádkové metodě. Vzhledem k tomuto zjištění bylo rozhodnuto, že optimálnějším objemem částic pro tuto práci je 400 μ l, které odpovídají koncentraci 0,4 mg/ml.

Tabulka 6 Výsledky porovnávání LIS a vsádkové metody (BATCH) při dvou různých koncentracích magnetických částic

VZOREK	ABSORBANCE (600 nm)		Výtěžnost (%), c = 0,4 mg/ml	Výtěžnost (%), c = 0,2 mg/ml
	Koncentrace částic 0,4 mg/ml	Koncentrace částic 0,2 mg/ml		
LIS	1,38 \pm 0,010	1,03 \pm 0,050	99,0	81,2
BATCH	1,12 \pm 0,165	0,96 \pm 0,060	80,5	75,5
ZÁSOBNÍ ROZTOK	1,38	1,24	100	100

Poslední optimalizací, kterou bylo třeba udělat před zahájením vazby s anti-spike protilátkami, byla optimalizace doby inkubace. Při vsádkové metodě trvá inkubace 3 hodiny, což je poměrně dlouhá doba, a cílem této práce byla automatizace této metody a také zkrácení její časové náročnosti. Bylo zkoušeno celkem pět možných časů pro inkubaci protilátky s magnetickými částicemi. V tomto experimentu byla použita protilátkou anti apoE a to v množství 12,5 μ g, což odpovídalo objemu 13,89 μ l. Pro vazbu v LIS bylo použito 1,25 mg sulfo-NHS rozpuštěno ve 200 μ l MES a 3,75 mg rozpuštěno ve 100 μ l MES, následně bylo odebráno 100 μ l sulfo-NHS a přidáno k EDC.

Směs byla následně promíchána na vortexu a napipetována přes otevřený port do stříkačky. Testovala se různá délka inkubace, zkoušela se 1 minuta, 10 minut, 30 minut, 1 hodina a 3 hodiny (Obr. 23).

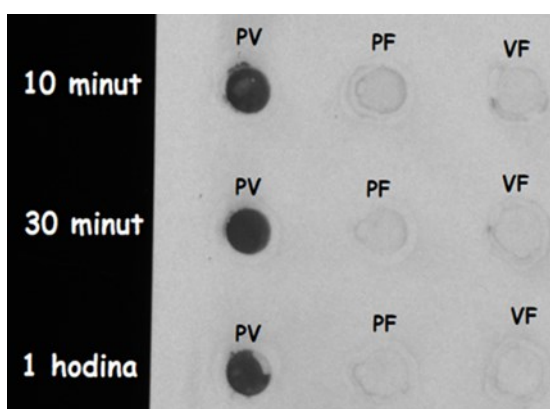


Obrázek 23 Výsledky optimalizace doby inkubace magnetických částic s anti – ApoE protilátkami

Hodnotilo se množství navázaných protilátek na magnetické nosiče. Výsledné roztoky z LIS se opět analyzovaly pomocí metody dotblot a membrána se detekovala kolorimetricky na přístroji ChemiDoc. Analyzoval se původní vzorek a ten se porovnával s promývací a vazebnou frakcí. Zjišťovalo se tedy, kolik protilátky v roztoku zbyde a zůstane nevyvázaných po uplynulé inkubaci. Z výsledku je patrné, že již po 1 minutě je vyvázána značná část protilátky, avšak pro další testování jsme zvolili časy 10 minut, 30 minut a 1 hodina. 3hodinová inkubace používaná ve vsádkovém uspořádání je nastavena schválně na dlouhý čas, protože se raději nechávají inkubovat déle, aby vazba proběhla do úplného konce. V systému LIS by v prostředí míchadla znamenalo, že částice by byly vystaveny nadměrnému mechanickému stresu, proto jsme čas inkubace optimalizovali s cílem tento stres co nejvíce zmírnit.

6.5 Imobilizace protilátek na magnetický nosič v LIS

Imobilizace anti – spike protilátek s magnetickými částicemi probíhala s inkubačními časy 10 minut, 30 minut a 1 hodina. Tato imobilizace probíhala v systému LIS. Bylo použito 12,5 µg protilátky, což odpovídalo 2,1 µl. Toto množství protilátek bylo imobilizováno na 0,4 mg magnetických částic, tedy 400 µl. Veškeré postupy prováděné systémem LIS byly naprogramované pomocí programu FIALab.

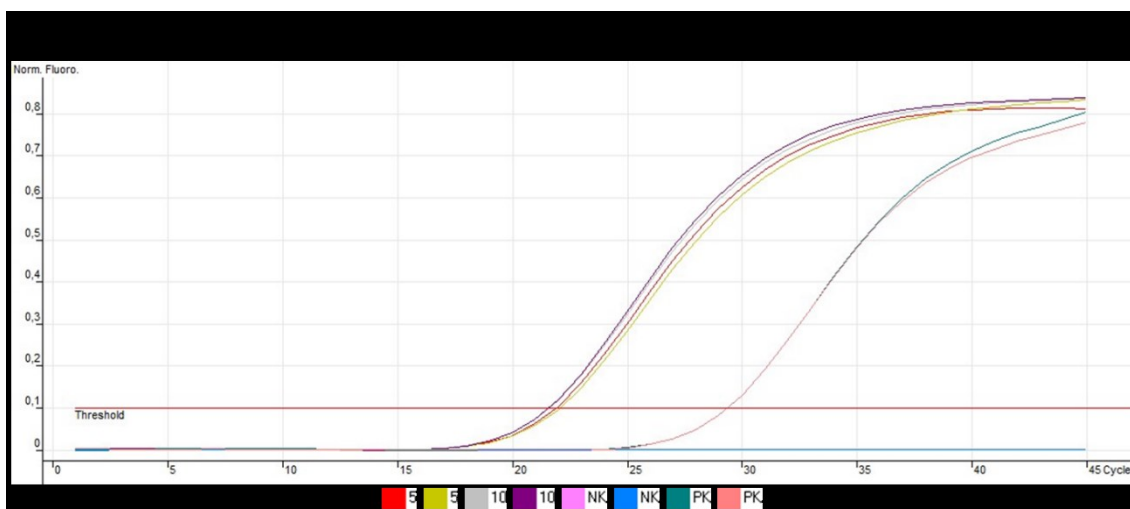


Obrázek 24 PVDF membrána z affiblotu vyfocena pomocí přístroje ChemiDoc

Z výsledků bylo zjištěno, že inkubace trvající 30 minut a 1 hodinu je zcela dostačující. Dle výsledků je patrné, že při těchto časech inkubace byla navázaná valná většina protilátek na magnetický nosič. Dle výsledků lze zvážit i využití inkubace po dobu 10 minut, nicméně tato doba inkubace vykazuje o něco málo nižší intenzitu ve výsledcích, což by mohlo znamenat, že se nevyvázalo tolik protilátek, jako při inkubaci 30 minut a 1 hodina (Obr. 24). U delších časů je větší jistota, že vazba protilátky proběhne kvantitativně.

6.6 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce byla zvolena jako konfirmační metoda pro ujištění, zda došlo k navázání protilátek na magnetický nosič. PCR byla prováděna ve specializované laboratoři se stupněm zajištění BSL3 na Katedře biologických a biochemických věd na FCHT Univerzity Pardubice. Pozitivní kontrola u této metody musí mít Ct (treshold cycle) do 35 cyklů dle laboratoře, nad 40 cyklů signál považován za nespecifickou vazbu a už se počítá jako negativní vzorek. Ideální Ct je mezi 20-30 cykly. Na Obr.24 je patrné, mezi inkubacemi s imunosorbentem 5 či 10 minut je minimální rozdíl a signál z Ct = 21 je téměř totožný s pozitivní kontrolou, která měla Ct 20,6. Pro izolaci viru ze vzorku stěru z nosu pomocí anti-COVID imunosorbentu stačí i 5 min inkubace. Zároveň se tím potvrdilo, že imunosorbent připravený v LIS specificky izoluje SARS-CoV-2 ze vzorku a jeho výsledky jsou srovnatelné s pozitivní kontrolou u komerčního kitu.



Obrázek 25 Výsledky analýzy z PCR, 5–5 minutová inkubace odebraných částic s navázanými anti – spike protilátkami a vzorku pozitivního na SARS – COV – 2, 10–10 minutová inkubace odebraných částic s navázanými anti – spike protilátkami a vzorku pozitivního na SARS – COV – 2, NK – Negativní kontrola, PK – Pozitivní kontrola

7. ZÁVĚR

Cílem experimentální části této diplomové práce byla automatizace ruční vsádkové metody imobilizace protilátky na magnetické částice. Zautomatizování bylo provedeno pomocí systému LIS. Před samotným začátkem práce s Lab-In-Syringe (LIS) bylo nutné dostat do ruky vsádkovou metodu a vyzkoušet si veškeré kroky pro řádné pochopení celé metody.

Vsádková metoda imobilizace protilátky na magnetické částice probíhala za pomoci magnetických separátorů a otočného rotátoru. Obsahovala kroky jako promytí částic, aktivaci povrchu částic, přidání protilátky, inkubace aktivovaných částic s protilátkou a nakonec analýzu vazebných a promývacích frakcí plus uskladnění imunosorbentu. V tomto kroku byly používány tři druhy částic – HEMA, PGMA a Sera-Mag. Testovalo se, se kterými částicemi se bude nejlépe pracovat a jak dobře na nich půjde provést samotná imobilizace protilátky. Při těchto počátečních experimentech byly využívány protilátky anti – campylobacter jejuni (kat. 3CJ2, HyTest, Turku, Finland). Analýza účinnosti imobilizace byla prováděna pomocí affiblotu, kde se jako sekundární protilátky využívaly polyklonální anti-myší IgG (kat. 12-349, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), výsledky byly poté kolorimetricky detekovány na přístroji ChemiDoc.

Během celého procesu automatizace imobilizace protilátek byly používány magnetické částice Sera-Mag (kat. 65152105050250, ThermoFisher scientific, Indianapolis, IN, USA).

Automatizace byla prováděna na Katedře analytické chemie, kde se nacházel systém Lab-In-Syringe (LIS). Při převodu vsádkové metody do LIS bylo potřeba naprogramovat jednotlivé kroky v programu FiaLab. Tento program slouží k ovládní celé LIS. V programu je nadefinováno, kde jsou které vstupy a výstupy pro kapaliny, jakou rychlostí má být který krok proveden, jaké použít objemy a průtoky, rychlost otáčení magnetu, včetně zpráv pro operátora, aby vložil reagentie či novou zkumavku pro jímání imunosorbentu apod.

Při převodu ruční metody do LIS byla provedena řada optimalizací a testů na funkci samotné pumpy, aby docházelo ke správnému promývání bez úniku většího množství částic, a také aby se vzniklý imunosorbent dostal všechen ven z injekční stříkačky po dokončení celého procesu imobilizace.

Při optimalizacích parametrů potřebných k vypuzení a promývání částic, byly výsledky hodnoceny pomocí spektrofotometrie ve viditelné oblasti v absorpčním maximu částic. Mezi optimalizované parametry patřil například mrtvý objem, který byl experimentálně stanoven na 53 μl . Dalšími parametry byly průtok pro vymývání vzniklého imunosorbentu, jenž byl stanoven na 400 $\mu\text{l/s}$, a objem, jehož zvolená hodnota byla 400 μl . U LIS bylo třeba vymyslet jiný způsob inkubace aktivovaných částic s protilátkami, protože jinak by míchadlo během 3 h kontinuálního míchání ve stříkačce mechanicky poškodilo částice. Proto bylo zavedeno takzvané přerušované míchání, které spočívalo v míchání po dobu 3 s a vypnutí na dobu 12 s. Celý tento krok se opakoval tak dlouho, jak bylo potřeba pro inkubaci, tedy 36 opakování pro 10 minut, 108 pro 30 minut, 216 pro 1 hodinu a 720 pro 3 hodiny.

Pro optimalizaci délky vazby a hodnocení úspěšnosti vazby protilátky na magnetické částice byly používány monoklonální myší anti-ApoE protilátky, až výsledný a ověřený protokol byl proveden s anti-spike Sars-CoV-2 protilátkami. Experimentálně byly zkoušeny různé inkubační doby a to 1, 10, 30, 60 a 180 minut. Nejlépe vyšla inkubace s časem 30 minut, kde úspěšnost vazby činila 96,65 %. Účinnost vazby při 1 min inkubaci činila 71,19 %, při 10 min 59,97 %, při 1h a 3 h 86,4 %. Pro imobilizaci anti-spike Sars-CoV-2 protilátky byly použity inkubace 10, 30 a 60 minut. Takto automatizovaně připravené anti-COVID 19 imunosorbenty byly následně otestovány v laboratoři se stupněm ochrany BSL 3 na Katedře biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice. Pomocí PCR proběhly srovnávací testy izolace viru pomocí imunosorbentu vytvořeného v systému LIS a komerčně vyráběného kitu z patientských vzorků. Výsledkem byla velká podobnost u obou metod. Mezi výsledky PCR byl pouze malý rozdíl (20,6 vs. 21 Ct), z čehož vyplývá, že námi vyrobený anti-COVID 19 imunosorbent je plně funkční a experimentálně byla ověřena jeho schopnost izolovat SARS-CoV-2 z patientských vzorků.

Jednou ze základních výhod metody imobilizace pomocí systému LIS je, že došlo k výraznému zkrácení doby celého procesu a to zhruba o 2 hodiny. Další výhodou je minimalizace lidského zásahu a tím snížení rizika zanesení většího počtu chyb, především ztráty magnetických částic. Při porovnání vsádkové metody a LIS, je patrné, že v LIS jsou všechny kroky stále stejné a časově konstantní. U vsádkové metody může docházet k prodlužování celého procesu imobilizace, například při čekání na sedimentaci částic, zatím co v LIS je naprogramovaná vždy jedna minuta. Dále u vsádkové metody hodně záleží na zručnosti operátora, což se v LIS eliminovalo. Díky tomu je imobilizace protilátek na magnetické částice pomocí systému LIS výborně reprodukovatelná. Nevětší výhodou je ovšem, že v LIS lze pracovat s daleko menšími objemy. Zatím co při vsádkové metodě je využíván 1 mg magnetických částic v LIS bylo využito pouze 0,4 mg.

8. SEZNAM ZKRATEK

3CL-PRO proteáza podobná chymotripsinu	HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie	Orf otevřený čtecí rámec
Ab protilátka	HR sedmičlenná repetice	PCR polymerázová řetězová reakce
ACE2 angiotenzin konvertující enzym 2	HV keramická hlava s dvanácticestným ventilem	PEEK polzetherketon
ARDS syndrom akutní dechové tísně	CH centrální šroubovice	PHB prohibitin
CD konektorová doména	IL interleukin	PL-PRO proteáza podobná papainu
CoV koronavirus	IRF interferon regulující faktor	POC point of care test
CT cytoplazmatický konec	ISG interferon podobný ubikvitinu	PTFE polytetrafluorethylen
CTD c-koncová doména	LIS Lab-In-Syringe	r.p.m otáčky za minutu
DDX ATP – dependentní RNA helikáza	LOV lab-on-valve	RBD receptor vázající doména
DLLME disperzivní liquid-liquid mikroextrakce	MERS middle east respiratory syndrom	RdRp RNA dependentní RNA polymeráza
ELFO elektrofozéza	MQ ultračistá voda	SARS sever acute respiratory syndrom
ELISA enzym linked immunosorbent assay	MS hmotnostní spektrometrie	SIA sekvenční injekční analýza
ERGIC Endoplasmatic reticulum – Golgi intermediate compartment	NeundoU nidovirový uridyl-specifická endoribonukleáza	SPIONS supramagnetic iron oxid nanoparticulans
FP fúzní peptid	NSPs nestrukturální proteiny	TM transmembránová doména
Hel helikáza	NTD n-koncová doména	TMPRSS transmembránová serinová proteáza

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura SARS-CoV-2	13
Obrázek 2	Spike protein SARS-CoV-2	15
Obrázek 3	Patogeneze SARS-CoV-2	19
Obrázek 4	Schéma testu na principu laterální imunochromatografie	23
Obrázek 5	Struktura magnetických nanočástic	27
Obrázek 6	Aparatura affiblotu	30
Obrázek 7	Systém LIS: Možnosti orientace stříkačky a aplikace	32
Obrázek 8	Promývání magnetických částic pomocí magnetického separátoru	36
Obrázek 9	Schéma aktivace karboxylových magnetických částic karbodiimidovou metodou	37
Obrázek 10	Schéma vzniku magnetického imunosorbentu	38
Obrázek 11	Lab-In-Syringe	40
Obrázek 12	Schéma systému LIS s popisem vícecestného ventilu	41
Obrázek 13	Detail vícecestného ventilu	42
Obrázek 14	Foto minimíhadla ve srovnání s jednokorunovou mincí	43
Obrázek 15	Detail míchacího systému	43
Obrázek 16	Graf výsledků vsádkové metody	47
Obrázek 17	Graf optimalizace mrtvého objemu	49
Obrázek 18	Optimalizace rychlosti otáčení magnetického míchadla	50
Obrázek 19	Kalibrační křivka závislosti koncentrace magnetických částic na vlnové délce	52
Obrázek 20	Kalibrační řada magnetických částic na magnetickém separátoru	52
Obrázek 21	Optimalizace přerušovaného točení	53
Obrázek 22	Graf výsledků absorpance při práci s částicemi vsádkovou metodou a LIS s koncentrací částic 0,4 mg/ml a 0,2 mg/ml	59
Obrázek 23	Výsledky optimalizace doby inkubace magnetických částic s anti – ApoE protilátkami	61
Obrázek 24	PVDF membrána z affiblotu vyfocena pomocí přístroje ChemiDoc	62
Obrázek 25	Výsledky analýzy z PCR	63

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Koronaviry přenosné na člověka .	10
Tabulka 2 Srovnání onemocnění SARS, MERS a COVID-19.	11
Tabulka 3 Varianty SARS-CoV-2 a jejich klinické příznaky	22
Tabulka 4 Výsledky absorpance při vypuzování magnetických částic z LIS pomocí průtoku vyprazdňujícího LIS.....	51
Tabulka 5 Výsledky absorpance při vypuzování magnetických částic z LIS pomocí vymývacího objemu	51
Tabulka 6 Výsledky porovnávání LIS a vsádkové metody (BATCH) při dvou různých koncentracích magnetických částic.....	60

11. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) SINGHAL, Tanu. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *The Indian Journal of Pediatrics* [online]. 2020, 87(4), 281-286 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0019-5456. Dostupné z: doi:10.1007/s12098-020-03263-6
- 2) Chilamakuri, R.; Agarwal, S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells* [online]. 2021, 10, 206. [cit. 2022-05-10]. <https://doi.org/10.3390/cells10020206>
- 3) Státní zdravotní ústa. Základní informace o onemocnění novým koronavirem – covid-19 (coronavirus disease 2019). 2021 [online]. [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Coronavirus/Zakladni_info/2020_08_07_Covid_19_zakladni_informace.pdf
- 4) Institut laboratorní medicíny, Lab In. Koronaviry přenosné na člověka. *Laboratorní listy* 2/2022
- 5) WANG, Y, Chen, Y, Qin, Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol.* 2020; 92: 568– 576. <https://doi.org/10.1002/jmv.25748>
- 6) HU, Ben, Hua GUO, Peng ZHOU a Zheng-Li SHI. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, 19(3), 141-154 [cit. 2022-04-10]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-00459-7
- 7) MALIK YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020 Apr;42(1):3-11. PMID: 32342926.
- 8) ARYA, Rimanshee, Shweta KUMARI, Bharati PANDEY, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2021, 433(2), 141-154 [cit. 2022-04-12]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2020.11.024

- 9) WANG, Mei-Yue, Rong ZHAO, Li-Juan GAO, et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, 10(2), 141-154 [cit. 2022-03-04]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2020.587269
- 10) ESMAEILI Gouvarchin Galeh, H., Karimi, M., Rezayat, P., Bolandian, M., Mirzaei Nodoushan, M., & Farzanehpour, M. (2020). The Possible Role of Novel Coronavirus 2019 Proteins in the Development of Drugs and Vaccines. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(2), 63-73. doi: 10.30491/jabr.2020.230039.1220
- 11) KADAM, Swapnil B., Geetika S. SUKHRAMANI, Pratibha BISHNOI, et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2021, 61(3), 180-202 [cit. 2022-06-12]. ISSN 0233-111X. Dostupné z: doi:10.1002/jobm.202000537
- 12) HARVEY, William T., Alessandro M. CARABELLI, Ben JACKSON, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, 19(7), 409-424 [cit. 2022-04-13]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-021-00573-0
- 13) XIA, Xuhua. Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses* [online]. 2021, 13(1) [cit. 2022-04-13]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v13010109
- 14) OU, Xiuyuan, Yan LIU, Xiaobo LEI, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications* [online]. 2020, 11(1) [cit. 2022-05-15]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-15562-9

- 15) LI F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*. 2005 Sep 16;309(5742):1864-8. doi: 10.1126/science.1116480. PMID: 16166518.
- 16) GORLA, Uma Sankar, GSN Koteswara RAO, Pratibha BISHNOI, et al. SARS-CoV-2: The Prominent Role of Non-structural Proteins (NSPs) in COVID-19. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* [online]. 2020, 54(3s), s381-s389 [cit. 2022-02-10]. ISSN 00195464. Dostupné z: doi:10.5530/ijper.54.3s.136
- 17) YOSHIMOTO, Francis K., GSN Koteswara RAO, Pratibha BISHNOI, et al. A Biochemical Perspective of the Nonstructural Proteins (NSPs) and the Spike Protein of SARS CoV-2: The Prominent Role of Non-structural Proteins (NSPS) in COVID-19. *The Protein Journal* [online]. 2021, 40(3), 260-295 [cit. 2022-02-05]. ISSN 1572-3887. Dostupné z: doi:10.1007/s10930-021-09967-8
- 18) GORKHALI, Ritesh, Prashanna KOIRALA, Sadikshya RIJAL, et al. Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins: The Prominent Role of Non-structural Proteins (NSPS) in COVID-19. *Bioinformatics and Biology Insights* [online]. 2021, 15(3), 260-295 [cit. 2022-04-20]. ISSN 1177-9322. Dostupné z: doi:10.1177/11779322211025876
- 19) RAJ, Resal, GSN Koteswara RAO, Pratibha BISHNOI, et al. Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing: The Prominent Role of Non-structural Proteins (NSPS) in COVID-19. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 2021, 25(3), 260-295 [cit. 2022-04-14]. ISSN 24055808. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrep.2020.100847

- 20) TROJÁNEK, M.; GREBENYUK, V.; HERRMANNOVÁ, K.; NEČAS, T.; GREGOROVÁ, J.; KUCBEL, M.; ŠÍN, R.; ROHÁČOVÁ, H.; STEJSKAL, F. Nový koronavirus (SARS-CoV-2) a onemocnění COVID-19. ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH [Online] 2020, 159, 2-55-66. [cit. 2022-04-10]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2020-2-6/novy-koronavirus-sars-cov-2-a-onemocneni-covid-19-122272>
- 21) BENEŠ, Jiří a Dana NOVÁKOVÁ. Pathogenesis of covid-19: principles of viral infection and immune response. Intervenční a akutní kardiologie [online]. 2021, 20(2), 73-77 [cit. 2022-04-13]. ISSN 1213807X. Dostupné z: doi:10.36290/kar.2021.023
- 22) CASCELLA M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Feb 5]. In: StatPearls [Online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
- 23) PRÜ, Birgit M. Variants of SARS CoV-2: mutations, transmissibility, virulence, drug resistance, and antibody/vaccine sensitivity. Frontiers in Bioscience-Landmark [online]. 2022, 27(2) [cit. 2022-04-13]. ISSN 2768-6701. Dostupné z: doi:10.31083/j.fbl2702065
- 24) Institut laboratorní medicíny, Lab In. Delta varianta koronaviru. Laboratorní listy 9/2021
- 25) CHOI, Jun Yong a Davey M. SMITH. SARS-CoV-2 Variants of Concern. Yonsei Medical Journal [online]. 2021, 62(11) [cit. 2022-04-13]. ISSN 0513-5796. Dostupné z: doi:10.3349/ymj.2021.62.11.961"
- 26) HE, Xuemei, Weiqi HONG, Xiangyu PAN, Guangwen LU a Xiawei WEI. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. MedComm [online]. 2021, 2(4), 838-845 [cit. 2022-04-13]. ISSN 2688-2663. Dostupné z: doi:10.1002/mco2.110

- 27) HARRISON, Andrew G., Tao LIN a Penghua WANG. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends in Immunology [online]. 2020, 41(12), 1100-1115 [cit. 2022-05-20]. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2020.10.004
- 28) PASCARELLA, Giuseppe, Alessandro STRUMIA, Chiara PILIEGO, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. Journal of Internal Medicine [online]. 2020, 288(2), 192-206 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0954-6820. Dostupné z: doi:10.1111/joim.13091
- 29) UMAKANTHAN S, SAHU P, RANADE AV, BUKELO MM, RAO JS, ABRAHAO Machado LF, DAHAL S, KUMAR H, Kv D. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Postgrad Med J [online]. 2020 Dec;96(1142):753-758. [cit. 2022-04-10] doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138234. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32563999
- 30) ORONSKY, Bryan, Christopher LARSON, Terese C. HAMMOND, et al. A Review of Persistent Post-COVID Syndrome (PPCS): a comprehensive review. Molecular Pharmaceutics [online]. 2021, 18(3), 754-771 [cit. 2022-04-10]. ISSN 1080-0549. Dostupné z: doi:10.1007/s12016-021-08848-3
- 31) Institut laboratorní medicíny, Lab In. Postcovidový syndrom. Laboratorní listy 6/2021
- 32) MALTEZOU, Helena C., Androula PAVLI a Athanasios TSAKRIS. Post-COVID Syndrome: An Insight on Its Pathogenesis. Vaccines [online]. 2021, 9(5) [cit. 2022-04-13]. ISSN 2076-393X. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines9050497

- 33) OLIVEIRA, Beatriz Araujo, Lea Campos de OLIVEIRA, Ester Cerdeira SABINO a Thelma Suely OKAY. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [online]. 2020, 62 [cit. 2022-03-23]. ISSN 1678-9946. Dostupné z: doi:10.1590/s1678-9946202062044
- 34) GÖSELOVÁ S., Blažková M., Holubová B., Karamonová L., a Rauch P., Imunodetekce v laterálním toku na membráně. *Chemické listy* 108 (2). 2014, 114-119. ISSN 0009-2770
- 35) Hangzhou Clongene Biotech Co., Ltd, Příbalový leták COVID-19 Antigen Rapid Test, 2020. Dostupné z: <https://www.specto-gmbh.de/wp-content/uploads/2020/11/Produktifo-Antigen-Schnelltest-Lungene.pdf>
- 36) PASSARGE, Eberhard. Barevný atlas genetiky. Ilustroval Jürgen WIRTH, přeložila Milada KOHOUTOVÁ. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-247-3099-8.
- 37) RAHBARI R, Moradi N, Abdi M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2021 May;516:1-7. doi: 10.1016/j.cca.2021.01.011. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33485902; PMCID: PMC7826022.
- 38) BACHMAN, J. (2013). Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). *Methods in Enzymology*, 67–74. doi:10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6
- 39) Státní ústav pro kontrolu léčiv. Databáze léků – Paxlovid. [online] [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0255450>
- 40) European Medicines Agency. Paxlovid (PF-07321332/ritonavirum). 2022 [online]. [cit. 2022-05-10] Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/paxlovid-epar-medicine-overview_cs.pdf

- 41) LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Paxlovid. [Updated 2022 Jan 31], [online] [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK577815/>
- 42) BARTOLI, Alessandra, Filippo GABRIELLI, Tatiana ALICANDRO, Fabio NASCIMBENI a Pietro ANDREONE. COVID-19 treatment options: a difficult journey between failed attempts and experimental drugs. *Internal and Emergency Medicine* [online]. 2021, 16(2), 281-308 [cit. 2022-04-13]. ISSN 1828-0447. Dostupné z: doi:10.1007/s11739-020-02569-9
- 43) UDDIN, Mohammed, Farah MUSTAFA, Tahir A. RIZVI, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses* [online]. 2020, 12(5) [cit. 2022-04-13]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v12050526
- 44) GARCÍA-LLEDÓ, Alberto, Javier GÓMEZ-PAVÓN, Juan GONZÁLEZ DEL CASTILLO, et al. Pharmacological treatment of COVID-19: an opinion paper. *Revista Española de Quimioterapia* [online]. 2022, 35(2), 115-130 [cit. 2022-04-13]. ISSN 02143429. Dostupné z: doi:10.37201/req/158.2021.
- 45) European Medicines Agency. Medicines – search vaccine. 2022 [online]. [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Human
- 46) LU, An-Hui, E. L. SALABAS, Ferdi SCHÜTH, et al. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2007, 46(8), 1222-1244 [cit. 2022-04-10]. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200602866

- 47) TADIC, Marin, Slavko KRALJ, Marko JAGODIC, et al. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Applied Surface Science* [online]. 2014, 322(8), 255-264 [cit. 2022-04-10]. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2014.09.181
- 48) PEČOVÁ, M.; ZAJONCOVÁ, L.; POLÁKOVÁ, K.; ČUDA, J.; ŠAFAŘÍKOVÁ, M.; ŠEBELA, M.; ŠAFAŘÍK, I. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy* [Online] 2011, 105/524-530. [cit. 2022-05-10].
- 49) KUČÍRKOVÁ, L., KRÁLOVEC, K., HAVELEK, R., BRŮČKOVÁ, L. a SEDLÁK, M. 2015. Toxicita magnetických nanočástic. *Chemické listy*. 109, 9 (zář. 2015), 693-700.
- 50) AVANCINI, T. G., Souza, M. T., de Oliveira, A. P. N., Arcaro, S., & Alves, A. K. (2018). Magnetic properties of magnetite-based nano-glass-ceramics obtained from a Fe-rich scale and borosilicate glass wastes. *Ceramics International*. doi:10.1016/j.ceramint.2018.11.111 10.1016/j.ceramint.2018.11.111
- 51) JAMSHAD, Talha, Ernandes Taveira Tenório NETO, Mohamed M. EISSA, et al. Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, 79(8), 344-362 [cit. 2022-04-10]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.10.022
- 52) POLÁKOVÁ, Kateřina. Magnetické nanočástice v medicíně. VÝZKUMNÉ CENTRUM NANOMATERIÁLŮ, Univerzita Palackého, Olomouc. Pokročilé vzdělávání ve výzkumu a aplikacích nanomateriálů [online]. 2012. Dostupné z: http://nanosystemy.upol.cz/upload/15/polakova_ls_ii_pdf.pdf

- 53) HERMANSON, Greg T. Bioconjugate techniques [online]. 3rd ed. London: Academic Press, 2013 [cit. 2022-08-03]. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/natl-ebooks/detail.action?docID=1323702>.
- 54) SVOBODOVA, Zuzana; Novotný, Jakub; Ospalkova, Barbora; Slovákova, Marcela; Bílková, Zuzana; Foret, Frantisek. (2021). Affiblot: A dotblot-based screening device for selection of reliable antibody. Analytical Methods. 13. 10.1039/D1AY00955A.
- 55) GIAKISIKLI, Georgia, Manuel MIRÓ, Aristidis ANTHEMIDIS, et al. Integrated Lab-in-Syringe Platform Incorporating a Membraneless Gas–Liquid Separator for Automatic Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. Analytical Chemistry [online]. 2013, 85(19), 8968-8972 [cit. 2022-04-10]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac402013j
- 56) HORSTKOTTE, Burkhard, Petr SOLICH, Aristidis ANTHEMIDIS, et al. The Automation Technique Lab-In-Syringe: A Practical Guide. Molecules [online]. 2020, 25(7), 8968-8972 [cit. 2022-04-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25071612
- 57) MAYA F, Horstkotte B, Estela JM, Cerdà V. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. Anal Bioanal Chem. 2012 Aug;404(3):909-17. doi: 10.1007/s00216-012-6159-4. Epub 2012 Jun 15. PMID: 22699237.
- 58) YILDRIM S, Cocovi-Solberg DJ, Uslu B, Solich P, Horstkotte B. Lab-In-Syringe automation of deep eutectic solvent-based direct immersion single drop microextraction coupled online to high-performance liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones. Talanta. 2022 Aug 15;246:123476. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123476. Epub 2022 Apr 13. PMID: 35461115.

- 59) FIKAROVÁ K, Horstkotte B, Machián D, Sklenářová H, Solich P. Lab-In-Syringe for automated double-stage sample preparation by coupling salting out liquid-liquid extraction with online solid-phase extraction and liquid chromatographic separation for sulfonamide antibiotics from urine. *Talanta*. 2021 Jan 1;221:121427. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121427. Epub 2020 Jul 23. PMID: 33076060.
- 60) HORSTKOTTE B, Lopez de Los Mozos Atochero N, Solich P. Lab-In-Syringe automation of stirring-assisted room-temperature headspace extraction coupled online to gas chromatography with flame ionization detection for determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in surface waters. *J Chromatogr A*. 2018 Jun 22;1555:1-9. doi: 10.1016/j.chroma.2018.04.055. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29705649.
- 61) GEMUH CV, Horstkotte B, Solich P. Lab-In-Syringe with Bead Injection Coupled Online to High-Performance Liquid Chromatography as Versatile Tool for Determination of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Surface Waters. *Molecules*. 2021 Sep 3;26(17):5358. doi: 10.3390/molecules26175358. PMID: 34500791; PMCID: PMC8433787.

12. PŘÍLOHY

1. ČISTĚNÍ SYSTÉMU SYRINGE

' This method replaces all solutions on head valve ports 2 - 4 and 6 - 8
' and then cleans the syringe with water

' Syringe head valve:
' Pos1: OpenSamplePort / Pos2: Water / Pos3: MES-Buffer / Pos4: Beads
' Pos5: Not used / Pos6: Detector / Pos7: Not used / Pos8: For aspiration of air
' Pos9: ? / Pos10: ? / Pos11: Waste + Air / Pos12: Not used

Variable Define New CleanVol
Variable Define New CleanTimes
Variable Define New CleanPos

Message put tubes into distilled water

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Command (?) O12R 'Air
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) O6R
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done

CleanVol = 300
CleanTimes = 3
CleanPos = 4

**Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_CleanSyringe
12PHV.fia**

2. ČIŠTĚNÍ STRÍKAČKY

' This procedure is for cleaning the syringe pump with
' a variable volume with a variable solution variable times

Loop Start (#) CleanTimes

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

If CleanPos = 2

SyringePump Command (?) O2R

End If

If CleanPos = 3

SyringePump Command (?) O3R

End If

If CleanPos = 4

SyringePump Command (?) O4R

End If

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) CleanVol
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J7R

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J0R

Loop End

3. NASÁVÁNÍ ČÁSTIC ZE ZÁSOBNÍHO ROZTOKU

Message put tube into beads solution

' **Aspiration of suspension**

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50
SyringePump Aspirate (microliter) 453
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

4. PROMÝVÁNÍ ČÁSTIC

' **Syringe head valve:**

' **Pos1: OpenSamplePort / Pos2: Water / Pos3: MES-Buffer / Pos4: Beads**
' **Pos5: Not used / Pos6: Detector / Pos7: Not used / Pos8: For aspiration of air**
' **Pos9: ? / Pos10: ? / Pos11: Waste + Air / Pos12: Not used**

Variable Define New VolBeads
Variable Define New VolBeadTube
Variable Define New VolBeadSuspension
Variable Define New CleanVol
Variable Define New CleanTimes
Variable Define New CleanPos

Variable Define New OptionCleanChannel
VolBeadTube = 82
VolBeads = 200
VolBeadSuspension = VolBeadTube + VolBeads
OptionCleanChannel = 0

' Empty Syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel if needed

If OptionCleanChannel = 1

' Aspirate Solution

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Clean Syringe

CleanVol = 300
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_CleanSyringe.fia

' Aspirate Air

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Get Beads

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_GetBeads.fia

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 200 'XXX
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX

SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O9R ' Not clear what is happening here and why

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx

SyringePump Empty

SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 1

CleanVol = 300 'xxx

CleanTimes = 4

CleanPos = 2

' Cleaning syringe - a variable volume with a variable solution variable times

Loop Start (#) CleanTimes

SyringePump Command (?) O8R

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200

SyringePump Aspirate (microliter) 150

SyringePump Delay Until Done

If CleanPos = 2

SyringePump Command (?) O2R

End If

If CleanPos = 3

SyringePump Command (?) O3R

End If

If CleanPos = 4

SyringePump Command (?) O4R

End If

SyringePump Command (?) J7R

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200

SyringePump Aspirate (microliter) CleanVol 'xxx

SyringePump Delay Until Done

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 400 'xxx

SyringePump Command (?) O7R

SyringePump Empty

SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J0R

Loop End

5. OPTIMALIZACE - 18.5.21

' Syringe head valve:

' Pos1: OpenSamplePort / Pos2: Water / Pos3: MES-Buffer / Pos4: Beads

' Pos5: Detector / Pos6: ? / Pos7: ? / Pos8: ? / Pos9: Waste + Air

Variable Define New VolBeads

Variable Define New VolBeadTube

Variable Define New VolBeadSuspension

Variable Define New CleanVol

Variable Define New CleanTimes

Variable Define New CleanPos

Variable Define New OptionCleanChannel

VolBeadTube = 82

VolBeads = 200

VolBeadSuspension = VolBeadTube + VolBeads

OptionCleanChannel = 0

' Empty Syringe

SyringePump Command (?) O9R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel if needed

If OptionCleanChannel = 1

' Aspirate Solution

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) O9R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Clean Syringe

CleanVol = 300
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_CleanSyringe.fia

' Aspirate Air

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Get Beads

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_GetBeads.fia

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'XXX
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O6R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

CleanVol = 300 'xxx
CleanTimes = 4
CleanPos = 2

' Cleaning syringe - a variable volume with a variable solution variable times

Loop Start (#) CleanTimes

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 150
SyringePump Delay Until Done

If CleanPos = 2

SyringePump Command (?) O2R

End If

If CleanPos = 3

SyringePump Command (?) O3R

End If

If CleanPos = 4

SyringePump Command (?) O4R

End If

SyringePump Command (?) J7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) CleanVol 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 400 'xxx
SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J0R

Loop End

6. AKTIVACE ČÁSTIC

Message EDC + SNHS to open port interface

' Addition of reagent 1 - EDC + SNHS

SyringePump Command (?) O1R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 1
SyringePump Command (?) J0R

Message Buffer to open port interface

' Addition of reagent 2 - PBS

SyringePump Command (?) O1R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100

SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' **Incubation - Repeat = 4 * Minutes**

Loop Start (40)

SyringePump Command (?) J7R

Delay (sec) 3

SyringePump Command (?) J0R

Delay (sec) 12

Loop End

7. ASPIRACE PROTILÁTEK

' **Aspirate Antibodies**

SyringePump Command (?) O1R

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100

SyringePump Aspirate (microliter) 200

SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) J7R

Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) J0R

8. MOBILIZACE PROTILÁTEK VERZE 1

' **Syringe head valve:**

' **Pos1: OpenSamplePort / Pos2: Water / Pos3: MES-Buffer / Pos4: Beads**

' **Pos5: Not used / Pos6: Detector / Pos7: Not used / Pos8: For aspiration of air**

' **Pos9: ? / Pos10: PBS - Buffer / Pos11: Waste + Air / Pos12: Not used**

Variable Define New VolBeads

Variable Define New VolBeadTube

Variable Define New VolBeadSuspension

Variable Define New CleanVol

Variable Define New CleanTimes

Variable Define New CleanPos

Variable Define New OptionCleanChannel

VolBeadTube = 82

VolBeads = 200

VolBeadSuspension = VolBeadTube + VolBeads

OptionCleanChannel = 0

' **Empty Syringe**

SyringePump Command (?) O11R

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200

SyringePump Empty

SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 1

' **Clean Channel if needed**

If OptionCleanChannel = 1

' Aspirate Solution

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Clean Syringe

CleanVol = 300
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_CleanSyringe
12PHV.fia

' Cleaning tube for beads

' Aspirate Air

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Dispense (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Get Beads

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_GetBeads 12PHV.fia

Loop Start (3)

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'XXX
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop End

' CleanVol = 400 'XXX
' CleanTimes = 4
' CleanPos = 2

' Activation of beads

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie
Krizova\P_BeadsActivationTwoSteps.fia

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O11R

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Message Antibodies to open port interface

' Addition of reagent - antibodies

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie
Krizova\P_BeadsActivationProgram.fia

' Aspirate MES buffer

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 300
SyringePump Delay Until Done

' Incubation - Repeat = 30 minutes, 1 hour or 3 hours

Loop Start (1)

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 3
SyringePump Command (?) J0R
Delay (sec) 12

Loop End

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

Message new eppendorf

SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

Message new eppendorf

SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop Start (2)

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop End

' Wash Beads with PBS - 10

SyringePump Command (?) O10R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty

SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirate PBS

Loop Start (5)

SyringePump Command (?) O10R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Command (?) J7R
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

' Empty Syringe

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 400
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J0R
Loop End

' Cleaning syringe - a variable volume with a variable solution variable times

Loop Start (#) CleanTimes

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\M_CleanSystem
12PHV.fia

Loop End

9. IMOBILIZACE PROTILÁTEK VERZE 2

' Syringe head valve:

' Pos1: OpenSamplePort / Pos2: Water / Pos3: MES-Buffer / Pos4: Beads
' Pos5: Not used / Pos6: Detector / Pos7: Not used / Pos8: For aspiration of air
' Pos9: ? / Pos10: PBS - Buffer / Pos11: Waste + Air / Pos12: Not used

Variable Define New VolBeads
Variable Define New VolBeadTube
Variable Define New VolBeadSuspension
Variable Define New CleanVol
Variable Define New CleanTimes
Variable Define New CleanPos
Variable Define New OptionCleanChannel

VolBeadTube = 82
VolBeads = 200
VolBeadSuspension = VolBeadTube + VolBeads
OptionCleanChannel = 0

' Empty Syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel if needed

If OptionCleanChannel = 1

' Aspirate Solution

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200
SyringePump Aspirate (microliter) 200
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Clean Syringe

CleanVol = 300
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_CleanSyringe
12PHV.fia

' Cleaning tube for beads

' Aspirate Air

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

SyringePump Command (?) O4R
SyringePump Dispense (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 100
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Get Beads

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\P_GetBeads 12PHV.fia

Loop Start (3)

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' **Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet**

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' **Empty syringe**

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop End

' CleanVol = 400 'XXX
' CleanTimes = 4
' CleanPos = 2

' **Activation of beads**

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie
Krizova\P_BeadsActivationTwoSteps.fia

' **Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet**

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60

' **Empty syringe**

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' **Wash Beads with MES - 3**

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' **Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet**

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' **Empty syringe**

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Message Antibodies to open port interface

' **Addition of reagent - antibodies**

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie
Krizova\P_BeadsActivationProgram.fia

' **Aspirate MES buffer**

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 300
SyringePump Delay Until Done

' **Incubation - Repeat = 30 minutes, 1 hour or 3 hours**

Loop Start (1)

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 3
SyringePump Command (?) J0R
Delay (sec) 12

Loop End

' **Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet**

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' **Empty syringe**

Message new eppendorf

SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

' **Wash Beads with MES - 3**

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' **Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet**

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX

SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

Message new eppendorf

SyringePump Command (?) O7R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop Start (2)

' Wash Beads with MES - 3

SyringePump Command (?) O3R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop End

' Wash Beads with PBS - 10

SyringePump Command (?) O10R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Command (?) J7R
Delay (sec) 15 'XXX
SyringePump Command (?) J0R

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

SyringePump Command (?) O12R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 50 'XXX
SyringePump Aspirate (microliter) 100 'XXX
SyringePump Delay Until Done

Delay (sec) 60 'XXX

' Empty syringe

SyringePump Command (?) O11R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 5 'xxx
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirate PBS

Loop Start (5)

SyringePump Command (?) O10R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Command (?) J7R
SyringePump Aspirate (microliter) 400 'xxx
SyringePump Delay Until Done

' Empty Syringe

SyringePump Command (?) O8R
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 400
SyringePump Empty
SyringePump Delay Until Done
SyringePump Command (?) J0R

Loop End

' Cleaning syringe - a variable volume with a variable solution variable times

Loop Start (#) CleanTimes

Insert File C:\Users\Obsluha\Documents\SIA3500 data\Lucie Krizova\M_CleanSystem
12PHV.fia

Loop