

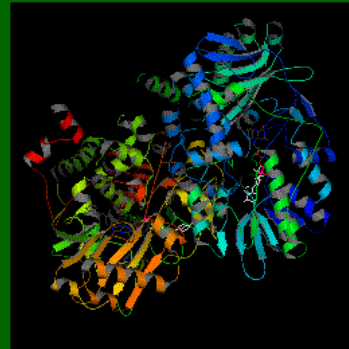
# **Bioanalytické metody v environmentální analýze**



# Enzymová analýza

## ■ Enzym

- chemický katalyzátor biologického původu syntetizovaný všemi organismy
- označují se jako „biokatalyzátory“
- bílkoviny jednoduché nebo složené
  - Složené: apoenzym + kofaktor
    - Kofaktor: vitamíny rozpustné ve vodě, některé nukleotidy, komplexy kovů atd.



Struktura enzymu  
monoaminoxidázy

# ■ Enzymová reakce

## 1. Tvorba komplexu „enzym – substrát“

- Substrát se váže na aktivní místo na apoenzymu

## 2. Aktivní místa mají mnoho společného u různých enzymů

- Trojrozměrné
- Jsou značně malé vůči celému enzymu
- Vypadají jako jamka, prohlubeň, kapsa
- Teorie „zámku a klíče“
  - Velmi stará, ale víceméně stále platná
- Teorie indukovaného přizpůsobení
  - Rukavice získá tvar až s vloženou rukou, zde získá aktivní místo podobu až se substrátem

## 2. Kinetika

- Dle počtu molekul podílejících se na tvorbě produktu označujeme reakci : mono-, bi-, a trimolekulární
  - $2A \longrightarrow P$
  - $A+B \longrightarrow P$
- Rychlost tvorby produktu  $v$  je dána rovnicí Michaelise a Mentenové:
  - $v = V [S] / K_m + [S]$  , kde  $[S]$  je konc.substrátu,  $V$  limitní rychlost a  $K_m$  Michaelisova konstanta

## 3. Vliv teploty

- S rostoucí teplotou roste reakční rychlost, ale současně se zvyšuje denaturace enzymu

# Enzymy jako analytická činidla

- Používají se pro stanovení substrátů, aktivátorů a inhibitorů
- Specifita používaných enzymů umožňuje stanovit většinu látek ve směsi bez jejich předchozího oddělení
- ALE riziko inaktivace až denaturace:
  - Teploty nad 40 C
  - pH nižší než 5 nebo vyšší než 9
  - Org.rozpouštědlo v konc. 3%>
  - Přítomnost O<sub>2</sub>, světlo, zbytky detergentu
  - kovové ionty ve vodě, fosfáty (živí mikroorg., které využívají enzymy)

# ■ Experimentální technika - 1

## ■ Stanovení substrátu:

### ■ Rovnovážnou metodou

- proměřením celkové změny koncového produktu či substrátu po dosažení rovnováhy
- produkt musí být odlišitelný od substrátu
- $\text{Etanol} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{alkoholdehydrogenasa}} \text{acetaldehyd} + \text{NADH} + \text{H}^+$

■

### ■ měření reakční rychlosti z průběhu reakce

- měří se změny fyzikálně-chemického parametru sledované látky (pH, absorbance, fluorescence apod.) se vynesou proti času
- směrnice je přímo úměrná reakční rychlosti
- vypočítává se z lineární části křivky
- měření r. rychlosti s fixní konc. a proměnným časem
  - sleduje se čas potřebný k dosažení předem stanovené koncentrace

## ■ Experimentální technika – 2

### ■ Stanovení substrátu:

#### ■ Kinetická metoda

- měření s r. rychlosti fixním časem a proměnnou koncentrací
  - měřeno po určitou dobu a pak změřena koncentrace jedné ze složek reakční směsi vhodnou fyzikálně-chemickou metodou

➤ výše zmíněné metody používáme ke stanovení: substrátu, iontů, koenzymů, inhibitorů, enzymové aktivity

➤ např.:

iont	enzym
Ca <sup>2+</sup>	alkalická fosfatasa
K <sup>+</sup>	fosfofruktokinasa
Mg <sup>2+</sup>	acetátkinasa

## ■ Experimentální technika – 2

### ■ Stanovení substrátu:

- Kinetická metoda

ko	
ADP	pyruvátkinasa
AMP	myokinasa
CoA	2-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa
FAD	oxidasa D-aminokyselin
FMN	laktátoxidasa
NAD	alkoholdehydrogenasa
NADH	laktátdehydrogenasa



# Metody měření enzymových reakcí

## 1. Úprava vzorku a podmínek měření

- Biologický materiál je nutno zpracovávat při teplotě 0-4 C
- Velice šetrná homogenizace
- Dále:
  - extrakce, odstranění lipidů a rozpuštěných plynů, filtrace, centrifugace, úprava pH a ředění vzorku
- Uskladněný vzorek může znehodnotit:
  - Oxidace, vysychání, naředění, činnost mikroorganismů

# Metody měření enzymových reakcí

## 2. Podmínky měření

- Postupným proměřováním se hledají
  - Zdlouhavé
- Výpočty pomocí PC
  - Nutno znát  $K_m$ ,  $V$ ,  $K_i$  a typ inhibice
- Hrubá optimalizace
  - Pro zjištění, které proměnné mají okrajový vliv a které jsou významné
  - Ve druhé fázi se optimalizují ty významné
  - Někdy může vysoká konc.substrátu působit inhibičně na enzym, nebo znemožní detekci produktů - nutné hledání kompromisu

# Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

- Manometrické metody
  - Předpoklad tvorby nebo spotřeby plynu
  - Podmínky:
    - Spotřeba nebo vývoj  $O_2$  tj. při reakcích katalyzovaných enzymy oxidoreduktasy (glukosaoxidas, peroxidasa, katalasa...)
    - Spotřeba nebo vývoj  $CO_2$  nebo  $NH_3$  tj. reakce katalyzované lyasami (karboxylasy, aspartasa ...)
    - Tvorba protonů nejčastěji odštěpením  $PO_4^{3-}$  tj. při reakcích kat. transferasami, hydrolasami
    - Dnes se tyto metody téměř nepoužívají

# Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

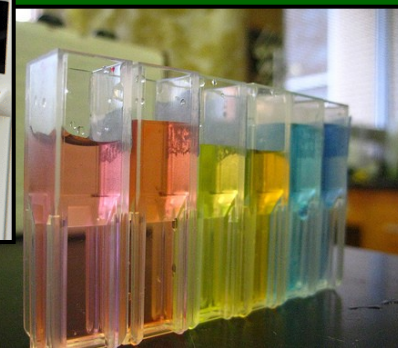
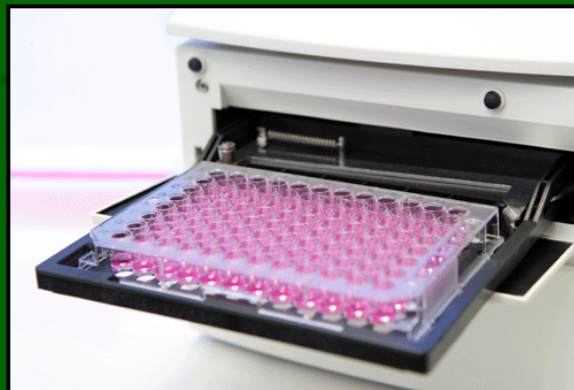
## ■ Spektrofotometrické metody

- Používají se tehdy, má-li některý z reaktantů nebo produktů výrazné absorpční maximum v UV, VIS nebo IR oblasti jímž se odlišuje od ostatních látek ve směsi
- Dává se přednost měření:
  - přírůstku před úbytkem
  - Při vlnové délce, v které absorbuje jen jedna složka směsi
  - Složky s větším molárním koeficientem ( $\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ )

# Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

## Spektrofotometrické metody

- Často používané ke sledování kofaktoru  $\text{NAD}^+$  neboť  $\text{NADH}$  silně absorbuje při vlnové délce 340 nm, zatímco  $\text{NAD}^+$  nikoliv
- Toho je využito pro stanovení substrátu: glukosa, laktát, ethanol, glutamát apod.



Spektrofotometr a Yvety

# Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

- Fluoroscenční metody
  - Založeno na tvorbě fluoreskující sloučeniny v enzymové reakci
  - až 2x citlivější než spektrofotometrické metody
  - Použití pro oxidační reakce:
    - reakce závislé na  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$
  - Pro hydrolytické reakce:
    - Nefluoreskující ester může poskytnout fluoreskující alkohol nebo amin
  - Nevýhody:
    - **Zhášení fluorescence** – vysoce absorbujícími molekulami, které odnímají energii
    - **Interferující látky** – fluoreskují ve stejné oblasti jako ta jež chceme stanovit

# Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

## Polarimetrické metody

- Měření optických isomerů
- Využití hlavně u reakcí oblasti cukerného metabolismu
- Výhodou je levné zařízení – pouze polarimetr s termostatovanou trubicí

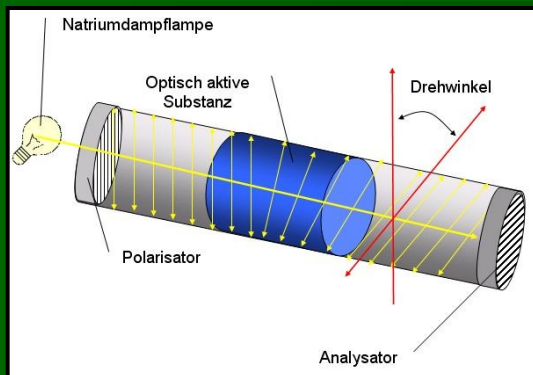


Schéma polarografu

# Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

## Elektrochemické metody

### Iontově selektivní elektrody

- Vzniká-li při reakci mnoho kyselin (změny konc. vodíku), používají se skleněné elektrody
- Udržuje se pH v konst. hodnotách a měří se k tomu množství potřebného hydroxidu nebo kyseliny (princip pH-statů)
- Existují  $O_2$ ,  $NH_3$  i  $CO_2$  elektrody, měří se spotřeba či uvolňování příslušného plynu
- Metoda se volí u oxidačních reakcí, kde se uplatní flavinové enzymy, dále dekarboxylace oxokyselin a aminokyselin

### Potenciometrické metody

- Vhodné pro kinetická měření, dochází-li k rozštěpení substrátu
- Musí být odlišný redox potenciál jednoho z produktů a substrátu
- $A \xrightarrow{\text{enzym}} C + D$
- Příklad: rozklad cholinesterasou thiolesteru cholinu
- Měří se potenciální rozdíl mezi dvěma platinovými elektrodami polarizovanými nízkým proudem



# Fyzikální a fyzikálně-chemické metody

- Elektrochemické metody
  - **Amperometrické m.**
    - Měří se změny proudu, způsobené oxidací hexakynoželeznatanu na hexakynoželezitan
    - Použitelné pro všechny reakce, kde vzniká peroxid vodíku
  - **Coulometrické m.**
    - Měří se kvantum prošlého náboje roztokem během enzymové reakce
    - Při primární coul.analýze je stanovovaná složka oxidována nebo redukována na jedné z elektrod
    - O sekundární se jedná, reaguje-li stanovovaná látka kvantitativně v roztoku s produktem elektrolýzy
  - **Někdy též polarografie**
    - Jako metoda spolupracující s enzymovými metodami

# Imobilizované enzymy v analytice

## ■ V kolonovém uspořádání

- Substrát, který má být analyzován, protéká kolonou a je přeměňován na produkt
- Produkt nebo vstupní reaktanty jsou kontinuálně proměřovány (spektrofotometricky, iontově selektivními el., ...), nutné tedy průtokové uspořádání
- Výhodou je, že kolona může být využita opakovaně pro několik set až tisíc analýz

### ■ Příklad:

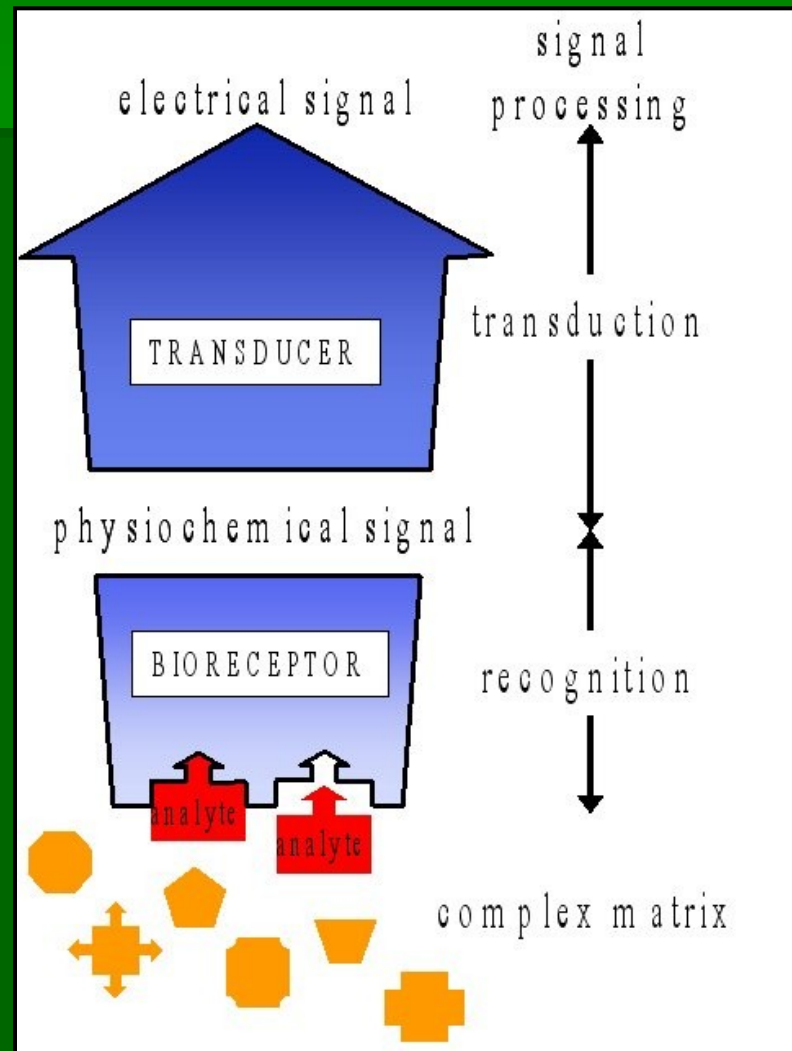
- Stanovení glukosy v krvi a moči pomocí glukosaoxidasy imobilizované na skleněných perlách. Úbytek kyslíku ze systému je monitorován Clarkovým kyslíkovým článkem
- Močovina  $\xrightarrow{\text{ureasa}}$   $\text{NH}_3 + \text{CO}_2$  (uvolňovaný amoniak se měří potenciometrickou reaktorovou el.)

# Imobilizované enzymy v analytice

## Enzymové thermistory

## Biosenzory

- Potenciometrické enz.elektrody
- Amperometrické enz.elektrody
- Buněčné a tkáňové elektrody
- Imunoafinitní biosenzory



Princip biosenzorů

# Imobilizované enzymy v analytice

## ▪ Enzymové thermistory

- princip této metody je založený na tom, že každá enzymová reakce uvolňuje jiné kvantum tepla (50-100 kJ/mol)
- skládá se z kolony s fixovaným imobilizovaným enzymem a thermistory na vstupu i výstupu, které měří vzniklé teplo
- konc. substrátu získáme porovnáním výsledku měření s výsledky vzorků se známým složením
- citlivost měření dosahuje až  $\mu\text{mol/litr}$
- nutné thermistor izolovat od vnějších interferujících faktorů, proto je thermistor v kovovém obalu a měří se ve vodném ultrathermostatu
- nemožnost dokonalé izolace je také důvodem, proč tato metoda zatím nedostála širšího uplatnění v praxi

# Imobilizované enzymy v analytice

## ▪ Biosenzory

- jedněmi z mála komerčně využívaných biosenzorů jsou senzory na elektrochemickém principu, resp. **enzymové elektrody**, které mají na elektrochemickém čidle zachycený imobilizovaný enzym

### ▪ **enzymové elektrody**

- enzym v im.formě je umístěn na čidle, které proměřuje úbytek reaktantu (úbytek O<sub>2</sub> při oxidaci glukosy) nebo vznikající produkt (CO<sub>2</sub> při dekarboxylaci AMKs)
- výhodou je používání elektrody dokud je enzym aktivní
- stanovovaná látka difunduje do vrstvy, v níž je vázán enzym, takže dojde k enzymové reakci, změny jsou proměřeny a zaznamenány
- možnost vázání enzymu na „sítky“, tudíž pak lze využít komerční elektrodu pro více enzymů

### ▪ **imobilizace enzymu**

- nejvýhodnější je kovalentně vázaný enzym, který snese 100 – 10 000 měření, je však náročné ho připravit
- snazší je zachycení do matrice gelu
- jsou i komerčně dostupné již hotové enz.elekt.

# Imobilizované enzymy v analytice

## ▪ Biosenzory

### ▪ způsoby upevnění enzymu na elektrodu

- upevnění překrytím dialyzační membránou:
  - rozpuštěný nebo imobilizovaný enzym je v blízkosti elektrody udržován tak, se překryje membránou (celofánem)
  - stabilní vydrží asi jeden týden
- fyzikální zachycení na povrchu:
  - na nylonovou či silonovou síťku se rozestře gel s enzymem a nechá se zpolymerovat
  - síťka se pak mechanicky (gumičkou) fixuje na elektrodu
  - síťky se dají snadno měnit
- přímá polymerace na povrchu elektrody
  - gel s enzymem zpolymeruje přímo na elektrodě
  - elektrodu pak ale není možno používat pro jiná měření

# Imobilizované enzymy v analytice

## ▪ Biosenzory

### ▪ Potenciometrické enzymové elektrody

- použití u těch reakcí, v nichž je produktem  $\text{NH}_3$  (nebo amonné ionty) či  $\text{CO}_2$
- jejich aktivitu měří vnitřní elektroda, což je obvykle plynová sonda nebo nonaktivní iontově selektivní el. pro amonné ionty
- patří sem především enz. el. pro stanovení močoviny, L-AMK
- dále el. pro stanovení amygdalinu, která využívá enz.  $\beta$ -glukosidasu, jež uvolňuje z molekuly amygdalinu kyanovodík, který je měřen kyanidovou indikační el.

### ▪ Amperometrické enz. el.

- kratší doba odezvy i doba regenerace než potenc.enz.el.
- nejčastěji užívaná pro stanovení glukosy s imobil. glukosaoxidasou

# Imobilizované enzymy v analytice

## ▪ Biosenzory

### ▪ Buněčné a tkáňové enzymové elektrody

- na el. se fixují celé buňky mikroorganismů nebo jejich organely
- často jsou mikroorg. fixovány v polyakrylamidovém gelu
- indikační el. bývá Clarkova kyslíková elektroda
  - ke stanovení EtOH, octové kys., cholesterolu, steroidních hormonů, ale též pro BSK (biologická spotřeba kyslíku)
- někdy se funkce org. Kombinují
- pomocí mikrosomů z krysích jater se stanovuje NADPH, NADH, G6P a askorbová kyselina
- u tkáňových el. se připevňují na elektrodu celé tkáně
- zde je důležitý azid sodný, brání mikrobiálnímu rozkladu tkání
- výhodou těchto metod je větší stabilita enzymů (brání je buněčné prostředí), o to je ale reakce pomalejší a dochází k interferenčním reakcím s enz. komplexy v buňkách



# Imobilizované enzymy v analytice

## ■ Biosenzory

### ■ Imunoafinitní biosenzory

- principem je interakce ligand (analyt) – bílkovina
- nejrozšířenějším případem těchto biosenzorů jsou takové využívající interakce antigen-protilátka
- jakmile se na protilátku naváže antigen nacházející se v roztoku, náboj se změní
- změnu náboje je možné změřit potenciometricky proti referenční elektrodě ponořené do stejného roztoku, rozdíl obou potenciálů je úměrný koncentraci antigenu v roztoku
- Analogicky stejně způsobem funguje antigenová el. k měření protilátek
- Detekční limity se pohybují v řádu jednotek až desetin ng/ml
- Vývoj v této oblasti již umožnil vyvinout čipy, tj. senzory, jež lze vpravit do buňky a měření provádět přímo in vivo

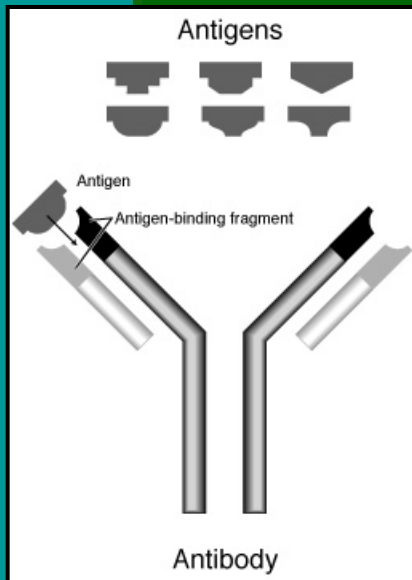
# Imunochemické metody

## ■ Immunoprecipitační metody

- Interakcí rozpustného antigenu (AG) s protilátkou (Ab) vzniká nerozpustný precipitát
- Immunoprecipitační reakce může probíhat buď v roztoku nebo v gelovém prostředí

## ■ Immunoprecipitace v roztoku

- Meří se nefelometricky nebo turbidimetricky zákal roztoku s AG, jež je úměrný konc. AG v roztoku
- Tato metoda je již automatizována např. centrifugální rychloanalyzátor s laserovou detekcí



Protilátka a antigeny

# Imunochemické metody

- Immunoprecipitace v gelovém prostředí
  - Tato metoda je založena na rozdílné rychlosti difuze v gelu
  - Rychlost ovlivňuje koncentrace, fyzikálně chemické vlastnosti, struktura látek a vlastnosti gelu
  - Difunduje-li v gelu pouze jedna složka (AG nebo Ab) jedná se o jednoduchou imunodifuzi, pokud obě jedná se o dvojitou
  - gelem bývá nejčastěji agar nebo agarosa
- Dvojitá imunodifuze - dále dělíme na:
  - Radiální
  - Imunoelektroforéza
  - Protisměrná imunoelektroforéza
- Jednoduchá imunodifuze - dále dělíme na:
  - Lineární
  - Radiální
  - Elektroimunodifuze
  - Dvourozměrná imunoelektroforéza

# Imunochemické metody

## ■ Citlivé imunochemické techniky

- detekci antigenů lze zcitlivět označením jedné z reagujících složek značkou
- k označení lze použít radionuklidy, enzymy, fluorescenční a luminiscenční činidla aj.
- citlivější metoda než měření zákalu precipitátu

### ■ Radioimunoanalýza

### ■ Enzymová imunoanalýza

### ■ Systém avidin-biotin

### ■ Další značky používané v imunoanalytických metodách

- Luminiscenční
- Fluorescenční
- Stabilní volné radikály (spinová značka)
- Atomy kovů
- Jiné značky
  - Stabilní nuklidy, koenzymy, chromofory, bakteriofágy aj

# Imunochemické metody

## ■ Citlivé imunochemické techniky

### ■ Radioimunoanalýza (RIA - radioimmunoassay)

- Spojuje specifitu imunochemických stanovení s vysokou citlivostí metod používajících radionuklidy
- Stanovit lze všechny látky, které jsou schopny vyvolat imunologickou odpověď, tj. tvorbu protilátek v organismu
- Jsou to:
  - Peptidy
  - Bílkoviny
  - Enzymy
  - Nukleoproteiny
  - Mikroorganismy
  - Hapteny (po navázání na makromolekulární nosič)
- Metoda se stala značně univerzální – stanovuje se celá řada látek
- Metoda je stará více jak 40 let

# Imunochemické metody

- Citlivé imunochemické techniky
  - Radioimunoanalýza (RIA - radioimmunoassay)
    - Metoda je založena na soutěži mezi radioaktivně označenými antigeny a antigeny ze vzorku při vazbě na specifickou protilátku
    - Po ustavení rovnováhy se oddělí protilátka s navázanými antigeny označenými i ze vzorku
    - Změří se radioaktivita, jejíž množství je nepřímo úměrné koncentraci antigenu ze vzorku
  - Značení AG
    - Na peptidy se používá převážně radionuklid  $^{125}\text{I}$
    - Na hapteny  $^3\text{H}$  (tritium), ale také  $^{125}\text{I}$

# Imunochemické metody

## ■ Citlivé imunochemické techniky

### ■ Enzymová imunoanalýza – EIA

- místo radionuklidu se jako značky využívá enzym
- V některých modifikacích může být označena i protilátka
- EIA heterogenní
  - Kompetitivní
    - Soutěží antigen značený enzymem a antigen ze vzorku
    - Heterogenní proto, že je nutné separovat komplex „protilátka-navázané AG“ od nenavázaných AG
    - Kompetitivní proto, že dochází k soutěži mezi značeným a neznačeným AG
    - V literatuře se vyskytuje nejčastěji pod zkratkou ELISA
  - Nekompetitivní
    - První fáze: na Ab, jenž je imobilizovaná např. na stěně zkumavky, se naváže AG ze vzorku
    - Druhá fáze: po promytí systému, se na AG vychytaný ze vzorku naváže další Ab, která je značena enzymem
    - Tuto metodu lze použít, pouze je-li AG polyvalentní
    - Tato varianta je méně přesná

# Imunochemické metody

## ■ Citlivé imunochemické techniky

### ■ Enzymová imunoanalýza – EIA

#### ■ EIA homogenní

- AG se kovalentně naváže na enzym v blízkosti aktivního centra
- Ab při interakci s AG „zakryje“ nejen molekulu AG, ale i vazebné místo enzymu, jenž se stává inaktivní
- Je-li přítomen AG ze vzorku, potom se naváže na Ab a část konjugátu AG-enzym zůstane volná a enzym tudíž aktivní
- Aktivita enzymu je pak úměrná množství antigenu ve vzorku
- Výhodou je, že se nemusí oddělovat komplex AG-Ab od volného AG, což umožňuje použití automatů
- Doba stanovení činí pouze minuty
- Nevýhodou je, že se podařilo stanovit pouze hapteny
- Tato metoda bývá označována jako EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique)



# Imunochemické metody

- Citlivé imunochemické techniky

- Enzymová imunoanalýza – EIA

- Používané enzymy – kritéria pro výběr

1. Co nejnižší MW
2. Schopnost vazby na Ab nebo AG a mít vhodné funkční skupiny
3. Co nejvyšší specifická katalytická aktivita
4. Stabilita
5. Dostatečná čistota bez interferujících příměsí
6. Produkt enzymové reakce musí být snadno detekovatelný i ve velmi nízkých koncentracích
7. Musí být dostupný a levný

# Imunochemické metody

- Citlivé imunochemické techniky

- Enzymová imunoanalýza – EIA

- Používané enzymy
  - EMIT: lysozym, malátdehydrogenasa a G6P-dehydrogenasa
  - ELISA: křenová peroxidasa, sérová alkalická fosfatasa, beta-D-galaktosidasa mikrobiálního původu, glukosaoxidasa mikr.pův., glukoamylasa, karboanhydrasa, acetylcholinesterasa
- Za optimálních podmínek se detekční limity enzymové imunoanalýzy blíží metodě RIA, takže lze prokázat v jedné zkoušce pmoly až fmoly látek



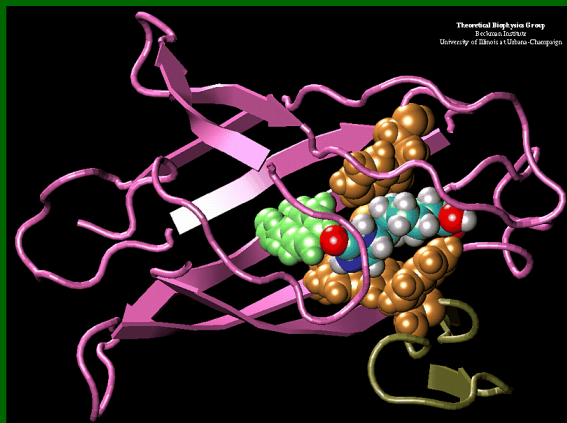
Klasická 96-jamková mikrodestička pro test ELISA

# Imunochemické metody

## ■ Citlivé imunochemické techniky

### ■ System avidin-biotin

- **Biotin:** nízkomolekulární, snadno dostupný, ve vodě rozpustný vitamin, díky snadné modifikaci je možné ho zavádět přímo do molekul různých proteinů, díky malé MW (244) neovlivňuje enzymovou aktivitu, s glykoproteinem vaječného bílku avidinem vytváří neobyčejně pevné komplexy
- **Avidin:** s MW (68.000) má 4 vazebná místa pro biotin, často bývá pro nedostatky nahrazen streptavidinem, který nemá cukernou složku a má neutrální pI
- Výhodou spojení těchto dvou látek je, že biotin jako nízkomolekulární látka j minimálně ovlivňuje imunoreaktivitu protilátky, použití této značky vede tedy ke zvýšení citlivosti metody a ke zkrácení inkubačních časů



Avidin-biotin komplex

# Imunochemické metody

## ■ Citlivé imunochemické techniky

### ■ Další značky používané v imunoanalytických metodách

#### 1. Luminiscenční

- Některé molekuly mají schopnost využít chemickou energii, aby se uvedly do excitovaného stavu
- Získanou energii potom vyzáří v podobě fotonů (luminiscence)
- Používá se luminol (3-aminofthalhydrazid) a jeho deriváty
- Po imunochemické interakci a separaci reagují značené sloučeniny s ox.čínidlem ( $H_2O_2$ ) a katalysátorem (hemin, laktoperoxidasa, kobaltové nebo měďnaté ionty) a pak jsou měřeny emitované fotony luminometrem
- Často používanou značkou jsou také arylderiváty esterů akridiniové kyseliny
- Někdy lze těmito metodami docílit ještě nižších detekčních limitů než s enzymovými nebo radionuklidovými značkami
- Předností těchto značek je dobrá stabilita
- Nevýhodou je že mnohý stanovovaný biol.materiál při chemiluminiscenci interferuje

# Imunochemické metody

## ■ Citlivé imunochemické techniky

### ■ Další značky používané v imunoanalytických metodách

#### 2. Fluorescenční

- měří se fluorescence, která vzniká při ozáření značky zářením vhodných vlnových délek
- měří se fluorescence separovaného komplexu AG-Ab
- používané značky jsou fluorescein, isothiokyanát, rhodamin, umbelliferon, dansyl chlorid, deriváty pyrenu a cheláty vzácných zemin

#### 3. Stabilní volné radikály (spinová značka)

- při tvorbě el.párů se jejich spiny ruší
- některé atomy mají nepárové el., které jsou-li vneseny do magnetického pole určité intesity a pak excitovány zářením, adsorbovaná energie způsobuje přechody nenulových mag.momentů na vyšší energ.stavy
- adsorpce nepárových el. může být ovlivněna změnami v jejich bezprostředním okolí jako se to stává při vazbě Ab na determinantní skupinu AG
- tyto změny je možné stanovit v EPR spektroskopu

#### 4. Atomy kovů

- obsah kovu (např. Au, Ag, Ba ...) se kvantifikuje pomocí atomové absorpční spektrometrie

# Využití imunometod v analytice

- Uplatnění v biologii, biochemii, mikrobiologii, cytologii, histochemii, ale i v potravinářském a zemědělském výzkumu
- Stanovení bílkovin a enzymů
  - Stanovení Bromelainu, ficinu, papainu, avidinu (bílkovina vaječného žloutku, který specificky váže biotin)
- Stanovení peptidových toxinů
  - Metody RIA umožňují stanovit nanogramová množství enterotoxinů v 1g potraviny, vypracovanými postupy je možné enterotoxiny stanovit i v masných, mlékárenských výrobcích, sušených polévkách, bramborech a dalších, díky RIA stanovujeme i endotoxiny E.coli
- Stanovení nízkomolekulárních látek (haptenu)
  - Stanovení steroidních hormonů v humánní i veterinární medicíně
  - Popsány RIA metody pro stanovení kys.pantothenové, listové, kobalaminů a biotinu
  - Průkaz estronu, progesteronu v telecím mase
  - RIA metody umožňují i studium hladiny povolených hormonů a veterinárních léčiv, dále stanovení oxytocinu v mléce a mléčných výrobcích nebo stanovení prostaglandinů a jejich metabolitů
  - Průkaz penicilinu v různých tekutinách zvláště v mléce i dalších antibiotik jako: gentamycin, tobramycin a amikacin

# Využití imunometod v analytice

- Stanovení nízkomolekulárních látek (haptenu)
  - Dnes stanovení i pesticidů a jejich residuů (paraquat, který slouží k ochraně jahod a chmelu)
  - Stanovení alfatoxinů, mykotoxinů
  - Stanovení některých látek s kancerogenním nebo mutagenním účinkem
  - Stanovení ethylkarbamátu (ve víně) či benzpyrenu (v potravinách)
- Zhodnocení a perspektivy citlivých immunochemických technik
  - Vzhledem k vysoké specifitě, citlivosti i relativně snadnému provedení, umožněnému komerční výrobou analytických souprav, našly citlivé immunochemické techniky, zvláště pak RIA a ELISA, rozsáhlé uplatnění v diagnostice humánní a veterinární medicíny, v základním výzkumu různých biologických věd (potravinářské a zem. analytice), ale i v ekologii při stanovení různých škodlivin, další předností je automatizace analýzy a tak možnost zpracovat stovky vzorků.
  - Imunometody jsou zvláště vhodné pro hromadné vyšetřování vzorků, pro případy potřeby analyzovat desítky až stovky vzorků denně
  - Nejoblíbenější jsou enzymové immunoanalýzy, neboť enzymové konjugáty mají dlouhou životnost, přičemž náklady jsou nejnižší

# Přednosti a omezení imunometod

- Přednosti
  - Lze stanovit od bisubstituovaného benzenu až po biopolymery
  - Specifita
  - Citlivost
  - Jednoduchost provedení
  - Možnost velkých vzorků
- Omezení
  - Neumožní stanovit menší molekuly
  - Křížové interakce
  - Interference
  - Zdlouhavá příprava protilátek
  - Ojedinelé analýzy



# ELISA

## ▪ Popis testu

- je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek.
- metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat i antigen
- využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů, schopnost proteinů (tedy imunoglobulinů) vázat se na povrch umělých hmot (např. polystyrenu) a schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul.
- pro průkaz specifických protilátek i antigenů existuje široké spektrum různých modifikací ELISA testu:
  - **Přímá ELISA** - pro detekci antigenu
  - **Nepřímá ELISA** - pro deteci specifických protilátek
  - **Přímá sendvičová ELISA** - pro detekci antigenu
  - **Nepřímá sendvičová ELISA** - pro deteci specifických protilátek

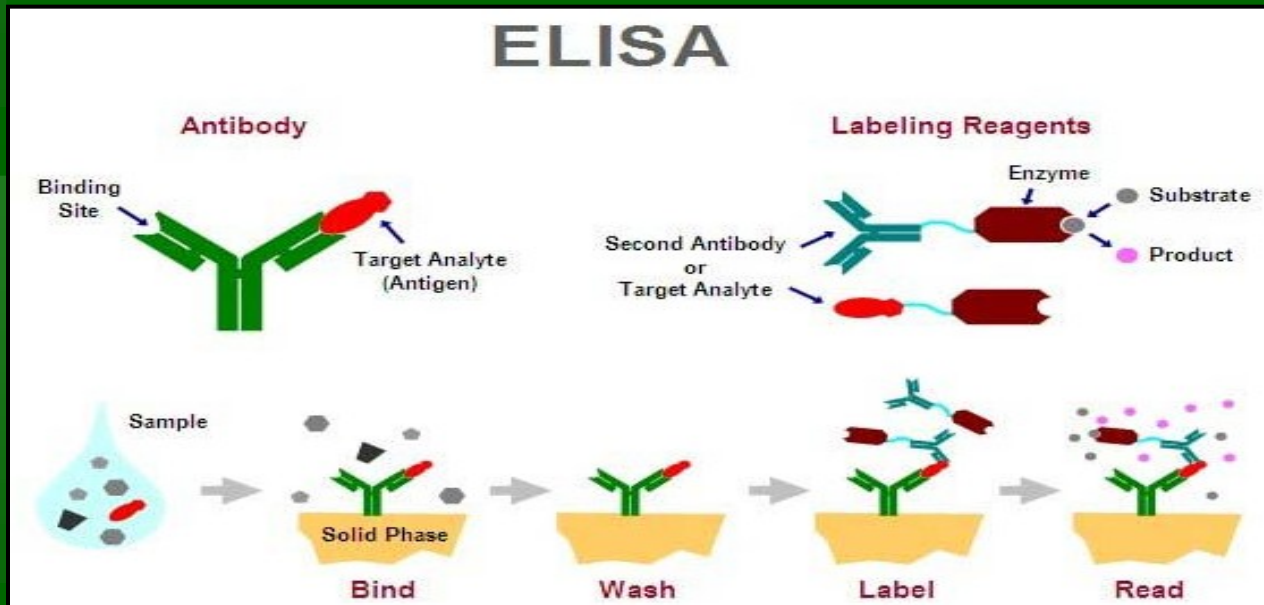
## ▪ Základní složky ELISA testu

- **Konjugát**
  - jedná se opět o protilátku proti protilátce (konkrétně proti druhově specifickým imunoglobulinům příslušného izotypu (proti IgG, IgM, IgA ..), na kterou je navázaný enzym (konjugovaná enzymem)
- **Substrát**
  - je chemická látka, která reaguje s enzymem a tím změní svou barvu

# ELISA

## ■ Praktické použití

- metody ELISA se využívají k diagnostice infekčních nemocí člověka a zvířat
- stanovují se buď protilátky proti konkrétnímu patogenu nebo se detekují přímo prionové, virové, bakteriální, parazitární antigeny
- dále se používají k detekci některých toxinů, hormonů, celé řady proteinů, případně dalších bioaktivních látek



Průběh testu  
ELISA

# Literatura

- Bioanalytické metody
  - Doc.Ing.Blanka Králová CSc.
  - Prof.Ing. Pavel Rauch, DrSc.
- Metody enzymové analýzy, Sevac, Praha 1987 (Maňchal P.)