

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

DETEKCE SOLUBILNÍHO ENDOGLINU V LAB-IN-SYRINGE

Bc. Marie Iličová

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

Konzultanti: Dr. Habil. M.Sc. Burkhard Horstkotte; PharmDr. Katarína Tripská, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

„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 2023

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí práce Mgr. Zuzaně Svobodové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a za její trpělivost během konzultací. Dále bych také chtěla poděkovat mým konzultantům za veškerou pomoc a připomínky, které mi pomohly zpracovat tuto diplomovou práci.

ABSTRAKT

Hlavním úkolem diplomové práce bylo vyvinout automatizované metody pro izolaci endoglinu ze vzorku pomocí magnetického imunosorbentu v Lab-In-Syringe s následnou imunodetekcí na affiblotu.

Teoretická část se věnuje endoglinu v jeho membránové i solubilní formě, zejména jejich souvislostem s endotelovou dysfunkcí. Je zde také stručně popsán princip anti-endoglinové terapie pomocí monoklonální protilátky carotuximab neboli TRC105. Dále jsou v teoretické části shrnuty informace o technikách Lab-In-Syringe a affiblot. Poslední kapitola pojednává o biofunkcionalizaci magnetických částic pomocí protilátek za účelem přípravy magnetického imunosorbentu a jeho využití pro izolaci proteinu ze vzorku.

V experimentální části jsou nejprve popsány postupy pro otestování prototypů affiblotu. Hlavním cílem bylo vyvinout metodu pro přípravu anti-endoglinového magnetického imunosorbentu a zvýšit kapacitu metody jejím převedením z 1ml do 5ml stříkačky (upscaling). Dále byly vyvinuty metody pro izolaci solubilní formy lidského endoglinu z kultivačního média s obsahem léčiva TRC105, které interferuje s jeho imunodetekcí, opět pro 1ml a 5ml stříkačku. Byla provedena řada experimentů za účelem optimalizace metod v Lab-In-Syringe a na závěr byly metody vyzkoušeny se vzorky a výsledky se hodnotily na affiblotu.

Klíčová slova: endoglin, Lab-In-Syringe, magnetické částice, magnetické míchadlo, stříkačka, imunosorbent, affiblot, protilátka

ABSTRACT

The main target of the thesis was to develop an automated method for the isolation of endoglin from a sample using a magnetic immunosorbent in Lab-In-Syringe with subsequent immunodetection by affiblot.

The theoretical part deals with endoglin, in its membrane and soluble form, especially with their connection to endothelial dysfunction. The principles of anti-endoglin therapy using the monoclonal antibody carotuximab or TRC105 are also briefly described here. Furthermore, the theoretical part summarizes the basics of the automation in Lab-In-Syringe and of the affiblot technique, their principles, and their applications. The last chapter deals with the biofunctionalization of magnetic particles by antibodies in order to prepare a magnetic immunosorbent which is used for the isolation of proteins from a complex sample.

The experimental part describes methods for testing the affiblot prototypes. The main goal was to develop a method for the preparation of anti-endoglin magnetic immunosorbent and to increase the capacity of the method by upscaling it from a 1 ml to a 5 ml syringe. Furthermore, methods for the isolation of the soluble form of human endoglin from the culture medium containing the drug TRC105 were developed for 1 ml and 5 ml syringes. Various experiments were carried out to optimize the methods in Lab-In-Syringe and finally, the methods were tested with samples and the results were verified on affiblot.

Keywords: endoglin, Lab-In-Syringe, magnetic particles, magnetic stirrer, syringe, immunosorbent, affiblot, antibody

OBSAH

ÚVOD.....	9
ZADÁNÍ – CÍLE PRÁCE.....	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1. Endoglin	12
1.1. Membránová forma endoglinu	12
1.1.1. Struktura a izoformy membránového endoglinu	13
1.1.2. Buněčná signalizace membránového endoglinu	15
1.2. Solubilní forma endoglinu	16
1.3. Metody stanovení endoglinu	17
2. Endotel, endotelová dysfunkce a endoglin	18
2.1. Funkce endotelu a endotelová dysfunkce	18
2.2. Endoglin a endotelová dysfunkce	19
3. Lidské aortální endotelové buňky	22
4. Carotuximab – TRC105	22
5. Affiblot	24
6. Lab-In-Syringe	26
7. Magnetické částice	29
7.1. Vlastnosti a funkce magnetických částic.....	29
7.2. Syntéza a modifikace magnetických částic	30
7.3. Biofunkcionalizace magnetických částic	31

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
8. Seznam vybavení	34
9. Seznam reagensů.....	35
10. Příprava roztoků	36
11. Metodika – affiblot	38
11.1. Části affiblotu a sestavení aparatury.....	38
11.2. Testování prototypů affiblotu pomocí barviv	41
11.3. Detekce protilátek ve vzorku pomocí affiblotu.....	42
11.4. Detekce endoglinu ve vzorku pomocí affiblotu	43
12. Metodika – Lab-In-Syringe	44
12.1. Části Lab-In-Syringe a příprava systému	44
12.2. Příprava magnetického imunosorbentu a izolace endoglinu v Lab-In-Syringe...	49
13. Výsledky a diskuze	53
13.1. Testování prototypů affiblotu	56
13.1.1. Testování prototypů affiblotu pomocí barviv	56
13.1.2. Testování prototypu 3.3 metodou dot blot	57
13.2. Optimalizace Lab-In-Syringe s 1ml stříkačkou.....	60
13.2.1. Optimalizace otáček motoru.....	60
13.2.2. Optimalizace pro minimalizování ztrát částic a výběr prstence míchacího systému.....	61
13.2.3. Optimalizace objemu elučního pufru.....	63
13.3. Převod metod do Lab-In-Syringe s 5ml stříkačkou.....	64
13.3.1. Optimalizace otáček motoru.....	64
13.3.2. Optimalizace kvantitativního převodu magnetických částic z Lab-In-Syringe do zkumavky	65

13.3.3.	Výběr magnetického míchadla.....	66
13.3.4.	Optimalizace průtokové rychlosti vypouštění roztoku	68
13.3.5.	Test síly magnetu míchadla D	69
13.3.6.	Optimalizace objemu elučního pufu.....	70
13.4.	Příprava anti-endoglinového magnetického imunosorbentu	71
13.5.	Izolace rekombinantního endoglinu z PBS pufu	73
ZÁVĚR.....		76
SEZNAM ZKRATEK		79
SEZNAM OBRÁZKŮ.....		81
SEZNAM TABULEK.....		83
POUŽITÁ LITERATURA		84
PŘÍLOHY.....		90

ÚVOD

Endoglin (ENG) je transmembránový glykoprotein vyskytující se ve formě homodimeru, který zastává úlohu koreceptoru ligandů rodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β , Transforming growth factor β). ENG se exprimuje na cytoplazmatické membráně endotelových buněk cév a zapojuje se do regulace řady mechanismů souvisejících s funkcí endotelu a angiogenezí. Z ENG vázaného na cytoplazmatickou membránu může být odštěpena celá extracelulární část jeho struktury matricovými metaloproteázami (MMPs, Matrix metalloproteinases), čímž vzniká solubilní forma ENG (sENG, Soluble endoglin), která cirkuluje v krevním oběhu [1] [2] [3] [4].

Současný výzkum se zabývá souvislostmi ENG a jeho patofyziologickou úlohou u endotelových buněk a endotelové dysfunkce (ED). Dále u poruch, které s ED souvisejí, jako například ateroskleróza, diabetes mellitus typu II, hypercholesterolémie, arteriální hypertenze, hyperglykémie a řada dalších [4].

Pro studium ED se používají různé modelové systémy, u *in vitro* studií se jedná o buněčné linie, které se získávají izolací z různých cév. Buňky mohou být izolovány například z koronárních tepen, z pupečnickové žíly nebo z aorty. Vhodným modelem pro studium ED s aterosklerózou jsou lidské aortální endotelové buňky (HAEC, Human aortic endothelial cells), na nichž je exprimován ENG a další proteiny regulující funkce endotelu. Pomocí HAEC je možné studovat různé funkce ENG při jeho zapojení do mechanismů ED a aterosklerózy. Lze také studovat reakci endotelu na zvýšenou nebo sníženou expresi ENG či nové terapeutické přístupy zaměřené na inhibici ENG. Příkladem je monoklonální protilátka carotuximab neboli TRC105, jež má antiangiogenní účinky. Váže se na ENG, čímž se inhibují jeho signální kaskády v buňce [4] [5] [6] [7].

Důležité je současně s jeho membránovou formou sledovat i formu solubilní. Bylo zjištěno, že se hladina sENG v krvi mění u ED a u souvisejících poruch, a proto se zkoumá jeho role jako biomarkeru ED. sENG vzniká v podmínkách *in vitro* stejným mechanismem jako v organismu, a tím se sENG uvolňuje do buněčného kultivačního média. V kultivačním médiu je sENG stanovován a je hodnocena změna jeho hladiny, která odráží patologické děje vznikající vystavením *in vitro* systému různým podmínkám.

Stanovení sENG probíhá pomocí imunoanalytických metod, nejčastěji metodou ELISA [3] [4] [8] [9].

V případě, že probíhá testování účinků TRC105 na ENG a sENG *in vitro*, je sENG detekován a stanovován z buněčného kultivačního média, ve kterém je zároveň vysoká koncentrace TRC105. TRC105 se váže na sENG stejně jako na membránový ENG. Tato vazba způsobí zablokování vazebného místa pro protilátky, a proto TRC105 interferuje s imunoanalytickými metodami při analýze sENG. Je třeba vyvinout metodu, která by umožnila detekovat sENG a stanovit jeho nízké hladiny v buněčném kultivačním médiu pohybující se v jednotkách ng/ml, kde se současně vyskytuje interferující protilátka TRC105. Jednou z možností je selektivní zachycení sENG v buněčném kultivačním médiu pomocí anti-endoglinového (anti-ENG) magnetického imunosorbentu (IS), ze kterého je uvolněn do elučního roztoku. Tento postup umožňuje zakoncentrování a purifikaci sENG z komplexní směsi média s TRC105 a rozrušení vazby mezi sENG a TRC105. Poté je tedy možné detekovat sENG a stanovit jeho koncentraci pomocí imunoanalytické metody affiblot s citlivou chemiluminiscenční detekcí.

ZADÁNÍ – CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této diplomové práce je shrnout základní informace o ENG, které pojednávají o jeho struktuře a úloze v cévním endotelu. Dalším úkolem teoretické části je popis zařízení affiblotu a techniky Lab-In-Syringe, a dále shrnutí informací o magnetických částicích, ze kterých lze různými způsoby připravit magnetické IS sloužící k extrakci celé řady analytů.

Cílem experimentální části bylo zejména převést automatizaci přípravy magnetického IS z 1ml do 5ml Lab-In-Syringe systému, tedy zvýšit množství připraveného magnetického IS v jednom cyklu. Dále připravit metodu pro 1ml a 5ml LIS systém pro izolaci lidského sENG z kultivačního média a metody otestovat s reálnými vzorky. Do práce byly zahrnuty i výsledky testování tří prototypů zařízení affiblotu vyrobeného 3D tiskem pro výběr prototypu s nejvhodnějšími vlastnostmi pro imunodetekci sENG a protilátek.

TEORETICKÁ ČÁST

1. ENDOGLIN

1.1. MEMBRÁNOVÁ FORMA ENDOGLINU

Endoglin (ENG) byl poprvé identifikován A. Gougosem a M. Letartem původně na buněčné linii lidských prekurozorových buněk B-lymfocytů v roce 1988 [10]. K jeho detekci byla použita nepřímá imunofluorescenční metoda s využitím monoklonální protilátky 44G4 pocházející z imunizované myši BALB/c (albínská myš). Po identifikaci ENG bylo zjištěno, že dochází k jeho výrazné expresi na membráně endotelových buněk, kde sehraává významnou fyziologickou úlohu [11].

Jedná se o transmembránový glykoproteinový receptor o molekulové hmotnosti 180 kDa, jehož gen se u lidí nachází na 9. chromozomu. Jeho hlavní funkce spočívá v tom, že váže ligandy rodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β , Transforming growth factor β) a ovlivňuje jejich buněčné signalizační dráhy [1]. Zapojuje se do buněčných signalizací během vývoje a remodelace cév, především jako modulátor proliferace, migrace a adheze endotelových buněk. Tím je dána jeho nepostradatelná role v angiogenních procesech a je nezbytný pro správnou funkci cévního endotelu [2].

Dnes je jeho přítomnost známa také na jiných buňkách a tkáních – na hematopoetických kmenových buňkách, makrofázích, aktivovaných monocytech, T-lymfocytech, cholangiocytech, dále také na fibroblastech, na syncytiotrofoblastu placenty, na buňkách nádorových, mezangiálních, hladké svaloviny cév a buňkách hvězdicových v játrech [1] [12].

Za patologických podmínek může docházet ke změnám v expresi a funkci ENG. Tkáňová exprese ENG je velmi rozmanitá, proto ENG souvisí s celou řadou různých patologických procesů. Je známé autozomálně dominantní dědičné onemocnění způsobené mutacemi v genu pro ENG, nazývané hereditární hemoragická telangiektázie typ I. Vyznačuje se krvácivými projevy a může postihovat všechny orgány [13]. Dle výsledků vědeckých studií je známá souvislost ENG s metabolickým syndromem,

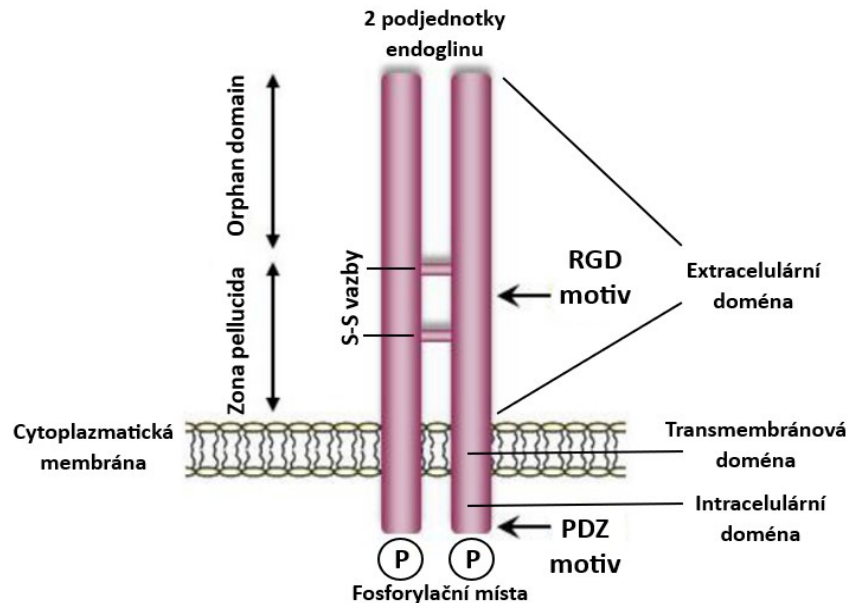
kde není úloha ENG zatím zcela objasněna. Metabolický syndrom se projevuje komplexem souvisejících symptomů včetně endotelové dysfunkce (ED), arteriální hypertenze, hyperglykémie, inzulinové rezistence, obezity a hypercholesterolémie. To jsou hlavní rizikové faktory pro závažná kardiovaskulární onemocnění, aterosklerózu, diabetes mellitus typu II a onemocnění jater [4]. ENG se také uplatňuje v patologických procesech při poruše hematopoézy [14] nebo vývoje srdce [15], fibróze různých orgánů [16] [17], zánětu [14] a preeklampsie [1]. Jelikož se ENG exprimuje i na nádorových buňkách a na nádorovém cévním endotelu, je ENG zkoumán také v souvislosti s různými nádory a nádorovou angiogenezí – nepostradatelným procesem při rozvoji nádorových metastáz [2] [18].

1.1.1. STRUKTURA A IZOFORMY MEMBRÁNOVÉHO ENDOGLINU

ENG je transmembránový homodimer složený ze dvou stejných podjednotek, které jsou spojeny disulfidickými vazbami (S–S vazby). Molekula ENG, která je zabudována do cytoplazmatické membrány, je rozdělena do třech částí/domén (Obrázek 1). Převážnou část molekuly zaujímá extracelulární doména, která je složena z osiřelé domény (Orphan domain) a z domény Zona pellucida. Tato část obsahuje vazebná místa pro ligandy rodiny TGF- β . Součástí Zona pellucida je RGD motiv – tripeptid arginin-glycin-asparagová kyselina (RGD, Arginyl-glycyl-aspartic acid), což je rozpoznávací a vazebné místo pro integriny leukocytů a jiné RGD receptory. Na extracelulární doméně se také nacházejí místa N-glykosylace a O-glykosylace, ENG je tedy z hlediska struktury glykoprotein [14] [18].

Extracelulární doména navazuje na hydrofobní transmembránovou doménu, a dále na menší část struktury ENG – intracelulární doménu, která je zodpovědná za funkci ENG v modulaci buněčné signalizace. Intracelulární doména postrádá enzymatickou aktivitu, ale je bohatá na aminokyseliny serin a threonin a na některých těchto aminokyselinách dochází k fosforylaci po vazbě s receptory rodiny TGF- β . Fosforylace způsobí konformační změnu ENG a reguluje tak jeho interakce s jinými proteiny [14] [18] [19]. Intracelulární doména dále obsahuje PDZ motiv – tetrapeptid serin-serin-metionin-alanin (PDZ, Post-synaptic density protein, Drosophila disc large

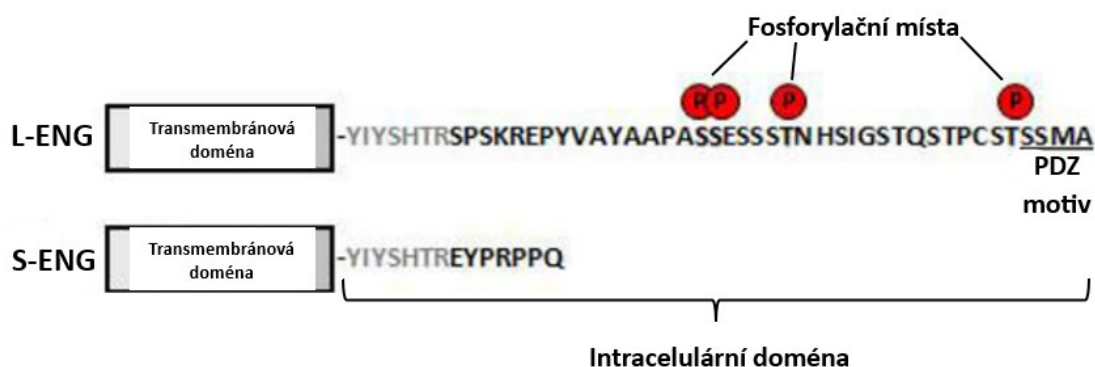
tumor suppressor, Zonula occludens-1 protein), což je pravděpodobně část důležitá pro regulaci fosforylace na serinu a threoninu [18]. Odstraněním tohoto motivu během laboratorních experimentů došlo k velmi zvýšené fosforylaci v této oblasti [20].



Obrázek 1. Struktura membránového ENG [18]

Jsou známy dvě alternativně sestřižené izoformy ENG (Obrázek 2), které se liší afinitou k receptorům, v délce intracelulární domény, úrovni fosforylace, zastoupením ve tkáních a funkcí. Isoforma, která je na buňkách nejvíce zastoupená, je dlouhý ENG (L-ENG, Long endoglin), jehož intracelulární doména obsahuje 47 aminokyselin. L-ENG je exprimován na většině již zmiňovaných buňkách a je známo, že stimuluje migraci endotelových buněk, proliferaci a angiogenezi. Minoritní izofomou je krátký ENG (S-ENG, Short endoglin) s intracelulární doménou o 14 aminokyselinách. Rozdíl v jeho funkci ve srovnání s L-ENG s největší pravděpodobností vyplývá z chybějících fosforylačních míst v intracelulární doméně a nepřítomnosti PDZ motivu. S-ENG je hojně exprimován na stárnoucích endotelových buňkách, plicních buňkách a jaterních buňkách. O S-ENG je známo zatím méně informací, ale pravděpodobně inhibuje proliferaci, migraci endotelových buněk a indukuje jejich stárnutí [1] [4] [14] [18].

Jelikož je L-ENG nejvýše zastoupenou izoformou a je významný svou patofyziologickou úlohou v organismu, budou veškeré následující informace o membránovém ENG pojednávat pouze o L-ENG s označením ENG.



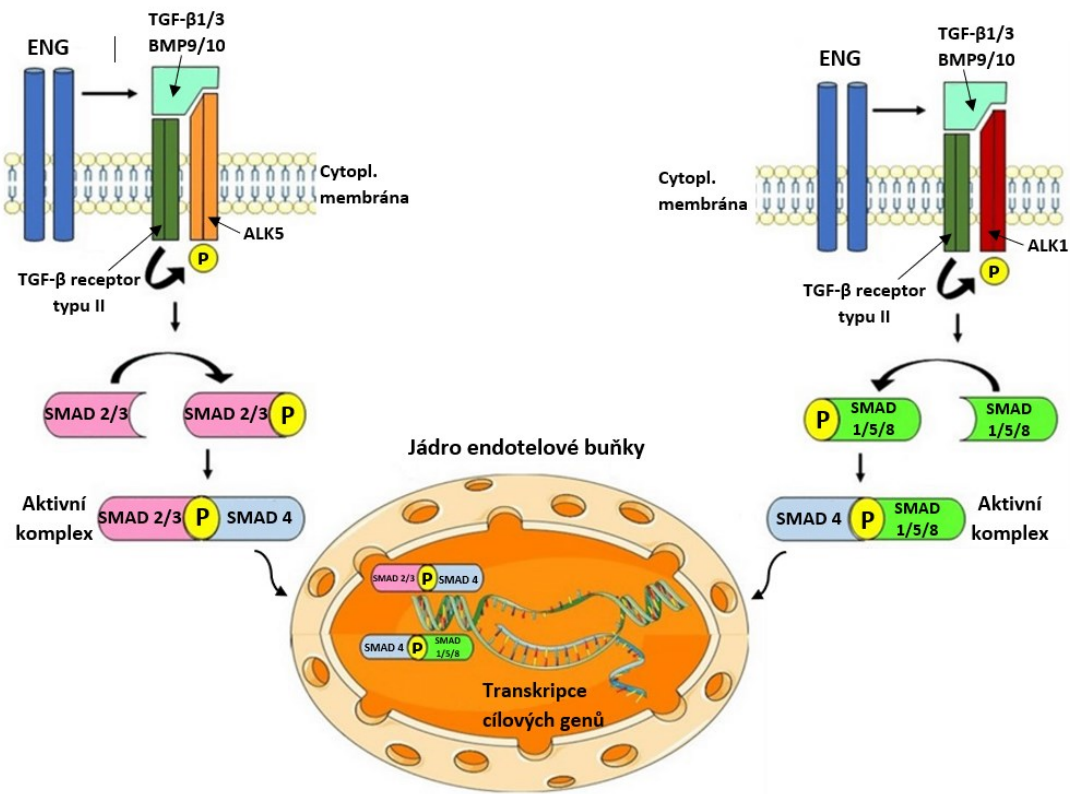
Obrázek 2. Izoformy membránového ENG – L-ENG a S-ENG [18]

1.1.2. BUNĚČNÁ SIGNALIZACE MEMBRÁNOVÉHO ENDOGLINU

Funkce ENG v TGF- β signalizaci je především pomocná a regulační. TGF- β rodina je skupina proteinů fungujících jako pleiotropní cytokiny. Regulují několik buněčných funkcí včetně proliferace, diferenciace, migrace, syntézy extracelulární matrix a hematopoézy, účastní se vaskulogeneze, hojení ran a angiogeneze. TGF- β rodina zahrnuje tři isoformy proteinů TGF – TGF- β 1, - β 2 a - β 3, ale také aktiviny, inhibiny, kostní morfogenetické proteiny (BMP, Bone morphogenetic protein) a růstové diferenciační faktory. Intracelulární signalizace pomocí TGF- β ligandů je zprostředkována serin/threonin kinázami, kam se řadí transmembránové receptory typu I – ALK1-ALK7 (ALK, Activin receptor-like kinase), receptory typu II a receptory typu III. Mezi receptory typu III se společně s betaglykanem řadí ENG [11] [21].

ENG interaguje s ligandy TGF- β rodiny pouze pokud je vázán s jinými receptory, váže se konkrétně s TGF- β receptory typu II a s ALK1 nebo ALK5. Tato vazba dále umožňuje vazbu ligandů, především BMP9, BMP10, TGF- β 1 nebo TGF- β 3. ENG ve spolupráci s receptory takto funguje jako koreceptor ligandů rodiny TGF- β . Po navázání ligandu se vytvoří heterotetramerní receptorový komplex, který vede k transfosforylaci ALK1/5 na serinových a threoninových zbytcích v intracelulární oblasti aktivním TGF- β receptorem typu II. ALK1/5 dále přenáší signál intracelulárním signálním molekulám SMAD (*Suppressor of mothers against decapentaplegic*), což jsou vlastně transkripční faktory. ENG reguluje signalizaci TGF- β tím, že váže různé receptory ALK a dochází tak k různým cestám přenosu intracelulárního signálu a spuštění transkripce

různých genů. Například určuje, zda jsou endotelové buňky aktivované nebo klidové (Obrázek 3)[4] [18] [21].



Obrázek 3. Signalizační dráhy ENG [1]

ENG je součástí dvou signalizačních drah. Pokud je ENG v komplexu s TGF- β receptorem typu II a ALK1, dochází k fosforylaci SMAD1/5/8. Fosforylovaný SMAD1/5/8 se dále váže se SMAD4 a vzniká aktivní komplex. Tento komplex se translokuje do jádra a indukuje transkripci genů souvisejících s aktivací endotelových buněk. Komplex ENG, TGF- β receptoru typu II a ALK5 naopak vede k fosforylaci SMAD2/3, který se dále váže se SMAD4, jenž je pro obě dráhy společný. Vzniklý aktivní komplex se translokuje do jádra a indukuje se transkripce genů zodpovědných za klidový fenotyp endotelových buněk [1] [4]

1.2. SOLUBILNÍ FORMA ENDOGLINU

Kromě membránové formy ENG se v organismu vyskytuje také solubilní forma ENG (sENG, Soluble endoglin), která vzniká štěpením celé extracelulární domény pomocí matricových metaloproteáz (MMPs, Matrix metalloproteinases) a dostává se do krevního oběhu nebo případně do buněčného kultivačního média [3]. MMPs jsou proteolytické enzymy, které zahrnují komplex 25 izoforem. Štěpí proteiny extracelulární matrix i proteiny mimo ni, kromě ENG to jsou například chemokiny, cytokiny nebo buněčné adhezí molekuly. Jejich hlavní funkcí je regulace signalizace během přestavby

matrix a zánětu, a rovněž regulace angiogeneze. sENG vzniká konkrétně štěpením MMP14 a MMP12 [3] [22].

sENG je asociován s patologickými procesy, kdy se mění jeho hladina v krvi. Proto může sENG sloužit jako krevní biomarker některých onemocnění, nebo také jako prognostický biomarker, protože byla zjištěna korelace mezi hladinou sENG v krvi a progresí symptomů. Například sENG byl prokázán jako včasný biomarker preeklampsie, hypertenzního onemocnění těhotných žen, které je často příčinou úmrtí plodu. Byla navíc zjištěna přímá souvislost mezi zvýšenou hladinou sENG a závažností symptomů preeklampsie [8].

sENG je také předmětem mnoha studií zaměřených na jeho asociaci s patologiemi endotelu. Cílem těchto studií je objasnit, jakým způsobem jeho hladina v krvi odráží tato onemocnění, nebo zda také přispívá samotné patogenezi [3] [4].

1.3. METODY STANOVENÍ ENDOGLINU

K vědeckým účelům jsou na trhu dostupné specifické anti-endoglinové (anti-ENG) protilátky proti ENG různého původu – lidského, myšího, prasečího či ENG z primátů, nebo také rekombinantnímu ENG. Používané protilátky mohou být monoklonální, polyklonální nebo rekombinantní. Anti-ENG protilátky lze v páru s detekčními značenými protilátkami využít u běžných imunoanalytických metod založených na afinitní reakci antigenu a protilátky. Páry protilátek slouží k detekci a stanovení jak membránového ENG, tak sENG, především u metod jako je western blot, průtoková cytometrie, imunohistochemie, imunocytochemie, imunoprecipitace, ELISA [9] [23], anebo affiblot (viz kapitola 5). Materiálem pro stanovení sENG je převážně krevní plazma, sérum nebo buněčné kultivační médium, ale sENG byl nalezen také v lidské moči a mozkomíšním moku [9]. Pro stanovení membránového ENG jsou vhodné vzorky různých tkání nebo buněčné kultury. Metody stanovení membránového ENG zahrnují kromě imunoanalytických metod také metody molekulární biologie, zejména real-time PCR pro hodnocení exprese ENG [7].

2. ENDOTEL, ENDOTELOVÁ DYSFUNKCE A ENDOGLIN

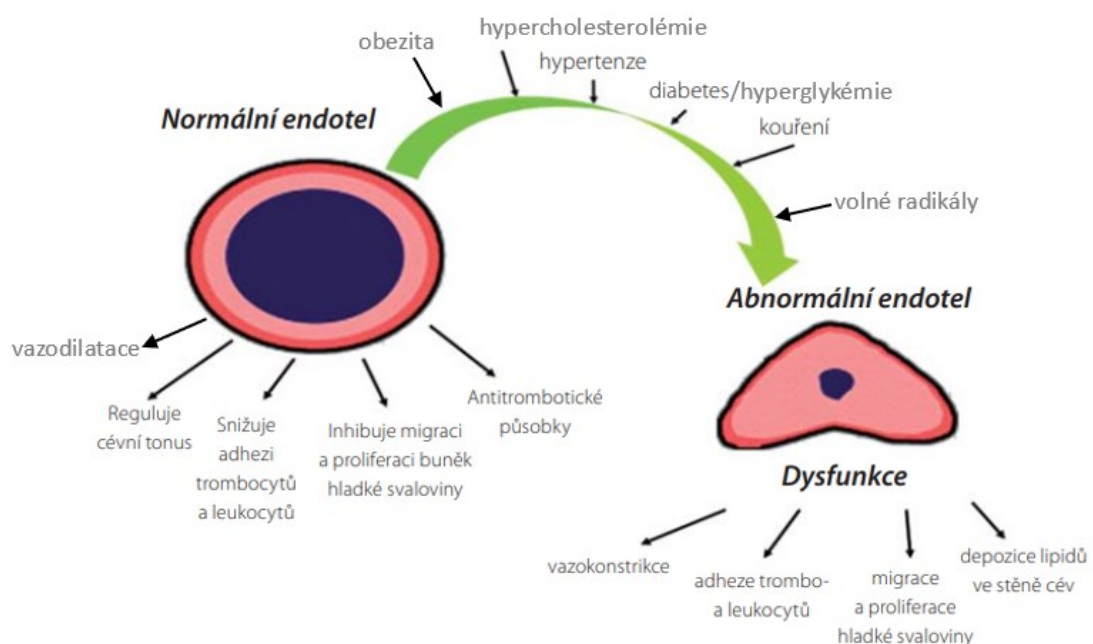
2.1. FUNKCE ENDOTELU A ENDOTELOVÁ DYSFUNKCE

Hlavní složku vnitřní vrstvy cév (*tunica intima*) tvoří endotelové buňky, které se podílejí na udržování homeostázy v organismu. V první řadě buňky vytváří endotel – mechanickou bariéru vystýlající celý vnitřní povrch cév. Endotel je zároveň metabolicky aktivní orgán s řadou funkcí. Svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a syntézou biologicky aktivních látek/mediátorů udržuje nesmáčivý a netrombogenní povrch, reguluje agregaci trombocytů, hemokoagulaci a fibrinolýzu či migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny. Podílí se dále na angiogenezi syntézou vaskulárního endotelového faktoru [24] [25] [26]. Syntézou vazodilatačních a vazokonstrikčních mediátorů reguluje cévní tonus. Na vazodilataci se podílí prostacyklin, hyperpolarizační faktor a zejména oxid dusnatý (NO) vznikající prostřednictvím enzymu endotelové NO-syntázy (eNOS). Naopak vazokonstrikci udržují například endotelin-1, tromboxan A2 nebo angiotensin II. V neposlední řadě se endotel podílí na regulaci permeability endotelu a na migraci a transmigraci leukocytů během zánětlivých reakcí. Prvním krokem před transmigrací leukocytů skrz endotelové buňky je jejich přilnutí na adhezivní molekuly exprimujících se na endotelových buňkách, k těmto molekulám se řadí selektiny, ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1), PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1) [25] [26] [27].

Za fyziologických podmínek je v endotelu přítomna rovnováha s převahou udržování vazodilatace, inhibice buněk hladké svaloviny, snížení adheze leukocytů a antitrombotické aktivity (Obrázek 4) [25].

K ED (Obrázek 4) může docházet kombinací různých rizikových faktorů jako je hypercholesterolémie, hypertenze, hyperglykémie, zvýšení volných radikálů nebo nezdravý životní styl. ED je charakterizována změnou rovnováhy s převahou vazokonstrikce, trombotické aktivity a syntézy mediátorů zodpovědných za zvýšenou aktivaci buněk hladké svaloviny [25]. Při ED dochází také k depozici lipidů v cévní stěně a k vysoké produkci prozánětlivých faktorů, což vede ke zvýšení exprese adhezivních

molekul pro leukocyty. Adhezivní molekuly jsou považovány za biomarkery probíhajícího zánětu v endotelu a jsou zásadní pro rozvoj ED [28]. Zvyšuje se také permeabilita endotelu pro leukocyty, a navíc také pro aterogenní lipidy jako je oxidovaný, acetylovaný nebo glykovaný LDL cholesterol [25] [26]. V případě dlouhodobého působení mohou tyto změny vyústit k ateroskleróze a dalším navazujícím závažným kardiovaskulárním komplikacím – infarktu myokardu, srdečnímu selhání a cévní mozkové příhodě. ED lze považovat za 1. stádium aterosklerózy, zároveň se ale dále podílí na její progresi a následných komplikacích [25] [27].



Obrázek 4. Přechod od zdravého endotelu k ED [25]

2.2. ENDOGLIN A ENDOTELOVÁ DYSFUNKCE

Některé rizikové faktory, které mají vliv na strukturální a funkční změny endotelu, mají také zároveň vliv na expresi membránového ENG (dále jen ENG) a hladiny sENG v krvi. ENG je exprimován v nízkých hladinách na klidových endotelových buňkách, ale u experimentálních zvířat a u lidí byla prokázána značně zvýšená exprese ENG v místech probíhající angiogeneze, v reakci na ischemii, a především v cévách postihnutých aterosklerózou a zánětem. Tato skutečnost naznačuje, že ENG se účastní aterosklerózy. Není zatím objasněno, jakým způsobem ENG a sENG odrážejí ED a následnou

aterosklerózu a zda se podílí na patogenezi, je však známo, že se u těchto onemocnění mění [29] [30].

O souvislostech ENG a sENG s ED a aterosklerózou pojednává mnoho *in vivo* a *in vitro* studií, výsledky jsou však mnohdy protichůdné. Rozdíly mohou být vysvětleny různými faktory, které je třeba také zohlednit a více objasnit. Například ENG může mít rozdílnou úlohu v malých cévách a ve velkých cévách jako je aorta. Dále může být rozdíl v tom, které experimentální podmínky byly vybrány během studií, například zda byl výzkumný model vystaven akutním nebo chronickým rizikovým faktorům [4].

Přítomnost ENG na endotelu může mít v první řadě důležitou roli v ochraně před ED a rozvojem aterosklerózy. ENG na endotelu je nezbytný pro fyziologickou vazodilataci zprostředkovanou NO, a také expresi a aktivitu eNOS. V několika studiích snížení exprese ENG mělo za následek snížení vazodilatačních funkcí cév [31] [32]. ENG možná také souvisí s mechanismy opravy poškozené cévní stěny, produkcí kolagenu a stabilizací aterosklerotických lézí [30]. Byla také zjištěna ochranná funkce ENG před poškozením bariérové funkce endotelu a udržováním permeability [33].

Ve studii zkoumající chronický účinek hypercholesterolemie jako rizikového faktoru na expresi ENG a na jeho souvislost s biomarkery ED byly analyzovány vzorky samic myší s deficitem apolipoproteinu E a LDL receptoru, jež se porovnávaly se vzorky myší „wild-type“. Byla zjištěna snížená exprese a signalizace ENG a zvýšená hladina sENG u myší s vyvolaným onemocněním. Dále byla detekována zvýšená hladina P-selektinu jako biomarkeru zánětu, porucha metabolismu NO a snížená funkce aorty. Autoři prokázali, že během chronické hypercholesterolemie se u myší snížila exprese a signalizace ENG provázená funkčními změnami aorty ještě před tvorbou aterosklerotických lézí. Při déle trvající ED se tedy snižovala exprese ENG, ale zvyšovala se hladina sENG v krvi [34].

V rámci zmiňované studie byly provedeny experimenty *in vitro* pomocí lidských aortálních endotelových buněk (HAEC, Human aortic endothelial cells), které byly vystaveny hladinám 7-ketocholesterolu, což je model pro navození akutní hypercholesterolemie oxidovaným LDL (rizikový faktor ED). Došlo naopak ke zvýšené expresi ENG prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů regulujících expresi ENG

a ke zvýšené adhezi a transmigraci leukocytů spolu se zvýšením hladin biomarkerů zánětu – adhezivních molekul E/P-selektiny a ICAM-1. Navíc, po inaktivaci genu pro ENG na HAEC buňkách došlo k inhibici adheze a transmigrace. ENG se může tedy podílet na adhezi a transmigraci leukocytů při akutní hypercholesterolémii [34].

Další studií potvrzující, že se ENG účastní zánětlivé reakce podporující rozvoj ED, je práce od autorů E. Rossi a kol., kde byla prokázána interakce leukocytárního integrinu s RGD motivem ENG na extracelulární doméně. ENG by mohl být pravděpodobně adhezivní molekulou pro leukocyty a přispívat tak k jejich transmigraci do subendotelového prostoru a rozvoji zánětu [35].

Co se týká sENG, zvýšení jeho hladiny je nejen biomarkerem již zmiňované preeklampsie, ale bylo zjištěno, že hladina je zvýšena také u ED, hypercholesterolémie, aterosklerózy, zánětu, hyperglykémie, diabetu mellitu II. Nebyla zatím prokázána žádná přímá souvislost, že by sENG byl příčinou vzniku a progresu ED a aterosklerózy, pokud se sENG nevyskytuje s dalšími rizikovými faktory, zejména s hypercholesterolémií nebo se stárnutím. sENG by mohl přispívat rozvoji již probíhající ED a aterosklerózy [3] [4].

Na druhou stranu ve studii od Rossi a kol. se prokázala protizánětlivá funkce sENG, tedy ochranná před ED a aterosklerózou. Jelikož sENG tvoří celá extracelulární doména ENG, obsahuje také RGD motiv, na který se vážou integriny leukocytu. Pokud sENG vyvazuje leukocyty, může tak zabraňovat jejich adhezi na poškozeném endotelu a transmigraci a fungovat protizánětlivě [35].

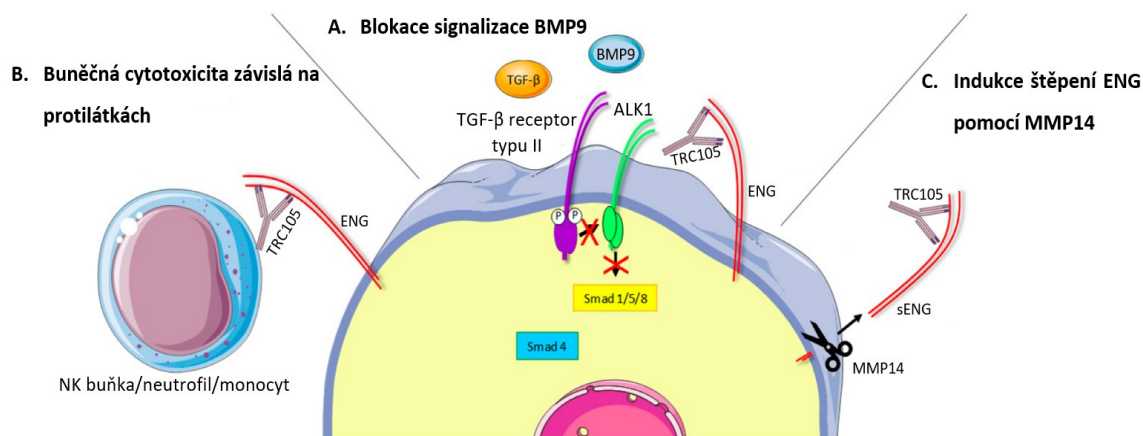
3. LIDSKÉ AORTÁLNÍ ENDOTELOVÉ BUŇKY

HAEC vystylají lumen aorty, největší tepny v lidském těle a produkují různé biologicky aktivní látky jako jsou trombotické a antitrombotické faktory, NO či endotelin. V reakci na zánět reagují expresí adhezivních molekul a v reakci na vysoké hladiny glukózy reagují sníženou proliferací. Na svém povrchu exprimují receptory pro acetylovaný LDL cholesterol a povrchový znak CD31. Tyto vlastnosti umožňují využití kultur HAEC při studiu mechanismů i při vývoji léčby u onemocnění jako je ED, ateroskleróza, trombóza, diabetes a hypertenze. Velkou výhodou HAEC jako výzkumného modelu je dlouhodobá proliferace, kdy si buňky zachovávají své vlastnosti *in vitro* po mnoho generací (například až třicet pasáží). Pro účely výzkumu jsou izolovány od dárců z hrudní a sestupné aorty a prodávány jako kryokonzervované ampule obsahující buňky primární nebo pasážované [5] [6] [36].

4. CAROTUXIMAB – TRC105

Carotuximab neboli TRC105 je chimérická monoklonální IgG1 protilátka s molekulovou hmotností přibližně 148 kDa. Skládá se ze dvou lehkých řetězců o 213 aminokyselinách a dvou těžkých řetězců o 448 aminokyselinách. S vysokou afinitou se váže na ENG, neutralizuje ho a blokuje jeho funkci a signalizaci, dále také vyvolává buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách a apoptózu buněk, na kterých je ENG exprimován [37] [38].

TRC105 byl vyvinut za účelem výzkumu jeho účinku v terapii nádorových onemocněních, jelikož je ENG exprimován jak na nádorových buňkách, tak na endotelových buňkách cév tvořených nádory. Exprese ENG je vyšší u proliferujících endotelových buněk, je proto také využíván jako biomarker nádorové angiogeneze. TRC105 se řadí do skupiny antiangiogenní nádorové terapie [37] [39]. Jsou navrženy některé mechanismy účinku této terapie (Obrázek 5).



Obrázek 5. Navrhované mechanismy účinku TRC105 [40]

A: Blokace signalizace ligandu BMP9, který je součástí signální dráhy fosforylovaného receptoru ALK1 a následně SMAD1/5/8. Tato dráha vede k aktivaci endotelových buněk stimulujících se k diferenciaci a angiogenezi. Vazbou TRC105 na ENG se obsadí vazebné místo pro BMP9, dojde k inhibici nádorové angiogeneze a tím zabránění růstu nádoru a jeho šíření ve formě metastáz. B: Vazba TRC105 na ENG a následná indukce buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách zprostředkované NK buňkami, neutrofily a monocyty, což vede k apoptóze cílových buněk. C: Vazba TRC105 na ENG a následná indukce štěpení extracelulární části pomocí MMP14 a uvolnění sENG [40] [41]

Výše uvedené mechanismy účinku TRC105 pojednávají o protinádorové anti-ENG terapii, ale teoreticky by se mohly také uplatnit v terapii ED a u souvisejících poruch. V této souvislosti byla provedena studie zabývající se potenciálním terapeutickým účinkem TRC105 na rozvoj ED. Ve studii byly použity HAEC, které byly vystaveny vysokým hladinám 7-ketocholesterolu anebo glukózy v kombinaci s terapeutickými koncentracemi TRC105. Působením TRC105 byla zjištěna významná inhibice exprese ENG na HAEC, byla inhibována buněčná signalizace ENG snížením hladin proteinů SMAD a byla rovněž inhibována adheze a transmigrace leukocytů. Výsledky studie celkově naznačují potenciálně terapeutické účinky TRC105 na ED, která je indukována hypercholesterolemií a hyperglykemií, ale v této oblasti je za potřebí provést více studií [7].

5. AFFIBLOT

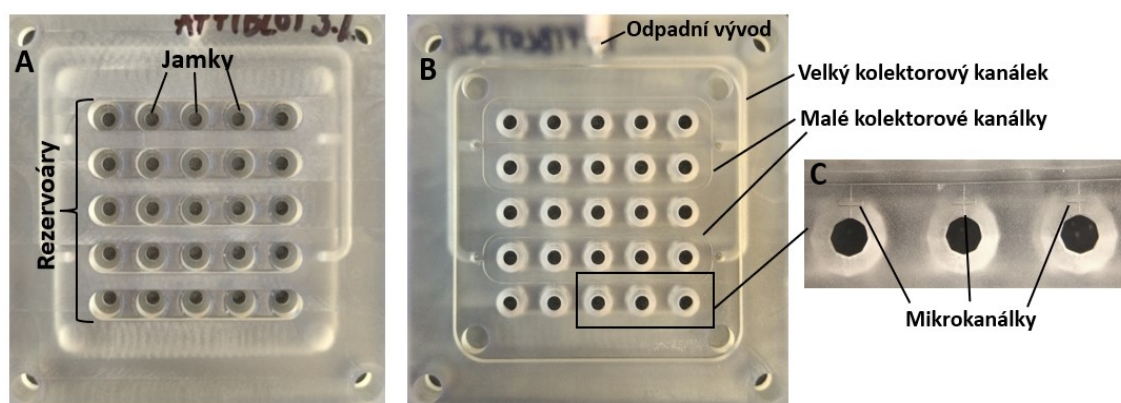
Affiblot je patentově chráněné zařízení, které vychází z metody dot blot. Analýza obou metod je založena na principu imunoanalytické reakce, tedy na vzniku imunokomplexu antigen-protilátka a jeho následné detekci. Affiblot má však ve svém uspořádání oproti dot blotu některá vylepšení a z toho plyne jeho širší možné využití [42].

Affiblot slouží v první řadě ke kvalitativní, semikvantitativní i kvantitativní analýze různých proteinových antigenů solubilní či korpuskulární povahy. Analyzovaný antigen je v prvním kroku pomocí vakua aplikován na blotovací membránu, na kterou je pevně navázán. V druhém kroku následuje blokace vazebných míst na membráně pro zabránění vzniku nespecifických interakcí. Membrána je následně inkubována s primární protilátkou, která se specificky váže na antigen a vzniká komplex antigen-protilátka, a nakonec se membrána inkubuje se sekundární protilátkou. Sekundární protilátka se specificky váže na primární protilátku a je konjugována s indikátorem. Podle typu indikátoru se celý „sendvič“ detekuje kolorimetricky, spektrofotometricky, chemiluminiscenčně nebo fluorescenčně. Celý postup analýzy obsahuje také promývací kroky pro odstranění nenasazených molekul [42] [43].

Affiblot je vhodné zařízení zejména pro screening vlastností zakoupených protilátek, které mnohdy nesplňují požadované parametry týkající se specifity. Na tomto zařízení lze snadno a rychle otestovat specifitu k cílovému antigenu, možnou zkříženou reaktivitu a afinitu/aviditu protilátek. Pomocí affiblotu lze testovat až pět protilátek současně. Tuto výhodu zajišťuje vrchní část affiblotu, což je speciálně navržené víko, které obsahuje na horní straně 25 jamek pro reagenty uspořádaných do pěti oddělených rezervoárů. Na každý rezervoár připadá pět jamek v řadě a v každém rezervoáru lze testovat jinou protilátku (Obrázek 6) [42].

Značnou výhodou je možnost provádět celou analýzu uvnitř zařízení, což je umožněno systémem kolektorových kanálků na spodní straně víka (Obrázek 6). Každá jamka navazuje na odtokový mikrokánek ve tvaru kříže, který je uspořádaný tak, aby nedocházelo k samovolnému vytékání kapaliny z jamek do kanálků. Mikrokánálky ústí do menších kolektorových kanálků, které navazují na jeden velký

kolektorový kanálek vedoucí do plastového vývodu, na něhož je napojena odpadní hadička. Celý systém kanálků umožňuje odtah všech reagensů až do odpadu pomocí vakuové pumpy a není nutné membránu po nadávkování antigenu vyjmát ze zařízení jako je tomu u standartního dot blotu. Zařízení určená pro standartní dot blot umožňují pouze aplikaci antigenu na membránu, všechny ostatní kroky probíhají mimo zařízení. Pro analýzu více vzorků najednou je nutné membránu rozstříhat na proužky a inkubovat je s reagensy separátně ve více nádobách. Tento postup je příliš pracný a časově náročný, affiblot systémem kanálků značně zjednodušuje a urychluje postup [42].



Obrázek 6. Speciální víko affiblotu [vlastní fotografie]. A: Horní strana víka. B: Spodní strana víka. C: Mikrokanálky

Na affiblotu je možné otestovat také afinitu/aviditu protilátek, čehož je docíleno tím, že jsou jamky a rezervoáry uspořádány do tvaru čtverce, a tak lze víko otočit o 90 stupňů a nanášet chaotropní činidla kolmo ke směru předchozího nanesení protilátek. Jako chaotropní činidlo se používá například thiokyanatan amonný, thiokyanatan sodný, guanidin hydrochlorid nebo močovina. Dávkují se do rezervoárů ve zvyšující se koncentraci a principem semikvantitativního hodnocení afinity je sledování úbytku intenzity skvrn, protože s rostoucí koncentrací roste množství rozrušených vazeb imunokomplexů antigen-protilátka, sníží se tedy detekční signál. Dá se říci, že čím nižší je koncentrace činidla, při kterém dochází k rozrušení vazeb imunokomplexů, tím je síla vazby slabší a afinita/avidita nižší [42].

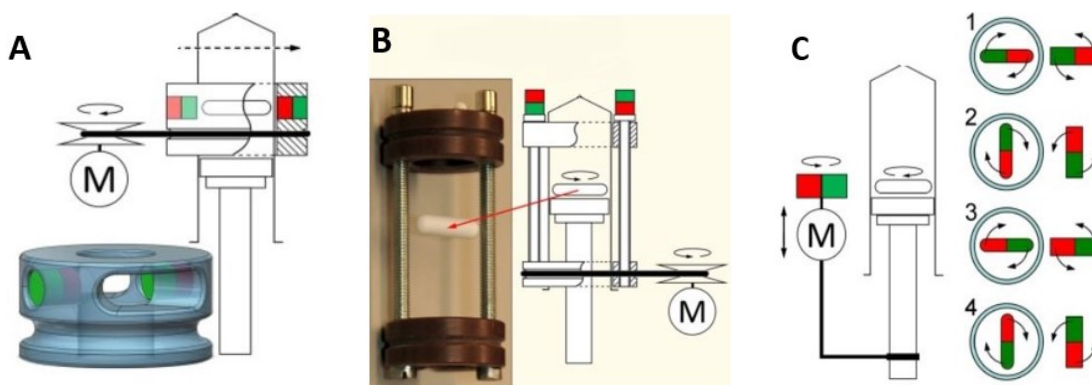
6. LAB-IN-SYRINGE

Lab-In-Syringe (LIS) se řadí do skupiny neseparačních průtokových technik, jejichž cílem je automatizace laboratorních postupů. Automatizace zvyšuje opakovatelnost a spolehlivost metod, dále umožňuje miniaturizaci, snížení objemů reagensů a zkrácení času analýz. LIS je modifikací techniky sekvenční injekční analýzy (SIA, Sequential injection analysis), u které jsou pomocí automatizované injekční pumpy do systému přiváděny činidla, vzorky a nosný roztok a reagentie jsou promíchávány v průtokovém systému. Nosný roztok unáší veškerá činidla a vzorky do reakční cívky a výsledné produkty přivádí do detektoru. U techniky LIS jsou samotné reagentie aspirovány hadičkami ze zásobníků do stříkačky, uvnitř které dochází k veškeré manipulaci s reagentiemi včetně míchání, extrakce, ředění a průběhu reakcí [44] [45] [46].

Stříkačka v LIS představuje reakční nádobu obsahující píst, který je ovládán automatickou pumpou a počítačovým softwarem. Ústí stříkačky je spojeno s vícecestným selekčním ventilem, na jehož porty jsou napojeny hadičky pro aspiraci jednotlivých reagensů. Takové uspořádání umožňuje koordinaci jednotlivých portů a pomocí softwaru lze podle potřeby nastavit různé objemy či rychlosti pro nasávání a vypouštění jednotlivých reagensů. V LIS je také proveditelná on-line detekce analytu ve spojení se spektrofotometrií, fluorimetrií, atomovou absorpční spektrometrií, chromatografií či s jiným detekčním systémem [44] [47] [48].

Další nedílnou součástí LIS je míchací systém sloužící k prostému mísení reagensů, čištění systému, urychlení extrakce během disperzní extrakce v kapalně fází (LLE, Liquid-liquid extraction) a během extrakce pevnou fází (SPE, Solid-phase extraction) nebo urychlení odpařování analytu při head-space mikroextrakci. Míchání je zajištěno magnetickým míchadlem umístěným uvnitř stříkačky. Míchadlo se otáčí vlivem rotujícího magnetického pole, kterého je dosaženo různými uspořádáními externích neodymových magnetů. Například dva magnety jsou umístěny na prstenec nasazený na stříkačku. Prstenec je spojen gumičkou s malým stejnosměrným motorem, který je řízen pomocí relé a jeho rychlost, zapnutí či vypnutí je ovládáno pomocí ovládacího panelu (Obrázek 7A). Magnety mohou být také umístěny na dva ocelové šrouby,

což zajistí magnetické pole po celé délce stříkačky. Šrouby jsou nesené prstencem, který je rovněž propojen gumičkou s motorem (Obrázek 7B). Další možností je použití jednoho externího magnetu, který je jednoduše spojen přímo s motorem. Magnet je umístěn vně stříkačky vedle míchadla a opačné póly magnetu a míchadla zajistí rotační magnetické pole (Obrázek 7C) [44] [49].

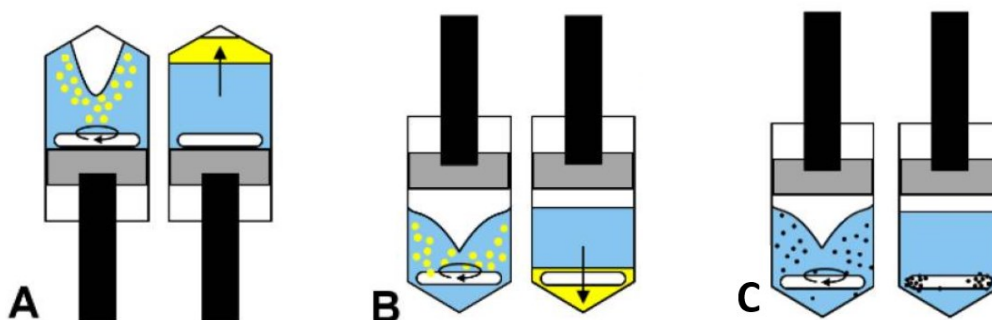


Obrázek 7. Příklady dosažení rotačního magnetického pole v LIS [44]. A: Dva neodýmové magnety na prstenci. B: Dva neodýmové magnety na dvou ocelových šroubech. C: Jeden neodýmový magnet spojen s motorem

LIS nachází uplatnění především u metod předúpravy vzorku před analýzou, zejména u LLE. Metoda byla použita například pro automatizaci disperzní LLE u analýzy aktivních látek v metylenové modři [50]. Pro LIS je také vhodná head-space mikroextrakce jednou kapkou rozpouštědla, která je založena na odpařování těkavého analytu a jeho extrakce ve formě par do kapky organického roztoku. Tato technika byla použita například pro kvantifikaci etanolu ve vzorcích vína [51]. Kromě LLE je možné v LIS použít také metody předúpravy vzorku, které jsou založeny na SPE. Byly použity magnetické sorbenty, například organokovové sítě (MOF, Metal-organic frameworks) pro analýzu malachitové zeleně z různých vzorků vody a ze pstruhů [52] nebo magnetické uhlíkové mikročástice pro analýzu estrogenů ze vzorků odpadních vod [53].

Výhodou LIS je uzavřenost a utěsnění stříkačky, nedochází tedy k odpařování roztoků ani ke kontaktu operátora s reagensy. Další velkou výhodou je možnost výměny stříkačky a použití různých velikostí, čímž je LIS přizpůsobitelný k různým objemům vzorků. Stříkačku lze také podle potřeby analýzy uspořádat ve dvou orientacích – pístem dolů, respektive ve vzpřímené orientaci, nebo pístem nahoru, tedy v převrácené orientaci. Obě orientace mají určitá uplatnění v závislosti

na podmínkách analýzy. Například při disperzní LLE analytu, která probíhá z vody do méně hustého rozpouštědla je výhodnější vzpřímená orientace (Obrázek 8A). Naopak pokud probíhá extrakce při LLE z vody do více hustého rozpouštědla, je výhodnější orientace převrácená (Obrázek 8B). Převrácená orientace je rovněž výhodnější pro extrakci analytu v SPE například při použití magnetického sorbentu (Obrázek 8C) [44].



Obrázek 8. Možnosti orientace stříkačky a použití v LIS [44]. A: Disperzní LLE při extrakci z vody do méně hustého rozpouštědla, vzpřímená orientace stříkačky. B: Disperzní LLE při extrakci z vody do více hustého rozpouštědla, převrácená orientace stříkačky. C: SPE za použití magnetického sorbentu, převrácená orientace stříkačky

LIS má také některá omezení. Nevýhodou je, že reagentie, které jsou aspirovány do stříkačky, nelze plně vypláchnout během jejich vypouštění. Může proto snadno docházet ke kontaminaci vzorků reagentiemi z předchozí analýzy. Je proto nutné promývat celý systém LIS po každé analýze, na rozdíl od metody SIA, kde dochází k čištění systému nosným roztokem. Neustálé promývání zvyšuje časovou náročnost metod. Další nevýhodou je také větší mrtvý objem způsobený například magnetickým míchadlem pod pístem, protože píst nelze nastavit do výchozí polohy. Tento problém může být řešen aspirací vzduchu před vypuštěním roztoku, což napomáhá úplnému vyprázdnění stříkačky. Mrtvý objem je ale také ale zvýšen hadičkami nebo i kanálky v hlavici vícecestného ventilu a dalšími částmi [44] [47].

7. MAGNETICKÉ ČÁSTICE

7.1. VLASTNOSTI A FUNKCE MAGNETICKÝCH ČÁSTIC

V analytických metodách se dnes velkou měrou uplatňují magnetické sorbenty, ke kterým se řadí magnetické částice (MČ), které mohou být dále modifikovány dle zamýšleného použití [54]. Velmi rozšířené jsou MČ o rozměrech 1–1000 μm (mikročástice) a 1–100 nm (nanočástice), protože disponují unikátními strukturními, chemickými, fyzikálními a magnetickými vlastnostmi. Velkým benefitem je možnost manipulace s MČ pomocí vnějšího magnetického pole, což značně zjednodušuje laboratorní postupy. Navíc z důvodu možnosti recyklace a opětovného použití MČ, je lze zařadit mezi ekologické a finančně výhodné materiály [54].

Uplatňují se u metod přípravy vzorku založených na SPE. Umožňují rychlou a jednoduchou extrakci, purifikaci nebo izolaci cílového analytu, kterým může být protein, DNA/RNA, bakterie, buňka či léčivo. Kromě analytických aplikací nacházejí uplatnění v řadě dalších oborů, například ve strojírenství a elektronice, v enviromentálních technologiích, dále také v medicíně, kde se používají zejména pro cílenou distribuci léčiv nebo pro hypertermickou léčbu nádorů [55] [56] [57].

Magnetické látky jsou obecně charakterizovány vnitřním magnetismem, veličinou zvanou magnetický moment neboli vnitřní hybnost elektronů (spiny). Důležitou vlastností MČ je tzv. superparamagnetismus, který je typický pro soustavu složenou z několika malých feromagnetických nebo ferimagnetických částic, jejichž spiny jsou pravidelně uspořádány. Pokud jsou částice dostatečně malé, chovají se jako malé magnety a každá jednotlivá MČ přispívá celku svou hodnotou magnetického momentu. V průměru má soustava MČ bez vnějšího magnetického pole nulovou hodnotu magnetického momentu, ale v přítomnosti vnějšího pole se spiny zorientují ve směru pole a magnetický moment soustavy získá nenulovou hodnotu. Stručně řečeno, MČ jsou magnetické pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole a při jeho absenci by MČ neměly interagovat mezi sebou a vytvářet agregáty. Vlastnost superparamagnetismu tedy v praxi napomáhá snadné manipulaci s MČ v roztoku, kdy se pomocí vnějšího

magnetu MČ vychytávají na stěnu reakční nádoby a po odstranění magnetu se mohou MČ znovu resuspendovat [54] [58] [59].

7.2. SYNTÉZA A MODIFIKACE MAGNETICKÝCH ČÁSTIC

MČ mohou být nalezeny přirozeně v přírodě, například ve skalách, ale také i v některých bakteriích, kde "minimagnety" pomáhají orientovat jejich pohyb nazývaný magnetotaxis. Častěji jsou získávány ze syntetické výroby, kde jsou vyráběny z magnetických materiálů obsahujících železo, nikl nebo kobalt. Mezi nejvíce využívané materiály patří magnetické oxidy železa magnetit a maghemit nebo jejich směsi. Oxidy železa jsou oproti ostatním kovům navíc biokompatibilní a biodegradabilní a jsou tedy vhodné i pro *in vivo* aplikace v medicíně. K výrobě se využívají rovněž různé typy feritů (slitiny železa a uhlíku) ve formě prášků nebo magnetických kapalin [55] [59] [60].

Syntéza MČ může probíhat ve vodných roztocích, v nepolárních organických rozpouštědlech nebo suchou cestou. Syntetizují se pomocí různých chemických reakcí, nejčastěji používaná je koprecipitační reakce solí železa. Dále také termickým nebo hydrolytickým rozkladem prekurzorů obsahujících železo, sol-gel reakcí, mikroemulzní technikou, hydrotermální reakcí, sonochemickou syntézou, elektrosprejovou syntézou nebo pomocí magnetotaktických bakterií [55] [56] [60].

Kromě magnetického základu (jádra), MČ potřebují pro správnou funkci také modifikaci ve formě navázání nemagnetického obalu, který chrání jádro před nežádoucími chemickými transformacemi. Obal by měl mít vysokou afinitu k železitému jádru a neměl by být imunogenní ani antigenní. Modifikace MČ zvyšují stabilitu a zabraňují jejich vzájemné agregaci, oxidaci a ztrátě magnetismu. Zajišťují také interakci s biologickými systémy pro využití v medicíně, jelikož zvyšují biokompatibilitu, snižují toxicitu a zabraňují reakcím s krevní plazmou. Navázaný obal také poskytuje MČ funkční skupiny potřebné k sekundární modifikaci [55] [56] [60].

Navázání obalu probíhá buďto již během syntézy samotných MČ nebo až po proběhlé syntéze. Příkladem modifikace MČ probíhající v průběhu syntézy je jejich obalování pomocí povrchově aktivních látek nebo polymerů. Mezi nejčastěji používané

povrchově aktivní látky se řadí kyselina olejová, oleát sodný, dodecylamin, dodecylbenzensulfonát sodný. Tyto látky stabilizují MČ pomocí vytvoření dvojvrstvy na jejich povrchu. Polymery mohou být jak přírodního původu (dextran, chitosan, škrob), tak syntetického původu (polyetylglykol, polyvinylalkohol, kyselina polymléčná). Polymery zabraňují hlavně agregaci MČ zvýšením odpudivých sil. Modifikace prováděné po ukončení syntézy MČ zahrnují jejich obalování pomocí sacharidů, fosfolipidů nebo zlata. Velmi častá modifikace je navázání oxidu křemičitého, který zajišťuje zejména netoxicitu a minimální zbytkový magnetismus, navíc silanolové skupiny činí povrch MČ lyofilním, což zvyšuje stabilitu jejich suspenzí i při změnách pH nebo změnách koncentrace elektrolytu [56] [61] [62].

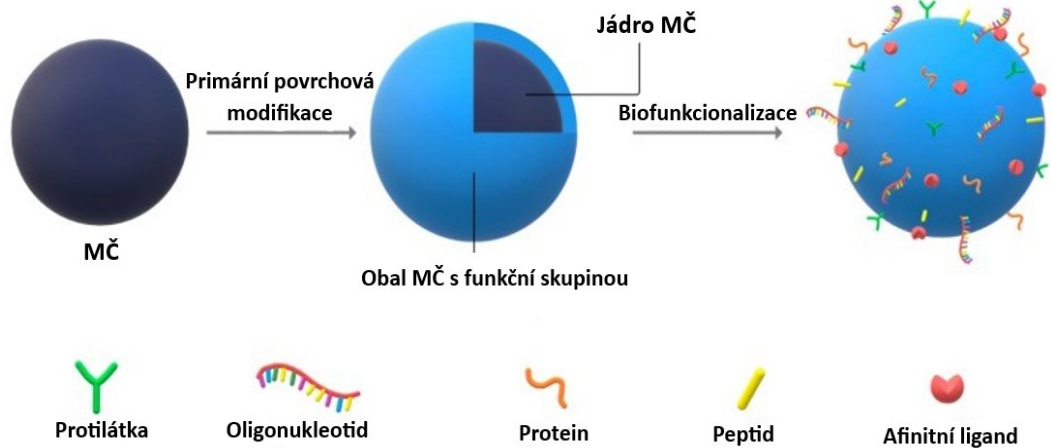
7.3. BIOFUNKCIONALIZACE MAGNETICKÝCH ČÁSTIC

Jak bylo již zmíněno, MČ se používají jako sorbenty určené k extrakci, izolaci a purifikaci cílového analytu ze vzorku. Je však potřeba MČ dále sekundárně modifikovat, takzvaně biofunkcionalizovat. Jedná se o imobilizaci různých biomolekul neboli ligandů na povrch MČ, což může být provedeno různými způsoby. Pro biofunkcionalizaci jsou voleny biomolekuly, které poskytují specifické interakce s cílovým analytem [55] [63].

Pro biofunkcionalizaci může být použita například přímá fyzikální sorpce, což je sice méně spolehlivá a méně stabilní vazba, ale umožňuje reverzibilní imobilizaci ligandů. Dále také mohou být ligandy zabudovány do magnetické gelové matrice, která je tvořena polymery, proteiny nebo polysacharidy. Zbobtnalá struktura gelu zadržuje ligandy, ty však ale mohou být po čase z gelu uvolňovány [55] [63].

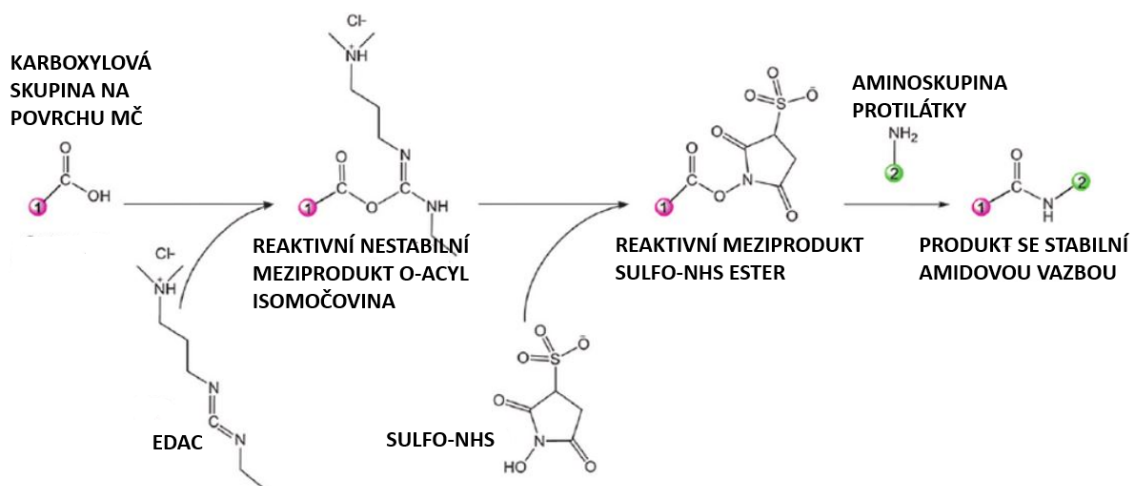
Nejčastějším způsobem imobilizace je vytvoření kovalentní vazby mezi ligandem a aktivovanou skupinou nacházející se na povrchu MČ. Tato vazba je pevná, stabilní a spolehlivá. Pomocí primární modifikace, tedy vytvoření obalu MČ, jsou na povrch zavedeny vhodné funkční skupiny, obvykle aminoskupiny, skupiny karboxylové, sulfanylové, hydroxylové, hydrazidové a jiné. Skupiny se nejprve aktivují vhodným aktivačním činidlem, a poté je možné přes tyto skupiny na povrch MČ imobilizovat ligandy jako jsou protilátky, peptidy a proteiny, nukleové kyseliny nebo jiné afinitní

ligandy, například streptavidin (Obrázek 9). Právě streptavidin na MČ se často používá pro imobilizaci biotinylovaných ligandů pomocí slabých vazebných interakcí. Další často využívanou kombinací je interakce proteinu A nebo G na MČ s Fc fragmentem IgG vázaného na ligand, což umožňuje orientovanou nekovalentní vazbu IgG na MČ [55] [63].



Obrázek 9. Biofunkcionalizace MČ pomocí kovalentní vazby [63]

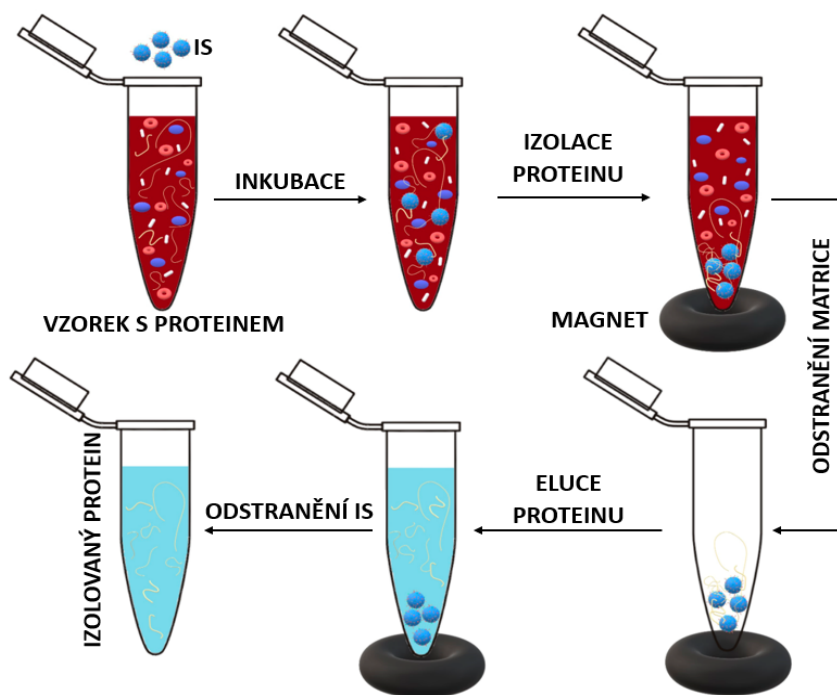
Příkladem biofunkcionalizace MČ protilátkami pomocí kovalentní vazby je karbodiimidová metoda, která se používá u MČ s karboxylovými skupinami na povrchu. Karboxylové skupiny se nejdříve aktivují činidly EDAC a sulfo-NHS. Mezi karboxylovými skupinami a aminoskupinami protilátek vzniká kovalentní vazba podle chemické reakce na obrázku níže (Obrázek 10) [64].



Obrázek 10. Chemická reakce karbodiimidové metody [64]

Velmi častá je imobilizace protilátky na povrch MČ za účelem izolace proteinu, který je potřeba stanovit ve vzorku se složitou maticí. Principem je imunanalytická reakce mezi protilátkou a antigenem (proteinem) za vzniku imunokomplexu. Imobilizací protilátek na MČ vzniká magnetický imunosorbent (IS), jehož příprava může být provedena jak vsádkově, tak automatizovaně [55] [65].

Schéma izolace proteinu je zobrazeno pomocí schématu (Obrázek 11). Stejně jako příprava samotného magnetického IS, tak jeho využití k izolaci proteinu může probíhat ve vsádkovém uspořádání i pomocí automatické instrumentální metody. Magnetický IS je ve vsádkovém uspořádání nejprve smíchán se vzorkem obsahujícím cílový protein a je s ním inkubován po určitou dobu, aby proběhla specifická interakce mezi protilátkou a proteinem. Následně je použito vnější magnetické pole pro vychytání MČ s proteinem na stěnu reakční nádoby. Po vychytání MČ jsou odebrány ostatní složky matrice vzorku. Magnetický IS s proteinem je nakonec smíchán s elučním činidlem, což je roztok, který způsobí rozštěpení vazby imunokomplexu a uvolnění proteinu do roztoku. Protein je takto zakoncentrován a izolován a může být použit pro další analýzu či stanovení. Může být také vynechán krok eluce proteinu, a celý magnetický IS společně s proteinem může být zaveden do biosenzoru, kde je protein stanoven [55] [63] [65].



Obrázek 11. Schéma izolace proteinu pomocí magnetického IS ve vsádkovém provedení [63]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8. SEZNAM VYBAVENÍ

- Affiblot – prototyp 3.2, 3.3, 3.4 (Ústav analytické chemie AV ČR, Brno, ČR)
- Analytická váha AE200 (Mettler Toledo, D1-25352/00)
- 3D tiskárna DeltiQ FDM (TriLAB Group s.r.o., Hradec Králové, ČR)
- 3D tiskárna Photon S, metoda stereolitografie (Anycubic, Šen-Čen, Čína)
- ChemiDoc MP imaging systém (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie)
- Lab-In-Syringe systém:
 - Injekční stříkačka 1 ml (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
 - Injekční stříkačka 5 ml (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
 - Pumpa Cavro XC12 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- Magnetické míchadlo s ohřevem MSH-300 (Biosan, Litva)
- Magnetická míchadla 1 sada R.C267.1 (P-LAB, Karlsruhe, Německo)
- pH metr Edge^{PH} – (504761, Hanna Instruments, Woonsocket, USA)
- Pipety Eppendorf research plus (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Říčany u Prahy, ČR)
- PVDF membrána pro blotování Immun-Blot[®], 26 cm x 3,3 m, 0.2 μm (1620177, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules)
- Rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan, Riga, Litva)
- Spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent technologies, Santa Clara, USA)
- Třepačka Titramax 101 (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Vakuová pumpa (Millipore, Burlington, Kanada)
- Vortex lab dancer S000 (IKA, Staufen, Německo)

9. SEZNAM REAGENCIÍ

Chemikálie:

- 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (TRIS), 3718005 (1 kg, Serva, Heidelberg, Německo)
- Azid sodný (Chemapol Limited, London, UK)
- Glycin, 50046 (50 g, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Bovine Serum Albumin), 80400 (100 g, Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA)
- Chlorid sodný p. a., 7647-14-5 (VERKON, Praha, ČR)
- Metanol, 34885 (2,5 l, Honeywell – Riedel-de-Haën, Muskegon, USA)
- Milli-Q – redestilovaná voda
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarboimid (EDAC), 25952-53-8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (sulfo-NHS), 106627-54-7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina (MES), 145224-94-8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Opti-4CN – kit pro kolorimetrickou detekci, 170-8235 (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Potravinářská barviva (Výrobní skupina AROMA, Praha, ČR)
- rhENG – rekombinantní lidský ENG produkovaný v buněčné linii myšího myelomu, Glu26-Gly586, 61kDa, extracelulární doména, 1097-EN (10 µg/ml, R&D Systems, Minnesota, Minneapolis)
- SuperSignal™ West Pico chemiluminiscenční substrát – kit pro chemiluminiscenční detekci, 34580 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
- Tablety pro fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS, Phosphate buffered saline), P4417 (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Burlington)
- Tween 20, P1379 (500 ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Magnetické částice:

- Sera-Mag – zásobní roztok karboxylovaných MČ o průměrné velikosti 1 µm, 24152105050250 (50 mg/ml, Cytiva, Buckingham, UK)

Primární protilátky:

- Anti-HuENG H-300 – králičí polyklonální IgG protilátka proti lidskému ENG, sc-20632 (200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Dallas)
- Anti-HuENG P3D1 – myší monoklonální IgG protilátka proti lidskému ENG, sc-18838 (200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Texas, Dallas)
- Anti-HuENG 3A9 – myší monoklonální IgG protilátka proti lidskému ENG, ab114052 (1 mg/ml, Abcam, Cambridge, UK)
- Anti-HuENG EPR10145-12 – králičí monoklonální IgG protilátka proti lidskému ENG, ab169545 (2,075 mg/ml, Abcam, Cambridge, UK)

Sekundární protilátky:

- Anti-králičí IgG/HRP – polyklonální IgG protilátka značená křenovou peroxidázou, produkovaná v koze, 7074S (1 ml, Cell Signaling Technology, Massachusetts, Danvers)
- Anti-myší IgG/HRP – FAB specifická IgG protilátka značená křenovou peroxidázou, produkovaná v koze, A9917 (1 ml, Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis)

10. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

- Barvení pro chemiluminiscenční detekci – SuperSignal™ West Pico chemiluminiscenční substrát: smíchání 1 ml roztoku luminolu + 1 ml roztoku peroxidu vodíku
- Barvení pro kolorimetrickou detekci – Opti-4CN: smíchání 4,5 ml Milli-Q + 500 µl diluentu + 100 µl roztoku substrátu 4-chloro-1-naftolu a peroxidu vodíku
- Blokační pufr – 5% BSA v PBST: 5 ml 0,05% PBST + 250 mg BSA, rozpuštěno na magnetickém míchadle
- 0,15M Chlorid sodný v PBS: 50 ml PBS + 450 mg chloridu sodného, rozpuštěno na magnetickém míchadle
- 0,1M Glycinový pufr (pH=2,8): 28 ml Milli-Q + 0,189 g glycinu, rozpuštěno na magnetickém míchadle, smíchání 10 ml Milli-Q + 85,9 µl 35% HCl, smíchání 25 ml

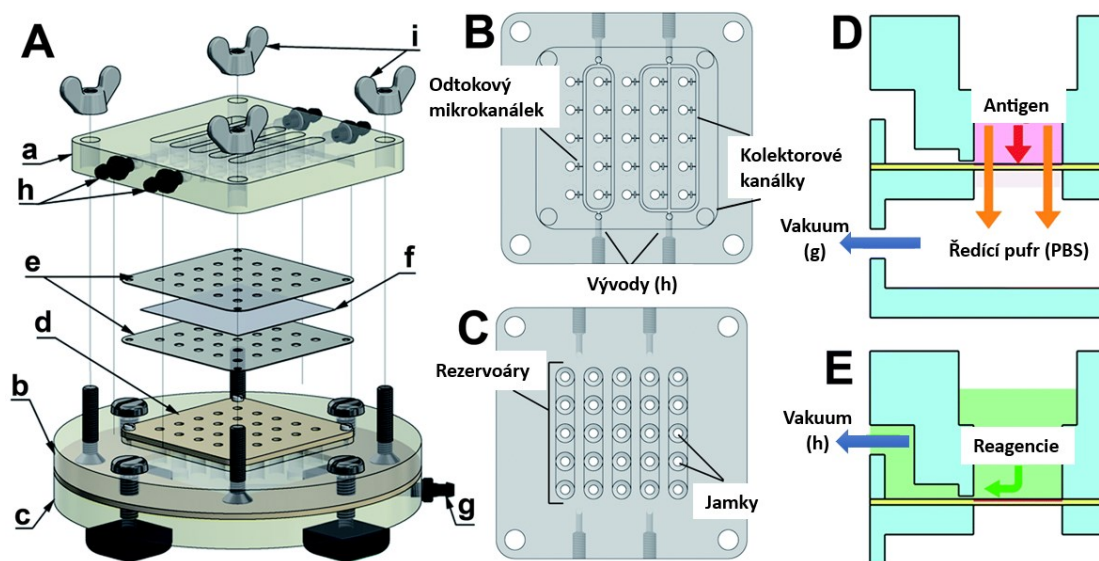
roztoku glycinu a 8,4 ml roztoku HCl, dopraveno na pH=2,8 pomocí zbylého glycinu a HCl, doplnění objemu do 100 ml vodou Milli-Q

- 0,1M MES pufr (pH=5): 100 ml Milli-Q + 1,95 g, rozpuštěno na magnetickém míchadle, dopraveno na pH=5 pomocí 0,1M NaOH
- PBS pufr (pH=7,4): 1 tableta pro fosfátem pufovaný fyziologický roztok + 200 ml Milli-Q, rozpuštěno na magnetickém míchadle
- Pracovní roztok MČ (1 mg/ml): smíchání 10 ml Milli-Q + 200 μ l zásobního roztoku Sera-Mag o koncentraci 50 mg/ml
- Pracovní roztok MČ (3 mg/ml): smíchání 10 ml Milli-Q + 600 μ l zásobního roztoku Sera-Mag o koncentraci 50 mg/ml
- Promývací pufr – 0,05% PBST: smíchání 100 ml PBS pufru + 10 μ l Tweenu 20
- Ředící pufr pro protilátky/pufr pro uchování magnetického IS – 0,1% BSA v PBST: 50 ml 0,05% PBST + 50 mg BSA, rozpuštěno na magnetickém míchadle
- 1M TRIS pufr: 10 ml Milli-Q + 1210 mg TRIS, rozpuštěno na magnetickém míchadle

11. METODIKA – AFFIBLOT

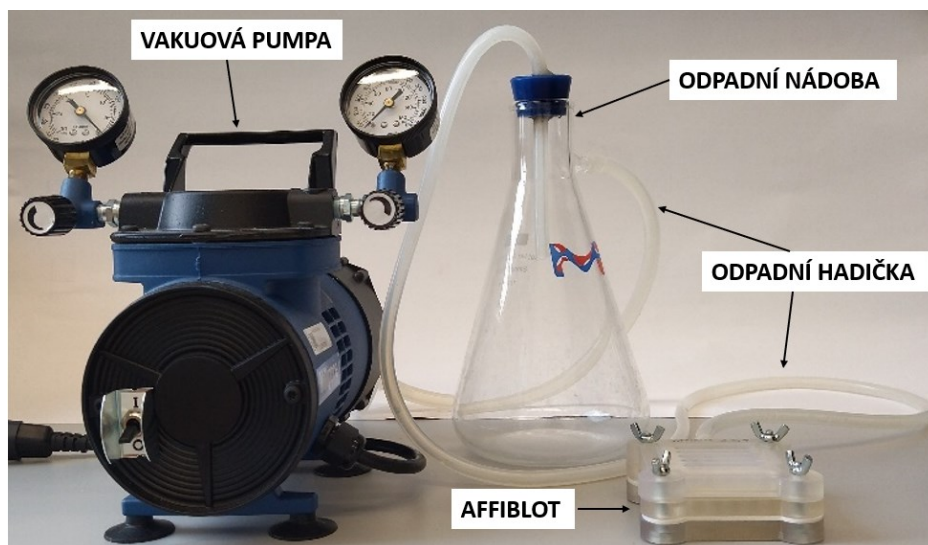
11.1. ČÁSTÍ AFFIBLOTU A SESTAVENÍ APARATURY

Před každou analýzou na affiblotu byla nejdříve sestavena aparatura (Obrázek 13) z jednotlivých součástí podle schématu (Obrázek 12). Hlavní části affiblotu tvoří tři čtvercové díly, které mohou být vyrobeny z transparentního polykarbonátu metodou CNC mikrofrézování nebo z pryskyřice pomocí 3D tisku metodou stereolitografie. Spodní díl affiblotu je komora pro odtaženou kapalinu a obsahuje spodní odpadní vývod pro napojení hadičky vedoucí přes odpadní nádobu k vakuové pumpě. Spodní vývod slouží pro aplikaci antigenu na membránu, kdy se roztok s antigenem „protahuje“ skrz membránu a antigen je na ní pevně zachycen. Na spodní díl se nasadil střední díl, který je nosičem blotovací membrány, jež je chráněna z obou stran polyetylenovou fólií. Na střední díl se dále připevnil mikroporézní silikon pro utěsnění aparatury. Celý střední díl, mikroporézní silikon a polyetylenové fólie obsahují otvory kopírující jamky horního dílu. Horní díl je speciální víko s jamkami a rezervoáry na horní straně a systémem kolektorových kanálků umístěných na spodní straně. Do jednotlivých jamek jsou dávkovány vzorky, jedna jamka pojme objem až 100 μl roztoku. Na víku se dále nachází druhý odpadní vývod, jenž navazuje na kolektorové kanálky. Vývod slouží pro odtažení kapaliny po inkubaci membrány s reagensy a pro odtažení promývacího pufru. Všechny tři díly byly spojeny dohromady čtyřmi šrouby a upevněny křídlovými maticemi.



Obrázek 12. Schéma affiblotu [42]

A: Části affiblotu – a: horní díl (víko), b: střední díl, c: spodní díl, d: mikroporézní silikon (těsnění), e: polyetylenové fólie, f: blotovací membrána, g: spodní odpadní vývod, h: horní odpadní vývod, i: křídlové matice. B: Spodní strana víka. C: Horní strana víka. D: Aplikace antigenu na membránu spodním vývodem pomocí vakua. E: Odtah reagentů horním vývodem pomocí vakua

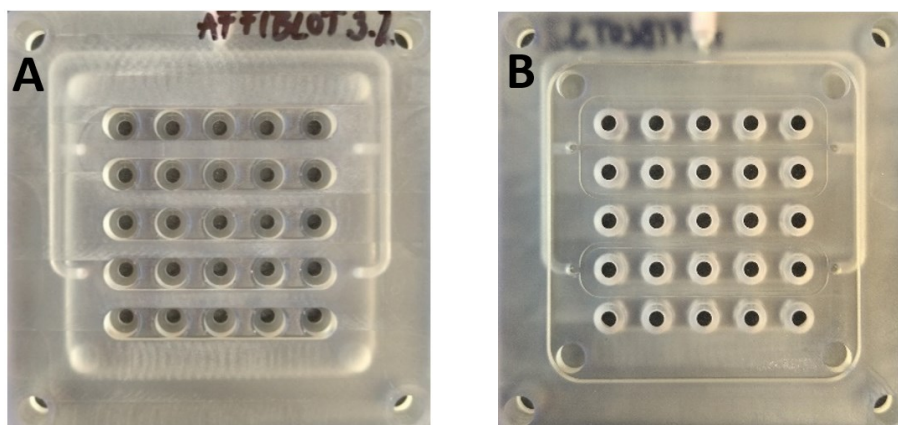


Obrázek 13. Sestavená aparatura affiblotu

V experimentální části byly použity tři prototypy affiblotu – 3.2, 3.3 a 3.4, které se liší v uspořádání kolektorových kanálků horního víka, ostatní části aparatury jsou u všech tří prototypů stejné. Níže jsou popsány jednotlivé prototypy.

PROTOTYP 3.2

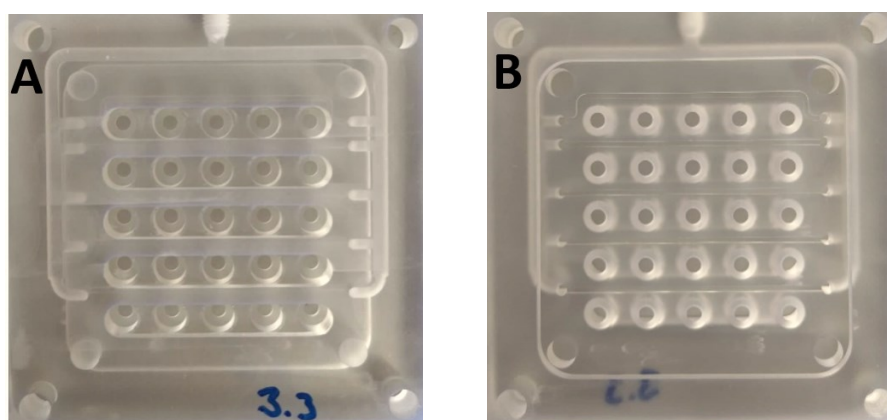
Jamky a rezervoáry na víku prototypu 3.2 jsou uspořádány do tvaru čtverce, každá jamka je spojena mikrokanálkem s malým kolektorovým kanálkem. Prototyp obsahuje dva malé kolektorové kanálky, jeden je společný pro tři horní rezervoáry a jeden pro dva dolní rezervoáry. Malé kolektorové kanálky ústí do velkého kolektorového kanálku, který navazuje na jeden odpadní vývod (Obrázek 14).



Obrázek 14. Affiblot prototyp 3.2. A: Horní strana víka. B: Spodní strana víka

PROTOTYP 3.3

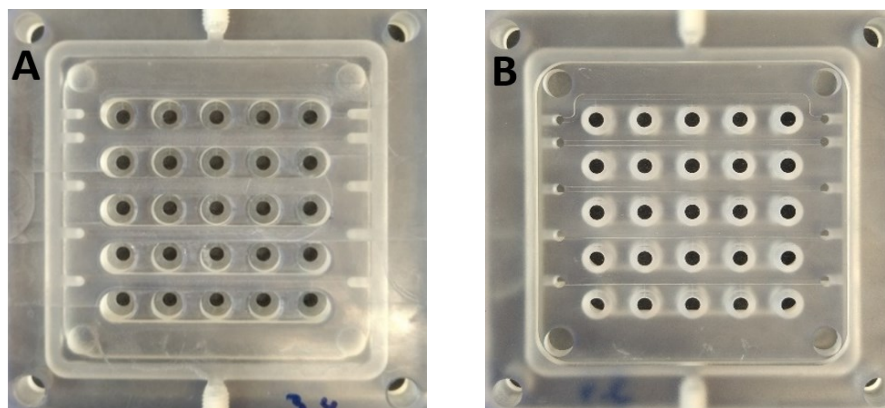
Prototyp 3.3 na rozdíl od prototypu 3.2 obsahuje pět malých kolektorových kanálků, tedy na každý rezervoár připadá jeden kanálek a všechny ústí do jednoho velkého kanálku. Rozdílem u prototypu 3.3 je také větší šířka velkého kolektorového kanálku (Obrázek 15).



Obrázek 15. Affiblot prototyp 3.3. A: Horní strana víka. B: Spodní strana víka

PROTOTYP 3.4

Prototyp 3.4 se liší velkým kolektorovým kanálkem, který se nachází po celém obvodu víka a ústí do dvou plastových vývodů. Velký kolektorový kanálek má také větší šířku než předchozí dva prototypy (Obrázek 16).



Obrázek 16. Affiblot prototyp 3.4. A: Horní strana víka. B: Spodní strana víka

11.2. TESTOVÁNÍ PROTOTYPŮ AFFIBLOTU POMOCÍ BARVIV

Nejprve byly připraveny potřebné reagentie, poté byla aktivována membrána v metanolu a byla sestavena aparatura. Po sestavení se zapojila odpadní hadička na spodní vývod a byl nadávkován 1 ml PBS pufr do každého rezervoáru. Zapnulo se vakuum a PBS pufr byl odtažen spodním vývodem, čímž došlo k ekvilibraci membrány. Po ekvilibraci membrány se nadávkovalo potravinářské barvivo, které bylo rozpuštěné ve vodě Milli-Q. Barvivo bylo dávkováno do lichých rezervoárů a v sudých rezervoárech byly naplněny pouze liché jamky. Po cca pěti minutách bylo doplněno barvivo do rezervoárů tak, aby v každém byl 1 ml. Opět bylo zapnuto vakuum a barvivo se odtáhlo spodním vývodem. Po odtahu byla přepojena hadička vakua na horní vývod a nadávkoval se 1 ml barviva do všech rezervoárů. Zapnulo se vakuum a barvivo bylo odtaženo horním vývodem.

11.3. DETEKCE PROTILÁTEK VE VZORKU POMOCÍ AFFIBLOTU

Během aktivace membrány v metanolu byly připraveny vzorky a pufrы, a poté byl sestaven affiblot. Napojila se hadička na spodní vývod a do všech rezervoárů se nadávkoval 1 ml PBS pufru. Zapnulo se vakuum a byla provedena ekvibrace membrány spodním odtahem PBS pufru. Během spuštěného vakua byly do jamek nadávkovány vzorky (100 μ l) obsahující detekovanou protilátku podle předem připravených schémat. Vypnulo se vakuum a hadička byla přepojena na horní vývod. Následně se nadávkoval 1 ml blokačního pufru do každého rezervoáru a probíhala inkubace 60 minut při RT. Během blokace membrány byl připraven konjugát – protilátka značena křenovou peroxidázou. Po inkubaci se odtáhl blokační pufr horním vývodem a dalším krokem bylo promytí membrány. Nadávkoval se 1 ml PBST pufru do všech rezervoárů, který byl následně odtážen horním vývodem. Připravený konjugát se nadávkoval do všech rezervoárů v objemu 1 ml a inkubace za RT opět probíhala po dobu 60 minut. Po inkubaci byl konjugát odtážen a následovalo 5x promytí membrány PBST pufrem. Nakonec bylo u affiblotu odmontováno víko a odstříhl se levý horní roh membrány pro identifikaci orientace membrány, a ta byla pinzetou přenesena do vaničky s PBST pufrem, kde se promývala cca 15 minut. Ke konečnému zviditelnění vzorků byly používány dva druhy detekce – kolorimetrická a chemiluminiscenční.

Ke kolorimetrické detekci byl použit komerční kit Opti-4CN. Membrána byla nejdříve promyta 5 minut na třepačce a během promývání bylo připraveno kolorimetrické činidlo. Smíchalo se 5 ml naředěného diluentu vodou Milli-Q (1:9) se 100 μ l roztoku chromogenního substrátu 4-chloro-1-naftolu a peroxidu vodíku. Kit slouží k detekci konjugátů značených křenovou peroxidázou, která katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu, přičemž kyslík následně oxiduje chromogenní substrát za vzniku barevného produktu. Produkt vytvoří na membráně barevné kruhové skvrny, jejichž intenzita je přímo úměrná koncentraci protilátky ve vzorku. Membrána byla s kolorimetrickým činidlem inkubována 5 minut, a poté byla opláchnuta vodou Milli-Q a usušena. Nakonec byla membrána vyfocena a denzita jednotlivých skvrn byla zhodnocena pomocí systému ChemiDoc^{MP} imaging. V softwaru ImageLab byly označeny

jednotlivé skvrny pomocí kruhové výseče, která ohraničila oblast pro změření intenzity signálu.

Chemiluminiscenční detekce byla provedena pomocí komerčního kitu SuperSignal™ West Pico chemiluminiscenční substrát. Kit se používá rovněž pro detekci konjugátů značených křenovou peroxidázou. Byly připraveny 2 ml činidla smícháním 1 ml roztoku luminolu a 1 ml roztoku peroxidu vodíku. Křenová peroxidáza katalyzuje rozklad peroxidu vodíku za vzniku kyslíku a vody, přičemž kyslík následně oxiduje luminol, který se přemění na nestabilní produkt v excitovaném stavu. Během přechodu produktu do základního stavu dochází k emisi světelného záření s vlnovou délkou 428 nm, které je zachyceno detektorem. Membrána byla inkubována s chemiluminiscenčním činidlem 3 minuty a po slití roztoku byla přenesena do systému ChemiDoc^{MP} imaging, jehož součástí je detektor, který zachytává emitované záření během snímání obrazu. Záření je přímo úměrné koncentraci protilátky ve vzorku. Výsledek byl dále zpracován stejně jako u kolorimetrické detekce v softwaru ImageLab.

11.4. DETEKCE ENDOGLINU VE VZORKU POMOCÍ AFFIBLOTU

Detekce ENG na affiblotu probíhala stejným postupem popsaném v kapitole 11.3., s tím rozdílem, že postup obsahoval inkubační krok navíc a detekovaným analytem ve vzorku byl ENG. Během dávkování vzorků do jamek byl ENG zachycen na membránu. Po nadávkování vzorků a blokaci membrány následoval krok 60minutové inkubace s primární protilátkou, která se navázala na ENG. Poté byla membrána 60 minut inkubována se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou, která sloužila k detekci imunokomplexu. K hodnocení vzorků s ENG se používala citlivější chemiluminiscenční detekce.

12. METODIKA – LAB-IN-SYRINGE

12.1. ČÁSTI LAB-IN-SYRINGE A PŘÍPRAVA SYSTÉMU

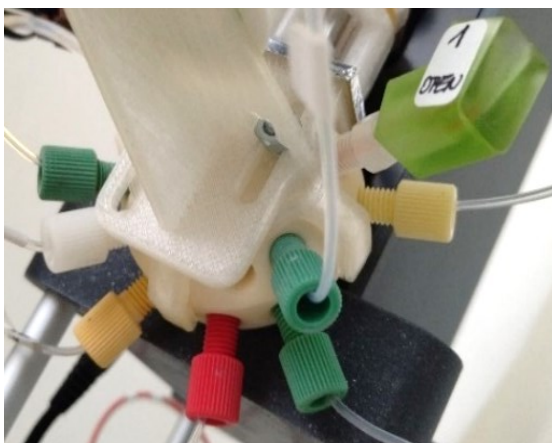
Nejdříve byl připraven systém LIS, který se skládal z několika částí. Všechny části byly ovládány automaticky počítačovým softwarem FIALab. Hlavní část LIS tvořila automatická pumpa Cavro XC12, která byla spojena s vyměnitelnou skleněnou injekční stříkačkou s pístem o délce 3 cm. Stříkačky mohou mít různé velikosti/objemy, například 1; 2,5 či 5 ml (Obrázek 17). V této diplomové práci byly použity dvě velikosti stříkaček – 1 ml a 5 ml. Stříkačky byly orientovány tak, že při nasávání roztoku se píst pohyboval nahoru a při vypouštění roztoku se pohyboval dolů.



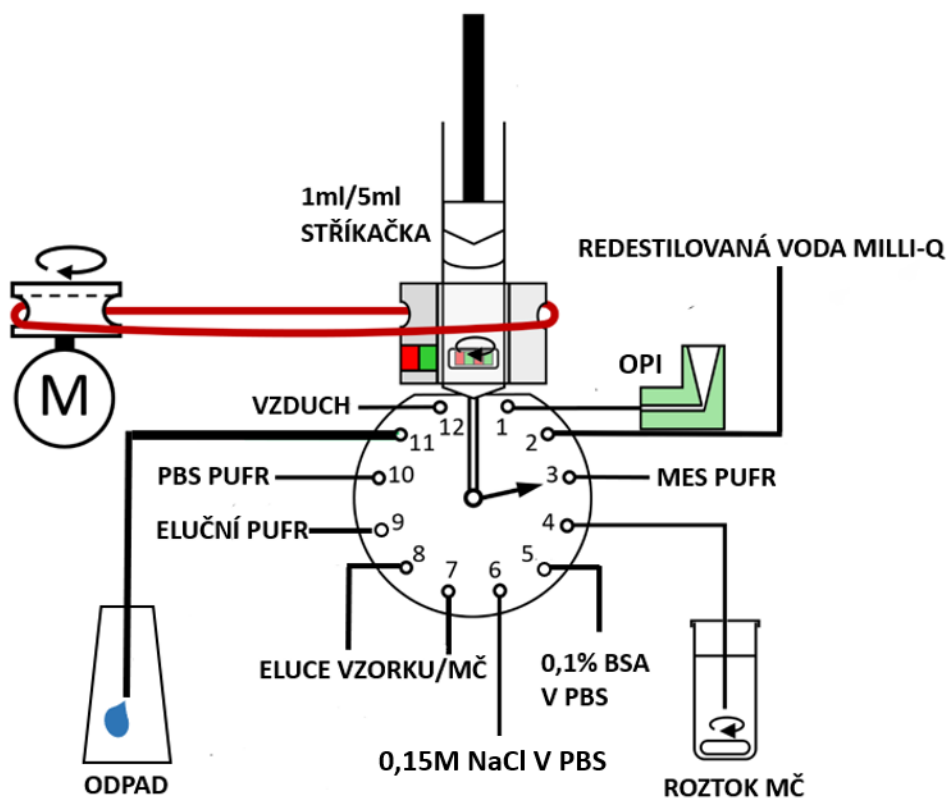
Obrázek 17. Různé velikosti injekčních stříkaček v LIS. Zleva: 5 ml; 2,5 ml; 1 ml

Ústí stříkačky bylo napojeno pomocí šroubení na dvanácticečný selekční ventil (Obrázek 18), na který se našroubovaly hadičky o vnitřním průměru 0,5 mm vyrobené z polytetrafluoretylenu. Pomocí hadiček byly aspirovány různé reagenty, vypouštěny roztoky do odpadu nebo eluovány vzorky. Každá hadička byla ponořena do jiného zásobního roztoku nebo byla vložena do eppendorf zkumavky nebo do odpadní nádoby podle schématu ventilu (Obrázek 19). Každé hadičce bylo přiřazeno číslo podle nadefinovaných portů a jednotlivé porty byly přepínány pomocí naprogramovaných příkazů v softwaru FIALab. Na port 1 byla z 3D tiskárny metodou stereolitografie

vyrobena malá komponenta ve tvaru nálevky nazývána otevřený port (OPI, Open port interface) (Obrázek 18, Obrázek 20). OPI byla vyrobena na objem 250 μl a reagentie byly do ní ručně pipetovány. Ústí nálevky vedlo přímo k ventilu, OPI měla tedy na rozdíl od hadiček minimální mrtvý objem a používala se pro reagentie, u kterých bylo nutné, aby se aspirovaly kvantitativně, například roztok protilátek, ENG nebo aktivačních činidel.

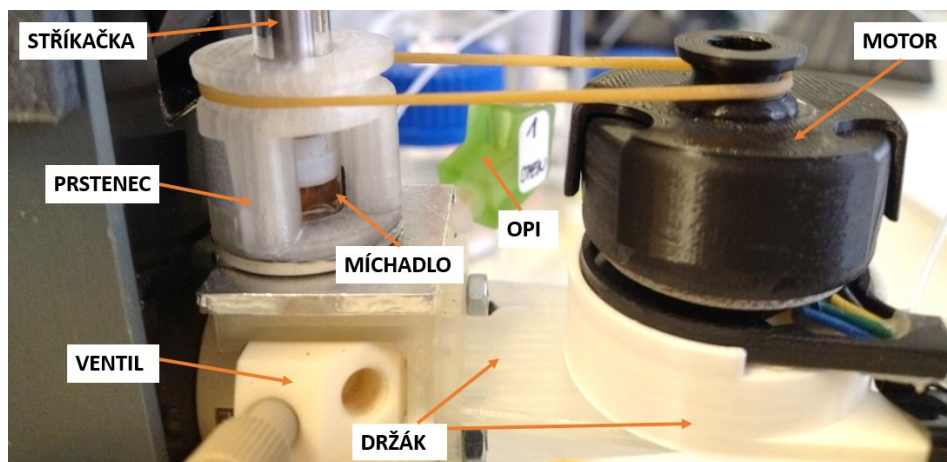


Obrázek 18. Dvanácticestný selekční ventil a OPI (port 1)



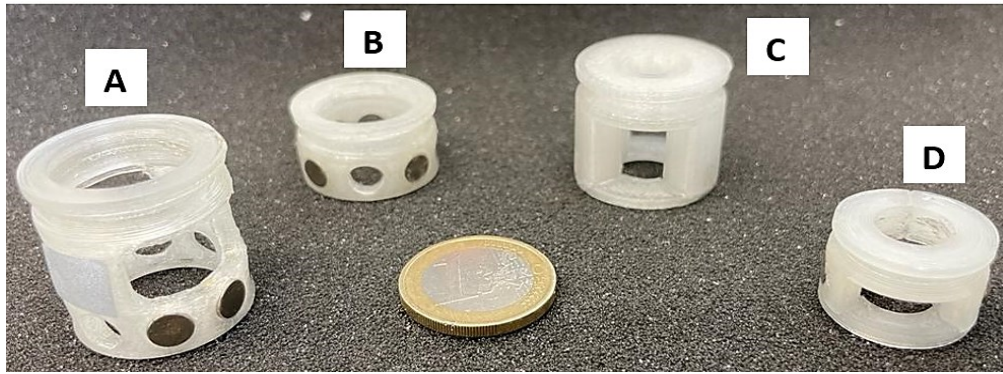
Obrázek 19. Schéma dvanácticestného selekčního ventilu a popis jednotlivých portů

Disperze roztoků uvnitř stříkačky bylo dosaženo míchacím systémem (Obrázek 20) sestávajícím z magnetického míchadla uvnitř stříkačky a z vnějšího prstence s externími magnety, který byl poháněn malým stejnosměrným motorem připojeným přes gumičku k prstenci. Motor byl připevněn k ventilu pomocí držáku vyrobeného z 3D tiskárny DeltiQ FDM z filamentu polylaktonové kyseliny.



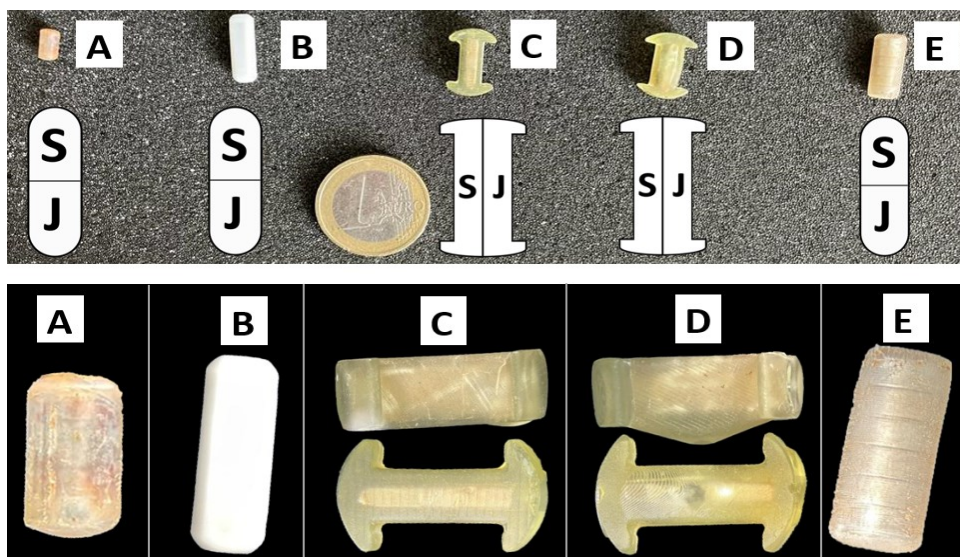
Obrázek 20. Míchací systém LIS

Pro 1ml a 5ml stříkačku byly vyrobeny různé vnější prstence s magnety (Obrázek 21A–D). V rámci optimalizací LIS se tyto prstence testovaly. Prstence byly vyrobeny 3D tiskem a lišily se velikostí, silou a počtem vnějších magnetů a jejich uspořádáním. Prstenec A byl vyroben pro 5ml stříkačku a obsahoval šest malých protilehlých neodymových magnetů vložených do prstence. Pro 5ml stříkačku byl také vyroben prstenec B, který se od prstence A lišil pouze velikostí. Prstenec B byl v experimentální části použit pouze jednou a z důvodu horší viditelnosti na MČ ve stříkačce byl ihned vyměněn za prstenec A. Pro 1ml stříkačku byly vyrobeny rovněž dva prstence – C a D. Prstenec C obsahoval dva velké protilehlé čtvercové neodymové magnety vložené uvnitř, naopak prstenec D obsahoval dva menší kruhové neodymové magnety uvnitř prstence.



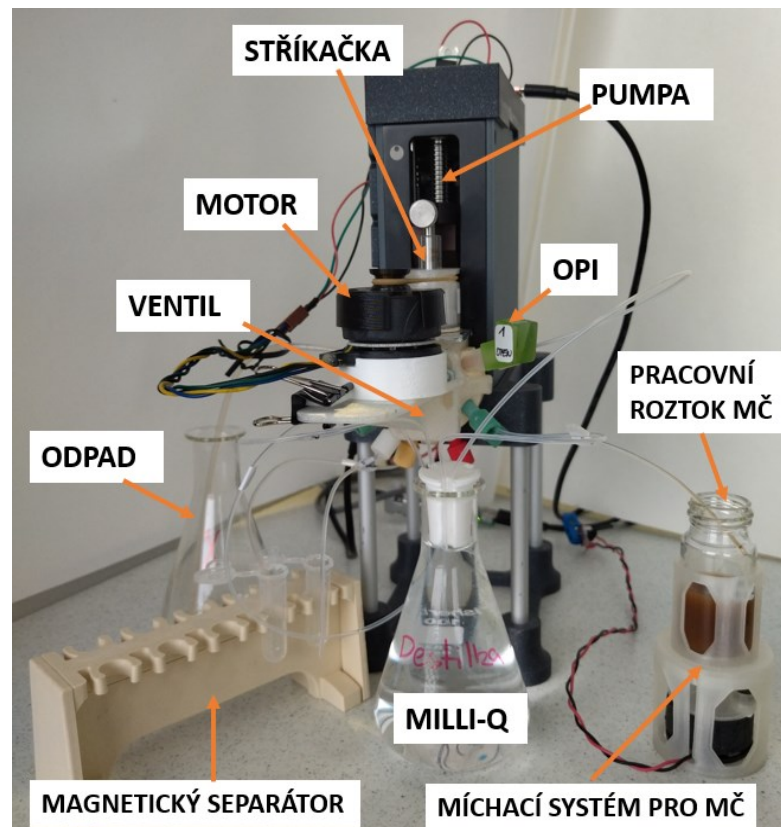
Obrázek 21. Prstence míchacího systému LIS. Prstence určené pro 5ml stříkačku – A, B; Prstence určené pro 1ml stříkačku – C, D

V rámci optimalizací byla dále testována čtyři různá magnetická míchadla u 5ml stříkačky (Obrázek 22B–E). Pro 1ml stříkačku bylo k dispozici pouze jedno magnetické míchadlo – míchadlo A, které bylo komerčně vyrobené a obsahovalo příčně uspořádané magnetické póly (Obrázek 22A). Míchadla u 5ml stříkačky se lišila tvarem, výrobou, a především silou magnetů a uspořádáním magnetických pólů. Míchadlo B bylo komerčně vyrobené, mělo tvar tyčinky a obsahovalo příčně uspořádané magnetické póly. Míchadlo C bylo vyrobeno 3D tiskem a obsahovalo podélně orientované magnetické póly. Míchadlo D bylo stejné jako míchadlo C, lišilo se pouze zvýšenou spodní plochou do špičky při pohledu z boku. Míchadlo E bylo vyrobeno spojením několika malých kulatých magnetů do tvaru tyčinky a obsahovalo příčně uspořádané magnetické póly.



Obrázek 22. Magnetická míchadla míchacího systému LIS. Míchadlo určené pro 1ml stříkačku – A; Míchadla určená pro 5ml stříkačku – B, C, D, E

V systému LIS byl rovněž druhý míchací systém, který byl součástí stojanu pro pracovní roztok MČ. Tento míchací systém zajišťoval homogenní disperzi roztoku MČ, aby byla odebírána přesná koncentrace, a také aby nedocházelo k postupnému zakoncentrování pracovního roztoku MČ. Systém fungoval na podobném principu jako hlavní míchací systém LIS. Spodní část obsahovala malý motor, na kterém byly připevněny dva magnety. Na spodní část byl nasazen horní držák pro nádobu s roztokem MČ. Do roztoku MČ bylo vloženo malé magnetické míchadlo, které se otáčelo vlivem otáčení motoru s magnety. Tento míchací systém je zobrazen na souhrnném obrázku celého systému LIS (Obrázek 23).



Obrázek 23. Části celého systému LIS a míchací systém pro pracovní roztok MČ

12.2. PŘÍPRAVA MAGNETICKÉHO IMUNOSORBENTU A IZOLACE ENDOGLINU V LAB-IN-SYRINGE

Pomocí softwaru FIALab byly naprogramovány metody pro počáteční promývání systému LIS (Tabulka 1), přípravu anti-ENG magnetického IS (Tabulka 2), izolaci ENG/sENG (Tabulka 3) a závěrečné promývání systému LIS (Tabulka 4). Programováním byl systém nadefinován přesný postup metod krok po kroku, dále byly nadefinovány přesné objemy a průtokové rychlosti aspirace a vypouštění roztoků z daných portů. V tabulkách níže jsou shrnuty jednotlivé kroky metod pro LIS s 1ml a 5ml stříkačkou. Celý program FIALab všech naprogramovaných metod s detailním postupem je součástí příloh 1–9 (přílohy).

Tabulka 1. Počáteční promývání systému LIS

Krok	Postup	Číslo portu	Objem (μl)		Průtoková rychlost (μl/s)	
			1ml	5ml	1ml	5ml
1. Oplach hadiček vodou Milli-Q	Aspirace vzduchu	12	200	700	200	400
	Aspirace vody (postupně)	3-10	150	300	100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		200	
2. Čištění OPI vodou Milli-Q	Aspirace vody	2	500		100	200
	Vypuštění do OPI	1	250		100	200
	Aspirace zpět do stříkačky	1	350		100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		200	
3. Čištění hadiček pomocí vzduchu	Aspirace vzduchu	12	510	900	200	400
	Vypuštění vzduchu (postupně)	4, 7, 8	170	300	200	400
4. Oplach hadiček pufry	Aspirace vzduchu	12	200	700	200	400
	Aspirace pufřů (postupně)	3, 5, 6, 9,10	150	300	100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		200	
5. Čištění stříkačky (2x)	Spuštění točení motoru	-	-		-	
	Aspirace vzduchu	12	200	700	200	400
	Aspirace vody	2	500	1000	100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		500	1000
	Vypnutí motoru	-	-		-	

Vysvětlivky: zelená – 1ml stříkačka, oranžová – 5ml stříkačka, bez barvy – obě stříkačky, * – vypustit celý obsah stříkačky

Tabulka 2. Příprava anti-ENG magnetického IS

Krok	Postup	Číslo portu	Objem (μl)		Průtoková rychlost (μl/s)	
1. Aspirace MČ do stříkačky	Aspirace MČ	4	Variabilní (+50 μl mrtvý objem hadičky)		50	
	Aspirace MES pufru (doplnění objemu do 1 ml)	3	Variabilní		200	
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
2. Promytí MČ MES puftrem	Aspirace MES pufru	3	300	500	100	200
	Míchání 6 s (1500 ot/min)	-	-		-	
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
3. Aktivace povrchu MČ	Aspirace aktivačních činidel EDAC a sulfo-NHS	1	200		100	
	Aspirace MES	1	200		100	
	Aspirace MES pufru (doplnění objemu do 1 ml)	3	600		200	
	Inkubace 10 minut za přerušovaného míchání	3 s míchání, 12 s pauza		4 s míchání, 10 s pauza		
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
4. Promytí MČ MES puftrem	Viz krok 2	-	-		-	
5. Vazba anti-ENG protilátek na MČ	Aspirace roztoku protilátek	1	200		100	
	Aspirace PBS pufru	3	400	800	100	200
	Inkubace 60 minut za přerušovaného míchání	3 s míchání, 12 s pauza		4 s míchání, 10 s pauza		
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
6. Eluce vazebné frakce protilátek	Vypuštění vzorku s nenavázanými protilátkami do eppendorf zkumavky	8	*		5	
7. Promytí MČ MES puftrem	Viz krok 2	-	-		-	
8. Eluce promývací frakce protilátek	Vypuštění vzorku s nenavázanými protilátkami do eppendorf zkumavky	8	*		5	
9. Kvantitativní převedení IS ze stříkačky do zkumavky	Opakování 5x: 1. Aspirace 200 μl vzduchu 2. Aspirace 400 μl PBS pufru 3. Vypuštění průtokovou rychlostí 400 μl/s za současného míchání (1500 ot/min) portem 7	Opakování 2x: 1. Zapnutí míchání 2. Aspirace 700 μl vzduchu 3. Aspirace 1000 μl PBS pufru 4. Vypnutí míchání 5. Vypuštění průtokovou rychlostí 1200 μl/s (1500 ot/min) portem 7				

Vysvětlivky: zelená – 1ml stříkačka, oranžová – 5ml stříkačka, bez barvy – obě stříkačky, * – vypustit celý obsah stříkačky

Tabulka 3. Izolace ENG/sENG

Krok	Postup	Číslo portu	Objem (μl)		Průtoková rychlost (μl/s)	
1. Aspirace IS do stříkačky	Aspirace MČ	4	Variabilní (+50 μl mrtvý objem hadičky)		50	
	Aspirace MES pufru (doplnění objemu do 1 ml)	3	Variabilní		200	
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
2. Promytí IS PBS pufrem	Aspirace PBS pufru	10	500	1000	100	200
	Míchání 6 s (1500 ot/min)	-	-		-	
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
3. Blokace povrchu stříkačky	Aspirace 0,1 % BSA v PBS	5	500	1000	100	200
	Inkubace 10 minut za přerušovaného míchání	3 s míchání, 12 s pauza		4 s míchání, 10 s pauza		
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
4. Promytí IS PBS pufrem	Viz krok 2	-	-		-	
5. Vazba ENG/sENG na IS	Aspirace roztoku ENG	1	500		100	
	Aspirace MES pufru (doplnění objemu do 1 ml)	3	500		200	
	Inkubace 60 minut za přerušovaného míchání	3 s míchání, 12 s pauza		4 s míchání, 10 s pauza		
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
6. Eluce vazebné frakce ENG	Vypuštění vzorku s nenavázaným ENG do eppendorf zkumavky	8	*		5	
7. Promytí IS 0,15M NaCl v PBS (2x)	Aspirace 0,15M v PBS	6	300	500	100	200
	Míchání 6 s (1500 ot/min)	-	-		-	
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
8. Promytí IS PBS pufrem	Viz krok 2	-	-		-	
9. Eluce ENG	Aspirace vzduchu	12	200	1000	50	200
	Aspirace elučního pufru	9	50	500-1000	100	200
	Aspirace vzduchu	12	100		50	
	Inkubace 5 minut za přerušovaného míchání	3 s míchání, 12 s pauza		4 s míchání, 10 s pauza		
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	

Krok	Postup	Číslo portu	Objem (μl)		Průtoková rychlost (μl/s)	
10. Eluce eluční frakce ENG	Vypuštění vzorku s eluovaným ENG do eppendorf zkumavky	7	*		5	
11. Regenerace IS	Aspirace elučního pufru	9	400	1000	100	200
	Míchání 6 s (1500 ot/min)	-	-		-	
	Aspirace vzduchu	12	100	500	50	200
	20 s prodleva (přitáhnutí MČ k míchadlu)	-	-		-	
	Vypuštění do odpadu	11	*		5	
12. Promytí IS PBS puftrem (2x)	Viz krok 2	-	-		-	
13. Převedení IS ze stříkačky do zkumavky	Opakování 5x: 1. Aspirace 200 μl vzduchu 2. Aspirace 400 μl PBS pufru 3. Vypuštění průtokovou rychlostí 400 μl/s za současného míchání (1500 ot/min) portem 7	Opakování 2x: 1. Zapnutí míchání 2. Aspirace 700 μl vzduchu 3. Aspirace 1000 μl PBS pufru 4. Vypnutí míchání 5. Vypuštění průtokovou rychlostí 1200 μl/s (1500 ot/min) portem 7				

Vysvětlivky: zelená – 1ml stříkačka, oranžová – 5ml stříkačka, bez barvy – obě stříkačky,
* – vypustit celý obsah stříkačky

Tabulka 4. Závěrečné promývání systému LIS

Krok	Postup	Číslo portu	Objem (μl)		Průtoková rychlost (μl/s)	
1. Oplach hadiček 20 % etanolem	Aspirace vzduchu	12	200	700	200	400
	Aspirace etanolu (postupně)	3-10	150	300	100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		200	
2. Čištění OPI 20 % etanolem	Aspirace etanolu	2	500		100	200
	Vypuštění do OPI	1	250		100	200
	Aspirace zpět do stříkačky	1	350		100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		200	
3. Oplach hadiček vodou Milli-Q	Aspirace vzduchu	12	200	700	200	400
	Aspirace vody (postupně)	3-10	150	300	100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		200	
4. Čištění OPI vodou Milli-Q	Aspirace vody	2	500		100	200
	Vypuštění do OPI	1	250		100	200
	Aspirace zpět do stříkačky	1	350		100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		200	
5. Čištění stříkačky (2x)	Spuštění točení motoru	-	-		-	
	Aspirace vzduchu	12	200	700	200	400
	Aspirace vody	2	500	1000	100	200
	Vypuštění do odpadu	11	*		500	1000
	Vypnutí motoru	-	-		-	

Vysvětlivky: zelená – 1ml stříkačka, oranžová – 5ml stříkačka, bez barvy – obě stříkačky,
* – vypustit celý obsah stříkačky

13. VÝSLEDKY A DISKUZE

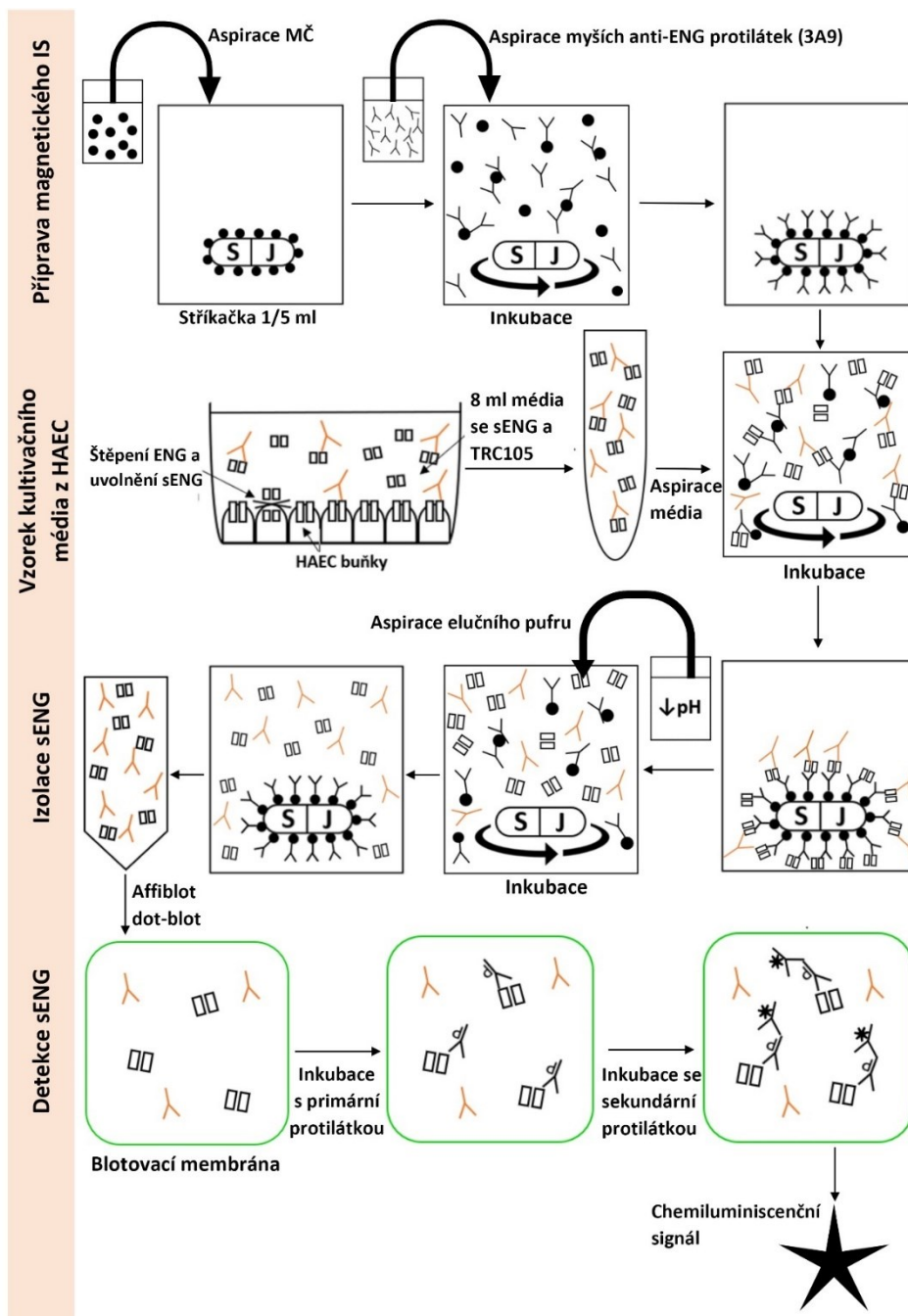
Metody přípravy magnetického IS a izolace proteinu pomocí magnetického IS mohou být provedeny vsádkově, tedy manuálně pomocí magnetického separátoru, vortexu, rotátoru, zkumavek a pipet, nebo automatizovaně pomocí instrumentální metody. Automatizované metody jsou na rozdíl od metod ve vsádkovém provedení reprodukovatelnější, zejména s ohledem na dodržení inkubačních časů a jednotlivých kroků, další výhodou je časová úspora a minimalizování chyb způsobených lidským faktorem.

Technika LIS byla v experimentální části této diplomové práce použita pro vývoj automatizované metody přípravy anti-ENG magnetického IS v 1ml a 5ml stříkačce, tedy pro kovalentní vazbu anti-ENG protilátek na povrch MČ. Dále byla v LIS vyvinuta automatizovaná metoda pro izolaci lidského sENG ze vzorku kultivačního média HAEC, které zároveň obsahuje léčivo TRC105 způsobující interferenci během detekce a stanovení sENG například pomocí metody ELISA. Vzorky z LIS byly hodnoceny semikvantitativně metodou dot blot na affiblotu, přičemž byly před samotnou analýzou vzorků nejprve otestovány tři nové prototypy zařízení affiblotu. Bylo provedeno několik experimentů, a poté byl k analýze vybrán prototyp s nevhodnějšími parametry.

Velkou část experimentální části této diplomové práce představovaly optimalizace pro převedení metod z 1ml do 5ml stříkačky v LIS, tedy do většího objemu. Vzhledem k rozměrům 5ml stříkačky, která je dvakrát širší než 1ml stříkačka, fungovaly některé kroky jinak, a proto bylo nutné nastavit nové podmínky metody. Například to znamenalo zvýšení objemů roztoků, větší mrtvý objem a větší magnetické míchadlo. Zároveň čas potřebný na provedení jedné metody se prodloužil, protože vypuštění většího objemu roztoku trvá mnohem déle. Na druhou stranu, větší stříkačka umožňuje během jednoho spuštění přípravu většího množství magnetického IS, respektive izolaci sENG z velkého objemu kultivačního média. Izolace sENG totiž měla být provedena z 8 ml kultivačního média, což by v 1ml stříkačce muselo být provedeno až osmkrát.

Po optimalizaci metod v LIS bylo třeba metody otestovat s reálnými vzorky. Prvním úkolem bylo připravit anti-ENG magnetický IS v 5ml stříkačce do zásoby a pomocí affiblotu zhodnotit vazbu anti-ENG protilátek na MČ. Zásobní roztok anti-ENG magnetického IS byl uchován pro následnou metodu izolace ENG/sENG. Hlavním cílem bylo metodu využít pro izolaci 10 ng sENG z 8 ml kultivačního média s obsahem interference TRC105 v LIS s 5ml stříkačkou a výsledky hodnotit opět pomocí affiblotu. Princip izolace sENG z média a jeho následné detekce je zobrazeno pomocí schématu (Obrázek 24). Před touto finální izolací bylo ale nejprve potřeba otestovat, zda vazba ENG/sENG na anti-ENG magnetický IS funguje. Byl navrhnout plán izolace podle následujících bodů:

- Izolace rekombinantního lidského ENG z PBS pufru
- Izolace rekombinantního lidského ENG z kultivačního média (obsahuje i další proteiny)
- Izolace sENG uvolněného z HAEC do kultivačního média s obsahem TRC105 o objemu 8 ml



Obrázek 24. Schematické znázornění izolace sENG z kultivačního média HAEC pomocí magnetického IS. Vysvětlivky: \square = membránový ENG, \square = sENG, Υ = TRC105, Υ = anti-ENG protilátka 3A9, Υ_p = primární protilátka, Υ_* = sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou

13.1. TESTOVÁNÍ PROTOTYPŮ AFFIBLOTU

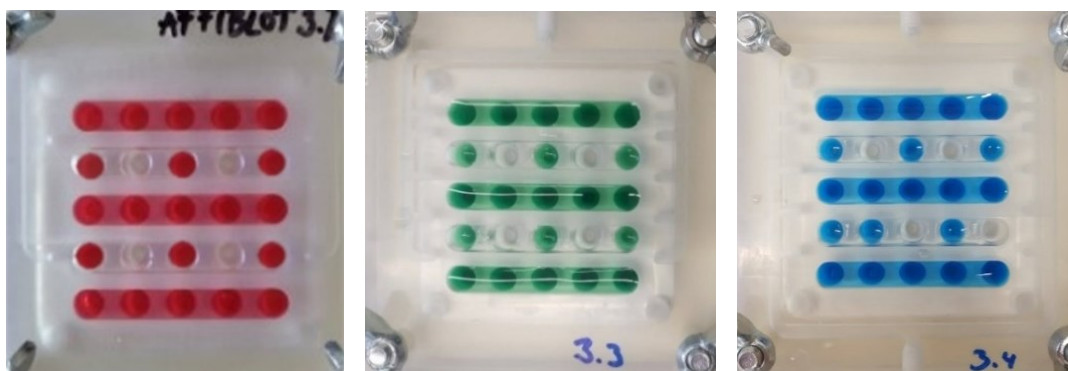
K testování byly k dispozici tři nové prototypy affiblotu – prototyp 3.2, 3.3 a 3.4. Pro spolehlivou analýzu na affiblotu je důležité, aby aparatura splňovala požadované parametry, aby během analýzy nedocházelo například k úniku kapaliny, ke kontaminaci sousedních jamek reagensy nebo k problémům s odtahem kapaliny. Zároveň je žádoucí aby odtah kapaliny přes spodní i horní vývod byl rychlý, z důvodu šetření času v průběhu analýzy.

Testování prototypů affiblotu zahrnovalo:

- Ověření funkčnosti všech částí affiblotu
- Ověření, zda nepodtéká kapalina pod jamkami nebo zda nevytéká z aparatury (funkčnost těsnění)
- Ověření, zda nevytéká kapalina samovolně do kanálků či sousedních jamek
- Sledování rychlosti odtahu kapaliny spodním a horním odtahem

13.1.1. TESTOVÁNÍ PROTOTYPŮ AFFIBLOTU POMOCÍ BARVIV

K těmto experimentům byla použita potravinářská barviva pro zviditelnění jednotlivých kroků. Prototyp 3.2 byl otestován červeným barvivem, 3.3 zeleným barvivem a 3.4 modrým barvivem. Hlavním cílem tohoto experimentu bylo ověřit případné samovolné vytékání kapaliny do kanálků, do sousedních jamek nebo z aparatury. Barvivo bylo nadávkováno do jamek a rezervoárů podle schématu (Obrázek 25) a pozorovalo se, zda se zbarví místa bez nadávkovaného barviva. Poté bylo barvivo doplněno do rezervoárů tak, aby v každém rezervoáru byl 1 ml barviva. Dalším bodem tohoto experimentu bylo sledování funkčnosti spodního a horního odtahu kapaliny (konkrétně 1 ml barviva v každém rezervoáru) a měření času stopkami.



Obrázek 25. Schéma dávkování barviva pro sledování úniku kapaliny z aparatury affiblotu

Z experimentů pomocí barviv byly nalezeny některé nedostatky u prototypů 3.2 a 3.4 (Tabulka 5). U prototypu 3.2, který má kolektorové kanálky s nejmenší šířkou, je horní odtah kapaliny příliš pomalý, u prototypu 3.4 s nejširšími kolektorovými kanálky dochází naopak k samovolnému úniku kapaliny z jamek do kolektorových kanálků. Požadované parametry splňoval nejlépe prototyp 3.3, který byl vybrán k dalšímu testování.

Tabulka 5. Shrnutí testování prototypů affiblotu pomocí barviv

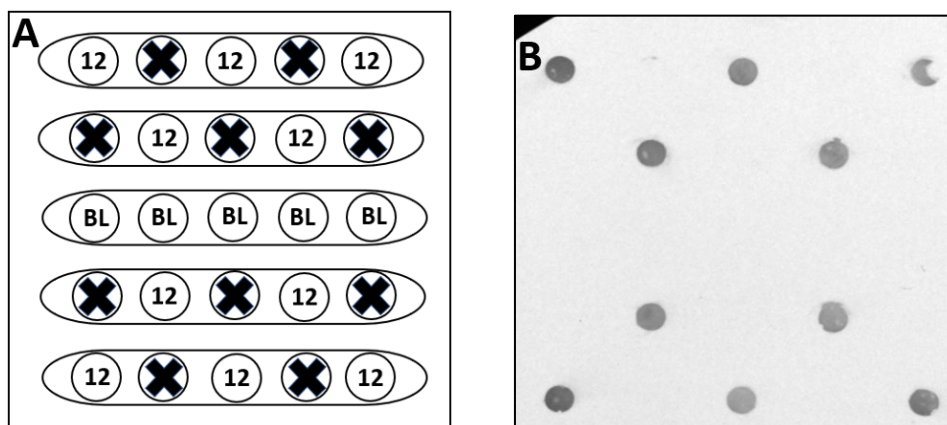
PROTOTYP AFFIBLOTU	SPODNÍ ODTAH KAPALINY	HORNÍ ODTAH KAPALINY	SAMOVLNÉ VYTĚKÁNÍ KAPALINY
3.2	46 s	28 s	Ne
3.3	46 s	14 s	Ne
3.4	46 s	14 s	Do kolektorových kanálků

13.1.2. TESTOVÁNÍ PROTOTYPU 3.3 METODOU DOT BLOT

Cílem tohoto testování bylo znovu ověřit požadované parametry pro affiblot prototypu 3.3. Dále se testovalo, zda je prototyp 3.3 spolehlivý pro metodu dot blot.

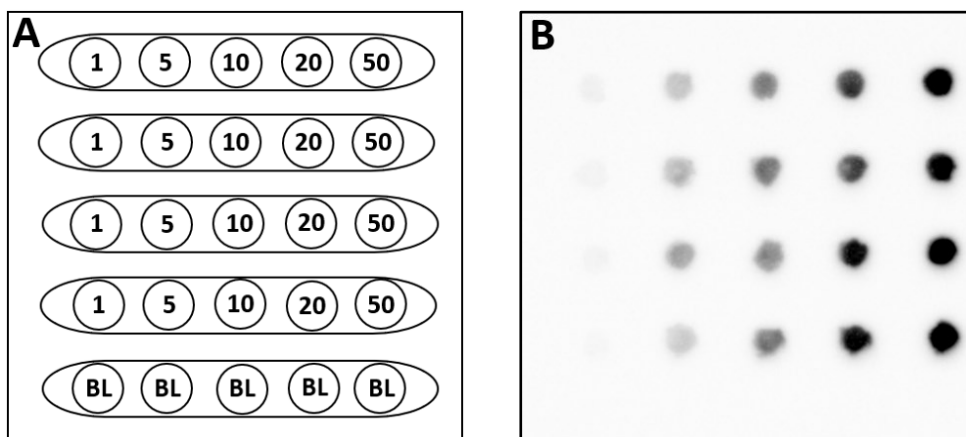
Byly provedeny experimenty, u kterých byla použita králičí polyklonální anti-ENG protilátka (H-300), která byla nanášena na membránu podle různých schémat. Protilátka představovala tedy antigen, který byl posléze detekován konjugátem – kozí polyklonální anti-králičí IgG protilátkou značenou křenovou peroxidázou (7074S) ředěnou v poměru 1:5000.

V prvním experimentu byl antigen naředěn v PBS pufru na požadovanou koncentraci 12 $\mu\text{g/ml}$ (1,2 $\mu\text{g/jamku}$) a byl nadávkován na membránu podle schématu (Obrázek 26A). Detekce antigenu probíhala kolorimetricky v ChemiDoc MP imaging a příslušné skvrny byly kvantifikovány v ImageLab. Jamky bez antigenu mezi jamkami s nadávkováným antigenem sloužily jako kontrola přetékání reagensů do sousedních jamek, což by se projevilo jejich zbarvením a zvýšením signálu oproti slepým vzorkům. Z výsledné fotografie membrány (Obrázek 26B) je patrné, že k tomuto problému nedocházelo. Po kvantifikaci byla intenzita skvrn slepého vzorku $21\,388\,597 \pm 470\,704$ (CV=2 %) a skvrny bez antigenu měly intenzitu $21\,338\,255 \pm 1\,118\,484$ (CV=5 %), tedy jejich průměrné intenzity se významně nelišily.



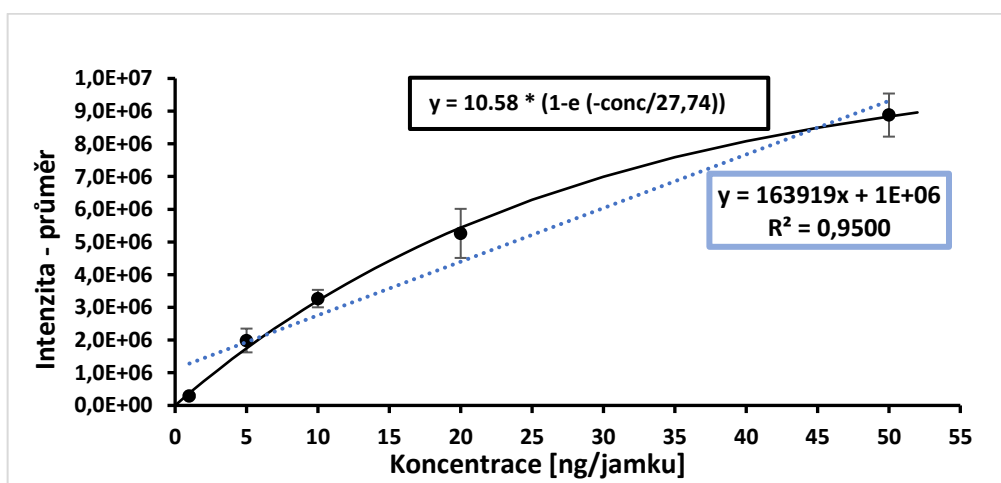
Obrázek 26. První experiment pro testování affiblotu prototypu 3.3. A: Schéma dávkování antigenu. B: Fotografie PVDF membrány s chemiluminiscenční detekcí v ChemiDoc MP imaging. BL – slepý vzorek, X – kontrolní jamka, do které nebyl dávkován antigen, 12 – jamka s nadávkováným antigenem o koncentraci 1,2 $\mu\text{g/jamku}$

Ve druhém experimentu byla provedena koncentrační řada stejného antigenu pomocí pěti různých koncentrací ve čtyřech opakováních. Antigen byl naředěn v PBS pufru a dávkován na membránu podle schématu (Obrázek 27A). Detekce antigenu probíhala chemiluminiscenčně v ChemiDoc MP imaging, kde byla rovněž pořízena fotografie membrány a skvrny byly kvantifikovány v ImageLab. Z výsledné fotografie membrány (Obrázek 27B) je patrné, že s rostoucí koncentrací stoupá intenzita signálu.



Obrázek 27. Druhý experiment pro testování affiblotu prototypu 3.3. A: Schéma dávkování antigenu koncentrační řady 1–5–10–20–50 ng/jamku. B: Fotografie PVDF membrány s chemiluminiscenční detekcí v ChemiDoc MP imaging

Graf zobrazuje kalibrační křivku závislosti intenzity na zvyšující se koncentraci antigenu. Intenzita nestoupá lineárně a u 50 ng/jamku bylo již patrné klesání intenzity, pravděpodobně způsobeno hook efektem. Jelikož bylo zvoleno příliš široké rozmezí koncentrace antigenu, závislost tedy lépe zobrazuje saturační křivka (Obrázek 28).



Obrázek 28. Graf závislosti průměrné intenzity skvrn na koncentraci antigenu

Během testování prototypu 3.3. metodou dot blot byla mimo jiné ověřena funkčnost spodního a horního odtahu kapaliny. Drobné potíže s odtahem, které se ojediněle objevily u některých jamek se při dalším používání zařízení nepotvrdily. Prototyp affiblotu 3.3 byl proto zvolen jako detekční systém pro analýzu vzorků z LIS pro chemiluminiscenční detekci protilátek a ENG v jednotkách ng/jamku.

13.2. OPTIMALIZACE LAB-IN-SYRINGE S 1ML STŘÍKAČKOU

Metoda pro přípravu magnetického IS v LIS s 1ml stříkačkou byla již provedena v rámci diplomové práce, ve které byl v experimentální části připraven anti-COVID magnetický IS [66]. V této diplomové práci byla použita stejná 1ml stříkačka, stejné magnetické míchadlo i stejný míchací systém, vycházelo se tedy z této diplomové práce, přičemž byly dále upraveny některé podmínky metody. V rámci optimalizací bylo provedeno několik experimentů, u kterých byl použit PBS pufr, pracovní roztok MČ Sera-Mag (karboxylované, průměrná velikost 1 μm) o koncentraci 1 mg/ml, jednoduchý magnetický separátor vyrobený 3D tiskem a spektrofotometr pro měření absorbance vzorků. Optimalizace se týkaly otáček motoru, doby sedimentace MČ na magnetické míchadlo před vypuštěním roztoku, průtokové rychlosti vypuštění roztoku s MČ uvnitř stříkačky, výběru vhodného prstence míchacího systému (prsteneček C, prsteneček D) a objemu elučního pufru.

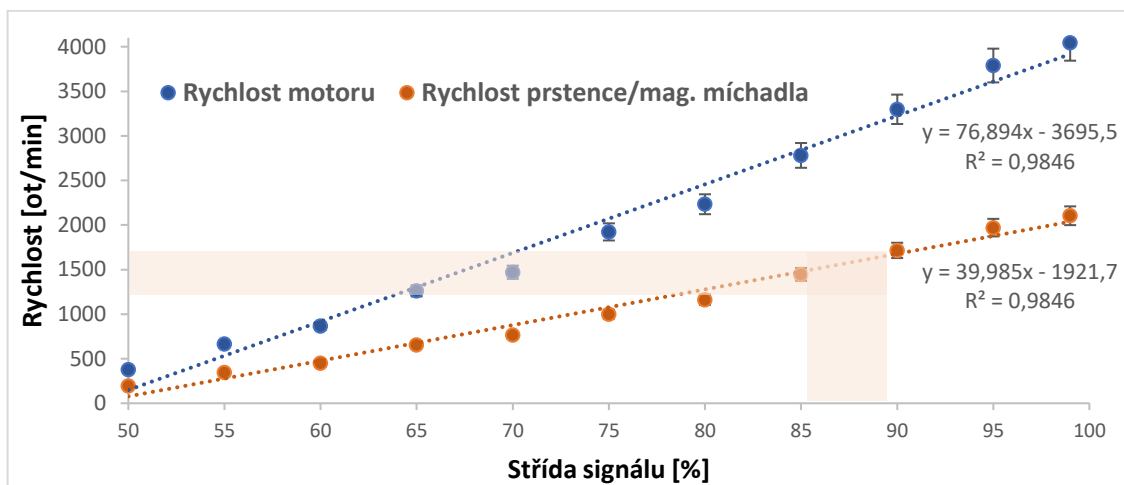
13.2.1. OPTIMALIZACE OTÁČEK MOTORU

Prvním úkolem bylo upravit nastavení v ovládacím panelu pro rychlost otáčení motoru, a tedy i prstence a magnetického míchadla. K malému motoru míchacího systému je přiváděno napětí, což je ovládáno počítačem přes čip s modulací šířky pulzu a podle hodnoty takzvané střídy signálu je regulována rychlost točení motoru. Střída signálu je udávána v rozsahu 0–99 % a určuje procento pracovního cyklu určující dobu, po kterou je dodáváno napětí do motoru v rámci jednoho cyklu. Čím vyšší je tedy procentuální hodnota, tím rychleji se motor otáčí.

Na optimální rychlosti motoru závisí správná rychlost točení prstence a magnetického míchadla, která musí být nastavena tak, aby docházelo ke vznosu všech MČ a jejich rozptýlu do roztoku pomocí odstředivé síly. Zároveň, při nadbytečně vysoké rychlosti by mohlo docházet k jejich mechanickému poškození. V diplomové práci [66] byla tato rychlost již optimalizována a byla manuálně stanovena na 1500 ot/min. V rámci této diplomové práce byl používán jiný ovládací panel pro motor, v němž bylo možné regulovat rychlost motoru nastavením procentuální hodnoty střídy signálu přes

software. Hledala se tedy hodnota střídání signálu, která by odpovídala rychlosti 1500 ot/min.

Na motor se nalepil reflexní štítek a během otáčení motoru, byla jeho reflexe zaznamenávána laserovým tachometrem. V ovládacím panelu byla postupně měněna hodnota střídání signálu v rozmezí 50–99 % a byla měřena rychlost u každé střídání signálu ve třech opakováních. Rychlost otáčení prstence byla zjištěna vynásobením rychlosti otáčení motoru faktorem $F=0,52$. 1500 ot/min odpovídalo hodnotám střídání signálu v rozmezí 85–90 %, ve všech krocích metod byla poté nastavena na 88 % (Obrázek 29).



Obrázek 29. Graf závislosti rychlosti točení motoru na střídě signálu. Oranžová barva označuje oblast střídání signálu odpovídající rychlosti kolem 1500 ot/min

13.2.2. OPTIMALIZACE PRO MINIMALIZOVÁNÍ ZTRÁT ČÁSTIC A VÝBĚR PRSTENCE MÍCHACÍHO SYSTÉMU

K největším ztrátám MČ dochází během kroku vypouštění roztoku, kdy je potřeba zajistit, aby co nejvíce MČ zůstalo uvnitř stříkačky. MČ musí být ponecháno dostatek času k tomu, aby se stihly přitáhnout na magnetické míchadlo (sedimentace MČ na míchadlo), a zároveň je potřeba nastavit dostatečně nízkou průtokovou rychlost pro vypouštění roztoku.

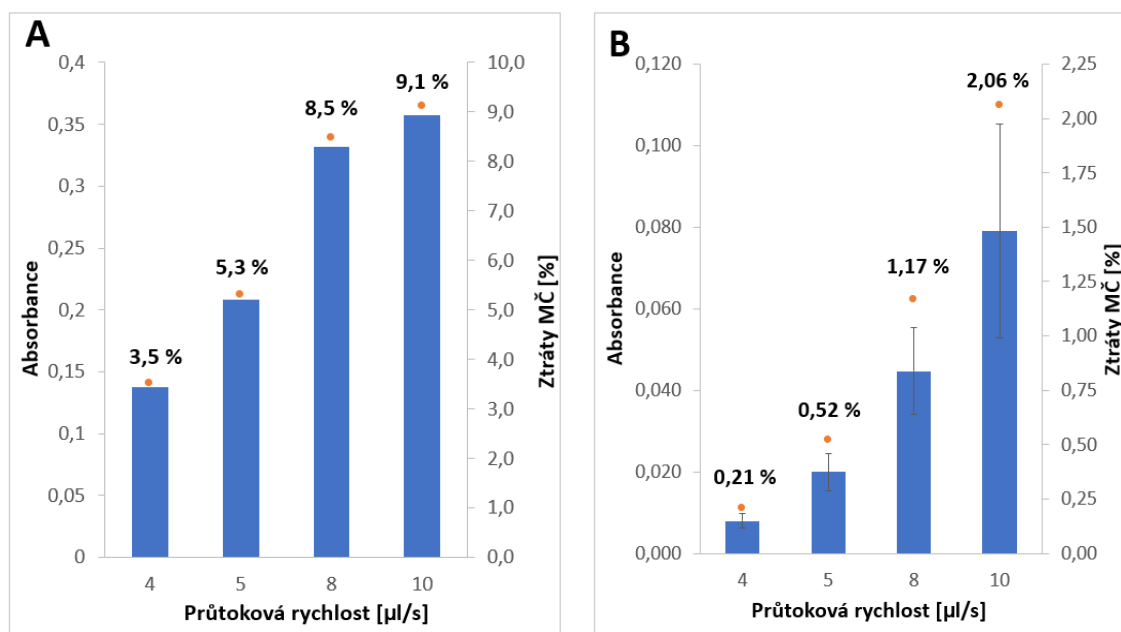
V rámci této optimalizace byla nejdříve hledána průtoková rychlost vypouštění roztoku, při které dochází k minimálním ztrátám MČ, ale zároveň, při které netrvá tento

krok příliš dlouho. Vzhledem k počtu opakování kroku v metodě, by metoda s příliš pomalou rychlostí byla časově náročná.

Dalším úkolem během této optimalizace bylo otestovat dva typy prstenců s magnety (prsteneček C, prsteneček D), které jsou součástí míchacího systému. Prstence jsou popsány v kapitole 12.1. (Obrázek 21).

Pracovalo se s 0,4 mg MČ, které byly aspirovány do stříkačky z pracovního roztoku MČ Sera-Mag o koncentraci 1 mg/ml (~ 400 μ l). Do stříkačky bylo dále přidáno 400 μ l PBS pufru a 100 μ l vzduchu. Po zamíchání MČ byl PBS pufr vypuštěn určitou průtokovou rychlostí, byly zkoušeny rychlosti: 4, 5, 8 a 10 μ l/s. U každé rychlosti byly vzorky pufru eluovány do zkumavek a měřila se absorbance vzorků při 600 nm, což je absorpční maximum MČ. Absorbance vzorků je přímo úměrná množství ztracených MČ v pufru. Absorbance vzorků byly porovnány s absorbancí kontrolního vzorku, který byl připraven odebráním 0,4 mg MČ přímo z pracovního roztoku (ředění 3:7). Tento experiment byl proveden u obou testovaných prstenců, které byly porovnány.

Podle grafů (Obrázek 30A, B) je patrný růst absorbance a procentuálních ztrát MČ se zvyšující se průtokovou rychlostí. Zároveň grafy zobrazují celkově mnohem nižší ztráty MČ u prstenečku C. Prsteneček C byl vyroben s většími magnety, které napomáhaly snižovat ztráty MČ, tím že byly přitáhnuty kromě na magnetické míchadlo také na stěnu stříkačky.



Obrázek 30. Závislost absorbance/ztrát MČ [%] na průtokové rychlosti [μ l/s] vypuštění pufru u 1ml stříkačky. A: Ztráty MČ u prstenečku D. B: Ztráty MČ u prstenečku C

Nakonec bylo také testováno, zda lze snížit možné ztráty MČ tím, že se MČ ponechá čas k sedimentaci k magnetickému míchadlu před vypuštěním roztoku. Pracovalo se opět s 0,4 mg MČ a 400 μ l PBS pufru a byly zkoušeny časy 0, 20, 40 a 60 s před vypuštěním pufru průtokovou rychlostí 5 μ l/s. U všech vzorků se změřila absorbance při 600 nm a vzorky byly porovnány s kontrolním vzorkem. Během této optimalizace bylo zjištěno, že se procentuální hodnoty ztrát MČ u různých časů sedimentace mezi sebou téměř neliší, doba sedimentace nemá tedy vliv na ztráty MČ. Sedimentace byla v metodách proto stanovena na 0 s, tedy byla vynechána.

Závěrem těchto optimalizací bylo nastavení průtokové rychlosti na 5 μ l/s, aby byly minimalizovány ztráty MČ, přičemž s vynechanou dobou sedimentace před vypuštěním roztoku je zároveň minimalizována časová náročnost tohoto kroku. K provedení finálních metod v LIS s 1ml stříkačkou byl vybrán prsteneček C.

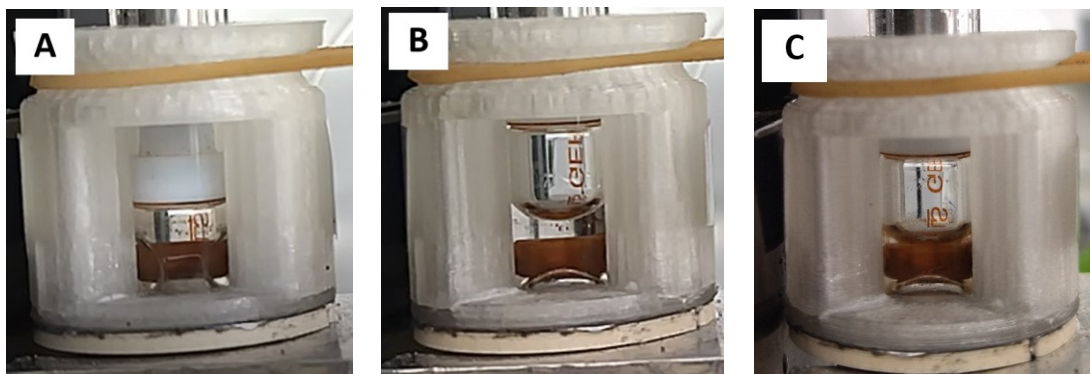
13.2.3. OPTIMALIZACE OBJEMU ELUČNÍHO PUFRU

Důležitým krokem v metodě izolace sENG je jeho eluce z magnetického IS pomocí pufru o nízkém pH. Cílem bylo najít nejnižší možný objem elučního pufru, aby byl izolovaný sENG dostatečně zakoncentrován a jeho detekce byla citlivější. Zároveň bylo nutné zvolit objem tak, aby byl magnetický IS zcela v kontaktu s elučním pufrem.

Do stříkačky bylo aspirováno 0,4 mg MČ a byl vypuštěn roztok průtokovou rychlostí 5 μ l/s, k MČ byl poté do stříkačky aspirován vzduch o objemu 200 μ l. Následně byly postupně aspirovány testované objemy PBS pufru a vzduchu, který se nacházel pod pufrem u ústí stříkačky (Obrázek 31A, B, C). Podle okometrického hodnocení byla vybrána vhodná kombinace objemů pufru a vzduchu u ústí stříkačky. Jako dostatečný a optimální byl zvolen objem elučního pufru 50 μ l v kombinaci se 100 μ l vzduchu. Aspirovaný vzduch pod pufrem pozvedne pufr směrem k magnetickému míchadlu a magnetický IS je proto dostatečně v kontaktu s elučním pufrem.

Vzduch pod pufrem nebo jiným roztokem u 1ml stříkačky celkově takto napomáhá možnosti použití menšího objemu roztoků v celém postupu metody, ale také zajišťuje

snížení ztrát MČ, které by se bez tohoto vzduchu nacházely pod míchadlem a byly vypuštěny do odpadu.



Obrázek 31. Optimalizace objemu elučního pufu u 1ml stříkačky. A: 100 μ l pufu, 0 μ l vzduchu u ústí stříkačky. B: 100 μ l pufu, 100 μ l vzduchu u ústí stříkačky. C: 50 μ l pufu, 100 μ l vzduchu u ústí stříkačky

13.3. PŘEVEDENÍ METOD DO LAB-IN-SYRINGE S 5ML STŘÍKAČKOU

Pro optimalizace LIS s 5ml stříkačkou se používal opět pouze PBS puf, pracovní roztok MČ Sera-Mag o koncentraci 1 mg/ml, magnetický separátor a spektrofotometr. Nové optimalizace se týkaly otáček motoru, postupu kvantitativního převedení MČ ze stříkačky do zkumavky, výběru vhodného magnetického míchadla (míchadlo B, C, D, E), průtokové rychlosti vypuštění roztoku, objemu elučního pufu, a nakonec byla otestována síla magnetu míchadla D.

13.3.1. OPTIMALIZACE OTÁČEK MOTORU

Prvním krokem po výměně 1ml stříkačky za 5ml stříkačku bylo ověření, jakým způsobem se změnila rychlost točení prstence a magnetického míchadla se stejnou hodnotou střídy signálu.

Byly vybrány čtyři hodnoty střídy signálu, u kterých se měřila rychlost otáčení laserovým tachometrem zaznamenávajícím reflexi štítku přímo na prstenci. Bylo zjištěno, že u 5ml stříkačky se rychlosti otáčení snížily v porovnání s rychlostmi u 1ml stříkačky (Tabulka 6). Střída signálu byla nastavena na maximální možnou hodnotu, tedy na 99 %, protože odpovídala rychlosti 1500 ot/min.

Tabulka 6. Srovnání rychlostí otáčení prstence u 1ml stříkačky a 5ml stříkačky závislých na střídě signálu

Střída signálu [%]	Rychlost otáčení prstence [ot/min] u 1ml stříkačky	Rychlost otáčení prstence [ot/min] u 5ml stříkačky
50	339	0 (motor nereagoval)
75	1021	825
88	1568	1200
99	2243	1505

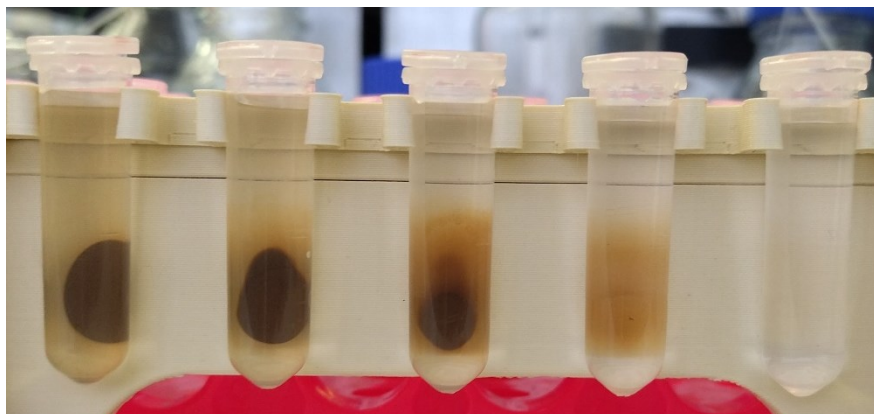
13.3.2. OPTIMALIZACE KVANTITATIVNÍHO PŘEVEDENÍ MAGNETICKÝCH ČÁSTIC Z LAB-IN-SYRINGE DO ZKUMAVKY

Výměna stříkačky také obnášela novou optimalizaci postupu konečného kroku pro získání MČ vymytím stříkačky pomocí PBS pufru. Nejdříve byl vyzkoušen postup pro 1ml stříkačku, což bylo optimalizováno v předchozí DP [66]. Postup zahrnoval následující parametry: PBS pufr v objemu 400 μ l, 200 μ l vzduchu, vypouštění za stálého míchání, v opakování 5x, průtoková rychlost vypuštění 400 μ l/s. V 5ml stříkačce takto zůstávalo mnoho MČ na magnetickém míchadle, a navíc také zůstávalo ve stříkačce velké množství kapaliny. Výsledný objem získaného roztoku MČ nebyl tedy 2 ml, ale cca 1,5 ml.

V rámci této optimalizace bylo aspirováno do stříkačky 0,5 mg MČ z pracovního roztoku o koncentraci 1 mg/ml (~ 500 μ l). Poté byl vypuštěn roztok průtokovou rychlostí 5 μ l/s a MČ byly ponechány uvnitř stříkačky. Pro získání MČ bylo zkoušeno několik různých kombinací parametrů týkajících se objemu vzduchu (v rozmezí 200–700 μ l), PBS pufru (3x 700 μ l, 2x 1000 μ l, 4x 500 μ l), průtokových rychlostí vypuštění (v rozmezí 400–1200 μ l/s), počtu opakování (2–5x) a zapnutí/vypnutí míchání. Okometricky se poté hodnotilo množství MČ ve zkumavce ve srovnání s kontrolním vzorkem a množstvím MČ, které zůstalo uvnitř stříkačky.

Nejoptimálnějšího výsledku bylo nakonec dosaženo u následujícího postupu: Objem aspirovaného vzduchu byl zvýšen na 700 μ l, objem PBS pufru byl zvýšen na 2x 1000 μ l, míchání bylo spuštěno před aspirací PBS pufru a zastaveno těsně před vypuštěním a s minimální prodlevou, aby MČ neměly čas se přitáhnout zpět k míchadlu. PBS pufr s MČ nebylo možné u široké 5ml stříkačky míchat současně s vypouštěním jako u 1ml stříkačky, protože v široké stříkačce je mnohem větší mrtvý objem po stranách stříkačky, kde během míchání zůstává nejvíce PBS pufru. Průtoková rychlost vypuštění

byla zvýšena až na 1200 $\mu\text{l/s}$. Tento postup je dostačující provést jednou s množstvím MČ 0,5 mg, ale při větším množství MČ je potřeba vždy počet opakování navýšit, dokud nejsou MČ kvantitativně převedeny ze stříkačky do zkumavky. Například u 20 mg MČ je potřeba tento postup zopakovat 4x (Obrázek 32).



Obrázek 32. Kvantitativní převedení 20 mg MČ z LIS s 5ml stříkačkou do zkumavky. Opakování postupu (zleva) 1x až 5x, po pátém zopakování se v pufru již nenacházely MČ

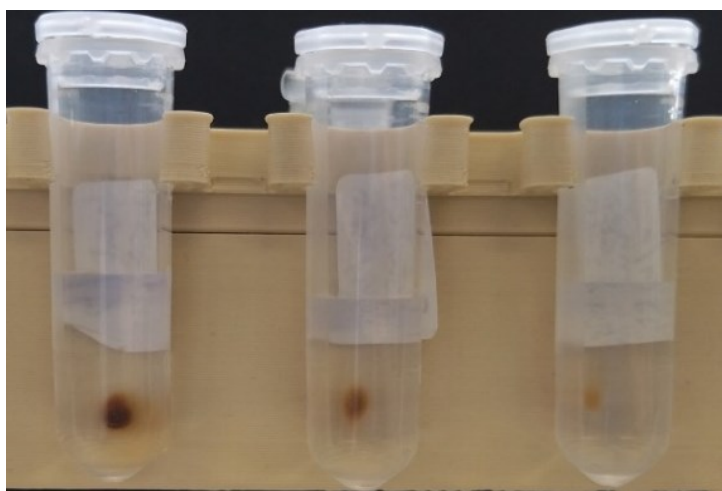
13.3.3. VÝBĚR MAGNETICKÉHO MÍCHADLA

V rámci optimalizací LIS s 5ml stříkačkou bylo hlavním úkolem otestovat čtyři různá magnetická míchadla (míchadlo B, C, D, E), která jsou popsána v kapitole 12.1. (Obrázek 22). U magnetického míchadla bylo důležité, aby obsahovalo dostatečně silný magnet, aby při pomalém vypouštění roztoku nedocházelo k výrazným ztrátám MČ. Zároveň bylo žádoucí, aby MČ nezůstávaly příliš pevně přitáhnuty k magnetickému míchadlu, protože by se tím snižoval výtěžek při získávání magnetického IS. Hodnotily se tedy dva parametry – ztráty MČ během vypouštění roztoku a výtěžek MČ po jejich kvantitativním převedení ze stříkačky do zkumavky.

Pro hodnocení ztrát MČ se do stříkačky aspirovalo 0,5 mg MČ (~ 500 μl), 500 μl vzduchu a 500 μl PBS pufru. Spustilo se míchání na 6 s a pufr byl vypuštěn do zkumavky rychlostí 4 $\mu\text{l/s}$. Navíc byla poté přidána 20s sedimentace MČ před vypuštěním pufru, protože se předpokládalo, že ve větším objemu potřebují MČ více času k přitáhnutí na magnetické míchadlo. Během tohoto experimentu bylo také zjištěno, že v 5ml stříkačce nelze aspirovat vzduch pod roztok jako u 1ml stříkačky, protože se vzduch v takto široké stříkačce neudrží u ústí stříkačky. Přidaná 20s sedimentace MČ před

vypuštěním roztoku slouží tedy také k eliminaci ztrát MČ nacházejících se pod míchadlem.

Okometricky byly hodnoceny ztráty MČ v pufru (Obrázek 33). U míchadla B docházelo k velmi vysokým ztrátám MČ, jelikož obsahovalo velmi slabý magnet, nebylo tedy již dále testováno. U míchadla C byly ztráty MČ mnohem menší a v kombinaci s 20s sedimentací byly minimální. U míchadla D a E bylo dosaženo podobného výsledku jako u míchadla C.







Obrázek 33. Testování míchadla B a C u 5ml stříkačky pomocí ztrát MČ při vypuštění pufru průtokovou rychlostí 4 $\mu\text{l/s}$. Vlevo – ztráty u magnetického míchadla B se sedimentací 20 s před vypuštěním. Uprostřed – ztráty u magnetického míchadla C bez sedimentace před vypuštěním. Vpravo – ztráty u magnetického míchadla C se sedimentací 20 s před vypuštěním

Hodnocení výtěžku MČ po kvantitativním převedení MČ ze stříkačky do zkumavky bylo provedeno pomocí 0,5 mg MČ, které byly získány optimalizovaným postupem (viz kapitola 13.3.2.). Byla změřena absorbance vzorků získaných MČ, která byla porovnána s absorbancí kontrolního vzorku (ředění 2:8).

Míchadla C a D obsahovala velmi silný magnet s nejsilnějším magnetickým polem uprostřed, předpokládalo se tedy, že při jejich použití bude mírně komplikované získat MČ ze stříkačky. Tato dvě míchadla se mezi sebou příliš nelišila, jediným rozdílem byl tvar spodní plochy směřované k ventilu. Míchadlo D bylo vyrobeno s vyvýšeným středem do tvaru špičky za účelem možného zvýšení výtěžku MČ, což potvrdily výsledky z měření absorbance (Tabulka 7). Podle tabulky 7 bylo nejlepšího výsledku dosaženo

tedy u míchadla D, ale také u míchadla E a obě míchadla byla vybrána k provedení metod v 5ml stříkačce.

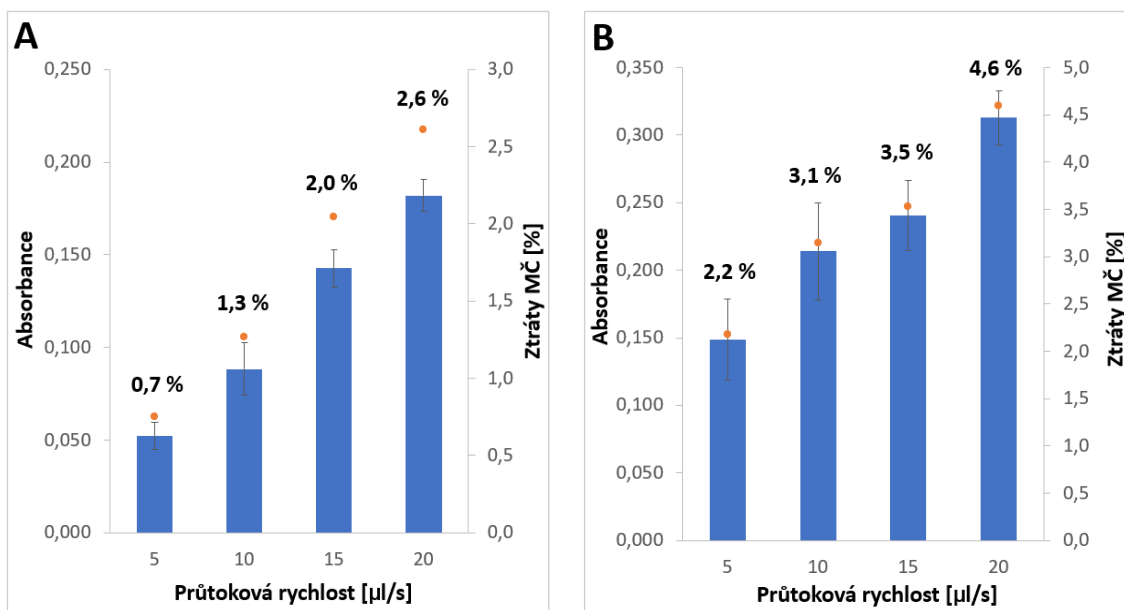
Tabulka 7. Shrnutí výsledků z měření absorpance vzorků získaných MČ a hodnocení výtěžku [%]

Magnetické míchadlo	Absorbance kontrolního vzorku	Absorbance vzorku			Průměr	SD	CV (%)	Výtěžek (%)
		1	2	3				
B 	-	-	-	-	-	-	-	Netestováno
C 	1,409	1,210	1,146	1,146	1,167	0,037	3,2	83
D 	1,361	1,259	1,222	1,264	1,248	0,023	1,8	92
E 	1,286	1,204	1,176	1,245	1,208	0,035	2,9	94

13.3.4. OPTIMALIZACE PRŮTOKOVÉ RYCHLOSTI VYPOUŠTĚNÍ ROZTOKU

U míchadla D a E byla dále optimalizována průtoková rychlost vypouštění roztoku pro minimalizování ztrát MČ. Optimalizace byla provedena s 0,5 mg MČ, 500 µl PBS pufru a 500 µl vzduchu. Zkoušely se průtokové rychlosti 5, 10, 15 a 20 µl/s a u každé testované rychlosti byla před vypuštěním ponechána 20s sedimentace MČ na míchadlo. Změřená absorpance vzorků (600 nm) se ztrátami MČ v pufru byla porovnána s absorbancí kontrolního vzorku (ředění 2:8) a byly spočítány procentuální ztráty MČ.

Z grafů (Obrázek 34A, B) je vidět, že s rostoucí průtokovou rychlostí stoupají také procentuální ztráty MČ, přičemž u míchadla D se silnějším magnetem jsou ztráty očekávaně celkově nižší. Jako optimální byla vybrána průtoková rychlost 5 µl/s u obou míchadel pro minimalizování ztrát MČ. Samozřejmě, pokud by bylo důležitějším kritériem provést rychlejší analýzu na LIS, lze vybrat i průtokovou rychlost 10 µl/s, u které jsou ztráty stále přijatelné.

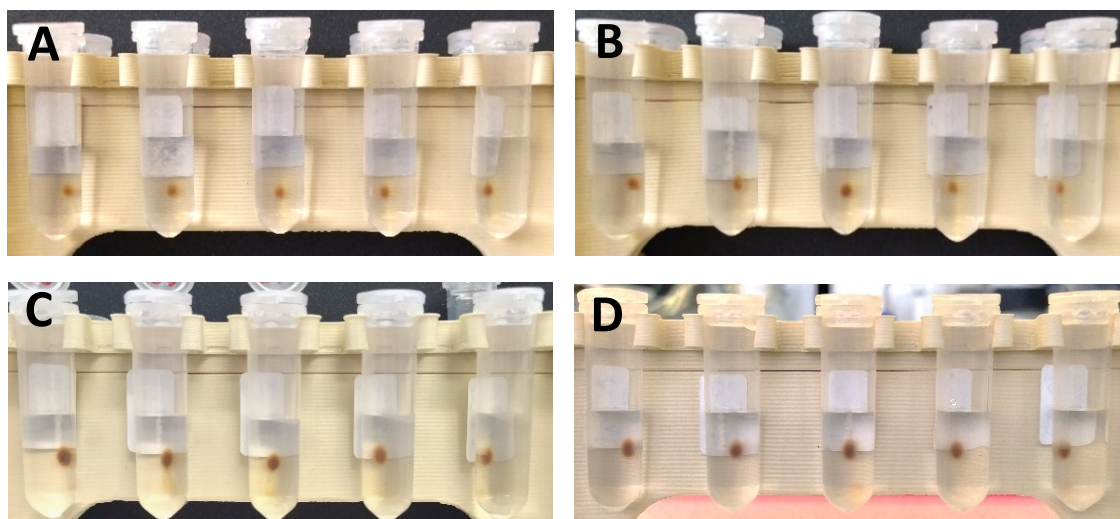


Obrázek 34. Závislost absorbance/ztrát MČ [%] na průtokové rychlosti [$\mu\text{l/s}$] vypuštění pufru u 5ml stříkačky. A: Ztráty MČ u míchadla D. B: Ztráty MČ u míchadla E

13.3.5. TEST SÍLY MAGNETU MÍCHADLA D

Míchadlo D je vhodné zejména k přípravě většího množství magnetického IS. Na základě toho byl proveden experiment, ve kterém se hodnotilo, kolik magnetického IS lze pomocí tohoto míchadla připravit naráz v jednom cyklu. Na začátku bylo do stříkačky aspirováno 0,5 mg MČ (~ 500 μl) a 500 μl PBS pufru, poté byl vypuštěn pufr do zkumavky rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$. Principem bylo postupné zvyšování množství MČ až na 20 mg a sledování množství ztracených MČ ve vypuštěném pufru, kterého bylo pokaždé 1 ml. Hodnotilo se tedy množství MČ, které je magnetické míchadlo schopno udržet najednou.

Ztráty MČ v pufru se zvyšovaly postupně s rostoucím množstvím MČ ve stříkačce (Obrázek 35A–D). Vyšší ztráty byly zaznamenány až cca od 6 mg. Pomocí magnetického míchadla D je tedy možné připravit až 5 mg magnetického IS, aniž by docházelo ke značným ztrátám při vypouštění roztoku.

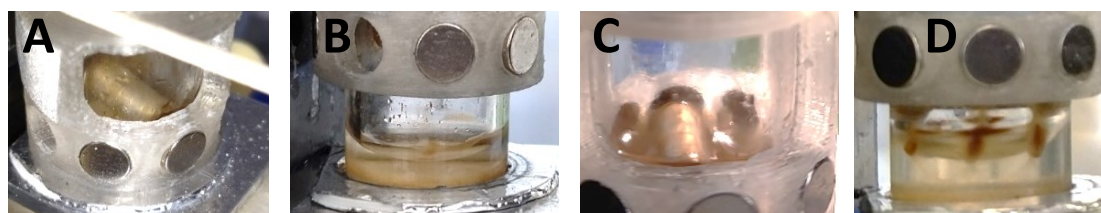


Obrázek 35. Ztráty MČ v pufru z experimentu testování síly magnetu míchadla D. Fotografie ukazují 2ml zkumavky s 1 ml pufru se ztrátami MČ po vypuštění s postupným přidáváním 0,5 mg MČ. A: 0,5 až 2,5 mg. B: 3 až 5 mg. C: 6 až 10 mg. D: 16 až 20 mg

13.3.6. OPTIMALIZACE OBJEMU ELUČNÍHO PUFRU

Vzhledem k šířce 5ml stříkačky a velikosti magnetického míchadla nebylo možné sENG zakoncentrovat do tak malého objemu jako u 1ml stříkačky (50 μ l). Navíc v 5ml stříkačce nelze aspirovat vzduch pod roztok s MČ, což tento krok více zkomplikovalo.

K 0,5 mg MČ byl aspirován PBS pufr v určitém objemu a sledovalo se, zda je míchadlo alespoň z části ponořené. Bylo rozhodnuto, že k eluci sENG lze použít eluční pufr v rozmezí 500–1000 μ l (Obrázek 36A–D). 500 μ l je pro samotné zakoncentrování sENG dostačující, ale míchadlo nebylo ani z poloviny ponořené, mohlo by se tedy stát, že nedojde k eluci veškerého sENG. Pro úplnou eluci je vhodnější použít pufr až v objemu 1000 μ l, ale z tohoto objemu by bylo potřeba zakoncentrovat sENG ještě jednou off-line, například pomocí speciálních zkumavek s membránovým filtrem (Amicon filtry).



Obrázek 36. Optimalizace objemu elučního pufru v 5ml stříkačce. A: 500 μ l pufru, pohled zhora. B: 500 μ l pufru, pohled z boku. C: 1000 μ l pufru, pohled zhora. D: 1000 μ l pufru, pohled z boku

13.4. PŘÍPRAVA ANTI-ENDOGLINOVÉHO MAGNETICKÉHO IMUNOSORBENTU

Příprava magnetického IS byla provedena optimalizovanou metodou v LIS s 5ml stříkačkou a bylo použito magnetické míchadlo D. Cílem bylo připravit 4 mg magnetického IS, na začátku se tedy aspirovaly do stříkačky 4 mg MČ Sera-Mag z pracovního roztoku o koncentraci 3 mg/ml, což odpovídalo objemu 1 333 μ l.

Před tím, než se na MČ imobilizovaly protilátky, bylo potřeba aktivovat karboxylové funkční skupiny, které se nacházejí na povrchu MČ Sera-Mag. K tomu byla použita dvě aktivační činidla – EDAC a sulfo-NHS. V tomto případě se jednalo o karbodiimidovou konjugační techniku vazby protilátek na MČ, při které vzniká kovalentní vazba mezi karboxylovými skupinami MČ a aminoskupinami protilátek. Bylo naváženo 7,5 mg činidla EDAC a 1,25 mg činidla sulfo-NHS a obě činidla byla rozpuštěna ve 200 μ l MES pufru. Celý objem byl poté kvantitativně aspirován do stříkačky přes OPI k MČ a do stříkačky byl doplněn MES pufr na objem 1 ml. Aktivace probíhala 10 minut během přerušovaného míchání.

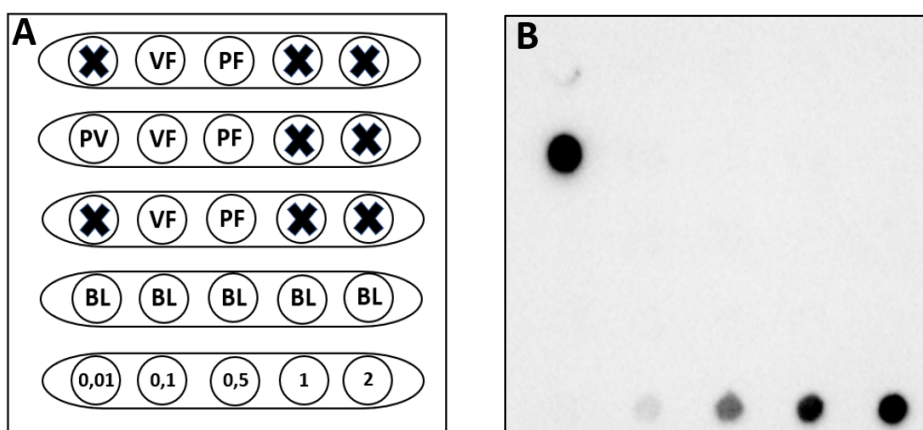
Na 4 mg MČ bylo imobilizováno 20 μ g anti-ENG protilátek anti-HuENG (3A9). Jedná se o myší monoklonální protilátky, které vážou lidský ENG/sENG. Ze zásobního roztoku protilátek o koncentraci 1 mg/ml bylo odebráno 20 μ l do 180 μ l PBS pufru a celý objem byl kvantitativně aspirován do stříkačky přes OPI. K protilátkám bylo přidáno 800 μ l PBS pufru, aby vazba probíhala v 1000 μ l ($c=20$ μ g/ml). Vazba probíhala 60 minut během přerušovaného míchání.

Po vazbě protilátek byl eluován první vzorek – vazebná frakce protilátek, ve které se nacházely nenavázané protilátky. Po promytí MČ MES puftrem byl eluován druhý vzorek – promývací frakce protilátek, ve které se rovněž mohly nacházet nenavázané protilátky nebo protilátky, které se navázaly na MČ pouze nekovalentně. Tyto vzorky slouží k nepřímému hodnocení vazby protilátek na MČ, přesněji tedy zobrazují, kolik protilátek se na MČ nenavázalo. Vazebná frakce a promývací frakce byly aplikovány na blotovací membránu affiblotu a pomocí metody dot blot byly ve vzorcích detekovány nenavázané protilátky anti-HuENG (3A9). Intenzita skvrn byla porovnávána s původním

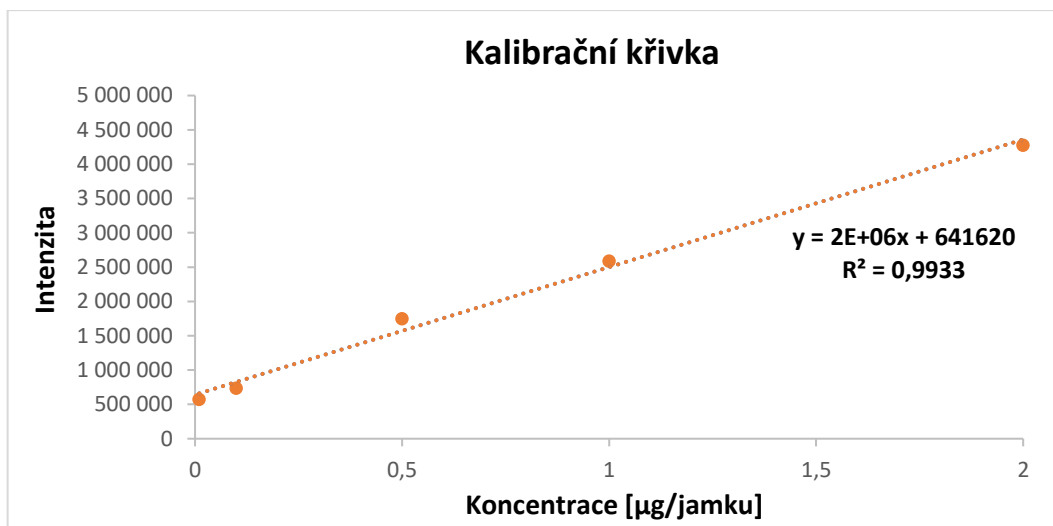
vzorkem protilátek, připraveným přímo ze zásobního roztoku odebráním 2 μ l protilátek do 98 μ l PBS pufru ($c=20 \mu\text{g/ml}$).

Vzorky byly nadávkovány na membránu podle schématu (Obrázek 37A). Do posledního rezervoáru byly navíc nadávkovány vzorky nařaděné jiné anti-ENG myší protilátky (P3D1) v rostoucí koncentraci 0,01–0,1–0,5–1,0–2,0 $\mu\text{g/jamku}$. Poslední rezervoár sloužil k orientačnímu zobrazení intenzit různých koncentrací myších anti-ENG protilátek. Protilátky ve vzorcích byly detekovány sekundární kozí anti-myší igG protilátkou značenou křenovou peroxidázou (A9917). Konjugát byl ředěn v 0,1% BSA v PBST v poměru 1:5000. Detekce probíhala chemiluminiscenčně, signály skvrn byly hodnoceny v ChemiDoc MP imaging a kvantifikovány v softwaru ImageLab.

Z výsledné fotografie membrány (Obrázek 37B) je viditelná velmi intenzivní skvrna původního vzorku, která vykazovala po kvantifikaci intenzitu 11 538 893. Naopak nejsou viditelné skvrny, které přísluší vazebné a promývací frakci. Z výsledků kvantifikace intenzit skvrn se potvrdilo, že se průměrné intenzity vazebné frakce a promývací frakce neliší od průměrné intenzity slepého vzorku. U vazebná frakce byla naměřená intenzita $531\,818 \pm 16\,796$ (CV=3 %), promývací frakce měla intenzitu $499\,646 \pm 16\,978$ (CV=3 %) a slepý vzorek měl intenzitu $508\,279 \pm 16\,298$ (CV=3 %). Vazba protilátek na MČ tedy proběhla úspěšně a připravený magnetický IS byl uchován v objemu 5 ml v 0,1% BSA v PBST s přidavkem 0,01% azidu sodného. Konečná koncentrace takto uchovávaného IS byla 0,8 mg/ml.



Obrázek 37. Hodnocení přípravy magnetického IS v LIS na affiblotu. A: Schéma dávkování vzorků. B: Fotografie PVDF membrány s chemiluminiscenční detekcí v ChemiDoc MP imaging. PV = původní vzorek protilátek anti-HuENG (3A9), VF = vazebná frakce protilátek anti-HuENG (3A9), PF = promývací frakce protilátek anti-HuENG (3A9), 0,01–0,1–0,5–1,0–2,0 = koncentrační řada anti-HuENG (P3D1), BL = slepý vzorek



Obrázek 38. Graf závislosti intenzity skvrn na koncentraci myší protilátky anti-HuENG (P3D1)

13.5. IZOLACE REKOMBINANTNÍHO ENDOGLINU Z PBS PUFRU

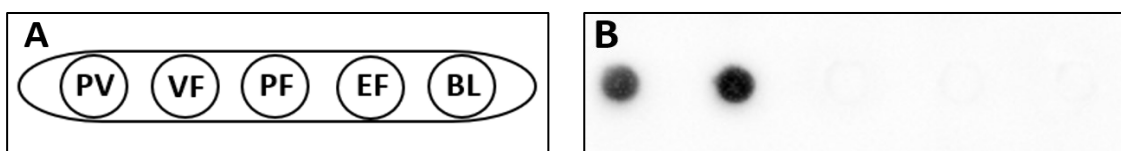
Optimalizovanou metodu pro izolaci sENG z kultivačního média HAEC s obsahem TRC105 bylo nutné nejprve otestovat pomocí zjednodušeného modelu antigen-protilátka. Prvním krokem bylo vyzkoušet izolaci samotného rekombinantního ENG z PBS pufru. K tomu byla použita 1ml stříkačka z důvodu šetření reagensů a pufrů. K izolaci bylo použito 0,4 mg připraveného magnetického IS – bylo aspirováno 500 µl do stříkačky z připraveného zásobního roztoku IS o koncentraci 0,8 mg/ml.

K izolaci byl připraven roztok rekombinantního lidského ENG, který byl naředěn v PBS pufru. Ze zásobního roztoku rekombinantního ENG o koncentraci 10 µg/ml byly připraveny malé alikvoty po 10 µl (~100 ng). K jedné alikvotě byl přidán PBS pufr v objemu 490 µl a z tohoto naředěného roztoku se odebralo 100 µl do 400 µl PBS pufru (~20 ng ENG v 500 µl PBS). Celý objem byl kvantitativně aspirován do stříkačky přes OPI k magnetickému IS, a poté probíhala vazba ENG na magnetický IS 60 minut za přerušovaného míchání.

Po vazbě ENG na magnetický IS byla eluována vazebná frakce ENG a po prvním promytí magnetického IS 0,15M NaCl v PBS byla eluována promývací frakce ENG. K eluci ENG z magnetického IS byl použit 0,1M glycinový pufr (pH=2,8) a po pětiminutové inkubaci byla eluční frakce odebrána do zkumavky obsahující 0,5 µl

1M TRIS pufr, aby byla ihned zneutralizována na pH=7. Všechny frakce byly analyzovány na affiblotu společně s původním vzorkem ENG, který byl nanášen na membránu přímo z naředěného roztoku ENG v objemu 100 μ l (~20 ng).

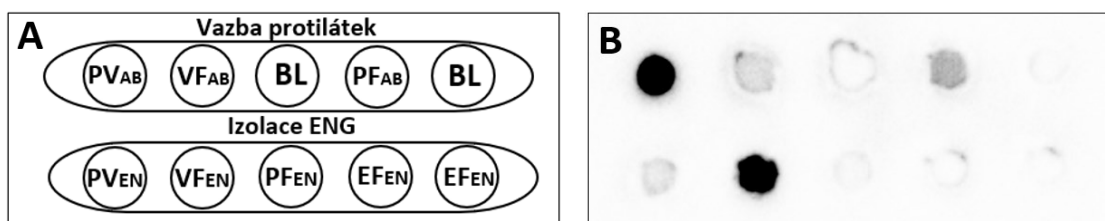
K detekci ENG ve vzorcích byla použita metoda affiblot s chemiluminiscenční detekcí. Z analýzy vzorků na affiblotu bylo zjištěno, že se ze vzorku nepodařilo vyizolovat žádný ENG. Veškerý ENG se nacházel ve vazebné frakci a menší část také v promývací frakci, eluční frakce naopak nevykazovala žádný signál (Obrázek 39A, B). Stejného výsledku bylo také dosaženo po provedené izolaci rekombinantního ENG vsádkovou metodou na magnetickém separátoru stejným postupem a stejným magnetickým IS.



Obrázek 39. Izolace rekombinantního lidského ENG z PBS pufru v LIS, hodnocení na affiblotu. A: Schéma dávkování vzorků. B: Fotografie PVDF membrány s chemiluminiscenční detekcí v ChemiDoc MP imaging. PV = původní vzorek protilátek ENG, VF = vazebná frakce ENG, PF = promývací frakce ENG, EF = eluční frakce ENG, BL = slepý vzorek

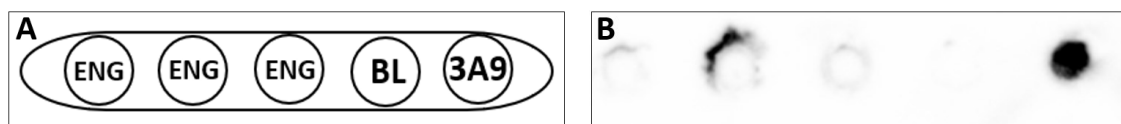
Bylo dále provedeno několik experimentů za účelem objasnit, proč k tomuto problému došlo. V první řadě byl vsádkovou metodou připraven nový magnetický IS, který byl hned na to použit pro izolaci ENG, rovněž vsádkovou metodou. Byl připraven IS z 1 mg MČ Sera-Mag, na které bylo imobilizováno 10 μ g protilátek anti-HuENG (3A9). Pomocí tohoto IS bylo izolováno 20 ng rekombinantního lidského ENG z PBS pufru. Vzorky z přípravy IS a z izolace ENG byly nadávkovány na blotovací membránu do dvou řádků podle schématu (Obrázek 40A).

Z fotografie membrány (Obrázek 40B) je vidět, že protilátky na MČ se opět úspěšně navázaly (slabé signály ve vazebné a promývací frakci jsou způsobeny použitím dvakrát většího množství protilátek než obvykle, počítalo se tedy s tím, že se nenavážou všechny protilátky). Po provedení izolace ENG ve vsádkovém uspořádání bylo opět prokázáno, že k izolaci ENG nedošlo a veškerý ENG se nacházel ve vazebné frakci, kdežto eluční frakce nevykazovala žádný signál.



Obrázek 40. Ověření výsledků automatizovaných metod přípravy magnetického IS a izolace ENG pomocí vsádkové metody. A: Schéma dávkování vzorků. B: Fotografie membrány z ChemiDoc MP imaging. PVAB = původní vzorek protilátek, VFAB = vazebná frakce protilátek, PFAB = promývací frakce protilátek, PVEN = původní vzorek ENG, VFEN = vazebná frakce ENG, PFEN = promývací frakce ENG, EFEN = eluční frakce ENG, BL = slepý vzorek

Následující experiment nám měl ověřit, zda došlo k chybě v postupu metody izolace anebo ve vazbě ENG a imobilizovaných protilátek anti-HuENG (3A9) na MČ. Vazba ENG a protilátek anti-HuENG (3A9) byla otestována na affiblotu. Na membránu byly do třech jamek nadávkovány 3 ng rekombinantního ENG a do jedné jamky bylo nadávkováno 10 ng samotné protilátky anti-HuENG (3A9). ENG byl inkubován s testovanou protilátkou anti-HuENG (3A9) a k detekci imunokomplexu byla použita sekundární protilátka anti-myší IgG/HRP. Samotná protilátka anti-HuENG (3A9) byla detekována stejnou sekundární protilátkou. Schéma dávkování a výsledek experimentu je zobrazen níže (Obrázek 41A, B).



Obrázek 41. Ověření vazby protilátky anti-HuENG (3A9) na ENG. A: Schéma dávkování vzorků. B: Fotografie membrány z ChemiDoc MP imaging

Výsledek tohoto experimentu potvrdil, že k vazbě protilátky anti-HuENG (3A9) na lidský ENG nedochází. Skvrna s detekovanou samotnou protilátkou ve vzorku vykazuje však výrazný signál, je tedy zřejmé, že protilátka sama o sobě je detekovatelná a není potíž s její detekcí sekundární protilátkou. Jelikož se v uspořádání affiblotu protilátka anti-HuENG (3A9) nevázá na rekombinantní lidský ENG, nebylo možné tento systém antigen-protilátka použít pro izolaci lidského sENG z kultivačního média. Řešením této situace by bylo pořízení jiné funkční protilátky, ovšem z časových důvodů nebyla další protilátka testována. Tento postup bude součástí budoucí diplomové práce.

ZÁVĚR

ENG je glykoprotein, který se v organismu vyskytuje v membránové a v solubilní formě. Obě formy ENG jsou považovány za biomarkery, které souvisejí s různými kardiovaskulárními poruchami. Vědecký výzkum se zaměřuje na souvislosti kardiovaskulárních poruch se změnami exprese ENG a hladinami sENG v krvi a součástí výzkumu jsou také nové terapeutické přístupy zaměřené na inhibici ENG například pomocí monoklonální protilátky TRC105.

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo vyvinout automatizované metody pro přípravu anti-ENG magnetického IS a izolaci lidského sENG ze složité matrix složené z kultivačního média HAEC s obsahem různých proteinů a přidavkem léčiva TRC105, které interferuje v metodě ELISA při detekci a stanovení sENG. Pro vývoj metod byl použit systém LIS s 1ml a 5ml stříkačkou a MČ Sera-Mag. Bylo potřeba naprogramovat postupy metod v programu FIALab, který ovládal celý systém LIS. Programování zahrnovalo nadefinování příkazů k jednotlivým krokům postupu, určení, kde se nachází, která reagentie, jakou rychlostí a v jakém objemu se mají reagentie aspirovat a vypouštět, kdy se má spustit a vypnout otáčení míchadla apod. Dále byl program doplněn o některé zprávy pro operátora, které slouží například k tomu, aby operátor vyměnil eppendorf zkumavku pro eluované vzorky nebo ručně napipetoval reagentii do OPI, což by v budoucnu mohlo být nahrazeno autosamplerm.

Při vývoji metod bylo provedeno několik experimentů za účelem optimalizace nejdůležitějších parametrů a výběru vhodných komponent pro systém LIS jako jsou prstence míchacího systému a magnetická míchadla. Bylo potřeba připravit postupy tak, aby nedocházelo k velkým ztrátám MČ při vypouštění roztoků a zároveň, aby metody nebyly příliš časově náročné. Součástí optimalizací byly také úpravy průtokových rychlostí a objemů pro kvantitativní převedení vyrobeného magnetického IS ze stříkačky do zkumavky, a nakonec byl také optimalizován objem elučního pufru pro ENG. K experimentům byl použit PBS pufr a MČ Sera-Mag a výsledky se hodnotily z převážně pomocí spektrofotometrie ve viditelné oblasti.

Optimalizace probíhaly nejdříve pro LIS s 1ml stříkačkou. Část poznatků byla převzata z diplomové práce [66]. V této diplomové práci se na ně navázalo a řada parametrů byla upravena. V první řadě se jednalo o parametr týkající se doby sedimentace MČ na magnetické míchadlo před vypuštěním roztoku, která byla původně nastavena na 60 s. Z našich experimentů bylo zjištěno, že doba sedimentace nemá v 1ml stříkačce vliv na ztráty MČ a bylo tedy možné tento krok vynechat ve všech metodách. Eliminace minutové prodlevy před každým vypuštěním roztoku značně zkrátila časy celé metody. Dále byly u 1ml stříkačky testovány dva prstence s magnety (prsteneček C a prsteneček D), které jsou součástí míchacího systému LIS. Testování probíhalo na základě měření ztrát MČ při různých průtokových rychlostech vypouštění roztoku a bylo zjištěno, že dochází k menším ztrátám MČ při použití prstenečku C. Tento prsteneček byl vybrán k provedení metod. Zároveň v rámci tohoto měření byla vybrána průtoková rychlost vypouštění roztoku 5 μ l/s, při které dochází k minimálním ztrátám MČ. Pro 1ml stříkačku byl dále optimalizován postup pro eluci ENG z magnetického IS. Cílem bylo najít co nejmenší objem elučního pufru, aby byl izolovaný ENG dostatečně zakoncentrován. Pro eluci bylo možné zvolit velmi nízký objem pufru – 50 μ l, v kombinaci se 100 μ l vzduchu pod pufrům u ústí stříkačky.

Metody, které byly připraveny pro 1ml stříkačku, byly následně převedeny do většího objemu – do LIS s 5ml stříkačkou. Pro metody v 5ml stříkačce bylo nutné zvýšit veškeré objemy pufrů a vzduchu i průtokové rychlosti. Větší rozměr stříkačky zkomplikoval některé kroky a bylo nutné je znovu zoptimalizovat. Překážkou byla zejména nemožnost aspirovat vzduch pod roztok, což v 1ml stříkačce velmi napomáhalo minimalizování ztrát MČ při vypouštění roztoku. V 5ml stříkačce bylo potřeba přidat 20s sedimentaci před každé vypuštění roztoku, aby MČ měly dostatek času k přitáhnutí na míchadlo a neztrácely se do odpadu. Dalším příkladem byl objem elučního roztoku. U 1ml stříkačky bylo možné vytvořit vzduchovou „bublinu“, jež zajišťovala použití velmi malého objemu elučního pufru. U 5ml stříkačky nebylo možné tuto eluci provést v tak malém objemu elučního pufru. Objem byl zde stanoven na rozmezí 500–1000 μ l. Dalším bodem optimalizací LIS s 5ml stříkačkou byla úprava postupu a parametrů pro kvantitativní převedení MČ ze stříkačky do zkumavky. Byly zvýšeny objemy PBS pufru ze 400 μ l na 1000 μ l a vzduchu z 200 μ l na 700 μ l, zvýšila se také průtoková rychlost

vypuštění ze 400 $\mu\text{l/s}$ na 1200 $\mu\text{l/s}$ a bylo upraveno míchání tak, aby nezůstával roztok s MČ uvnitř kvůli velkému mrtvému objemu stříkačky. V rámci optimalizací LIS s 5ml stříkačkou byla také testována různá magnetická míchadla (míchadlo B, C, D, E), kdy bylo potřeba zajistit, aby docházelo k minimálním ztrátám MČ, a zároveň, aby byl magnetický IS na konci metody kvantitativně převeden do zkumavky. K provedení metod byla vybrána míchadla D a E, přičemž míchadlo D bylo vhodné zejména pro přípravu většího množství magnetického IS – až 5 mg, což bylo také experimentálně stanoveno. Co se týká parametru průtokové rychlosti při pomalém vypouštění roztoku, u 5ml stříkačky byla vybrána rychlost 5 $\mu\text{l/s}$, při které dochází v kombinaci s 20s sedimentací před vypuštěním k minimálním ztrátám MČ.

Optimalizované metody byly nakonec otestovány se vzorky. V 5ml stříkačce byly připraveny 4 mg magnetického IS s 20 μg imobilizovaných protilátek anti-HuENG (3A9) na MČ Sera-Mag. K imobilizaci byla použita karbodiimidová metoda za použití aktivačních činidel EDAC a sulfo-NHS. Vzorky z imobilizace byly analyzovány semikvantitativně na affiblotu prototypu 3.3. Výsledky analýzy potvrdily úspěšnou vazbu protilátek na MČ a bylo tedy možné připravený magnetický IS použít pro následnou izolaci ENG/sENG.

Izolace ENG/sENG měla proběhnout podle třibodového plánu izolace popsaném v kapitole 13. Z důvodu neúspěšného výsledku u prvních izolací v LIS bylo přistoupeno k provedení vsádkové izolace. Ani ta se však nezdařila, a to ani po opakované přípravě magnetického IS vsádkovou metodou. Po dalším testování bylo prokázáno, že protilátka, která měla za úkol izolovat ENG ze vzorků není schopná vytvořit imunokomplex v prostředí affiblotu. Protilátka či použitý rekombinantní ENG patrně nejsou schopny společně vytvořit imunokomplex, a tím pádem bude potřeba najít vhodnější afinitní bioreagencie, které požadované nároky splňují. Poté bude možné provést izolaci ENG a pokračovat v započatém úsilí o vytvoření automatizované izolace ENG. Než budou nalezeny vhodné bioreagencie, je také možné otestovat metody připravené v této diplomové práci pomocí jiného modelového systému antigen-protilátka s ověřenou tvorbou imunokomplexu.

SEZNAM ZKRATEK

ZKRATKA	ČESKÝ VÝZNAM	ANGLICKÝ VÝZNAM
ALK	Kinázoový receptor pro aktivin	Activin receptor-like kinase
anti-ENG	Anti-endoglin	Anti-endoglin
anti-HuENG	Protilátka proti lidskému endoglinu	Anti-human endoglin
BL	Slepý vzorek	Blank
BMP	Kostní morfogenetický protein	Bone morphogenetic protein
BSA	Hovězí sérový albumin	Bovine serum albumin
CD	Diferenční skupina	Cluster of differentiation
CNC	Počítačem řízený obráběcí stroj	Computer numerical control
CV	Variační koeficient	Coefficient of variation
ED	Endotelová dysfunkce	Endothelial dysfunction
EDAC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarboimid	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarboimide
ELISA	-	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENG	Endoglin	Endoglin
eNOS	Endotelová NO-syntáza	Endothelial NO-synthase
HAEC	Lidské aortální endotelové buňky	Human aortic endothelial cells
ICAM-1	Intracelulární adhezivní molekula 1	Intercellular adhesion molecule 1
IS	Imunosorbent	Imunosorbent
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě	Low density lipoprotein
L-ENG	Dlouhý endoglin	Long endoglin
LIS	-	Lab-In-Syringe
LLE	Extrakce v kapalně fázi	Liquid-liquid extraction
MČ	Magnetické částice	Magnetic particles
MES	2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MMPs	Matricové metaloproteázy	Matrix metalloproteinases
MOF	Organokovové sítě	Metal-organic frameworks
NO	Oxid dusnatý	Nitric oxide
OPI	Otevřený port	Open port interface
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok	Phosphate buffered saline

PBST	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok + Tween 20 (promývací pufr)	Phosphate buffered saline + Tween 20
PCR	Polymerázová řetězová reakce	Polymerase chain reaction
PDZ	Tetrapeptid serin-serin-metionin-alanin	Post-synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, Zonula occludens-1 protein
PECAM-1	Adhezivní molekula krevních destiček a endotelových buněk 1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
RGD	Tripeptid arginin-glycin-asparagová kyselina	Arginyl-glycyl-aspartic acid
RT	Pokožová teplota	Room temperature
rhENG	Rekombinantní lidský endoglin	Rekombinant human endoglin
SD	Směrodatná odchylka	Standart deviation
sENG	Solubilní forma endoglinu	Soluble endoglin
S-ENG	Krátký endoglin	Short endoglin
SIA	Sekvenční injekční analýza	Sequential injection analysis
SMAD	-	<i>Suppressor of mothers against decapentaplegic</i>
SPE	Extrakce pevnou fází	Solid-phase extraction
sulfo-NHS	N-hydroxysulfosukcinimid sodný	Sodium N-hydroxysulfosuccinimide
TGF- β	Transformující růstový faktor β	Transforming growth factor β
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol	2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
VCAM-1	Adhezivní molekula vaskulárních buněk 1	Vascular cell adhesion molecule 1

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Struktura membránového ENG.....	14
Obrázek 2. Izoformy membránového ENG – L-ENG a S-ENG.....	15
Obrázek 3. Signalizační dráhy ENG.....	16
Obrázek 4. Přechod od zdravého endotelu k ED.....	19
Obrázek 5. Navrhované mechanismy účinku TRC105.....	23
Obrázek 6. Speciální víko affiblotu	25
Obrázek 7. Příklady dosažení rotačního magnetického pole v LIS.....	27
Obrázek 8. Možnosti orientace stříkačky a použití v LIS	28
Obrázek 9. Biofunkcionalizace MČ pomocí kovalentní vazby	32
Obrázek 10. Chemická reakce karbodiimidové metody.....	32
Obrázek 11. Schéma izolace proteinu pomocí magnetického IS ve vsádkovém provedení	33
Obrázek 12. Schéma affiblotu	39
Obrázek 13. Sestavená aparatura affiblotu.....	39
Obrázek 14. Affiblot prototyp 3.2	40
Obrázek 15. Affiblot prototyp 3.3	40
Obrázek 16. Affiblot prototyp 3.4	41
Obrázek 17. Různé velikosti injekčních stříkaček v LIS.....	44
Obrázek 18. Dvanácticestný selekční ventil a OPI (port 1).....	45
Obrázek 19. Schéma dvanácticestného selekčního ventilu a popis jednotlivých portů.....	45
Obrázek 20. Míchací systém LIS	46
Obrázek 21. Prstence míchacího systému LIS.....	47
Obrázek 22. Magnetická míchadla míchacího systému LIS.....	47
Obrázek 23. Části celého systému LIS a míchací systém pro pracovní roztok MČ.....	48
Obrázek 24. Schematické znázornění izolace sENG z kultivačního média HAEC pomocí magnetického IS.....	55

Obrázek 25. Schéma dávkování barviva pro sledování úniku kapaliny z aparatury affiblotu.....	57
Obrázek 26. První experiment pro testování affiblotu prototypu 3.3	58
Obrázek 27. Druhý experiment pro testování affiblotu prototypu 3.3.....	59
Obrázek 28. Graf závislosti průměrné intenzity skvrn na koncentraci antigenu	59
Obrázek 29. Graf závislosti rychlosti točení motoru na střídě signálu.....	61
Obrázek 30. Závislost absorbance/ztrát MČ [%] na průtokové rychlosti [$\mu\text{l/s}$] vypuštění pufru u 1ml stříkačky	62
Obrázek 31. Optimalizace objemu elučního pufru u 1ml stříkačky	64
Obrázek 32. Kvantitativní převedení 20 mg MČ z LIS s 5ml stříkačkou do zkumavky ...	66
Obrázek 33. Testování míchadla B a C u 5ml stříkačky pomocí ztrát MČ při vypuštění pufru průtokovou rychlostí 4 $\mu\text{l/s}$	67
Obrázek 34. Závislost absorbance/ztrát MČ [%] na průtokové rychlosti [$\mu\text{l/s}$] vypuštění pufru u 5ml stříkačky	69
Obrázek 35. Ztráty MČ v pufru z experimentu testování síly magnetu míchadla D	70
Obrázek 36. Optimalizace objemu elučního pufru v 5ml stříkačce.....	70
Obrázek 37. Hodnocení přípravy magnetického IS v LIS na affiblotu	72
Obrázek 38. Graf závislosti intenzity skvrn na koncentraci myší protilátky anti-HuENG (P3D1)	73
Obrázek 39. Izolace rekombinantního lidského ENG z PBS pufru v LIS, hodnocení na affiblotu.....	74
Obrázek 40. Ověření výsledků automatizovaných metod přípravy magnetického IS a izolace ENG pomocí vsádkové metody	75
Obrázek 41. Ověření vazby protilátky anti-HuENG (3A9) na ENG.....	75

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Počáteční promývání systému LIS	49
Tabulka 2. Příprava anti-ENG magnetického IS.....	50
Tabulka 3. Izolace ENG/sENG	51
Tabulka 4. Závěrečné promývání systému LIS	52
Tabulka 5. Shrnutí testování prototypů affiblotu pomocí barviv.....	57
Tabulka 6. Srovnání rychlostí otáčení prstence u 1ml stříkačky a 5ml stříkačky závislých na střídě signálu	65
Tabulka 7. Shrnutí výsledků z měření absorpance vzorků získaných MČ a hodnocení výtěžku [%].....	68

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Margioulas-Siarkou G, Margioulas-Siarkou C, Petousis S et al. The role of endoglin and its soluble form in pathogenesis of preeclampsia. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2022; 477: 479-491 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04294-z>
- [2] Smolej L, Andrýs C, Belada D et al. Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu mají prognostický význam u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií. *Transfuze a hematologie dnes* [online]. 2008; 1: 24-28 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuze-hematologie-dnes/2008-1/plazmaticke-koncentrace-solubilniho-endoglinu-maji-prognosticky-vyznam-u-nemocnych-s-chronickou-lymfocytarni-leukemii-1338>
- [3] Nejmanová I, Vitverová B, Eissazadeh S et al. High Soluble Endoglin Levels Affect Aortic Vascular Function during Mice Aging. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* [online]. 2021; 8(12): 173 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcdd8120173>
- [4] Vicen M, Igreja Sá IC, Tripská K et al. Membrane and soluble endoglin role in cardiovascular and metabolic disorders related to metabolic syndrome. *Cellular and Molecular Life Science* [online]. 2021; 78, 2405-2418 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03701-w>
- [5] Human Aortic Endothelial Cells (HAOEC). iXCells Biotechnologies [online]. [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://www.ixcellsbiotech.com/human-primary-cells/human-aortic-endothelial-cells-haoec>
- [6] Human Aortic Endothelial Cells (HAOEC). PromoCell [online]. [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://promocell.com/product/human-aortic-endothelial-cells-haoec/>
- [7] Tripská K, Igreja Sá IC, Vašinová M et al. Monoclonal anti-endoglin antibody TRC105 (carotuximab) prevents hypercholesterolemia and hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Frontiers in Medicine* [online]. 2022; 9: 845918 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.845918>
- [8] Zhang L, Li X, Zhou C et al. The diagnosis values of serum STAT4 and sEng in preeclampsia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2020; 34(2): 23073 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.23073>
- [9] Smirnov IV, Gryazeva IV, Vasileva MY et al. New highly sensitive sandwich ELISA system for soluble endoglin quantification in different biological fluids. *The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2018; 78(6): 515-523 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1516892>
- [10] Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *The Journal of Immunology* [online]. 1988; 141 (6): 1925-1933 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.141.6.1925>

- [11] Fonsatti E, Vecchio, LD, Altomonte M et al. Endoglin: An accessory component of the TGF- β -binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2001; 188(1): 1-7 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcp.1095>
- [12] Sier VQ, van der Vorst JR, Quax PHA et al. Endoglin/CD105-Based Imaging of Cancer and Cardiovascular Diseases: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021; 22(9): 4804 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22094804>
- [13] Grigg C, Anderson D, Earnshaw J. Diagnosis and Treatment of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Ochsner Journal* [online]. 2017; 17(2): 157-161 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: [28638289](https://doi.org/10.3390/ijms21239247)
- [14] Meurer SK, Weiskirchen R. Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020; 21(23): 9247 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21239247>
- [15] Arthur HM, Ure J, Smith AJH et al. Endoglin, an Ancillary TGF β Receptor, Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development. *Developmental Biology* [online]. 2000; 217(1), 42-53 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9534>
- [16] Shyu KG. The Role of Endoglin in Myocardial Fibrosis. *Acta Cardiologica Sinica* [online]. 2017; 33(5): 461-467 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.6515/acs20170221b>
- [17] Finnson KW, Philip A. Endoglin in liver fibrosis. *Journal of Cell Communication and Signaling* [online]. 2012; 6: 1-4 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12079-011-0154-yb>
- [18] Pérez-Gómez E, Del Castillo G, Santibanez JF et al. The Role of the TGF- β Coreceptor Endoglin in Cancer. *The Scientific World Journal* [online]. 2010; 10: 2367-2384 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.230>
- [19] Ray BN, Lee NY, How T, Blobe GC. ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis* [online]. 2010; 31(3): 435-441 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp327>
- [20] Koleva RI, Conley BA, Romero D et al. Endoglin Structure and Function: DETERMINANTS OF ENDOGLIN PHOSPHORYLATION BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β RECEPTORS. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2016; 281(35): 25110-25123 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M601288200>
- [21] Schoonderwoerd MJA, Goumans M-JTH, Hawinkels LJAC. Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules* [online]. 2020; 10(2): 289 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom10020289>

- [22] Lindsey ML, Iyer RP, Jung M et al. Matrix metalloproteinases as input and output signals for post-myocardial infarction remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. 2016; 91: 134-140 [cit. 29.04.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.12.018>
- [23] CD105 (Endoglin) Antibodies. Thermo Fisher Scientific [online] [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: [https://www.thermofisher.com/antibody/primary/target/CD105+\(Endoglin\)?gclid=CjwKCAiA_6yfBhBNEiwAkmXy50fvqHiHFgv38x9PoXqDj1HrIv273bufDPNCfPigVpekP8xfv5gQNBoCg6AQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAiA_6yfBhBNEiwAkmXy50fvqHiHFgv38x9PoXqDj1HrIv273bufDPNCfPigVpekP8xfv5gQNBoCg6AQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!593537697342!p!!g!!endoglin%20antibody!352132362!37556940406&cid=bid_pca_aup_r0_1_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con#](https://www.thermofisher.com/antibody/primary/target/CD105+(Endoglin)?gclid=CjwKCAiA_6yfBhBNEiwAkmXy50fvqHiHFgv38x9PoXqDj1HrIv273bufDPNCfPigVpekP8xfv5gQNBoCg6AQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAiA_6yfBhBNEiwAkmXy50fvqHiHFgv38x9PoXqDj1HrIv273bufDPNCfPigVpekP8xfv5gQNBoCg6AQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!593537697342!p!!g!!endoglin%20antibody!352132362!37556940406&cid=bid_pca_aup_r0_1_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con#)
- [24] Hrnčíř Z, Tomš J. Vaskulární endotelový růstový faktor u zánětlivých revmatických nemocí. *Česká revmatologie* [online]. 2009; 17(3): 168-172 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-revmatologie/2009-3/vaskularni-endotelovy-rustovy-faktor-u-zanetlivych-revmatickyh-nemoci-15537>
- [25] Vrablík M, Janotová M, Motyková E, Prusíková M. Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Medicína pro praxi* [online]. 2011; 8(3): 119-122 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-201103-0005_Endotelialni_dysfunkce-prvni_stadium_aterosklerozy.php
- [26] Karásek D, Vaverková H, Halenka M, Hutýra M. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2004; 6(9): 450-453 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200409-0006_Endotelialni_dysfunkce_moznosti_jeji_detekce_a_vyuziti_v_klinicke_praxi.php
- [27] Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J et al. The vascular endothelium and human diseases. *International Journal of Biological Sciences* [online]. 2013; 9(10): 1057-1069 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>
- [28] Rathouská J, Němečková I, Zemánková L et al. Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis. *Heart and Vessels* [online]. 2015; 30: 241-248 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00380-014-0493-8>
- [29] Leite AR, Borges-Canha M, Cardoso R et al. Novel Biomarkers for Evaluation of Endothelial Dysfunction. *Angiology* [online]. 2020; 71(5): 397-410 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0003319720903586>
- [30] Nachtigal P, Zemánková L, Rathouská J, Stráský Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* [online]. 2012; 224(1): 4-11 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.001>
- [31] Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *The FASEB Journal* [online]. 2004; 18(3): 421-614 [cit. 11.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1096/fj.03-0197fje>
- [32] Toporsian M, Gros R, Kabir MH et al. A Role for Endoglin in Coupling eNOS Activity and Regulating Vascular Tone Revealed in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia.

Circulation Research [online]. 2005; 96(6): 684-692 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000159936.38601.22>

[33] Jerkic M, Letarte M. Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells. *The FASEB Journal* [online]. 2015; 29(9): 3595-4081 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1096/fj.14-269258>

[34] Vicen M, Vitverová B, Havelek R et al. Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction *in vivo* and *in vitro*. *The FASEB Journal* [online]. 2019; 33(5): 6099-6114 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1096/fj.201802245R>

[35] Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N et al. Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* [online]. 2013; 121(2): 403-415 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435347>

[36] Donnini D, Perrella G, Stel G et al. A new model of human aortic endothelial cells *in vitro*. *Biochimie* [online]. 2000; 82(12): 1107-1114 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01195-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01195-0)

[37] Apolo AB, Karzai FH, Trepel JB et al. A Phase II Clinical Trial of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Adults With Advanced/Metastatic Urothelial Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer* [online]. 2017; 15(1): 77-85 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.05.010>

[38] Rosen LS, Hurwitz HI, Wong MK et al. A phase I first-in-human study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. 2012; 18(17): 4820-4829 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0098>

[39] Liu Y., Tian H., Blobe G.C. et al. Effects of the combination of TRC105 and bevacizumab on endothelial cell biology. *Investigational New Drugs* [online]. 2014; 32: 851-859 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0129-y>

[40] Liu Y, Paauwe M, Nixon AB, Hawinkels LJAC. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021; 22(1): 147 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22010147>

[41] Nolan-Stevaux O, Zhong W, Culp S et al. Endoglin Requirement for BMP9 Signaling in Endothelial Cells Reveals New Mechanism of Action for Selective Anti-Endoglin Antibodies. *PLOS One* [online]. 2012; 7(12): e50920 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050920>

[42] Svobodová Z, Novotný J, Ospalková B et al. Affiblot: A dot blot-based screening device for selection of reliable antibody. *Analytical Methods* [online]. 2021; 13(35) [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1AY00955A>

[43] Stott DI. Immunoblotting, Dot-Blotting, and ELISPOT Assays: Methods and Applications, *Journal of Immunoassay*. *Journal of Immunoassay* [online]. 2008; 21(2-3): 273-296 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01971520009349537>

- [44] Horstkotte B, Solich P. The Automation Technique Lab-In-Syringe: A Practical Guide. *Molecules* [online]. 2020; 25(7): 1612 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25071612>
- [45] Economou A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2005; 24(5): 416-425 [cit. 16.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.12.004>
- [46] Batch – SI format and lab-in-syringe. Programmable flow injection analysis [online]. [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://portal.faf.cuni.cz/Flowtutorial/Methods/Programmable-Flow-Injection/3-1-3-Batch-SI-format-and-lab-in-syringe/>
- [47] Cerdà V, Ferreira SLC, Phansi P. Lab-in-Syringe, a Useful Technique for the Analysis and Detection of Pollutants of Emerging Concern in Environmental and Food Samples. *Molecules* [online]. 2022; 27(21): 7279 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27217279>
- [48] Maya F, Horstkotte B, Estela JM, Cerdà V. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid–liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012; 404: 909-917 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6159-4>
- [49] Horstkotte B, Suárez R, Solich P, Cerdà V. In-syringe-stirring: A novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013; 788: 52-60 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.049>
- [50] Suárez R, Horstkotte B, Cerdà V. In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for automation and downscaling of methylene blue active substances assay *Talanta* [online]. 2014; 130: 555-560 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.063>
- [51] Šrámková I, Horstkotte B, Solich P, Sklenářová H. Automated in-syringe single-drop head-space micro-extraction applied to the determination of ethanol in wine samples. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014; 828: 53-60 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.031>
- [52] Maya F, Cabello CP, Estela JM et al. Automatic In-Syringe Dispersive Microsolid Phase Extraction Using Magnetic Metal–Organic Frameworks. *Analytical Chemistry* [online]. 2015; 87(15): 7545-7549 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01993>
- [53] González A, Avivar J, Maya F et al. In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017; 409: 225-234 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9988-8>
- [54] Faraji M, Shirani M, Rashidi-Nodeh H. The recent advances in magnetic sorbents and their applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2021; 141: 116302 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116302>

- [55] Pečová M, Zajoncová L, Poláková K et al. Biologické aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy* [online]. 2011; 105: 524-530 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11104/0205787>
- [56] Kučírková L, Královec K, Havelek R et al. Toxicita magnetických nanočástic. *Chemické Listy* [online]. 2015; 109(9): 693-700 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/314>
- [57] Kim SE, Tieu MV, Hwang SY, Lee MH. Magnetic Particles: Their Applications from Sample Preparations to Biosensing Platforms. *Micromachines (Basel)* [online]. 2020; 11(3): 302 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi11030302>
- [58] Tadic M, Kralj S, Jagodic M et al. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment. *Applied Surface Science* [online]. 2014; 322: 255-264 [cit. 15.05.2023]. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.09.181>
- [59] Zákutná D, Nižňanský D, Barnsley LC et al. Field Dependence of Magnetic Disorder in Nanoparticles. *Physical Review X* [online]. 2020; 10: 031019 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.10.031019>
- [60] Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews* [online]. 2010; 1 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>
- [61] Ma Z, Liu H. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology* [online]. 2007; 5(1-2): 1-10 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cpart.2006.11.001>
- [62] Lewandowska-Łańcucka J, Staszewska M, Szuwarzyński M et al. Synthesis and characterization of the superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with cationic chitosan and coated with silica shell. *Journal of Alloys and Compounds* [online]. 2014; 586: 45-51 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.10.039>
- [63] Chircov C, Grumezescu AM, Holban AM. Magnetic Particles for Advanced Molecular Diagnosis. *Materials (Basel)* [online]. 2019; 12(13): 2158 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma12132158>
- [64] Bart J, Tiggelaar R, Yang M et al. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab on a Chip* [online]. 2009; 9(24): 3481-3488 [cit. 28.06.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b914270c>
- [65] Kim SE, Tieu MV, Hwang SY, Lee MH. Magnetic Particles: Their Applications from Sample Preparations to Biosensing Platforms. *Micromachines (Basel)* [online]. 2020; 11(3): 302 [cit. 15.05.2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi11030302>
- [66] Křížová L. Automatizovaná příprava anti-COVID magnetického imunosorbentu. Hradec Králové 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra biologických a lékařských věd. Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Svobodová, Ph.D. [cit. 28.06.2023]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/175599>

PŘÍLOHY

Příloha 1. Program FIALab pro počáteční čištění systému LIS	90
Příloha 2. Program FIALab pro přípravu anti-ENG magnetického IS.....	92
Příloha 3. Program FIALab pro izolaci ENG.....	96
Příloha 4. Program FIALab pro závěrečné čištění systému LIS.....	103
Příloha 5. Program FIALab pro čištění OPI (vodou Milli-Q/etanolem).....	105
Příloha 6. Program FIALab pro oplach hadiček pufrů	106
Příloha 7. Program FIALab pro čištění stříkačky	107
Příloha 8. Program FIALab pro aktivaci MČ.....	108
Příloha 9. Program FIALab pro vazbu protilátek	109

Příloha 1. Program FIALab pro počáteční čištění systému LIS

1 ml stříkačka

Method – Clean system, initial

Variable Define New OSP_MQCleaning
Variable Define New Tubes_AirCleaning

OSP_MQCleaning = 1
Tubes_AirCleaning = 1

' Aspirate air

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate MQ

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150

5 ml stříkačka

Method – Clean system, initial

Variable Define New OSP_MQCleaning
Variable Define New Tubes_AirCleaning

OSP_MQCleaning = 1
Tubes_AirCleaning = 1

' Clean all tubes with MQ

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate MQ

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300

CavroXP12 Delay Until Done

' Waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate air

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate MQ

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

' Waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

If OSP_MQCleaning = 1

' Clean OSP with MQ (procedure)

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\ Methods_1ml_syringe
\P_Clean_OSP_MQ.fia
End If

If Tubes_AirCleaning = 1

' Aspirate Air

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 510
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Dispense (microliter) 170
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Delay Until Done

' Waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate air

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate MQ

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

' Waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

If OSP_MQCleaning = 1

' Clean OSP with MQ (procedure)

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\Methods_5ml_syringe\P_Clean_OSP_MQ.fia
End If

If Tubes_AirCleaning = 1

' Aspirate Air

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Aspirate (microliter) 900
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Dispense (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Dispense (microliter) 170
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Dispense (microliter) 170
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Dispense (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Push Air to bead tube

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Dispense (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

Příloha 2. Program FIALab pro přípravu anti-ENG magnetického IS

1 ml stříkačka

Method – IS synthesis

'Check the IF – variables 0 / 1

'Check the Rep number

' Syringe head valve:

' Pos1: OSP / Pos2: Water / Pos3: MES buffer / Pos4: Beads

' Pos5: Not used / Pos6: Not used / Pos7: Beads removal / Pos8: BF and WF

' Pos9: Not used / Pos10: PBS buffer / Pos11: Waste / Pos12: 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 OptionCleanChannel4
Variable Define New OptionCleanSyringe
Variable Define New ActivationOfBeads
Variable Define New AntibodiesOSP
Variable Define New OptionRinsing with buffers
VolBeadTube = 50
VolBeads = 400
VolBeadSuspension = VolBeadTube + VolBeads

OptionCleanChannel4 = 0

ActivationOfBeads = 1

AntibodiesOSP = 1

OptionCleanSyringe = 1

OptionRinsing with buffers = 1

' Rep = 3 sec spin + 12 sec sedim:

' 4 = 1 min, 20 = 5 min, 36 = 10 min, 108 = 30 min, 216 = 1 h, 648 = 3 h

5 ml stříkačka

Method – IS synthesis

'Check the IF - variables 0 / 1

'Check the Rep number

' Syringe head valve:

' Pos1: OSP / Pos2: Water / Pos3: MES buffer / Pos4: Beads

' Pos5: Not used / Pos6: Not used / Pos7: Beads removal / Pos8: BF and WF

' Pos9: Not used / Pos10: PBS buffer / Pos11: Waste / Pos12: 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 OptionCleanChannel4
Variable Define New OptionCleanSyringe
Variable Define New ActivationOfBeads
Variable Define New AntibodiesOSP
Variable Define New OptionRinsing with buffers
VolBeadTube = 50
VolBeads = 1333
VolBeadSuspension = VolBeadTube + VolBeads

OptionCleanChannel4 = 0

ActivationOfBeads = 1

AntibodiesOSP = 1

OptionCleanSyringe = 1

OptionRinsing with buffers = 1

' Rep = 3 sec spin + 12 sec sedim:

' 4 = 1 min, 20 = 5 min, 36 = 10 min, 108 = 30 min, 216 = 1 h, 648 = 3 h

' Empty Syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel 4 if needed**If OptionCleanChannel4 = 1**

CleanPos = 4
CleanVol = 150
CleanTimes = 1
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Initial_Clean_Syringe.fia
End If

' Tubes rinsing with buffers**If OptionRinsing with buffers = 1**

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_CleanTubes_Buffers_Synthesis
.fia
End If

If OptionCleanSyringe = 1**' Clean Syringe**

CleanVol = 500
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Initial_Clean_Syringe.fia
End If

' Aspiration of suspension of beads

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter)
VolBeadSuspension
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Wash Beads with MES

CavroXP12 Command (?) O3R

' Empty Syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel 4 if needed**If OptionCleanChannel4 = 1**

CleanPos = 4
CleanVol = 300
CleanTimes = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Initial_Clean_Syringe.fia
End If

' Tubes rinsing with buffers**If OptionRinsing with buffers = 1**

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_CleanTubes_Buffers_Synthesis.
fia
End If

If OptionCleanSyringe = 1**' Clean Syringe**

CleanVol = 1000
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Initial_Clean_Syringe.fia
End If

' Aspirate Air

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspiration of suspension of beads

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter)
VolBeadSuspension
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

/*

' Add MES

CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done
*/

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

If ActivationOfBeads = 1

' Activation of beads

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_BeadsActivationTwoSteps.fia

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Wash Beads with MES

CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate MES

CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

If ActivationOfBeads = 1

' Activation of beads

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_BeadsActivationTwoSteps.fia

' Beads sedimentation

Delay (sec) 10

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' Wash Beads with MES

CavroXP12 Command (?) O3R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

If AntibodiesOSP = 1

' Addition of antibodies

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_AspirateAntibodies.fia

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

**' Empty syringe to port 8 to test lost/not reacted
antibodies (BF)**

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Wash Beads with MES

CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

Beep

Message Place new eppendorf port 8 (WF)

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Get IS out

Loop Start (5)

' Aspirate Air

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate PBS buffer

CavroXP12 Command (?) O10R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

If AntibodiesOSP = 1

' Addition of antibodies

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_AspirateAntibodies.fia

' Beads sedimentation

Delay (sec) 10

**' Empty syringe to port 8 to test lost/not reacted
antibodies (BF)**

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

End If

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' Wash Beads with MES

CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

Beep

Message Place new eppendorf port 8 (WF)

CavroXP12 Command (?) O8R

CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 400
 CavoXP12 Delay Until Done
' Empty Syringe to port 7
 TrinketM0 Stirr_Fast
 Delay (sec) 5
 CavoXP12 Command (?) O7R
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
 CavoXP12 Empty
 CavoXP12 Delay Until Done
 TrinketM0 Deact_All
Loop End

Beep

CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
 CavoXP12 Empty
 CavoXP12 Delay Until Done
 Delay (sec) 1
'Aspirate PBS and get IS
Loop Start (2)
 TrinketM0 Stirr_Max
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 500
 CavoXP12 Command (?) O12R
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 700
 CavoXP12 Delay Until Done
 CavoXP12 Command (?) O10R
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 1000
 CavoXP12 Delay Until Done

 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 1200
 CavoXP12 Command (?) O7R
 TrinketM0 Deact_All
 CavoXP12 Empty
 CavoXP12 Delay Until Done
Loop End

Beep

Příloha 3. Program FIALab pro izolaci ENG

1 ml stříkačka

Method – ENG isolation

'Check the IF - variables 0 / 1
'Check the Rep number

' Syringe head valve:
' Pos1: OSP/ Pos2: Water / Pos3: MES buffer / Pos4: Get beads
' Pos5: PBS + 0,1%BSA / Pos6: PBS+NaCl / Pos7: Beads and BF
' Pos8: BF and WF / Pos9: Elution buffer / Pos10: PBS buffer / Pos11: Waste / Pos12: Air

Variable Define New CleanVol
 Variable Define New CleanTimes
 Variable Define New CleanPos
 Variable Define New OptionCleanChannel4
 Variable Define New OptionCleanSyringe
 Variable Define New OptionRinsing with buffers

OptionCleanChannel4 = 0
OptionCleanSyringe = 1
OptionRinsing with buffers = 1

' Rep = 3 sec spin + 12 sec sedim:
' 4 = 1 min, 20 = 5 min, 36 = 10 min, 108 = 30 min, 216 = 1 h, 648 = 3 h

5 ml stříkačka

Method – ENG isolation

'Check the IF - variables 0 / 1
'Check the Rep number

' Syringe head valve:
' Pos1: OSP / Pos2: Water / Pos3: MES buffer / Pos4: Get beads
' Pos5: PBS + 0,1%BSA / Pos6: PBS+NaCl / Pos7: Beads and EF
' Pos8: BF and WF / Pos9: Elution buffer / Pos10: PBS buffer / Pos11: Waste / Pos12: Air

Variable Define New CleanVol
 Variable Define New CleanTimes
 Variable Define New CleanPos
 Variable Define New OptionCleanChannel4
 Variable Define New OptionCleanSyringe
 Variable Define New OptionRinsing with buffers

OptionCleanChannel4 = 0
OptionCleanSyringe = 1
OptionRinsing with buffers = 1
' Rep = 3 sec spin + 12 sec sedim:

' 4 = 1 min, 20 = 5 min, 36 = 10 min, 108 = 30 min, 216 = 1 h, 648 = 3 h

' Empty Syringe

' Empty Syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel 4 if needed

If OptionCleanChannel4 = 1

CleanPos = 4
CleanVol = 200
CleanTimes = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Initial_Clean_Syringe.fia
End If

' Tubes rinsing with buffers

If OptionRinsing with buffers = 1

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_CleanTubes_Buffers_Eng_Iso
lation.fia
End If

If OptionCleanSyringe = 1

' Clean Syringe

CleanVol = 500
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Initial_Clean_Syringe.fia
End If

' Aspiration of IS

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) **450 'XXXX**
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 50
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Empty Syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 2

' Wash Beads with PBS

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Clean Channel 4 if needed

If OptionCleanChannel4 = 1

CleanPos = 4
CleanVol = 300
CleanTimes = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Initial_Clean_Syringe.fia
End If

' Tubes rinsing with buffers

If OptionRinsing with buffers = 1

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\Methods_5ml_syringe\P_CleanTubes_Buffe
rs_Eng_Isolation.fia
End If

If OptionCleanSyringe = 1

' Clean Syringe

CleanVol = 1000
CleanTimes = 2
CleanPos = 2
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\Methods_5ml_syringe\P_Initial_Clean_Syri
nge.fia
End If

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspiration of IS

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) **550 'XXXX**
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Add MES

CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) **500 'XXXX**
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 6

TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate 0,1% BSA + PBS - blocking

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' Incubation - Repeat = 10 minute(s)

Loop Start (36)

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 3
TrinketM0 Deact_All
Delay (sec) 12

Loop End

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Wash Beads with PBS

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Empty Syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 2

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' Wash Beads with PBS

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate 0,1% BSA + PBS - blocking

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000
CavroXP12 Delay Until Done

' Incubation - Repeat = 10 minute(s)

Loop Start (36)

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 4
TrinketM0 Deact_All
Delay (sec) 10

Loop End

' Beads sedimentation

Delay (sec) 10

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

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' **Empty syringe - waste**

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

Beep

Message 500 ul HuEng to OSP

' **Aspirate HuEng**

CavroXP12 Command (?) O1R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 2

' **Incubation - Repeat = 60 minute(s)**

Loop Start (216)

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 3
TrinketM0 Deact_All
Delay (sec) 12

Loop End

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

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

Beep

Message new eppendorf port 8 (BF HuEng)

' **Collect BF for HuENG**

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop Start (2)

' **Wash IS with PBS + 0,15M NaCl**

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast

Delay (sec) 6

TrinketM0 Deact_All

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

' **Empty syringe - waste**

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' **Aspirate Air to lift piston**

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' **Wash Beads with PBS**

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 6

TrinketM0 Deact_All

' **Beads sedimentation**

Delay (sec) 20

' **Empty syringe - waste**

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' **Aspirate Air to lift piston**

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

Beep

Message 500 ul HuEng to OSP

' **Aspirate HuEng**

CavroXP12 Command (?) O1R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 600
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 2

' **Add MES**

CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' **Incubation - Repeat = 60 minute(s)**

Loop Start (216)

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' **Empty syringe**

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop End

' **Wash Beads with PBS**

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast

Delay (sec) 6

TrinketM0 Deact_All

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

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' **Empty syringe - waste**

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

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

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

' **Aspirate elution buffer**

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 50
CavroXP12 Delay Until Done

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

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' **Incubation - Repeat = 5 minute(s)**

Loop Start (20)

TrinketM0 Stirr_Fast

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 4

TrinketM0 Deact_All
Delay (sec) 10

Loop End

' **Beads sedimentation**

Delay (sec) 10

Beep

Message new eppendorf port 8 (BF HuEng)

' **Collect binding fraction (BF) for HuEng**

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop Start (2)

' **Aspirate Air to lift piston**

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' **Wash IS with PBS + 0,15M NaCl**

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 6

TrinketM0 Deact_All

' **Beads sedimentation**

Delay (sec) 20

' **Empty syringe**

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop End

' **Aspirate Air to lift piston**

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' **Wash Beads with PBS**

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000
CavroXP12 Delay Until Done

Delay (sec) 3
TrinketM0 Deact_All
Delay (sec) 12
Loop End

' Collect elution fraction (EF)

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Dispense (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Wash IS with elution buffer

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 400
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

Beep

Message New eppendorf - Waste - port 7

Loop Start (2)

' Wash IS with PBS

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Aspirate Air to lift beads from Syringe Inlet

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 6
TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate elution buffer

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) **1000 '1000 or 500**
CavroXP12 Delay Until Done

' Incubation - Repeat = 5 minute(s)

Loop Start (20)

TrinketM0 Stirr_Max
Delay (sec) 4
TrinketM0 Deact_All
Delay (sec) 10

Loop End

' Beads sedimentation

Delay (sec) 10

' Collect elution fraction (E)

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Dispense (microliter) **1000 'XXXX 1000 or 500**
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 50
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Aspirate (microliter) 100
CavroXP12 Delay Until Done

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

Loop End

'Aspirate PBS and get beads

Beep

Message Place new eppendorf port 7

Loop Start (5)

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 400
CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Fast

Delay (sec) 5

CavroXP12 Command (?) O7R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400

CavroXP12 Empty

CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Deact_All

Loop End

Beep

' Wash IS with elution buffer

CavroXP12 Command (?) O9R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000

CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 6

TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O11R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5

CavroXP12 Empty

CavroXP12 Delay Until Done

Delay (sec) 1

Beep

Message Waste - port 7

Loop Start (2)

' Aspirate Air to lift piston

CavroXP12 Command (?) O12R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXP12 Aspirate (microliter) 500

CavroXP12 Delay Until Done

' Wash IS with PBS

CavroXP12 Command (?) O10R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000

CavroXP12 Delay Until Done

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 6

TrinketM0 Deact_All

' Beads sedimentation

Delay (sec) 20

' Empty syringe - waste

CavroXP12 Command (?) O7R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 5

CavroXP12 Empty

CavroXP12 Delay Until Done

Delay (sec) 1

Loop End

'Aspirate PBS and get beads

Beep

Message Place new eppendorf port 7

Loop Start (2)

TrinketM0 Stirr_Max

CavroXP12 Command (?) O10R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 500
CavroXP12 Aspirate (microliter) 1000
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 1200
CavroXP12 Command (?) O7R
TrinketM0 Deact_All
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

Loop End

Beep

Příloha 4. Program FIALab pro závěrečné čištění systému LIS

1 ml stříkačka

Method – Clean system, final

Variable Define New Tubes_EthanolCleaning
Variable Define New OSP_EthanolCleaning
Variable Define New OSP_MQCleaning
Variable Define New CleanSyringe

Tubes_EthanolCleaning = 1
OSP_EthanolCleaning = 1
OSP_MQCleaning = 1
CleanSyringe = 1

If Tubes_EthanolCleaning = 1
' Clean tubes with ethanol

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

5 ml stříkačka

Method – Clean system, final

Variable Define New Tubes_EthanolCleaning
Variable Define New OSP_EthanolCleaning
Variable Define New OSP_MQCleaning
Variable Define New CleanSyringe

Tubes_EthanolCleaning = 1
OSP_EthanolCleaning = 1
OSP_MQCleaning = 1
CleanSyringe = 1

If Tubes_EthanolCleaning = 1
' Clean tubes with ethanol

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

End If

If OSP_EthanolCleaning = 1
' Clean OSP with ethanol
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Clean_OSP_Ethanol.fia

End If

Beep
Message put all tubes into MQ
' Clean tubes with MQ
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

End If

If OSP_EthanolCleaning = 1
' Clean OSP with ethanol
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Clean_OSP_Ethanol.fia

End If

Beep
Message Put all tubes into MQ
' Clean tubes with MQ
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O4R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300

CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

```
If OSP_MQCleaning = 1
' Clean OSP with MQ
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Clean_OSP_MQ.fia
End If
If CleanSyringe = 1
' Clean syringe
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Final_Clean_Syringe.fia
End If
```

CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O7R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O8R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

```
If OSP_MQCleaning = 1
' Clean OSP with MQ
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Clean_OSP_MQ.fia
End If
```

```
If CleanSyringe = 1
' Clean syringe
Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Marie
Iličová\metody\P_Final_Clean_Syringe.fia
End If
```

Příloha 5. Program FIALab pro čištění OPI (vodou Milli-Q/etanol)

1 ml stříkačka

Procedure – Clean OSP (MQ/etanol)

5 ml stříkačka

Procedure – Clean OSP (MQ/etanol)

Loop Start (1)

' Aspirate MQ

CavroXP12 Command (?) O2R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Dispense to OSP

CavroXP12 Command (?) O1R
CavroXP12 Dispense (microliter) 250
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 2

' Aspirate MQ back from OSP

CavroXP12 Command (?) O1R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 350
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

Loop End

Loop Start (1)

' Aspirate MQ

CavroXP12 Command (?) O2R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Dispense to OSP

CavroXP12 Command (?) O1R
CavroXP12 Dispense (microliter) 250
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 2

' Aspirate MQ back from OSP

CavroXP12 Command (?) O1R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 350
CavroXP12 Delay Until Done
Delay (sec) 1

' Empty syringe

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

Loop End

Příloha 6. Program FIALab pro oplach hadiček pufry

1 ml stříkačka

Procedure – Rinsing with buffers

'Aspirate air

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

'Aspirate buffers

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

'Waste

CavroXP12 Command (?) O11R

5 ml stříkačka

Procedure – Rinsing with buffers

' Aspirate air

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

' Aspirate buffers

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O3R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O9R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O10R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

' Waste

CavroXP12 Command (?) O11R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

'Aspirate air

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done

'Aspirate buffers

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 150
CavroXP12 Delay Until Done

'Waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

'Aspirate air

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done

'Aspirate buffers

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Command (?) O5R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

CavroXP12 Command (?) O6R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 300
CavroXP12 Delay Until Done

'Waste

CavroXP12 Command (?) O11R
CavroXP12 Empty
CavroXP12 Delay Until Done

Příloha 7. Program FIALab pro čištění stříkačky

1 ml stříkačka

Procedure – Clean syringe

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

Loop Start (#) CleanTimes

TrinketM0 Stirr_Fast
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 200
CavroXP12 Delay Until Done
If CleanPos = 2
CavroXP12 Command (?) O2R
End If
If CleanPos = 3
CavroXP12 Command (?) O3R
End If
If CleanPos = 4
CavroXP12 Command (?) O4R
End If
If CleanPos = 5
CavroXP12 Command (?) O5R
End If
If CleanPos = 6
CavroXP12 Command (?) O6R

5 ml stříkačka

Procedure – Clean syringe

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

Loop Start (#) CleanTimes

TrinketM0 Stirr_Max
CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 400
CavroXP12 Command (?) O12R
CavroXP12 Aspirate (microliter) 700
CavroXP12 Delay Until Done
If CleanPos = 2
CavroXP12 Command (?) O2R
End If
If CleanPos = 3
CavroXP12 Command (?) O3R
End If
If CleanPos = 4
CavroXP12 Command (?) O4R
End If
If CleanPos = 5
CavroXP12 Command (?) O5R
End If
If CleanPos = 6
CavroXP12 Command (?) O6R

End If
If CleanPos = 7
 CavoXP12 Command (?) O7R
End If
If CleanPos = 8
 CavoXP12 Command (?) O8R
End If
If CleanPos = 9
 CavoXP12 Command (?) O9R
End If
If CleanPos = 10
 CavoXP12 Command (?) O10R
End If
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
 CavoXP12 Aspirate (microliter) CleanVol
 CavoXP12 Delay Until Done

 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 500
 CavoXP12 Command (?) O11R
 CavoXP12 Empty
 CavoXP12 Delay Until Done
 TrinketM0 Deact_All
Loop End

End If
If CleanPos = 7
 CavoXP12 Command (?) O7R
End If
If CleanPos = 8
 CavoXP12 Command (?) O8R
End If
If CleanPos = 9
 CavoXP12 Command (?) O9R
End If
If CleanPos = 10
 CavoXP12 Command (?) O10R
End If
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
 CavoXP12 Aspirate (microliter) CleanVol
 CavoXP12 Delay Until Done

 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 1000
 CavoXP12 Command (?) O11R
 TrinketM0 Deact_All
 CavoXP12 Empty
 CavoXP12 Delay Until Done
Loop End

Příloha 8. Program FIALab pro aktivaci MČ

1 ml stříkačka

Procedure – Beads activation

Beep
Message 200 ul EDC + SNHS to OSP
' Addition of EDC + SNHS
 CavoXP12 Command (?) O1R
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 200
 CavoXP12 Delay Until Done
 Delay (sec) 1

Beep
Message 200 ul MES to OSP
' Addition of MES, wash OSP
 CavoXP12 Command (?) O1R
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 200
 CavoXP12 Delay Until Done
 Delay (sec) 1

' Incubation - Repeat = 10 Minutes

Loop Start (36)
 TrinketM0 Stirr_Fast
 Delay (sec) 3
 TrinketM0 Deact_All
 Delay (sec) 12
Loop End

5 ml stříkačka

Procedure – Beads activation

Beep
Message 200 ul EDC + SNHS to OSP
' Addition of EDC + SNHS
 CavoXP12 Command (?) O1R
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 200
 CavoXP12 Delay Until Done
 Delay (sec) 1

Beep
Message 200 ul MES to OSP
' Addition of MES, wash OSP
 CavoXP12 Command (?) O1R
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 100
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 200
 CavoXP12 Delay Until Done
 Delay (sec) 1

' Aspirate MES

CavoXP12 Command (?) O3R
 CavoXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
 CavoXP12 Aspirate (microliter) 600
 CavoXP12 Delay Until Done

' Aspirate Air to lift piston

CavoXP12 Command (?) O12R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200
CavroXP12 Aspirate (microliter) 500
CavroXP12 Delay Until Done

' **Incubation - Repeat = 10 Minutes**

Loop Start (36)

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 4

TrinketM0 Deact_All

Delay (sec) 10

Loop End

Příloha 9. Program FIALab pro vazbu protilátek

1 ml stříkačka

Procedure – Antibodies binding

Beep

Message 200 ul of antibodies to OSP

' **Aspirate antibodies**

CavroXP12 Command (?) O1R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100

CavroXP12 Aspirate (microliter) 300

CavroXP12 Delay Until Done

Delay (sec) 2

' **Aspirate MES buffer**

CavroXP12 Command (?) O3R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100

CavroXP12 Aspirate (microliter) 400

CavroXP12 Delay Until Done

' **Incubation - Repeat = 60 minute(s)**

Loop Start (216)

TrinketM0 Stirr_Fast

Delay (sec) 3

TrinketM0 Deact_All

Delay (sec) 12

Loop End

5 ml stříkačka

Procedure – Antibodies binding

' **Aspirate Air to lift piston**

CavroXP12 Command (?) O12R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXP12 Aspirate (microliter) 500

CavroXP12 Delay Until Done

Beep

Message 200 ul of antibodies to OSP

' **Aspirate antibodies**

CavroXP12 Command (?) O1R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 100

CavroXP12 Aspirate (microliter) 300

CavroXP12 Delay Until Done

Delay (sec) 2

' **Add MES buffer**

CavroXP12 Command (?) O3R

CavroXP12 Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXP12 Aspirate (microliter) 800

CavroXP12 Delay Until Done

' **Incubation - Repeat = 60 minute(s)**

Loop Start (216)

TrinketM0 Stirr_Max

Delay (sec) 4

TrinketM0 Deact_All

Delay (sec) 10

Loop End