

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**CHARAKTERIZACE AFINITNÍHO PÁRU
ANTIGEN-PROTILÁTKA POMOCÍ METODY
AFFIBLOT**

KATEŘINA BJALCOVÁ

Vedoucí diplomové práce: Mgr. ZUZANA SVOBODOVÁ Ph.D.

Konzultant: Mgr. Katarína Tripská

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí této práce Mgr. Zuzaně Svobodové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady při konzultacích, doporučení, pomoc s experimenty a interpretací výsledků. Dále bych chtěla poděkovat kolegyni Anetě Starobové za podporu a poskytnutí vzorků k měření.

„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 2024

ABSTRAKT

V teoretická části je popsána základní charakteristika antigenů a protilátek, včetně jejich struktury a funkcí. Dále jsou uvedeny třídy protilátek spolu s tvorbou protilátek v lidském organismu. Taktéž jsou objasněny různé možnosti přípravy či výroby protilátek, jako jsou monoklonální, polyklonální a rekombinantní protilátky pro diagnostické účely. Jsou zde zhodnoceny jejich výhody i nevýhody. Shrnutο je rovněž využití protilátek v diagnostice a v terapii, stejně tak je vysvětlen význam afinitní interakce mezi antigenem a protilátkou a použití magnetických částic v diagnostice. V následujících kapitolách jsou zmíněny vybrané metody, které se používají pro charakterizaci afinitních párů, zejména imunoblotovací techniky jako jsou Dot blot, Affiblot a Western blot, ale také imunoenzymatické metody jako je např. ELISA.

V experimentální části se nacházejí výsledky získané z affiblotu verze 3.5.2. za účelem ověření funkčnosti modelového systému antigen-protilátka (lidské IgG a jeho detekční protilátky či konjugáty) a optimalizace metody jejich detekce. Byly testovány a porovnány dvě metody detekce kolorimetrická a chemiluminiscenční. V další fázi byly testovány dvě různé membrány, aby se určil jejich vliv na přesnost a citlivost měření. Důležitou částí experimentů bylo ověření modelového systému antigen-protilátka za účelem izolace antigenu pomocí magnetických částic s imobilizovanou protilátkou a kvantifikace takto získaného proteinu. Měření na Affiblotu bylo srovnáno s měřením na klasickém dot blotu. Rovněž bylo testováno, zda magnetické částice vykazují nespecifickou sorpci či nikoliv.

Klíčová slova: affiblot, dot blot, western blot, ELISA, protilátka, antigen, magnetické částice

ABSTRACT

The theoretical part describes the basic characteristics of antigens and antibodies, including their structure and functions. The different classes of antibodies are also presented along with the process of antibody production in the human body. Additionally, various methods of antibody preparation or production are explained, such as monoclonal, polyclonal, and recombinant antibodies for diagnostic purposes, with their advantages and disadvantages evaluated. The use of antibodies in diagnostics and therapy is summarized, and the significance of the affinity interaction between antigen and antibody is explained, along with the use of magnetic particles in diagnostics. The following chapters mention selected methods used for the characterization of affinity pairs, particularly immunoblotting techniques such as Dot blot, Affiblot, and Western blot, as well as immunoenzymatic methods like ELISA.

The experimental part contains the results obtained from Affiblot version 3.5.2 to verify the functionality of the model antigen-antibody system (human IgG and its detection antibodies or conjugates) and to optimize the detection method. Two detection methods, colorimetric and chemiluminescent were tested and compared. In the next phase, two different membranes were tested to determine their impact on the accuracy and sensitivity of the measurements. An important part of the experiments was the verification of the model antigen-antibody system for the purpose of antigen isolation using magnetic particles with immobilized antibodies and the quantification of the protein obtained in this way. The measurements on Affiblot were compared with those on a classic dot blot. It was also tested whether the magnetic particles exhibit nonspecific adsorption or not.

Keywords: affiblot, dot blot, western blot, ELISA, antibody, antigen, magnetic particles

ZADÁNÍ-CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo poskytnout ucelený obraz o základních aspektech imunologie se zaměřením na antigeny a protilátky. Dále informovat o praktickém využití protilátek v diagnostice a terapii, stejně tak objasnění významu afinitní interakce antigen-protilátka. Cílem bylo také podat přehled používaných metod pro charakterizaci afinitních párů spolu s přiblížením použití magnetických částic a protilátek v diagnostice.

Cílem praktické části bylo ověřit funkčnost modelového systému antigen (v našem případě lidské IgG)-protilátka (myší anti-lidský IgG). To zahrnovalo ověření funkčnosti zařízení Affiblot, spolu s jeho optimalizací za použití lidského IgG, zvolení preferovaného druhu detekce a upřednostňovaného typu membrány. Dále bylo cílem navázat myší anti-lidskou IgG na MČ, vyizolovat lidské IgG z pufru pomocí MČ, určit navázané a vyizolované množství a stanovit nespecifickou sorpci MČ.

OBSAH

ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1. Antigeny.....	10
2. Protilátky, stavba a jejich funkce	11
2.1 Třídy protilátek.....	14
2.2 Tvorba protilátek v lidském organismu	16
2.3 Typy protilátek	17
2.3.1 Monoklonální protilátky	17
2.3.2 Polyklonální protilátky	19
2.3.3 Rekombinantní protilátky	20
2.4 Využití protilátek v praxi	21
2.4.1 Protilátky využívané v diagnostice	21
2.4.2 Protilátky využívané v terapii.....	22
3. Vysvětlení významu afinitní interakce antigen-protilátka.....	24
4. Použití magnetických částic a protilátek v diagnostice	26
5. Přehled používaných metod pro charakterizaci afinitních párů.....	27
5.1 Imunoblottovací metody	27
5.1.1 Dot blot	28
5.1.2 Affiblot	28
5.1.3 Western blot	32
5.2 ELISA.....	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
1. Seznam použitých reagensí	37
2. Použité částice	38
3. Seznam použitých protilátek	38

4. Použité laboratorní pomůcky	38
5. Příprava použitých roztoků.....	39
6. Metody a postupy.....	40
6.1 Affiblot	40
6.2 Klasický dot blot	41
6.3 Kolorimetrická detekce	41
6.4 Chemiluminiscenční detekce	41
6.5 Vazba ligandu na MČ.....	42
6.6 Izolace lidského IgG z pufru pomocí MIS (anti-lidské IgG Sera Mag MČ)	43
6.7 Testování nespecifické sorpce magnetických částic	44
7. Výsledky a diskuse	46
7.1 Optimalizace metody affiblot	46
7.2 Optimalizace metody detekce lidského IgG na affiblotu	47
7.2.1 Kolorimetrická vs. chemiluminiscenční detekce	48
7.2.2 Klasický dot blot	50
7.3 Porovnání měření na dvou rozdílných membránách.....	51
7.4 Vazba ligandu a Izolace lidského IgG z pufru pomocí MČ.....	53
7.4.1 Optimalizace affiblotu za použití myšího a kozího konjugátu	53
7.4.2 Opakování měření na klasickém dot blotu	55
7.4.3 Výpočet množství IgG navázaného na MČ.....	57
7.4.4 Výpočet množství lidského IgG izolovaného pomocí MČ	59
7.4.5 Testování nespecifické sorpce magnetických částic	61
ZÁVĚR	63
SEZNAM ZKRATEK.....	64
SEZNAM TABULEK	65
SEZNAM OBRÁZKŮ	66
POUŽITÁ LITERATURA.....	68

ÚVOD

Afinitní pár antigen-protilátka hraje klíčovou roli ve fungování imunitního systému, kde specifické protilátky produkované B-lymfocyty rozpoznávají konkrétní antigeny, váží se na ně prostřednictvím slabých vazebných interakcí a neutralizují je [1].

Pro úspěšný vývoj a vylepšení diagnostických testů, stejně tak pro zvýšení účinnosti terapeutických protilátek je afinita mezi protilátkou a antigenem klíčová [2, 3]. Silnější afinitní vazba přispívá ke zlepšení citlivosti a specificity diagnostických testů [4]. Může rovněž zlepšit schopnost protilátky vázat se na svůj cílový antigen, což může zvýšit její účinnost [5].

Na trhu existuje obrovské množství protilátek s různou afinitou k cílovému antigenu. Výběr správné protilátky pro danou aplikaci může být i přes různá doporučení komplikované, jelikož chování konkrétní protilátky může být v daném testu těžké předvídat z důvodu odlišných podmínek během testování u výrobce a spotřebitele. Na základě tohoto bylo vyvinuto zařízení Affiblot, jenž může pomoci v optimalizaci testování a výběru správné protilátky pro konkrétní experiment [6].

Jedná se o semikvantitativní metodu založenou na principu dot blotu, která umožňuje určit afinitu/aviditu mezi protilátkou a antigenem. Tato metoda umožňuje současné semikvantitativní porovnání až pěti protilátek od různých výrobců. Zároveň se jedná o jednoduchou metodu, která umožňuje snadné nanášení antigenu, rychlou aplikaci a odstranění roztoků [6].

TEORETICKÁ ČÁST

1. ANTIGENY

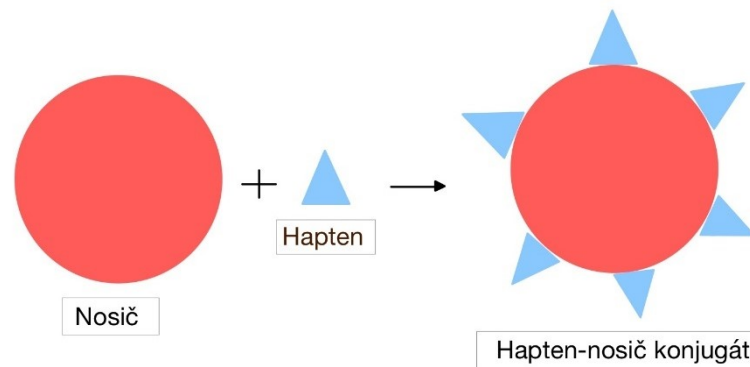
Imunitní systém dokáže rozpoznat cizí, potenciálně škodlivé látky a reaguje na ně spuštěním imunitní reakce [1]. Imunitní reakce může být vrozená, zprostředkována kůží a sliznicemi, které zabraňují vstupu antigenu do těla. Důležitou úlohu plní také fagocyty, enzymy a NK buňky, jenž se snaží antigeny zneškodnit nebo je označit ke zničení. Dále pak adaptivní imunitní reakce, která je sice pomalejší než vrozená, ale za to přesnější. Dokáže si zapamatovat bakterie, se kterými se již setkala. Když se adaptivní imunitní systém poté znovu střetne se stejnou bakterií, umí na ni reagovat rychleji a účinněji, tudíž má onemocnění spojené s danou bakterií lehčí průběh nebo může probíhat bezpříznakově. Hlavní roli v adaptivní imunitní reakci hrají T buňky, které rozpoznávají a ničí infikované buňky a B buňky, které produkují protilátky specifické pro danou bakterii [7].

Látky, na které se protilátky vážou a mají schopnost vyvolat jejich produkci se nazývají antigeny [1]. Antigeny, na které IS útočí a jsou tělu vlastní se nazývají autoantigeny. Antigeny z vnějšího prostředí označujeme pak jako exoantigeny [8].

Složení antigenů je různorodé. Mohou se skládat z proteinů nebo peptidových fragmentů proteinů, sacharidů, nukleových kyselin (DNA nebo RNA), lipidů nebo dokonce haptenu [9].

Protilátky se vážou na antigeny na jejich specifických epitopických místech. Tyto epitopy mají konkrétní strukturu, která určuje interakce mezi protilátkou a antigenem [10]. Antigeny, jako je například tetanový toxoid, mohou na svém povrchu obsahovat více druhů epitopů. Na základě toho pak imunitní systém začne tvořit protilátky proti každému druhu epitopů. Epitopy neboli antigenní determinanty obvykle osahují 6–8 AMK [11]. Aby byl antigen schopen spustit imunitní reakci, musí mít dostatečně velkou molekulu. Proto například nikotin, i když se jedná o tělu cizí látku, nevyvolává imunitní odpověď. Hranice, kdy je molekula schopna vyvolat odpověď IS je asi 10 000 Da. Existuje však situace, kdy i molekula o nízké molekulární hmotnosti může vyvolat tvorbu protilátek, a to v případě, že se naváže na větší, tělu vlastní

molekulu a stane se tak imunogenní. Antigen, který je navázán na takové molekule označujeme jako haptenu (Obr. 1) [1].



Obrázek 1. Vznik haptenu-nosič konjugátu, obrázek nakreslen podle [100]

2. PROTILÁTKY, STAVBA A JEJICH FUNKCE

Jedná se o látky, které jsou schopny rozpoznat antigen a navázat se na něj pomocí elektrostatických interakcí, vodíkových vazeb, van der Waalsových interakcí a hydrofobních interakcí [1]. Mají schopnost chránit člověka před opakovanými onemocněními a udržovat jedince zdravého. Zvládnou totiž shlukovat mikroby, precipitovat rozpustné antigeny nebo ničit bakteriální toxiny [12].

V těle jsou již připraveny protilátky, které odpovídají různým možným antigenním strukturám. Tyto protilátky jsou uloženy jako vzorky na povrchu B lymfocytů, čekající na signál k aktivaci, pokud se antigen objeví [8].

Všechny protilátky jsou glykoproteiny [13], které mají strukturu tzv. imunoglobulinu, jenž můžeme tvarem přirovnat k tvaru písmene Y [14]. Složeny jsou ze čtyř řetězců. Dva z nich jsou kratší, označovány jako lehké (L-light) a dva delší, označovány jako těžké (H-heavy). Spojeny mezi sebou jsou disulfidickými můstky (R-S-S-R). Tyto vazby se spolu i uvnitř řetězců různě spojují a způsobují tak propojení vnitřních řetězců imunoglobulinu do smyčkových struktur zvaných domény [1].

Lehké řetězce se vyskytují ve dvou typech kapa (κ) a lambda (λ) [15]. Těžké řetězce pak v pěti typech, kterými jsou gama (γ), mí (μ), alfa (α), delta (δ) a epsilon (ϵ) [16]. Dále rozlišujeme u lehkých řetězců doménu variabilní (VL) a konstantní (CL) [1]. Variabilní z toho důvodu, že mají

tyto domény proměnlivou posloupnost aminokyselin. Konstantní domény mají aminokyselinovou sekvenci stále stejnou [12]. V případě těžkých řetězců se pak jedná o doménu variabilní (VH) a tři až čtyři konstantní domény (CH) [1]. Hlavní funkcí variabilní oblasti protilátky je vázat se na antigen.[17].

Konstantní doména (fragment Fc) interaguje s následnými složkami imunitního systému [18]. Protilátky se touto doménou vážou na buňky jako jsou granulocyty, makrofágy a buňky NK. Tyto buňky pak spolupracují při eliminaci cizorodých látek. Dále podlé ní u savců dělíme protilátky do pěti tříd, které jsou G, M, A, D, E, které se od sebe liší počtem aminokyselinových jednotek, velikostí polypeptidového řetězce a obsahem sacharidů [8, 12].

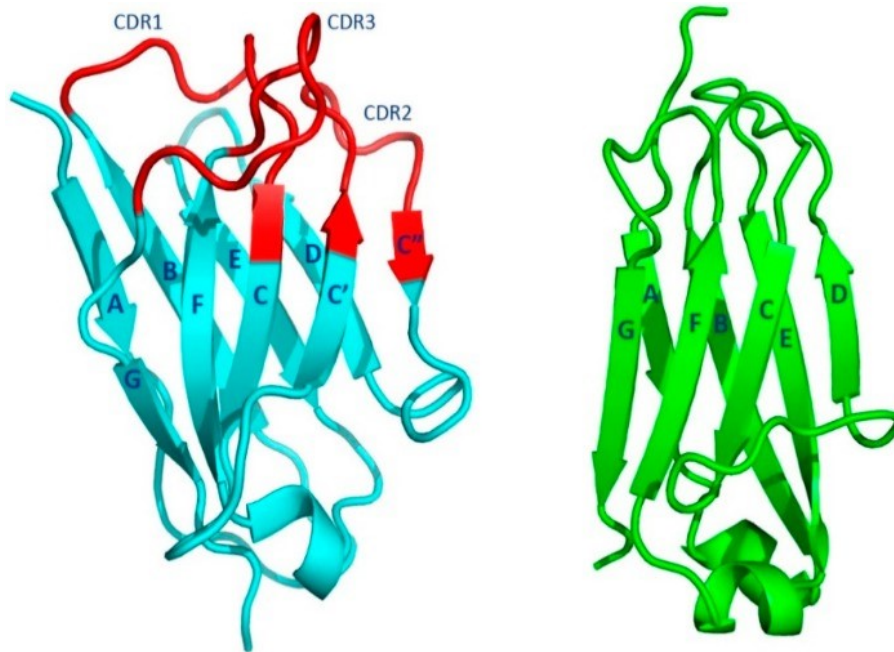
Obecné schéma imunoglobulinu je zobrazeno na obrázku 3.

Zajímavostí je, že u ptáků rozeznáváme pouze tři třídy imunoglobulinů (IgY, IgM a IgA) [19].

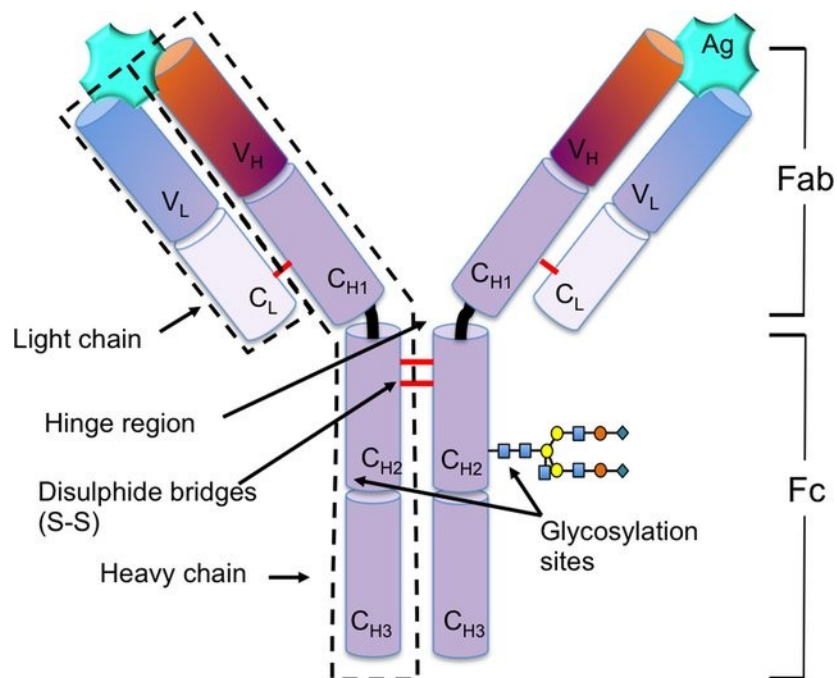
Všechny domény, jak těžkých, tak lehkých řetězců se skládají z přibližně 110 aminokyselinových zbytků a mají specifickou strukturu, skládající se ze dvou antiparalelních β -skládaných listů, které jsou těsně zabalené. C-domény tedy obsahují dva β -skládané listy, přičemž jeden z nich má čtyři β -vlákna (na obrázku 2, zobrazeno zeleně, A, B, E, D) a druhý tři β -vlákna (na obrázku 2, zobrazeno zeleně, C, F, G). Tyto β -skládané listy jsou spojeny disulfidovou vazbou mezi dvěma cysteinovými zbytky. C-domény jsou obecně kompaktní, s krátkými smyčkami spojujícími β -vlákna. V-domény imunoglobulinů, podílející na interakci s antigenem, mají podobnou strukturu jako C-domény s těmito rozdíly. Oba β -skládané listy ve V-doménách mají podobnou konfiguraci jako β -skládané listy v C doménách. Čtyřvláknový β -skládaný list je podobný tomu v C doméně. Druhý β -skládaný list ve V-doméně obsahuje pět β -vláken namísto tří. Mezi β -vlákný (na obrázku 2, zobrazeno modře, C, F, G) je vloženo další dvouvláknové β -vlákno (na obrázku 2, zobrazeno modře, C', C''). Také ve V-doménách je přítomen disulfidový můstek mezi β -vlákný, ale jejich struktura je méně kompaktní s delšími smyčkami (Obr. 2) [20].

Vazba antigenu je umožněna strukturou šesti smyček, které tvoří komplementárně-determinační oblast (CDR). Přesné modelování těchto CDR smyček nám umožňuje lépe porozumět mechanismům vazby a nabízí možnost racionálně navrhovat specifické protilátky [21]. Díky specifickému uspořádání AMK je v daném místě protilátky vytvořen určitý tvar, který

je schopen rozpoznat a vázat se na konkrétní části antigenu. Antigen pak do protilátky zapadne jako klíč do zámku [12].



Obrázek 2. Imunoglobulinová doména. **Modrá**-ilustruje vzor skládání V domény imunoglobulinu (VH). **Červená**-ilustruje oblasti určující komplementaritu (CDR) v doměně V. **Zelená**-ilustruje podobný vzor skládání typické C domény (CL) [20]



Obrázek 3. Obecné schéma imunoglobulinu vázající antigen. Fab-fragment vázající antigen. Fc-fragment krystalizující [101]

2.1 Třídy protilátek

Jak je již zmíněno výše protilátky můžeme rozdělit do pěti tříd IgA, IgD, IgE, IgG a IgM (Ig- imunoglobulin). Které se od sebe liší počtem aminokyselinových jednotek, velikostí polypeptidového řetězce a obsahem sacharidů [12].

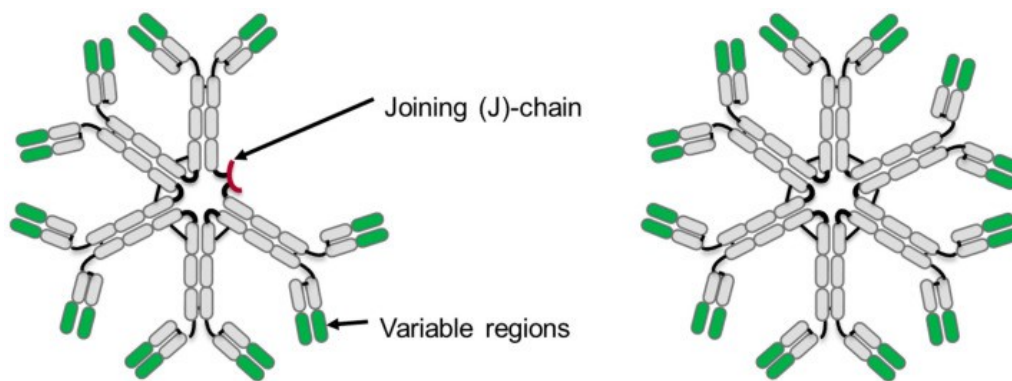
Imunoglobulin G má strukturu monomeru s dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci [22]. V séru má nejvyšší zastoupení a vyskytuje se ve čtyřech podtřídách, tj. IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4, které jsou vysoce konzervované a liší se ve své konstantní oblasti [23]. IgG protilátky jsou typické pro sekundární imunitní odpověď. Po opakované expozici antigenu (např. po druhé injekci při imunizaci) dochází k výraznému nárůstu hladiny IgG protilátek [24]. Protilátky IgG jsou přítomny v krvi a extracelulární tekutině, kde se podílejí na neutralizaci toxinů, virů a bakterií, jejich opsonizaci pro fagocytózu a aktivaci komplementu [25]. Imunoglobulin G má schopnost prostupovat placentou do krevního oběhu plodu a chránit jej do doby, dokud není schopno vytvořit si vlastní protilátky [26]. Z patologického hlediska může hrát důležitou roli ve vývoji autoimunitních poruch [27].

Imunoglobulin M se v lidském těle vyskytuje převážně jako je pentamer složený z pěti monomerních jednotek spojených tzv. spojovacím nebo J řetězcem nebo jako hexamer, který obsahuje šest monomerních jednotek a zcela postrádá J řetězec. Přítomnost hexamerického IgM je často spojována s různými poruchami (Waldenströmova makroglobulinémie, chladová aglutinace a opakované bakteriální infekce močových cest). Předpokládá se však, že malé množství hexameru je přítomno i v normálním lidském séru. Je také velmi účinný při aktivaci komplementu. Aktivuje komplement asi 20krát silněji než pentamer. Zatím není zcela jasné, zda hexamerický IgM slouží jako účinná obrana za určitých podmínek, nebo zda je spíše vedlejším produktem, který může přispět k patologii [28]. Multimer IgM má buď 10 (pentamer), nebo 12 (hexamer) antigenních vazebných míst. Jsou to také první protilátky, které se vylučují po expozici cizím antigenům [29]. Krom toho, že IgM hraje klíčovou roli v počáteční obraně proti cizím patogenům a rakovinným buňkám, je také zapleten do centrální patogeneze některých autoimunitních onemocnění [30]. Je také přítomen na povrchu naivních B buněk jako monomerní molekula [28].

Imunoglobulin A hraje klíčovou roli v obraně slizničních povrchů proti infekčním mikroorganismům. Jedná se o nejrozšířenější třídu protilátek na slizničních površích (přibližně 400 m²) jako jsou výstelky respiračního, gastrointestinálního a genitourinárního traktu [31, 32]. Je také přítomna v značných koncentracích v séru, kde je druhou nejrozšířenější cirkulující imunoglobulinovou třídou po IgG. U lidí rozlišujeme dvě podtřídy IgA, nazvané IgA1 a IgA2. Imunoglobulin A existuje v několika molekulárních formách. V lidském séru je převládající formou monomer. Na slizničních površích pak převládá forma dimerická, přičemž jsou přítomny i vyšší molekulové formy, včetně trimerů a tetramerů [31].

IgD hlavním antigenovým receptorem na povrchu většiny periferních B buněk, kde je nejčastěji koexpresován s IgM. Je to unikátní imunoglobulin, jehož koncentrace v séru je daleko nižší než u IgG, IgA a IgM, ale mnohem vyšší než u IgE [33]. IgD je monomer složený ze dvou identických těžkých a lehkých řetězců uspořádaných do variabilních a konstantních domén, podobně jako IgG [34]. IgD je na B-lymfocyty je upevněn pomocí dvou řetězců (dimerů) Ig-alfa a Ig-beta, které molekulu antigenu upevňují do fosfolipidové membrány [8, 12].

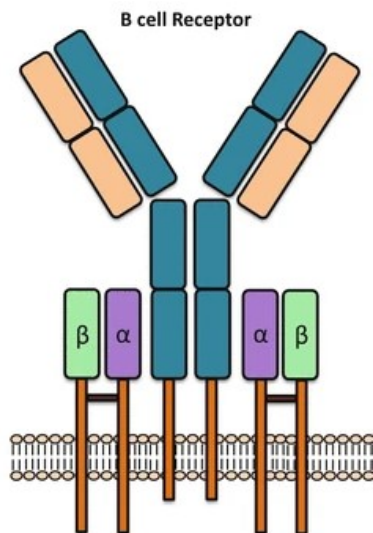
Posledním izotypem imunoglobulinu je IgE. Ze všech typů imunoglobulinu má v séru nejnižší koncentraci [12]. Imunoglobulin E je známý jako „anafylaktický“ imunoglobulin a hraje klíčovou roli v alergických reakcích, včetně alergické rýmy, astmatu a potravinových alergií. Když alergen naváže specifický IgE, spouští se uvolnění zánětlivých mediátorů, jako jsou histamin, heparin, tryptáza a prostaglandiny, což vede k alergickým symptomům a zánětu [35]. IgE je také důležitou součástí ochranných imunitních odpovědí hostitele proti helmintickým parazitům. Daná studie popisuje, jak alergie ovlivňuje imunitní odpověď na parazitické infekce. Studie byla provedena u dvou skupin dětí z Venezuely. Jedna skupina dětí s alergiemi žila na ostrově Coche, kde je vysoká míra alergických onemocnění, zatímco druhá skupina dětí, bez alergií, žila na pevninské oblasti Barrio Los Erasos. Obě skupiny měly podobné podmínky a stejnou míru nákazy parazitem zvaným *Ascaris lumbricoides*. Výsledkem bylo, že děti z oblasti bez alergií měly mnohem vyšší intenzitu infekce a také vyšší hladiny celkového IgE. Naopak, děti s alergiemi měly silnější specifickou imunitní odpověď na tento parazit a nižší úroveň infekce. Výsledky tedy naznačují, že alergie může pomoci lépe se bránit parazitům, což je výhoda, která by mohla vysvětlovat, proč se alergické reakce v evoluci vyvinuly [36].



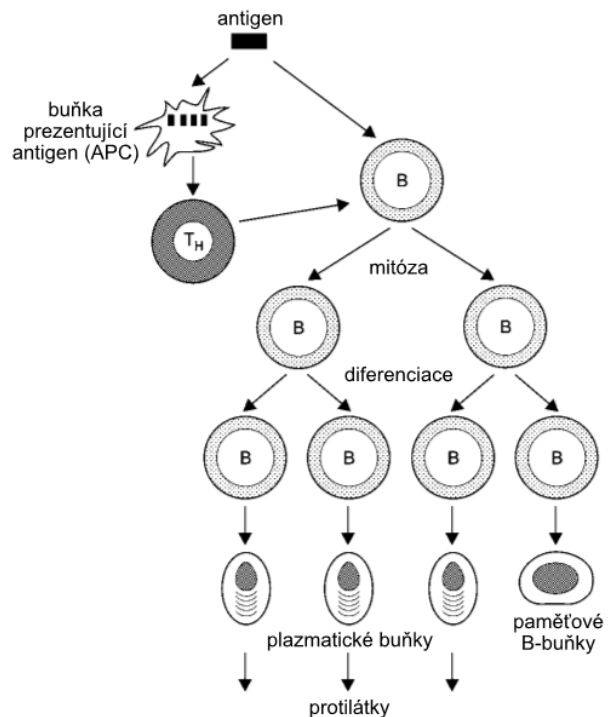
Obrázek 4. Schématický diagram pentameru protilátky imunoglobulinu M (IgM) (vlevo) a hexameru (vpravo). Konstantní oblasti jsou zobrazeny šedě a variabilní oblasti zeleně. Na pentameru IgM je také zobrazen malý spojovací řetězec (J-řetězec) červeně [29].

2.2 Tvorba protilátek v lidském organismu

Vývoj B-buněk u savců zahrnuje několik stádií, která začínají v primárních lymfoidních tkáních (např. lidská fetální játra a fetální/dospělé kostní dřeň) a pokračují funkčním dozráním v sekundárních lymfoidních tkáních (např. lidské lymfatické uzliny a slezina) [37]. Zralé naivní B-buňky jsou poté připraveny reagovat na antigeny. Rozpoznáním antigenu pomocí BCR (Obr. 6) jsou B-buňky aktivovány a diferencují se na plazmatické buňky prostřednictvím diference [38]. Konečným bodem je produkce protilátek terminálně diferencovanými plazmatickými buňkami [37]. V lidském těle se vyskytuje obrovské množství B-lymfocytů z nichž přibližně sto až tisíc buněk tvoří skupinu, která je schopná interagovat pouze s jedním specifickým antigenem. Takových skupin s různou specifičností může být nespočet. Po navázání se tedy daná skupinka B-lymfocytů zaktivuje, B-lymfocyty se začnou dělit a výsledkem jsou plazmatické buňky, které vytváří protilátky proti stejnému antigenu, jaký se původně navázal na antigenní receptor. Kromě protilátek se z B-lymfocytů tvoří také paměťové B-buňky, které mají schopnost pamatovat si specifické antigenní struktury se kterými se v minulosti setkaly a pokud se tento antigen znovu objeví paměťové B-buňky rychle reagují produkcí protilátek (Obr. 5) [12]. B-lymfocyty nejsou aktivovány všemi antigenními signály. Například proteinové antigeny musí být nejprve zpracovány buňkami prezentujícími antigen a také vyžadují pomoc pomocných T-lymfocytů [12].



Obrázek 6. B-cell receptor (BCR) [102]



Obrázek 5. Aktivace B-lymfocytů a jejich diferenciaci na plazmatické a paměťové buňky [12]

2.3 Typy protilátek

2.3.1 Monoklonální protilátky

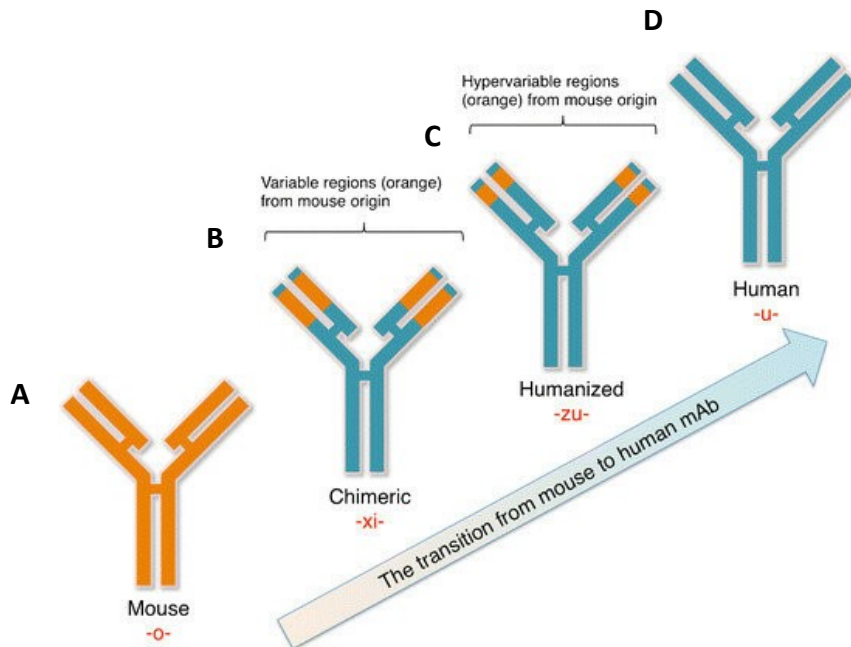
Monoklonální protilátky vznikají z jednoho klonu, tedy z jednoho společného B-lymfocyty. Všechny vzniklé protilátky mají unikátní specifitu vůči jednomu typu epitopu antigenu [11].

Monoklonální protilátky se uměle vyrábějí buď za použití zvířat, nebo pomocí rekombinantních metod [39].

Existují dva obecné způsoby, jak vyrábět mAbs za použití zvířat. Jedná se o metody "ascitu" a "in vitro" metoda. Počáteční krok obou metod je stejný. Nejprve je zvíře (obvykle myš) imunizováno antigenem. Myš je často imunizována několikrát, a to po dobu několika týdnů. Po dokončení imunizace je třeba myš usmrtit, aby se extrahovala slezina. Slezinné B lymfocyty produkující protilátky z myši se fúzí s nesmrtelnými myelomovými nádorovými buňkami in vitro a vzniká hybridom, který bude produkovat pouze jeden typ protilátky [39]. Tato protilátka bude specifická pro jeden epitop antigenu, který rozpoznával původní B-lymfocyt [40]. Hybridomy lze rozšířit dvěma způsoby, a to injekcí do peritoneální dutiny druhé myši (tzv. in

vivo ascitová metoda) nebo kultivací hybridomových buněk in vitro (tzv. "in vitro" metoda). I když obě metody používají zvířata v počátečním kroku imunizace, ascitová metoda je považována pro laboratorní zvířata za bolestnou a stresující [39]. Tento postup pro tvorbu monoklonálních protilátek objevili vědci Georges Köhler a César Milstein v roce 1975 [41].

Zejména kvůli imunogenicitě protilátek pocházejících z hybridomu bylo třeba hledat nové metody, které by tento problém vyřešily. Vývoj v oblasti molekulární biologie a genetického inženýrství otevřely cestu pro výrobu protilátek pomocí rekombinantních buněčných linií namísto hybridomových buněk [42]. V 90. letech byly vyvinuty chimerické protilátky, které kombinovaly lidské konstantní imunoglobulinové oblasti a myší variabilní oblasti, díky čemuž se snížila imunogenita proti myším protilátkám. Za účelem odstranit zbylé T-buněčné epitopy na variabilních oblastech protilátek, byly vyvinuty strategie humanizace (Obr. 7) [42]. Jedná se o proces, který má za úkol upravit tyto protilátky tak, aby byly kompatibilní s lidským organismem, nezpůsobovaly nežádoucí imunitní reakce a zároveň si zachovaly svou terapeutickou účinnost [43]. Techniku humanizace protilátek, poprvé uvedl v roce 1988 Greg Winter a jeho kolegové [44, 45].



Obrázek 7. Proces humanizace Ab. **A** Myší Ab. **B** Chimerická Ab. **C** Humanizovaná Ab. **D** Lidská Ab [103]

V současné době se monoklonální protilátky většinou produkují v myších nebo potkanech, což může být nebezpečné z hlediska přenosu nemocí těchto zvířat na lidi. Navzdory tomu, že

procházejí procesem čištění, není možné zcela vyloučit přítomnost virů v těchto protilátkách. Mohou také vyvolávat imunogenní reakce u lidí kvůli jejich myšímu původu. Genetické inženýrství však v dnešní době umožňuje zmírnit některé z těchto problémů a vylepšit tak kvalitu protilátek. Navíc je vývoj monoklonálních protilátek finančně nákladný a časově náročný proces. Na druhou stranu mají monoklonální protilátky vysokou mírou specifity, čistoty a citlivosti [40]. Imunizace zvířat a následný sběr protilátek vyvolávají také etické otázky týkající se jejich pohody a humánního zacházení [39, 46]. Jak již bylo řečeno, hlavní výhodou monoklonálních protilátek je jejich specifičnost vůči jednomu typu antigenu, čehož se využívá v laboratořích například při analýze změn v molekulární struktuře proteinu nebo při sledování interakcí proteinů. Monospecifita může ale také být jejich nevýhodou, jelikož i malé změny v aminokyselinové struktuře epitopu, mohou značně ovlivnit jejich funkci [19]. Hybridomové buněčné linie mohou zaniknout, ztratit své geny pro protilátky nebo přestat růst, což může vést k nenávratné ztrátě konkrétní monoklonální protilátky. Může se také stát, že se tyto protilátky budou vázat na více než jeden cíl [47].

2.3.2 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky vznikají, když B-lymfocyty zaznamenají na antigenu více typů epitopů. Na základě toho pak musí docházet k polyklonální imunitní odpovědi, jelikož každý typ protilátky je specifický jen k jednomu typu epitopu [11].

Polyklonální protilátky jsou uměle získávány prostřednictvím cílené imunizace zvířat. Tento proces zahrnuje podání specifického antigenu spolu s adjuvantem vybranému zvířeti. Během imunizace se v krevním séru zvířete tvoří směs protilátek, které rozpoznávají různé části antigenu, proti kterému bylo zvíře očkováno. Ze séra jsou následně protilátky izolovány [48].

Výroba polyklonálních protilátek je rychlejší, ekonomicky výhodnější a technicky méně náročná [19]. U polyklonálních protilátek bude změna menšího počtu epitopů méně zásadní, jelikož tyto protilátky mají schopnost rozpoznávat velké množství epitopů. Avidita polyklonálních protilátek vytvořených proti jednomu antigenu z různých zvířat může být různá [19]. Funkčnost polyklonálních protilátek se mezi šaržemi liší, protože imunizace zvířete — dokonce i stejného zvířete — nikdy nevede k vytvoření přesně stejné směsi protilátek [47]. U

polyklonálních protilátek hraje také důležitou roli velikost a životnost zvířete. Tyto faktory mají vliv na získané množství [19].

2.3.3 Rekombinantní protilátky

Rekombinantní protilátky jsou protilátky, které byly vytvořeny pomocí genového inženýrství. Tato technologie umožňuje produkci protilátek se specifickými vlastnostmi [49].

Postup pro tvorbu rekombinantních protilátek odstartoval objev technologie hybridomu [42] (více v kap. [2.3.1](#)).

V dnešní době se rekombinantní protilátky získávají většinou zavedením expresních vektorů in vitro prostřednictvím genového inženýrství [50]. Lze jím získat 100% lidskou protilátku, jenž má téměř nulovou imunogenicitu [51, 52]. Výroba rekombinantních protilátek vyžaduje gen, kódující danou protilátku, vektor jako je například plazmid, který umožní vložení genetické informace do hostitelské buňky a expresní systém, což je vlastně hostitelská buňka, která produkuje rekombinantní protilátky. Protilátky mají složitou strukturu a výroba vyžaduje takové hostitelské buňky, které jsou schopny protilátky přirozeně skládat a modifikovat. Mezi modifikace patří např. post-translační glykosylace. Savčí buňky splňují tyto kritéria a jsou tedy ideálním hostitelem pro výrobu protilátek. Kromě savčích buněk se také používají bakterie, buňky rostliny a buňky hmyzu [39, 53]. Jako výrobní systém jsou také velmi oblíbené kvasinky díky výhodám jako jsou rychlý růst, jednoduchá genetická manipulace, správné post translační modifikace a bezpečná produkce bez patogenů [54]. V současné době jsou téměř všechny terapeutické protilátky stále vyráběny v savčích buněčných liniích, za účelem snížení rizika imunogenicity. Menší fragmenty protilátek jsou úspěšně vyráběny v bakteriích [55]. Díky vyšší citlivosti, specifitě rekombinantních protilátek, jejich neomezené reprodukovatelnosti, která je dána znalostí jejich sekvence, a dlouhodobé stabilitě transfekovaných buněčných linií oproti hybridomům je stále jasnější, že by vědci měli přejít na jejich plošnou výrobu a používání [56]. Navíc použití např. expresního systému pro výrobu rekombinantních protilátek snižuje nebo úplně eliminuje potřebu používání pokusných zvířat [57]. Jedním z problémů při výrobě rekombinantních protilátek může být například nesprávné skládání nebo post translační modifikace, které mohou vést k hromadění špatně složených proteinů, jenž poškozují buňky a

způsobují rozsáhlé abnormality [58]. Další nevýhodou je například vysoká cena a složitá technologie [59]

2.4 Využití protilátek v praxi

Využití protilátek v praxi můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na protilátky využívané v diagnostice a protilátky využívané v terapii různých onemocnění [60, 61].

2.4.1 Protilátky využívané v diagnostice

Diagnostika infekčních onemocnění často vyžaduje prokázání původce nemoci nebo přítomnosti specifických protilátek. Monoklonální protilátky hrají v tomto procesu klíčovou roli, protože jsou schopny rozpoznávat unikátní antigenní determinanty (epitopy) na povrchu patogenů. Díky své vysoké specifitě, kdy reagují pouze s jedním konkrétním epitopem, umožňují MAbs přesnou identifikaci původce onemocnění, což je zásadní pro efektivní diagnózu a následnou léčbu [60].

Protilátky využívané v diagnostice vyžadují oproti terapeutickým protilátkám méně přísné kontroly kvality a bezpečnosti. Dále je v diagnostickém průmyslu důležité udržet náklady na výrobu a distribuci protilátek na co nejnižší úrovni. Důraz je také kladen na rychlost výroby [62].

Využití monoklonálních protilátek značně převažuje nad polyklonálními kvůli schopnosti monoklonálních protilátek cílit na specifické epitopy s minimálními problémy s křížovou reaktivitou, které jsou časté u polyklonálních protilátek. Konvenční metody přípravy polyklonálních protilátek z krevního séra vedou vždy k produkci protilátek různých tříd, specifit a afinit. Naopak monoklonální protilátky jsou cílené na jeden konkrétní epitop, což zajišťuje vyšší přesnost a citlivost diagnostických testů [60].

V laboratorní diagnostice je klíčové mít k dispozici spolehlivé a efektivní metody pro detekci a charakterizaci protilátek. Tyto testy musí být rychlé, univerzální, citlivé a schopné zpracovat velké množství vzorků. Jedním z nejrozšířenějších systémů pro detekci protilátek je enzymově vázaný imunisorbentní test (ELISA) (více v kap. [5.2](#)) [60]. Dalšími metodami pro detekci protilátek je např. uhlíkový imunotest (CIA), který je založen na přilnutí mikroskopických

uhlíkových částic indického inkoustu na králičí imunoglobulin G (Waller et al., 1978) [63]. Metodu vylepšili vědci Bergquist a Waller v roce 1983 [64], kteří přidali protein A jako ligand, který se naváže na protilátky, pokud jsou ve vzorku přítomny. Na navázaný protein A se poté navážou uhlíkové částice, které mohou být detekovány. Použití proteinu A umožnilo detekci protilátek i jiného původu, než je králičí [65]. Jedním z prvních používaných imunotestů byl radioimunotest (RIA), který vyvinuli Yalow a Berson v roce 1959 [66]. Od tohoto typu testů se však upouští, zejména kvůli rizika plynoucího z práce s radioizotopy [67]. Další technikou k identifikaci protilátek je fluorescenční imunotest (FIA). Fluorescenční imunotesty zahrnují kromě antigenu a protilátky také fluorescenční značku, která je připojená k jednomu z těchto prvků a umožňuje detekci [67].

Pro detekci protilátek může být využita i technologie Luminex. Tato technologie využívá bead-based imunoanalýzu založenou na průtokové cytometrii. V této technologii jsou využívány sady polystyrenových nebo magnetických mikrosfér [68], které jsou pokryté různými fluorochromy a HLA antigeny. K těmto mikrosférám se přidává sérum pacienta. Pokud jsou v séru přítomny protilátky proti HLA antigenům, vážou se na dané antigeny přítomné na mikrosférách. Po vazbě protilátek na HLA antigeny se přidává druhá protilátka, která je konjugována s phycoerythrinem (fluorescenční barvivo). Fluorescenční signál je poté detekován. Systém Luminex je průtokový cytometr, který obsahuje dva laserové zdroje. Červený laser excituje fluorochrom uvnitř mikrosfér, zatímco zelený laser detekuje fluorescenční signál phycoerythrinu konjugovaného se sekundární protilátkou. Data jsou poté systémem Luminex shromažďována, zpracovávána a analyzována [69].

Pro zajištění správné funkce a specificity MAbs je důležitá jejich důkladná charakterizace. Toho se dá docílit např. pomocí Western blottingu, který testuje schopnost MAbs vázat se na různé antigenní přípravky, což poskytuje informace o jejich specifitě a afinitě (více v kap. [5.1.3](#)) [60]. Další metodou pro výběr spolehlivých protilátek je metoda Affiblot (více v kap. [5.1.2](#)) [6].

2.4.2 Protilátky využívané v terapii

Výroba protilátek, které jsou využívány v terapii se řídí striktně regulovanými předpisy. Klade se důraz na přísnou kontrolu kvality, testování šarží a důslednou dokumentaci vedenou v souladu s FDA regulacemi. Rychlost výroby je sice méně kritická než u diagnostických

protilátek, přesto je ale důležitá pro včasné uvedení produktu na trh. Stále je zde snaha udržet náklady na výrobu a distribuci protilátek na nižší úrovni. Není to však tak zásadní jako u výroby diagnostických protilátek [62].

Sekvence aminokyselin, které tvoří terapeutické protilátky, byly pečlivě navrženy a modifikovány tak, aby měly lepší biologické účinky a klinické výsledky. Každá část struktury protilátky byla změněna tak, aby se snížila její imunogenicita [70].

Než dojde k uvedení protilátky na trh musí projít preklinickou a klinickou fází. Preklinický vývoj terapeutických protilátek lze přibližně rozdělit na objevování a verifikaci cílového antigenu, přípravu a screening protilátek, pilotní výrobu a kontrolu kvality protilátek, účinnost léku, farmakokinetiku, hodnocení bezpečnosti a deklaraci. V klinických studiích je hlavním cílem hodnocení bezpečnosti a účinnosti terapeutických protilátek v populaci [71].

U terapeutických protilátek je také velmi důležitá jejich čistota. Pro účinné stanovení čistoty je třeba použít řadu analytických metod. Mezi ně patří zejména elektroforéza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a imunoeseje. Charakter a celistvost monoklonálních protilátek musí být pečlivě ověřovány v každé fázi jejich výroby. Tento proces zahrnuje monitorování, které začíná už při kultivaci buněk a pokračuje přes purifikaci (monitorování procesu), charakterizaci produktu, až po uvolnění šarže. V každém z těchto kroků je nezbytné potvrdit, že vzniká správný produkt, který vykazuje požadovanou čistotu a celistvost, a že nedochází k nežádoucím modifikacím protilátky. Zásadní je také neustálá kontrola klíčových provozních parametrů jako jsou pH, vodivost, průtok, tlak a teplota. Také měření fyzikálních charakteristik protilátek je klíčové, protože změny v jejich konformaci a tvorba agregátů během výroby mohou ovlivnit účinnost produktu a nežádoucí účinky. Nečistoty, které mohou do produktu pronikat během procesu výroby protilátek jsou např. proteiny hostitelských buněk, DNA, složky kultivačního média nebo zbytky chromatografického média [72].

Nejvyužívanějšími oblastmi aplikace protilátek jsou onkologie a imunologie například při léčbě autoimunitních onemocnění [70].

Monoklonální protilátky také představují nový a slibný přístup v léčbě závislosti na nikotinu. Na rozdíl od tradičních farmak, které přímo ovlivňují nikotinové acetylcholinové receptory v mozku, se monoklonální protilátky vážou na nikotin v krvi, a tím zabraňují jeho rychlému

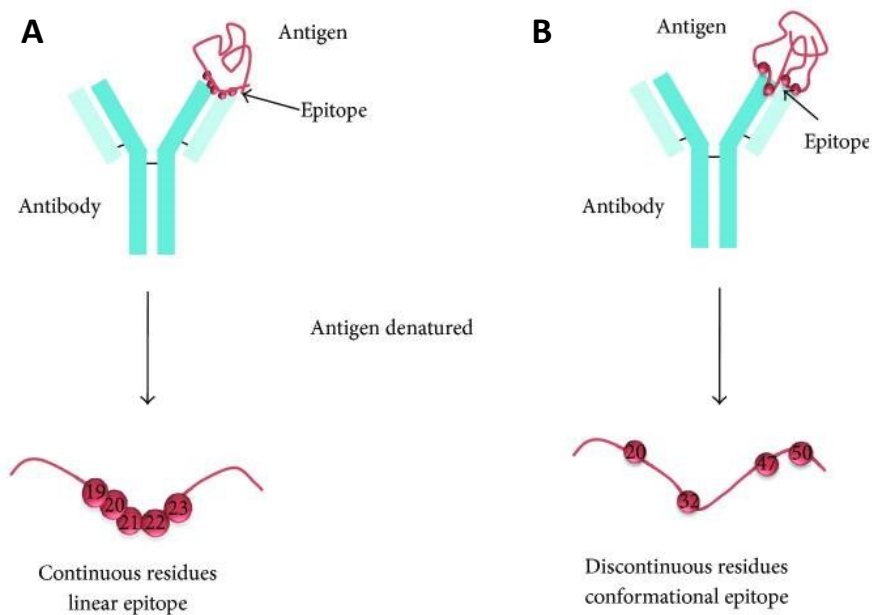
vstupu do centrálního nervového systému. Tento mechanismus je důležitý z toho důvodu, že nikotin má největší stimulační a subjektivní účinky během několika prvních minut po inhalaci. Snížením časné distribuce nikotinu do mozku mohou monoklonální protilátky významně zmírnit účinky kouření a pomoci tak lidem překonat závislost bez obvyklých vedlejších účinků. Monoklonální protilátky s vysokou afinitou k nikotinu byly získány z B-buněk očkovaných kuřáků [73].

Protilátky se využívají také v případě hadího uštknutí. Klíčové je v tomto případě použití antivenomu, což je terapeutická látka složená z imunoglobulinů nebo jejich fragmentů, získaných z plazmy zvířat, která byla hyperimunizována jedním (monospecifickým) nebo několika (polyspecifickými) jedy, za účelem vyvolání vysoké koncentrace protilátek ve zvířeti [74].

3. VYSVĚTLENÍ VÝZNAMU AFINITNÍ INTERAKCE ANTIGEN-PROTILÁTKA

Protilátky se skládají z lehkých a těžkých řetězců, které mají jak variabilní, tak konstantní oblasti. Variabilní části protilátky, konkrétně tedy oblasti zvané CDR (complementarity-determining regions), jsou zodpovědné za rozpoznání antigenu a navázání se na něj. Tyto oblasti mají specifické uspořádání aminokyselin, které je jedinečné pro každý antigen. Malé molekuly, jako například hapteny, se obvykle vážou v oblasti, kde se lehké a těžké řetězce protilátky setkávají a vytvářejí kapsu. Naopak větší antigeny, například proteinové molekuly, mohou být příliš velké na to, aby se do této kapsy vešly. V takovém případě se antigeny vážou na protilátku na jejím větším povrchu, který zahrnuje všechny CDR oblasti. Tento povrch nemusí být jen konkávní, může být i plochý, zvlněný nebo konvexní [75].

Epitopy antigenu se mohou vyskytovat ve dvou základních formách, a to jako lineární epitopy (Obr. 8-A), které se skládají z po sobě jdoucích aminokyselin nebo jako konformační epitopy (Obr. 8-B), jenž zahrnují aminokyseliny, které nemusí být nutně po sobě jdoucí, ale vzájemně se ovlivňují a vytvářejí specifickou trojrozměrnou strukturu proteinu. Protilátky tedy mohou cílit buď na specifické sekvence aminokyselin v lineárních epitopech nebo na specifické 3D struktury vytvořené konformačními epitopy [76, 77].



Obrázek 8. A Lineární epitopy. **B** Konformační epitopy [77]

Síly, které spojují antigen s protilátkou, nejsou silné kovalentní vazby, naopak se jedná o slabé vazebné interakce jako jsou Van der Waalsovy síly, vodíkové vazby, hydrofobní vazby a ion-dipólové vazby. Antigenní determinanta (epitop) a místo vázání antigenu na molekulu imunoglobulinu (paratop) jsou velmi malé plochy, které obsahují pouze několik AMK. Když se tyto molekuly přiblíží, přitahují je různé síly, jako jsou iontové a hydrofobní interakce. Tyto přitažlivé síly překonávají energii hydratace obou molekul, čímž vytlačují molekuly vody, což jim umožňuje přiblížit se k sobě. Jakmile jsou molekuly blízko, začínají se uplatňovat van der Waalsovy síly, které jsou velmi krátkodobé, ale stále důležité. Celková síla vazby mezi epitopem a paratopem závisí na tom, jak dobře do sebe zapadají (přesnost spojení) a na velikosti jejich kontaktní plochy [78].

Afinita mezi protilátkou a antigenem je zásadní pro vývoj a optimalizaci diagnostických testů a terapeutických protilátek [2, 3]. Vyšší afinitní interakce zlepšuje citlivost a specifitu diagnostických testů [4]. Také může zlepšit vazbu protilátky na její cílový antigen, což může vést ke zvýšení účinnosti protilátky [5].

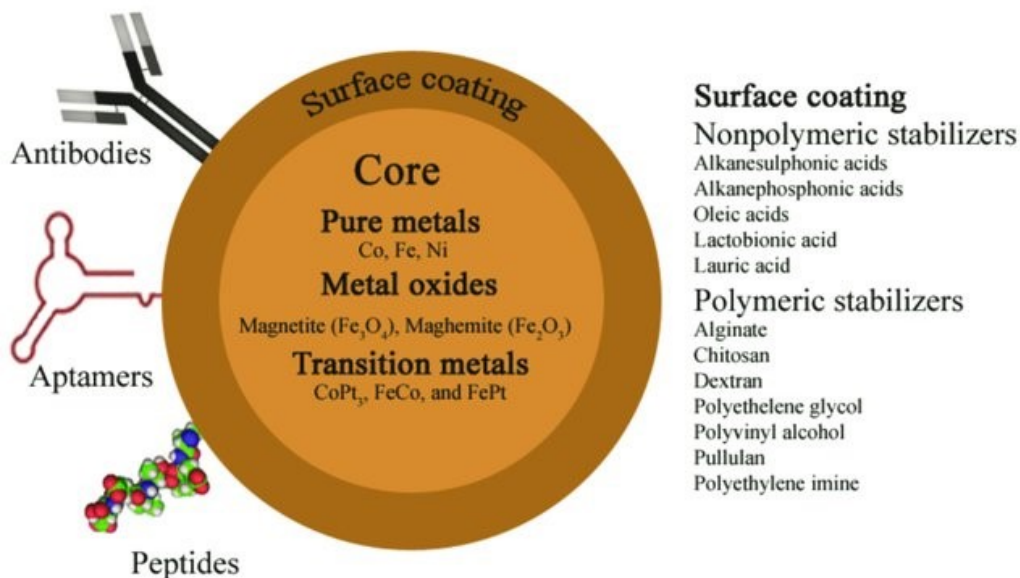
4. POUŽITÍ MAGNETICKÝCH ČÁSTIC A PROTILÁTEK V DIAGNOSTICE

Díky svým jedinečným magnetickým vlastnostem a nízké toxicitě se magnetické částice v posledních letech staly předmětem intenzivního výzkumu. Tyto částice, charakterizované svou malou velikostí a silnými superparamagnetickými vlastnostmi, se snadno, stabilně dispergují v reakčních médiích a mohou být efektivně shromažďovány pomocí vnějšího magnetického pole. Tato kombinace vlastností činí magnetické částice vysoce atraktivními pro široké spektrum aplikací, včetně separace cílových látek, cílené dodávání terapeutických látek do tkání a diagnostika [79].

Magnetické kuličky mohou v ELISA testu nahradit klasickou ELISA destičku, což přináší řadu výhod. Díky možnosti snadného oddělení cílových antigenů pomocí magnetického pole, dochází k výraznému zvýšení citlivosti a zkrácení doby trvání testu. Výsledná zvýšená efektivita testování může být klíčová při rychlé diagnostice a výzkumu [80].

Magnetické částice se nejčastěji skládají z magnetického jádra, povrchového nátěru a specifických ligandů (Obr. 9). Magnetická jádra mohou být složeny z různých materiálů s magnetickými vlastnostmi, jako jsou čisté kovy (např. Co, Fe, Ni), jejich oxidy (magnetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)), nebo přechodné kovy a slitiny (např. CoPt_3 , FeCo, FePt). Fině rozdělené železo je v přítomnosti vody nebo vlhkého vzduchu náchylné k oxidaci. Je tedy nutné zajistit fyzikální a chemickou stabilitu MČ. Toho se dá dosáhnout povrchovým nátěrem MČ pomocí stabilizačních povrchových materiálů nebo enkapsulací do polymerních obalů či liposomů. Povrchové stabilizace se obvykle dosahuje pomocí nepolymerních stabilizátorů jako jsou alkanesulfonová a alkanofosfonová kyselina, fosfonáty, olejová, laktobionová a laurová kyselina nebo pomocí polymerních stabilizátorů, tj. alginát, chitosan, dextran, polyethylenglykol, polyvinylalkohol, pullulan nebo polyethylenimin. Polymerní obal zlepšuje disperzibilitu ve vodě a poskytuje funkční skupiny jako jsou karboxylové pro konjugaci s cílovými ligandy. Jako ligandy vázající se na pevný povrch MČ se nejčastěji používají enzymy, nukleové kyseliny, protilátky, aptamery a peptidy. Pro připojení protilátek se běžně využívá ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid/N-hydroxysukcinimid (EDC/NHS). Orientace protilátek na povrch MČ je většinou náhodná. Protilátka se tedy může k povrchu MČ připojit jak svým Fc tak svým Fab koncem [81]. EDC reaguje s karboxylovou kyselinou a tvoří O-

acylisoureu, vysoce reaktivní chemickou látku, která reaguje s NHS a vytváří ester NHS, který rychle reaguje s aminem (např. protilátkou) za vzniku kovalentní amidové vazby [82].



Obrázek 9. Stavba magnetické částice [81]

5. PŘEHLED POUŽÍVANÝCH METOD PRO CHARAKTERIZACI AFINITNÍCH PÁRŮ

V této kapitole budou představeny metody, které se využívají při analýze afinitního páru antigen-protilátka.

5.1 Imunoblottovací metody

Metody kombinují elektroforézu a vizualizační metody jako například imunochemické reakce s enzymatickou detekcí nebo fluorescencí, díky kterým můžeme stanovit v neznámém vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky. Elektroforéza umožňuje rozdělení antigenu podle elektroforetické pohyblivosti závislé na molekulové hmotnosti. Oba procesy jsou vyplněny mezikrokem známým jako blotting neboli upevnění rozděleného antigenu na pevný nosič jako je například nitrocelulósová membrána. Přenos probíhá buď difuzí nebo pomocí jednosměrného proudu [8]

5.1.1 Dot blot

Dot blot patří mezi imunoblotové metody [8]. Touto metodou lze buďto zjistit přítomnost antigenu či protilátky. Nebo s ní lze stanovit koncentrace antigenu ve vzorku [6].

Klasický dot blot je obvykle zařízení obdelníkového tvaru, které se skládá ze tří plastových desek. V horním víku jsou jamky, do kterých se nanáší vzorek. Spodní díl je napojen na vakuum, díky němuž bude roztok s antigenem nasáván skrz blotovací membránu a zůstane na ní fixován. Následující kroky jsou prováděny v nádobě mimo zařízení. Pokud je porovnáváno několik protilátek nebo antigenů, je potřeba membránu nařezat na proužky. Následně se s každým proužkem pracuje zvlášť. Řezání však výrazně přidává práci a prodlužuje čas pro analýzu, což činí metodu poměrně nepraktickou [6]. Dot blotový test je ale i tak efektivní metodou pro zkoumání interakcí mezi dvěma proteinovými molekulami, z nichž jedna je připojena k povrchu membrány. Výhodou dot blotového testu je jeho rychlost, snadná proveditelnost a cenová dostupnost [83, 84].

Antigeny se v případě dot blotu vyskytují v tekuté formě a jsou ve velmi malých objemech imobilizovány na membránu pomocí filtrace [8, 85]. Poté jsou tyto vzorky inkubovány s protilátkami, které jsou specifické pro antigen, který se má detekovat. Po inkubaci se provádí několik oplachů, aby se odstranily nenavázané složky. Následně se přidává detekční reagens, který indikuje přítomnost vázaných protilátek [6].

5.1.2 Affiblot

Metoda affiblot funguje na principu dot blotu. Jedná se o zařízení velikostí odpovídající dlani, které má speciálně upravené horní víko tak, aby mohlo současně mezi sebou porovnat až pět různých protilátek (Obr. 11-C). Zařízení affiblot umožňuje testovat aviditu mezi antigenem a protilátkou, spolehlivost mezi šaržemi a křížovou reaktivitu. Křížovou reaktivitu lze popsat jako jev, ke kterému dochází, když specifické molekuly jako jsou antigeny nebo protilátky reagují s jinými molekulami, které nejsou jejich cílovými molekulami. To pak může vést například k falešně pozitivním výsledkům [6, 86].

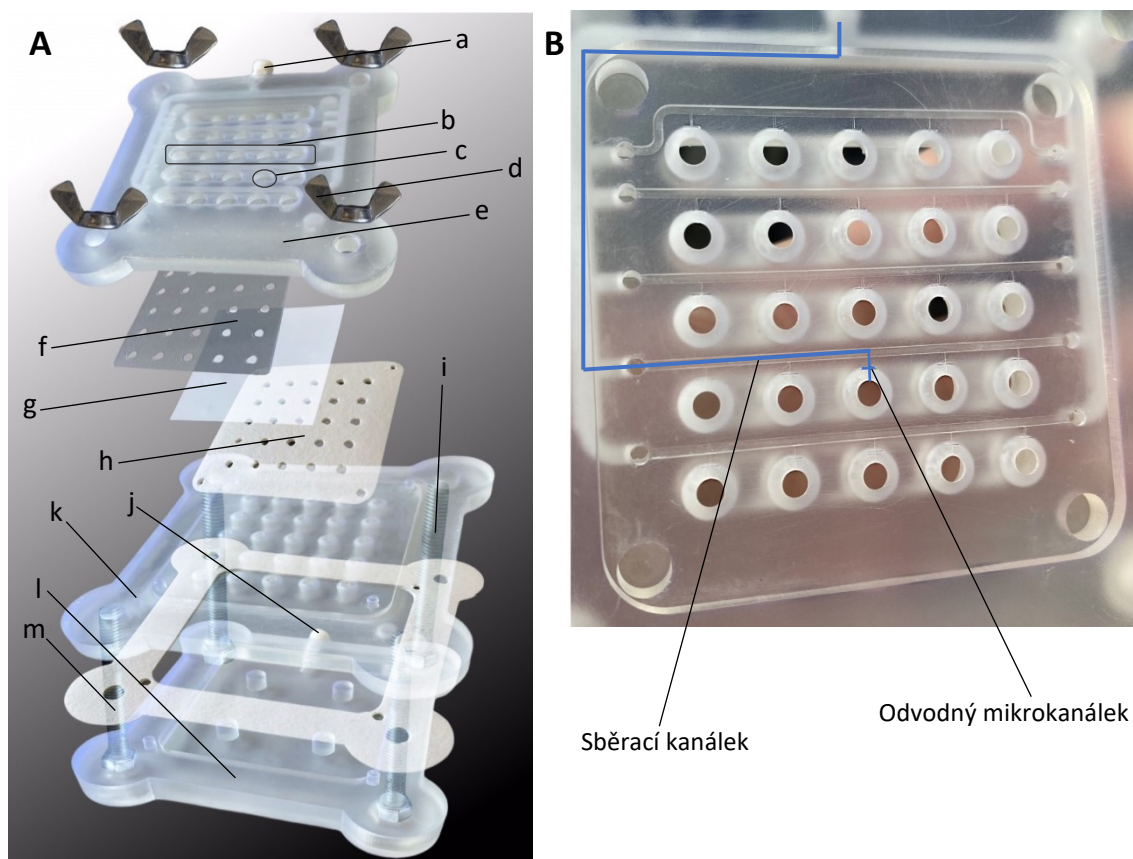
K uvedení affiblotu do provozu je potřeba vakuová pumpa, odpadní láhev (Obr. 12), kamera a membrána. Metoda odpovídá účinností například ELISE, klasickému dot blotu nebo western blotu. Výhodou oproti těmto metodám je její jednoduchost. Umožňuje snadné nanesení

antigenu a rychlou aplikaci a odsátí roztoků (Obr. 11-A). Dále umožňuje provádět celý imunotest včetně hodnocení afinitní reakce uvnitř zařízení. Díky přidaným rezervoárům může být každý řádek inkubován s jinou primární a jí odpovídající sekundární protilátkou. Membránu tedy není třeba stříhat. Sestavené zařízení affiblot má dva ventily (Obr. 11-C). Napojení na horní ventil umožňuje rychlé propláchnutí a odsátí reagensů do odpadní láhve (Obr.11-A). Oproti tomu připojení na spodní ventil umožňuje zachycení antigenu na membránu (Obr. 11-B) [6].

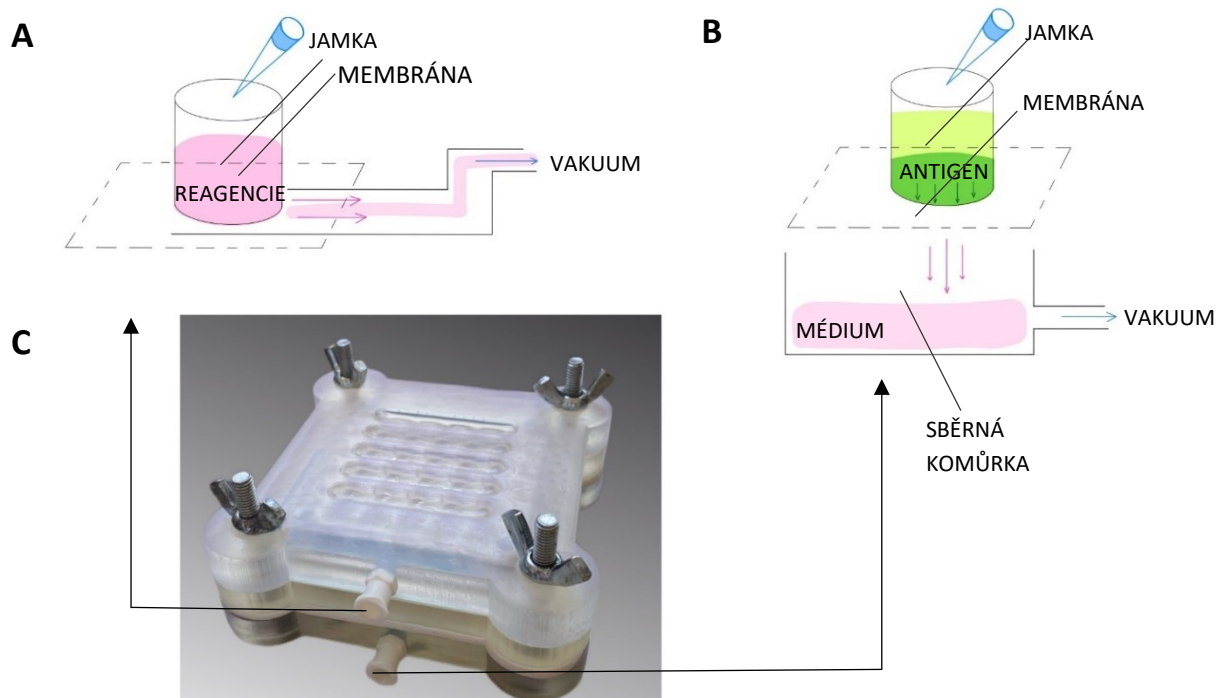
Na spodní straně horního víka se nacházejí odvodné mikrokanálky (Obr. 10-B), díky kterým pomocí vakuového čerpadla odchází činidlo rovnou do odpadu. Jedinou nevýhodou má affiblot v porovnání s western blotem. Při použití affiblotu nelze před analýzou jednotlivé složky směsi antigenů oddělit. Western blot to díky elektroforéze umožňuje, a proto je možné identifikovat a analyzovat jednotlivé složky směsi antigenů zvlášť. Zařízení affiblot se kromě vrchního dílu skládá ještě ze spodního, středního dílu, těsnící membrány, PE fólie, která chrání membránu před reagensy procházejícími odvodňovacími kanálky, výstupů pro vakuum, utahovacích matic a šroubů. Sestavení zařízení affiblot je zobrazeno na obrázku 10-A. Výsledky, které affiblot poskytuje jsou semi-kvantitativní. To znamená, že metoda umí porovnávat proteiny mezi sebou, ale neposkytuje přesné množství těchto proteinů. Detekci je pak možné provést například kolorimetricky nebo chemiluminiscenčně [6].

Křenová peroxidáza (HRP) se velmi často používá jako značka imunoreagentů. K aktivaci tohoto enzymu se používají různé detekční metody jako například kolorimetrie, fluorimetrie nebo chemiluminiscence. Detekce chemiluminiscencí je oproti ostatním metodám značně citlivější. Chemiluminiscenční detekce je založena na enzymatické oxidaci luminolu peroxidem za katalýzy křenové peroxidázy a mírně alkalických podmínek. Oxidace luminolu vede k tvorbě molekuly 3-aminofthalát, která se nachází v excitovaném stavu. Tento stav je ale nestabilní a postupně přechází do nižšího energetického stavu. Při přechodu z excitovaného stavu do nižšího energetického stavu molekula luminolu uvolňuje energii ve formě světla [87]. Tento emitovaný signál je pak zaznamenán například CCD kamerou [88].

Kolorimetrická detekce také může detekovat proteiny značené křenovou peroxidázou (HRP). Využívá k tomu peroxid vodíku, který se za katalýzy HRP rozkládá dvě molekuly peroxidu vodíku na vodu a kyslík, a chromogenní substrát, jako je například 4-chlor-1-naftol (4-CN). Vzniklý kyslík poté oxiduje chromogenní substrát na barevný produkt [89].



Obrázek 10. A Sestavení zařízení affiblot - (a) horní výstup pro vakuum (b) rezervoár 1 ml (c) jamka 100 μ l (d) utahovací matice (e) horní víko (f) PE fólie (g) membrána (h) těsnící membrána (i) šroub (j) dolní výstup pro vakuum (k) střední díl (l) spodní díl obsahující sběrnou komoru (m) těsnění. **B** Detail horního víka s odvodnými mikrokanálkami a sběracími kanálkami ústících do odpadu[6] (vlastní foto)



Obrázek 11. *A* Reagencie jako například blokovací činidlo jsou odváděny pomocí odvodňovacích a sběracích kanálků do horního výstupu na který je napojena odpadní láhev a vakuum. *B* Médium spolu s antigenem je nanášeno do jamky, vakuum je připojené na dolní ventil, antigen se zachytí na membráně a médium projde membránou do sběrné komůrky umístěné ve spodním díle affiblotu. *C* Sestavené zařízení affiblot[6] (vlastní foto)



Obrázek 12. Sestavená aparatura affiblotu, affiblot napojen na odpadní láhev a vakuum (vlastní foto)

5.1.3 Western blot

Díky western blotu je možné identifikovat specifické proteiny a separovat je z komplexní směsi proteinů. Tato technika využívá k separaci proteinů ze směsi elektroforézu. V metodě jsou využívány dva různé typy agarózového gelu, a to navrstvovací a separační gel. V horní vrstvě se využívá mírně kyselý (pH 6,8) navrstvovací gel s menší koncentrací akrylamidu. Tento gel má porézní strukturu. Nevyniká v separování proteinů, avšak díky němu jsou proteiny schopny tvořit tenké, ostře definované pruhy. V dolní vrstvě se nachází separační gel s vyšším obsahem akrylamidu a mírně zásaditým pH (pH 8,8). Póry tohoto gelu jsou užší a díky tomu jsou, na základě své velikosti, proteiny v tomto gelu lépe separovány. Příprava vzorku zahrnuje zahřívání při 100 °C po dobu 5 minut. To zařídí denaturaci proteinů, jejich záporný náboj při nanesení na gel, pohyb směrem ke kladně nabitě elektrodě po připojení napětí, a tedy i separaci proteinů [90].

Separovaná směs je pomocí elektroblottingu přenesena na membránu. Místo elektrického pole lze využít i prostou difuzi nebo vakuový blotting. Membrána může být například nitrocelulózová, nylonová nebo PVDF [91].

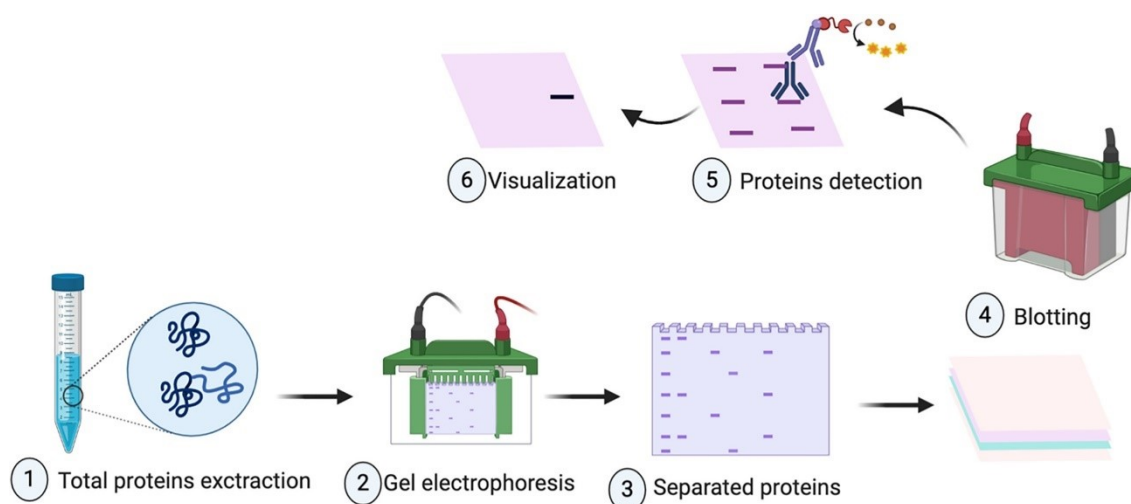
Membrána z polyvinylidenfluoridu (PVDF), je velmi hydrofobní. Nesmáčí se tedy ve vodných roztocích. Aby této schopnosti nabyla, musí se předem namočit v methanolu. Správně smočená membrána umožňuje efektivní přenos proteinů z gelu na membránu. Doba, po kterou je membrána ponořená v methanolu musí být optimální, jelikož při dlouhodobém smáčení dochází k negativnímu ovlivnění vlastností jako je schopnost vázat proteiny a mechanická pevnost [92].

Následuje promývání, kdy se odmyjí nenavázané protilátky, blokování, inkubace s protilátkami specifickými pro cílový protein a detekce pomocí značené protilátky [90]. Proces blokování je důležitý z toho důvodu, že zabraňuje nespecifickému vázání protilátek na membránu zablokováním absorpčních míst [93].

Po detekci se na membráně objeví pruhy značící vazbu mezi protilátkou a cílovým proteinem. Tloušťka pásů odpovídá množství přítomného proteinu [90].

Shrnutí průběhu metody WB je zobrazeno na obrázku 13.

Metoda western blot, stejně jako metoda affiblot poskytuje výsledky, které jsou semikvantitativní. Faktory ovlivňující přenos proteinu z gelu na membránu jsou především povaha gelu, molekulární hmotnost přenášených proteinů a použitá membrána [90, 91].



Obrázek 13. Průběh metody western blot. Izolované proteiny jsou nejprve separovány podle velikosti za použití gelové elektroforézy (1 a 2). Následně jsou oddělené proteiny přeneseny na blotovací membránu (3 a 4). Blotovací membrána je dále inkubována nejprve s primárními a poté se sekundárními protilátkami (4 a 5). Nakonec je cílový protein detekován (6) [104]

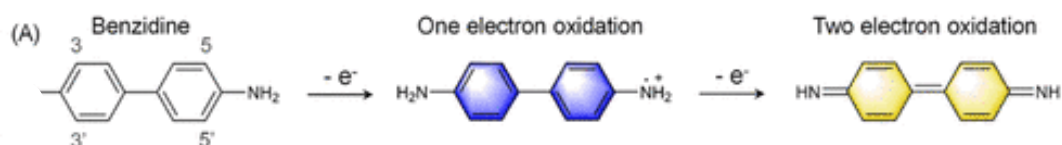
5.2 ELISA

Metoda ELISA patří do skupiny enzymoimunoanalytických (EIA) testů. Tyto testy využívají k detekci imunochemické reakce a enzymatické značení za účelem stanovení koncentrace antigenu nebo protilátky v neznámém vzorku. Konkrétně se jedná o heterogenní (je potřeba oddělit nenasazené látky od nasazených promytím) kompetentní (má buď značenou protilátku nebo značený antigen) nebo heterogenní, nekompetentní (má značenou protilátku) typ EIA testů. Metoda je citlivá, specifická a poměrně rychle poskytuje výsledky [8].

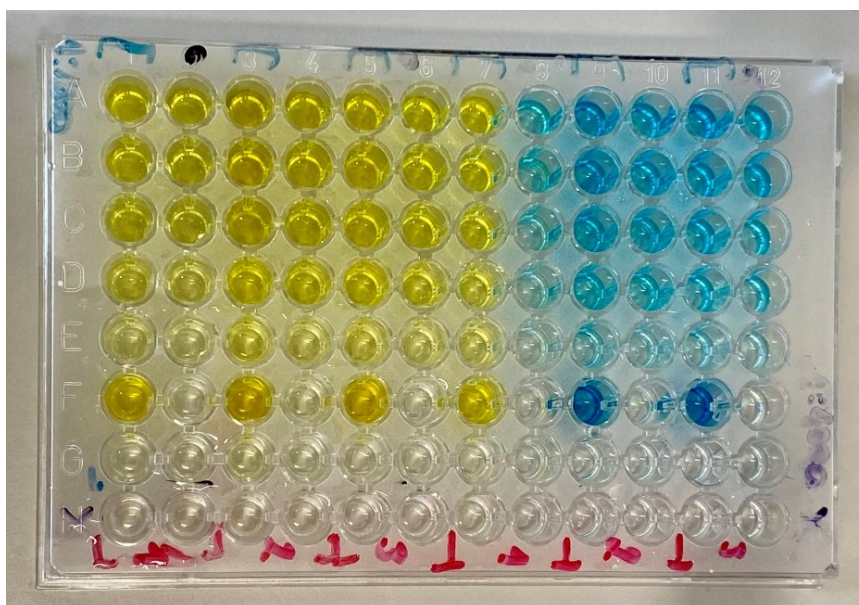
Princip spočívá v tom, že se protilátka naváže na obvykle 96 jamkovou mikroděstičku, vyrobenou z tuhého polystyrenu, polyvinylu nebo polypropylenu [8, 94]. Vazba může být kovalentní nebo se protilátka může na destičku navázat pomocí nespecifické sorpce [95]. K pevné fixaci protilátky na destičku a minimalizaci nespecifických interakcí se často využívá glutaraldehyd, se kterým se destička inkubuje. Koncentrace glutaraldehydu vyšší než 0,10 % (v/v) mohou způsobit zvýšenou nespecifickou vazbu protilátek v ELISA testech. Na druhou stranu, použití glutaraldehydu v nižších koncentracích, jako je 0,05 % nebo 0,025 % (v/v), je efektivní pro stabilní fixaci buněk a zároveň snižuje úroveň nespecifické vazby [96].

Následuje blokace míst, která jsou volná. Dále se přidá antigen a inkubuje se. Následuje odmytí nenavázných složek. Nyní se přidá sekundární protilátka obsahující enzym. Následuje inkubace a promytí. Nakonec se přidá substrát, který je enzymem štěpen a dochází ke vzniku specifického zbarvení, které je měřeno fotometricky [94].

Jedno z nejběžnějších enzymových značení je pomocí křenové peroxidázy (HRP), jejíž enzymovým substrátem je peroxid vodíku. HRP katalyzuje rozklad dvou peroxidů vodíku na vodu a kyslík, který oxiduje chromogenní substrát například 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Oxidace jedním elektronem způsobuje přechod do modrého zbarvení. Po přidání kyseliny za účelem zastavení substrátové reakce vznikají dvouelektronové oxidační produkty a modré zbarvení přechází na žluté, které je následně spektrofotometricky měřeno (Obr. 14,15). Enzymatická substrátová reakce je dokončena obvykle do 60 minut například pomocí kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové [89, 94, 97].



Obrázek 14. Oxidace TMB, změna zbarvení z modrého na žluté po přijetí elektronů [97]



Obrázek 15. 96 jamková mikrodestička, změna zbarvení TMB z modré na žlutou po okyselení kyselinou v praxi (vlastní foto)

Existují různé faktory, které mohou ovlivnit enzymatickou aktivitu, a tedy i koncentraci výsledného produktu reakce. Patří zde například čas reakce, nedostatek substrátu a vystavení

světlu. Aby se předešlo "edge effect" (rozdíl optické hustoty mezi okrajovými a středovými jamkami), je důležité provádět inkubaci substrátu ve tmě [98].

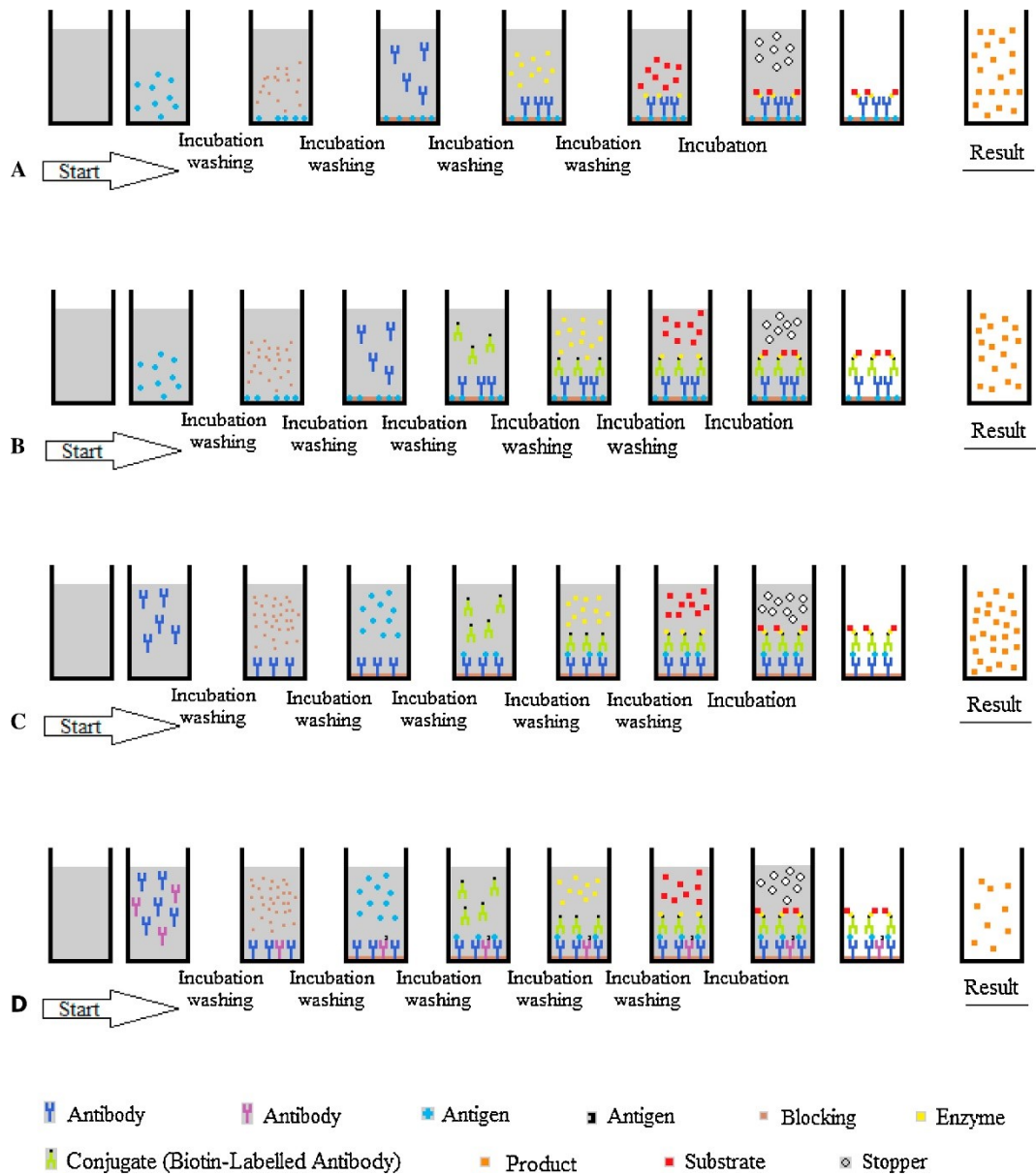
ELISU můžeme rozdělit na čtyři typy. Přímá ELISA, nepřímá ELISA, sendvičová ELISA a kompetitivní ELISA [94].

U přímé metody je destička pokryta antigenem nebo protilátkou. Následuje inkubace, propláchnutí, blokace a další propláchnutí. Poté se přidá enzymem konjugovaná primární detekční protilátka nebo antigen a opět se inkubuje a proplachuje. Následně je přidán substrát. Vzniká specifické zbarvení, které určuje množství antigenu nebo protilátky (Obr. 16-A) [94, 99].

Nepřímá metoda je podobná přímé. Rozdíl je v počtu promývání a v tom, že k antigenu, který má být měřen, je přidána primární protilátka, která se na něj naváže. Promyje se, následně se přidá sekundární protilátka označená enzymem, která je komplementární s primární protilátkou a inkubuje se (Obr. 16-B) [94, 99].

V sendvičové metodě je tzv. "capture" protilátka nanášena do jamek, inkubována, promyta, zablokována a opět promyta. Následně je do jamek přidán antigen, který "capture" protilátka zachytí. Destička je poté inkubována a následně promyta. Poté se přidá sekundární enzym-konjugovaná protilátka, inkubuje se a promývá. Nakonec se přidá substrát. Jelikož je zde antigen umístěn mezi dvěma protilátkami, nazývá se tato ELISA sendvičová (Obr. 16-C) [94, 99].

Posledním typem ELISY je kompetitivní ELISA, jenž bude vysvětlena na příkladu v rámci testování přítomnosti protilátky proti danému antigenu v testovaném séru. Potřeba jsou dvě specifické protilátky. Enzymem konjugovaná protilátka a další protilátka přítomná v testovaném séru (pokud je přítomná). Tyto protilátky se současně nanášou do jamek a soutěží spolu o navázání na antigen. Pokud se po přidání substrátu změní barva média, znamená to, že test je negativní a že se enzymem konjugovaná protilátka navázala na antigeny. Pokud se substrátový roztok neobjeví, znamená to, že jsou protilátky v testovaném séru přítomny a že se navázaly na antigeny (enzymem konjugované protilátky jsou odstraněny během promývání) (Obr. 16-D) [95].



Obrázek 16. Jednotlivé kroky jdoucí po sobě u čtyř různých typů ELIS. **A** Přímá ELISA. **B** Nepřímá ELISA. **C** Sendvičová ELISA. **D** Kompetitivní ELISA [94]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. SEZNAM POUŽITÝCH REAGENCIÍ

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

- Fosfátové pufované fyziologické tablety (P4417-50TAB, SIGMA Life Science, Massachusetts, Burlington)
- Hovězí sérový albumin-lyofilizovaný bez mastných kyselin (PM-T1727/100, Biosera Francie, Nuaille, Pays De La Loire)
- Methanol p. a. (67-56-1, Lach-Ner s. r. o., Česká republika, Neratovice)
- 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina, (MES) (145224-94-8, Sigma-Aldrich, USA, MO, St. Louis)
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarboiimid (EDAC) (25952-53-8, Sigma-Aldrich, USA, MO, St. Louis)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (S-NHS) (106627-54-7, Sigma-Aldrich, USA, MO, St. Louis)
- Azid sodný (Chemapol Limited, UK, London)
- Hydroxid sodný (LACHEMA o.p., Chemapol, ČR, Brno)
- Tween®20 (39796.01, SERVA, Německo, Heidelberg)
- SuperSignal™ West Pico chemiluminiscenční substrát (34580, Thermo Fisher SCIENTIFIC, Massachusetts, Waltham)
- Opti-4-CN detekční kit (1708235, Bio-Rad, USA, CA, Hercules)
- Redestilovaná voda - Milli-Q
- 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (TRIS) (3718005, Serva, Německo, Heidelberg)
- Glycin (50046, Sigma-Aldrich, USA, St. Louis)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)

2. POUŽITÉ ČÁSTICE

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

- Sera-Mag-zásobní roztok karboxylovaných magnetických částic o průměrné velikosti 1 μm , (24152105050250, Cytiva, UK, Buckingham)

3. SEZNAM POUŽITÝCH PROTILÁTEK

Název (katalogové číslo, výrobce, stát, město)

Protilátky:

- Myší anti-lidský IgG (H+L) (SAB3701329, Sigma-Aldrich, USA, St. Louis, MO)
- Lidské IgG ze séra (I2511, Sigma-Aldrich, USA, MO, Saint Louis)
- Kozí anti-lidský IgG (H+L)/HRP (AP112P, Millipore, USA, CA, Temecula)
- Kozí anti-myší IgG/HRP (12-349, Sigma-Aldrich, USA, MO, St. Louis)

4. POUŽITÉ LABORATORNÍ POMŮCKY

- Affiblot-prototypy 3.5.1 a 3.5.2 (Ústav analytické chemie AV ČR, Brno, ČR)
- Analytická váha AE200 (Mettler Toledo, D1-25352/00)
- ChemiDoc MP imaging systém (BIO-RAD, Hercules, Kalifornie)
- Magnetické míchadlo s ohřevem MSH-300 (Biosan, Litva)
- Magnetická míchadla 1 sada R.C267.1 (P-LAB, Karlsruhe, Německo)
- pH metr EdgePH-(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)
- Immobilon-E-PVDF-membrána, 0,45 μm (IEVH85R, Merck Millipore, IRL, Tullagreen, Carrigtohill)
- Rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan, Riga, Litva)

- Třepačka Titramax 101 (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Vakuová pumpa (Millipore, Burlington, Kanada)
- Vortex lab dancer S000 (IKA, Staufen, Německo)
- Magnetický separátor (Invitrogen)
- Vortex V-1 plus, verze V3AW (Biosan, Riga, Latvia)

5. PŘÍPRAVA POUŽITÝCH ROZTOKŮ

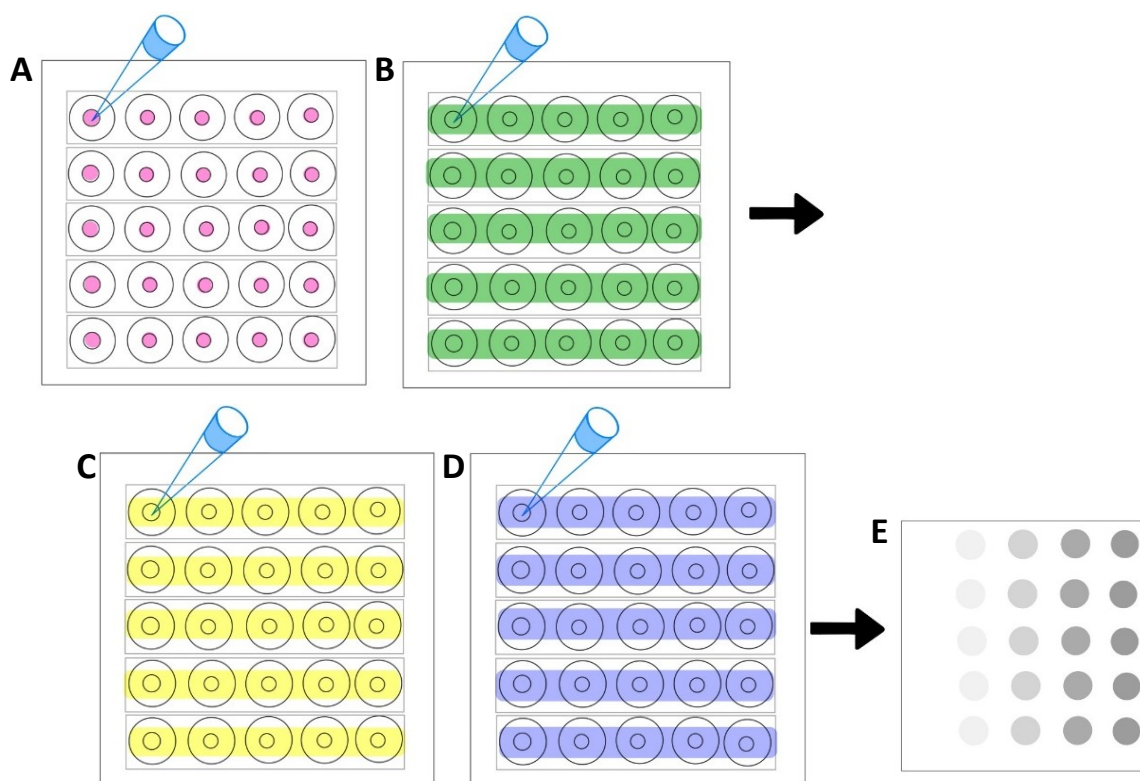
Θ PBST (promývací Θ)	150 ml Θ PBS 75 μl Tweenu
Θ BSA v PBST 5 % (blokační Θ)	1 g BSA 20 ml PBST
Θ BSA v PBST 0,1 % (pufr pro ředění protilátek)	0,05 g BSA 50 ml PBST
Θ MES pufr	1,95 g MES 100 ml redestilované H ₂ O pH doladíme 0,15M NaOH
Θ Opti-4CN Substrátu (substrátový roztok pro kolorimetrickou detekci)	500 μl Opti-4CN diluent 4500 μl dest.Vody smícháme přidáme 100 μl Opti-4CN Substrate
Θ 0,1M Glycinový pufr	0,189 g glycinu rozpustíme ve 28 ml destilované vody odebereme 25 ml 85,9 μl HCl rozpustíme v 10 ml destilované vody odebereme 8,4 ml smícháme (25+8,4) upravíme pH zbytkem roztoků, popř. pomocí HCl/NaOH doplníme do 100 ml
Θ SuperSignal™ West Pico (substrátový roztok pro chemiluminiscenční detekci)	1 ml SuperSignal West Pico PLUS Luminol/Enhancer Solution 1 ml SuperSignal West Pico PLUS Stable Peroxide Solution
Θ 1M TRIS pufru	10 ml Milli-Q 1,210 g TRIS
Zředěný Θ lidského IgG (9μg/ml)	2 μl zásobního Θ lidského IgG (4,5 mg/ml) 1000 μl PBS (pH 7,4)
Blank	1 ml PBS pH 7,4 1 μl Θ BSA v PBST 0,1 %

Tabulka 1 - Příprava použitých roztoků

6. METODY A POSTUPY

6.1 Affiblot

PVDF membrána byla namočena v methanolu. Poté byla připravena vanička s promývacím roztokem PBS, do kterého byla membrána přendána. Po ekvilibraci byla membrána vyjmuta a vložena do affiblotu. Při použití membrány Imobillon, stačila pouze redestilovaná voda MQ a promývací roztok PBS. Na sestavený affiblot byl nanesen antigen dle předem připravených schémat. Po nanesení Ag bylo zařízení propláchnuto 50 μ l PBS (pH 7,4), byl nanesen blokační roztok, 1ml na rezervoár. Po uplynutí jedné hodiny bylo zařízení promyto roztokem PBST, 1 ml na rezervoár. Poté byl pipetován zředěný konjugát, 1ml na rezervoár, dle předem připraveného schématu. Následovala hodinová inkubace. Pokud byla prováděna sendvičová metoda následovalo propláchnutí promývacím PBST roztokem, 1 ml na rezervoár, nanesení sekundární protilátky a hodinová inkubace. Finálně bylo 5x promyto roztokem PBST, 1ml na rezervoár. Membrána byla po rozložení affiblotu vyjmuta a zdetekována.



Obrázek 17. *A* Nanášení antigenu. *B* Blokování. *C* Nanášení primární protilátky (tento krok je navíc u sendvičové metody). *D* Nanášení sekundární protilátky značenou HRP. *E* Detekce [6]

6.2 Klasický dot blot

U klasického dot blotu bylo do určitého bodu postupováno stejně jako u affibotu (kapitola 2.6.1). Změna nastala po nanesení Ag a následném promytí 50 μ l PBS (pH 7,4). Affiblot byl poté rozložen a membrána vložena do vaničky s blokačním roztokem. Vanička s membránou byla umístěna na třepačku a po dobu jedné hodiny byla membrána inkubována. Blokační roztok byl nahrazen roztokem PBST a 5 minut bylo promýváno na třepačce. Roztok PBST byl vyměněn za roztok s protilátkou a membrána byla opět hodinu inkubována. Po uplynutí jedné hodiny bylo promýváno 5x 5 minut v roztoku PBST a následovala detekce.

6.3 Kolorimetrická detekce

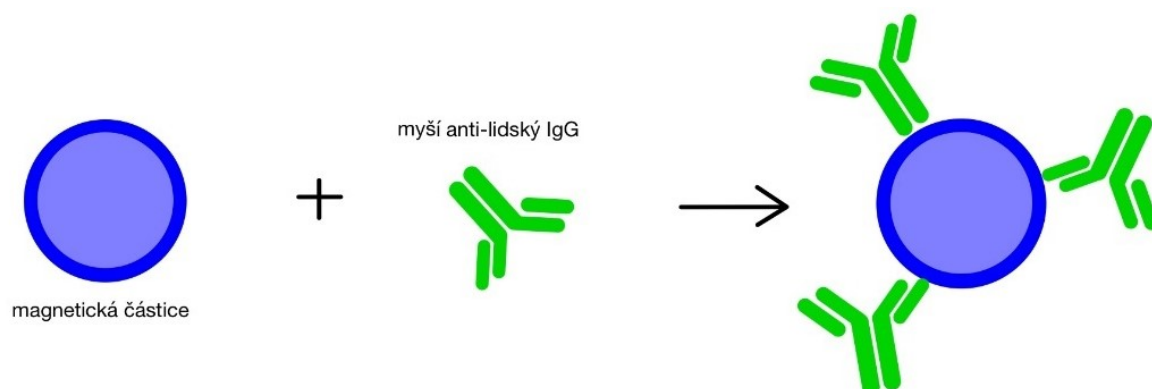
Pro kolorimetrickou detekci byl použit Opti-4-CN detekční kit. Membrána ponořená do roztoku PBST byla umístěna na třepačku na 10 minut. Nejprve byl připraven substrátový roztok podle tabulky č. 1. Na připravenou membránu byl nalit substrátový roztok. Inkubace trvala 15 minut. Poté byly reagentie slity a nahrazeny destilovanou vodou. Opět bylo 15 minut inkubováno. Pro získání výsledných intenzit skvrn bylo třeba membránu, po uschnutí, vložit do přístroje ChemiDoc a vyfotit v programu ImageLab (Obr. 8).

6.4 Chemiluminiscenční detekce

Pro chemiluminiscenční detekci byl použit SuperSignal™ West Pico chemiluminiscenční substrát. Byla použita průhledná eurofólie, která byla vystřižena do obdélníku a rozstřižena po straně. Do otevřené fólie byl vložen papírový ubrousek, na něj plastová podložka a na ni membrána. Substrátový roztok připravený podle tabulky č.1 byl nalit na membránu po celé její ploše. Inkubace trvala 3 minuty. Přebytečný substrátový roztok byl poté slit na ubrousek, podložka s membránou byla uzavřena fólií a přebytek tekutin byl vytlačen do ubrousku. Membrána byla vložena do přístroje ChemiDoc. K zjištění intenzity skvrn byl použit program Image Lab.

6.5 Vazba ligandu na MČ

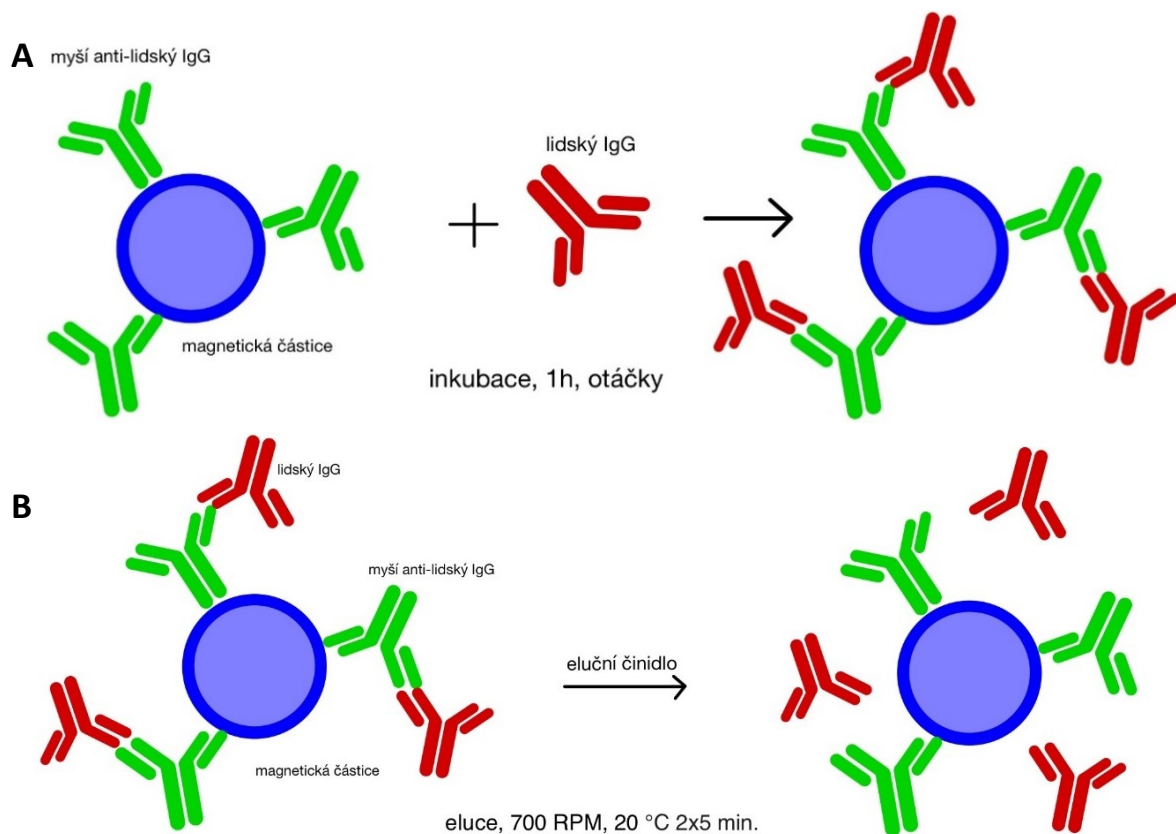
Nejprve byl resuspendován zásobní roztok s magnetickými částicemi. Sterilní špičkou byl odebrán 3 x 0,3 mg magnetických částic. Roztok MČ byl napipetován na zadní stěny vialek, které byly umístěny v magnetickém držáku. Poté bylo 3 x promyto 1 ml 0,1M MES pufru. Po každém promytí byly vialky umístěny na třepačku a vloženy zpět do magnetického držáku. Následně bylo naváženo 3 x 7,5 mg EDC do jedné 2 ml vialky a 3 x 1,25 mg S-NHS do druhé 2 ml vialky. Z magnetických částic byl odebrán supernatant. K EDC bylo přidáno 1,5 ml MES pufru. Z tohoto roztoku bylo odebráno 500 μ l a poté přidáno do každé vialky s magnetickými částicemi. Stejný postup byl zopakován s S-NHS. Do každé vialky s S-NHS bylo přidáno 1,5 ml MES pufru. Z tohoto roztoku bylo poté odebráno 500 μ l a tento objem byl přidán do každé vialky s magnetickými částicemi. Poté byly vialky umístěny do rotátoru. Inkubace probíhala 10 minut při pokojové teplotě-aktivace funkčních skupin (EDC, S-NHS = aktivační činidla). Byly nachystány čtyři 2 ml vialky (3x pro PV pro mikročástice, 1x pro PV pro analýzu) a protilátka (myší anti-lidský IgG (H + L) unconjugated, Sigma-Aldrich, SAB3701329, Lot: RI36745). Do každé vialky byl pipetován 1 ml 0,1M MES pufru a 10 μ l protilátky (10 μ g/ml). Poté byly protilátky přidány do vialek s MČ a opět umístěny na rotátor, 2 hodiny bylo inkubováno- navázání Ab na MČ (Obr. 18). U každého vzorku byla následně odebrána vazebná frakce (VF1,2,3). Po inkubaci bylo 3x promyto PBST. První promytí každého vzorku bylo uchováno pro analýzu (P1, 0,5 ml) a 2x bylo promyto do odpadu (P2 a P3). Následně bylo 1x promyto roztokem PBST. Vzniklý imunosorbent byl uchován v 0,1% BSA v PBST (1 ml) + 0,05% azid sodný (10 μ l). Vzorky byly zdetekovány na affiblotu.



Obrázek 18. Ligand vázající se na MČ

6.6 Izolace lidského IgG z pufru pomocí MIS (anti-lidské IgG Sera Mag MČ)

K třem alikvotům MIS anti-lidské IgG-SeraMag-COOH (0,3 mg) byl přidán 1ml roztoku PBST za účelem odmytí zbavení konzervačních látek. Poté byl přidán antigen, lidský IgG (Sigma I2511), 50 ng/0,3mg magnetických částic + 0,5 ml PBS (PV) (pH 7,4). Následovala inkubace (1 h, RT, otáčky)-vazba lidského IgG na magnetický imunisorbent (Obr. 19-A). Po ukončení inkubace byla odebrána VF1,2,3 pro následnou analýzu. Poté bylo 3x promyto roztokem PBS pH 7,4. První promytí bylo uchováno pro analýzu (P1, 0,5 ml) a 2x bylo promyto do odpadu (P2 a P3, 1 ml). Dalším krokem byla eluce lidského IgG z magnetického imunosorbentu. K MIS bylo přidáno 200 μ l elučního činidla, poté byly vialky vloženy 2x na 5 minut do zařízení Eppendorf ThermoMixer (700 RPM, 20°C) (Obr. 19-B). U každého vzorku byla následně odebrána první a druhá eluční frakce (E1, E2) do zkumavky s 0,5 μ l 1M TRIS pufrém-neutralizace na pH 7. Posledním krokem byla regenerace. MIS bylo promyto 1x 1 ml glycinového pufru pH 2,8. Následovalo promytí PBST pufrém (3x). MIS byl poté uskladněn v 0,1% BSA v PBST (1 ml) + 0,01% azid sodný (10 μ l). Vyvázaný lidský IgG byl zdetekován na affiblotu.

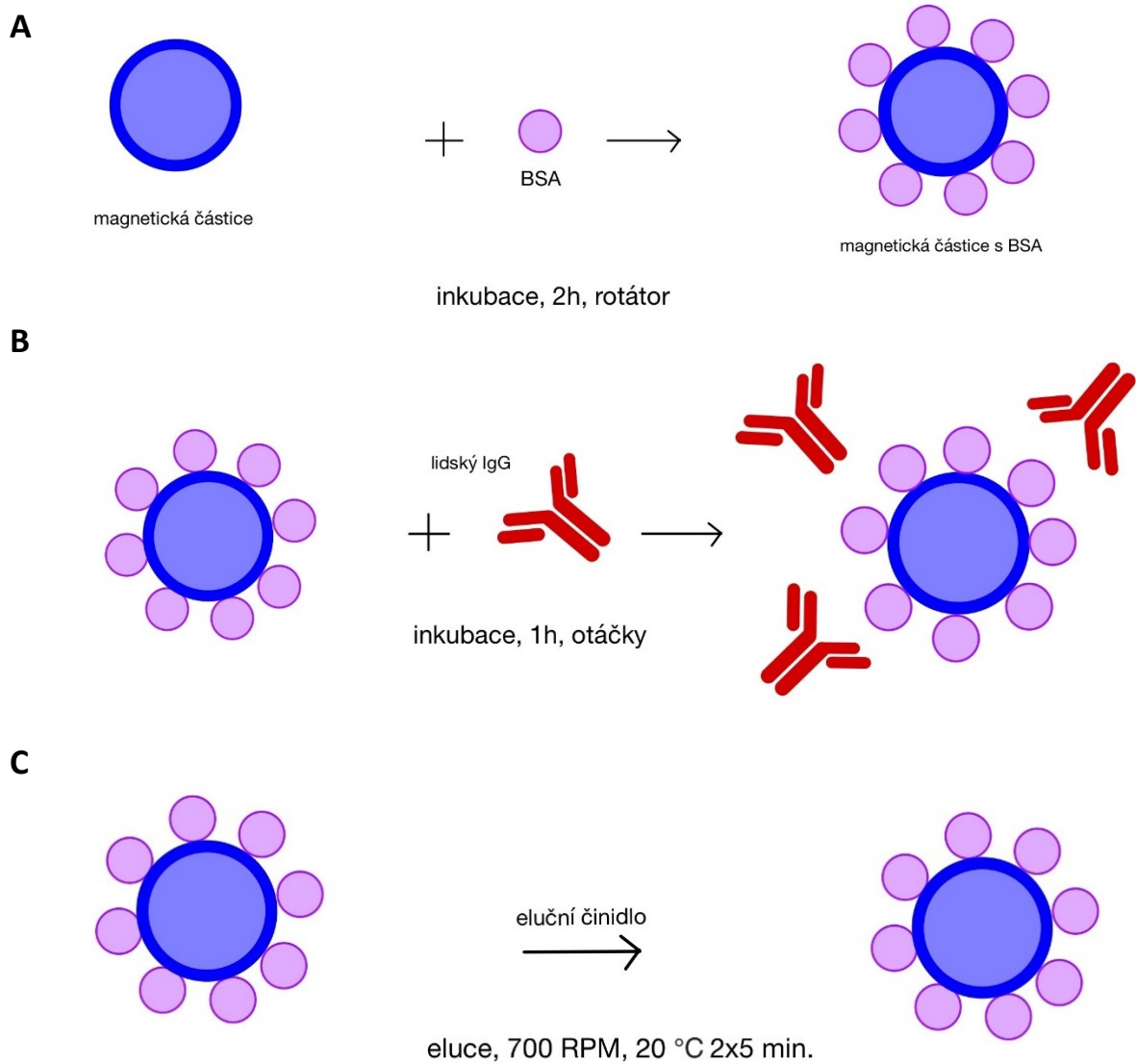


Obrázek 19. A Lidský IgG vázající se na MIS. **B** Eluce lidského IgG z MIS

6.7 Testování nespecifické sorpce magnetických částic

Nejprve byl resuspendován zásobní roztok s magnetickými částicemi. Sterilní špičkou byl odebrán 3 x 0,3 mg magnetických částic. Roztok MČ byl napipetován na zadní stěny vialek, které byly umístěny v magnetickém držáku. Poté bylo 3 x promyto 1 ml 0,1M MES pufru. Po každém promytí byly vialky umístěny na třepačku a vloženy zpět do magnetického držáku. Následně bylo naváženo 3 x 7,5 mg EDC do jedné 2 ml vialky a 3 x 1,25 mg S-NHS do druhé 2 ml vialky. Z magnetických částic byl odebrán supernatant. K EDC bylo přidáno 1,5 ml MES pufru. Z tohoto roztoku bylo odebráno 500 μ l a poté přidáno do každé vialky s magnetickými částicemi. Stejný postup byl zopakován s S-NHS. Do každé vialky s S-NHS bylo přidáno 1,5 ml MES pufru. Z tohoto roztoku bylo poté odebráno 500 μ l a tento objem byl přidán do každé vialky s magnetickými částicemi. Poté byly vialky umístěny do rotátoru. Inkubace probíhala 10 minut při pokojové teplotě-aktivace funkčních skupin (EDC, S-NHS = aktivační činidla). Byly nachystány čtyři 2 ml vialky (3x pro PV pro mikročástice, 1x pro PV pro analýzu) a BSA (10 μ g/ml). Do každé vialky byl pipetován 1 ml 0,1M MES pufru a 10 μ l BSA. Poté byly protilátky přidány do vialek s MČ a opět umístěny na rotátor, 2 hodiny bylo inkubováno-navázání BSA na MČ (obr. 20-A). U každého vzorku byla následně odebrána vazebná frakce (VF1,2,3). Po inkubaci bylo 3x promyto PBST. První promytí každého vzorku bylo uchováno pro analýzu (P1, 0,5 ml) a 2x bylo promyto do odpadu (P2 a P3). Následně bylo 1x promyto roztokem PBST. Vzniklý imunosorbent byl uchován v 0,1% BSA v PBST (1 ml) + 0,05% azid sodný (10 μ l). K třem alikvotům MIS (0,3 mg) byl přidán 1ml roztoku PBST za účelem odmytí konzervačních látek. Poté byl přidán antigen, lidský IgG (Sigma I2511), 50 ng/0,3 mg magnetických částic + 0,5 ml PBS. Následovala inkubace (1 h, RT, otáčky)-blokovaná vazba lidského IgG na magnetický imunosorbent (obr.20-B). Po ukončení inkubace byla odebrána VF1,2,3 pro následnou analýzu. Poté bylo 3x promyto roztokem PBS pH 7,4. První promytí bylo uchováno pro analýzu (P1, 0,5 ml) a 2x bylo promyto do odpadu (P2 a P3, 1 ml). Dalším krokem byla eluce lidského IgG z magnetického imunosorbentu. K MIS bylo přidáno 200 μ l elučního činidla, poté byly vialky vloženy 2x na 5 minut do zařízení Eppendorf ThermoMixer (700 rpm, 20 °C) (obr. 20-C). U každého vzorku byla následně odebrána první a druhá eluční frakce (E1, E2) do zkumavky s 0,5 μ l 1M TRIS pufrům (neutralizace na pH 7). Posledním krokem byla regenerace. MIS bylo promyto 1x 1 ml glycinového pufru pH 2,8. Následovalo promytí PBST pufrům (3x). MIS byl

poté uskladněn v 0,1 % BSA v PBST (1 ml) + 0,01% azid sodný (10 ul). Výsledky byly zdetekovány na affiblotu.

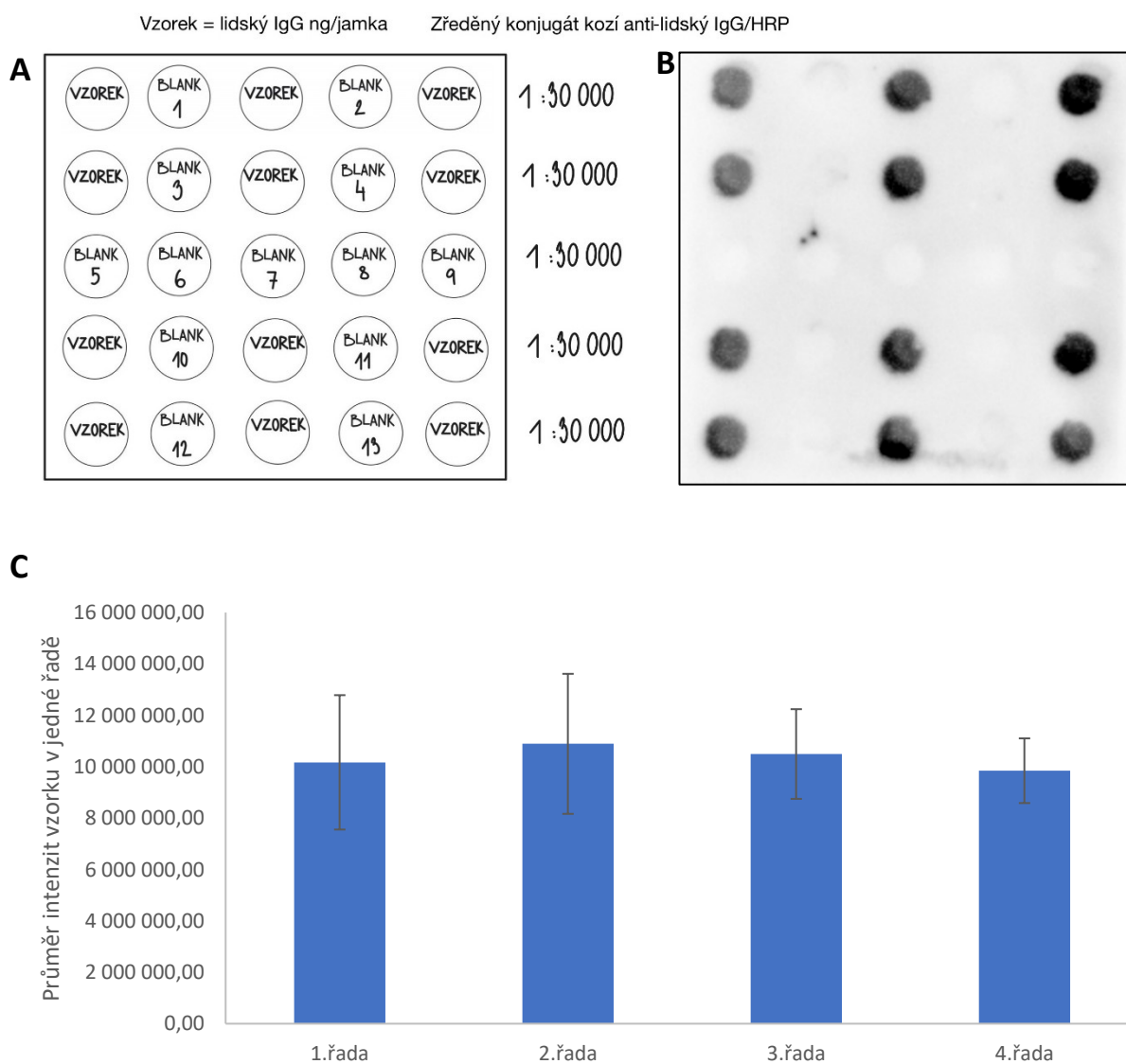


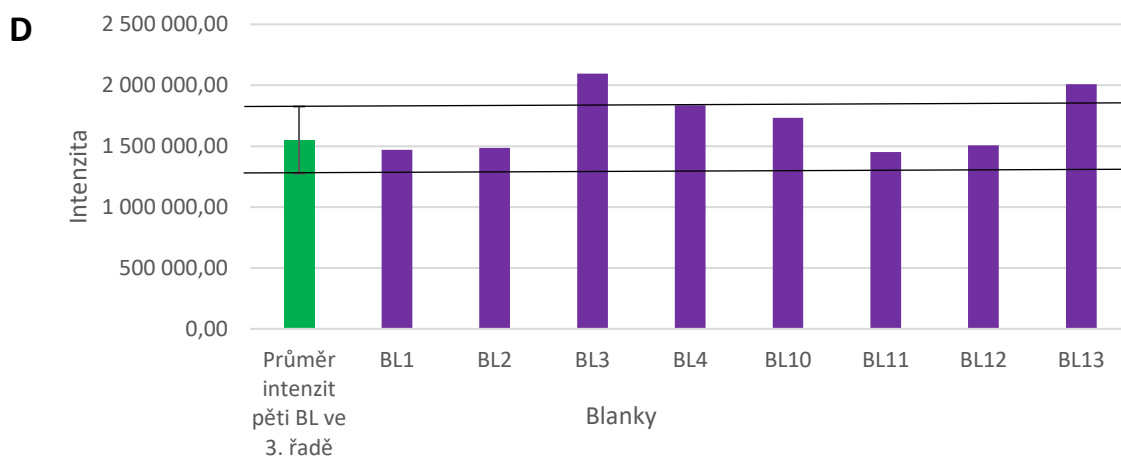
Obrázek 20. A BSA vázající se na MČ. B inkubace MČ s BSA s lidským IgG. C Eluce nespecificky navázaného lidského IgG, pokud se navázalo

7. VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Optimalizace metody affiblot

Prvním krokem optimalizace bylo zjistit rovnoměrnost intenzity skvrn na affiblotu 3.5.2 Byl připraven antigen lidský IgG, který byl nanesen na membránu dle následujícího schématu v množství 20 ng na jamku (Obr. 21-A). Následně byla všude přidána protilátka kozí anti-lidský IgG/HRP zředěná 1:30 000. Výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu je zobrazena na obrázku 21-B





Obrázek 21. *A* Pipetovací schéma. *B* Chemiluminiscenční detekce, výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. *C* Průměrná intenzita vzorku včetně SD v jedné řadě. *D* Intenzity blanků v porovnání s průměrným blankem

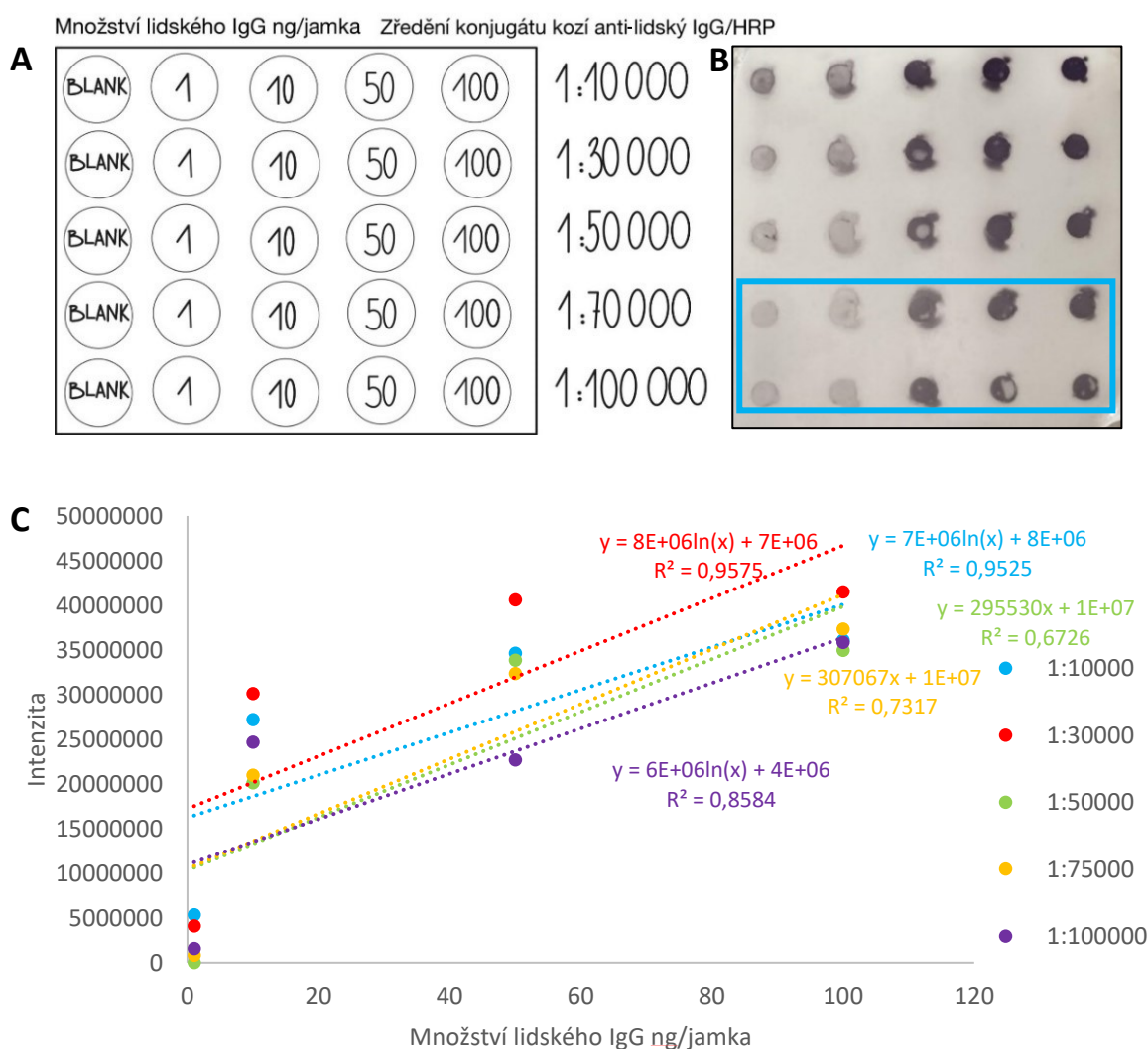
Z výsledných intenzit všech vzorků lidského IgG v jednom řádku byl odečten průměrný blank a udělán průměr. Průměrná intenzita ve všech řádcích, kde byly nanесeny vzorky lidského IgG, by měla být stejná, neměla by klesat ani stoupat. Směrodatné odchylky ukazují, jak moc jsou od sebe odchýlené skvrny v jednom řádku. Nejmenší směrodatnou odchylku mají vzorky v posledním řádku. Skvrny jsou si intenzitou nejvíce podobné (Obr. 21-C). Dále byl udělán průměr intenzit blanků ve třetí řadě. Byla zjištěna směrodatná odchylka daných skvrn. S tímto průměrem byly poté porovnány ostatní blanky. Všechny by měly být v označeném rozmezí směrodatné odchylky průměrné hodnoty blanků ve třetí řadě. Až na blank č. 3 a 13 se všechny blanky vešly do požadovaného rozmezí (Obr. 21-D). Z výsledků grafu č. 1 a 2 lze říct, že affiblot 3.5.2 může být použit pro další měření.

7.2 Optimalizace metody detekce lidského IgG na affiblotu

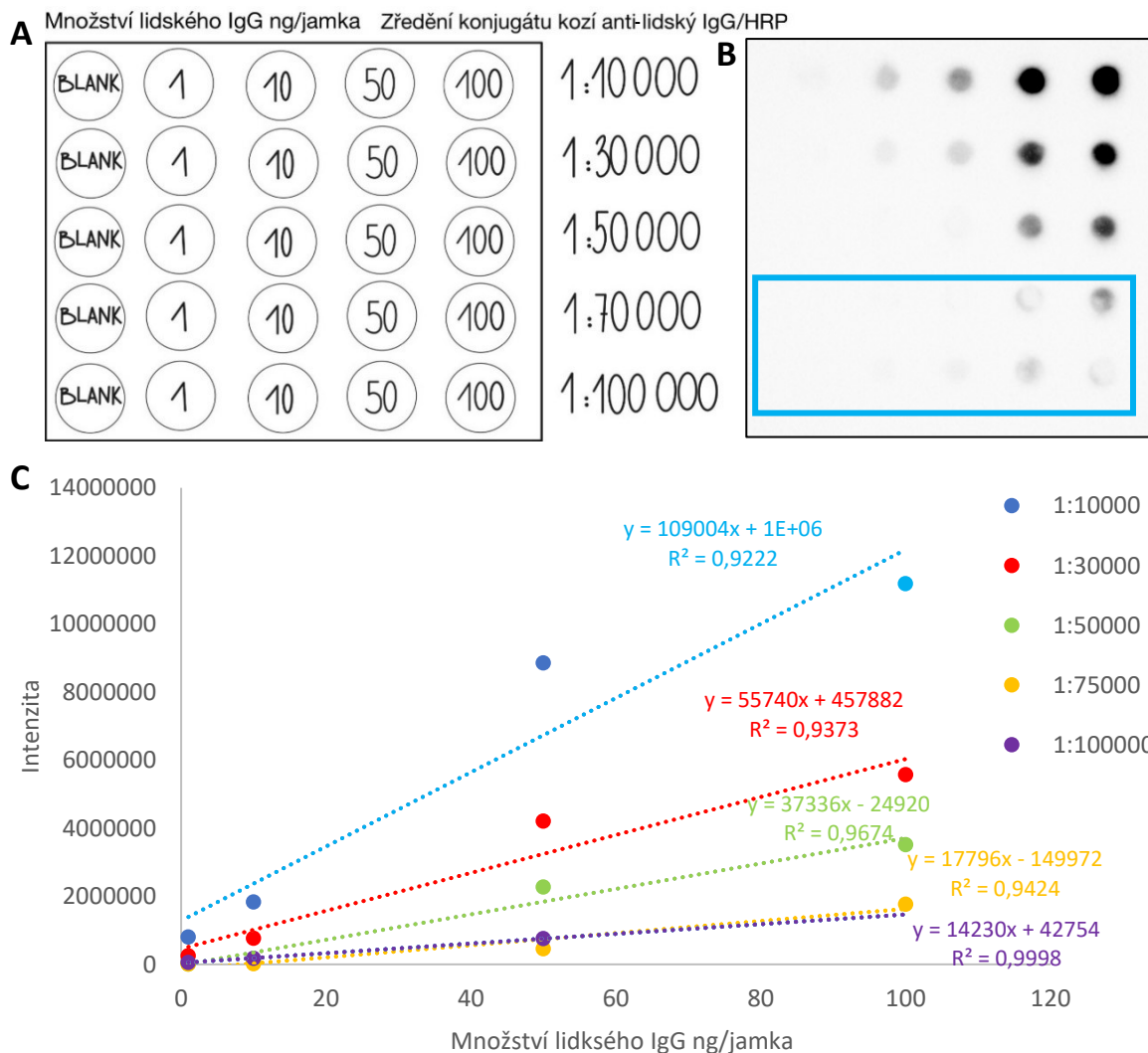
Dalším krokem optimalizace bylo najít optimální pracovní rozmezí Ag lidského IgG a vhodné ředění protilátky kozí anti-myší/HRP, tedy takové, které po zdetekování vytvoří dobře viditelný, lineární gradient. Za pomoci lidského IgG byla sestavena koncentrační řada, která obsahovala koncentrace antigenu 1, 10, 50, 100 ng/jamka (100 μ l). Dle následujícího schématu (Obr. 22-A, 23-A) byly nanесeny vzorky Ag na membránu. Následně byla do každého řádku napipetována různě zředěná protilátka kozí anti-myší, v rozmezí doporučeném výrobcem 1:10000-1:100000 (Obr. 22-A, 23-A). V prvním sloupci byla slepá kontrola. Detekovalo se kolorimetricky a chemiluminiscenčně.

7.2.1 Kolorimetrická vs. chemiluminiscenční detekce

Detekce byla prováděna dvěma způsoby, a to kolorimetricky za použití Opti-4-CN detekčního kitu (1708235, Bio-Rad, USA, CA, Hercules) (Obr. 22-B) a chemiluminiscenčně za použití SuperSignal™ West Pico chemiluminiscenčního substrátu (Obr. 23-B). Výsledkem byly různě silné intenzity, ze kterých byla po odečtení průměrné hodnoty blanků vytvořena kalibrační křivka (Obr. 22-C, 23-C), která zobrazuje, pro každé ředění Ab, závislost množství lidského IgG na intenzitě skvrn.



Obrázek 22. **A** Pipetovací schéma. **B** Kolorimetrická detekce, PVDF membrána vyfocená mobilem, označeno nejlepší ředění. **C** Kolorimetrická detekce, čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn, membrána PVDF



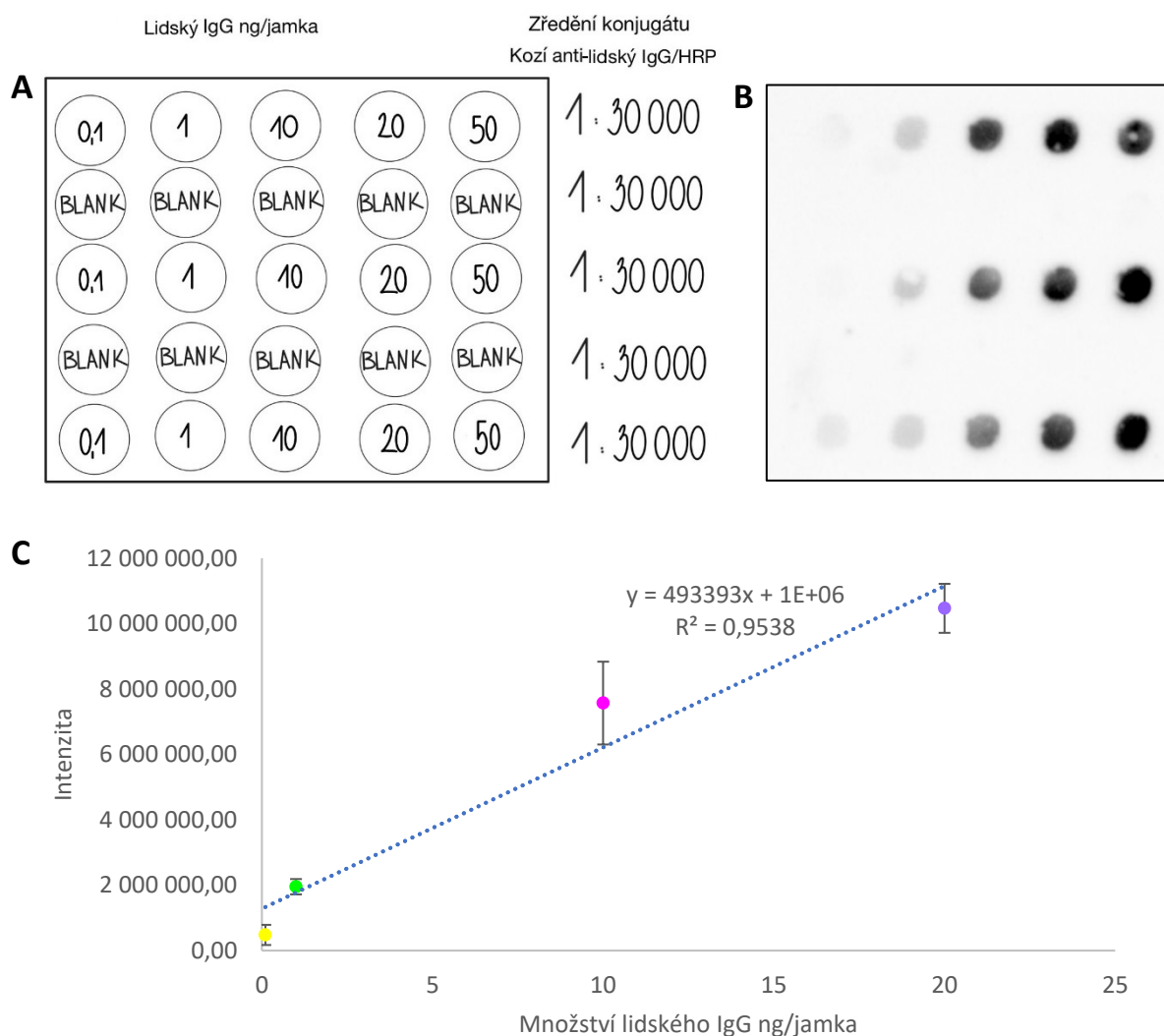
Obrázek 23. **A** Pipetovací schéma. **B** Chemiluminiscenční detekce, Immobilon membrána vyfocená v ImageLabu, označeno nejlepší ředění. **C** Chemiluminiscenční detekce, čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn, membrána Immobilon

Pro každou detekci je optimální jiné ředění sekundární protilátky. Pro kolorimetrickou detekci to je ředění Ab2 1:70 000 a 1:100 000 (Obr.22-B). Pro chemiluminiscenční detekci pak 1:10 000 a 1:30 000 (Obr. 23-B). Pracovní rozmezí Ag bylo 1–100 ng/jamku. Při dalším měření na affiblotu s lidským IgG a protilátkou kozí anti-lidský IgG/HRP bylo proto zvoleno toto ředění a koncentrační rozmezí. Na obrázku 23-B můžeme vidět, jak se skvrny v závislosti na množství lidského IgG ztmavují. Nejvyšší signál lze sledovat u navážky 100 ng lidského IgG na jamku (100 ul). V grafu chemiluminiscenční detekce (Obr. 23-C) je pěkně vidět, jak se postupně s vyšším ředěním intenzita skvrn snižuje. Skvrny, které byly detekovány kolorimetricky mají nepravidelný tvar. Světlé skvrny uvnitř tmavých skvrn vznikly nejpravděpodobněji vyschnutím membrány nebo v důsledku bublin, které se vytvořily v průběhu měření. Blanky u

kolorimetrické detekce jsou poměrně tmavé. Vzhled skvrn se nepodařilo vylepšit ani změnou podmínek, proto bylo od kolorimetrické detekce upuštěno. Lepší lineární průběh a citlivost mají data z chemiluminiscenční detekce, proto byla pro další měření zvolena chemiluminiscenční detekce.

7.2.2 Klasický dot blot

Měření bylo v triplicátu ověřeno s užším koncentračním rozmrzím metodou klasického dot blotu. Koncentrační řada pro lidský IgG byla 0,1, 1, 10, 20, 50 ng/jamka. Ředění protilátky pro detekci kozí anti-lidský IgG/HRP bylo 1:30 000 (zjištěno v kap. 7.2.1) (Obr. 24-A). Do 2. a 4. řady byl nanesen blank. Bylo pipetováno 100 µl roztoku antigenu a blanku a 1 ml protilátky na rezervoár.

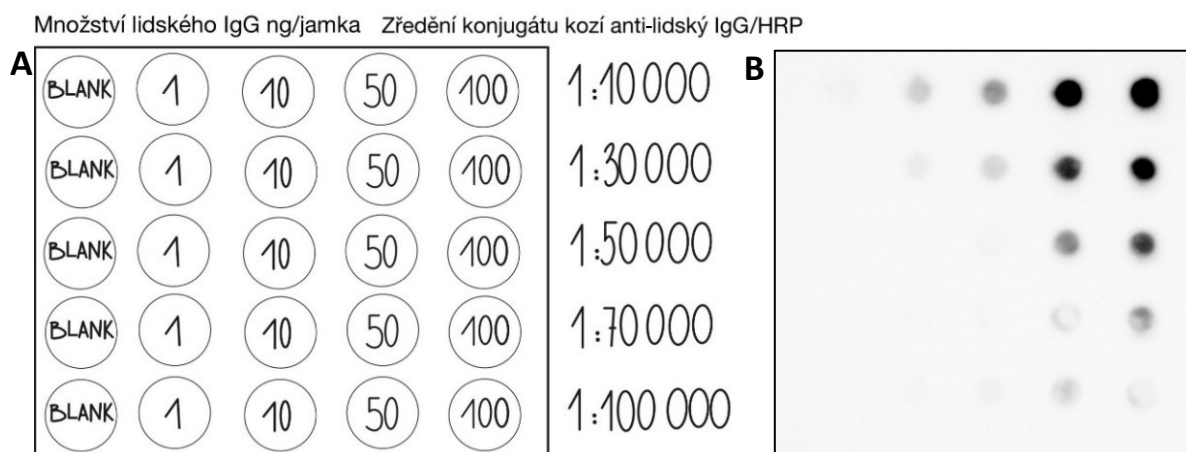


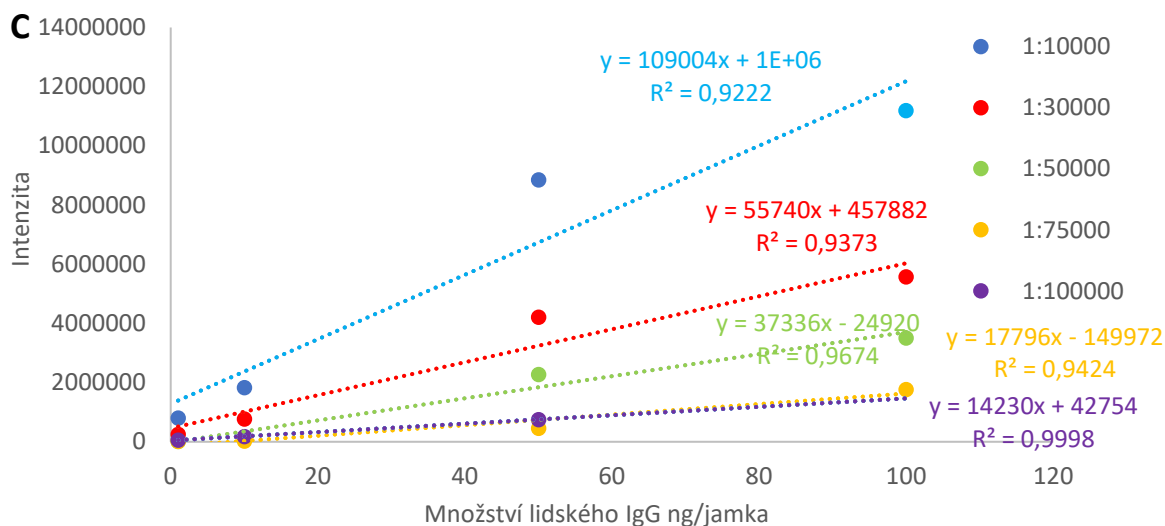
Obrázek 24. **A** Pipetovací schéma. **B** Výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Graficky znázorněná čtyřbodová kalibrační křivka sestavená z průměru intenzit tří stejných koncentrací v jednom sloupci a jejich směrodatná odchylka

Výsledná PVDF membrána, vyfocená v ImageLabu, je zobrazena na obrázku 24-B. Graficky jsou výsledky zobrazeny na obrázku 24-C. Poslední bod kalibrační křivky 50 ng/jamka byl vyškrtnut. Kalibrační křivka měla s tímto bodem spíše logaritmický průběh namísto lineárního. Znamená to tedy, že model je spolehlivý v rozmezí hodnot 0-20 ng. Koncentrační řada byla dále použita k výpočtu množství vzorků z izolace.

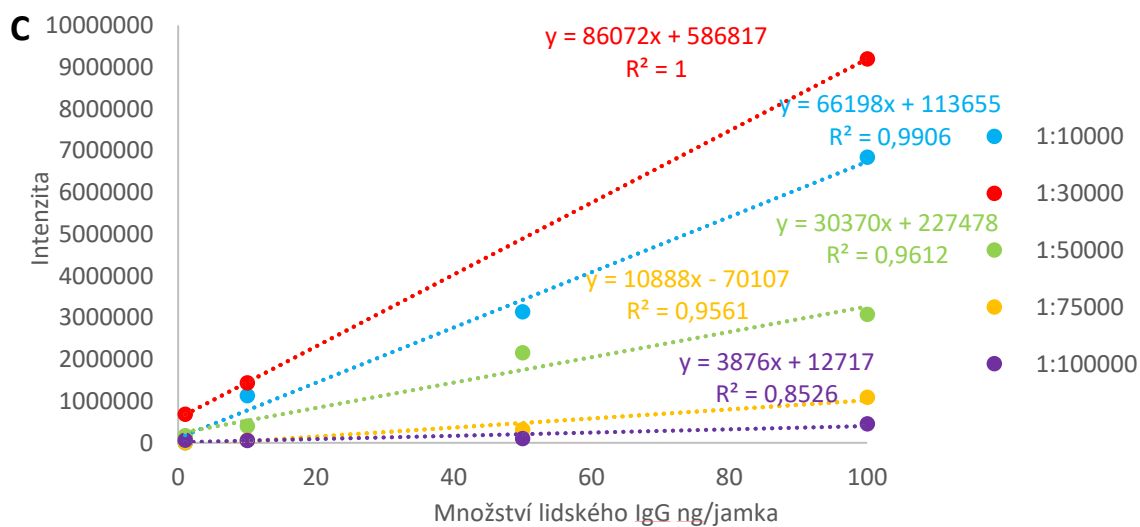
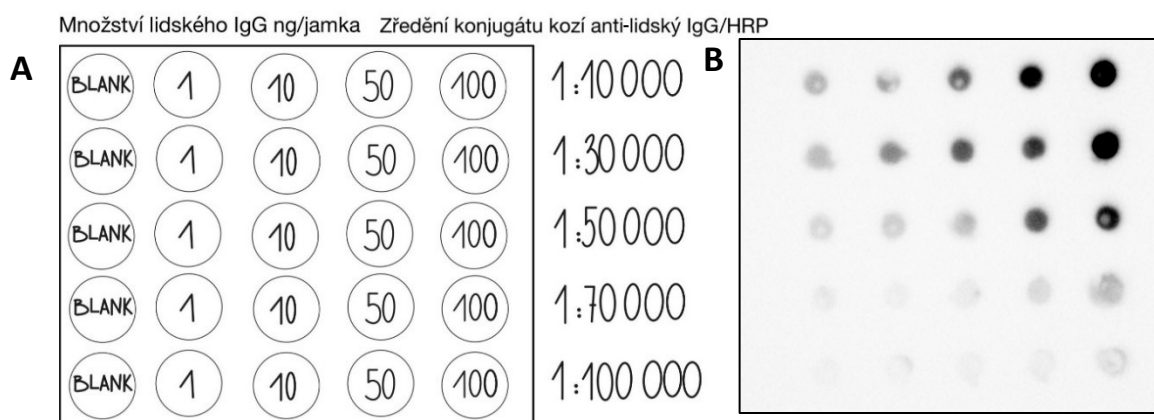
7.3 Porovnání měření na dvou rozdílných membránách

Optimalizace pokračovala porovnáním typu použité membrány a jeho vlivu na intenzitu signálu. Testována byla membrána Immobilon-E-PVDF-membrána, 0,45 μm (IEVH85R, Merck Millipore, IRL, Tullagreen, Carrigtohill) a PVDF membrána pro blotování Immun-Blot[®], 26 cm x 3,3 m, 0.2 μm (1620177, BIO-RAD, Kalifornie, Hercules). Byla sestavena koncentrační řada za pomoci lidského IgG v rozmezí 1-100 ng/jamka. V prvním sloupci byla slepá kontrola. Dle následujícího schématu (Obr. 25-A, 26-A) byly nanесeny vzorky antigenu lidského IgG a sekundární protilátky kozí anti-myší IgG na membránu. Výsledné membrány PVDF a Immobilon byly vyfoceny v ImageLabu a zobrazeny na obrázku 25-B a 26-B.





Obrázek 25 A Pipetovací schéma. **B** Chemiluminiscenční detekce, výsledná Immobilon membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Chemiluminiscenční detekce, čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn, membrána Immobilon



Obrázek 26 A Pipetovací schéma. **B** Chemiluminiscenční detekce, PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Chemiluminiscenční detekce, čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn, membrána PVDF

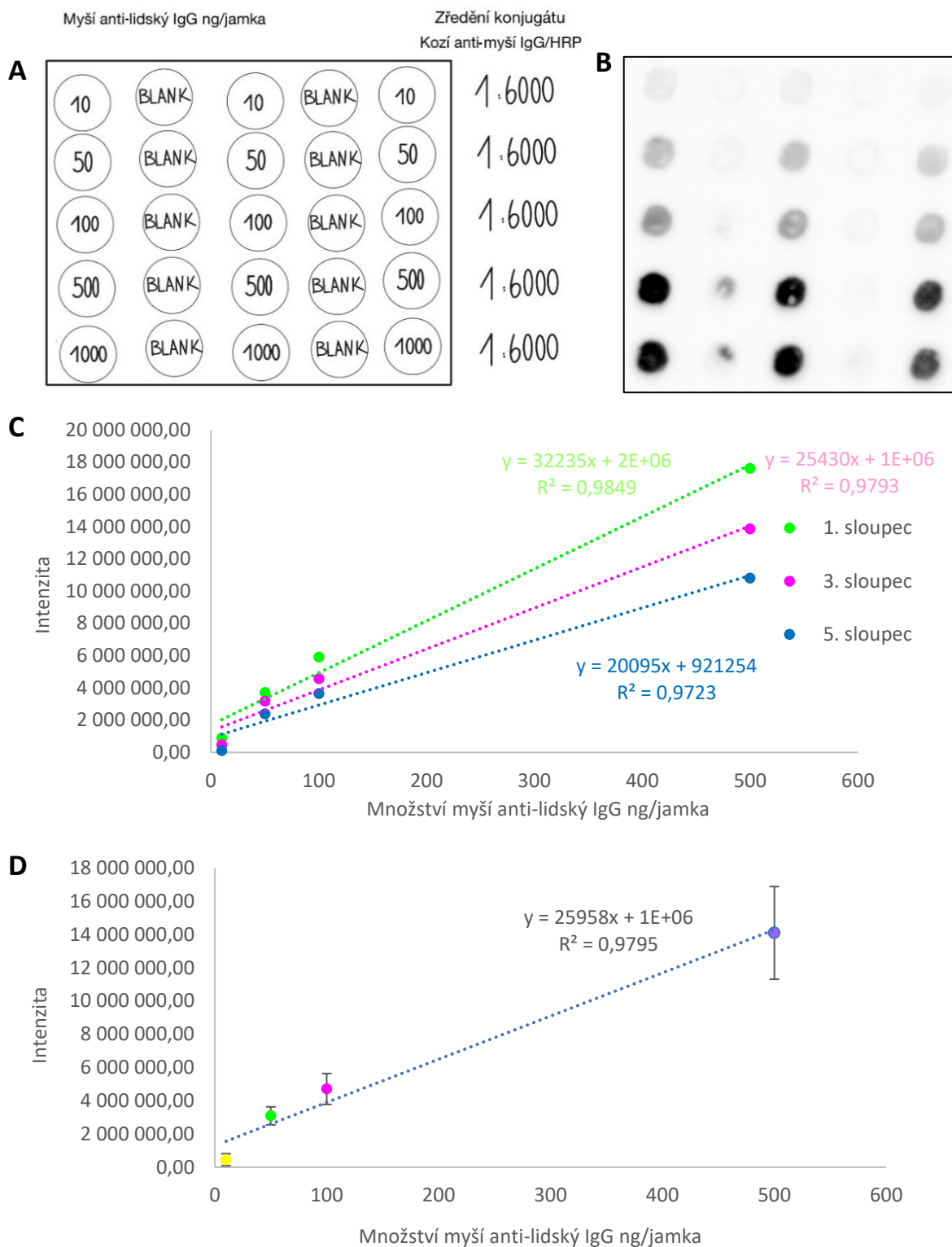
Z výsledných intenzit byl odečten průměrný blank a byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 25-C, 26-C). Na grafech je patrné, že výsledky s membránou Immobilon nemají zcela lineární průběh a že u ředění konjugátu 1:50 000 již skvrny na membráně nejsou u prvních dvou bodů patrné. PVDF má sice vyšší blanky, ale citlivost je zde vyšší a růst intenzity má lineární průběh, proto budeme používat PVDF membránu.

7.4 Vazba ligandu a Izolace lidského IgG z pufru pomocí MČ

V předchozích měření bylo zjištěno, že protilátka s antigenem reaguje. V další části měření bylo snahou vyizolovat lidský IgG z pufru pomocí MČ. To zahrnovalo navázání ligandu myší anti-lidský IgG na MČ (více v kap. [6.5](#)) a následná Izolace lidského IgG z pufru pomocí MIS (anti-lidské IgG Sera Mag MČ) (více v kap. [6.6](#)). Měření jsem si vyzkoušela ovšem dané výsledky jsou kolegyně Anety Starobové, která se konkrétnímu měření věnovala více. Já se věnovala detekci vzorků. Součástí detekce bylo sestavení koncentrační řady, díky které bylo zjištěno, kolik ligandu myší anti-lidský IgG bylo na MČ navázáno a kolik lidského IgG z MČ vyvázáno. Měření zahrnovalo také zjišťování nespecifické sorpce MČ (více v kap. [6.7](#)). Nespecifickou sorpci lze chápat jako situaci, kdy dochází k vazbě dané substance na povrchy nebo struktury, které nejsou cílem interakce [8, 93].

7.4.1 Optimalizace affiblotu za použití myšího a kozího konjugátu

Cílem bylo najít optimální pracovní rozmezí antigenu myší anti-lidský IgG a vhodné ředění protilátky kozí anti-myší IgG/HRP pro vazbu za účelem sestavení koncentrační řady, díky které bylo zjištěno, kolik protilátky myší anti-lidský IgG se navázalo. Koncentrační řada pro myší anti-lidský IgG byla 10, 50, 100, 500 a 1000 ng/jamka. Ředění protilátky pro detekci kozí anti-myší IgG/HRP bylo 1:6000 (Obr. 27-A). Do 2. a 4. sloupce byl nanesen blank. Vzorku bylo pipetováno 100 μ l, protilátky 1 ml na rezervoár.

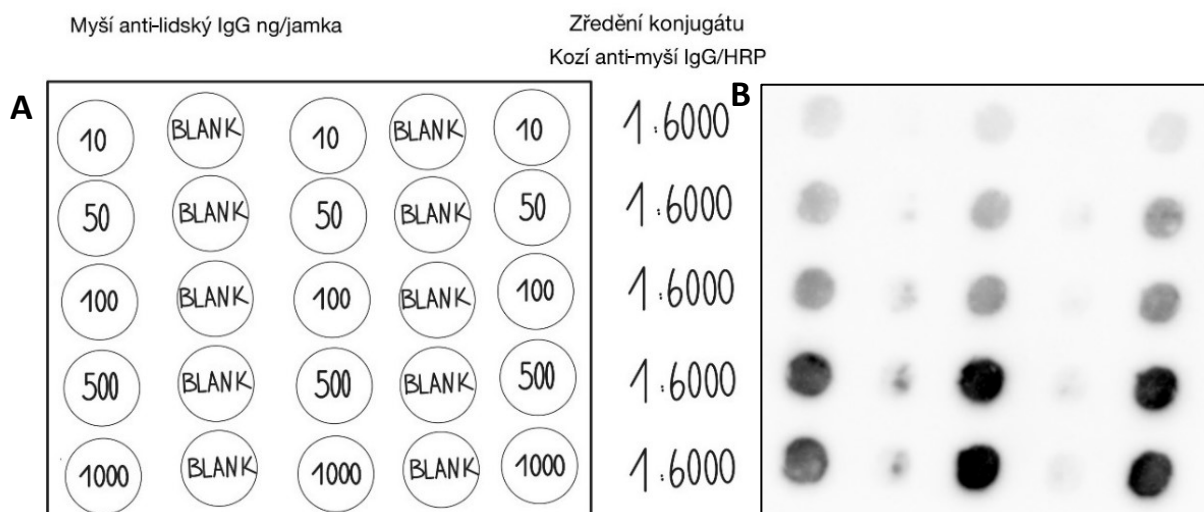


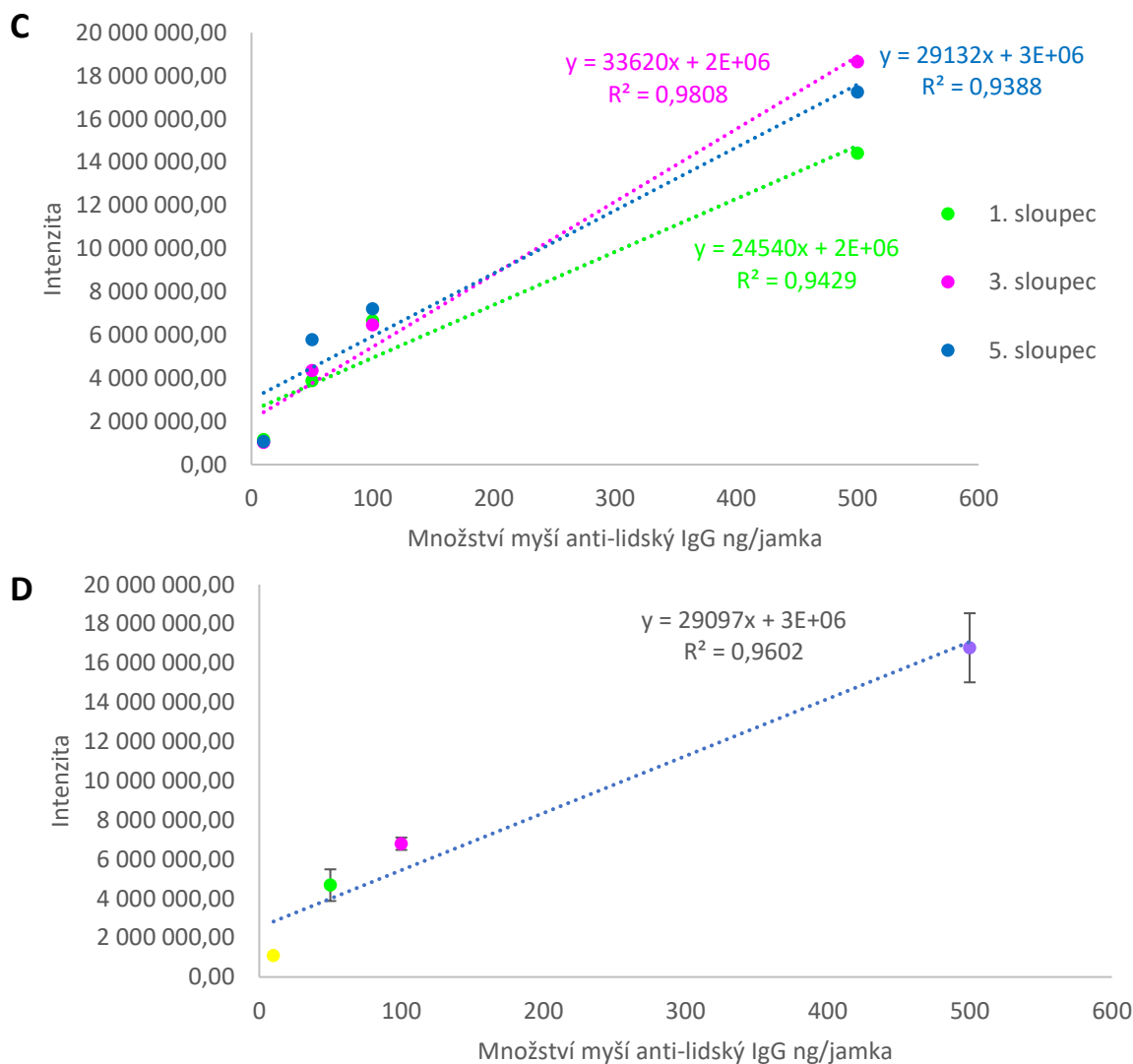
Obrázek 27. A Pipetovací schéma. **B** Výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Čtyřbodové kalibrační křivky závislosti množství myší anti-lidský igG na intenzitě skvrn. **D** Graficky znázorněná čtyřbodová kalibrační křivka sestavená z průměru intenzit tří stejných koncentrací v jednom řádku a jejich směrodatná odchylka

Z výsledných intenzit byl odečten průměrný blank. Do průměrného blanku nebyly nezapočteny blanky číslo 4 a 5 druhého sloupce affiblotu, protože byly shledány jako odlehlé body. Z výsledných intenzit byla poté sestavena kalibrační křivka (Obr. 27-C). Výsledné kalibrační křivky mají do koncentrace 500 ng/jamka lineární průběh. Model je tedy spolehlivý pro předvídání hodnot antigenu při koncentracích nižších než 500 ng/jamka. Dále byl vypočítán průměr intenzit ze tří stejných koncentrací v jednom řádku a ke každé hodnotě pak směrodatná odchylka. Můžeme vidět že se směrodatná odchylka s rostoucí koncentrací zvyšuje (Obr. 27-D). Směrodatná odchylka posledního bodu je větší než ostatní. Znamená to, že intenzity jsou od průměru rozptýleny dále a jsou méně předvídatelné. Na výsledné PVDF membráně vyfocené v ImageLabu (Obr. 27-B) můžeme vidět Hookův efekt, kdy v koncentraci 1000 ng/jamka již nedochází ke zvýšení intenzity, proto tento bod již není součástí kalibrační křivky. Koncentrační řada 10-1000 ng/jamka a ředění 1:6000 byly dále použity pro výpočet vzorků z izolace.

7.4.2 Opakování měření na klasickém dot blotu

Cílem bylo ověřit, zda metoda klasický dot blot poskytuje rovnocenné výsledky jako metoda affiblot. Dle následujícího schématu (Obr. 28-A) byly na membránu naneseny vzorky antigenu myší anti-lidský IgG v koncentračním rozmezí 10–1000 ng/jamka. Detekční protilátkou byla kozí anti-myší IgG/HRP zředěná 1:6000. Vzorku bylo pipetováno 100 μ l, protilátky 1 ml na rezervoár. Výsledná PVDF membrána, vyfocená v ImageLabu, je zobrazena na obrázku 28-B.



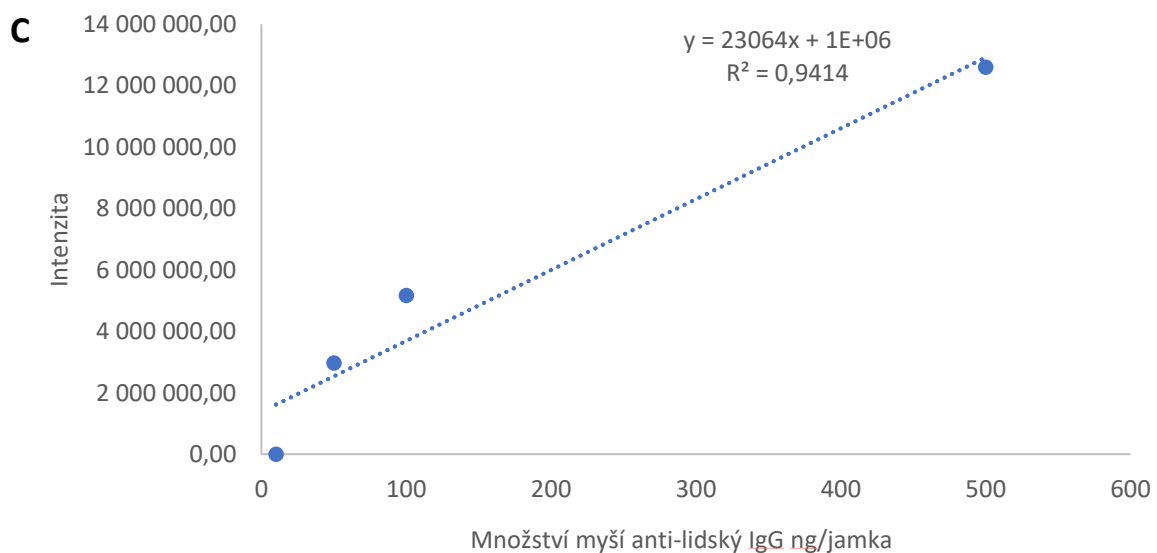
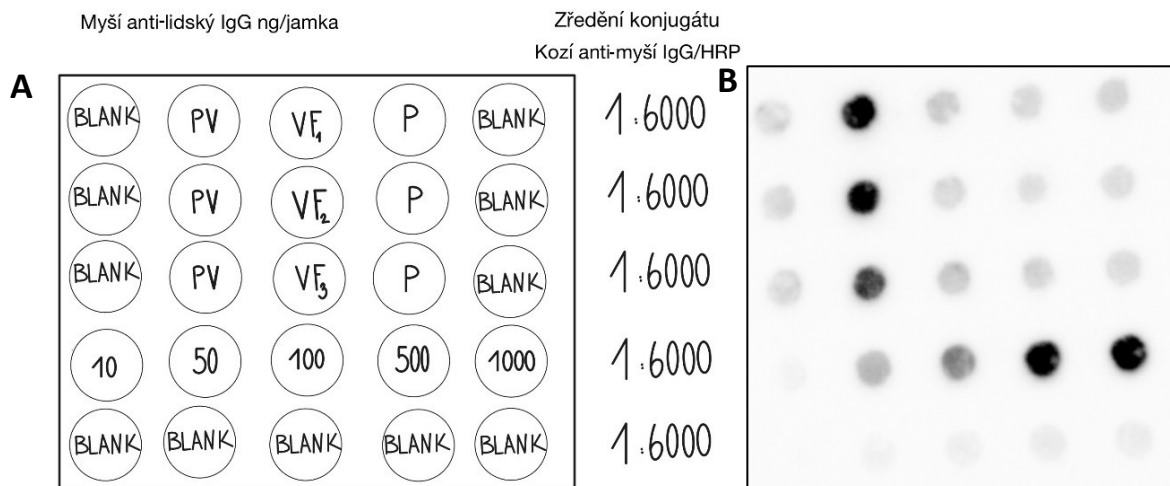


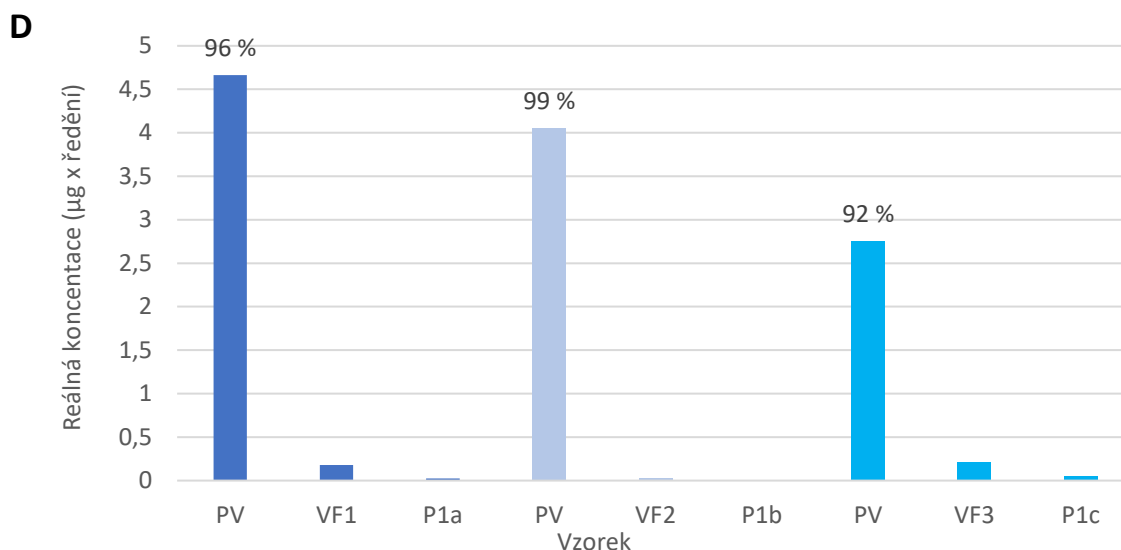
Obrázek 28. **A** Pipetovací schéma. **B** Výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Čtyřbodové kalibrační křivky závislosti množství myší anti-lidský igG na intenzitě. **D** Graficky znázorněná čtyřbodová kalibrační křivka sestavená z průměru intenzit tří stejných koncentrací v jednom řádku a jejich směrodatná odchylka

Z výsledných intenzit byl odečten průměrný blank. Do průměrného blanku nebyly nezapočteny blanky číslo 3, 4, 5 druhého sloupce affiblotu, protože byly identifikované jako odlehlé body. Z výsledných intenzit byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 28-C). Dále byl vypočítán průměr intenzit ze tří stejných koncentrací v jednom řádku a ke každé hodnotě pak směrodatná odchylka, která je opět největší u nejvyšší koncentrace (Obr. 28-D). Při koncentraci 1000 ng/jamka můžeme, stejně jako u měření na affiblotu, vidět Hookův efekt (Obr. 28-B). Výsledky měření na affiblotu a na klasickém dot blotu jsou velmi podobné. Znamená to, že metoda klasický dot blot je stejně účinná a spolehlivá jako metoda affiblot a může být využita jako konfirmační metoda k affiblotu.

7.4.3 Výpočet množství IgG navázaného na MČ

Cílem bylo zjistit kolik ligandu myší anti-lidský IgG bylo navázáno na MČ. Vzorky, které byly odebrány v průběhu vazby (PV, VF, P) byly naneseny na membránu spolu s koncentrační řadou a blanky dle následujícího schématu po 100 μ l. (Obr. 29-A). Jako detekční protilátka byla použita kozí anti-myší IgG/HRP v ředění 1:6000 (1 ml na rezervoár).



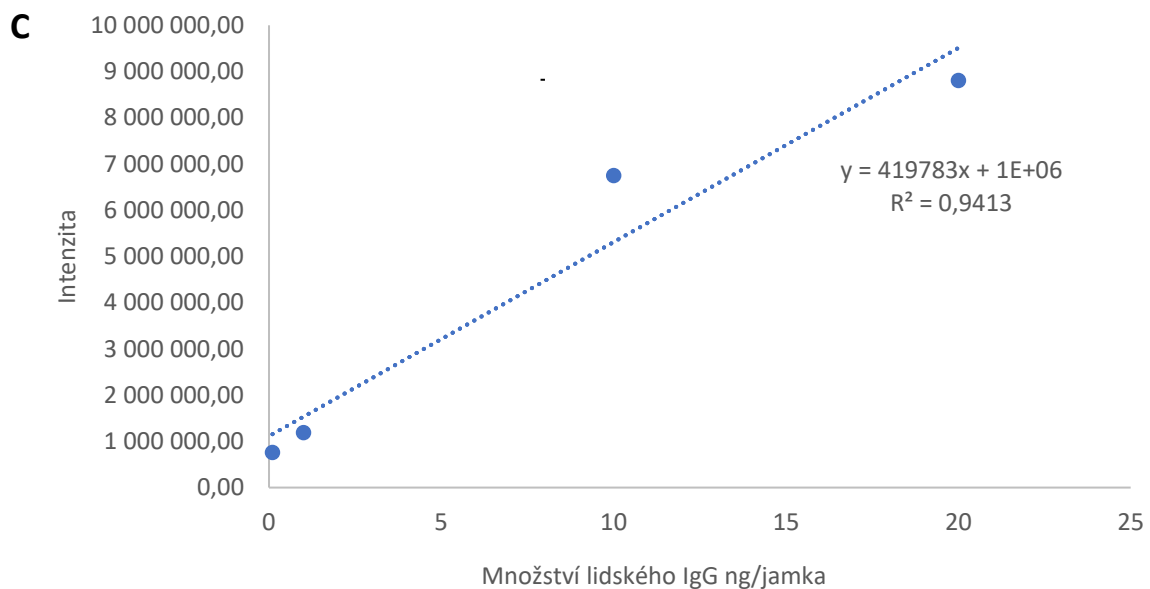
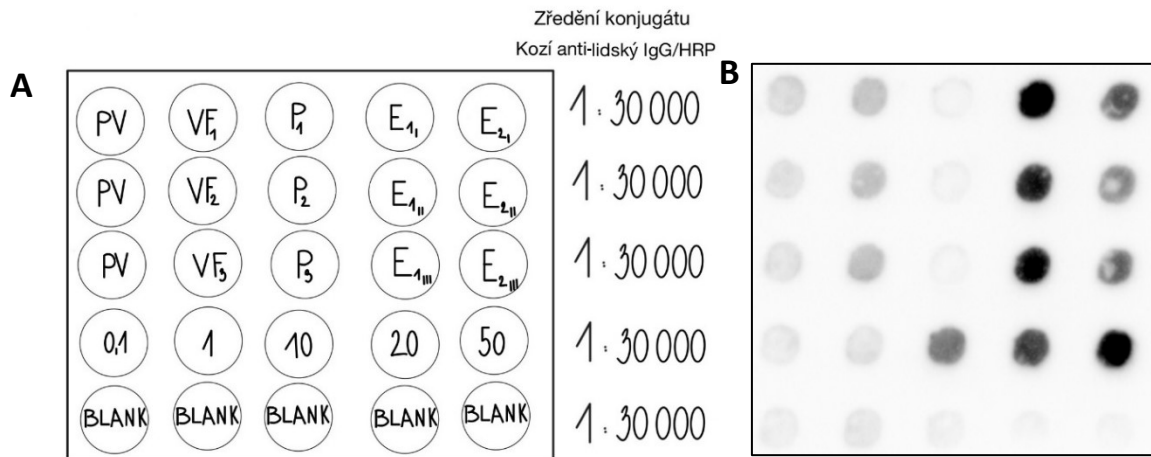


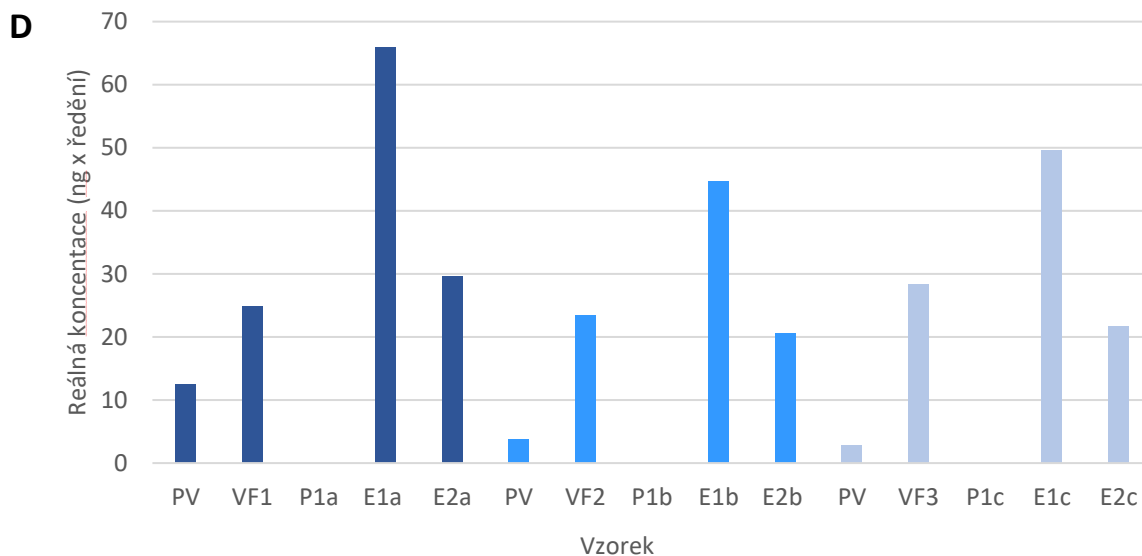
Obrázek 29. **A** Pipetovací schéma. **B** Chemiluminiscenční detekce, výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Kalibrační křivka, závislost množství myší anti-lidský IgG na intenzitě skvrn. **D** Graficky znázorněná výsledná koncentrace vzorků

Jak můžeme vidět na obrázku 29-B, jediný pozitivní signál se objevil v původním vzorku, který obsahuje původní koncentraci myšího anti-lidský IgG ($10 \mu\text{g/ml}$) než dojde k jeho vazbě na MČ. Vazebná frakce se jeví jako světlá skvrna, jelikož se myší anti-lidský IgG navázal na magnetické částice, které jsou následně přitahovány magnetem na magnetickém držáku, tudíž se již nevyskytují volně v roztoku. Promývací frakce se taktéž jeví jako světlá skvrna. Znamená to, že ligand zůstal navázán na MČ během promývání. Z výsledných intenzit byl odečten průměrný blank a z koncentrační řady byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 29-C). Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace IgG ng/jamka. Tuto koncentraci bylo třeba přepočítat na reálný objem (u PV byl objem $1000 \mu\text{l}$ zatímco u VF, P byl $500 \mu\text{l}$). Cílem měření bylo zjistit, zda se ligand navázal na MČ. Ačkoliv se hodnoty PV po přepočítání dle kalibrační křivky pohybují mezi $3 - 4,5 \mu\text{g/ml}$, což neodpovídá hodnotě $10 \mu\text{g/ml}$, je po přepočtu množství vyvázaného množství patrné, že na MČ bylo navázáno 96 %, 99 % a 92 % myší anti-lidský IgG. Na obrázku 29-D můžeme vidět výsledky zobrazené graficky.

7.4.4 Výpočet množství lidského IgG izolovaného pomocí MČ

Cílem bylo zjistit kolik lidského IgG se specificky navázalo na magnetický imunosorbent s navázaným anti-lidským IgG. Vzorky, které byly odebrány v průběhu izolace (PV, VF, P, E1, E2) byly nanесeny na membránu spolu s koncentrační řadou (ng/jamka) a blanky dle následujícího schématu po 100 μl (Obr. 30-A). Jako detekční protilátka byla použita kozí anti-lidská IgG/HRP v ředění 1:30 000 (1 ml na rezervoár).



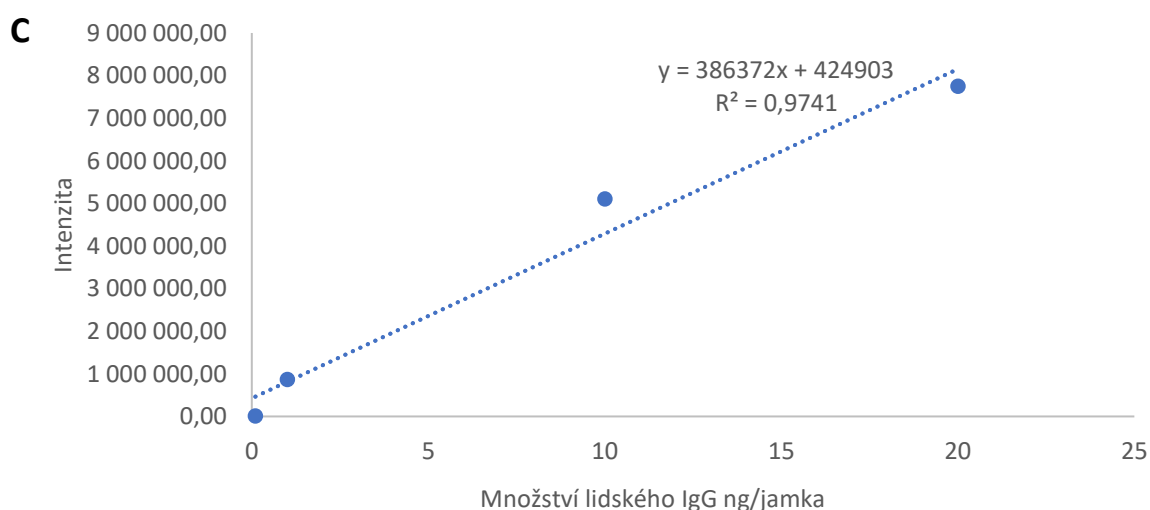
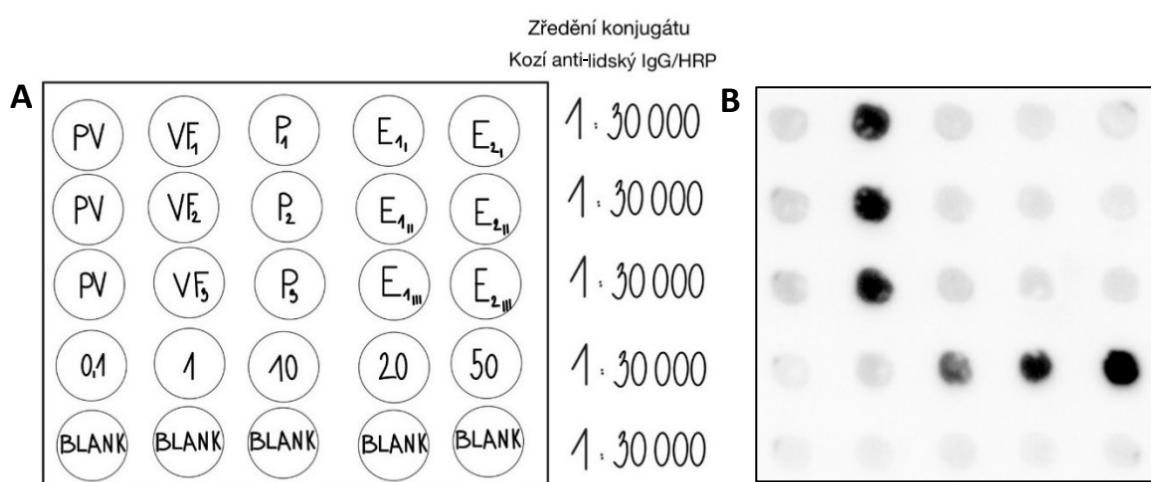


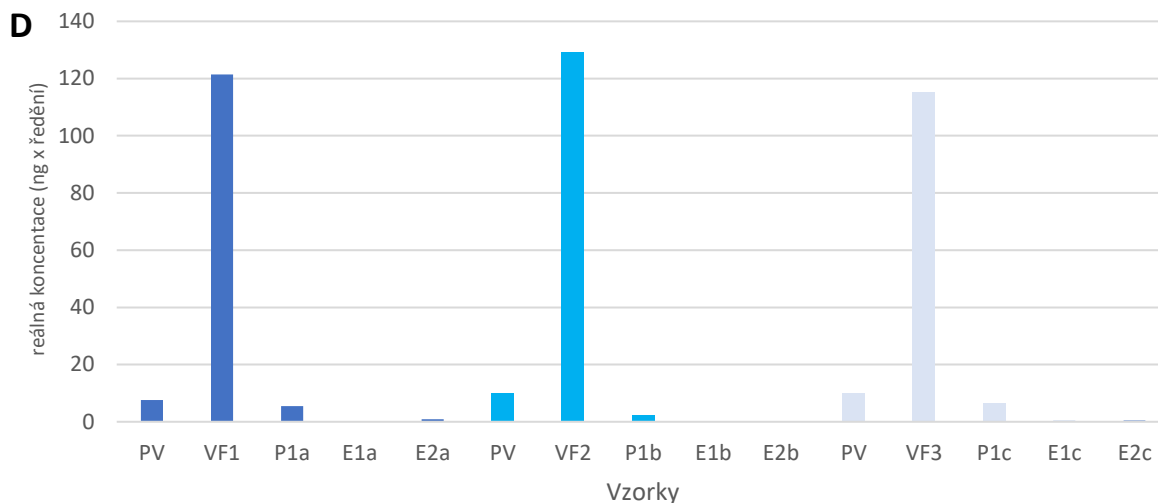
Obrázek 30. A Pipetovací schéma. **B** Chemiluminiscenční detekce, výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Kalibrační křivka, závislost množství lidského IgG na intenzitě. **D** Graficky znázorněná výsledná koncentrace vzorků

Z výsledných intenzit byl odečten průměrný blank a z koncentrační řady byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 30-C). Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace vzorku ng/jamka. Tuto koncentraci bylo třeba přepočítat na reálný objem (u PV, VF a P byl objem 500 μ l zatímco u E byl 200 μ l). Získané výsledky neodpovídají koncentraci původního vzorku (100 ng/ml), jelikož vyizolované množství v obou elučních frakcích přesahuje tuto hodnotu. Důvodem může být, že kalibrační křivka nemá přesný lineární průběh, což se pak může projevit jako nepřesnost ve vypočtených výsledcích, které se ještě násobí v případě ředění. Cílem však bylo zjistit, zda se vazba a izolace povedla a zda se lidský IgG vyizoloval, což výsledky především z elučních frakcí potvrzují. Na obrázku 30-B můžeme vidět, že vazebné frakce jsou světlé, tedy lze předpokládat, že se Hu IgG vyizoloval na magnetický nosič s anti-HuIgG. Promývací frakce jsou světlé, jelikož lidský IgG zůstal navázán na MČ. První eluční frakce se jeví jako tmavší skvrna, jelikož k hlavní eluci dochází během prvního cyklu v elučním činidle. Druhá eluční frakce by tedy měla být světlejší než první, jelikož v druhém cyklu dochází spíše k douvolnění toho, co se neeluovalo v prvním cyklu. Původní vzorek neodpovídá. Z neznámého důvodu není dostatečně stabilní, aby vydržel zamražený do analýzy. Měření PV bylo opakováno také s neadherentní zkumavkou, která měla zabránit případnému navázání na stěny zkumavky, ale se stejným výsledkem po analýze na affiblotu i ELISA. Patrně bude zapotřebí protein v roztoku stabilizovat přidavkem jiné substance jako BSA.

7.4.5 Testování nespecifické sorpce magnetických částic

Cílem bylo zjistit míru nespecifické sorpce magnetických částic. Bylo tedy testováno, kolik lidského IgG se nespecificky naváže na magnetický nosič s BSA. Magnetické částice s navázaným BSA by lidské IgG neměly vázat, jestli se objeví v elučních frakcích signál, potvrdí se nespecifická sorpce. Vzorky, které byly odebrány v průběhu izolace (PV, VF, P, E1, E2) byly nanášeny na membránu spolu s koncentrační řadou (ng/jamka) a blanky dle následujícího schématu po 100 μ l (Obr. 31-A). Jako detekční protilátka byla použita kozí anti-lidská IgG/HRP v ředění 1:30 000 (1 ml na rezervoár).





Obrázek 31. **A** Pipetovací schéma. **B** Chemiluminiscenční detekce, výsledná PVDF membrána vyfocená v ImageLabu. **C** Čtyřbodová kalibrační křivka, závislost množství lidského IgG na intenzitě. **D** Výsledná koncentrace vzorku v reálném objemu

Z výsledných intenzit byl poté odečten průměrný blank a z koncentrační řady byla sestavena kalibrační křivka (Obr. 31-C). Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace vzorku ng/jamka. Tuto koncentraci bylo třeba přepočítat na reálný objem (u PV, VF a P byl objem 500 μ l zatímco u E byl 200 μ l). Koncentrace PV byla 100 ng/ml, čemuž by měla odpovídat i vazebná frakce. Jelikož se ani v promývací ani v eluční frakci nenachází téměř žádný protein, vše zůstalo nevyvázané ve vazebné frakci. Metoda affiblot je semikvantitativní, navíc kalibrační křivka není dokonale lineární, tudíž hodnoty ne vždy odpovídají těm teoretickým. Množství ve VF se proto pohybuje v rozmezí 115-129 ng/ml, ačkoliv v PV je koncentrace 100 ng/ml. Jak lze vidět v grafu (Obr. 31-D) původní vzorek je opět z neznámého důvodu nízký, kvůli jeho malé stabilitě. Jak můžeme vidět na obrázku 31-B, jediný intenzivní signál vykazují vazebné frakce, v promývací a v eluční frakci je signál roven blanku. To znamená, že se IgG na MČ s BSA nespecificky nezachytilo a v elučních frakcích se téměř nic nevyeluovalo. Lze tedy říci, že nespecifická sorpce magnetických částic je minimální. To také znamená, že výsledky z předchozí izolace potvrdily, že se izolace proběhla na základě specifické interakce. Metoda Affiblot se osvědčila pro semikvantitativní detekci lidského IgG.

ZÁVĚR

V této práci byla úspěšně provedena optimalizace metod pro detekci a izolaci lidského IgG za pomoci magnetického imunosorbentu. Optimalizace zahrnovala výběr správných experimentálních podmínek, kde se ukázalo, že PVDF membrána je vhodnější než Immobilon, zejména díky větší citlivosti. Pro detekci lidského IgG byla ze dvou testovaných metod detekce zvolena chemiluminiscenční metoda, která poskytla vyšší citlivost a přesnost měření.

Vazba protilátky na magnetické částice byla úspěšná a ověřena pomocí metody na affiblotu. Výsledky prokázaly, že se navázalo 92-99 % ligandu myší anti-lidský IgG na 1 mg magnetických částic SeraMag v triplikátu.

Izolace lidského IgG na magnetickém imunosorbentu byla taktéž úspěšná. Koncentrace v elučních frakcích na affiblotu ukázaly, že proces byl efektivní. Nicméně, bylo také zjištěno, že stabilita lidského IgG v původním vzorku po zamražení je značně omezena a ani použití nízko adherentních zkumavek nezabránilo znehodnocení vzorku, tedy jeho intenzita na membráně byla nad očekávání nízká. Jeho stabilizací se budeme zabývat v budoucích experimentech. Dále bylo ověřeno, zda vazba lidského IgG je dílem specifické či nespecifické interakce s imunosorbentem. Proto byl připraven identický magnetický imunosorbent, jen místo protilátky bylo navázáno BSA. Pomocí affiblotu bylo zjištěno, že množství nespecificky navázaného IgG na tyto částice je minimální, což je pozitivní pro budoucí aplikace, protože minimalizuje falešně pozitivní výsledky.

Zajištění funkčního modelového systému antigen-protilátka je důležitý pro vývoj a inovaci analytických metod. Je možné takto přispět ke zvýšení spolehlivosti a citlivosti analytických metod, což má přímý dopad na kvalitu získaných dat. Výsledky této práce mohou napomoci ve výzkumu či klinické praxi, a to v oblastech jako je diagnostika, monitorování stavu pacienta nebo při vývoji terapeutických metod.

SEZNAM ZKRATEK

ZKRATKA	VÝZNAM
PE	Polyetylen
Ag	Antigen
MČ	Magnetické částice
BSA	Bovinní sérový albumin
PV	Původní vzorek
VF	Vazebná frakce
P	Promývací frakce
E	Eluční frakce
RT	Pokožová teplota
MIS	Magnetický imunosorbent
RPM	Otáčky za minutu
Ab	Protilátka
IS	Imunitní systém
AMK	Aminokyselina/y
Mab	Monoklonální protilátka
NK	Přirození zabijáci
BCR	B-buněčný receptor
CIA	Uhlíková imunoanalýza
RIA	Radioimunoanalýza
FIA	Fluorescenční imunoanalýza
HLA	Lidský leukocytární antigen
CDR	Komplementárně-determinační oblast
VL	Variabilní oblast lehké řetězce
VH	Variabilní oblast těžké řetězce
CL	Konstantní oblast lehké řetězce
CH	Konstantní oblast těžké řetězce
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
NHS	N-Hydroxysukcinimid
S-NHS	Sulfo-N-Hydroxysukcinimid
Fc	Fragment krystalizující
Fab	Fragment vázající antigen
HRP	Křenová peroxidáza
CCD	Zařízení s vázaným nábojem
4-CN	4-chlor-1-naftol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
EIA	Enzymatická imunoanalýza
ELISA	Enzymově spjatý imunosorbentní test
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
PBS	Fosfátový pufovaný solný roztok
MQ	Milli-Q voda
PBST	Fosfátový pufovaný solný roztok s Tweenem
MES	2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina
Ig	Imunoglobulin
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Příprava použitých roztoků.....	39
---	----

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Vznik haptenu-nosič konjugátu.....	11
Obrázek 2. Imunoglobulinová doména.....	13
Obrázek 3. Obecné schéma imunoglobulinu	13
Obrázek 4. Schéma pentameru a hexameru protilátky imunoglobulinu M	16
Obrázek 5. Aktivace B-lymfocytů a jejich diferenciaci na plazmatické a paměťové buňky	17
Obrázek 6. B-cell receptor	17
Obrázek 7. Proces humanizace Ab	18
Obrázek 8. A Lineární epitopy. B Konformační epitopy	25
Obrázek 9. Stavba magnetické částice	27
Obrázek 10. A Sestavení zařízení affiblot. B Detail horního víka s odvodnými mikrokanálkami a sběracími kanálkami	30
Obrázek 11. A Detail horního víka affiblotu. B Detail dolního víka affiblotu. C Sestavené zařízení affiblot	31
Obrázek 12. Sestavená aparatura affiblotu	31
Obrázek 13. Průběh metody western blot	33
Obrázek 14. Oxidace TMB, změna zbarvení z modrého na žluté po přijetí elektronů	34
Obrázek 15. 96 jamková mikrodestička, změna zbarvení TMB z modré na žlutou po okyselení kyselinou v praxi.....	34
Obrázek 16. Jednotlivé kroky jdoucí po sobě u čtyř různých typů ELIS	36
Obrázek 17. A Nanášení antigenu. B Blokování. C Nanášení primární protilátky. D Nanášení sekundární protilátky značenou HRP. E Detekce	40
Obrázek 18. Ligand vázající se na MČ.....	42
Obrázek 19. A Lidský IgG vázající se na MIS. B Eluce lidského IgG z MIS.....	43
Obrázek 20. A BSA vázající se na MČ. B inkubace MČ s BSA s lidským IgG. C Eluce nespecificky navázaného lidského IgG, pokud se navázalo	45
Obrázek 21. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Průměrná intenzita vzorku včetně SD v jedné řadě. D Intenzity blanků v porovnání s průměrným blankem.....	47
Obrázek 22. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF. C Kolorimetrická detekce, čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn	48
Obrázek 23. A Pipetovací schéma. B Výsledná Immobilon membrána. C Čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn.....	49
Obrázek 24. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Čtyřbodová kalibrační křivka sestavená z průměru intenzit tří stejných koncentrací v jednom sloupci a jejich směrodatná odchylka	50
Obrázek 25 A Pipetovací schéma. B Výsledná Immobilon membrána. C Čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn.....	52
Obrázek 26 A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Čtyřbodová kalibrační křivka závislosti množství lidského IgG na intenzitě skvrn	52

Obrázek 27. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Čtyřbodové kalibrační křivky závislosti množství myší anti-lidský igG na intenzitě skvrn. D Čtyřbodová kalibrační křivka sestavená z průměru intenzit tří stejných koncentrací v jednom řádku a jejich směrodatná odchylka	54
Obrázek 28. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Čtyřbodové kalibrační křivky závislosti množství myší anti-lidský igG na intenzitě. D Graficky znázorněná čtyřbodová kalibrační křivka sestavená z průměru intenzit tří stejných koncentrací v jednom řádku a jejich směrodatná odchylka	56
Obrázek 29. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Kalibrační křivka, závislost množství myší anti-lidský IgG na intenzitě skvrn. D Graficky znázorněná výsledná koncentrace vzorků	58
Obrázek 30. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Kalibrační křivka, závislost množství lidského IgG na intenzitě. D Graficky znázorněná výsledná koncentrace vzorků	60
Obrázek 31. A Pipetovací schéma. B Výsledná PVDF membrána. C Čtyřbodová kalibrační křivka, závislost množství lidského IgG na intenzitě. D Graficky znázorněná výsledná koncentrace vzorků	62

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JÍLEK, Petr. *Imunologie stručně, jasně, přehledně*. B.m.: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.
- [2] STEWARD, Michael W. a Andrew M. LEW. The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1985, **78**(2), 173–190. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(85)90074-2
- [3] MAKOWSKI, Emily K., Patrick C. KINNUNEN, Jie HUANG, Lina WU, Matthew D. SMITH, Tiexin WANG, Alec A. DESAI, Craig N. STREU, Yulei ZHANG, Jennifer M. ZUPANCIC, John S. SCHARDT, Jennifer J. LINDERMAN a Peter M. TESSIER. Co-optimization of therapeutic antibody affinity and specificity using machine learning models that generalize to novel mutational space. *Nature Communications* [online]. 2022, **13**(1), 3788. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-31457-3
- [4] MACDONALD, Patrick J., Qiaoqiao RUAN, Jessica L. GRIESHABER, Kerry M. SWIFT, Russell E. TAYLOR, John C. PROSTKO a Sergey Y. TETIN. Affinity of anti-spike antibodies in SARS-CoV-2 patient plasma and its effect on COVID-19 antibody assays. *eBioMedicine* [online]. 2022, **75**, 103796. ISSN 23523964. Dostupné z: doi:10.1016/j.ebiom.2021.103796
- [5] WANG, Bo, Sachith GALLOLU KANKANAMALAGE, Jianbo DONG a Yue LIU. Optimization of therapeutic antibodies. *Antibody Therapeutics* [online]. 2021, **4**(1), 45–54. ISSN 2516-4236. Dostupné z: doi:10.1093/abt/tbab003
- [6] SVOBODOVA, Zuzana, Jakub NOVOTNY, Barbora OSPALKOVA, Marcela SLOVAKOVA, Zuzana BILKOVA a Frantisek FORET. Affiblot: a dot blot-based screening device for selection of reliable antibodies. *Analytical Methods* [online]. 2021, **13**(35), 3874–3884. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/D1AY00955A
- [7] INFORMEDHEALTH.ORG [INTERNET]. *In brief: The innate and adaptive immune systems*. [online]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG). 2006. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>
- [8] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK a KOLEKTIV. *Vyšetřovací metody v imunologii 2., přepracované a doplněné vydání*. B.m.: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
- [9] STEWART, J. Immunological principles. In: *Medical Microbiology* [online]. B.m.: Elsevier, 2012, s. 98–108. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-7020-4089-4.00023-8
- [10] DESTA, Israel T., Sergei KOTELNIKOV, George JONES, Usman GHANI, Mikhail ABYZOV, Yaroslav KHOLODOV, Daron M. STANDLEY, Dmitri BEGLOV, Sandor VAJDA a Dima KOZAKOV. The ClusPro AbEMap web server for the prediction of antibody epitopes. *Nature Protocols* [online]. 2023, **18**(6), 1814–1840. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/s41596-023-00826-7

- [11] NELSON, P N. Demystified ...: Monoclonal antibodies. *Molecular Pathology* [online]. 2000, **53**(3), 111–117. ISSN 13668714. Dostupné z: doi:10.1136/mp.53.3.111
- [12] FERENČÍK, Miroslav, Jozef ROVENSKÝ, Yehuda SHOENFELD a Vladimír MAŤHA. *Imunitní systém Informace pro každého*. B.m.: Grada, 2005. ISBN 80-247-1196-6.
- [13] WANG, Lai-Xi, Xin TONG, Chao LI, John P GIDDENS a Tiezheng LI. Glycoengineering of Antibodies for Modulating Functions. *Annual review of biochemistry* [online]. 2019, **88**, 433–459. ISSN 1545-4509. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012911
- [14] JANEWAY, C. A., Jr., P. TRAVERS, M. WALPORT et al. The structure of a typical antibody molecule. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* [online]. 5th edition. New York: Garland Science, 2001. ISBN 0-8153-3642-X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>
- [15] TOWNSEND, Catherine L, Julie M J LAFFY, Yu-Chang Bryan WU, Joselli SILVA O'HARE, Victoria MARTIN, David KIPLING, Franca FRATERNALI a Deborah K DUNN-WALTERS. Significant Differences in Physicochemical Properties of Human Immunoglobulin Kappa and Lambda CDR3 Regions. *Frontiers in immunology* [online]. 2016, **7**, 388. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2016.00388
- [16] SHEEHY, M J, C A EMLER, T W MAK a J P PANDEY. Human genes for the immunoglobulin gamma-chain (Gm) allotypes and for the T cell receptor alpha-chain are distantly linked or unlinked. *Experimental and clinical immunogenetics*. 1991, **8**(1), 6–10. ISSN 0254-9670.
- [17] IGAWA, Tomoyuki, Hiroyuki TSUNODA, Taichi KURAMOCHI, Zenjiro SAMPEI, Shinya ISHII a Kunihiro HATTORI. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *mAbs* [online]. 2011, **3**(3), 243–52. ISSN 1942-0870. Dostupné z: doi:10.4161/mabs.3.3.15234
- [18] BOWEN, Anthony a Arturo CASADEVALL. The Role of the Constant Region in Antibody-Antigen Interactions: Redefining the Modular Model of Immunoglobulin Structure. In: *Structural Biology in Immunology* [online]. B.m.: Elsevier, 2018, s. 145–170. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803369-2.00006-1
- [19] LIPMAN, N. S., L. R. JACKSON, L. J. TRUDEL a F. WEIS-GARCIA. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal* [online]. 2005, **46**(3), 258–268. ISSN 1084-2020. Dostupné z: doi:10.1093/ilar.46.3.258
- [20] CHIU, Mark L, Dennis R GOULET, Alexey TEPLYAKOV a Gary L GILLILAND. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)* [online]. 2019, **8**(4). ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib8040055
- [21] RUFFOLO, Jeffrey A., Lee-Shin CHU, Sai Pooja MAHAJAN a Jeffrey J. GRAY. Fast, accurate antibody structure prediction from deep learning on massive set of natural antibodies. *Nature Communications* [online]. 2023, **14**(1), 2389. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-023-38063-x

- [22] BURTON, Dennis R. Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1990, **15**(2), 64–69. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/0968-0004(90)90178-E
- [23] VIDARSSON, Gestur, Gillian DEKKERS a Theo RISPENS. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* [online]. 2014, **5**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00520
- [24] BANDILLA, K K, F C MCDUFFIE a G J GLEICH. Immunoglobulin classes of antibodies produced in the primary and secondary responses in man. *Clinical and experimental immunology*. 1969, **5**(6), 627–41. ISSN 0009-9104.
- [25] JANEWAY, C. A., Jr., P. TRAVERS, M. WALPORT et al. The distribution and functions of immunoglobulin isotypes. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* [online]. 5th edition. New York: Garland Science, 2001. ISBN 0-8153-3642-X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27162/>
- [26] PALMEIRA, Patricia, Camila QUINELLO, Ana Lúcia SILVEIRA-LESSA, Cláudia Augusta ZAGO a Magda CARNEIRO-SAMPAIO. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clinical & developmental immunology* [online]. 2012, **2012**, 985646. ISSN 1740-2530. Dostupné z: doi:10.1155/2012/985646
- [27] ZHANG, Haoze, Ping LI, Di WU, Dong XU, Yong HOU, Qian WANG, Mengtao LI, Yongzhe LI, Xiaofeng ZENG, Fengchun ZHANG a Qun SHI. Serum IgG Subclasses in Autoimmune Diseases. *Medicine* [online]. 2015, **94**(2), e387. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.0000000000000387
- [28] PETRUŠIĆ, Vladimir, Irena ŽIVKOVIĆ, Marijana STOJANOVIĆ, Ivana STOJIĆEVIĆ, Emilija MARINKOVIĆ a Ljiljana DIMITRIJEVIĆ. Hexameric immunoglobulin M in humans: Desired or unwanted? *Medical Hypotheses* [online]. 2011, **77**(6), 959–961. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2011.08.018
- [29] KEYT, Bruce A., Ramesh BALIGA, Angus M. SINCLAIR, Stephen F. CARROLL a Marvin S. PETERSON. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. *Antibodies* [online]. 2020, **9**(4), 53. ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib9040053
- [30] HIRAMOTO, Emiri, Akihisa TSUTSUMI, Risa SUZUKI, Shigeru MATSUOKA, Satoko ARAI, Masahide KIKKAWA a Toru MIYAZAKI. The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Science Advances* [online]. 2018, **4**(10). ISSN 2375-2548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.aau1199
- [31] DE SOUSA-PEREIRA, Patrícia a Jenny M. WOOF. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies* [online]. 2019, **8**(4), 57. ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib8040057
- [32] WOOF, Jenny M a Michael A KERR. The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of Pathology* [online]. 2006, **208**(2), 270–282. ISSN 0022-3417. Dostupné z: doi:10.1002/path.1877

- [33] VLADUTIU, Adrian O. Immunoglobulin D: Properties, Measurement, and Clinical Relevance. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* [online]. 2000, **7**(2), 131–140. ISSN 1071-412X. Dostupné z: doi:10.1128/CDLI.7.2.131-140.2000
- [34] CHEN, Kang a Andrea CERUTTI. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunological Reviews* [online]. 2010, **237**(1), 160–179. ISSN 0105-2896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00929.x
- [35] COLAS, Luc, Antoine MAGNAN a Sophie BROUARD. Immunoglobulin E response in health and disease beyond allergic disorders. *Allergy* [online]. 2022, **77**(6), 1700–1718. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.15230
- [36] LYNCH, Neil R., Isabel A. HAGEL, Miguel E. PALENQUE, Maria C. DI PRISCO, Jaime E. ESCUDERO, L.Alejandra CORAO, J.Alberto SANDIA, Lisbeth J. FERREIRA, Carlos BOTTO a Mireya PEREZ. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment☆☆☆★★★. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 1998, **101**(2), 217–221. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-6749(98)70386-0
- [37] LEBIEN, Tucker W. a Thomas F. TEDDER. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* [online]. 2008, **112**(5), 1570–1580. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-02-078071
- [38] YAM-PUC, Juan Carlos, Lingling ZHANG, Yang ZHANG a Kai-Michael TOELLNER. Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation. *F1000Research* [online]. 2018, **7**, 429. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.13567.1
- [39] GROFF, Katherine, Jeffrey BROWN a Amy J. CLIPPINGER. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, **33**(8), 1787–1798. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.10.004
- [40] MITRA, Sanchita a Pushpa Chaudhary TOMAR. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* [online]. 2021, **19**(1), 159. ISSN 1687157X. Dostupné z: doi:10.1186/s43141-021-00264-6
- [41] KÖHLER, G. a C. MILSTEIN. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* [online]. 1975, **256**(5517), 495–497. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/256495a0
- [42] KUNERT, Renate a David REINHART. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(8), 3451–3461. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7388-9
- [43] MARKS, Claire, Alissa M HUMMER, Mark CHIN a Charlotte M DEANE. Humanization of antibodies using a machine learning approach on large-scale repertoire data. *Bioinformatics* [online]. 2021, **37**(22), 4041–4047. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btab434

- [44] RIECHMANN, Lutz, Michael CLARK, Herman WALDMANN a Greg WINTER. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* [online]. 1988, **332**(6162), 323–327. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/332323a0
- [45] JIN, Shijie, Yanping SUN, Xiao LIANG, Xinyu GU, Jiangtao NING, Yingchun XU, Shuqing CHEN a Liqiang PAN. Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2022, **7**(1), 39. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-021-00868-x
- [46] VIEGAS BARROSO, Joao Filipe, Maria Elisabeth HALDER a Maurice WHELAN. *EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies*. [online]. EUR 30185 EN. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 2020. ISBN 978-92-76-18346-4. Dostupné z: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC120199>
- [47] BRADBURY, Andrew a Andreas PLÜCKTHUN. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature* [online]. 2015, **518**(7537), 27–29. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/518027a
- [48] LEENAARS, M. a C. F. M. HENDRIKSEN. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal* [online]. 2005, **46**(3), 269–279. ISSN 1084-2020. Dostupné z: doi:10.1093/ilar.46.3.269
- [49] KRIANGKUM, Jitra, Biwen XU, Les P. NAGATA, R.Elaine FULTON a Mavanur R. SURESH. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. *Biomolecular Engineering* [online]. 2001, **18**(2), 31–40. ISSN 13890344. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-0344(01)00083-1
- [50] ZHANG, Jun-He, Lin-Lin SHAN, Fan LIANG, Chen-Yang DU a Jing-Jing LI. Strategies and Considerations for Improving Recombinant Antibody Production and Quality in Chinese Hamster Ovary Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2022, **10**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.856049
- [51] LIAO, Xinmei, Hui LIANG, Jian PAN, Qian ZHANG, Jiaqi NIU, Cuili XUE, Jian NI a Daxiang CUI. Preparation and characterization of a fully human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor alpha. *Bioengineered* [online]. 2021, **12**(2), 10821–10834. ISSN 2165-5979. Dostupné z: doi:10.1080/21655979.2021.1967710
- [52] ZHANG, Jun-He, Lin-Lin SHAN, Fan LIANG, Chen-Yang DU a Jing-Jing LI. Strategies and Considerations for Improving Recombinant Antibody Production and Quality in Chinese Hamster Ovary Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2022, **10**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.856049
- [53] KIPRIYANOV, Sergey M. a Fabrice LE GALL. Generation and Production of Engineered Antibodies. *Molecular Biotechnology* [online]. 2004, **26**(1), 39–60. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:26:1:39

- [54] BAGHBAN, Roghayyeh, Safar FARAJNIA, Masoumeh RAJABIBAZL, Younes GHASEMI, AmirAli MAFI, Reyhaneh HOSEINPOOR, Leila RAHBARNIA a Maryam ARIA. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology* [online]. 2019, **61**(5), 365–384. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1007/s12033-019-00164-8
- [55] FRENZEL, André, Michael HUST a Thomas SCHIRRMANN. Expression of Recombinant Antibodies. *Frontiers in Immunology* [online]. 2013, **4**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2013.00217
- [56] BRADBURY, Andrew R. M., Nathan D. TRINKLEIN, Holger THIE, Ian C. WILKINSON, Atul K. TANDON, Stephen ANDERSON, Catherine L. BLADEN, Brittany JONES, Shelley Force ALDRED, Marco BESTAGNO, Oscar BURRONE, Jennifer MAYNARD, Fortunato FERRARA, James S. TRIMMER, Janina GÖRNEMANN, Jacob GLANVILLE, Philipp WOLF, Andre FRENZEL, Julin WONG, Xin Yu KOH, Hui-Yan ENG, David LANE, Marie-Paule LEFRANC, Mike CLARK a Stefan DÜBEL. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *mAbs* [online]. 2018, **10**(4), 539–546. ISSN 1942-0862. Dostupné z: doi:10.1080/19420862.2018.1445456
- [57] SHOEMAKER, Charles B. When will rAbs replace mAbs in labs? *The Veterinary Journal* [online]. 2005, **170**(2), 151–152. ISSN 10900233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tvjl.2004.12.003
- [58] BEYGMORADI, Azadeh, Ahmad HOMAEI, Roohullah HEMMATI a Pedro FERNANDES. Recombinant protein expression: Challenges in production and folding related matters. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2023, **233**, 123407. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123407
- [59] Will recombinant DNA technology become obsolete? *Nature India* [online]. 2012. ISSN 1755-3180. Dostupné z: doi:10.1038/nindia.2012.189
- [60] SIDDIQUI, MZ. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, **72**(1), 12. ISSN 0250-474X. Dostupné z: doi:10.4103/0250-474X.62229
- [61] SHARMA, Prerna, Rahul V. JOSHI, Robert PRITCHARD, Kevin XU a Maya A. EICHER. Therapeutic Antibodies in Medicine. *Molecules* [online]. 2023, **28**(18), 6438. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28186438
- [62] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES. Large-Scale Production of Monoclonal Antibodies. In: *Monoclonal Antibody Production* [online]. Washington, DC: National Academies Press (US), 1999. ISBN 0-309-07511-4. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100189/>
- [63] WALLER, T., B. MOREIN a Eva FABIANSOON. Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals* [online]. 1978, **12**(3), 145–148. ISSN 0023-6772. Dostupné z: doi:10.1258/002367778780936331

- [64] BERGQUIST, N.R. a T. WALLER. A novel simple immunoassay for rapid detection of human IgG antibodies to toxoplasma gondii. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1983, **61**(3), 339–344. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(83)90229-6
- [65] WALLER, T., A. UGGLA, N.R. BERGQUIST a C. WALTER. Application of an indirect carbon immunoassay (CIA) for the rapid diagnosis of antibody to in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online]. 1983, **5**(2), 203–208. ISSN 01652427. Dostupné z: doi:10.1016/0165-2427(83)90021-1
- [66] YALOW, ROSALYN S. a SOLOMON A. BERSON. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* [online]. 1959, **184**(4699), 1648–1649. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/1841648b0
- [67] HICKS, Jocelyn M. Fluorescence immunoassay. *Human Pathology* [online]. 1984, **15**(2), 112–116. ISSN 00468177. Dostupné z: doi:10.1016/S0046-8177(84)80049-0
- [68] MAZHARI, Ramin, Jessica BREWSTER, Rich FONG, Caitlin BOURKE, Zoe S. J. LIU, Eizo TAKASHIMA, Takafumi TSUBOI, Wai-Hong THAM, Matthias HARBERS, Chetan CHITNIS, Julie HEALER, Maria OME-KAIUS, Jetsumon SATTABONGKOT, James KAZURA, Leanne J. ROBINSON, Christopher KING, Ivo MUELLER a Rhea J. LONGLEY. A comparison of non-magnetic and magnetic beads for measuring IgG antibodies against Plasmodium vivax antigens in a multiplexed bead-based assay using Luminex technology (Bio-Plex 200 or MAGPIX). *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(12), e0238010. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0238010
- [69] PICASCIA, Antonietta, Teresa INFANTE a Claudio NAPOLI. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. *Clinical and Experimental Nephrology* [online]. 2012, **16**(3), 373–381. ISSN 1342-1751. Dostupné z: doi:10.1007/s10157-012-0635-1
- [70] GOULET, Dennis R. a William M. ATKINS. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2020, **109**(1), 74–103. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2019.05.031
- [71] WANG, Zeng, Guoqing WANG, Huaqing LU, Hongjian LI, Mei TANG a Aiping TONG. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine* [online]. 2022, **3**(1), 35. ISSN 2662-8651. Dostupné z: doi:10.1186/s43556-022-00100-4
- [72] FLATMAN, Stephen, Imtiaz ALAM, Jeffery GERARD a Nesredin MUSSA. Process analytics for purification of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **848**(1), 79–87. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.018
- [73] RALEIGH, Michael D., Nicola BELTRAMINELLI, Stephanie FALLOT, Mark G. LESAGE, Amy SAYKAO, Paul R. PENDEL, Steve FULLER, Thomas THISTED, Zuzanna BIESOVA, Stephen HARRIGAN, Darryl SAMPEY, Bin ZHOU a Matthew W. KALNIK. Attenuating nicotine's effects

- with high affinity human anti-nicotine monoclonal antibodies. *PLOS ONE* [online]. 2021, **16**(7), e0254247. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0254247
- [74] DIAS DA SILVA, Wilmar, Sonia A. DE ANDRADE, Ângela Alice Amadeu MEGALE, Daniel Alexandre DE SOUZA, Osvaldo Augusto SANT'ANNA, Fábio Carlos MAGNOLI, Felipe Raimondi GUIDOLIN, Kemily Stephanie GODOI, Lucas Yuri SALADINI, Patrick Jack SPENCER a Fernanda Calheta Vieira PORTARO. Antibodies as Snakebite Antivenoms: Past and Future. *Toxins* [online]. 2022, **14**(9), 606. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins14090606
- [75] JANEWAY, C. A., Jr., P. TRAVERS, M. WALPORT et al. The interaction of the antibody molecule with specific antigen. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* [online]. 5th edition. New York: Garland Science, 2001. ISBN 0-8153-3642-X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27160/>
- [76] LIU, Fang, ChengCheng YUAN, Haoqiang CHEN a Fei YANG. Prediction of linear B-cell epitopes based on protein sequence features and BERT embeddings. *Scientific Reports* [online]. 2024, **14**(1), 2464. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-024-53028-w
- [77] SANCHEZ-TRINCADO, Jose L., Marta GOMEZ-PEROSANZ a Pedro A. RECHE. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research* [online]. 2017, **2017**, 1–14. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2017/2680160
- [78] REVERBERI, Roberto a Lorenzo REVERBERI. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* [online]. 2007, **5**(4), 227–40. ISSN 1723-2007. Dostupné z: doi:10.2450/2007.0047-07
- [79] ZHANG, Yue a Dejian ZHOU. Magnetic particle-based ultrasensitive biosensors for diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2012, **12**(6), 565–571. ISSN 1473-7159. Dostupné z: doi:10.1586/erm.12.54
- [80] WANG, Yuan-Kai, Yu-Chen WANG, Heng-an WANG, Wen-Hui JI, Jian-He SUN a Ya-Xian YAN. An immunomagnetic-bead-based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of fumonisin B1. *Food Control* [online]. 2014, **40**, 41–45. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2013.11.025
- [81] MODH, Harshvardhan, Thomas SCHEPER a Johanna-Gabriela WALTER. Aptamer-Modified Magnetic Beads in Biosensing. *Sensors* [online]. 2018, **18**(4), 1041. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s18041041
- [82] ASIAEI, Sasan, Brendan SMITH a Patricia NIEVA. Enhancing conjugation rate of antibodies to carboxylates: Numerical modeling of conjugation kinetics in microfluidic channels and characterization of chemical over-exposure in conventional protocols by quartz crystal microbalance. *Biomicrofluidics* [online]. 2015, **9**(6). ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.4937929

- [83] CITARTAN, Marimuthu. Aptamers as the powerhouse of dot blot assays. *Talanta* [online]. 2021, **232**, 122436. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122436
- [84] HAWKES, R, E NIDAY a J GORDON. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical biochemistry* [online]. 1982, **119**(1), 142–7. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(82)90677-7
- [85] MISHRA, Vibhor. Dot-Blotting: A Quick Method for Expression Analysis of Recombinant Proteins. *Current protocols* [online]. 2022, **2**(9), e546. ISSN 2691-1299. Dostupné z: doi:10.1002/cpz1.546
- [86] SVOBODOVÁ ZUZANA, NOVOTNÝ JAKUB, OSPALCOVÁ BARBORA, NEMČEKOVÁ KLÁRA, TRIPSKÁ KATARÍNA, FORET FRANTIŠEK a BÍLKOVÁ ZUZANA. Affiblot: Semi-quantitative Selection and Characterization of Research Antibodies. 2021.
- [87] VDOVENKO, Marina M., Alexandra S. DEMIYANOVA, Tamara A. CHEMLEVA a Ivan Yu. SAKHAROV. Optimization of horseradish peroxidase-catalyzed enhanced chemiluminescence reaction by full factorial design. *Talanta* [online]. 2012, **94**, 223–226. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.03.025
- [88] AKHAVAN-TAFTI, Hashem, A. Paul SCHAAP, Zahara ARGHAVANI, Renuka DESILVA, Robert A. EICKHOLT, Richard S. HANDLEY, Barry A. SCHOENFELNER, Katsuaki SUGIOKA a Yumiko SUGIOKA. CCD camera imaging for the chemiluminescent detection of enzymes using new ultrasensitive reagents. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* [online]. 1994, **9**(3), 155–164. ISSN 0884-3996. Dostupné z: doi:10.1002/bio.1170090309
- [89] HARPAZ, Dorin, Evgeni ELTZOV, Timothy S. E. NG, Robert S. MARKS a Alfred I. Y. TOK. Enhanced Colorimetric Signal for Accurate Signal Detection in Paper-Based Biosensors. *Diagnostics* [online]. 2020, **10**(1), 28. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics10010028
- [90] YANG, Ping-Chang a Tahrin MAHMOOD. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, **4**(9), 429. ISSN 1947-2714. Dostupné z: doi:10.4103/1947-2714.100998
- [91] KURIEN, Biji T. a R. Hal SCOFIELD. Western Blotting: An Introduction. In: [online]. 2015, s. 17–30. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2694-7_5
- [92] KURIEN, Biji T. a R. Hal SCOFIELD. Other Notable Protein Blotting Methods: A Brief Review. In: [online]. 2015, s. 487–503. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2694-7_51
- [93] JEYACHANDRAN, Y.L., J.A. MIELCZARSKI, E. MIELCZARSKI a B. RAI. Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2010, **341**(1), 136–142. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2009.09.007

- [94] AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 4–15. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
- [95] ALHAJJ, Mandy, Muhammad ZUBAIR a Aisha FARHANA. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. 2024.
- [96] CARROLL, Kenneth, Bernadette LANNON a Richard O’KENNEDY. Optimal fixation of cells for use in solid-phase ELISA. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1990, **129**(1), 71–76. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(90)90422-R
- [97] ZHANG, Xiao, Qin YANG, Yunhe LANG, Xia JIANG a Peng WU. Rationale of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as the Chromogenic Substrate in Colorimetric Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2020, **92**(18), 12400–12406. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.0c02149
- [98] GIBBS, Judy, Michelle VESSELS a Mark ROTHENBERG. *Selecting the Detection System – Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods for ELISA Assays* [online]. Kennebunk, ME: Corning Incorporated, Life Sciences. Dostupné z: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-DD-AN-458.pdf>
- [99] SAKAMOTO, Seiichi, Waraporn PUTALUN, Sornkanok VIMOLMANGKANG, Waranyoo PHOOLCHAROEN, Yukihiko SHOYAMA, Hiroyuki TANAKA a Satoshi MORIMOTO. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines* [online]. 2018, **72**(1), 32–42. ISSN 1340-3443. Dostupné z: doi:10.1007/s11418-017-1144-z
- [100] SU DONG KIM, KI-ROO SHIN a BYOUNG-TAK ZHANG. Molecular immunocomputing with application to alphabetical pattern recognition mimics the characterization of ABO blood type. In: *The 2003 Congress on Evolutionary Computation, 2003. CEC '03*. [online]. B.m.: IEEE, nedatováno, s. 2549–2556. ISBN 0-7803-7804-0. Dostupné z: doi:10.1109/CEC.2003.1299409
- [101] O’KENNEDY, Richard, Caroline MURPHY a Tatyana DEVINE. Technology advancements in antibody purification. *Antibody Technology Journal* [online]. 2016, **Volume 6**, 17–32. ISSN 2230-3170. Dostupné z: doi:10.2147/ANTI.S64762
- [102] JANG, Miran a Poh Yin YEW. Deep Sequencing of T-Cell and B-Cell Receptors with Next-Generation DNA Sequencers. In: *Immunopharmacogenomics* [online]. Tokyo: Springer Japan, 2015, s. 3–25. Dostupné z: doi:10.1007/978-4-431-55726-5_1
- [103] TAN, Hern-Tze Tina, Kazunari SUGITA a Cezmi A. AKDIS. Novel Biologicals for the Treatment of Allergic Diseases and Asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. 2016, **16**(10), 70. ISSN 1529-7322. Dostupné z: doi:10.1007/s11882-016-0650-5
- [104] MEFTAHI, Gholam Hossein, Zahra BAHARI, Ali ZAREI MAHMOUDABADI, Maryam IMAN a Zohreh JANGRAVI. Applications of western blot technique: From bench to bedside.

Biochemistry and Molecular Biology Education [online]. 2021, **49**(4), 509–517. ISSN 1470-8175. Dostupné z: [doi:10.1002/bmb.21516](https://doi.org/10.1002/bmb.21516)