

IMUNOSENSORY 2

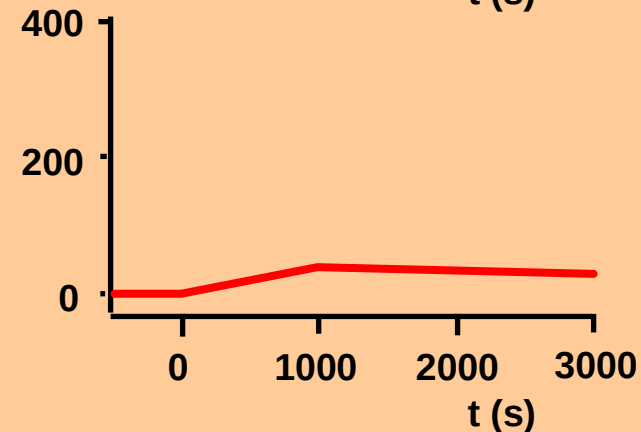
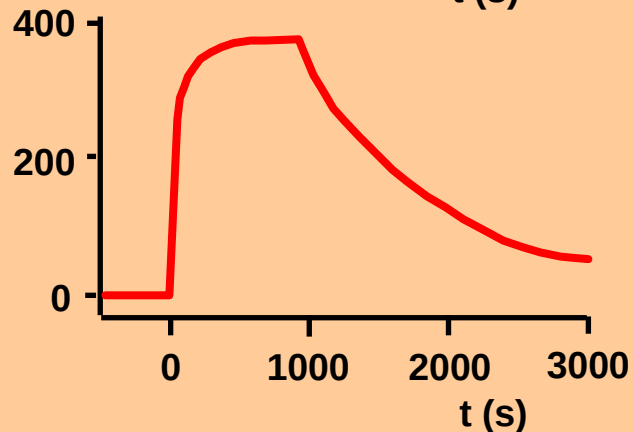
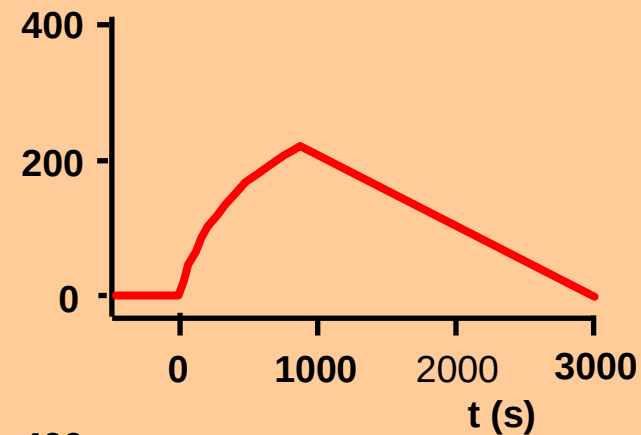
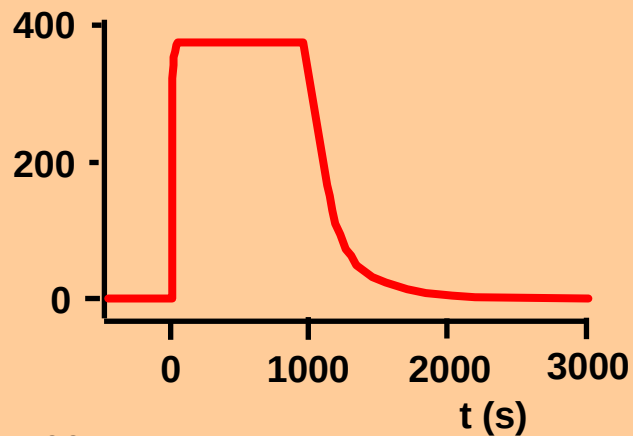
Kinetika afinitních interakcí

2 způsoby stanovení:

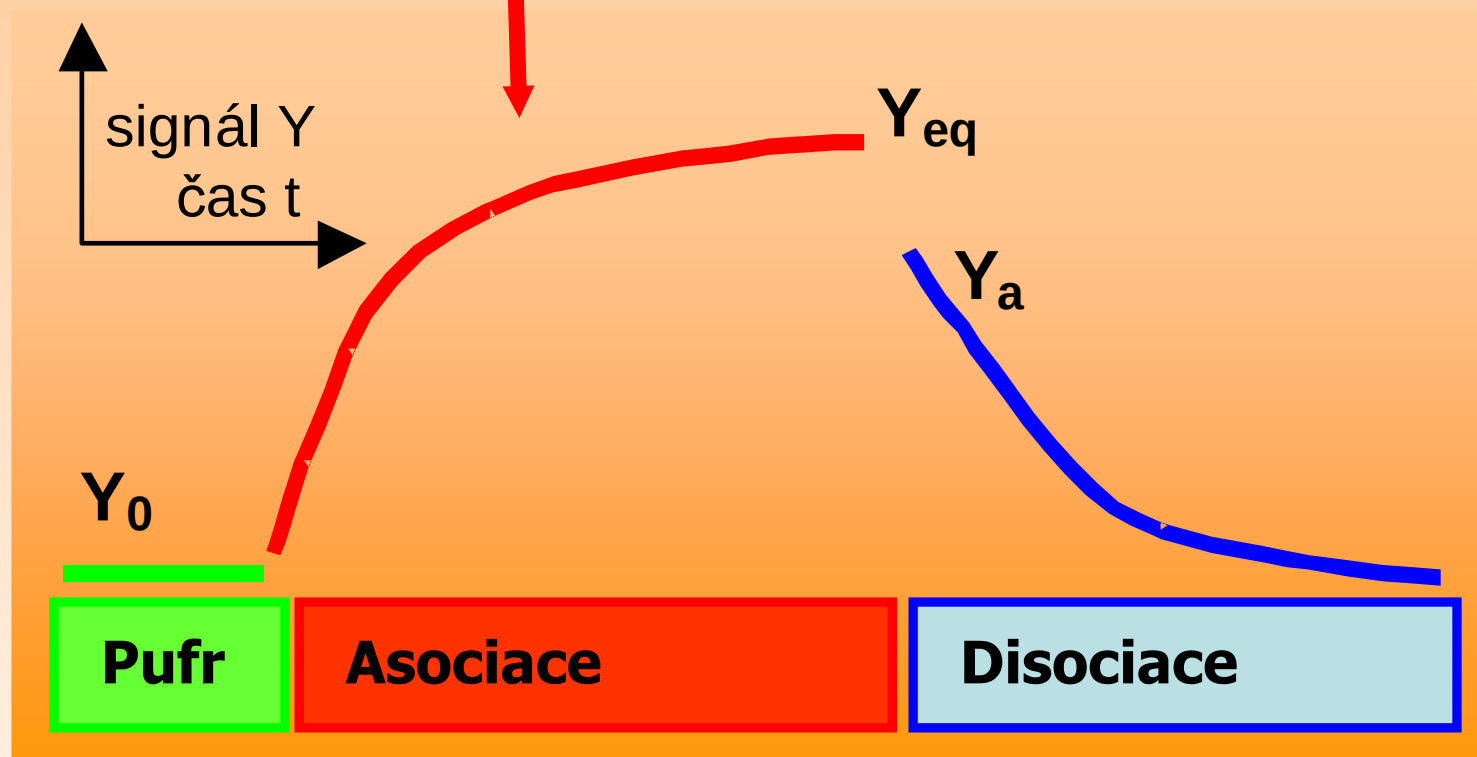
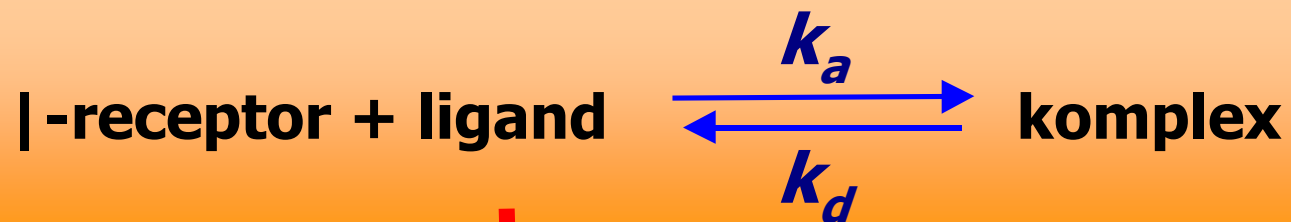
- ✓ smísení interagujících složek,
dosažení rovnováhy
separace volných a vázaných molekul
kvantifikace jednoho z partnerů.
detekční značky -radioaktivita, fluorescence
Nezískají se kinetická data, změny nativní molekuly
- ✓ průběžné sledování vazebného děje pomocí biosensoru
interagující složka je navázána na fyzikální sensor
specifické navázání druhé látky (ligand)
změna fyzikální charakteristiky sensoru = Δ signálu
Měří se vazebné interakce v reálném čase

Charakterizace afinitních interakcí

proč měřit rychlostní kinetické konstanty?

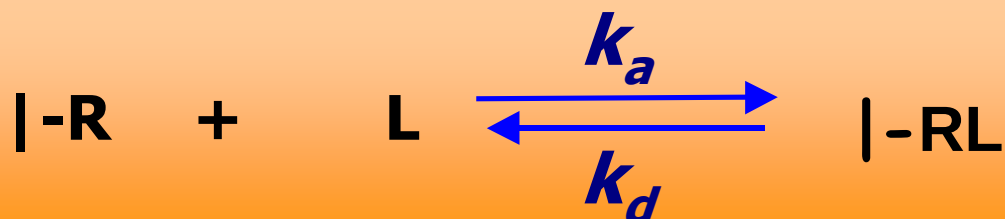


Všechny tyto interakce mají stejnou konstantu K_A



Signál je přímo úměrný množství vznikajícího komplexu.
 U všech typů sensorů je velikost signálu závislá
 na hmotnosti navázaných molekul.

Sledování asociace a disociace molekul



Děj popisují kinetické rychlostní konstanty k_a (asociační) a k_d (disociační). Rychlost tvorby komplexu je dána:

$$d[RL]/dt = k_a[R][L] - k_d[RL]$$

Po ustavení rovnováhy ($d[RL]/dt = 0$) jsou koncentrace dány rovnovážnými konstantami K_A , resp. K_D platí vztah:

$$K_A = [RL] / [R][L] = k_a/k_d \quad K_D = 1/K_A$$

Průtočné uspořádání:

- ✓ ustavení základní linie signálu v pufru
- ✓ roztok obsahující ligand = vazebná křivka (asociace)
- ✓ opět základní roztok = rozpad komplexu RL (disociace)

Hodnocení experimentálních záznamů:

- ✓ výchozí signál Y_0 nulový
- ✓ vazebná kapacita povrchu je úměrná celkové změně signálu po obsazení všech přítomných molekul receptoru R $Y_{\max}$
- ✓ zbývající množství navázaného ligandu Y
(neobsazený R = $Y_{\max} - Y$)

$$dY/dt = k_a c(Y_{\max} - Y) - k_d Y \quad dY/dt = k_a c \cdot Y_{\max} - (k_a c + k_d) Y$$

Určení kinetických parametrů

Z experimentálních závislostí Y na čase t
dva odlišné postupy:

- ✓ linearizace transformací
- ✓ nelineární regresi

Linearizace

BIAcore

$$Y = f(t)$$

$$dY/dt = f(y)$$

$$dY/dt = a + bY$$

Pro úsek na ose y platí: $a = k_a c Y_{\max}$

Pro směrnici : $b = -k_a c - k_d$

$$dY/dt = k_a c (Y_{\max} - Y) - k_d Y \quad dY/dt = k_a c \cdot Y_{\max} - (k_a c + k_d) Y$$

Provedou se vazebná měření pro řadu koncentrací c volného partnera L , lze rychlostní konstanty k_a a k_d zjistit vynesáním závislostí a , b na koncentraci c .

Na základě grafu směrníc se určí velikost konstant a a z grafu úseků vazebná kapacita $Y_{\max}$.

Lineární transformace může vést k transformaci chyb.

Postup funguje pro systémy, které se chovají podle jednoduchého kinetického schématu.

Pokud dY/dt vs Y není zcela lineární, je proložení subjektivní

Nelineární regrese

je exaktní postup, který vychází z integrace rovnice výchozí podle času, což vede k výrazu závislosti signálu Y na čase t :

$$y = \frac{k_a c Y_{\max} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\}}{k_a c + k_d}$$

Z jediného experimentu lze určit kinetické konstanty. Pro usnadnění numerického výpočtu lze zavést Y_{eq} , tj. velikost signálu při dosažení rovnovážného stavu:

$$Y_{eq} = k_a c Y_{\max} / (k_a c + k_d) = c Y_{\max} / (c + K_d) = K_a c Y_{\max} / (c + K_a)$$

$$Y = Y_{eq} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\}$$

Dalšího zjednodušení lze dosáhnout zavedením:

$$k_{obs} = k_a c + k_d$$

Hodnoty kinetických rychlostních konstant lze určit vynesáním k_{obs} proti koncentraci volného vazebného partnera.

Nelineární regrese umožňuje vyhodnotit vazebné křivky tvořené ze dvou nezávislých integrací, je možné uvažovat vliv nestability základní linie, korigovat změny signálu vyvolané výměnou pracovního roztoku.

Po nástřiku vzorku se projeví prudká změna indexu lomu okolního prostředí, která se projeví jako změna signálu u optických sensorů.

Stejně tak působí změny viskozity u piezoelektrických sensorů.

Nelineární regrese je univerzální a lze ji použít i tam, kde linearizace selhává nebo není principiálně použitelná vůbec.

Disociační fáze

- ✓ vytvoření komplexu RL a odstranění volného ligandu
- ✓ zpětný rozpad disociací komplexu

Kineticky: rovnice

$$d[RL]/dt = k_a[R][L] - k_d[RL]$$

kde $[L]' = 0$,

z toho plyne: $dY/dt = -k_d Y$

Je-li výchozí množství komplexu RL na povrchu sensoru dáno signálem Y_a , integrace vede ke vztahu:

$$Y = Y_a \exp(-k_d t)$$

Z experimentálních disociačních křivek lze parametry k_d a Y_a určit nelineární regresí nebo po úpravě na rovnici přímky lineární regresí:

$$\ln Y = \ln Y_a - k_d t$$

Komplikace při praktickém provádění experimentů

- ✓ k_a i k_d lze vypočítat z asociační reakce,
- ✓ když k_d pod 10^{-4}s^{-1} nepřesné hodnoty k_d
- ✓ lépe určit k_d z disociační křivky a takto získanou hodnotu použít v asociačních rovnicích při určování k_a .

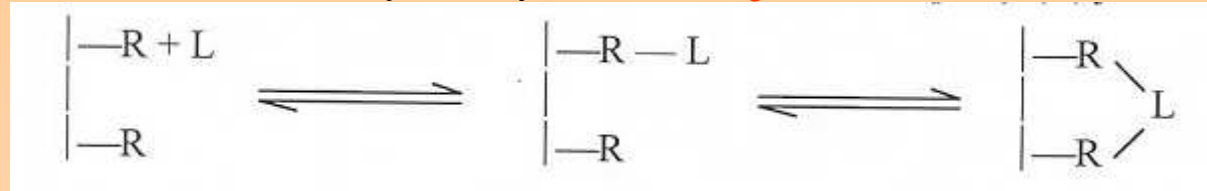
Při disociaci „rebinding“

ligand se uvolní z komplexu RL, ale než se stačí dostat do volného roztoku, je zachycen jinými neobsazenými receptory.

Jev nastává:

- ✓ povrchová hustota receptoru je vysoká (R nízkomolek.)
- ✓ biospecifická vrstva není monovrstvou, ale má větší tloušťku (imobilizace v dextranové matici), projevuje se nízké hodnoty k_d proti očekávání.

Předpoklad: Interakce antigen : protilátka 1:1 (IgG)
Imobilizovaný haptén R je možná i bivalentní vazba:



Při vyhodnocování se nevystačí z jednoduchým modelem.

Omezení jevu:

- ✓ vysoké koncentrace protilátek
- ✓ snížení povrchové hustoty hapténu (vzdálenost mezi R větší ve srovnání se vzdáleností mezi vazebnými místy protilátky)

Imobilizace:

Nespecifické imobilizační postupy

různé orientace receptoru a tím různé afinity.

orientovaná imobilizace

vazba protilátek na Protein A.

Transport látek z roztoku k sensoru:

Na povrchu sensoru při průtočných měřeních existuje nemíchaná vrstva na povrchu sensoru.

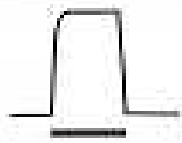
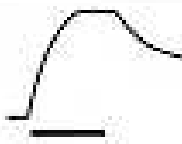
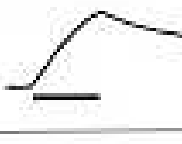
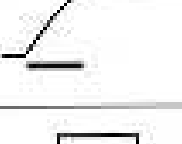
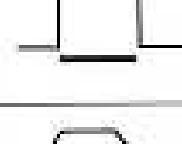
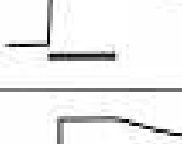
Mimo vlastní afinitní interakce je nutné uvažovat **difúzní transport ligandu L**.

Eliminace jevů:

- ✓ dostatečně rychlý průtok
- ✓ intenzivním míchání.

Realné bioafinitní interakce se mohou sestávat z řady **rovnovážných nebo nevratných kroků**

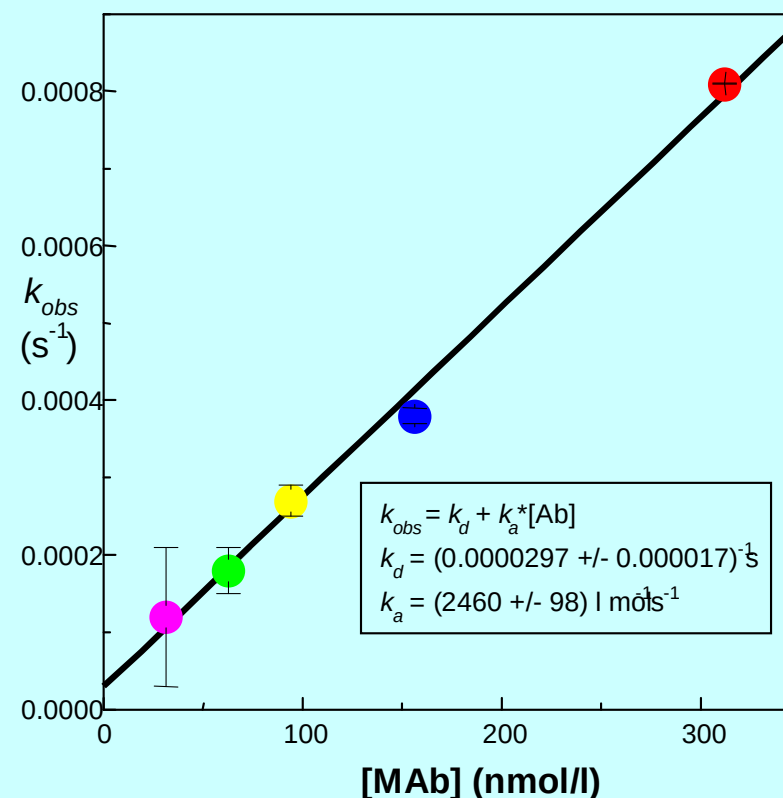
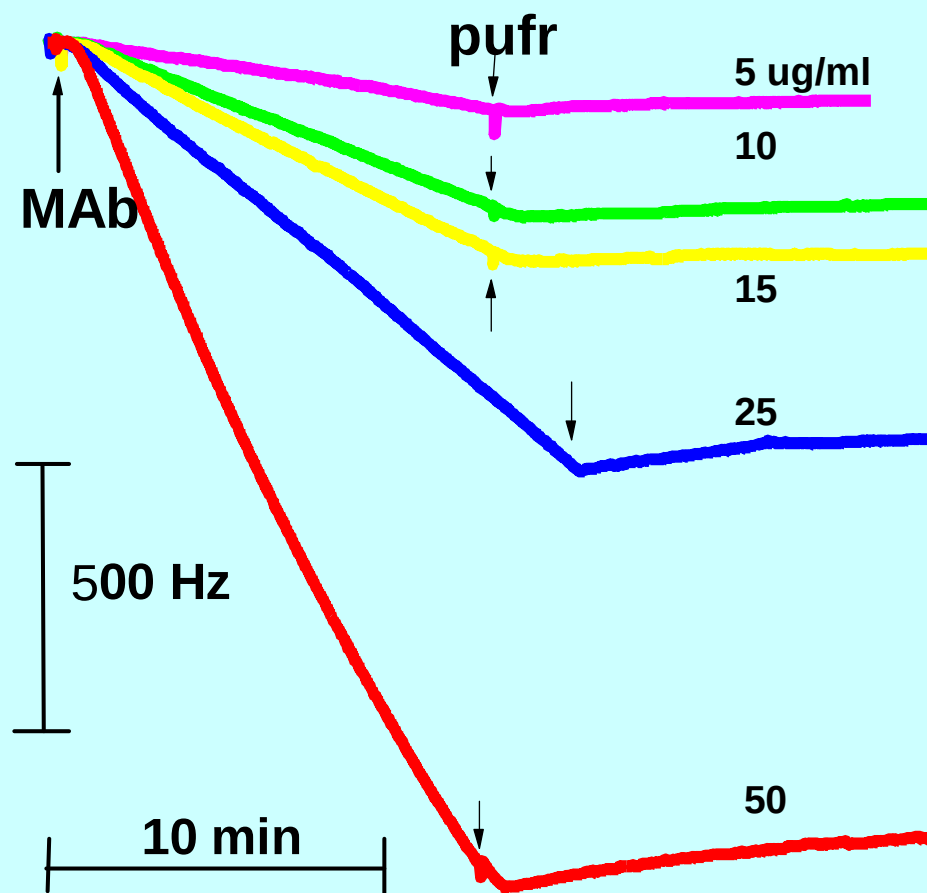
(konformační změny, interakce s jinou částí biomolekuly než s aktivním místem). Takové odchylky pak mohou ovlivnit vypočítané parametry.

Asociace k_a ($\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Disociace k_d (s^{-1})	Tvar závislosti ^a	Způsoby určení konstant
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	velmi rychlá ≈ 0.01		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováhy $\Rightarrow K_d$ disociace příliš rychlá
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha $\Rightarrow K_d$ disociace $\Rightarrow k_d$
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	středně rychlá 10^{-2} až 0.001		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha nemastává disociace $\Rightarrow k_d$
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	pomalá $< 10^{-2}$		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha nemastává disociace příliš pomalá
rychlá $> 5 \cdot 10^6$	velmi rychlá ≈ 0.01		asociace příliš rychlá rovnováha $\Rightarrow K_d$ disociace příliš rychlá
rychlá $> 5 \cdot 10^6$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace příliš rychlá rovnováha $\Rightarrow K_d$ disociace $\Rightarrow k_d$
rychlá $> 5 \cdot 10^6$	středně rychlá 10^{-2} až 0.001		asociace příliš rychlá disociace $\Rightarrow k_d$

^a tučná vodorovná čára označuje dobu kontaktu se vzorkem

**Experimentální
záznamy dle
předpokládaných
velikostí rychlostních
konstant**

UKÁZKA KINETICKÉ ANALÝZY



Studium interakce protilátky s imobilizovaným
hapténem pomocí piezoelektrického biosensoru

Protilátky a imunosensory

Imunochemické afinitní biosensory
biorekogniční prvek **Protilátky** - bílkoviny
schopné rozpoznat specificky jiné molekuly.

imunoglobuliny **IgG**

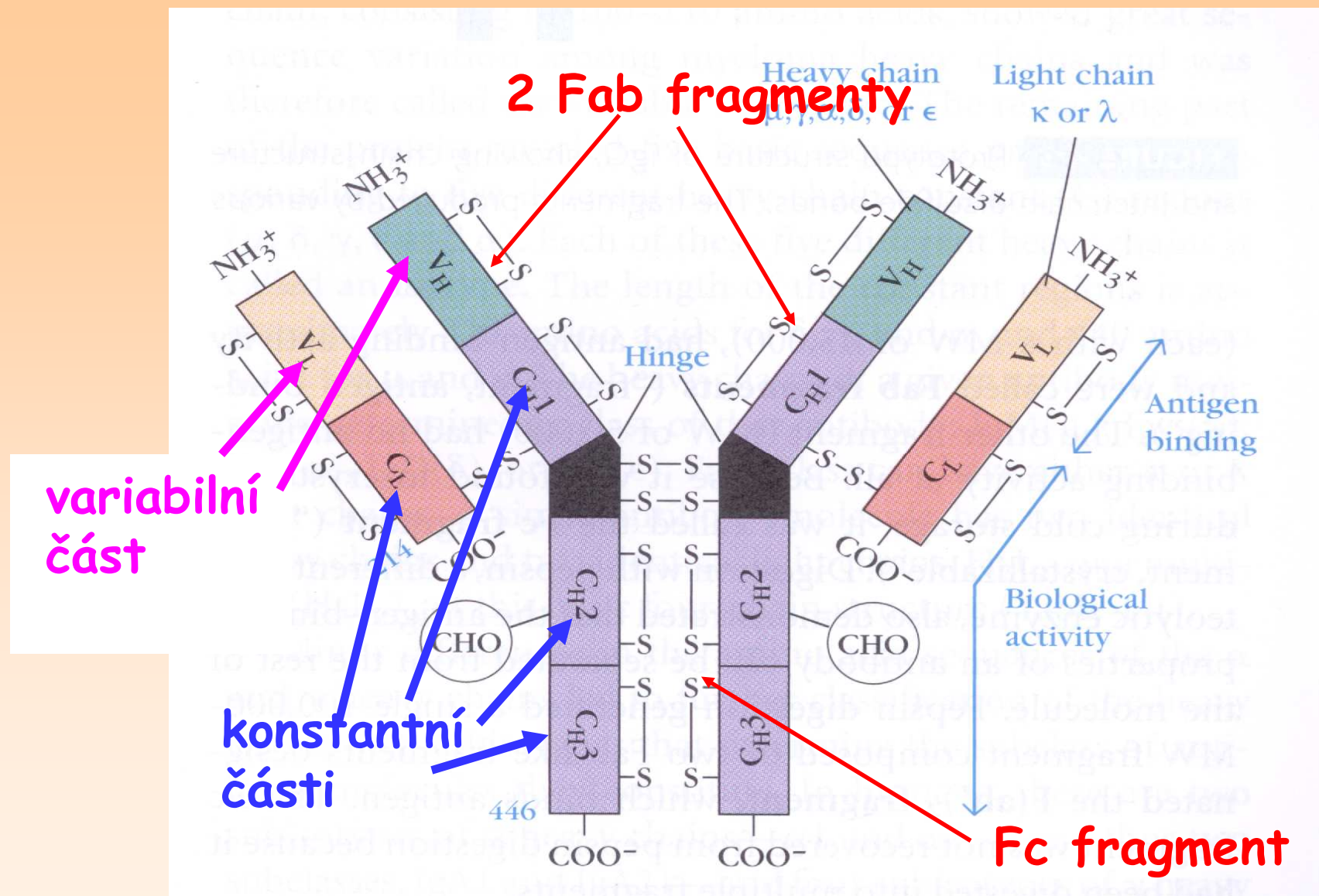
hmotnost 160 kDa

tvořené: 2 lehké řetězce L (25 kDa)

2 těžké řetězce H (50 až 77 kDa)

řetězce spojeny disulfidickými můstky

vzniká typická struktura Y



Protilátky:

2 fragmenty Fab -váží antigen

1 Fc, který umožňuje vazbu protilátky na membránu

Řetězce:

konstantních částí C

variabilní úseky V (V_H a V_L), různá vazebná místa

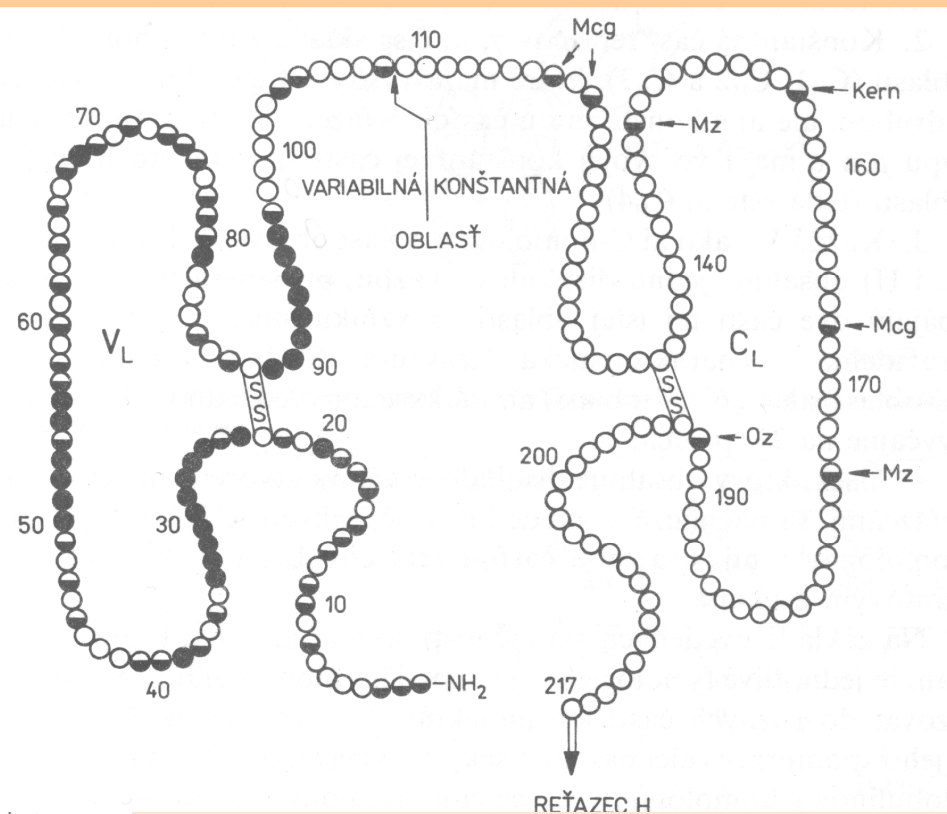
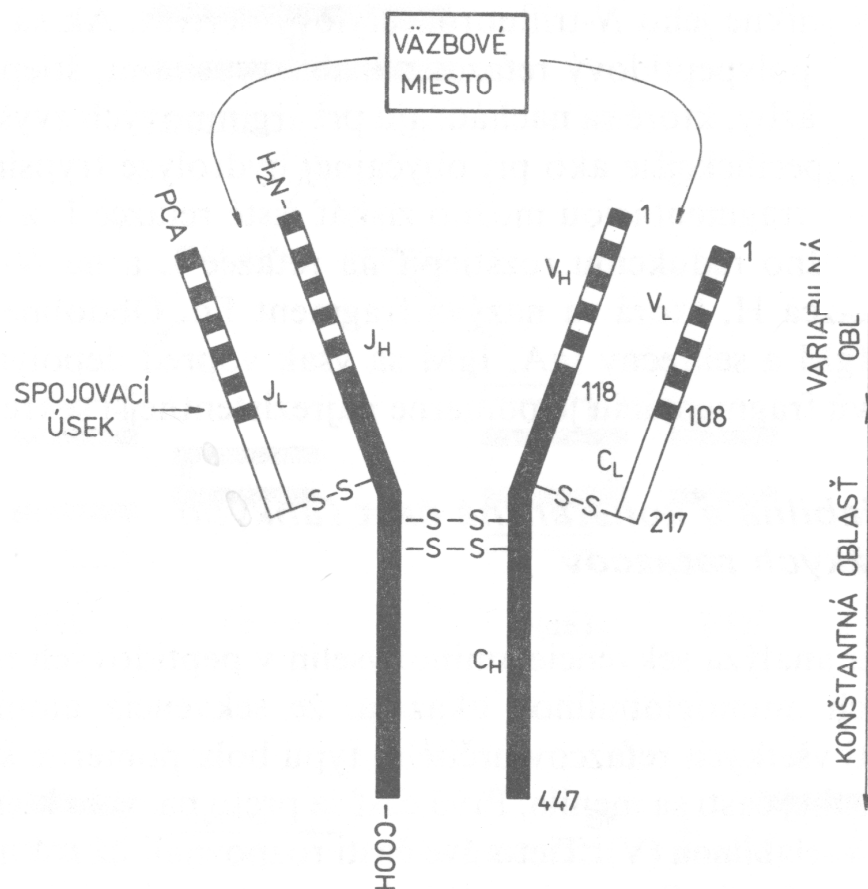
Variabilní část

3 hypervariabilních úseků

CDR (complementary determinant region).

CDR vytváří vlastní vazebné místo pro antigen

Variabilní část



Hypervariabilní úseky

24 až 34

50 až 55

89 až 96

Chemická variabilita

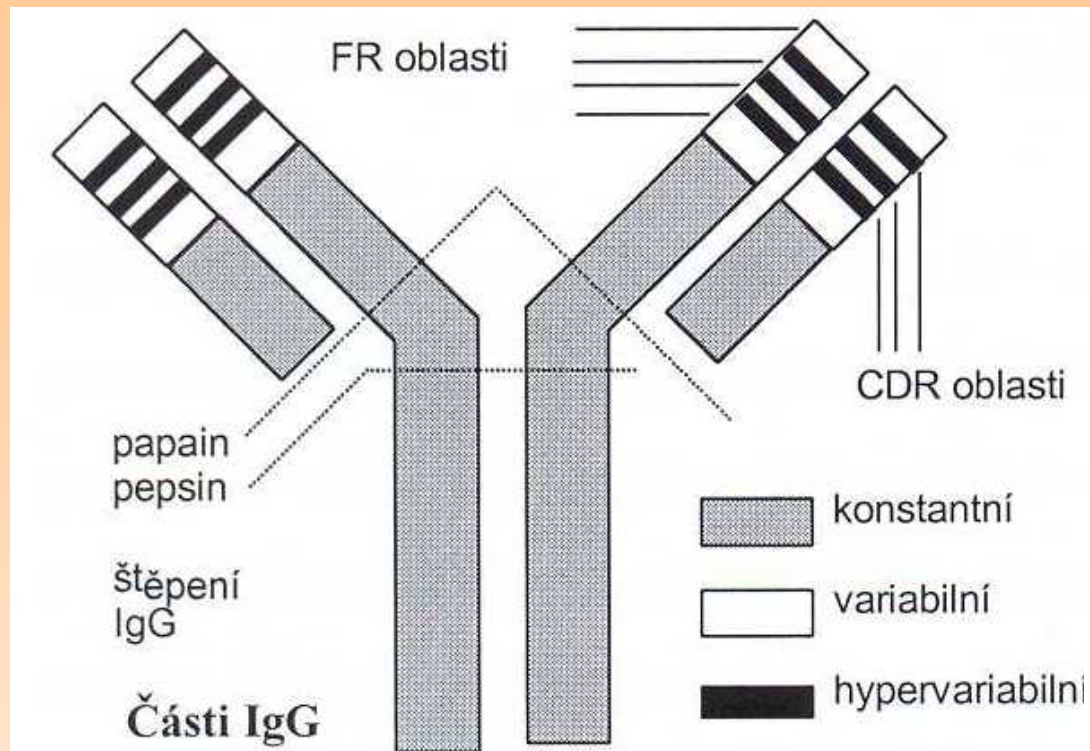
- ✓ výměna jedné AK za druhou- změni vazebné místo
- ✓ variabilní L lidský 65-70 AK
- ✓ jedno místo 2-3 záměna (ne z 20 AK)
- ✓ variabilní část L obsahuje asi 25 hypervariabilních pozic, které jsou spojeny do 3 variabilních úseků:

24 až 34

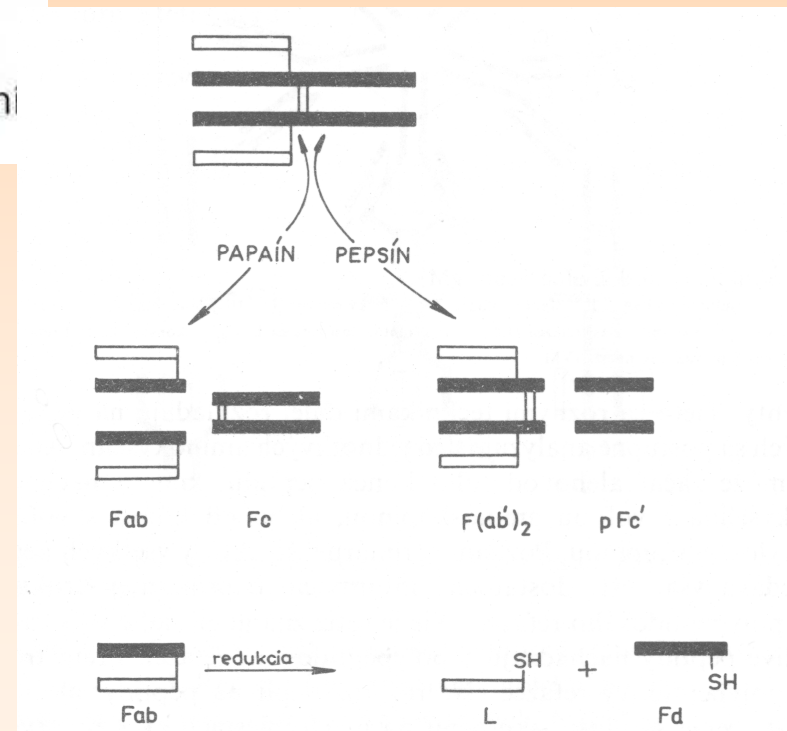
50 až 55

89 až 96

podobně v těžkých řetězcích



Pomocí proteas lze protilátky rozštěpit na fragmenty, což lze využít pro některé aplikace



Vznik protilátek

- ✓ odezva na přítomnost imunogenu (molekula o hmotnosti větší jak 10 kDa, kterou organismus rozpozná jako cizorodou látku)
- ✓ Protilátky produkují B-lymfocyty, které vznikají v kostní dřeni, odtud přecházejí do sleziny a lymfatických uzlin.
- ✓ B-lymfocyty nesou na povrchu nesou receptorovou formu protilátky, po navázání antigenu na tento receptor, daná buňka proliferuje a začne produkovat protilátky o dané specifitě.

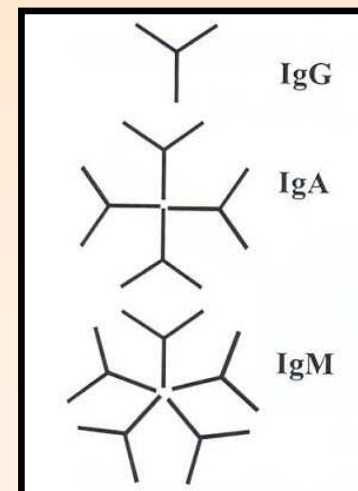
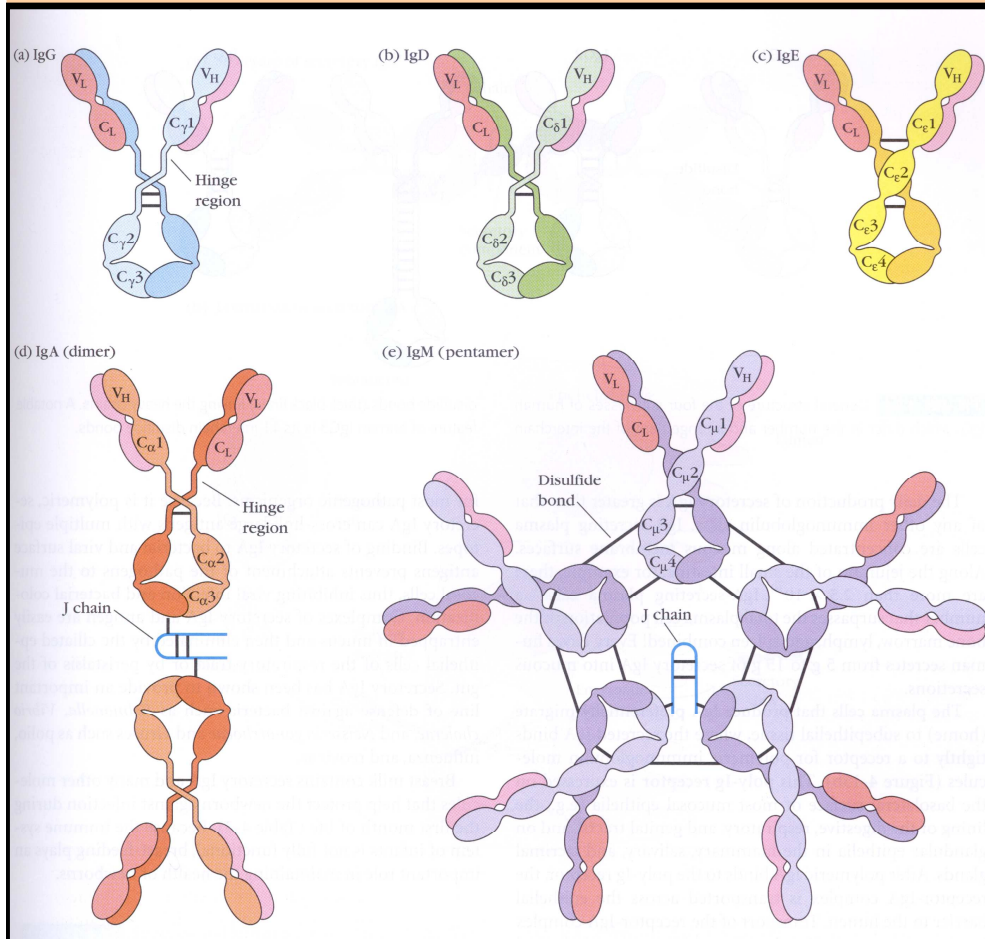
5 tříd protilátek:

(IgA, IgG, IgD, IgE a IgM)
z nich každá má odpovídající
těžký řetězec:

α , γ , δ , ϵ , μ

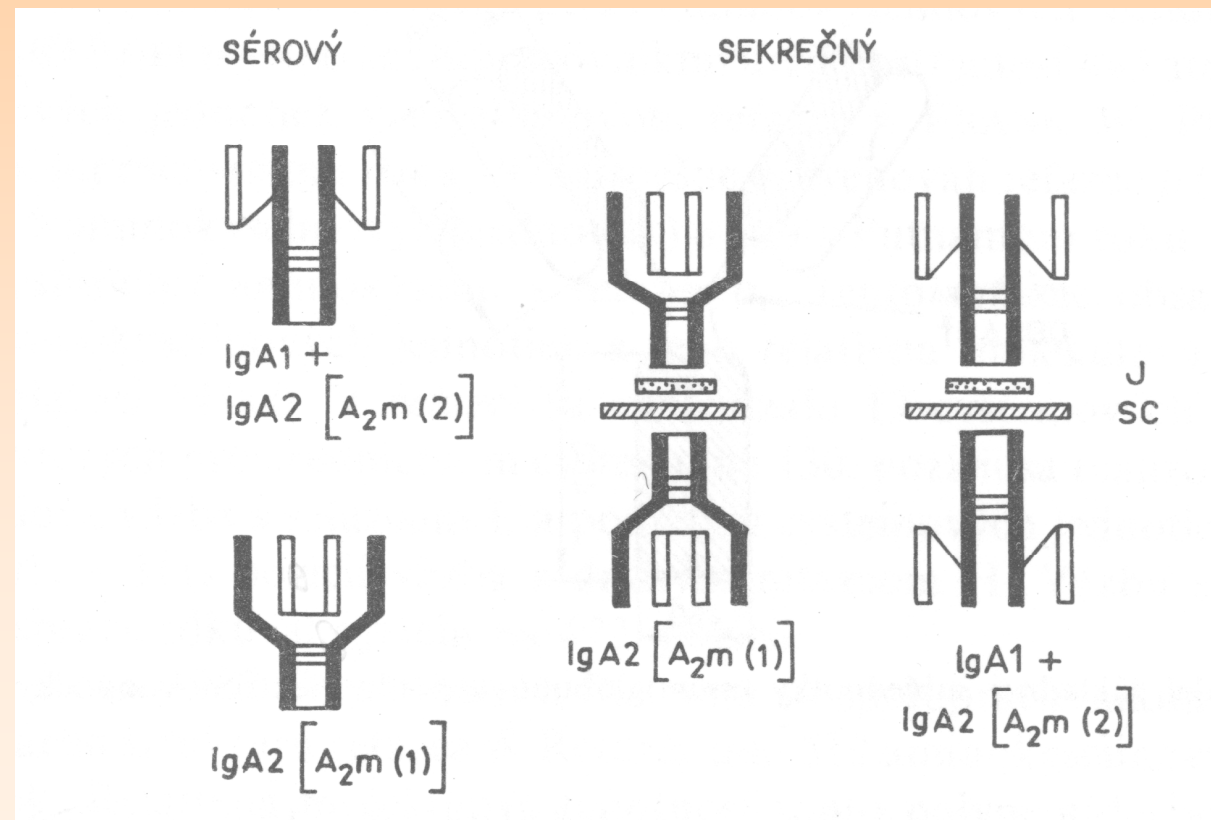
U IgG jsou navíc 4 podtřídy
s částečně odlišnými těžkými
řetězci.

Každá třída protilátek má
určité strukturní a funkční
vlastnosti.



IgA

- ✓ sérový
- ✓ sekreční -dimér
-tetramér



Některé vlastnosti tříd protilátek (myš)

Třída	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
M (kDa)	170	180	190	160	900
H řetězec	α	δ	ϵ	γ	μ
Sacharid (%)	7-11	12-15	12	2-3	9-12

IgG je nejrozšířenější v séru, kde se vyskytuje jako monomer (L_2H_2)

IgM se objevuje jako první odezva na přítomnost antigenu obvykle má malou afinitu. velký počet vazebných míst může vyvolávat aglutinaci

IgD se vyskytuje zřídka, funguje jako buněčný receptor pro antigen

IgA je hlavně v sekretech (sliny, slzy, trávicí šťávy) může přecházet ze séra do žluči

IgE vystupuje v souvislosti s alergickými reakcemi
V bioanalytických aplikacích se používají převážně IgG.

Produkce protilátek

Vniknutí cizorodé látky imunogenu do organismu obvykle vyvolá obranou reakci organismu.

Antigeny:

- ❖ **Makromolekulární látky** (více jak 10 kDa) tvorbu protilátek přímo po vpravení (injekčně) do zvoleného organismu.
- ❖ **Nízkomolekulární látky hapteny** spojení s vhodným makromolekulárním nosičem (BSA, ovalbumin, hemocyanin)

Vzniklé protilátky

schopné rozpoznat i haptenu.

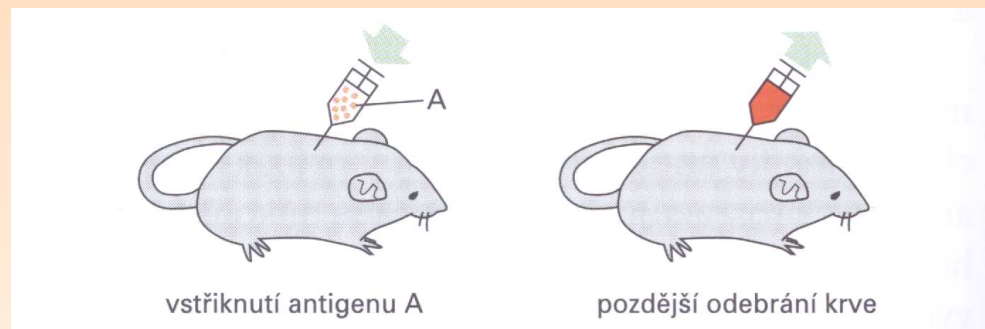
2 typy protilátek

- ☐ polyklonální imunizace experimentálních zvířat
- ☐ monoklonální hybridomová technologie

POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY



Experimentální zvířata (králík, myš, ovce, koza, kůň) se imunizují vhodným analytem. Po několikrát opakované imunizaci a kontrole na přítomnost protilátek se nakonec provede odběr krve.



Získané antiserum se uchovává zmražené (1000x i více) zředěné. Neprovádí se purifikace protilátek. Z chemického hlediska obsahuje polyklonální protilátka řadu imunoglobulinů typu G, které se navzájem liší afinitou.

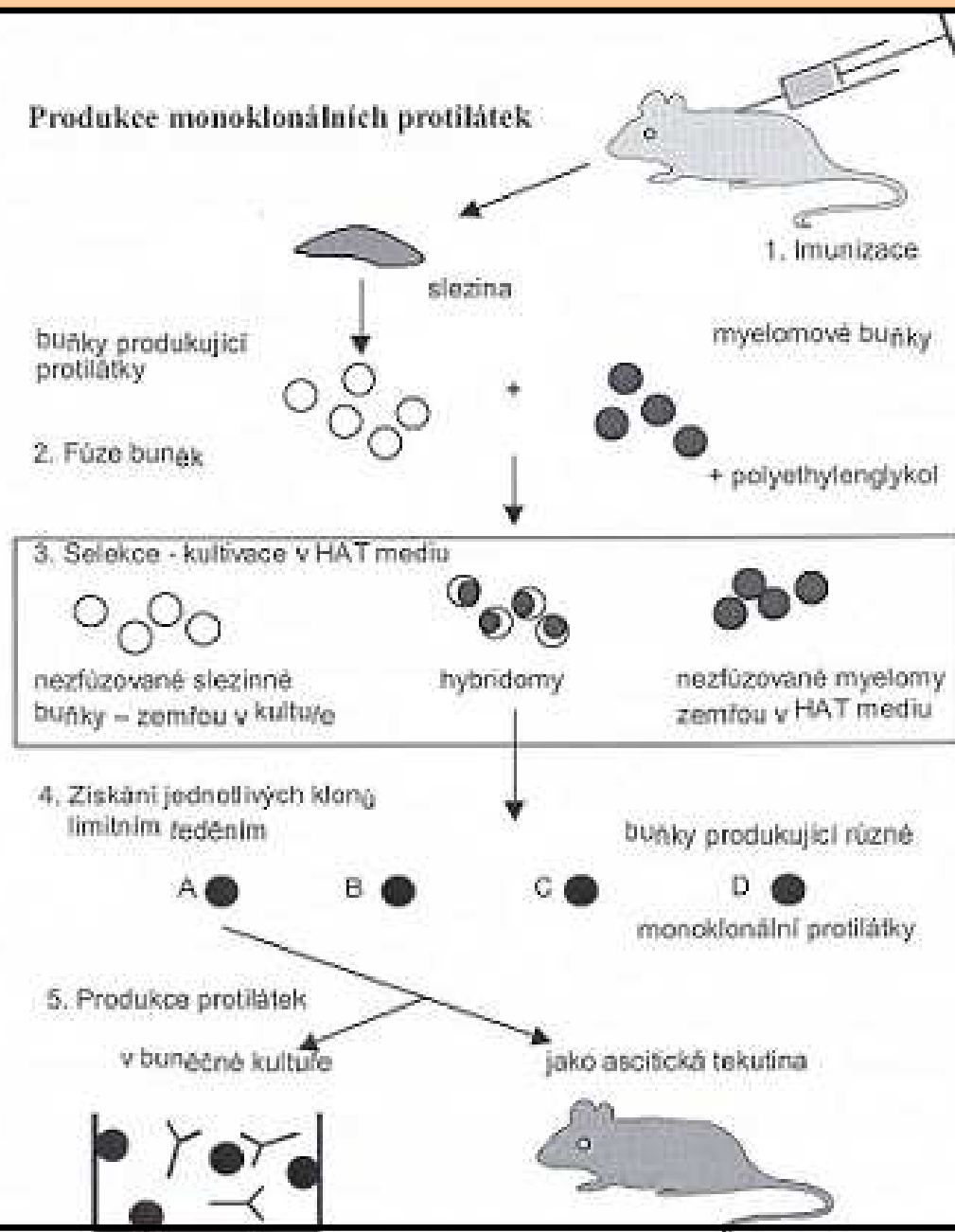
Monoklonální protilátky

- ✓ přesně definované vlastnosti
- ✓ produkce: hydridomová technologie
- ✓ homogenní protilátky o vysoké specifitě ve velkém množství

Příprava monoklonálních protilátek:

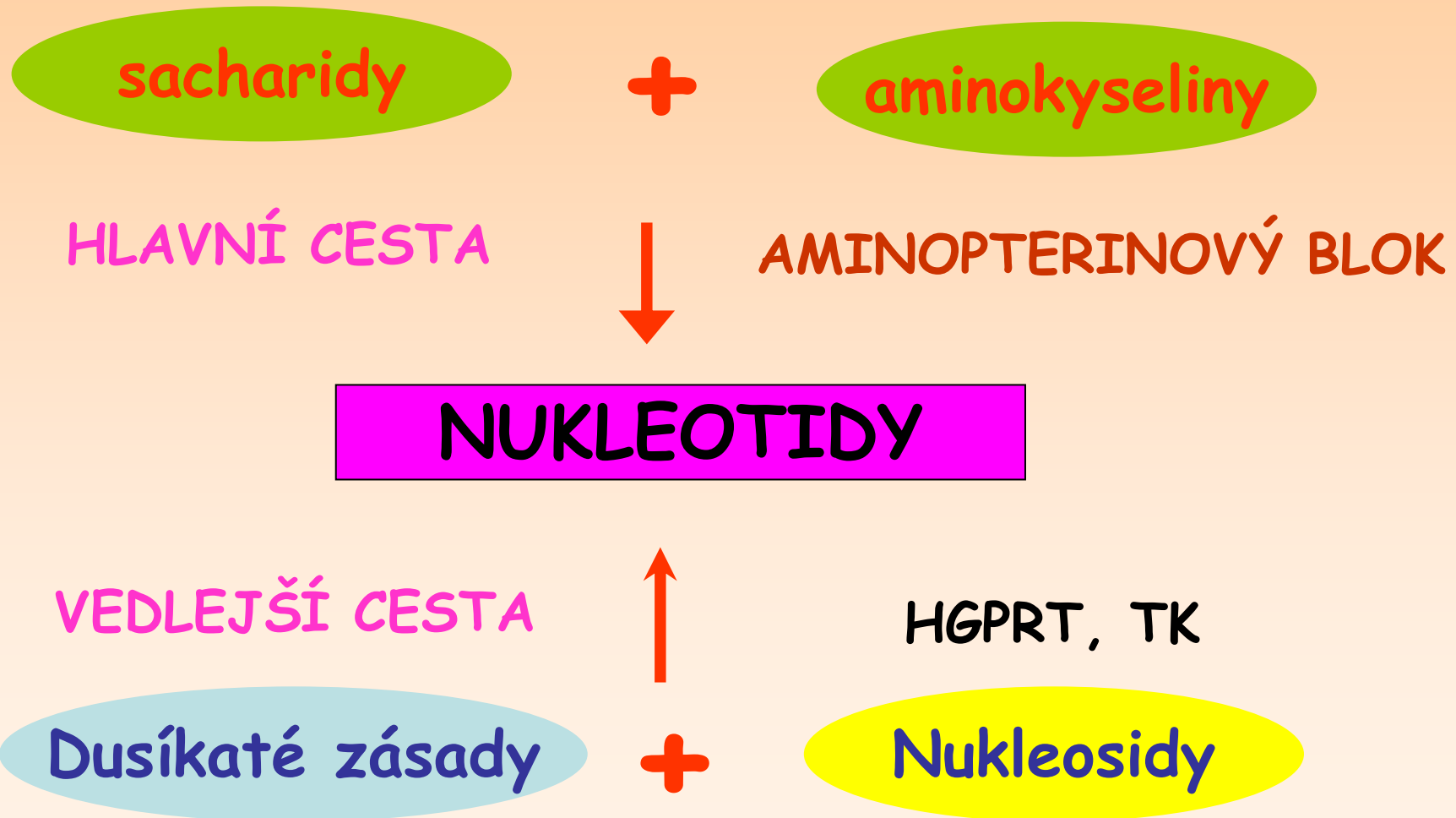
- ✓ imunizace myší, ze sleziny se získají B lymfocyty
- ✓ B lymfocyty se fúzí s rakovinnými (myelomovými) buňkami v přítomnosti PEG (polyethylenglykol)
- ✓ hybridomové buňky se selektivní kultivací zbaví nefuzovaných buněk v HAT mediu (hypoxanthin, aminopterin thymidin)
- ✓ hybridomová kultura se naředí a hledají se vzniklé protilátky pomocí ELISA metody
- ✓ vhodné linie, které produkují požadované protilátky opět naředit až na hranici 1 buňka na jamku a celý proces se opakuje

Produkce monoklonálních protilátek



Buňky syntetizují nukleotidy dvojím způsobem:

- ✓ hlavní cesta (de novo)
- ✓ vedlejší cesta (hotové purinové báze a nukleosidy)



HGPRT= hypoxantin(guanin)-fosforibozyltransferasa; TK=thymidinkinasa

Dusíkaté zásady

Nukleosidy

Nukleotid

hypoxantin

HGPRT

Inosin-5' -fosfát

5' -fosforibozyl-
1 -pyrofosfát

guanin

Guanosin-5' -fosfát

VEDLEJŠÍ CESTA

thymin

TK

5' -fosforibozyl-
1 -pyrofosfát

Thymidin-5' -fosfát

HGPRT= hypoxantin(guanin)-fosforibozyltransferasa; TK=thymidinkinasa

Zamezení syntézy nukleotidů vedlejší cestou:

- ✓ kultivace myelomových buněk s **8-azaguaninem** (analog guaninu),
v buňkách s funkční HGPRT se zabudovává do DNA (čímž se zničí genetická informace)
V přítomnosti 8-azaguaninu přežívají jen mutanty deficitní na HGPRT.
- ✓ kultivací s analogem thyminu **5-brómdeoxyuridinem**
myelomové linie deficitní na TK.

Zamezení syntézy nukleotidů hlavní cestou:

- ✓ Při normálních kultivačních podmínkách se syntetizují nukleotidy hlavním způsobem a nepřítomnost enzymů nevadí.
- ✓ buňka s deficitem HGPRT nebo TK kultivuje přítomnosti **aminopterinu** (inhibitor hlavního způsobu) nastane její smrt. Přežít může jen když se spojí s buňkou, která kompenzuje enzymový deficit.

HLAVNÍ CESTA

Hybridomovou technologií se nakonec získá jednotná buněčná kultura produkující monoklonální protilátky (mAb)

Dva způsoby výroby mAb:

- ✓ aplikace do experimentálního zvířete
ascitická tekutina - produkce 5 až 15 mg/ml
- ✓ v bioreaktorech - produkce 5 až 50 µg/ml

Nepřímé imunochemické metody

- ✓ použití vhodného značkového systému
- ✓ heterogenní průběh
- ✓ imunokomplex je zachycen na vhodném povrchu (mikrotitrační destička, citlivá oblast převodníku),
- ✓ po reakci se odstraní reakční směs
- ✓ povrch se promyje
- ✓ změří se množství zachycené značky

Použité značky:

- ✓ radiaktivita (u biosensorů se nepoužívá)
- ✓ fluorescence
- ✓ luminiscence
- ✓ enzymová značka

Výchozí metoda: ELISA

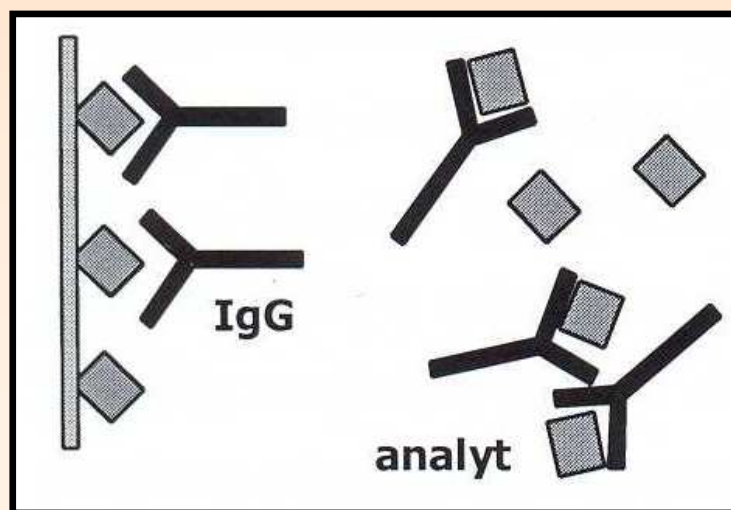
Výchozí metoda při vývoji nepřímého imunosensoru

ELISA:

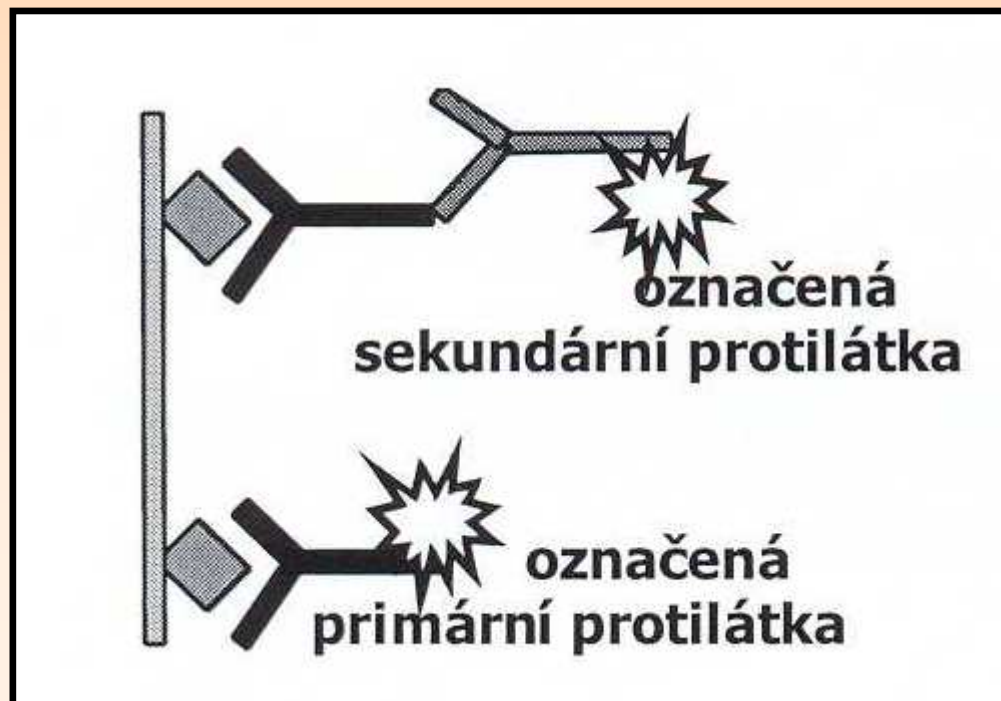
- ✓ kompetitivní uspořádání
- ✓ sendvičové uspořádání

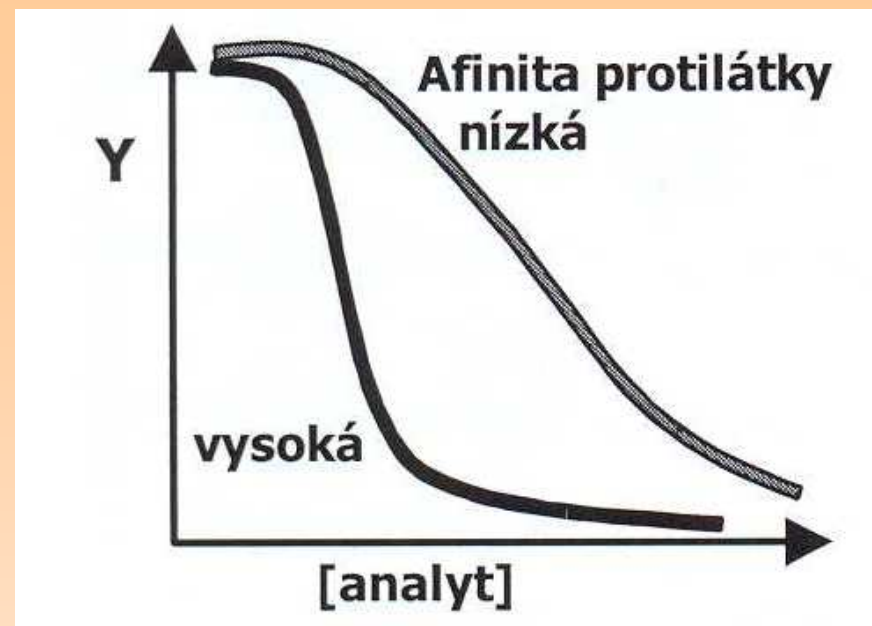
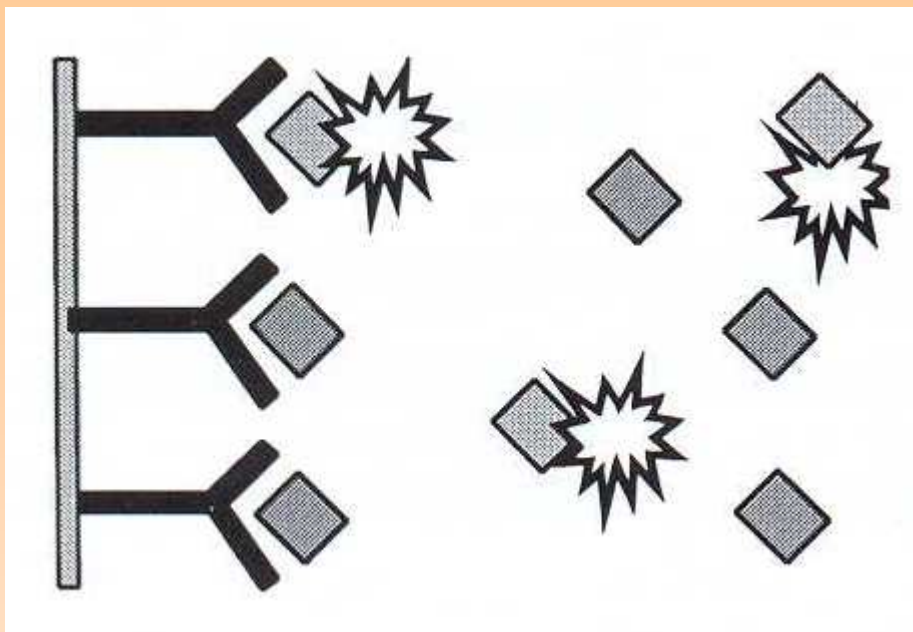
Kompetitivní uspořádání

- ✓ na citlivý povrch je imobilizován analyt
- ✓ vzorek smíchá s protilátkou a nechá se určitou dobu inkubovat
- ✓ směs se přidá k sensoru a zbylé protilátky se váží na modifikovaný povrch
- ✓ volný a vázaný analyt soutěží o limitované množství protilátky
- ✓ na konci reakce se povrch opláchne



- ✓ Zachycená protilátka primární se detekuje přidavkem sekundární vhodně označené protilátky.
- ✓ Sekundární protilátka má specifitu k té části primární protilátky, která neváže analyt (např. Fc část)
- ✓ lze používat vhodně označenou primární protilátku





Ize také:

- ✓ na povrch sensoru lze navázat protilátku.
- ✓ inkubace provádí se vzorkem obsahujícím analyt a navíc se přidá analyt spojený s vhodnou značkou.

Tracer: konjugátu značky s jedním z vazebných partnerů

Kalibrační křivka: závislost signálu Y na koncentraci analytu má sigmoidní tvar.

Strmost je tím větší, čím vyšší je afinita protilátky

Vyhodnocení:

- $Y_{\max}$ maximální signál (největší množství zachycené značky)
v nepřítomnosti volného analytu
- Y_0 nulový signál (žádná značka se nezachytí)
při nadbytku analytu
Ize měřit pokud při imunochemické reakci nepřidáme
tracer

Místo absolutního signálu je vhodnější použít
relativní vyjádření:

$$B_{\text{rel}} = (Y - Y_0) / (Y_{\max} - Y_0)$$

tím lze kompenzovat nespecifickou vazbu traceru nebo
zbytkový signál naměřený v nepřítomnosti značky

Značení: biomolekul pomocí enzymů nebo fluorescenční
značky

Limit detekce: je definován pomocí minimálního poklesu signálu proti maximu např. o 10% nebo 20% (tomu odpovídá B_{rel} 0,9 nebo 0,8)

Koncentrace analytu x_{50} , která způsobí pokles signálu na polovinu maximální hodnoty ($B_{rel} = 0,5$)

Tento parametr je přímo úměrný afinitě použité protilátky (čím menší afinita, tím menší x_{50})

Průběh kalibrační závislosti se dá aproximovat např. sigmoidní funkcí.

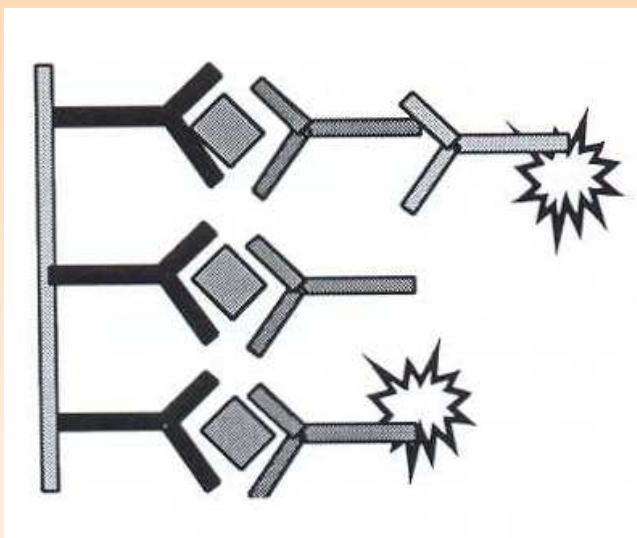
$$Y = \frac{A - D}{1 + (x / x_{50})^b} + D$$

A je maximální,
D zbytkový signál.

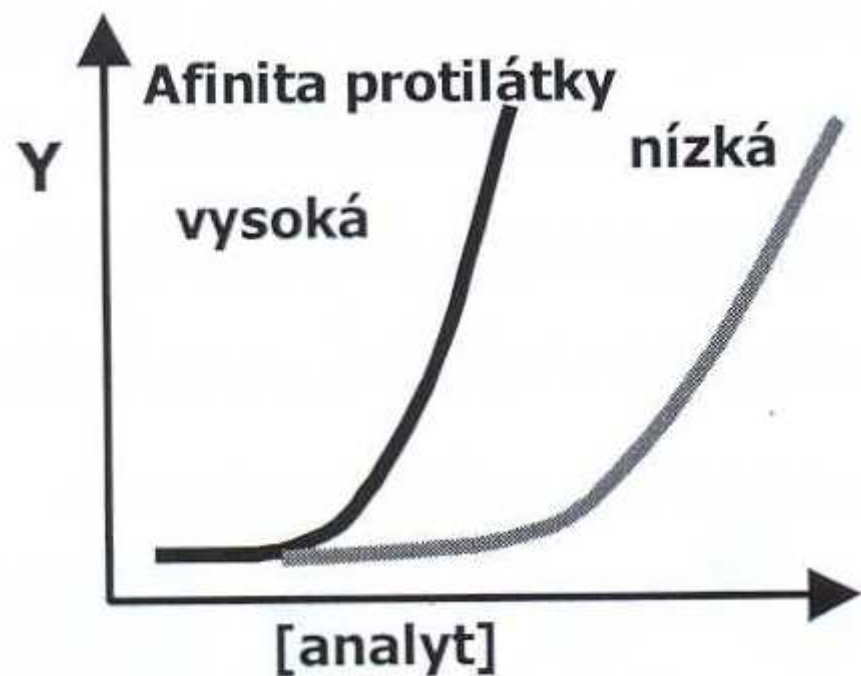
Křížová reaktivita analytu A a jemu podobné látky B
= relativní poměr x_{A50}/x_{B50} (může se uvádět v %).

Sendvičové uspořádání

pro rozměrnější analyty, které v molekule nesou několik vazebných míst pro protilátku. Při inkubaci se vzorkem protilátka váže přítomný analyt.



Poté se povrch opláchne a přidá se další protilátka, která rozpoznává jiné vazebné místo na povrchu analytu. Může být vhodně značená nebo se detekce provede pomocí třetí označené protilátky. Množství navázané značky je přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku.



Průběh kalibračních křivek při sendvičovém stanovení je závislý na afinitě protilátek.
Afinita hraje menší roli, jak při kompetitivním stanovení.

Nepřímé imunosenzory

Imunochemická stanovení v klinické biochemii jsou většinou na principu ELISA.

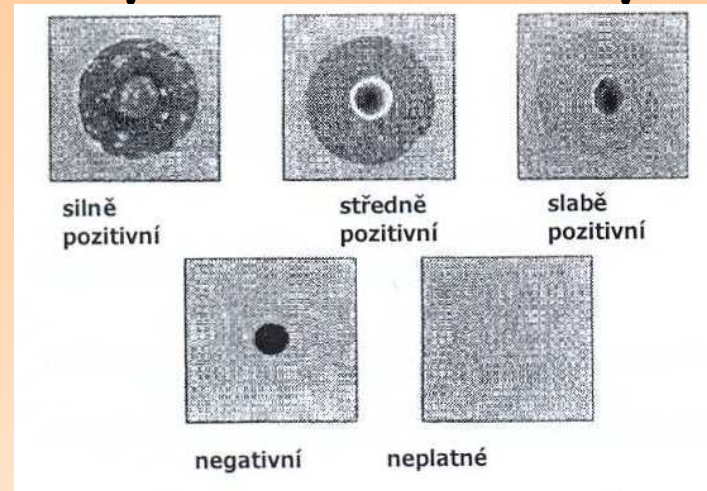
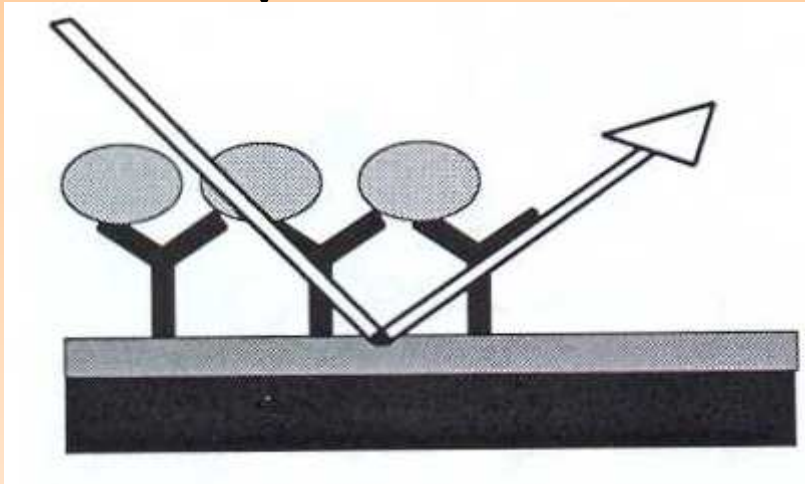
Nevýhody ELISA:

- ✓ je třeba přesné dávkování vzorků a reagentů
- ✓ inkubace časově náročná
- ✓ separační a promývací kroky (čas)

Proto je zde snaha vytvářet přenosné systémy, které nejsou náročné na čas.

Páskové varianty imunochemického stanovení s vizuálním vyhodnocováním.

Předstupeň mezi ELISA a nepřímými imunosensory



Změna tloušťky vrstvy způsobená specifickým navázáním analytu se při vyhodnocování projeví jako **změna pozorované barvy**.

Semikvantitativního imunostanovení na křemíkovém čipu. Barva a tvar pozorovaných skvrn umožňují kvantitativní vyhodnocení přítomnosti analytu ve vzorku. Výhodou je rychlost: nakápnutí a během několika minut lze pozorovat odezvu.

Elektrochemické imunosensory

Jednoduché
levné
velmi citlivé



elektrochemický
převodník

+

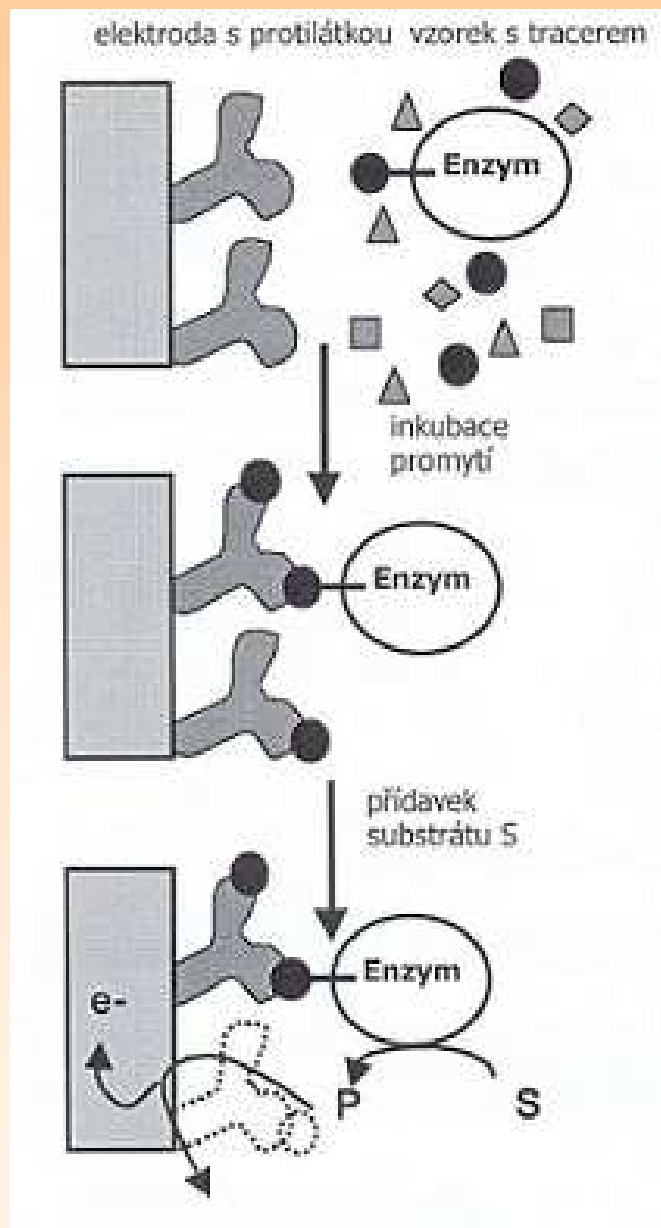
vysoká specifita
protilátek

Pracovní povrch:

pracovní elektroda
výměnná membrána s protilátkou
předřazený imunoreaktor

Značky:

enzymy aktivita měřena elektrochemicky
redoxaktivní látky (voltametricky)
cheláty kovů (voltametricky)



Heterogenní stanovení:

elektroda je modifikována protilátkou váže tracer při kompetitivním stanovení, zachycená enzymová aktivita se pak stanoví po přidavku substrátu:

- amperometricky (změna proudu)
- potenciometricky (změna potenciálu)

Amperometrické stanovení

je vhodné ve spojení s těmito:

enzymy

peroxidasa

lakasa

katalasa

glukosaoxidas

alkalická fosfatasa

galaktosaoxidas

acetylcholinesterasa

a

substráty

H_2O_2 + jodid, ferrocen
nebo hydrochinon

O_2 + hydrochinon
(H_2O_2)

O_2 nebo ferrocen+glukosa

p-aminofenylfosfát

p-aminofenyl- β -D-galaktosid

acetylthiocholin

Potenciometrické stanovení

enzym

ureasa

substrát

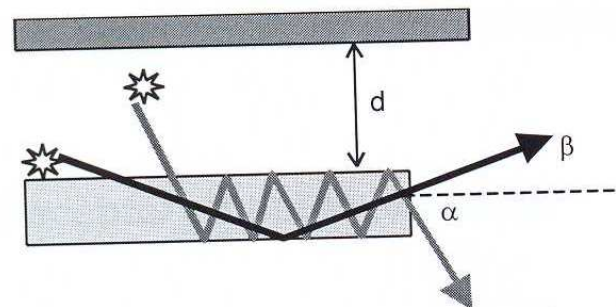
močovina

Nepřímé optické sensory

- ✓ optická vlákna
- ✓ planární světlovody

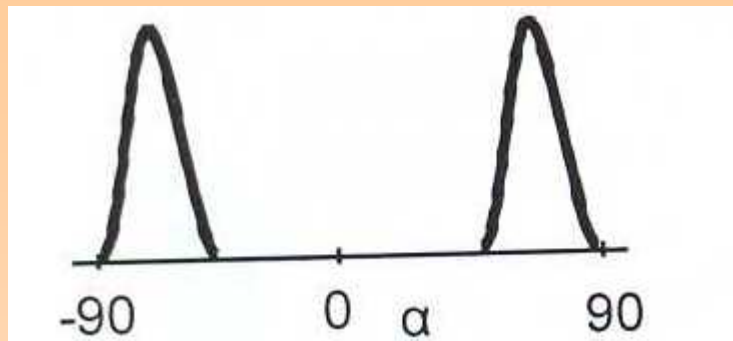
příklad komerčního systému FCFD
(fluorescence capillary fill device)

Komerčního systému FCFD (fluorescence capillary fill device)

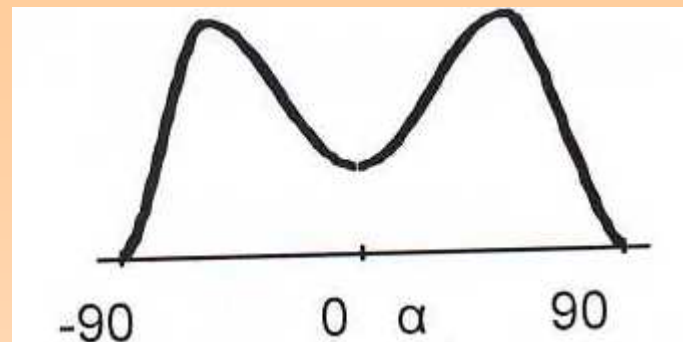


- ✓ dvě paralelní skleněné destičky s pracovním prostorem o tloušťce $d = 0,1 \text{ mm}$ (naplnit vzorkem)
- ✓ povrch světlovodu imobilizována protilátka
- ✓ bioligand značen fluroforem
- ✓ část fluoroforu v komplexu s bioligandem na povrchu světlovodu, část v roztoku
- ✓ emitované světlo (fluorescence) z roztoku vstupuje do světlovodu jen pod omezenými úhly (větší než kritické)
- ✓ světlo s vázaných fluoroforů může vstupovat i pod menšími úhly.
- ✓ po výstupu světla z konce světlovodu lze pak podle výstupního úhlu odlišit fluorescenci z roztoku a z povrchu = kvantitativně stanovit množství vázaného fluoroforu (bez separace) –homogenní stanovení

Úhly paprsků na výstupu ze světlovodu

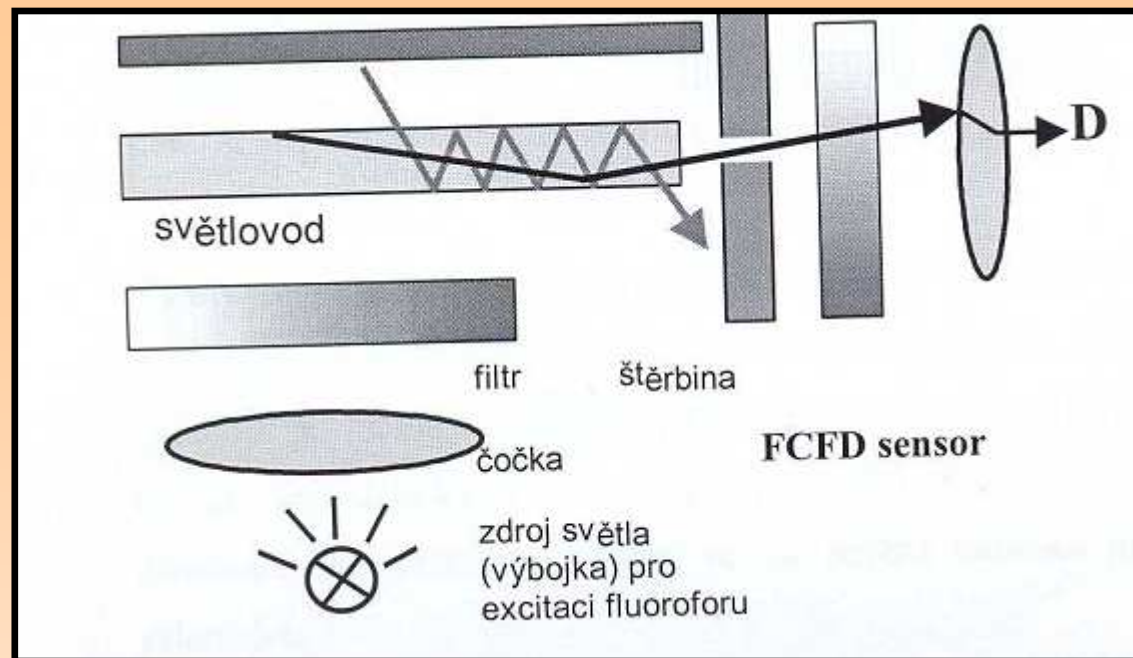


fluorofory volné v roztoku



fluorofory vázané
na povrchu světlovodu

Výstupní úhly světla emitovaného vázaným a volným fluoroforem se liší, takže lze odlišit vázanou a volnou formu fluoroforu a vyhodnotit průběh homogenního stanovení



Zdroj světla: výbojka fotoblesku

Omezení výstupních úhlů: štěrbina

Další součásti: filtry, čočky, detektor

Zařízení je levné, snadná masová výroba na jedno použití.

Malé vzdálenosti v systému sensoru zkracují odezvy, kterou určuje pouze kinetika vazebné interakce.

Není třeba odměřovat vzorek (krev, moč - přímo)

Nejsou velké nároky na manipulaci a odbornost obsluhujícího personálu.