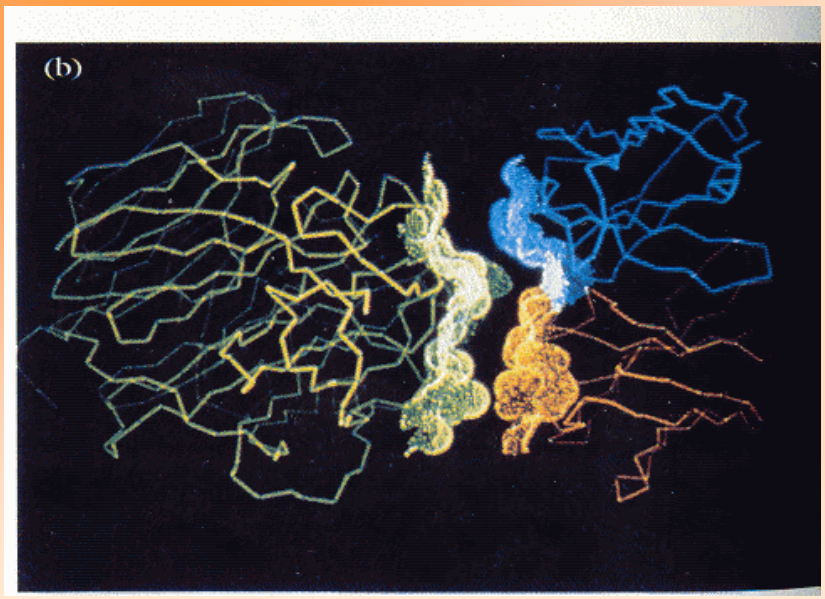
IMUNOANALÝZA
V KLINICKÉ BIOCHEMII

BIOSENSORY
V KLINICKÉ BIOCHEMIE

Vazba antigen – protilátka

- cizorodé látky (toxické, léky)
- látky tělu vlastní
- infekční látky
- specifické protilátky

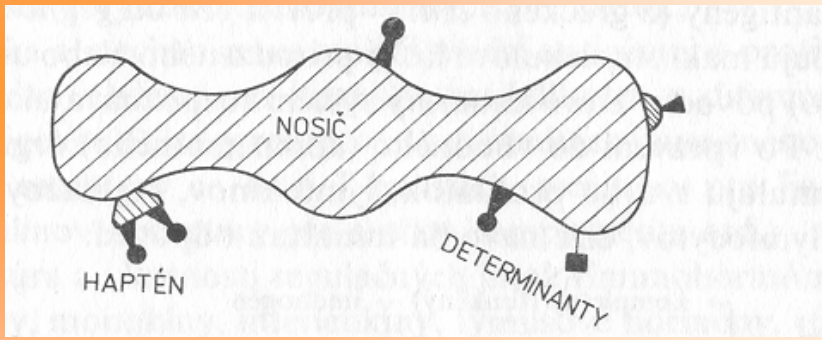


Antigeny

- přirozený
- umělý
- kompletní - imunogen
- nekompletní – haptén

Imunogen

- imunogennost
- specifičnost

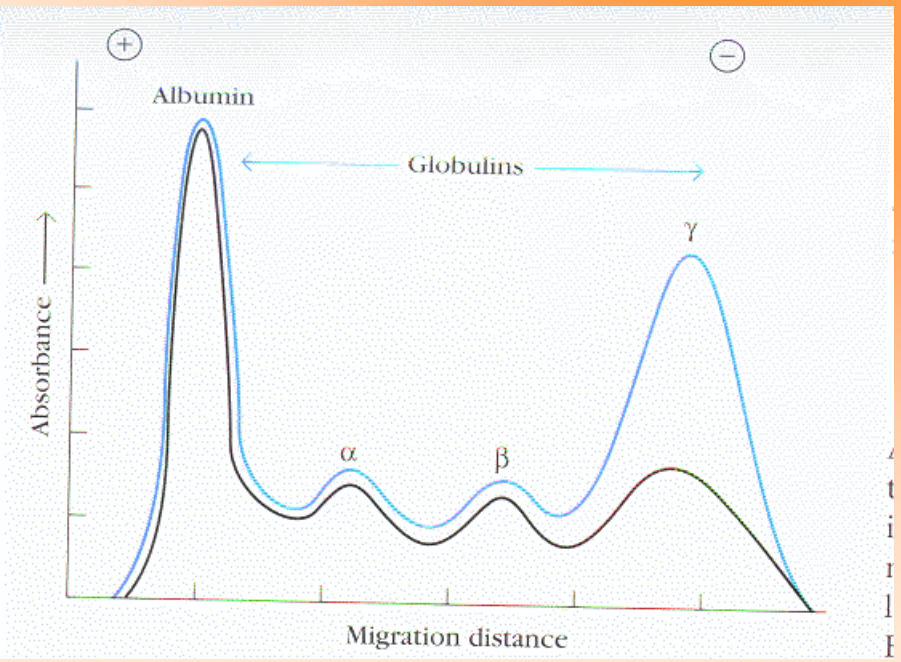


Složení imunogenu:

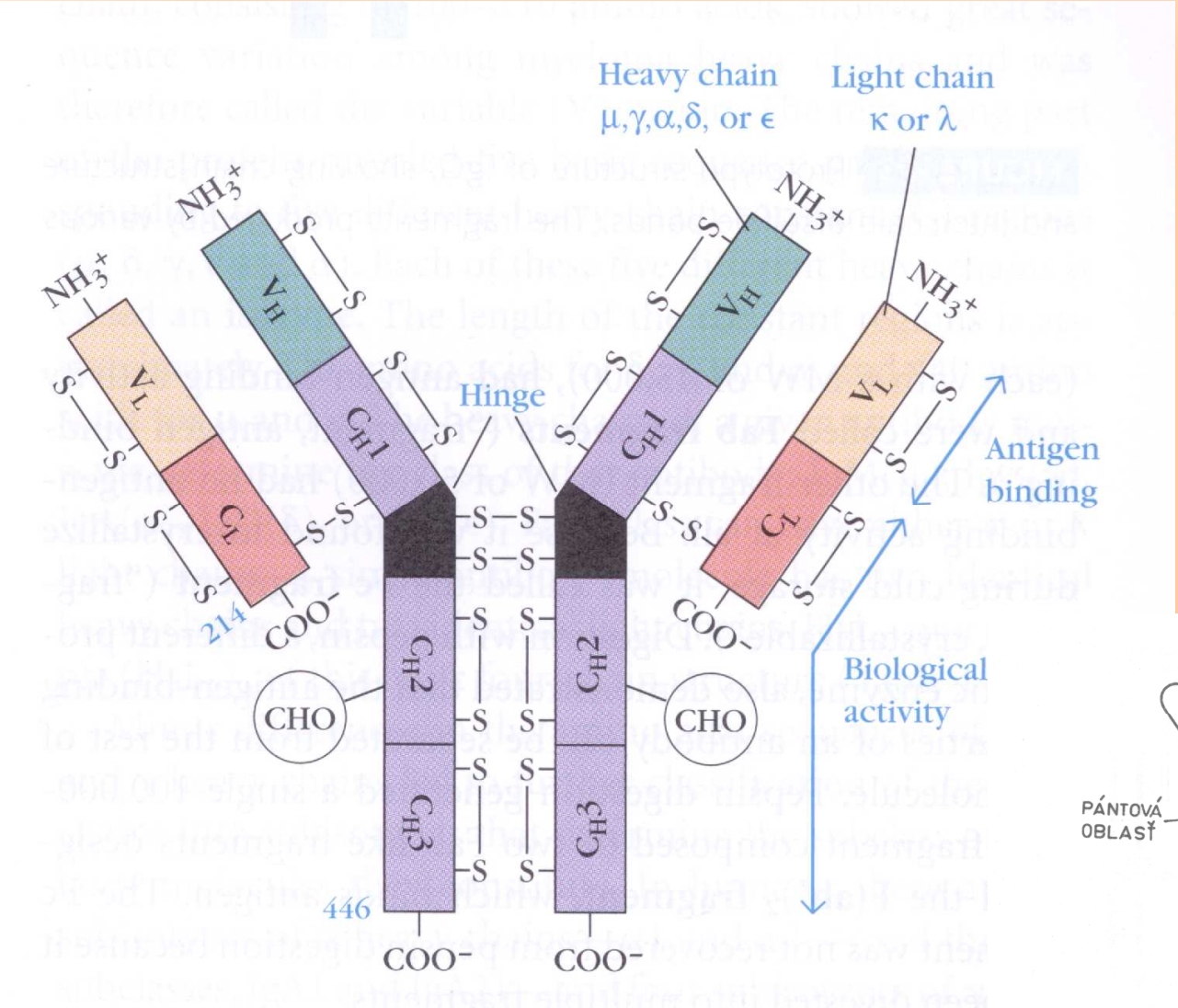
- makromolekulární nosič
- nízkomolekulární determinatní skupiny epitofy

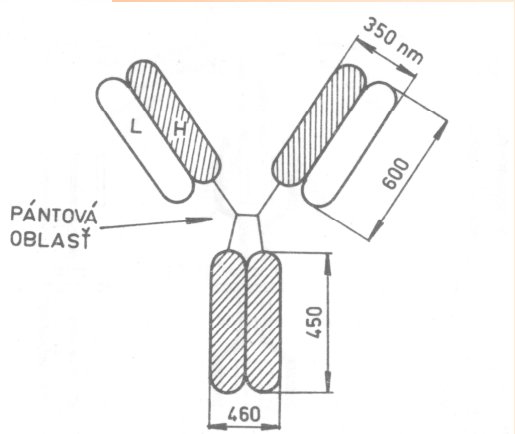
Protilátky

Proteiny živočišného původu
protilátková aktivita
antigenová specifita



Struktura protilátek

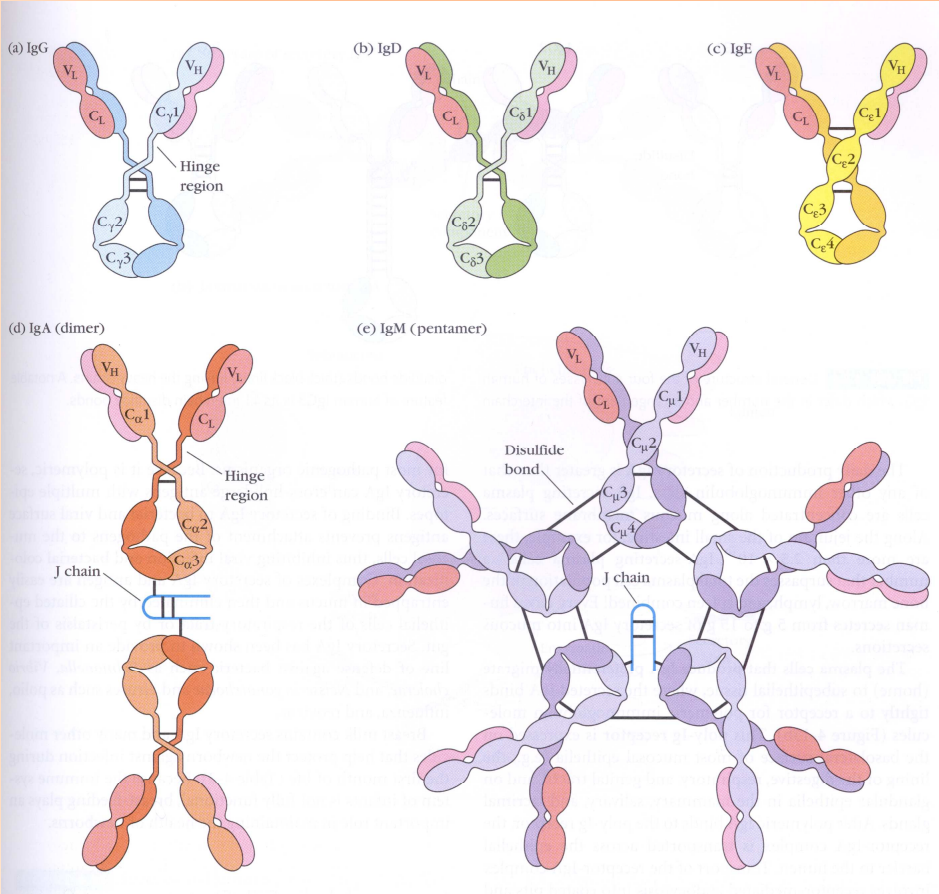




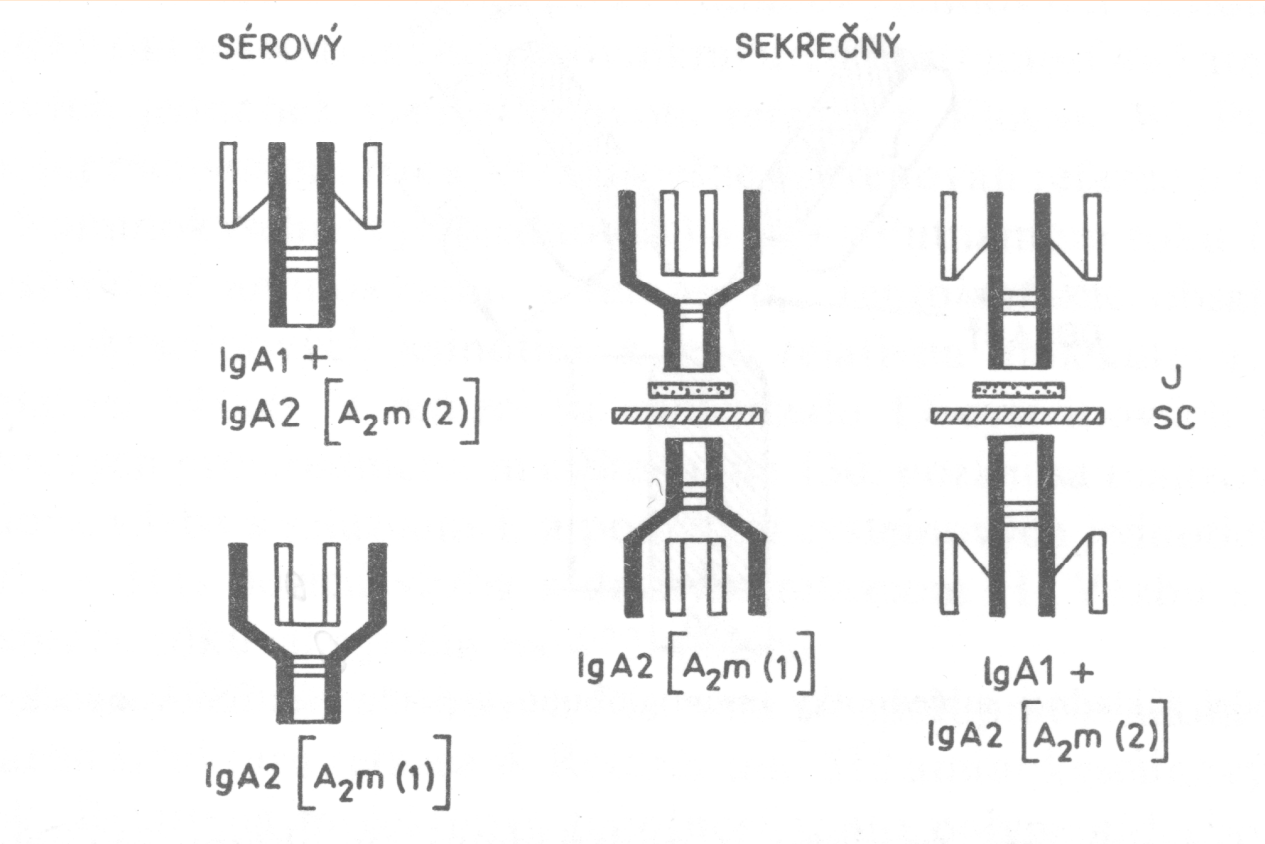
2 druhy polypeptidových řetězců:

lehké L (κ a λ)

těžké H (γ, μ, δ, α, ε) IgG, IgM,IgD, IgA, IgE

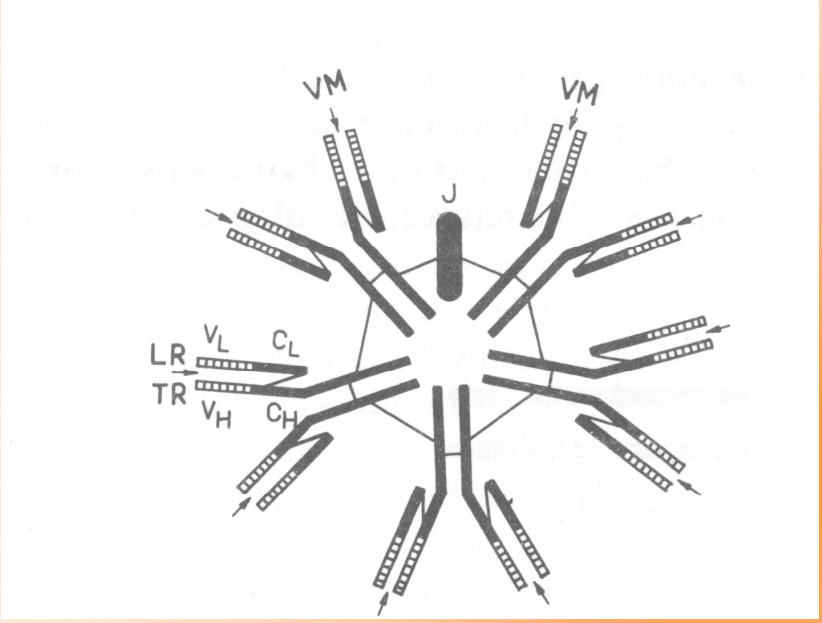


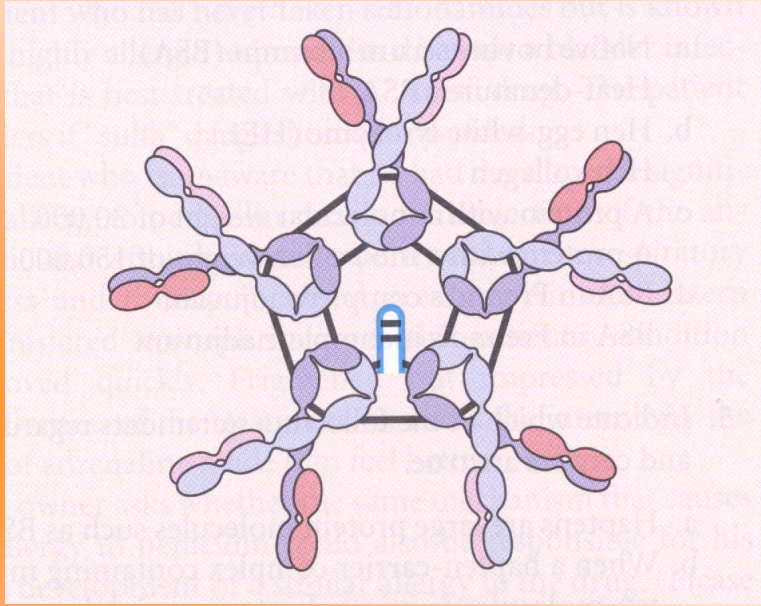
IgA



J - spojovací řetězec
SC - sekreční komponenta

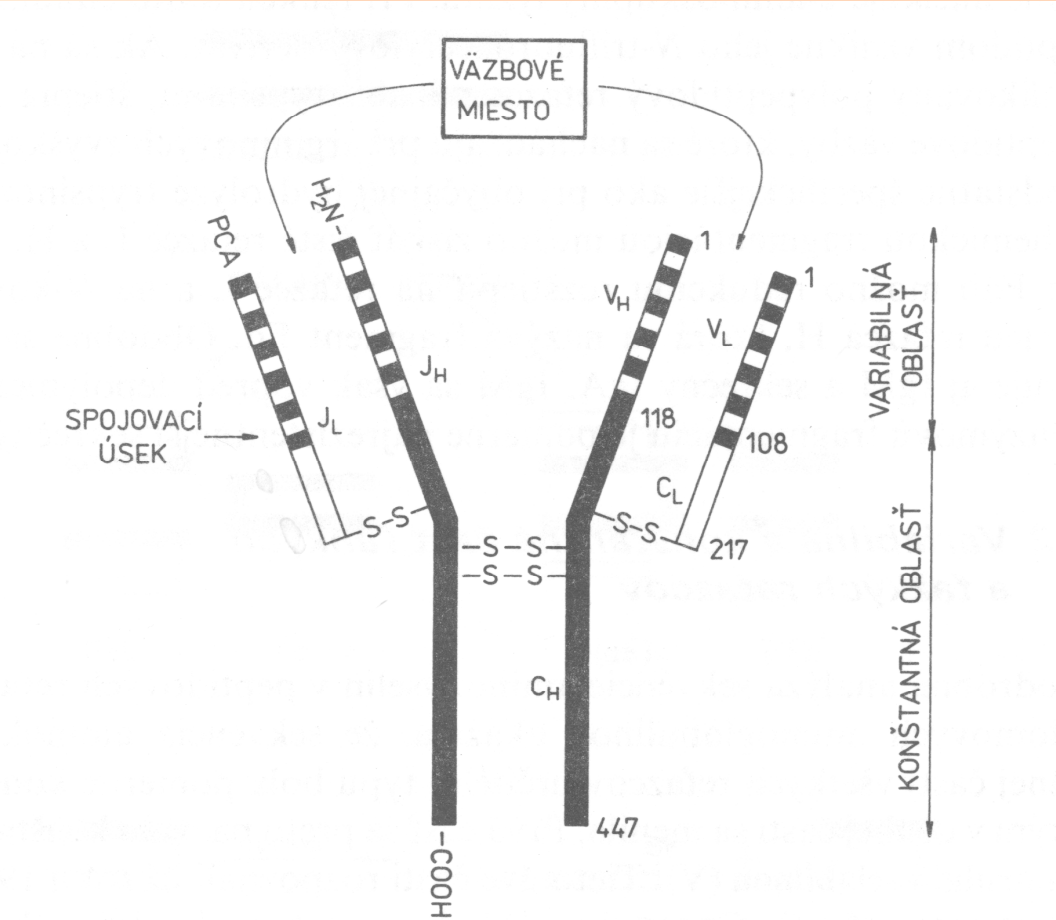
IgM

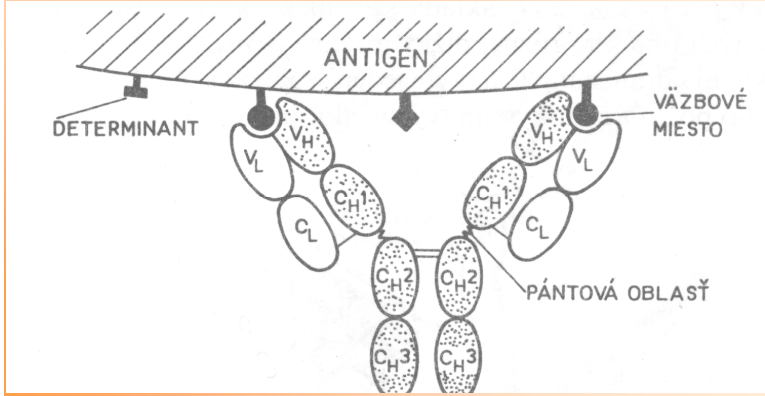


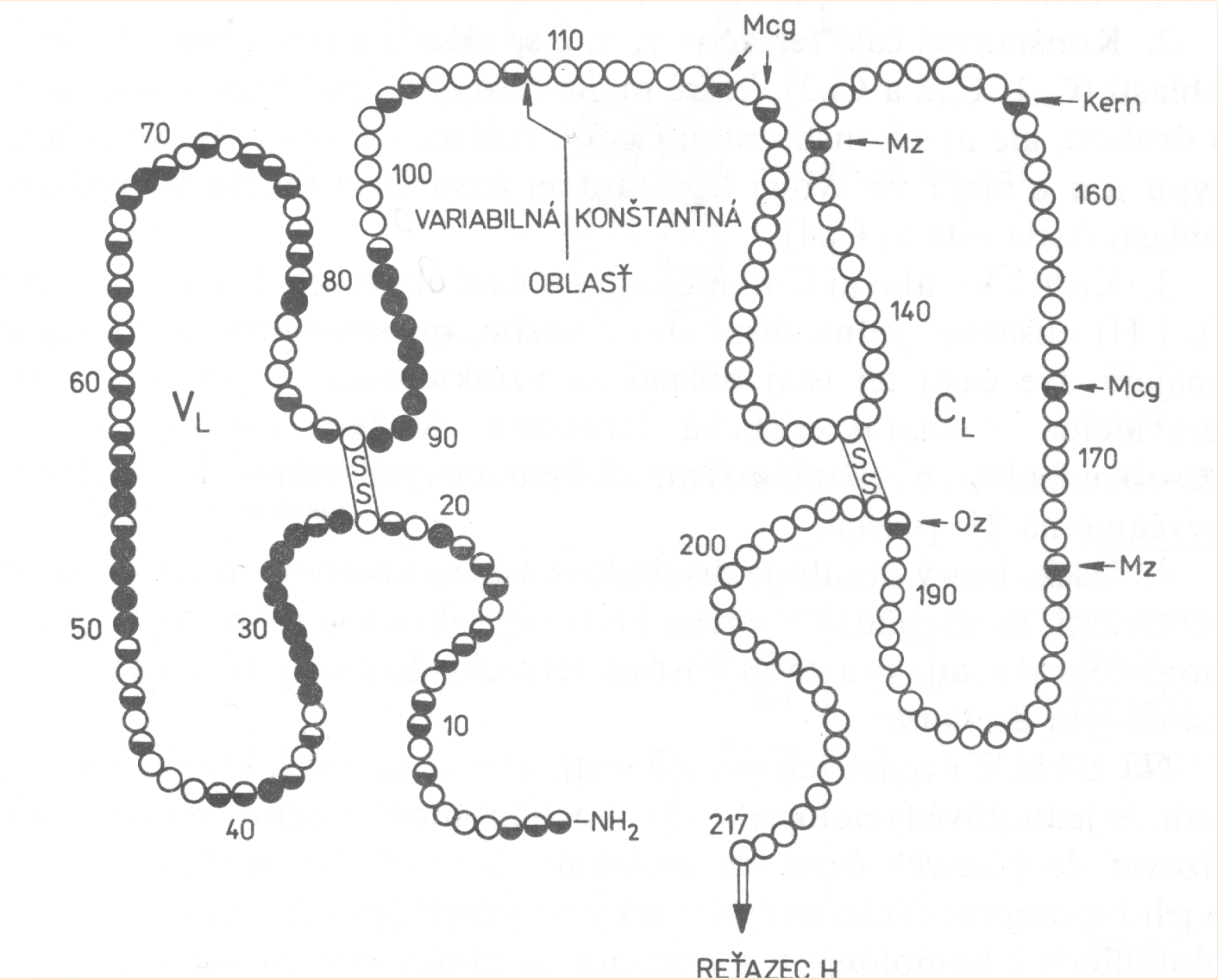


10 H, 10 L, J

Vazebné místo protilátek






110
Mcg
Kern
70
Mz
100
160
VARIABILNÁ
KONŠTANTNÁ
OBLASŤ
80
140
60
Mcg
V_L
C_L
90
170
S
S
S
S
20
Oz
200
Mz
190
50
30
10
40
$-NH_2$
217
REŤAZEC H

Afinita

Síla vazby (vazebné místo Ig – antigenový deter)

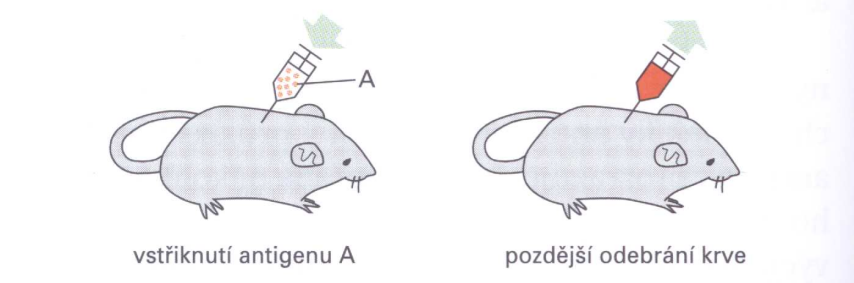
Avidita

Síla vazby mezi antigenem a protilátkou

Počet vazebných míst

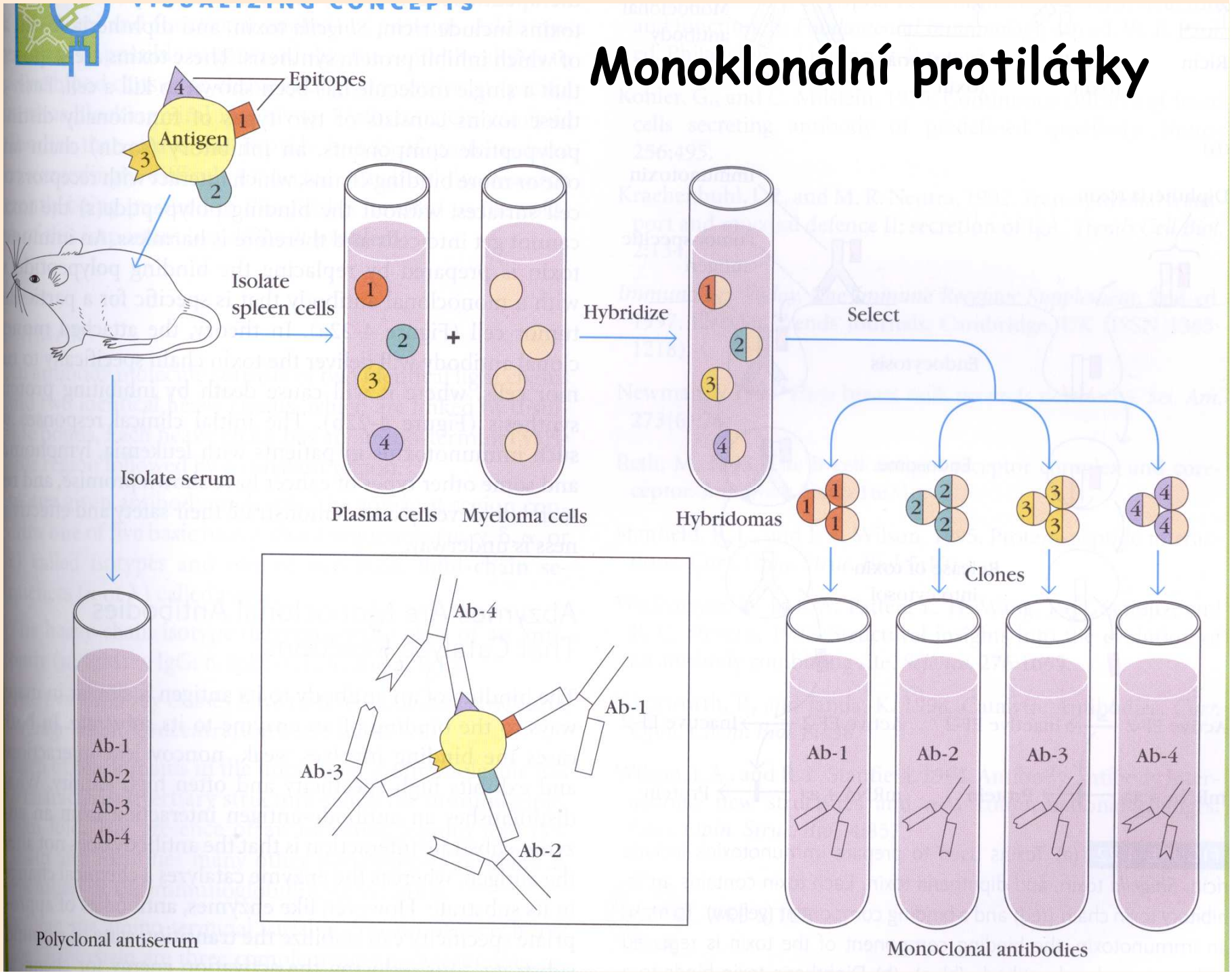
- dvojvazné (IgG, IgD, IgE, sérový IgA)
- čtyřvazné (sekreční IgA)
- desetivazné (IgM)

Získávání protilátek



Polyklonální protilátky

Monoklonální protilátky



Metoda založená na enzymových defektech: (chybění důležitých enzymů)

- ✓ V buňkách kultivovaných *in vitro* lze navodit určité enzymové defekty.
- ✓ Buňky se enzymovými defekty nejsou schopné růst v médiích, které obsahují selekční komponenty
- ✓ Hybridní buňky mohou nepřítomnost potřebného enzymu v jedné buňce kompenzovat jeho přítomností v partnerské buňce.
- ✓ Na selekci hybridomů se využívá vynechání některých enzymů syntetizujících nukleotidy.

Buňky syntetizují nukleotidy dvojím způsobem:

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

sacharidy + aminokyseliny

HLAVNÍ CESTA ↓ AMINOPTERINOVÝ BLOK

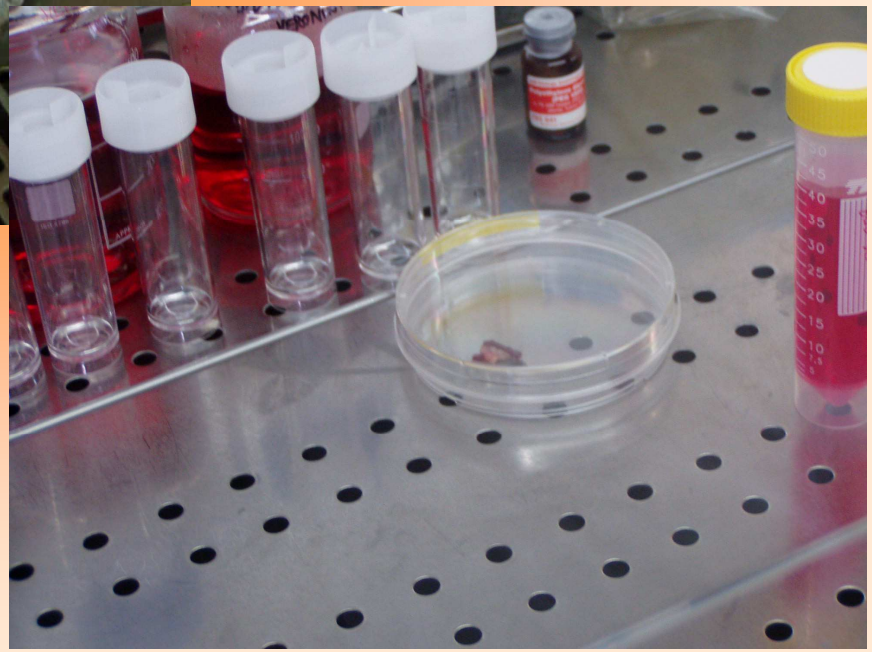
NUKLEOTIDY

VEDLEJŠÍ CESTA ↑ HGPRT, TK

Dusíkaté zásady + Nukleosidy

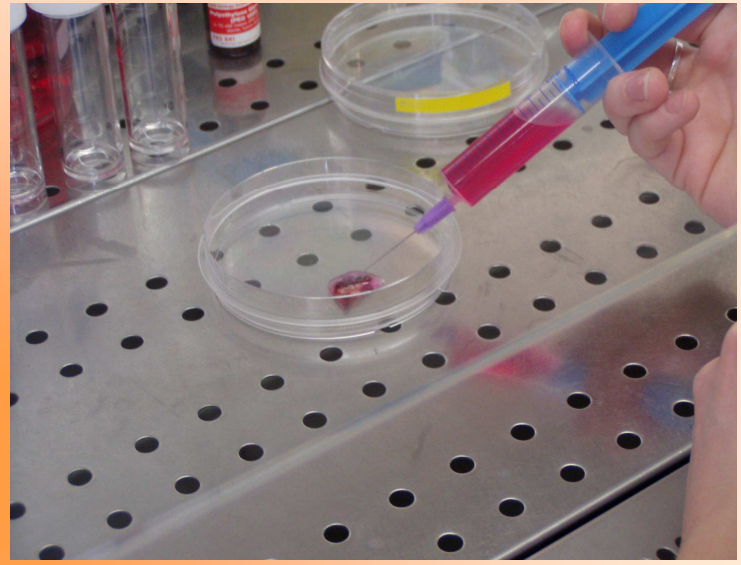
PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK PRAKTICKY

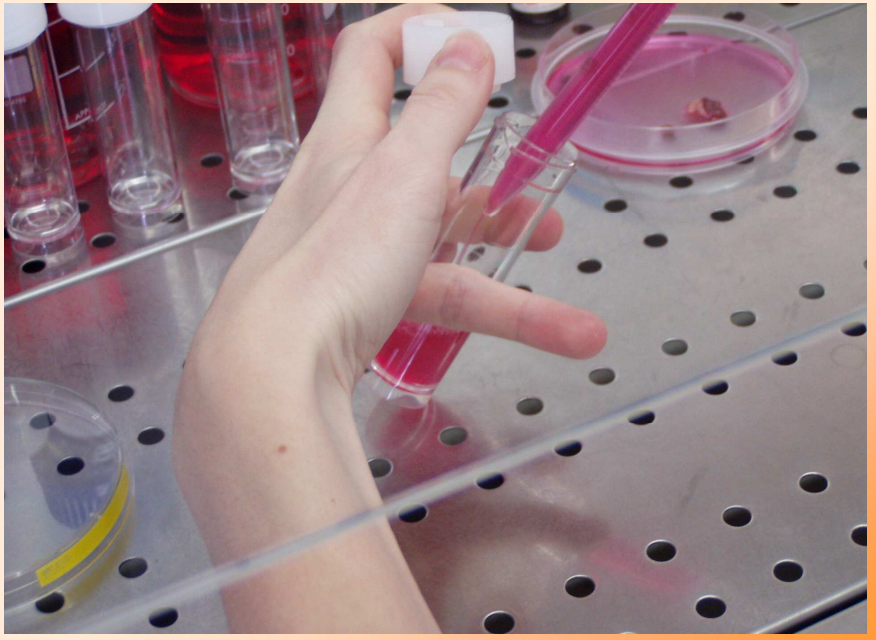
Myš imunizovaná,
Připravená k odběru
sleziny pro získání
B-lymfocytů



Separace sleziny

Získání slezinných buněk – B-LYMFOCYTŮ

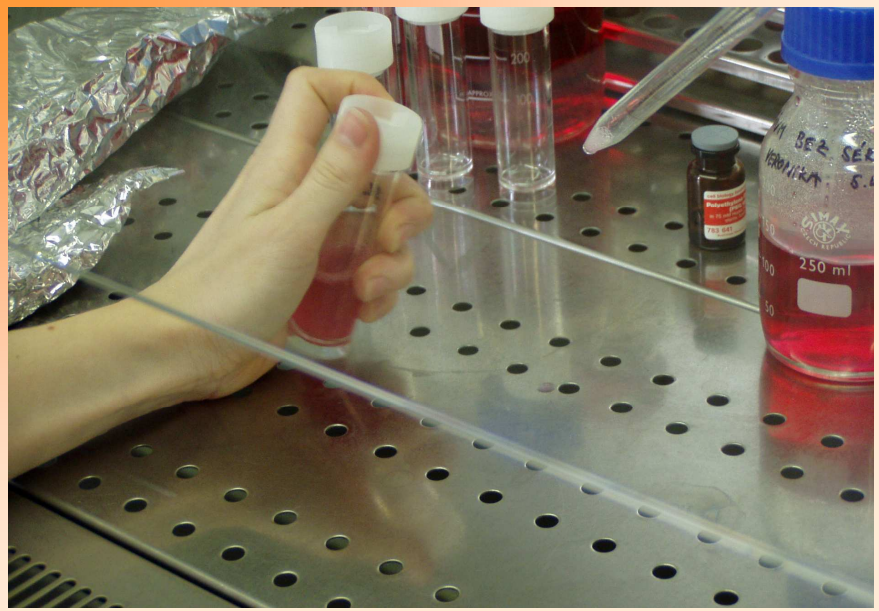




Odpipetování vyplavených B-lymfocytů ze sleziny do centrifugační zkumavky. Následuje centrifugace.

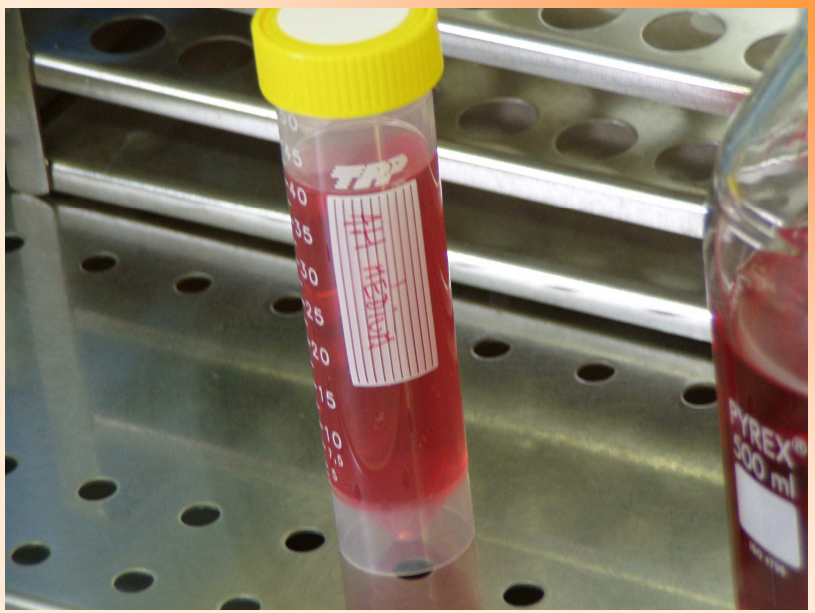
Odsátí supernatantu. Buňky jsou připraveny pro fúzi s myelomovými buňkami.

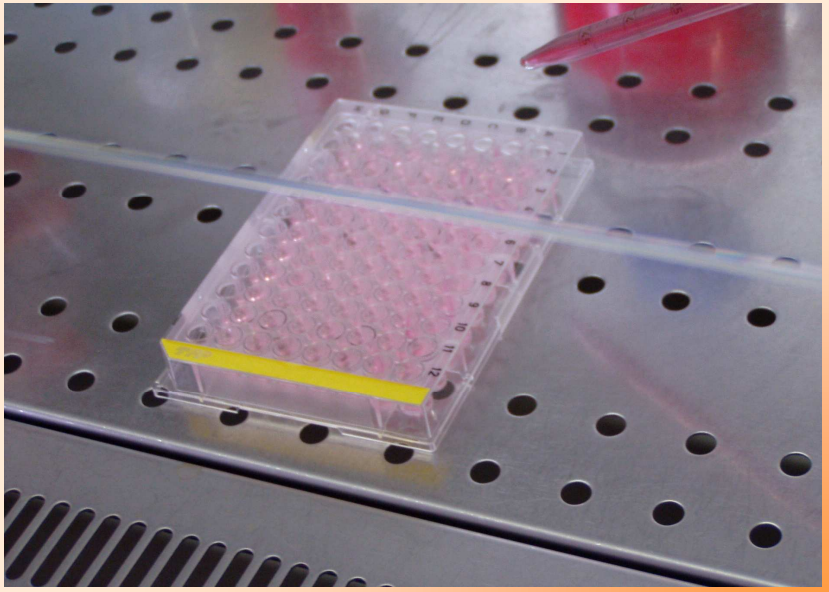
Myelomové buňky.
Centrifugace a odsátí supernatantu.
Spojení myelomových buněk s B-lymfocyty



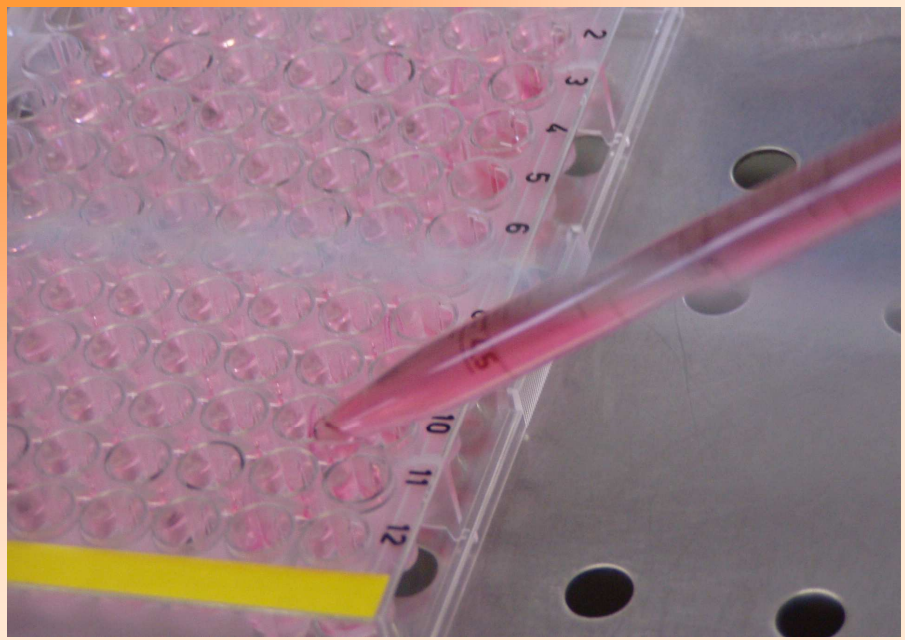
Fúze v prostředí polyethylenglykolu 1000.

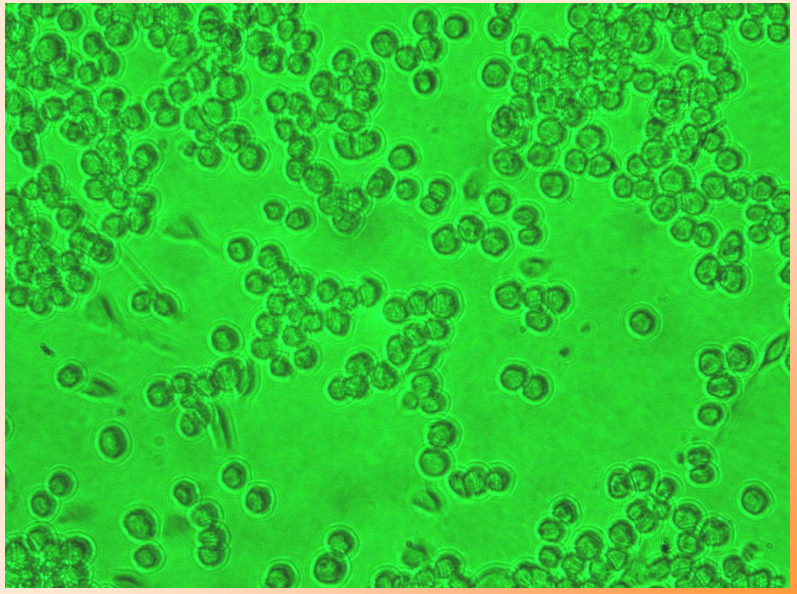
Růst buněk v AH-médiu.
Rostou jen hybridy B-lymfocyt-myelomová buňka.



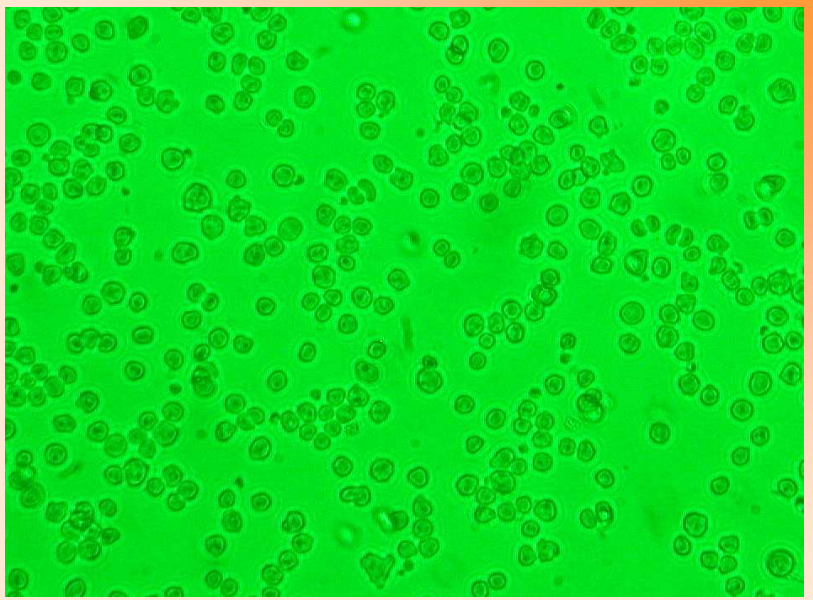


Rozpipetování po fúzi
do 10 mikrotitračních destiček





Hybridomy

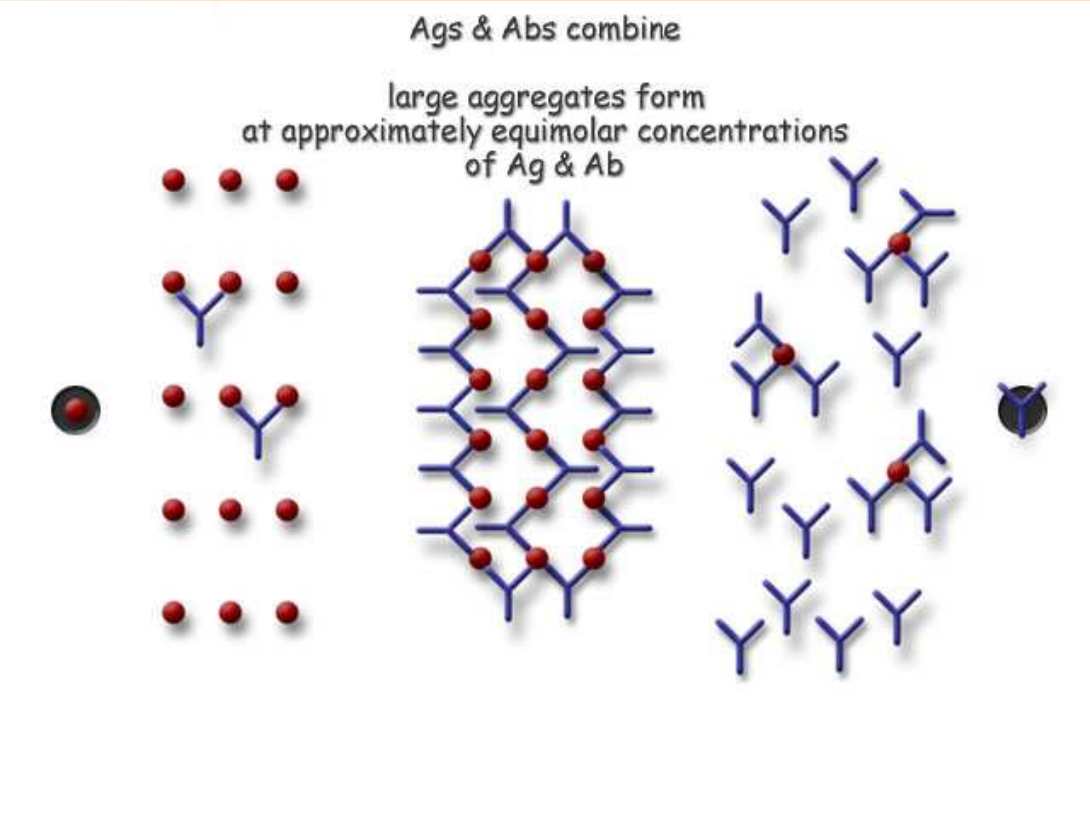


SP2- buňky
myolemové buňky

Antigen + protilátka = biospecifická vazba

- polyklonální Ig: vznik zákalu
  vznik precipitátu
  vznik aglutinátu
  úbytek reaktantu
  přírůstek produktu
- monoklonální: zákal ani precipitát nevznikají
  úbytek reaktantu
  vznik produktu

Imunoprecipitace



kvalitativně
zákal
precipitát
aglutinát
kvantitativně
měřit
úbytek reaktantu
vznik produktu

Aglutinace

částice (buňky, erythrocyty, bakterie, latexové) aglutinují

hodnocení aglutinace

- ✓ přímo okem, lupa
- ✓ pod mikroskopem

provedení

- ✓ sklíčko
- ✓ zkumavka
- ✓ mikrotitrační destička

Typy aglutinace

- přímá – antigen –součást povrchové struktury
- nepřímá – antigen nebo Ig se naváže na korpuskulární částice

- ✓ latexová aglutinace
- ✓ pasivní hemaglutinace

Sérologické metody

přítomnost protilátek či antigenů v krevním séru

- kapalné prostředí
- precipitace (antigen rozpustný)
- aglutinace (antigen – částice)

- semikvantitativně (titr séra)
- kvalitativně (vznik zákalu, precipitátu)
- kvantitativně (turbidimetrie, nefelometrie)

Turbidimetrie a nefelometrie

Turbidimetrie

- snížení zářivého toku, k němuž dochází jeho rozptylem na částicích suspendovaných v kapalině.
- spektrofotometr

Nefelometrie

- tok záření vzniklého rozptylem paprsků zdroje na částicích v roztoku.
- specielní přístroje nefelometry.
  nákladnější zařízení.

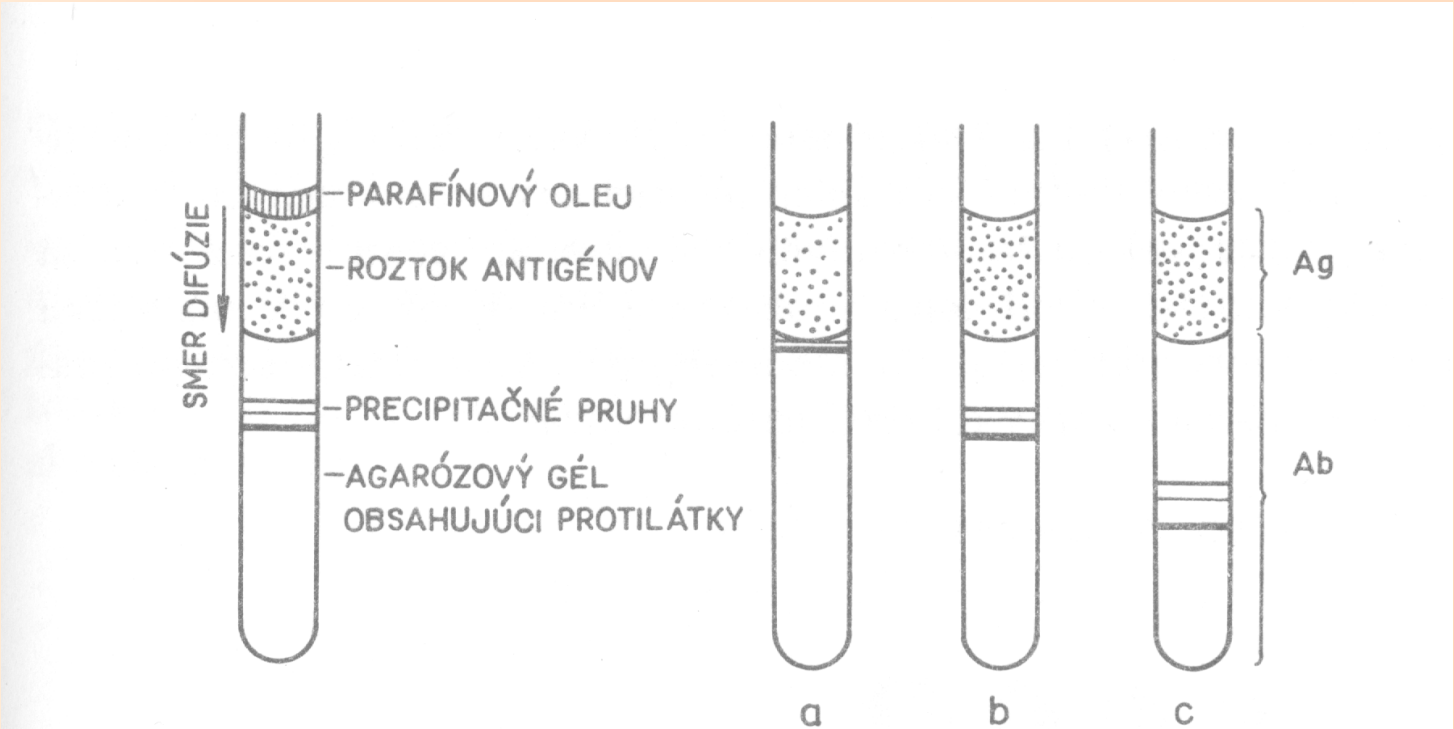
Imunodifúzní metody

- ✓ 1% agarosa
- ✓ Ag i Ab v gelu
- ✓ precipitační linie

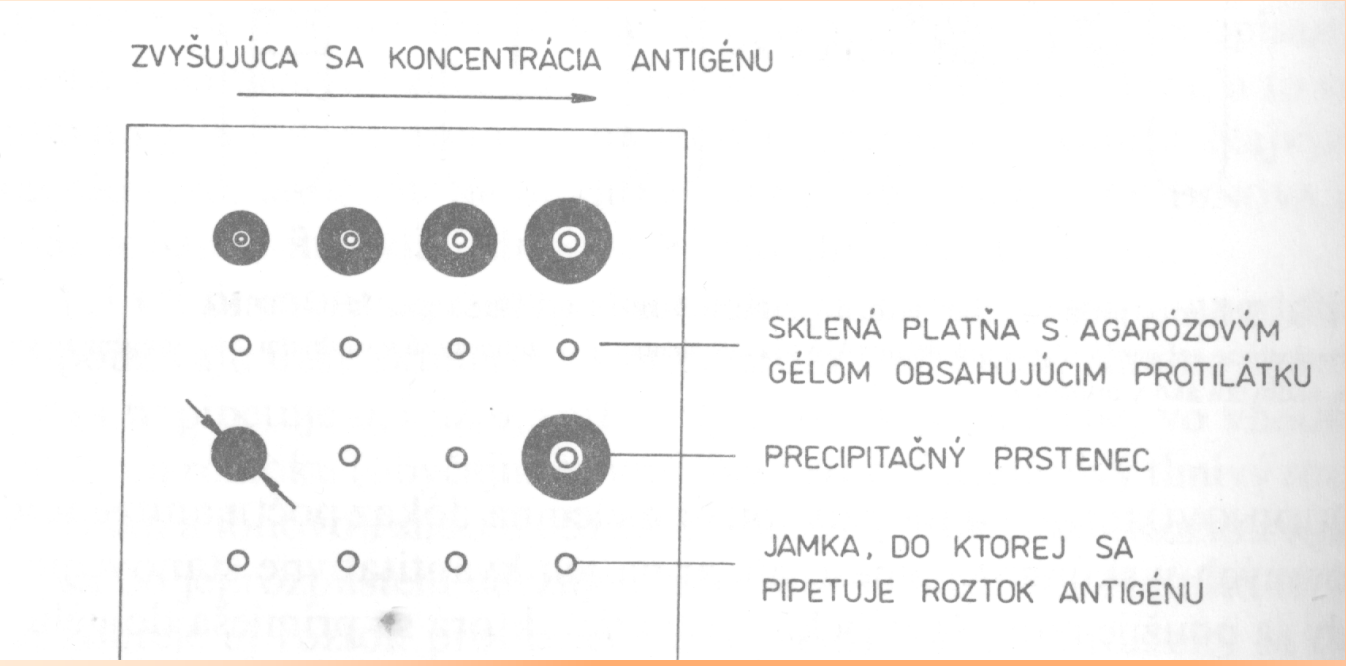
Detekce imunoprecipitátu:

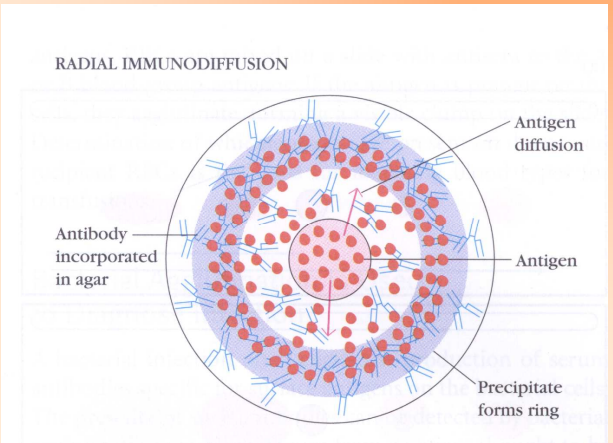
- ✓ okem
- ✓ po zabarvení
- ✓ radiograficky
- ✓ označení enzymem

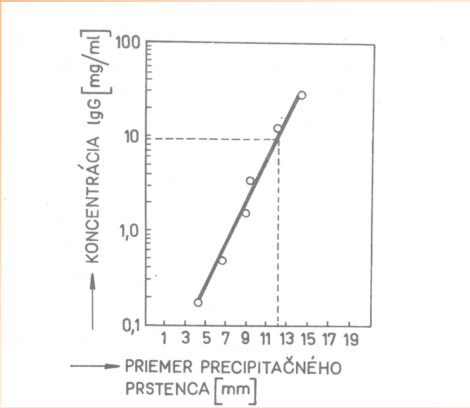
Oudinova metoda



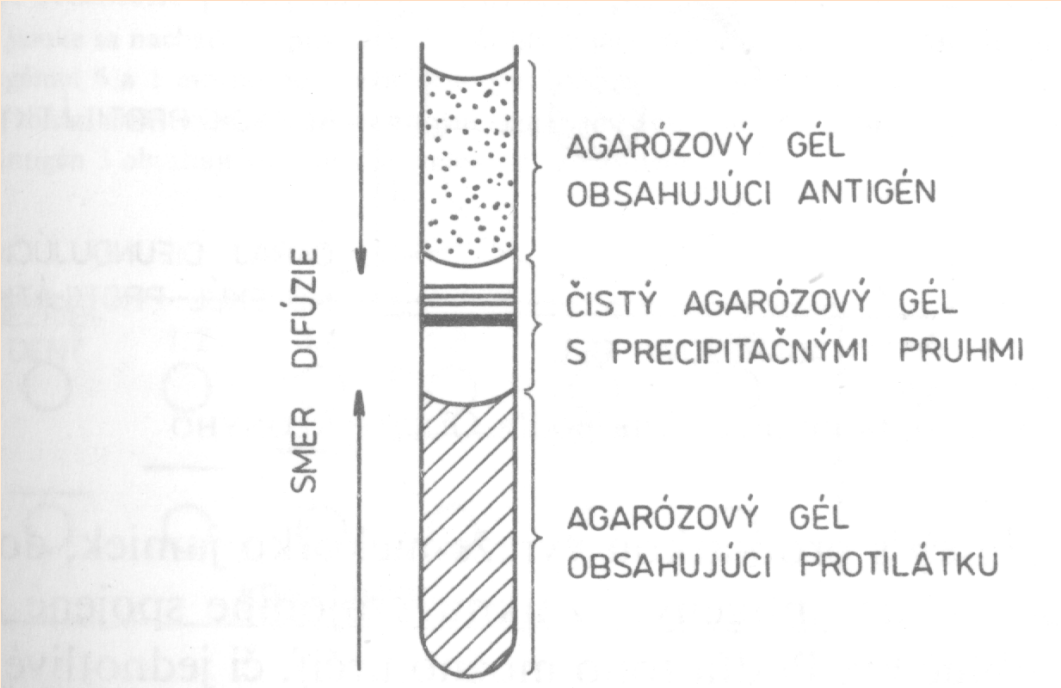
Jednoduchá radiální imunodifúze (RID)



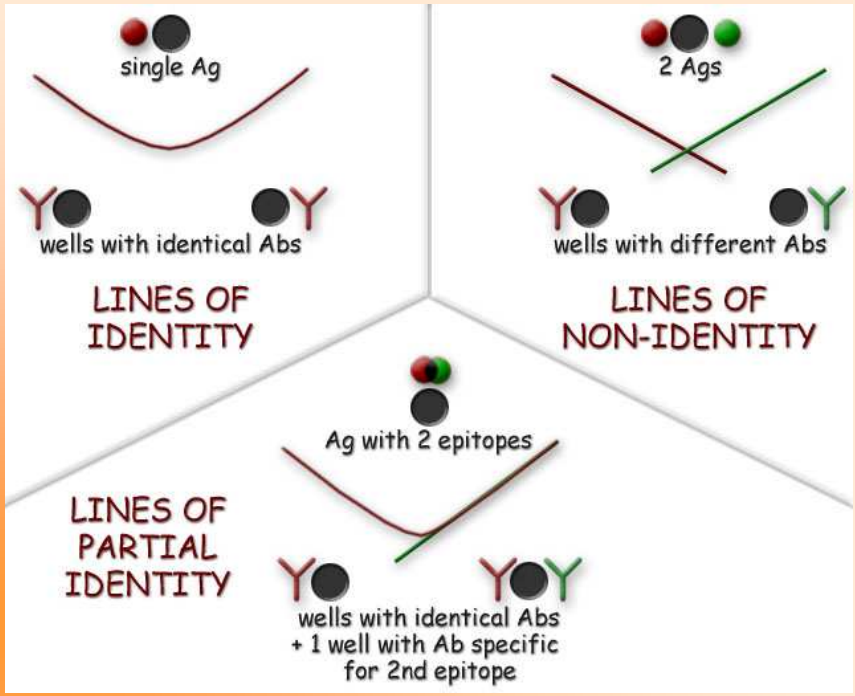


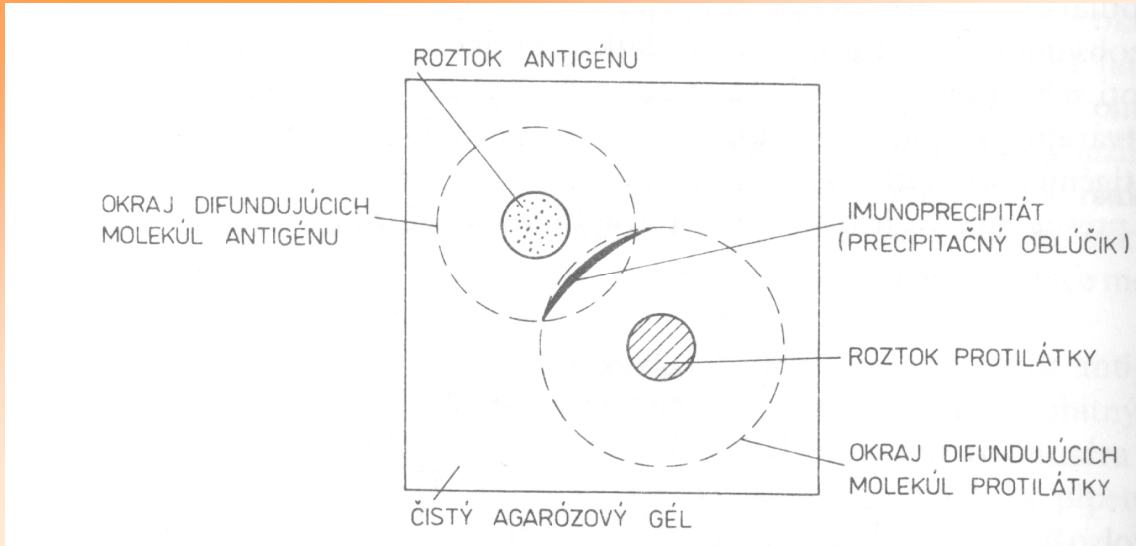


Dvojitá imunodifúze



Ouchterlonova metoda

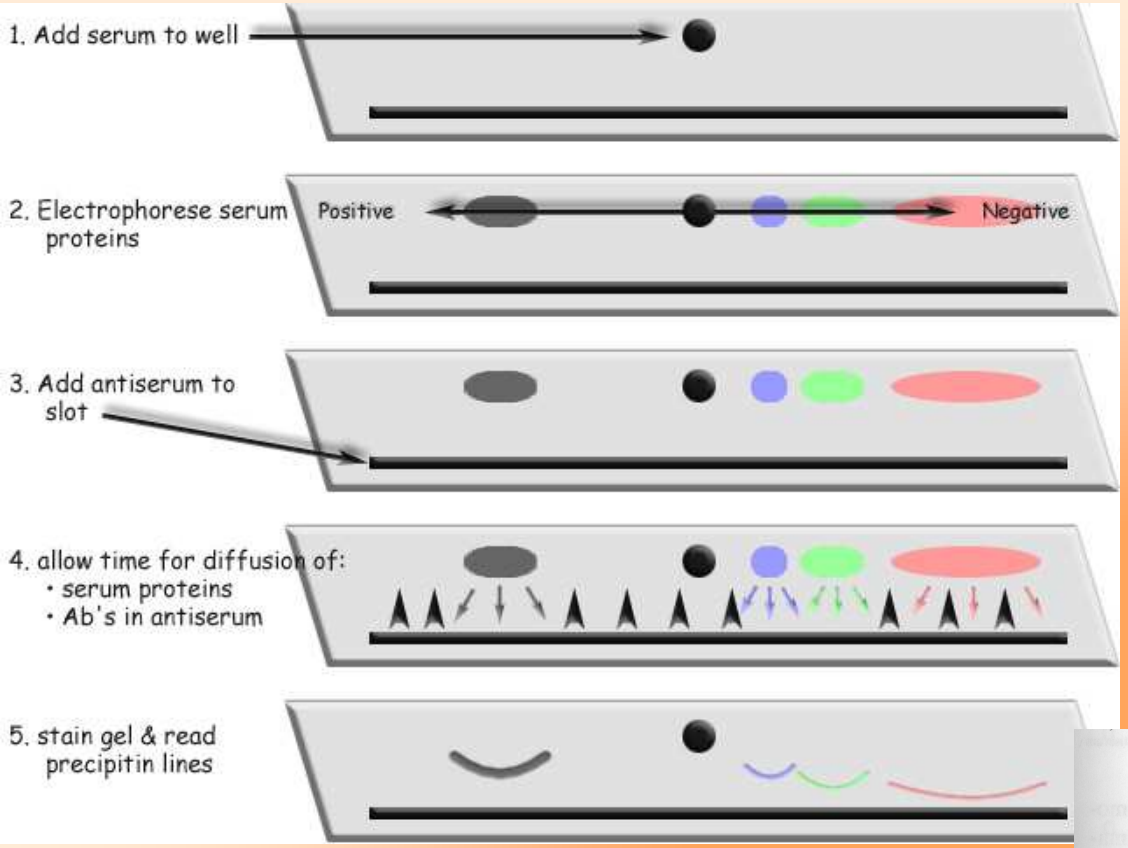


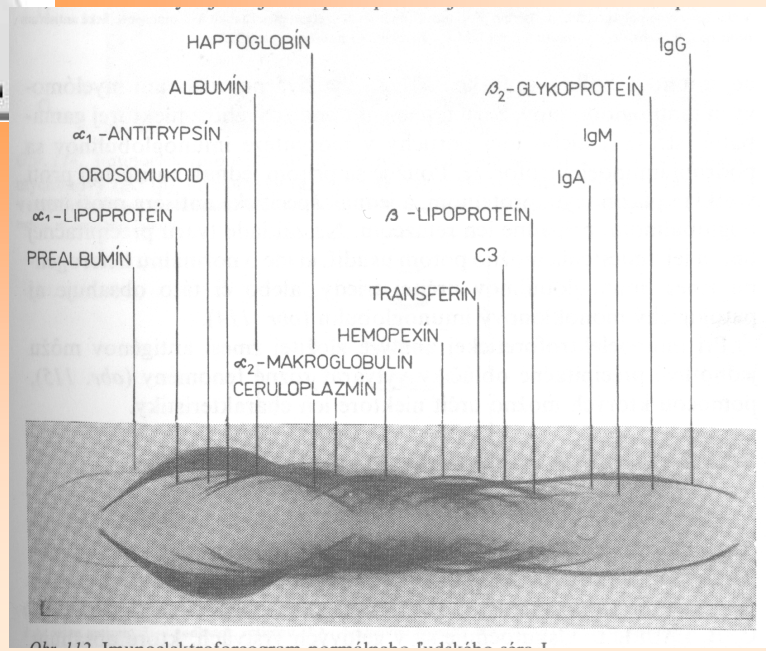


Imunoelektroforetické metody

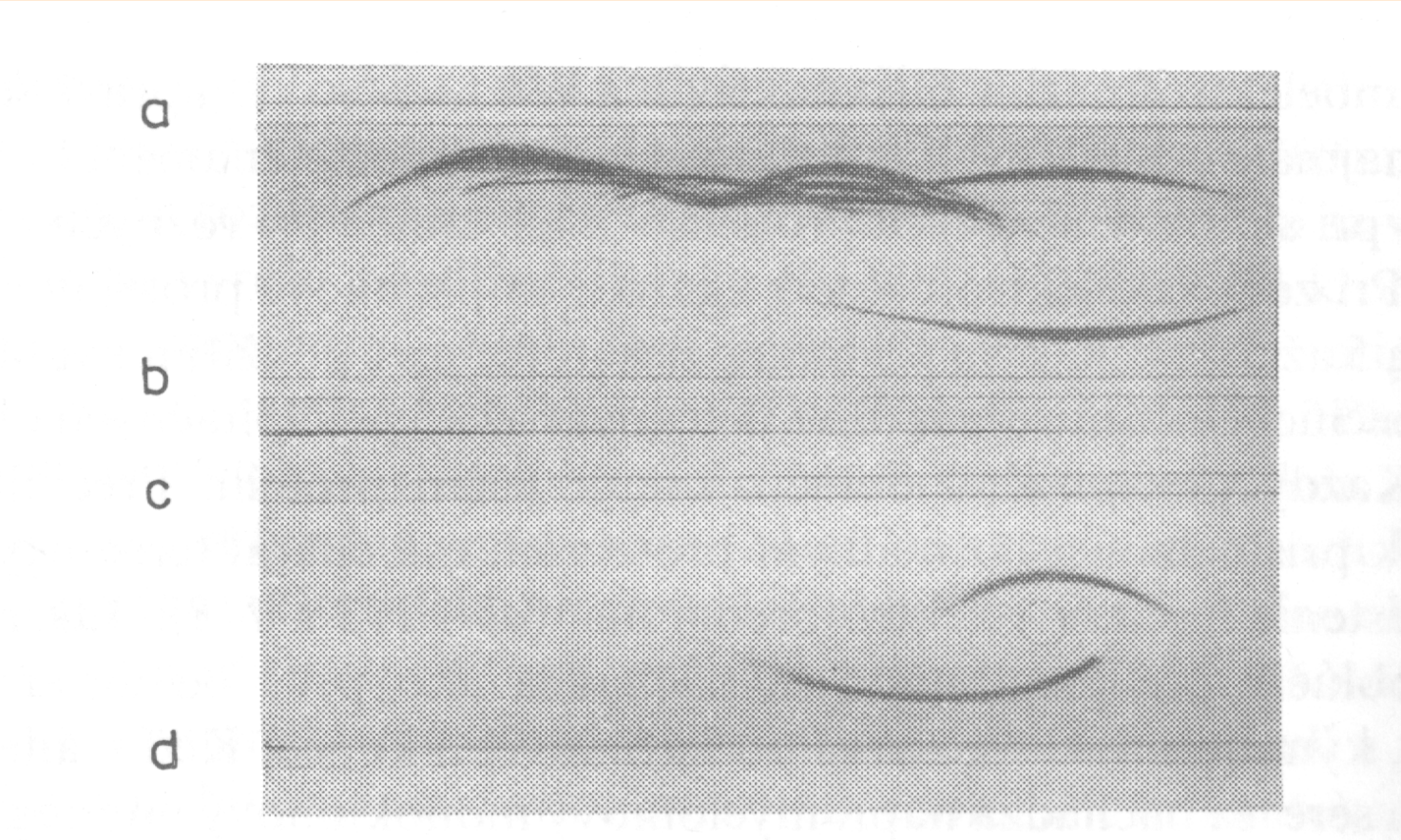
Imunoelektroforéza podle Grabara a Williamsa

- ✓ zónová elektroforéza 5-6 frakcí
- ✓ imunoelektroforéza 35 precipitačních linií
- ✓ zjišťování gamapatií, poruchy v biosyntéze Ig
- ✓ zkoumání sérových proteinů a jejich změn při různých chorobách



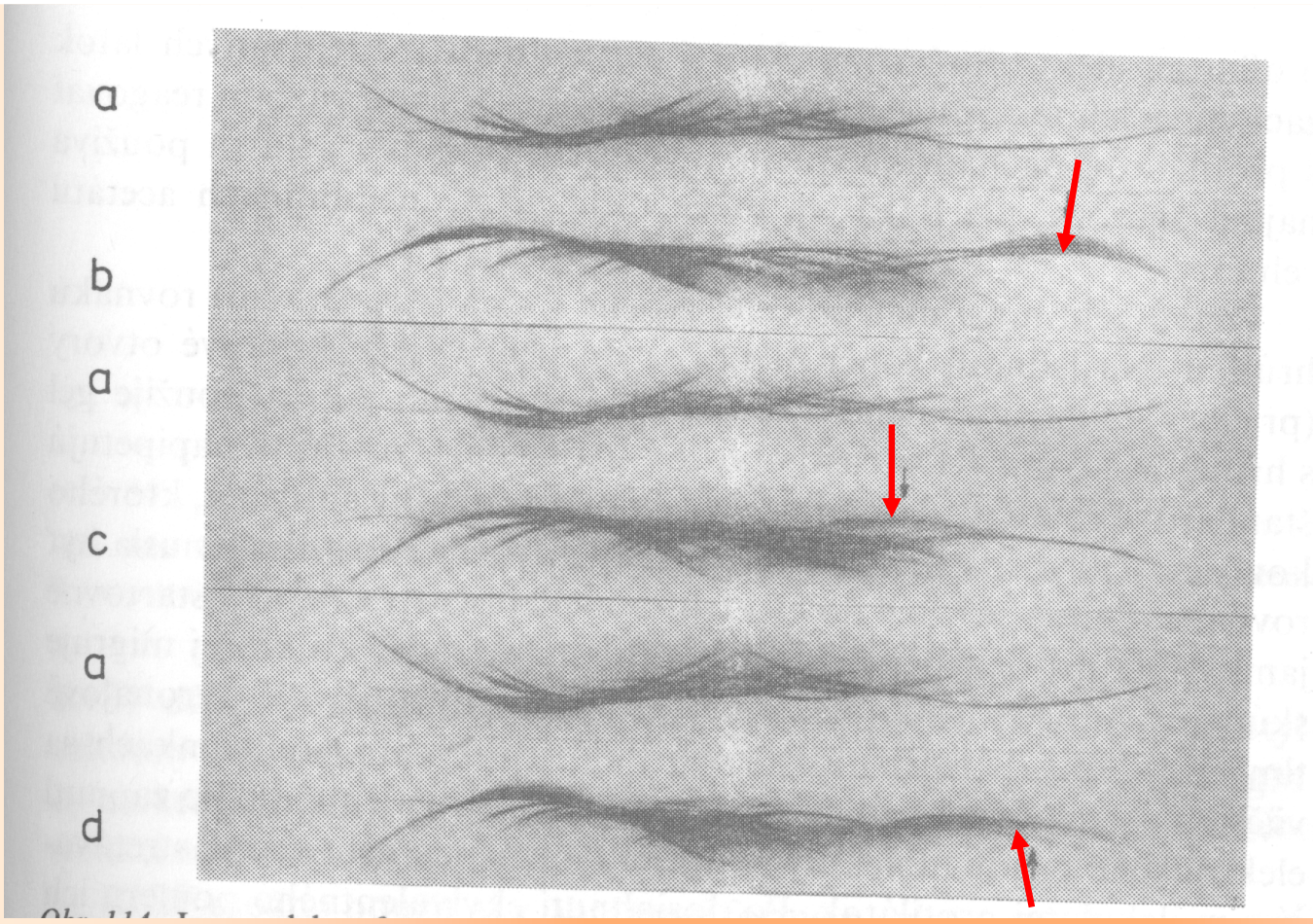


Imunoelektroforegram normálního lidského séra
Ve žlábku je králičí antisérum proti lidským sérovým proteinům



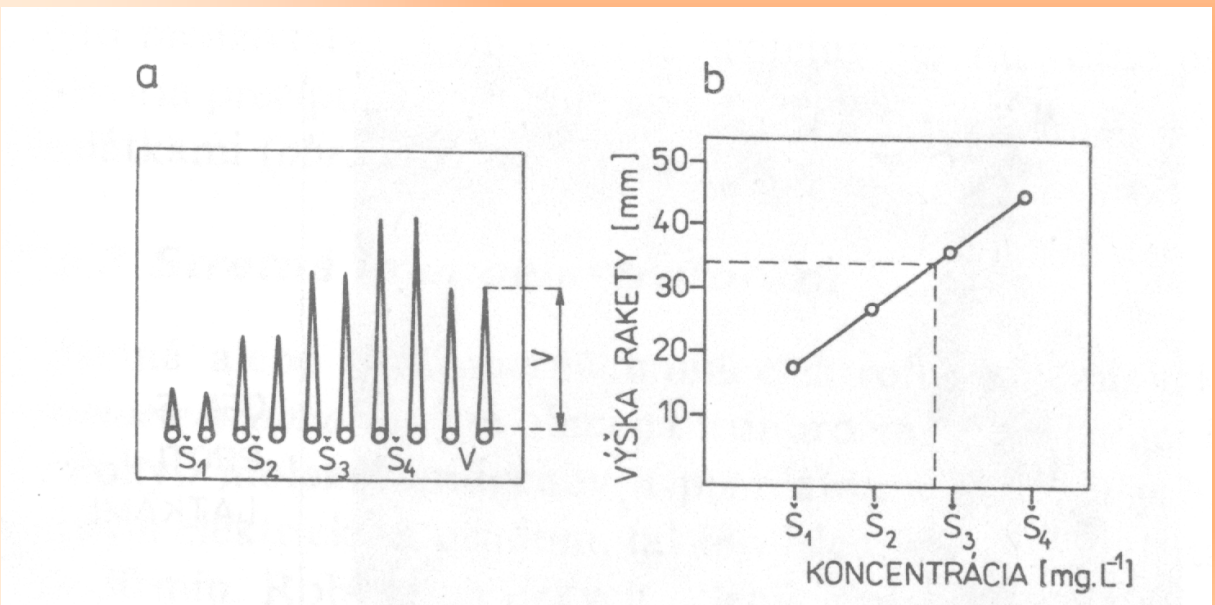
Imunoelektroforegram normálního lidského séra:

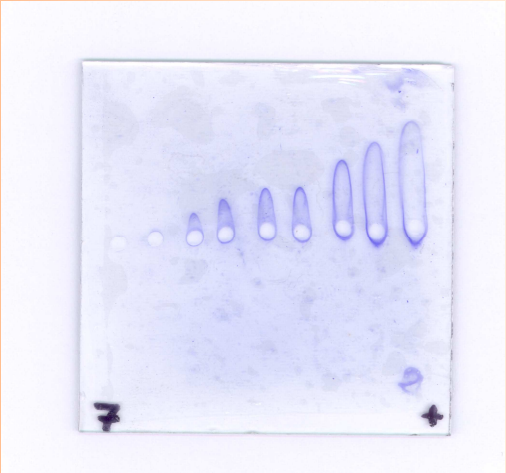
žlábek a polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům
žlábek b monospecifické antisérum proti IgG
žlábek c antisérum proti IgM
žlábek d antisérum proti IgA



Imunoelektroforegramy normálních lidských sér (a) a sér obsahujících myelómový IgG (b), myelómový IgA © a Waldenströmův makroglobulin IgM (d)
Ve žlábcích je polyspecifické antisérum proti lidským sérovým proteinům. Monoklonové (patologické) imunoglobuliny jsou vyznačeny šipkou.

Raketová imunoelektroforéza





kvantitativní stanovení

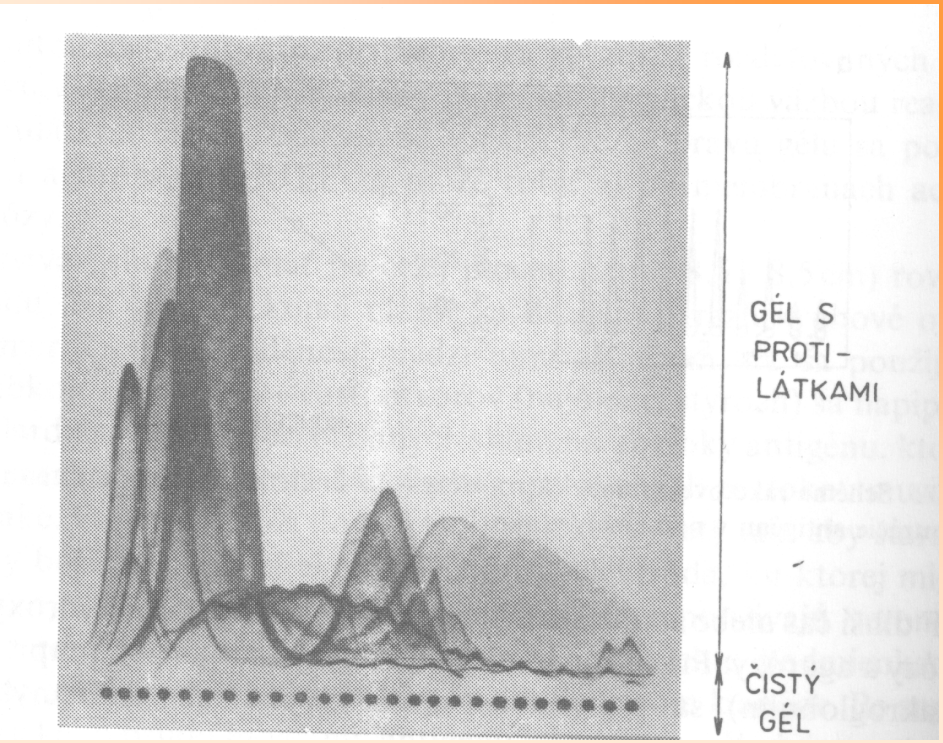
Spojitá raketová imunoelektroforéza

Umožňuje rozdělení proteinů do jednotlivých frakcí získaných různými chromatografickými technikami.

2 různé gely:

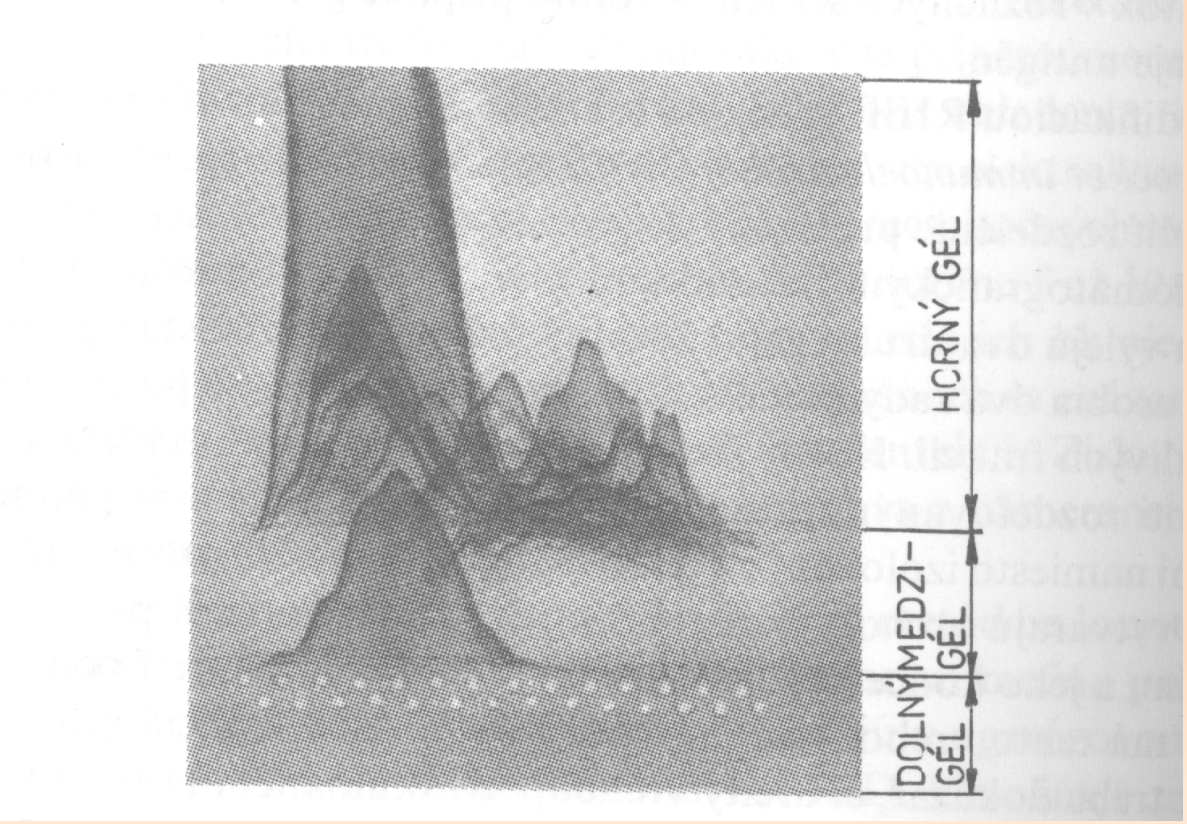
Čistá agarosa, kde dvě řady jamek - vzorky jednotlivých frakcí

2. Horní široký gel s polyspecifickými Ab proti proteinům

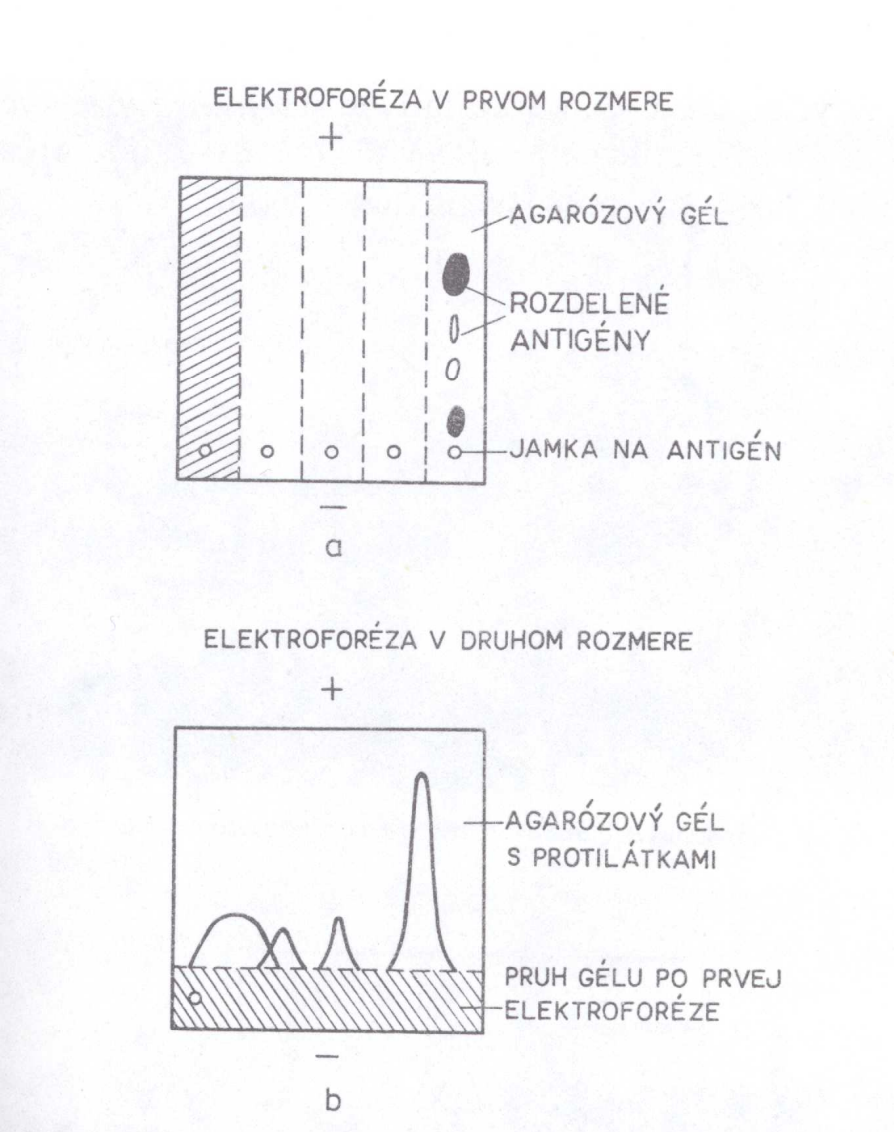


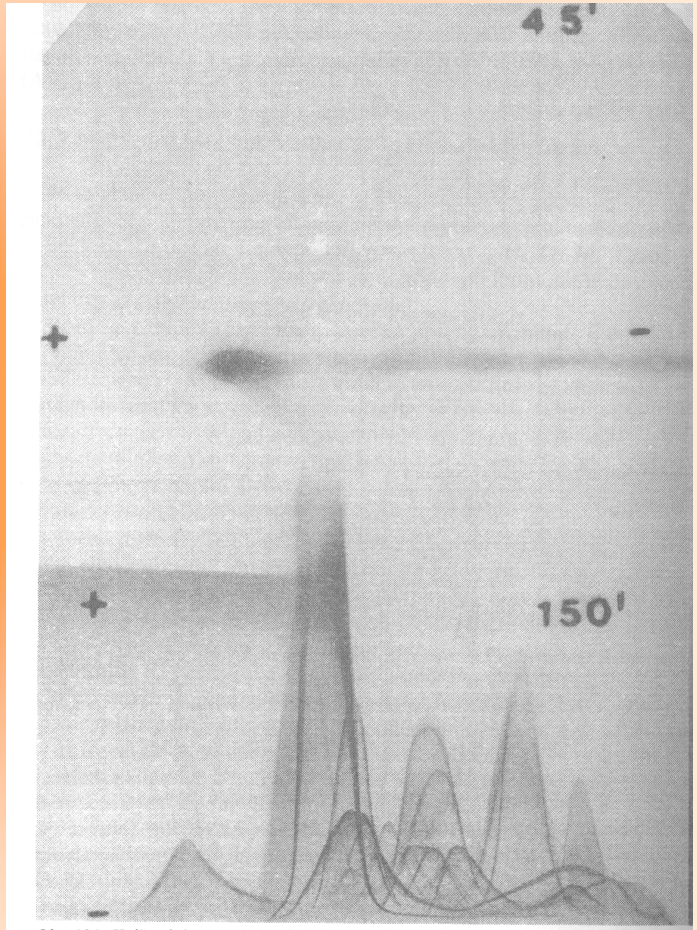
Rozpoznání určitého konkrétního proteinu

mezi gel čisté agarozy a agarosy s polyspecifickými Ab, zařadíme gel se specifickou protilátkou proti zkoumanému proteinu.



Dvourozměrná křížová imunoelektroforéza





Obr. 121. Krížová imunoelektroforéza normálneho ľudského séra v agarózovom gél (dolná polovica)

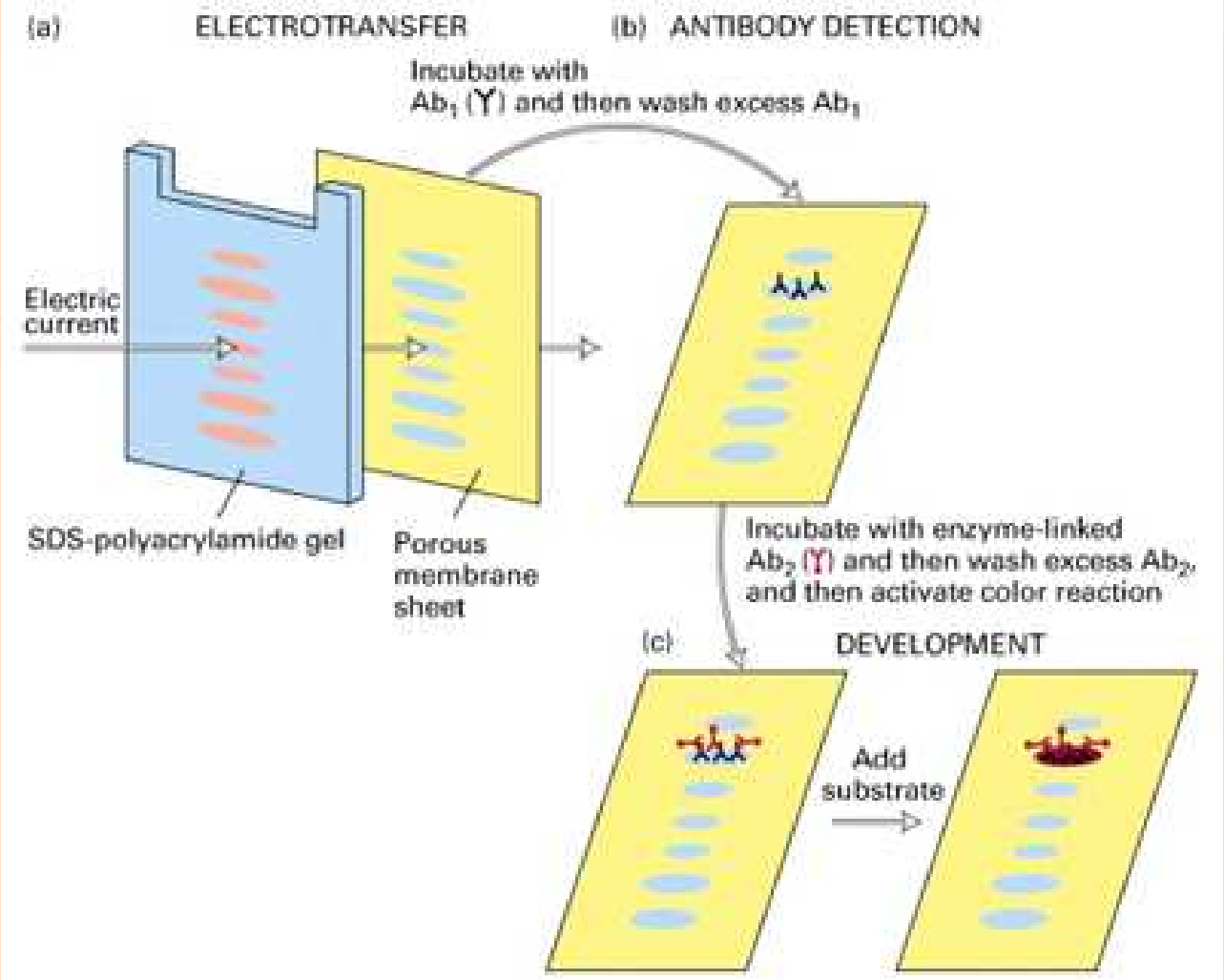
Western blotting a dot blotting

dot blotting

aplikace proteinu přímo na membránu
a imunodetekce

Western blotting

- ✓ rozdělení SDS PAGE
- ✓ přenesení na PVDF membránu
- ✓ detekce specifického proteinu pomocí protilátek


(a)
ELECTROTRANSFER
(b) ANTIBODY DETECTION
Incubate with
Ab1 (Y) and then wash excess Ab1
Electric
current
SDS-polyacrylamide gel
Porous
membrane
sheet
Incubate with enzyme-linked
Ab2 (Y) and then wash excess Ab2,
and then activate color reaction
(c)
DEVELOPMENT
Add
substrate

Detekce konjugátu protein-Ab

- ✓viditelná detekce — konjugát Ab s enzymy HRP nebo ALP
- ✓opak ELISA — substráty musí poskytovat precipitující barevné produkty
- ✓substráty — HPR-diaminobenzidin; 4-chlor-1-naftol; ALP-5-brom-4-chlorin doxyl fosfát/nitrotetrazoliová modř
- ✓detekční limit — 1 ng/mm^2 membrány
- ✓luminiscence — fluorescenční substráty pro enzymy 2-3 řády citlivější

Imunohistochemie

Histochemie
identifikace a lokalizace látky v místě výskytu v tkáni
Imunohistochemie
vazba molekul imunoglobulinu s molekulami antigenů v tkáni

protilátky
monoklonální
polyklonální

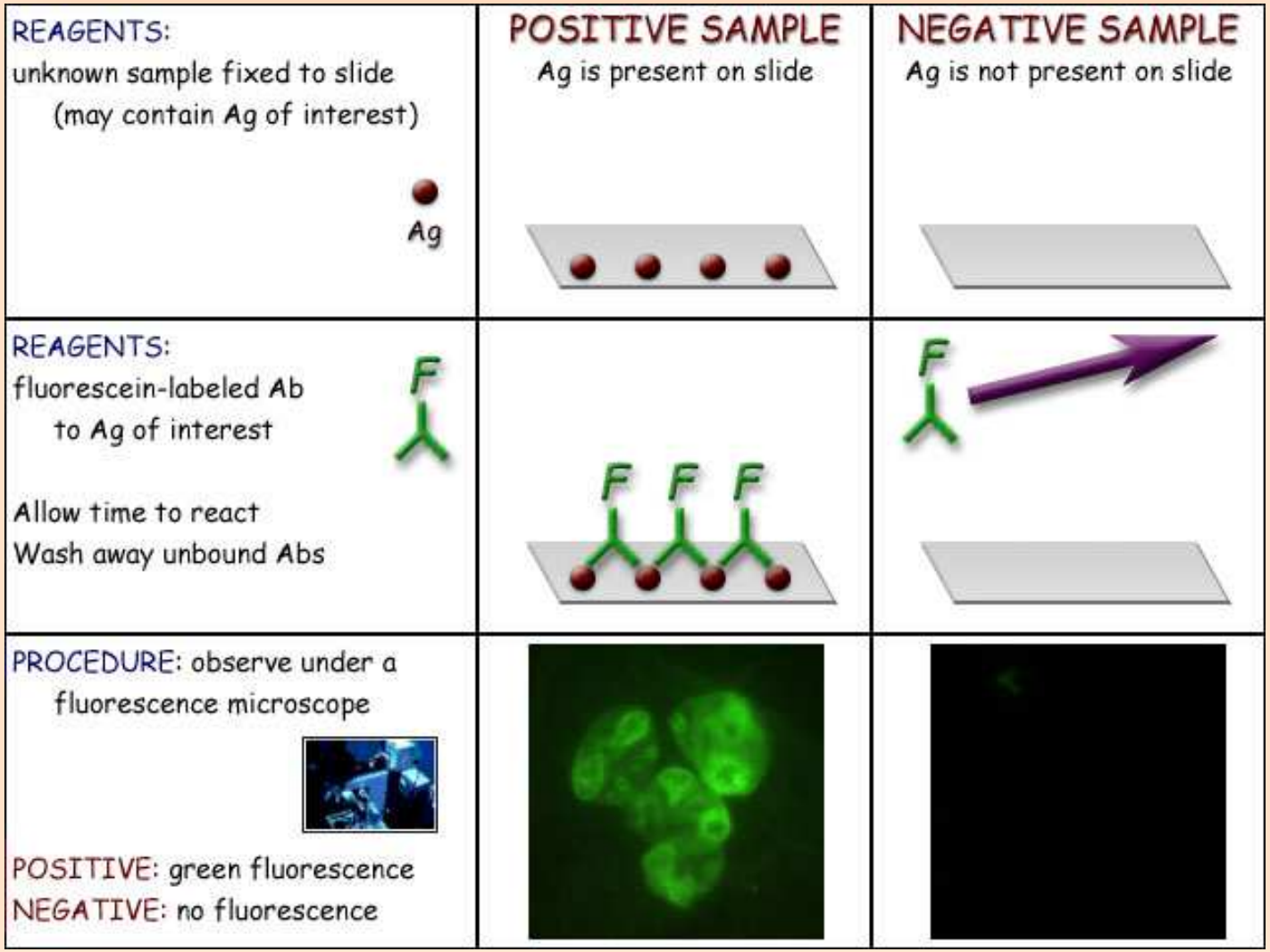
Význam imunohistochemie v KB

- diagnostika chorob
- lokalizace antigenů v tkáni

Příprava preparátu

- řez tkáně (mikrotom, zalití tkáně-paraplast)
- napínání řezů na sklíčku (potažení sklíčka)
- odstranění paraplast (xylol)
- zavodnění tkáně (sestupná řada alkoholů)
- obnovení přístupnosti antigenů – proteolýza
- blokace endogenních enzymů a vysycení tkáně
- reakce s primární a sekundární protilátkou
- vizualizace chromogenů (substrát)
- fluorescenční značky v fluorescenční mikroskop
- kovové značky (Ag, Au)

Přímý test


REAGENTS:
unknown sample fixed to slide
(may contain Ag of interest)
Ag
POSITIVE SAMPLE
Ag is present on slide
NEGATIVE SAMPLE
Ag is not present on slide
REAGENTS:
fluorescein-labeled Ab
to Ag of interest
F
Allow time to react
Wash away unbound Abs
F F F
F
PROCEDURE: observe under a
fluorescence microscope
POSITIVE: green fluorescence
NEGATIVE: no fluorescence

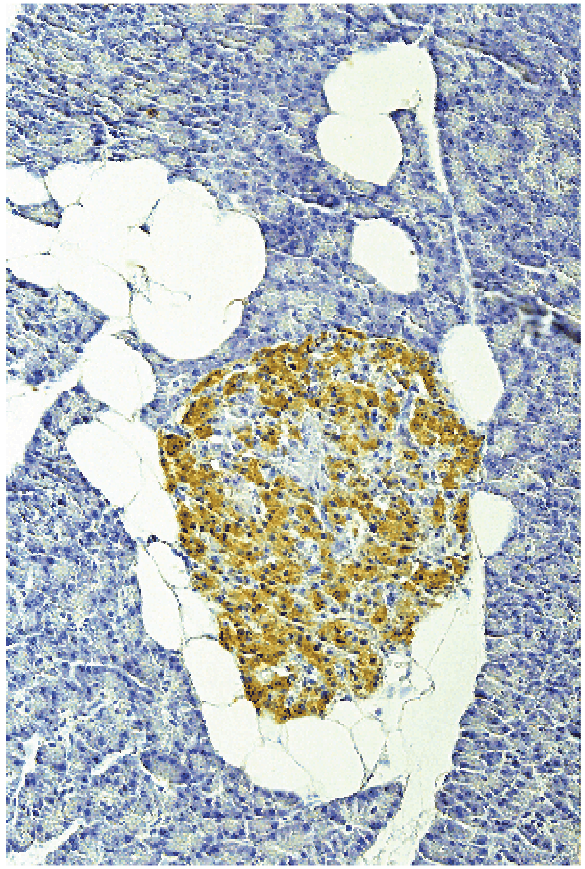
Nepřímý test

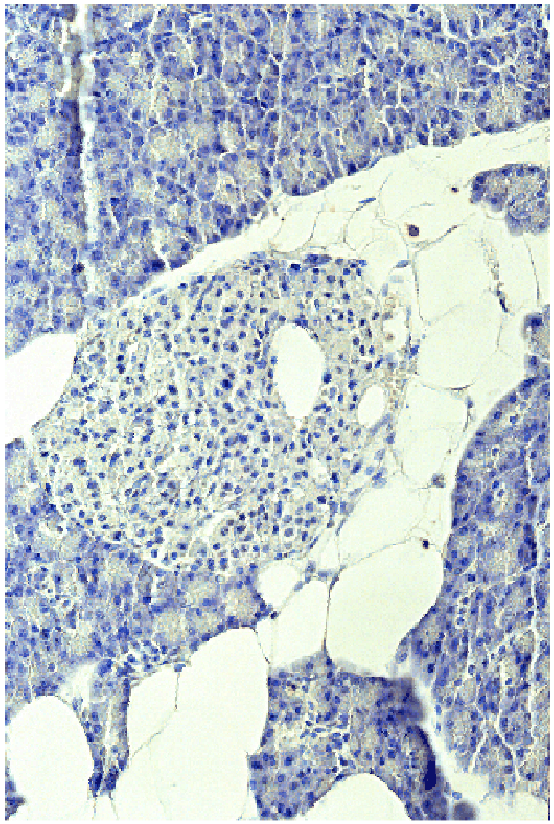
REAGENTS: Ag of interest is fixed to slide Unknown serum sample added Ag Allow time to react Wash away unbound Abs	POSITIVE SAMPLE specific Ab's are present & bind to Ag	NEGATIVE SAMPLE specific Ab absent; other Ab's washed away
REAGENTS: fluorescein-labeled Ab specific for Ab's (antiglobulin) F Allow time to react Wash away unbound F-Abs	F F F F	F
PROCEDURE: observe under a fluorescence microscope POSITIVE: green fluorescence NEGATIVE: no fluorescence		

Vizualizace lokalizace antigenu

- **fluorochromy** – imunofluorescence
  FITC (fluorescein-izothiokyanát)
  TRITC (tetramethyl-rhodamin-izothiokyanát)
  DANSYL(1-dimethyl-aminonaftalen-5-sulfonylchlorid)
  deriváty rhodaminu B
  texaská červeň
- **enzymy** – imunoenzymové lokalizace
  křenová peroxidasa
  alkalická fosfatasa
  acetylcholinesterasa
- **kovy** částice zlata nebo stříbra 5-20 nm

Anti-inzulin-pankreas





Radioamunoanalýza (RIA)

citlivost pg/ml
kompetice radioaktivně značeného a neznačeného antigenu o vazbu na protilátku

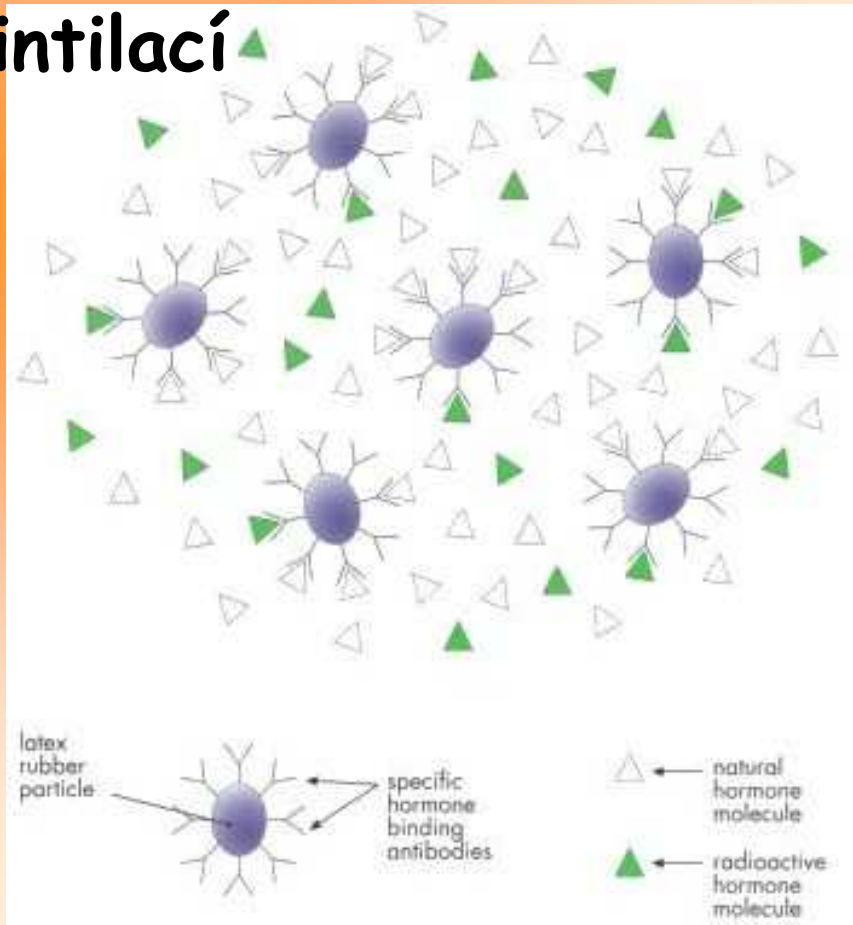
způsoby provedení:

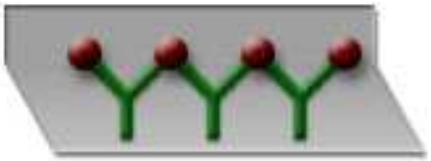
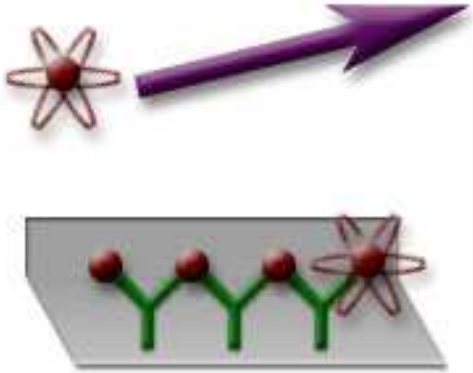
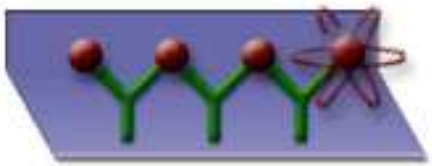
- Smísí se známé Ag* neznámé Ag a směs se inkubuje se specifickou protilátkou (v roztoku).
  Přidá se sekundární protilátka a komplex Ab-Ag/Ag* se separuje a v precipitátu se měří radioaktivita
  Primární Ab může být imobilizována na stěně zkumavky
- Ab reaguje nejdříve se značeným antigenem, pak se přidá neznámý antigen o různé koncentraci. Dochází k vytěsňování z vazby značeného Ag*

Značení

- ^{125}I nebo ^{131}I — proteinové antigeny
- tritium nebo ^{14}C — nízkomolekulární látky

Radioaktivita se měří scintilací



	POSITIVE SAMPLE high level of hormone	NEGATIVE SAMPLE low level of hormone
REAGENTS: Ab specific for hormone (coating the filter) Unknown sample with hormone Allow time to react Wash away unbound substances		
REAGENTS: ^{125}I-labeled hormone Allow time to react Wash away unbound radiolabeled hormone		
PROCEDURE: measure radioactivity in a gamma counter RESULT: amount of radioactivity is inversely proportional to the concentration of hormone in the sample.		

Enzymová imunoanalýza

- homogenní – enzymová aktivita značky se mění
  po vazbě Ab nebo Ag
  není třeba separace
- heterogenní –enzymová aktivita je stejná
  i po vzniku vazby
  nutná separace

Homogenní imunoanalýza

princip

Dochází ke změně aktivity enzymu, který byl konjugován haptenem nebo antigenem, po vazbě na protilátku.
Aktivita volného konjugátu je jiná než aktivita komplexu konjugát-protilátka.

provedení

Nechá se reagovat známé množství označeného hapténu (antigenu) s limitovaným množstvím Ab.
Aktivita enzymu je přímo úměrná množství konjugátu navázaného na protilátku

výhoda

nemusí se oddělovat volný konjugát od vázaného

Enzymy pro značení hapténu:

lysozym (EC 3.2.1.17)

malátdehydrogenasa (EC 1.1.1.37)

glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1.49)

Význam v klinické biochemii

- kvantitativní stanovení nízkomolekulárních látek –haptenů
- koncentrace léků (antibiotika, omamné látky, hypnotika, sedativa, cytostatika, kardiotonika)
- koncentrace hormonů (tyroxin, trijodtyroxin, kortizol, estriol)
- kontrola hladin léků a hormonů - monitorování

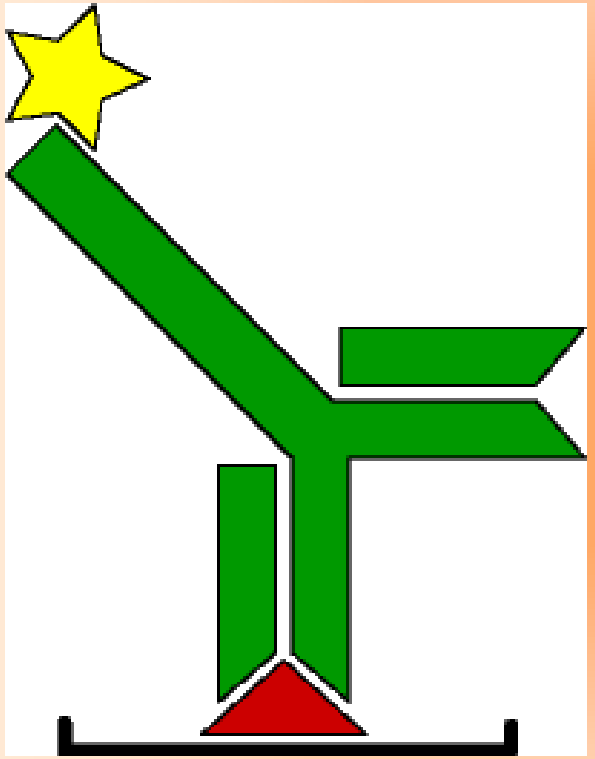
Heterogenní enzymová imunoanalýza ELISA

- Ab nebo Ag jsou značeny enzymem:
  alkalická fosfatasa ALP
  křenová peroxidasa HRP

- enzym v komplexu přeměňuje chromogenní substrát
  intenzita zbarvení se měří speciálním fotometrem
  ELISA-reader

- komplex je imobilizován na povrchu plastové
  mikrotitrační destičky

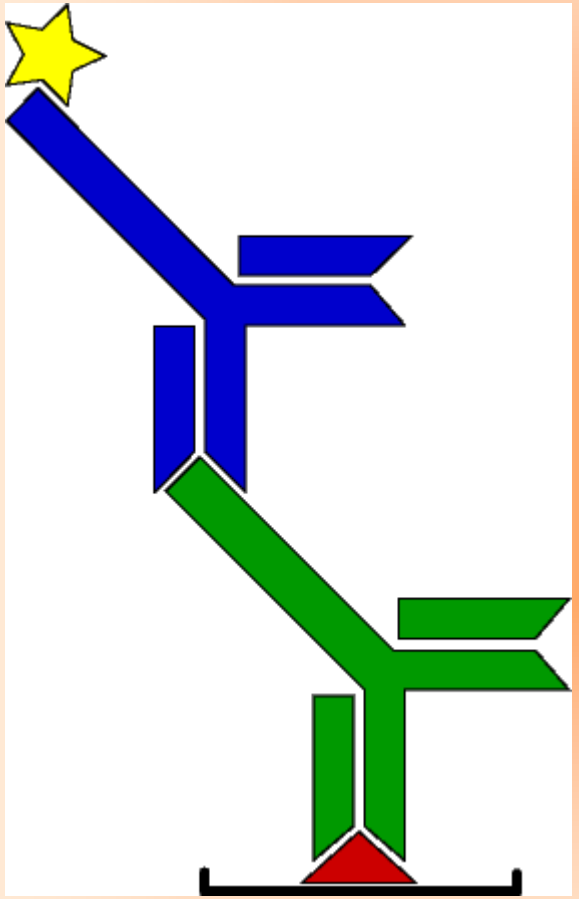
Přímá ELISA



Pro detekci antigenu (virus, bakterie rekombinantní peptid, protein)
Ab značená HRP, ALP, FITC
Po vymytí nadbytku Ab-konjugátu se přidá substrát a měří se zbarvení nebo fluorescence

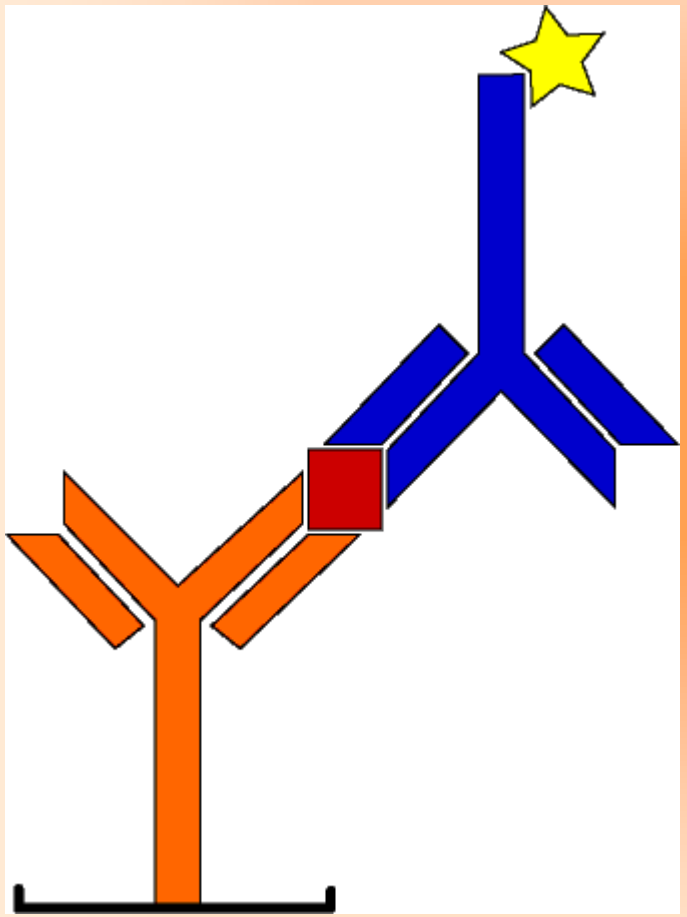
Ab-konjugát může být komerční nebo v laboratoři připravený

Nepřímá ELISA



Ag je imobilizován, inkubuje se s primární Ab a její nadbytek se vymyje,
přidá se sekundární Ab-konjugát, který se váže na primární Ab, nadbytek se vymyje
Detekce jako v předchozím způsobu provedení.

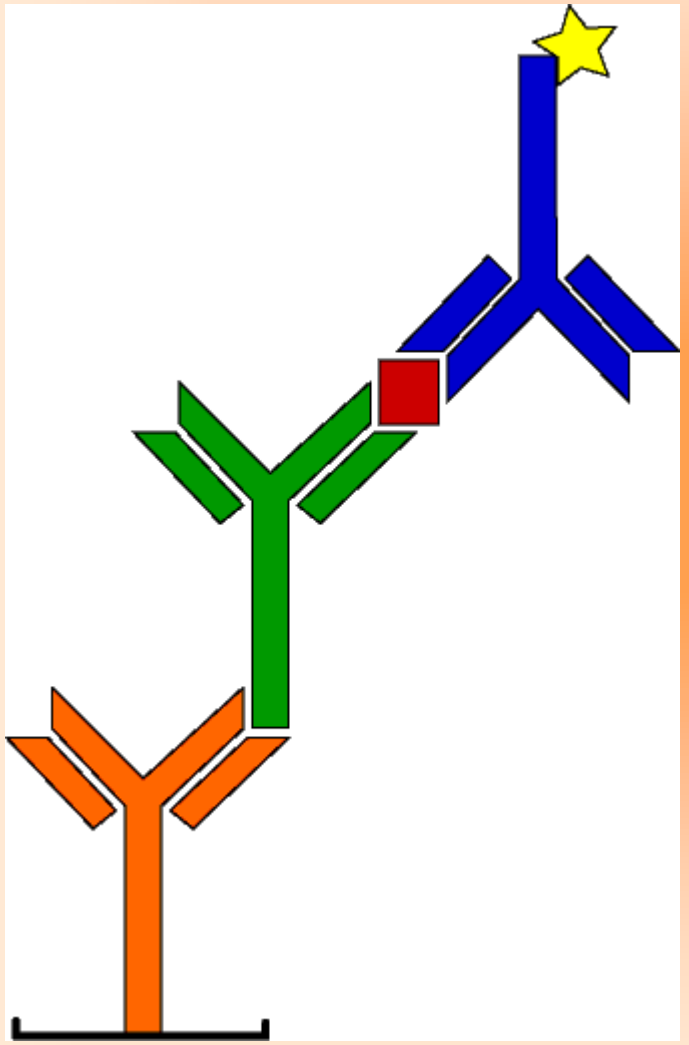
Sendvičová ELISA



Záchyt antigenu

Ab vážící antigen je imobilizována.
Přidá se Ag, promytí.
Přidá se značená Ab*,
která váže zachycený Ag
Ab* musí být z jiného obratlovce
(králík-koza)

Sendvičová ELISA



Se záchytem protilátky

Imobilizovaná Ab váže Ab ze vzorku (lidské IgG, IgA nebo IgM zkoumaného séra pacienta)

Po vymytí se přidá specifický Ag a nakonec Ab-konjugát poskytující signál.

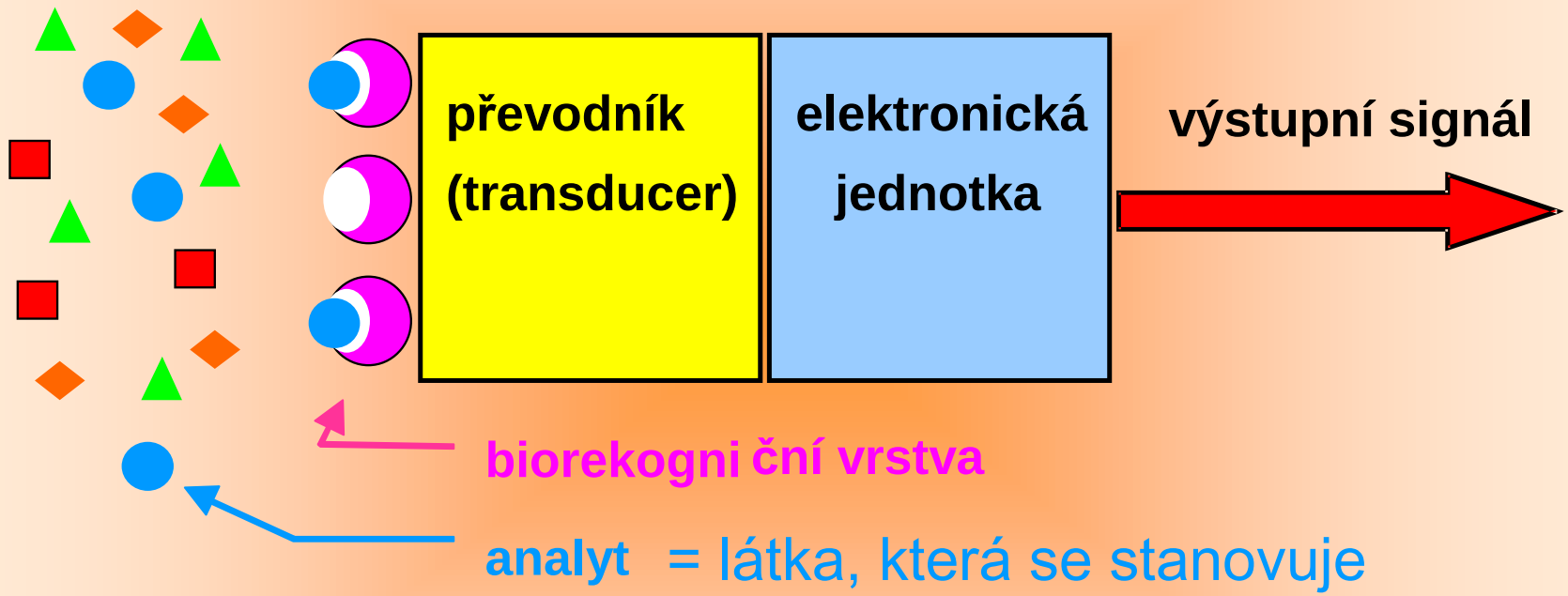
Používané substráty pro peroxidasu v Ab konjugátech:

3, 3´, 5, 5´-tetramethylbenzidin
2,2´-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát) (ABTS)
o-fenylendiamin
o-dianisidin
o-toluidin

Používané substráty pro alkalickou fosfatasu v Ab-konjugátech:

4-nitrofenylfosfát

BIOSENSORY V KLINICKÉ BIOCHEMIE



BIOREKOGNIKAČNÍ VRSTVA

Biokatalytická

katalyzují přeměnu analytu v průběhu chemické reakce

Bioafinitní

analyt je specificky vázán ve vznikajícím afinitním komplexu

FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ PŘEVODNÍKY

poskytují signál k dalšímu zpracování

Elektrochemické:	potenciometrie
	amperometrie
	voltametrie
	konduktometrie
Optické:	fotometrie
	fluorometrie
	luminometrie
	nelineární optika

Piezoelektrické a akustické

Kalorimetrické

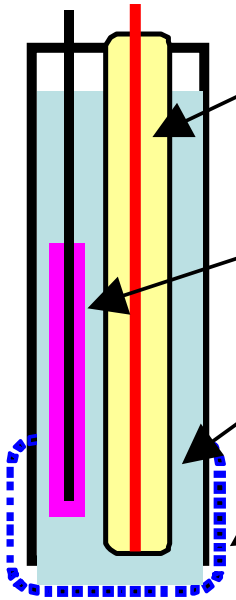
Nejčastěji používané biosensory v KB

- biokatalytické (amperometrické, potenciometrické)
- afinitní (nelineární optika, piezoelektrické)

Amperometrické biosensory v KB

- kyslíková elektroda (měření spotřeby O_2) enzymy oxidasy
- peroxidová elektroda (měření vzniku H_2O_2)

Měření kyslíku



- Clarkova kyslíková elektroda
- potenciál pro redukci kyslíku: -650 mV vzhledem Ag/AgCl
- Elektroda má předřazenu membránu propustnou pouze pro O_2

Elektrodová redukce kyslíku je čtyřelektronový proces:

$$O_2 + 2\,H_2O + 2\,e^- \longrightarrow H_2O_2 + 2\,OH^-$$

$$H_2O_2 + 2\,e^- \longrightarrow 2\,OH^-$$

Měření peroxidu vodíku

Anodická oxidace peroxidu vodíku
potenciál: +600 mV

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,e^- + 2H^+$$

- lze použít kyslíkovou elektrodu bez membrány
- Pt, Ir
- interference oxidabilních látek
  (např.v séru: kyselina askorbová, močová, paracetamol) – předřazení membrány

Enzymové elektrody s oxidasami

vznikají spojením kyslíkové nebo peroxidové elektrody s oxidasami jako biorekognikační vrstvou

Oxidasy: katalyzují oxidaci substrátu za vzniku H_2O_2 nebo vody

$$\text{Substrát} + O_2 \longrightarrow \text{Produkt} + H_2O_2$$

$$\text{Substrát} + O_2 \longrightarrow \text{Produkt} + H_2O$$

Přehled oxidas

Substrát oxidasy	Zkratka	EC číslo	koenzym	H_2O_2
Alkohol	AOD	1.1.3.13	FAD	ano
L-Aminokyseliny		1.4.3.2	FAD	ano
D-Aminokyseliny		1.4.3.3	FAD	ano
Askorbát		1.10.3.3	Cu	ne
Bilirubin	BRO	1.3.3.5		ne
Diaminy	DAO	1.4.3.6	Cu	ano
Fenol (Tyrosinasa)		1.14.18.1	Cu	ne
Galaktosa		1.1.3.9	Cu	ano
Glukosa	GOD	1.1.3.4	FAD	ano
L-Glutamát		1.4.3.11	FAD	ano
Choiln		1.1.3.17	FAD	ano
Cholesterol	COD	1.1.3.6	FAD	ano
p-difenoly (Lakasa)		1.10.3.2	Cu	ne
L-Laktát	LOD	1.1.3.2	FAD	ano
L-Laktát (dekarb.)	LMO	1.13.12.4	FMN	ne
L-Lyzin		1.4.3.14		ano
Monoaminy	MAO	1.4.3.4	FAD	ano
NADH				ano
Oxalát		1.2.3.4	Fp	ano
Pyruvát		1.2.3.3	FAD	ano
Sulfit		1.8.3.1	Mo	ano
Urát(Urikasa)		1.7.3.3	Cu	ano
Xanthin	XOD	1.1.3.22	Mo	ano

Biosensor pro glukosu

Enzymová elektroda na jedno použití

Dnes na českém trhu přístroj SeNOVA fa Abbott dovozce A. Import.cz spol. s r.o. pro domácí léčbu cukrovky

Sloučeniny, které mohou být stanoveny amperometrickými biosensory:

glukosa, laktosa, galaktosa,maltosa
cholesterol,alkohol, fenol, aminokyseliny,
dusíkaté látky (močovina, kyselina močová)
purinové báze, estery a amidy, triglyceridy,
fosfolipidy, penicilin, vitamín C

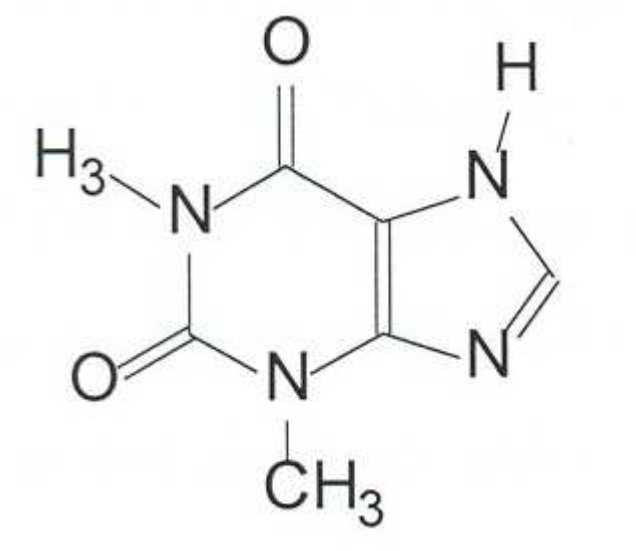
aktivita enzymů

laktátdehydrogenasa, α-amylasa, transaminasy,
arginasa

stanovení inhibitorů

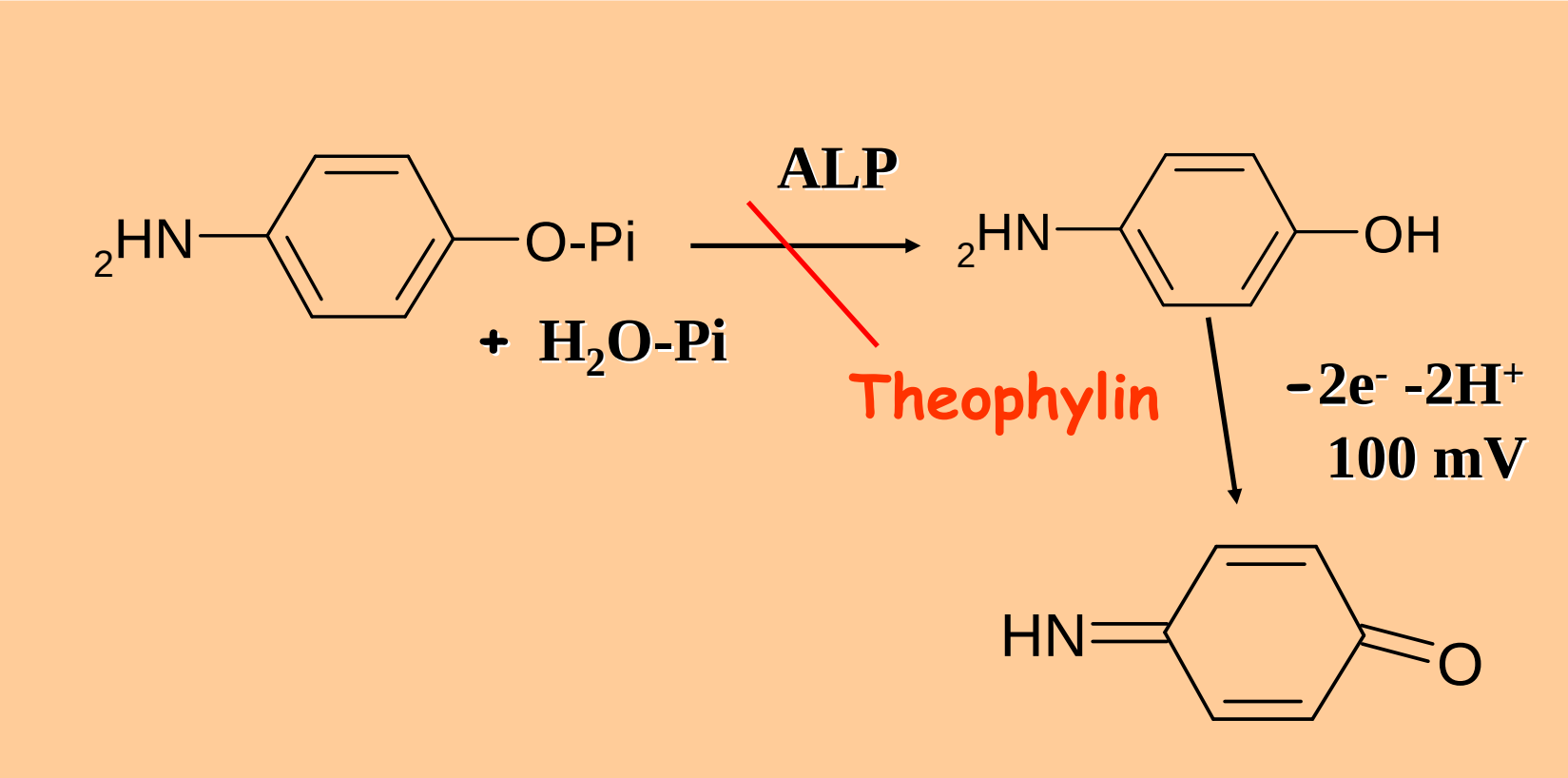
theophylin

Aplikace stanovení inhibitorů biosensory
Alkalická fosfatasa (EC 3.1.3.1, ALP)



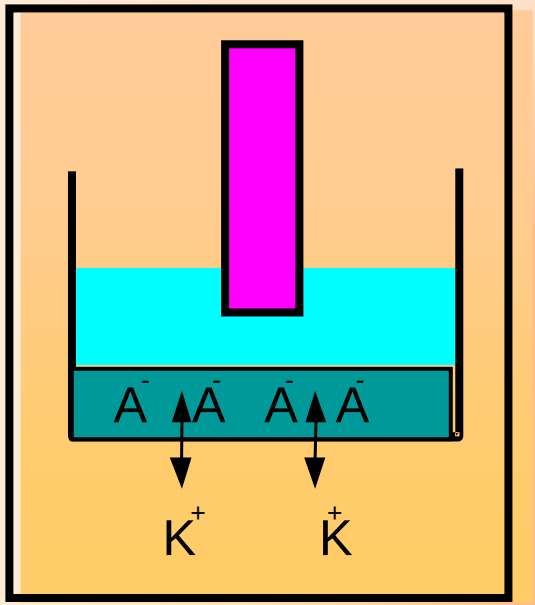
THEOPHYLIN učinkuje jako stimulátor centrální nervové soustavy, používá se jako bronchodilátátor (látka rozšiřující průdušky) k respirační stimulaci.
Terapeutická hladina v krvi: (10 až 20 mg/kg), je třeba sledovat, aby nedošlo k předávkování.

Stanovení theophylinu



Biosensor s ALP (hovězí jaterní isoenzym),
substrát: *p*-aminofenylfosfátu (PAPP)
Je akompetitivní. Pufr: Tris nebo diethanolamin.
Stanovení ve vzorcích krve (přímo), mez detekce je 5 μM

Potenciometrické biosensory



Základem potenciometrie je změna potenciálu na rozhraní elektrody s roztokem.

Převodníkem je iontově selektivní elektroda (ISE) v kombinaci s enzymovou vrstvou.

Potenciometrické biosensory

spojení potencimetrického sensoru s biorekognikační vrstvou

většinou jsou výhodnější amperometrické

příklady:

pH: penicilin (penicilinasa),
acetylcholin (cholinesterasa)
glukosa (glukosaoxidasa)
esterasy, nukleové kyseliny (nukleasy)

NH_3/NH_4 močovina (ureasa)
aminokyseliny (glutamátdehydrogenasa nebo oxidasa L-/D-aminokyselin)
nitrát, nitrit (bakterie)

CO_2 močovina (ureasa),
aminokyseliny (lysindekarboxylasa, tyrosindk)
laktát (laktát monooxygenasa-dekarboxylující)

I^- detekce H_2O_2 (peroxidasa)

F^- peroxid vodíku (peroxidasa-
oxidace fluorofenolu)

CN^- amygdalin (β-glukosidasa)

Afinitní sensory

princip

interakce antigenu a protilátky lze měřit kontinuálně

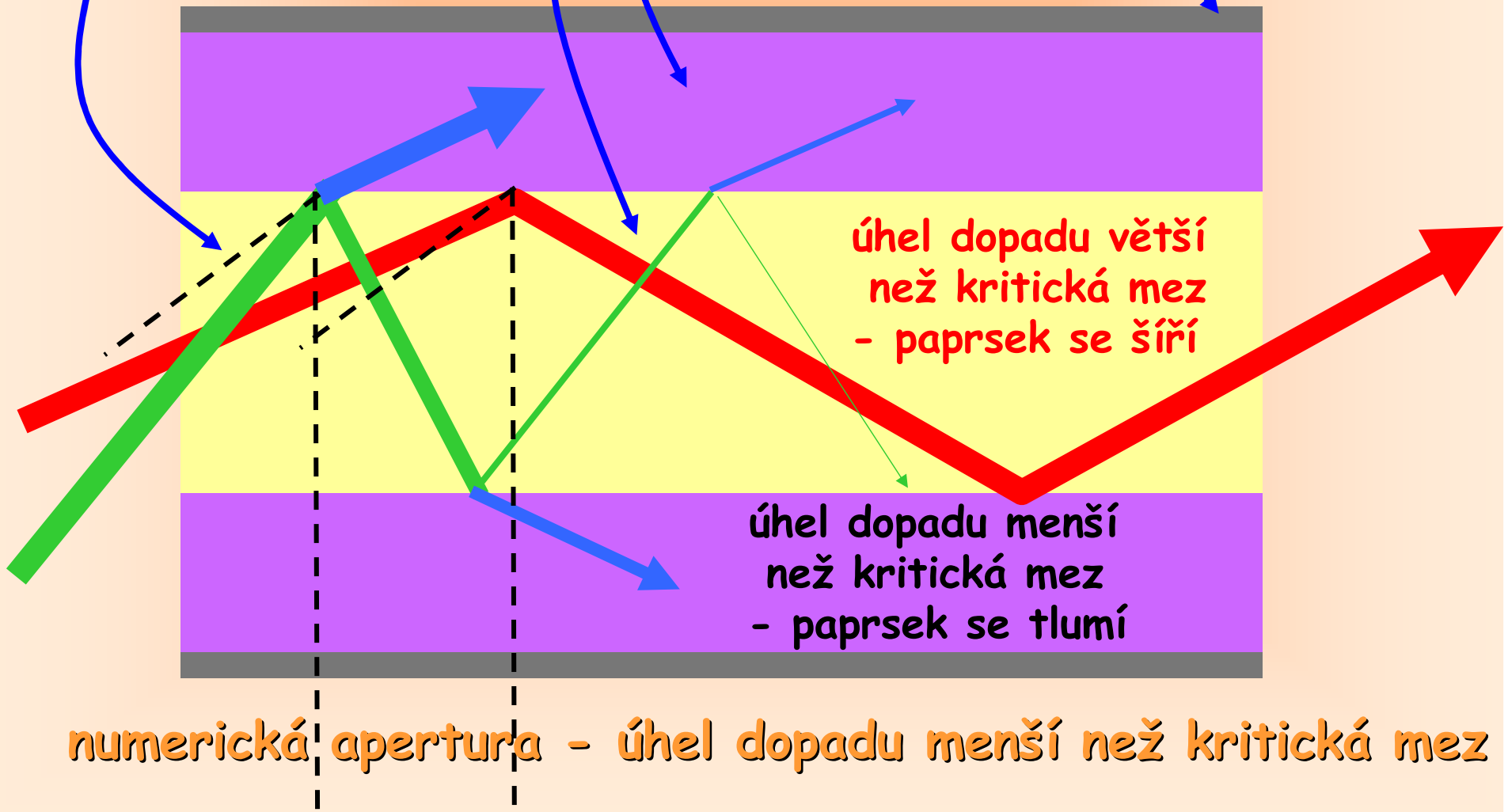
- **nelineární optika (optické vlákno)**
- **piezoelektrické biosensory**

Optická vlákna

Šíření paprsku ve světlovodu

jádro (core) - index lomu n_1
plášť (cladding) - n_2, $n_2 < n_1$
mechanický obal

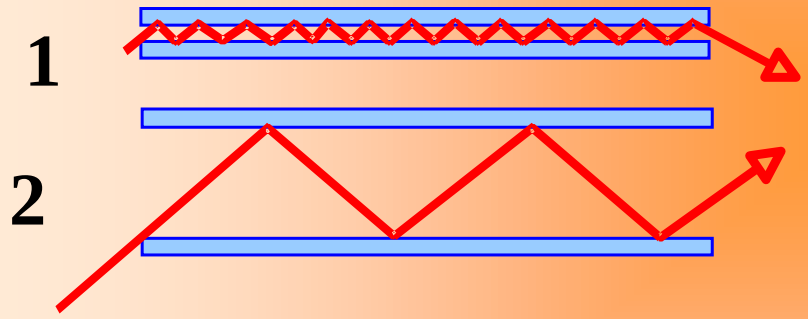
kritická mez



numerická apertura - úhel dopadu menší než kritická mez

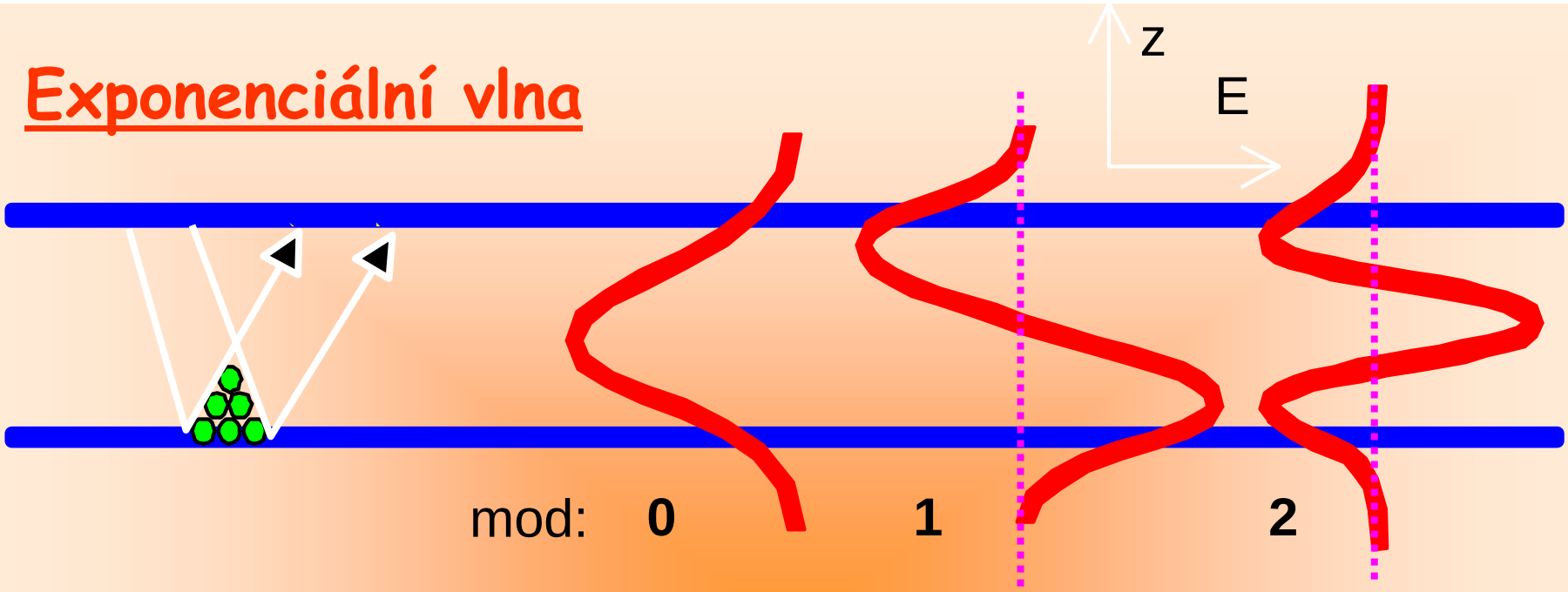
Nepřímé ozařování intrinsic sensing

optický vodič neslouží jen k pasivnímu vedení světla
chemické změny v okolí světlovodu se sledují
na základě změněných podmínek pro vedení světla
uvnitř světlovodu



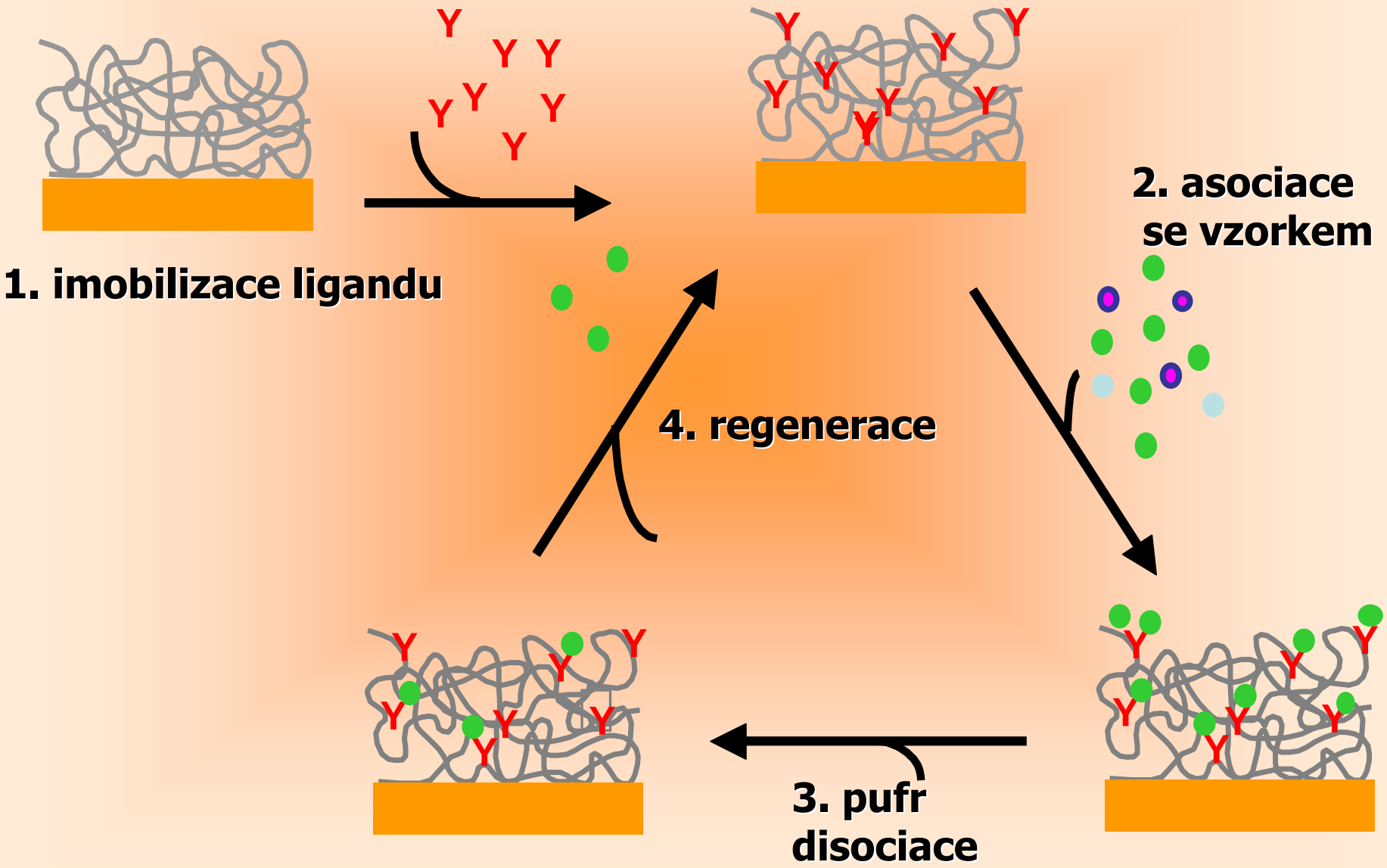
1. Velmi tenký světlovod (tloušťka asi vlnová délka světla), světlo se šíří v určitých diskrétních modech (více odrazů na jednotku délky)
2. Silný světlovod

Exponenciální vlna



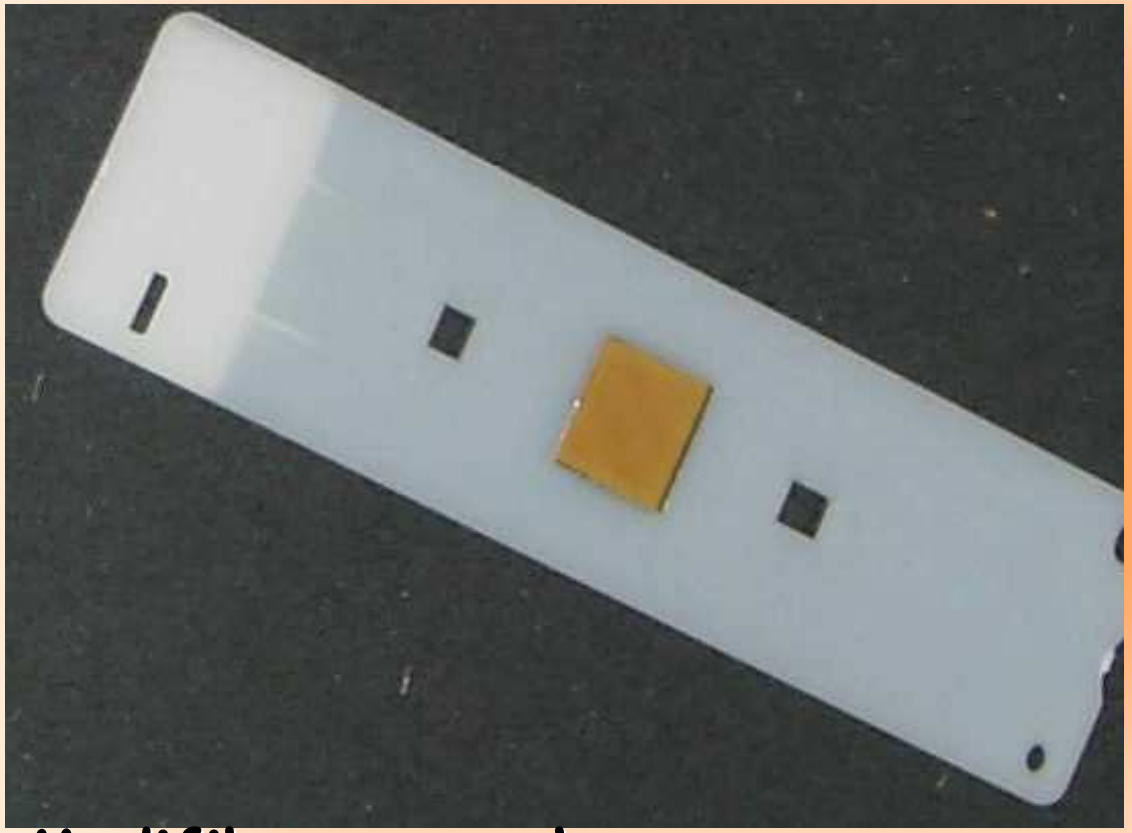
Při vedení světla uvnitř světlovodu dochází k interferenci mezi dopadajícím a odraženým světelným paprskem a tím vzniká elektromagnetické stojaté vlnění. tlumená (zhášivá) vlna (evanescent wave).

Schéma měření



SPR BIOSENSOR

čip systému BIACORE



Rozměry:
9 x 2,5 x 0,1 cm

citlivá vrstva:
napařené zlato

Modifikace povrchu:
CM5 karboxymethyl-dextran, HPA hydrofobní,
SA streptavidinový, NTA komplexace kovů

firma Pharmacia

Použití bioafinitních sensorů

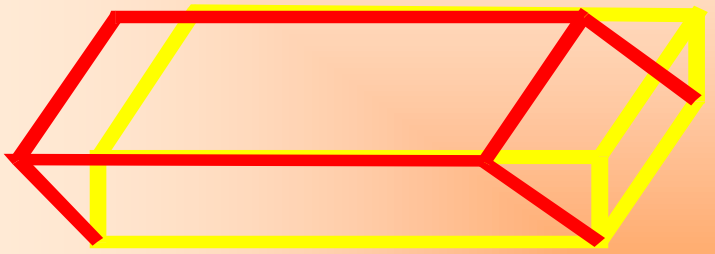
- ✓ Pomocí imobilizovaného ligandu lze stanovit odpovídající analyt.
- ✓ V séru je možné stanovit 1 až 100 μg/l pro proteiny při délce analýzy 10 minut.
- ✓ Studium bioafinitních interakcí (charakterizace protilátek,mapování vazebných míst).
- ✓ Kinetické studie (určování asociačních, disociačních a rovnovážných vazebných konstant).

Piezoelektrické sensory

Piezoeletrický efekt

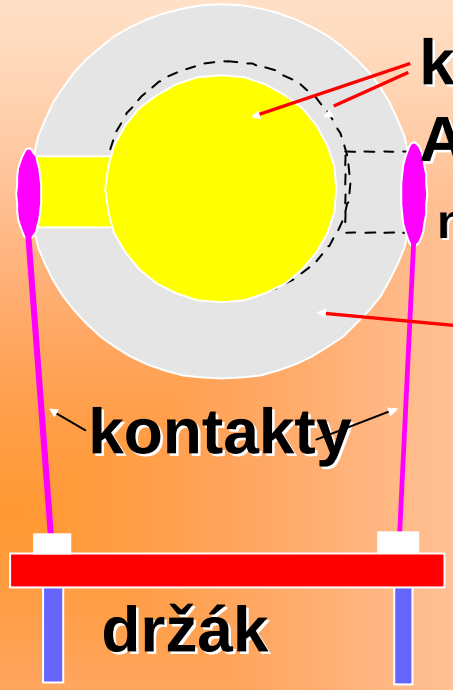
V některých anizotropních krystalech (křemen, turmalín, Rochellova sůl) se při mechanickém namáhání generují orientované dipóly a vznik elektrické napětí.
Tento efekt se uplatňuje i v obráceném smyslu:
Pokud se na krystal přivede střídavé napětí o vhodné rezonanční frekvenci, začne krystal se stejnou frekvencí vibrovat,přitom se převážná část energie (10^5 : 1) uchová v oscilujícím systému a nerozptyluje se do okolí.

Piezosensory - chemické mikrovážky



objemová akustická vlna - schéma tloušťkové střihové vibrace

základní stav / amplituda



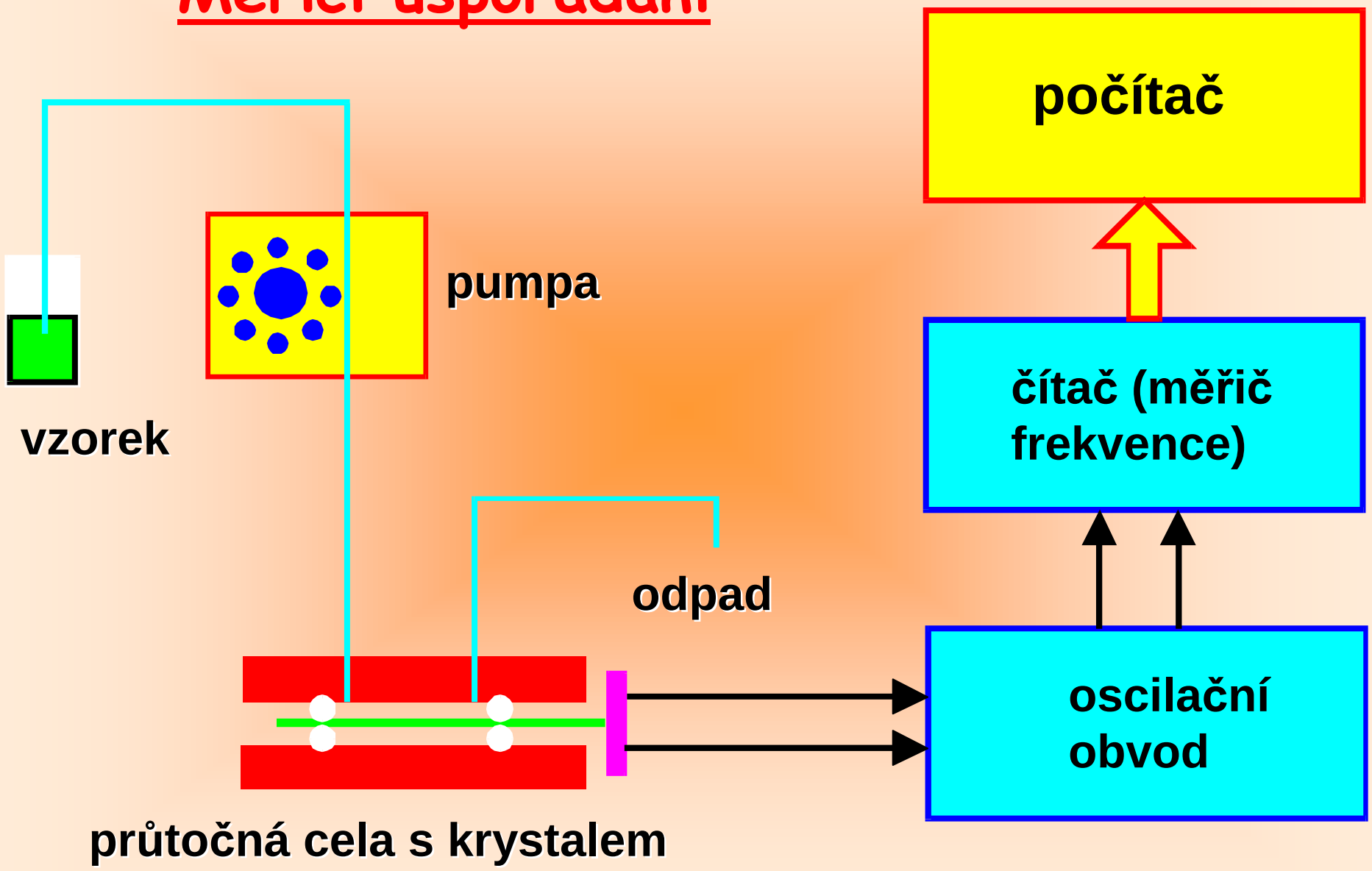
Piezoelektrický krystal

Hmotnostní citlivost:

QCM - quartz crystal microbalance

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

Měřící uspořádání



UKÁZKA MĚŘÍCÍHO ZAŘÍZENÍ

Biochemická laboratoř MU Brno, PřF, katedra biochemie

Výhody piezoelektrických biosensorů

- sledování afinitní interakce v reálném čase
- pokud ignorujeme viskozitu, rychlé měření
- levné měření, lehce dostupné v řádů desetitisíců korun (zařízení)