

# **Metody značení a imobilizace biomolekul**

---

**Petr Skládal**

**Ústav biochemie PŘF MU  
Kamenice 5, Brno**

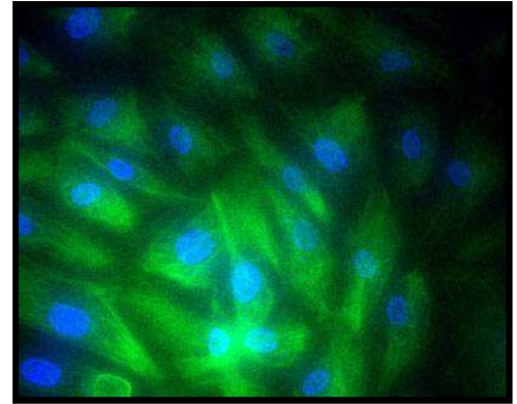
**skladal@chemi.muni.cz**

**<http://biosensor.chemi.muni.cz/edu/mib>**

## Úvod

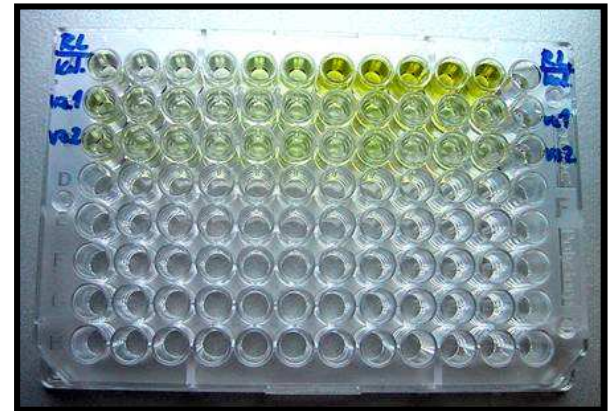
### ■ modifikace biomolekul:

- vzájemné spojování
- zavádění vhodných značek
- navázání na pevný povrch (separační materiály, mg. částice, sensory, ...)



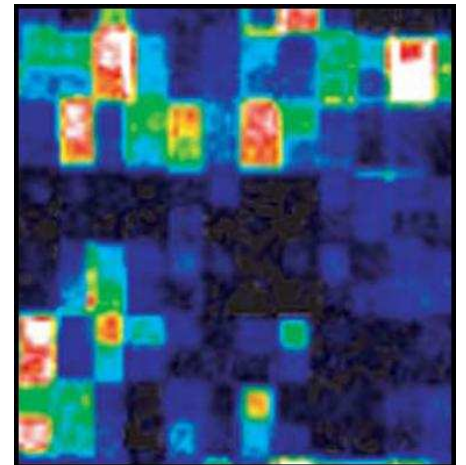
### ■ základ řady moderních:

- vědeckých výzkumných metod
- bioanalytických procesů
- terapeutických postupů



### ■ často zmiňovány jen okrajově

- cílem přednášky je podat ucelený pohled na tuto problematiku



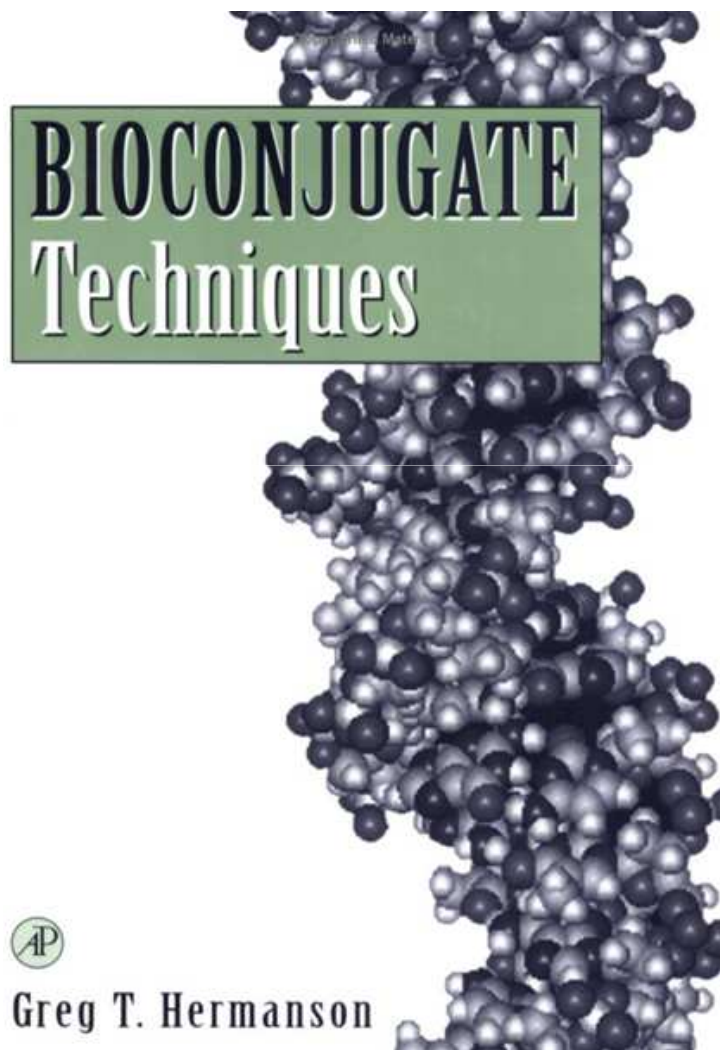
# **Souhrn přednášky**

- 1. Modifikace proteinů a peptidů.**
- 2. Funkční skupiny nukleotidů, modifikace DNA a RNA. Modifikace (poly)sacharidů.**
- 3. Chemické reakce vybraných skupin biomolekul.**
- 4. Biokonjugační reakce, zesítující činidla. Štěpitelné můstky.**
- 5. Fluorescenční značky.**
- 6. Biotinylace, chelatační skupiny, histidinové skupiny, boronátové komplexy. Radioaktivní značení. Liposomy, nanočástice.**
- 7. Enzymové značky, metodiky značení a detekce aktivity.**
- 8. Imobilizace biomolekul. Aktivace matric, polymerní materiály, porézní skleněné nosiče.**
- 9. Aktivace povrchu zlata, platiny, uhlíku a křemíku. Spontánní vznik monovrstev, fotoaktivace.**
- 10. Charakterizace biokonjugátů - stupeň substituce, povrchová hustota ligandu.**
- 11. Aplikace: konjugace haptenu s nosiči, značení protilátek.**
- 12. Aplikace: imobilizace proteinů na povrch zlata, příprava DNA biočipů.**

# Literatura

- **P. Skládal: Metody značení a imobilizace biomolekul. Elektronický text (PDF), MU Brno, 2007.**
- **Lowe C.R., Dean P.D.G.: Afinitní chromatografie. SNTL, Praha 1979.**
- **Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K.: Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, San Diego, CA, 1992.**
- **Hermanson G.T.: Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego, CA, 1996.**
- **C.M. Niemeyer: Bioconjugation Protocols, Strategies and Methods. Humana Press, Totowa, NJ, 2004**
- **internetové zdroje - webové stránky dodavatelů reagensů (Pierce, Sigma, ...)**

# Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K.: Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, San Diego, 1992.



## **PART I**

### Bioconjugate Chemistry

- |                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 1. Functional Targets               | 3   |
| 2. The Chemistry of Reactive Groups | 137 |

## **PART II**

### Bioconjugate Reagents

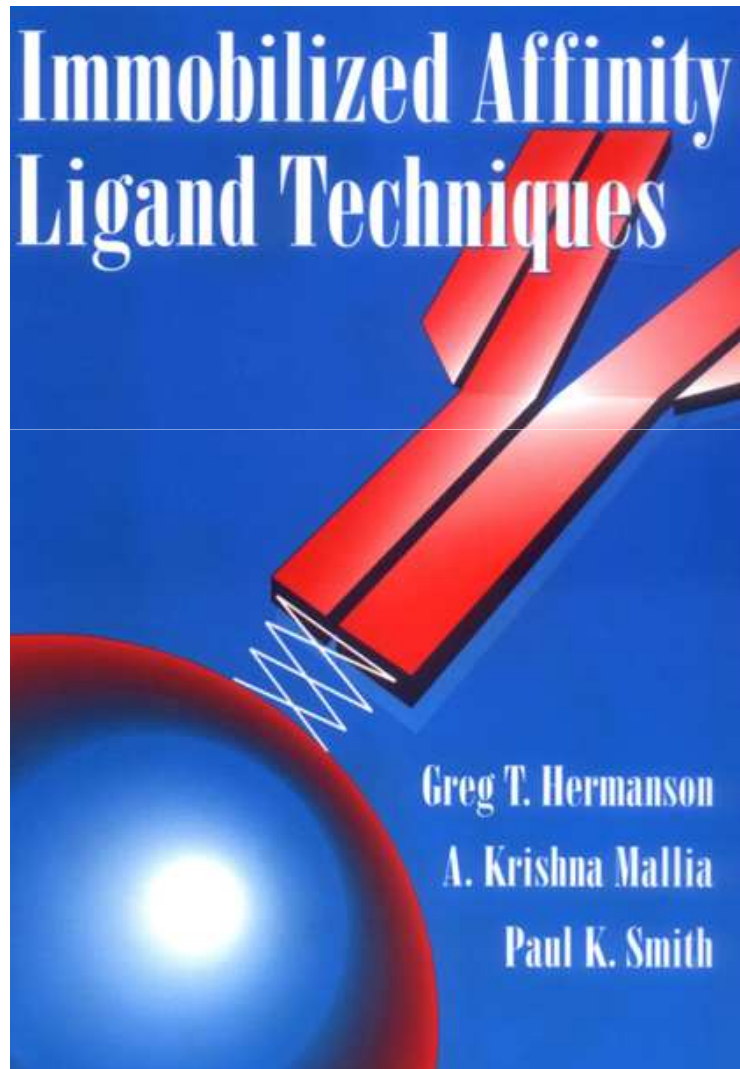
- |                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 3. Zero-Length Cross-linkers        | 169 |
| 4. Homobifunctional Cross-linkers   | 187 |
| 5. Heterobifunctional Cross-linkers | 228 |
| 6. Trifunctional Cross-linkers      | 287 |
| 7. Cleavable Reagent Systems        | 292 |
| 8. Tags and Probes                  | 297 |

## **PART III**

### Bioconjugate Applications

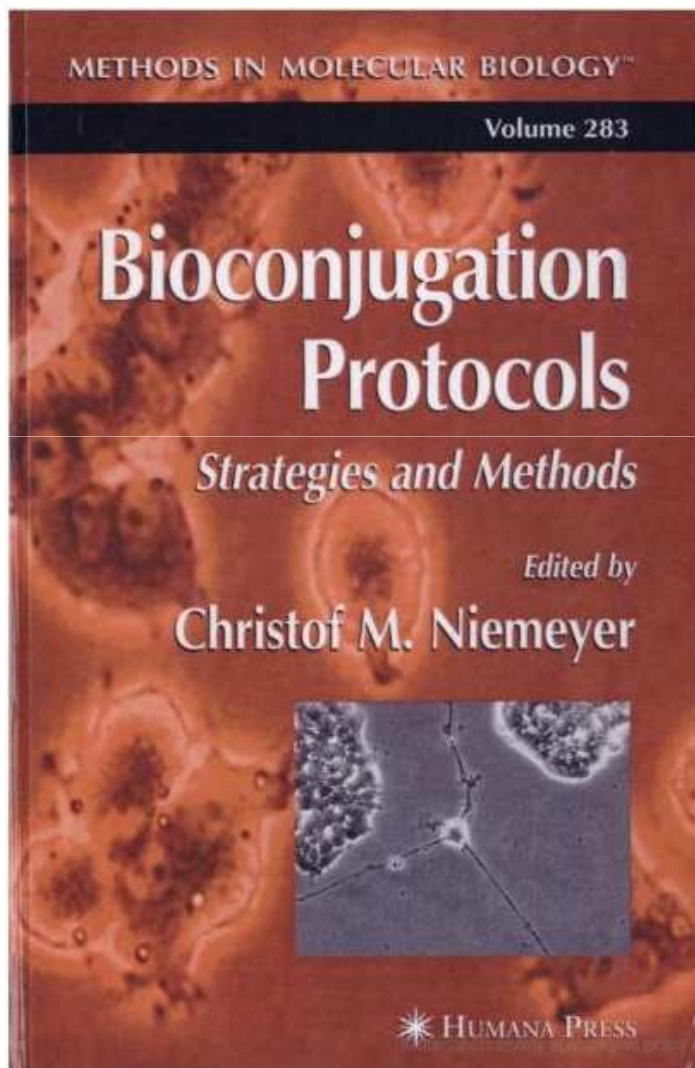
- |                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 9. Preparation of Hapten–Carrier Immunogen Conjugates             | 419 |
| 10. Antibody Modification and Conjugation                         | 456 |
| 11. Immunotoxin Conjugation Techniques                            | 494 |
| 12. Preparation of Liposome Conjugates and Derivatives            | 528 |
| 13. Avidin–Biotin Systems                                         | 570 |
| 14. Preparation of Colloidal-Gold-Labeled Proteins                | 593 |
| 15. Modification with Synthetic Polymers                          | 605 |
| 16. Enzyme Modification and Conjugation                           | 630 |
| 17. Nucleic Acid and Oligonucleotide Modification and Conjugation | 639 |

**Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K.: Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, San Diego, 1992.**



- **The matrix**
- **Activation methods**
- **Immobilization of ligands**
- **Techniques of the trade**
- **Selected applications**

# C.M. Niemeyer: Bioconjugation Protocols, Strategies and Methods. Humana Press, Totowa, NJ, 2004



### Contents

Preface .....	v
Contributors .....	ix
<b>PART I ANTIBODY AND ENZYME CONJUGATES</b>	
1 Streptavidin–Biotin Crosslinking of Therapeutic Enzymes With Carrier Antibodies: <i>Nanoconjugates for Protection Against Endothelial Oxidative Stress</i> <i>Vladimir V. Shuvaev, Thomas Dziubla, Rainer Wiewrodt, and Vladimir R. Muzykantov</i> .....	3
2 Characterization of Endothelial Internalization and Targeting of Antibody–Enzyme Conjugates in Cell Cultures and in Laboratory Animals <i>Silvia Muro, Vladimir R. Muzykantov, and Juan-Carlos Murciano</i> .....	21
3 Smart Polymer–Streptavidin Conjugates <i>Patrick S. Stayton, Zhongli Ding, and Allan S. Hoffman</i> .....	37
4 Conjugates of Peptides and Proteins to Polyethylene Glycols <i>Margherita Morpurgo and Francesco M. Veronese</i> .....	45
5 Chemical Production of Bispecific Antibodies <i>Robert F. Graziano and Paul Guptill</i> .....	71
6 Preparation of Immunoconjugates Using Antibody Oligosaccharide Moieties <i>Carl-Wilhelm Vogel</i> .....	87
7 Synthesis of Hapten–Protein Conjugates Using Microbial Transglutaminase <i>Markus Meusel</i> .....	109
<b>PART II NUCLEIC ACID CONJUGATES</b>	
8 Fluorescent Sample Labeling for DNA Microarray Analyses <i>Verena Beier, Andrea Bauer, Michael Baum, and Jörg D. Hoheisel</i> .....	127
9 High-Density Labeling of DNA for Single Molecule Sequencing <i>Susanne Brakmann</i> .....	137
10 Sequence-Specific DNA Labeling Using Methyltransferases <i>Goran Pijealčić, Falk Schmidt, Alexander Peschlow, and Elmar Weinhold</i> .....	145
11 Hapten Labeling of Nucleic Acids for Immuno-Polymerase Chain Reaction Applications <i>Michael Adler</i> .....	163

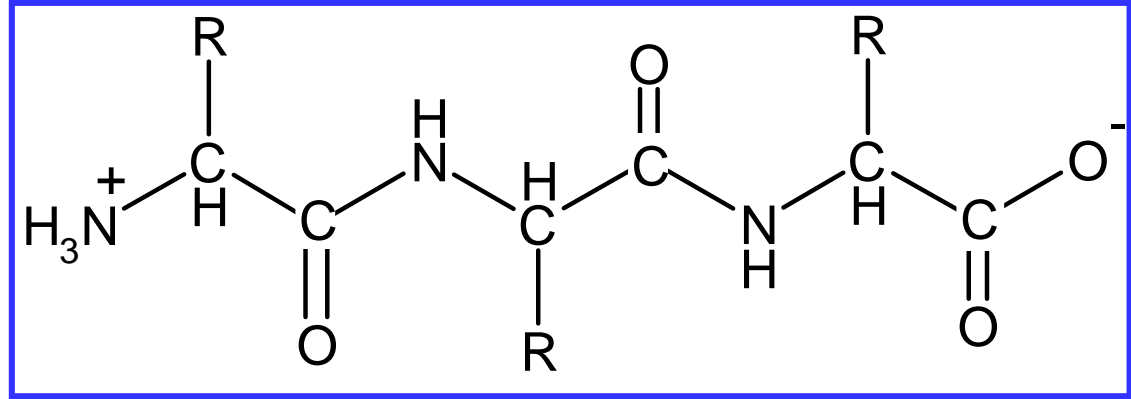
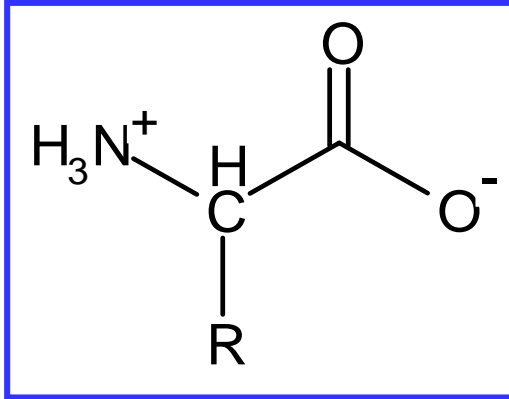
vii

viii Contents

12 Covalent Coupling of DNA Oligonucleotides and Streptavidin <i>Florian Kukolka, Marina Lovrinovic, Ron Wacker, and Christof M. Niemeyer</i> .....	181
13 Synthesis of Oligonucleotide–Peptide and Oligonucleotide–Protein Conjugates <i>David R. Corey</i> .....	197
14 Synthesis of Peptide Nucleic Acid–Peptide Conjugates <i>Kunihiko Kaihatsu and David R. Corey</i> .....	207
<b>PART III GLYCOSYL AND LIPID CONJUGATES</b>	
15 Protein Lipidation <i>Jürgen Kuhlmann</i> .....	217
16 Synthesis of Lipidated Peptides <i>Ines Heinemann, Martin Völkert, and Herbert Waldmann</i> .....	221
17 In Vitro Semisynthesis and Applications of C-Terminally Modified Rab Proteins <i>Thomas Durek, Roger S. Goody, and Kirill Alexandrov</i> .....	233
18 Generation and Characterization of Ras Lipoproteins Based on Chemical Coupling <i>Melanie Wagner and Jürgen Kuhlmann</i> .....	245
19 Conjugation of Glycopeptide Thioesters to Expressed Protein Fragments: <i>Semisynthesis of Glycosylated Interleukin-2</i> <i>Thomas J. Tolbert and Chi-Huey Wong</i> .....	255
20 Subtilisin-Catalyzed Glycopeptide Condensation <i>Thomas J. Tolbert and Chi-Huey Wong</i> .....	267
<b>PART IV BIOFUNCTIONALIZATION OF SURFACES</b>	
21 Peptide Nucleic Acid Microarrays <i>Anette Jacob, Ole Brandt, Achim Stephan, and Jörg D. Hoheisel</i> .....	283
22 Synthesis and Characterization of Deoxyribonucleic Acid-Conjugated Gold Nanoparticles <i>Pompi Hazarika, Tatiana Giorgi, Martina Reibner, Buelent Ceyhan, and Christof M. Niemeyer</i> .....	295
23 Biofunctionalization of Carbon Nanotubes for Atomic Force Microscopy Imaging <i>Adam T. Woolley</i> .....	305
Index .....	321

# Modifikace peptidů a proteinů

- aminokyseliny spojené navzájem peptidovou vazbou:



- modifikovat lze některé postranní řetězce AK, koncovou aminoskupinu a karboxyskupinu, a případně také kovalentně připojené prostetické skupiny (např. koenzymy)
- AK nepolární a hydrofobní: glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, **methionin** a prolin
- AK nepolární aromatické: fenylalanin a **tryptofan**
  - tyto jsou často orientovány dovnitř struktury proteinu, a tedy nepřístupné pro modifikační činidla

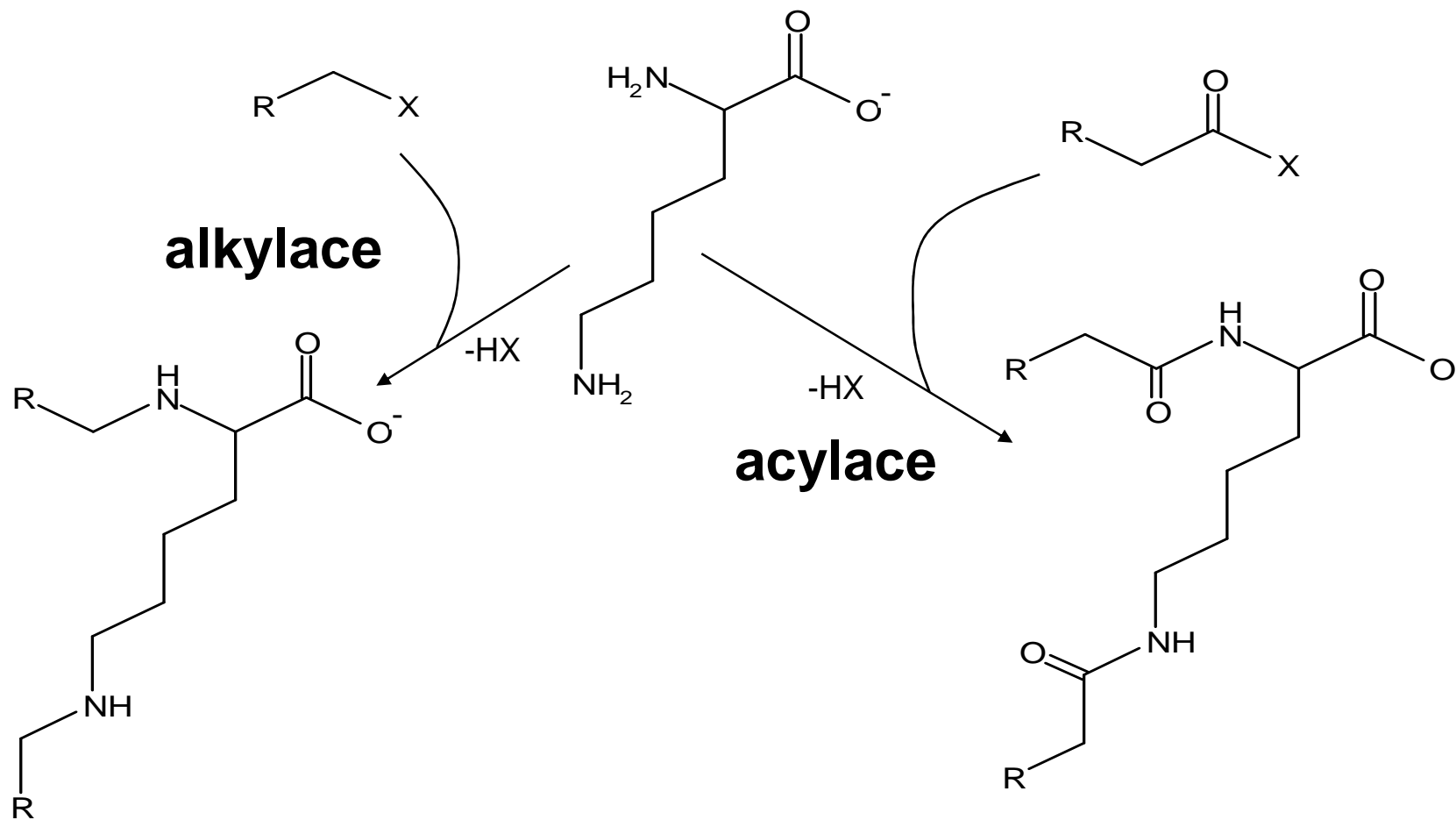


- **AK polární: asparagin, glutamin, threonin a serin**
  - mimo Gln často posttranslačně modifikovány oligosacharidovými zbytky přes N- nebo O- glykosidické vazby
  - často modifikovány enzymově (např. fosforylace), avšak chem. modifikace ve vodném prostředí nesnadná, protože nukleofilní vlastnosti hydroxyly i amidu se blíží vodě
- **AK s ionizovatelnou skupinou - kyseliny asparagová a glutamová, lyzin, arginin, cystein, histidin a tyrosin**
  - v deprotonovaném stavu jsou účinná nukleofilní činidla
  - hlavní cíl modifikačních reakcí

## Aminoskupina (Lys, Arg, His, N-konec)

- volná aminoskupina (konec pept. řetězce a Lys) je nejčastějším cílem
- Lys ( $pK_a$  9,3 až 9,5) je obvykle protonován
- Arg ( $pK_a$  přes 12) je protonován prakticky vždy
- His s imidazolovým kruhem ( $pK_a$  6,7 až 7,1)
- aminoskupiny se účastní alkylačních a acylačních reakcí, kdy fungují jako nukleofily
- imidazol. kruh může být elektrofilní, např. při jodaci

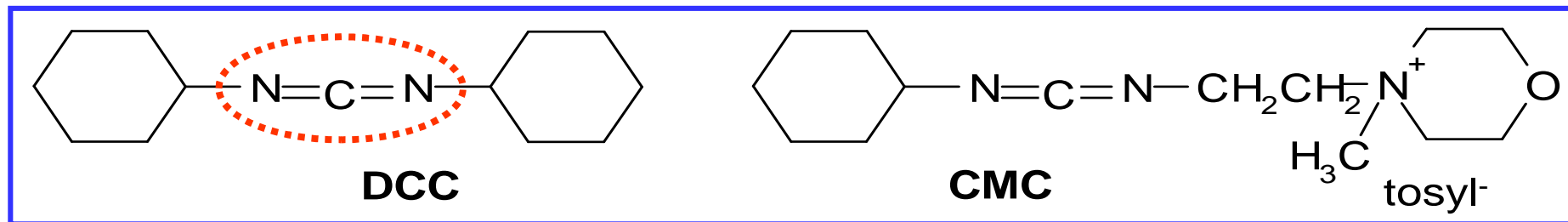
# Alkylace a acylace aminoskupiny



- průběh při reakcích je nukleofilní substituce - vzniká tetraedrický intermediát, X je obecná odstupující skupina

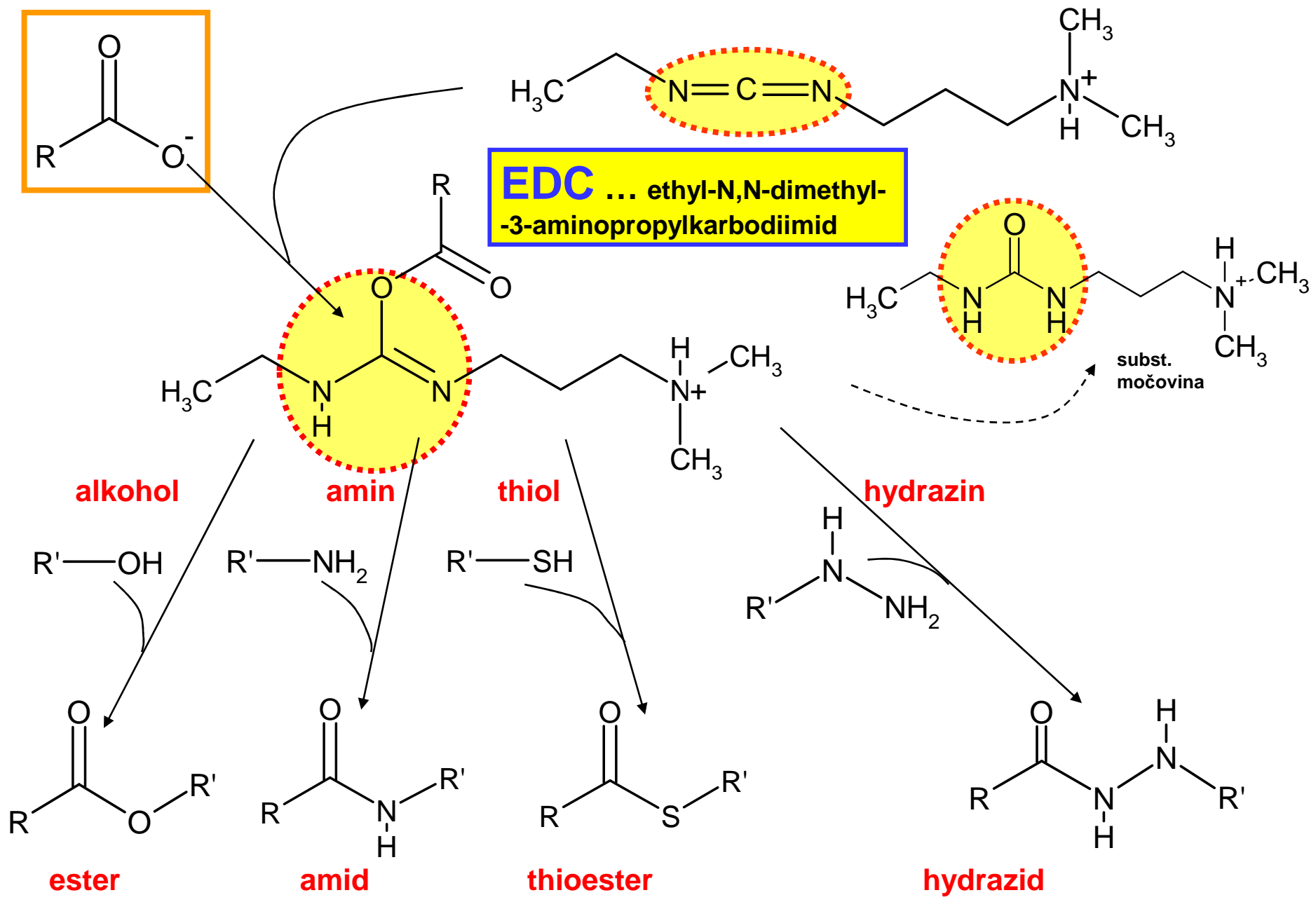
## Karboxyskupina (Asp, Glu, C-konec)

- postranní karboxyly ( $pK_a$  3,7 až 4,5) při fyziologickém pH nesou záporný náboj
- vhodné pro tvorbu amidových, případně i hydrazidových derivátů
- lze připravit i thioestery - ve vodném prostředí nestabilní
- derivatizace probíhá přes reaktivní intermediáty - nejznámější je použití **karbodiimidů** (EDC, DCC, CMC):



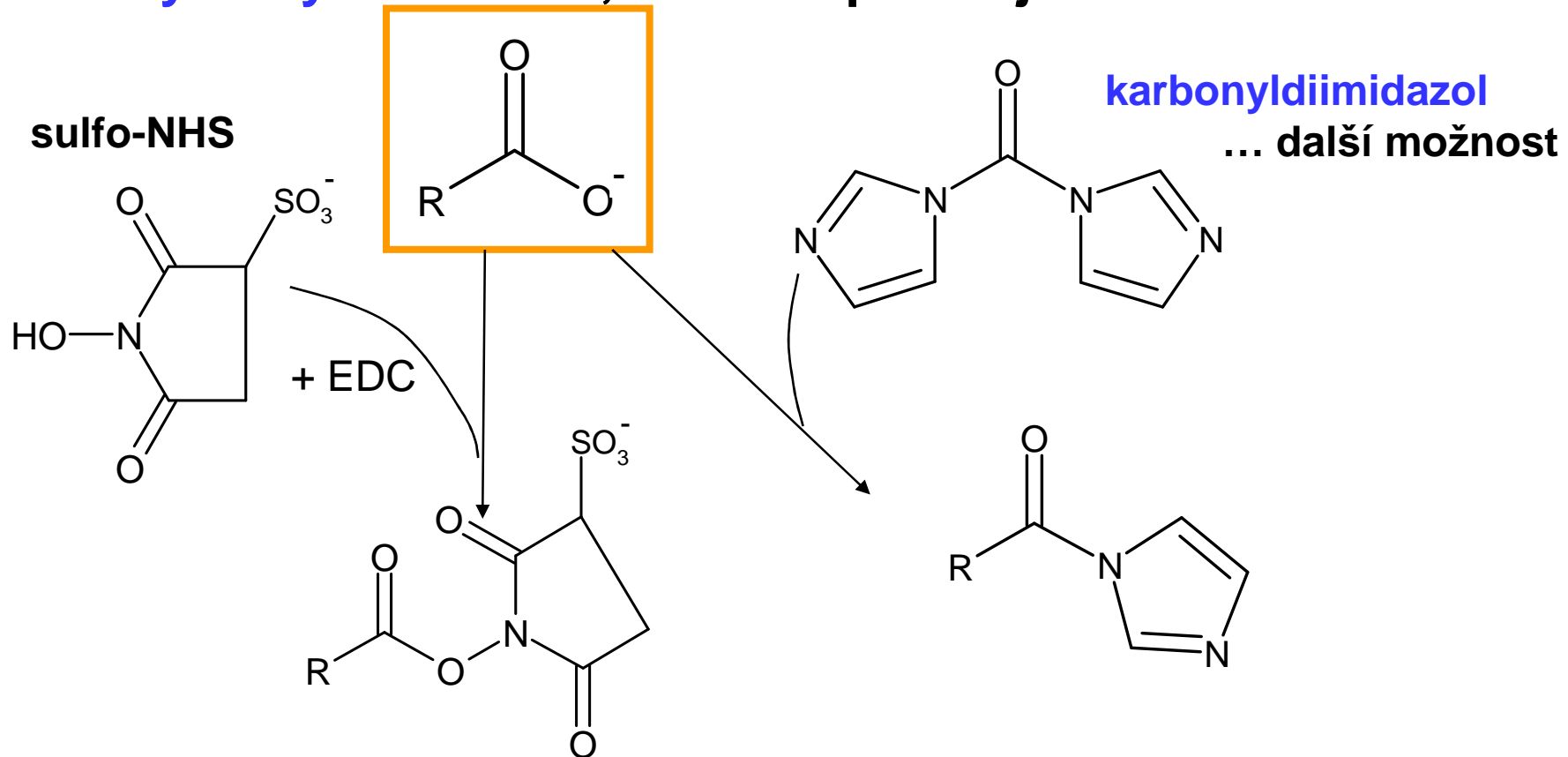
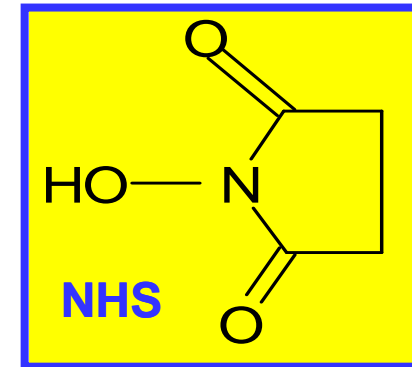
- **CMC** ... cyklohexylmorfolinoethylkarbodiimid
- **DCC** ... dicyklohexylkarbodiimid
  - nerozp. ve vodě, spíše pro konjugace malých molekul

# Aktivace karboxylu karbodiimidem

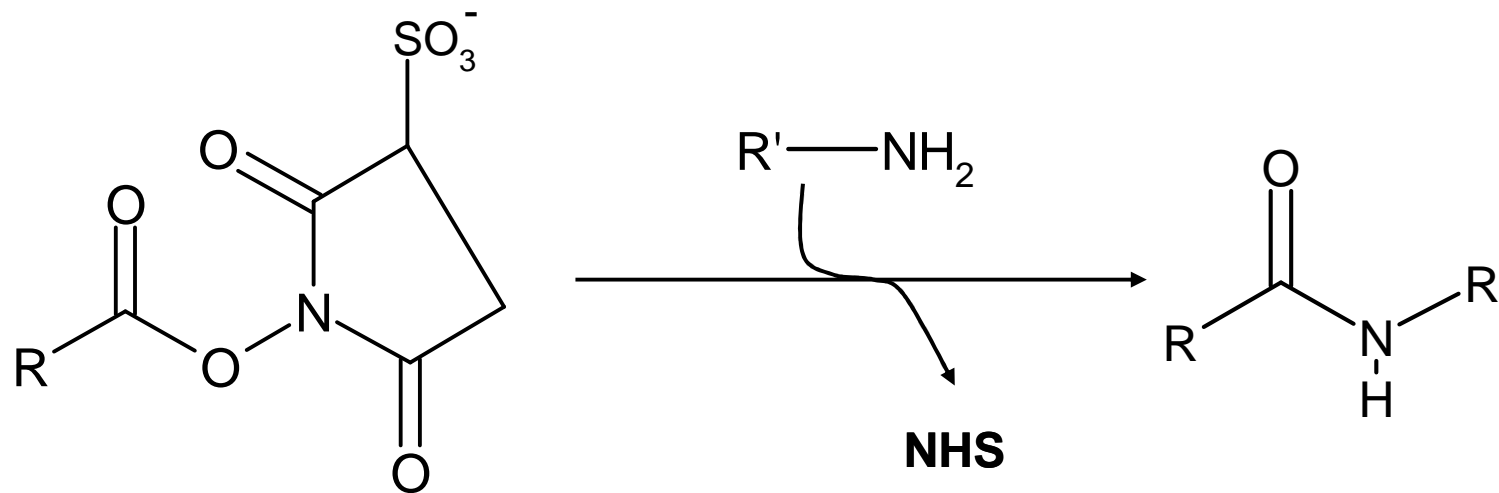


# Alternativní postupy

- reakce s karbodiimidy je velmi rychlá
  - nesnadná kontrola průběhu, nežádoucí postranní reakce, konkurenční hydrolyza je rychlá
- konjugační reakce se provádí přes stabilnější aktivované meziprodukty - NHS, N-hydroxysukcinimid, nebo rozpustnější sulfo-NHS

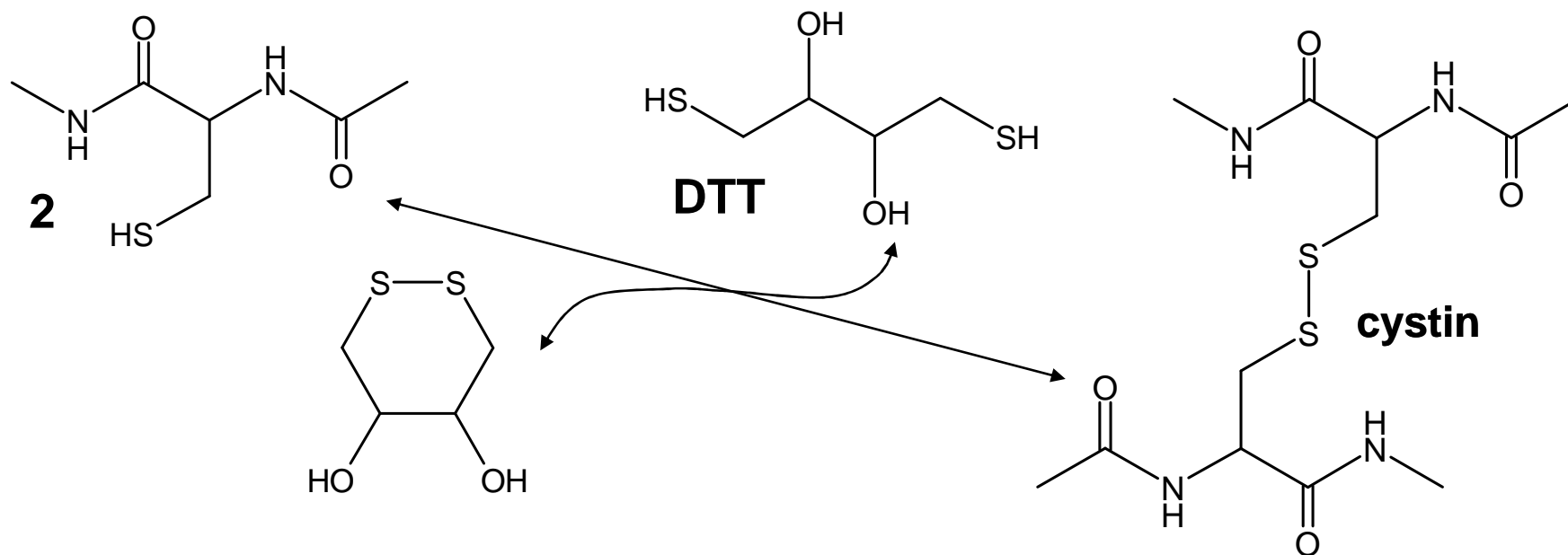


- vzniklé NHS-deriváty nebo imidazolylové deriváty jsou relativně stabilní ve vodném prostředí a ochotně reagují např. s aminoskupinou za vzniku amidů
- komerčně je dostupná široká škála NHS-aktivovaných molekul (NHS-biotin, NHS-fluorescein, ...), které se pak velmi jednoduše mohou konjugovat s cílovou biomolekulou ( $R'-NH_2$ ):



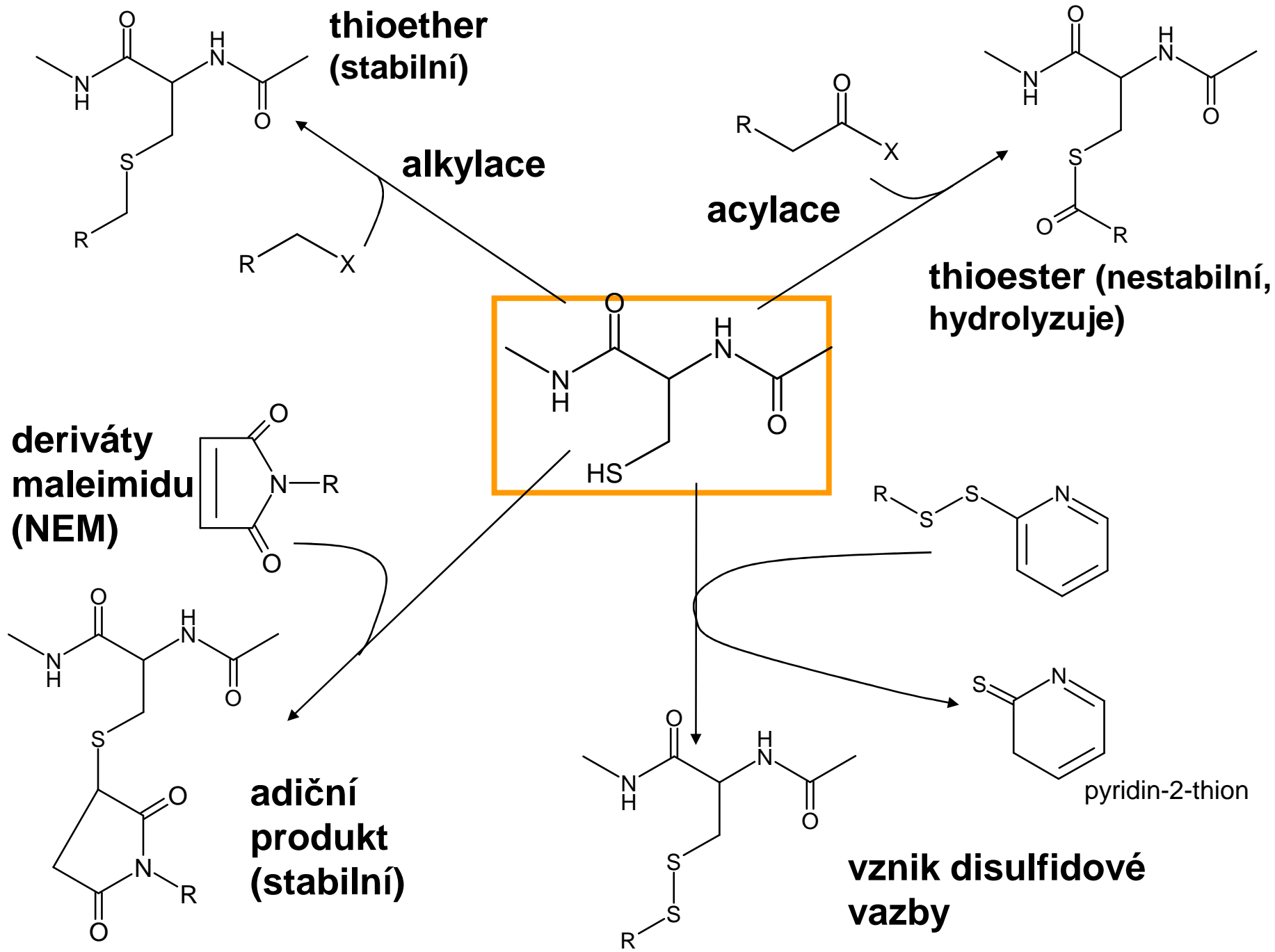
# Thioskupina (Cys)

- cysteinové zbytky jsou normálně protonované a bez náboje ( $pK_a$  8,8 až 9,1)
- nejdůležitější reakcí v přirozeném stavu je tvorba vzájemných disulfidů (cystinové uskupení)
- mohou se účastnit alkyací a reversibilních redoxních reakcí



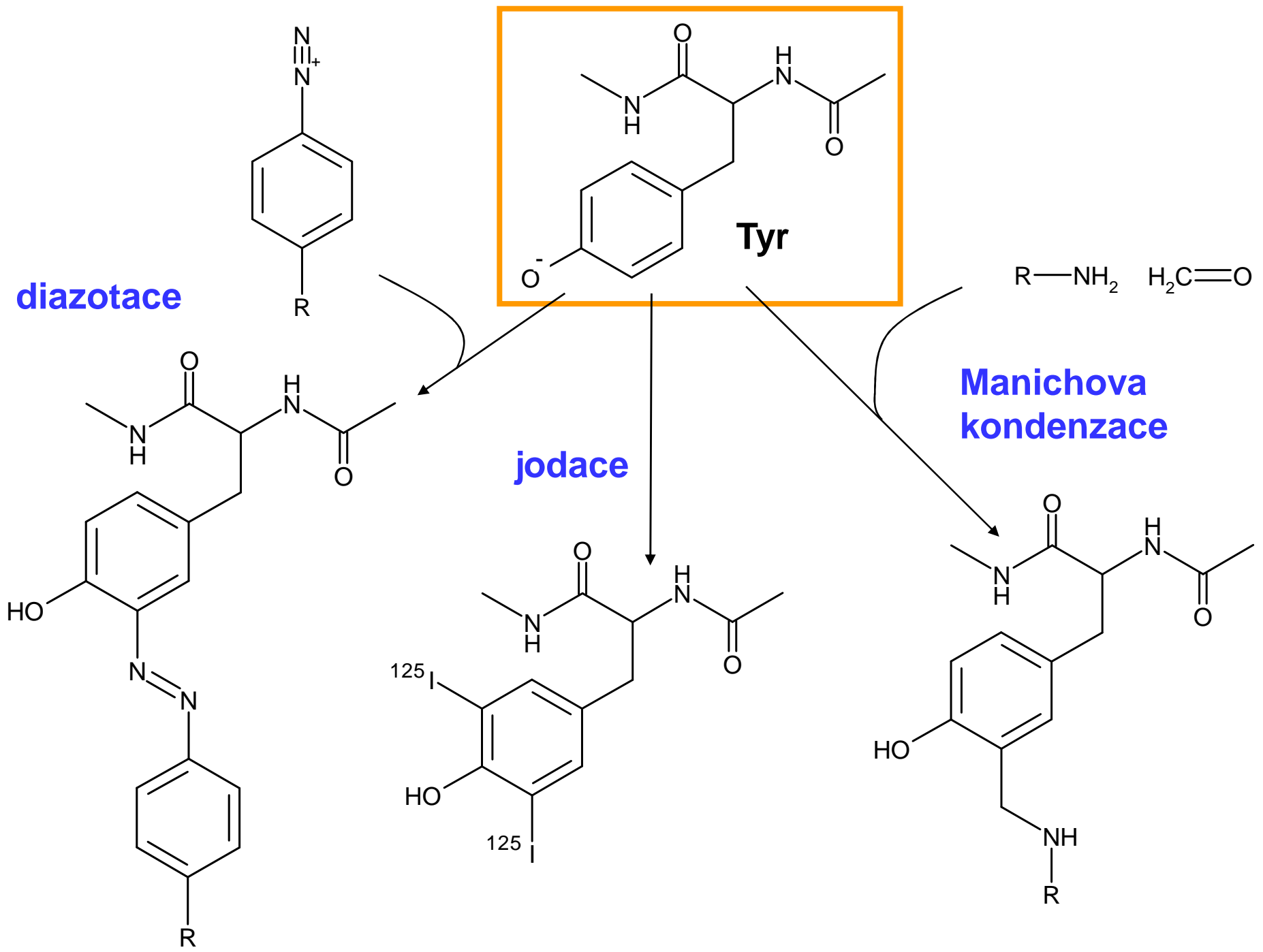
- z oxidované formy (disulfid) vzniká redukovaná forma (volná SH skupina) pomocí redukčního činidla **dithiothreitolu (DTT, Clelandovo činidlo)**
- reakce může probíhat oběma směry





## Fenolická skupina (Tyr)

- **diazotační kopulace - elektrofilní substituce na aktivovaném benzenovém jádře**
  - probíhá do ortho polohy, spojení s aromatickými aminoskupinami, aktivací s kys. dusitou (dusitan a HCl) vzniká regující diazoniová sůl
  - vzniklé konjugáty mají oranžovou barvu
- **další možnost - jodace, radioaktivní značení <sup>125</sup>I**
- **Manichova kondenzace - připojení aminosloučeniny v přítomnosti formaldehydu**



# Specifita modifikačních reakcí

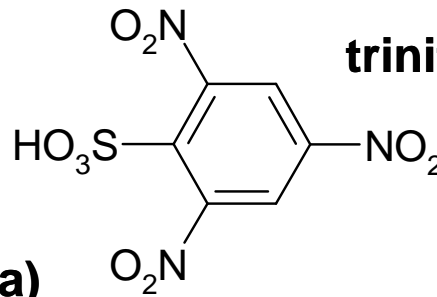
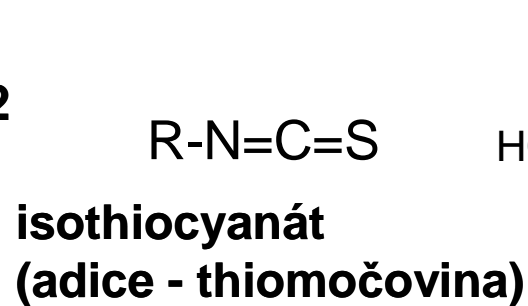
- účastní se bílkoviny, které obvykle poskytují řadu různých skupin - jejich srovnání dle síly nukleofilních vlastností:



- úlohu hraje přítomnost náboje (protonovaná / deprotonovaná forma) - lze ovlivnit volbou pH, ale protože se hodnoty  $pK_a$  často překrývají, tak to není příliš spolehlivé
- pro přesné cílení modifikace na konkrétní skupiny je zapotřebí zvolit specificky reagující činidlo

## Cílené zablokování postranních skupin

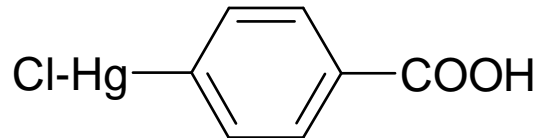
- **P-NH<sub>2</sub>**  
**(Lys)**



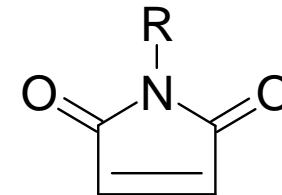
trinitrobenzensulfonová  
kyselina (subst.)

aldehyd  $R-CH=O$   
(+ redukce borohydridem)

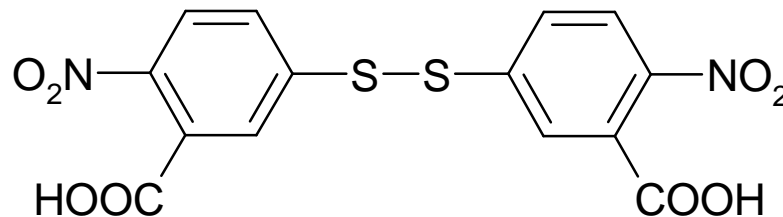
- **P-SH**  
**(Cys)**



*p*-chlormerkuri  
benzoová k.

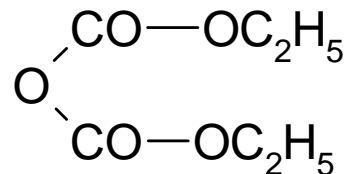


maleimidy, např. NEM  
(adice)



5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoová k.)  
DTNB, Ellmanovo činidlo  
(substuce)

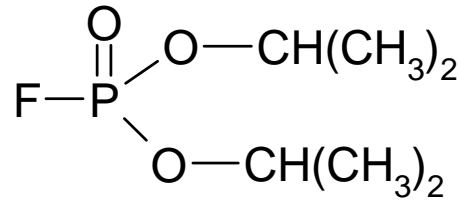
- **P--N**  
**(His)**



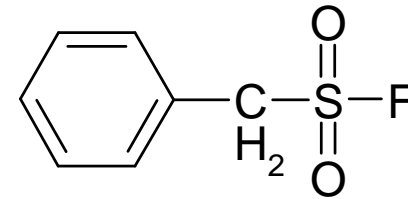
diethylpyrokarbonát (alkoxylace)

## Cílená modifikace postranních skupin

### ■ P-OH (Ser)



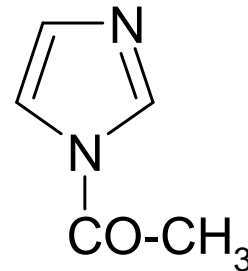
diisopropylfluorofosfát  
DFP (fosforylace)



fenylmethylsulfonylfluorid  
PMSF (sulfonylace)

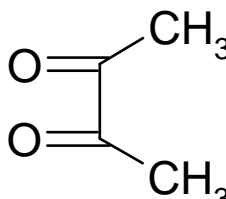
### ■ P---OH (Tyr)

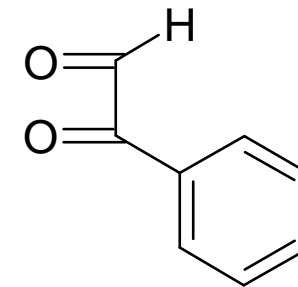
$C(NO_2)_4$   
tetranitromethan  
(nitrace)



N-acetylimidazol  
NAI (acetylace)

### ■ P--NH- (Arg)

  
2,3-butandion  
(kondenzace)



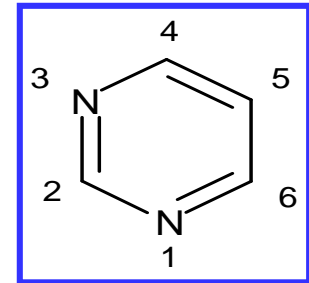
fenylglyoxal (kondenzace)

# Modifikace nukleových kyselin

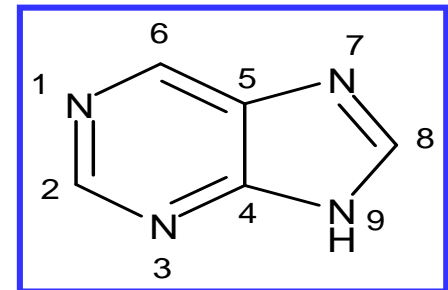
- nukleové kyseliny (DNA a RNA) jsou tvořeny z jednotlivých nukleotidů spojených fosfodiesterovou vazbou mezi sacharidovými kruhy

- základní složkou jsou **báze**

- pyrimidinové (C cytosin, T thymin a U uracil)

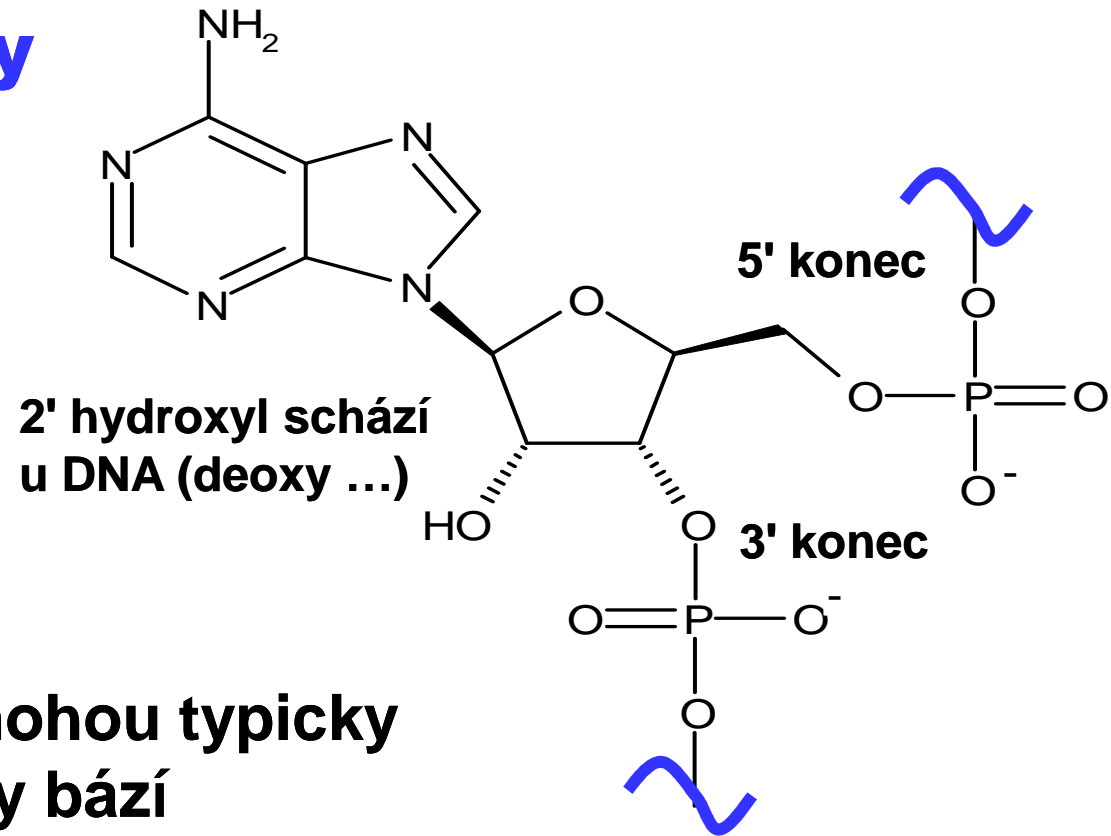


- purinové (A adenin, G guanin)



- spojením s molekulou sacharidu (ribosa nebo deoxyribosa) poskytují **nukleosidy** (např. Ade adenosin nebo dAde deoxyadenosin)
- připojením fosfátu vznikají **nukleotidy** (např. AMP adenosin monofosfát).

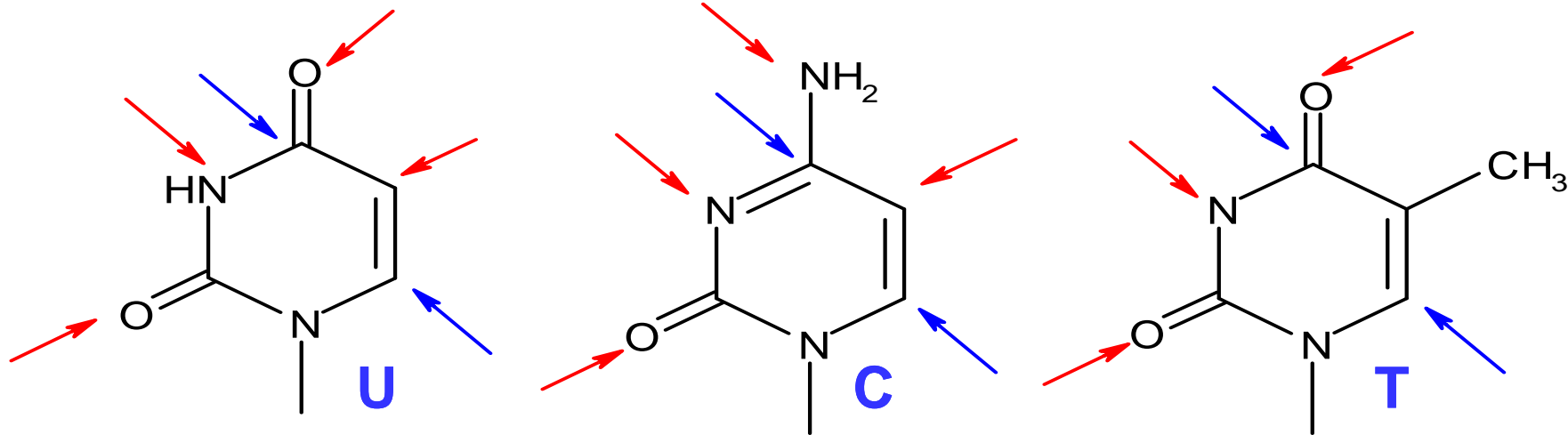
# Nukleové kyseliny



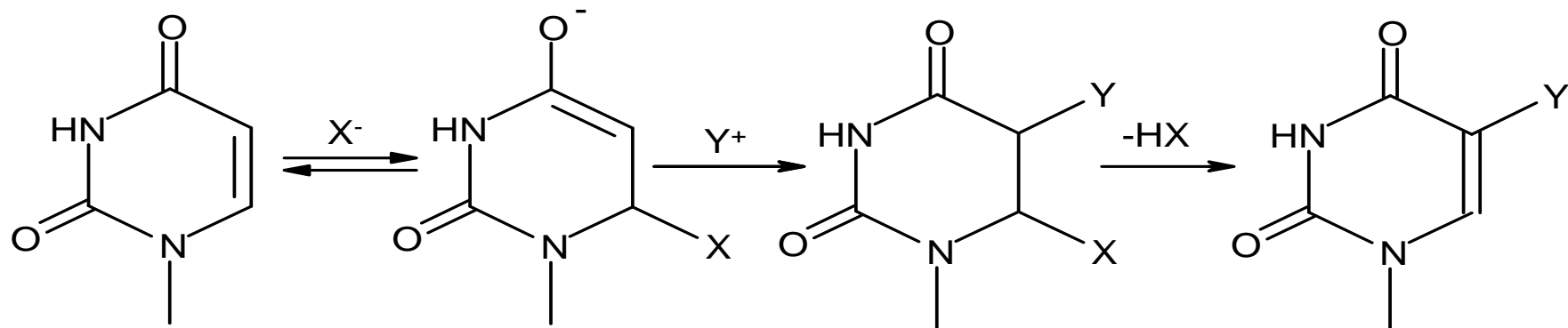
- modifikační reakce mohou typicky směřovat na molekuly bází
- méně časté je využití sacharidové části (2' hydroxyl u RNA)
- velmi běžné je připojení dalších funkčních molekul na konec řetězce nukleové kyseliny



# Pyrimidinové base

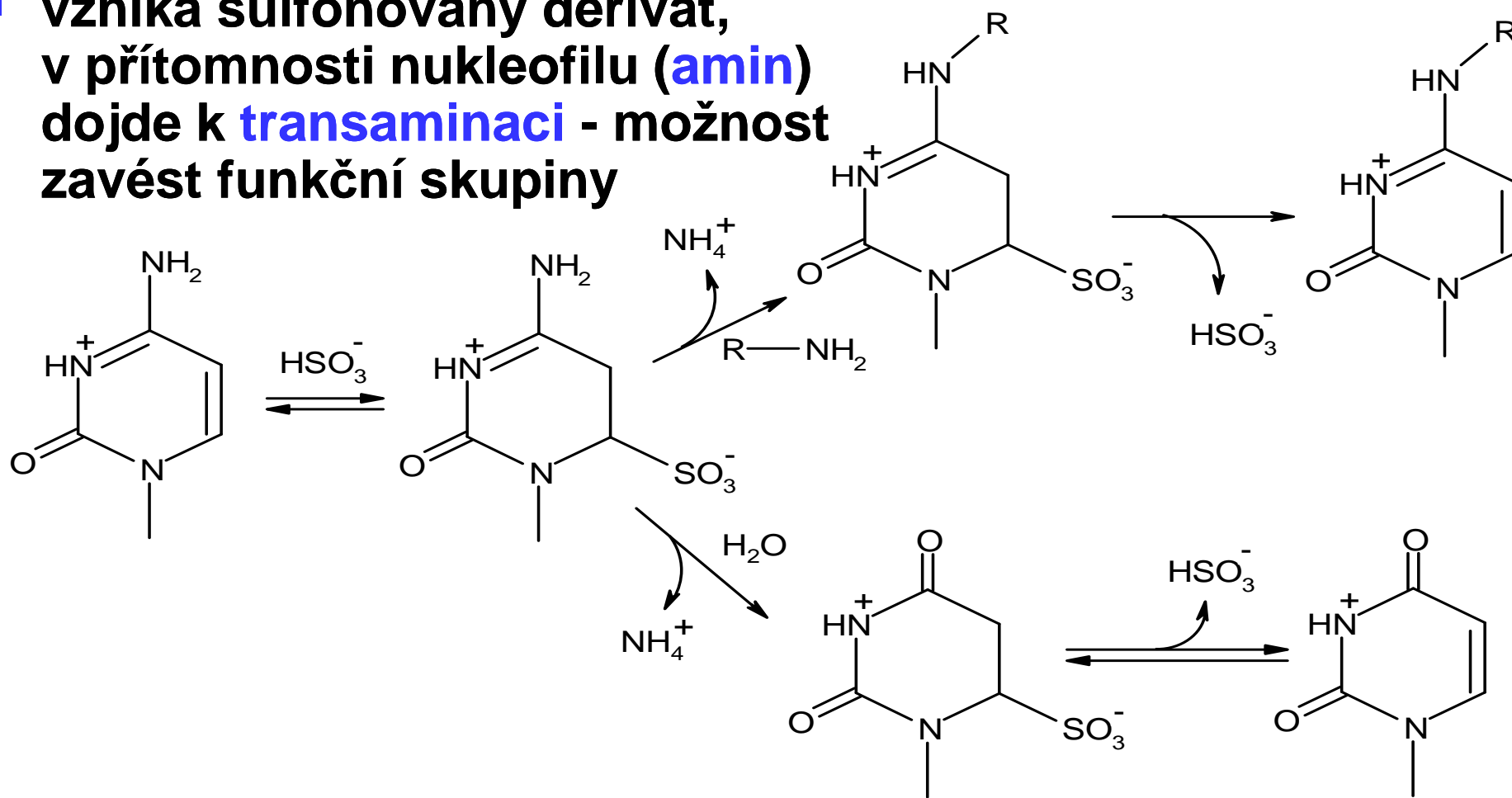


- části jejich molekul mohou být cílem ataku elektrofilních (červeně) i nukleofilních (modře, pozice 4 a 6) činidel
- v molekule uracilu nukleofilní substituce v C6 pozici následně aktivuje C5 pozici pro elektrofilní atak:



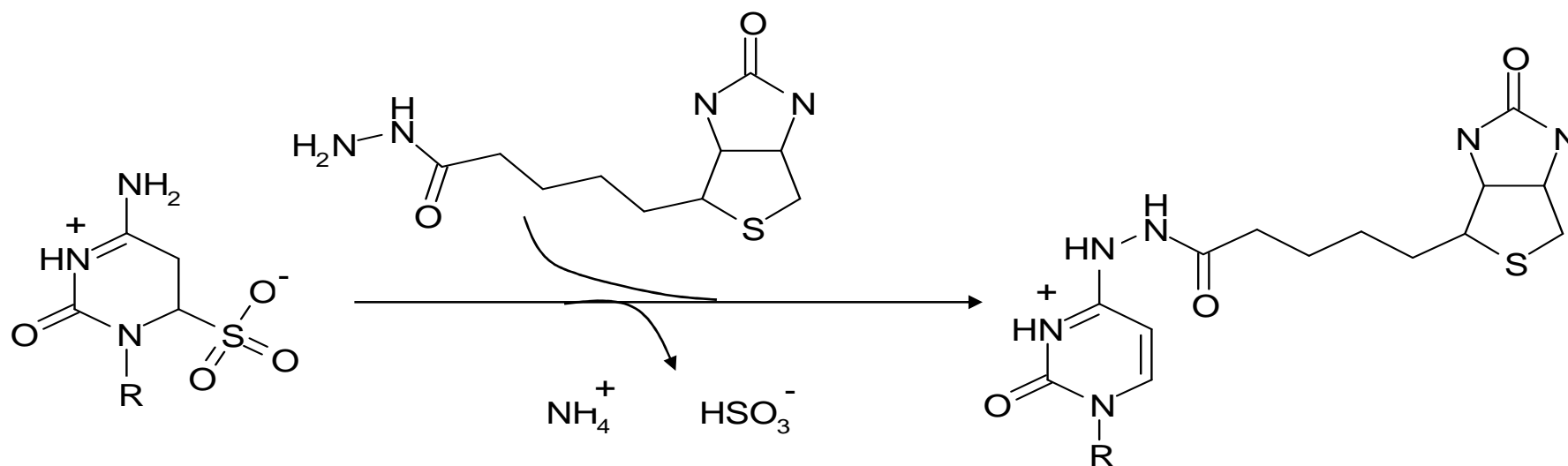
# Reakce cytosinu s hydrogensířičitanem

- vzniká sulfonovaný derivát, v přítomnosti nukleofilu (**amin**) dojde k **transaminaci** - možnost zavést funkční skupiny



- v slabě kyselém prostředí pak dojde k hydrolyse aminoskupiny na C4 a následně po alkalizaci se odštěpí hydrogensířičitan - proběhla **konverze na uracil**

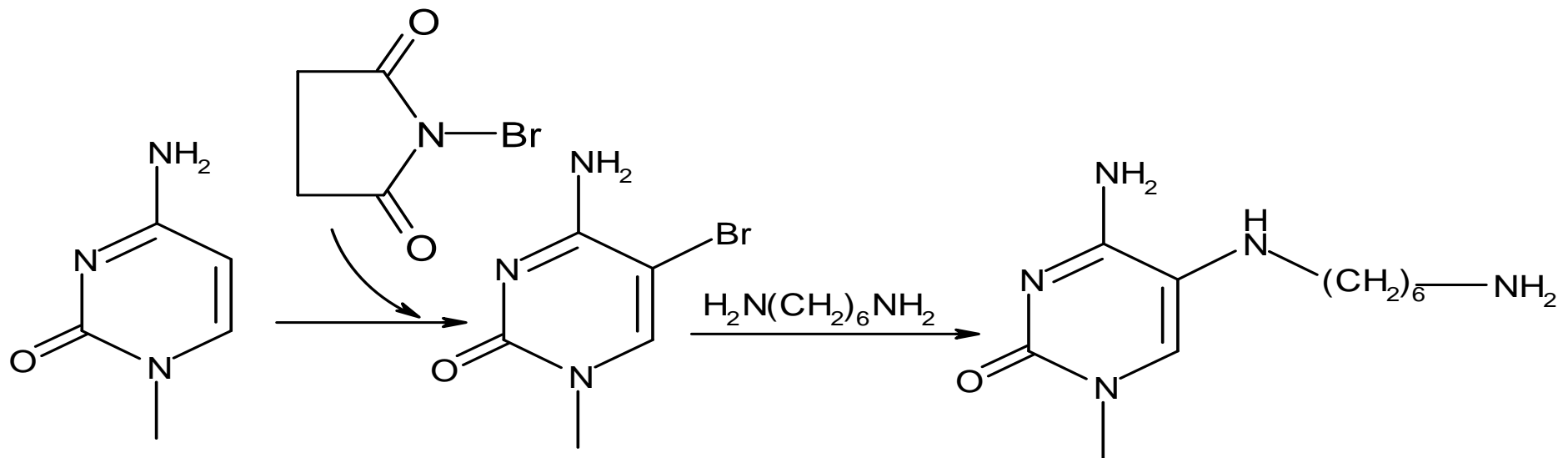
## Biotinylace cytosinu



- reaktivní adukt cytosinu s hydrogensířičitanem se v reakci s **biotin-hydrazidem** přemění na žádaný derivát

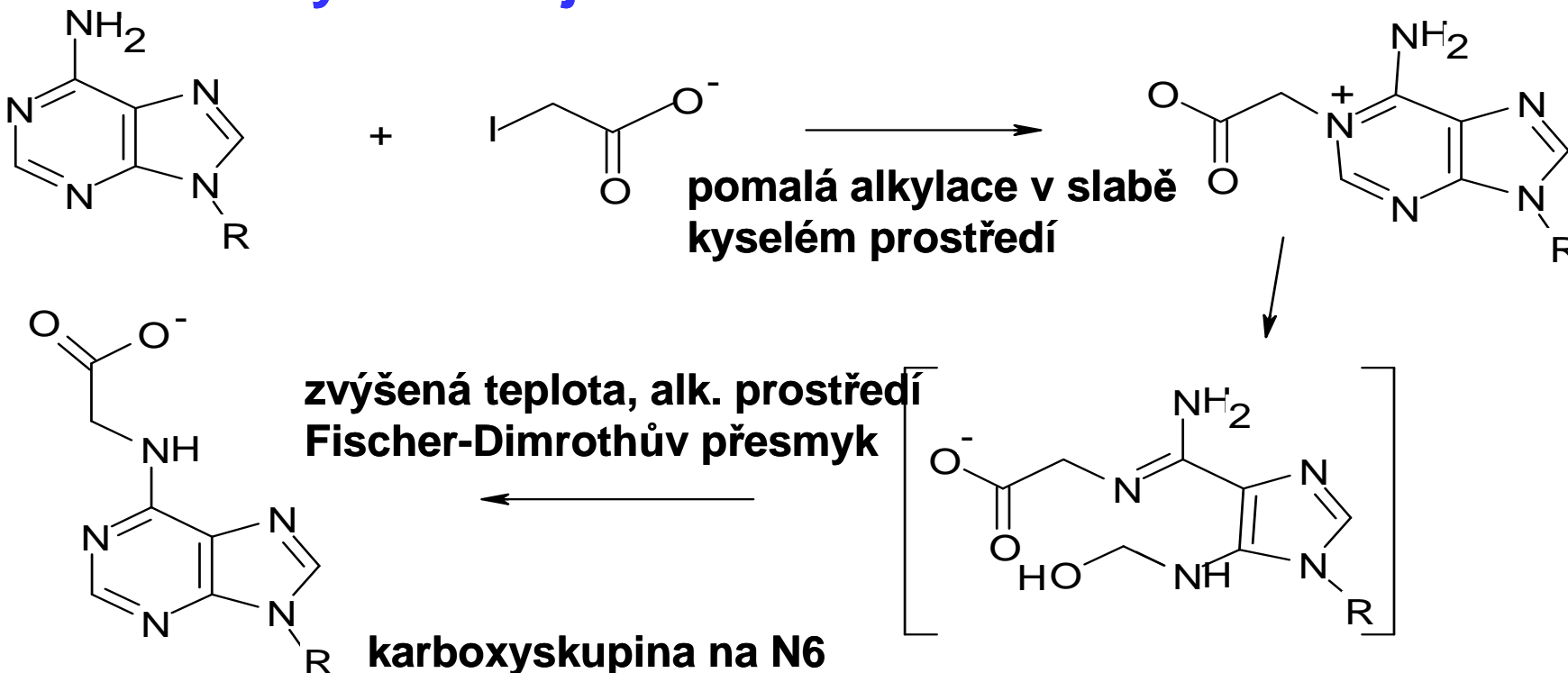
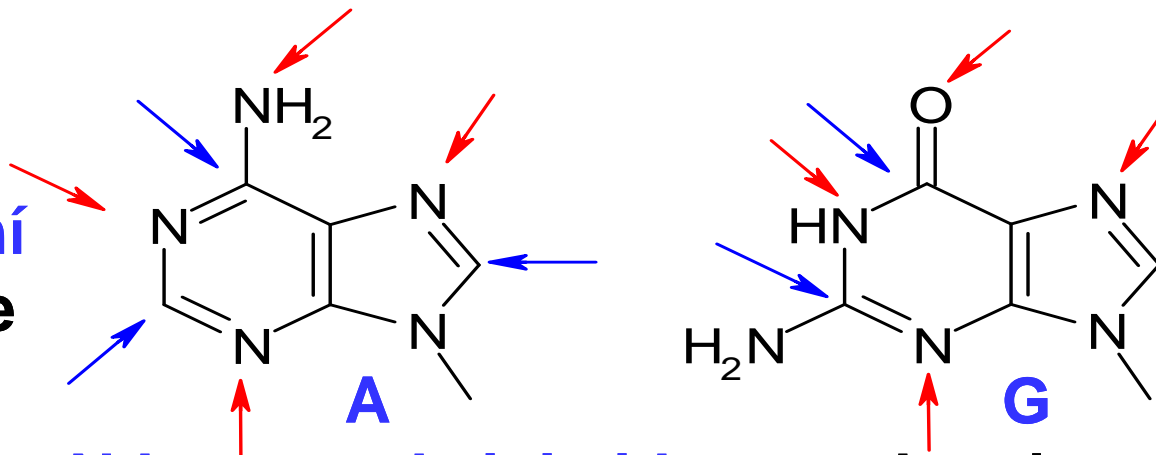
# Cytosin - halogenace

- možností vpravení vhodné reaktivní aminoskupiny v postranním řetězci je halogenační reakce
- vodný roztok jodu nebo bromu, případně pomocí **N-bromosukcinimidu**
- poslední krok je substituce diaminem:



# Purinové base

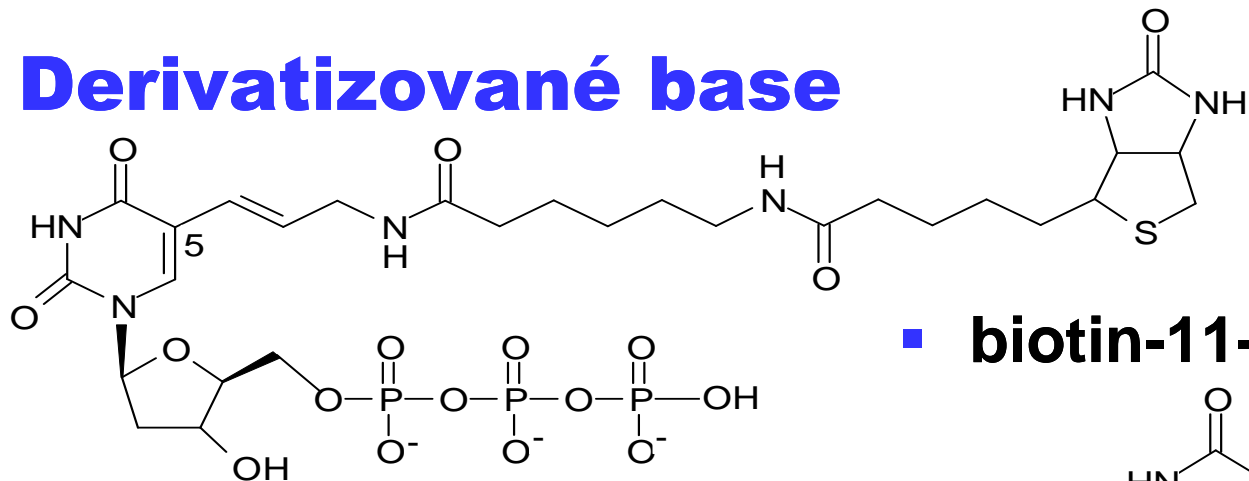
- pozic pro nukleofilní i elektrofilní ataky je celá řada
- halogenační reakce s N-bromosukcinimidem poskytuje brom v pozici C-8 jak v případě adeninu, tak guaninu
- reakce s kyselinou jodoctovou:



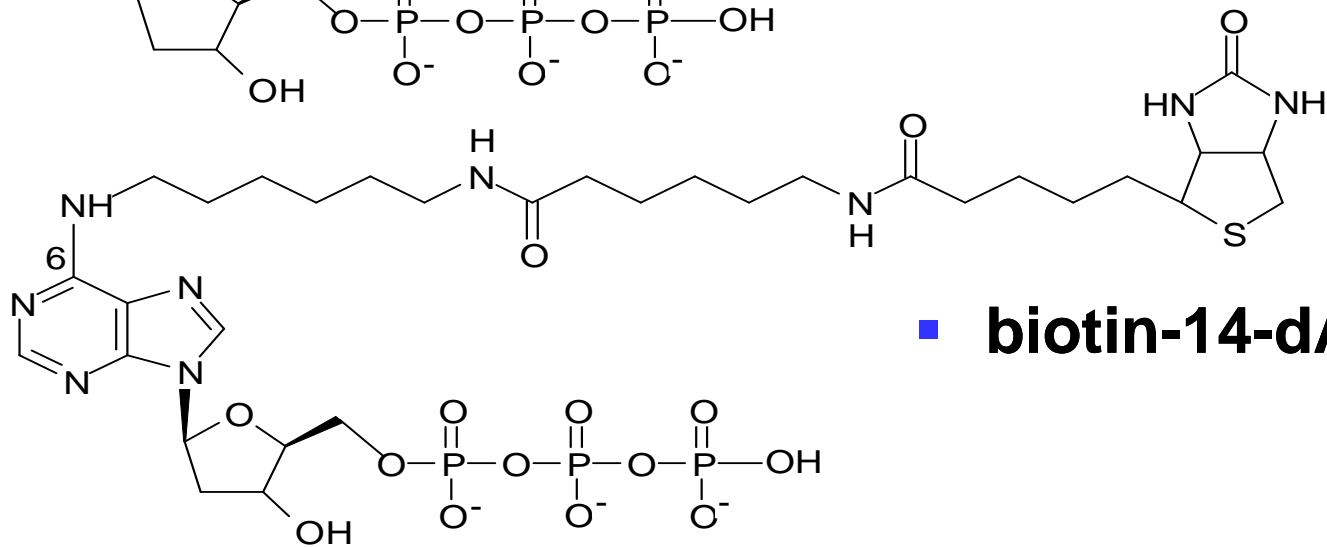
# Modifikace DNA

- **in vitro enzymová syntéza DNA polymerasou pomocí komplementárního templátového vlákna**
- **do reakční směsi se přidají pozměněné nukleotidy, schopné párování, které tak do struktury DNA vnesou žádané funkční skupiny**
- **je-li vyžadováno správné párování, tak stupeň substituce max. 30-40 modifikovaných míst/1000 bází**
  - derivatizace na cukr-fosfátové kostře nebo na koncích vlákna párování nevadí
- **pozměněné base - deriváty s biotinem, nebo methylenový řetězec s volnou aminoskupinou**
  - menší modifikace - není ovlivněna rychlost připojování bází
- **mnohočetné včlenění značených bází může být nevýhodné pro hybridizační reakci**

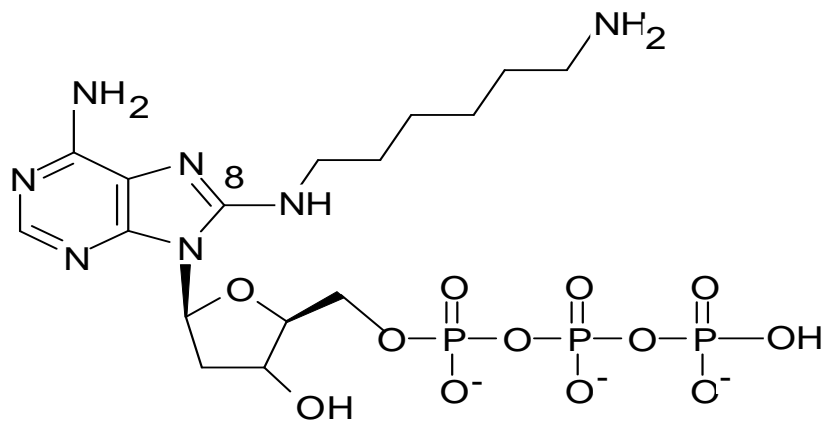
# Derivatizované base



■ **biotin-11-dUTP**



■ **biotin-14-dATP**



■ **8-aminohexyl-dATP**

# Metoda náhodných primerů

- směs náhodných hexanukleotidových úseků sloužících jako 3'-OH primery s templátovou DNA
- modifikované nukleotidy se připojují pomocí **DNA polymerasy I**
  - pouze **Klenowův fragment**, který postrádá 5'-3' exonukleasovou aktivitu přítomnou v nativním enzymu z *E. coli*
- výsledkem je náhodné včlenění značených bazí

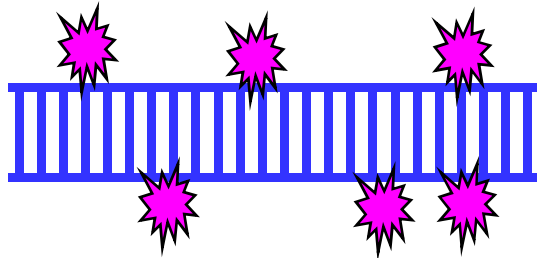


# Nick-translace

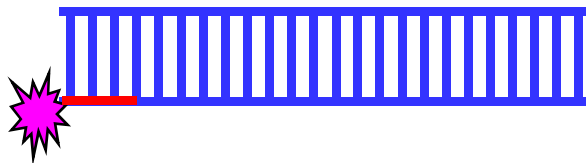
- nick-translační značení účinkuje na dvojitou šroubovici
- směs pankreatické **deoxyribonukleasy I (DNasa I)** a **DNA polymerasy I**
- v přítomnosti  $Mg^{2+}$  DNasa (v limitujícím množství) provádí hydrolýzu pouze v jednom vlákně
- vzniklé štěpy jsou však ihned zaplněny přítomnými modifikovanými i nativními nukletidovými monomery za katalysy DNA polymerasy
- výsledkem je modifikace původní molekuly dsDNA

# Značení v průběhu PCR

- nejúčinnější metodou je provést značení DNA v průběhu polymerasové řetězové reakce (PCR)
  - současně se samozřejmě zmnoží množství původní DNA
- buď se do reakční směsi prostě přidají **značené nukleotidy** a jsou náhodně vestavovány do nově syntetizovaných řetězců

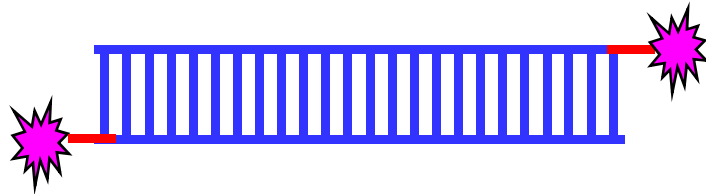


- nebo je možné použít pouze **značené primery** (např. biotinylované)



# Koncové značení

- cílem je zamezit modifikaci uprostřed řetězce DNA
- využití **terminální transferasy** - přidává nukleotidy ke 3'-OH koncům DNA bez potřeby templátového vlákna
- např. také pro radioaktivní značení

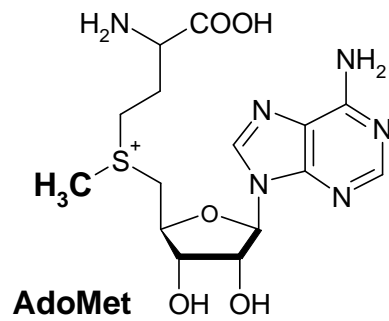
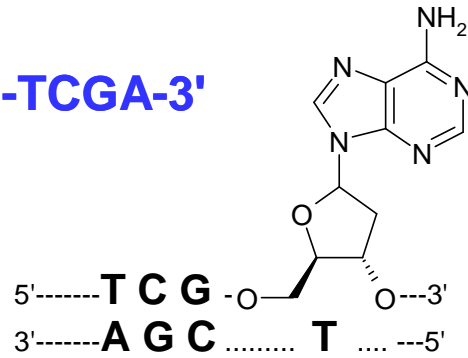


# Sekvenčně-specifické značení

- rozpoznání cílového místa, vytvoření kovalentní vazby se značkou
- **DNA methyltransferasy (MTasy)** - přenáší methylovou skupinu z S-adenosyl-L-methioninu (AdoMet) na A nebo C zbytky
- methylová skupina se nahradí něčím "užitečnějším" - aziridinový reaktivní zbytek pro vytvoření kovalentní vazby s DNA v průběhu enzymové methylace, biotinová skupina připojena v postranní části
- značení DNA v předem určeném místě, daném polohou cílové sekvence MTasy

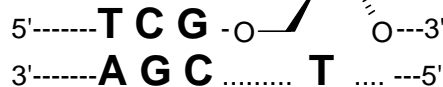
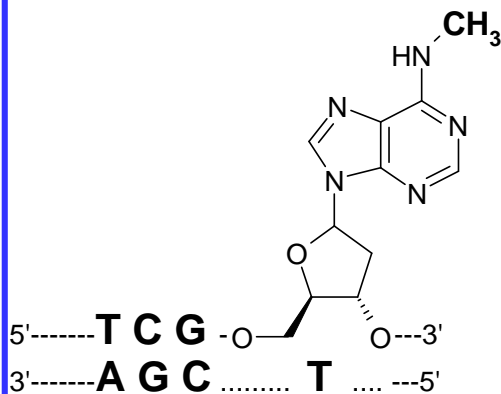
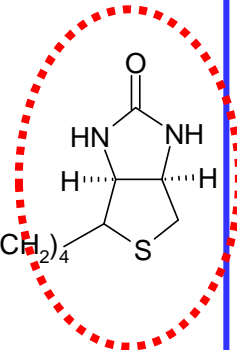
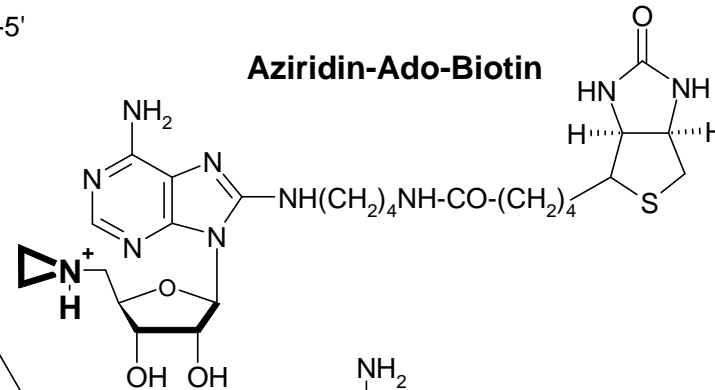
# Značení pomocí methyltransferasy

cílová sekvence 5'-TCGA-3'



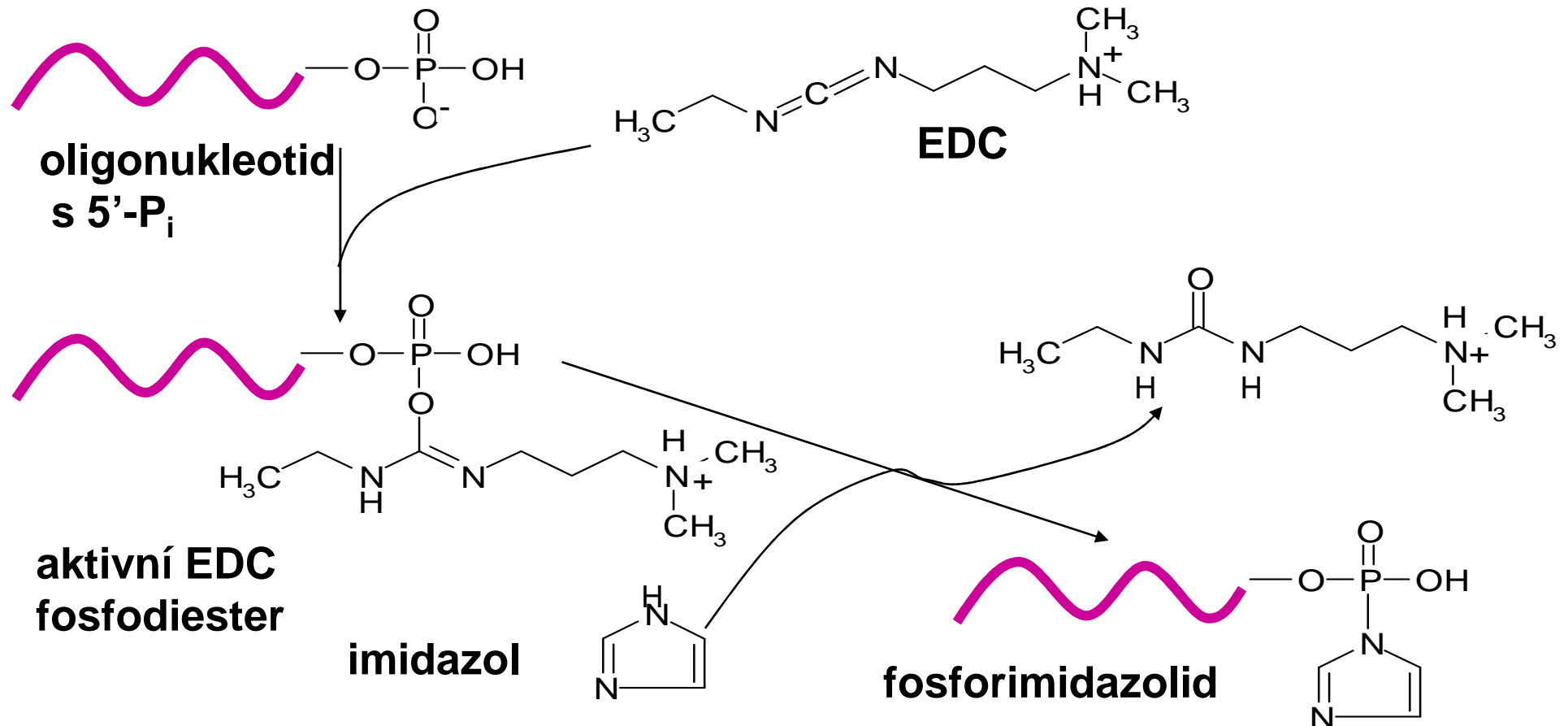
*M-TaqI*

**Aziridin-Ado-Biotin**



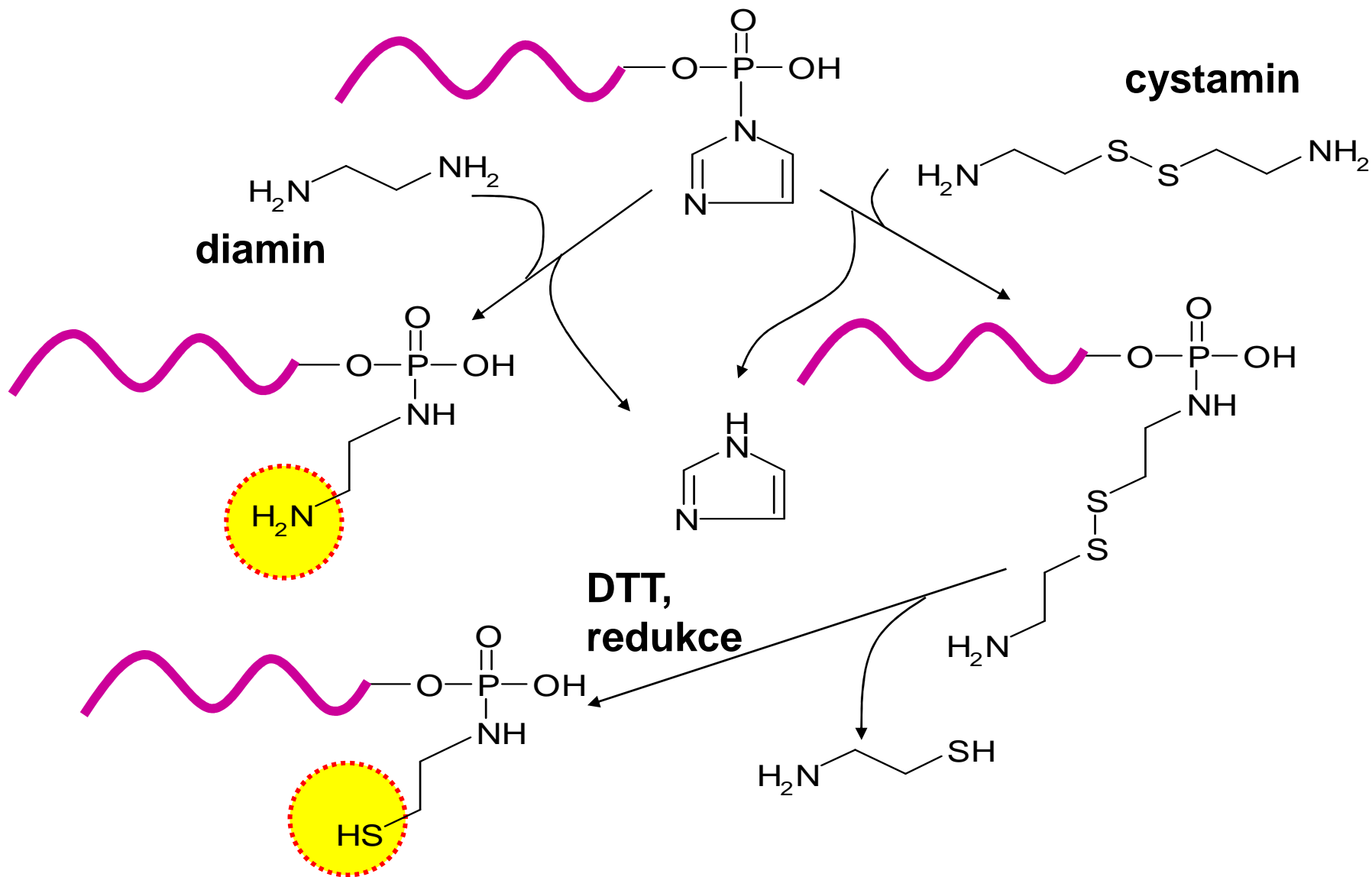
# Fosforamidová metoda

- aktivace konc. fosfátu EDC vede s aminy k fosforamidům
- reakci lze provést také s **imidazolem**, čímž vznikne fosforimidazolidový produkt
  - má ve vodném prostředí prodlouženou životnost a reaguje velmi dobře s aminy - vyšší výtěžky fosforamidové reakce



# Fosforimidazolid

- vnesení amino nebo thioskupiny na konec DNA



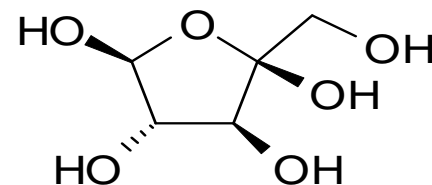
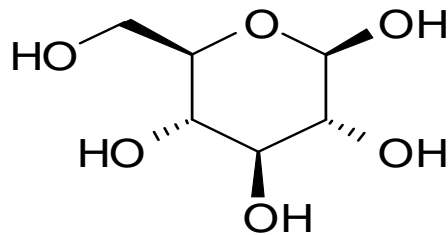
# Modifikace RNA

- molekuly RNA obvykle jednořetězcové, vnitřní vzájemně komplementární krátké sekvence
- párování vede ke vzniku různých třidimenzionálních struktur (helikální úseky, smyčky, vlásenky, G-kvartety...)
- další změnou oproti DNA je existence **diolového uskupení** v molekule ribosy - lze specificky oxidovat **jodistanem**, na reaktivní aldehydové skupiny
- vhodně orientované struktury RNA (i DNA) mohou vytvářet vazebná místa, komplementární k jiným biomolekulám - **APTAMERY**
  - možnost náhrady protilátek
  - tyto vazebné struktury, tzv. aptamery, lze vytvářet uměle kombinatorickými postupy (SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
  - nejznámější je aptamer vážící thrombin



# Modifikace sacharidů

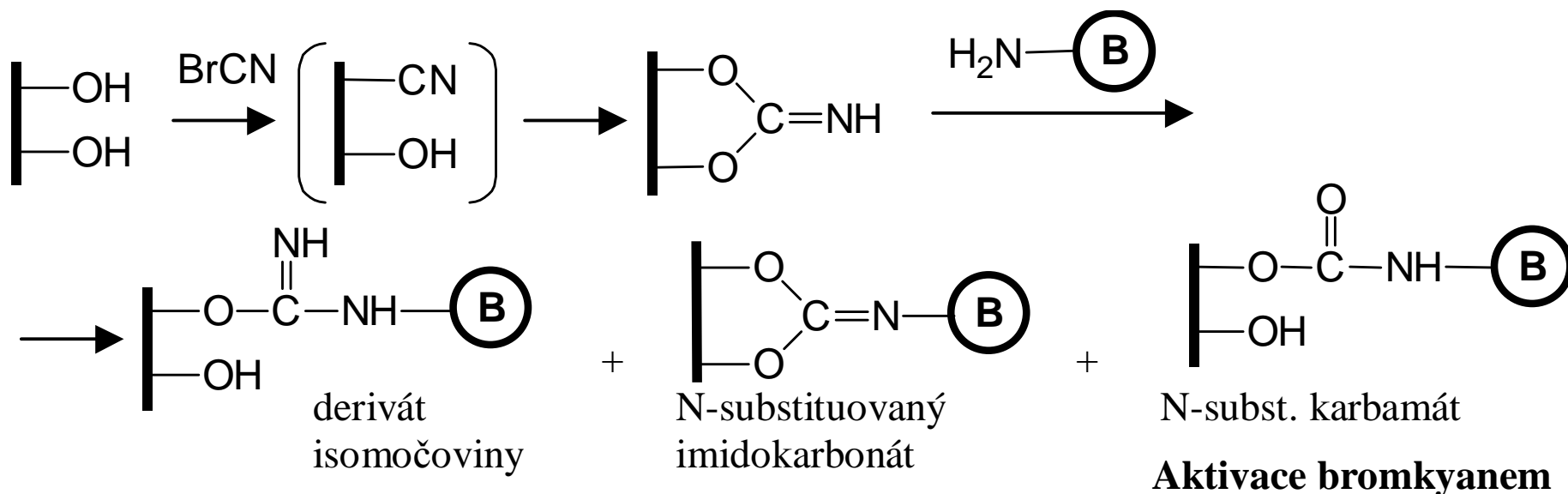
- volné existují v monomerní, oligo- a polymerní formě
- vázané ve formě konjugátů s proteiny (**glykoproteiny**) nebo lipidy (**glykolipidy**)
- reaktivní skupiny - hydroxyly a oxoskupiny
  - monosacharidy - dle polohy oxo skupiny aldosa a ketosa
  - ve vodném prostředí přítomna zejména hemiacetalová forma
  - glukosa jako glukopyranosa a fruktosa jako fruktofuranosa



- následně jsou přirozené oxoskupiny jsou méně reaktivní
- k modifikaci se využívají postranní glykosidické skupiny pokrývající povrch glykoproteinů
- velký význam má derivatizace polysacharidových matic sloužících jako stacionární fáze (separace, sensory, ...)

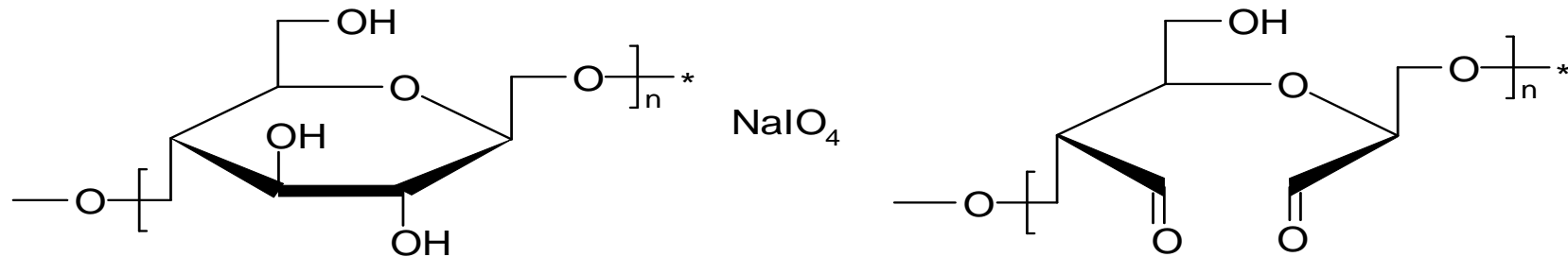
# Aktivace bromkyanem BrCN

- klasická metoda aktivace polysacharidových materiálů
- nevýhodou je vysoká jedovatost činidla
- výhodou dobré výtěžky reakce
- reakce probíhá v alkalickém prostředí, rozsah je úměrný koncentraci činidla
- meziproduct imidokarbonát reaguje s aminoskupinou biomolekuly B za vzniku různých derivátů:



# Oxidace jodistanem

- jodistan (periodate) za mírných podmínek a v neutrálním pH účinkuje na diolová uskupení v molekule sacharidů
- vhodné i pro postranní sacharidové složky glykoproteinů
  - postup je např. často využíván k oxidaci peroxidasy při výrobě enzymových imunokonjugátů



- získají se reaktivní aldehydové skupiny

# Reaktivní skupiny

- **obecný pohled na reaktivní skupiny bez vazby na konkrétní typ biomolekuly - univerzálně použitelné metody**
- **možnosti konverze existujících skupin**
- **reakce typické pro vybrané skupiny**

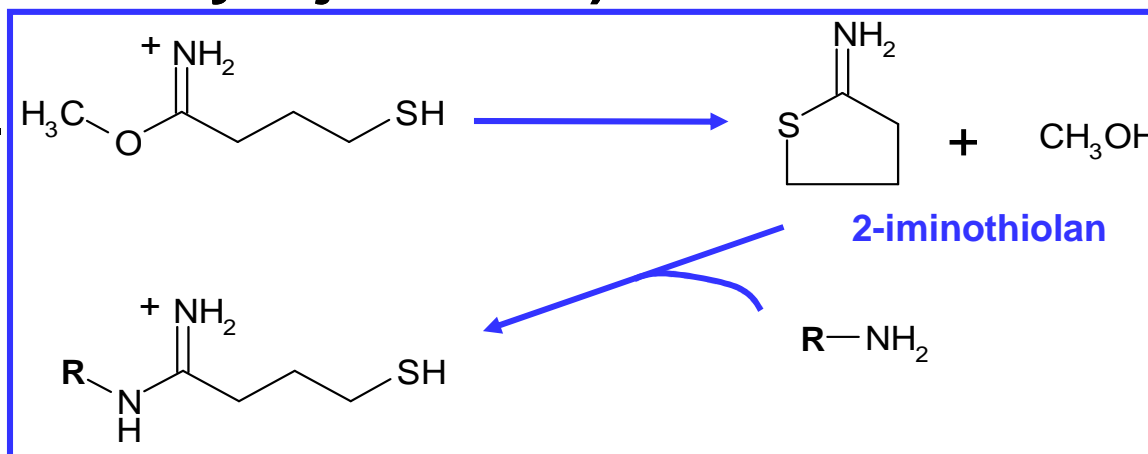
## **Vnášení reaktivních skupin**

- **přírozené reaktivní skupiny biomolekuly nemusí dostačovat pro zamýšlené syntetické postupy**
- **konjugace bílkovin - často heterobifunkční činidla, která vyžadují různé koncové skupiny v obou partnerech**
- **jeden z reakčních partnerů předem upraven zavedením potřebné skupiny**

## Thiolace (zavedení -SH)

- volná -SH skupina je pro konjugace velmi oblíbená
- v bílkovinách obvykle zřídka, nebo blokováno ve formě disulfidických -S-S- můstků
- stabilita -SH špatná - oxidace (inertní atmosféra, chelatace iontů kovů - katalyzují oxidaci)

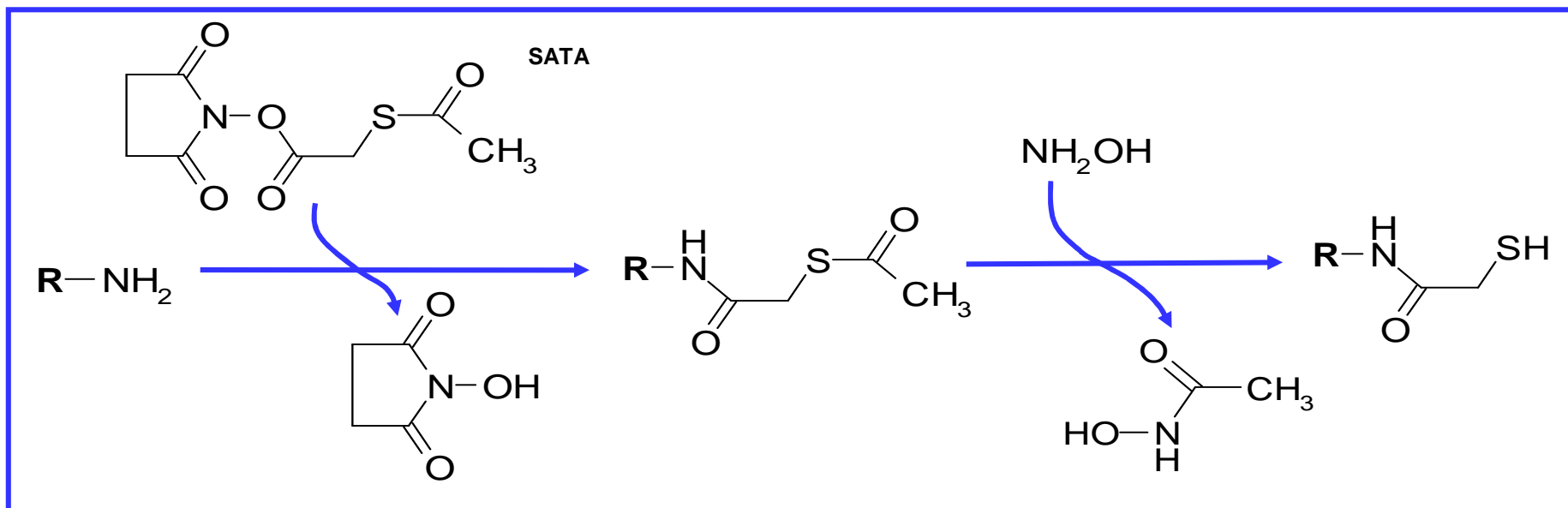
- methyl-4-merkaptobutyrimidát (Trautův reagent) cykl. na 2-iminothiolan (imidothioester)



- v mírně alk. podmínkách reaguje s primárními aminy
- alternativní methyl-3-merkaptopropionimidát poskytne kratší můstkovou část

## -NH<sub>2</sub> na -SH pomocí SATA

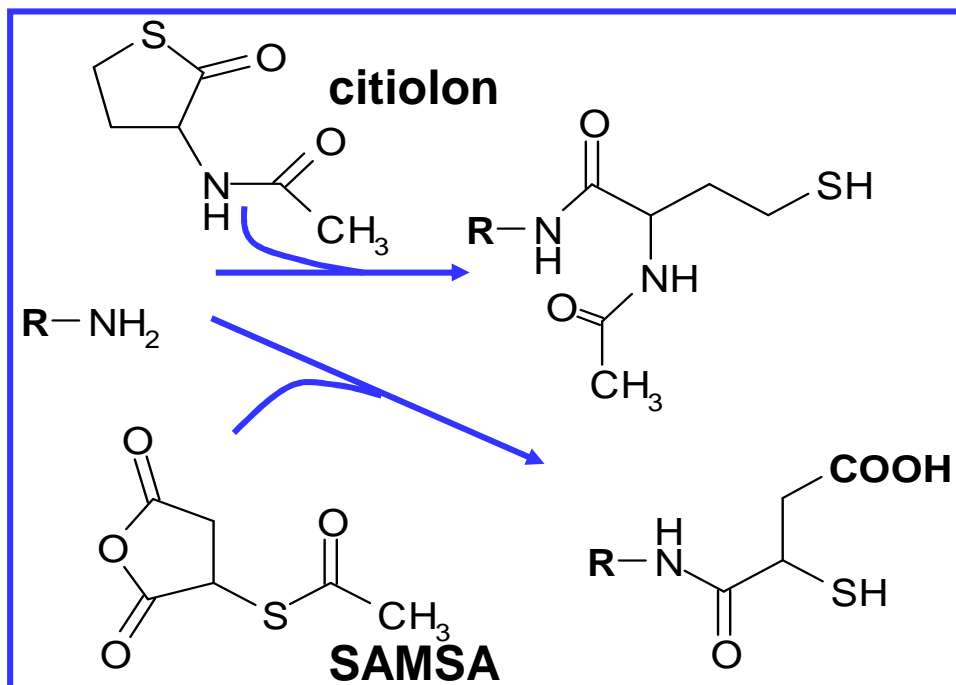
- N-sukcinimidyl-S-acetylthioacetát (SATA) působí konverzi aminoskupiny na thioskupinu
- odštěpí se N-hydroxysukcinimid, produkt obsahuje chráněnou sulfhydrylovou skupinu (lze uchovávat)
- deprotektace nadbytkem hydroxylaminu



- není třeba redukce - neovlivní se tedy nativní -SH skupiny
- analog N-sukcinimidyl-S-acetylthiopropionát (SATP) poskytne delší můstek

## -NH<sub>2</sub> na -SH: citiolon a SAMSA

- **citiolon**, N-acetylhomocysteinethiolakton resp. 2-acetamido-4-merkaptobutyrát reaguje jako Trautův reagent, reakci urychluje Ag<sup>+</sup>

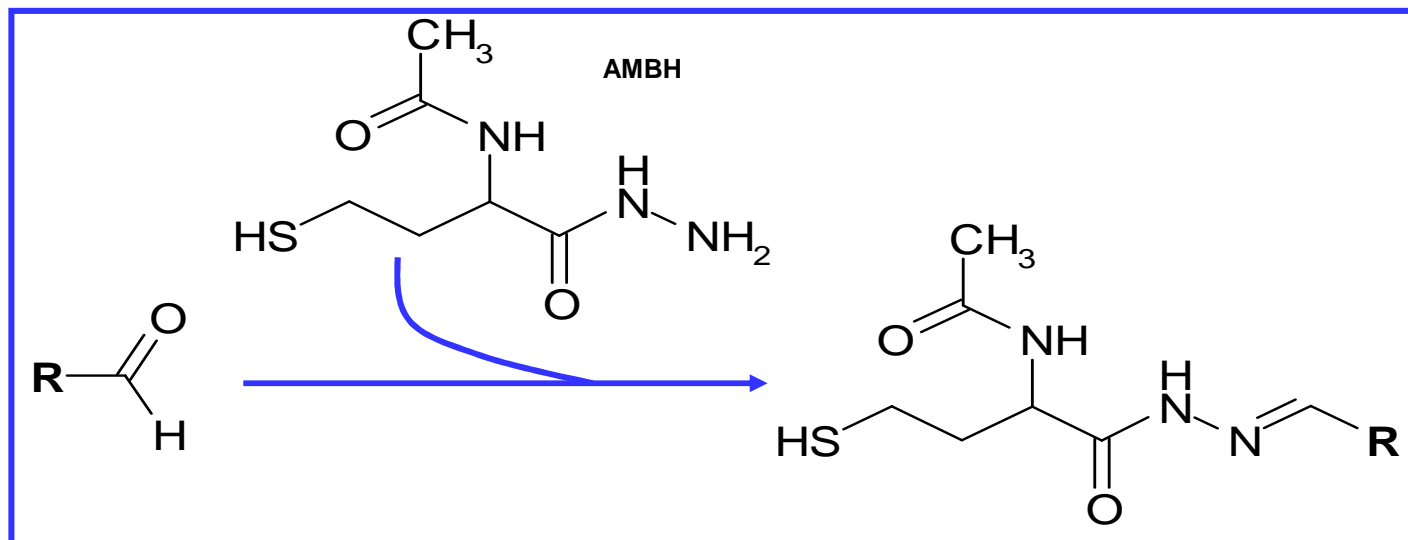


- reaktivní cyklický anhydrid - anhydrid S-acetylmerkaptó-jantarové kyseliny (**SAMSA**)
- uvolnění -SH skupiny deprotekcí s hydroxylaminem



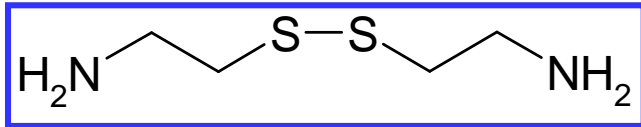
## >C=O na -SH

- konverze oxoskupiny (aldehyd / keton) je možná **hydrazidem** 2-**acetamido**-4-**merkaptomáselné** kyseliny (**AMBH**)
- např. pro **jodistanem oxidované sacharidy** či **glykoproteiny**



## -COOH nebo -O-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup> na -SH

- **cystamin** v přítomnosti karbodiimidu (EDC)

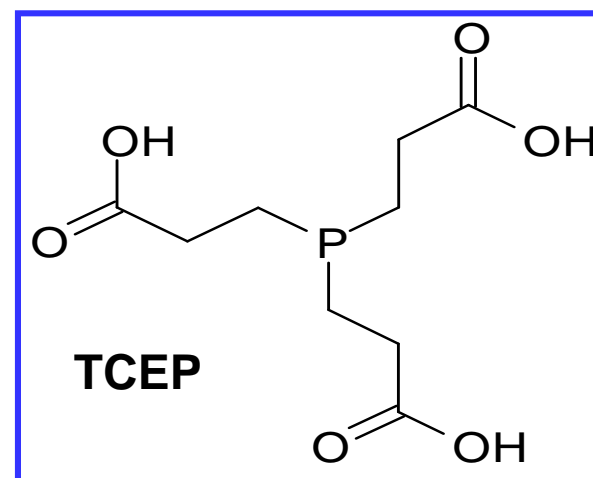


- vznikne amidová resp. fosfamidová vazba
- vnesené -S-S- disulfidové uzkupení je možné přímo spojit s molekulou obsahující volnou -SH skupinu (uvolní se cysteamin)
- nebo lze získat volnou -SH skupinu redukcí, např. DTT

- 
- **cysteamin** = 2-aminoethanethiol / 2-merkaptotoethylamin / dekarboxycystein / thioethanolamin
  - **cystein**
  - **cystin**

## **-S-S- na -SH**

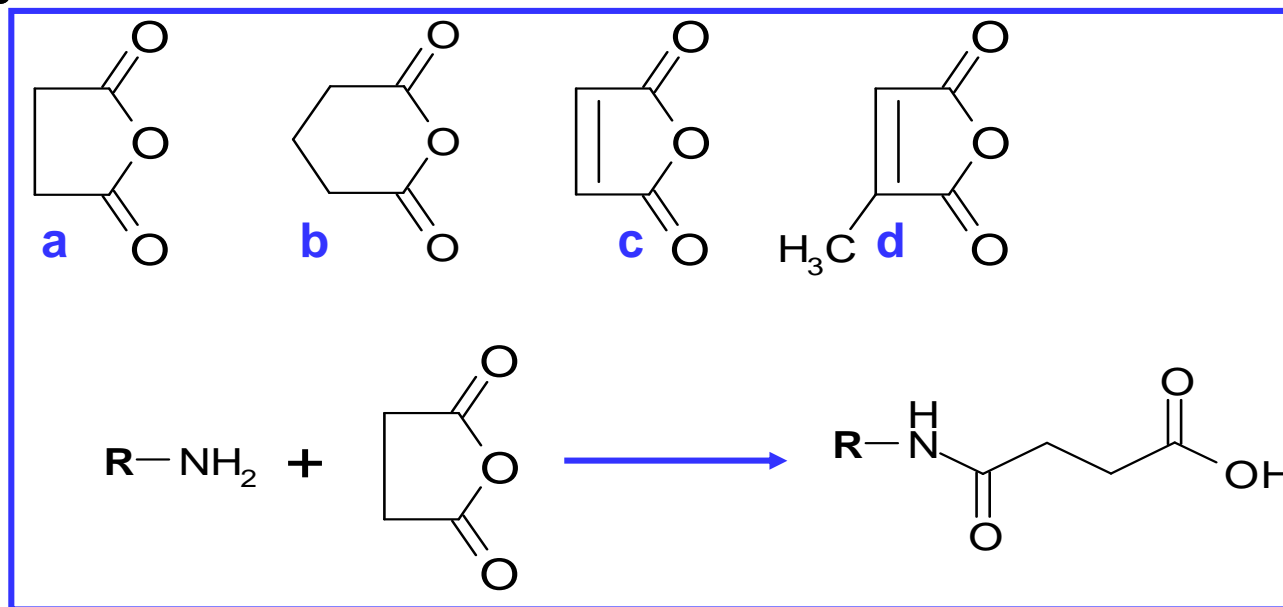
- speciální případ, k rozštěpení dojde redukcí, činidel je celá řada, např. s volnou -SH skupinou:
  - dithiothreitol (DTT, Clelandovo činidlo), 2-merkapt ethanol, 2-merkapt ethylamin
- imobilizované formy činidel - není třeba provádět separaci nadbytečného činidla
- obdobný výsledek poskytuje i TCEP, tris(karboxyethyl)fosfin
- nejjednodušší redukce pomocí borohydridu  $\text{NaBH}_4$
- má význam i pro štěpení nativních S-S můstků v bílkovinách



# Karboxyskupina místo -NH<sub>2</sub>

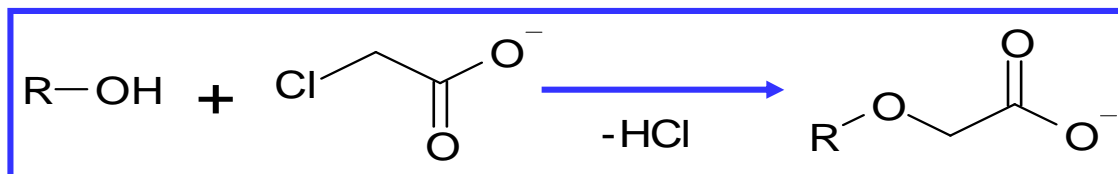
- užívají se **cyklické anhydridy dikarboxylových kyselin**
- reagují s volnou aminoskupinou - otevírá se kruh a vzniká amid
- může reagovat i hydroxyl serinu a threoninu, fenolátový anion dává nestabilní produkt
- dočasné blokování aminoskupiny - anhydrid kyseliny citrkonové
  - poskytuje amidovou vazbu při pH 8, snadno hydrolyzuje při pH 3 až 4 za opětovného uvolnění aminoskupiny
- možnosti: **a** sukcinanhydrid, **b** glutaranhydrid, **c** maleinanhydrid, **d** anhydrid kyseliny citrkonové

- změna aminoskupiny za karboxyskupinu mění náboj a pl dané biomolekuly



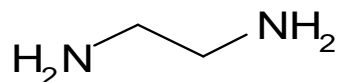
# Halogenoctové kyseliny

- **kyselina jodoctová:**
  - může reagovat s aminoskupinami lyzinu nebo imidazolového kruhu histidinu, se sulfhydrylovou skupinou cysteinu i s methylthioskupinou methioninu
  - reakce závisí na pH prostředí
- **další  $\alpha$ -halogenoctové kyseliny - podobně**
  - reaktivita derivátů klesá v řadě  $I > Br > Cl > F$
  - z druhé strany v řadě sulfhydryl  $>$  imidazolyl  $>$  thioether  $>$  amin
  - za ekvimolárních poměrů a v mírně alkalickém prostředí jodacetát reaguje exkluzivně s cysteinovým zbytkem
- **kyselina chloroctová** slouží k derivatizaci hydroxylových skupin v polysacharidových maticích (dextran)
  - reakce probíhá v alkalickém pH:

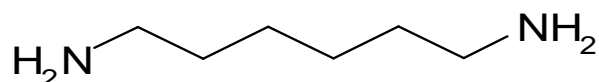


# Vnesení aminoskupiny

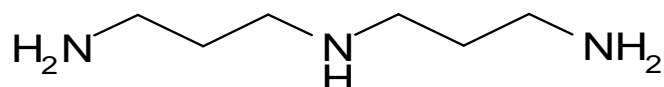
- nejběžněji konverze karboxylu pomocí **diaminů** v přítomnosti karbodiimidu (EDC) - vzniká amidová vazba a druhá koncová aminoskupina zůstává volně k dispozici



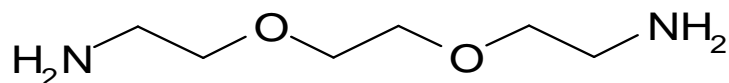
**ethylenediamin** (krátký můstek)



**hexamethylenediamin**  
(1,6-diaminohexan)



**3,3'-iminobis(propylamin)**

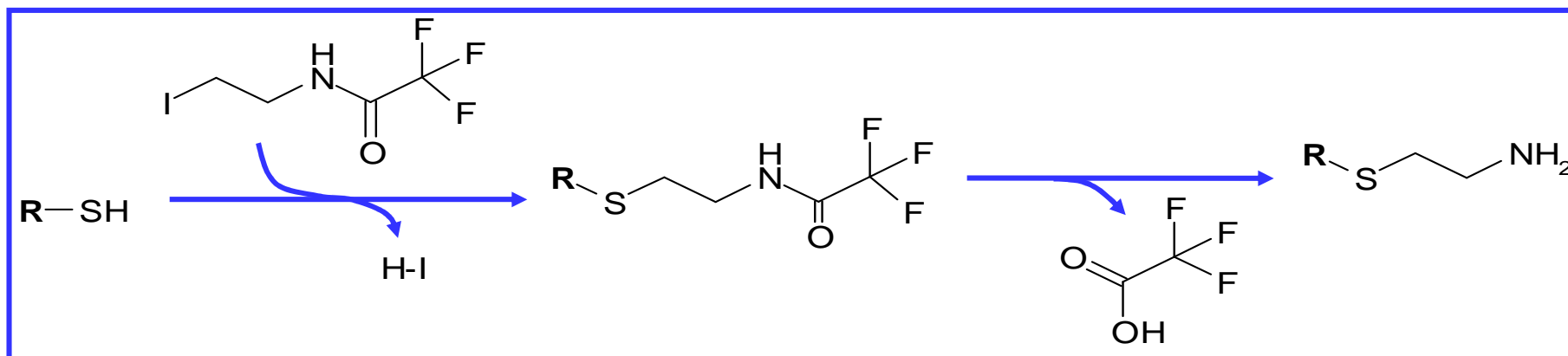


**Jeffamin EDR-148** (hydrofilní)

- konverze karboxyskupiny na aminoskupiny výrazně ovlivní celkový náboj biomolekuly a také její pI hodnotu
  - často je to zamýšleným účelem modifikace

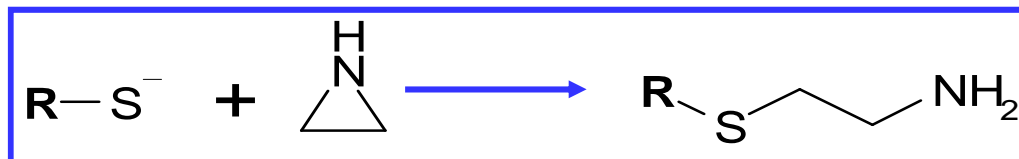
## -SH na -NH<sub>2</sub>

- Ize pomocí **aminoethyl-8,N-(jodoethyl)trifluoracetamidu**:



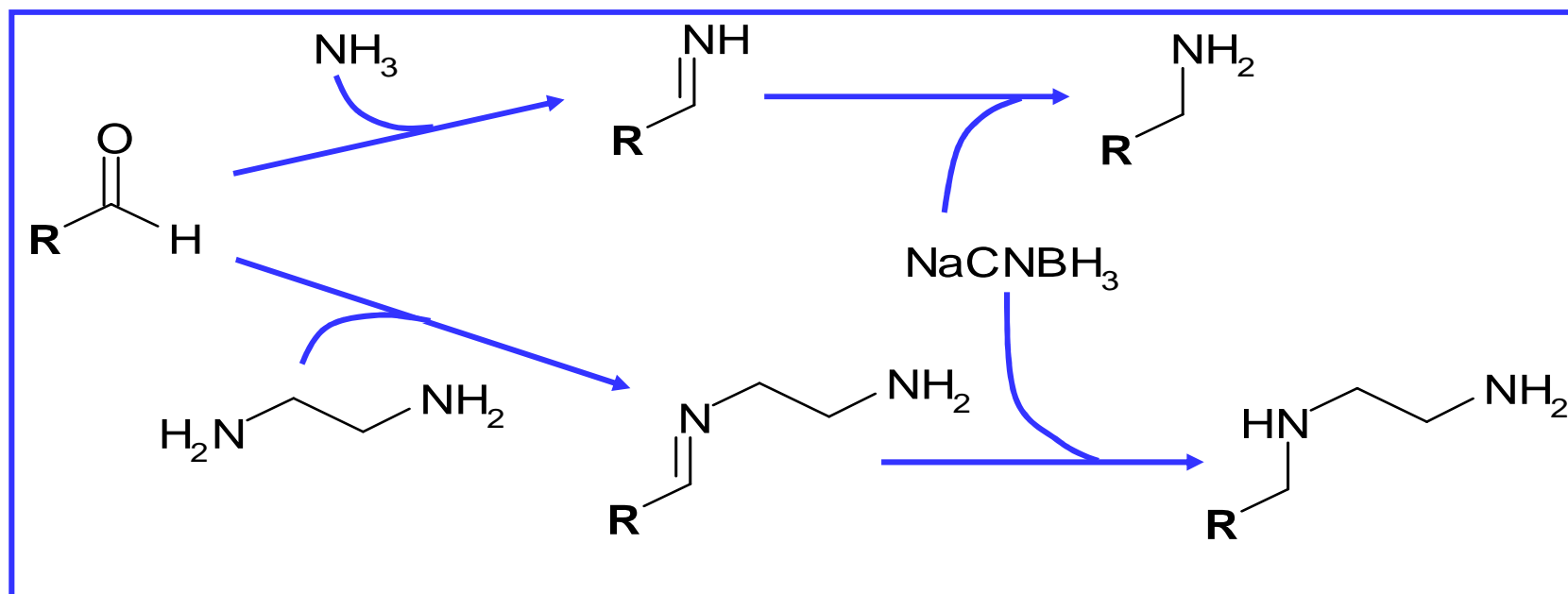
– deblokace v druhém kroku je spontánní

- **ethylenimin** v alkalickém prostředí - reakce převážně pouze s Cys
  - činidlo může vznikat přímo v alk. směsi cyklizací z 2-bromoethylaminu



## Aldehyd na -NH<sub>2</sub>

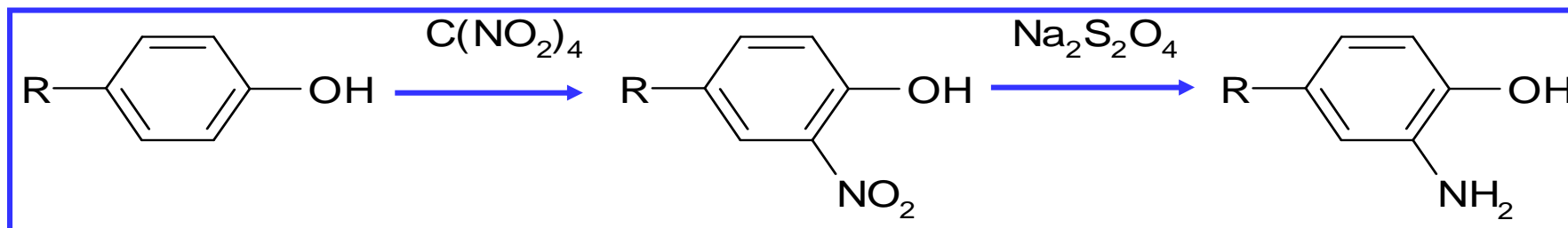
- redukční aminace pomocí **amoniaku** nebo **diaminu** v přítomnosti kyanoborohydridu sodného **NaCNBH<sub>3</sub>**
  - vzniká Schiffova báze, pak stabilizována redukcí
  - lze takto připravit např. aminovaný dextran po předcházející oxidaci jodistanem
  - nedochází k redukci aldehydické skupiny





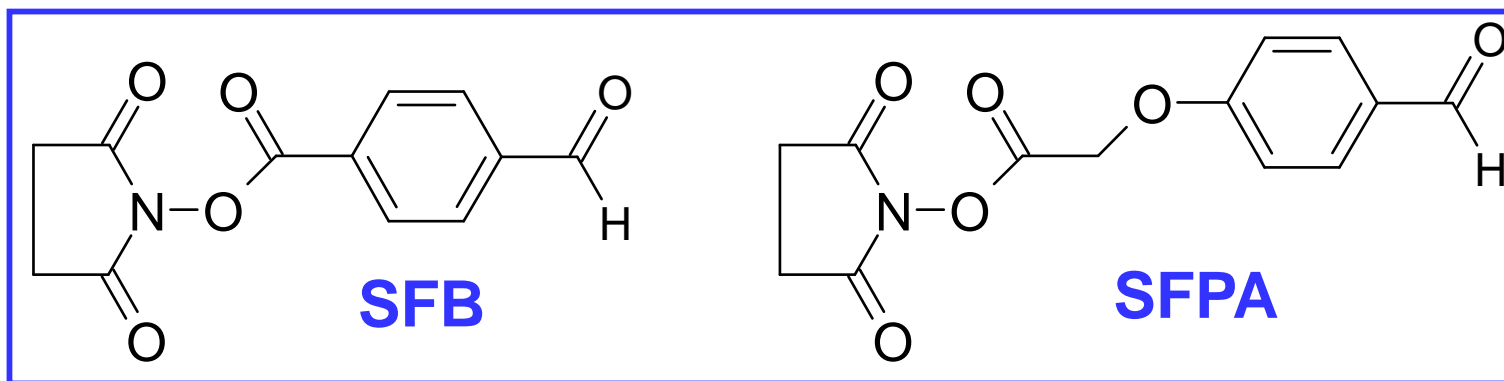
## -NH<sub>2</sub> z tyrosinu

- nitrace pomocí **tetranitromethanu**
- nitroskupina se zredukuje na aminoskupinu
- lze výhodně aktivovat **kyselinou dusitou** na diazoniovou sůl pro kopulační reakce



# Aminoskupina na aldehyd

- sukcinimidyl-p-formylbenzoová kyselina (SFB)
- sukcinimidyl-p-formyl-fenoxyoctová kyselina (SFPA)
  - při reakci vzniká amidová vazba, v případě proteinů výrazně narůstá jejich hydrofobicita



# Glutaraldehyd

## Schiffova báze

-C=N- je redukována na stabilnější formu (A)

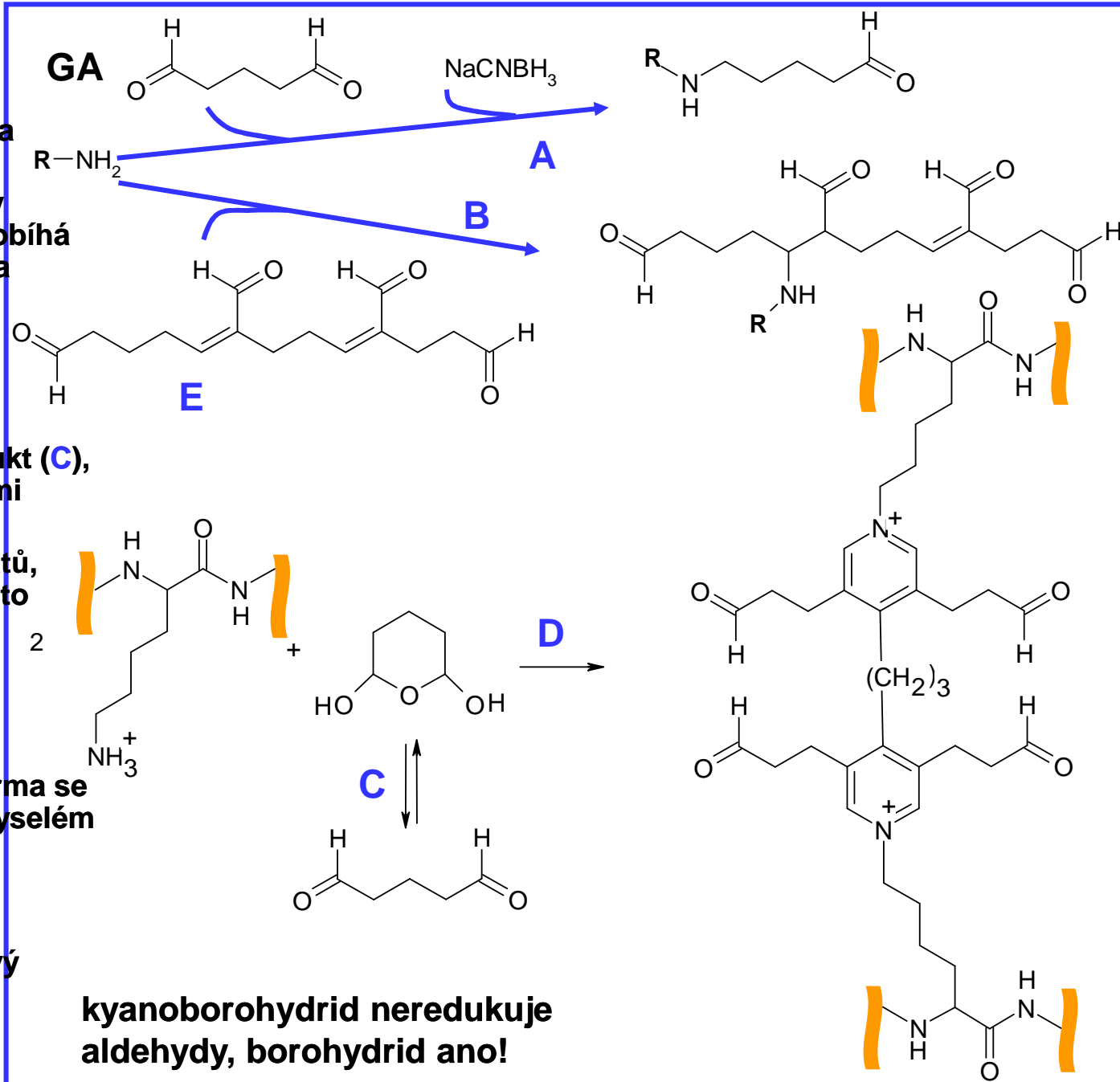
reagují i oligomerní adukty glutaraldehydu (E), probíhá adice aminoskupiny na dvojnou vazbu (B)

kondenzace na cykl. produkt (C), pak reakce s lyzinovými zbytky - zesítnění

tvorba smíšených konjugátů, málo definované a často vysokomolekulární

cyklická hemiacetalová forma se vyskytuje zejména v kyselém prostředí, může dále polymerovat (D)

$\alpha,\beta$  nenasycený aldehydový polymer (E) vzniká při zásaditém pH

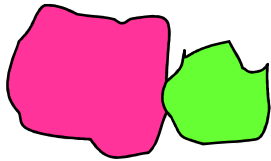


kyanoborohydrid neredukuje aldehydy, borohydrid ano!

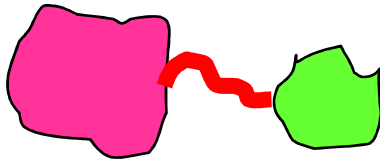
# Biokonjugační reakce

- spojení dvou biomolekul - vyžaduje činidla, která dokáží spojit přímo dvě různé nebo shodné povrchové skupiny na obou různých molekulách
- **přímé spojení** biomolekul bez přítomnosti nějaké můstkové spojovací struktury - **zero length crosslinkers**

karbodiimidy, karbonyldiimidazol,  
aldehyd + aminoskupina



- včlenění se **spojovací můstek** požadované definované délky tzv. **linker** – bifunkční činidla

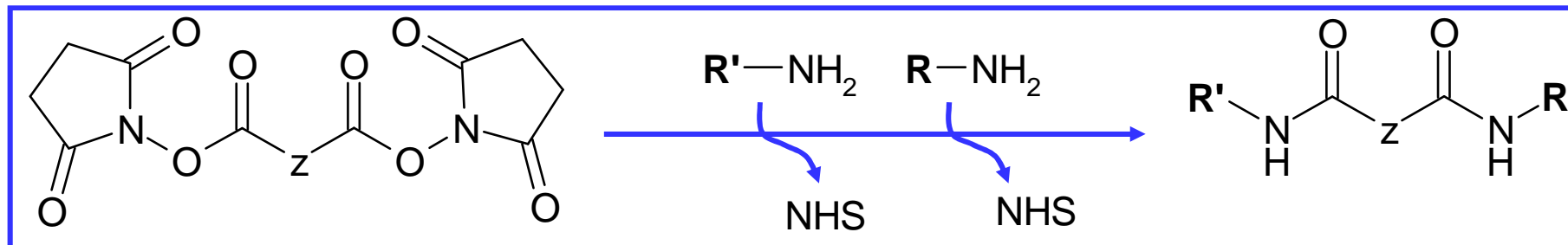


# Homobifunkční síťující činidla

- **symetrická činidla**, co mají **dvě shodné reaktivní skupiny**
- činidlo se spojí jedním koncem s biomolekuly A
- druhý konec se spojí s biomolekulou B
- vznikne **A-B konjugát** (to je žádaný produkt)
  - nežádoucí produkty: A-A, B-B, oligomerní  $A_xB_y$ , prokřížení skupin v rámci jedné molekuly A (nebo B)
- průběh je málo definovaný
- provádění reakce
  - jedнокrokově – vše se smíchá dohromady – pak vznikají často oligomerní, případně i precipitující produkty
  - nejprve biomolekulu A smíchat s konjugačním činidlem a nechat proběhnout její modifikaci, odstranit nadbytek činidla (např. dialýzou) a pak přidat druhou biomolekulu B
- komplikace - nestabilita reaktivních skupin ve vodném prostředí
  - mimo konjugaci probíhá i hydrolýza
- přes uváděné nedostatky se běžně a úspěšně využívají

# Homobifunkční NHS estery

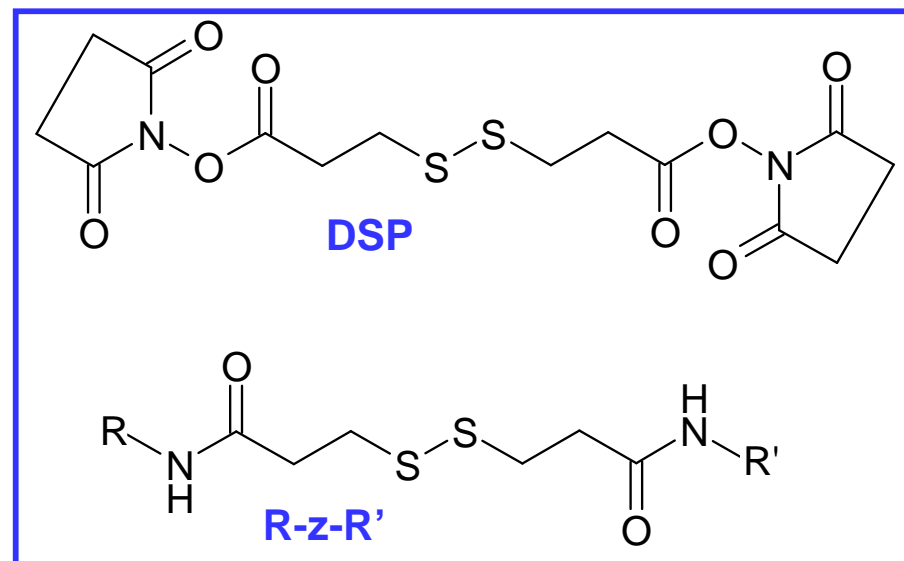
- karboxylové skupiny aktivované N-hydroxysukcinimidovou skupinou (NHS) (nebo sulfo-NHS) - velmi reaktivní vůči nukleofilním  $\text{-NH}_2$
- obecná struktura **NHS-z-NHS**, z značí střední část = spojovací můstek:



- **dithiobis(sukcinimidylpropionát) (DSP nebo DTSP)**, Lomantovo činidlo, z = 1,2 nm, disulfidové uskupení může být rozštěpeno pomocí DTT nebo merkaptoethanolu

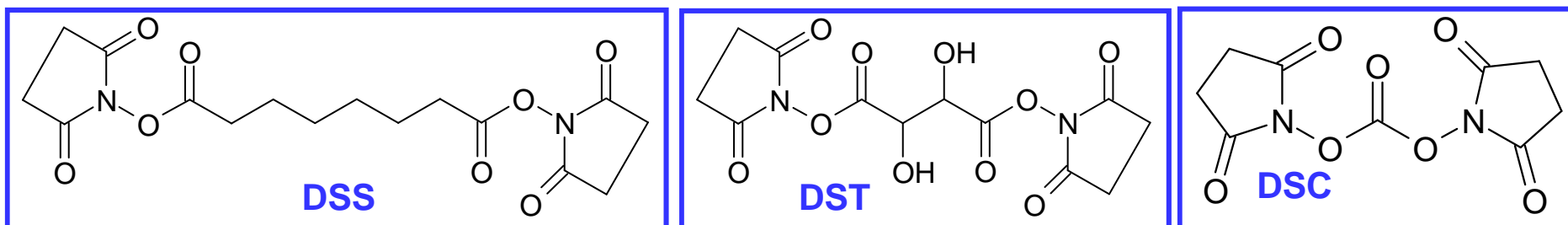
- sulfonovaná varianta:  
3,3'-dithiobis(sulfo-sukcinimidyl-propionát) (DTSSP)
- rozpustný ve vodě

- DSP a vznikající produkt:



## Další NHS bifunkční činidla

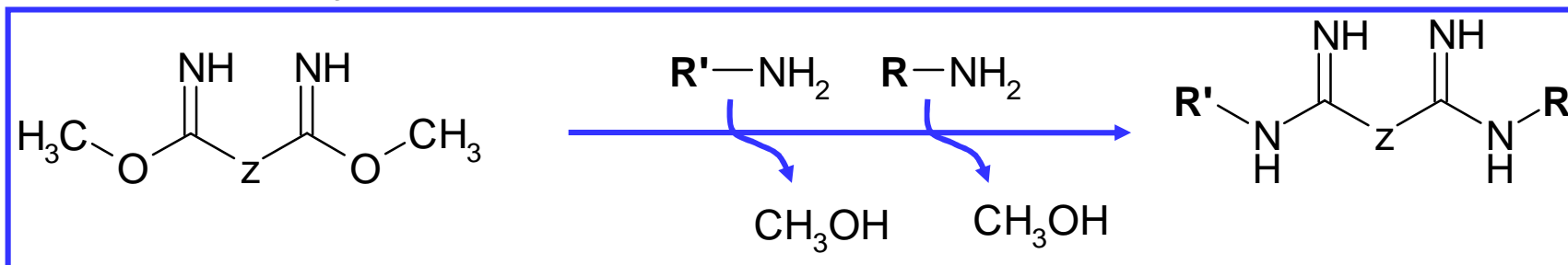
- disukcinimidylsüberát (**DSS**), C8 alifatický můstek,  $z = 1,14$  nm
  - existuje sulfovarianta bis(sulfosukcinimidyl)süberát (**BS<sup>3</sup>**)
  - hydrofilní **BS<sup>3</sup>** je výhodný k prokřížení (bílkovinných) komplexů na povrchu buněk - činidlo neprochází buněčnou membránou
  - kratší C5 můstek,  $z = 0,77$  nm, poskytuje disukcinimidylglutarát (**DSG**)



- disukcinimidyltartrát (**DST**) vytváří kratší můstek o délce 0,64 nm
  - přítomnost dvou hydroxylů uprostřed můstku umožňuje rozštěpit spojení použitím mírné oxidace jodistanem
- nejkratší spojení vytvoří **N,N'-disukcinimidylkarbonátu (DSC)**
  - spojením vzniká substituovaný derivát močoviny, vůči nukleofilům je extrémně reaktivní
  - nelze použít ve vodném prostředí, hydrolýzou vzniká  $\text{CO}_2$  a 2 NHS
  - pro derivatizaci polyethylenglykolů - spojí hydroxy a aminoskupinu za vzniku karbamátového uskupení
  - napřed se v nevodném prostředí aktivuje PEG, ten pak může ve vodném prostředí reagovat s proteiny (pegylace)

# Homobifunkční imidoestery

- imidoesterová (jinak imidátová) skupina ve vodném prostředí reaguje s aminoskupinou za vzniku imidoamidu (amidinu)
  - činidlo i produkt jsou ve vodném prostředí protonovány na imidovém dusíku, tedy dobře rozpustné

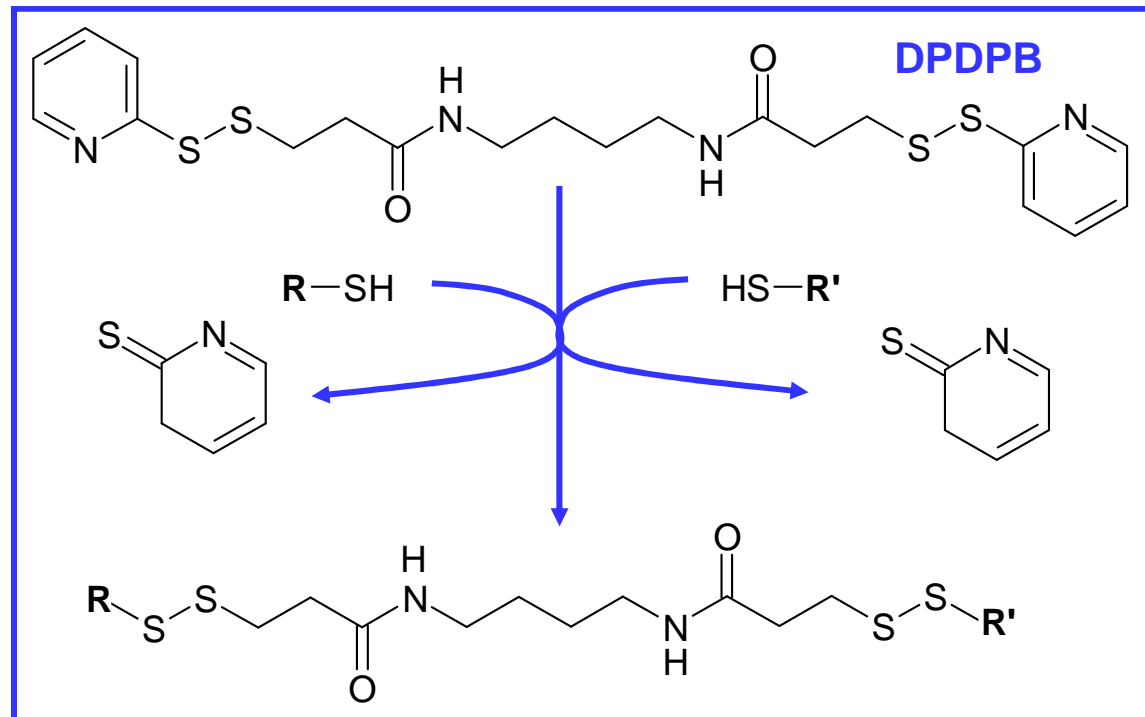


- amidinová vazba je stabilní v mírně kyselém prostředí, při vyšším pH může hydrolyzovat
- činidla jsou na bázi **imidoderivátů dikarboxylových kyselin**:
  - dimethyl adipimidát (**DMA**, C6 z = 0,86 nm)
  - dimethyl pimelimidát (**DMP**, C7 z = 0,92 nm)
  - dimethyl suberimidát (**DMS**, C8 z = 1,1 nm)
- **DMP** stabilizuje komplexy protilátek s proteinem A
- dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidát (**DTBP**) obsahuje uprostřed disulfidové spojení (z = 1,19 nm)
  - může být případně rozštěpen DTT



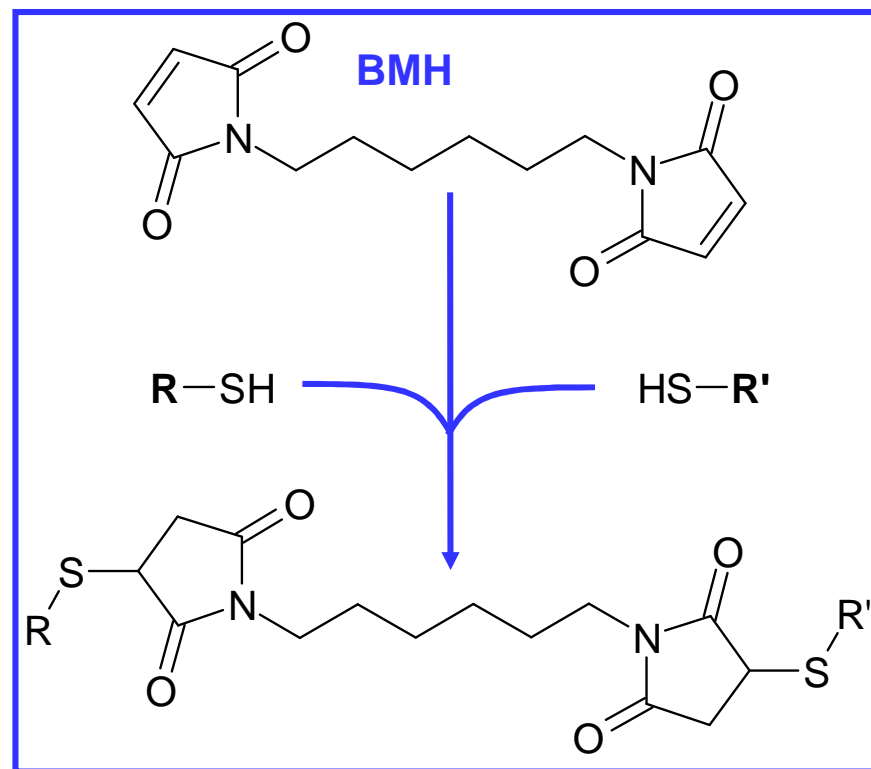
# Homobifunkční činidla spojující -SH skupiny

- dvě skupiny podle stability vznikajícího spojení:
  - disulfidová vazba - spojení lze snadno rozrušit pomocí oxidačních činidel
  - thioetherová vazba - spojení trvanlivé
- 1,4 di-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] butan (**DPDPB**)
  - reverzibilní spojení biomolekul,  $z = 1,6$  nm, 14 atom. řetězec
  - odštěpovaný pyridin-2-thion lze sledovat při 343 nm
  - pro vytváření konjugátů redukováných molekul protilátek s enzymy



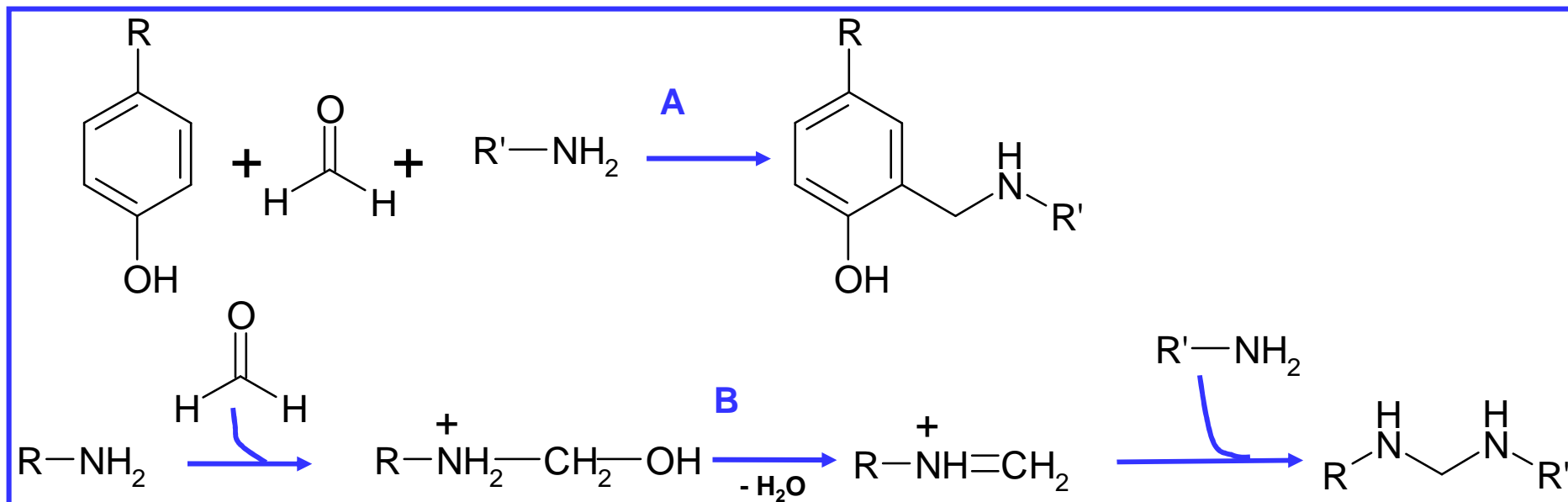
## Thioetherové spojení

- bis(maleimido)hexan (**BMH**) reaguje v neutrálním prostředí za vzniku stabilního spojení ( $z = 1,6$  nm)
- dochází k adici sulfhydrylových skupin na dvojně vazby v cyklu a vznikají tak stabilní thioetherové vazby
  - mechanismus vychází z použití N-ethylmaleimidu (NEM) jako inhibitoru cíleného na SH skupinu



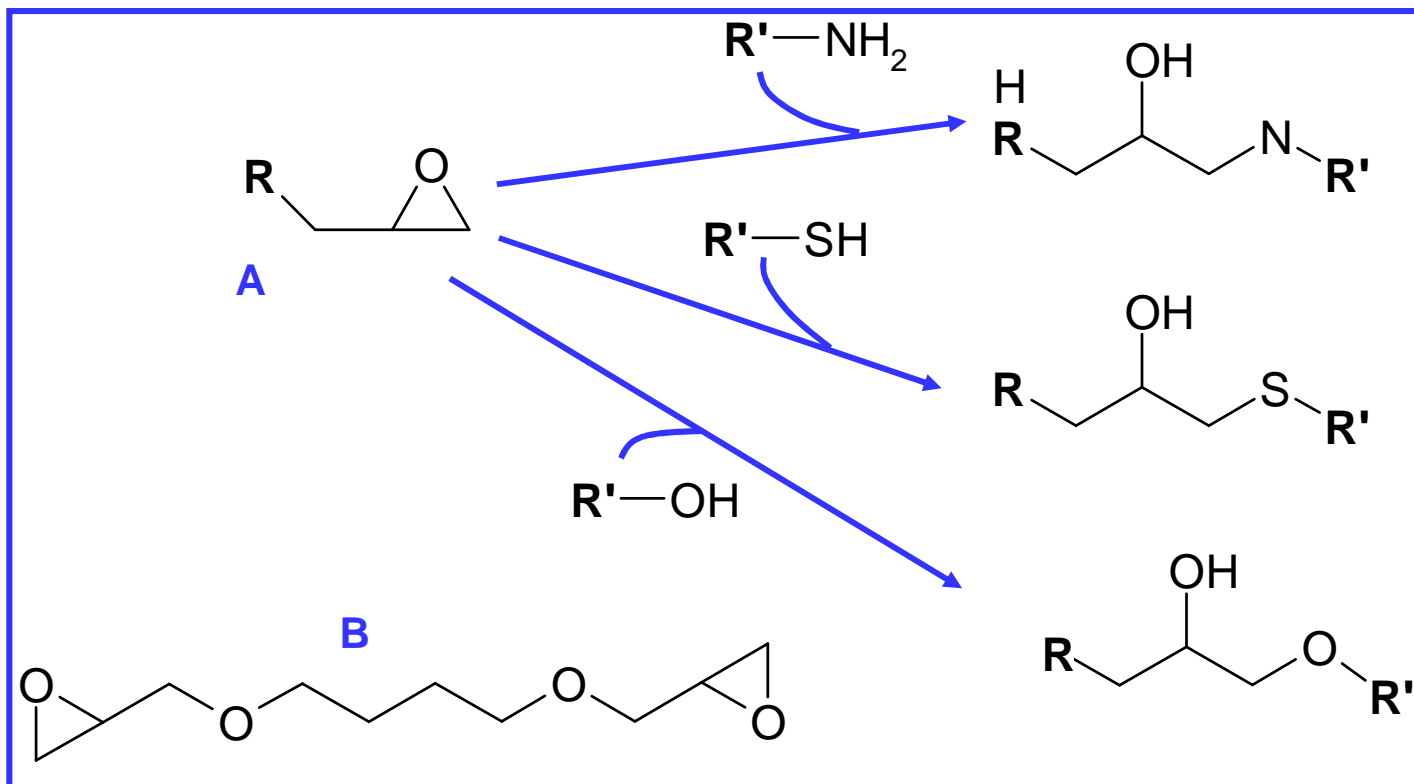
# Homobifunkční aldehydy

- dříve zmíněný **glutaraldehyd**
- **formaldehyd** - nejkratší spojovací můstek, reaguje prostřednictvím
- **Mannichových kondenzací (A)**
  - spojuje sloučeniny s aktivovanými vodíky (např. na jádře fenolu v *ortho* a *para* polohách) s formaldehydem a dále s aminoskupinou
- **přes imoniový kationt s aminoskupinou (B)**
  - spontánně vznikne reaktivní imoniový kationt, který zreaguje s další aminoskupinou a dojde ke spojení přes C1 můstek



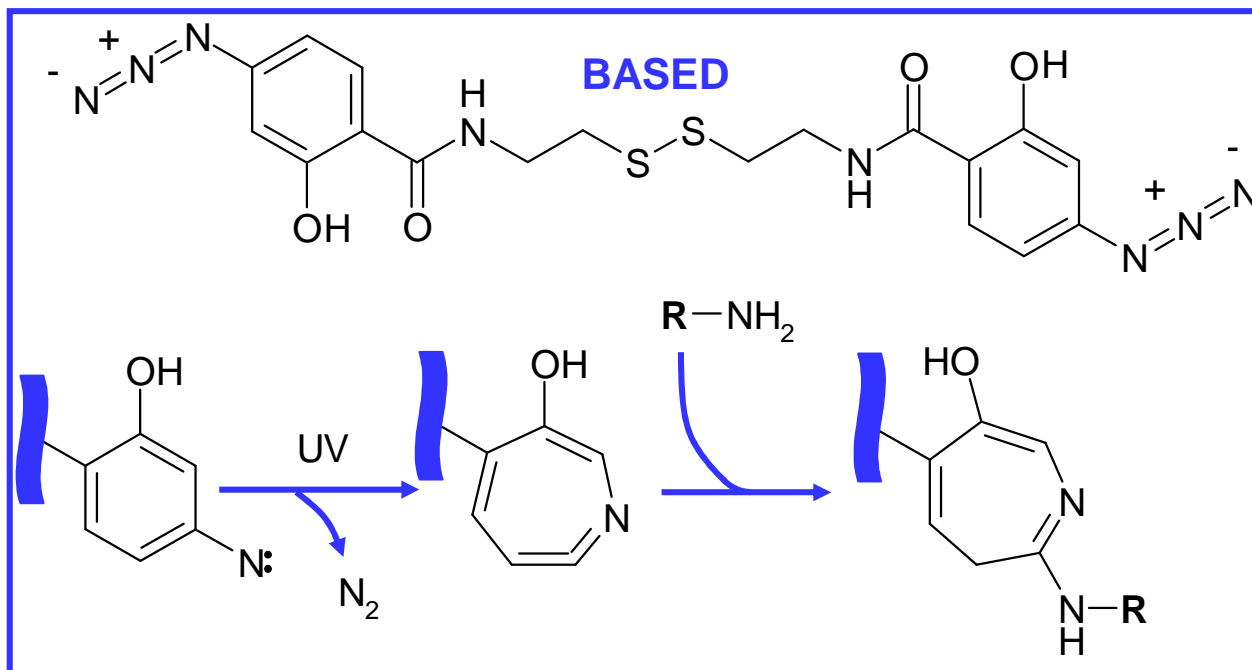
## Bis-epoxidové sloučeniny

- jsou schopné spojovat biomolekuly obsahující nukleofilní skupiny včetně aminů, hydroxylů a sulfhydrylů
- dochází k otevření tříčlenného epoxidového kruhu (A)
- reakce probíhají v mírně alkalickém prostředí
- k aktivaci matric nesoucích hydroxylové skupiny (polysacharidy)
- nejznámějším činidlem je **1,4-butandiol diglycidylether (B)**



# Fotoreaktivní crosslinkery

- bis[ $\beta$ -(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfid (**BASED**) je aktivován ozářením UV světlem (270 nm)
- uvolní se molekula dusíku a vznikne velmi reaktivní a nestálý **arylnitren** - rychle se přemění za rozšíření aromatického kruhu na **dehydroazepin**, ten následně reaguje s aminoskupinou biomolekuly



- derivát vzniklý po konjugaci obsahuje na 7-členném kruhu fenolický hydroxyl, který ho aktivuje např. pro elektrofilní značení radioaktivním jodem

## další možnosti...

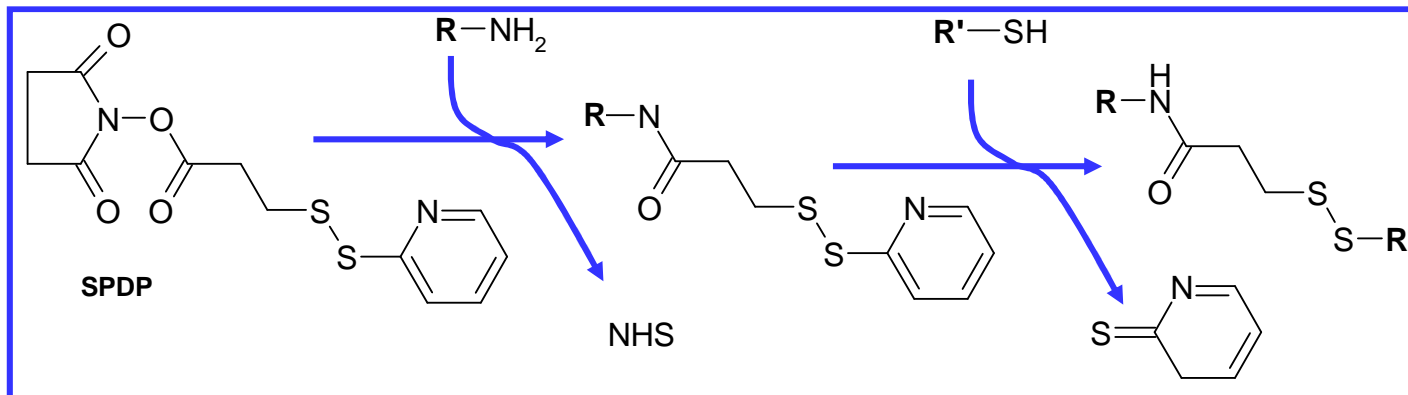
- aktivované vodíky na aromatickém jádře - diazoniové deriváty
- úspěšné spojení se projeví oranžovým nebo ještě tmavším zbarvením vzniklých konjugátů - charakteristické pro diazosloučeniny
- diazoniové sloučeniny se obvykle generují z příslušných diaminů - **o-tolidin** a **benzidin** (*p*-diaminodifenyl) - reakcí s  $\text{NaNO}_2$  v slabě kyselém prostředí v chlazené reakční směsi
- vzniklá diazoniová sůl reaguje ochotně se zbytky tyrosinu a histidinu
- 
- difluorbenzenové deriváty - atomy fluoru na vhodně aktivovaném aromatickém jádře (např. pomocí nitroskupin) reagují substitučně s aminoskupinami
  - mohou ale reagovat i jiné nukleofily
- dostupná činidla jsou 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen (**DFDNB**) nebo 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrodifenylsulfon (**DFDNPS**)

# Heterobifunkční konjugační činidla

- obsahují **dvě různé reaktivní skupiny** - spojí se s různými funkčními skupinami konjugovaných biomolekul
- použití obvykle probíhá ve dvou nebo třech krocích
  - výrazně se omezuje množství oligomerních nebo polymerních produktů
  - činidlo je smícháno s první biomolekulou, kterou derivatizuje svou reaktivnější skupinou
  - nadbytek činidla je odstraněn (dialýza, gelová filtrace)
  - druhá reaktivní skupina je obvykle stabilnější a následně reaguje s druhou biomolekulou
- **variabilita reaktivních skupin** - lze lépe vybrat cílové místo
  - menší narušení důležitých aktivních míst (epitop antigenu, vazebné místo protilátky, aktivní místo enzymu ...)
- **důležitá je i spojovací můstková část – linker**
  - může být samozřejmě pasivní
  - může být cílem dalších reakcí, zejména se jedná o rozštěpení
  - význam pro zachování bioaktivity konjugátu má délka a polarita linkeru

## Spojení -SH a -NH<sub>2</sub>

- nejčastější vzhledem k běžné dostupnosti cílových skupin v bílkovinách
- pro aminoskupinu je v činidle nejčastěji přítomna NHS skupina v kombinaci s několika možnostmi pro SH skupiny
- N-sukcinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionát (**SPDP**) poskytuje amidovou vazbu s biomolekulou nesoucí -NH<sub>2</sub> a disulfidovou vazbu s biomolekulou nesoucí -SH:



- pro SPDP je  $z = 0,68$  nm
- s delším řetězcem ( $z = 1,12$  nm) pod názvem **LC-SPDP** (long-chain)
- rozpustnější se sulfonovanou NHS skupinou – **Sulfo-LC-SPDP**

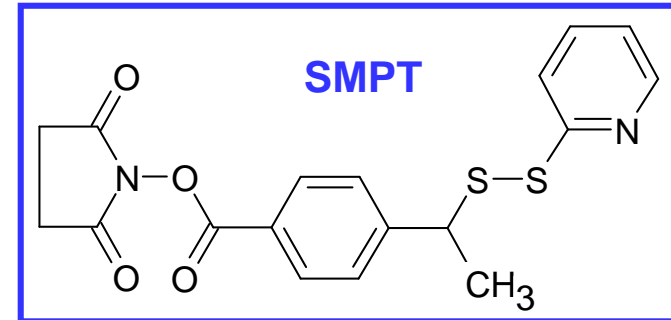


- **sukcinimidyl- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-pyridyldithio)toluen (SMPT)**

- můstek tvořený benzenovým jádrem a methylovou skupinou chránící disulfidovou skupinu (sterická zábrana ataku) zlepšuje trvanlivost konjugátů

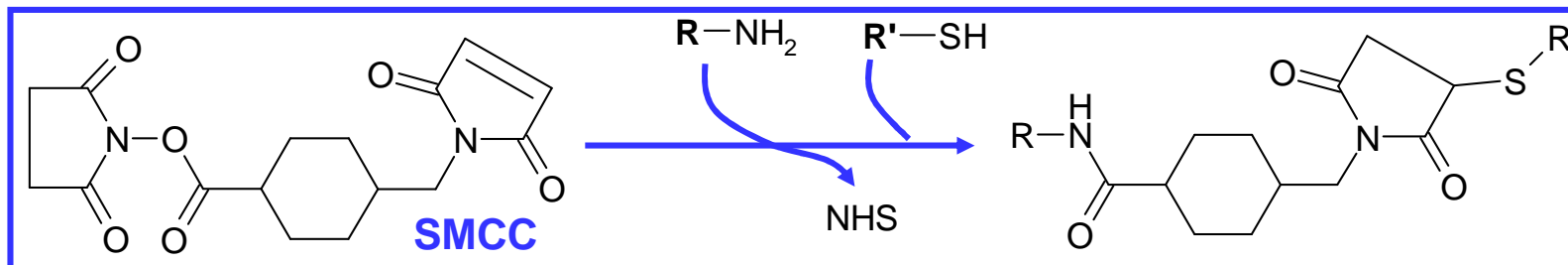
- analog **Sulfo-LC-SMPT**

- spojení biomolekul lze rozebrat v místě **-S-S-** vazby redukcí (např. DTT)



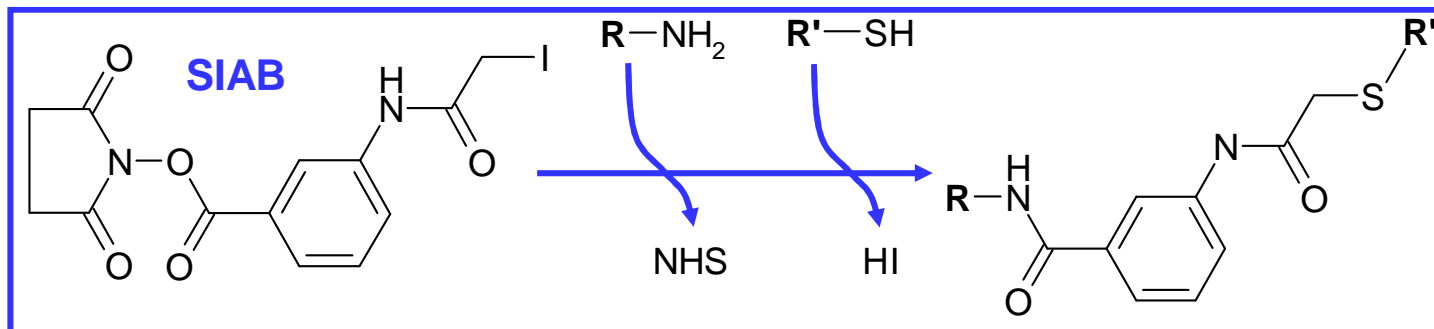
- „nerozebíratelné“ spoje používají pro SH skupinu maleimidovou nebo jodacetátovou reaktivní část

- sukcinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-karboxylát (**SMCC**)  
z = 1,16 nm)



- další alternativní činidla: *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysukcinimidoester (**MBS**, 0,99 nm), sukcinimidyl-4-(*p*-maleimidofenyl)butyrát (**SMPB**, 1,45 nm) a *N*-( $\gamma$ -maleimidobutyryloxy)-sukcinimidester (**GMBS**, 1,02 nm)

- **N-sukcinimidyl(4-jodoacetyl)-aminobenzoátem (SIAB, 1,06 nm)**

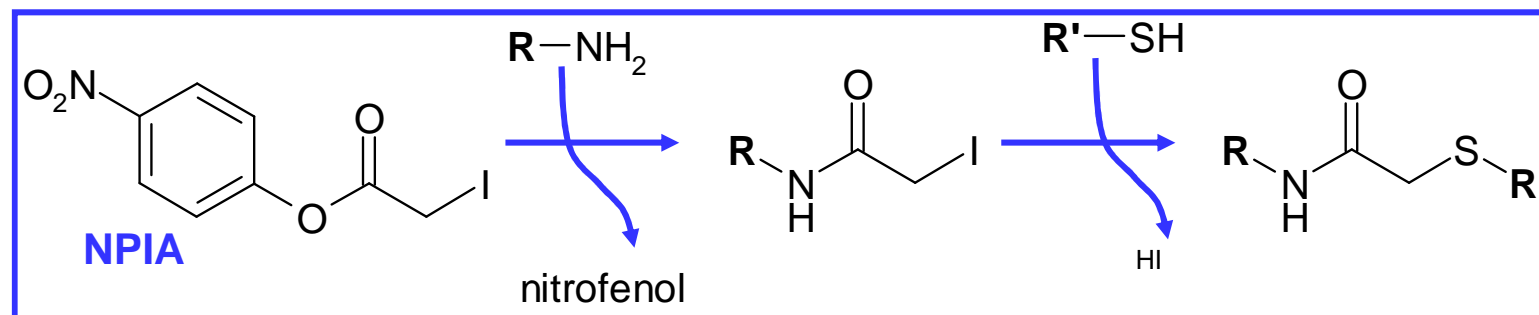


- **alternativní činidla**

- sukcinimidyl-6-[(jodoacetyl)-amino]hexanoát (**SIAX**)
- jeho varianta s můstkem prodlouženým o aminohexanovou kyselinu, tj. sukcinimidyl-6-[6-(((jodoacetyl)amino)-hexanoyl)amino]hexanoát (**SIAXX**)
- sukcinimidyl-4-(((jodoacetyl)amino)methyl)cyklohexan-1-karboxylát (**SIAC**) s analogem **SIACX** mají objemnější spojovací můstek

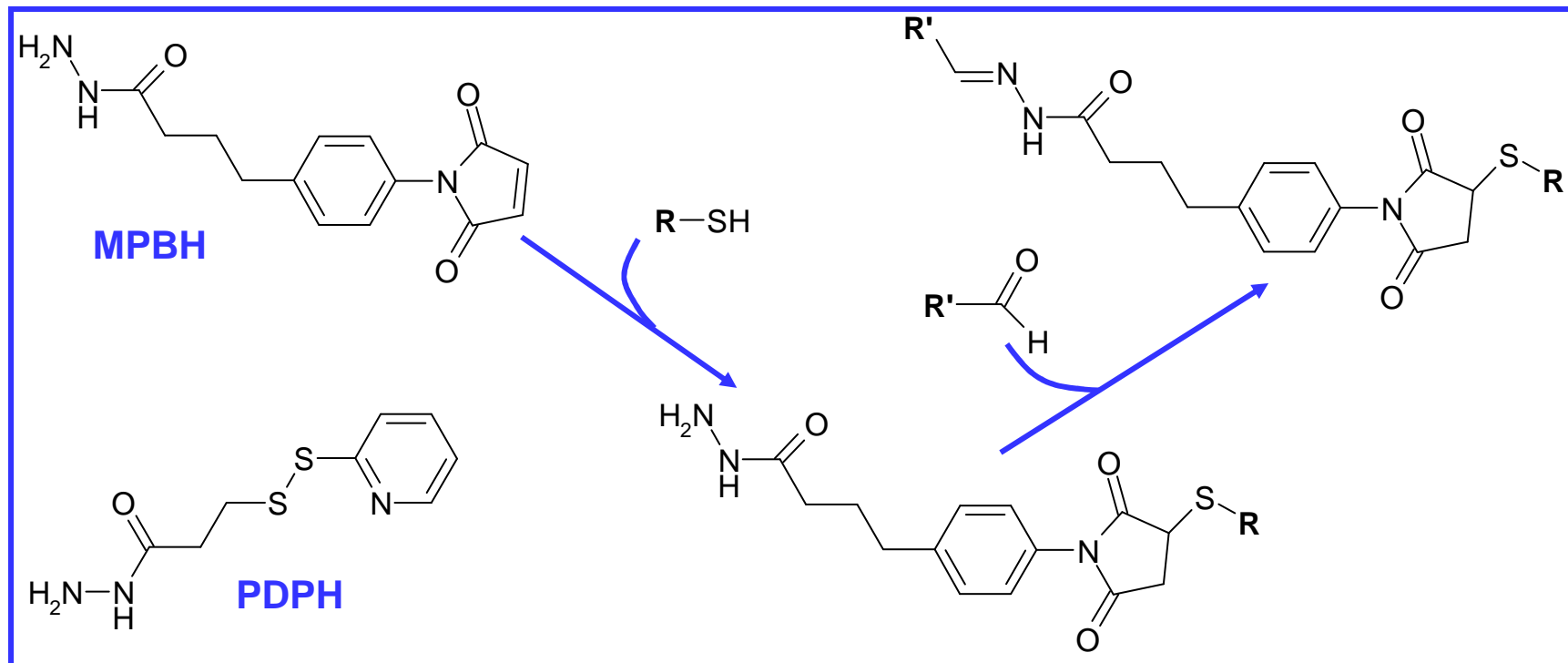
- ***p*-nitrofenyljodo-acetát (NPIA) vůči –NH<sub>2</sub> reaguje podobně jako NHS, vzniká také amidová vazba**

- výhodou může být krátké spojení mezi biomolekulami



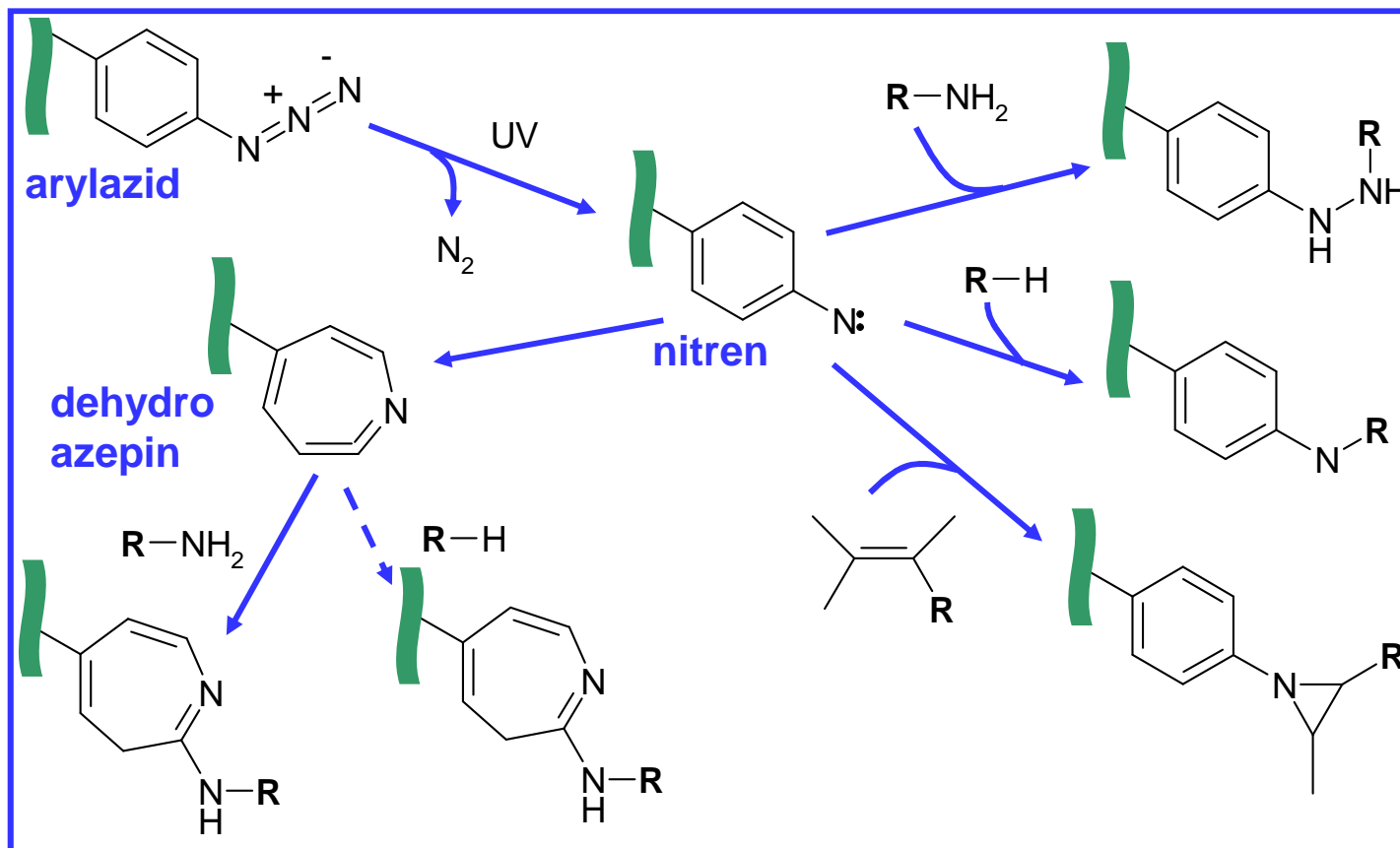
## Spojení $>C=O$ a $-NH_2$

- pro konjugaci zejména sacharidů (a glykoproteinů)
  - oxoskupina se snadno generuje mírnou oxidací jodistanem
  - reaguje s ní zejména hydrazidová skupina
  - z druhé strany se účastní skupiny popsané již dříve
- hydrazid kyseliny 4-(4-N-maleimidofenyl)-máselné (**MPBH**),  $z = 1,79$  nm
  - je vhodné provést reakci nejprve s SH skupinou, purifikovat produkt a následně připojit aldehydovou skupinu.
- rozebíratelné spojení se získá 3-(2-pyridyldithio)-propionylhydrazidem (**PDPH**)

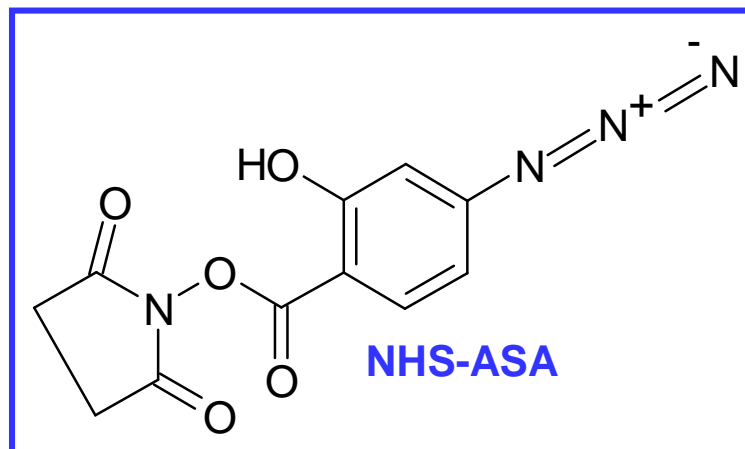


# Amino- a fotoreaktivní konjugační činidla

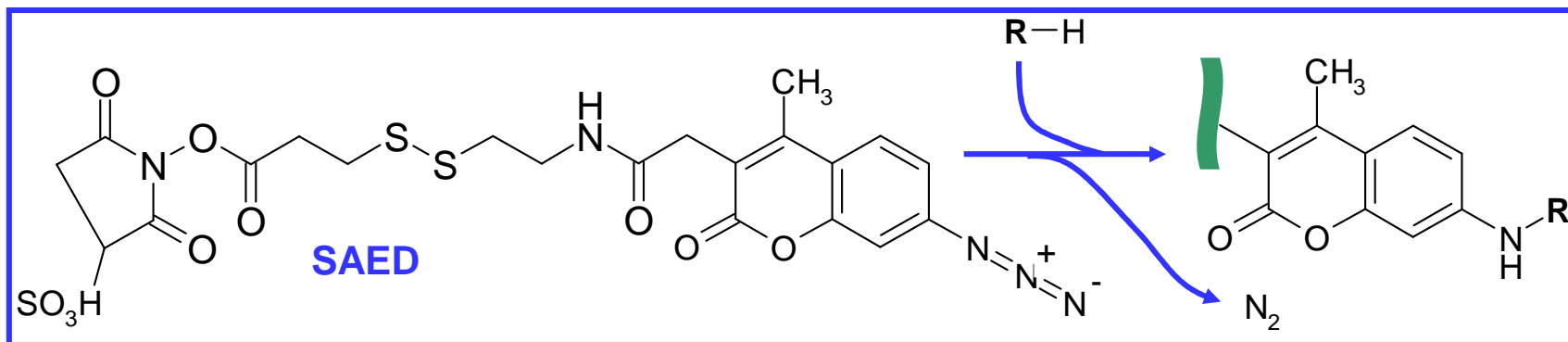
- jedna část činidel je aktivována světlem - **arylazidy**, fluorované aryl azidy, benzofenony, některé diazosloučeniny a diazirinové deriváty
  - první konjugační reakce napojí činidlo na biomolekulu (pracovat ve tmě)
  - odstraní se nadbytek činidla a navázaná fotoreaktivní skupina pak po osvětlení reaguje s partnerskou biomolekulou



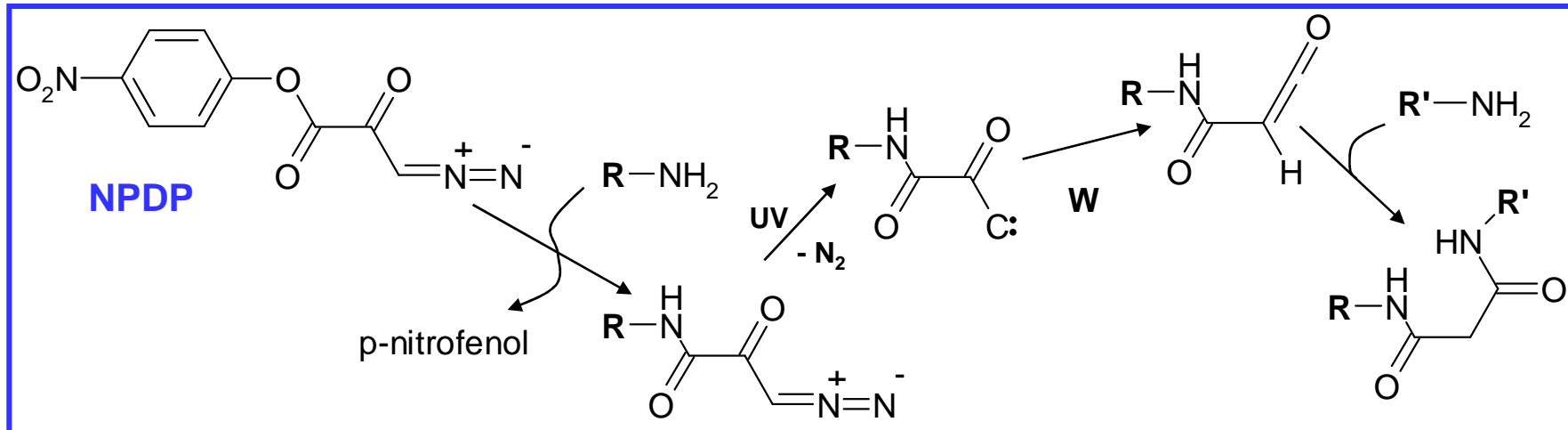
- **N-hydroxysukcinimidyl-4-azidosalicylát (NHS-ASA, 0,80 nm)**
  - derivatizuje aminoskupiny obvyklým způsobem – vznik amidové vazby
  - k dispozici jsou i varianty Sulfo-NHS-ASA a Sulfo-NHS-LC-ASA (1,8 nm)
- **fenolický hydroxyl aktivuje benzenové jádro pro značení radioaktivním jodem, to lze provést před fotoreakcí**
  - k dispozici jsou varianty bez hydroxyly na benzenovém jádře:
- **N-hydroxysukcinimidyl-4-azidobenzoát (HSAB, 0,90 nm)**
- **případně s nitroskupinou N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysukcinimid (ANB-NOS, 0,77 nm)**
- **štěpitelné konjugáty poskytuje sulfosukcinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionát (SASD, 1,89 nm)**
- **linker může být alifatický řetězec u N-sukcinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrofenylamino)hexanoátu (SANPAH, 1,82 nm)**
  - nitroskupina podporuje fotoaktivaci již nad 320 nm



- **sulfosukcinimidyl-2-(7-azido-4-methylkumarin-3-acetamid)ethyl-1,3'-dithiopropionát (SAED, 2,25 nm)**
  - vzniklý konjugát obsahuje fluoreskující uskupení – derivát kumarinu
  - lze tak pohodlně sledovat pohyb konjugátu
  - fluorescence se přitom iniciuje až po fotolytické reakci
- **podobně se chová sulfosukcinimidyl-7-azido-4-methylkumarin-3-acetát (Sulfo-SAMCA, 1,28 nm)**



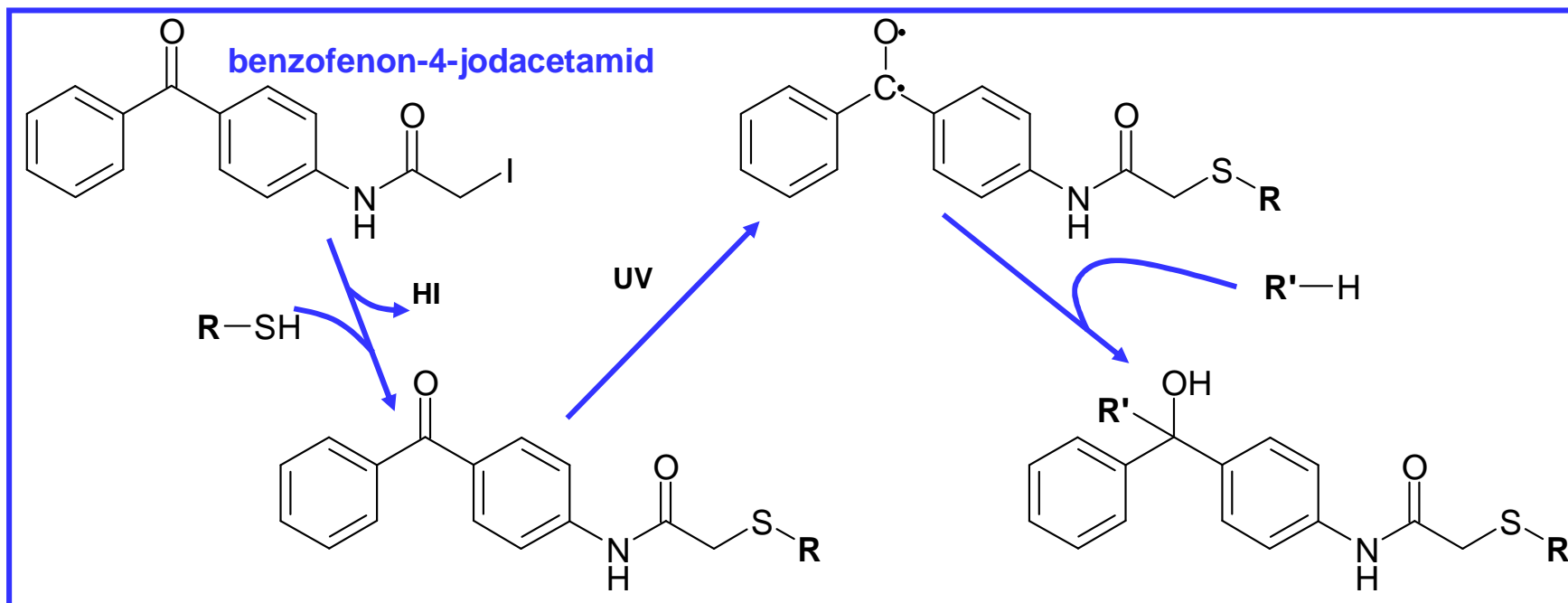
- alternativní fotolytickou skupinou je **diazopyruvátové** uskupení
  - poskytuje reaktivní karbenové uskupení, které se přemění Wolfovým přesmykem (W) na ketenové uspořádání
  - pak aduje nukleofilní skupinu - *p*-nitrofenyldiazopyruvát (pNPDP)



- podobným mechanismem reaguje i *p*-nitrofenyl-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionát (PNP-DPT)

# Sulfhydrylová a fotoreaktivní konjugační činidla

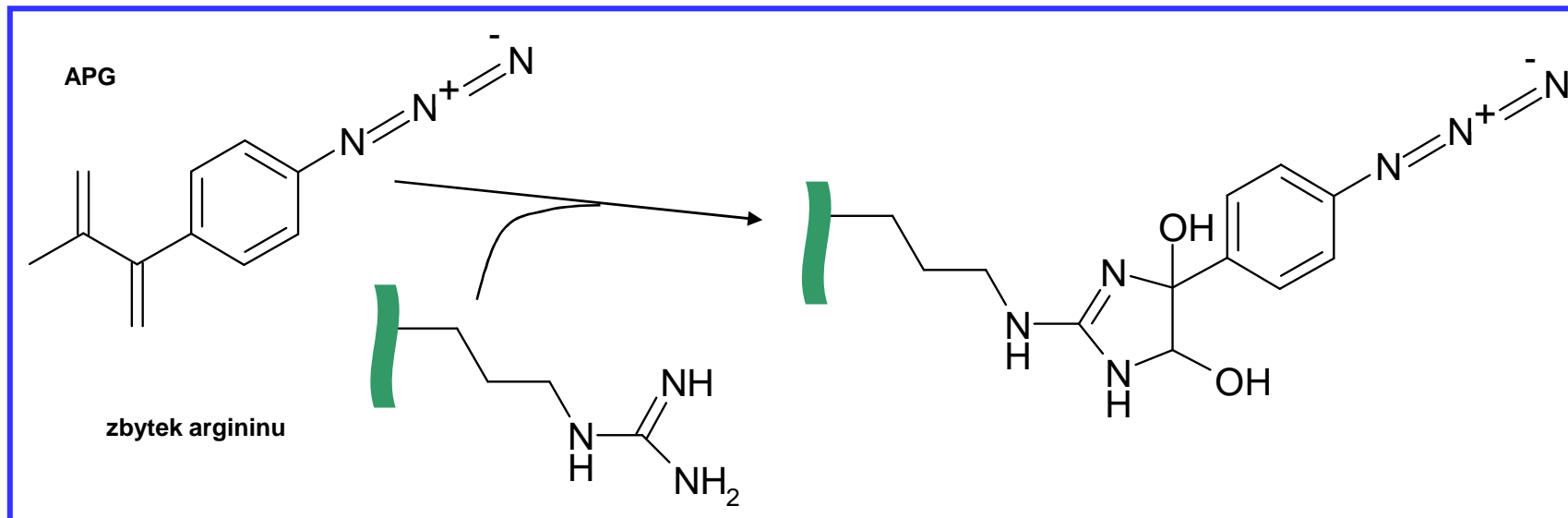
- kombinací předchozích skupin je 1-(*p*-azidosalicylamido)-4-(jodacetamido)butan (ASIB) a N-[4-(*p*-azidosalicylamido)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamid (APDP)
- jinou fotoaktivní část obsahuje **benzofenon-4-jodacetamid**
  - výhoda benzofenonu - možnost opakovaného průběhu fotoaktivace i po nekonjugační zpětné rekombinaci volných elektronů
  - vyšší výtěžky konjugace
  - alternativní SH-reaktivní část má benzofenon-4-maleimid





## Další fotokonjugace

- s guanidinovou skupinou argininu může reagovat *p*-azidofenyglyoxal (APG)

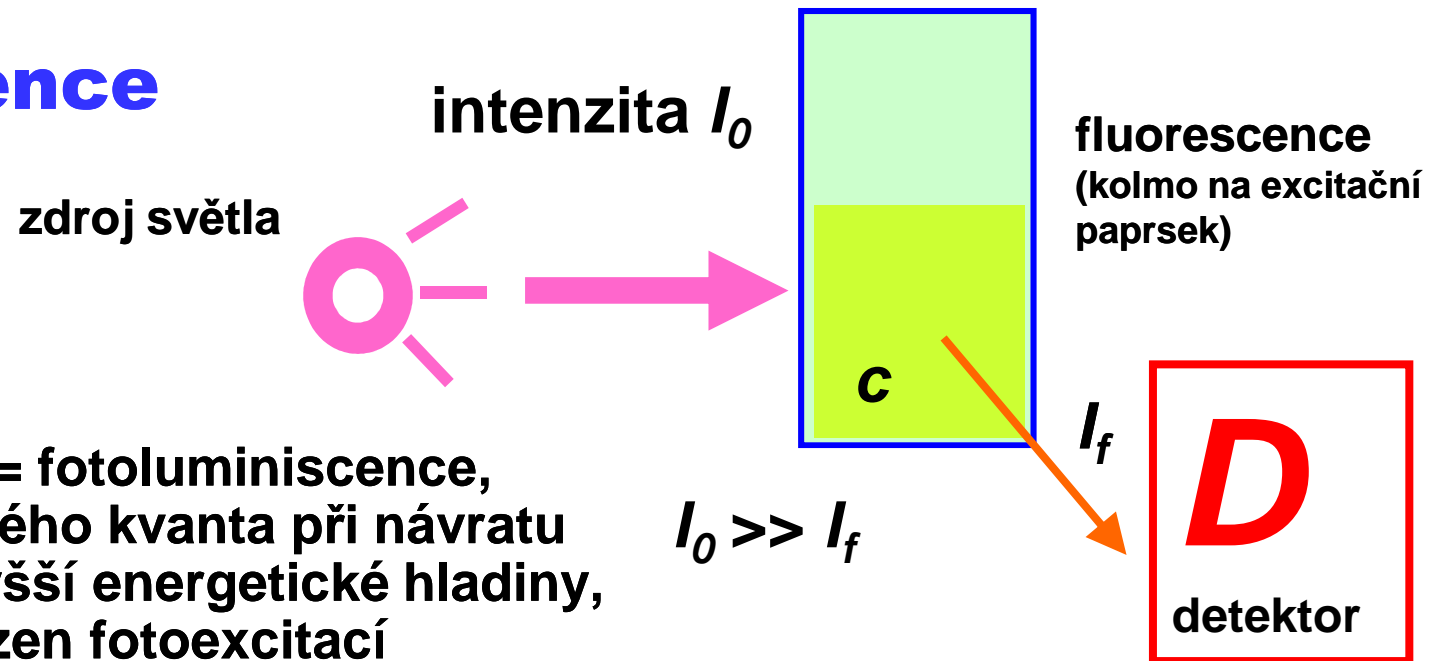


- pro napojení fotoaktivní části na aldehydovou skupinu je použitelný *p*-azidobenzoylhydrazid (ABH)
- karboxyskupina může být fotoaktivována pomocí 4-(*p*-azidosalicylamido) butylaminu (ASBA)
  - jeho volná aminoskupina se spojí s karboxylem v přítomnosti karbodiimidu, kdy vznikne amidová vazba

# Fluorescenční metody

- široké použití v oblasti výzkumu i praktické aplikace
- **bioanalytické metody**
  - klinická chemie (fluorogenní substráty při stanovení enzymů)
  - imunochemické metody (ELISA, FIA fluorescenční imunoanalýza)
  - genetické analýzy a DNA biočipy
  - monitorování prostředí (fluorescenční proby)
- **biomedicína**
  - identifikaci a separace buněk v průtokové cytometrii
  - zobrazení buněčných komponent ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu
  - konformace a dynamika buněčných systémů

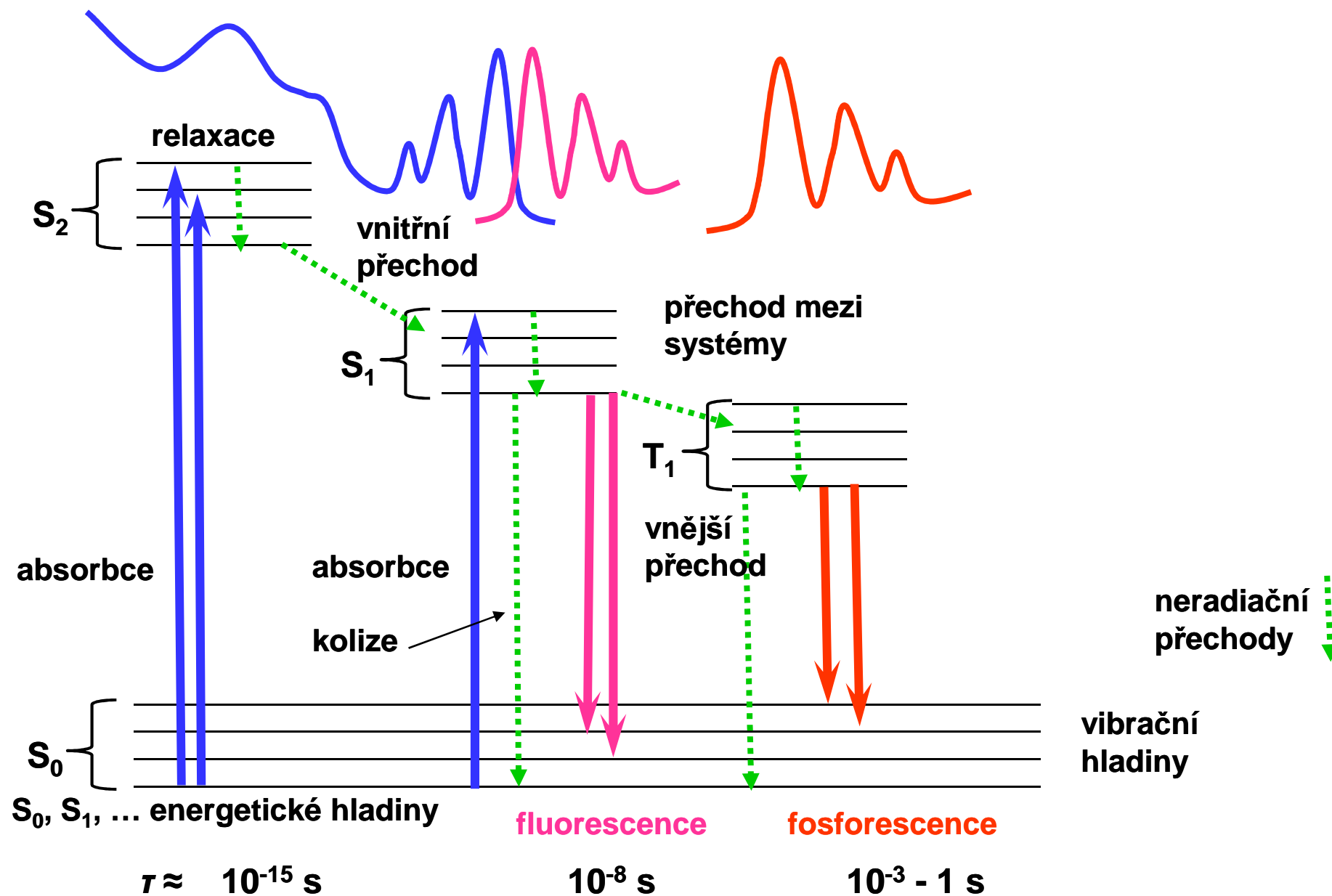
# Fluorescence



- fluorescence = fotoluminiscence, emise světelného kvanta při návratu elektronu z vyšší energetické hladiny, kam byl vybuzen fotoexcitací
- fluorescence  $F$  se udává při určité vlnové délce
  - emisní x excitační spektra
  - relativní vyjádření, alternativně jako intenzita světelného toku na jednotkovou plochu ("count")
- další charakteristiky: kvantový výtěžek  $\Phi$ , střední doba života  $\tau$ , polarizace  $P$  (směr kmitání el. vektoru emg. vlny)
- fluorescence prakticky ihned ( $10^{-8}$  s) po skončení excitace ustane
- fosforescence trvá delší dobu, při excitaci vzniká metastabilní stav
- energetické přechody - **Jablonského diagram**: (vznik a zánik excitovaných stavů)

$$I_f = k\Phi \varepsilon c l$$

# Fluorescence



- **Kashovo pravidlo:**
  - před emisí dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu  $S_1$
- **Vavilovův zákon:**
  - kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření
  - obecná vlastnost fluorescence: emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace
- **Zadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem:**
  - absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu
  - po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_1$ , poté dochází k rychlé relaxaci na stavu  $S_1$  (v čase  $10^{-12}$ - $10^{-13}$  s) a teprve poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_0$  a další vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu stavu  $S_0$
  - výjimky jsou důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném a základním stavu
- **Stokesův posuv**
  - rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu

# Sledování a měření fluorescence

- **spektrofluorimetry** – měří střední signál celého vzorku v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky
- **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
- **fluorescenční skenery** (i "čtečky" mikrodestiček) – měří fluorescenci 2D makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
- **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací
- **měření relaxačních časů** (pulzní, nebo fázový posun - frekvenčně modulované světlo)
- **fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)**
  - fluktuace intenzity  $F$  v mikroobjemu ( $10^{-15}$  l) určeném fokusovaným laserovým excitačním paprskem
  - rychle difundující fluorofory - fluktuace fluorescence (nedochází ke zprůměrování), její časová závislost se analyzuje pomocí autokorelační funkce (informace o kinetice, difúzi, koncentraci molekul ve vzorku)

# Rozdělení fluoroforů

- **vlastní (vnitřní, intrinsic) - přirozený výskyt**
  - proteiny (Trp, Tyr, Phe), NADH, FAD, FMN, chlorofyl
  - fykobiliproteiny, green fluorescent protein (GFP)
- **nevlastní (vnější, extrinsic) - přidávají se ke vzorkům, které samy nemají fluorescenční vlastnosti**
- **fluoresceční značky (váží se kovalentně)**
- **fluoresceční sondy (váží se nekovalentně)**
  - fluorofory, jejichž kvantový výtěžek, případně i spektrální vlastnosti se výrazně mění po navázání na bílkoviny, nukleové kyseliny, membrány aj.
  - studium změn konformace, membránového potenciálu, polarity a viskozity prostředí
- **fluorescenční indikátory (chemické sondy)**
  - spektrální vlastnosti nebo intenzita fluorescence jsou citlivé na přítomnost dalších látek - zjištění koncentrace

# Fluoresceční značky

- **klasické: organická barviva, fluorescentní bílkoviny, cheláty lanthanidů**
  - dobře rozpustné ve vodě, snadné použití, mnoho existujících protokolů a aktivovaných forem
  - ale široké spektrální pásy, náchylné na fotorozklad
- **moderní - polovodičové kvantové tečky, anorganické nanočástice dopované lanthanidy, nanočástice latexu a křemičitanů s navázanými fluorofory**
  - díky pokroku v oblasti materiálových věd



# Fluorescein

- nejčastěji používaný fluorofor
  - výhody: vysoká absorbce, velké  $\Phi$ , nízká cena
  - exc. lze při 488 nm Ar laserem (kofokál. mikrosk., cytometrie)

- **fluorescein-5-isothiokyanát**

- FITC, 494 / 520, s  $-NH_2$  skupinou dává thiomocovinové uskupení

- výhodnější je **NHS-fluorescein**

- reaguje rychleji, stabilnější produkt

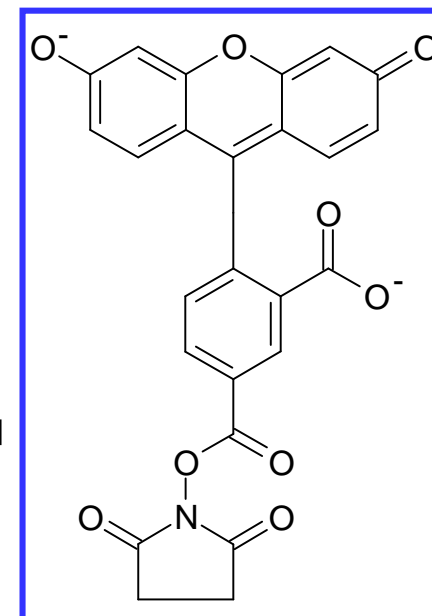
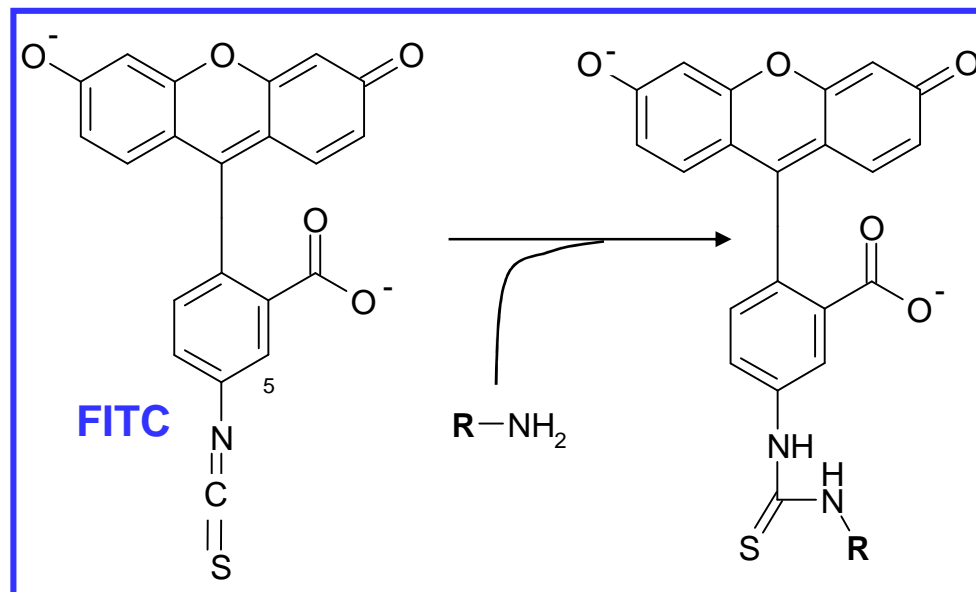
- na  $-SH$  skupiny: **5-jodoacetamidofluorescein (5-IAF)** a **fluorescein-5-maleimid**

- na aldehydové či oxoskupiny:

- fluorescein-5-thiosemikarbazid, dá hydrazonovou vazbu
- použitelný např. pro značení cytosinův DNA či RNA po jejich aktivaci hydrogensířičitanem

- na sacharidové zbytky:

- fluorescein-dichlorotriazin (**DTAF**), i na jiné biomolekul s volnými alifatickými hydroxyly, také na tubulin

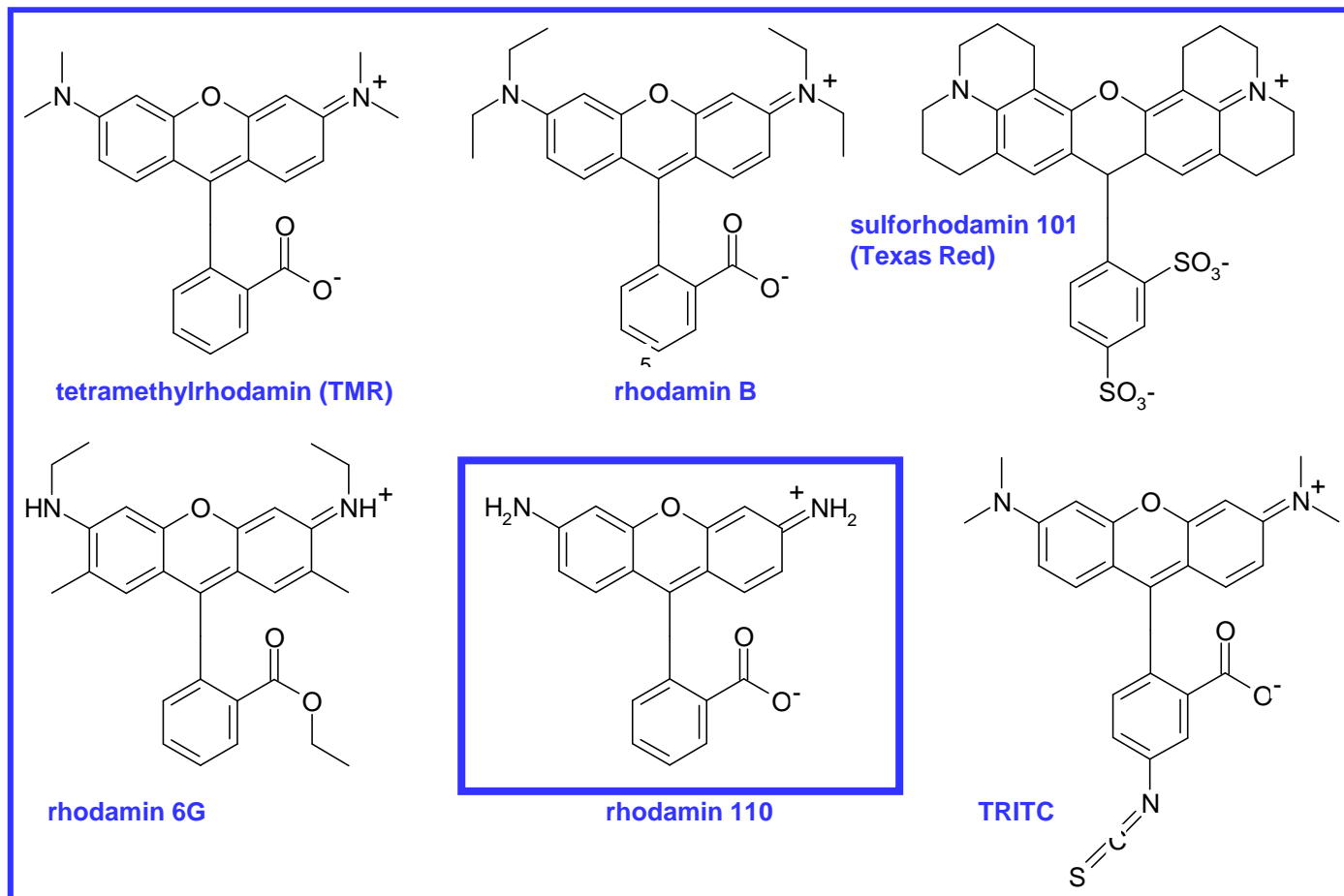


NHS-fluorescein

## **Problémy s fluoresceinem**

- **náchylný na fotorozklad - signál vydrží pouze pár minut**
- **pH závislost fluorescence - výrazně klesá signál pro pH pod 7**
- **existence isomerů - může komplikovat geometrii vazby k proteinům, následně eluční časy v chromatografii, migraci v gelech**
- **méně vhodný pro "ultracitlivé" aplikace**

# Rhodaminy



- **strukturně podobné fluoresceinu, který doplňují**
  - místo atomů kyslíku jsou na postranní cykly vázány dusíkové atomy
  - mohou nést různé substituenty a tím je dostupná široká škála variant
- **emise probíhá při delších vlnových délkách ve srovnání s fluoresceinem**
  - použitelné pro techniky s dvojitým značením
  - vyšší fotostabilita a dobrá excitovatelnost světlem rtuťových výbojek

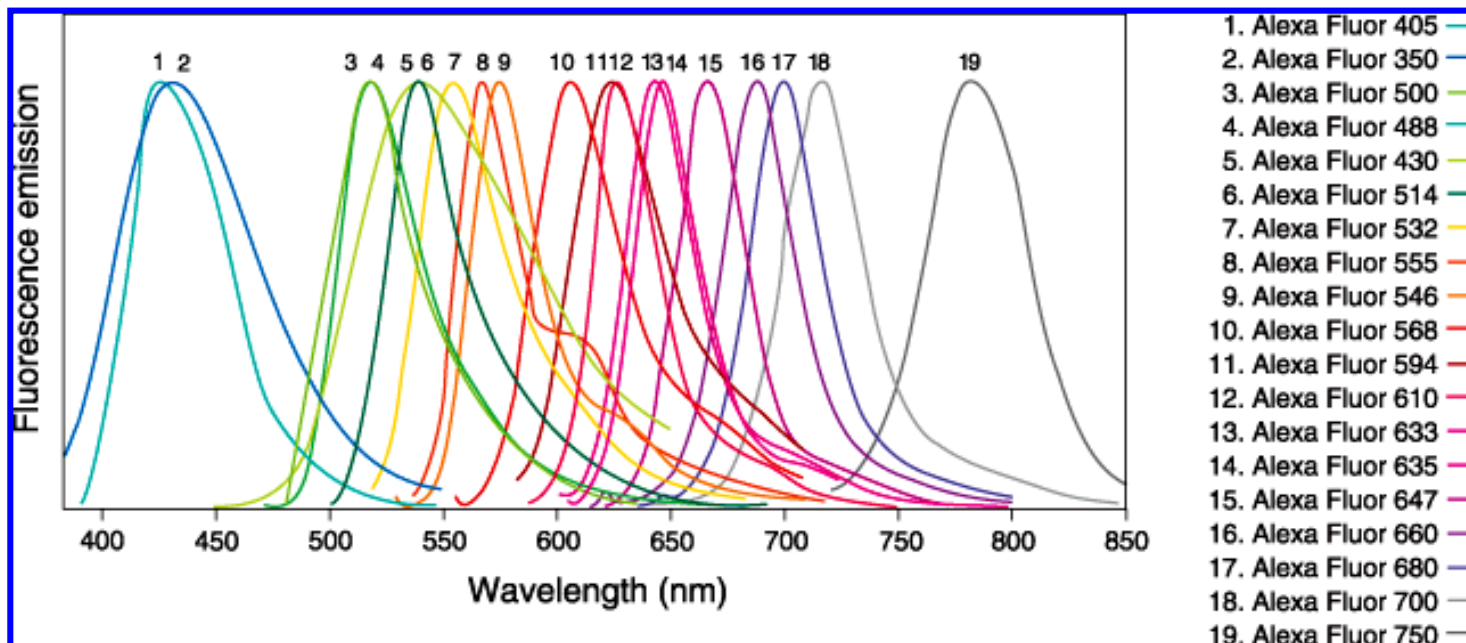
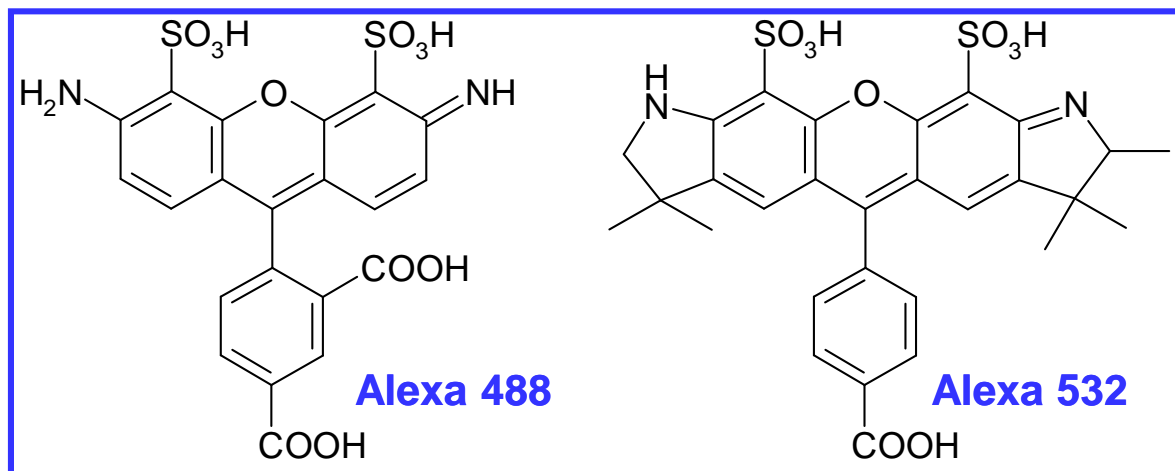
- **sulforhodamin B, jinak **Lissamin** rhodamin B**
  - obsahuje na dolním aromatickém jádře dvě sulfoskupiny v polohách 3 (vpravo nahoře) a 5 (dole) (Imperial Chemical Industries)
- **sulforhodamin 101, **Texas Red** (Molecular Probes)**
  - emitující nad 600 nm
- **tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát (**TRITC**) resp. (**TMR**)**
  - od tetramethylrhodaminu, nejběžnější značkovací činidlo z této skupiny, (544 / 570),  $\epsilon_{544} = 10^5 \text{ M cm}^{-1}$
  - reakce s aminoskupinou probíhá analogicky jako u FITC
  - karboxytetramethylrhodamin (**TAMRA**) další alternativa
- **NHS-rhodamin (5-karboxymethylrhodamin sukcinimidylester) (544 / 576)**
- **karboxy-X-rhodamin (**ROX**) - značení oligonukleotidů, sekvenování**
- **Lissamin Rhodamin B sulfonylchlorid (556 / 576)**
  - má v 5-pozici reaktivní skupinu  $-\text{SO}_2\text{Cl}$  - s  $-\text{NH}_2$  vzniká sulfonamid
  - podobně existuje sulfonylchlorid i od Texas Red derivátu
- **na derivatizaci SH: tetramethylrhodamin-5-jodacetamid (540 / 567)**
- **pro reakci s aldehydy Lissamin rhodamin B sulfonylhydrazin**
  - má v 5 poloze skupinu  $-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{NH}_2$ ) (560 / 585)
  - sulfonylhydrazin Texas Red emituje při delší vlnové délce (580 / 604)

## **Rhodaminy - zhodnocení**

- **fluorescence v červené oblasti**
- **vyšší stabilita než fluorescein**
- **excitovat (při 520 nm) lze rtuťovou výbojkou**

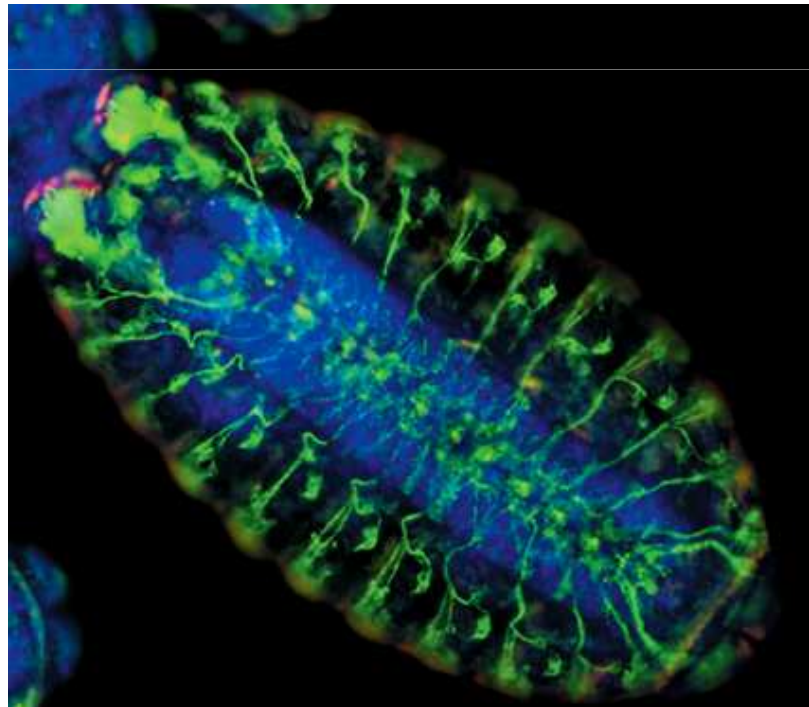
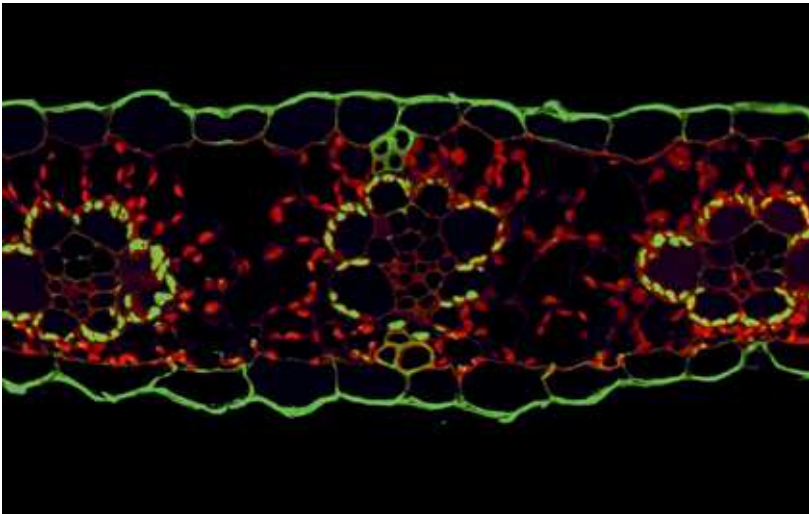
# Alexa Fluor

- rhodaminový nebo kumarinový skelet doplněný o sulfoskupiny
- vyšší rozpustnost
- celá odstupňovaná řada sloučenin s posunujícími se exc. a emis. maximy
- napojení na značené biomolekuly probíhá v dolní části molekuly přes karboxyl v poloze 5 aktivovaný např. NHS skupinou
  - jsou přítomny i isomery se skupinou posunutou do polohy 6



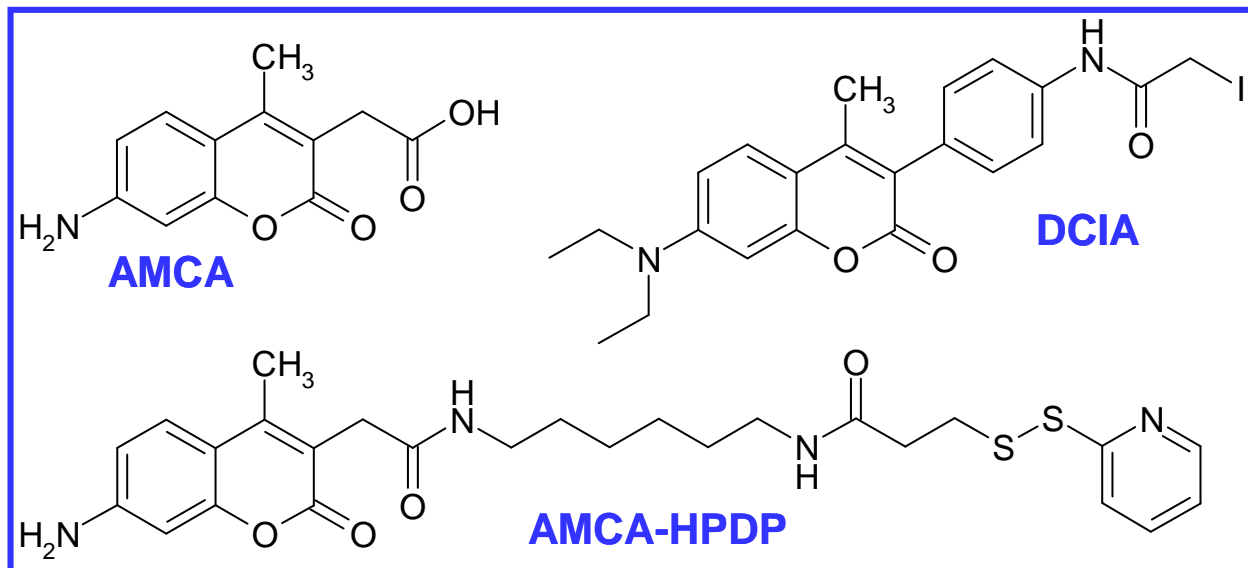
# Značení AlexaFluor

■

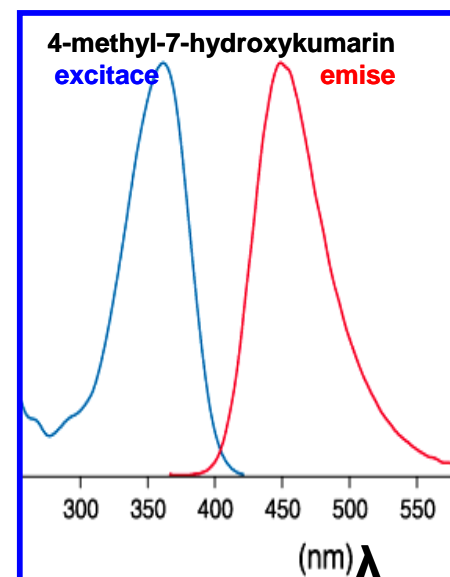


■

# Kumariny

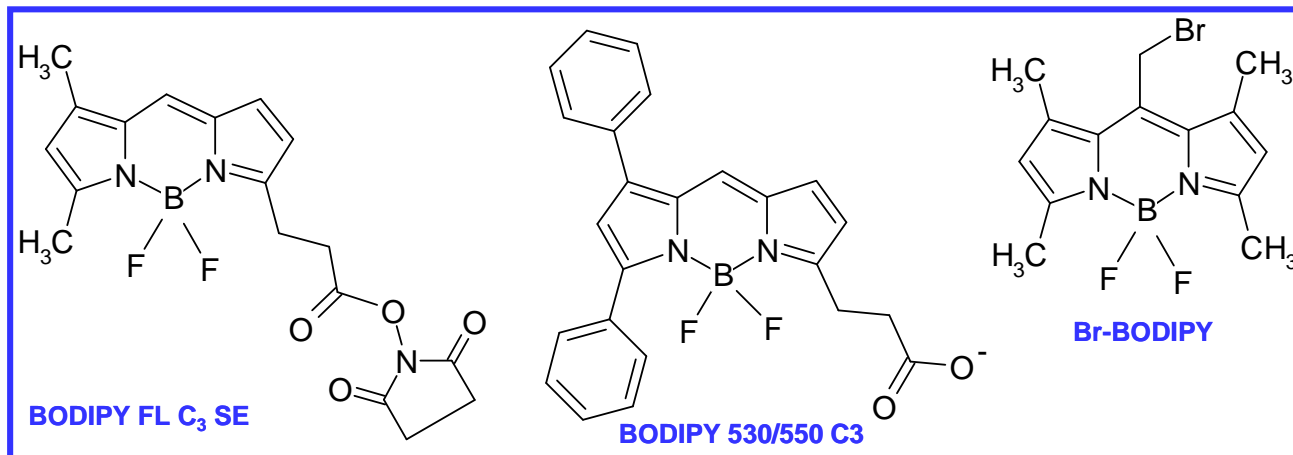


- kumarin = 2H-1-benzopyran-2-on je přírodní látka
- 7-amino-4-methylkumarinové deriváty, zejména 7-amino-4-methylkumarin-3-octová kyselina (**AMCA**) (345 / 450)
  - pro -NH<sub>2</sub> AMCA-NHS
  - pro -SH AMCA-HPDP
  - pro aldehydy AMCA-hydrazid
- 7-diethylamino-3-[(4'-(jodacetyl)amino)-fenyl]-4-methylkumarin (**DCIA**)
  - velmi intenzivní fluorescence (382 / 472)
  - na světle nestabilní



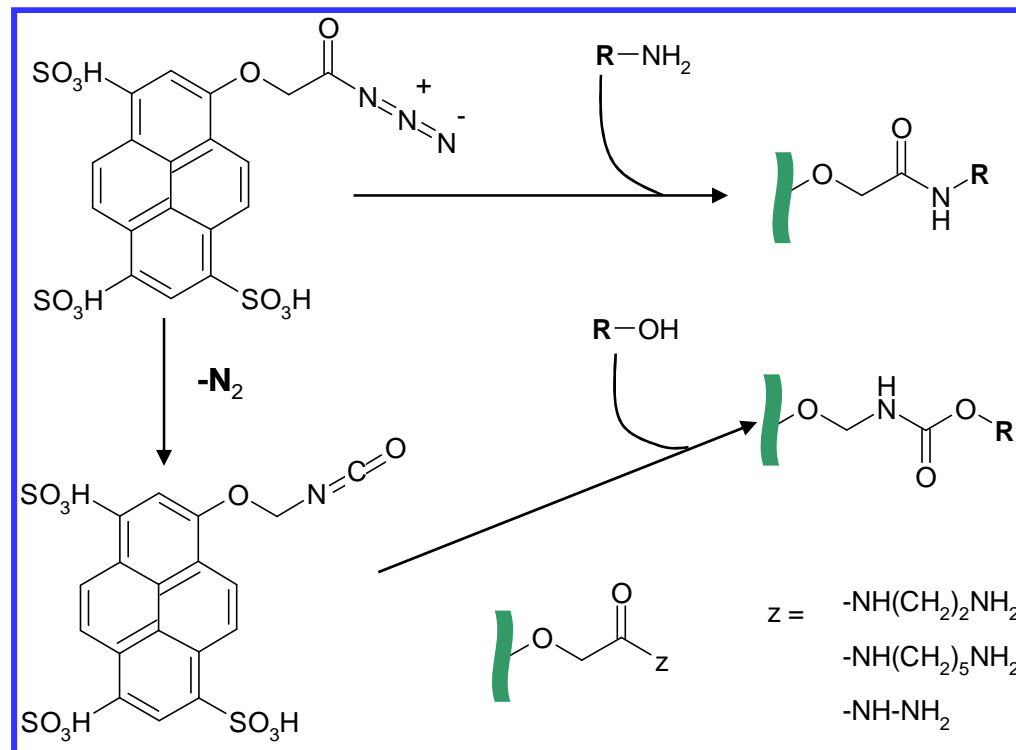


# BODIPY



- **4,4-difluoro-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen**
  - nemá ionizovatelné skupiny - málo ovlivněn pH
  - vysoké absorpance a vysoké kvantové výtěžky fluorescence
  - menší komplikací jsou malé Stokesovy posuny pod 20 nm
- **modifikace v krajních polohách postranních cyklopentadienů**
  - deriváty s posunutými spektrálními charakteristikami
  - pro -NH<sub>2</sub> existuje BODIPY FL C<sub>3</sub> SE s postranní NHS skupinou (502 / 510)
  - komplikací je vzájemné zhašení, pokud je stupeň substituce vyšší
  - dostupné deriváty s jodacetamidovou a hydrazidovou skupinou
- **deriváty BODIPY 530/550 C<sub>3</sub>-X - maxima k vyšším vlnovým délkám**
  - přítomnosti objemných aromatických postranních substituentů
  - reaktivní skupinou X může být NHS nebo hydrazid
- **bromderivát Br BODIPY pro substituce sulfhydrylových skupin**

# Cascade blue



- **od sulfonovaného pyranu**

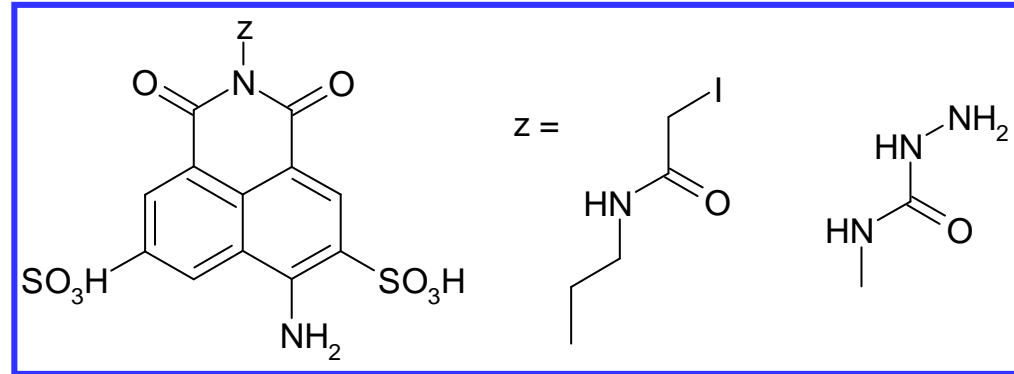
- vlastnostmi vhodně doplňuje fluorescein při multiznačení
- výborná rozpustnost ve vodě
- dobré kvantové výtěžky (kolem 50%)
- malá úroveň vzájemného zhášení při vyšších substitučních poměrech
- mateřská sloučenina má na horním jádře vpravo pouze methoxyskupinu.

- **pro značení aminoskupin - acetylazidový derivát (375+400 / 410)**

- při vyšších teplotách – kolem 80 °C v DMF probíhá p řesmyk azidového uskupení na isokyanátovou formu a odštěpí se molekula dusíku
- isokyanát reaguje s volnými hydroxyly, vzniká urethanové uskupení
- další formy mají v postranní části hydrazinový, ethylendiaminový nebo kadaverinový (pentamethylendiaminový) zbytek

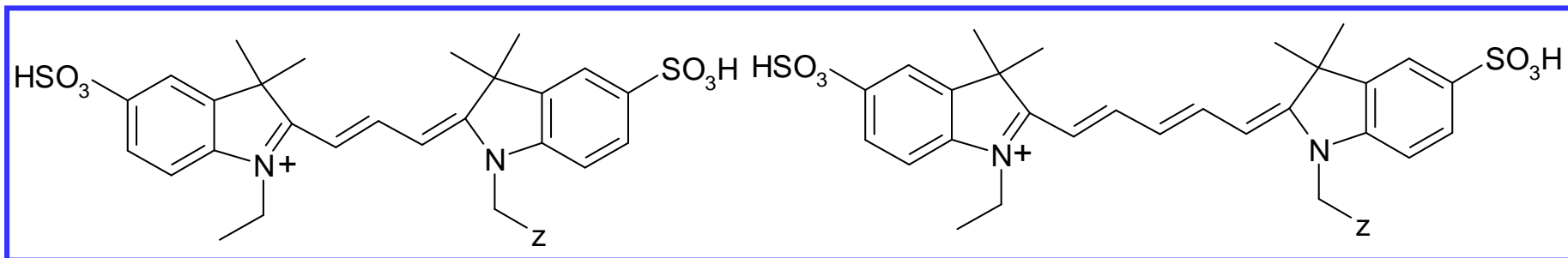
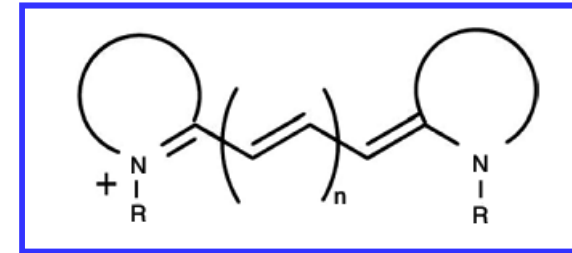
# Lucifer yellow

- základní sloučeninu  $z = H$
- deriváty 4-aminonaftalimid-3,6 disulfonátu
- napojení se realizuje přes horní imidový atom dusíku
  - jodacetamidový derivát (na –SH)
  - hydrazidová skupina (Lucifer Yellow CH, na aldehydy)
  - optické parametry (427 / 530)
- především v cytochemii

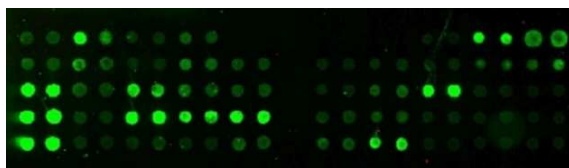
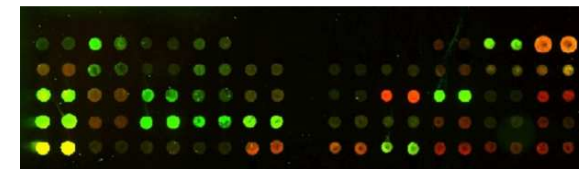


# Cyaninové fluorofory

- velmi populární zejména v oblasti DNA biočipů využívajících cDNA fragmenty jako imobilizované próby
- základem je **indokarbocyaninový skelet**
  - je sulfonován, obě aromatické části jsou spojeny uhlíkatým můstkem s konjugovaným systémem dvojných vazeb (methin)
- je k dispozici odstupňovaná řada fluoroforů (Amersham Biosci.)



vzorek - Cy5



kontrola Cy3

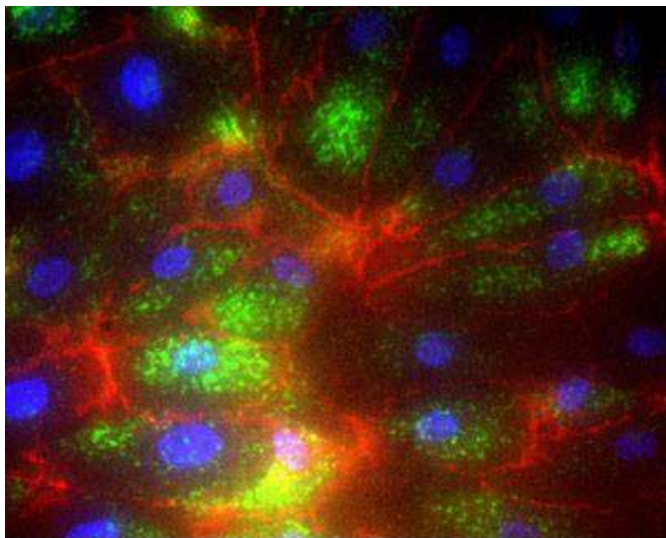
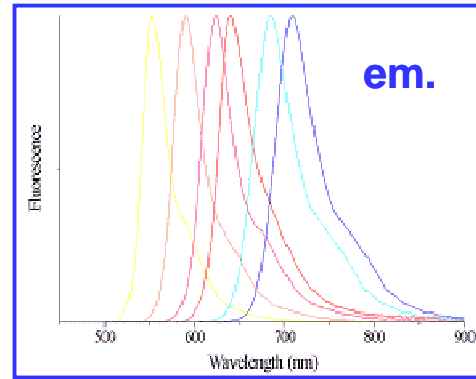
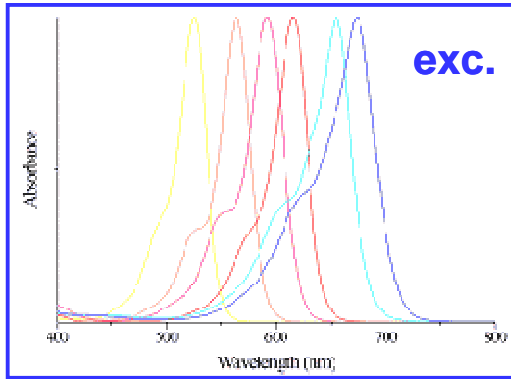
překryvový signál (oba kanály)

# Cyaniny - zhodnocení

- **délka polyenového spojovacího řetězce**
  - monomethinové sloučeniny - thiazol orange (TO), oxazole yellow (YO) nebo jejich dimery (TOTO, YOYO) - fluoreskují po vazbě na nukleové kyseliny (fluorescenční sondy)
  - polymethinové sloučeniny - Cy3, Cy5, ...
  - délka spoj. řetězce, resp. počet vinylenových -CH=CH- skupin působí bathochromní posun o cca 100 nm - fluorofory emitující až v NIR oblasti
- **výhody NIR fluorescence**
  - není zde už autofluorescence biologických složek - vyšší citlivosti
  - méně nákladná instrumentace, excitace při delších vlnových délkách
- **problémy**
  - úzké excitační pásy, fotorozklad, menší intenzita v NIR

# Atto

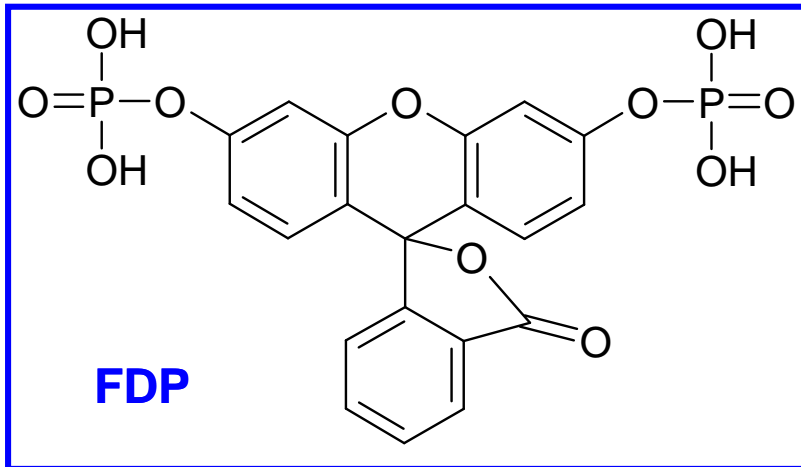
- vysoká absorbce a výtěžek, fotostabilita
- modifikace oligonukleotidů
- několik typů struktur na bázi kumarinu, rhodaminu, ... (Atto-Tec)



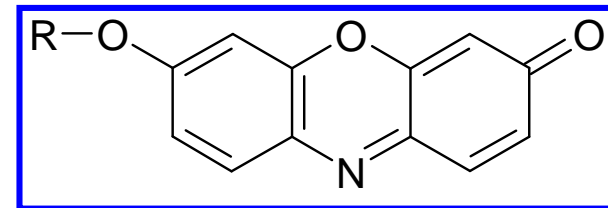
Fluorescent Dye	Absorption max. [nm]	Emission max. [nm]	Extinction coefficient [cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
<b>Atto 390</b>	390	479	24.000
<b>Atto 425</b>	436	484	45.000
<b>Atto 465</b>	453	508	75.000
<b>Atto 495</b>	495	527	80.000
<b>Atto 488</b>	501	523	90.000
<b>Atto 520</b>	516	538	110.000
<b>Atto 532</b>	532	554	115.000
<b>Atto 550</b>	554	579	120.000
<b>Atto 565</b>	563	592	120.000
<b>Atto 590</b>	594	624	120.000
<b>Atto 594</b>	601	627	120.000
<b>Atto 620</b>	619	643	120.000
<b>Atto 633</b>	629	657	130.000
<b>Atto 647N</b>	644	669	150.000
<b>Atto 655</b>	663	684	125.000

Trojnásobné značení endoteliálních buněk (HUVEC): von Willebrand faktor - Atto 550 znač. Ab (zelené), kadherin - Atto 655 znač. Ab (červeně) a jádra DAPI (modře)

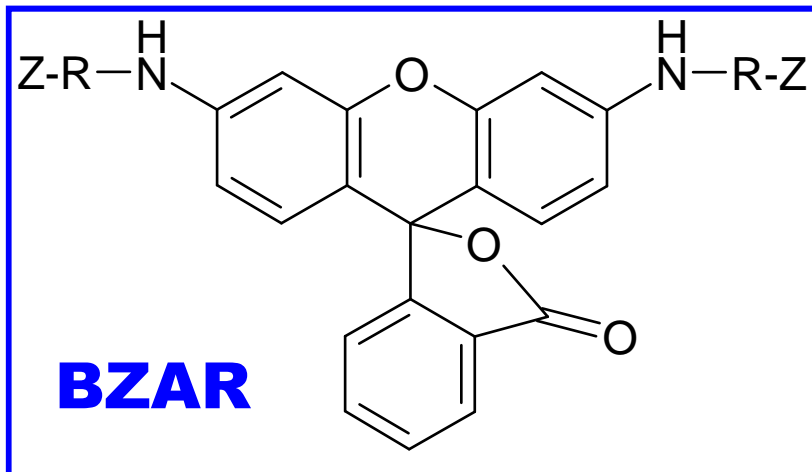
# Fluorogenní substráty hydrolas



deriváty fluoresceinu, např.  
fluoresceindifosfát pro ALP



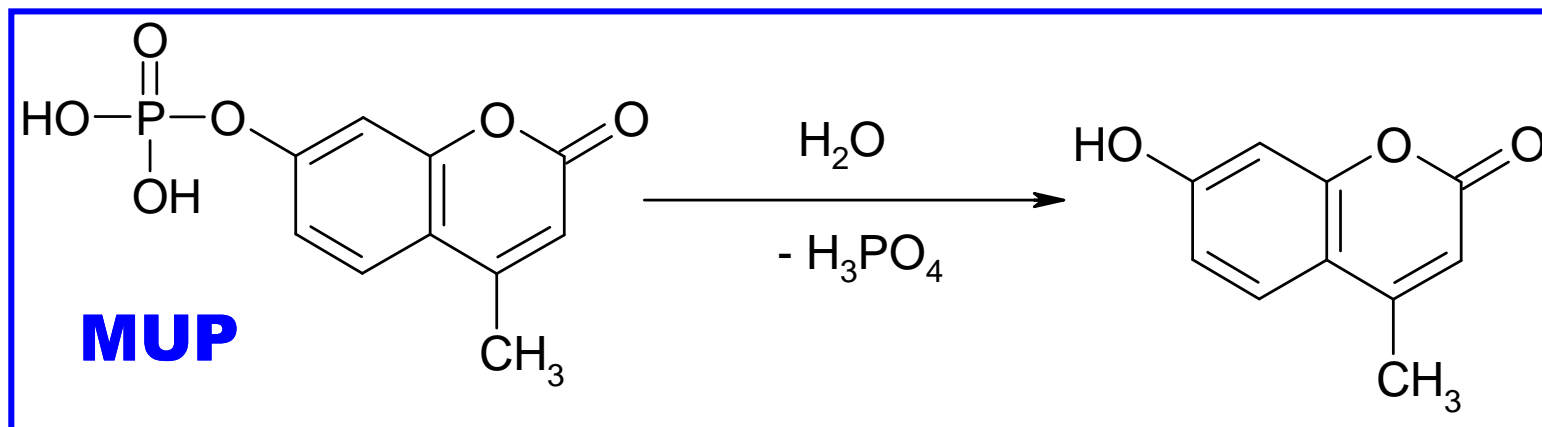
deriváty resorufinu



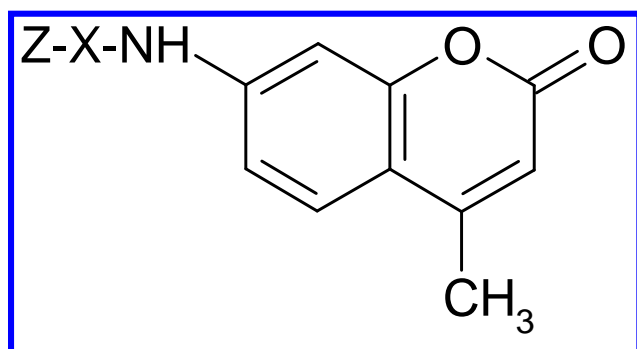
rhodamin 110, bis-(*N*-CBZ-L-argininamid) (**BZAR**), pro serinové proteiny, (496 / 520) cca 100x citlivější než sloučeniny založené na AMC

jiný příklad - rhodamin 110, bis-(*N*-CBZ-L-fenylalanyl-L-arginin amid) (**Z-FR-R110**) pro cysteinové proteiny katepsin B a L

# Fluorogenní enzymové substráty



4-methylumbelliferylfosfát (**MUP**), po hydrolyse fosfatasou vzniká 4-methyl-7-hydroxykumarin (**methyumbelliferol**), modrá fluorescence, (360 / 450)



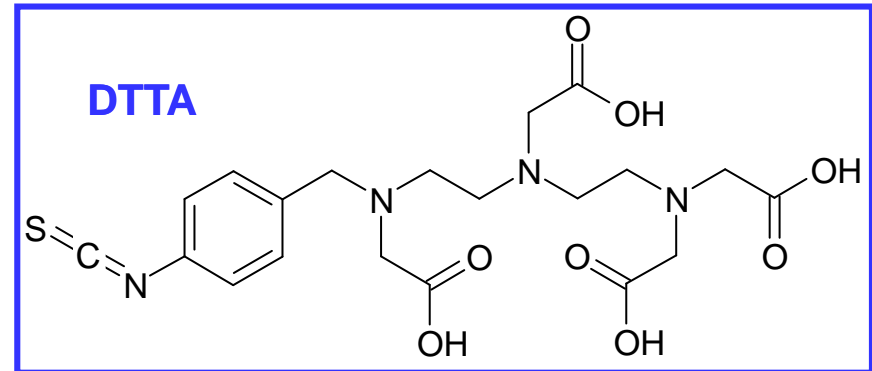
deriváty 7-amino-4-methylumbelliferolu (**Z-X-AMC** nebo **Z-X-MCA**), AMC produkt (342 / 441), např. 7-amino-4-methylkumarin *N*-CBZ-*L*-fenylalanyl-*L*-argininamid (**Z-FR-AMC**) pro stanovení serinových proteinas a plasminu, kalikreinu, katepsinu), nebo 7-amino-4-methylkumarin, *N*-CBZ-*L*-aspartyl-*L*-glutamyl-*L*-valyl-*L*-asparagylamid (**Z-DEVD-AMC**) pro kaspasu 3

alternativně deriváty 7-amino-4-trifluoromethylkumarinu, např. **Z-DEVD-AFC**

*N*-CBZ- je *N*-benzyloxykarbonyl-

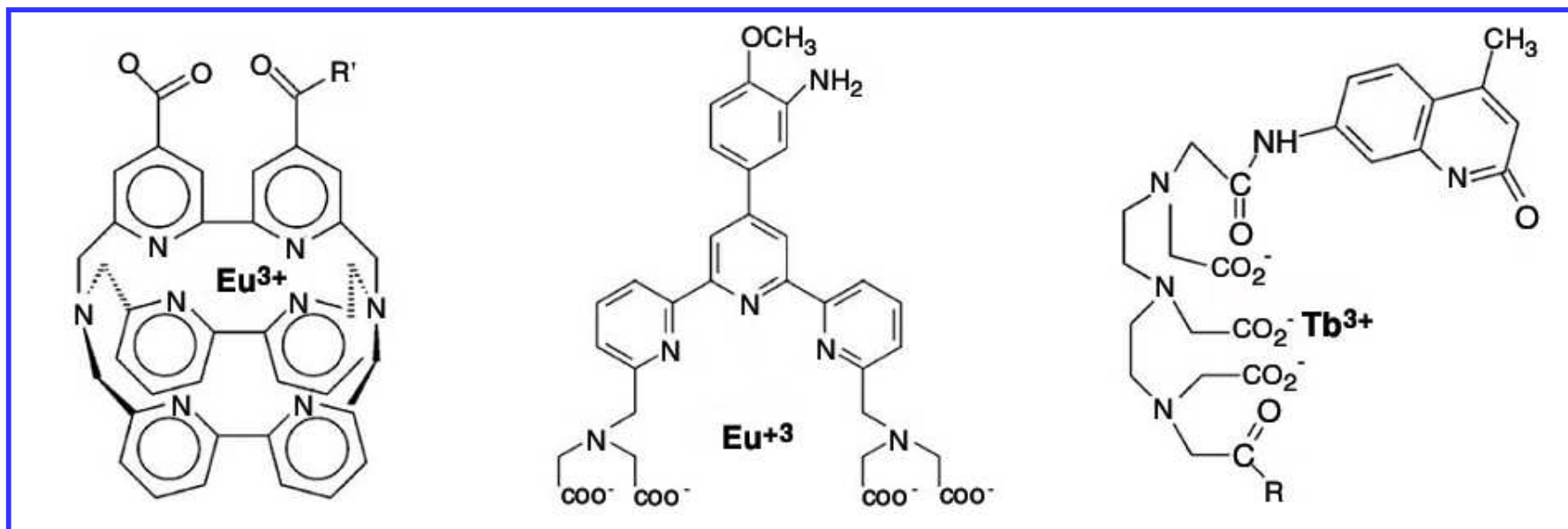


# Lanthanidové komplexy



- **Eu<sup>3+</sup> a Sm<sup>3+</sup> ve formě chelátových komplexů**
  - atraktivní fluorescenční značky vhodné pro časově rozlišenou fluorescenci („time-resolved fluorescence“, TRF)
- pro "přichycení" k biomolekulám slouží N<sup>1</sup>-(p-isothiokyanatobenzyl)-diethylen-triamin-N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>3</sup>-tetraoctová kyselina (DTTA)
- která se může vázat na aminoskupiny za vzniku thiomocovinového uskupení.
- takto připravené komplexotvorné místo pak váže iont lanthanidu a získá se intenzivně fluoreskující značka s relativně dlouhou dobou záření po excitaci
  - při pulzní excitaci se vyčká, až vymizí či vyhasne nespecifická fluorescence pozadí, případně rozptýlené záření, a až pak se po krátké prodlevě změří fluorescence značky
  - lze použít i další lanthanidy, např. terbium a dysprosium
  - proces pod názvem DELFIA zavedla finská firma Wallac Oy

## Další chelátové struktury



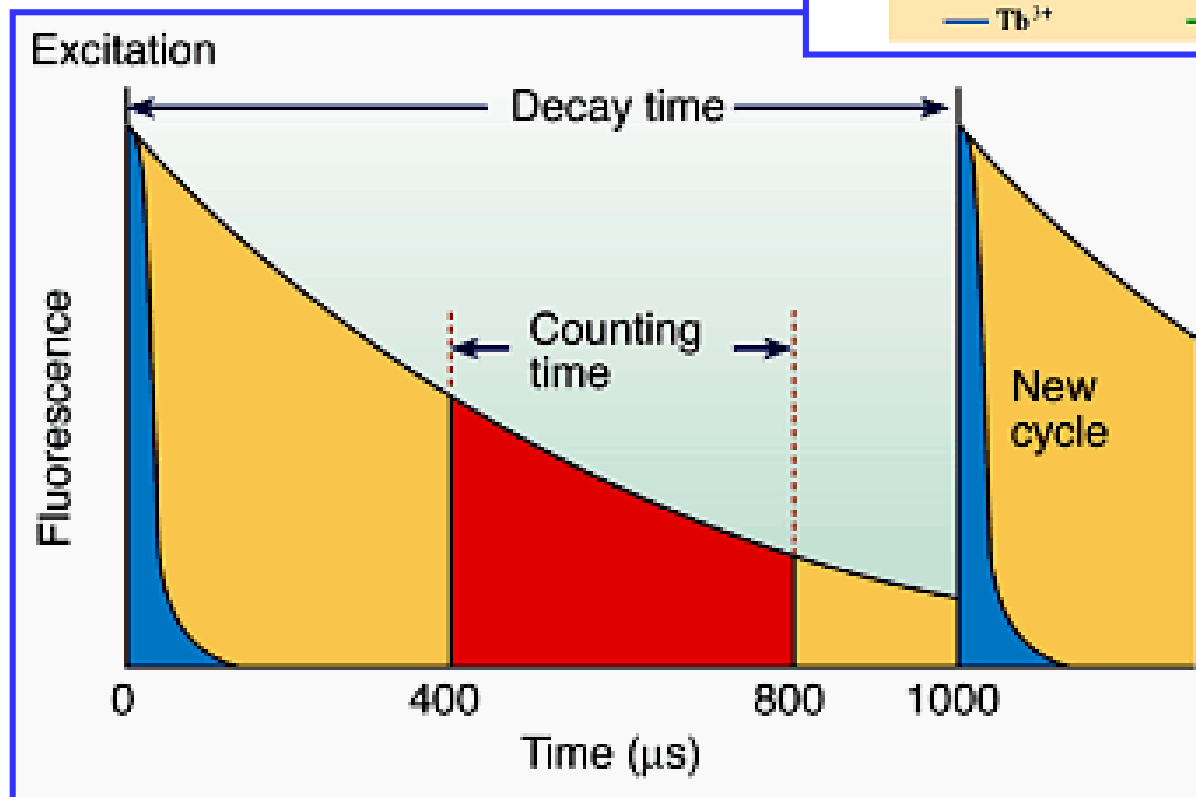
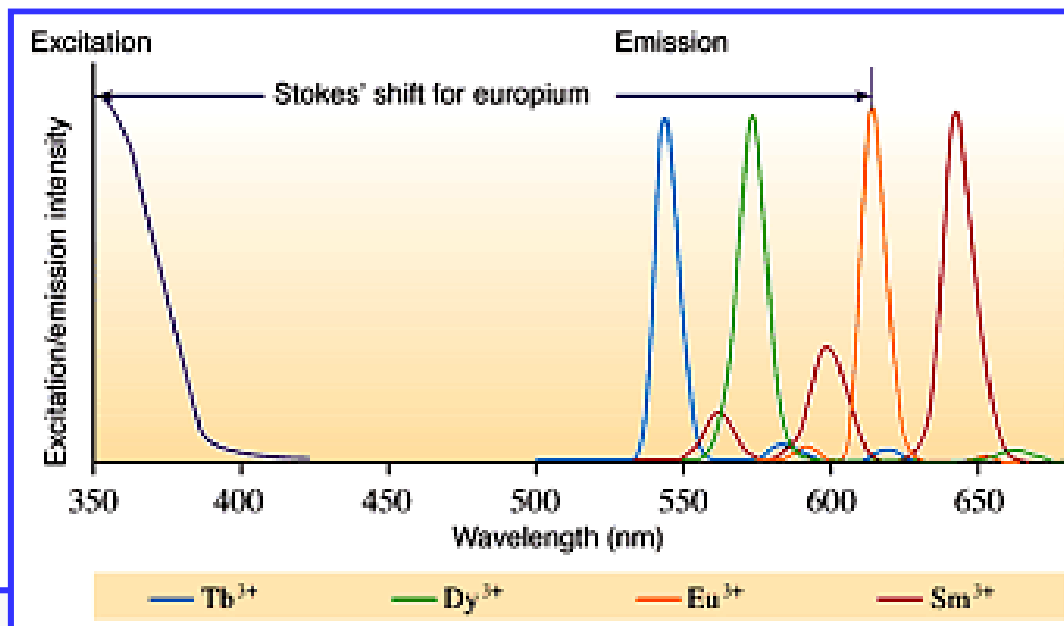
■ kryptát

terpyridin

chelát s anténou

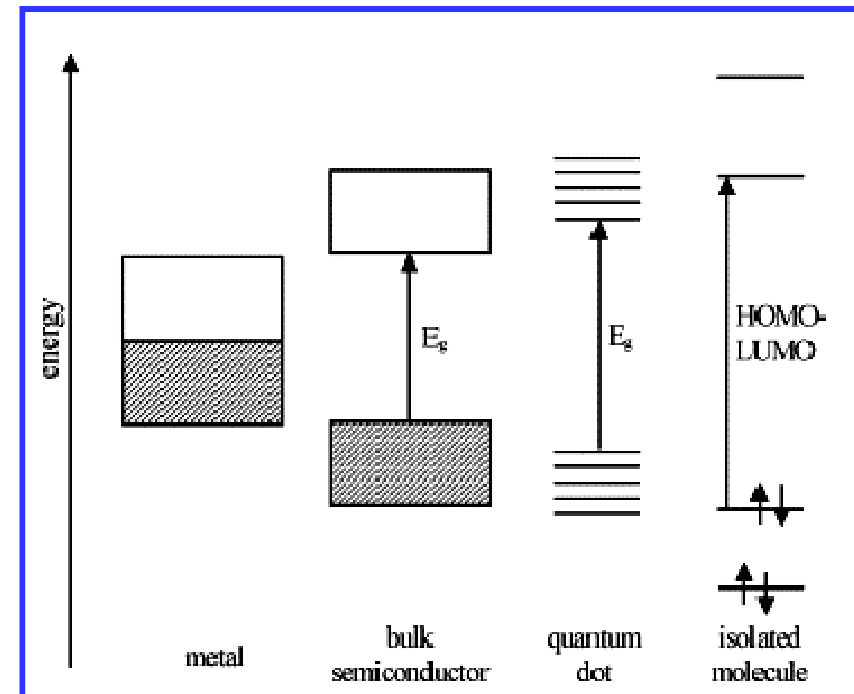
## TRF měření

- cheláty lanthanidů (Eu, Sm, Dy)
  - dlouhá životnost excitovaného stavu
  - velké Stokesovy posuny



# Kvantové tečky

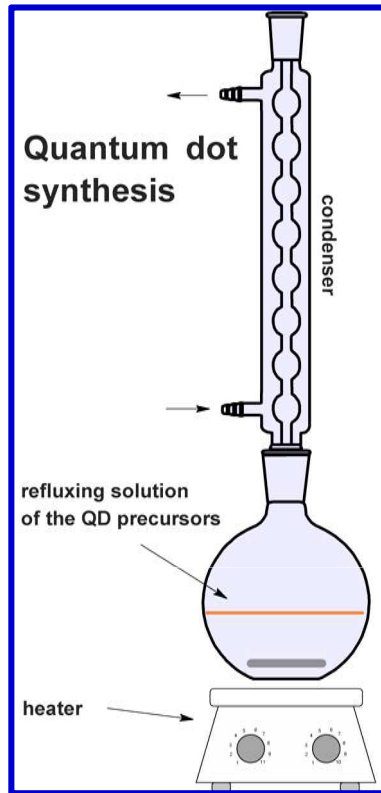
- moderní fluoreskující polovodičové nanokrystaly
- QD, "quantum dots" jsou menší než 10 nm a svým kvantovým chováním se nachází mezi polovodiči a izolovanými atomy
- polovodiče - valenční a vodivostní energ. hladiny odděleny o  $E_g$ 
  - excitace - elektron přejde do vodivostní hladiny a zanechá za sebou kladně nabitou díru ve valenční hladině
  - prostorová separace tohoto páru ("exciton") odpovídá Bohrovu průměru a je typicky 1 až 10 nm
- QD mají obdobnou velikost
  - excitony jsou v nich ohraničeny podobně jako chování částice v uzavřeném prostoru
  - energetické hladiny připomínají atomy či molekuly
  - optické vlastnosti závisí na velikosti



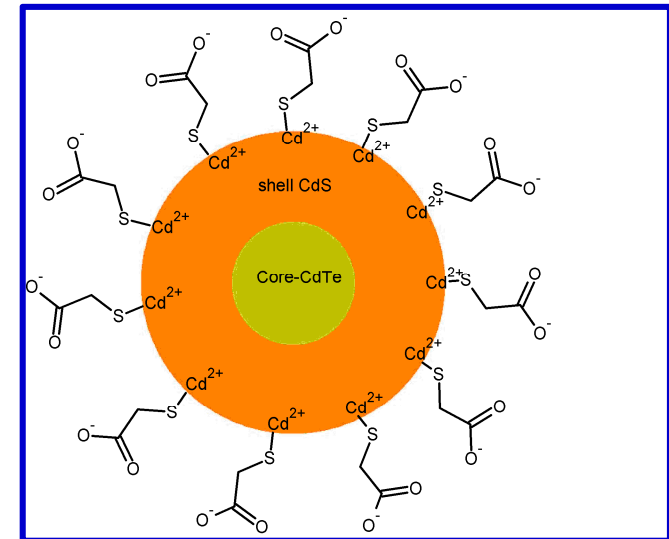
## Fotoluminiscence u QD

- vzniká radiální rekombinací excitonů, spektrální vlastnosti jsou „laditelné“ změnou velikosti částic
  - např. u CdSe nanokrystalů lze emisi nastavit od 450 do 650 nm
  - menší QD jsou „modřejší“ (hypsochromní efekt)
- **výhody nanoteček** oproti klasickým fluoroforům zahrnují
  - vysoký jas (20x vyšší proti jiným typům, daný velkým kvantovým výtěžkem a vysokým extinkčním koeficientem)
  - úzké emisní pásy pod 30 nm, velké Stokesovy posuny - částice obsahujících různě barevné QD v různých poměrech, čímž vzniká chemický „čárový kód“ umožňující identifikaci v komplexních směsích
  - velmi stabilní a nepodléhají fotodegradaci (často se chrání proti fotooxidaci pláštěm z polymerů nebo jiných polovodičů (např. CdSe povlečený ZnS nebo silikátem)
  - široké absorpční pásy - různě barevné QD lze excitovat stejným zdrojem světla a jednoduše tak vyhodnocovat současně různé značení odlišnými barvami při multiplexních stanoveních
- pro konjugaci s biomolekulami se nanáší reaktivní vrstvy jako tri-n-oktylfosfinoxid (TOPO) nebo hexadecylamin

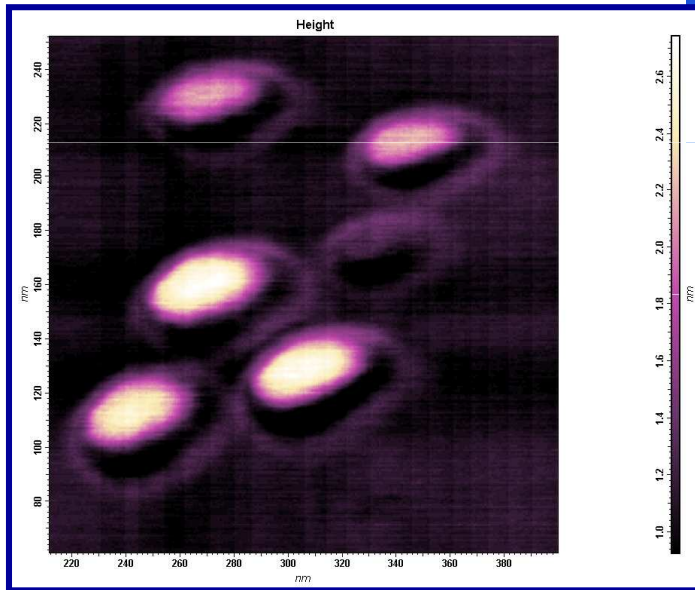
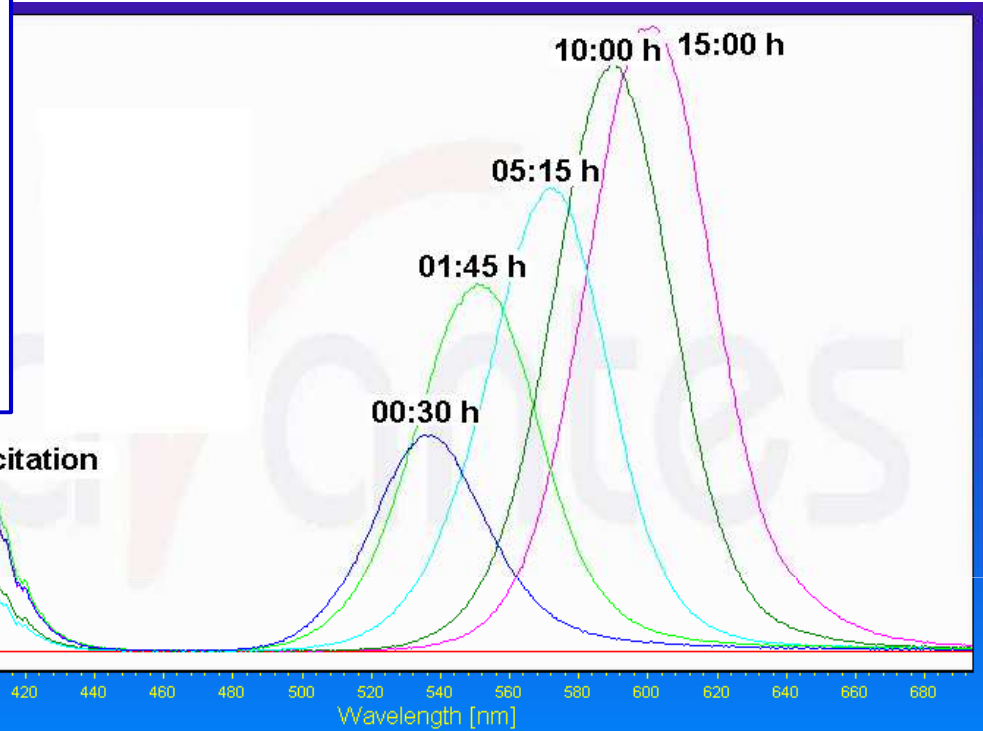
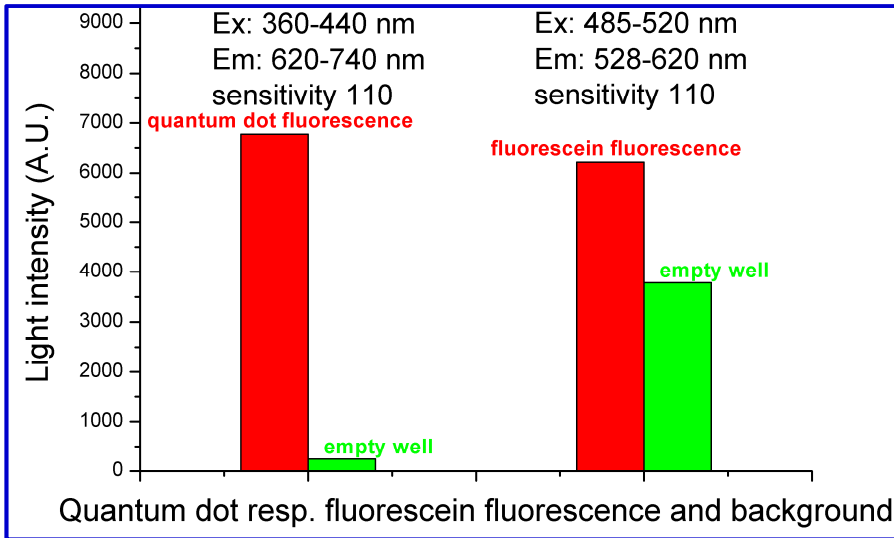
# Kvantové tečky (QD)



- unikátní fluorescenční vlastnosti - stabilita vůči fotorozkladu, velké Stokesovy posuny
- CdTe jádro obalené CdS, rozpustnost díky vazbě thioglykolové kys. (TGA)
- prekurzory - Te, CdCl<sub>2</sub>, TGA a NaBH<sub>4</sub>
  - NaHTe připraven redukcí Te pomocí NaBH<sub>4</sub>
  - nástřik roztoku NaHTe do směsi CdCl<sub>2</sub> a TGA v inertní atmosféře
  - refluxace na vzduchu (minuty až hodiny)
- při zahřívání roste průměr QD, emisní maximum se posouvá k delším vln. délkám
- větší QD mají lepší stabilitu

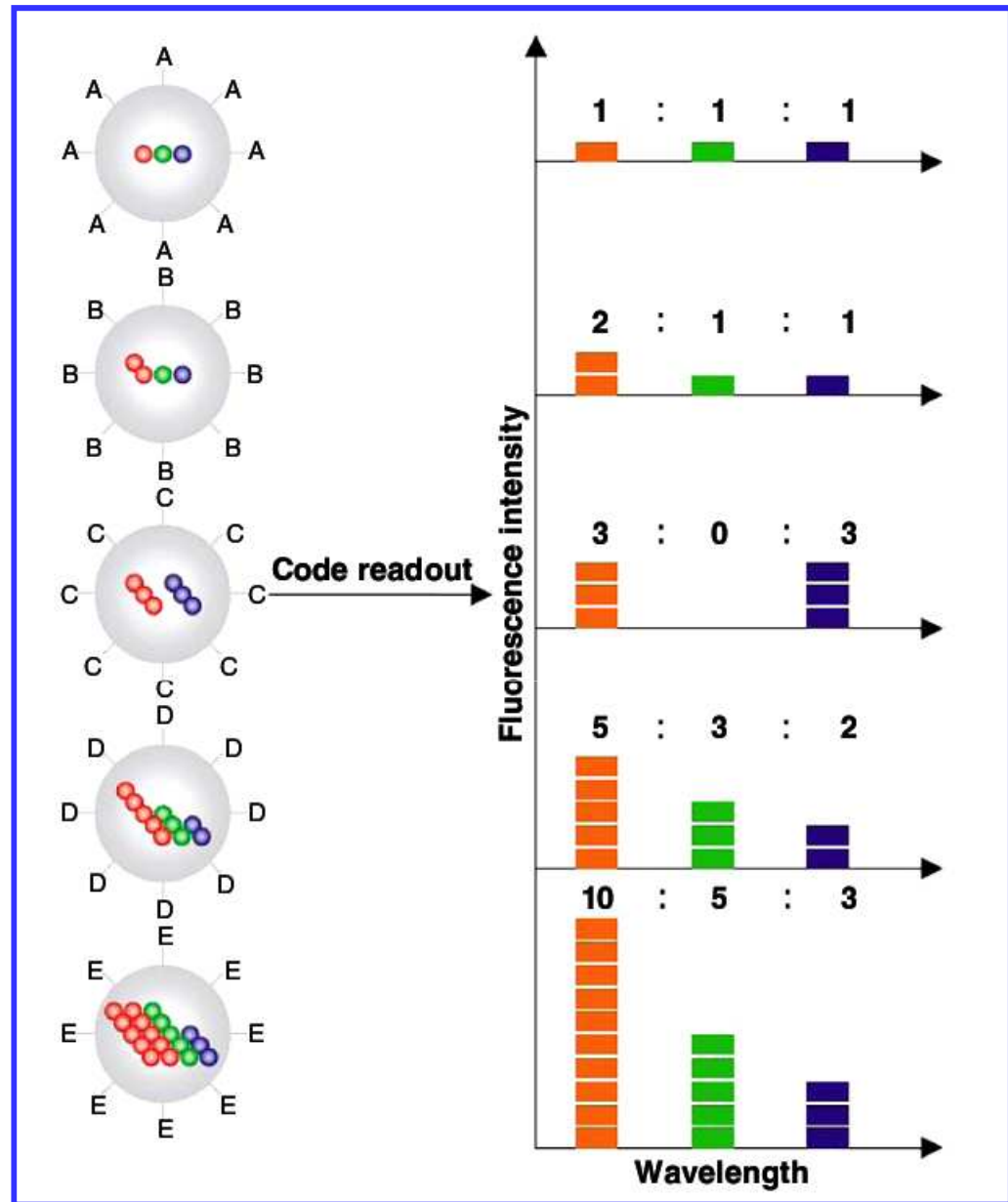


# Vlastnosti QD



# Nanočástice s fluorofory

- **optické kódování** na základě multiplexování vln. délek
- **polymer**, uvnitř směsi různě fluoreskujících QD - charakt. spektrum
- **možnost identifikace cílových biomolekul** ve směsích při užití kombinatorických postupů





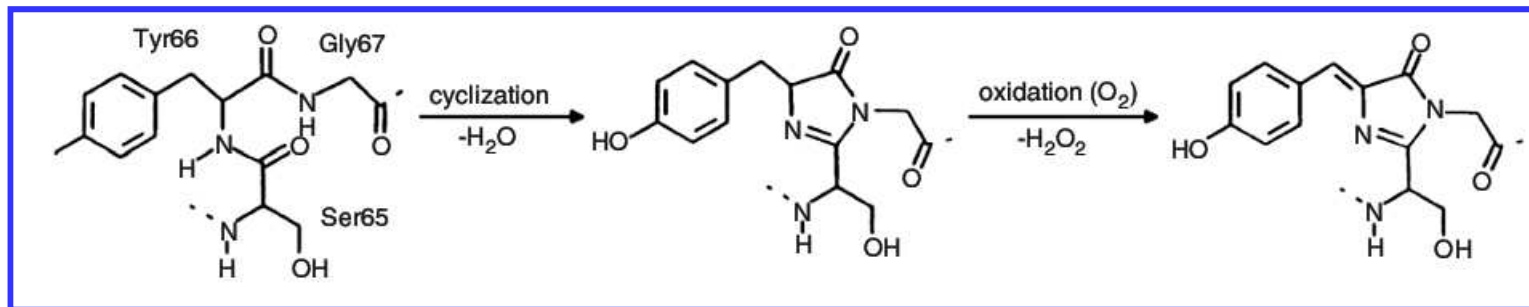
# Fykobiliproteiny

- intenzivně fluoreskující proteiny z fotosyntetického aparátu eukaryot, modrozelených a červených sinic, řas a cyanobakterií
- nativní nefluoreskují, ale excitační energii předávají na chlorofyly
- purifikované fluoreskují s výtěžky kolem 100%
  - obsahují několik bilinových chromoforů (např. B-fykoerithrin 34)
  - to v souhrnu poskytuje vysoké extinkční koeficienty pro celou molekulu
  - fluorescenční výtěžky se blíží 30 fluoresceinům nebo 100 rhodaminům
  - fluorescence není externě zhasená
  - dostupnost mnoha konjugačních míst
  - v prodeji jako konjugáty se streptavidinem nebo biotinem

Název	Zdroj	Složení	$M_r$ (kDa)	Počet bilinů	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm)	$\epsilon$ ( $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
B-fykoerythrin	<i>Porphyridium cruentum</i>	$(\alpha\beta)_6\gamma$	240	34	546 / 575	2,4
R-fykoerythrin	<i>Gastroclonium coulteri</i>	$(\alpha\beta)_6\gamma$	240	34	566 / 574	2,0
C-fykocyanin	<i>Anabaeba variabilis</i>	$(\alpha\beta)_2$	72	4	614 / 643	0,58
allofykocyanin	<i>Anabaeba variabilis</i>	$(\alpha\beta)_3$	110	6	650 / 660	0,70
CryptoFluor Crimson	<i>cryptomonad algae</i>		40,2		585 / 658	
CryptoFluor Gold	<i>cryptomonad algae</i>		30,8		566 / 600	

# Zelený fluoresceční protein

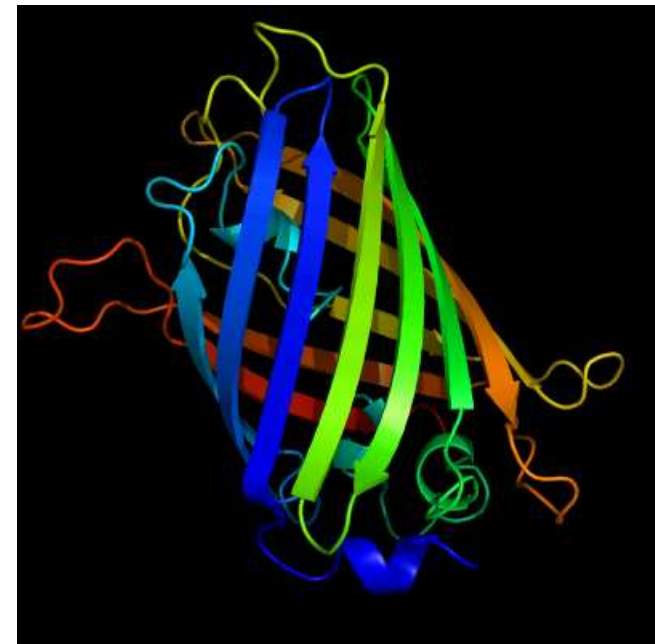
- "green fluorescent protein", **GFP** - z bioluminiscentní medúzky (*Aequorea victoria*, jellyfish), 26 kDa
- chromofor - *p*-hydroxybenzyliden-imidazolidinon, vzniká cyklizací a oxidací aa zbytků Ser-Tyr-Gly:



- mutagenézí získány vylepšené varianty - široké použití pro značení
  - divoký typ, směs fenolu a fenolátu
  - fenolátový anion
  - fenol
  - fenolátový anion s přidruženým pí-elektronovým systémem
  - indol (Trp místo Tyr)
  - imidazol (His místo Tyr)
  - fenyl (Phe místo Tyr)

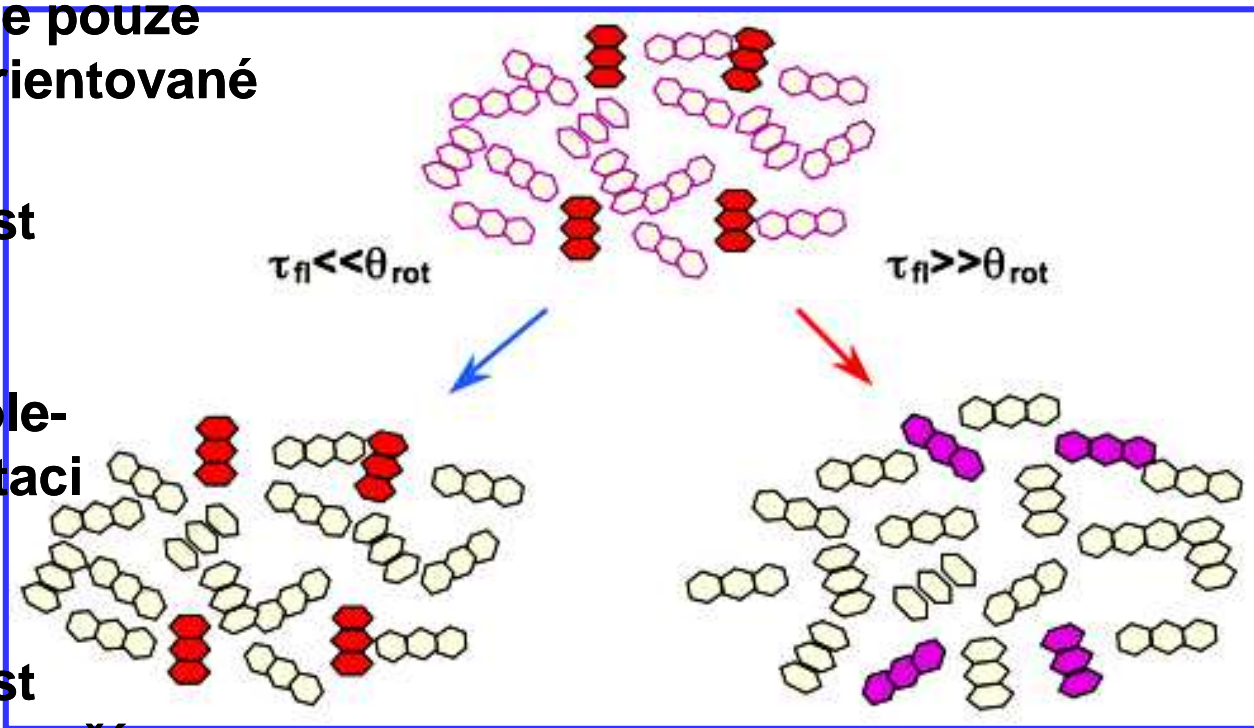
## Použití GFP

- biologická značka pro sledování a kvantifikaci exprimovaných bílkovin
- studium protein-protein interakcí
- interní buněčný "biosensor" pro sledování signálů
- rekombinantní techniky - spojení GFP se sekvencí jiné bílkoviny - chiméry - sledování lokalizace a pohybu bílkovin v buňkách
- zelené myši a podobné ...



# Fluorescenční polarizace (FP)

- založena na velikosti rotačního pohybu molekul
- v protikladu jsou doba života  $\tau_{fl}$  a rychlost pohybu  $\theta_{rot}$  fluoroforu
- excitace se provádí polarizovaným světlem, tj. excitují se pouze fluorofory vhodně orientované vůči rovině světla
- pokud bude životnost exc. stavu mnohem kratší, než rotace, tak si excitované molekuly zachovají orientaci a bude emitováno polarizované záření
- pokud bude životnost exc. stavu dlouhá, poruší se orientace molekul a nastane depolarizace



polarizované

depolarizované

emitované záření

## FP a mobilita molekul

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right)$$

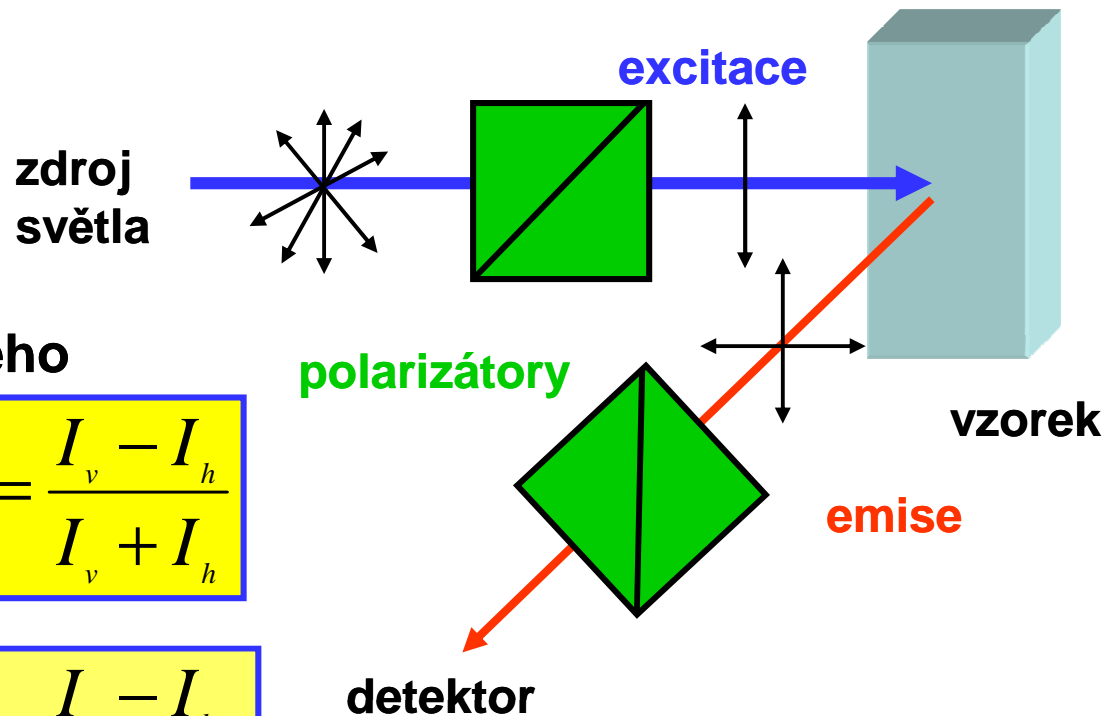
- $P_0$  ... FP v nepřítomnosti rotační difuze
- alternativní vyjádření rotace pomocí viskosity a molekulárního objemu  $V$ , lze dále zavést molekulovou hmotnost spec. objem bílkoviny  $v$  a hydrataci  $h$  (typ. 0.2 g vody na 1 g proteinu)
- v praxi jsou díky hydrataci a nesférickému tvaru korelační časy  $\theta$  asi 2x větší než odvozené pro kouli v suchém stavu (např. HSA,  $M=65$  kDa,  $h=1,9$  vychází  $\theta$  kolem 50 ns)

$$\theta = \frac{\eta V}{kT} = \frac{\eta M_r}{RT} (\bar{v} + h)$$

# Polarizátor

- světlo po průchodu polarizátorem osciluje pouze v jedné rovině
- dichroické systémy - adsorbují jednu z obou rovin polarizace (film z orientovaného PVA dopovaná jódem), málo efektivní v UV oblasti
- krystaly kalcitu vykazující dvojitou refrakci - rozptylují různě obě roviny polarizace (Nicol a Glan polarizátory, Wollastonův hranol)

# Měření FP



- změří se horizontální a vertikální složky emitovaného záření

$$P = \frac{I_v - I_h}{I_v + I_h}$$

- polarizace se vypočte podle vztahu: bývá od -0.25 po 0.5

- alternativně se používá anisotropie  $r$ :

$$r = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h}$$

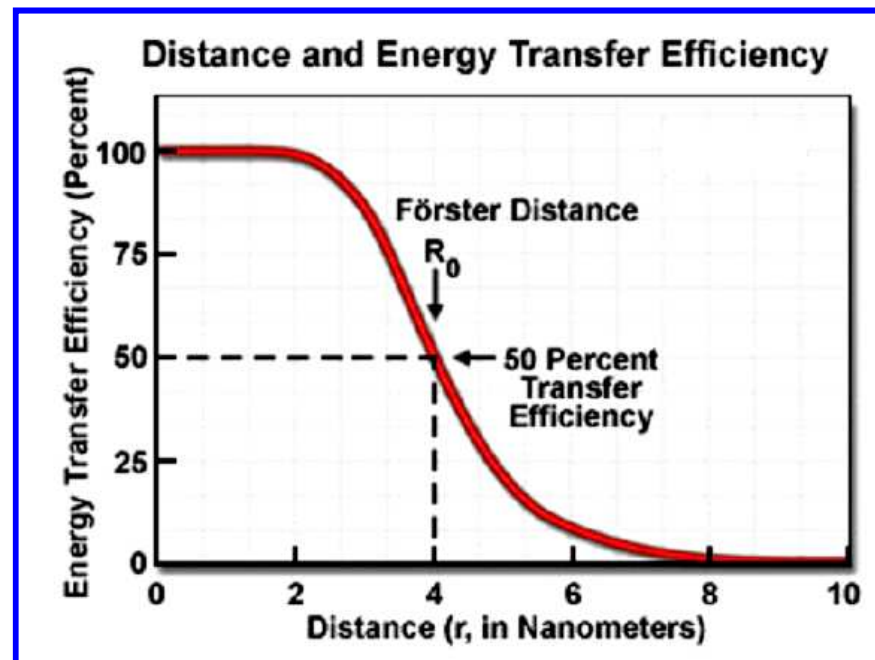
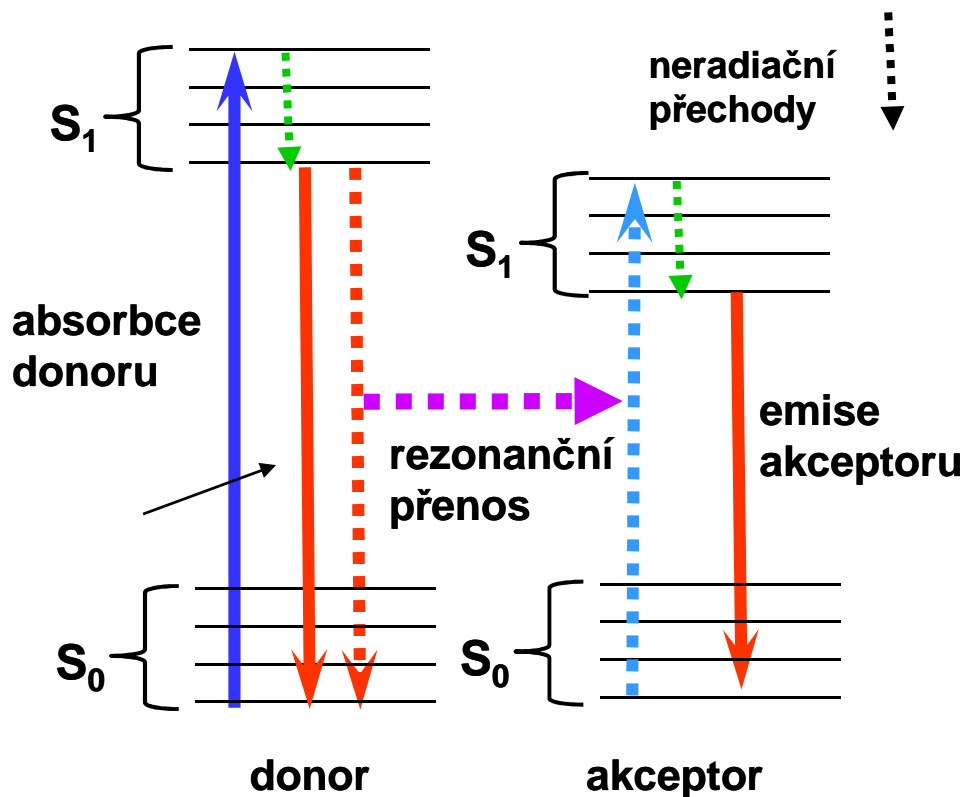
- obě veličiny jsou zaměnitelné (vnitřně souvisí):

$$P = \frac{2r}{2 + r}$$

- jako tracer fungují konjugáty malých molekul (peptidy, léčiva, pesticidy, ...), které jsou pomocí vhodného můstku (linker) spojeny s fluoroforem (fluorescein, rhodamin)

# FRET Förster energy resonance transfer

- přenos energie zářivými nebo nezářivými mechanismy mezi dvěma chromofory
  - zářivý (triviální) přenos - excitovaná molekula donoru emituje záření, které je absorbováno molekulou akceptoru
  - nezářivý přenos energie (FRET) - ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem je excitovaná molekula akceptoru (chromofor, budící záření sám neabsorbuje)
  - nedochází k emisi světla donorem





# Efektivita FRET

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{r_0}\right)^6} = 1 - \frac{\tau'_D}{\tau_D} = 1 - \frac{F'_D}{F_D}$$

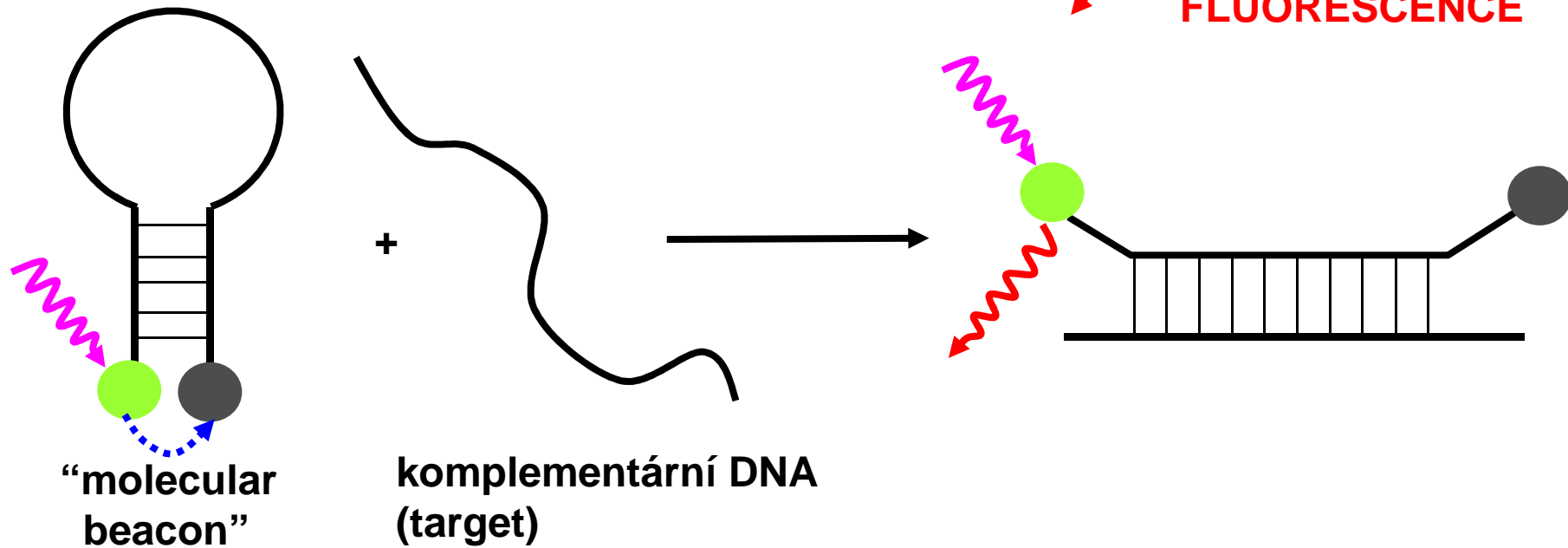
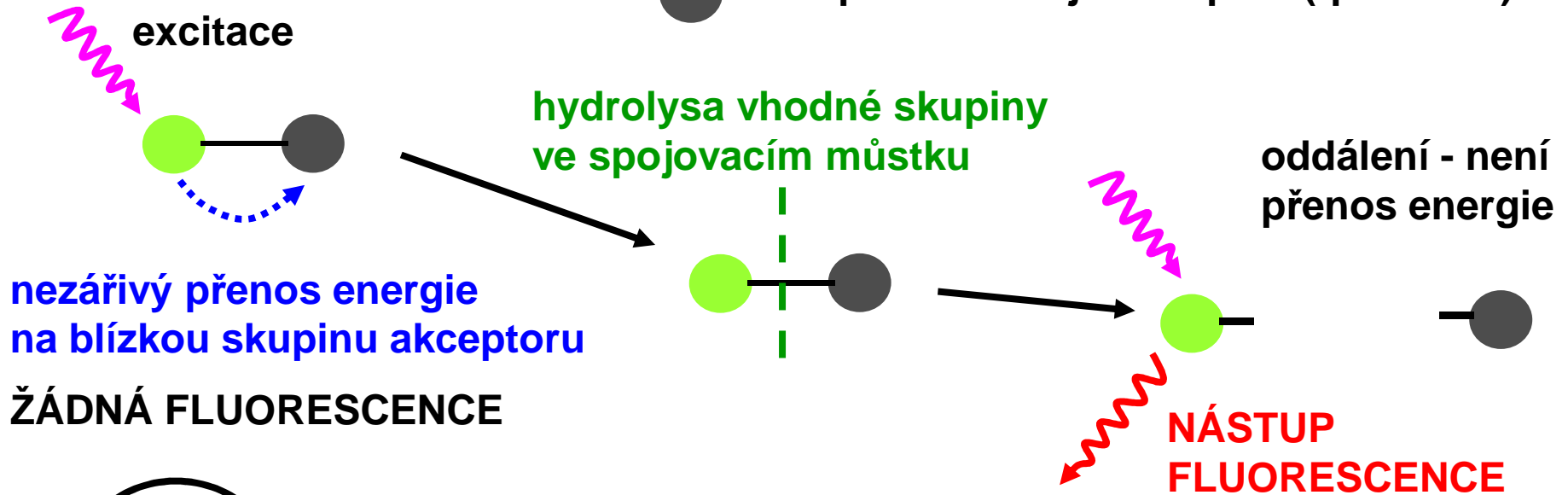
- dána poměrem vzdálenosti  $r$  mezi D a A a Forsterova poloměru  $r_0$ , nebo alternativně poměry doby  $\tau$  nebo intenzity  $F$  fluorescence donoru bez ( $\tau, F$ ) a v přítomnosti ( $\tau', F$ ) akceptoru, závisí dále na:
  - vzdálenosti mezi donorem a akceptorem
  - spektrální překryv emisního pásu donoru a absorpčního pásu akceptoru
  - vzájemné relativní orientaci dipólů donoru a akceptoru
- pravděpodobnost rezonančního přenosu energie určuje  $k_{DA}$ ,
  - určující složkou je dipól-dipólový přenos energie
  - Försterův vzorec (v případě slabé vazby, kdy vzájemné interakce donoru a akceptoru neovlivní optická spektra)
  - $\tau_D$  – doba dohasínání fluorescence donoru,  $r_0$  – vzdálenost, ve které je pravděpodobnost přenosu energie rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly,  $r_{DA}$  – vzdálenost mezi donorem a akceptorem

$$k_{DA} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{r_{DA}}\right)^6$$

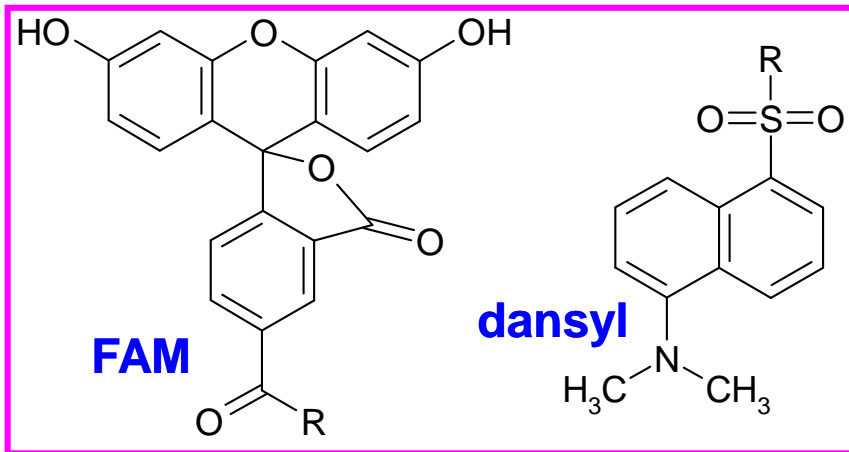
# FRET uspořádání

● donor - fluorescenční skupina (fluorofor)

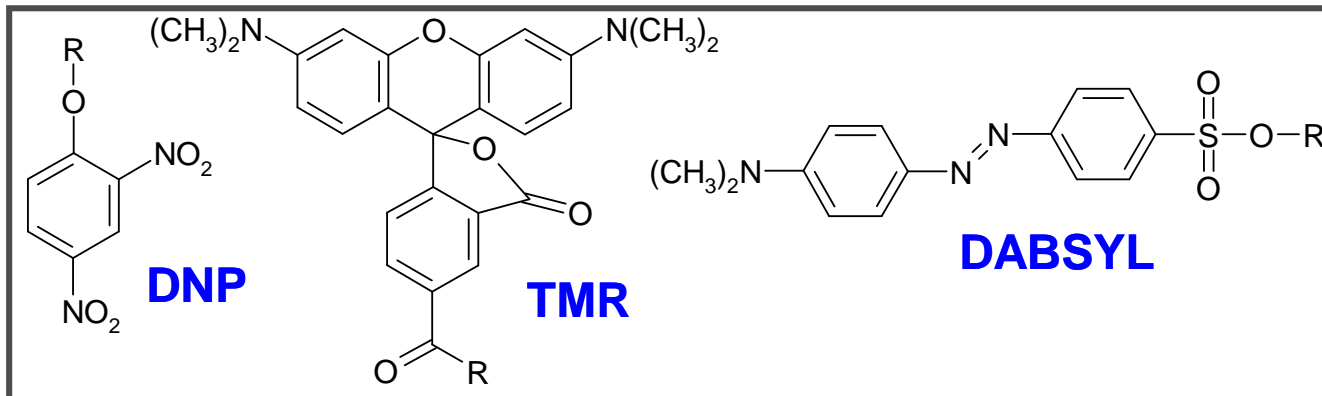
● akceptor - zhasějící skupina (quencher)



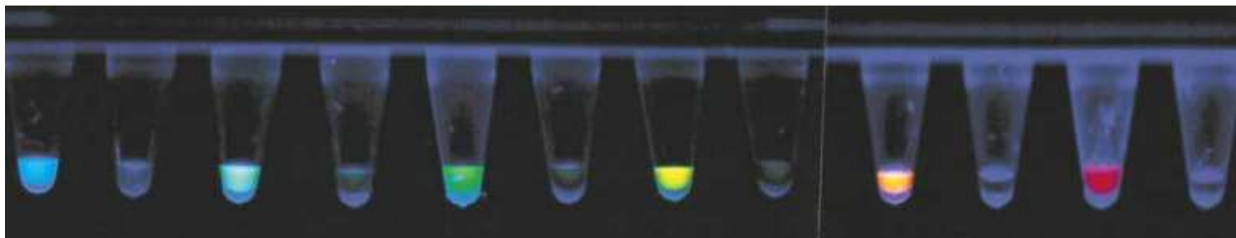
## FRET - vhodné skupiny



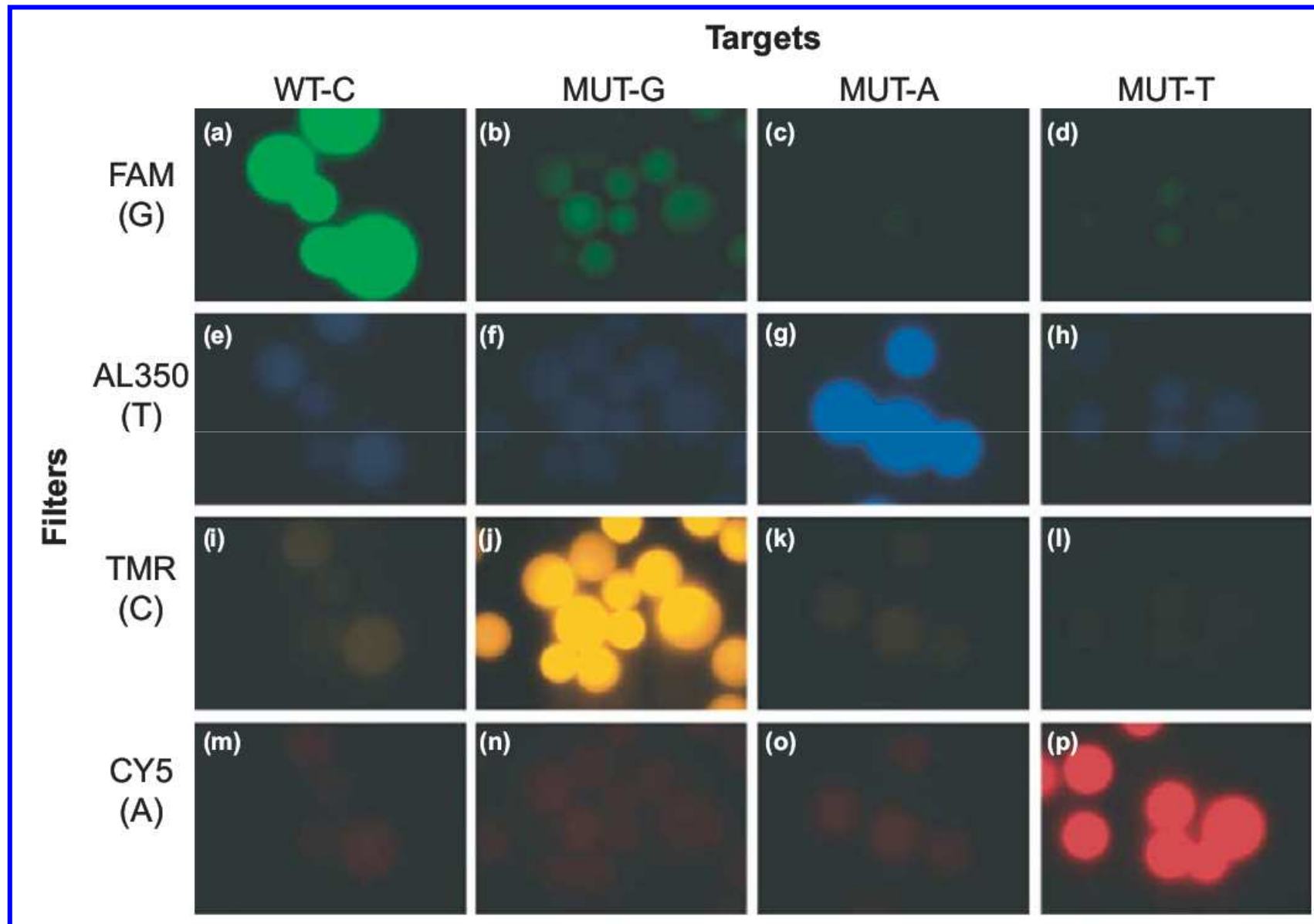
fluorofory (donory, R značí napojení na další část molekuly)



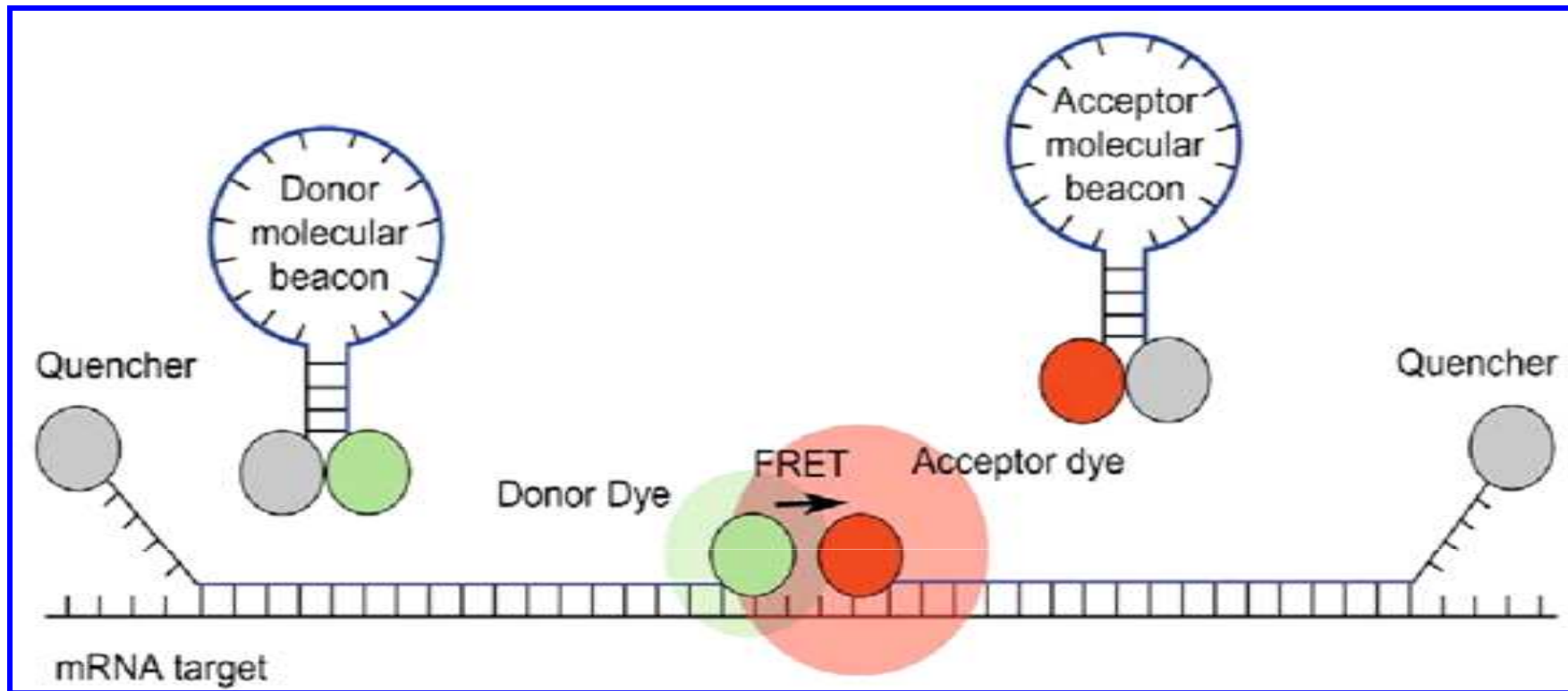
zhášeče (akceptory)



# Vícenásobné značení - detekce mutací



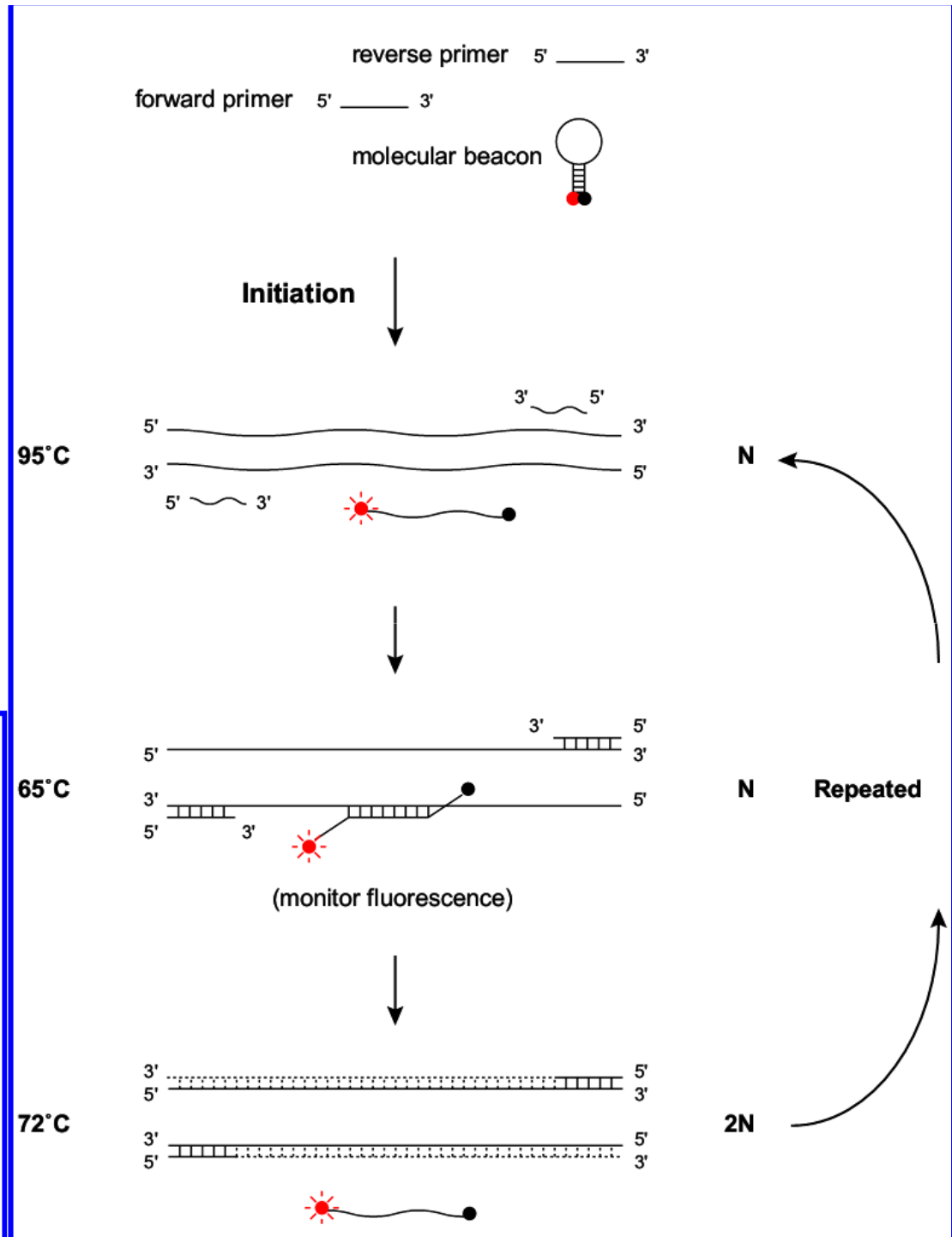
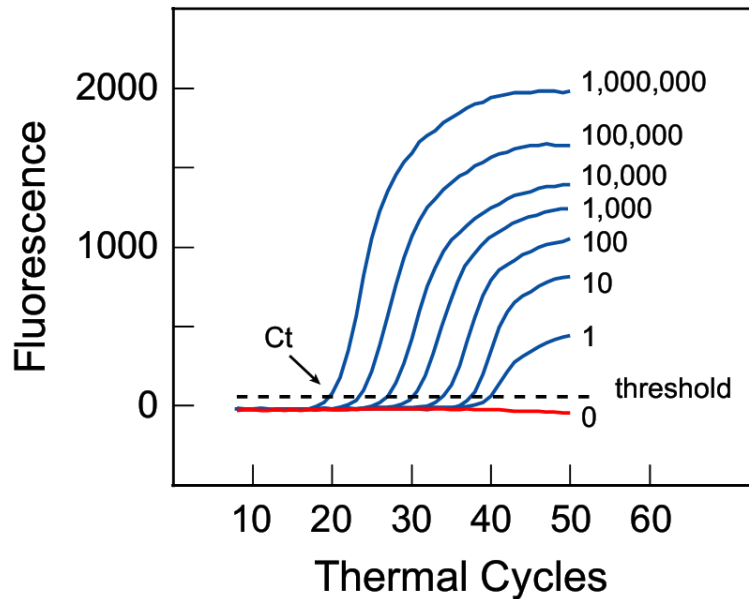
# FISH fluorescence in situ hybridization



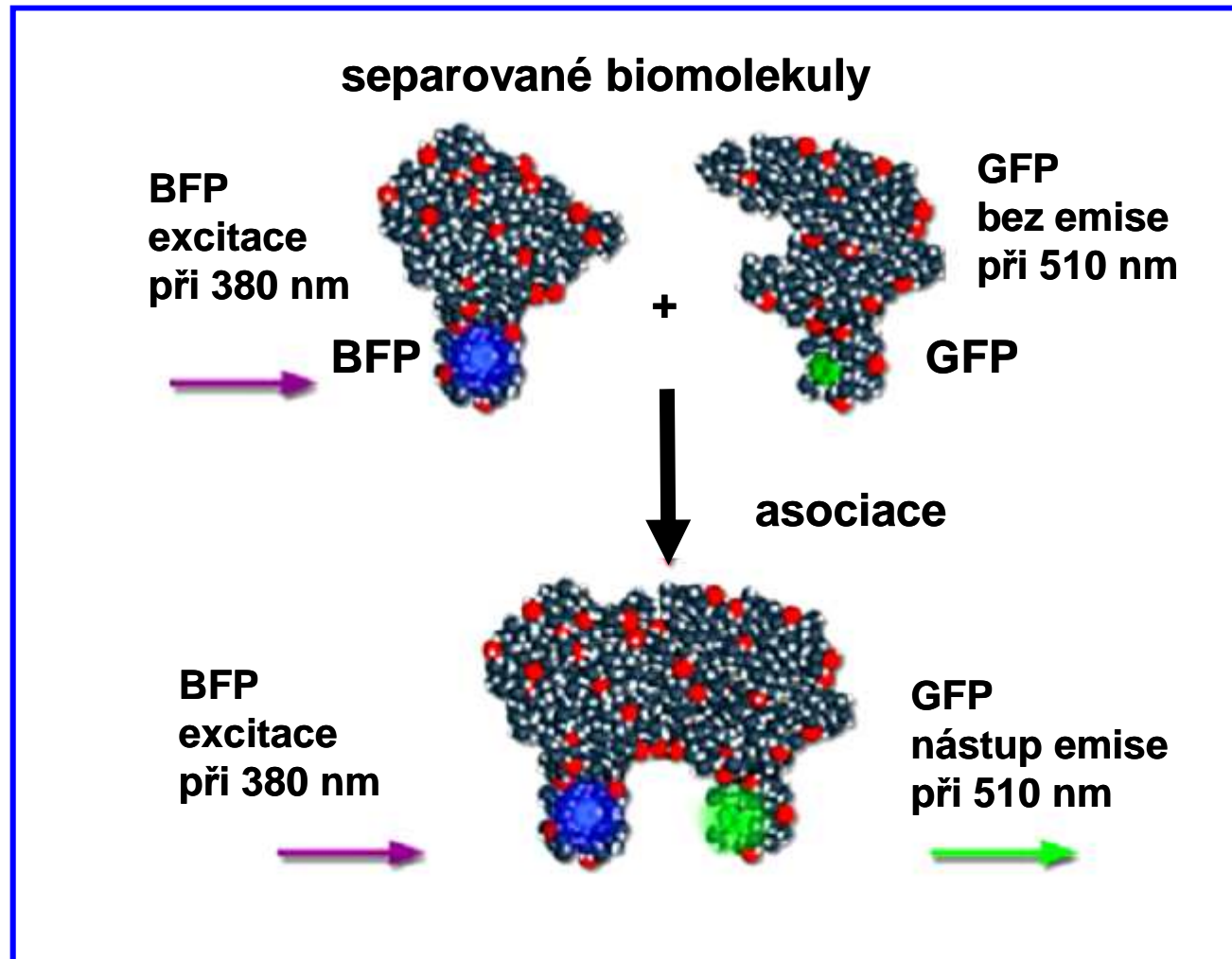
- **dual molecular beacon - vyšší specifita - obě proby musí hybridizovat s cílovými místy, technika "adjacent probes"**

# Real time PCR

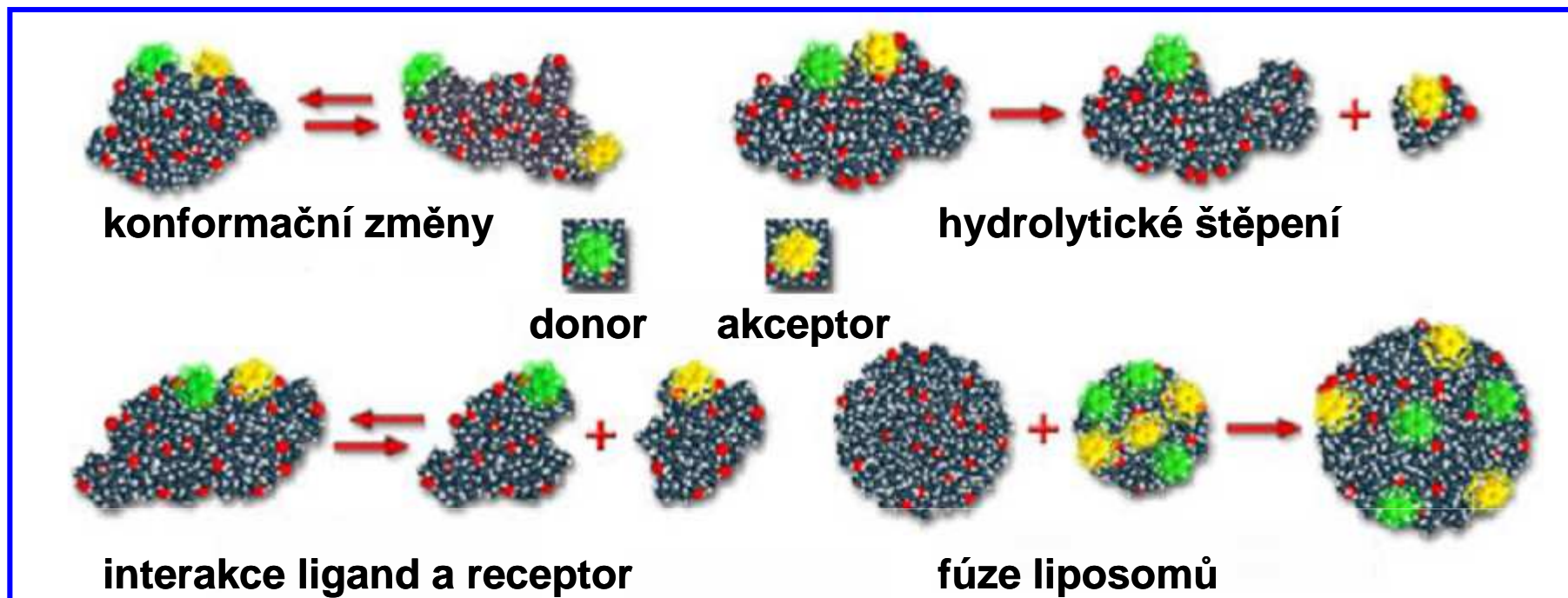
- zviditelnění průběhu pomocí MB
  - 95 °C denaturace
  - 65 °C annealing, přisednutí primerů a MB = fluorescence
  - 72 °C prodloužení vláken



# FRET: in vivo interakce biomolekul

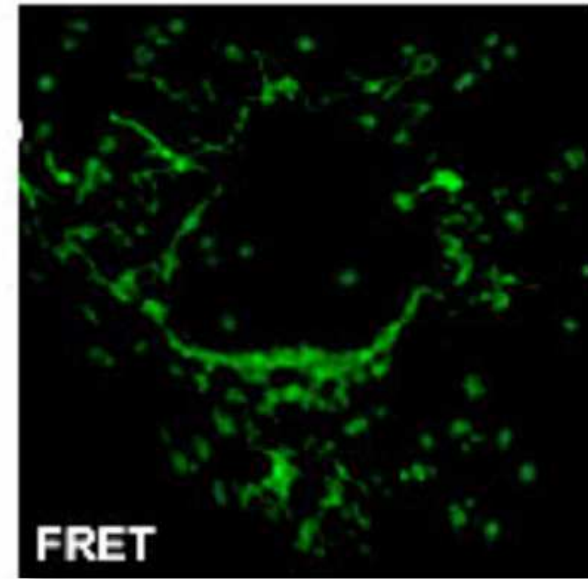
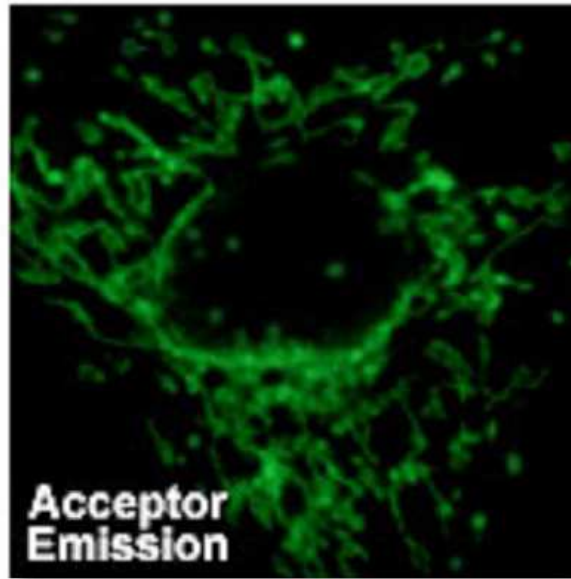
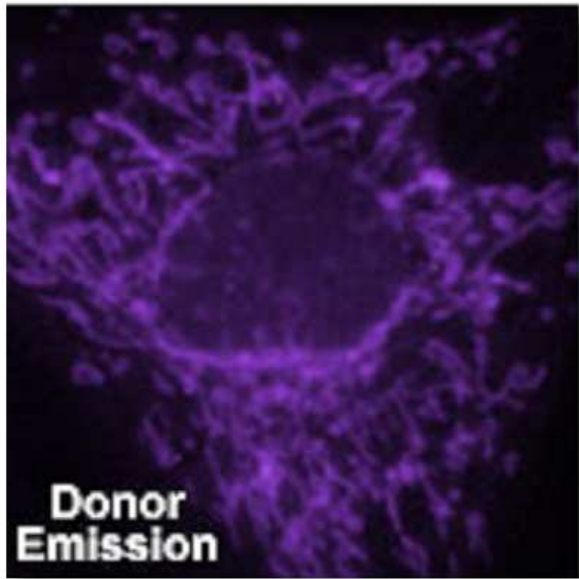


# FRET: in vivo interakce biomolekul





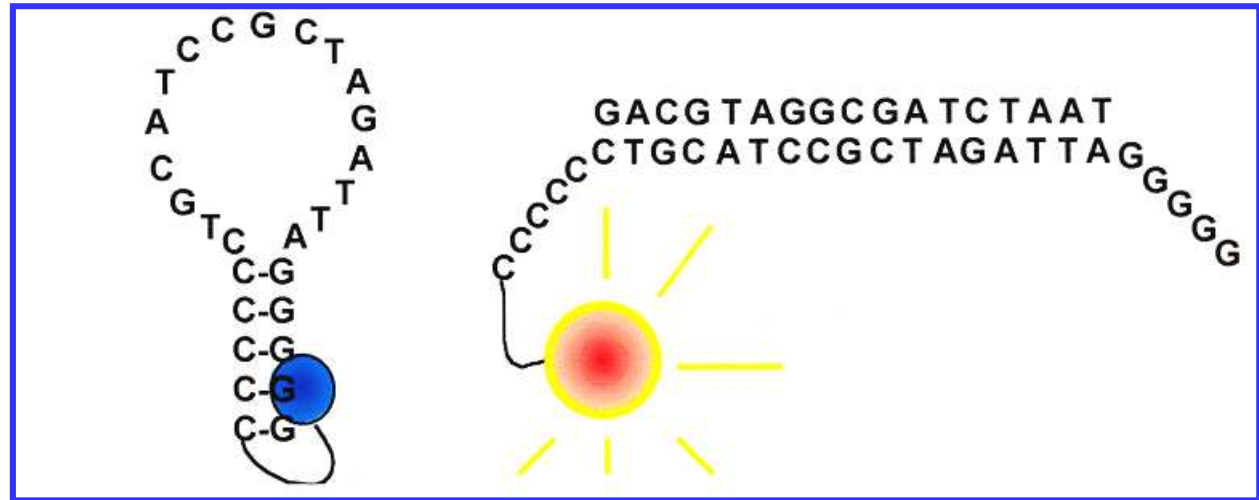
# FRET imaging v mikroskopii



- lokalizace a vzdálenosti biomolekul v buňce



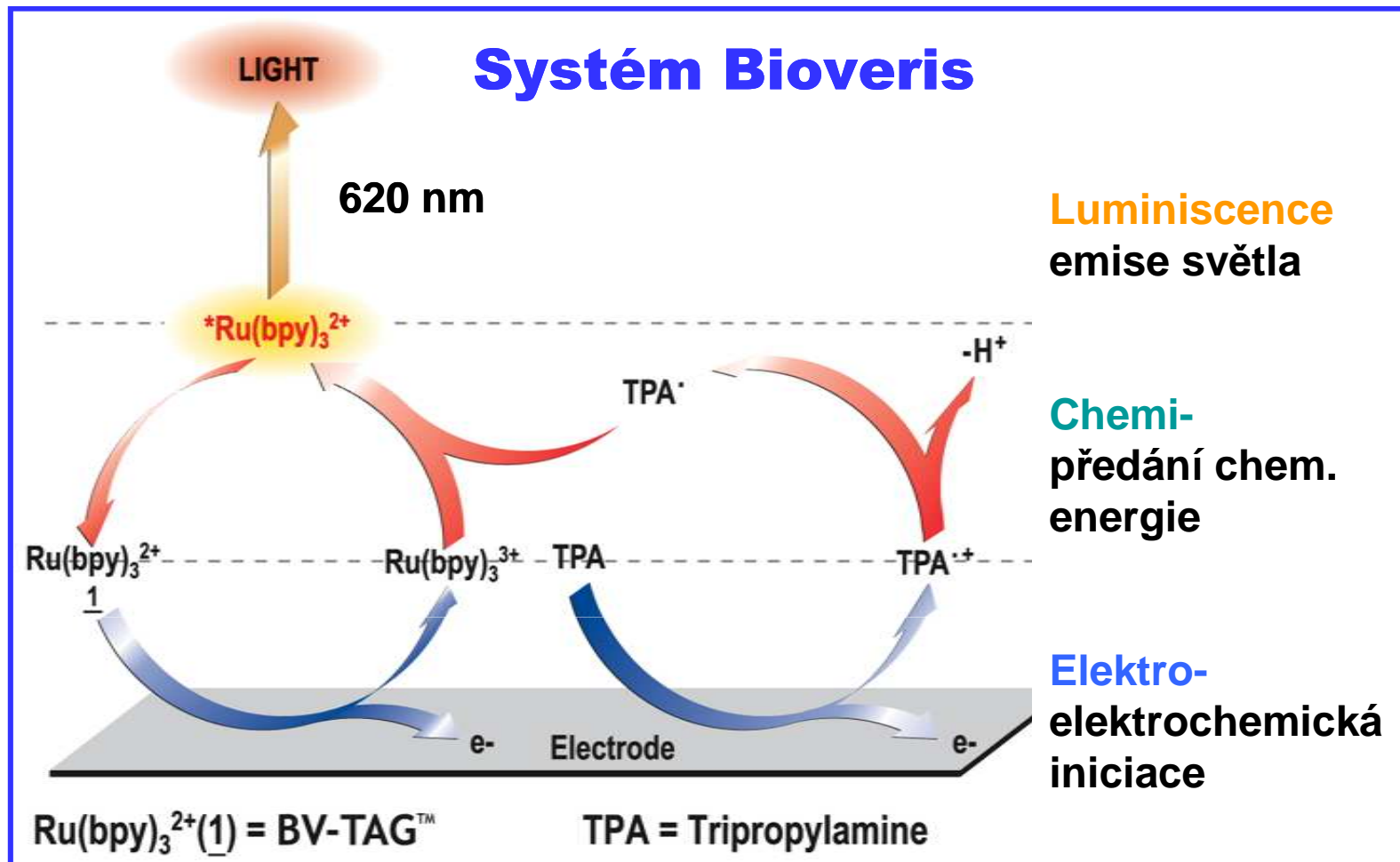
# Gene-PIN



- oligonukleotid - "inteligentní" DNA proba obsahující sekvenci komplementární k cílové sekvenci v analyzovaném vzorku
- na jednom konci má řadu G, na druhém konci řadu C a navíc skupinu fluoroforu
- v roztoku tedy vytvoří vlásenkovou strukturu, v níž se fluorofor přiblíží ke guaninovým zbytkům, které fungují jako zhášec
- v přítomnosti cílové sekvence se vlásenka otevře a objeví se fluorescence
- výhody: jednoduchost, rychlost, citlivost ( $10^{-7}$  až  $10^{-12}$  M)

# Elektrochemiluminescence (ECL)

- chemiluminescence jako výsledek elektrochemické reakce, ze stabilního prekurzoru na povrchu elektrody vytvořen vysoce reaktivní prvek, který reaguje za tvorby světelného záblesku
- chemiluminiscentní reakce, která vede k emisi fotonu z rutheniového komplexu, je iniciována elektricky, spíše než chemicky
- realizace ECL na povrchu elektrody umožňuje přesnou prostorovou kontrolu procesu, včetně zapnutí a vypnutí (ON / OFF), PMT detektor je prostorově velmi blízko
- hlavní výsledek je intenzita světelného toku, podružnou informací je závislost proudové odezvy elektrody
- vhodné i pro velmi nestabilní látky (generování in situ)
- možnost recyklování - zesilovací účinek
- ECL lze provést i s luminolem
- komplexy ruthenia s bipyridinem,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$
- technologie se využívá v imunoanalyzátoch firmy Roche



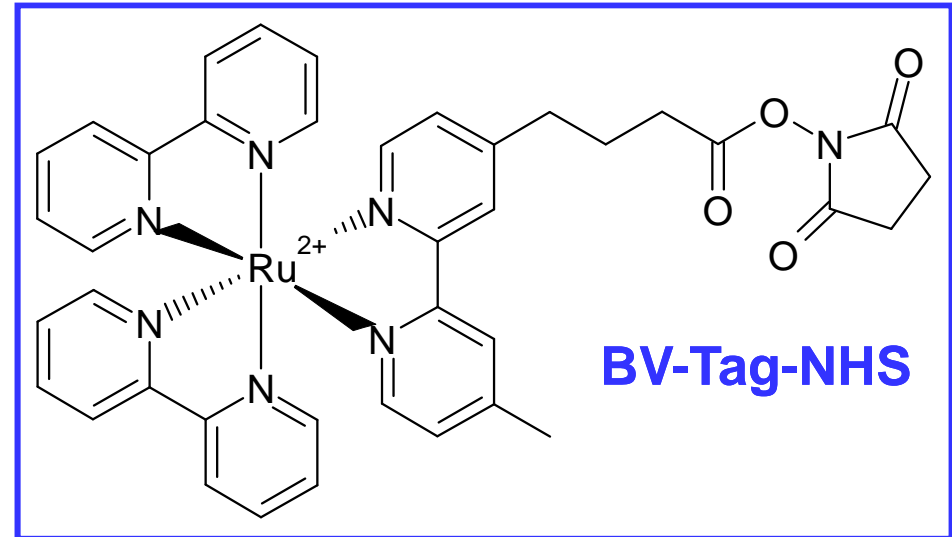
- ruthenium a TPA jsou oxidovány po aplikaci napětí na elektrodu
- radikál TPA $\cdot^+$  ztrácí proton, redukuje Ru $^{3+}$  na Ru $^{2+}$ , které z excitovaného stavu přechází do základního za vyzáření fotonu
- Ru se nespotřebovává – recykluje se – zesilovací mechanismus
  - zvýšení citlivosti stanovení

# BioVeris tag

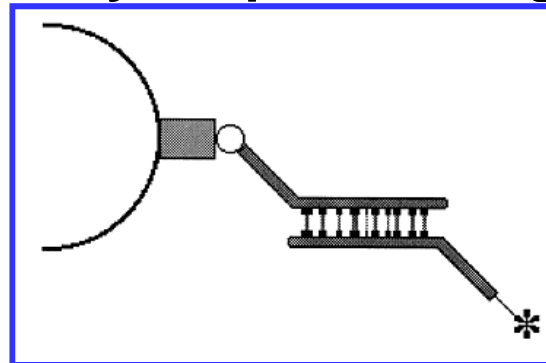
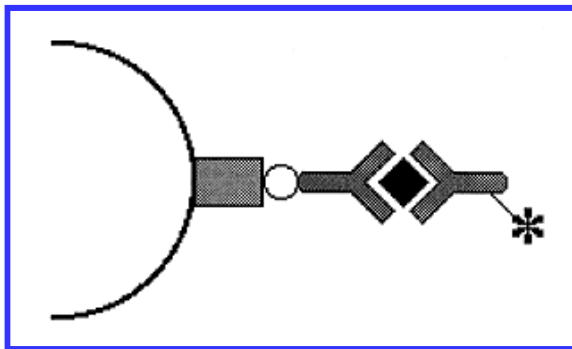
- stabilní neizotopická značka
- různé formy pro biomolekuly:

- BV-Tag-NHS-ester
- BV-Tag-fosforamid
- BV-Tag-maleimid
- BV-Tag-hydrazid
- BV-Tag-amin

aminy (bílkoviny)  
fosfoskupiny (nukleové kyseliny)  
thioly  
sacharidy  
karboxyly



- podobný je systém ELECSYS
- obvykle kombinováno se záchytem pomocí magnetického nosiče

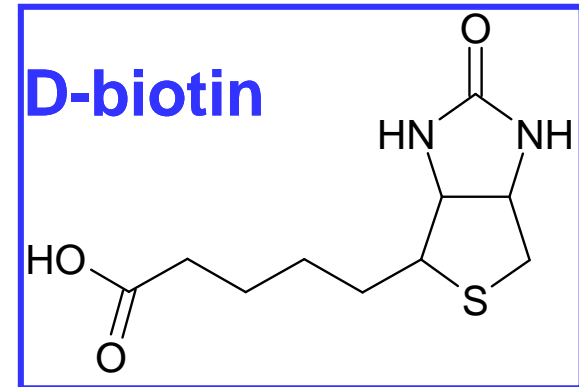


# **Biotin a (strept)avidin**

- **široce používáno pro přípravu konjugátů, značení a imobilizace**
  - 1927 - objeveno, že krysy krmené bílkem dostanou dermatitidu
  - 1940 tu odstraní vitamin H
  - 1941 efekt přiřazen avidinu a objevena vysoká afinita avidinu k biotinu
  - 1976 praktické využití interakce pro značení - Wilchek

# Biotin / avidin

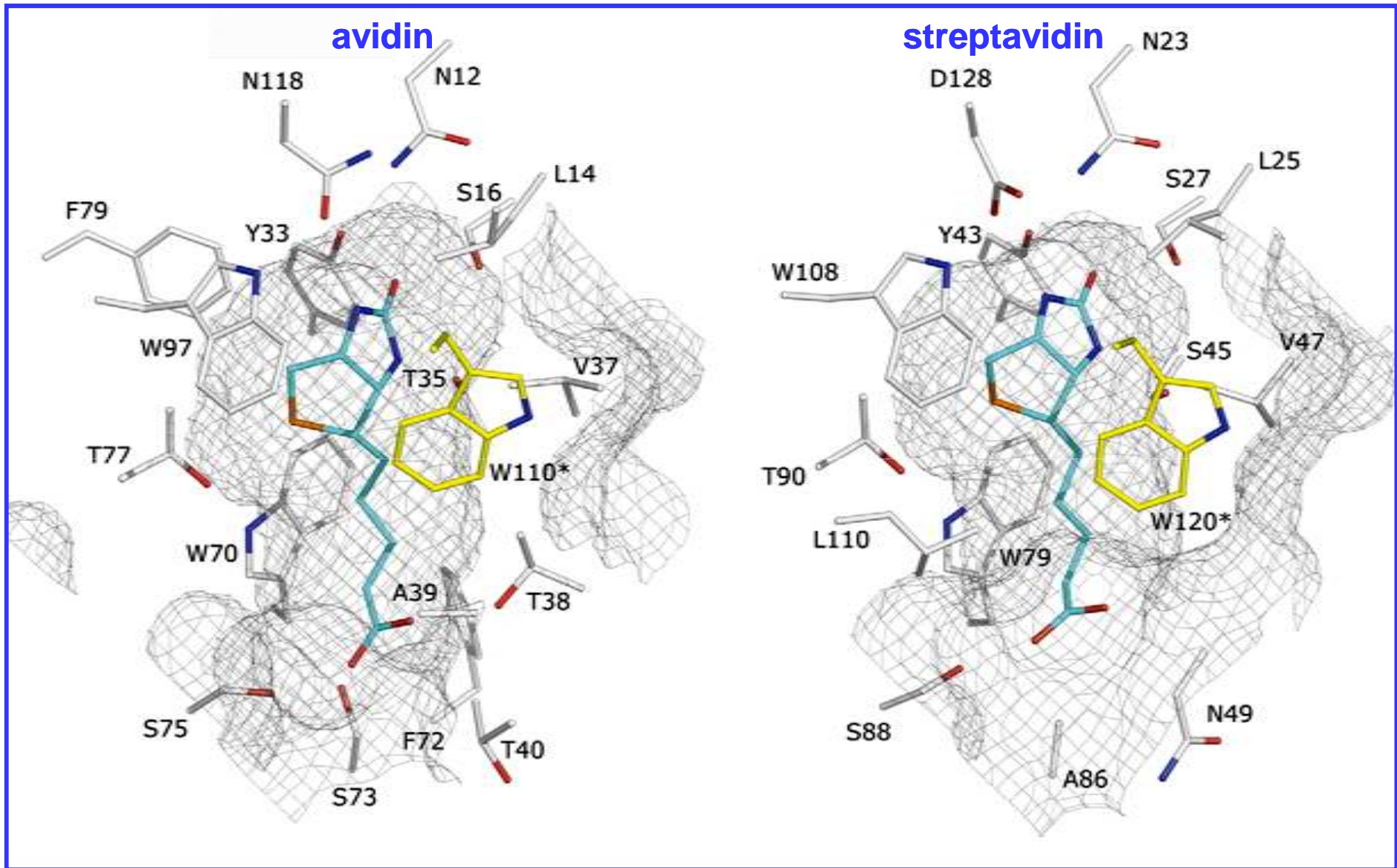
- velmi pevná interakce,  $K_D = 1.3 \times 10^{-15} \text{ M}$
- odolnost komplexu - stabilní v 8 M guanidinu při pH 5, disociuje až při pH sníženém na 1.5
- biotin, vitamin B<sub>7</sub>, vitamin H
- avidin
  - tetramer (4 x 16.4 = 58 kDa)
  - každá podjednotka má vazebné místo pro biotin
  - glykoprotein, pI 9.5, izoluje se z vaječného bílku
- streptavidin
  - obdobný (tetramer 4 x 15 kDa), ale strukturně i co do aa složení odlišný od avidinu
  - pI 5-6 - menší celkový náboj - méně nespecifických interakcí
  - ze *Streptomyces avidinii*
  - výhodou mnohem menší nespecifické interakce
- neutraavidin
  - deglykosylovaná forma avidinu (nevadí lektiny), pI 6.3



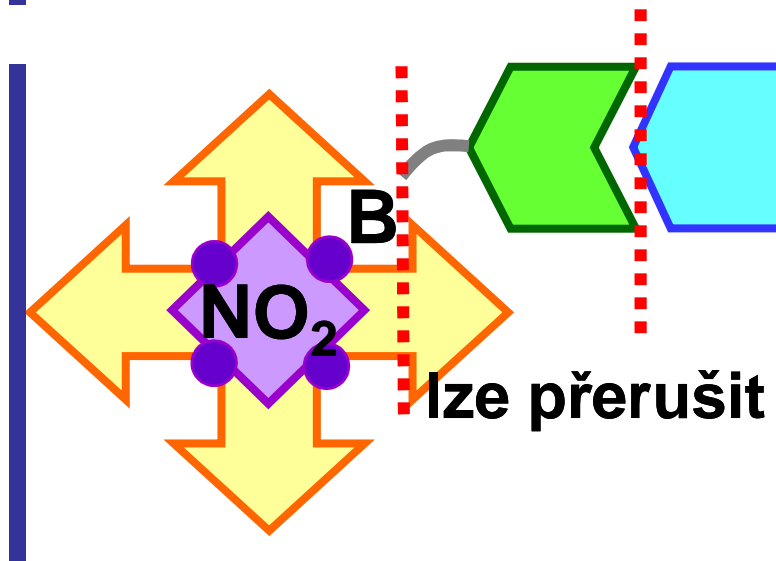
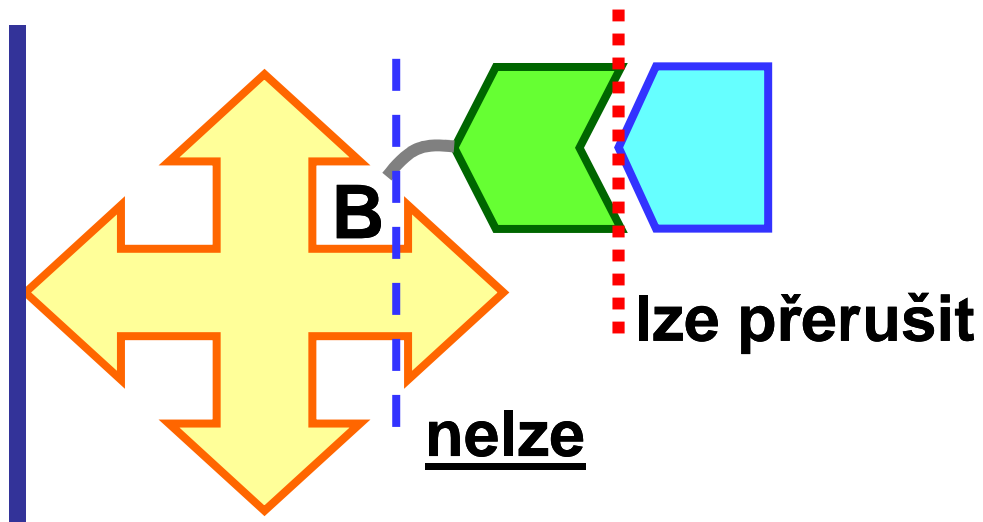




# Detaily vazebného miesta

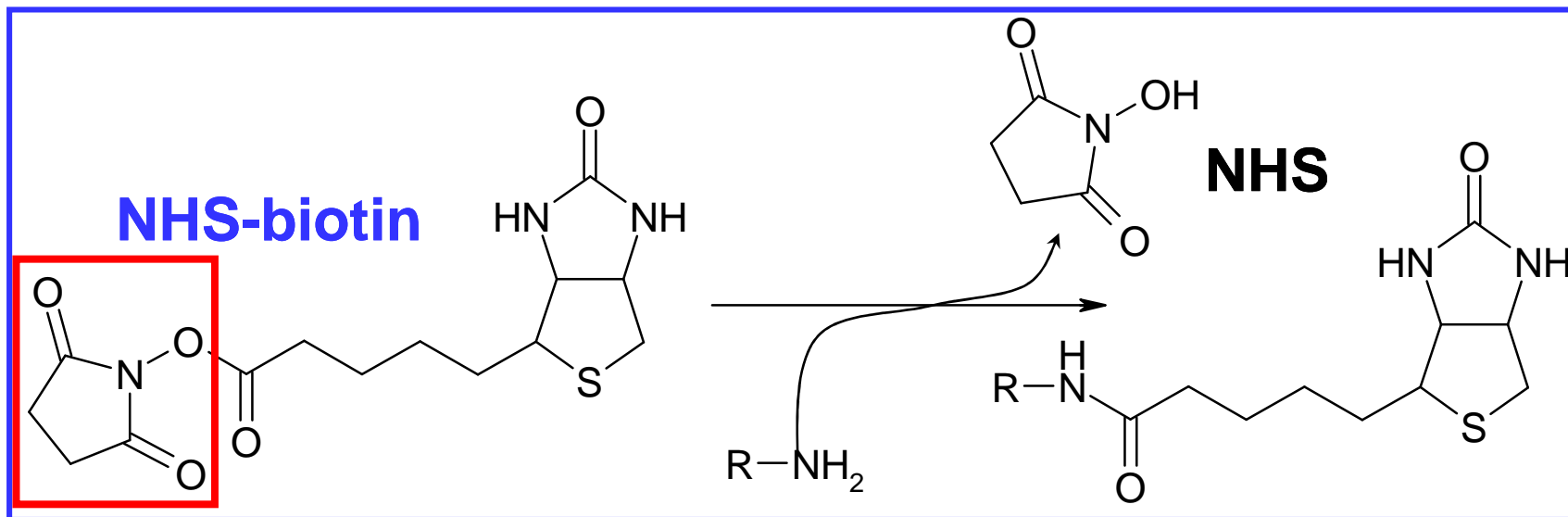


# Reverzibilita komplexu



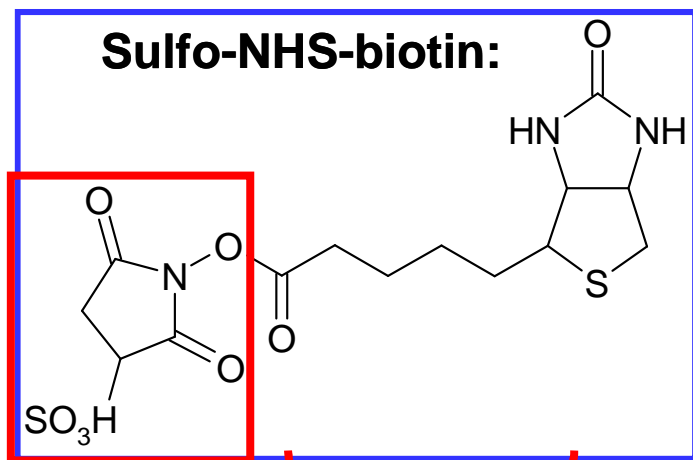
- interakce mezi biotinem a avidinem za normálních podmínek nelze přerušit
- imobilizace různých biotinylovaných biomolekul na avidinovaný povrch
- nitroavidin – připraví se nitrací tyrosinových zbytků v avidinu (volný nebo imobilizovaný) pomocí tetranitromethanu
- interakci mezi biotinem a nitroavidinem lze narušit nadbytkem biotinu nebo při pH 10

# Biotinylace - lysin, ev. jiné -NH<sub>2</sub>

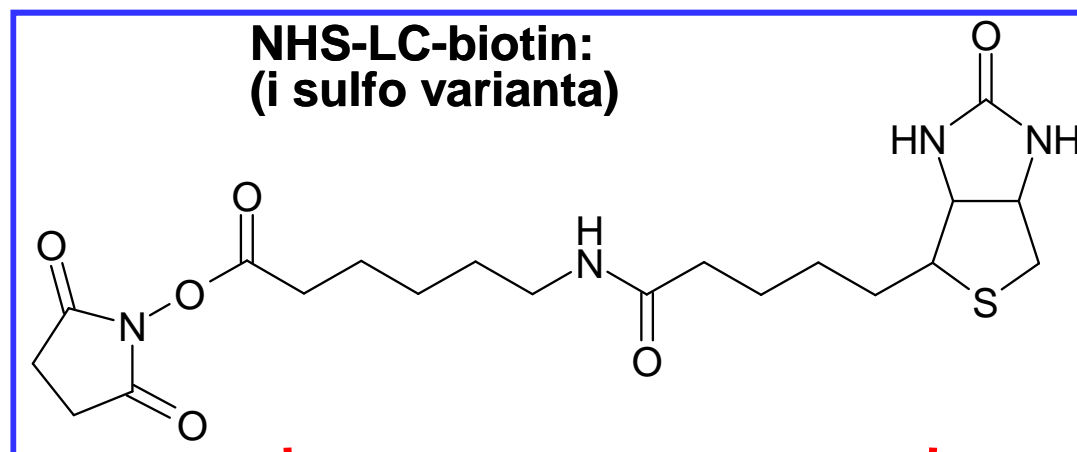


- alternativně lépe rozpustný

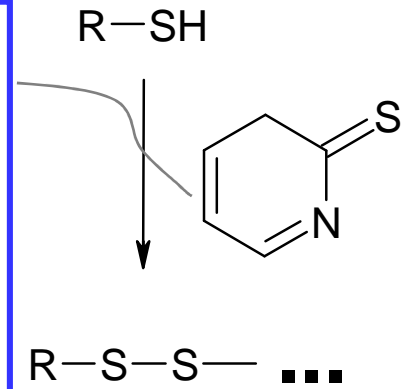
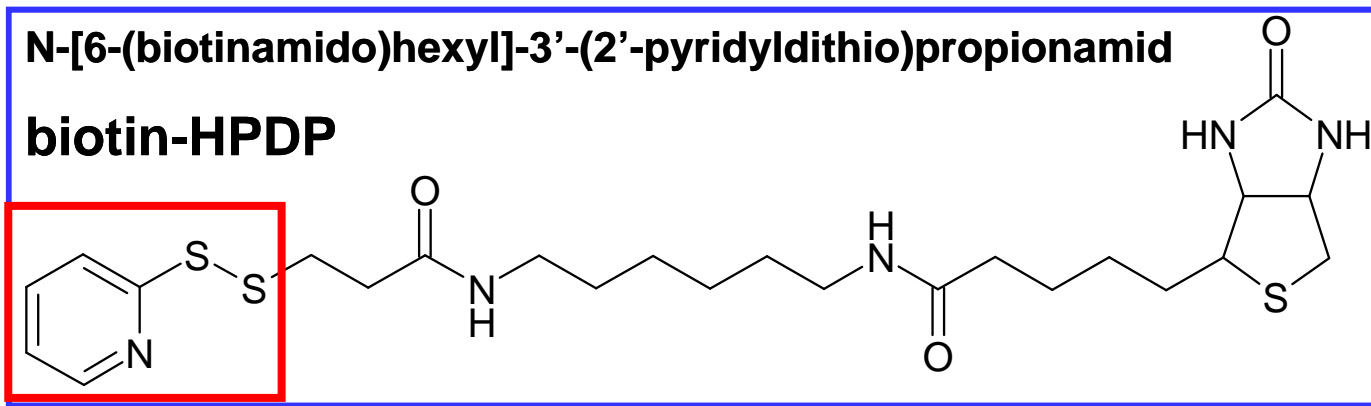
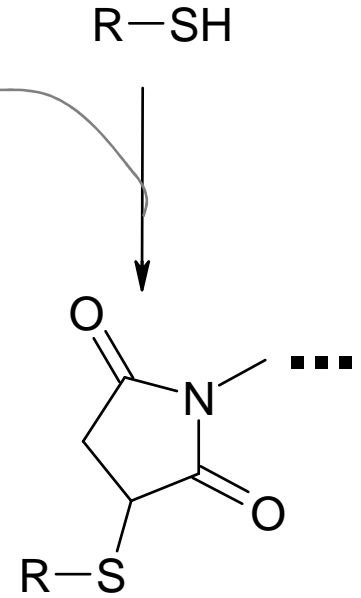
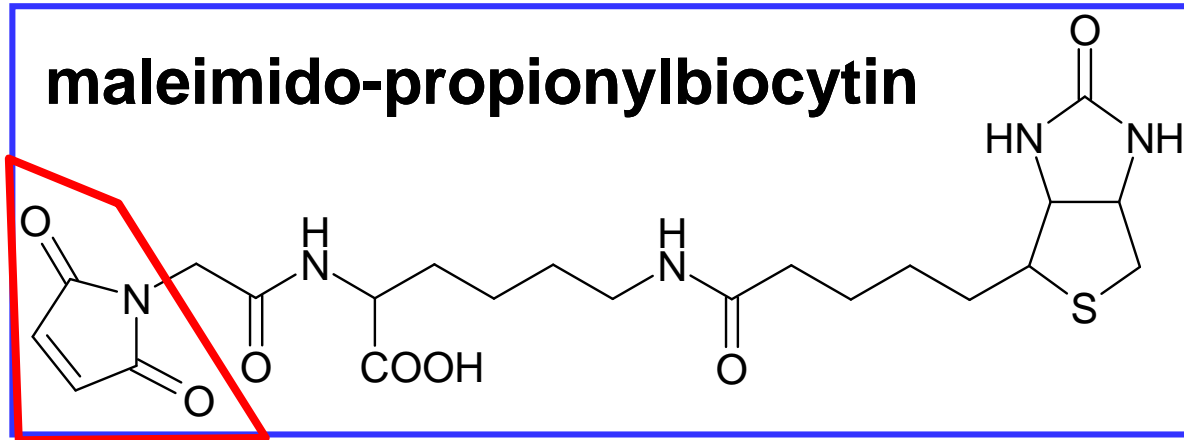
nebo s delším spacerem:



x

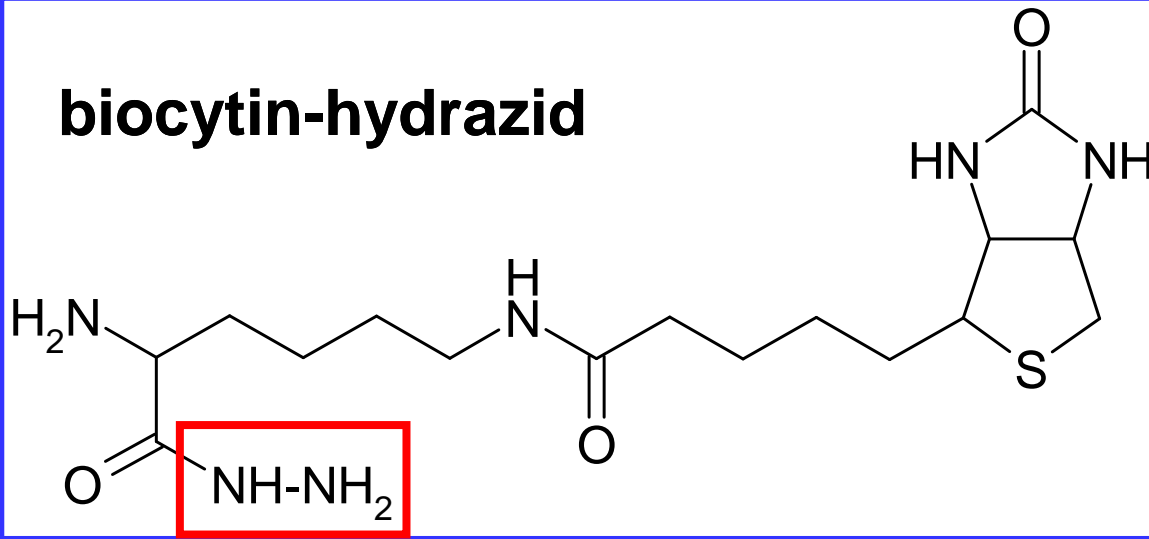


# Biotinylace -SH



# Biotinylace sacharidů

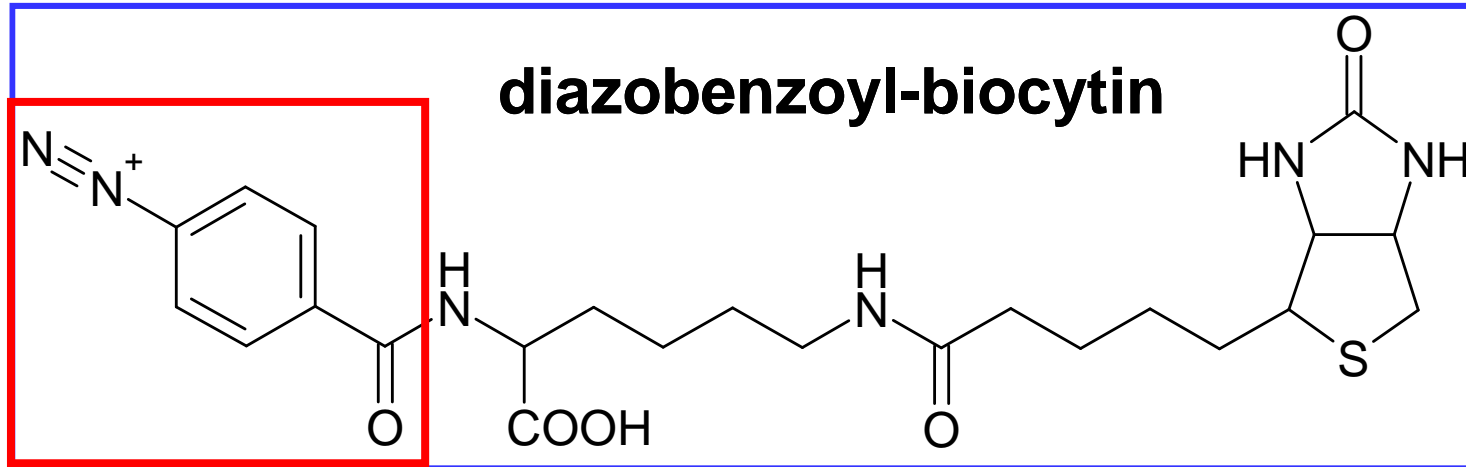
**biocytin-hydrazid**



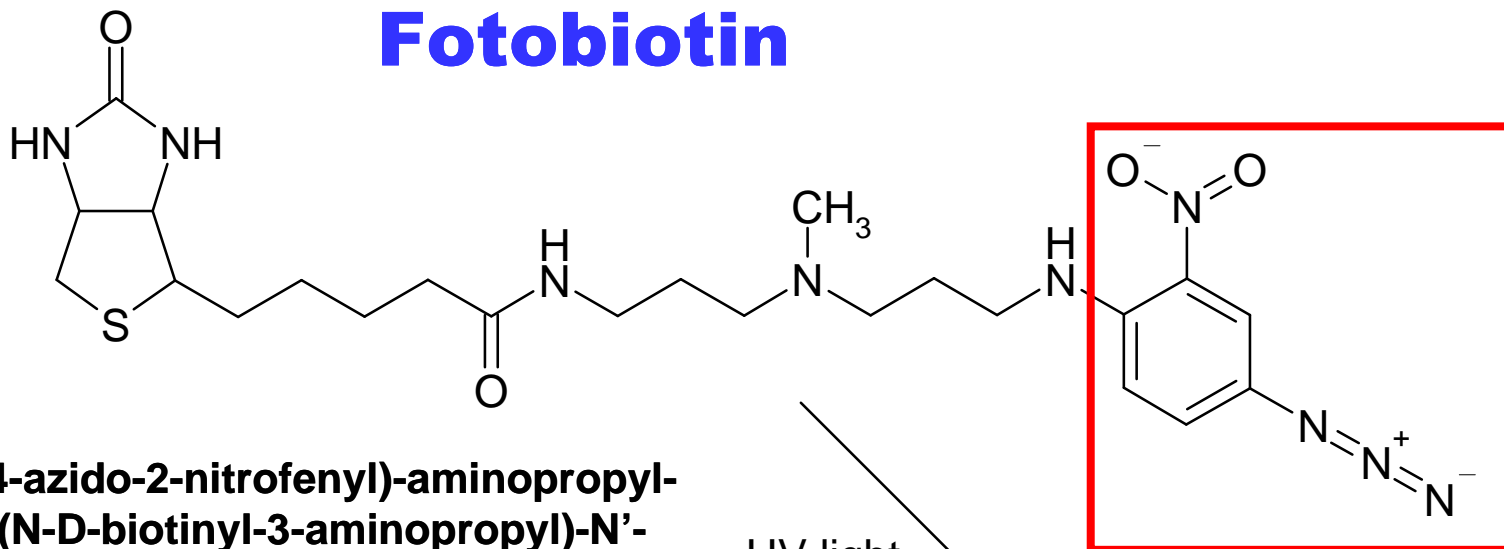
po oxidaci jodistanem  
na aldehyd

s CDI účinkuje i na  
Asp a Glu

# Biotinylace Tyr, His

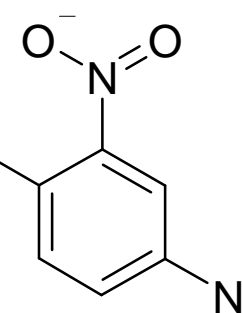


# Fotobiotin

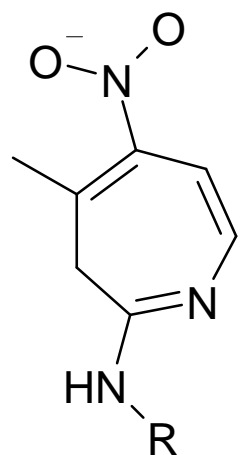


**N-(4-azido-2-nitrofenyl)-aminopropyl-  
-N'-(N-D-biotinyl-3-aminopropyl)-N'-  
-methyl-1,3-propandiamin**

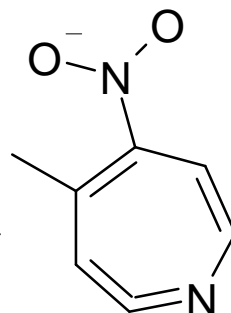
UV light



fotoaktivace,  
expanze kruhu



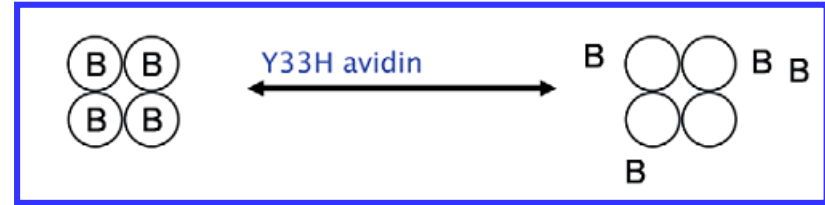
R-NH<sub>2</sub>



# Modifikace

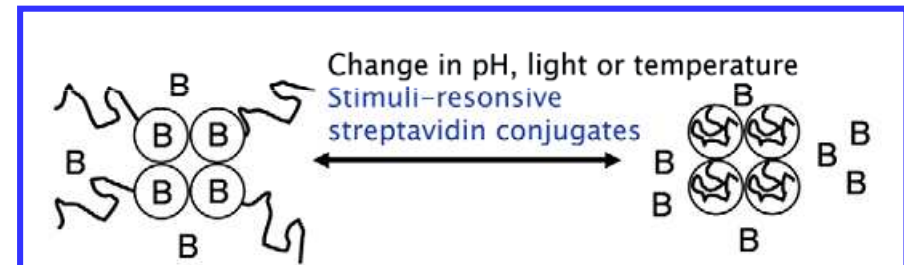
- **genetické manipulace**

- mutace Y33H - pH-nastavitelná vazba biotinu
- monovalentní protein (N23A, S27D, S45A) - odstranění crosslink-interakcí



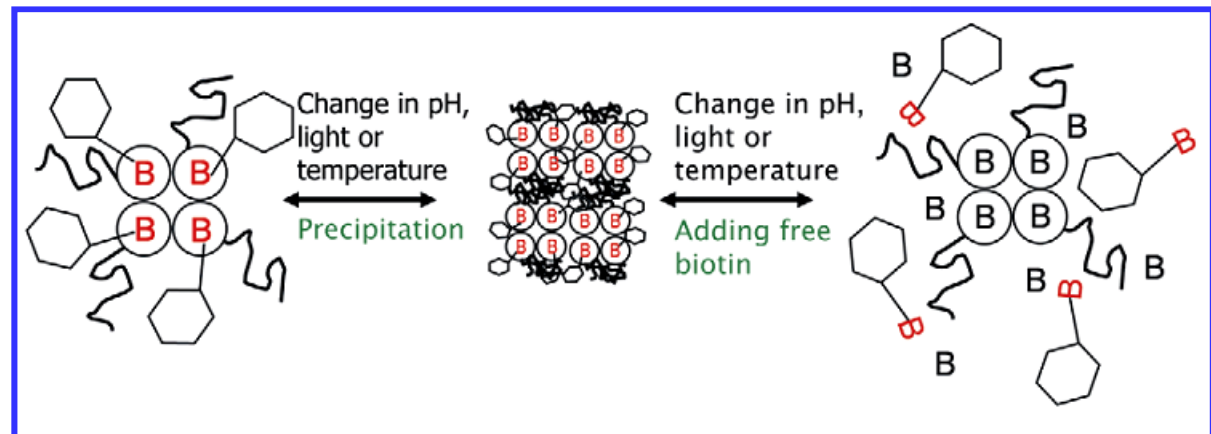
- **cílená kovalentní vazba polymerů reagujících na stimuly**

- "molecular switches" - reakce na podněty - teplota, pH, světlo, ... změnou konformace
- "smart polymers"



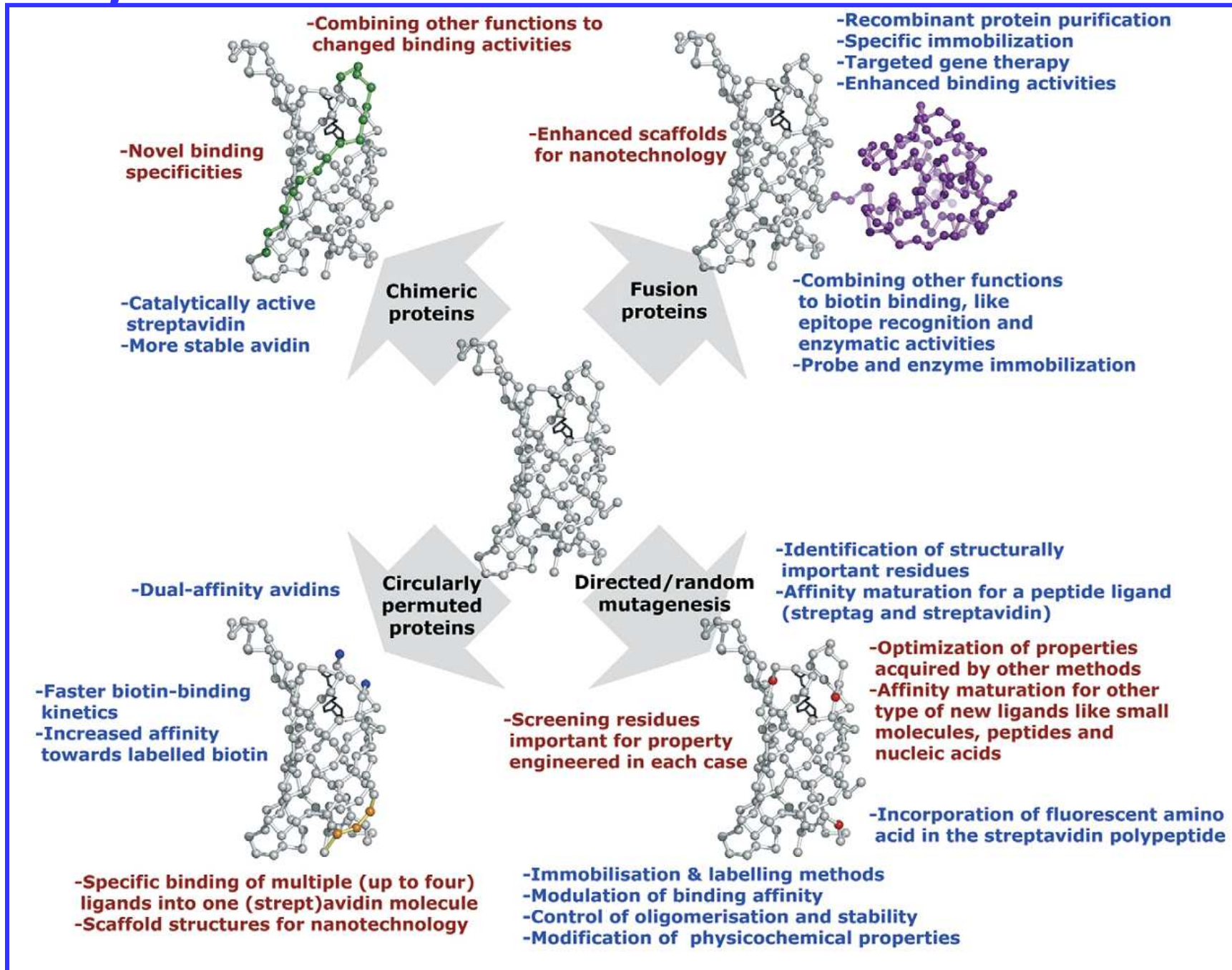
- **fúzní chimerické proteiny**

- dvojí afinita
- "single-chain"





# Existující a budoucí možnosti



# Radioaktivní

## značení

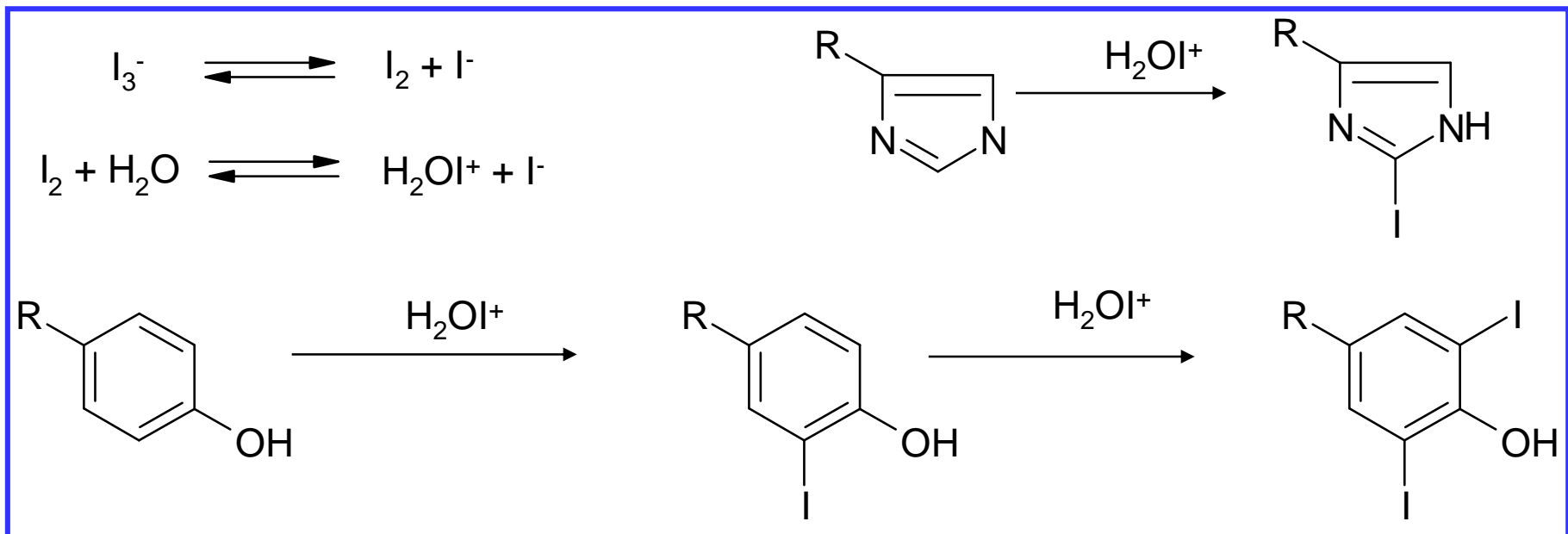
- sledování radioaktivně označené bílkoviny, nukleové kyseliny, substrátu nebo produktu enzymové reakce
- používané sloučeniny:
  - jednoduché -  $^{14}\text{CO}_2$ ,  $^3\text{H}_2\text{O}$ ,  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$
  - uniformě značené - [ $^{14}\text{C}$ ] alanin, [ $^{14}\text{C}$ ] ethanol
  - specificky značené L-[methyl- $^{14}\text{C}$ ] methionin, [methyl- $^3\text{H}$ ] thymin
- jednotky: Becquerel  $\sim \text{s}^{-1}$  (dle SI), Curie  $\sim 1 \text{ g } ^{226}\text{Ra}$ , ( $\mu\text{Ci}$  –  $\text{mCi}$  v praxi)
- detektory
  - ionizační (Geiger-Mullerova trubice)                      - scintilační
  - polovodičové skenery                                              - fotografický materiál
- separace rad. produktu
  - precipitací, extrakce
  - vývoj nebo inkorporace rad. plynu nebo těkavé látky
  - elektroforesa, papírová nebo tenkovrstevná chromatografie
- výhody: přesnost, chemická identita, měření radioaktivity nezávisí na formě a podmínkách
- problémy: nákladné vybavení i reagenty, pracovní rizika

# Radioaktivní značení

- vysoce citlivé z hlediska detekce
- komplikací je striktní dodržování zásad bezpečnosti práce s radioaktivním materiálem a získání potřebného oprávnění
- pro značení biomolekul přichází do úvahy řada izotopů:
- $\beta$  zářiče -  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  a  $^3\text{H}$ 
  - slabé záření vyžaduje použití scintilačních činidel
- $\gamma$  zářiče -  $^{131}\text{I}$  a  $^{125}\text{I}$ 
  - lepší z hlediska citlivosti detekce sledovatelné přímo s několikařádově lepší odezvou
- $^{131}\text{I}$  má velmi silné záření a zejména krátký poločas (8,1 dne)
  - obojí je nevýhodné
- $^{125}\text{I}$  má delší poločas rozpadu (60 dní) a je slabší zářič

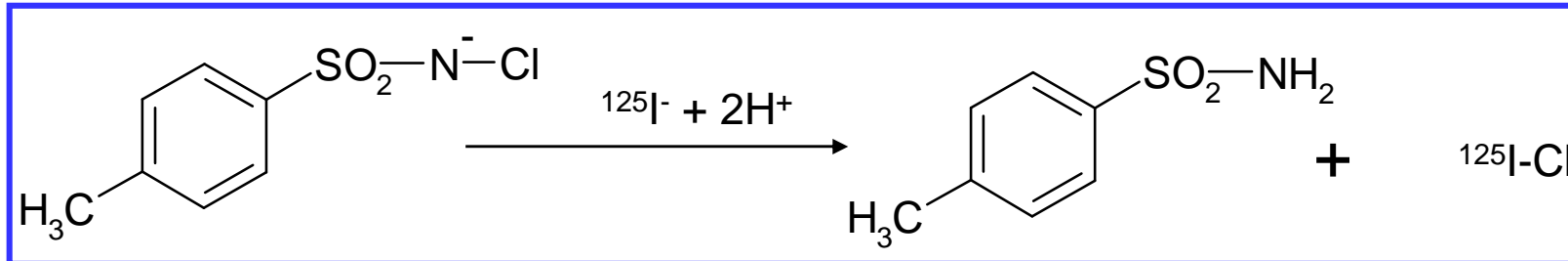
# Jodace

- lze využít přímo vodný roztok  $I_2$ , který obsahuje reaktivní formu  $H_2OI^+$ , vznikající v důsledku rovnovážných reakcí
- dochází k substituci aktivovaných aromatických jader tyrozinu (mono i disubstituce) a histidinu
- mohou být najodovány některé uměle vnesené skupiny
- jodace obvykle snižuje rozpustnost bílkovin
- doba reakce určuje stupeň jodace
- ukončí se přidáním redukčního činidla, např. dithioničitanu

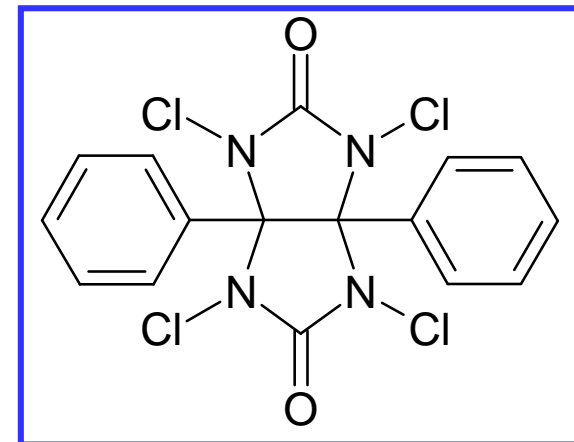


# Jodační činidla

- pro oxidaci jodidu se používá nejčastěji **chloramin T**

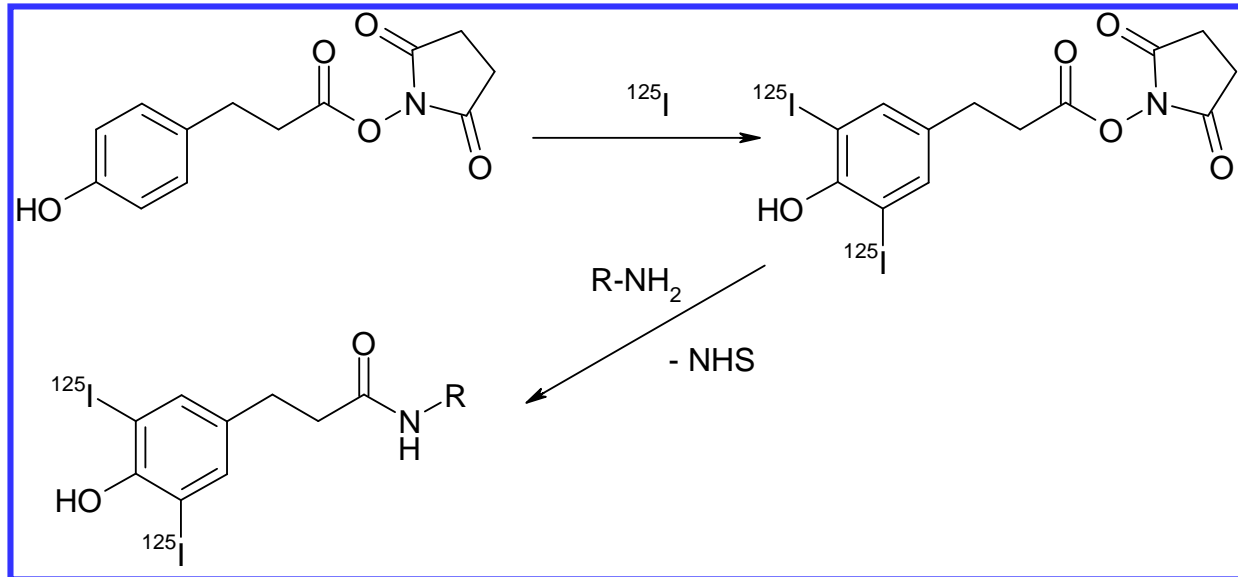


- dostupný i v imobilizované formě na polystyrenových částicích jako tzv. **IDO-BEADS (Pierce)**
  - výhodou je pomalejší reakce a lepší kontrola průběhu a stupně jodace
- IDO-GEN**
  - 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenyglykouril
  - nerozpustný ve vodě, potáhne se jím povrch pracovní nádoby
- laktoperoxidasová jodace**
  - nosič s imobilizovanou glukosa oxidasou (generuje s glukosou peroxid vodíku) a laktoperoxidasou - oxiduje jodid na jod



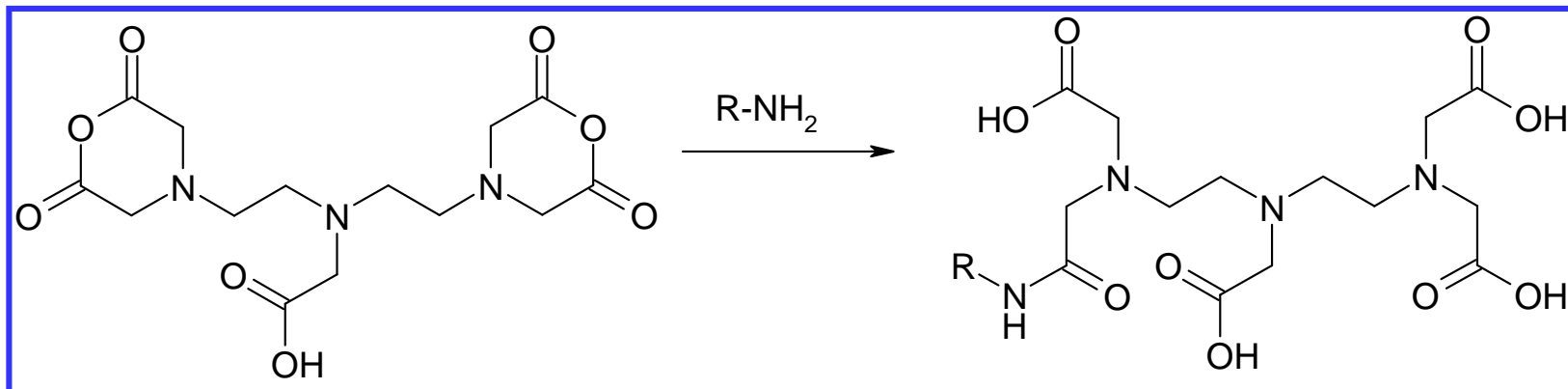
# Bolton-Hunterovo činidlo

- často efektivnější než přímá jodace
- když nejsou k dispozici volné tyrosinové zbytky
- napřed se najduje činidlo, to se pak konjuguje s bílkovinou



# Radioaktivně značené protilátky

- cílené radioterapeutické aplikace
- radionuklidy -  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{114}\text{In}$ ,  $^{115}\text{In}$
- přímé metody
  - jodace, interakce kovů s povrchovými -SH skupinami
- nepřímé
  - zavedení chelátových skupin komplexujících ionty kovů
  - BCA, "bifunctional chelating agents"
  - DTPA, diethylentetraaminpentaoctová kyselina - na bázi dianhydridu pro derivatizaci -NH<sub>2</sub> skupiny



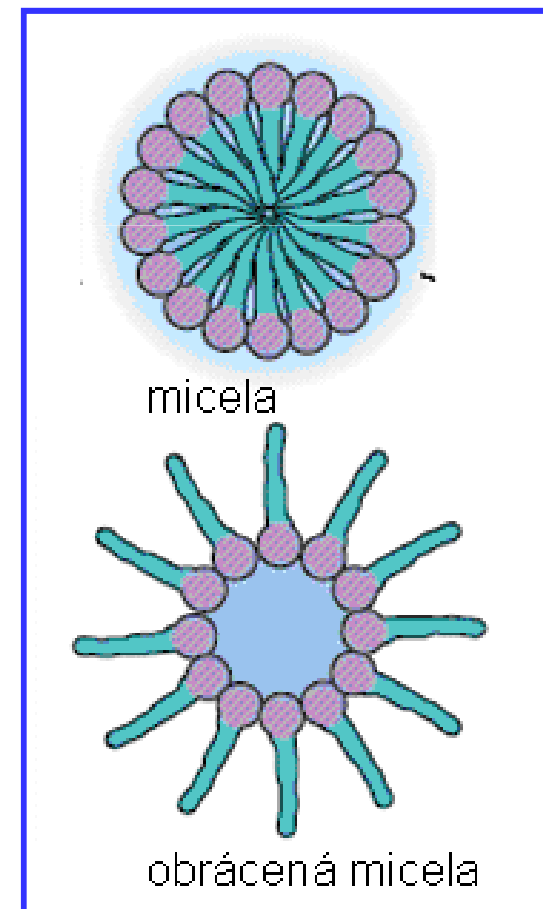
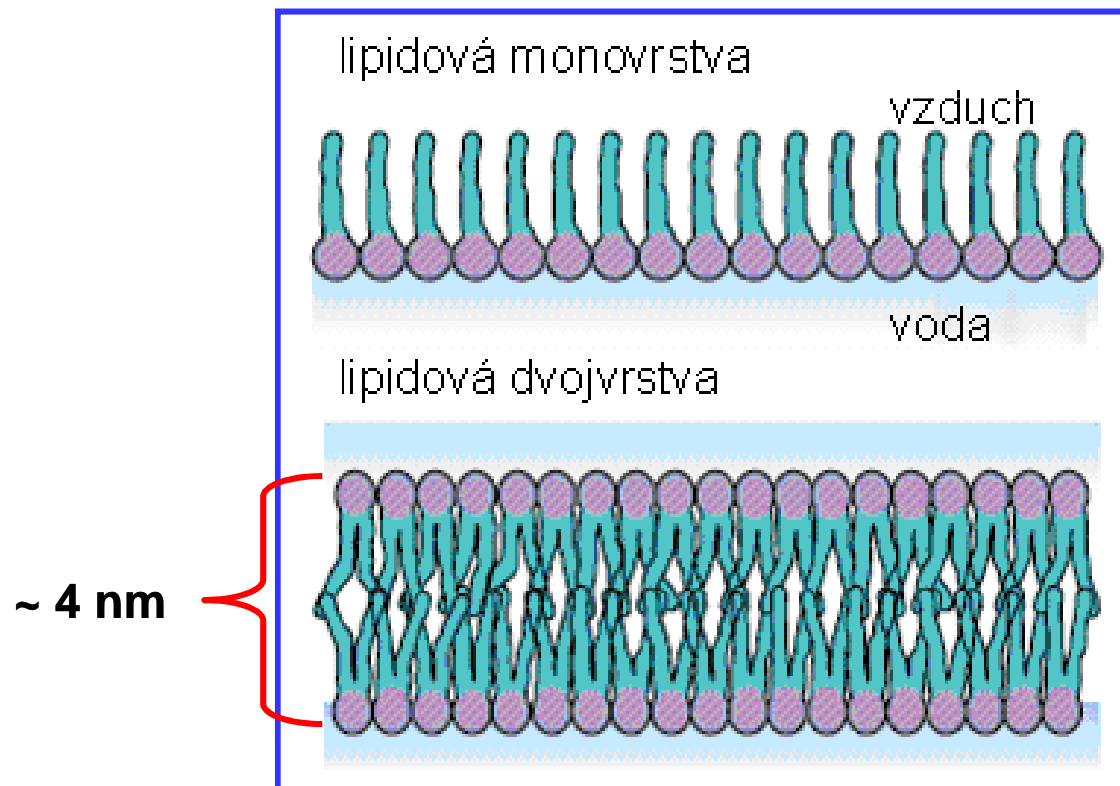
# Liposomy

- **poprvé popsal Bangham v roce 1965**
- **široké uplatnění v bioanalytických aplikacích, jako nosičů terapeutických prostředků nebo vakcín, kosmetický průmysl**
- **spontánně vznikající sférické lipidové struktury sestávající z fosfolipidových dvojvrstev (jedna nebo několik) tvořených amfifilními molekulami -**
  - **mohou být přítomny také např. cholesterol, mastné kyseliny nebo další látky důležité pro funkcionalizaci povrchu liposomů**
- **amfifilní molekuly na rozhraní fází – voda / vzduch - vytváří orientovanou strukturu monovrstvy, kdy polární části molekuly směřují do vodné fáze a nepolární do prostředí vzduchu**
- **mezi jednotlivými dvojvrstvami je uzavřena vodná fáze - může obsahovat hydrofilní látky, do lipidové dvojvrstvy lze vpravit hydrofobní látky**



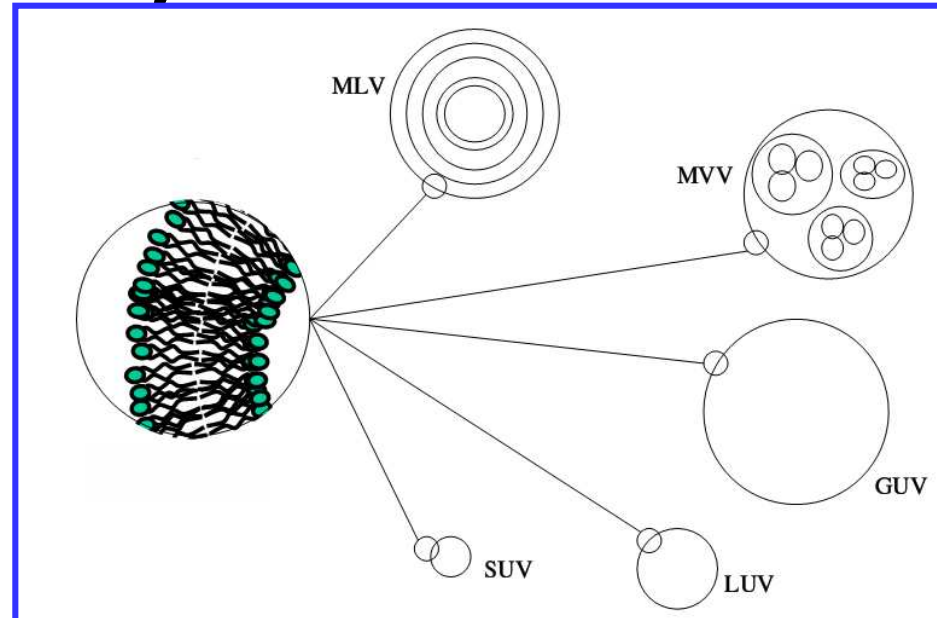
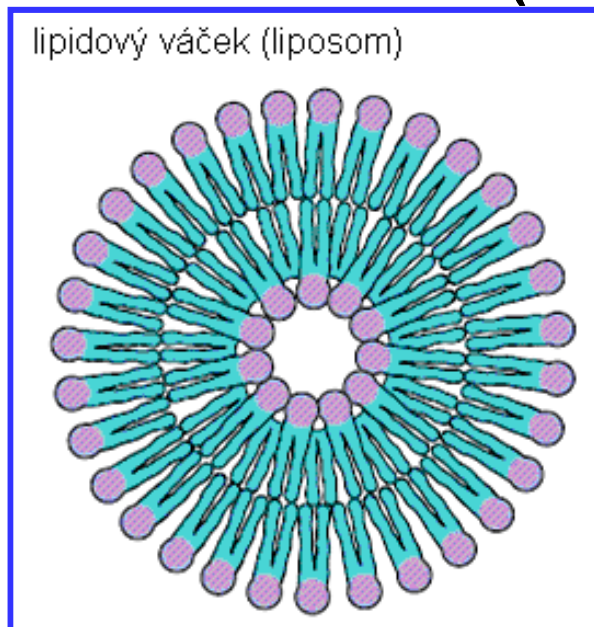
## Vrstvy a micely

- lipidová dvojvrstva sestává ze dvou monovrstev nad sebou orientovaných tak, že nepolární části jsou uvnitř struktury, kde navzájem interagují
  - základem přirozených biomembránových struktur
- sbalením monovrstvy do kulovitého tvaru vzniká micela (ve vodném prostředí) nebo obrácená (invertovaná) micela (v nevodném prostředí)



# Uzavřené struktury

- sbalením dvojvrstvy do sférické struktury vznikají membránové váčky (vesikly) – **liposomy**, které uvnitř obsahují vodnou fázi
- nejjednodušší jsou unilamelární (ULV) v praxi nejvhodnější
  - 20 až 50 nm – SUV, „**small unilamellar vesicles**“, velké zakřivení povrchu
  - od 100 nm až do asi 1  $\mu\text{m}$  LUV, „**large ...**“
  - 1 až 200  $\mu\text{m}$  GUV, „**giant ...**“
- multilamelární (MLV, připravují se nejnádhěji a jsou stabilnější), až 20  $\mu\text{m}$ , uspořádány koncentricky i nekoncentricky
- multivesikulární (MVV) - obsahují uvnitř několik vesiklů



# Příprava liposomů

- **rozpuštění směsi lipidů v org. rozpouštědle (chloroform:methanol, 2:1)**
  - lze použít i rozpouštědla mísitelná s vodou, zejména ethanol; nejsou v něm ale rozpustné všechny lipidy potřebné pro přípravu liposomů
- **rozptýlení ve vodné fázi**
  - po odpaření rozpouštědle ve vodné fázi se dá využít mechanické protřepávání, vysokotlaká emulzifikace, ozvučování, protlačování membránou s póry (extruze) nebo opakované zmrazování / rozmrazování - vznikají různé druhy liposomů
  - přidání detergentů, které proces disperze usnadní dočasným maskováním nepolárních částí (Triton X-100, cholát, oktylglukosid)
  - přidání chaotropních činidel (močovina, guanidin HCl, thiokyanát, nitrát)
- **izolaci žádané frakce z populace liposomů**
- **separace nadbytečných modifikujících látek nezachycených uvnitř liposomů,**
  - gelová filtrace (Sephadex G-50) nebo dialýza
  - pro velikostní frakcionaci liposomů (Sepharosa 2B nebo 4B)
- **uchovávání**
  - ve vodném prostředí obvykle vede k reorganizaci liposomů
  - zmražení poškozuje integritu vnější membrány
  - zmražení v přítomnosti polyolů nahrazujících vodu, např. sorbitol

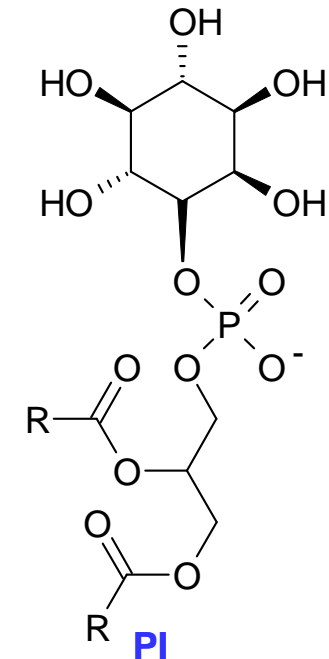
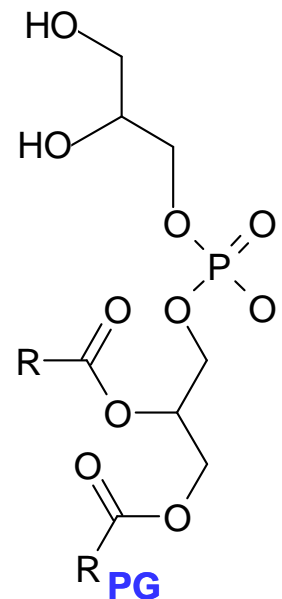
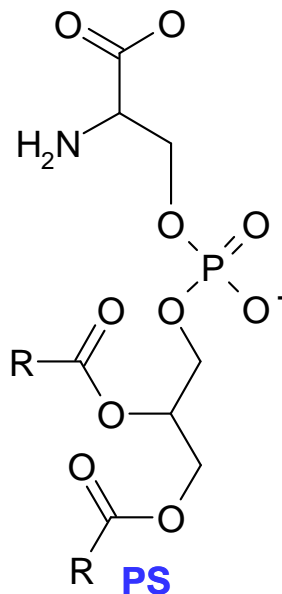
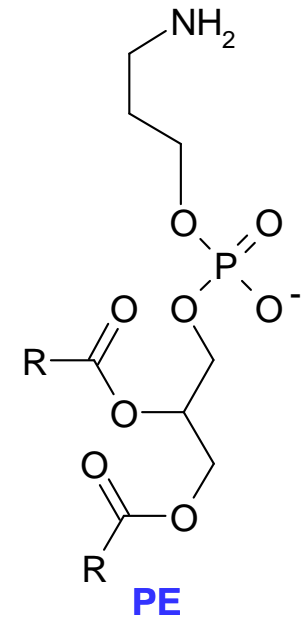
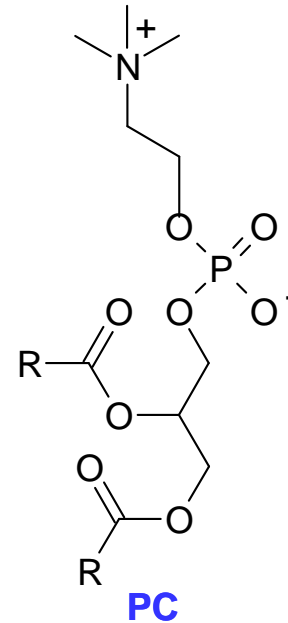
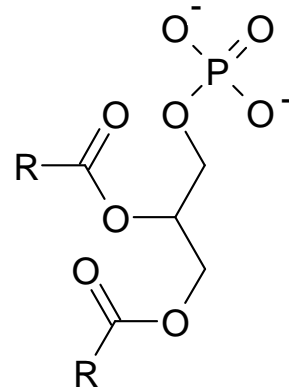
# Lipidy

- složení je variabilní:
  - cholesterol
  - fosfatidylethanolamin (PE)
  - fosfatidylglycerol (PG)
  - fosfatidylcholin (PC lecithin)
  - fosfatidylserin (PS)
  - fosfatidylinositol (PI)
  - roztoky je třeba chránit před oxidací, udržovat ve tmě

- R značí zbytek mastné kyseliny, např.

- kyselina myristová  
 $R = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}^-$
- kyselina palmitová  
 $R = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}^-$
- kyselina stearová  
 $R = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}^-$

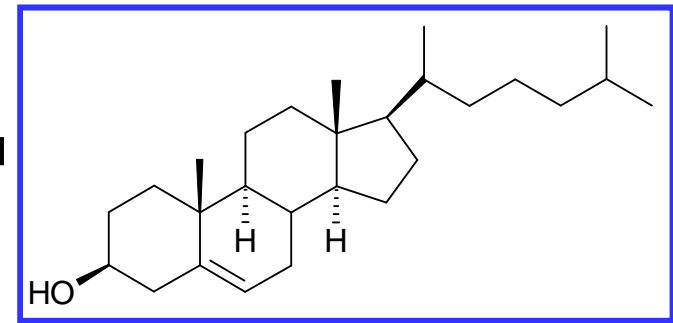
fosfatidová  
kyselina



# Cholesterol

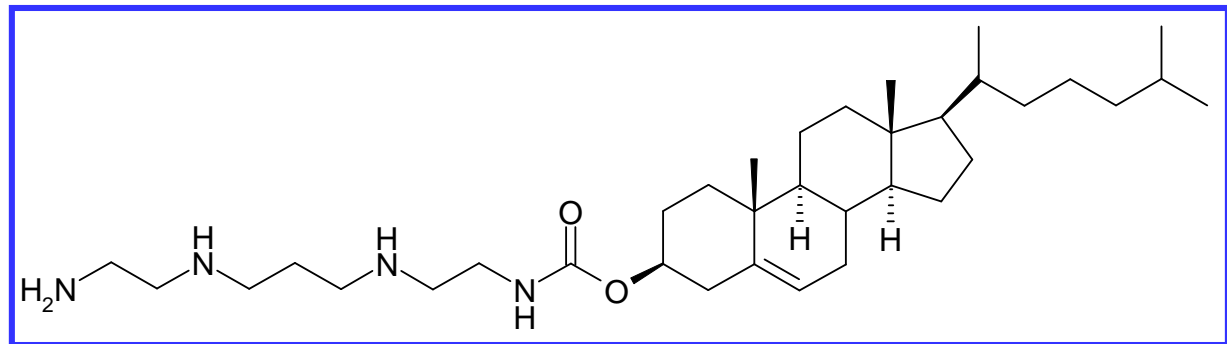
- může tvořit až 50% (mol.) z přítomných lipidů

- je v membráně do značné míry rigidní a nemá volnost ohybu
- jeho vzrůstající podíl snižuje fluiditu membrány liposomů a posouvá fázové přechody k vyšším teplotám



- N<sup>1</sup>-cholesteryloxykarbonyl-3,7-diazanonan-1,9-diamin (C-DAN)

- polyaminový kladně nabitý derivát



- dále je možné do liposomů včlenit i sfingolipidy na bázi sfingosinu, běžné v přirozených membránách, prakticky to omezuje vysoká cena těchto složek

## Náboj liposomů

- **neutrální (PC, PE)**
  - náchylné k agregaci a sedimentaci
- **záporně nabité (PG, k. fosfatidová, PS)**
  - dobře vychytávány buňkami, uvolní obsah při cirkulaci
- **kladně nabité (dimethyldioktadecylamonium bromid, DoDAB, stearylamin, C-DAN)**
  - zejména pro přenos nukleových kyselin (genová terapie)

## Charakterizace vlastností

- **morfologické (velikost, tvar, stabilita, distribuce velikostí - mono/polydisperzní, náboj)**
- **strukturní organizace (permeabilita a fluidita)**
- **funkcionalizace (zachytávací kapacita, stabilita, reaktivita, schopnost fúzování)**
- **techniky**
  - elektronová mikroskopie (SEM, cryo-TEM)
  - rozptyl světla (statický SLS a dynamický DLS)
  - separace (SEC, FFF, CZE)
  - kalorimetrie (DSC) - určení teploty přechodu  $T_m$

# Funkcionalizace liposomu

- interagující makromolekuly

- amfifilní molekuly

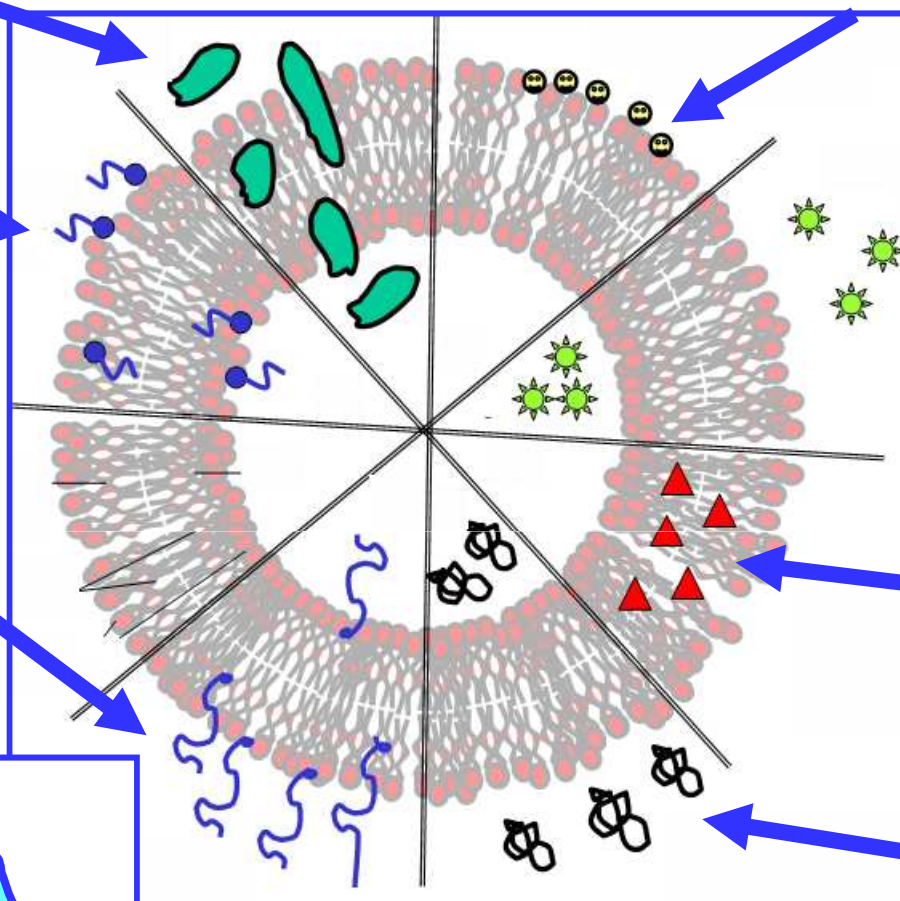
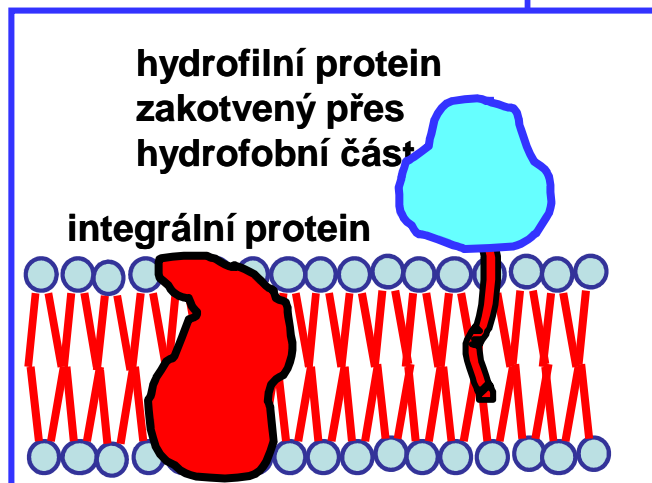
- zakotvené makromolekuly

povrchově zakotvené molekuly

malé ve vodě rozpustné látky

lipofilní látky

ve vodě rozpustné makromolekuly



# (Chemická) modifikace liposomů

- **aktivace liposomů je možná předem**
  - modifikací komponent tvořících membránu
  - biotinylované liposomy
  - přímé zakotvení lipofilních antigenů (kardiolipiny, glykosfingolipidy) nebo biomolekul modifikovaných lipidy
- **nebo až u hotového liposomu**
  - oxidace PG nebo PI v diolové části pomocí jodistanu – vznikne **aldehydová skupina**
  - volné **aminoskupiny** u fosfatidylethanolaminu a fosfatidylserinu, nebo přidání stearylaminu
  - **karboxyskupina** z PS, lze získat začleněním karboxylových kyselin s dostatečně dlouhým alifatickým řetězcem přímo do membrány
  - **hydroxylové skupiny** u fosfatidylglycerolu a fosfatidylinositolu

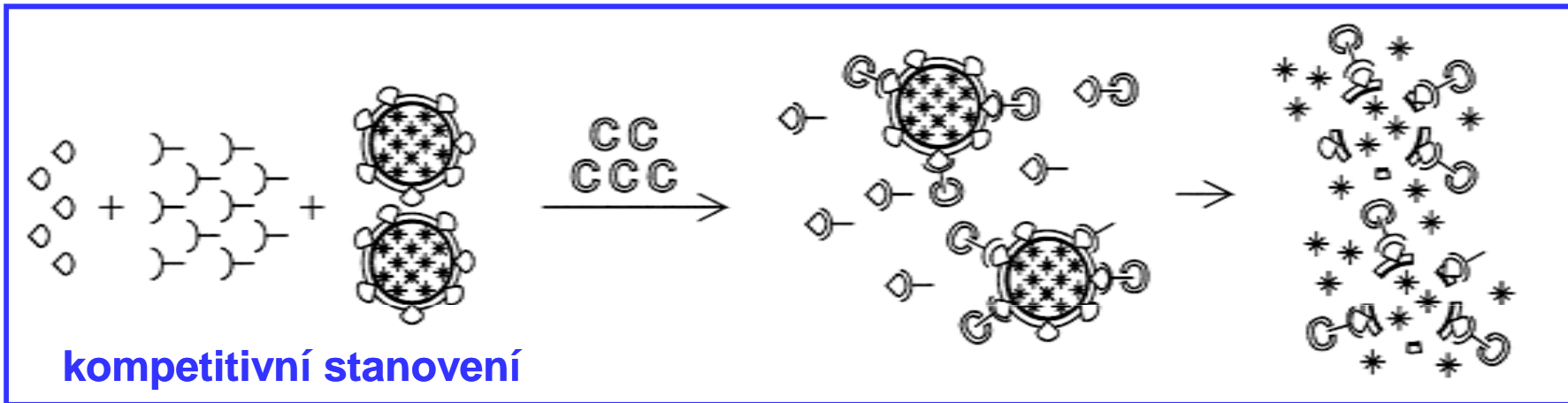


# Náplň liposomů

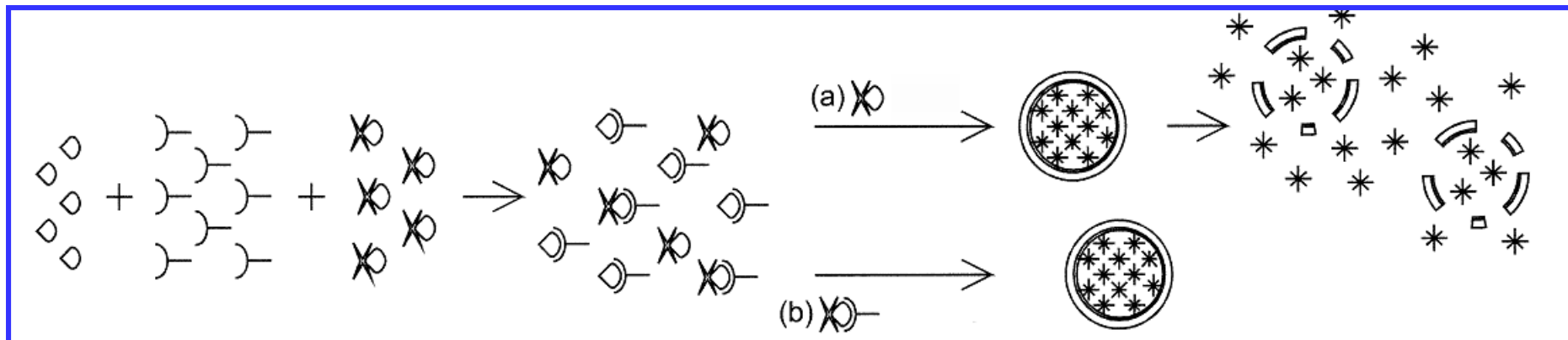
- **při přípravě mohou být dovnitř vpraveny různé látky z okolního vodného prostředí**
  - barviva, fluorofory, enzymy, léčiva, ...
- **liposomy pak fungují jako nosiče velkého množství detekovatelných nebo jinak "užitečných" komponent**
  - mohou být s vysokou citlivostí stanoveny po uvolnění do okolního prostředí rozrušením membrány liposomu detergentem -  
- zesilovací mechanismus
  - postupně se uvolňují v cílovém prostředí po specifické vazbě liposomu na vhodné determinanty na povrchu buněk, tzv. cílené směřování - "homing"

# Homogenní imunostanovení

- použití komplementu (skupina sérových bílkovin, ničících cizí buňky)
  - cizí buňka (resp. liposom) je opsonizována protilátkami, pak se navážou složky komplementu a zlyžují buňku (resp. liposom - přitom se uvolní značka) - CMLIA (complement mediated liposome IA)

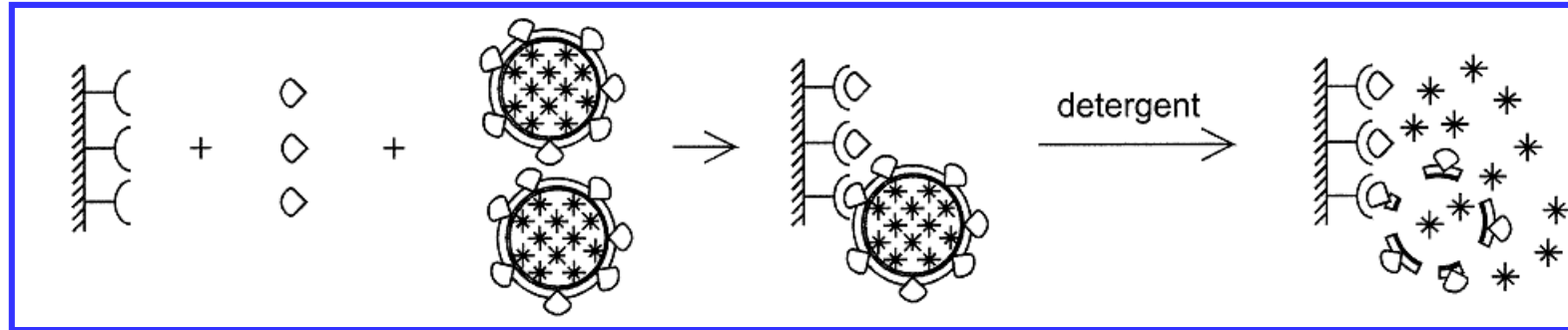


- lyze pomocí mellitinu (cytolysin, 26 AA) - CyMLIA
  - konjugát mellitinu s antigenem, v imunokomplexu mellitin blokován

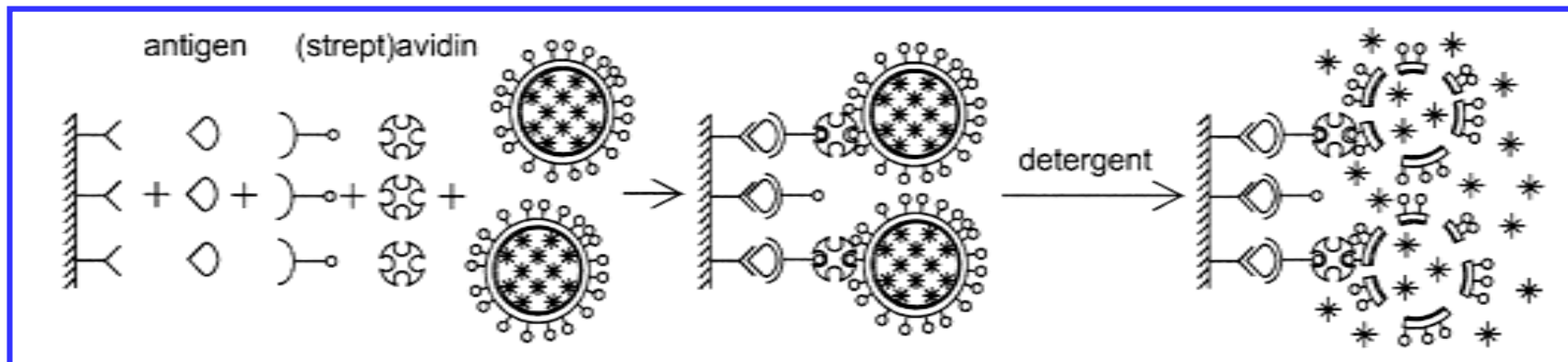


## Heterogenní stanovení

- LISA, liposome immunosorbent assays

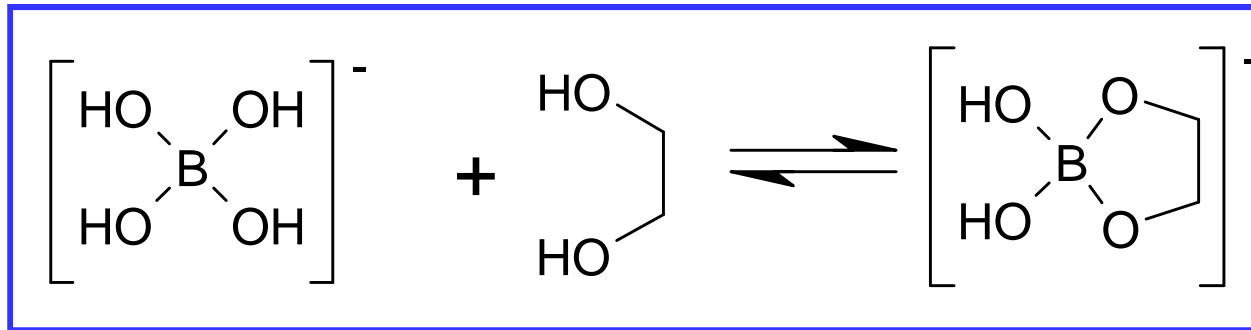


- varianta s využitím biotinu/avidinu - univerzální použití

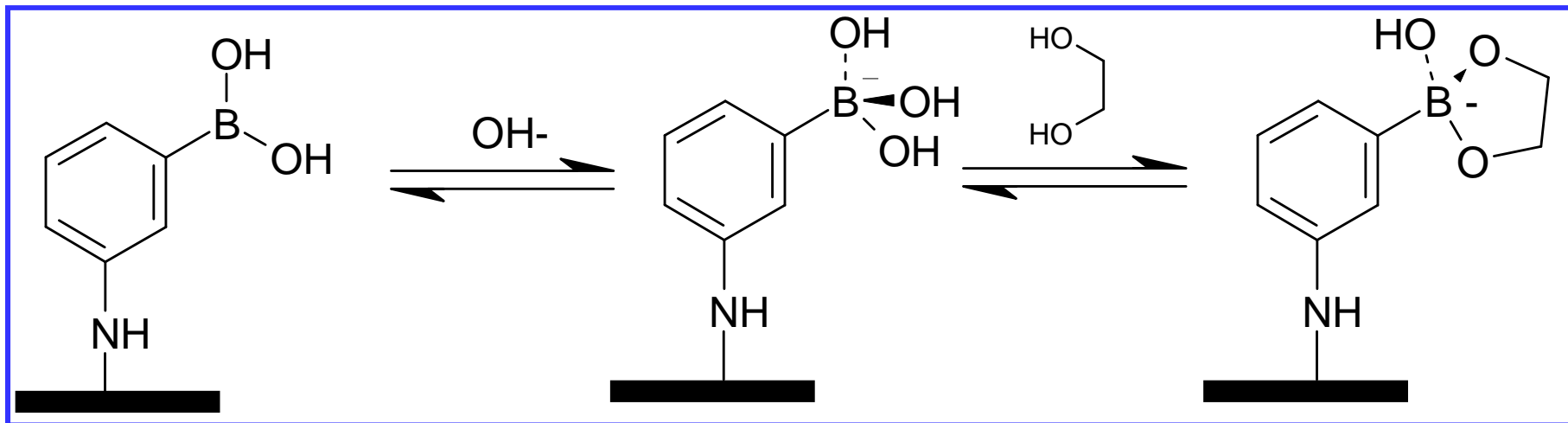


- výhoda: vyšší citlivost oproti klasické ELISA

# Boronátové komplexy



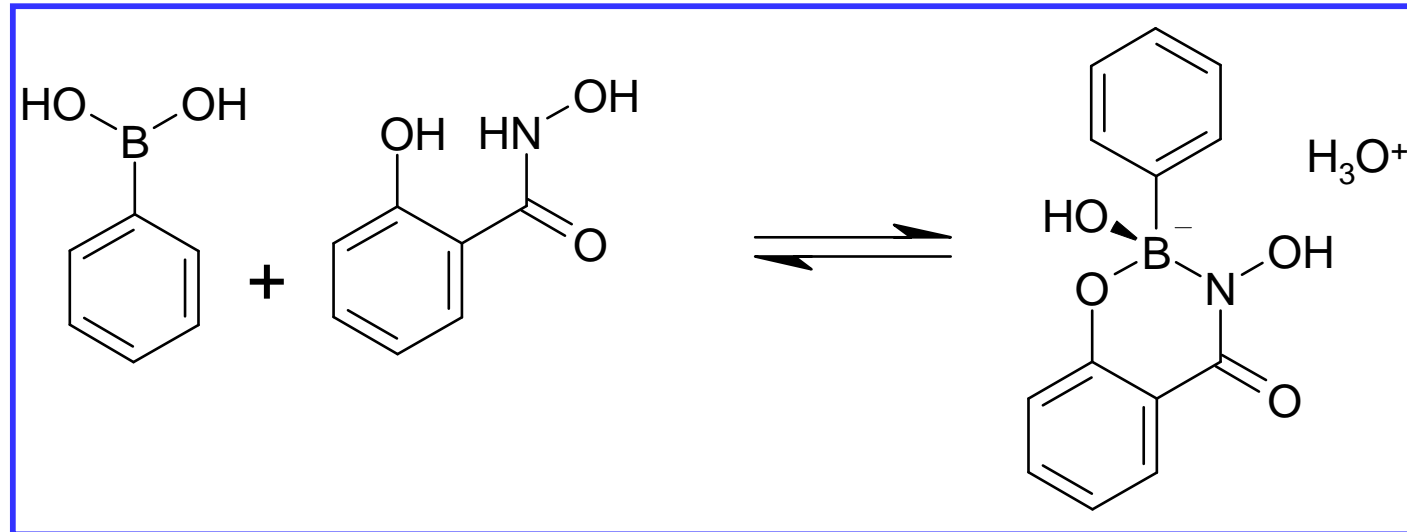
- kyselina boritá je schopna vytvářet komplexy se sloučeninami obsahujícími diolové uskupení – sacharidy, glykoproteiny
- možnost využití pro reversibilní immobilizaci biomolekul pomocí kyseliny *m*-aminofenylborité (APBA):



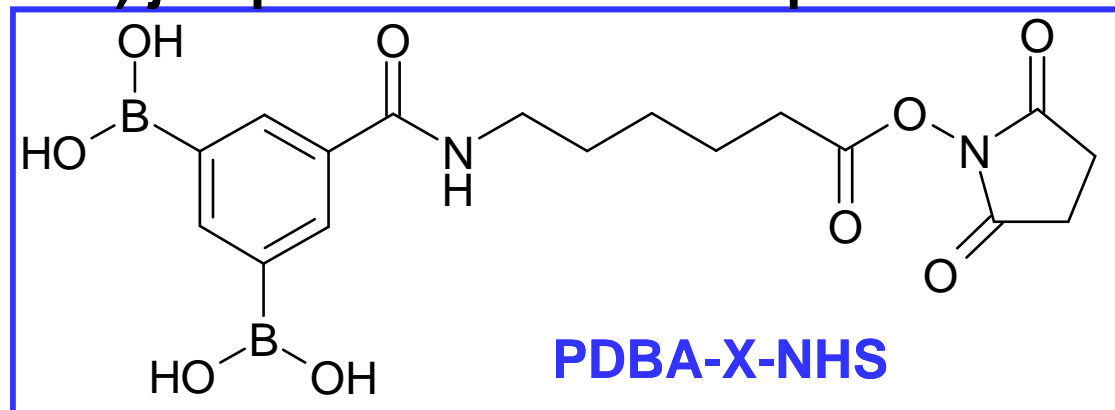
- nejznámější je možnost měření hladiny glykosylovaného hemoglobinu

# Boronátové komplexy (Versalinx)

- velmi silnou komplexaci mezi kyselinou fenyloboritou (**PBA**) a salicylhydroxamovou (**SHA**) využívá firma Prolinx pro generický způsob imobilizace biomolekul či tvorbu biokonjugátů:



- SHA je obvykle kovalentně navázána na jednom partneru a PBA (nebo diboritá varianta **PDBA**) je v preaktivované formě pro modifikaci biomolekul:



# Imunoreagencie

- pro značení se využívá specifická interakce mezi vazebným místem **protilátky** a rozpoznávaným místem (epitopem) **antigenu**
  - protein, lipopolysacharid, nízkomolekulární hapteny – peptidy, pesticidy, toxiny, léčiva, ...
- protilátka – prakticky výhradně **imunoglobulin G (IgG)**
  - 160 kDa, 2 vazebná místa pro antigen, tvar Y, 1 Fc a 2 Fab fragmenty
  - polyklonální (pAb), monoklonální (mAb), rekombinantní (rAb)
- **primární** protilátky – rozpoznávají cílové místo, ale obvykle nejsou nijak dále označeny
  - jsou dostupné tisíce prim. Ab a nebylo by ekonomické od každé připravovat různě značené konjugáty
  - je to ale samozřejmě možné, má význam při dlouhodobém častém používání – zjednoduší se pracovní proces
- **sekundární** protilátky – obvykle značené (konjugát s enzymem nebo fluoroforem)
  - skupinová specifita – rozpoznávají všechny protilátky pocházející z určitého organismu, např. kozí anti myší protilátka rozpozná všechny IgG připravené imunizací myší (nebo vytvořené pomocí DNA pocházející z myši)

## **Sekundární protilátky**

- **rozpoznávající (anti) protilátky původem:**
  - myší, králičí, kozí, krysí, ovčí, koňské, lidské
- **specifita vůči:**
  - celý IgG, IgM, Fc, Fab, IgG<sub>1 2 ...</sub>,
- **konjugované s:**
  - peroxidasa, alkalická fosfatasa
  - fluorescein, rhodamin, Texas red, fykoerithrin
  - biotin, streptavidin

# Proteiny A, G, L

- některé kmeny *Staphylococcus aureus* produkují protein A
  - skupinový ligand, velmi pevně a specificky váže molekuly imunoglobulinů v oblasti Fc fragmentu (až 4 vazná místa)
  - 42 kDa, stabilní při pH 1 až 12, snadno renaturuje
  - $K_A$  až  $10^8$  l/mol, neváže ale všechny podtřídy IgG
- skupiny C a G streptokoků - podobný protein G
  - 23 kDa, nižší afinita k IgG, ale váže širší skupinu IgG
  - má vazebné místo pro albumin (odstraněno v rekombinantní formě)
  - produkují i podobné protein H (IgG Fc), protein B (IgA), Arp (IgG a IgA)
- *Peptostreptococcus magnus* - protein L
  - 35.8 kDa, 4 vazná místa
  - váže některé  $\kappa$  (ne však  $\lambda$ ) řetězce L protilátek, i Fab a scFv fragmenty
- rekombinantní hybridní varianty (L/G, L/A, ...)



# Použití proteinů A G L

- **orientovaná imobilizace protilátek**
  - na povrchu sensorů nebo afinitních nosičů
  - vzniklý komplex lze zpevnit prokřížením pomocí dimethylpimelimidátu
- **purifikace protilátek**
  - po imobilizaci na vhodnou (agarosovou) matici - Protein A Sepharose
- **obecně použitelné jako detekční činidlo pro imunokomplexy**
  - Protein A značený peroxidasou nebo vhodným fluoroforem
  - zviditelnění přítomnosti protilátek

# Porovnání specifity

Antibody	Protein A	Protein G	Protein L (*)
Bovine	++	++++	-
Cat	+	-	?
Chicken	-	+/-	-
Dog	+++	+	?
Goat	-	+++	-
Guinea pig	++++	++	?
Horse	++	++++	?
Human IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>4</sub>	++++	++++	++++
Human IgG <sub>3</sub>	-	++++	++++
Human IgM, IgA, IgE	+/-	-	++++
Human IgD	-	-	++++
Mouse IgG <sub>1</sub>	+	++++	++++
Mouse (others)	++	++	++++
Pig	+++	+++	++++
Rabbit	++++	+++	++
Rat	+/-	++	++++
Sheep	+/-	++	-
	* pouze pokud má kapa řetězec		

# Lektiny

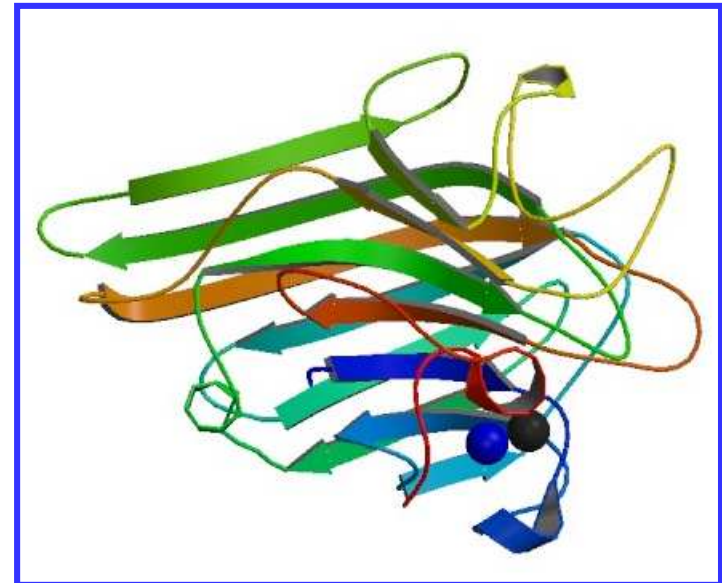
- **buněčné proteoglykany, glykoproteiny a glykolipidy mohou obsahovat širokou škálu oligosacharidových zbytků**
  - vyskytují se obvykle na povrchu buněk jako složky zakotvené do buněčné membrány
  - pro různé buňky mohou být specifické různé sacharidové sekvence
  - např. nádorové buňky mohou změnit své povrchové oligosacharidy
- **lektiny - proteiny schopné rozpoznávat a vázat specifické konfigurace sacharidových molekul**
  - aglutinace buněk (aglutininy)
  - precipitace komplexních oligosacharidů
- **fluorescenčně značené lektiny se uplatňují při:**
  - detekce povrchových buněčných struktur a intracelulárních glykoproteinů v mikroskopii
  - detekční postupy v histochemii a cytometrii
  - lokalizace glykoproteinů na gelech a v blotech
  - precipitace glykoproteinů
  - aglutinace specifických buněk

## Concanavalin A

- z bobu *Canavalia ensiformis* (*Fabaceae*, "jack bean", "pig bean")
- první známý lektin, 237 aa, Mr 26,5 kDa, dvě místa pro ionty kovu ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ )
- vytváří dimery a z nich pak tetramer
  - 4 dostatečně vzdálená vazebná místa
  - výhodné pro tvorbu agregátů, (např. z erythrocytů)
- má afinitu ke glukose a k manose
  - nejlépe váže methyl-3,6-di-O-(-D-manopyranosyl)- $\alpha$ -D-manopyranosid



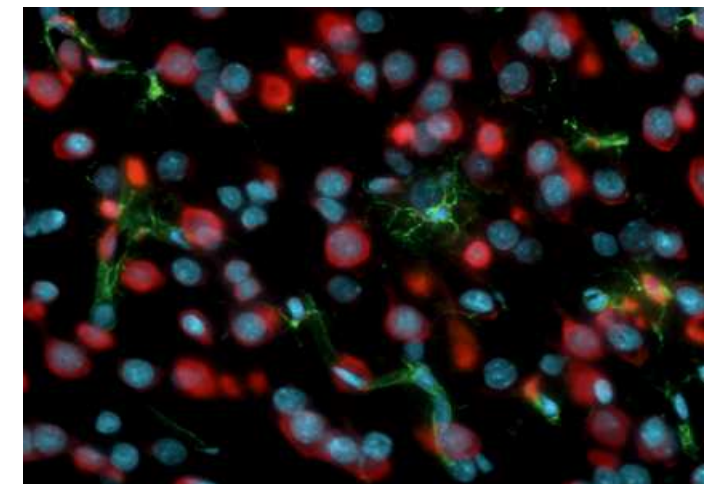
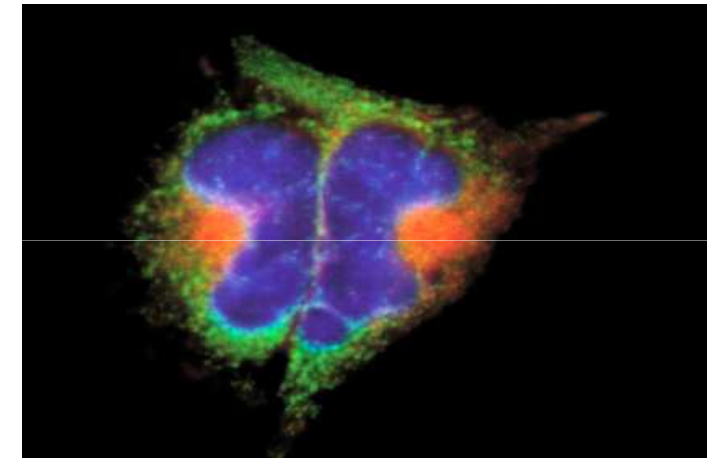
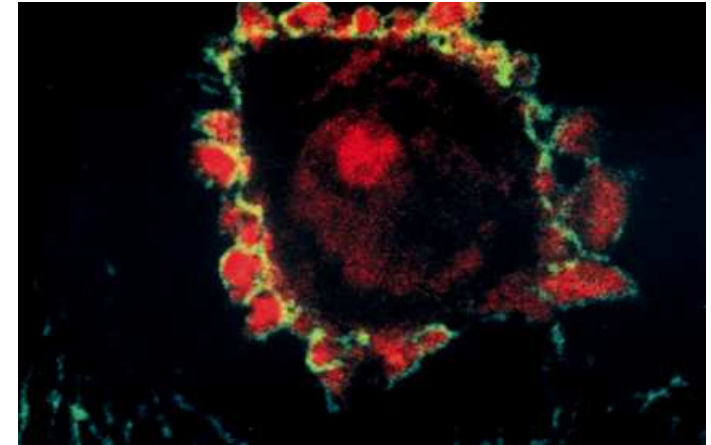
- podjednotka Con A



<b>Lektiny</b>	<b>Izolován z</b>	<b>Vlastnosti</b>	<b>Vazebná specifita</b>
<b>Con A</b>	brazilské boby, <i>Canavalia ensiformis</i>	4-mer, 104 kDa ionty Ca <sup>2+</sup> a Mn <sup>2+</sup>	α-Glc, α-Man
<b>WGA</b>	obilní klíčky, <i>Triticum vulgaris</i>	dimer, 36 kDa	(GlcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc
<b>GS- .. IA4, IA3B, IA2B2, IAB3, IB4</b>	africké boby, <i>Griffonia simplicifolia</i>	isolektiny, 4- mery, 114 kDa	A: term. α-GalNAc, B: term. α-Gal
<b>GS-II</b>	- " -	4-mer 113 kDa	term. nereduk. GlcNAc
<b>PHA-L</b>	fazol, <i>Phaseolus vulgaris</i>	4-mer, 126 kDa	GlcNAc(1-2)Man
<b>PNA</b>	arašídý <i>Arachis hypoglea</i>	4-mer, 110 kDa	term. β-Gal
<b>HPA</b>	hlemýždi, <i>Helix pomatia</i>	6-mer, 70 kDa, váže A-erythrocyt	GalNAc
<b>SBA</b>	soja, <i>Glycine max</i>	4-mer, 120 kDa, isolektiny	term. GalNAc a Gal
<b>ABA</b>	žampion, <i>Agaricus bisporus</i>	Monomer, 59 kDa	β-Gal(1-3)GalNAc
<b>PSA</b>	hrách, <i>Pisum sativum</i>	49 kDa, 4-mer	α-Man
<b>RCA</b>	Castor bean, <i>Ricinus comunis</i>	120 kDa, 4-mer	β-Gal
<b>B-podjednotka z choleratoxinu</b>	<i>Vibrio cholerae</i>		Gal, gangliosid G

# Fluorescenční značení pomocí lektinů

- 
- 
- 

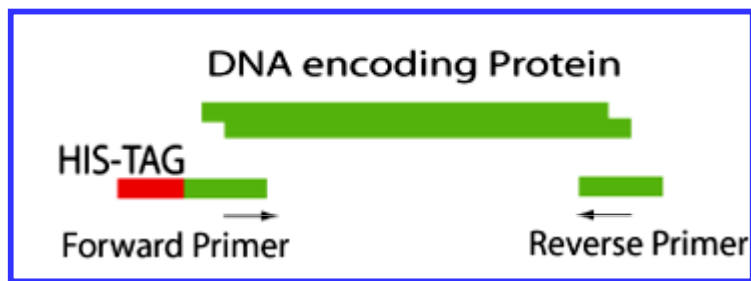


# His-tag

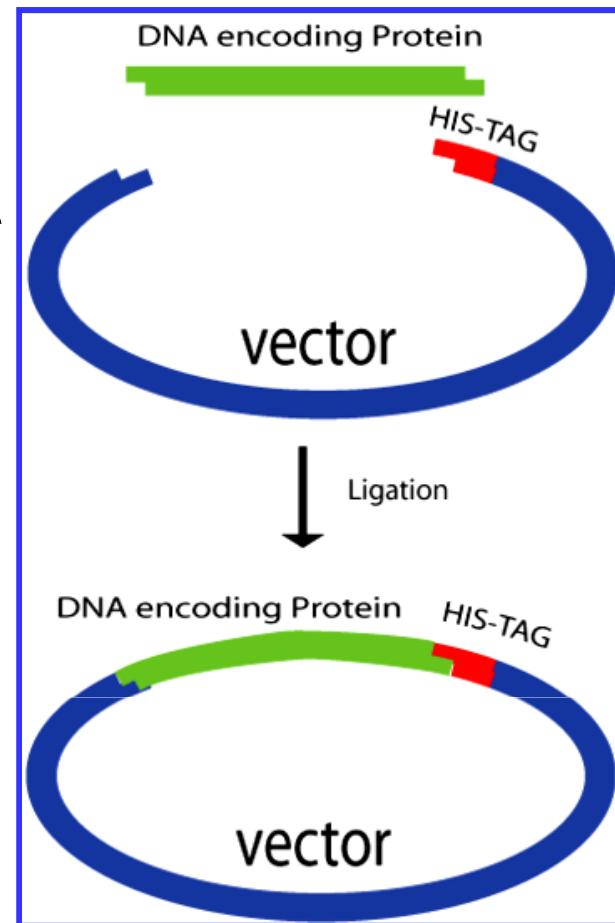
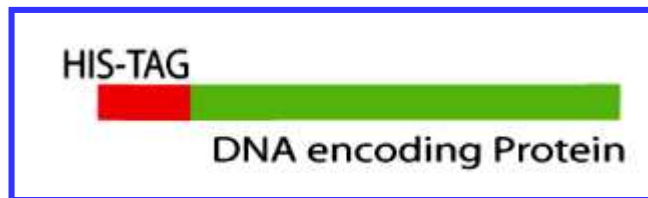
- purifikace geneticky modifikovaných rekombinantních proteinů exprimovaných v *E. coli* nebo jiných mikroorganismech
- jinak "polyhistidine-tag" nebo "hexahistidine-tag" je úsek histidinových zbytků na N- nebo C-konci
  - volí se ten méně důležitý nebo dostupnější
- slouží k rychlé izolaci pomocí metaloafinitní chromatografie s Ni<sup>2+</sup> nebo Co<sup>2+</sup> ionty
  - eluce snížením pH (protonace His) nebo komplexotvorným činidlem (imidazol, EDTA)
  - další formáty - magn. nosiče, jednoúčelové kolony, ...
- po purifikaci se tento koncový úsek odstraní
  - pomocí exopeptidasy z N-konce
  - na základě další krátké cílové sekvence endoproteinasy
- vhodné i pro denaturované proteiny (důležitá je sekvence)
- vadí peptidylprolylisomerasa (25 kDa, SlyD) - lépe použít SlyD-deficientní *E. coli*
- vynalezeno u Roche (licence, akademická zdarma), vhodné vektory distribuje Qiagen

# Vnesení His-tagu

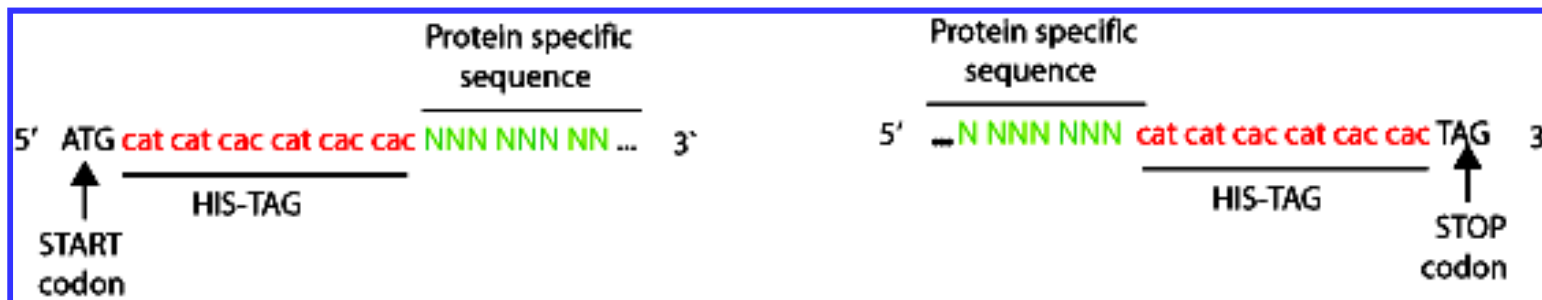
- vnesení DNA úseku kodujícího cílový protein do vektoru, kde je His-tag sekvenční přítomna na C-konci
- použití primeru s His-tag sekvencí ke spojení s cílovou DNA v průběhu PCR



PCR



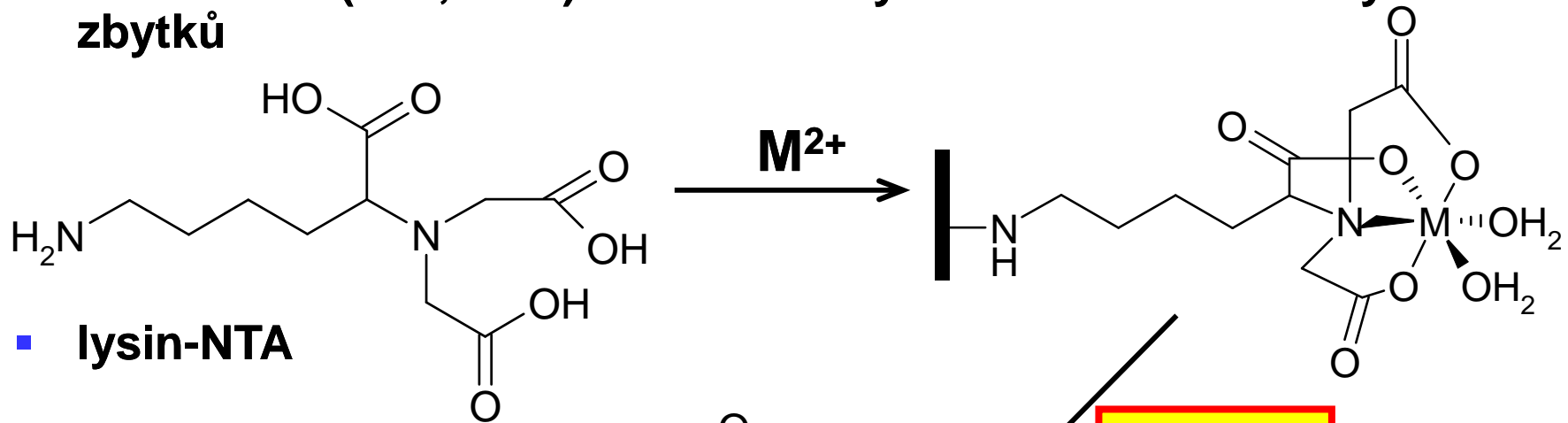
- primery s repetitivními His sekvencemi (CAC nebo CAT)





# Metaloafinitní interakce

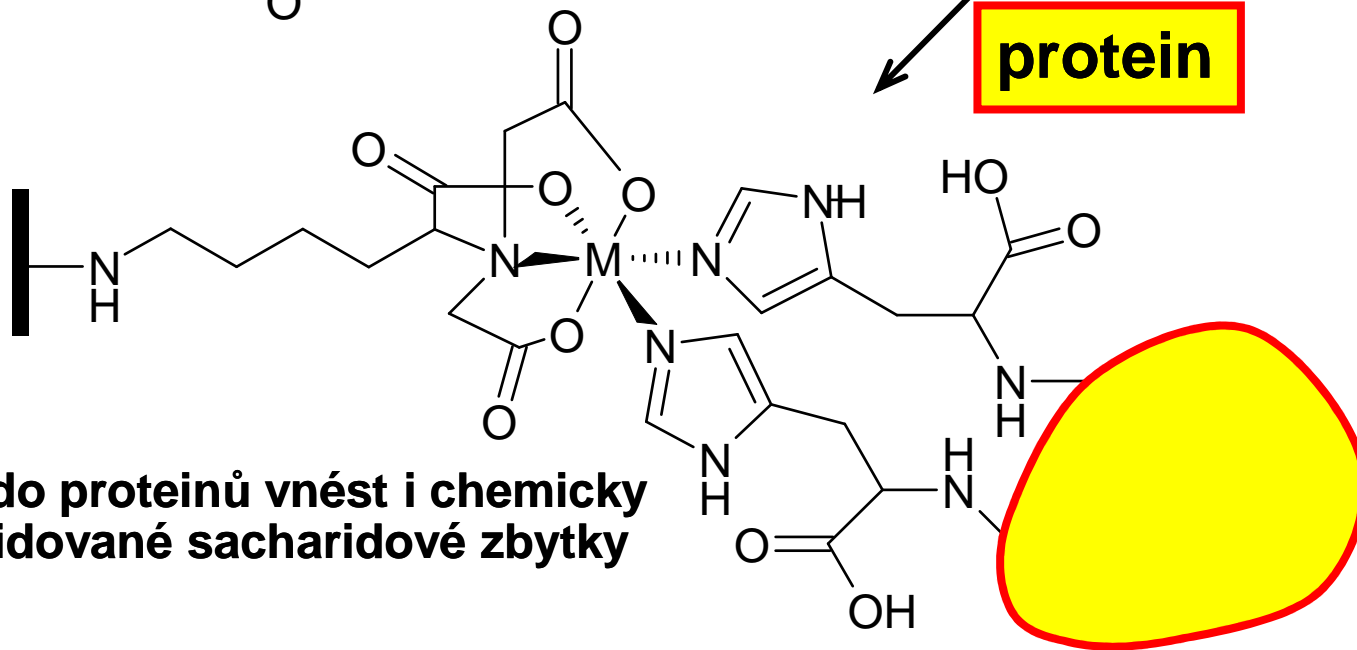
- komplexotvorná reakce nitrilotrioctové kyseliny (NTA) s vhodným iontem kovu ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) a imidazolovým kruhem histidinových zbytků



- lysine-NTA

protein

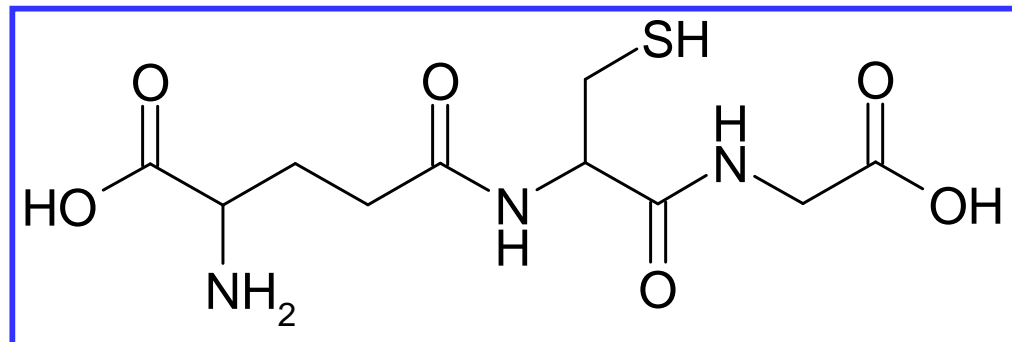
- His lze do proteinů vnést i chemicky přes oxidované sacharidové zbytky



# GST-tag

- glutathion-S-transferasa (26 kDa) - má silnou afinitu k nosičům s imobilizovaným glutathionem
- GST reprezentuje skupinu multifunkčních cytosolických proteinů u eukaryot
- nevyskytují se u prokaryot - není tedy žádná kompetice s glutathionovou maticí
- připraví se fúzí konjugát cílového proteinů s GST
  - exprese se provede v bakteriích
  - GST část může zlepšit rozpustnost eukaryotických bílkovin v prokaryotickém prostředí
  - purifikace na glutathionové matici
  - odstranění GST části štěpením proteasou

glutathion,  
γ-Glu-Cys-GLy

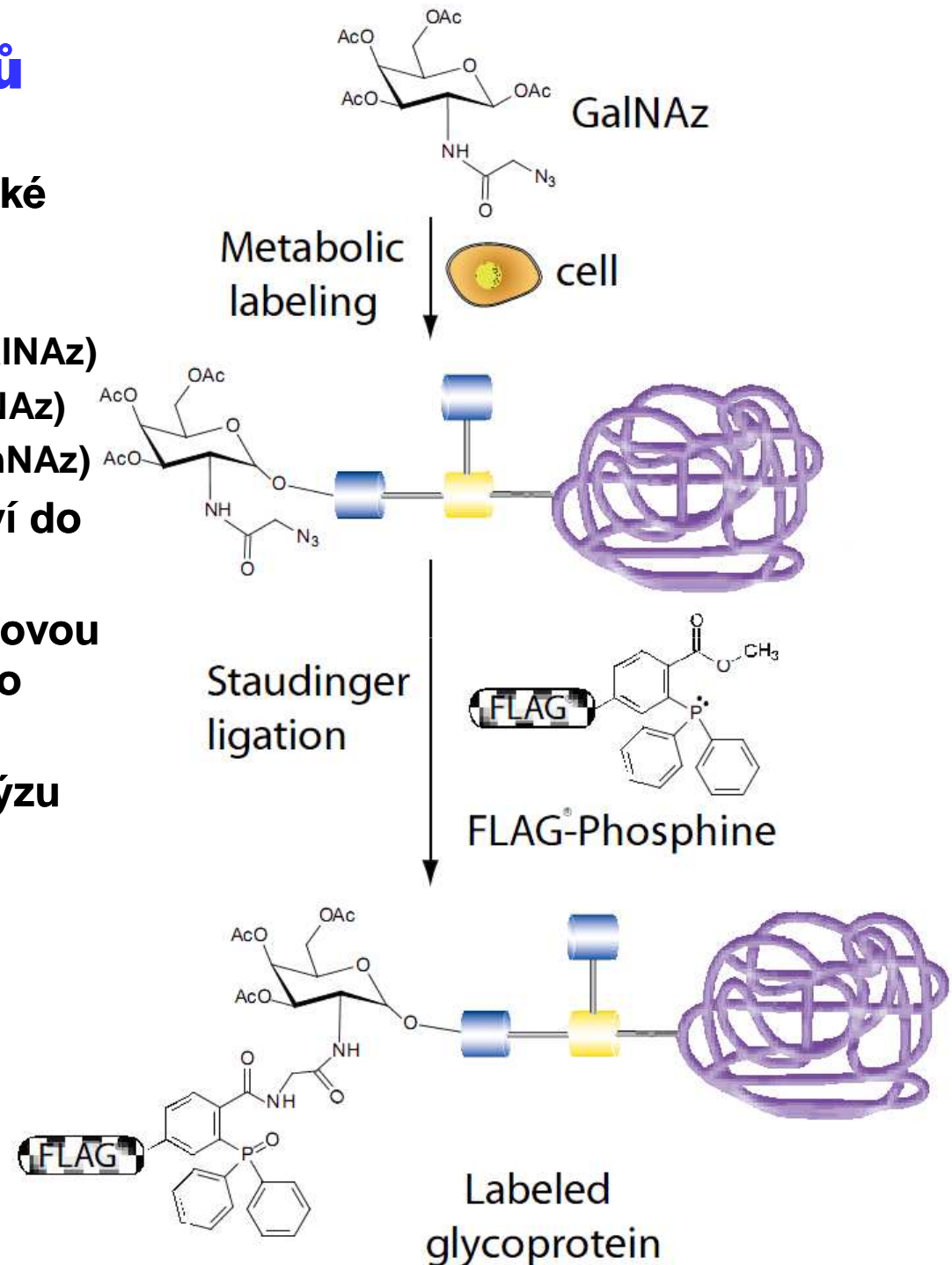


## Další "tagy"

- tyto cizorodé sekvence se vkládají pomocí rekombinantních technik do cílových genů
- kódují krátké peptidy, které vytváří antigenní determinanty (epitopy), které rozpoznávají specifické protilátky
- výsledkem je "označení" exprimovaného proteinu daným úsekem ("tagged protein")
- běžně komerčně dostupné protilátky proti tag sekvencím zjednodušují identifikaci, imunoprecipitaci nebo imunoafinitní purifikaci označených bílkovin
- tyto fúzní proteiny se vzhledem ke krátké značce neliší od nativních bílkovin co se týká bioaktivity nebo biodistribuce
- příklady "tagů":
  - HIS HHHHHH
  - c-MYC EQKLISEEDL
  - HA YPYDVPDYA
  - VSVG YTDIEMNRLGK
  - HSV QPELAPEDPED
  - V5 GKPIP NPLLGLDST
  - FLAG DYKDDDDK

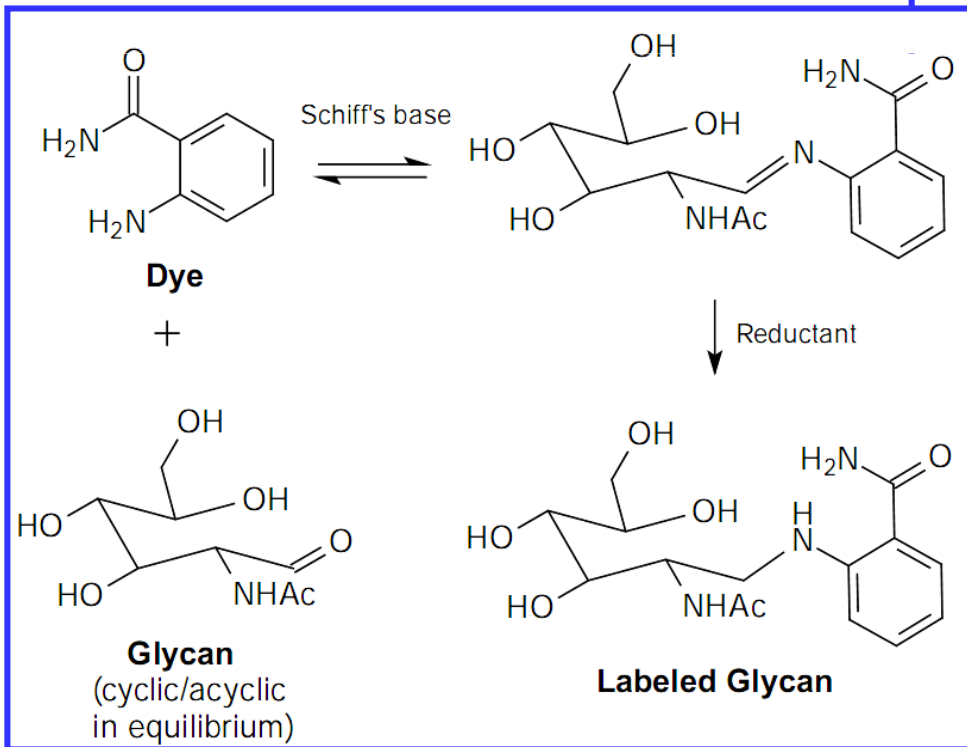
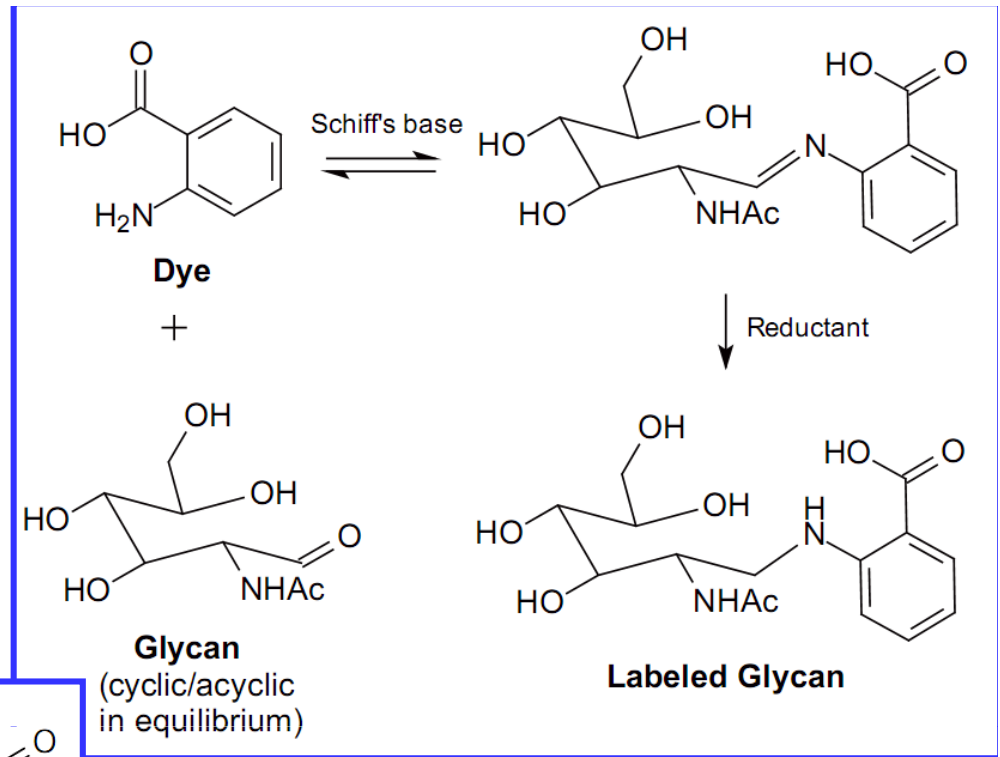
# Značení glykoproteinů

- mapování glykomu – metabolické značení pomocí acetylovaných derivátů:
  - N-azidoacetylgalaktosamin (GalNAz)
  - N-azidoacetylglukosamin (GlcNAz)
  - N-azidoacetylmanosamim (ManNAz)
- v metabolismu buňky se vestaví do glykoproteinů
- chemicky se označí Staudingerovou ligací pomocí FLAG-fosfinového derivátu
- vhodné pro proteomickou analýzu postranslačních modifikací
- FLAG se „zviditelní“ pomocí značené anti FLAG protilátky



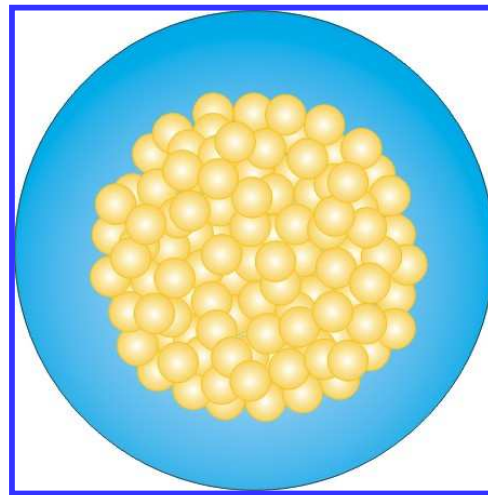
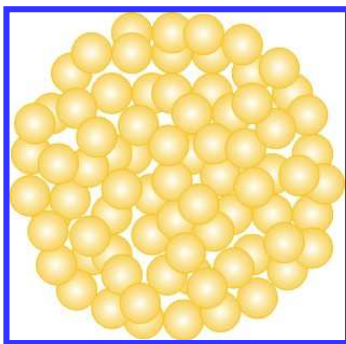
# Značení red. konce

- **anthranilová kyselina (2AA) nebo 2-aminobenzamid (2AB)**  
– fluorescenční značky
- **redukční aminace**
  - **Schiffova báze stabilizovaná redukcí NaBH<sub>4</sub>**



# Nanočástice

- **techniky značení biomolekul pomocí různých částic se používají již několik desetiletí, „immunogold“**
  - částice zlata potažené protilátkou se zmiňují už kolem roku 1970
  - rutinně se používají např. v elektronové mikroskopii
- **značná popularita se zvedla v posledních letech se všeobecným trendem nanotechnologií, kam řada tradičních značek „rozměrově“ samozřejmě zapadá**

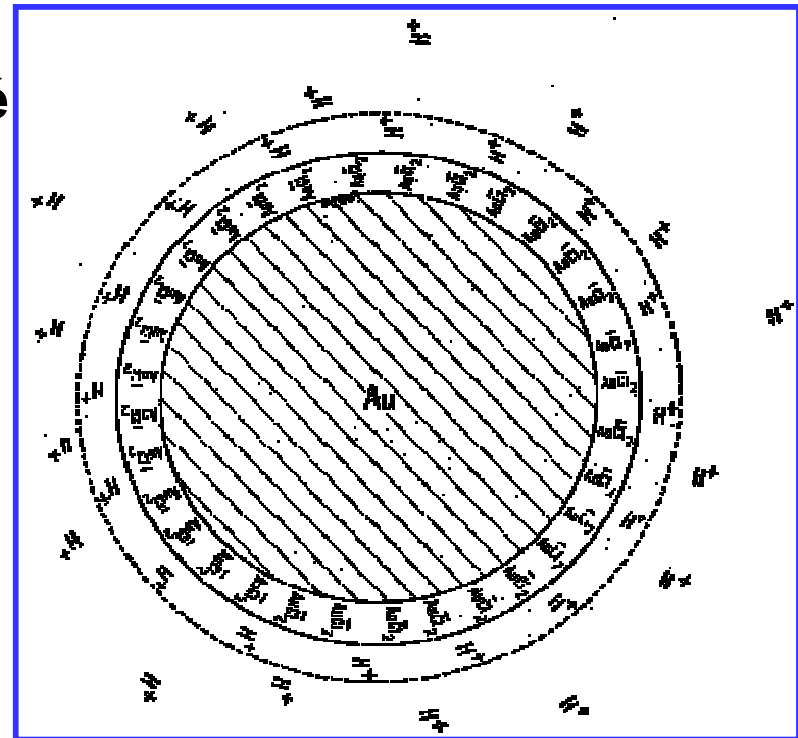


# Koloidní zlato

- **stabilní suspenze dispergovaných částic kovu vel. 5 až asi 150 nm**
  - v roztoku se jeví jako intenzívně zbarvené (červeně, dle velikosti částic – při koagulaci – zvětšování velikosti – se barva posouvá do modra)
  - **Casiův purpur** - již od středověku k barvení skla či hedvábí
- **příprava konjugátů s proteiny - řada způsobů podle toho**
  - který typ interakce bude zodpovědný za vazbu proteinu na povrch částice; ta nese obvykle záporný náboj
  - mohou se uplatnit i hydrofobní vazby
  - velmi často se používá pevné adsorbce thiosloučenin na zlato (SAM, „self assembled monolayers“)
  - v roztoku se záporně nabitě částice odpuzují, ale existují mezi nimi a jinými molekulami i přitažlivé síly, v závislosti na iontové síle prostředí
- **adsorbované bílkoviny stabilizují sol zlata a brání koagulaci, kterou lze jinak vyvolat např. přidavkem NaCl**
  - vazba bílkovin by měla probíhat v blízkosti jejich izoelektrického bodu, ale proces samozřejmě ovlivní i další faktory
  - sledovat se adsorbce dá při 580 nm.

## Příprava

- prakticky je výhodné používat monodisperzní částice
- redukce kyseliny chlorozlatité  $\text{HAuCl}_4$  pomocí různých činidel
- obecně větší „redukční síla“ poskytuje menší částice
  - redukce citrátem sodným poskytuje částice 15 až 150 nm velké dle použitých koncentračních poměrů
  - střední částice 6 až 15 nm se získají nejlépe pomocí askorbátu sodného
  - nejmenší lze připravit redukcí bílým fosforem (pod 5 nm)
  - nebo pomocí borohydridu sodného (2 nm)
- struktura koloidní částice - Au obalené záporně nabitými  $[\text{AuCl}_2]^-$ 
  - neshlukují se, přitahují kationty



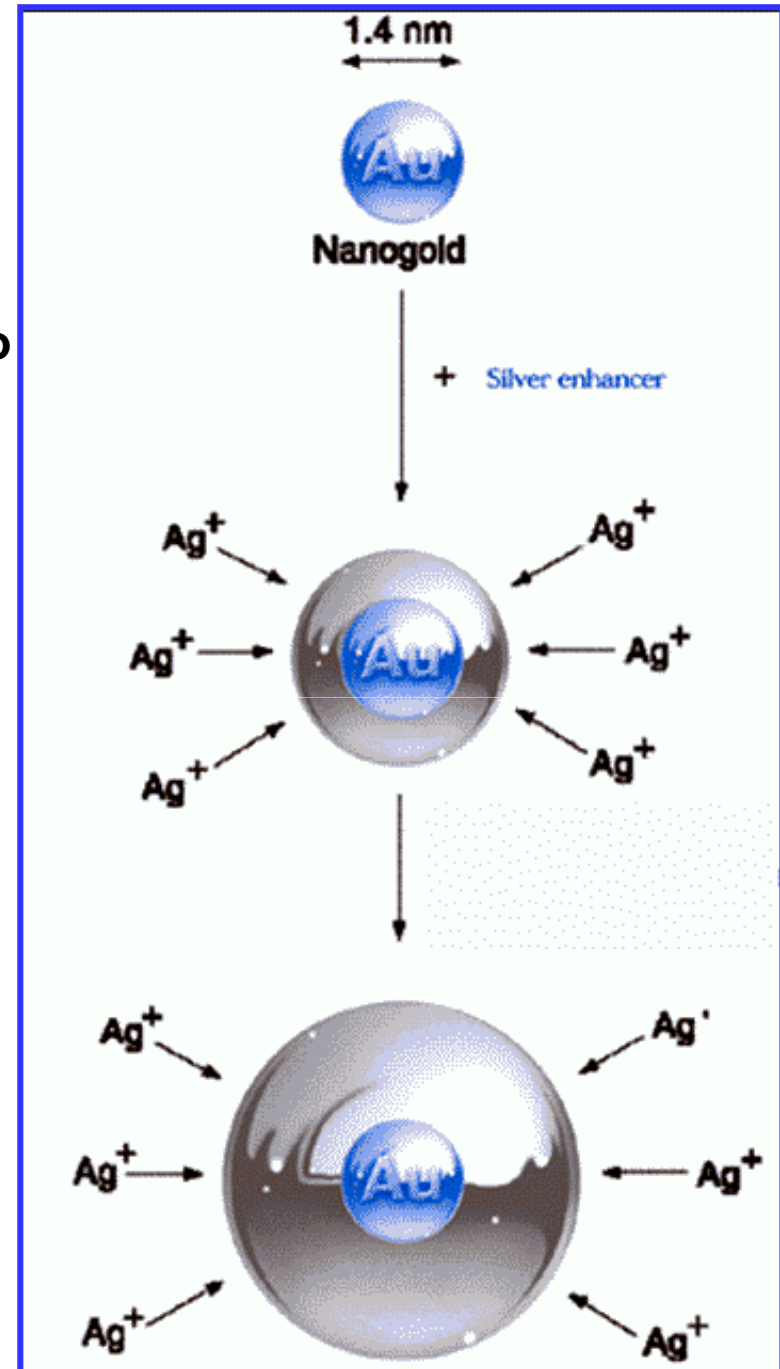


# Adsorbce bílkovin

- inkubace s proteinem, zcentrifugování částic, rozsuspendují
- částice s proteinem A (G, L) - univerzální zviditelnění imunokomplexů
  - adsorbce při pH 6,9 v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG 20 kDa, 0,025%) jako stabilizačního činidla
  - produkt se uchovává v 10 mM fosfátovém pufru pH 7,4 s 1% PEG
- adsorbce protilátek - pH 8 až 9, PEG lze nahradit albuminem (0,25%)
- další často používané kombinace
  - lektiny - detekce sacharidových struktur na povrchu buněk
  - avidin / streptavidin - široké univerzální použití.
- rychlé vizuálně vyhodnocované imunotesty
  - červená barva snadno a citlivě detekovatelná
  - výhodou je stabilita nanočástic - nepodléhají degradaci na rozdíl od biomolekul
  - nulová toxicita

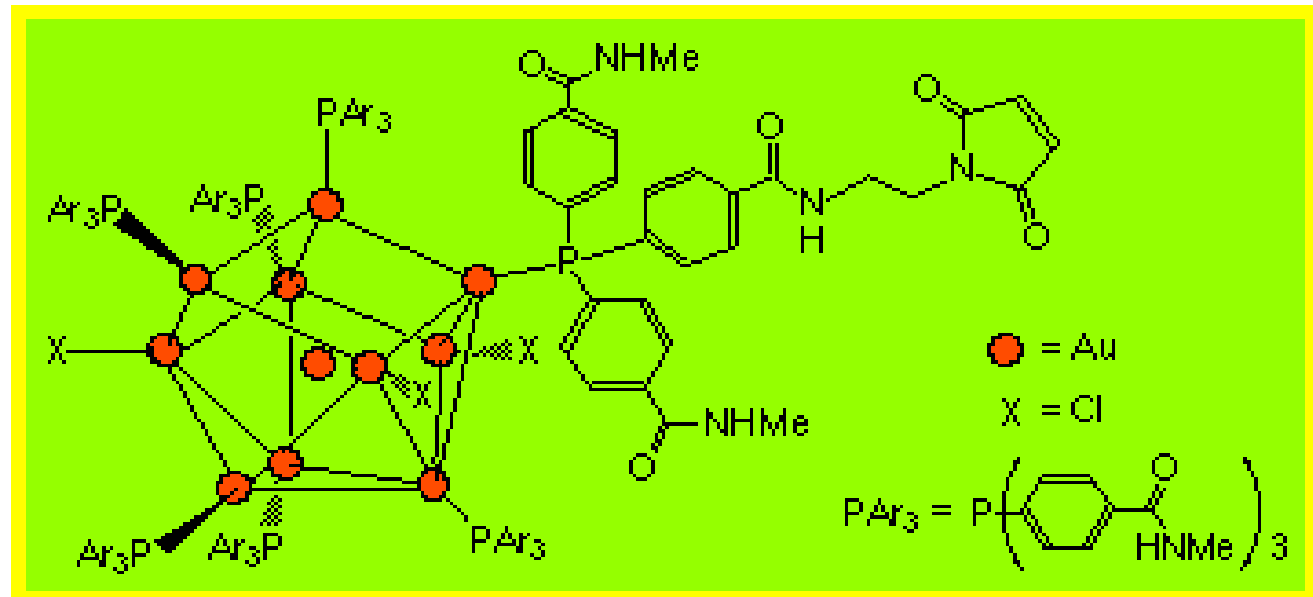
# Depozice stříbra

- zlepšení citlivosti detekce
  - zvětšením velikosti nanočástic v průběhu stanovení
  - specificky zachycené částice fungují jako nukleační místa pro růst krystalů v přítomnosti  $\text{Ag}^+$  solí nebo  $\text{HAuCl}_4$

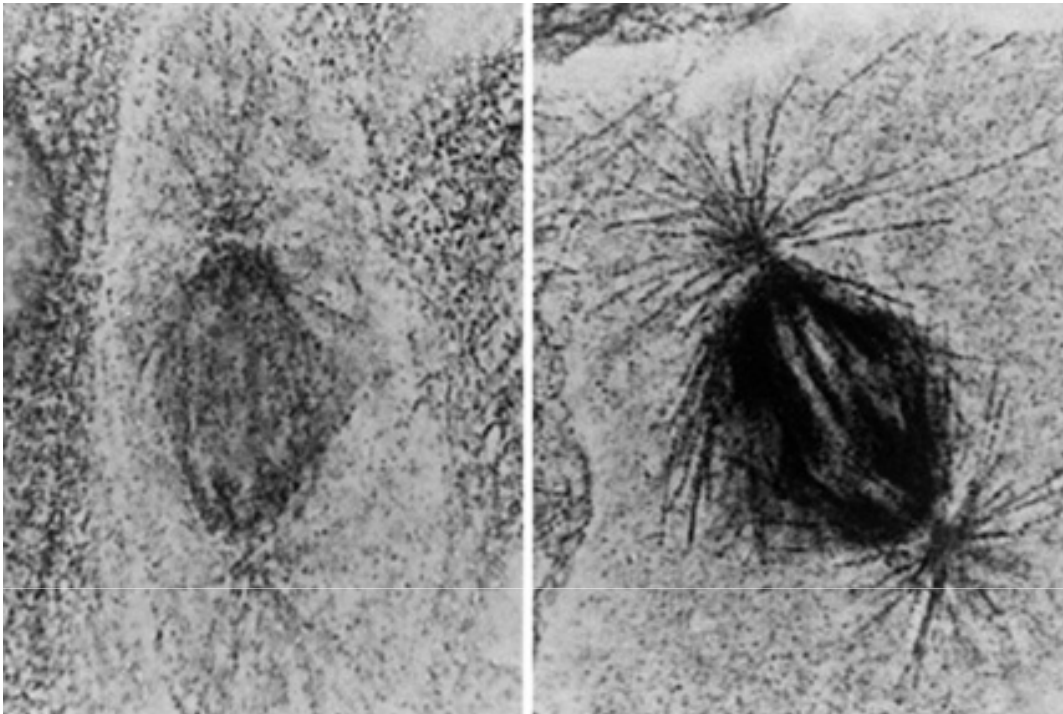


# Nanočástice zlata

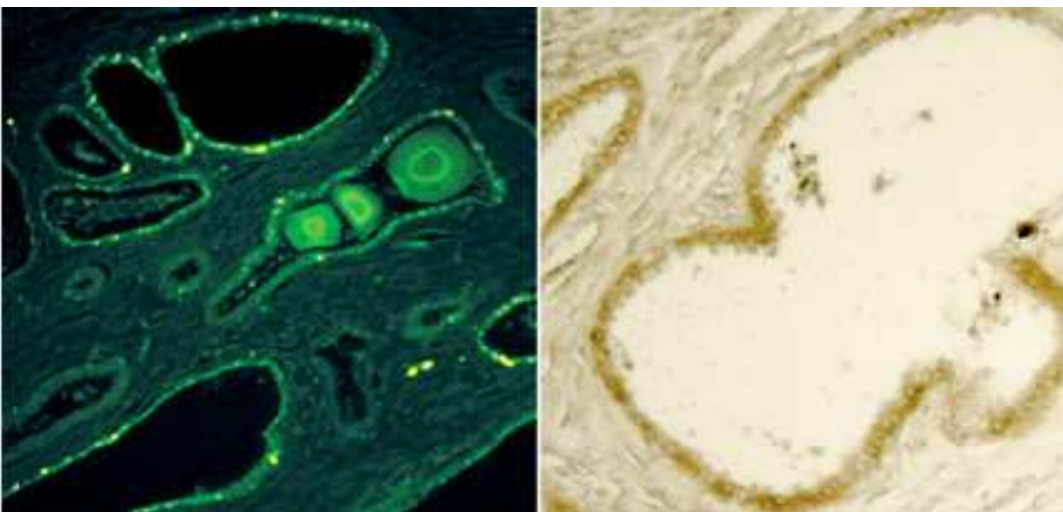
- nanoklastry zlata jsou vlastně koordinační komplexem
- centrální atomy Au jsou v dané konfiguraci, na povrchu jsou koordinačně vázány s vhodným ligandem, takže zlato je valenčně saturováno a tím stabilizováno - Undecagold a Nanogold
  - tris (aryl) fosfin
  - halidové anionty
- menší klastry Hexagold (6 Au) a Octagold (8 Au) mohou nést náboj
- ukázka nanoklastru Au aktivovaného maleimidovou skupinou



## Au nanočástice v mikroskopii



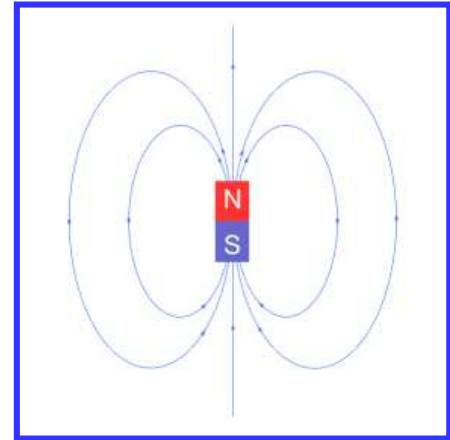
- **svazek mikrotubulů**
  - anti-tubulinová Ab, kozí Ab anti myší IgG značená koloidním zlatem (vlevo) nebo nanočásticemi NANOGOLD (vpravo)
  - zvětšení 1300x



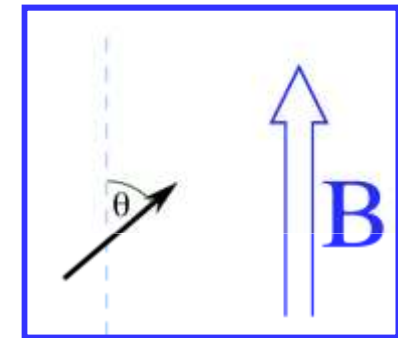
- **adenokarcinomy prostaty**
  - Ab anti cytokeratin antibody, konjugát Alexa Fluor 488 FluoroNanogold s Fab' fragmentem kozí Ab anti myší IgG
  - vlevo, fluorescence
  - vpravo, lokalizace Au po zesílení Ag+

# Magnetické pole

- **permanentní magnet** má dva póly, které vytváří magnetický dipól (často reprezentován šipkou, směr od S do N), mezi póly se šíří magnetické pole



- magn. dipól  $m$  v magn. poli o hustotě toku  $B$  je natáčen torzní silou do směru rovnoběžného se siločarami pole:  $\tau = mB\sin(\theta)$

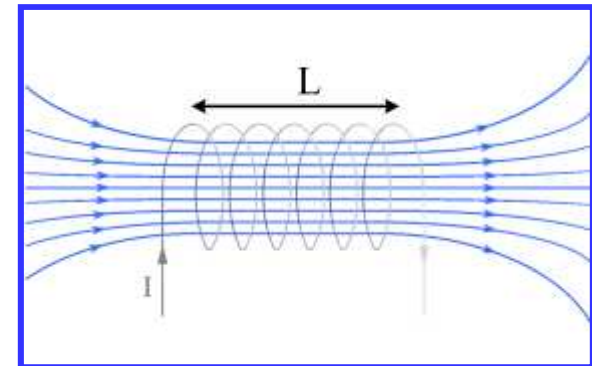


- magnetické materiály mají volný magnetický moment, vykazují magnetizaci  $M$ , která závisí na:
  - hustotě magn. dipólů na jednotkový objem materiálu
  - velikosti a vzájemné orientaci dipólů
  - je důsledkem nespárovaných spinů elektronů, v malé míře i pohybem elektronu v rámci orbitalu

- magn. pole může vyvolat i **elektromagnet**
  - elektrický proud procházející vodivou smyčkou (solenoid) vytváří uvnitř homogenní pole

- hustota toku  $B$  je dána intenzitou  $H$  a permeabilitou vakua  $\mu_0$ :

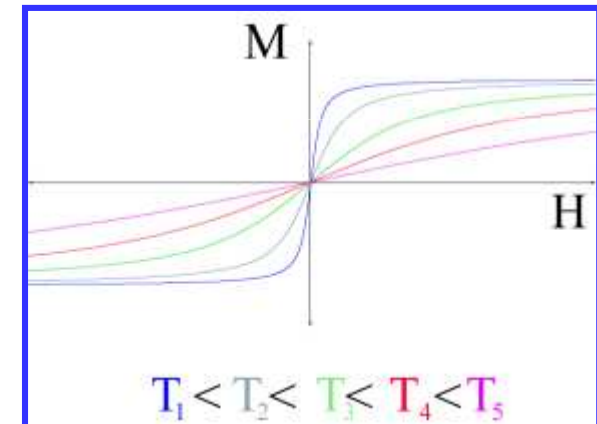
$$B = \mu_0 (H + M)$$



# Magnetizace

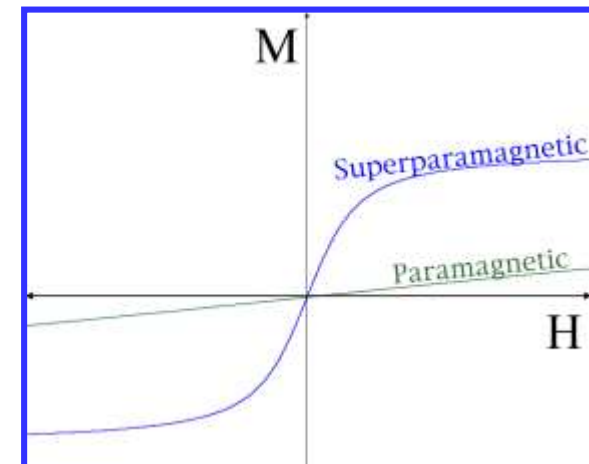
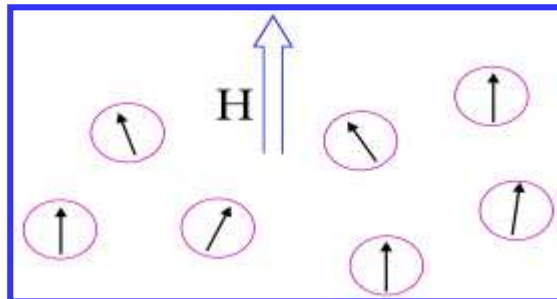
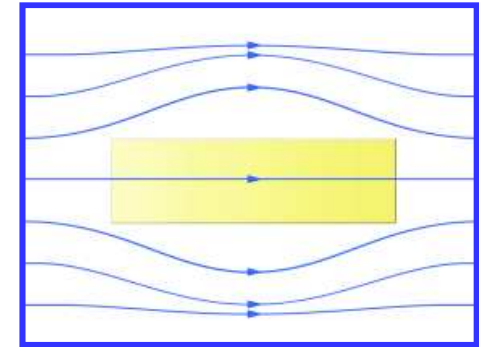
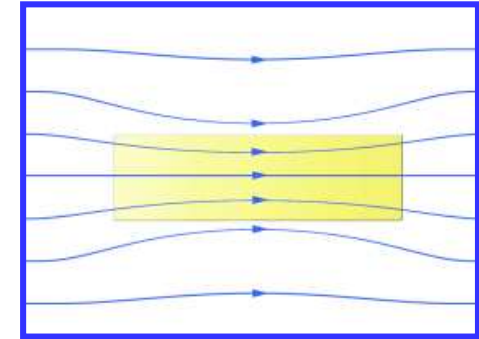
- magnetizace  $M$  se mění v závislosti na intenzitě pole  $H$ 
  - konstantou úměrnosti je magnetická susceptibilita  $\chi$
  - velikost změny závisí na typu materiálu, teplotě a někdy i na historii předcházejícího magn. pole (hystereze)
- zahřívání zmagnetizovaného materiálu snižuje jeho magnetizaci, při zahřátí nad  $T_c$  (Curieova teplota) pak  $M$  zcela vymizí

$$\chi = M/H$$



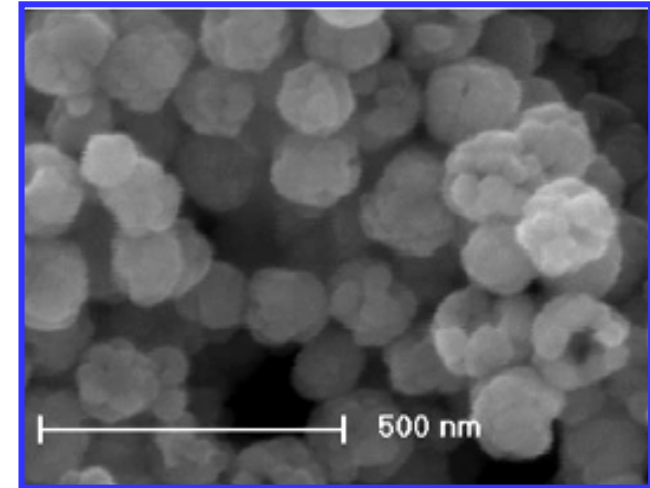
# Magnetické materiály

- **magnetické** - mají tendenci "zahušťovat" siločáry
  - železo, kobalt
  - vykazují magnetizaci i při absenci magn. pole
- **diamagnetické** - siločáry slabě odpuzují
  - bílkoviny, tuky, voda
  - malá negativní magnetická susceptibilita
- **paramagnetické**
  - v magn. poli se u nich orientují magn. dipóly a získávají magnetizaci
- **superparamagnetické**
  - nanočástice, 1 až 10 nm
  - orientují se v magn. poli



# Magnetické částice

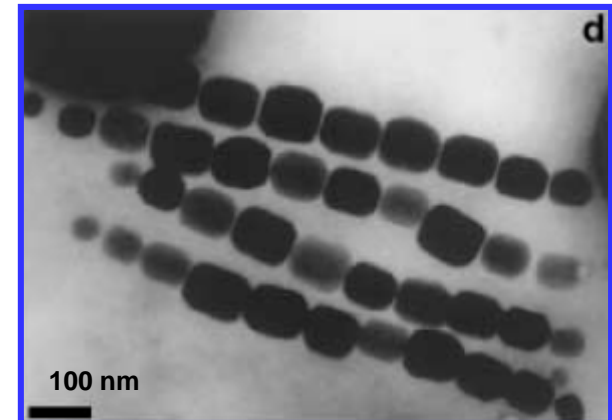
- široká škála aplikací zahrnující:
  - imunostanovení
  - separace proteinů a buněk
  - distribuce léčiv, oligonukleotidů
  - magnetická hypertermie
  - magnetické značení
  - zobrazování při magnetické resonanci (MRI)
- superparamagnetické materiály na bázi **maghemitu** ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) a **magnetitu** ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )
  - dobré magnetické vlastnosti, nízká toxicita
  - žádané vlastnosti: uniformní tvar, definovaná krystalinita, monodispersnost, stabilita ve vodném prostředí, povrchové funkční skupiny
  - nanočástice nebo duté koule (vyšší magnetický moment)





## Metody přípravy

- depozice z plynné fáze
- tepelný rozklad
  - $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ,  $\text{Fe}(\text{oleát})_2$ , Fe tris(acetylacetonát)
- mikroemulzní precipitace
- sonochemická syntéza
- hydrolytické postupy
  - zahřívání  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  s hexamethyldiaminem a NaAc v glykolu (6 hod, 200 °C)
  - vzniknou částice rovnou s  $-\text{NH}_2$  na povrchu
- bakteriální (BMP) produkce
  - vznikají potažené fosfolipidovou vrstvou (magnetosomy)
- povrchová funkcionalizace
  - vrstvička zlata
  - polymerní povlak s funkčními skupinami
  - silanizace pomocí aminopropyltriethoxysilanu (APTES)
  - elektrostatická adheze (přes polyaminový povlak)



## **Magn. částice v kapalině**

- **vliv vnějšího magn. pole**
  - uniformní pole částici otáčí - orientace dle jejího magn. dipólového momentu, nedochází ale k jejímu translačnímu pohybu
  - pouze gradient magn. pole způsobí translační pohyb
- **viskozitní efekty**
- **mezičásticové magnetické a elektrostatické síly**
  - může docházet k agregaci až precipitaci
  - el. odpuzování zabraňuje agregaci

# Separace buněk

- **přímá metoda**
  - ligand imobilizovaný na povrchu mg. nanočástice (kolem 50 nm - nezpůsobit mech. stres)
  - přidá se ke vzorku, naváže se na povrch cílové buňky
- **nepřímá metoda**
  - cílové buňky se označí ligandem, např. protiláku (biotinylovanou, ...)
  - vymyje se nadbytek ligandu (pokud možno)
  - označené buňky se pak zachytí na modifikovaných mg. částicích
- **získaný mg. komplex se zachytí mg. separátorem**
- **pozitivní nebo negativní izolace**
  - odseparují se cílové nebo balastní buňky

## **Cílená distribuce (magnetic targeting)**

- akumulace podaných látek ve zvolené cílové oblasti organismu
- injekce do cévy zásobující orgán
- v přítomnosti externího mg. pole
  - musí překonat lokální lineární toky odnášející nosič (0.05 až 10 cm/s, dle průřezu a rozvětvení cévního systému)
  - dlouhodobé zadržení nosiče v daném místě (až 70%)
  - lokální vysoká koncentrace uvolňované látky (až 8x)
  - mnohem menší zatížení pro další části organismu než při systémové aplikaci
- termocitlivé magnetoliposomy
  - v cílovém místě se přenášená látka uvolní lokálním zahřátím pomocí elmg. pole

## **Hypertermie prostřednictvím magnetické kapaliny**

- metoda likvidace nádoru lokálním zvýšením teploty na 42 až 46 °C
  - sníží se viabilita buněk a ty jsou citlivější na chemoterapii a radiaci
  - mg. subdoménové nanočástice se bioselektivně zachytí na povrch maligních buněk
  - aplikace externího střídavého mg. pole generuje teplo mech. pohybem

## **Kontrastní zobrazování**

- **MRI, "magnetic resonance imaging" - H-NMR aplikované na tkáně**
- **při MRI je kontrast zobrazení důsledkem rozdílných odezev různých tkání na aplikované radiofrekvenční pulsy**
  - hustota protonů a mg. relaxační časy dané chemickým složením
  - zejména množství vody a lipidů
- **přítomnost superparamagnetických nanočástic (magnetit-dextran) v cílovém místě velmi výrazně zvyšuje kontrast**
  - více nanočástic vede k tmavšímu zobrazení, mění se rychlost relaxace protonů z excitovaného stavu
  - např. zdravé buňky nanočástice přijmou, ty odumřelé či poškozené ne
- **sledování buněk značených uvnitř umístěnými mg. nanočásticemi in vivo - např. dodané buňky kostní dřeně, případně v budoucnu kmenové buňky**

# Bioanalytické aplikace

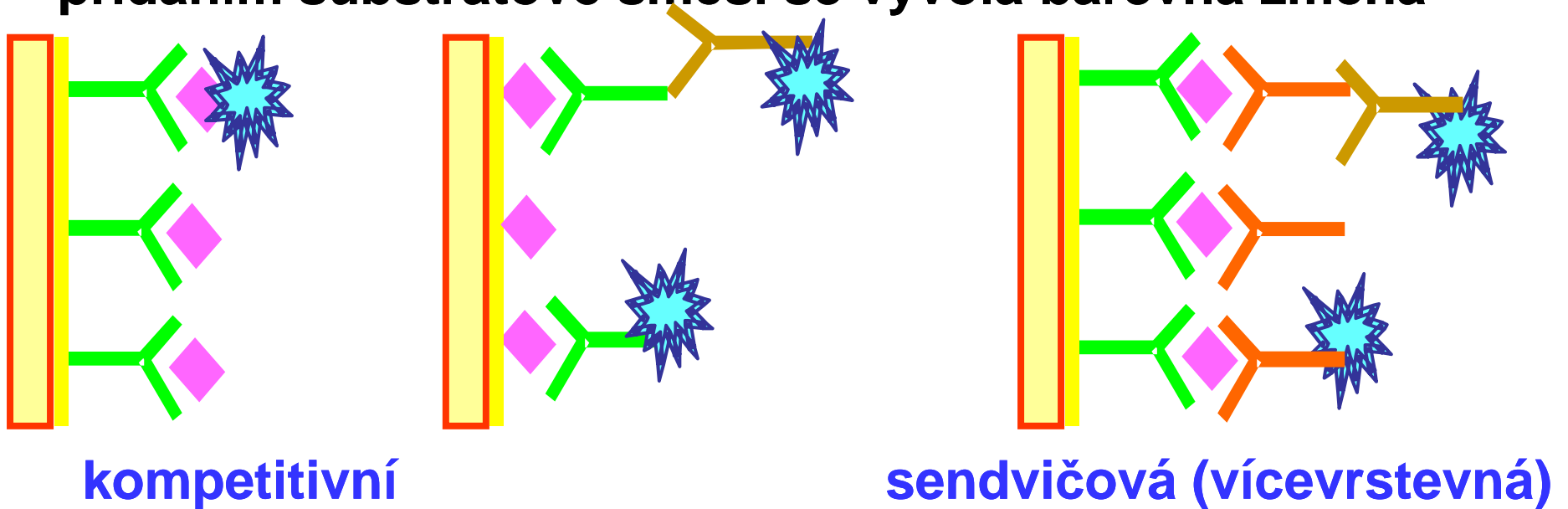
- **imunomagnetické sensory** - snadná regenerace citlivého povrchu
  - na povrchu vhodného převodníku jsou zachyceny (magnet, elektromagnet) mg. mikročástice s imobilizovanou protilátkou
  - provede se imunostanovení, na konci se mg. částice uvolní a nahradí novými
  - vhodné zejména pro komplexní vzorky (potravin, krev), které normálně degradují imunorekogniční vrstvu
- **enzymové sensory** - regenerace při stanovení ireverzibilních inhibitorů
- **analýza DNA**
  - specifická extrakce cílové sekvence z komplexního materiálu

# Enzymové značky

- **jedna molekula značky při detekční enzymové reakci konvertuje mnoho molekul substrátu**
  - chromogenní, fluorogenní nebo poskytující jiné detekovatelné produkty
- **takže je zde využít jistý zesilovací mechanismus**
- **nejběžnější využití je v bioanalytice - v imunochemických technikách typu ELISA**

# ELISA

- enzyme linked immunosorbent assay“
- enzymové konjugáty („tracery“) slouží pro detekci vzniku a množství imunokomplexů
- enzymová značka se zachytí v komplexu na pevné fázi
  - povrch zkumavky, mikrotitrační destičky, imunostripu
- přidáním substrátové směsi se vyvolá barevná změna



 enzymová značka

 protilátka

 analyt

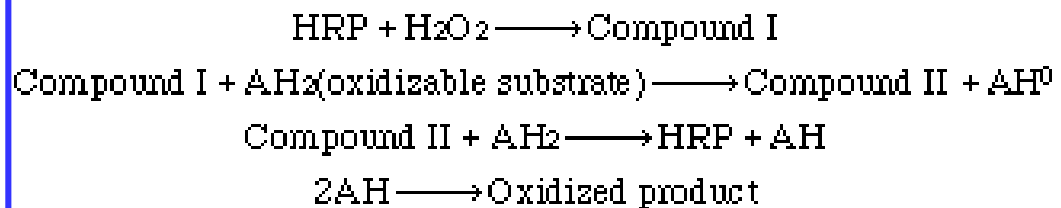


# **Vlastnosti enzymu vhodného pro značení**

- **dostatečně vysoká aktivita**
  - vysoké číslo přeměny
- **stabilita**
- **snadná detekovatelnost**
- **skupiny vhodné pro konjugaci**
  - konjugáty lze připravit mezi zvoleným enzymem a značenou komponentou
  - výhodně lze používat univerzálně např. biotinylované enzymy nebo protein A (G) - enzymové konjugáty

# Peroxidasa

- z kořenů křenu (HRP, „horse radish peroxidase“, EC 1.11.1.7)
- malý (40 kDa) oxidoredukční enzym s hemem (protohem IX) v aktivním místě, glykoprotein, katalyzuje oxidaci široké škály substrátů pomocí peroxidu vodíku (i MeOOH a EtOOH)
- donory fenolické povahy nebo aromatické aminy, které jsou bezbarvé (leukoformy) a po oxidaci vznikají intenzívně barevné produkty
- pH optimum je 5 až 7, stabilita při pH 4 až 10
- enzym je inhibován mimo jiné azidem, kyanidy a sulfidy
- mnoho isoenzymů, komerčně dostupná HRP C



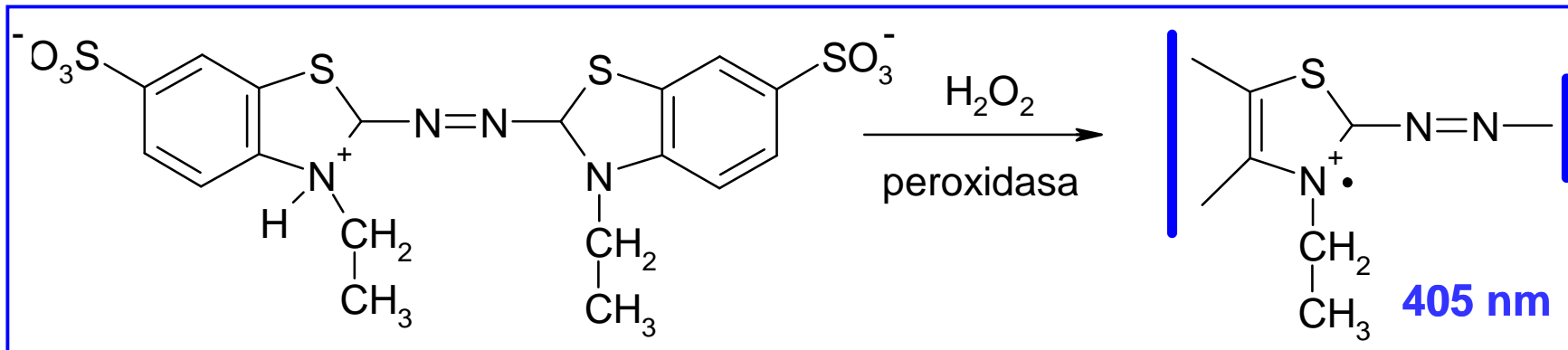
- peroxidasa ze sojových bobů (40 kDa) je termostabilní (do 90 °C) a aktivní v širokém rozsahu pH 2 až 10

# Konjugace peroxidasy

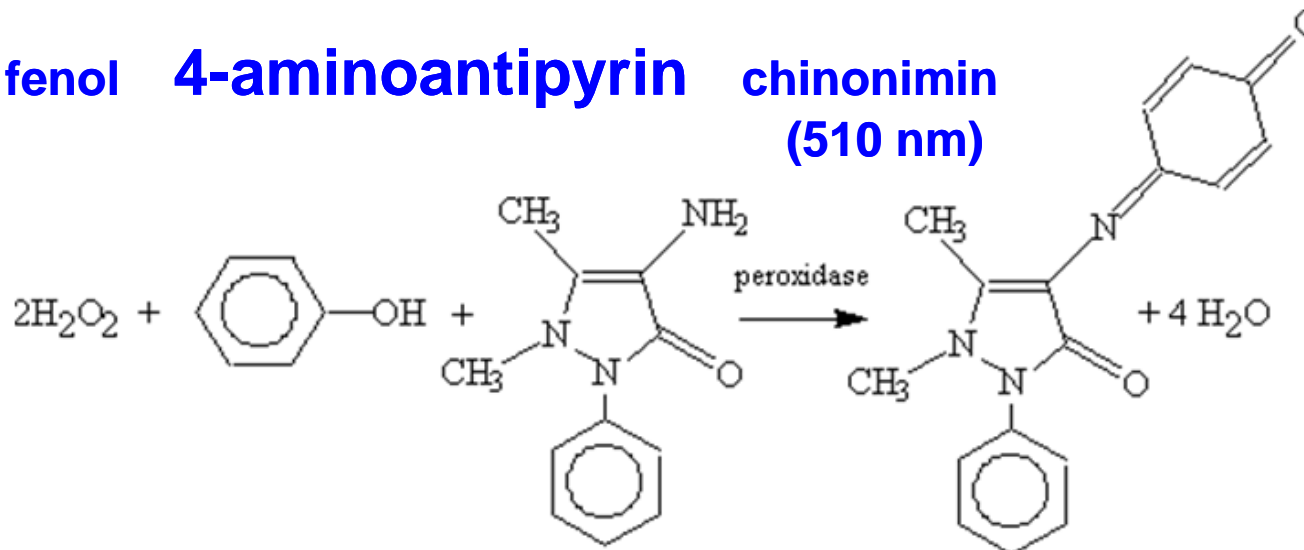
- při tvorbě konjugátů se peroxidasa může jednoduše sledovat a stanovovat na základě absorbance při 403 nm (typické pro hemoproteiny)
- poměr absorbancí při 403 a 275 nm charakterizuje čistotu enzymu
  - toto jednoduché stanovení komplikuje existence několika isoenzymů
  - velmi kvalitní preparáty mají tuto hodnotu (R.Z., reinheitszahl) mezi 3 až 3.4, nemá to ale vazbu na aktivitu
- reakce mohou využít  $\epsilon$ -aminoskupiny zbytků lyzinu – ty jsou ale pouze 2, což je velmi málo
- využívají se sacharidové postranní řetězce
  - snadno se aktivují pomocí oxidace jodistanem a tak se získají aldehydové skupiny

# Chromogenní substráty HRP

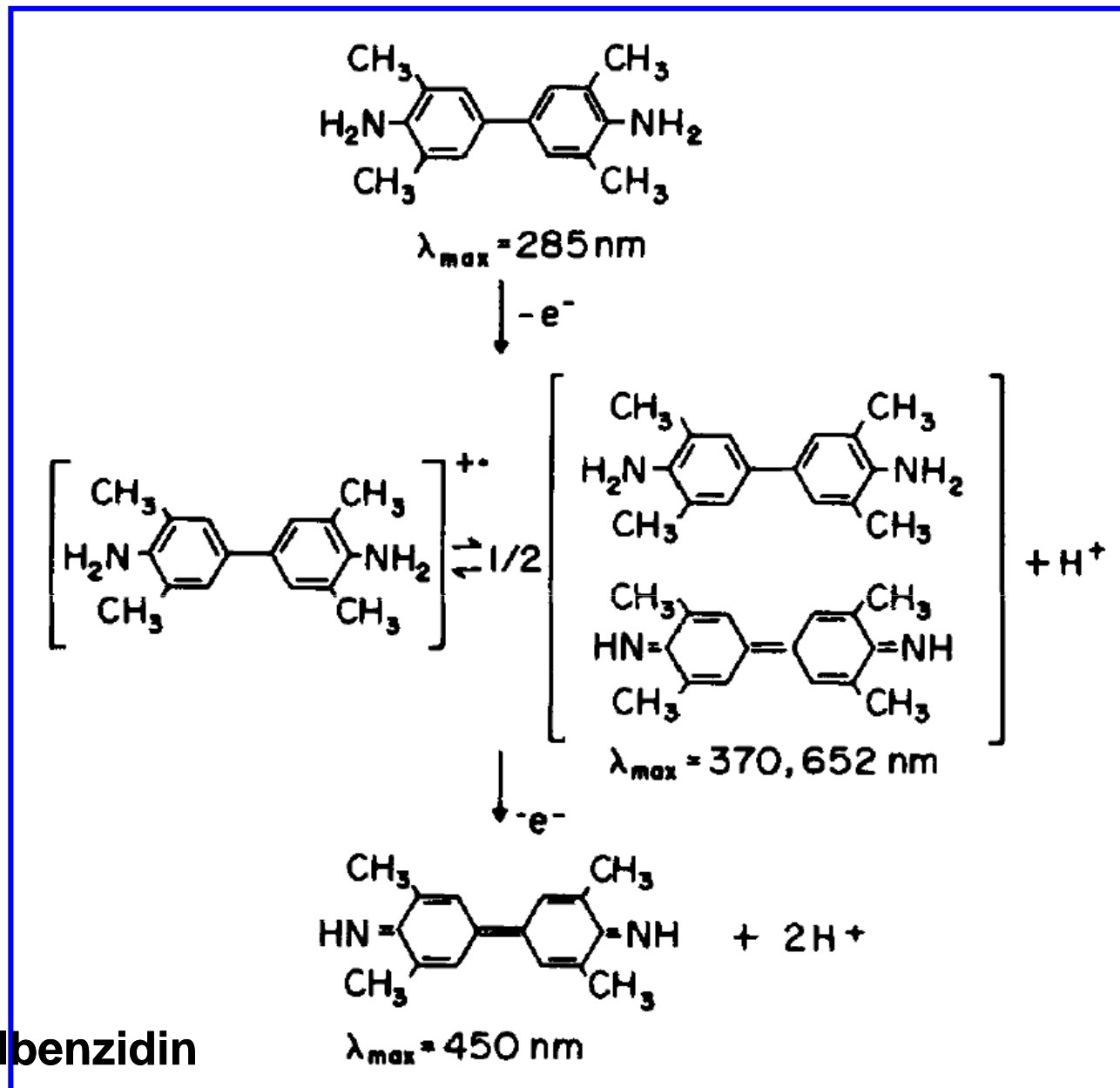
- $\text{DH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{D} + 2 \text{H}_2\text{O}$   
bezbarvý barevný ... obecná reakce
- **ABTS**, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)



fenol 4-aminoantipyrin chinonimin  
(510 nm)



# TMB

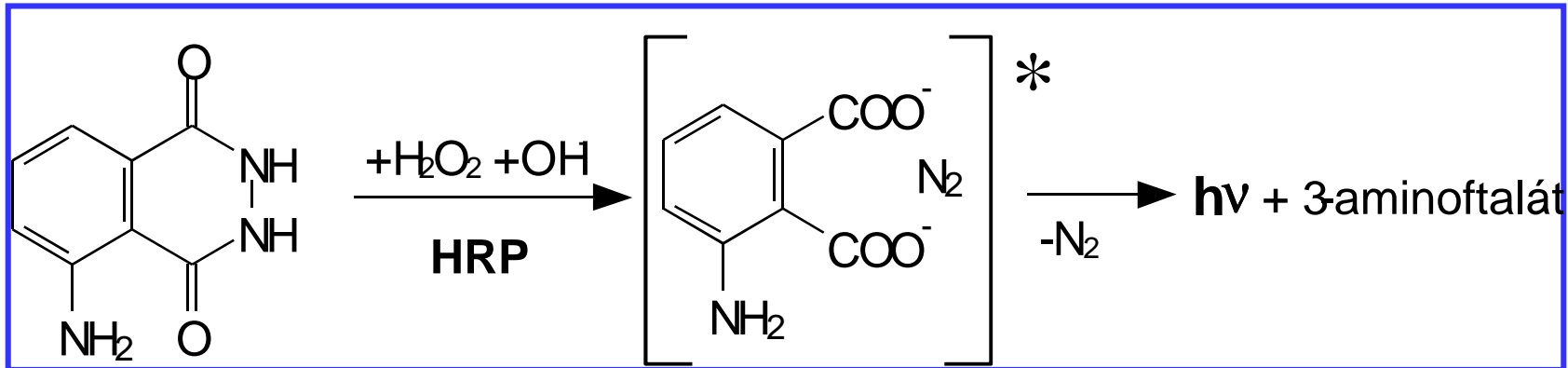


- **3,3',5,5'-tetramethylbenzidin**

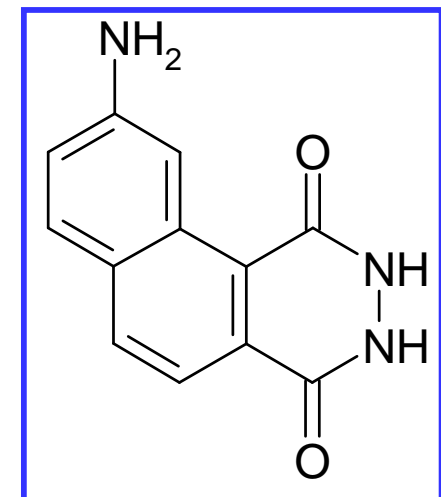
- měří se při 620 až 650 nm v průběhu reakce, nebo po zastavení kyselinou sírovou při 450 nm)

## Luminogenní substráty HRP

- pro citlivou detekci HRP se používá **luminol**
  - 5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion
- v nadbytku  $\text{H}_2\text{O}_2$  je intenzita světla (425 nm) úměrná množství HRP

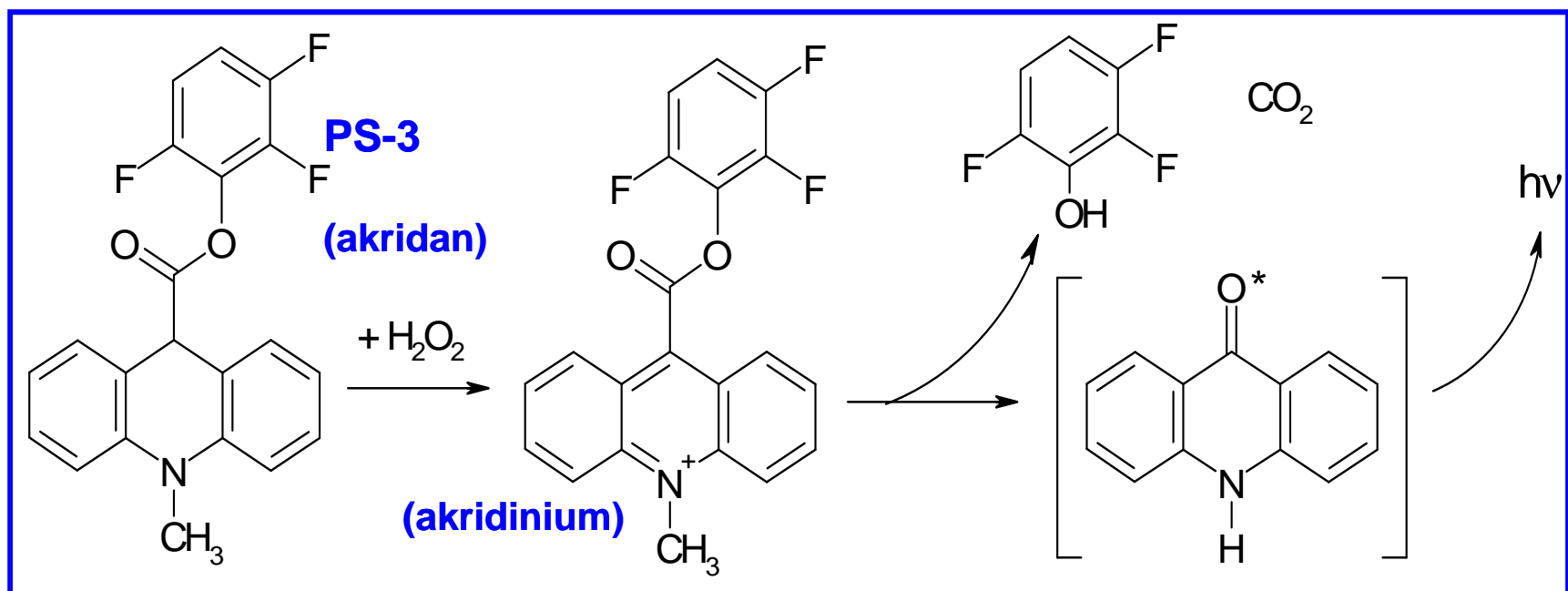


- zlepšení luminiscence (vyšší výtěžek) - přítomnost "enhancers" sloučenin - *p*-jodofenol, *p*-fenylfenol
  - nejde již o záblesk, ale o stabilnější světelný tok
  - výsledek silně závisí na podmínkách reakce
  - raději použít komerčně namíchané směsi
- vyšší výtěžek dává 7-dimethylaminonaftalen-1,2-dikarboxyhydrazid



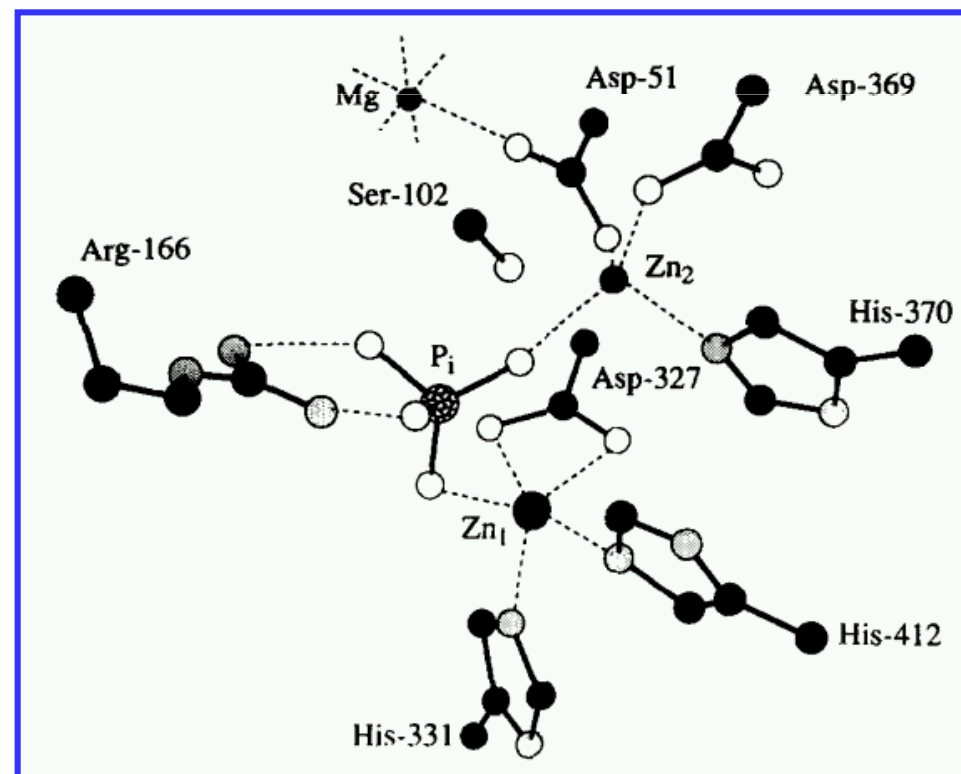
# Akridanové luminogeny

- alternativní substráty pro HRP
- emise při 435 nm



# Alkalická fosfatasa

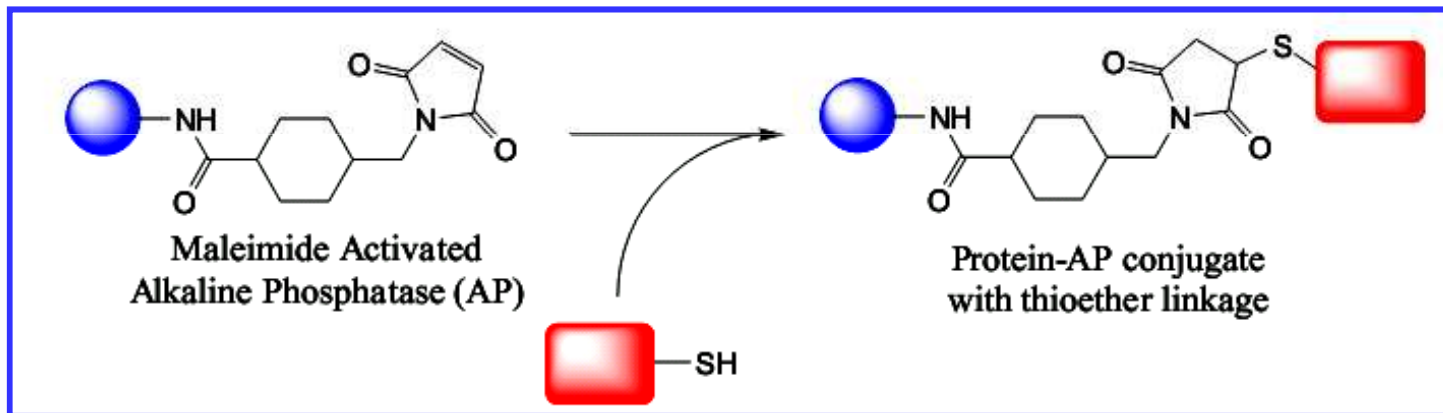
- katalyzuje štěpení ortho-esterů kyseliny fosforečné v zásadité oblasti pH (AP, EC 3.1.3.1)
- řada isoenzymů, používá se enzym izolovaný z mukosy telecích střev
  - CIAP, 140 kDa dimer, 2  $Zn^{2+}$  na podjednotku, vysoké číslo přeměny 3500  $s^{-1}$  při reakci kolem pH 9,8 (pH optimum je 8 až 10)
  - aktivována aminoalkoholy (diethanolamin, Tris)
- uchovává se lyofilizovaná nebo v 3 M NaCl
  - nesnáší kyselé prostředí
  - poškozuje ji opakované zmrazování / rozmrazování
- relativně dobře snáší vyšší teploty
  - např. v průběhu hybridizace
  - značka při detekci nukleových kyselin



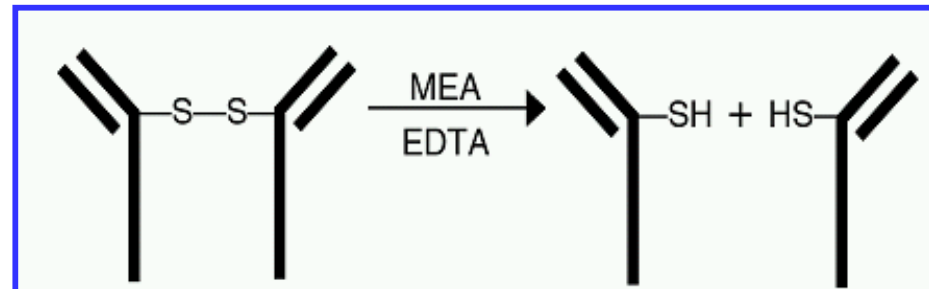


# Konjugace ALP

- příprava konjugátů není snadná a často dochází ke ztrátám aktivity
- pomocí glutaraldehydu nebo lépe
- heterobifunkčními činidly SMCC a SPDP
  - je dobré provádět konjugaci ve fosfátovém pufru, který chrání aktivní místo jako reverzibilní inhibitor
- komerčně dostupná je ALP s maleimidem (EZ-link od Pierce):

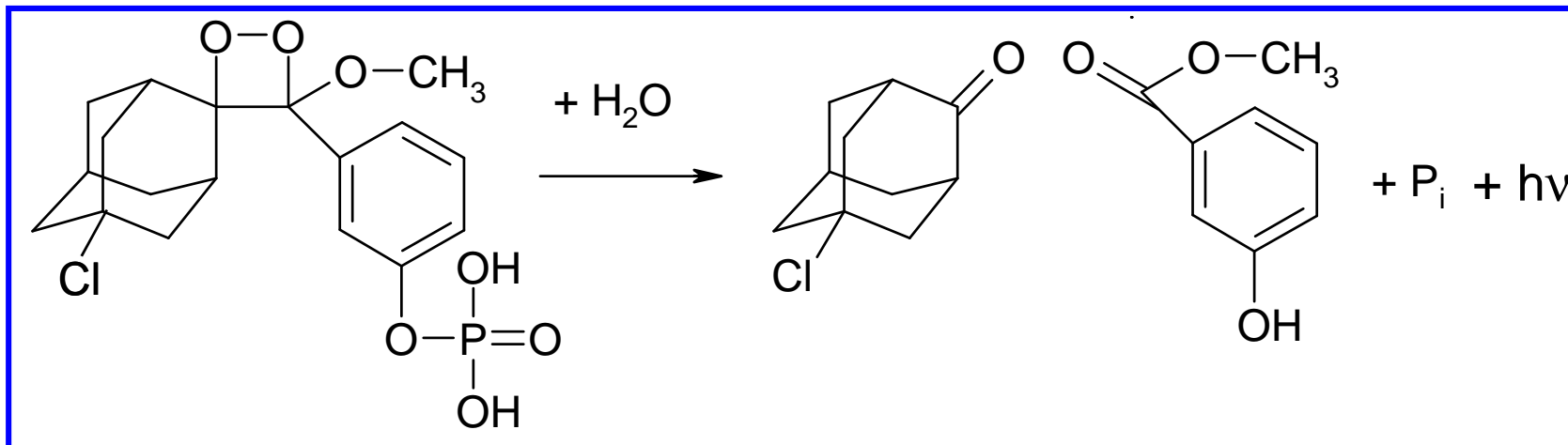
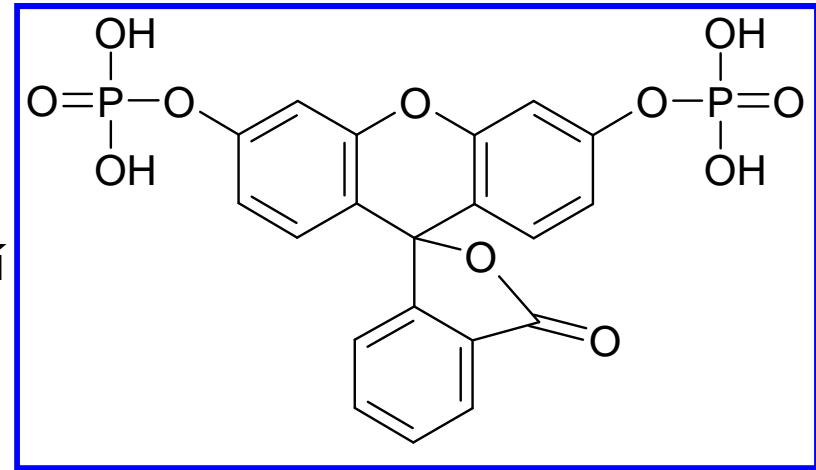


- protilátky se redukuje merkaptoethanolem a po dialyze lze provést konjugaci
- pro zavedení -SH slouží SATA

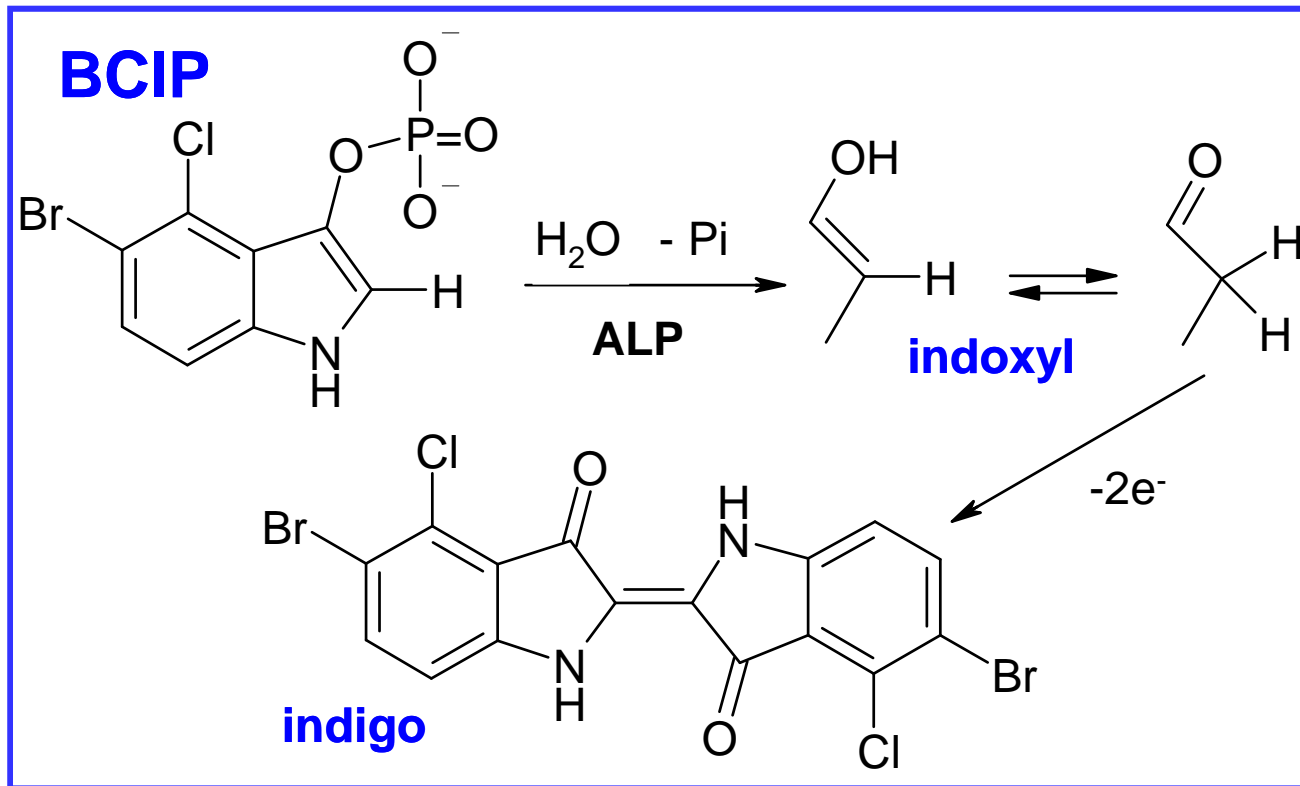


# Měření aktivity

- ***p*-nitrofenylfosfát (PNPP, 405 nm)**,  
hydrolyzou vzniká nitrofenol
  - intenzivně žlutý v alkalickém prostředí
- od fluoresceinu - **fluoresceindifosfát**
- **4-MUP** (methyumbelliferylfosfát)
- **luminogenní substrát - Lumigen PPD**
  - chloro-4-methoxy-4-(3-fosfátophenyl)spiro[1,2-dioxetan-3,2'-adamantan]
  - patří do skupiny dioxetanových luminogenů
  - substibuce halem v adamantanovém skeletu zlepšuje citlivost detekce (už 600 molekul ALP, zeptomoly)
  - 477 až (dle enhanceru) 620 nm



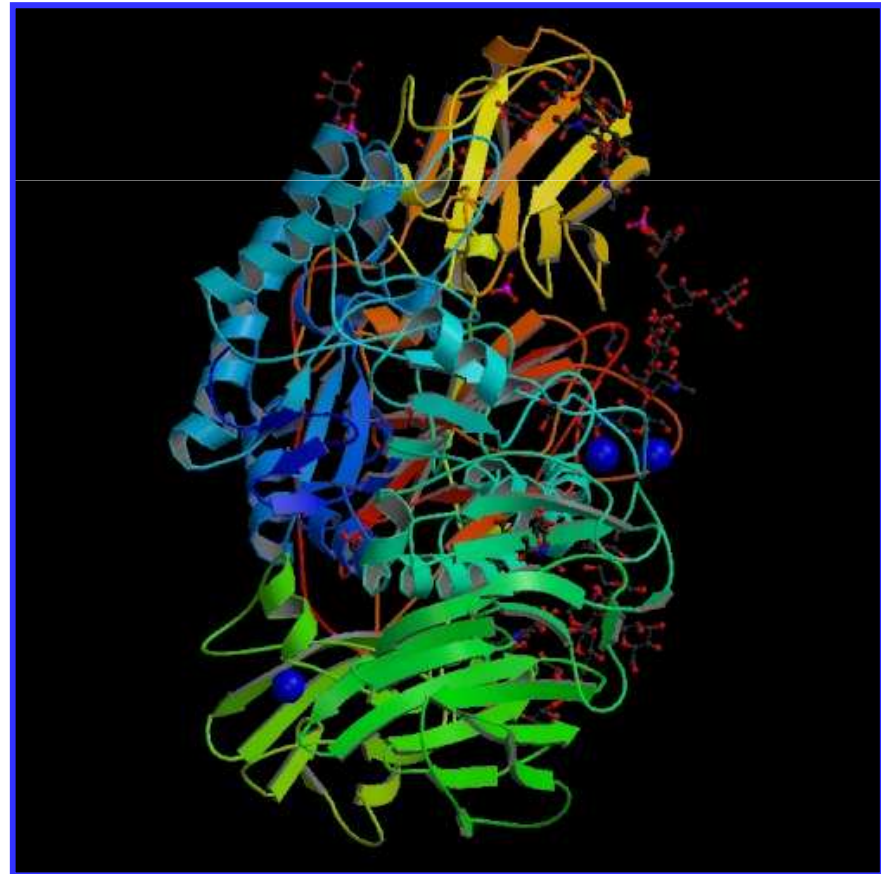
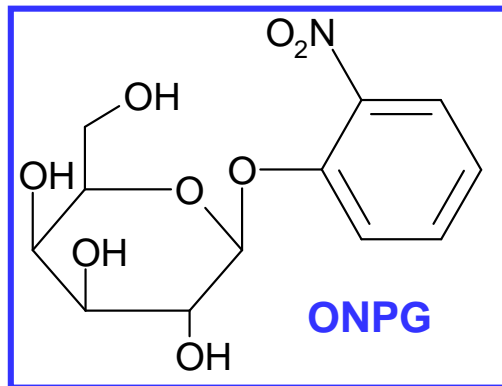
## 5-bromo-4-chloro-indolylfosfát (BCIP)



- hydrolytickou reakcí vzniká indoxyl, který po oxidaci (např. tetrazolium) přechází na modré nerozpustné **indigo**

# Galaktosidasa

- $\beta$ -galaktosidasa ( $\beta$ Gal, EC 3.2.1.23) je velký enzym (540 kDa, 4 podjednotky po 135 kDa) a je tedy snadno inaktivován
- katalyzuje hydrolýzu galaktosidů, pl 4,6, pH optimum má 7 až 7,5 (enzym z *Escherichia coli*)
- má dostatek sulfhydrylových skupin pro konjugační reakce, takže lze jednoduše spojit s protilátkami aktivovanými předem SMCC
- chromogen. substrátem je ONPG
  - o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
  - v hydrolytické reakci nitrofenol
- Xgal produkuje indigo



# Gal jako reporter genové exprese

- enzym může být rozdělen na dva peptidy LacZ $\alpha$  a LacZ $\Omega$ 
  - samy o sobě nemají aktivitu
  - ale spontánně se spojí do funkčního enzymu
- využívá se v mnoha klonovacích vektorech pro dosažení  $\alpha$ -komplementace u speciálních lab. kmenů *E. coli*
  - malý LacZ $\alpha$  peptid je kodován v plasmidu
  - velký LacZ $\Omega$  je kodován bakteriálním chromosomem
  - když se DNA fragment vpraví do vektoru a produkce LacZ $\alpha$  se přeruší, ztratí se  $\beta$ -galaktosidasová aktivita
  - základem pro modro/bílý screening rekombinantních klonů
-

# Glukosa oxidasa

- ( $\beta$ -D-glukosa: $O_2$ -1-oxidoreduktasa, EC 1.1.3.4, GOD)
- dostupná z plísní *Aspergillus niger* nebo *Penicillium notatum*
- 160 kDa, dimer se dvěma FAD kovalentně vázanými na podjednotky
- obsahuje asi 16% glykosylových zbytků
- specifická aktivita preparátů přesahuje 200 IU/mg
- velmi stabilní
- v imunostanoveních často "spolupracuje" s HRP, pro kterou generuje peroxid vodíku oxidací glukosy
  - tunelovací stanovení, imunosenory

# Ureasa

- **substrátem je močovina**
  - změna pH vyvolaná hydrolysou, měří se
  - pomocí indikátoru bromkresolová modř při 588 nm
  - potenciometricky (light addressable potentiometric sensor, na bázi pH ISFETu) - pro imunosensory

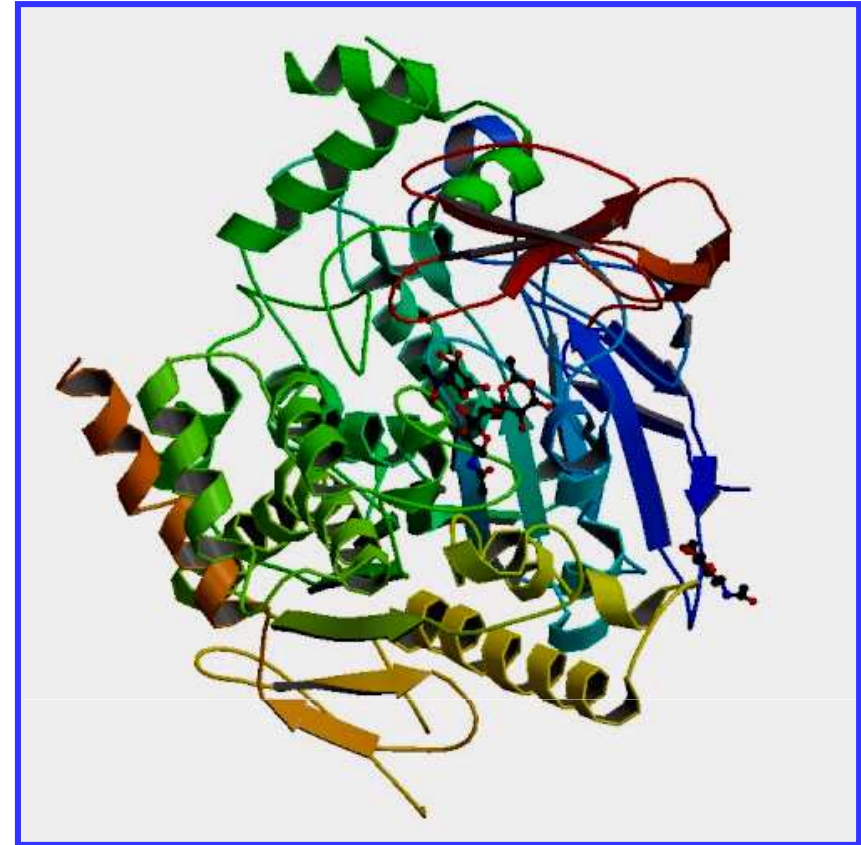
# Lakasa

- z choroše *Coriolus hirsutus*, Cu-dependentní 1,4-benzendiol oxidasa (EC 1.10.3.2)
- oxiduje fenolické substráty pomocí kyslíku
  - alternativa k peroxidase
  - menší problémy s dlouhodobou stabilitou substrátové směsi



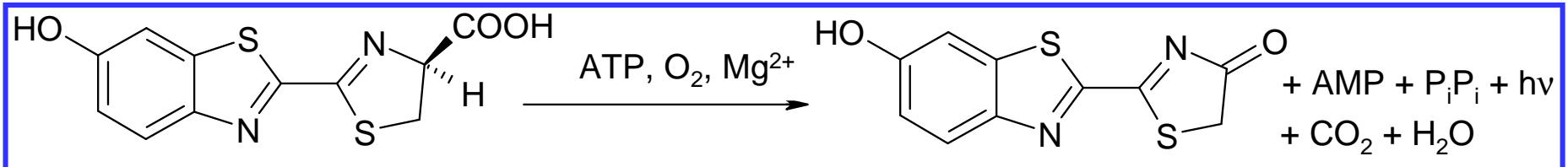
# Acetylcholinesterasa

- vysoké číslo přeměny ( $10^5 \text{ s}^{-1}$ )
- z elektrického úhoře
- vysoká citlivost stanovení
- substrát acetylthiocholin a DTNB
  - dithiobis(nitrobenzoová kyselina), Ellmanovo činidlo
  - poskytuje žluté zbarvení



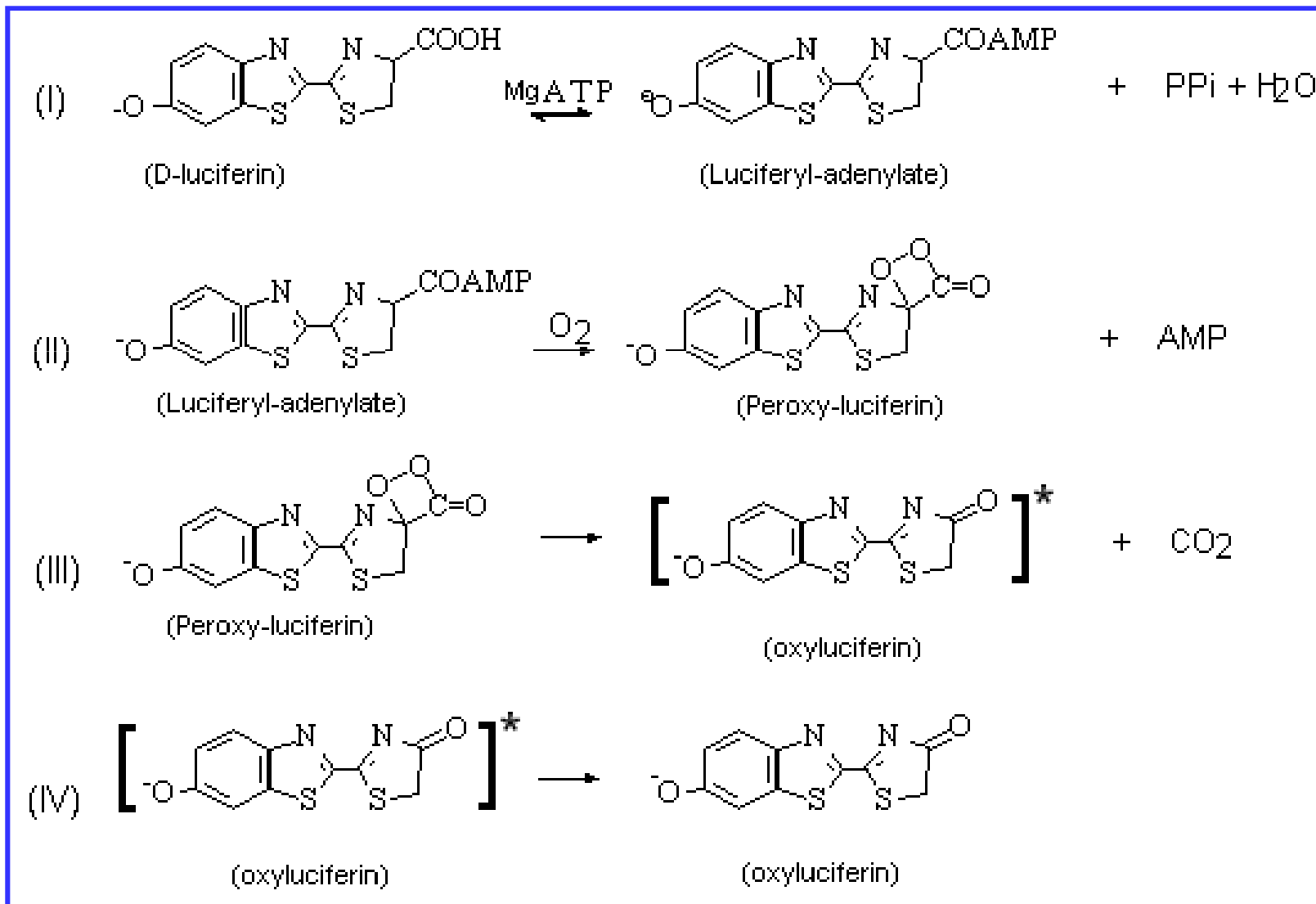
# Luciferasy

- patří mezi oxygenasy, štěpí substrát luciferin za účasti ATP
  - meziproduktem je luciferyladenylát, ten je poté oxidován
  - luciferin-4-monooxygenasa, 61 kDa, 550 aa
  - dochází k emisi světla při 560 nm (žlutozelené světlo), výtěžek asi 0.88 !
- zdrojem světluška (firefly, *Photinus pyralis*), (EC 1.13.12.7)



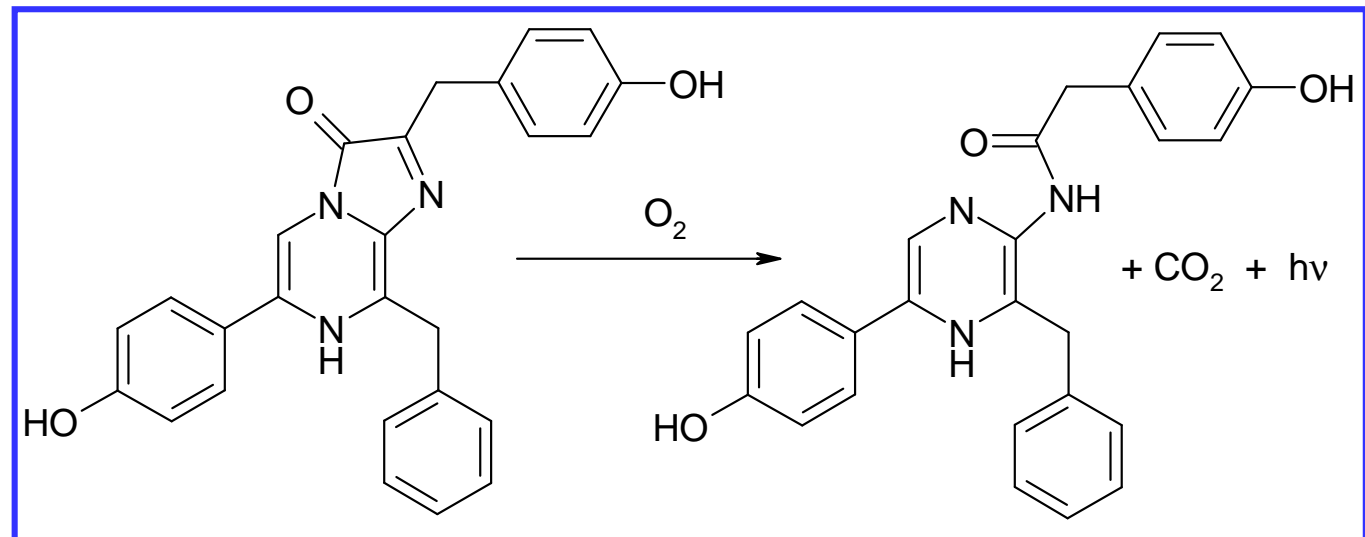
# Reakce luciferasy

- kroky I a II jsou enzymové (ligace a oxygenace)



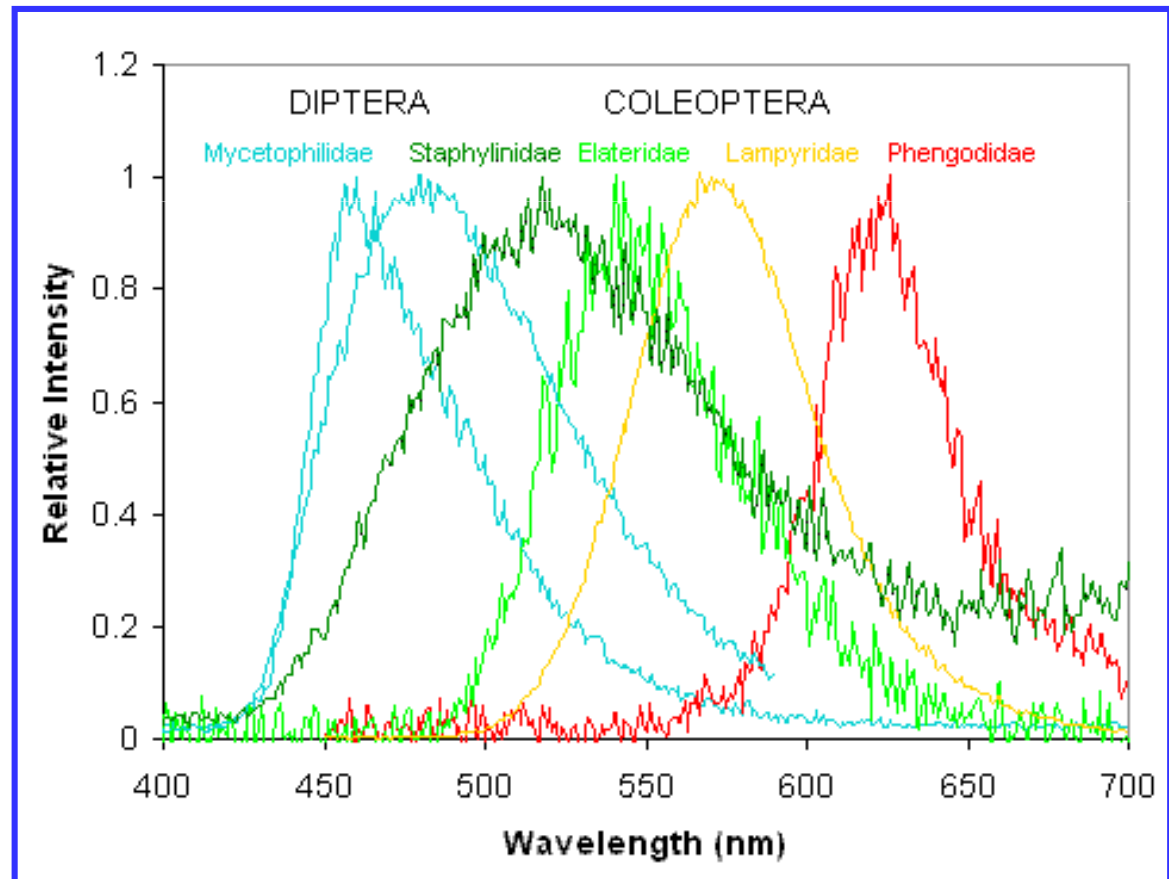
## Luciferasa z *Renilla*

- mořská sasanka ("sea pansy", *Renilla reniformis*) svítí při dráždění
- emituje modré světlo 480 nm, přenosem na GFP vzniká zelené záření
- 36 kDa monomer
- luciferinem je **coelenterazin**



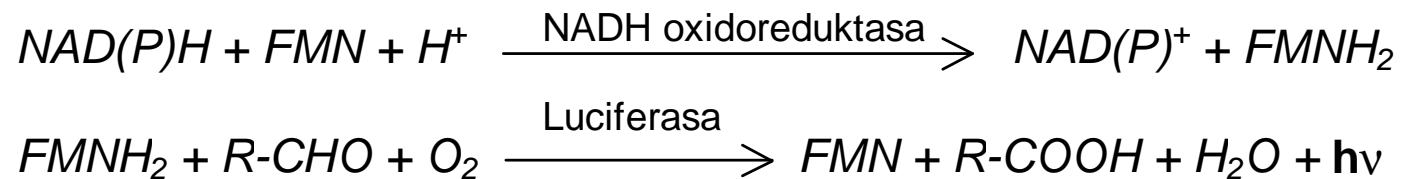
## Luciferasa z brouků

- zdrojem je "click-beetle", *Pyrophorus plagiophthalmus*
- různé enzymy emitující od 544 do 593 nm (zeleně až oranžově)
  - byly geneticky upraveny pro emisi při 611 nm a 544 nm
  - *lucRD* červená emise ("Chroma-Glo"), *lucGR* zelená emise (nebo *CBRluc*, *CBGluc*)



## Luciferasa z bakterií

- mořské bakterie - luciferasa (EC 1.14.14.3) oxiduje aldehydy (>C8, dekanal, tetradekanal)
  - *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium phosphoreum*
- nemají význam pro použití v eukaryotických buňkách, pouze u prokaryot

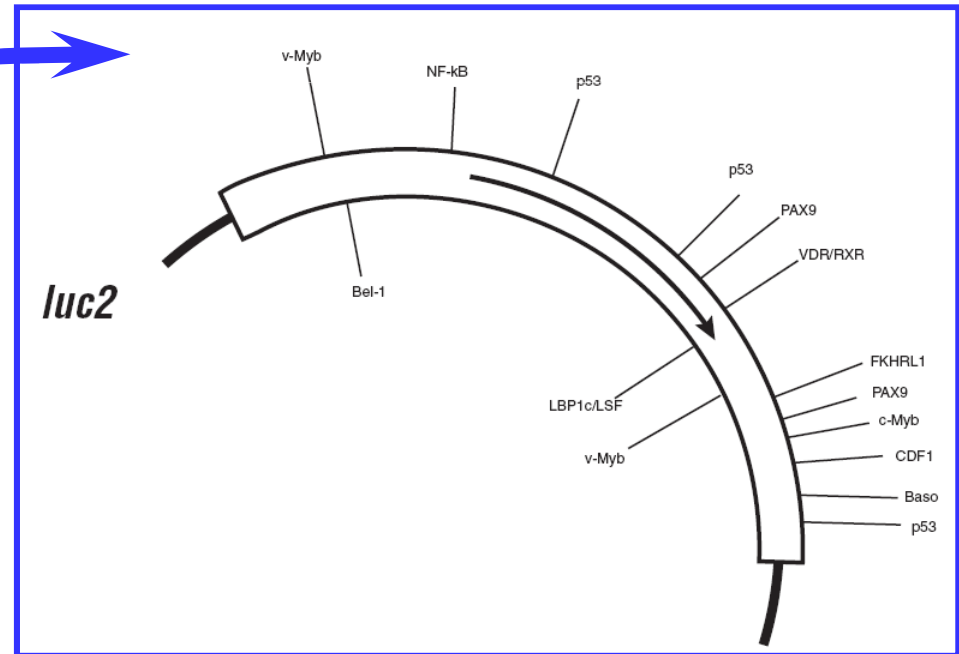
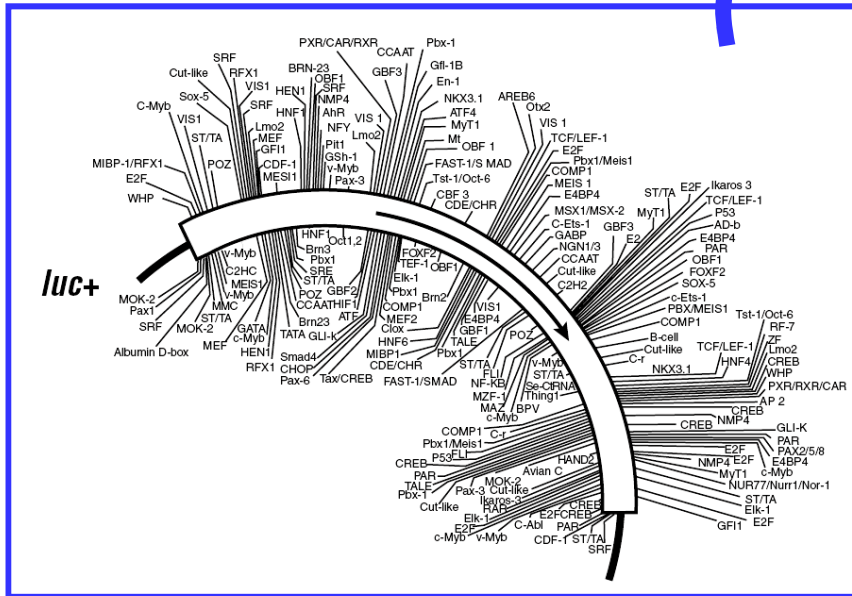
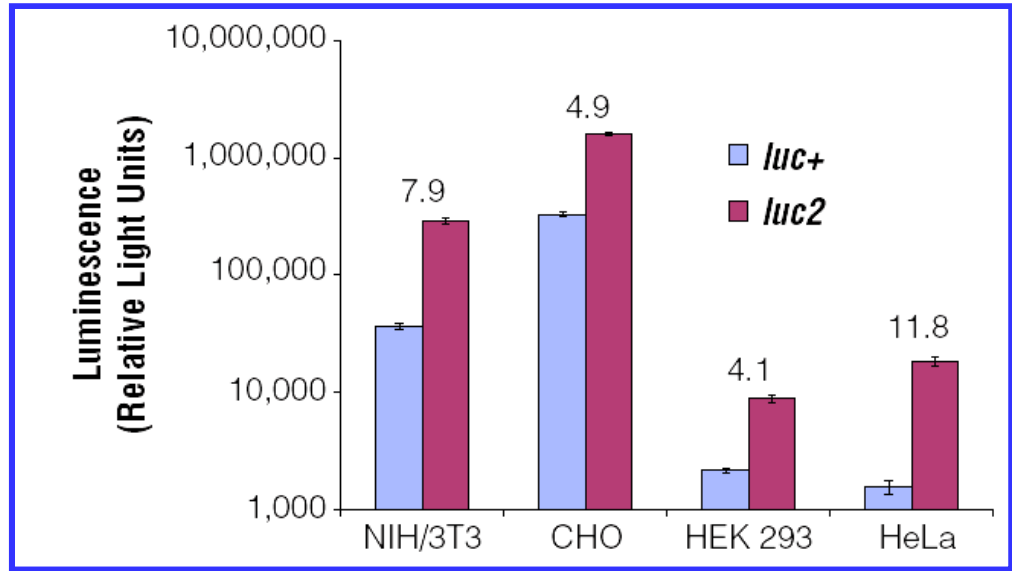


# Geneticky upravené luciferasy

- **světlušky:**
  - *luc* nativní varianta, *luc+* "enhanced", zvýšená luminiscence (vyšší svítivost) - vyžadují zlyzování buněk před přidáním substrátů
  - *h/luc+* optimalizované kodony pro expresi v savčích buňkách, svítí déle, poločas přes 5 hod, "Steady-Glo", *h/lucP+* zkrácená stabilita uvnitř buňky, poločas 30 min, "Bright-Glo", *h/lucCP+* velmi krátká živostnost - svítí přímo v buněčné kultuře, vhodné pro mikrodestičkový formát
  - nahrazení C-terminální sekvence Ser-Lys-Leu cílové pro peroxisomy za Ile-Ala-Val
- u *Renilla* obdobné: *R/luc*, *hR/luc*, *hR/lucP*, *hR/lucCP*, nemá C-term. cílovou sekvenci
- "Dual-Luciferase" - použijí se oba typy luciferas, lyze buněk, dva substráty, postupné měření emise
  - "Dual-Glo" - stejné, ale přímo v buněčné kultuře
- optimalizace kodonů pro dobrou expresi v savčích buňkách
- odstranění skrytých ("cryptic") regulačních a potenciálních sestřihových sekvencí
- [www.promega.com](http://www.promega.com)

# Vylepšené luciferasy

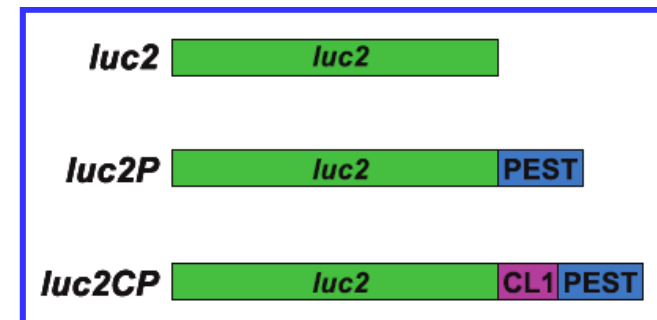
- z *luc+* na *luc2* - mnohem vyšší exprese
- odstranění konsensuálních sekvencí pro vazbu transkr. faktorů - vyšší specifita



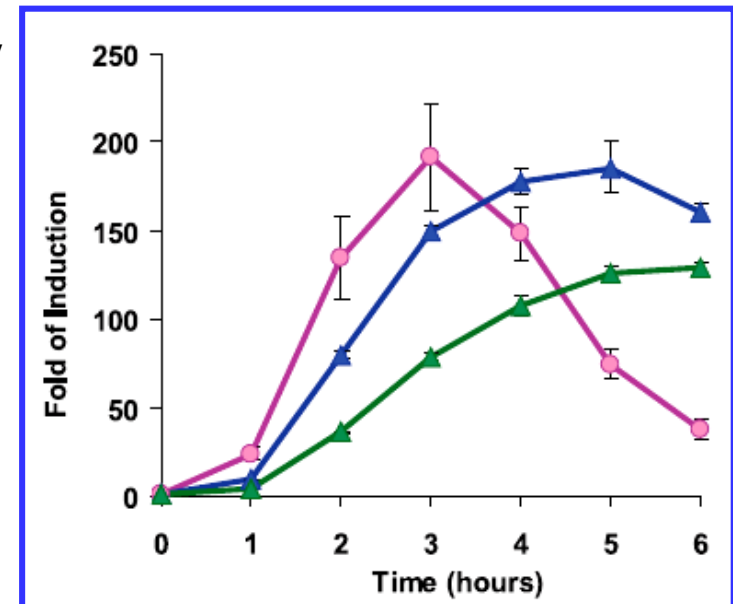


# Reportery genové exprese

- molekul luciferasy je pro zobrazení potřeba mnohem méně než např. GFP (musí mít silnější promotor, je velmi stabilní)
  - rychlejší metabolismus (začlenění sekvence pro degradaci - PEST, Pro-Glu-Ser-Thr)
  - lepší pro zobrazení dynamiky exprese
  - efektorová specifita, uniformní a optimální exprese v hostitelských buňkách

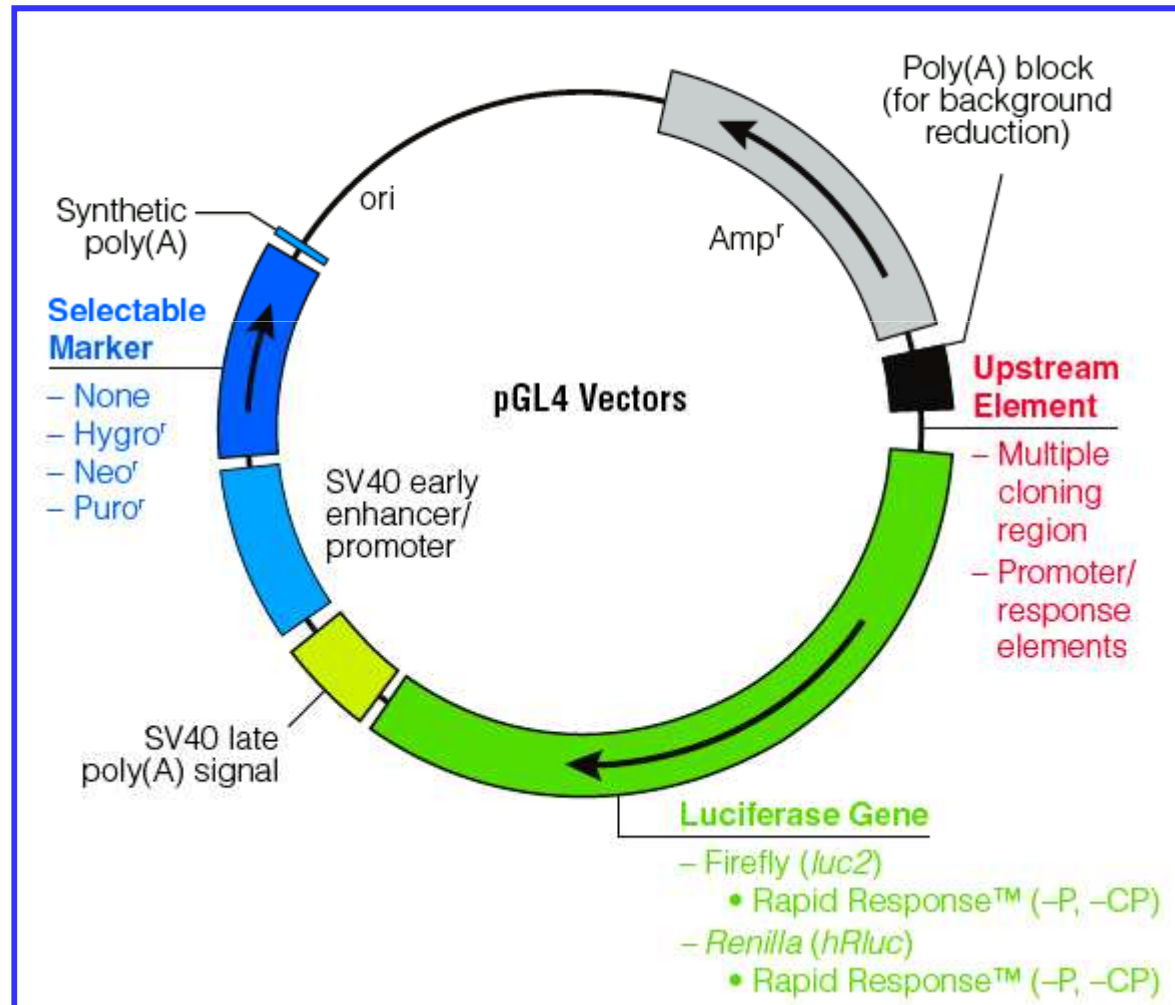


- zobrazení žádané buněčné linie po úspěšné transfekci
  - hledání a studium účinku nových léčiv
  - efekty cizorodých látek na buněčné procesy
- identifikace interagujících proteinů
  - společně spustí prepis reporterového genu
- interakce a vzdálenosti biomolekul - BRET
  - fúze studovaného proteinu s luciferasou (Rluc) a druhého partnera s vhodným fluoroforem (GFP)



# Luciferasový reporterový vektor pGL4

- pro přenos reporterového genu do hostitelských buněk, obsahuje:
  - promotorové sekvence (HSV-TK, SV-40, CMV)
  - savčí selekční sekvence (Hygr - resistance k hygromycinu)
  - poly(A) úseky
  - klonovací místa
  - *luc* gen (dle volby),
    - *luc2* nebo *RlucNeo*



# Přehled dostupných vektorů

Vector	Reporter Gene	Multiple Cloning Region	Protein Degradation Sequence	Gene Promoter	Mammalian Selectable Marker
pGL4.10	<i>luc2</i>	Yes	No	No	No
pGL4.11	<i>luc2P</i>	Yes	hPEST	No	No
pGL4.12	<i>luc2CP</i>	Yes	CL1-hPEST	No	No
pGL4.13	<i>luc2</i>	No	No	SV40	No
pGL4.14	<i>luc2</i>	Yes	No	No	Hyg <sup>r</sup>
pGL4.15	<i>luc2P</i>	Yes	hPEST	No	Hyg <sup>r</sup>
pGL4.16	<i>luc2CP</i>	Yes	CL1-hPEST	No	Hyg <sup>r</sup>
pGL4.70	<i>hRluc</i>	Yes	No	No	No
pGL4.71	<i>hRlucP</i>	Yes	hPEST	No	No
pGL4.72	<i>hRlucCP</i>	Yes	CL1-hPEST	No	No
pGL4.73	<i>hRluc</i>	No	No	SV40	No
pGL4.74	<i>hRluc</i>	No	No	HSV-TK	No
pGL4.75	<i>hRluc</i>	No	No	CMV	No
pGL4.76	<i>hRluc</i>	Yes	No	No	Hyg <sup>r</sup>
pGL4.77	<i>hRlucP</i>	Yes	hPEST	No	Hyg <sup>r</sup>
pGL4.78	<i>hRlucCP</i>	Yes	No	No	Hyg <sup>r</sup>

# BRET

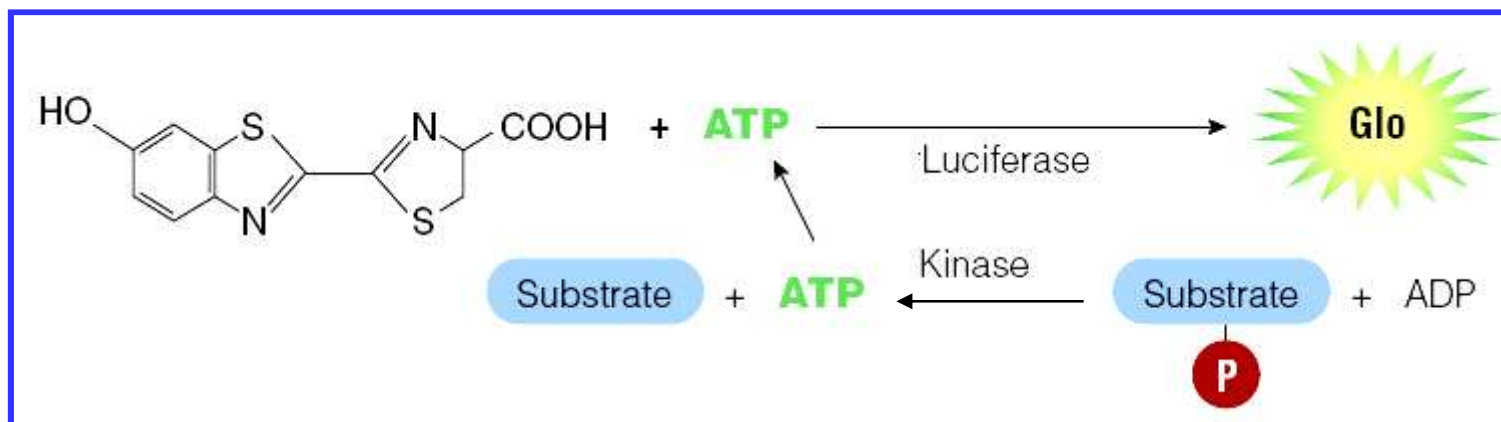
- **bioluminescence resonance energy transfer**
  - neradiační přenos energie z luminiscentního donoru na fluorescentní akceptor
  - vyskytuje se také in vivo (rod *Renilla* obsahuje luciferasu emitující modré světlo, BRET přenosem na GFP se ale mění na zelené)
  - účinnost BRET se stanovuje jako poměr intenzit emise akceptoru a emise donoru - eliminují se tak vlivy techniky měření, počtu buněk, prostředí
- **aplikace in vivo - studium interagujících biomolekul**
  - jeden z partnerů se na úrovni DNA sfúzuje s genem luciferasy (rluc), druhý partner pak s genem GFP
- **výhody**
  - není problém s fotorozkladem
  - lze studovat buňky citlivé na světlo, případně buňky s vysokou přirozenou autofluorescencí
- **při sterických problémech lze použít velmi malou luciferasu z rodu *Gaussia* (20 kDa)**

## **Bioluminescence vs. fluorescence**

- **F** - vysoký jas, excitované stavy mohou vznikat rychle díky masívnímu excitačnímu záření (napumpování energie)
  - ale zvyšuje se i signál pozadí, rozhoduje poměr signál/šum
  - detektory nerozliší excitační a emitované fotony (geometrická diskriminace ani filtry nejsou 100% účinné)
  - emitují i nežádoucí fluorofory přítomné v komplexním biomateriálu
  - uplatní se při zobrazování detailů - rozhraní, kdy S/N nemá takový vliv
  - mikroskopie, cytometrie, kdy stejně optická konstrukce limituje citlivost detektoru
- **BL** - nižší intenzita světla, ale současně prakticky nulové pozadí
  - uplatní se při "větších" vzorcích, kdy je pouze jednoduchá optika (žádné filtry) a detekce fotonů je tedy efektivnější (detektor blíže vzorku)
  - stanovení ve zkumavkách, v mikrodestičkách, detaily u větších organismů (myši, ...)
  - široká lineární oblast (6 až 8 koncentračních řádů)
  - při bioanalytických stanoveních dosahuje 10 až 1000x vyšší citlivosti a limity detekce ( $10^{-20}$  mol, cca  $10^4$  molekul/vzorek, několik molekul v buňce)
  - luminofor je chráněn při emisi uvnitř bílkovinného obalu

# Acetátkinasa

- jako značka pro vysoce citlivá imunostanovení
- generuje ATP z acetylfosfátu a ADP
- vzniklé ATP se pak použije pro vyvolání bioluminiscence luciferinu s luciferasou
- citlivost až  $10^{-22}$  mol

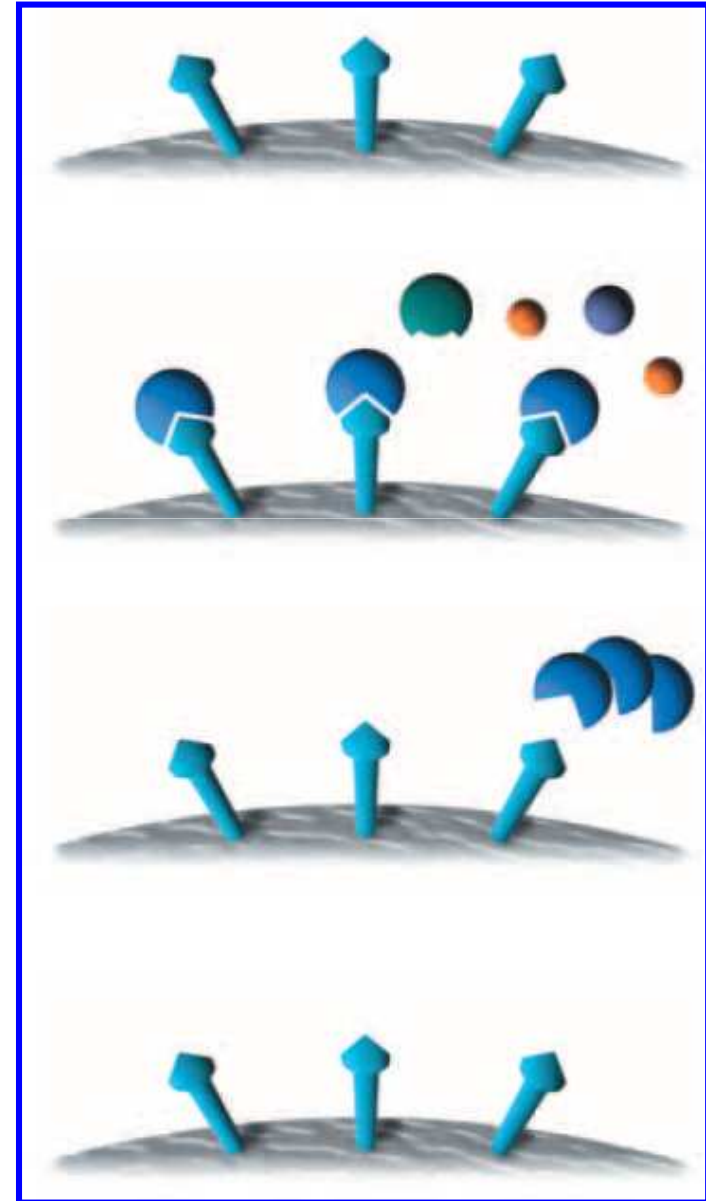


# **Imobilizace biomolekul v afinitní chromatografii**

- **separační postupy využívající vysokou specifitu bioafinitních interakcí - afinitní chromatografie**
- **možnost opakovaného použití biomolekul - snížení pracovních nákladů**
  - **imobilizované enzymové reaktory**

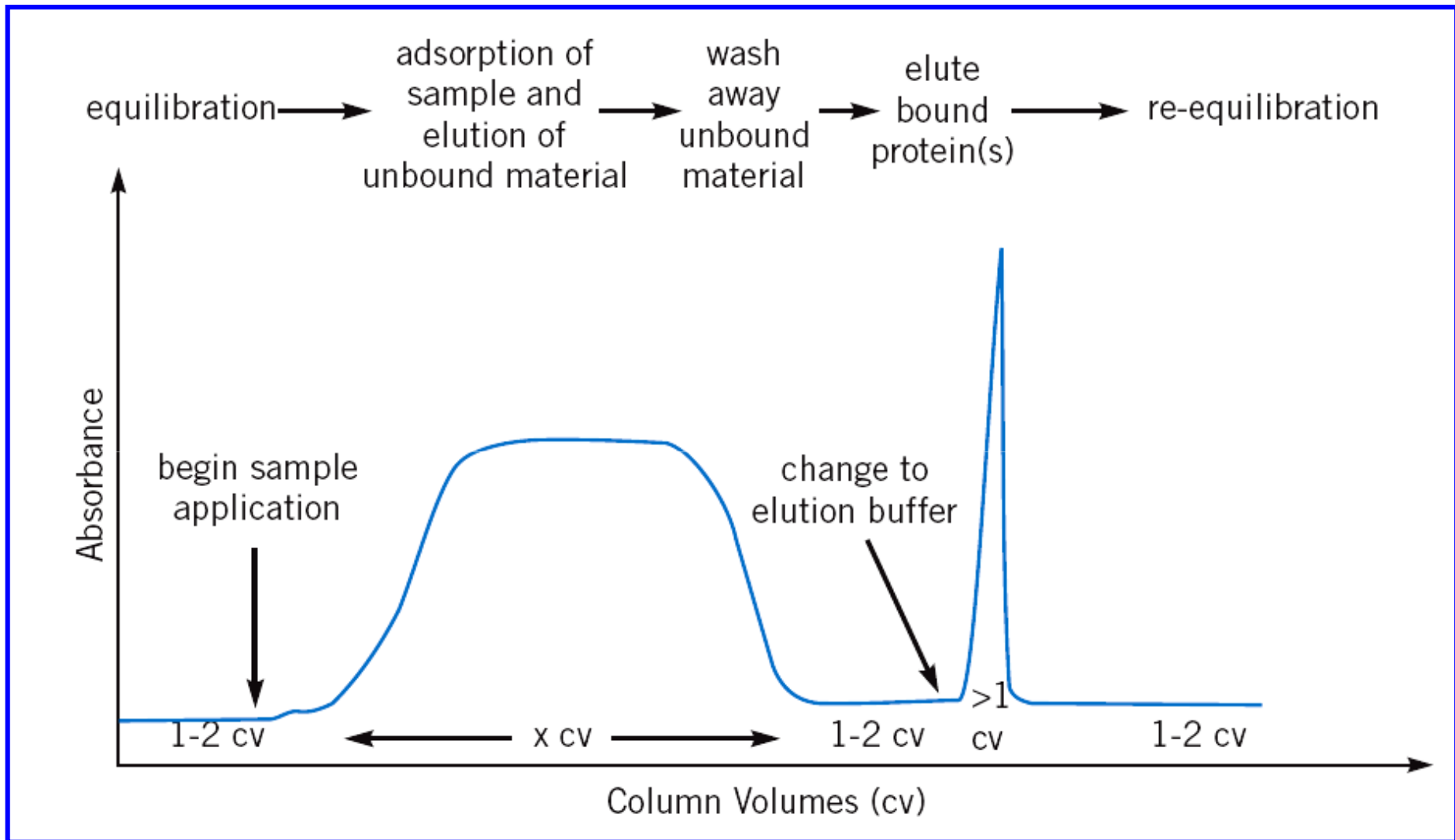
# Afinitní chromatografie

- separace biomolekul na základě reversibilní interakce s ligandem imobilizovaným na vhodném nosiči
- ekvilibrace matrice ve vazebném pufru
- nanesení vzorku za podmínek, které jsou vhodné pro vznik afinitního komplexu, vymytí nenavázaných složek vzorku
- uvolnění biomolekuly změnou podmínek
  - přidání volného kompetujícího ligandu
  - změna pH, iontové síly, polarity, ...
  - biomolekula se získá v čisté podobě a v zakoncentrovaném stavu
- reekvilibrace nosiče s vazebným pufrům





# Průběh afinitní separace



## **Nosiče (bio)ligandů**

- **ve vodě nerozpustné materiály obvykle sférického tvaru**
  - kuličky "beads"
  - gelové materiály
  - membránové separační techniky
  - monolitické materiály
  - magnetické nosiče
- **v zásadě lze připravit vlastní materiály, je vhodnější používat komerčně dostupné matrice**
  - výrobci poskytují materiály dostatečně reprodukovatelné
  - charakterizující informace, bohatá firemní literatura
  - doporučené postupy imobilizace
- **povrchové reaktivní nebo derivatizovatelné skupiny**
  - obvykle nejčastěji hydroxyly - dobře se aktivují, vykazují nízkou nespecifickou adsorbci
  - aminy, karboxyskupiny - snadná vazba biomolekul, ale vyšší podíl nespecifických interakcí (mohou nést náboj)

## **Mechanické parametry nosičů**

- **mechanická a chemická stabilita nosiče může být aktivačními reakcemi negativně ovlivněna**
- **mechanické parametry**
  - ovlivňují možnost použití vysokých tlaků a rychlých průtoků
  - rigidní nosiče na bázi skla a silikátů či zesíťovaných polymerů
  - měkké gelovité nosiče jsou málo odolné a nemusí snášet ani míchání při derivatizaci
- **chemická odolnost**
  - vhodná pro použití různých typů solventů
  - možnost pracovat v širším rozsahu pH mezi 3 až 11
- **odolnost vůči mikroorganismům**
  - uchovávání v chladu, přidání konzervační bakteriocidních činidel (azid)

# Průtočné vlastnosti

- **dobry průtok přes daný nosič závisí na průměru použitých částic**
  - pro běžné účely v laboratoři vyhovuje asi 100  $\mu\text{m}$
  - přesná definice průměru není pro afinitní techniky až tak kritická jako pro jiné druhy chromatografických separací
  - typický rozsah pro Sepharosu CL-6B je 45 až 160  $\mu\text{m}$
  - pohyb kapaliny přes sloupec mohou komplikovat jemné fragmenty vznikající mechanickým poškozením částic např. při intenzivním míchání
- **velikost částic společně s porozitou samozřejmě ovlivňují kapacitu připraveného sloupce**
  - vzrůstá pro menší částice

## Vazebná kapacita nosiče

- udává množství cílové molekuly navázané na jednotku nosiče
- teoretická vs. praktická
  - vhodnější je vztahovat tento údaj na nosič při reálném použití, tedy ne v suchém, ale v nabobtnalém stavu
  - často se může výsledná kapacita např. pro protein výrazně odlišovat od udávaného množství reaktivních skupin pro immobilizaci ligandu (výrobci počítají s malou molekulou ...)
  - dostupnost molekul ligandu na povrchu a uvnitř v pórech matrice
  - roli hraje také vzdálenost mezi povrchem matrice a ligandem
  - spojovací můstková část ("spacer" nebo "linker"), jeho délka může výrazně ovlivnit probíhající afinitní interakci

## **Nespecifické interakce**

- **nespecifická vazba balastních molekul v separovaném roztoku probíhají na bázi iontových nebo hydrofobních vazeb**
- **proces lze ovlivnit**
  - složením pracovních pufrů
  - promývacími kroky
  - také volbou teploty
- **obvykle nelze zcela vyloučit oba typy rušivých vazeb**
- **různé typy matric vždy vykazují zbytkové interakce**

## **Volba nosiče**

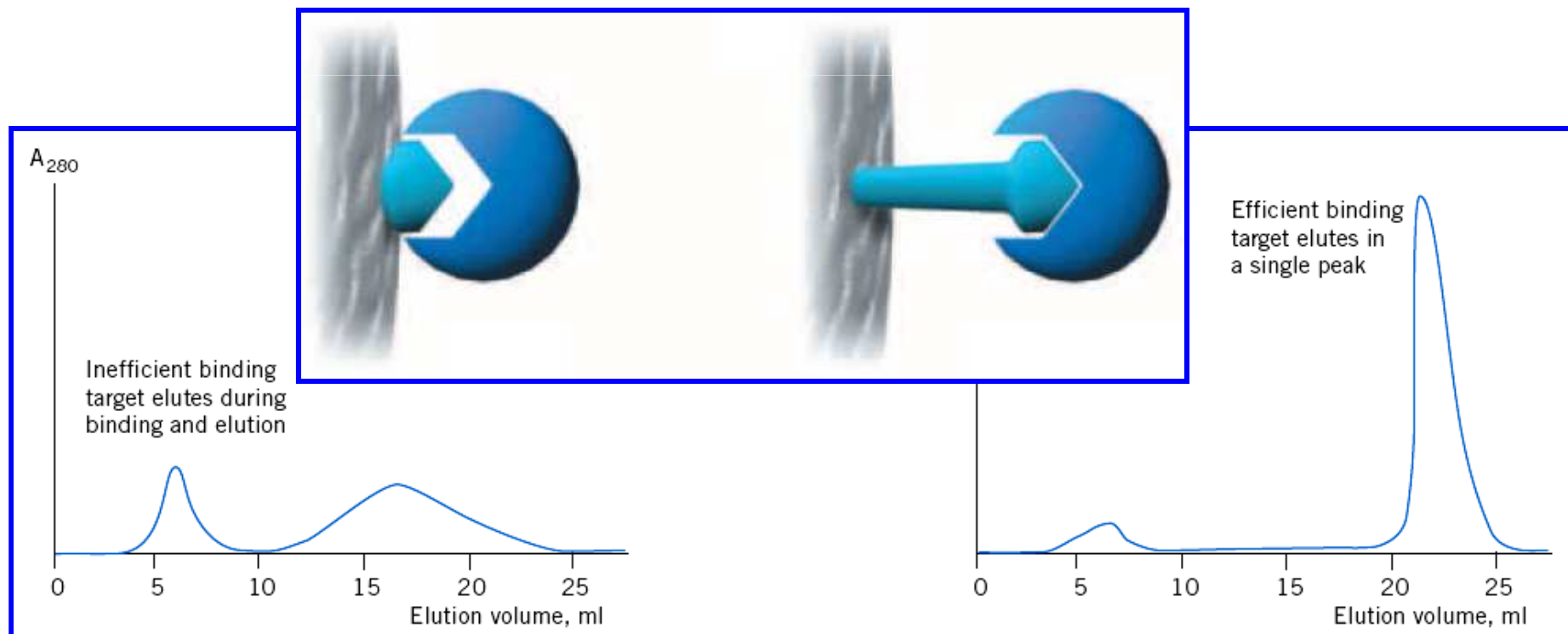
- kombinace výše zmíněných parametrů
- cena a dostupnost daného materiálu
- předchozí zkušenosti

## **Postup modifikace**

- nosič
- nosič s aktivními skupinami
- imobilizace bioligandu
- blokování zbylých aktivních míst
  - glycin, ethanolamin, glycerol
  - hydrolysa při zvýšeném pH
- volba pracovního uspořádání
  - naplnění do kolony, ...

## Způsob vazby ligandu

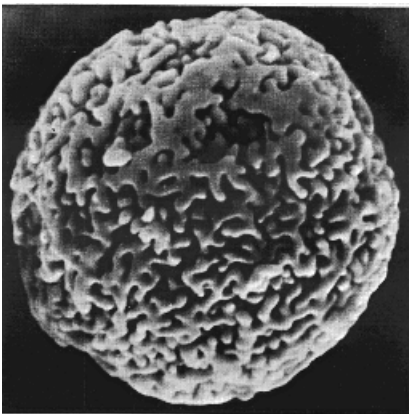
- vliv vzdálenosti ligandu od povrchu nosiče - ovlivní se délkou spojovacího můstku - "linker", "spacer arm"
  - je potřebný pro ligandy menší než asi 1 kDa
  - příliš krátký - biomolekula ligand neváže efektivně, sterické zábrany vzniku pevného biokomplexu
  - příliš dlouhý - balastní biomolekuly s ním mohou reagovat nespecificky





# Silikagel

- "silica",  $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , voda chemicky vázaná v nestechiometrickém poměru, obsahuje vazby
  - siloxanové (Si-O-Si)
  - silanolové (Si-OH)
- amorfní struktura, výborná mechanická stabilita - vysoké tlaky
- omezená pH stabilita (mezi 2 a 8)
- náchylný na nespecifické interakce
- povrchové silanolové skupiny (Si-OH) se musí aktivovat, např. silanizací

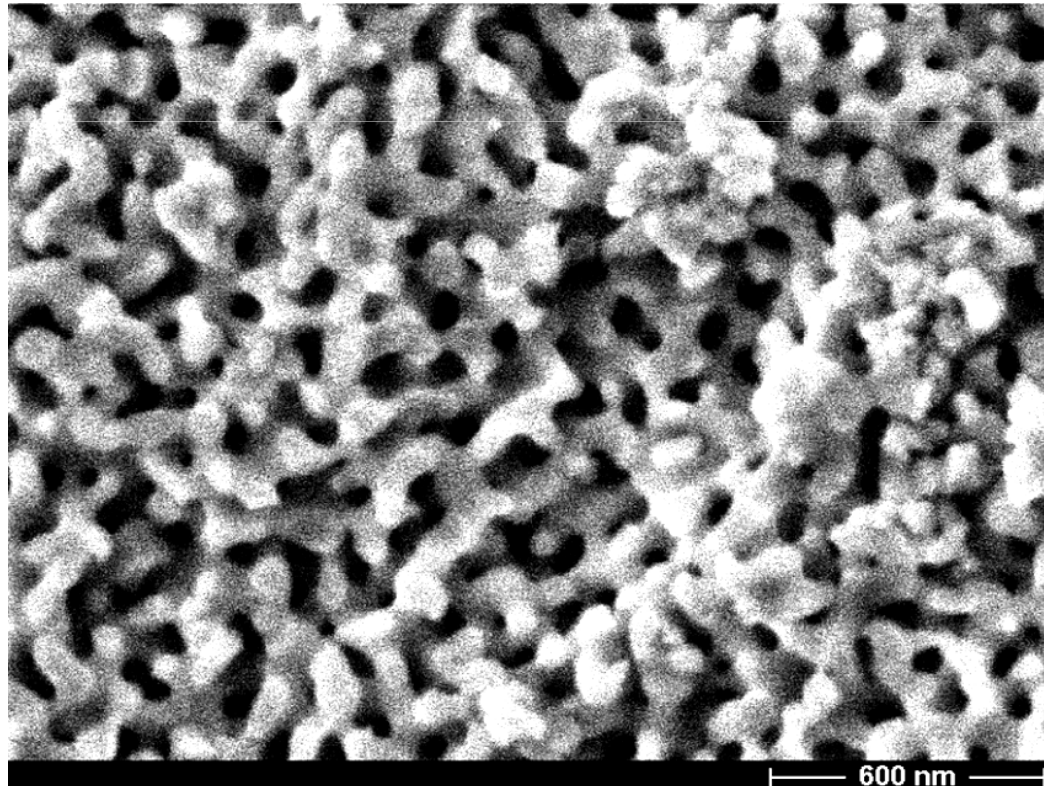


# Poresní sklo

- **CPG, "controlled pore glass" stejně jako obdobné anorganické silikáty, alumina a zeolity vynikají především výbornými mechanickými vlastnostmi**
  - pro techniky pracující s vysokými tlaky
  - poměrně křehké, při aktivacích raději jemně třepat a nemíchat
  - při výměně roztoků je dobré používat vakuum, aby se odstranily bublinky zachycené v pórech
- **příprava - borosilikátové sklo se zahřeje - dojde k separaci borátové a silikátové fáze, boráty se odstraní vylouhováním, vzniknou uniformní póry**
- **chemická stabilita**
  - toleruje dobře kyselé pH
  - v alkalické oblasti nad pH 8 se rychle degraduje
- **pro modifikace se využívá silanizace**
- **komerčně dostupné jsou aminované CPG i jiné deriváty**
- **nízká nespecifická adsorpce biomolekul**

# CPG

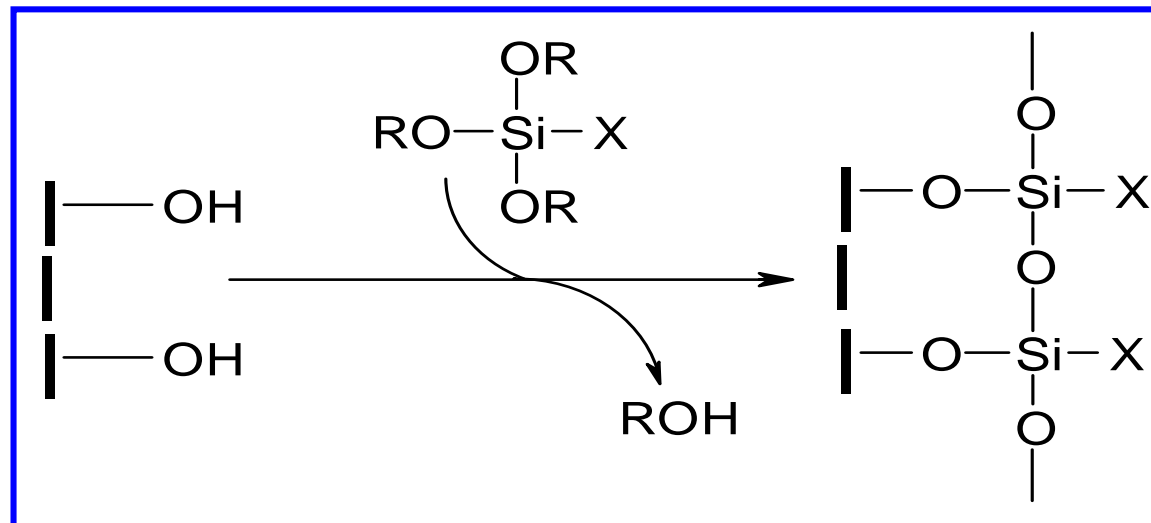
- vysoký povrch uvnitř pórů
- velikosti částic:
  - grade A: 80/120 mesh, 125–177  $\mu\text{m}$
  - grade B: 120/200 mesh, 74 – 125  $\mu\text{m}$
  - grade C: 200/400 mesh, 37 – 74  $\mu\text{m}$



Průměr pórů (nm)	Plocha ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
7.5	340
17	150
35	75
100	25
200	13
300	9

# Silanizace

- aktivace inertních povrchů pokrytých vrstvou oxidu (sklo, silikáty, slída, oxidy kovů)
  - v hydratovaném stavu obsahuje hydroxylové skupiny, např. Si-OH, silanolový zbytek
- reakcí se silany vzniká spontánně uspořádaná vrstva
  - obvykle několik vrstev, ne monovrstva
  - nepoužívají se organické halogenované silany (jsou příliš reaktivní a žádná další skupina už by nezbyla), ale méně reaktivní alkoxyderiváty
- silanizací se na povrch modifikovaného nosiče zavedou vhodné reaktivní skupiny X



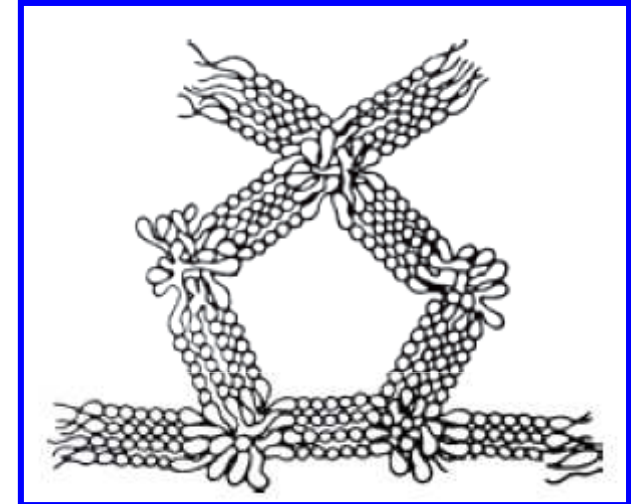
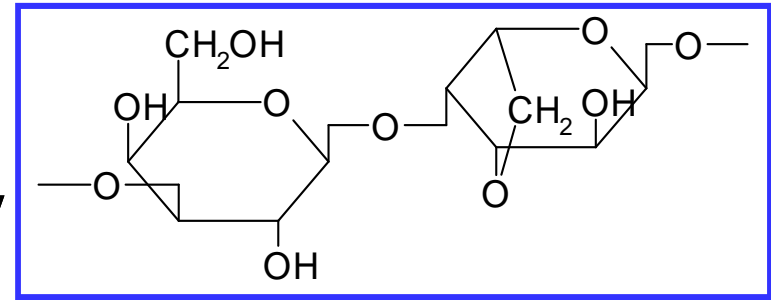


## Silanizační reakce

- Ize provádět z organické fáze
  - 10% roztok silanu v toluenu, v něm se daný povrch refluxuje 12 až 24 hod, po promytí toluenem či acetonem a vysušení se dále zahřívá 2 až 4 hod při 110 °C
- z vodné fáze se dosáhne menší vazebná kapacita, ale vrstva je stabilnější při použití ve vodném prostředí
  - povrch se hydratuje 30 min povařením ve vodě
  - zahřívá 3 až 4 hod při 75 °C v 10% vodném roztoku silanu, pH 4
  - po usušení se zahřívá přes noc při 110 °C
- odpařovací nanesení je nejjednodušší
  - povrch se inkubuje 1 hod v 1% roztoku silanu v acetonu
  - po opláchnutí acetonem a vysušení se zahřívá 1 hod při 110 °C
- nanášení silanu z vodné fáze nebo z polárních rozpouštědel vede ke tvorbě složitějších struktur (4 až 5 vrstev silanu)

# Agarosa (Sepharosa)

- polysacharid tvořen z D-galaktosy 3-anhydrogalaktosy
- poly- $\{\beta\text{-}1,3\text{-D-galaktosa-}\alpha\text{-}1,4\text{-}(3,6\text{-anhydro})\text{-L-galaktosa}\}$
- sekundární a primární struktura je komplexní, vláknitá s přítomnými póry
- přirozená je mechanicky labilní (zahřátím nad 40 °C se rozpouští)
  - modifikuje se zesíťováním pomocí epichlorhydrinu nebo divinylsulfonu
  - ztratí se tím část využitelných hydroxylových skupin
  - zesíťená je relativně stabilní (rozpouštědla mísitelná s vodou, pH 3 až 14),
  - neměla by se nechat vyschnout



# Sepharosa

- **nejběžnější je Sepharosa CL-6B**
  - zavedená firmou Pharmacia (Amersham Biosciences, dnes GE Healthcare)
  - CL = „crosslinked“, 6B = 6% „beaded“ agarose
  - póry dostatečné pro biomolekuly do 1 MDa, varianty 2B a 4B do 10 MDa
  - nosič dodávají i firmy BioRad jako Bio-Gel A a IBF jako Ultrogel
- **pro aktivaci vhodné metody zaměřené na hydroxylové skupiny**

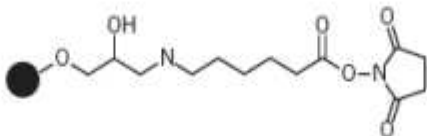
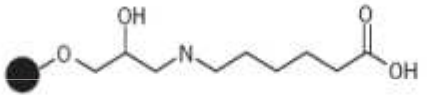
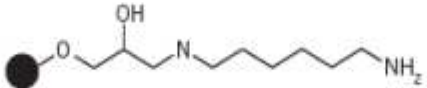
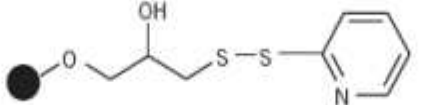
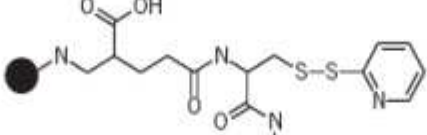
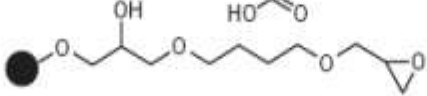
Sepharose	Forma (částice vesměs 90 μm)
High Performance	6% highly cross-linked agarose (34 μm)
6 Fast Flow	6% highly cross-linked agarose
4 Fast Flow	4% highly cross-linked agarose
CL-6B	6% cross-linked agarose
CL-4B	4% cross-linked agarose
6B	6% agarose
4B	4% agarose



## Preaktivované Sepharosy

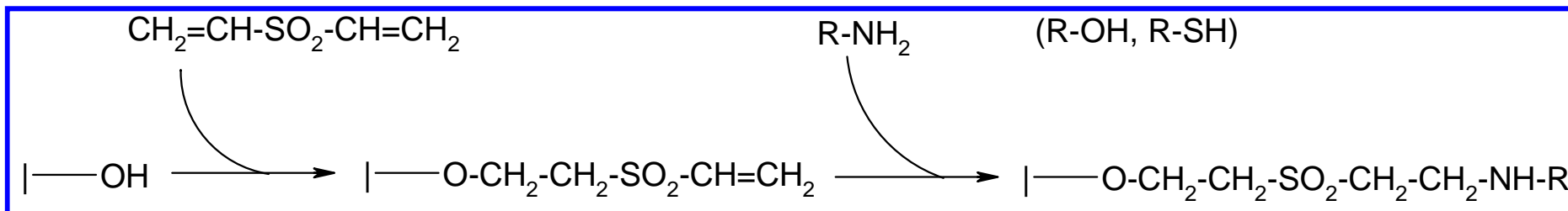
NHS-activated Sepharose High Performance	12-atom. hydrofil. můstek, přes $\text{-NH}_2$
NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow	viz výše
CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow	vazba primárních $\text{-NH}_2$ skupin
EAH Sepharose 4B	10-atom. můstek, přes $\text{-NH}_2$
ECH Sepharose 4B	9-atom. můstek, přes $\text{-COOH}$
Epoxy-activated Sepharose 6B	12-atom. hydrofil. můstek, přes $\text{-OH}$ , $\text{-NH}_2$ nebo $\text{-SH}$ skupiny
Activated Thiol Sepharose 4B	10-atom. můstek pro reversibilní vazbu přes volné thioskupiny
Thiopropyl Sepharose 6B	4-atom. hydrofilní pro reversibilní vazbu proteinů a thiolovaných ligandů. Reaguje i s těžkými kovy, alkyl- a arylhalogenidy a dává adiční reakce s $\text{C=O}$ , $\text{C=C}$ a $\text{N=N}$ vazbami

# Preaktivované Sepharosy

Chemical group on ligand	Length of spacer arm	Structure of spacer arm	Product
<b>Proteins, peptides, amino acids</b>			
amino	10-atom		HiTrap NHS-activated HP NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow
	None	–	CNBr-activated Sepharose 4B CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow
	10-atom		ECH Sepharose 4B
carboxyl	11-atom		EAH Sepharose 4B
thiol	4-atom		Thiopropyl Sepharose 6B
	10-atom		Activated Thiol Sepharose 4B
	12-atom		Epoxy-activated Sepharose 6B

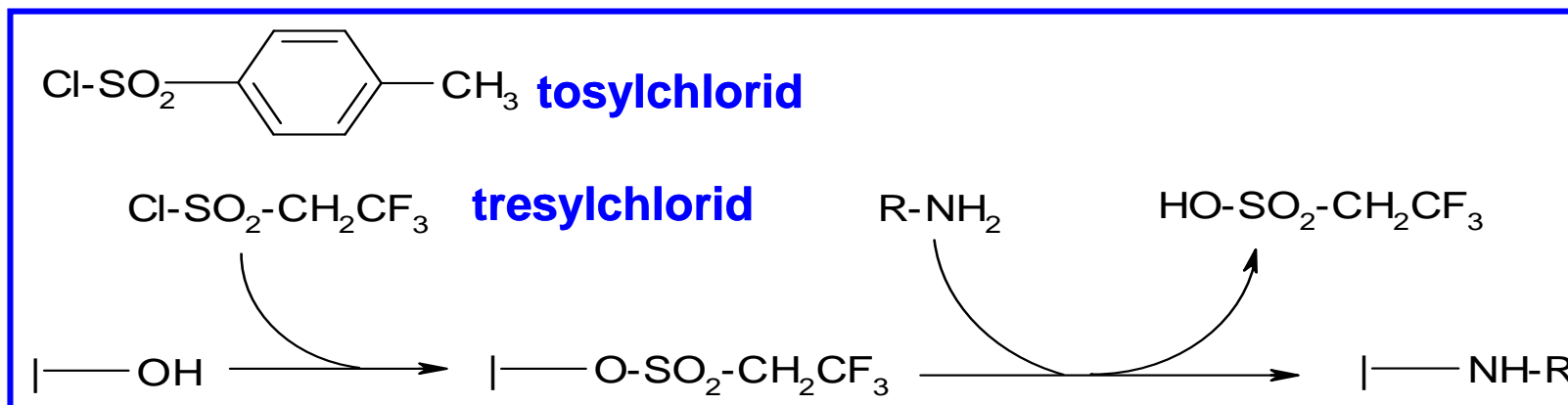
## Aktivace -OH v sacharidových maticích

- epoxyskupiny (bisoxiran, epichlorhydrin)
- bromkyanová metoda
- divinylsulfon



- **sulfonylchloridy**

- tosylchlorid = *p*-toluensulfonylchlorid
- tresylchlorid = 2,2,2-trifluorethansulfonylchlorid



## Srovnání reakčních parametrů

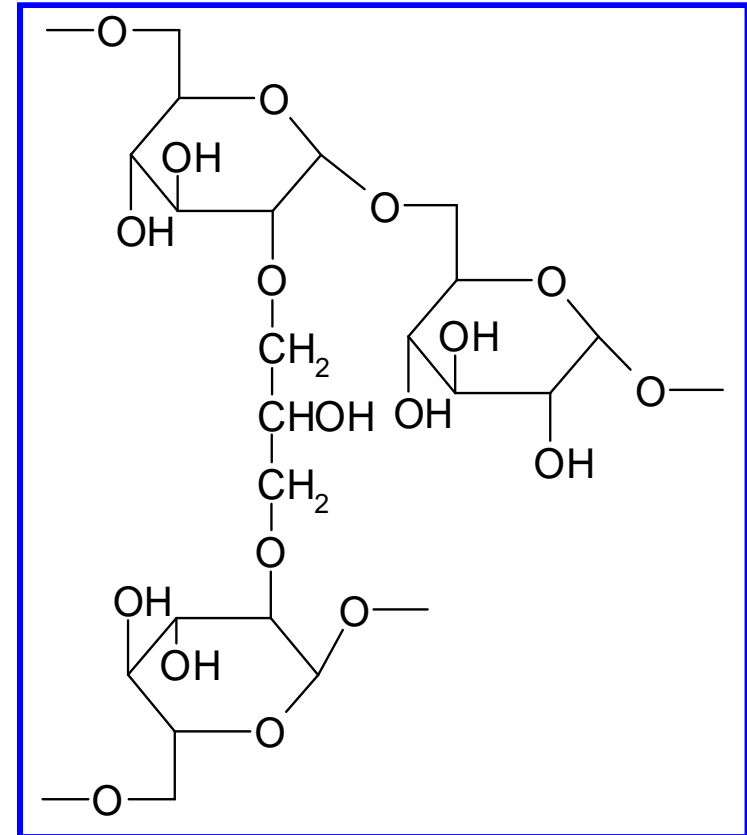
Aktivní skupina	Reagující skupiny ligandu	Reakční podmínky
epoxy	- NH <sub>2</sub> - OH - SH - COOH	pH 5 - 12 doba 4 - 72 hod teplota 4 - 60° C
bromkyan	- NH <sub>2</sub>	pH 7 - 10, doba 1 - 12 hod, teplota 4 - 25° C
divinylsulfon	- NH <sub>2</sub> - OH - SH	pH 6 - 11, doba 2 - 24 hod teplota 4 - 25° C
tresyl	- NH <sub>2</sub>	pH 7 - 9, doba 2 - 16 hod, teplota 4 - 25° C

## **Množství navazovaného ligandu - kolik ho použít?**

- **když ho máme dostatek**
  - 10 až 100x molární přebytek vůči přítomným reaktivním skupinám
- **malé biomolekuly**
  - 1 až 20  $\mu\text{mol}$  na 1 ml media (2  $\mu\text{mol}$  typicky)
- **proteinové ligandy**
  - 5 až 10 mg na 1 ml media
- **protilátky**
  - 5 mg proteinu na 1 ml media
- **velmi slabě interagující systémy**
  - co nejvyšší koncentrace ligandu
  - vyšší koncentrace vede k vyšší vazbě

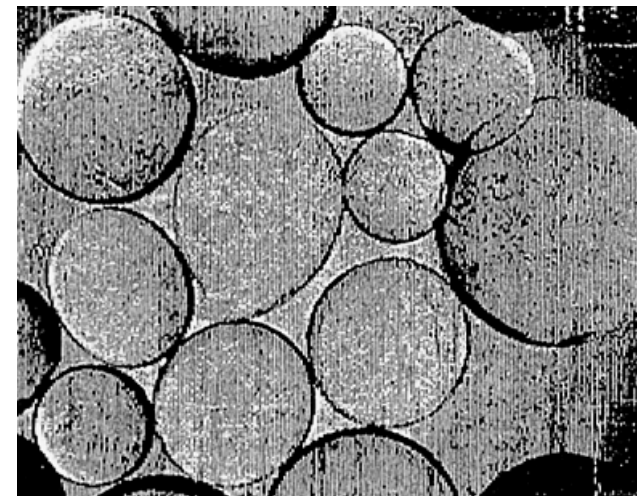
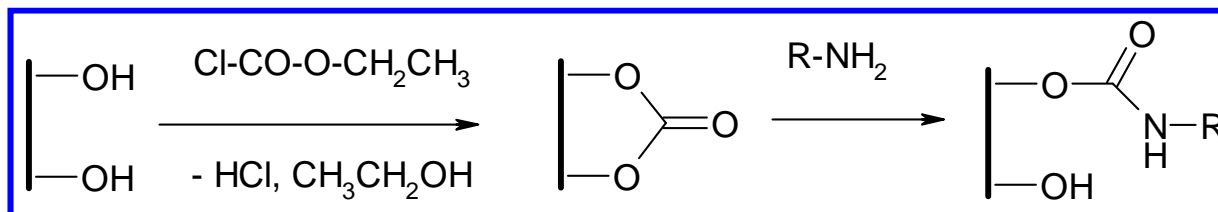
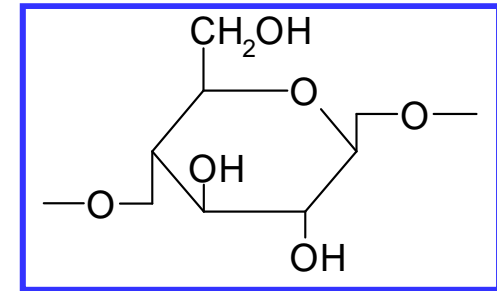
# Dextranové nosiče

- materiály **Sephadex**, **Superdex**
- glukosové jednotky spojené 1,6 vazbou, větvení i přes 1,2 / 1,3 a 1,4 spoje
- mechanicky málo stabilní
- náchylné na bakteriální degradaci
- glykosidické vazby nestabilní při nízkém pH



# Celulosa

- použití není tak běžné, spíše v průmyslové oblasti
- velmi často se objevuje ve formě membrán
- lineární polymer z 1,4-β-D-glukosových jednotek
- nativní polymer je ve formě vláken bez poretní struktury, reinformovaná celuloza je ve formě kuliček
- snáší pH 3 až 10, stabilnější je při kyselé oblasti pH, při pH 7 může být autoklávována
- vláknitá celuloza se dodává jako suchý prášek
  - Whatman, BioRad, Schleicher & Schuell
  - v roztoku je náchylná na mechanické poškození (NE magn. míchání)
- aktivace - karbonyldiimidazol a divinylsulfon  
**chloroformiát**



- celulosové částice, průměr kolem 450 μm

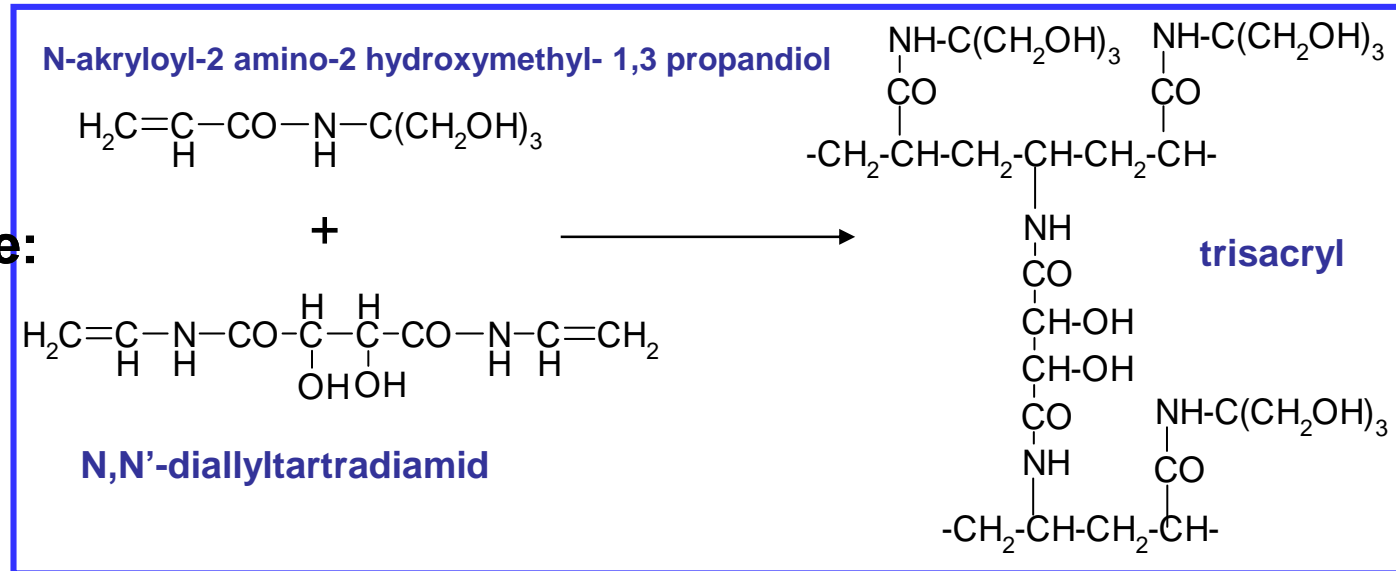
# Polyakrylamidové nosiče

- v biochemické oblasti velmi oblíbené
- připravují se kopolymerací akrylamidu a N,N'-methylenbis(akrylamidu), probíhá radikálovým mechanismem v přítomnosti tetramethyldiaminu (TEMED) a peroxodvojsíranu amonného jako iniciátoru
- **Bio-Gel P** dodává materiál firma BioRad
  - póry poskytují vylučovací limity od 2 do 400 kDa
  - nízké nespecifické vazby
  - dobrá pH stabilita (2 – 10)
- nevýhodou je malá mechanická stabilita
  - variabilita matrice při změně složení pufrů
  - nízké průtočné rychlosti
- aktivace se nejnáz provádí částečnou hydrazinolýzou při 50 °C
  - dostupné jsou i preaktivované materiály (Enzacryl)
- glutaraldehydem - uplatní se adice amidové skupiny na dvojně vazby přítomné v polymerní formě glutaraldehydu.



# Trisacryl

- **kopolymerace:**
- **dodává IBF**

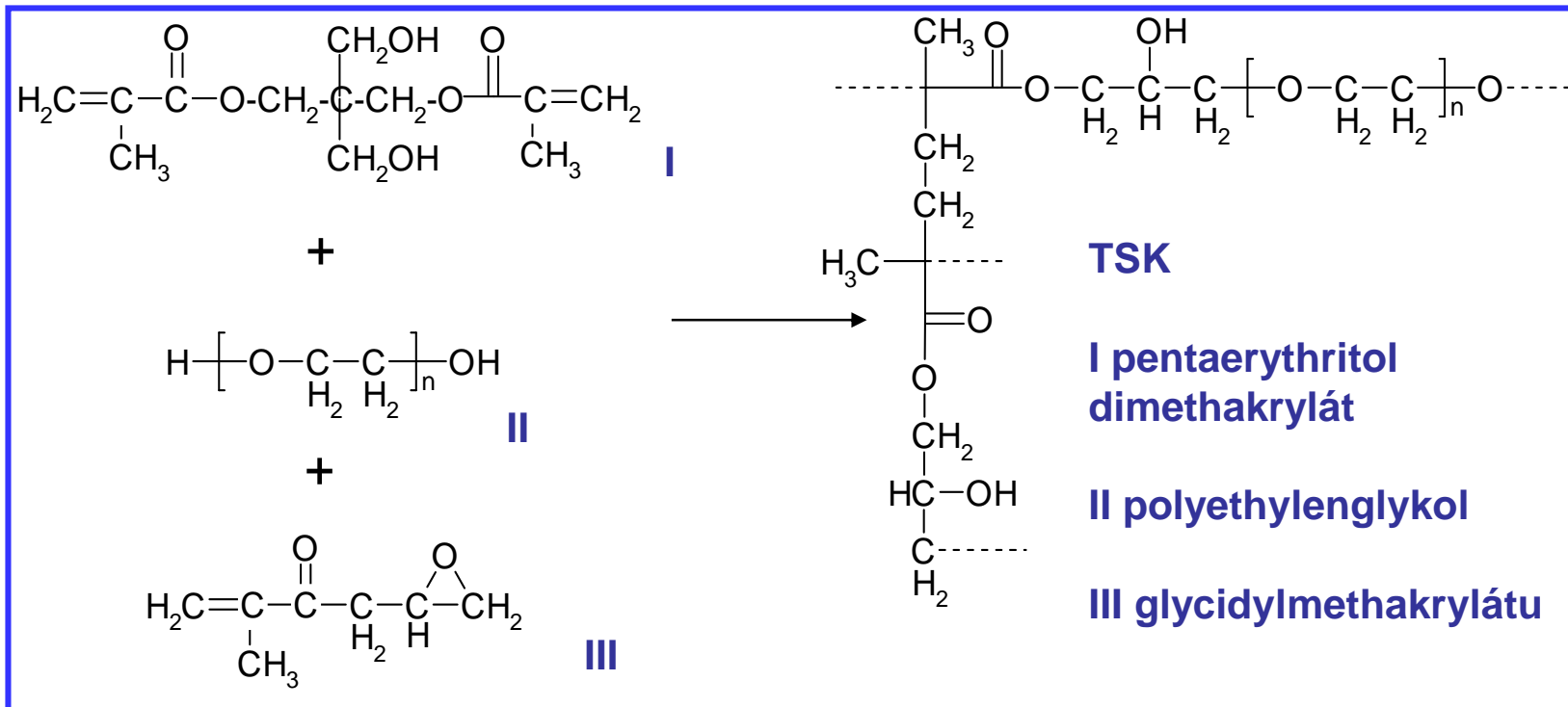


- **tris(hydroxymethylové) uskupení poskytuje materiálu výborné hydrofilní vlastnosti**
- **zesíťovaný charakter přináší zlepšení mechanických vlastností oproti polyakrylamidu**
- **tolerance pH je od 1 do 11**
- **snáší zmražení, teploty do 120 °C a organická rozpouštědla**
- **aktivace je možná pomocí**
  - karbonyldiimidazolu
  - bromkyanu
  - divinylsulfonu

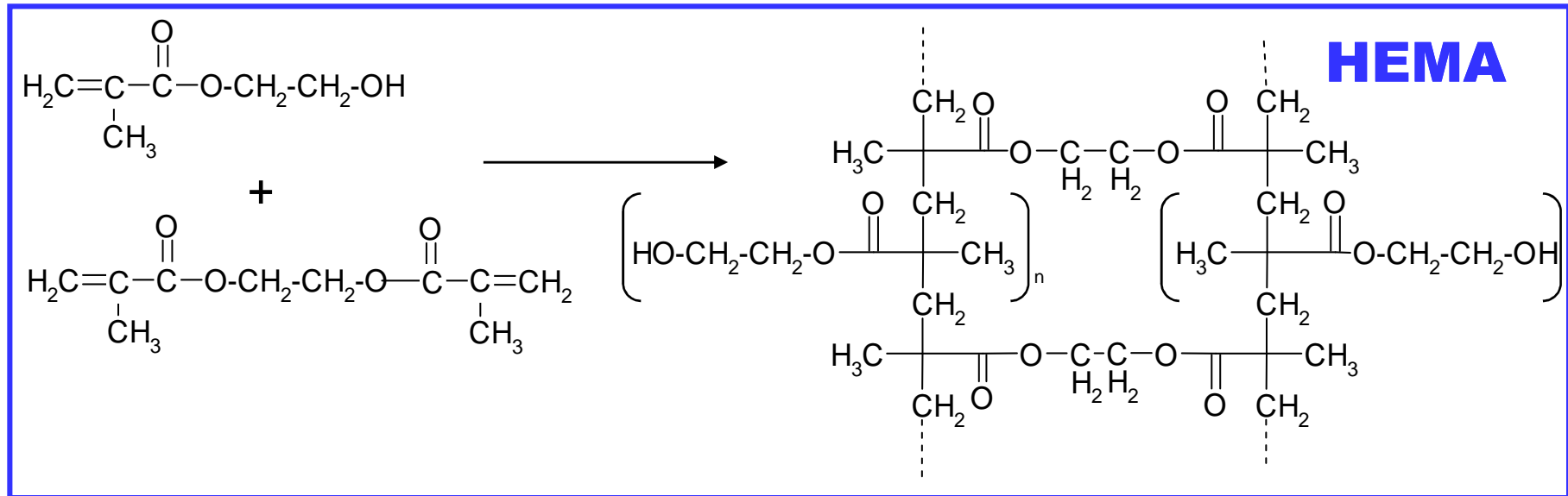
# Sephacryl

- na bázi dextranového gelu s vnesenými allylovými postranními skupinami zesíťovanými pomocí N,N'-methylen-bis(akrylamidu)
- obsahuje tedy lineární glukosové řetězce spojené přes molekuly bis(akrylamidu) a také lineární části polymerního bis(akrylamidu)
- vyrábí Pharmacia
- Sephacryl S-300 a S-400 - vylučovací limity 1,5 a 8 MDa
- gely HR řady - vylepšené průtočné vlastnosti
- materiál je dostatečně chemicky i mechanicky odolný
- aktivace - přes sekundární hydroxylové skupiny

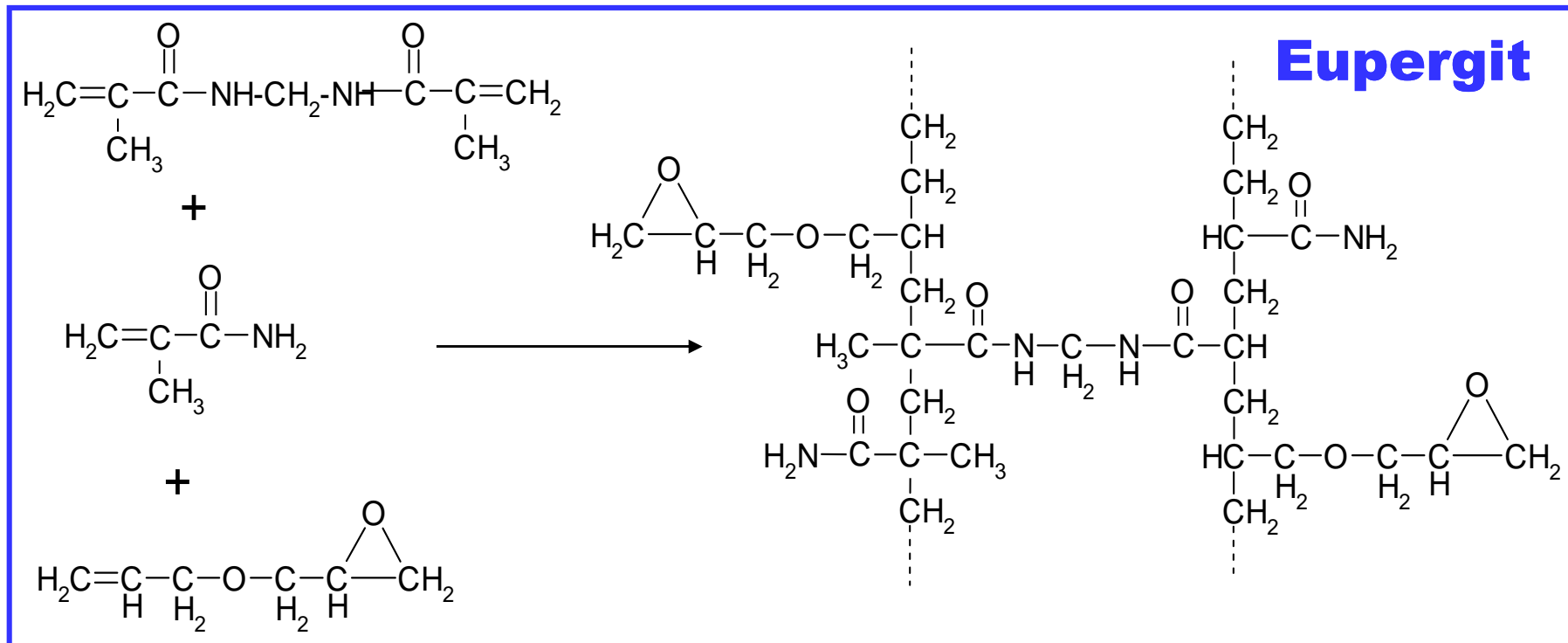
# Methakrylátové matrice



- **TSK-Gel Toyopearl** (vyr. Tosoh, distribuce Merck jako Fractogel TSK)
  - kopolymerace glycidylmethakrylátu, pentaerythritol dimethakrylátu a polyethylenglykolu - velký počet hydroxylů a etherových vazeb
- částečně hydrofilní, výborné mech. vlastnosti, tolerancí pH 2 až 12
- velikosti S („superfine“, 20 až 40  $\mu\text{m}$ ), F („fine“, 30 až 60  $\mu\text{m}$ ) a C („coarse“, 50 až 100  $\mu\text{m}$ )
- střední typ rozsah 50 kDa až 5 MDa - nejvhodnější pro afin. separace



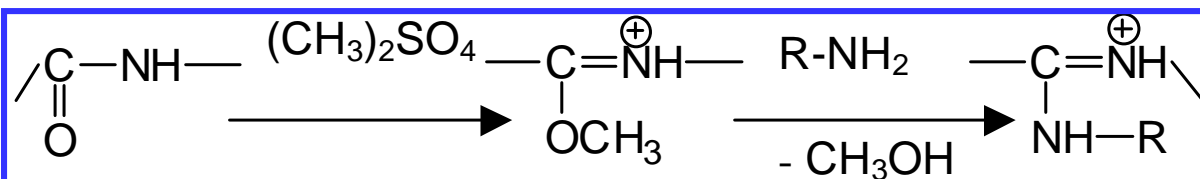
- **poprvé připraven v Československu**
  - distribuován pod názvy Separon a **Spheron**
  - vzniká kopolymerací 2-hydroxyethylmethakrylátu se síťujícím ethylendimethakrylátem
  - zesíťovaná struktura vytváří makro i mikropóry, které poskytují vysokou odolnost vůči tlaku
- **chemická odolnost je pro pH 2 až 12**
  - krátké promytí je možné i 2 M NaOH či 2 M HCl
- **tepelná odolnost až do 170 °C**
- **dodávané velikosti částic jsou 5, 10 a 60 μm**
  - v tuzemsku nyní vyrábí firma Tessek
  - k dispozici i předaktivované matrice s různými reaktivními skupinami



- kopolymerací methakrylamidu, N,N'-methylen-bis(methakrylamidu) a složky s oxiranovou skupinou, glycidylmethakrylátu nebo allylglycidyletheru (na obr. dole)
- Rohm Pharma, v USA jako Spectra/Cryl
- porézní částice 30, 150 a 250  $\mu\text{m}$ , neporézní 1  $\mu\text{m}$ 
  - mechanická stabilita výborná
- imobilizace probíhá adicí na oxiranové uskupení
  - reagovat mohou primární aminy, sulfhydrylové skupiny či hydroxyly
  - doporučována přítomnost fosfátového pufru, urychlí se tím reakce a může probíhat blízko neutrálního pH

# Polyamidové nosiče

- **polykondenzační reakce**
  - Nylon 66 z 1,6-diaminohexanu a hexan-1,6-dikarboxylové kyseliny
  - tuzemský Silon vzniká kondenzací  $\epsilon$ -kaprolaktamu
  - ve formě membrán, sítěk, kuliček a trubiček pro imobilizaci enzymů
- **přírozený materiál má pro imobilizaci málo volných konc. skupin**
  - je nutné jeho strukturu částečně narušit opatrnou hydrolyzou
  - asi 3 M HCl, doba působení závisí na formě materiálu, 10 sec až 1 hod
- **aktivační postupy, které amidovou vazbu nepřerušují**
  - O-alkylace peptidové vazby oxoniovou solí (triethyloxonium tetrafluoroboritan) - dimethylsulfátem
  - vzniklý imidoester reaguje v slabě alkalickém prostředí s aminoskupinou (lyzin, 1,6-diaminohexan) za vzniku amidinu
  - kladný náboj zvyšuje polaritu polymeru
  - získá se větší povrchová hustota využitelných karboxy nebo aminoskupin
  - na trhu dostupná řada aktivovaných membrán



**Aktivace polyamidu dimethylsulfátem**

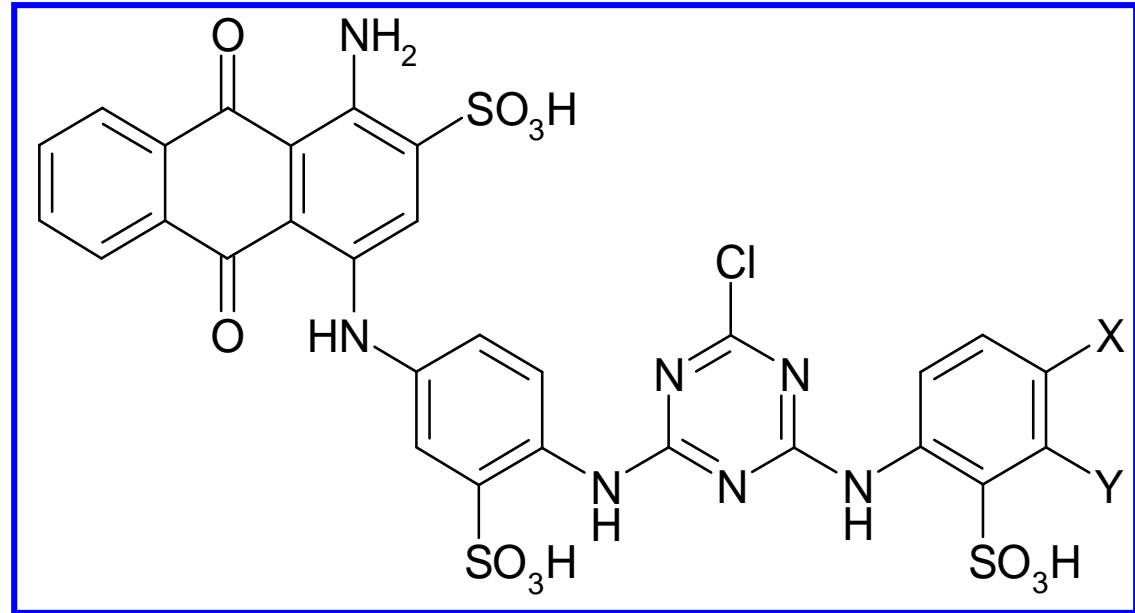
## Skupinově specifické ligandy

- interaguje s třídou podobných biomolekul - skupinová separace

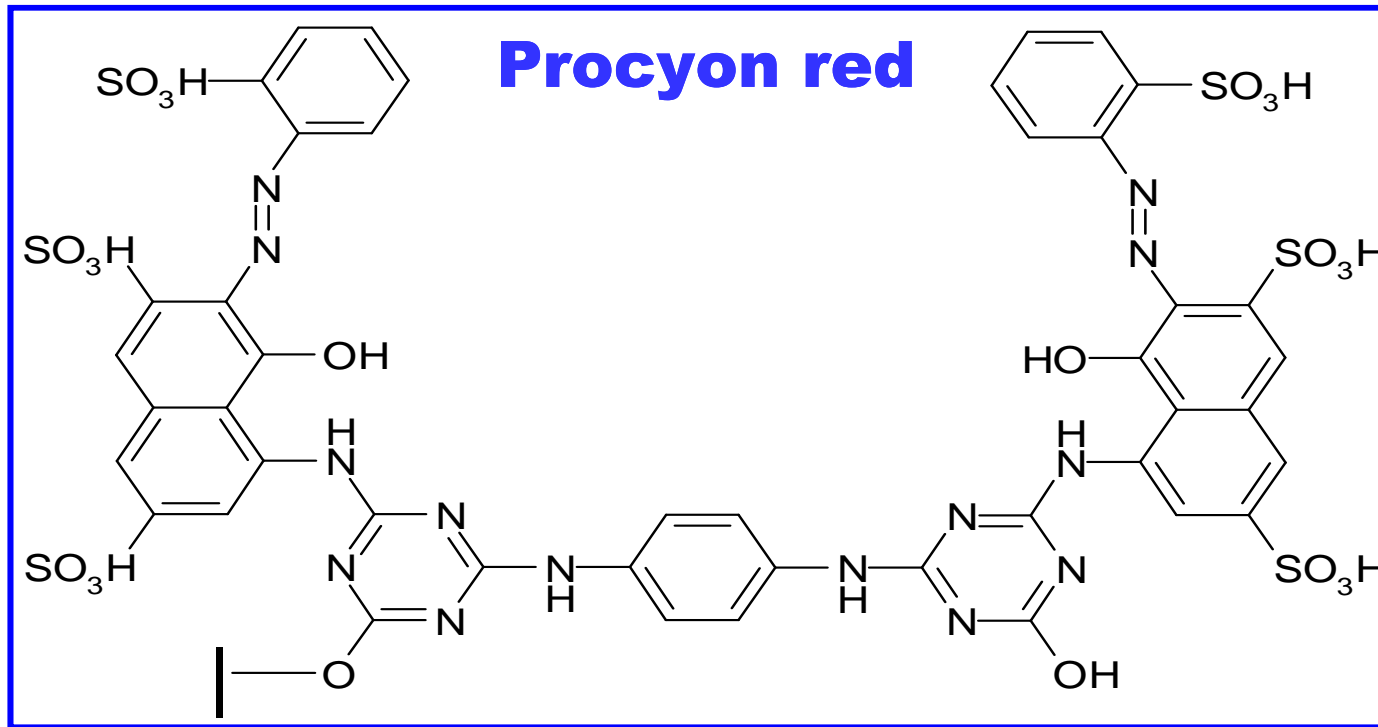
<b>NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, Blue B</b>	<b>dehydrogenasy</b>
<b>5'-AMP, Blue F3G-A</b>	<b>NAD<sup>+</sup>-dependentní enzymy</b>
<b>2',5'-ADP, Red HE-3B</b>	<b>NADP<sup>+</sup>-dependentní enzymy</b>
<b>kalmmodulin, Blue B</b>	<b>kinasy</b>
<b>glutathion</b>	<b>glutathion-S-transferasa (fúzní proteiny)</b>
<b>chitin</b>	<b>chitin vážící protein (fúzní proteiny)</b>
<b>amylosa</b>	<b>maltosu vážící protein (fúzní proteiny)</b>
<b>Green A</b>	<b>CoA proteiny, HSA</b>
<b>benzamidin</b>	<b>serinové proteiny</b>
<b>heparin</b>	<b>lipoproteiny, hormony, DNA, RNA</b>
<b>polymyxin</b>	<b>endotoxiny</b>
<b>konkanavalin A</b>	<b>gluko- a manopyranosylové zbytky</b>
<b>poly U, oligo-dT</b>	<b>poly(A)+mRNA</b>

## Cibacron blue F3G-A

- příklad racionálního návrhu skupinově specifického ligandu
- původně textilní barvivo
- váže se pevně do aktiv. místa dehydrogenas namísto přirozeného substrátu NAD<sup>+</sup>
  - antrachinonová část - odpovídá adeninové kapse
  - diaminobenzensulfonát - interaguje s guanidinovou skupinou Arg zbytku
  - triazinový cyklus - atom chloru se váže v pyrofosfátovém místě
- substituenty X a Y pak jemně doladují afinitu ligandu
  - nejvyšší afinitu má derivát s -COOH v meta poloze (Y)
  - vliv na velikost disociační konstanty a tím pevnost vazby na afinitní nosič
- další aplikace - odstranění albuminu
- vazba na nosič - substituce v místě chloru triazinového cyklu, např.  
**Blue Sepharose**



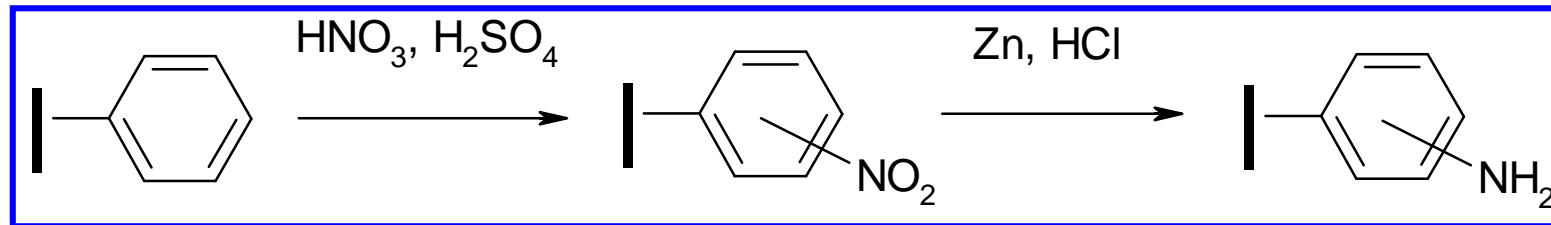




- polycyklické barvivo vykazující jistou strukturní podobnost k NADP<sup>+</sup>
- dále interagují albumin, lipoproteiny, interferon, koagulační faktory
  - méně specifické - elektrostatické a hydrofobní interakce

# Polystyren

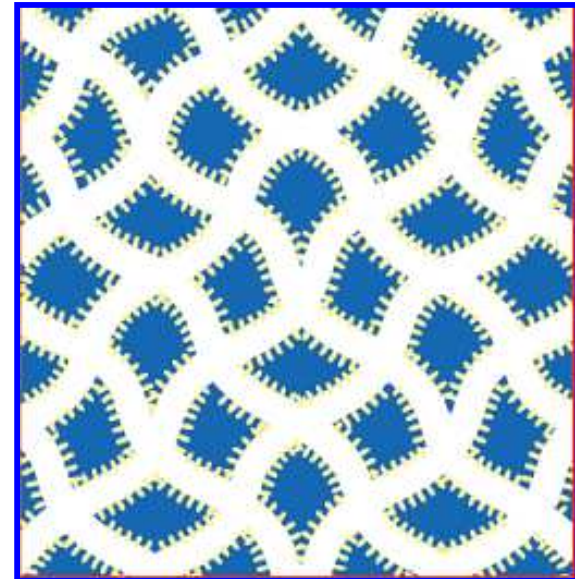
- zejména používán jako materiál pro mikrodestičky
- nejjednodušší immobilizace - adsorpce proteinů na povrch na základě hydrofobních interakcí ("coating" protilátek)
  - třeba vysytit zbývající vazebná místa vhodnou inertní bílkovinou (albumin, kasein, želatina, sušené mléko bez tuku, ...)
- immobilizace malých molekul - třeba kovalentní vazby
- modifikace PS - nitrace a redukce poskytnou povrchové aminoskupiny



- komerčně dostupné (Nunc) i modifikované mikrodestičky
  - "vážící aminosloučeniny"
  - se streptavidinem

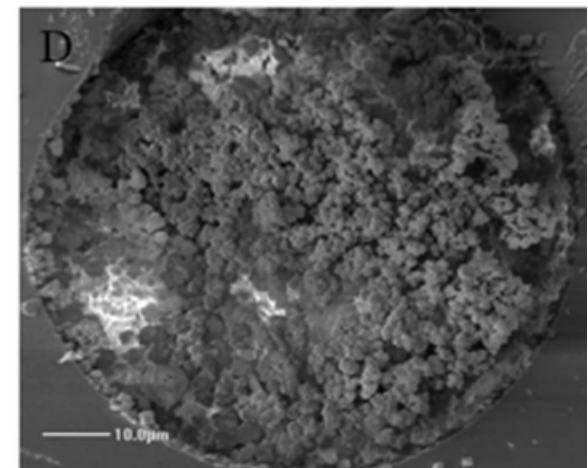
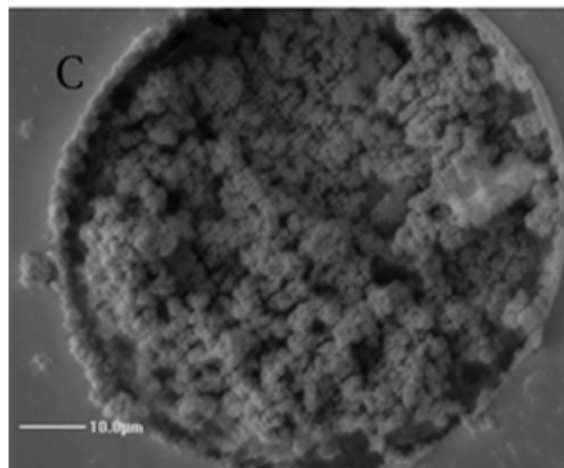
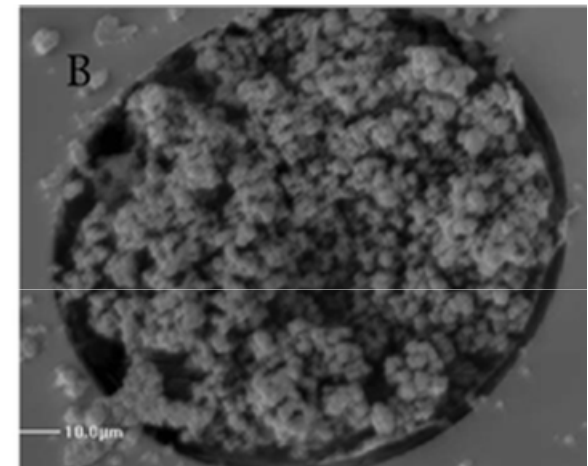
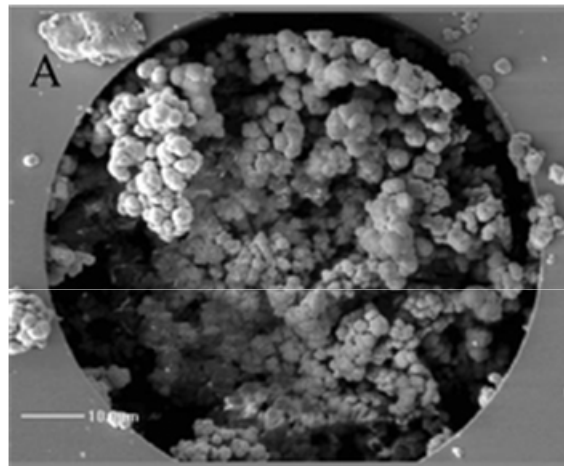
# Monolitické kolony

- **poresní chromatografické sorbenty ve formě vyplňující celý separační prostor**
  - Hjerten 1989 - PAG - "continuous bed"
  - Švec a Frechet 1992 - "monolith" na bázi makroporesního org. polymeru
- **polymerace uvnitř kolony (i kapilární)**
  - polyakrylamid a methylenbis(akrylamid) nebo piperazindiakrylamid
  - styren a jeho deriváty, síťovadlo divynylbenzen
  - deriváty methakrylát - butylmetakrylát, methakrylová kyselina, glycidylmethakrylát, zesítují se ethylendimethakrylátem (Bioseparations)
- **modifikované silikagely, spečené chemicky modifikované silikagelové částice (Chromolith, Merck)**
- **kombinace malých ("mesopores", vhodné pro imobilizace ligandů, nm rozměry, difuze) a velkých ("through pores", zajišťují tok kapaliny,  $\mu\text{m}$  rozměry, konvekce)**



## Monolitické materiály

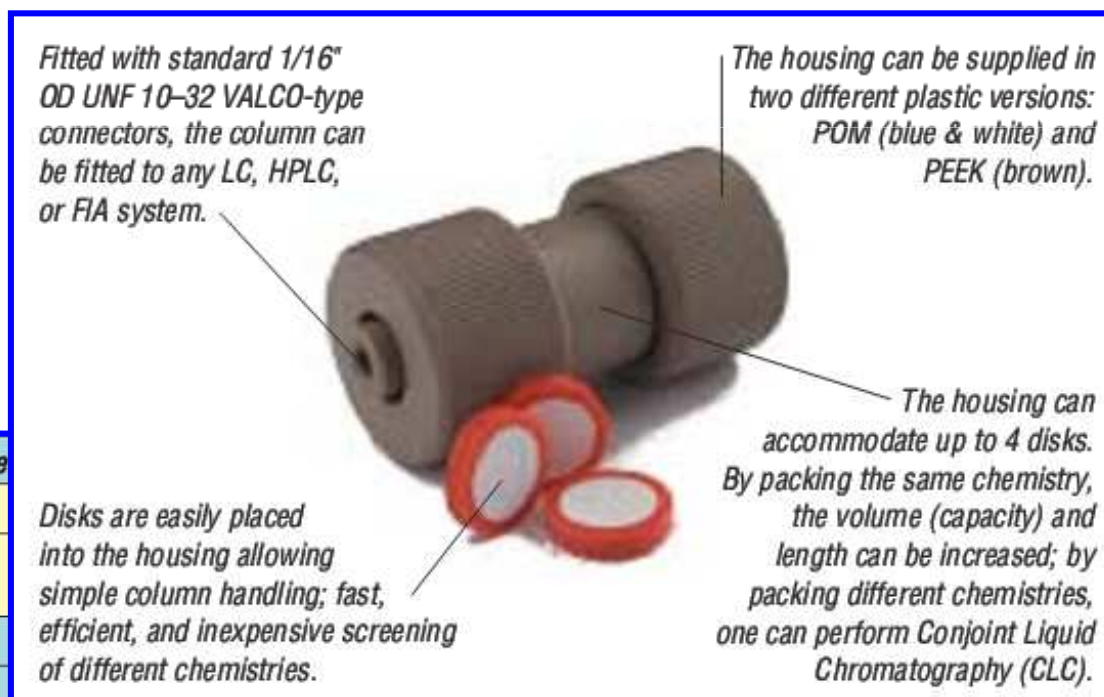
- porogenní rozpouštědla: A MeOH, B 75% EtOH, C 75% PrOH, D 75% dodekanol



## CIMs

- "convective interaction media" - separační monolitický materiál ve formě disků - výborné průtočné vlastnosti díky převažující konvekci
  - celý tok media jde přes separační oblast, u částicových nosičů dochází k neefektivnímu obtékání částic
  - průtočné rychlosti až o řád vyšší bez vlivu na separační vlastnosti a vazebnou kapacitu materiálu
  - kombinovatelnost různých materiálů v jednom "sloupci" - seriové spojení různých disků

	<i>CIM® monoliths</i>	<i>Porous particle</i>
<i>Column volume</i>	<i>0.34 ml</i>	<i>1 ml</i>
<i>Flow rate applied</i>	<i>4 ml/min (11.8 CV/min)</i>	<i>1 ml/min (1 CV/min)</i>
<i>Time – loading (5 CV)</i>	<i>0.4 min</i>	<i>5 min</i>
<i>Time – elution (10 CV)</i>	<i>0.9 min</i>	<i>10 min</i>
<i>Time – equilibration (5 CV)</i>	<i>0.4 min</i>	<i>5 min</i>
<i>Time – total per run</i>	<i>1.7 min</i>	<i>20 min</i>



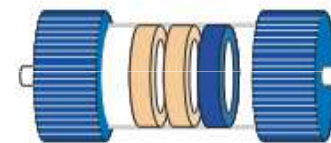
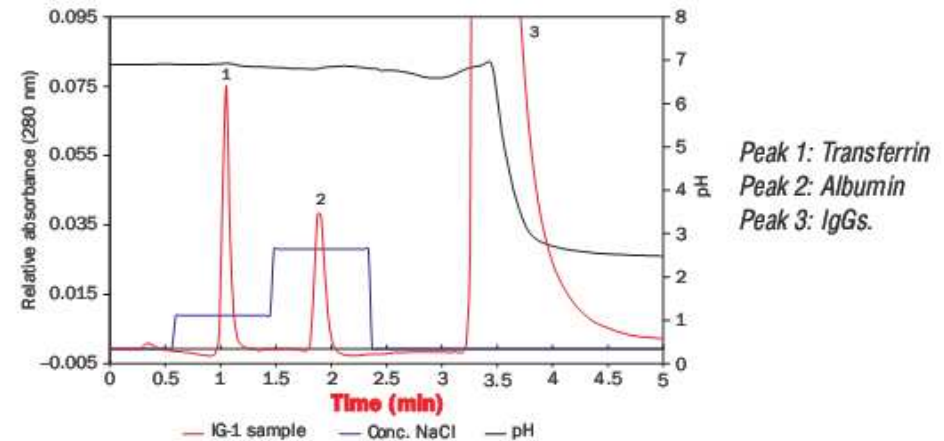
# Kombinace AC / IEC

# Selektivní frakcionace

## Quantification of impurities in IgGs

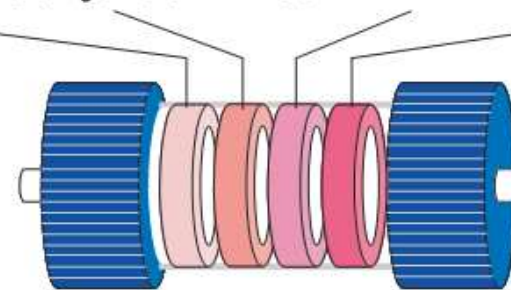
Transferrin and albumin are often present in IgG concentrates and are considered impurities. It is important to determine their concentration in order to obtain a well-characterized biological product. Two CIM® Protein G disks and one CIM® quaternary amine (QA) monolithic disk were placed consecutively into one housing forming a CLC monolithic column allowing a complete separation of all three proteins in less than 5 minutes. Under the applied binding conditions, the IgGs were captured on the Protein G disks while transferrin and albumin were bound to the QA disk. Subsequently, transferrin and albumin were eluted separately by a stepwise gradient using sodium chloride, whereas the IgGs were released from the Protein G ligands by applying a low pH. This validated method permits the quantification of albumin and transferrin in IgG concentrates.

From: Branović et al. (Octapharma), *J. Immunol. Meth*, 2002, 271, 47–58



<b>Sample</b>	0.25 ml (amount of IgG sample was 8 mg)
<b>Buffer A</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7.0)
<b>Buffer B</b>	20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl (pH 7.0)
<b>Buffer C</b>	0.1 M Glycine-HCl (pH 2.6)
<b>Flow rate</b>	4 ml/min
<b>Column</b>	2 CIM® Protein G disks + 1 CIM® QA disk

Bradykinin (BK) 1.5 mg/ml disk  
 Bovine serum albumin (BSA) 3.0 mg/ml disk  
 Succinylated BSA (BSA-S) 3.0 mg/ml disk  
 Conjugate of BK with BSA (BSA-S-BK) 7.4 mg/ml disk



<b>Sample</b>	500 µl rabbit blood sera (proteins: 2 mg/ml)
<b>Buffer A</b>	10 mM phosphate, 150 mM NaCl (pH 7.0)
<b>Buffer B</b>	10 mM HCl (pH 2.0)

# Imobilizace enzymů

- **enzymy - průmyslové použití**
  - biokatalytické konverse
  - bioanalytické aplikace, enzymové sensory
- **ekonomický aspekt** - snížení výrobních nákladů enzymových procesů díky opakovanému použití
- **dlouhodobá stabilizace** enzymové aktivity
- **snadná separace** výsledného produktu
  - dvoufázový systém, enzym zachycen na heterogenní fázi
  - substrát, produkt volně v roztoku
  - realizace kontinuálně pracujících procesů (enzymové reaktory)
- **nevhodné, pokud je i enzymový substrát nerozpustný**

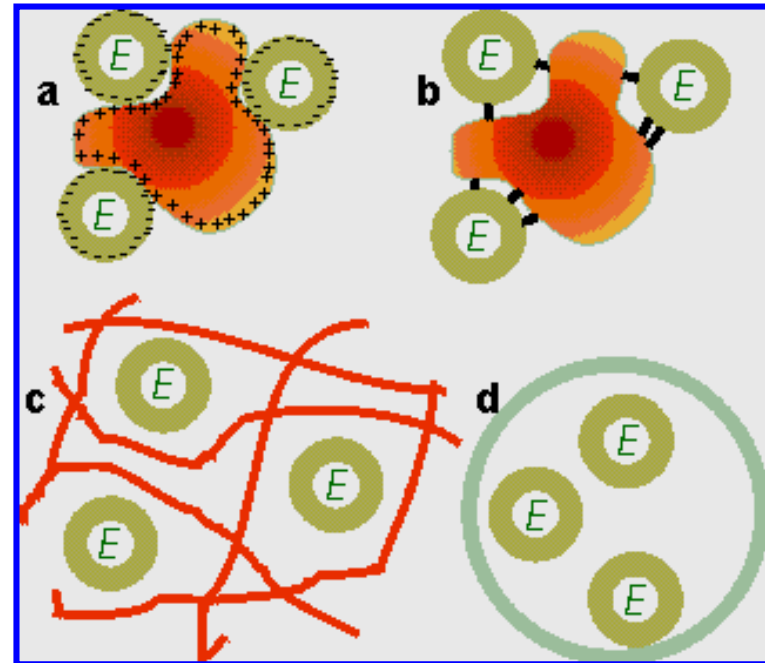
# Ideální nosič enzymu

- levný, inertní, mechanicky pevný, chemicky stabilní
- zachovává nebo zvyšuje specifitu enzymu (dána poměrem  $k_{\text{cat}}/K_m$ )
- snižuje inhibici enzymu produktem
- posunuje pH optimum enzymu žádaným směrem
- zabraňuje mikrobiální kontaminaci
- omezuje nespecifickou adsorpci



# Způsoby imobilizace

- **a** adsorbce
- **b** kovalentní vazba
- **c** zachycení v polymeru, "entrapment"
- **d** zachycení v membránovém váčku, "cofinement"



## Volba nosiče

- nízká cena (po zničení enzymové aktivity se vyhodí)
- drahé nosiče - při malém rozsahu procesu, případně pokud je lze použít opakovaně (opakovaná imobilizace enzymu)
- uplatní se forma, tvar, mech. stabilita, hustota, porosita, distribuce velikosti pórů, povrchový náboj (posun pH optima reakce), hustota reaktivních skupin (vazebná kapacita)
- speciální vlastnosti
  - magnetismus
  - rozklad nežádoucích produktů ( $\text{MnO}_2$  a peroxid vodíku)
  - povrch s redukčními vlastnostmi ( $\text{TiO}_2$ )

## Geometrické uspořádání

- **částice („beads“)**
  - definovaná velikost a porosita
- **filmové povlaky**
  - tenké vrstvy na vhodném neutrálním nosném materiálu
- **membrány**
  - současně je možné realizovat biokatalytickou reakci a separaci na základě rozdílné velikosti substrátu a produktu
- **vláknité materiály**
  - vysoký podíl povrchu – velká objemová aktivita
- **pěny** - zachycení uvnitř (polyurethany)

## Struktura

- mikroporesní 0.1 až 10 nm
- mesoporesní 3 až 10 nm – srovnatelné s velikostí enzymů
- makroporesní 8 až 1000 nm, povrch 25 až 100 m<sup>2</sup>/g
- neporesní – výborná průtočnost, ale malá kapacita a malý povrch
- gelovitá – nemá stálé póry, ty vznikají až při nabobtnání; obdoba neporesního uspořádání

## Adsorpce enzymů na nosič

- jednoduchý, široce použitelný postup – velmi mírné podmínky, zachování aktivity – není kovalentní vazba, není narušení konformace
- reversibilita – jak enzymu (purifikace), tak vlastní matrice – obojí lze regenerovat a použít znovu
- možnost vysokých obsahů (až 1 g enzymu na 1 g nosiče)
- ale slabá interakce – enzymy se mohou postupně spontánně uvolňovat z matrice
- zúčastněné interakce
  - nescifické (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofilní interakce): CPG, silikagely
  - biospecifické – přes ligand interagující s enzymem (mimo aktivní místo)
  - interakce s imobilizovanými barvivy nebo ionty kovů
  - iontové interakce (ionexy)
  - hydrofobní interakce: PET, HDPE, polyethylentereftalát, latex (polystyren), poly(ST-DVB), amberlit XAD, silikáty, zeolity, talek
- částečná desolvatace v průběhu vazby na nosič, může docházet ke změnám konformace
  - stabilizace, změny aktivity a specifity katalyzované reakce

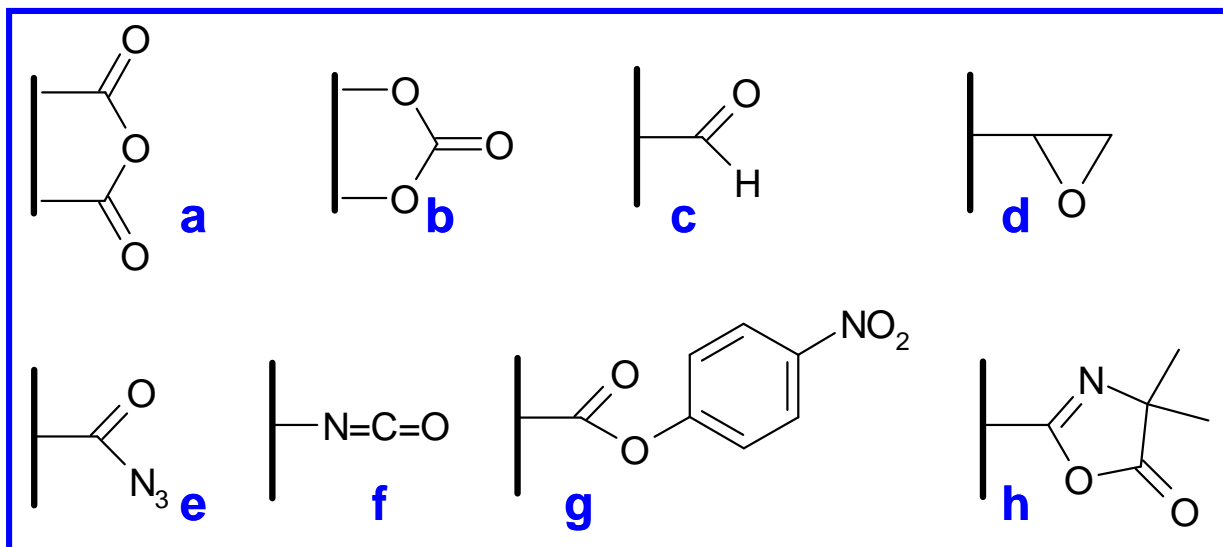
## Iontové interakce

- syntetické pryskyřice (SP)
  - kopolymery akrylamidu a kys. maleinové nebo itakonové, fenolformaldehydové kondenzáty
- SP s povrchovými skupinami – Dowex, Amberlit, Duolit
- polysacharidové deriváty – DEAE-celulosa, DEAE-dextran, DEAE-Sephadex, CM-celulosa, CH-Sepharosa, AH-Sepharosa, Q-Sepharosa, S-Sepharosa
  - **DEAE** ... diethylaminoethyl, **CM** ...  $-O-CH_2-COOH$ , **CH** ...  $-NH(CH_2)COOH$ , **AH** ...  $NH-(CH_2)_6-NH_2$ , **Q** ...  $-CH_2-N^+(CH_3)_3$ , **S** ...  $-CH_2-SO_3H$
  - všeobecně velmi hydrofilní materiály, náboj závisí na pH okolního roztoku
- důležitou roli hrají podmínky, zejména pH, při adsorpci

Invertasa	Typ nosiče	
% vazby	DEAE-Sephadex (anex)	CM-Sephadex (katex)
pH 2.5	0	100
pH 4.7	100	75
pH 7.0	100	34

## Kovalentní immobilizace enzymů

- poresní / neporesní nosiče, vzájemná velikost pórů a molekul enzymu
- povrchová hustota navázaných molekul
- reaktivní skupiny vhodné pro kovalentní immobilizace



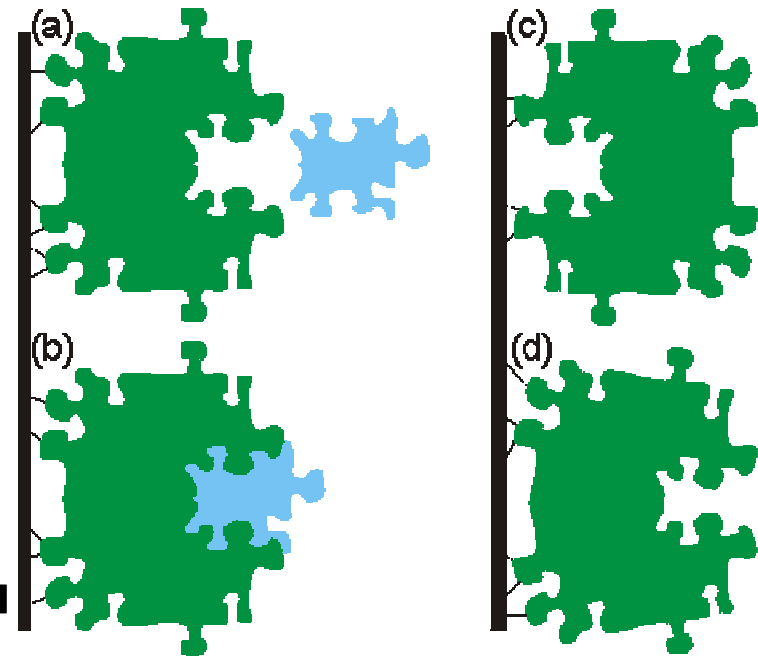
- **a** anhydrid, **b** karbonát, **c** aldehyd, **d** epoxid, **e** azid, **f** isothiokyanát, **g** nitrofenylester karboxylové kyseliny, **h** azlaktón
- typické množství 0.02 g enzymu na 1 g nosiče

## Relativní užitečnost aa pro imobilizaci

AA zbytek	Obsah	Dostupnost	Reaktivita	Stabilita spojení	Použití
Asp	+	++	+	+	+
Arg	+	++	-	±	-
Cys	-	±	++	-	-
cystin	+	-	±	±	-
Glu	+	++	+	+	+
His	±	++	+	+	+
Lys	++	++	++	++	++
Met	-	-	±	-	-
Ser	++	+	±	+	±
Thr	++	±	±	+	±
Trp	-	-	-	±	-
Tyr	+	-	+	_ <sub>-</sub> +	+
C konec	-	++	+	+	+
N konec	-	++	++	++	+
sacharid. zbytek	- ~ ++	++	+	+	±

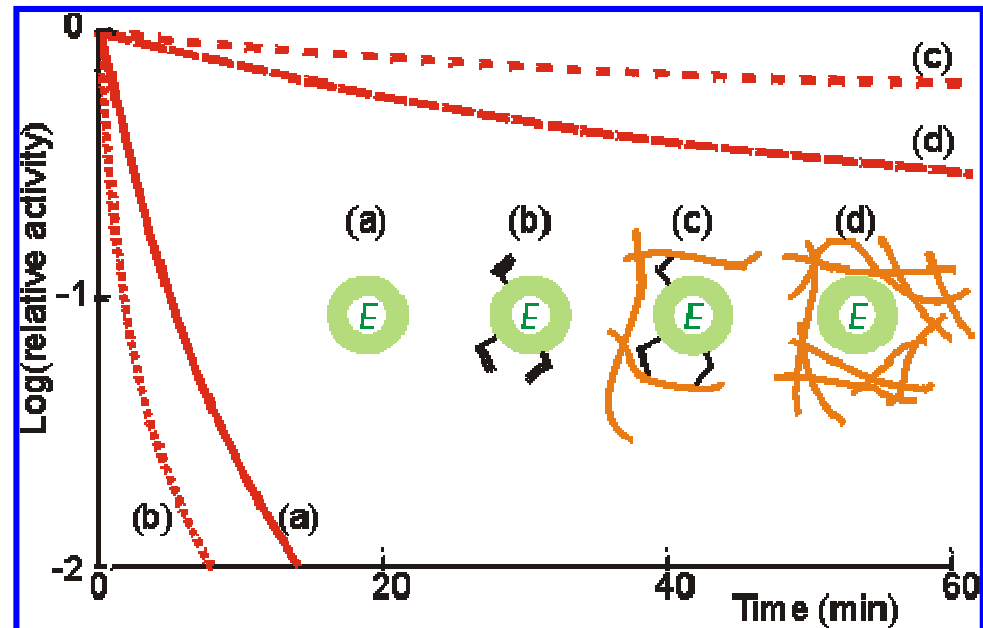
# Orientace enzymu

- nesmí dojít (a) ke změně konformace vazebného místa, aby docházelo k optimální vazbě substrátu (b)
  - nevhodné je nepřístupné aktivní místo (c) v důsledku sterické zábrany
  - méně efektivní až nefunkční může být vazebné místo deformované v důsledku distorse (d)
- 
- v obou případech může pomoci "oddálení" molekuly enzymu od nosiče použitím vhodně dlouhého raménka (spacer, linker, ...)



# Zachycení enzymu v polymeru

- může se jednat o čistě fyzikální zachycení na základě velikosti
    - v gelu, zapolymerování uvnitř vhodné matrice
  - kombinace zachycení a kovalentní vazby
    - derivatizace lyzinových zbytků akryloylchloridem  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{Cl}$
    - vzniklý na enzym vázaný akrylamid se pak kopolymerizuje s klasickou směsí akrylamidu a bisakrylamidu
  - vhodné pro imobilizaci "komplexnějších" systémů obsahujících daný enzym (buňky, organely, ...)
  - metoda je vhodná pouze pro enzymy účinkující na nízkomolekulární substráty
- 
- stabilita chymotrypsinu
  - v závislosti na způsobu imobilizace
    - volný (a), derivatizovaný akryloyl Cl (b)
    - zachycený v polymethakryl. gelu (d), kombinovaně (c)



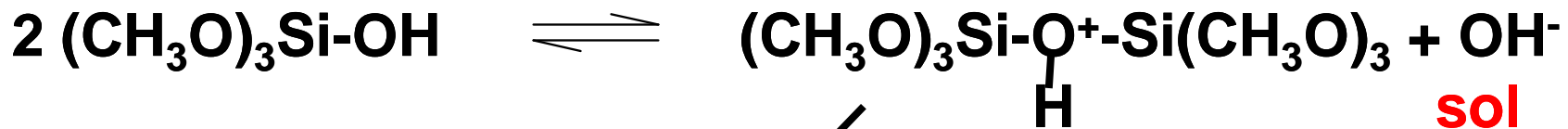


# Gelové matrice

- enzym se zachytí v průběhu přípravy gelu
  - alginát, chitosan, želatina, PAG, PVA plus MNOHO dalších polymerů
- vznikne tak monolitický materiál
  
- enzym se nechá vsáknout do hotového gelu ve formě kuliček (Sepharosa, Sephadex) a následně se chemicky zesítuje (glutaraldehydem)
- prosté zesíťování nedává geometricky definované tvary
  
- "smart" polymery - mění vlastnosti pod vlivem externích vlivů (pH, teplota, iontová síla) a mohou tak cíleně např. uvolnit vázaný enzym do roztoku

# Sol-gel imobilizace

- sol-gel proces – vznik „skla“ hydrolytickou polymerací monomolekulárních prekursorů  $(\text{CH}_3\text{O})_4\text{Si}$  tetramethyl-o-křemičitan (**TMOS**):



enzym

gelovatění



zachycení v pórech

stárnutí a vysychání



# Zachycení v membránových systémech

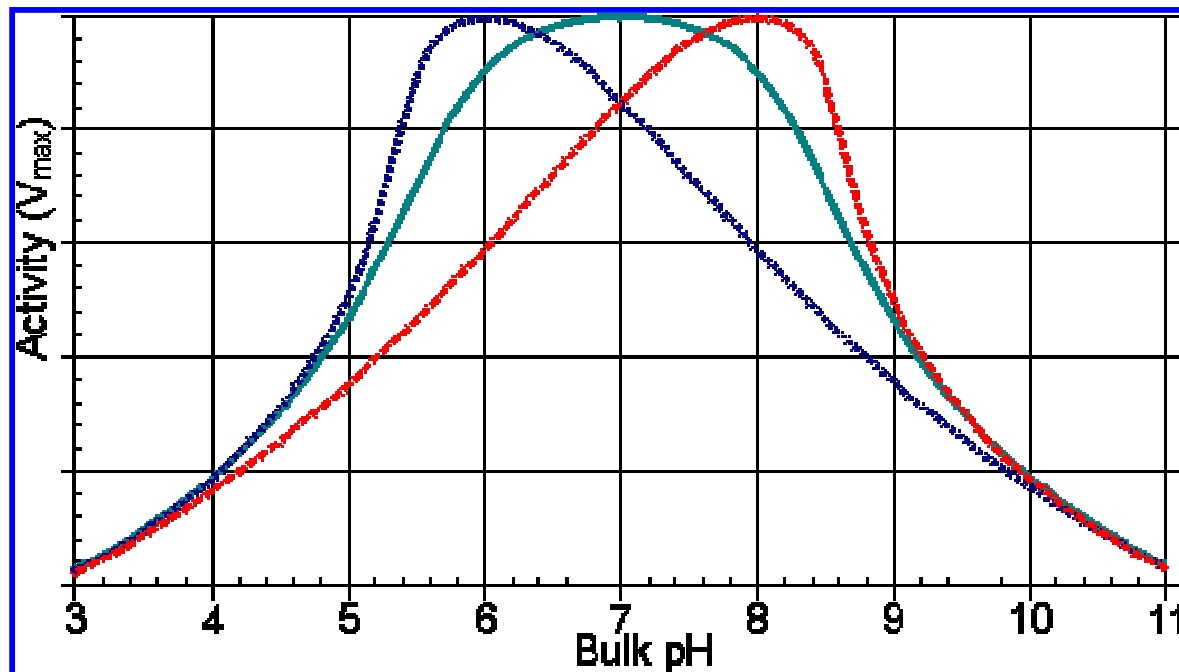
- enzym je od pracovního prostředí oddělen semipermeabilní membránou, průchozí pro substráty a produkty
- membránová dutá vlákna "**hollow fiber membranes**" obsahují enzym uvnitř, pracovní roztok proudí okolo
  - povrch membrány i více než 20 m<sup>2</sup>/l
- jednoduché - není třeba nic optimalizovat
- relativně drahé
- membrána může být i ve formě váčků ("**droplets**")
  - enzym se rozpustí ve vodném roztoku 1,6-diaminohexanu
  - disperguje se v roztoku 1,6-hexandiové kyseliny v chloroformu
  - vzniknou kapičky enzymu obalené tenkou membránou z nylonu (Nylon-6,6)
- je možné použít i liposomy s enzymem uvnitř

# Srovnání imobilizačních postupů

Charakteristika	Adsorpce	Kovalentně	Entrapment	Zachycení v membráně
<b>Příprava</b>	snadné	obtížné	obtížné	snadné
<b>Náklady</b>	nízké	vysoké	střední	vysoké
<b>Vazebná síla</b>	různé	silné	slabé	silné
<b>Únik enzymu</b>	ana	ne	ano	ne
<b>Použitelnost</b>	široká	selektivní	široká	univerzální
<b>Pracovní problémy</b>	vysoké	nízké	vysoké	vysoké
<b>Matricové efekty</b>	ano	ano	ano	ne
<b>Velká difúzní bariéra</b>	ne	ne	ano	ano
<b>Ochrana před mikroby</b>	ne	ne	ano	ano

# Vliv imobilizace na pH optimum enzymu

- náboj nosiče posouvá pH optimum
- důsledek partitice  $H^+$  iontů v mikrookolí enzymu na povrchu nebo v pórech nosiče
- posun pH pracovního roztoku může být výhodný pro zlepšení rozpustnosti substrátu či produktu
- **nativní** enzym v roztoku
- imobilizace na **kladně** nebo **záporně** nabitý nosič

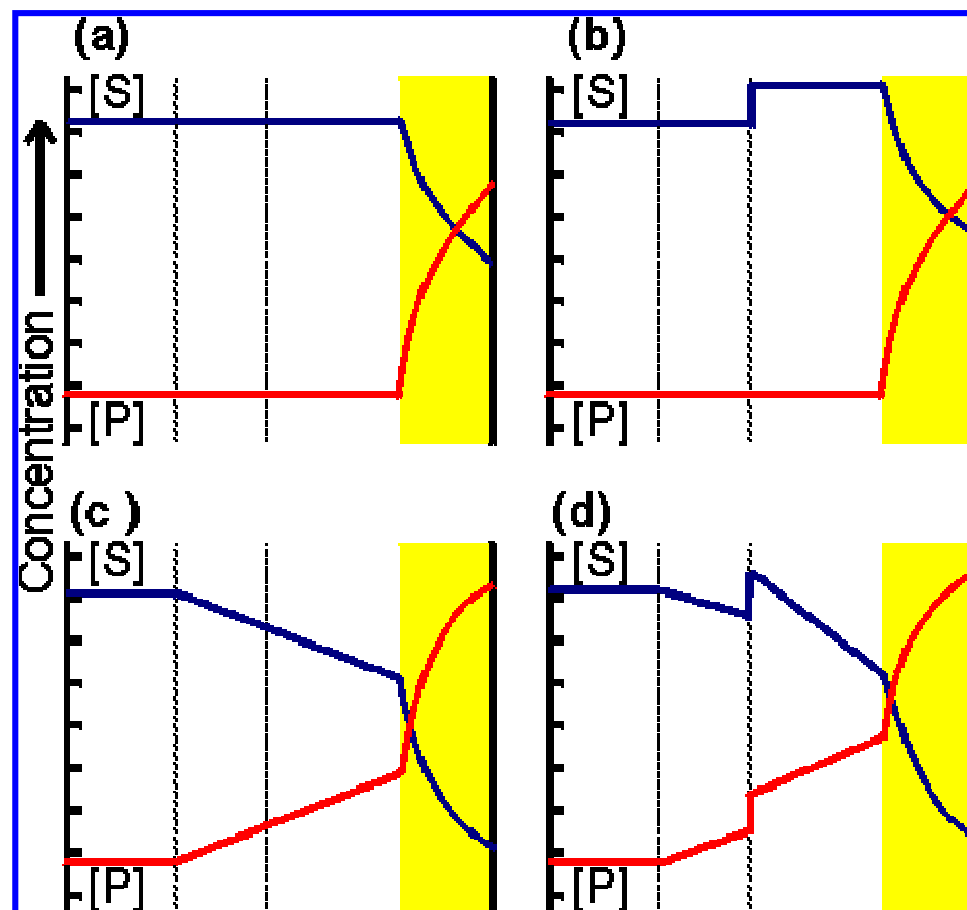


# Difúzní vlivy

- substrát se musí dostat z okolního prostředí do aktivního místa
- překonává se nemíchaná vrstva na povrchu nosiče - externí difúze
- poté se pohybuje uvnitř pórů nosiče - interní difúze
- koncentrační gradienty substrátu a produktu v případě poresního nosiče

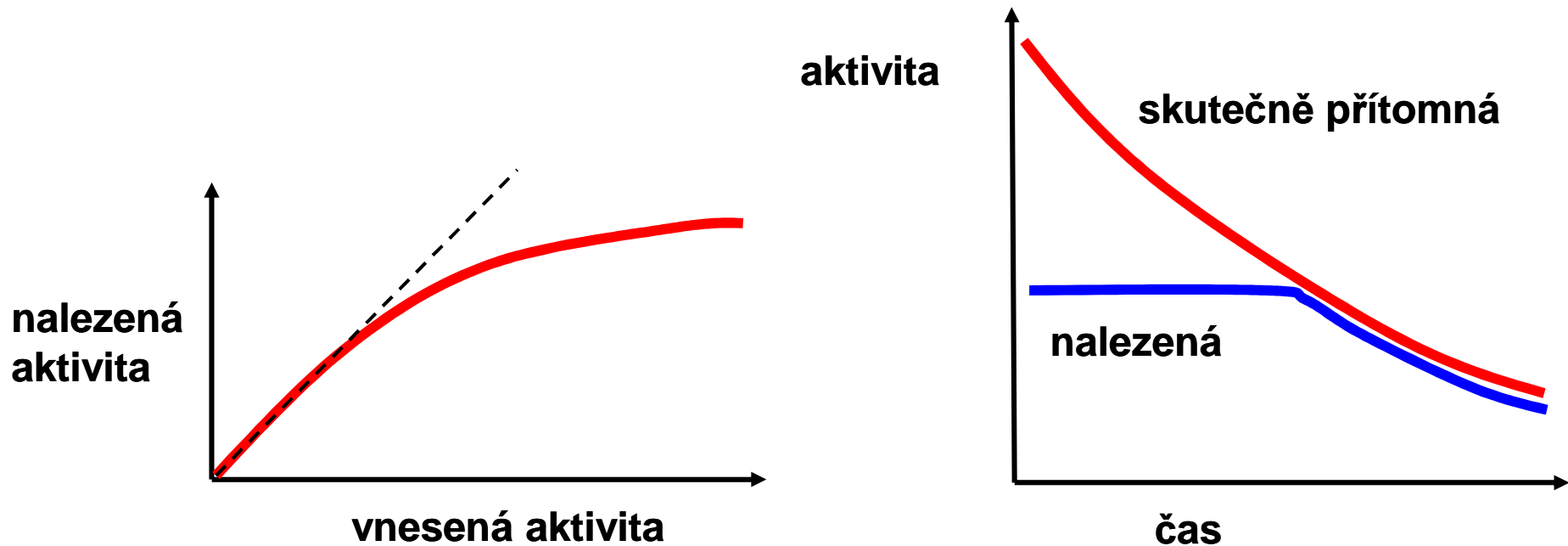
- **a** pouze reakce a interní difúze
- **b** navíc partitice S a P v mikro prostředí nosiče
- **c** jako **a**, navíc externí difúze
- **d** kombinace difúzních a partitičních efektů

- partitiční vrstva je cca 1000x tenčí než difúzní vrstva



# Difúzní kontrola enzymové konverze

- při imobilizování velkého množství enzymu se jeho aktivita jakoby zdánlivě ztrácí
- **efektivní aktivita** enzymu na nosiči je mnohem menší než teoreticky navázaná - důsledek difúzních problémů - omezený pohyb substrátu
- pozitivní projev - zdánlivá stabilizace imobilizovaného enzymu

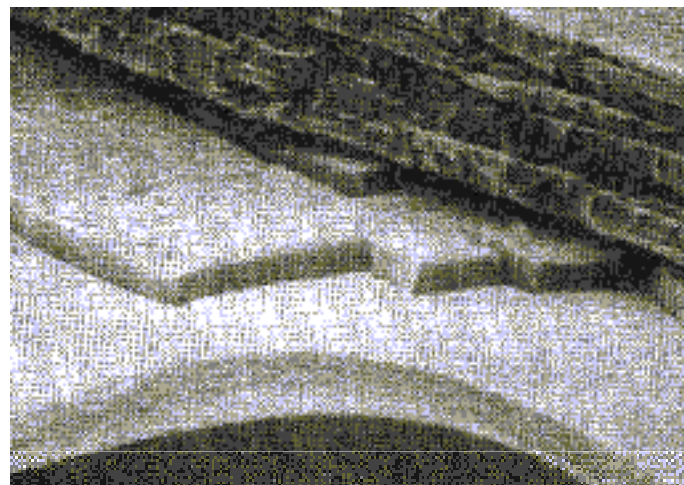
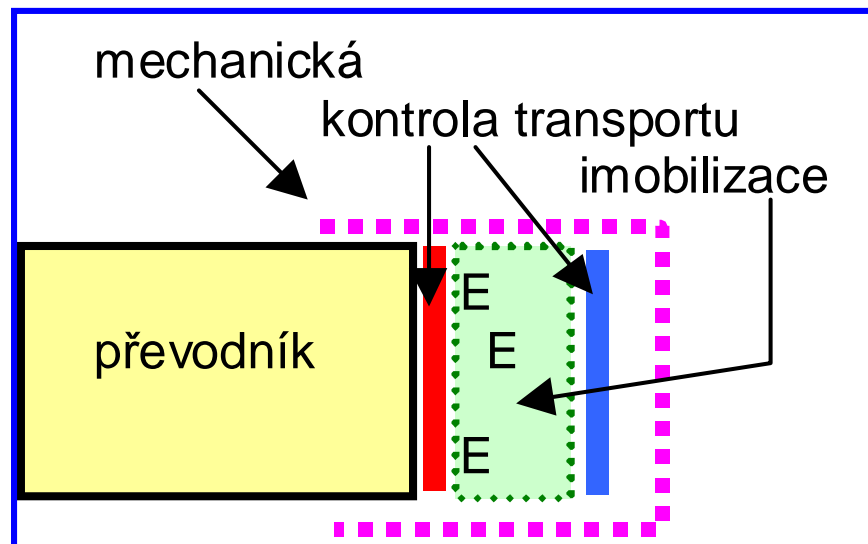


# Enzymové biosensory

- imobilizace enzymu na povrch fyzikálně-chemického převodníku
- využívají se postupy imobilizace zmíněné dříve i další speciální metodiky
- nejčastější jsou enzymové elektrody - kombinace enzymu a elektrochemického převodníku
- enzymové optody (optrody) - analogie, nosičem je ale obvykle světlovod (optické vlákno)



# Membrány a biosensory



- **membrány v biosensorech plní několik funkcí:**
- **imobilizace enzymových molekul – nosná funkce**
- **řízení transportu látek buď prostřednictvím difúzní kontroly nebo ovlivněním selektivity (antiinterferenční)**
- **zlepšení mechanické stability**
- **biokompatibilita**

# Rozdělení membrán

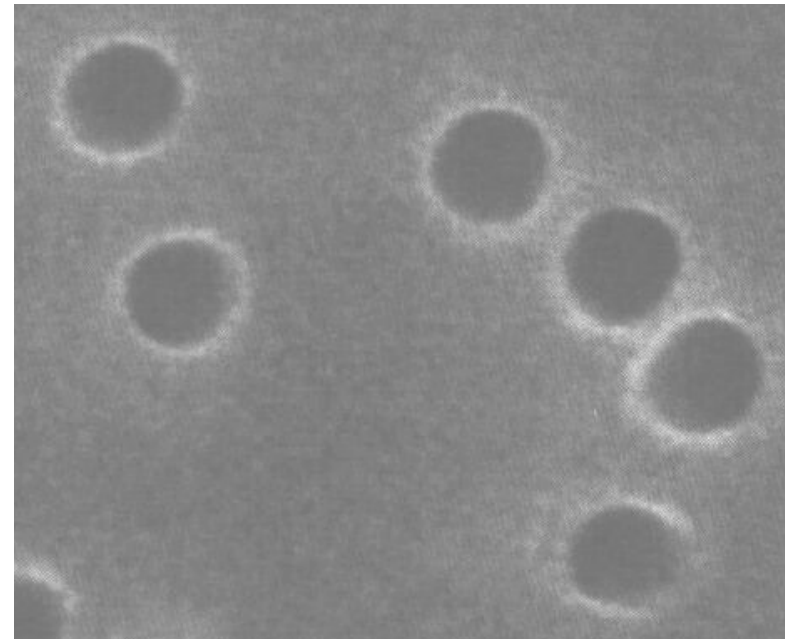
- membrána = porézní prostředí, rozdělení:
- hrubě porézní - póry nad 5 nm (skelná frit), permeabilitu ovlivňuje rozdíl hydrostatického tlaku na obou stranách, osmotický tlak se neuplatňuje (pokud polymer membrány neinteraguje s rozpouštědlem); permselectivita je velmi špatná až žádná (prochází všechny látky)
- jemně porézní - póry 1 až 5 nm (např. acetylcelulosa), rozpouštědlo prochází konvekcí a difúzí, permeabilita je dána velikostí rozpuštěných látek
- neporézní (husté) - nevykazují porézní strukturu, rozpouštědlo prochází pouze difúzí

# Příprava membrán

- je potřeba pečlivě kontrolovat podmínky (vlhkost, teplota), které silně ovlivňují vlastnosti vznikajících membrán
- **fázová konverze** - roztok polymeru ve vhodném rozpouštědle se nalije na pevný povrch a vyčká se odpaření rozpouštědla
  - polyvinyl chlorid (tetrahydrofuran - THF), acetylcelulosa (aceton), polyethersulonát (dimethylsulfoxid) nebo polyurethan (THF, aceton)
  - vyšší vlhkost a nižší teplota okolí - vznikají větší póry
  - nalití roztoku polymeru v org. rozpouštědle nemísitelném s vodou na vodní hladinu, zde se na rozhraní vytvoří asymetrická membrána
- **polymerace** z mono či oligomerů přímo na místě použití (tvorba „in situ“) - vhodná k přípravě fragilních gelovitých membrán (polyvinylalkohol, polyakrylamid), které obsahují velký podíl vody
- **dodatečná tvorba pórů** - tzv. nukleární membrány (Nucleopore)
  - vrstva polymeru se „prostrhává“ urychlenými nukleony, lokálně narušená struktura polymeru se naleptá a vzniknou póry
  - velmi dobrá reprodukovatelnost a homogenita pórů o poměrně přesně definovaném průměru
  - lokální změny lze vyvolat mechanickým natahováním (polyenové membrány, obsahující krystalické a amorfni oblasti, v amorfních pak následně vzniknou póry)

# Úpravy membrán

## Nucleopore membrána

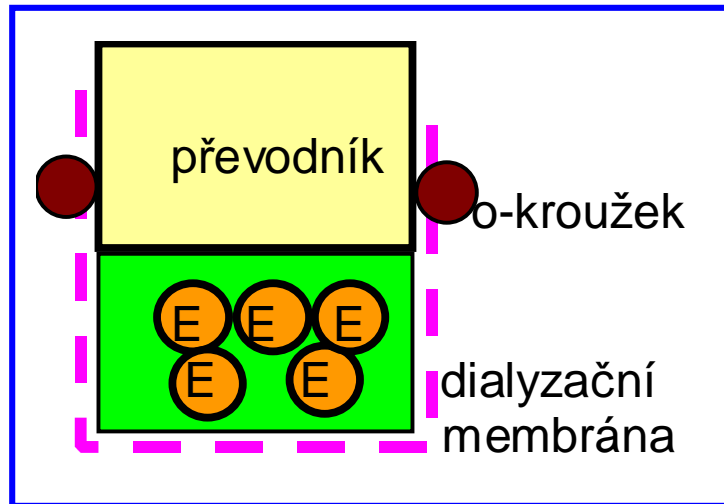


- velikost pórů membrány lze dodatečně změnit:
- zvětšení průchodnosti se dosáhne naleptáním polymeru membrány, které vede ke zvětšení průměru pórů
  - alkalická hydrolýza acetylcelulosy nebo polykarbonátů
- zmenšení průchodnosti a zlepšení permselektivity se dosáhne depozicí vhodných látek uvnitř pórů
  - např. organosilanů nebo lipidických látek
- symetrické membrány - obě strany jsou rovnocenné, průchodnost oběma směry je stejná
- asymetrické membrány - připravují se na rozhraní dvou fází

# Biokompatibilita

- při použití biosensorů v živém organismu (in vivo) nebo v klinické praxi při kontaktu zejména s krví (in vitro)
- při kontaktu povrchu membrán s prostředím dochází k adsorpci proteinů – zejména albuminu a fibrinogenu na povrch
- pak se vytváří další vrstva krevních destiček (koagulační trombóza)
- při dlouhodobé implantaci dochází k zarůstání biosensoru tkání
- postupné snižování citlivosti důsledkem snížené prostupnosti
  
- biosensor může vyvolávat rušivé reakce u živého organismu
  - srážení krve, zánětlivé procesy
- je potřeba povrch biosensoru povléknout vhodnými polymery
  - silikon, polytetrafluorethylen a zejména polyurethany
- modifikovat povrchní obal
  - hydrofilizace, konverze aminoskupin na hydroxyskupiny
- do vnější vrstvy vpravit látky omezující rušivé reakce
  - fosforylcholin, fosfolipidy, heparin

# Mechanické zachycení enzymu

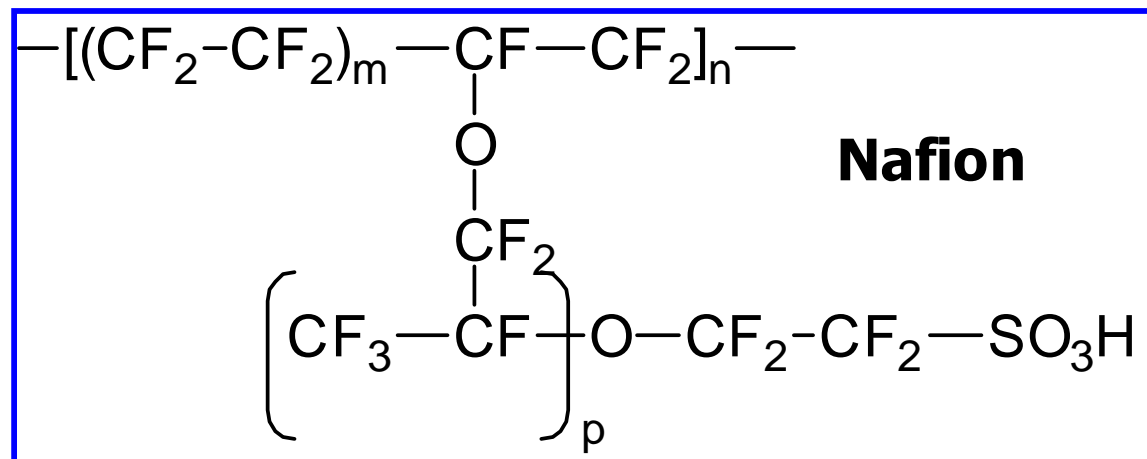


- nejjednodušší - kápne se roztok biokomponenty na povrch převodníku a překryje se dialyzační membránou
- alternativní metodou je zachycení biomolekul uvnitř vhodného polymeru (inkluze), polymerní vrstva se vytvoří na povrchu podpůrné dialyzační membrány



# Zachycení v gelu

- želatina je často používána pro enzymové membrány; 5% roztok se rozpustí při zvýšené teplotě (až 50 °C) a přidá se enzym, promíchá se a naleje na podložku (např. dialyzační membrána)
- Nafion je polymer rozpuštěný ve směsi alkoholů s vodou
  - používá se pro tvorbu permselektivních membrán - jako iontoměnič
  - může zachycovat biomolekuly



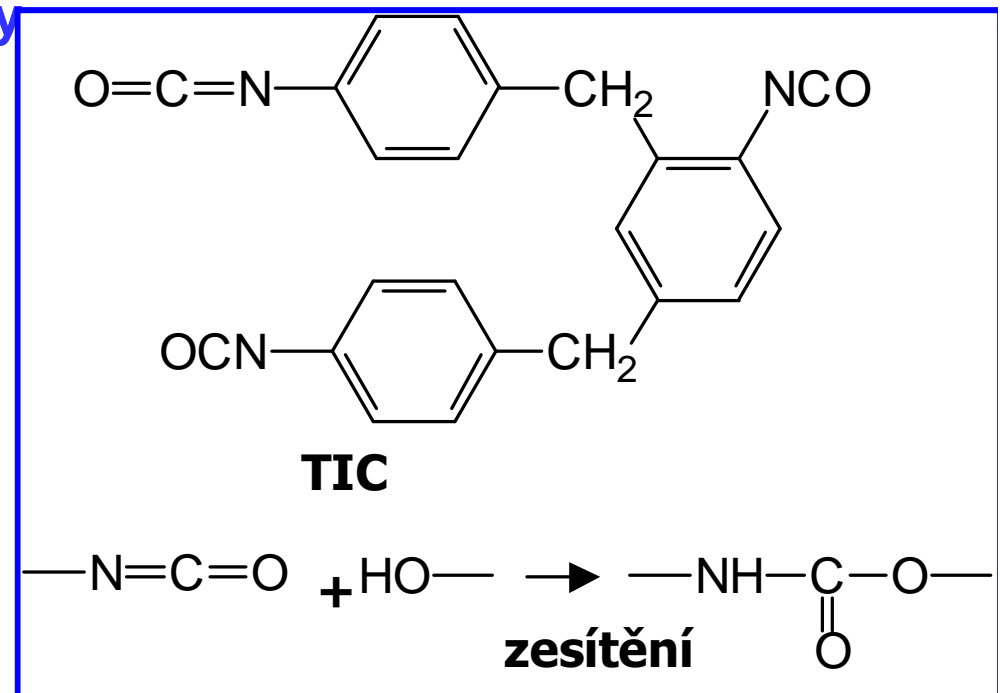
# Zachycení v PVA

- polyvinylalkohol (PVA) je hydrofilní, neutrální a biokompatibilní polymer, ve vodě silně bobtná; dostupný ve formě oligomerů (90 kDa), které po zesíťování vytvoří konečný polymer
- radiální polymerace využívá ozáření směsi oligomerů a enzymu  $\gamma$ -zářením (generuje  $^{60}\text{Co}$ )
  - vzniklé radikály vyvolají další polymeraci a zesíťování
  - výsledná membrána neobsahuje žádné nežádoucí produkty a současně je sterilizována

- chemické síťování – **triisokyanáty (TIC)**, spojí postranní hydroxyly

- UV polymerace - PVA obsahující styrylbipyridiniové skupiny (PVA-SbQ, 1.3%)

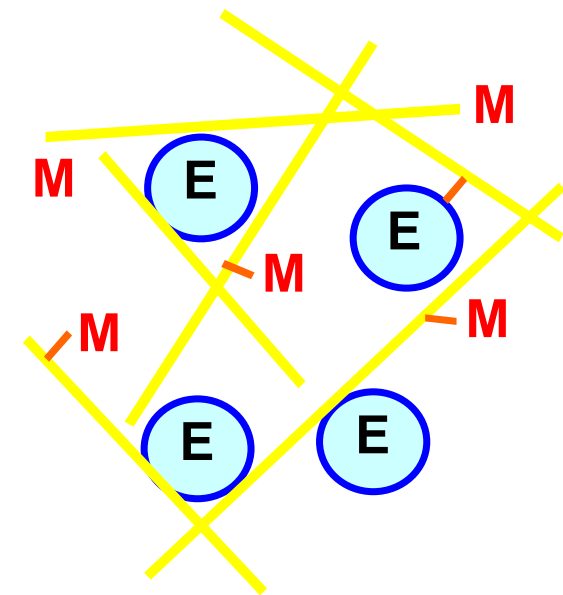
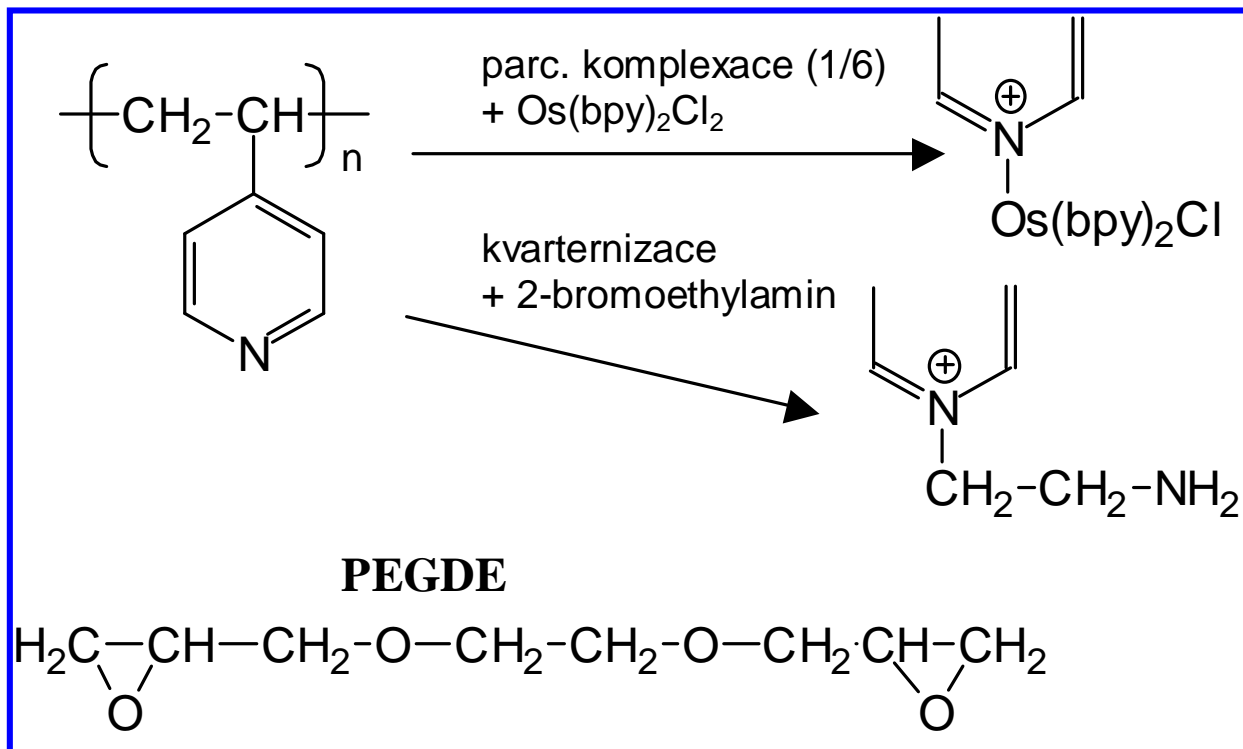
- vůbec nejšetrnější postup imobilizace pomocí PVA



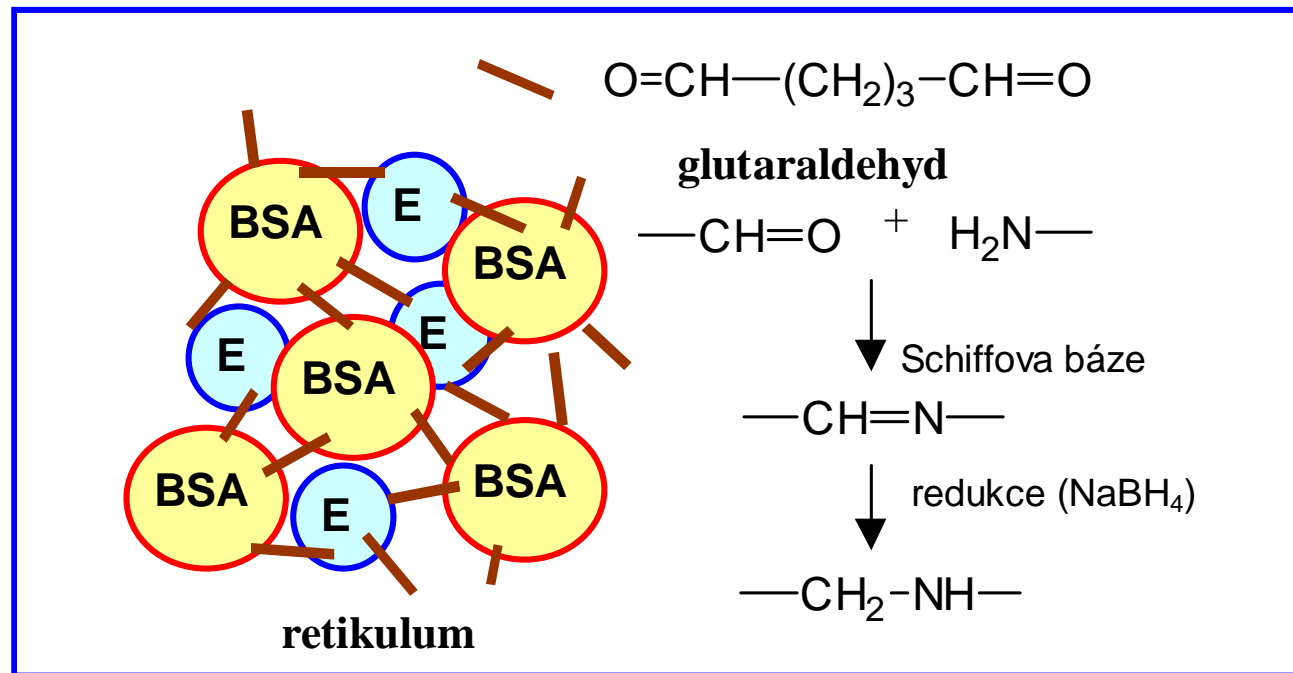


# Multifunkční polymery

- kombinují imobilizaci enzymu s polymerní strukturou nesoucí skupiny mediátorů přenášející elektrony, tzv. redox relays
- poly-4-vinylpyridin (oligomer kolem 50 kDa) se částečně využije pro tvorbu komplexu s osmiem (mediátor), a částečně se do něj kvarternizací zavedou aminoskupiny
- směs modifikovaného oligomeru, enzymu a bifunkčního činidla PEGDE (polyethylenglykoldiglycidylether) se nanese na elektrodu



# Zesíťování enzymu na povrchu



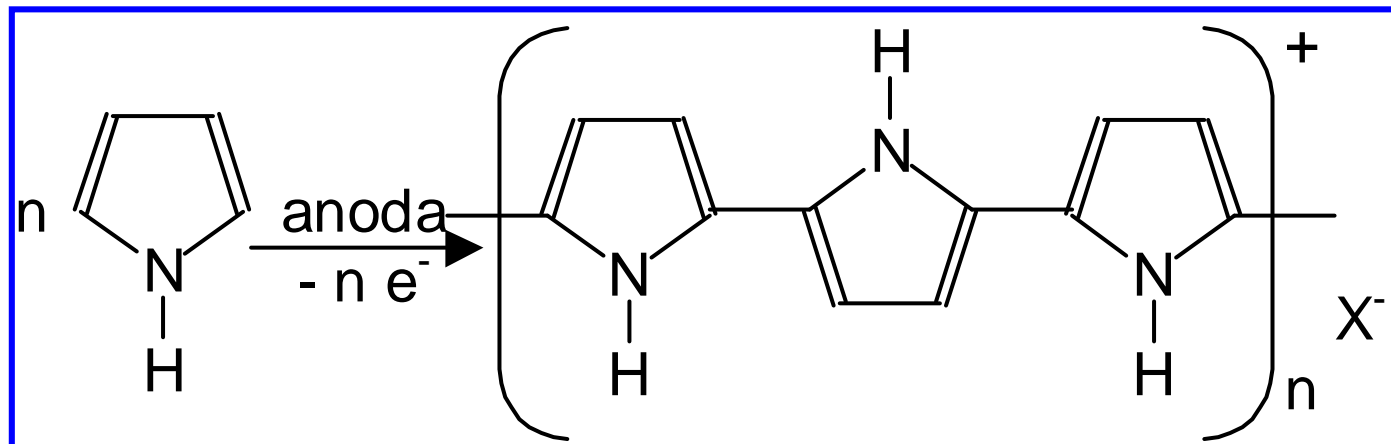
- nejčastěji se používá **glutaraldehyd**; směs s roztokem bílkoviny v závislosti na koncentraci složek vytváří spontánně retikulum buď přímo na povrchu sensoru, nebo na vhodném podkladovém materiálu (polyamidová síťka, dialyzační membrána)
- reakcí mezi aldehydovou skupinou činidla s aminoskupinou bílkoviny (postranní lyzinové zbytky) vzniká propojením Schiffova báze
  - může se zredukovat na stabilnější aminovou vazbu

# Imobilizace pomocí elektropolymerace

- využívá elektrochemickou oxidaci k přípravě reaktivních monomerů, které pak spontánně vytváří polymerní film na povrchu elektrody
- filmy se dají vytvořit i na členitém povrchu nebo na povrchu mikroelektrod (cílená modifikace)
- pokud jsou v průběhu elektropolymerace v roztoku přítomné biomolekuly, dochází k jejich zachycení uvnitř vznikající membrány; méně se může uplatnit také kladný náboj polymeru
- vlastnosti membrány je možné ovlivnit přidáním dalších látek do elektropolymerační směsi
- tloušťku membrány určuje velikost prošlého náboje, tak se dá snadno reprodukovatelně ovlivnit množství imobilizované biomolekuly
- některé elektropolymerární vrstvy mohou být navíc vodivé, což usnadňuje přenos elektronů mezi elektrodou a biomolekulami
  - tyto polymery jsou obvykle barevné

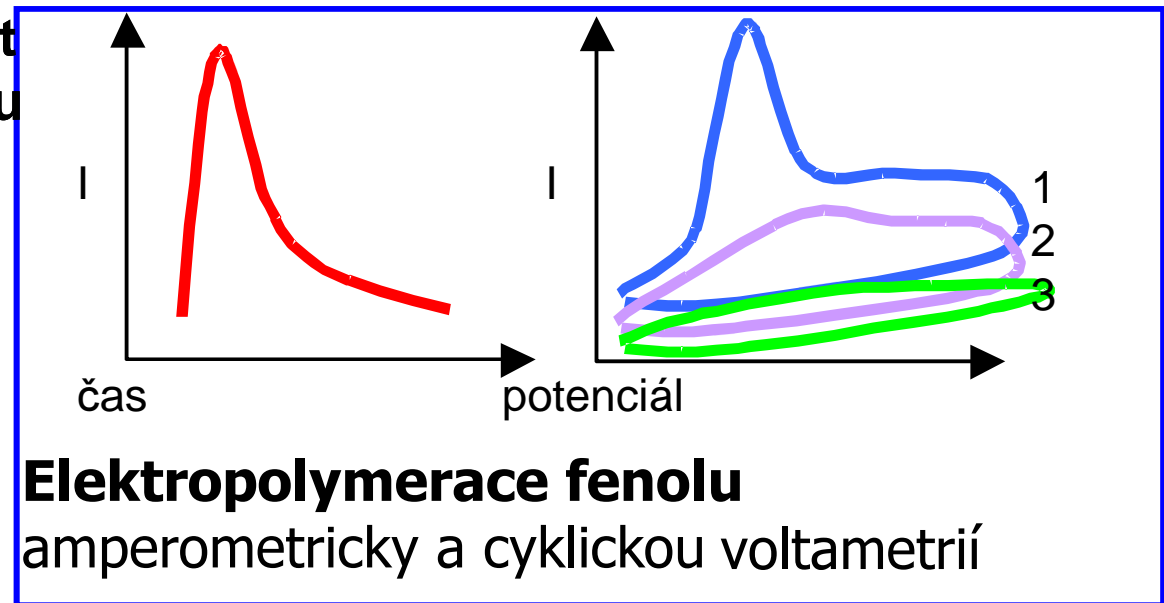
# Polypyrrol (PPY)

- klasický příklad, provádí se oxidací 50 až 200 mM pyrrolu amperometrickou oxidací při potenciálu kolem 0.8 V, jako elektrolyt se přidává KCl, pracuje se v anaerobním prostředí
- tloušťka filmu je úměrná množství prošlého náboje (5 mC/cm<sup>2</sup> odpovídá 13 nm), lze dosáhnout až 100 nm tlustých vrstev
- vzniklý PPy film **je vodivý**, vodivost dosahuje asi 500 S/cm
  - pro srovnání jsou vodivosti mědi 10<sup>6</sup>, křemíku 10<sup>-4</sup> a skla 10<sup>-11</sup> S/cm).
- obdobně probíhá elektropolymerace metylpyrrolu

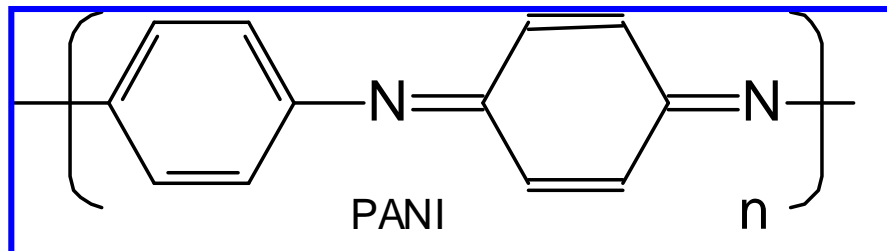


# Polyfenylenoxid (PPO)

- velmi tenké a mechanicky stabilní filmy PPO na povrchu elektrod vznikají elektropolymerací fenolu
- **nevodivé**, takže elektropolymerace se samovolně zastaví, jakmile je povrch elektrody elektricky izolován
- průběžně se dá pozorovat pokles oxidačního proudu při vzniku filmu:



- méně stabilní jsou polyanilinové (**PANI**) filmy vzniklé z anilinu:

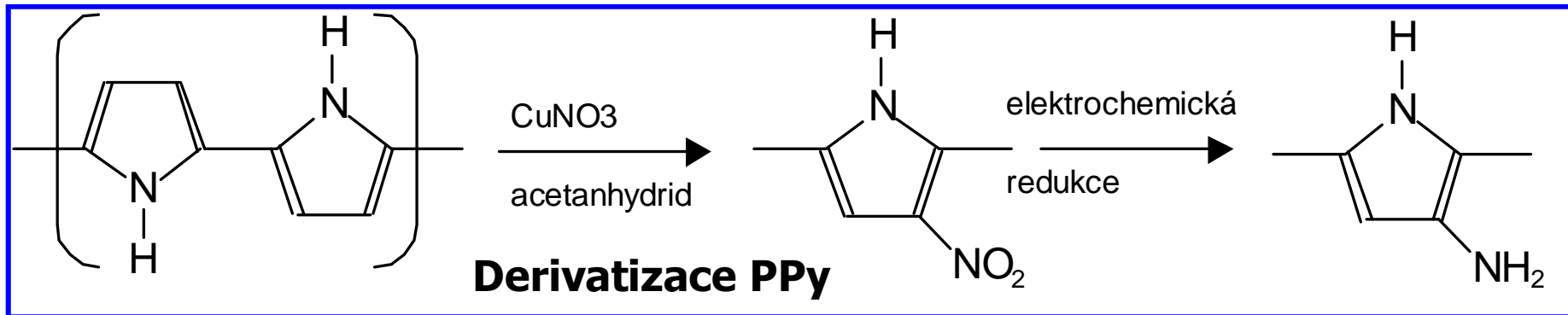


# Kontrolní membrány

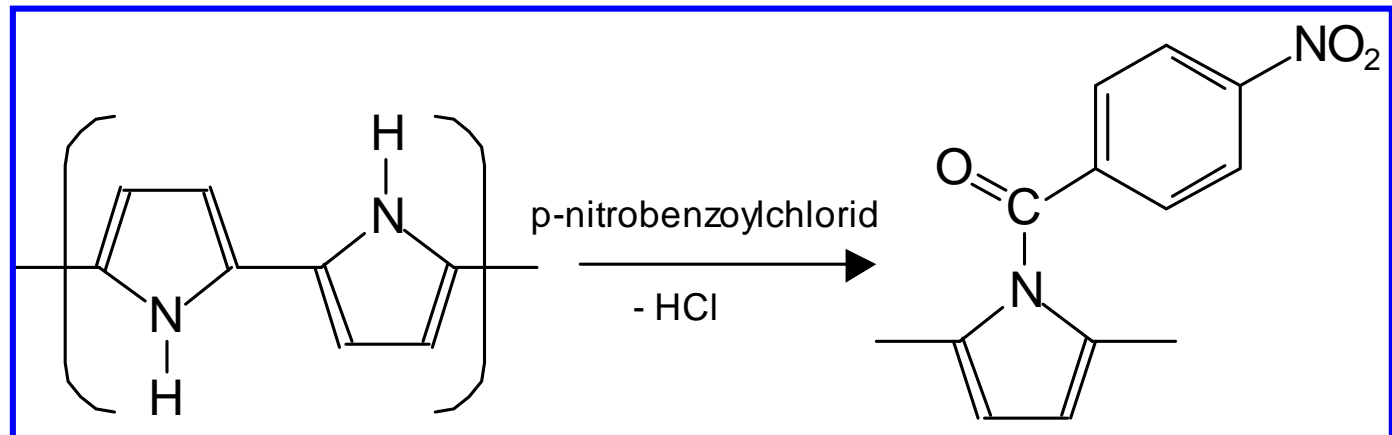
- elektropolymerní vrstvy jsou také vhodné pro ovlivňování transportu látek jako kontrolní membrány - polyfenylendiaminové (PPD) filmy z 1,2 diaminobenzenu
- nevodivé o tloušťce kolem 10 nm; snadno přes ně prochází peroxid vodíku, přitom jiné rušivé látky jsou odstíněny
- protože zachycení bílkovin uvnitř polymeru je poměrně volné, dochází časem k uvolnění do roztoku a tím k poklesu aktivity
- jiné postupy proto používají elektropolymerní film jen jako výchozí chemickou modifikaci povrchu elektrody, a film se pak dále upravuje chemickými reakcemi.

# Modifikace elektropolymerů

- polypyrrol se dá **nitrovat** v  $\beta$  poloze a elektrochemickou redukcí nitroskupiny se získá aminoskupina vhodná pro další kovalentní vazbu biomolekul:

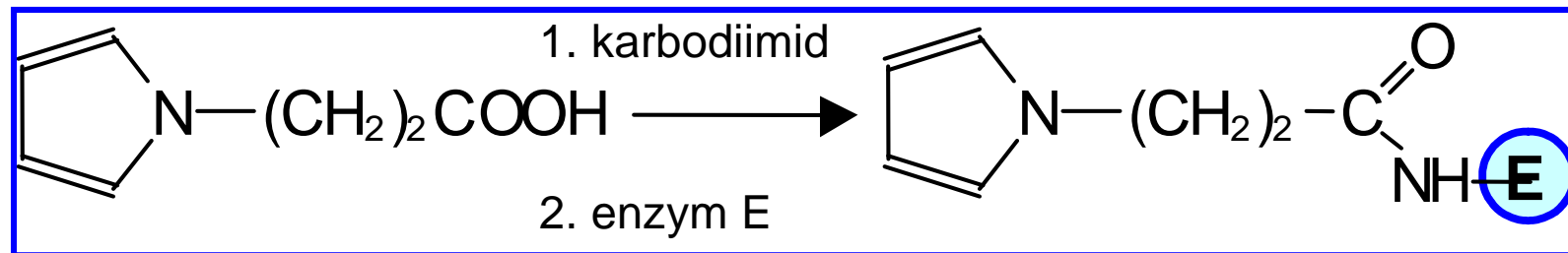


- jinou možností je reakce PPy s nitrobenzoylchloridem, nitroskupinu je pak možné redukovat také chemicky zinkem v kys. octové:



# Elektropolymerace bílkovin

- elektropolymerovat se dají také vhodné deriváty biomolekul ve směsi např. s pyrrolem
- k postranním skupinám enzymů je možné připojit pyrrolová jádra, takže po skončení elektropolymerace je enzym nedílnou součástí řetězce polymeru:



- podobně je možné využít i derivát s koncovou aminoskupinou

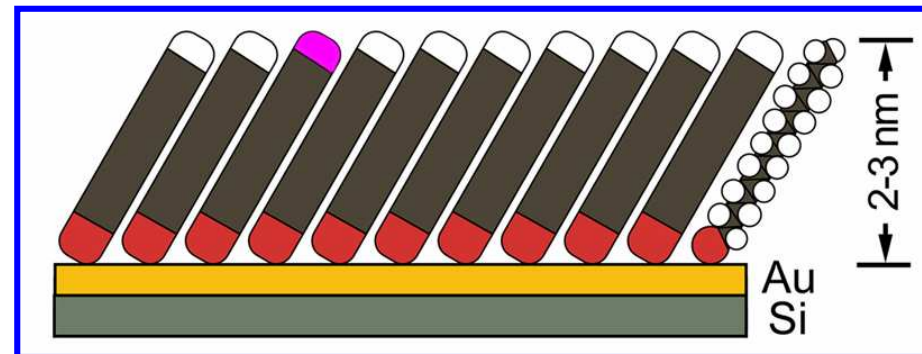


# Aktivace inertních povrchů

- pracovní povrch sensorů tvoří malá skupina poměrně inertních materiálů: sklo, křemík, různé modifikace uhlíku (grafit, skelný uhlík, kompozitní směsi) a ušlechtilé kovy (zejména zlato a platina)
- některé biomolekuly se na tyto materiály adsorbují s různou pevností, avšak spolehlivá a dlouhodobě stabilní imobilizace vyžaduje kovalentní vazbu mezi biomolekulou a povrchem
- prvním krokem imobilizace jsou aktivační postupy, které na málo reaktivní povrch sensoru zavádějí reaktivní skupiny schopné pak kovalentní vazby s biomolekulami

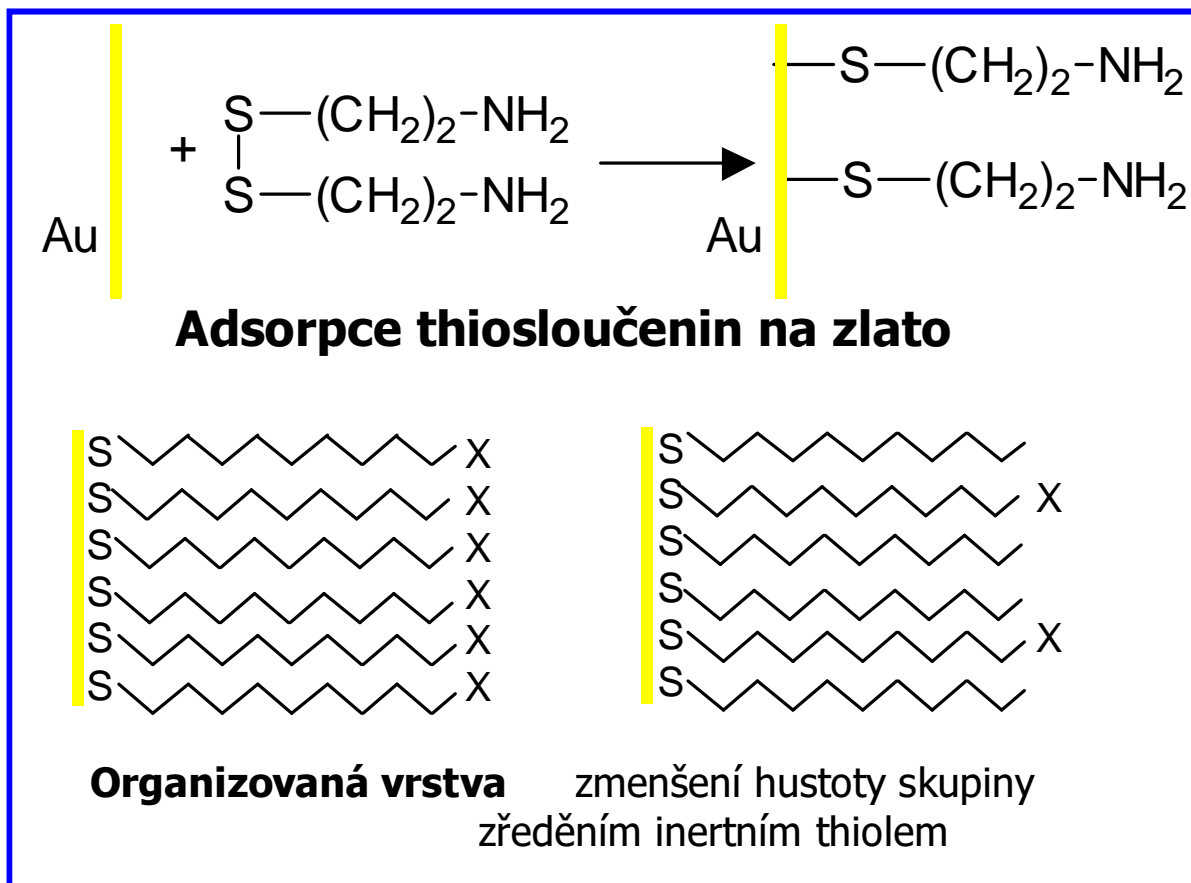
# Spontánní vznik monovrstev

- monovrstvy (**SAM**, „self-assembled monolayer“)
  - molekulární soubor vzniklý samovolnou organizací molekul aktivního surfaktantu na nosném substrátu, který se ponoří do jejich roztoku ve vhodném rozpouštědle
  - tři části molekuly - povrchově aktivní skupina (pevně se váže na povrch, head), alkylový spojovací můstek, koncová funkční skupina (na povrchu monovrstvy, tail)
- 1940, Zisman - Pt v roztoku amfifilních molekul se stává hydrofobní - monovrstva
- 1983, Nuzzo a Allara - thioly na zlatě
- další SAM:
  - alkylsilany na hydroxylovaných površích (např.  $\text{SiO}_2$ )
  - mastné kyseliny na povrchu kovů
  - alkylfosfoniové soli na zirkonu



# Spontánní vznik monovrstev

- Au-S monovrstvy - vznik velmi pevné vazby mezi zlatem a sírou



- nejběžnějším příkladem je velmi pevná adsorpce thiosloučenin na povrchu zlata
- vhodnou volbou dalších funkčních skupin thiolu nebo disulfidu lze získat reaktivní skupiny využitelné pro další imobilizační kroky

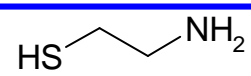
# Thiosloučeny

- používají se thioly obsahující v molekule další vhodnou funkční skupinu
- **aminoskupina** - nejběžnější, monovrstvy na bázi krátkých řetězců - dobře prostupné, vhodné pro elektrochemické aplikace
- **hydroxyskupina** - slouží spíše pro inaktivaci povrchu, vnesení hydrofilního charakteru a zabránění nespecifickým vazbám biomolekul
- **karboxyskupina** - vhodná pro aktivaci pomocí EDC/NHS

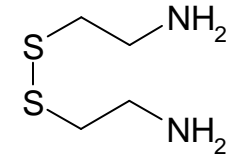
**12-merkaptododekanol, 16-merkaptohexadekanol**

**MUA, merkaptoundekanová k.**

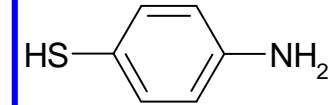
**cysteamin**



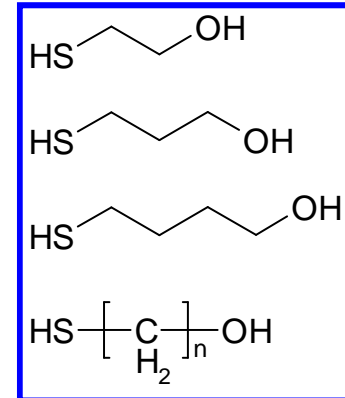
**cystamin**



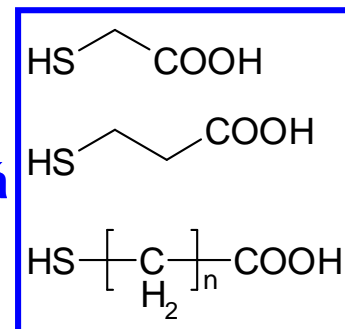
**thiofenol**



**merkapt ethanol /  
propanol /  
butanol ...**

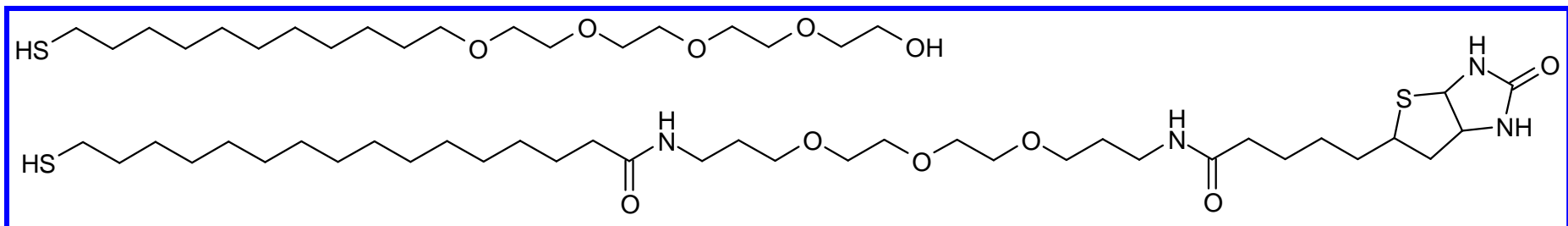
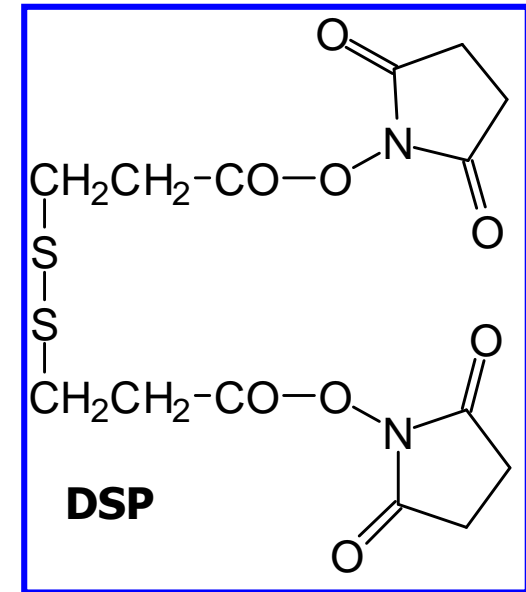


**merkapt octová /  
propionová  
/ ...**

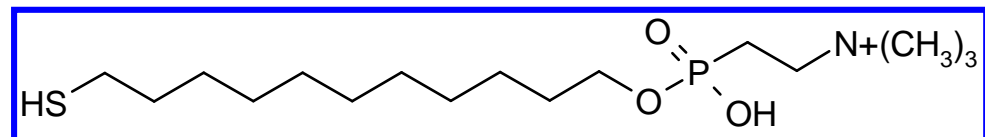


# Speciální thiosloučeny

- bis(N-hydroxysukcinimidester) kyseliny 3,3'-dithiopropionové (DSP)
  - váže na zlato, vnáší reaktivní NHS skupiny pro vazbu biomolekul
- PEO (polyethylneoxid, nebo jinak EG, ethylenglykol) jako koncová hydrofilní skupina

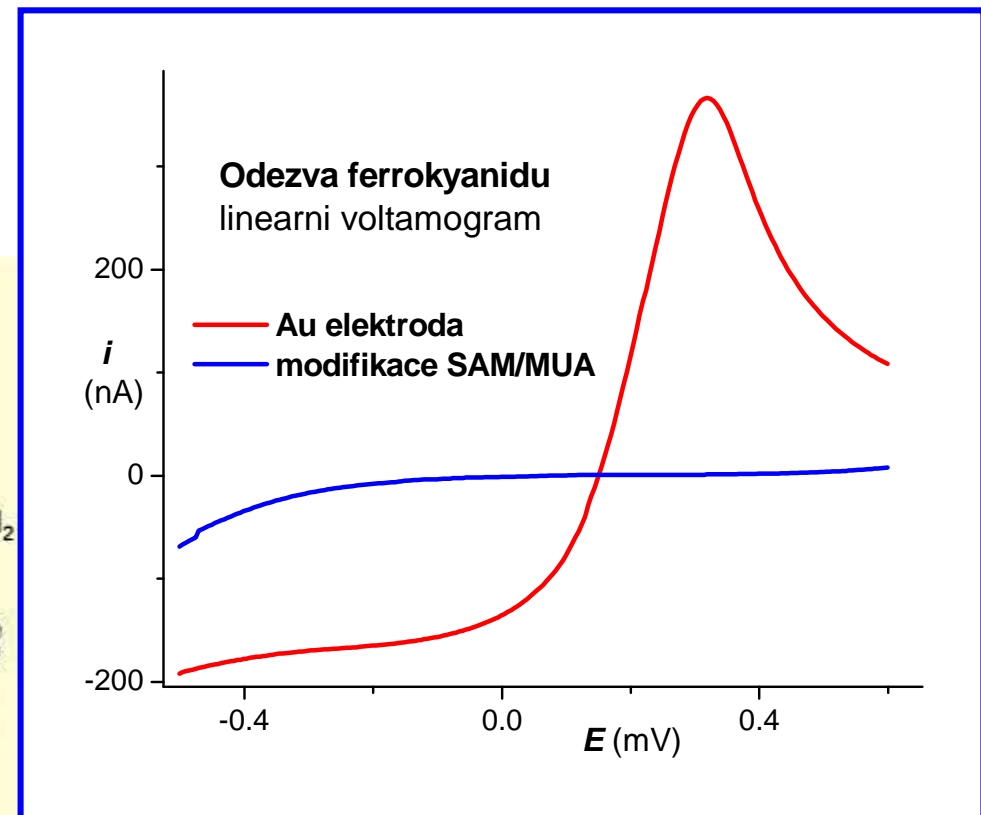
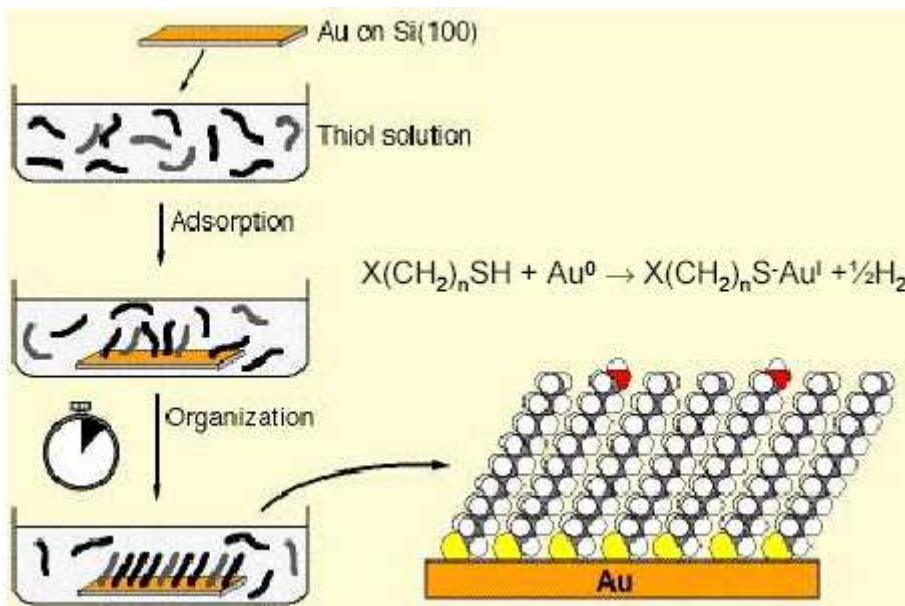
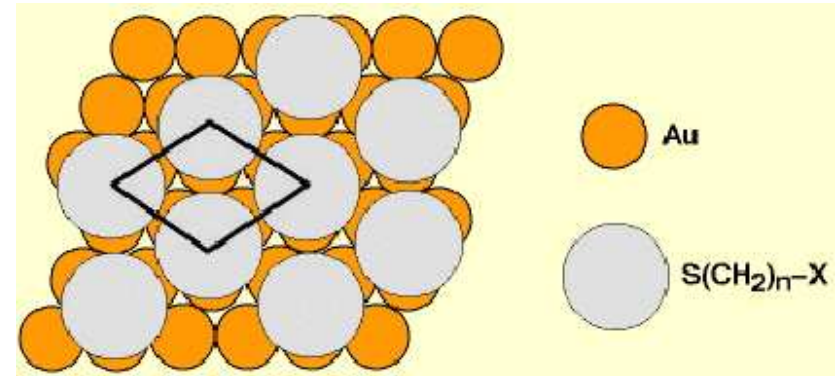


- případně nesoucí na konci ještě biotin - smíšené SAM, kontrolovaná hustota biotinových zbytků
- 11-merkaptoundecylfosforylcholin - biokompatibilní povrchy



# SAMs

- vždy vzniká monomolekulární vrstva, která může být tak hustá, že povrch je prakticky elektricky izolován
- naopak adsorpce krátkých thioderivátů často zlepšuje elektrochemické odezvy bílkovin a jiných látek (usnadněná výměna elektronů s cyt c)
- hustotu a kompaktnost vrstvy lze určit elektrochemicky
  - na základě signálu vhodné elektroaktivní látky (ferrikyanid)
  - nebo sledovat pokles vodivosti povrchu v průběhu vzniku SAM

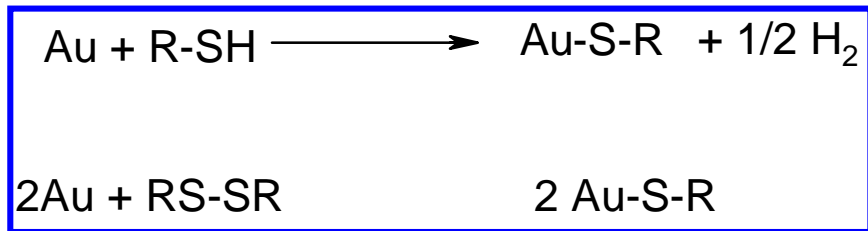


## Povrch zlata

- v zásadě může být jakýkoliv (zlato je inertní vůči oxidaci)
- pro dobrou kvalitu SAM je nejlepší povrch Au(111)
  - připravitelný termálním napařováním ve vysokém vakuu
  - tloušťka 100 až 200 nm optimální
- nosičem křemík nebo sklo (slída, křemen, ...)
- adhezi zlepší mezivrstvička (1 - 5 nm) Ti nebo Cr, poté povrch lépe snáší kapaliny i agresivnější chemikálie (neodchlípne se)
- zvýšení hrubosti povrchu (např. pro SERS)
  - elektrochemické leptání
  - nanesení vrstvy nanočástic zlata
- čištění povrchu zlata
  - aqua regia zředěná, HCl:HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O 3:1:6
  - piranha, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poměr
  - elektrochemické cyklování 0.17 až 1.87 V
  - UV ozáření, následně oplach ethanolem
  - čerstvý povrch se rychle na vzduchu kontaminuje (stává se hydrofobnějším)

## Depozice thiolů

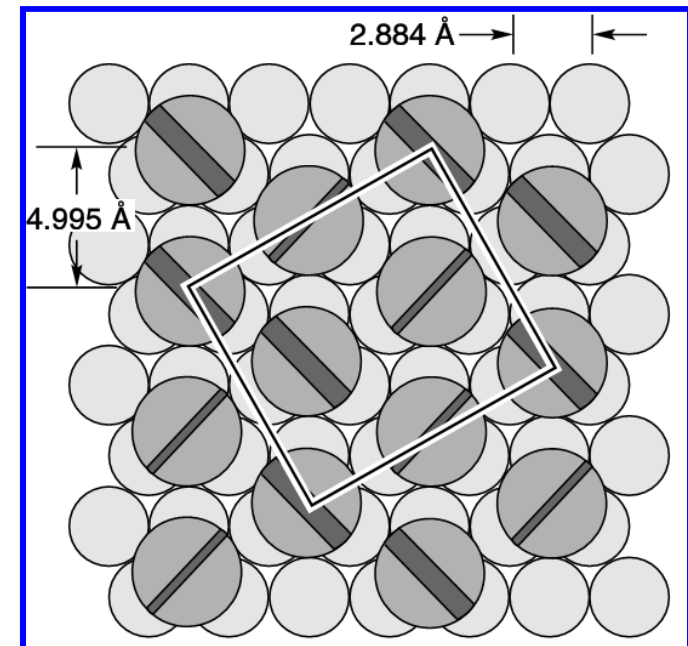
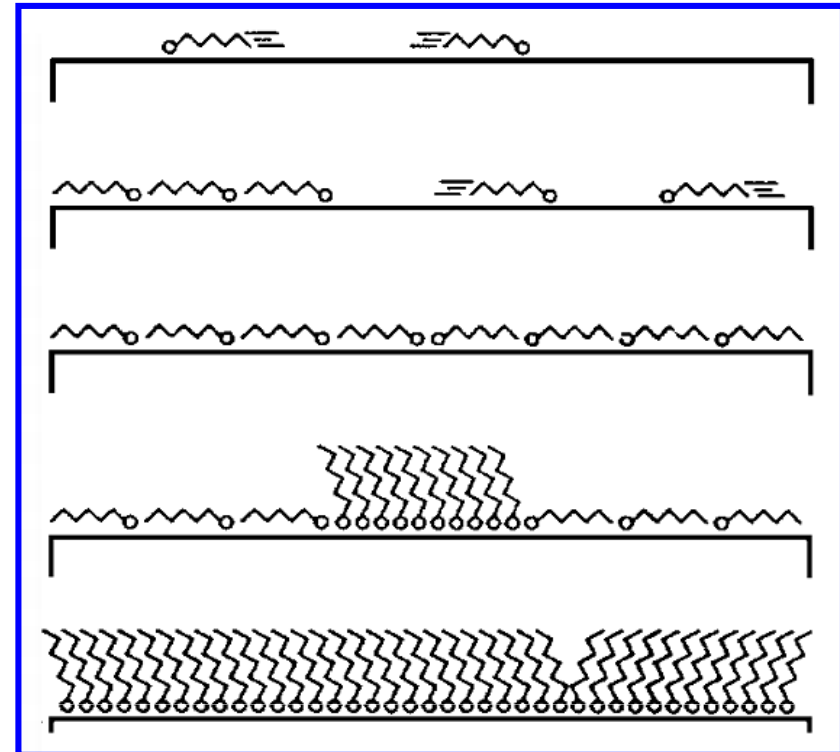
- obecně doporučovaný postup:
- 1 mM roztok thiolu v ethanolu po dobu 16 až 24 hod, následně oplach ethanolem
  - kratší časy (1 - 2 hod) - monovrstva nemusí být úplně kompaktní ani dokonale organizovaná (crystallinity)
  - objemné thiosloučeniny - může pomoci zahřátí (60 °C)
  - změny podmínek (optimalizace) mají často na výslednou monovrstvu zanedbatelný vliv
- alternativní rozpouštědla
  - voda, hexan, toluen, THF, dichlormethan, acetonitril, DMF
  - rozpouštědla s dlouhými uhlíkatými řetězci - defekty v monovrstvě (kontaminace rozpouštědlem)
- depozice par thiolu (v proudu dusíku, nebo ve vysokém vakuu)
- chemický proces:
  - vývoj vodíku se nevylučuje
  - v přítomnosti kyslíku může přecházet na vodu





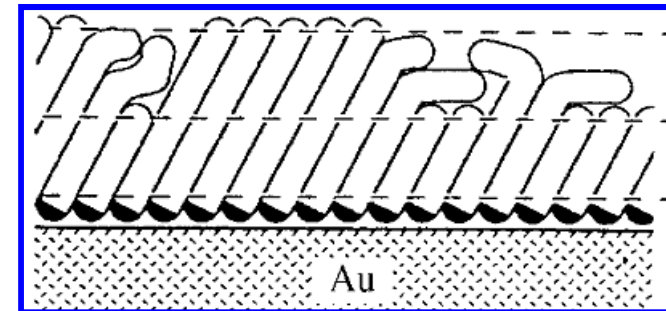
## Postupná organizace na povrchu

- nejprve velmi pohyblivé, náhodně rozmístěné molekuly
- nad kritickou mezí začnou vznikat ostrůvky z několika molekul
- až dojde k pokrytí celého povrchu
- a začnou vznikat husté domény, fungující jako nukleační místa
- nakonec je celý povrch pokryt organizovanou strukturou
  - mohou v ní být ale malé defekty
  - pinholes, průměr kolem 0.25 nm
- povrch zlata se může částečně rozpouštět, zejména v konc. roztocích thiosloučenin



## Smíšené monovrstvy

- současná adsorpce dvou různých thiosloučenin - vznikne smíšená vrstva tvořená oběma komponentami roztoku
- obecně složení monovrstvy neodpovídá složení nanášecího roztoku
- více se váží delší thioly a méně polární thioly
- méně se váží thioly s polární nebo dokonce s nabitou koncovou skupinou
- méně se váží thioly s objemnými koncovými skupinami
- silný vliv na složení má povaha rozpouštědla
  - nejméně rozpustný thiol se váže přednostně
- při vyšší teplotě nemusí vznikat smíšené monovrstvy, ale oddělené oblasti tvořené např. krátkými a dlouhými thioly
- lze použít i asymetrické disulfidy R-S-S-R'
- v existující monovrstvě lze nahradit již adsorbované thioly novými z roztoku (displacement), probíhá zejména v oblastech rozhraní



## Stabilita thio-SAM

- obecně je stabilita monovrstev velmi vysoká za normálních laboratorních podmínek
  - snáší až 1 M roztoky kyselin a zásad
- při uchovávání na vzduchu lze za cca 20 dnů pozorovat změny úhlu alk. řetězců - postupná oxidace atomů síry na povrchu zlata
  - vznik sulfidů  $RS^-$  až sulfonátů  $RSO_3^-$
  - vzdušnou oxidaci výrazně urychluje UV záření
- nestabilní v přítomnosti:
  - silná oxidační činidla (piranha, halogeny, ozon, peroxid vodíku)
  - činidla atakující zlato (jodidy, kyanidy, aqua regia)
  - organická rozpouštědla
  - zahřívání nad 70 až 80 °C, při 300 °C kompletní desorbce
  - elektrochemická redukční desorbce pod -1.5 V (reverzní děj k adsorpci)
  - elektrochemická oxidace (0.5 až 1.5 V) v alkalickém (0.1 M KOH) nebo neutrálním prostředí

## Vlastnosti thio-SAM

### ■ tloušťka a stupeň pokrytí

#### – elipsometrie

- polarizace světla odráženého od modifikovaného povrchu závisí na tloušťce a indexu lomu nanesené vrstvy

#### – povrchová plasmonová resonance (SPR)

- p-polarizovaný koherentní paprsek se odráží hranolem umístěným pod sklíčkem s napařenou tenkou vrstvičkou kovu
- při jistém rezonančním úhlu se část světla absorbuje díky excitaci volných elektronů ve vrstvičce kovu (plasmony)
- jev závisí na tloušťce a indexu lomu nanesené modifikující vrstvy
- funguje v suchém stavu i v kapalině - studium vzniku filmů *in situ*

#### – piezoelektrické křemenné mikrováčky (QCM)

- rezonační frekvence vibrujícího krystalu závisí na jeho hmotnosti, včetně pevně adherovaných modifikujících filmů
- funguje v suchém stavu i v kapalině - studium vzniku filmů *in situ*

## Vlastnosti thio-SAM

### ■ struktura a chemické složení

#### – FTIR spektroskopie

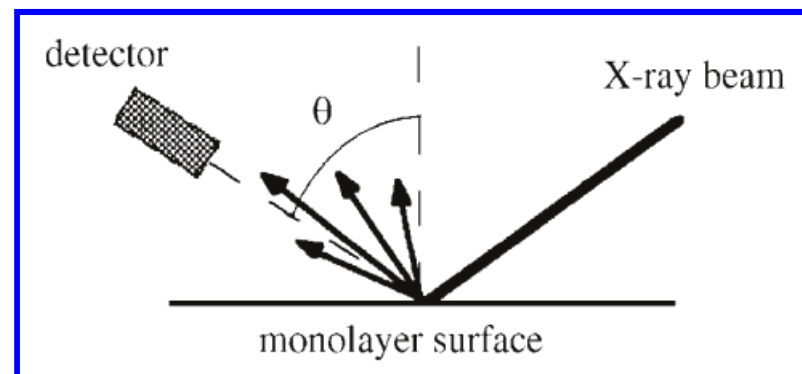
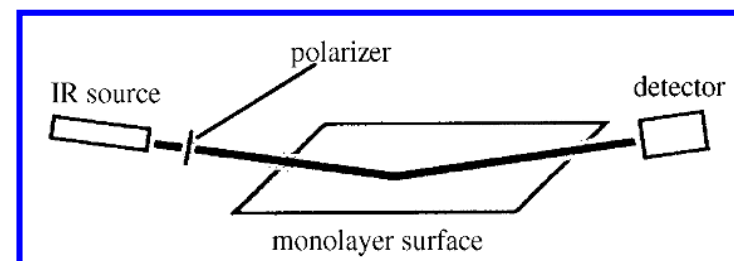
- IR paprsek se odráží pod malým (grazing) úhlem od povrchu monovrstvy
- je možné vypočítat orientaci funkčních skupin v monovrstvě

#### – SERS (surface enhanced Raman spectroscopy)

- je potřeba hrubý povrch pro zvýšení intenzity
- citlivé na funkční skupiny blízko povrchu kovu (0.35 až 0.7 nm)
- funguje v suchém stavu i v kapalině (normální Ramanovo spektrum je zanedbatelné)
- informace o chemickém složení povrchu

#### – X-ray fotoelektronová spektroskopie (XPS, ESCA)

- měří se energie elektronů vyražených z obalu atomů po ozáření rentgenovým paprskem ve vakuu
- specifické pro atomy - elementární analýza monovrstvy, schopnost rozlišit i oxidační stavy (amino x nitro)



# Vlastnosti thio-SAM

## ■ struktura a chemické složení ...

### – SIMS (secondary ion MS)

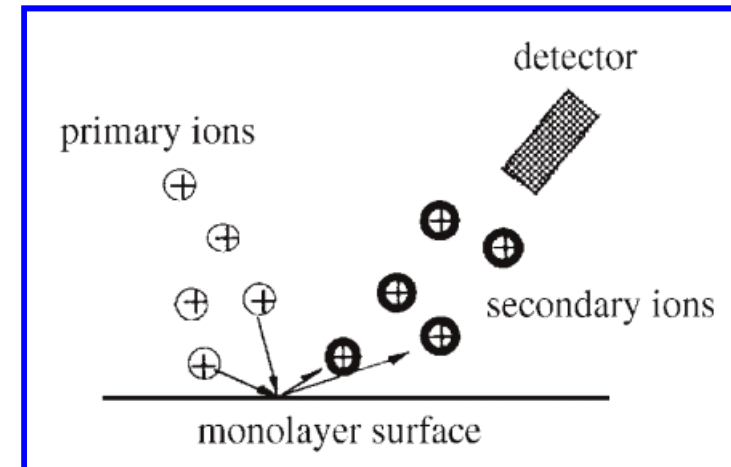
- vzorek se bombarduje primárními ionty, obvykle  $\text{Ar}^+$  nebo  $\text{Xe}^+$
- detekují se vyražené sekundární ionty

### – difrakční techniky

- GIXD (grazing incidence X-ray diffraction) malý úhel dopadu, analýza reflektivity a rozptylu, informace o mol. struktuře, tloušťce a indexu lomu

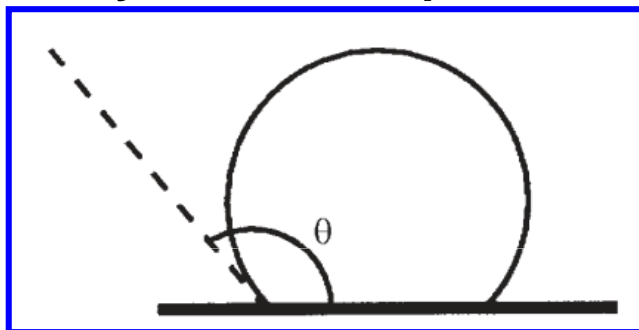
### – elektrochemické techniky

- cyklická voltametrie - odezvy redoxní proby - blokování elektronového transportu při vzniku kompaktní monovrstvy
- impedanční techniky - snižování vodivosti



# Vlastnosti thio-SAM

- povrchové vlastnosti
  - kontaktní úhel - smáčitelnost
  - kapka umístěná na zkoumaném povrchu, velikost úhlu závisí na hydrofobnosti povrchu

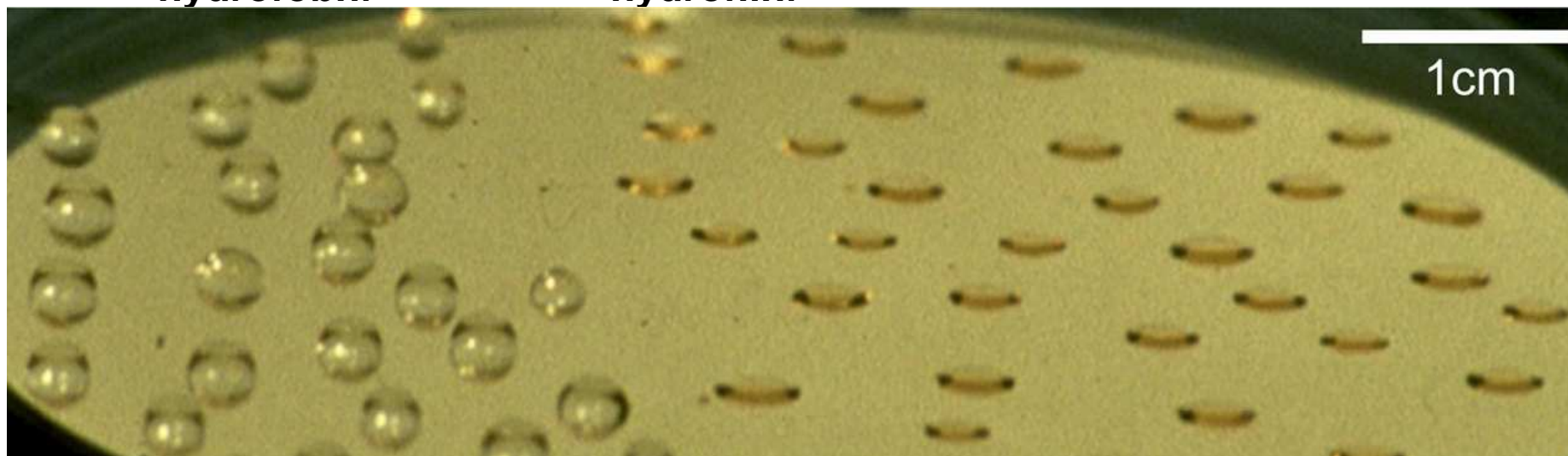


– hydrofobní

hydrofilní

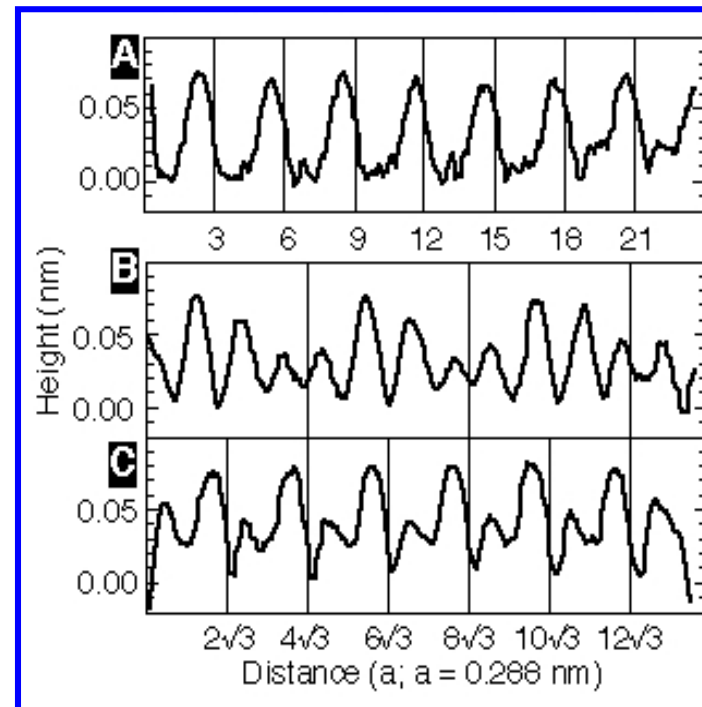
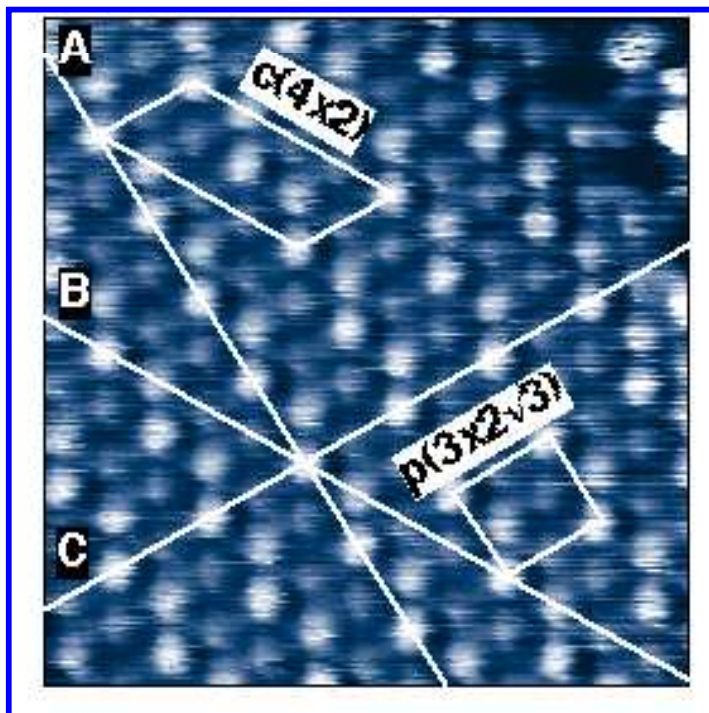
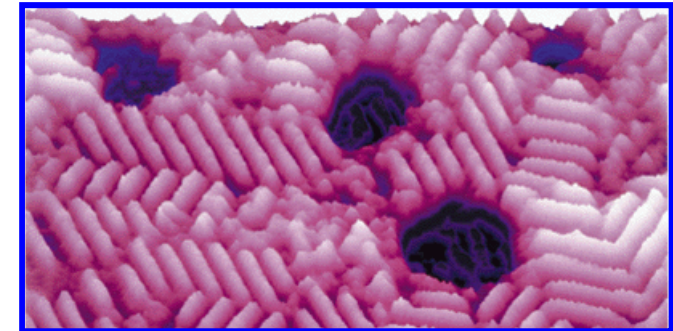
TABLE 1. Advancing contact angles of water on films prepared by adsorption of  $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$  on gold<sup>50</sup>

X	n	Contact angle, (deg)
$(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$	2	119
$\text{CH}_3$	21	117
$\text{CH}=\text{CH}_2$	17	105
$\text{OCOCF}_3$	11	93
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	10	89
Cl	11	89
$\text{OCH}_3$	11	85
CN	21	74
$\text{CONHCH}_3$	11	76
$\text{CO}_2\text{CH}_3$	10	74
OH	11	<15
$\text{CONH}_2$	10	<15
COOH	10	<15



# AFM / STM studium

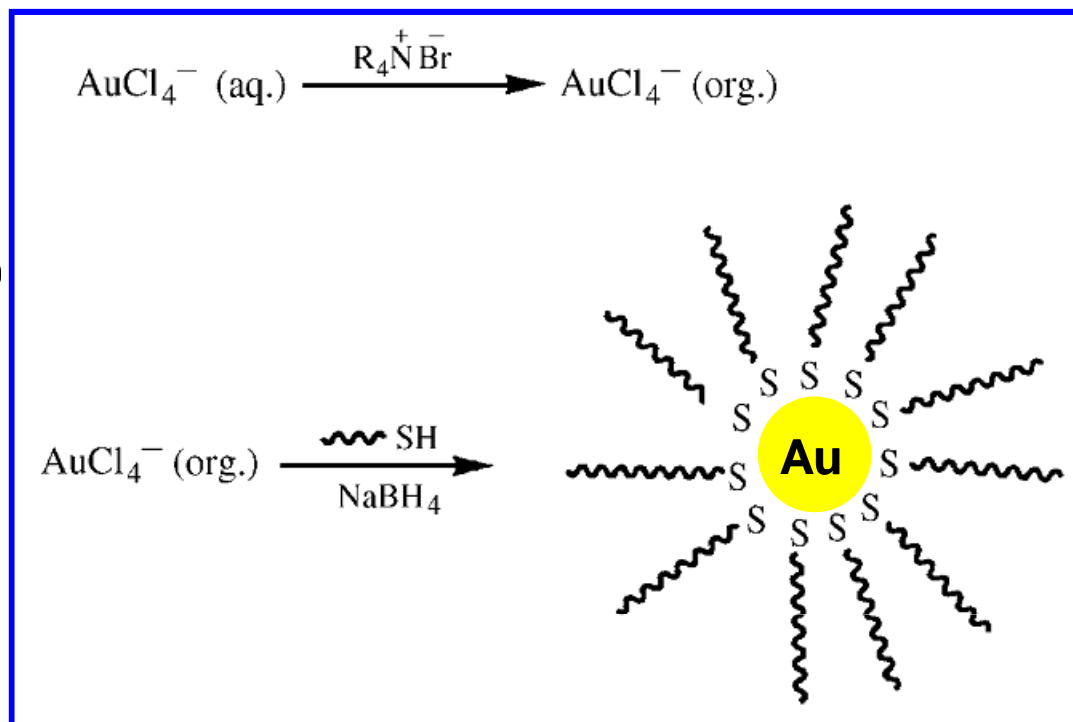
- STM, merkaptoethansulfonová k.,  $w=30$  nm
  - zřetelné poruchy struktury (pits, pinholes)
- oktadekanthiolová vrstva
  - zobrazení výškových profilů
  - periodičita odpovídá rozměrům daným molekulovými modely





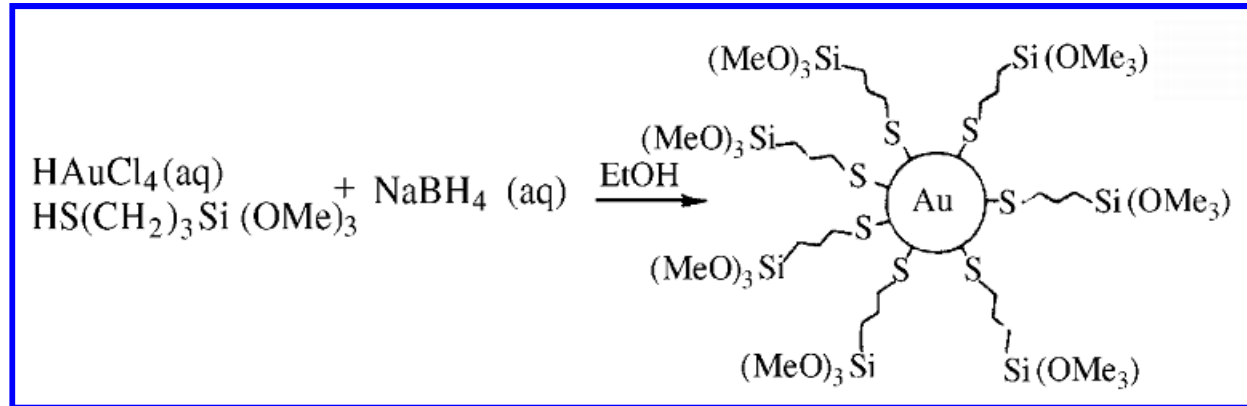
# Thio-SAM na povrchu Au koloidů či nanočástic

- vytvoření Au nanočástic v přítomnosti thiolu, v org. rozpouštědle
- reakční poměry (Au ku RSH) ovlivní velikost nanočástic
- disperse klasického Au solu v ethanolu obsahujícím thiol
- třepání Au solu s roztokem thiolu v toluenu



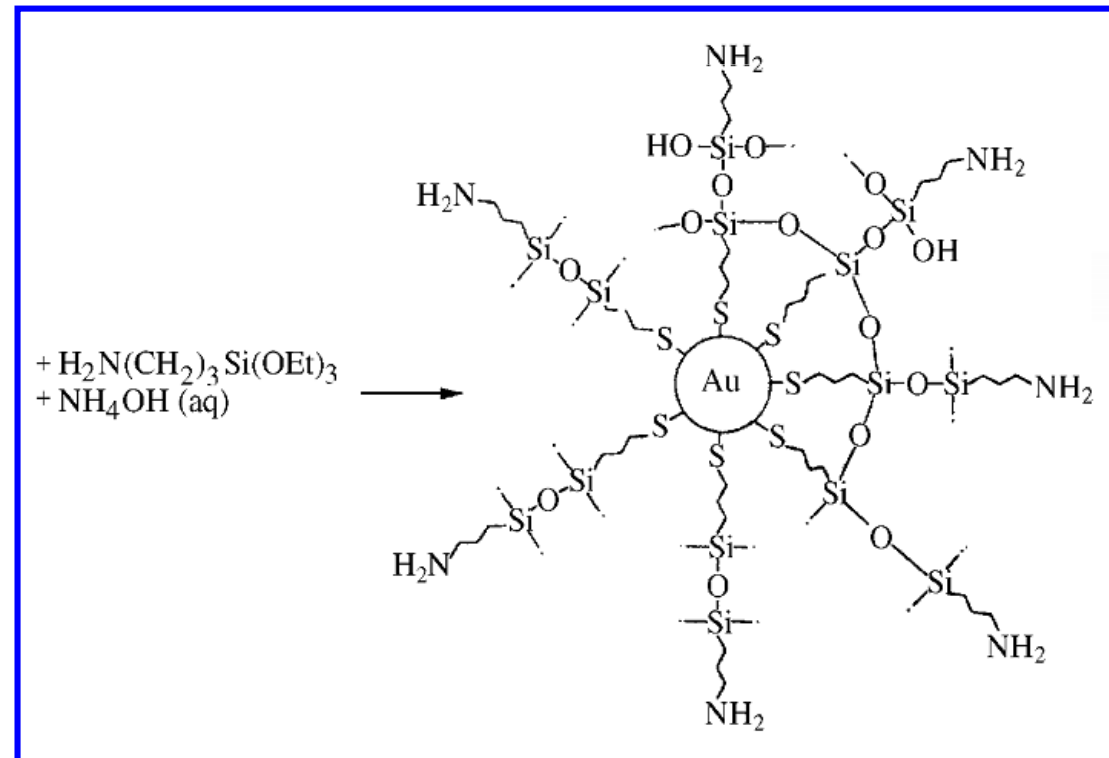
# Další derivatizace povrchu Au nanočástic

- kombinace se silanizačním thiočínidlem:



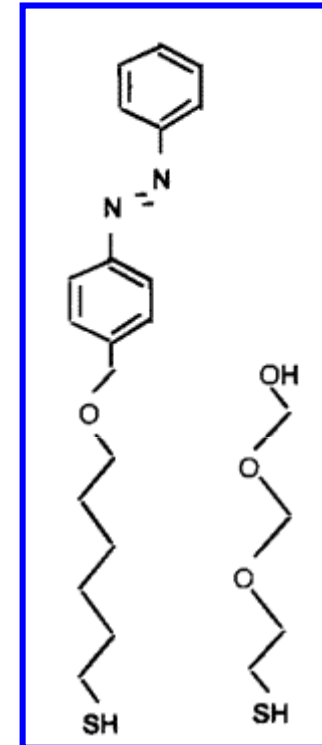
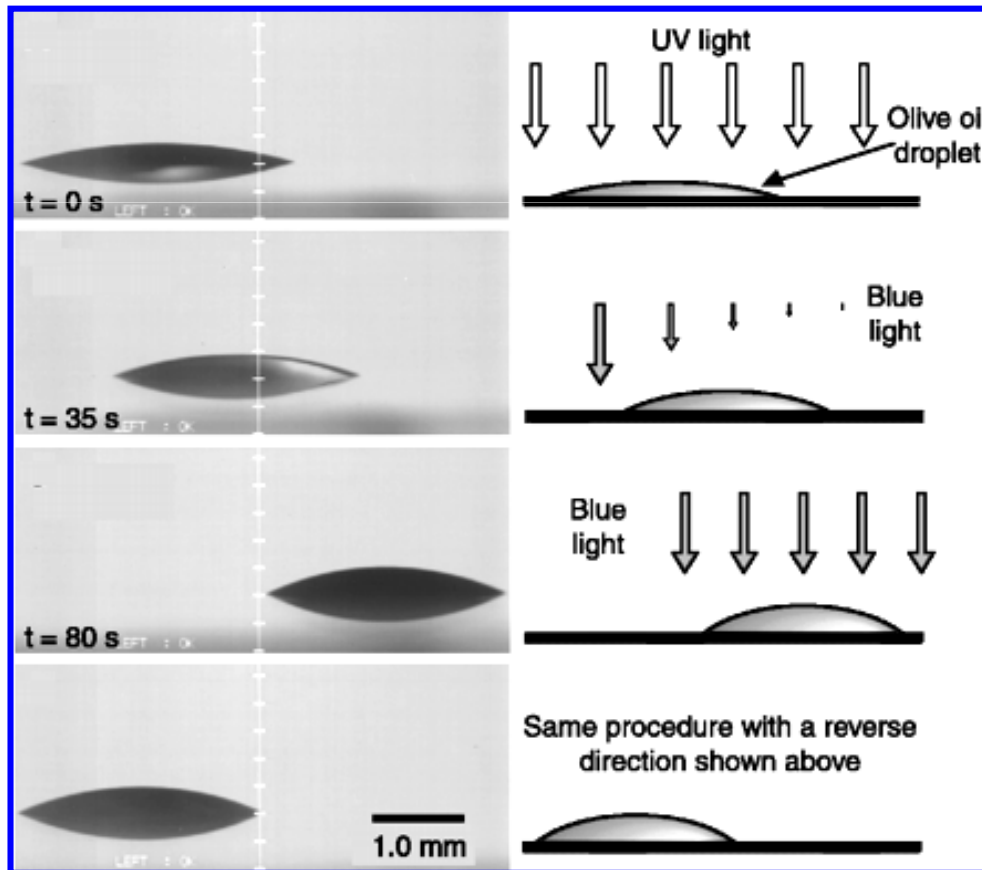
- následuje hydrolyzáza:

- lze i opačně umístit Au nanočástice na silanizovaný povrch



# Dynamické povrchy - světlocitlivé

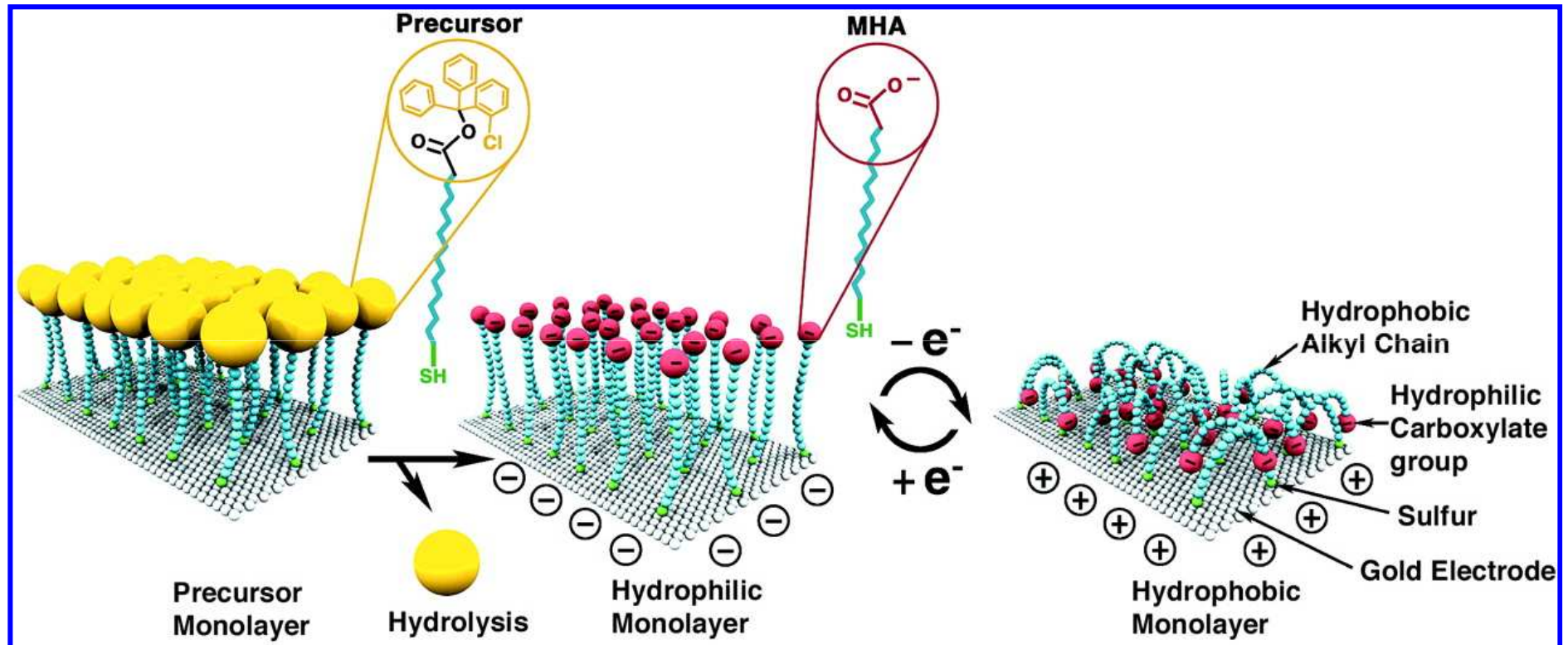
- deriváty azobenzenu: cis-trans isomerizace, po osvětlení
  - UV (366nm) - cis isomer
  - modré (436nm) - trans isomer
- změna konfigurace vede ke změně polarity
- pohyb kapky po povrchu poháněný světlem





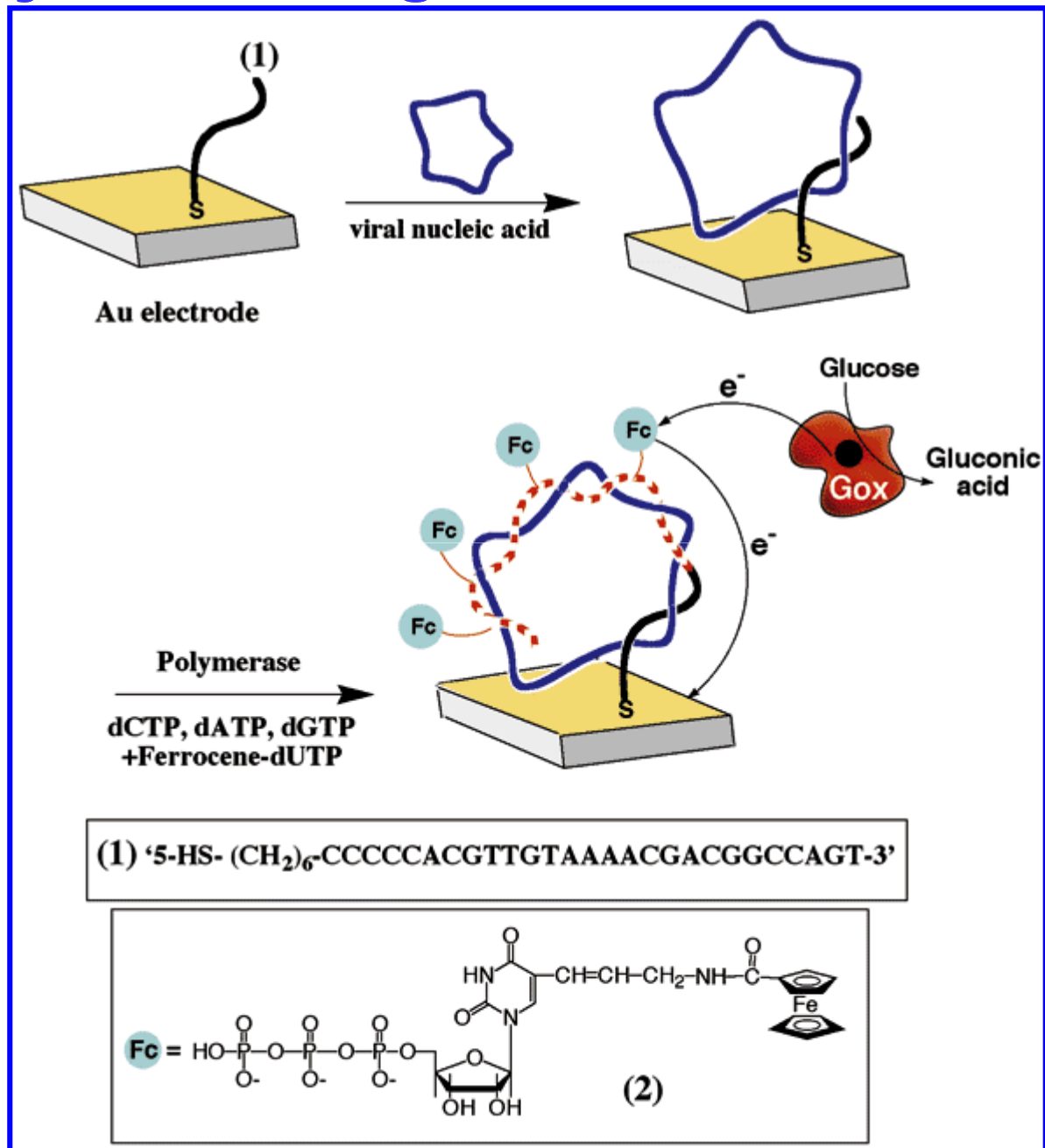
# Dynamické povrchy - změny polarity

- v závislosti na aplikovaném potenciálu elektrody vykazuje její povrch hydrofilní nebo hydrofobní charakter



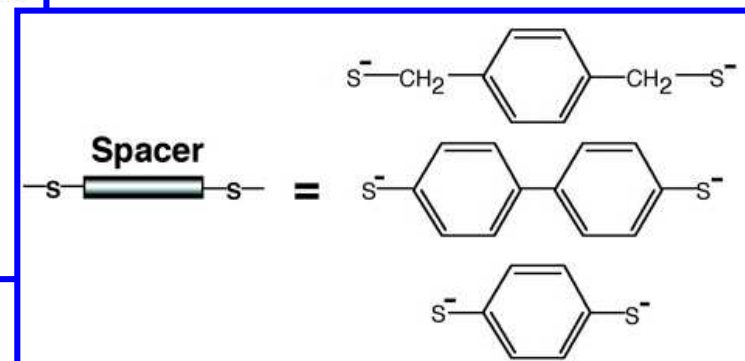
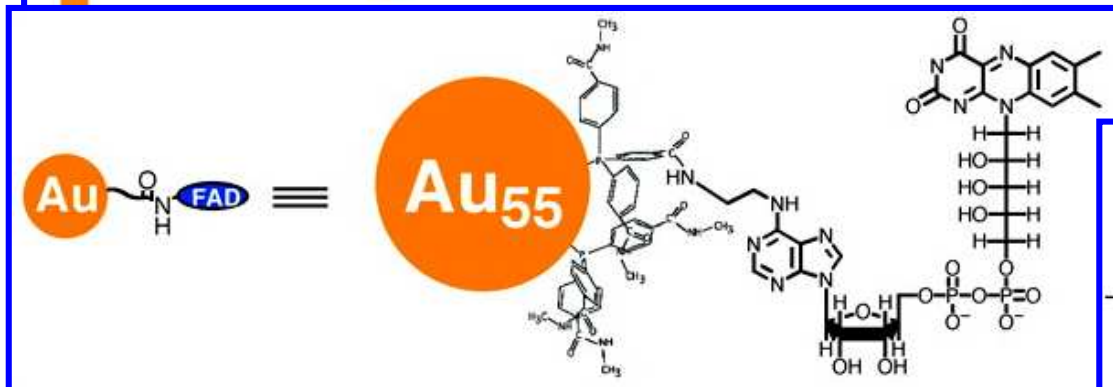
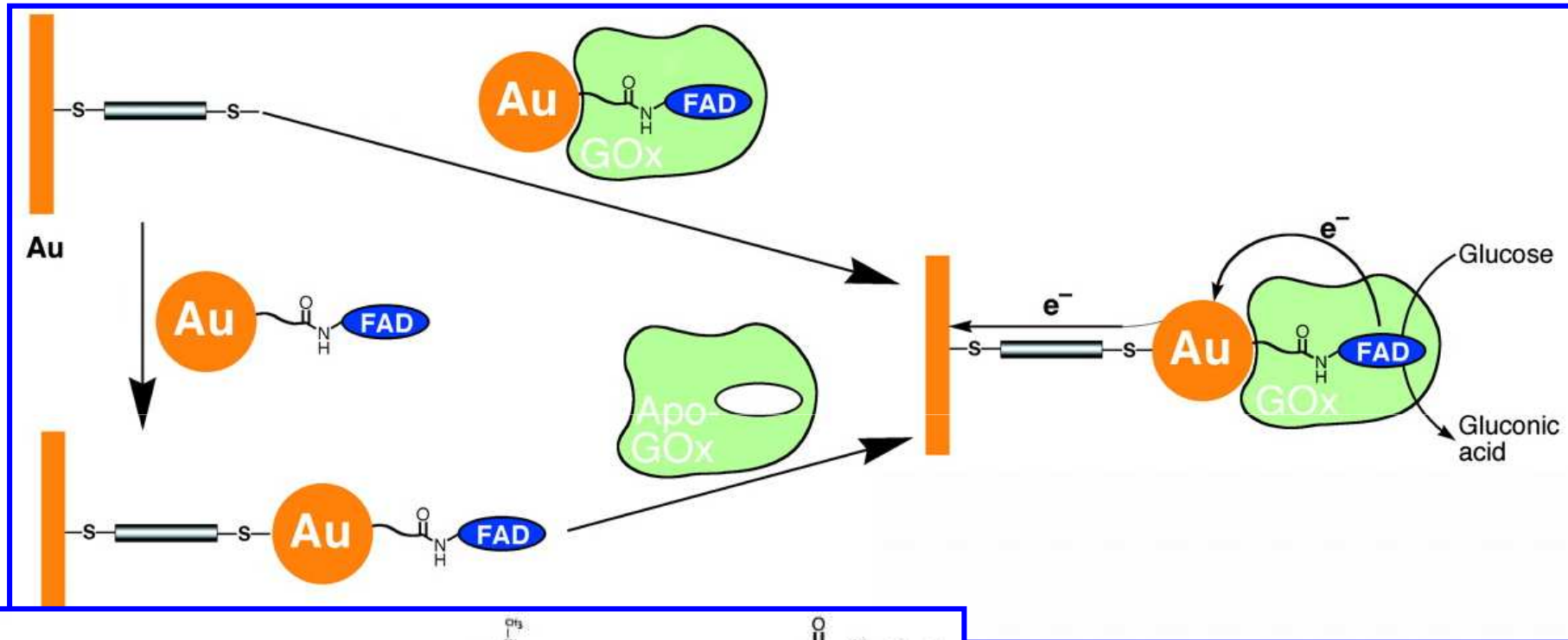
# Dynamické povrchy - biosensing

- SAM oligonukleotidové proby specificky rozpozná virální NA
- polymerasa dosyntetizuje druhé vlákno, přitom ho označí redoxní molekulou ferrocenu
- tím je umožněn přenos elektronů z donorového enzymu GOD
- (I. Willner)



# Dynamické povrchy - nanowiring

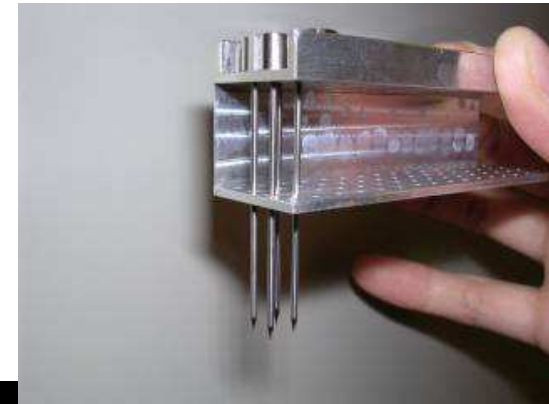
- komunikace enzymů s elektrodou prostřednictvím chemického „nanodrátku“
  - „wired enzymes“, rychlost přenosu elektronů řádově vyšší než reakce s kyslíkem



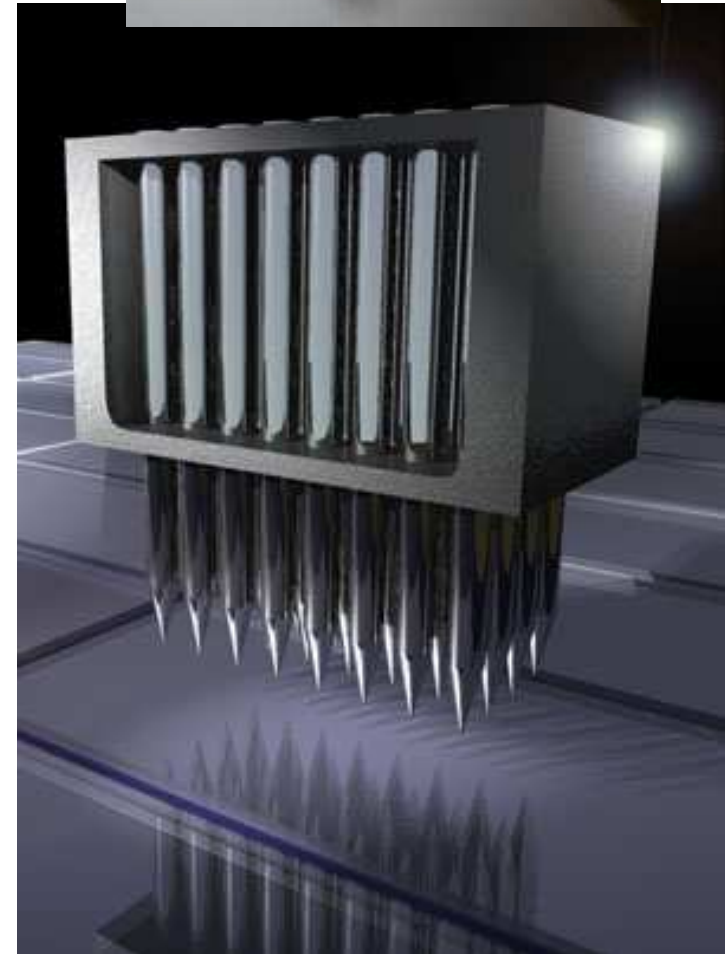




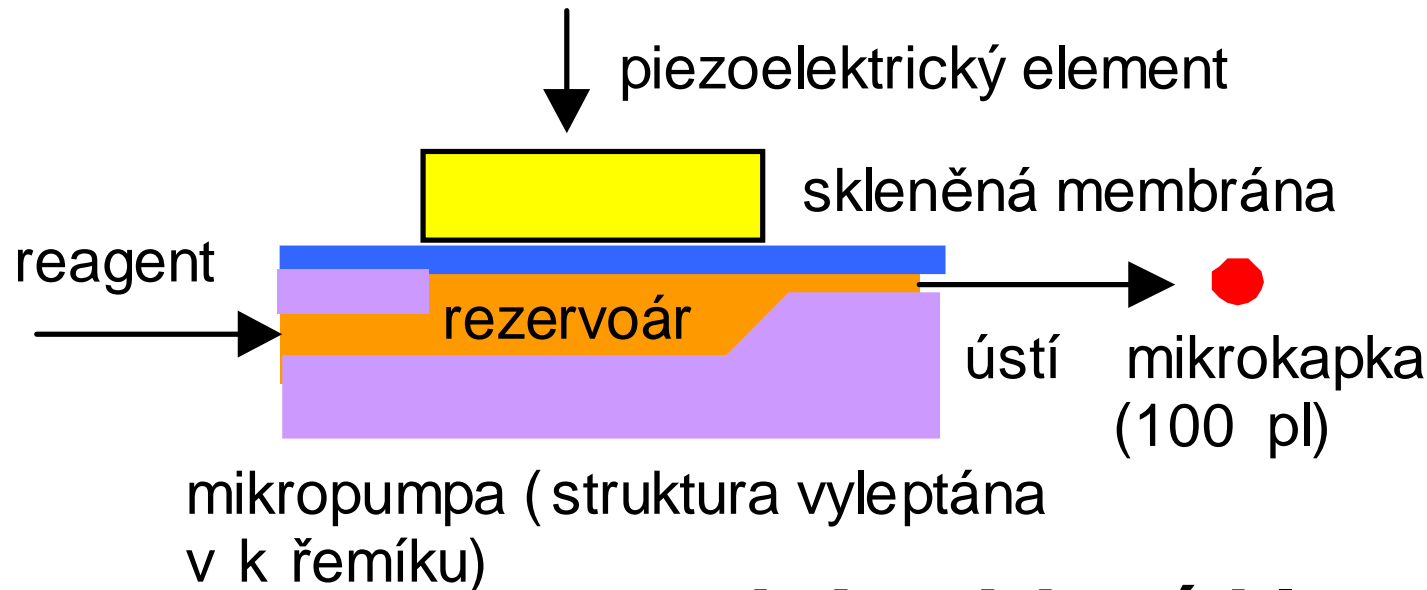
# Cílená lokální imobilizace



- primitivní postupy - „**pin printing**“ – hrot se namočí v roztoku činidla a mikropapka se přenesse do žádané pozice na čipu
- velikost spotů je 100-300  $\mu\text{m}$ , až 10 tisíc prob na čipu
- horší reprodukovatelnost, pomalost
- nízká cena, laboratorní příprava



## Ink-jet printing

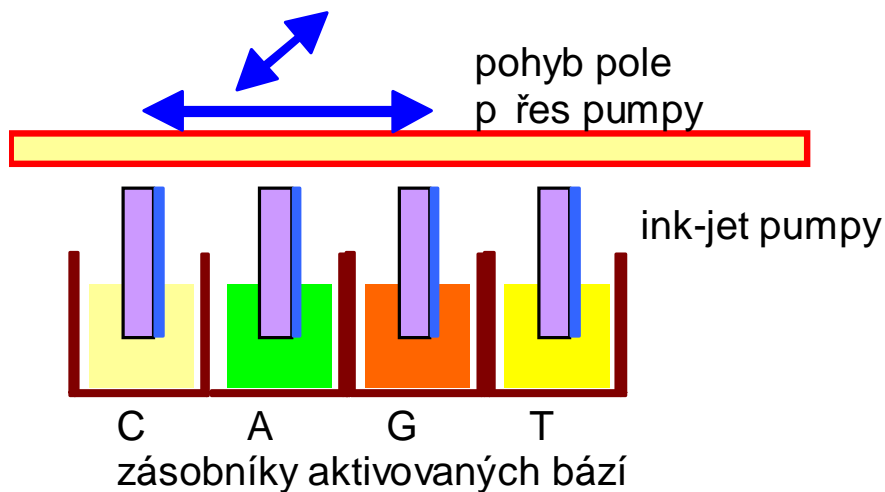
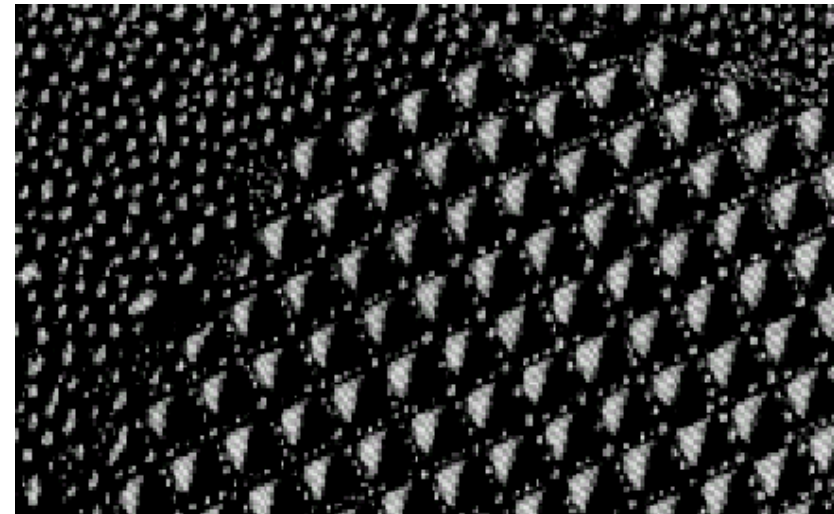


## Ink-jet tisková hlava

- alternativní metoda přípravy DNA čipů – „tisk“ reagensů na podklad – obdoba inkoustových tiskáren
- základem je struktura rezervoáru vytvořená v křemíku (micromachining), překrytá velmi tenkou skleněnou membránou, na kterou přiléhá piezoelektrický element (aktuátor)
- rezervoár se naplní reagentem, poté nad ústí pumpy posune žádaná pozice čipu, a na piezoelektrický aktuátor se přivede puls napětí
- piezoelement se mechanicky deformuje, zatlačí na membránu, čímž dojde k vystříknutí mikrokapky reagentu
- rychlost „tisku“ je 1 až 6 kHz

## Ink-jet printing

- rozptýlení kapky na povrchu brání předcházející modifikace čipu
- hydrofilní místa pro imobilizaci prób navzájem oddělené hydrofobními úseky (surface tension wells)
- nanášené kapky reagentů se nerozpíjí, povrchové napětí je drží uvnitř dané pozice

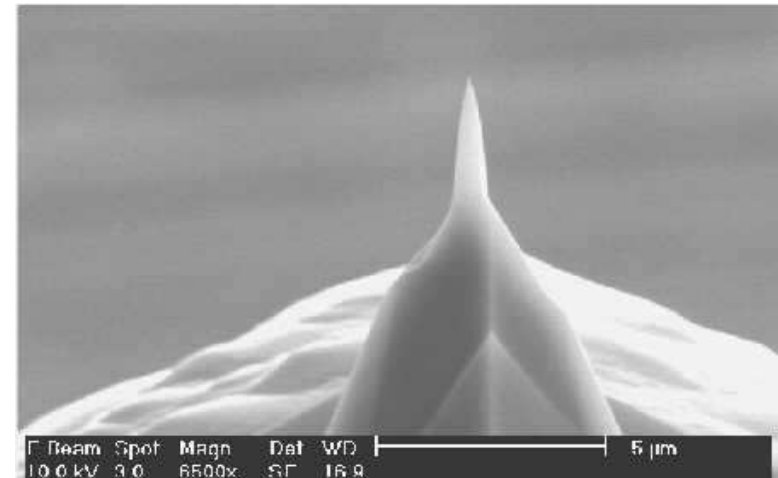


### Syntéza souboru DNA prób

- reakční kroky probíhají naráz na všech pozicích čipu
- promývání a pomocné reakce se provádí pro celý čip společně
- pro 100000 pozic trvá prodloužení o jednu bázi asi 5 minut
- syntéza souboru o délce 25 bází zabere 2 hodiny.

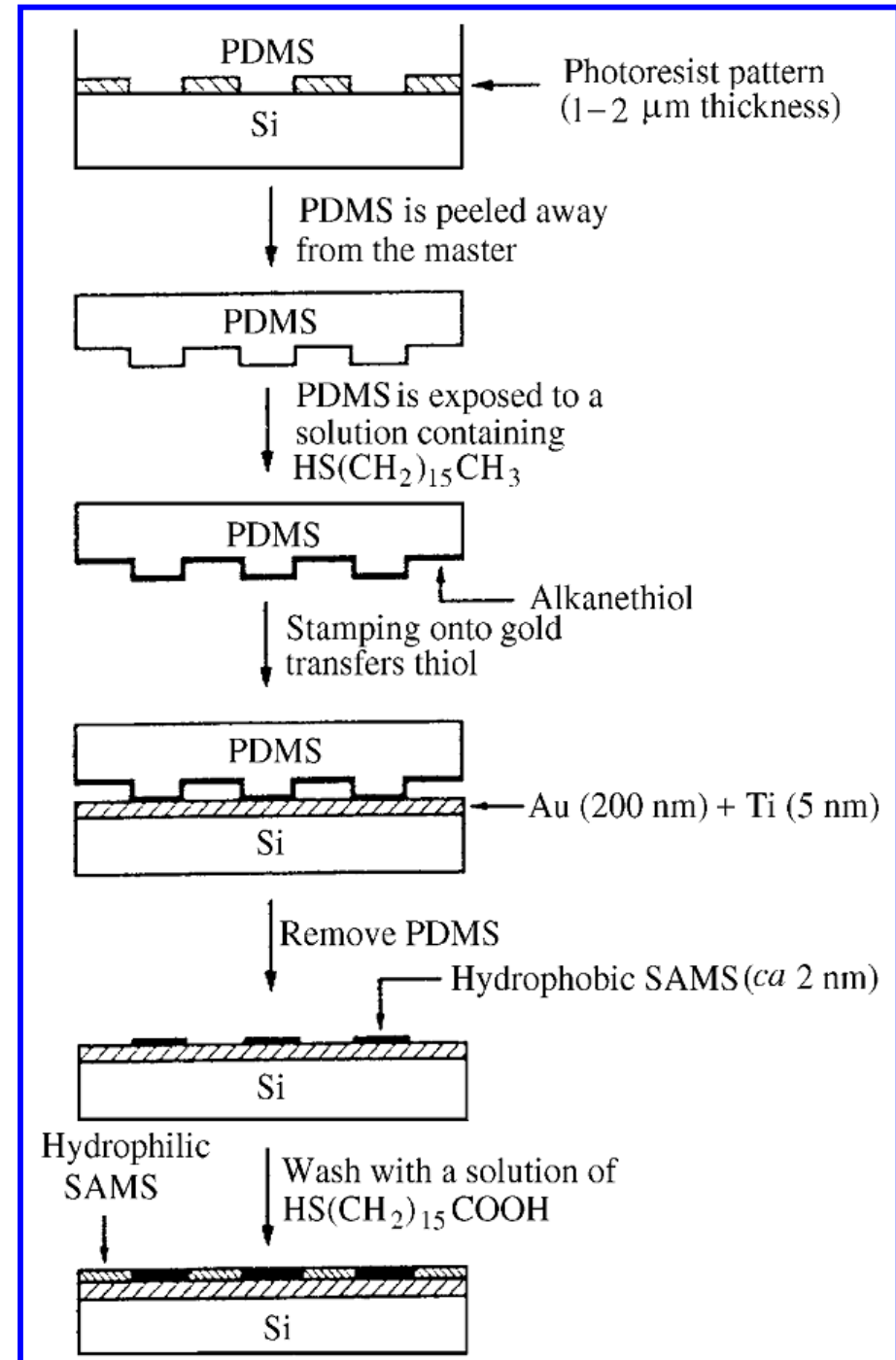
# Subtraktivní techniky

- vytváření struktur či obrazců pomocí odstranění přebytečných částí
- leptání
- FIB (focused ion beam) milling
- laserové opracování
  - machining, pulzy různého trvání
- ultrazvukové vrtání
  - 25  $\mu\text{m}$  amplituda při frekvenci 20-100 kHz
  - bezstresové opracování křehkých materiálů
- tradiční technologie
  - NC frézky, vrtačky, ...



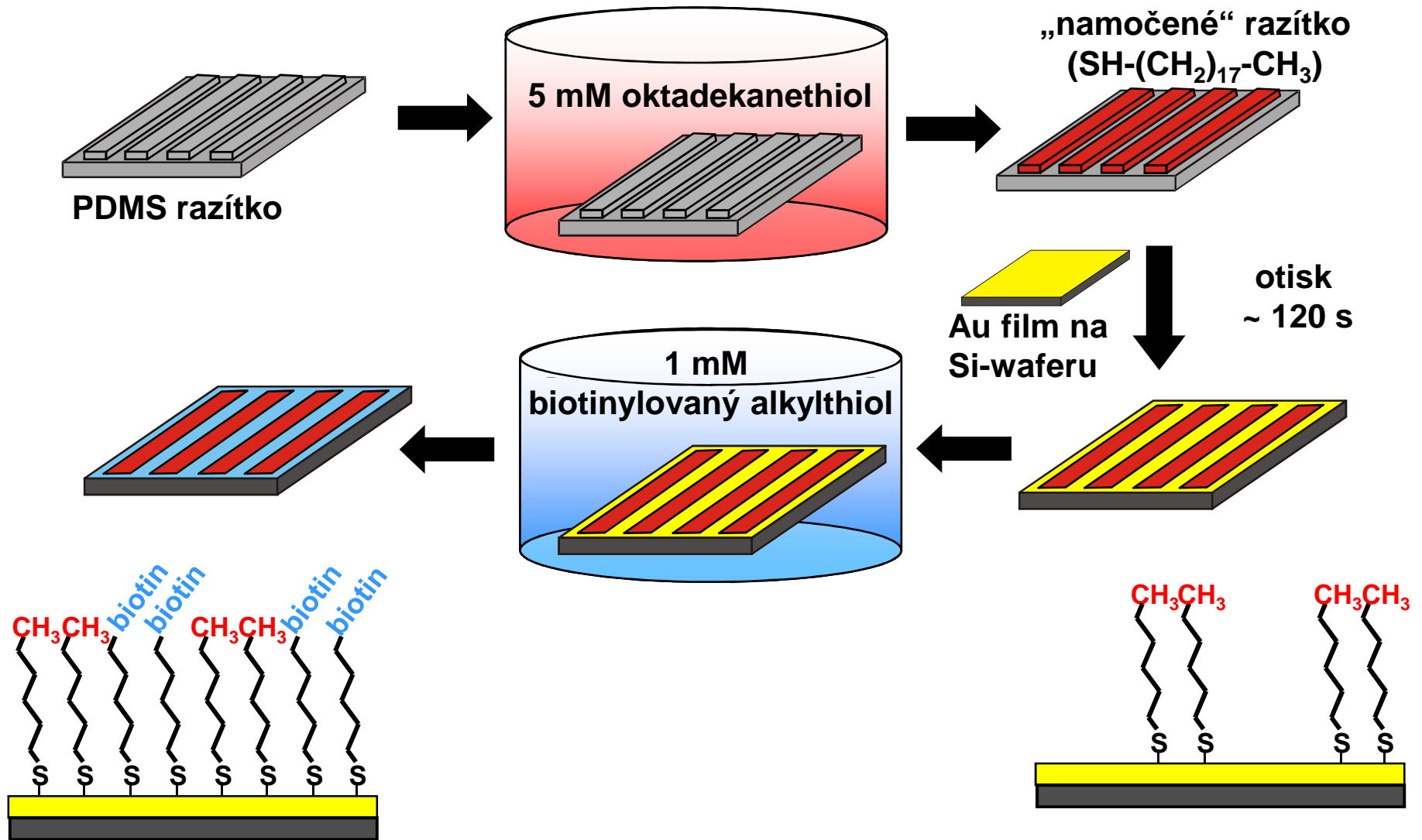
## Strukturace povrchu

- surface patterning
- cílem je imobilizovat danou biomolekulu pouze v určitém geometricky definovaném místě povrchu
- využití pro konstrukci různých typů souborů (arrays) detekčních elementů nebo multikanálových biosensorů
- technika tisku - plastové "razítko" se namočí v modifikačním roztoku a motiv se přenese na povrch



# Strukturace povrchu

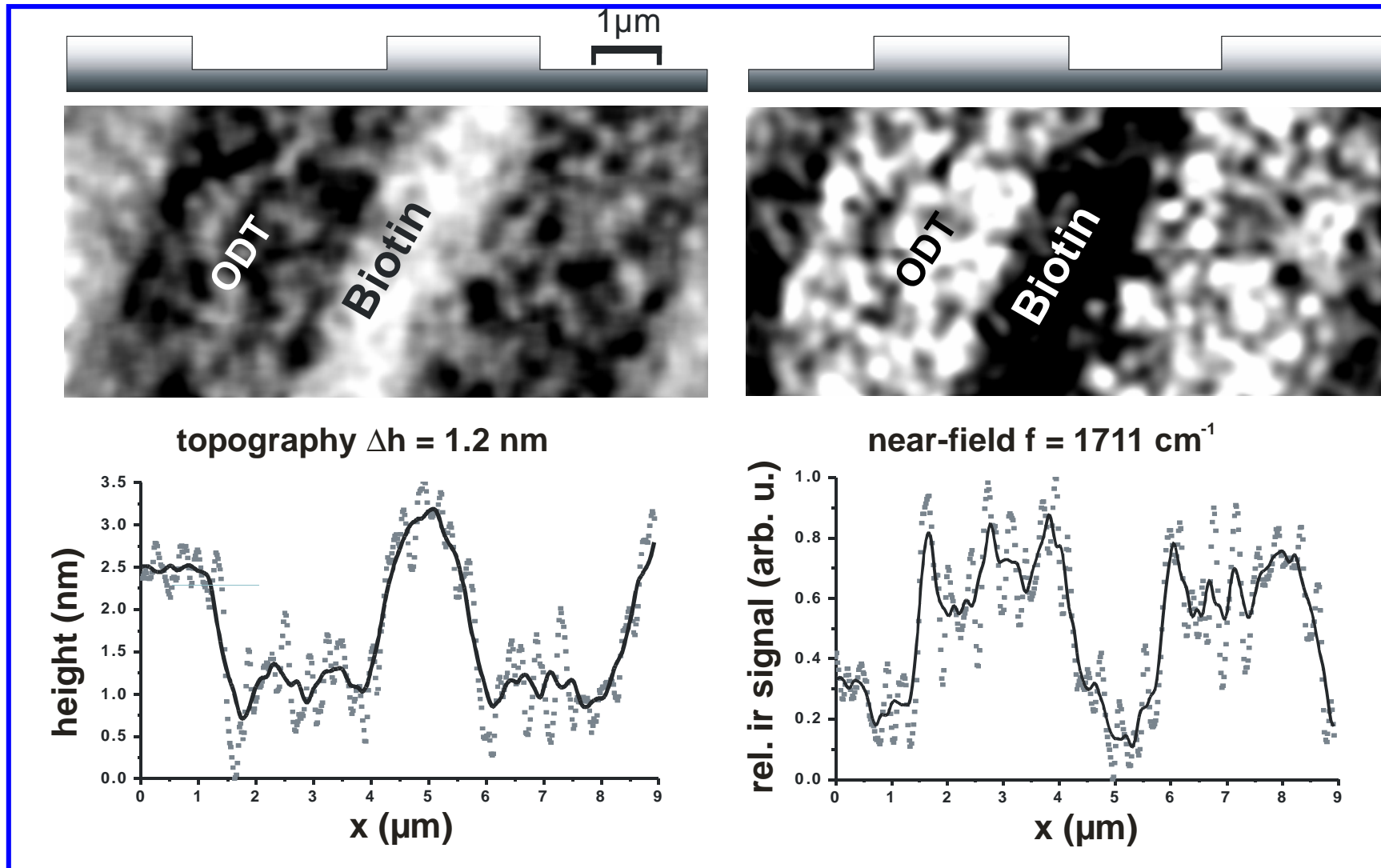
- surface patterning



# Charakterizace strukturovaného povrchu

topografie (AFM)

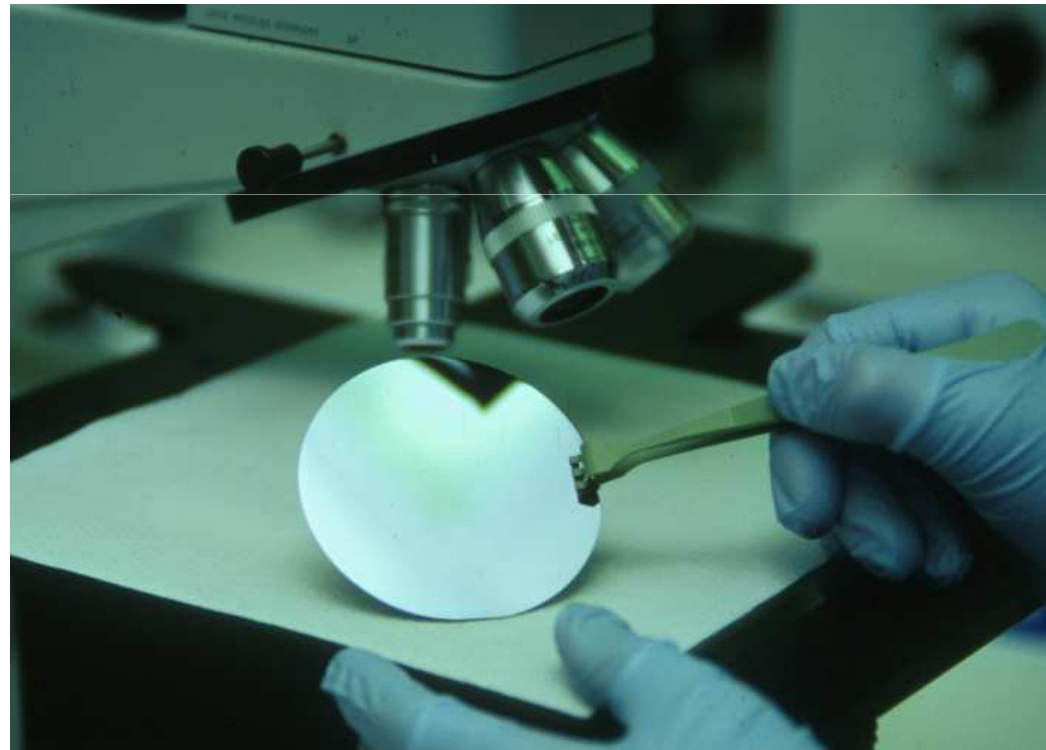
SNIM, IR spektrum,  
1711  $\text{cm}^{-1}$ , absorpce ureidoskupiny



- SNIM, scanning near field IR microscopy

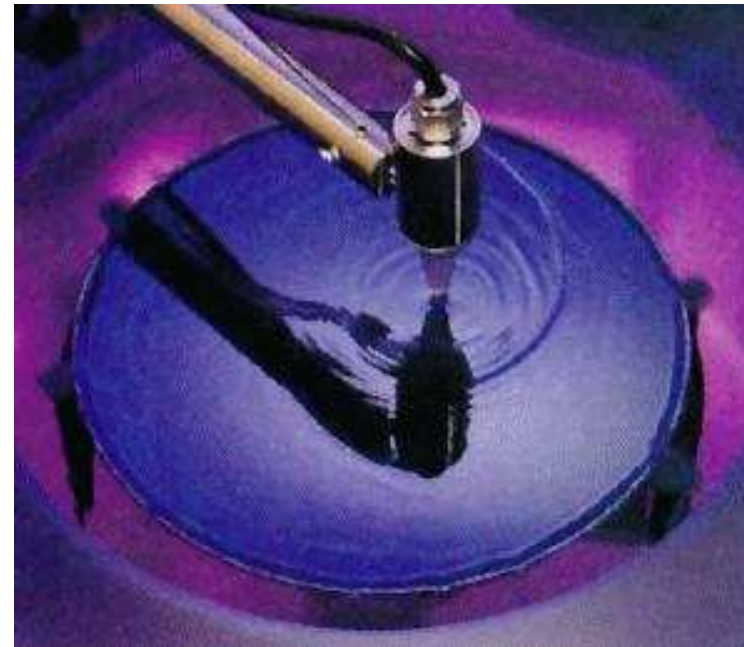
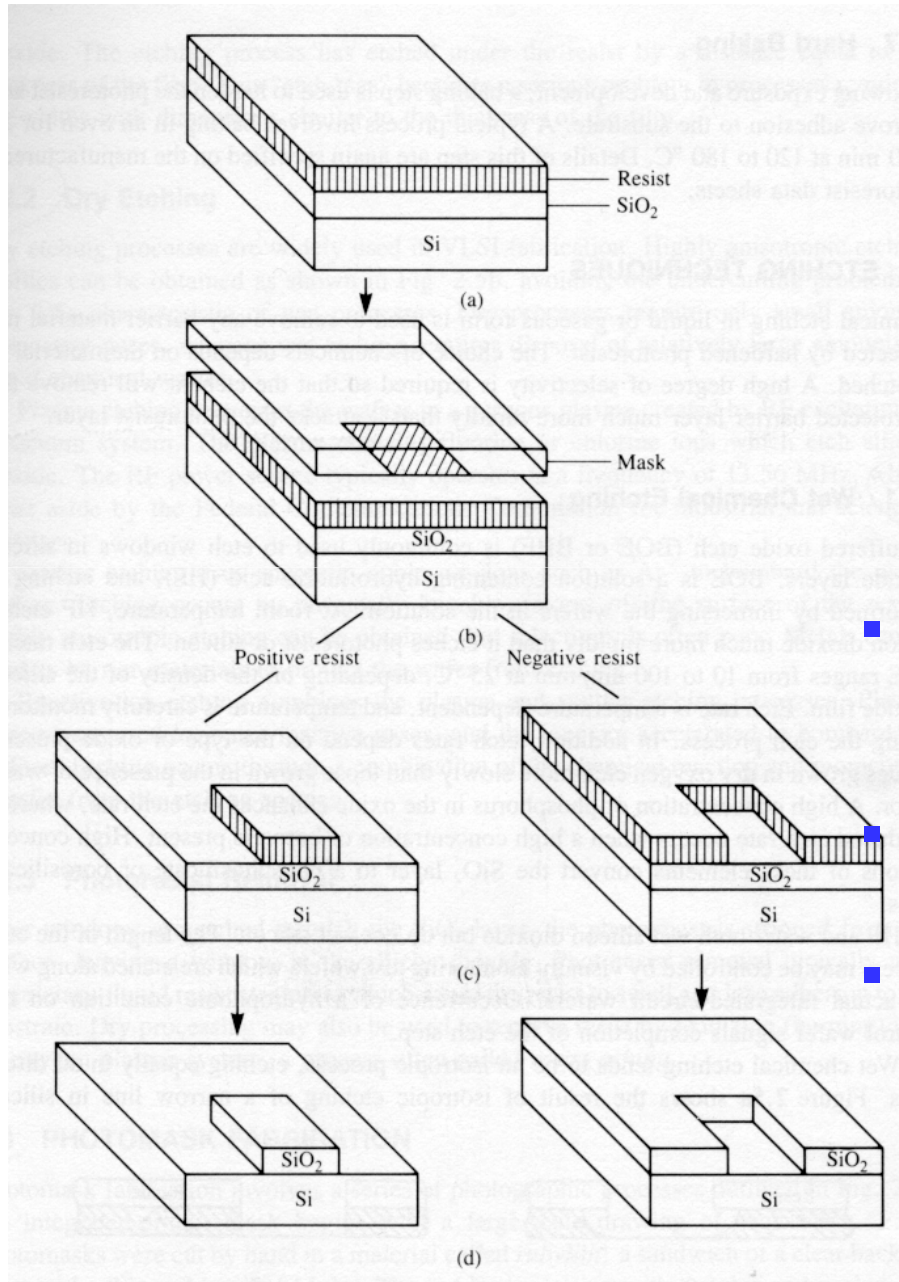
# Litografie

- tenkovrstvá technologie nejen pro výrobu elektronických součástek, ale i mikroanalytických planárních systémů
- základním materiálem je křemík („silicon wafer“)
- techniky přenosu kopie výchozího motivu („master pattern“) na povrch pevného materiálu



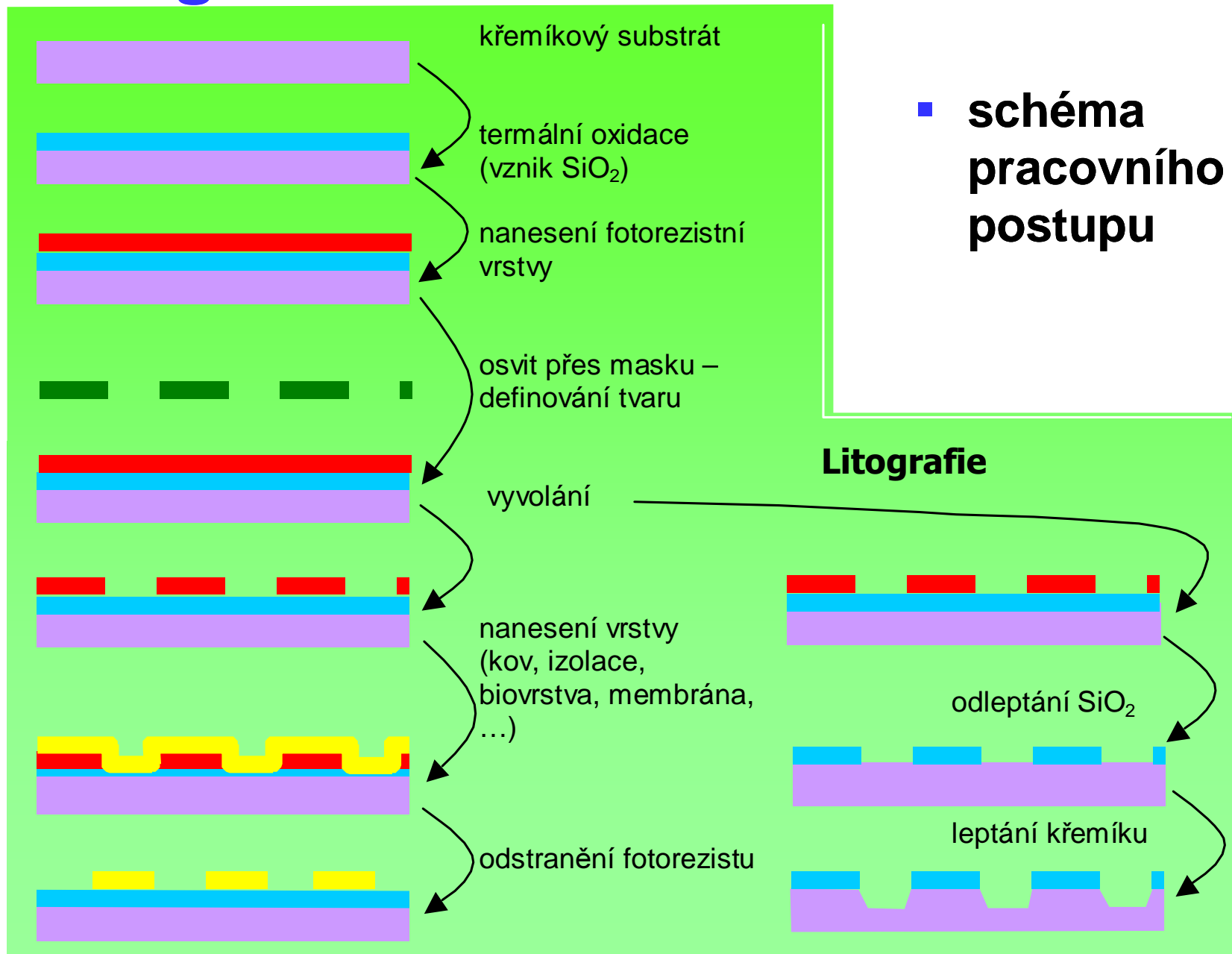


# Fotorezist



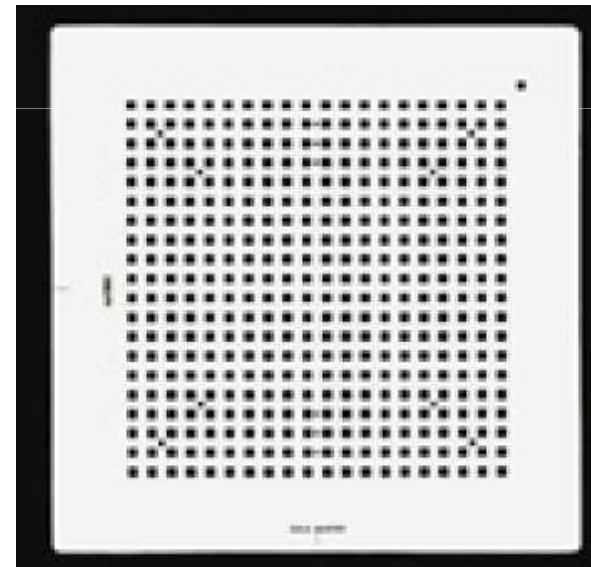
- modifikovaný materiál se pokryje tenkou vrstvou fotocitlivého materiálu - fotorezist (spin-coating)
- ten se pak osvětlí přes masku nesoucí žádaný motiv
- fotorezist – pozitivní nebo negativní

# Litografie

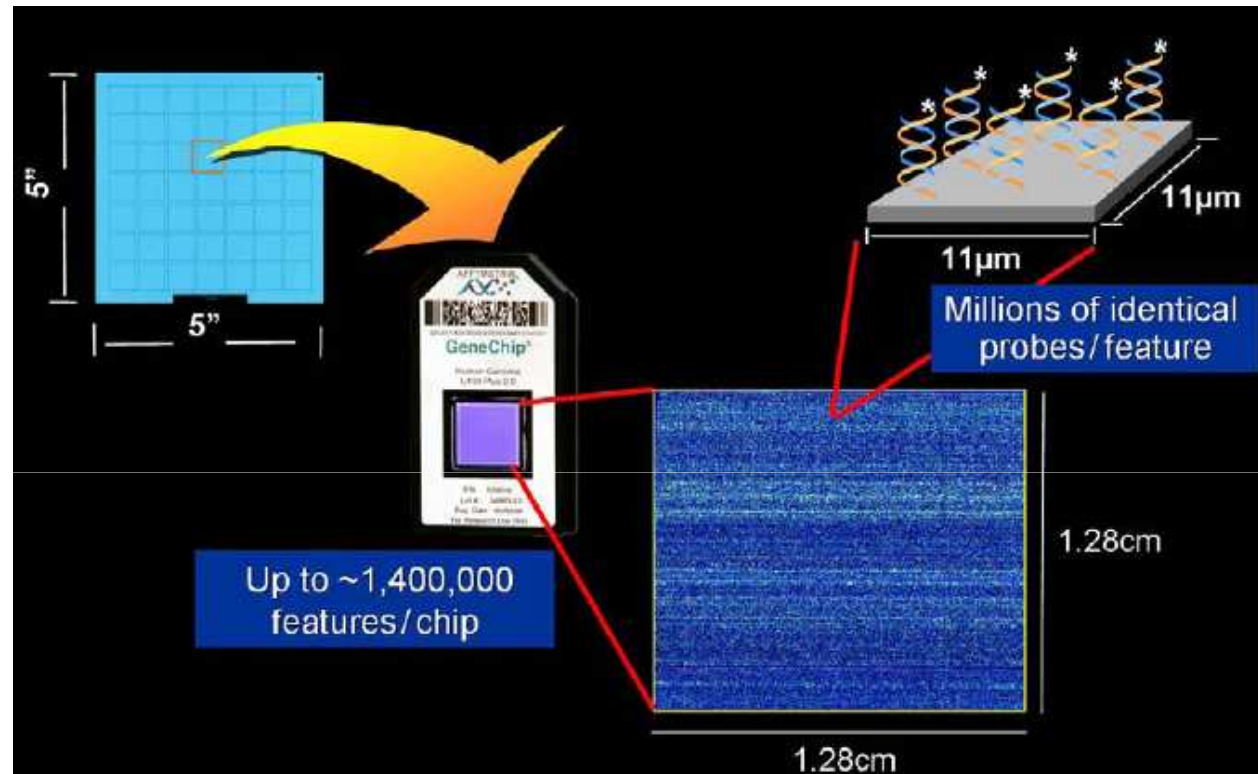


# Fotolitografická maska

- ukázka masky pro celý wafer (vlevo)
- vpravo pak výsek pro 20x20 elementů



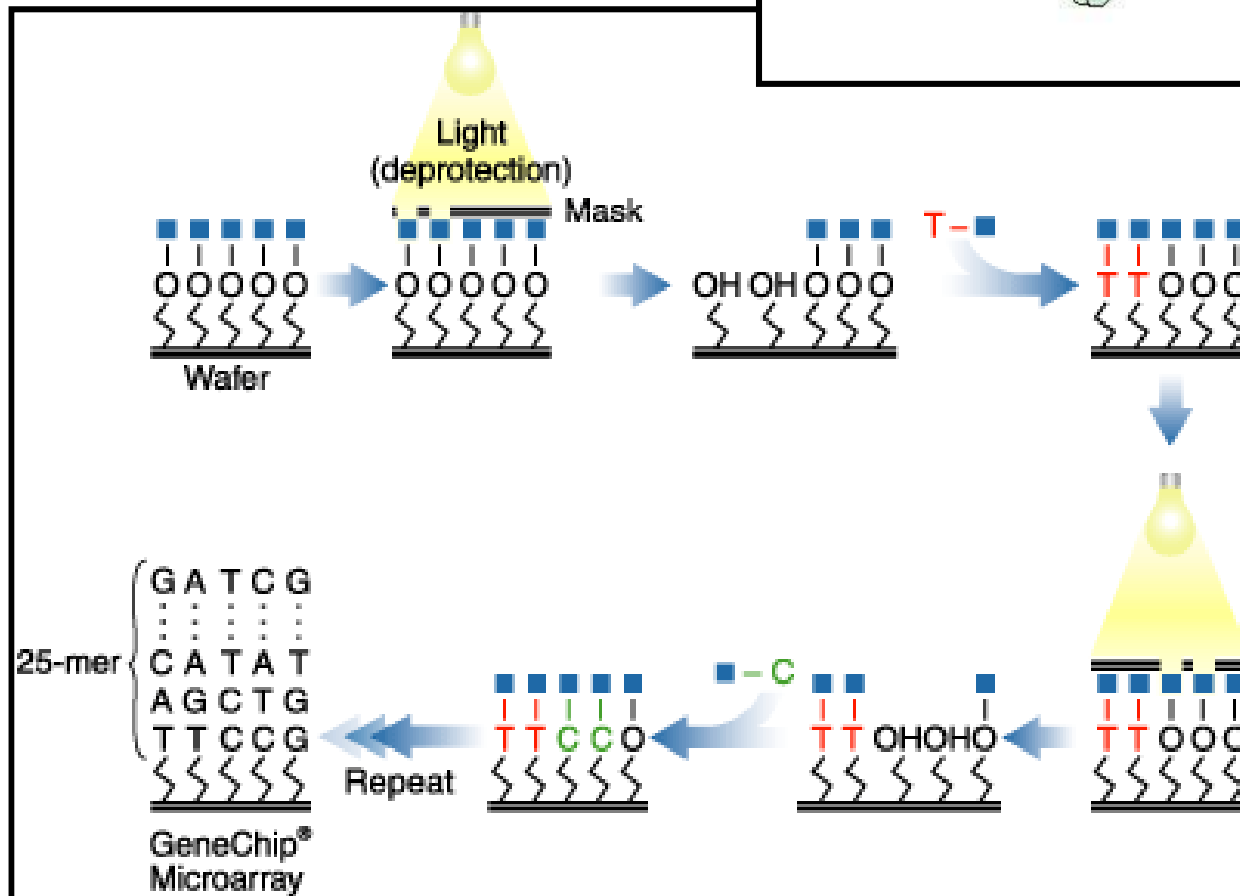
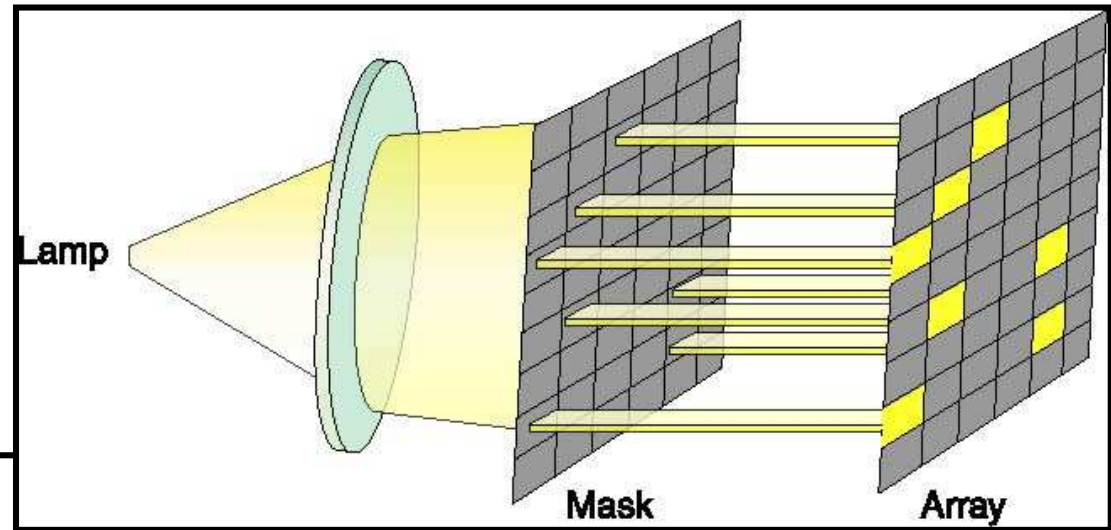
# DNA biočipy (DNA microarrays)



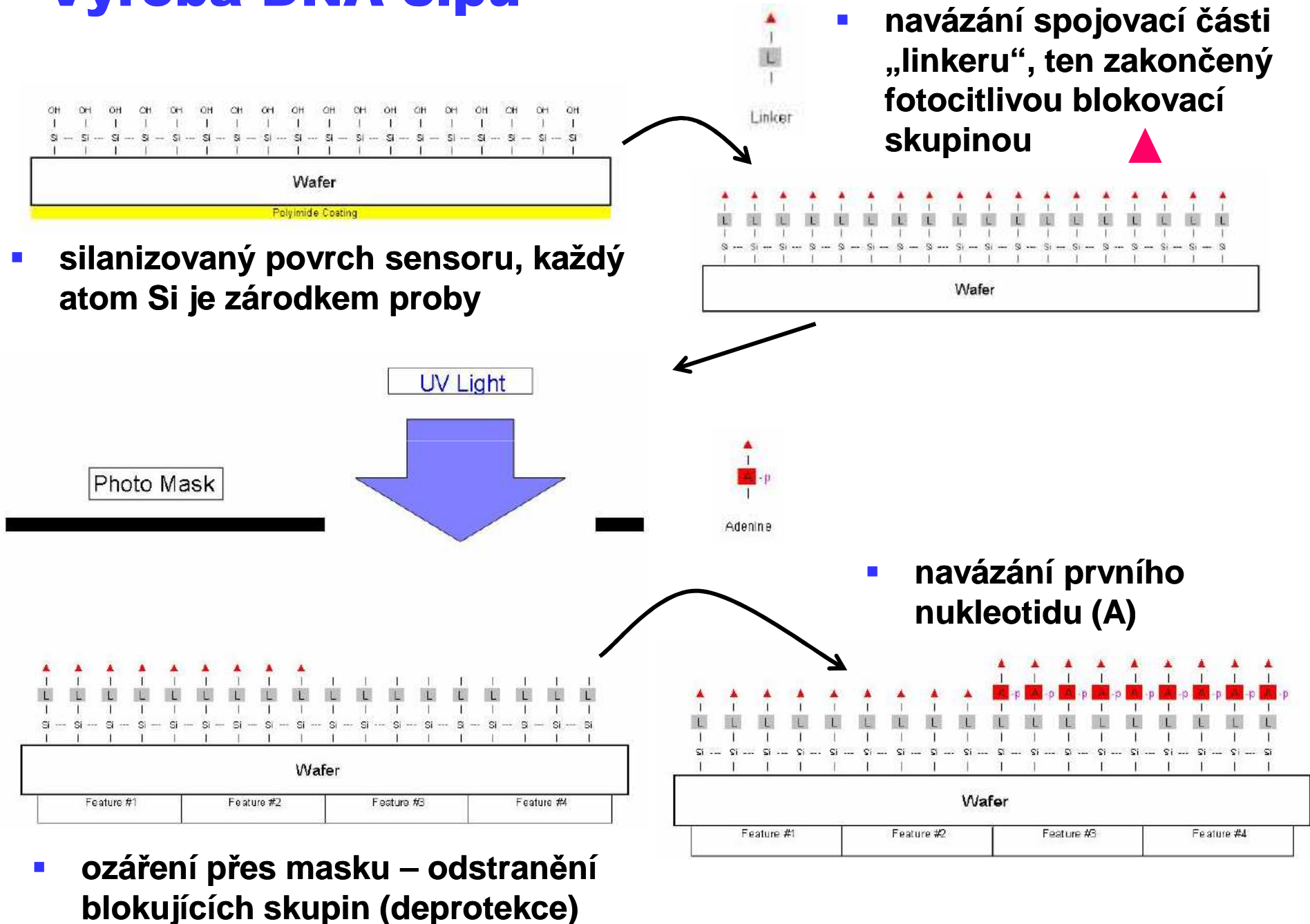
- plátek křemíku (wafer, 5x5 inch, tj. 12.5x12.5 cm)
- z něho 49 až 400 jednotlivých sensorů (chips, 1.28x1.28 cm)
- na každém čipu až 1.4 milionu pozic (features, 11x11 μm)
- v každé pozici několik milionů kopií stejné oligonukleotidové próby s danou známou sekvencí

# Modifikace povrchu

- kombinace chemické reakce a UV ozařování
- fotolitografie, fotosenzitivní imobilizační procedura



# Výroba DNA čipu



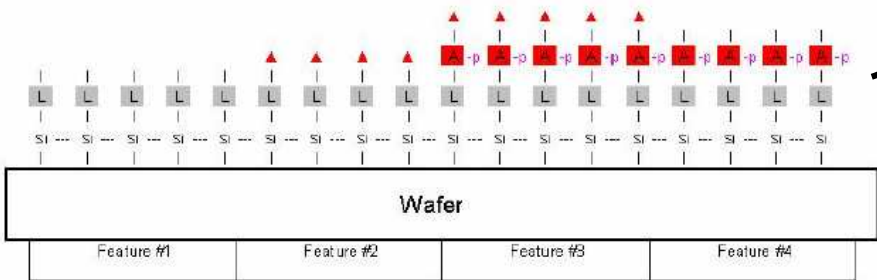
- silanizovaný povrch sensoru, každý atom Si je zárodkem proby

- navázání spojovací části „linkeru“, ten zakončený fotocitlivou blokovací skupinou

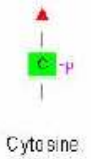
- navázání prvního nukleotidu (A)

- ozáření přes masku – odstranění blokujících skupin (deproteckce)

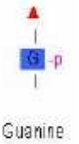
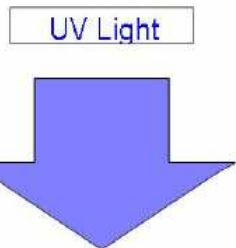
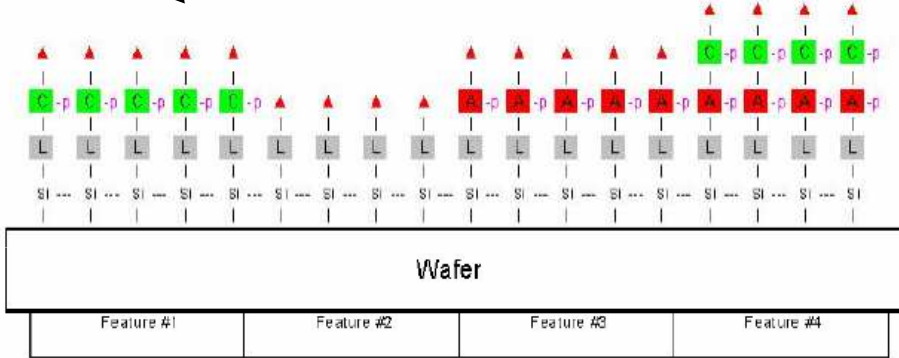
# Výroba (2)



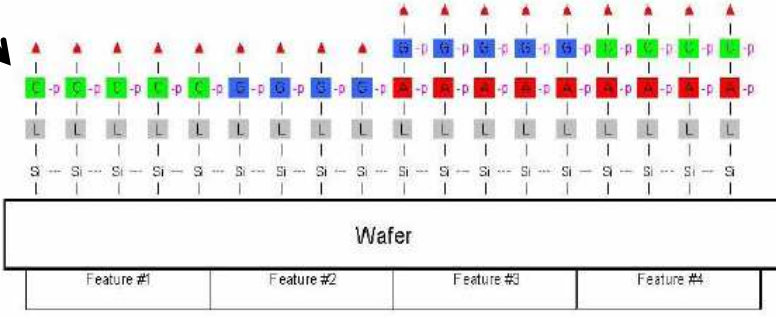
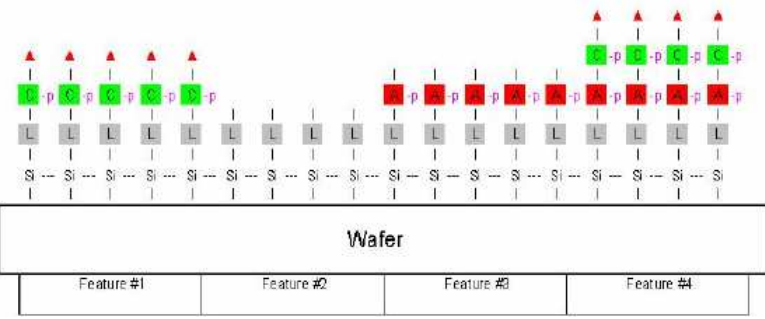
- ozáření přes masku č. 2
- ozáření přes masku č. 3



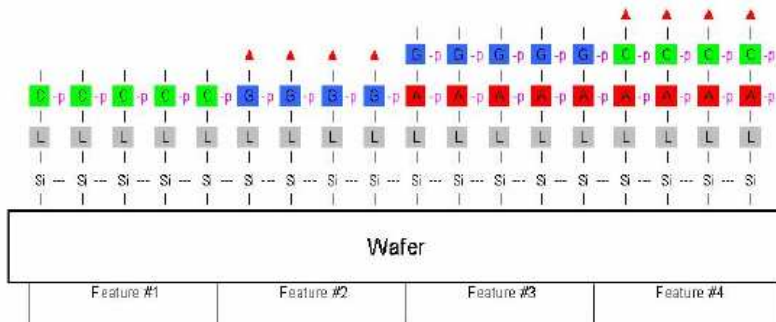
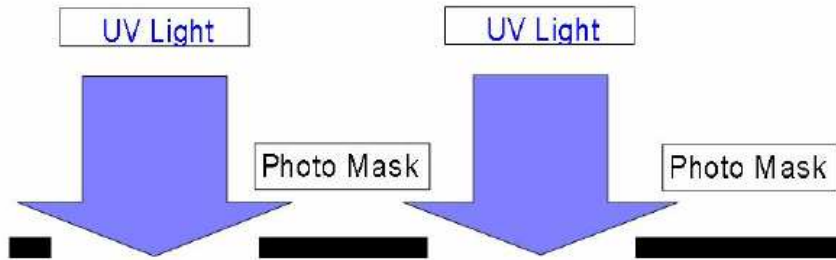
- navázání dalšího nukleotidu (C)



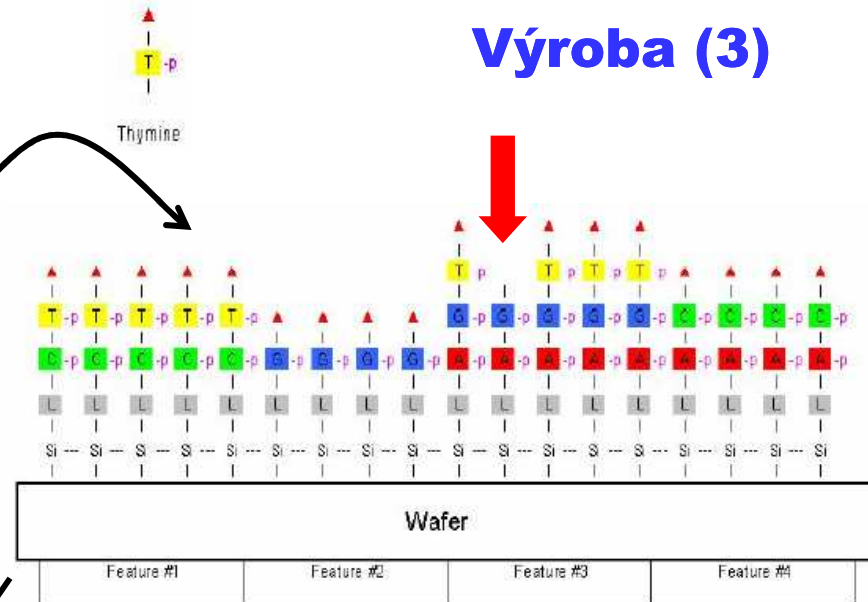
- další nukleotid (G)



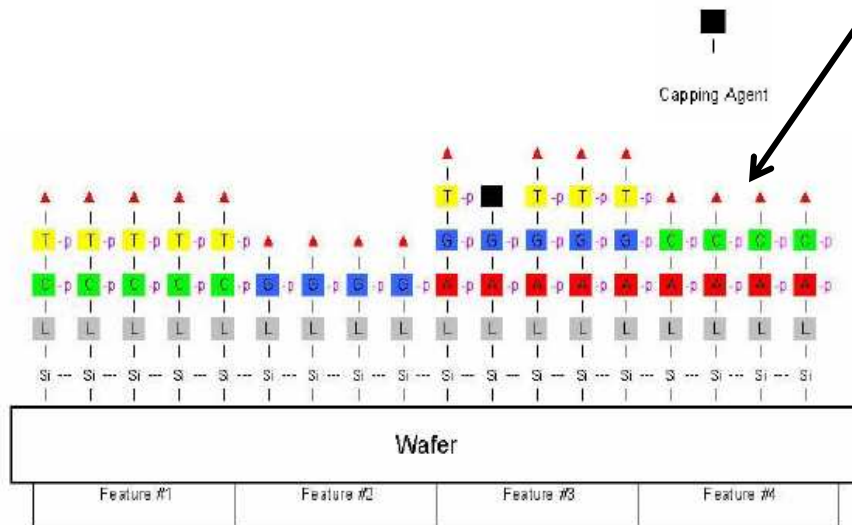
## Výroba (3)



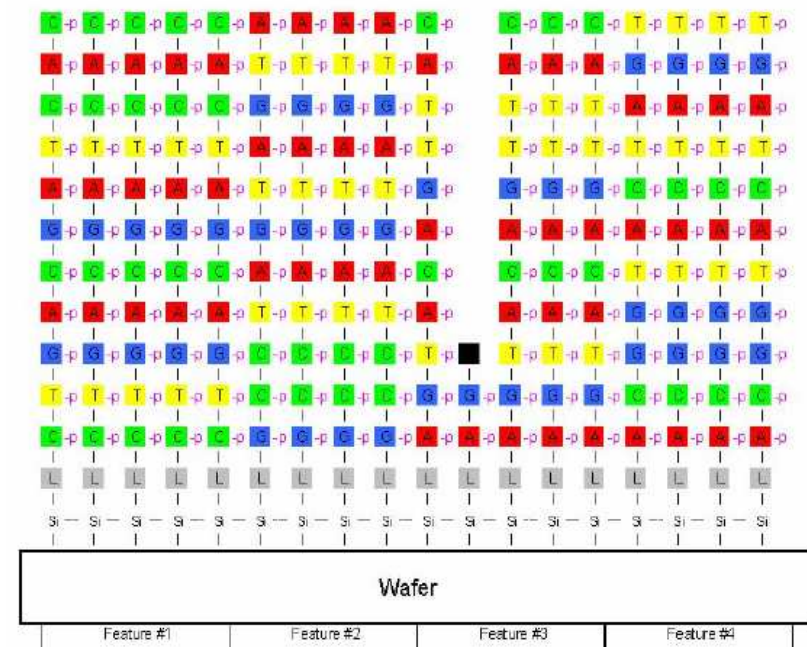
- maska č. 4



- další (T), ale výskyt chyby!



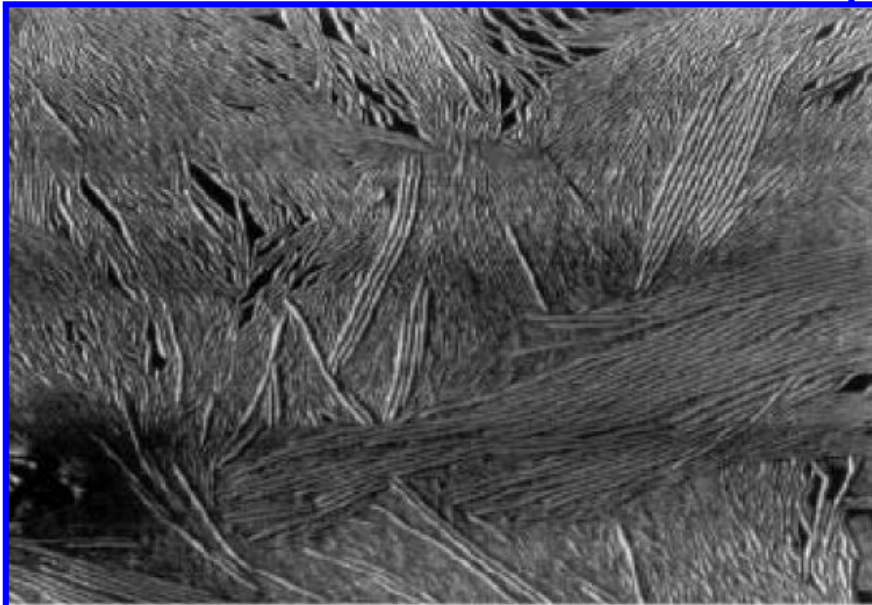
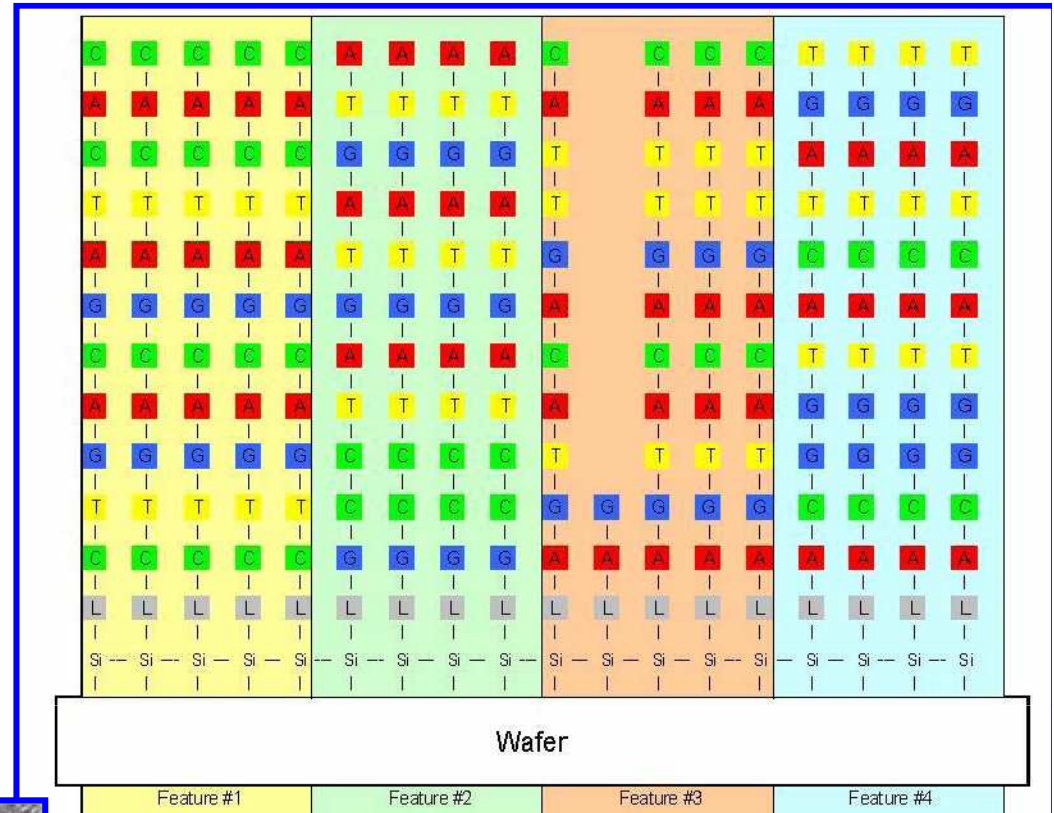
- zabránění dalšího růstu chybné sekvence – ukončovací báze („capping agent“) po každém kroku





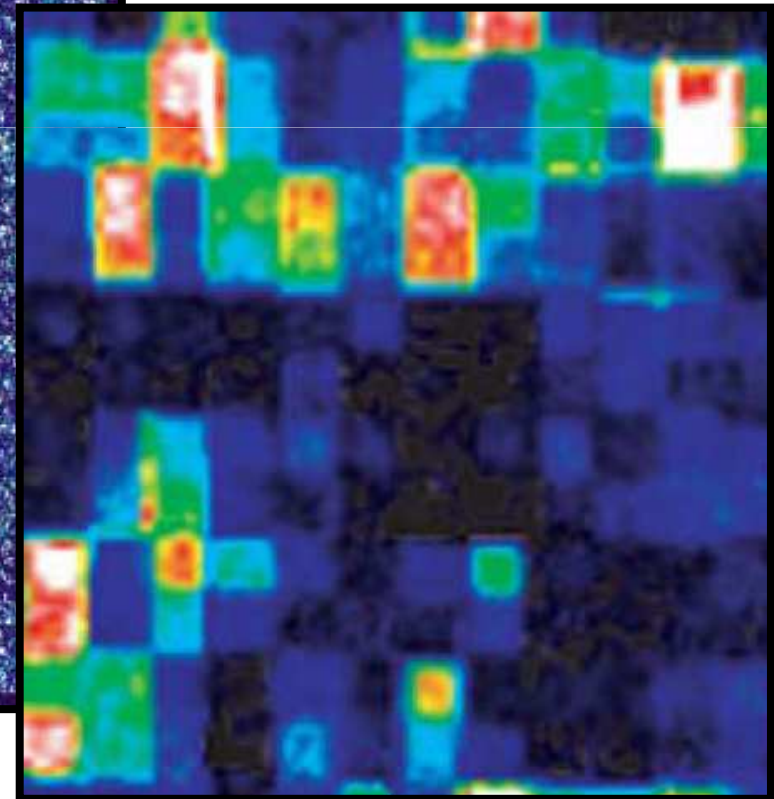
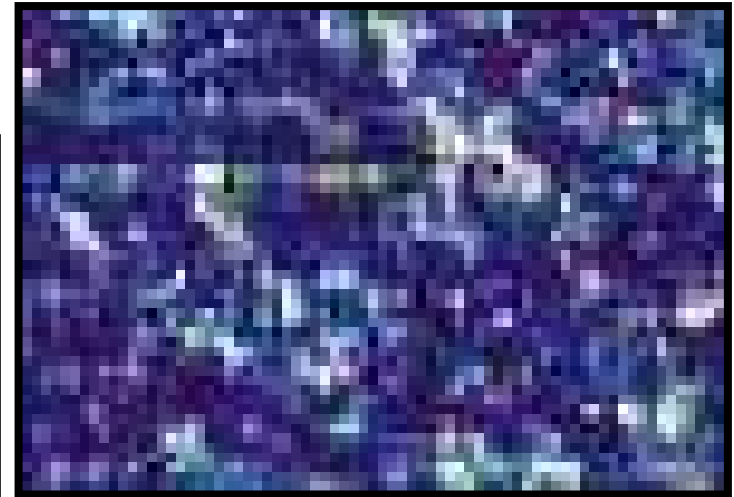
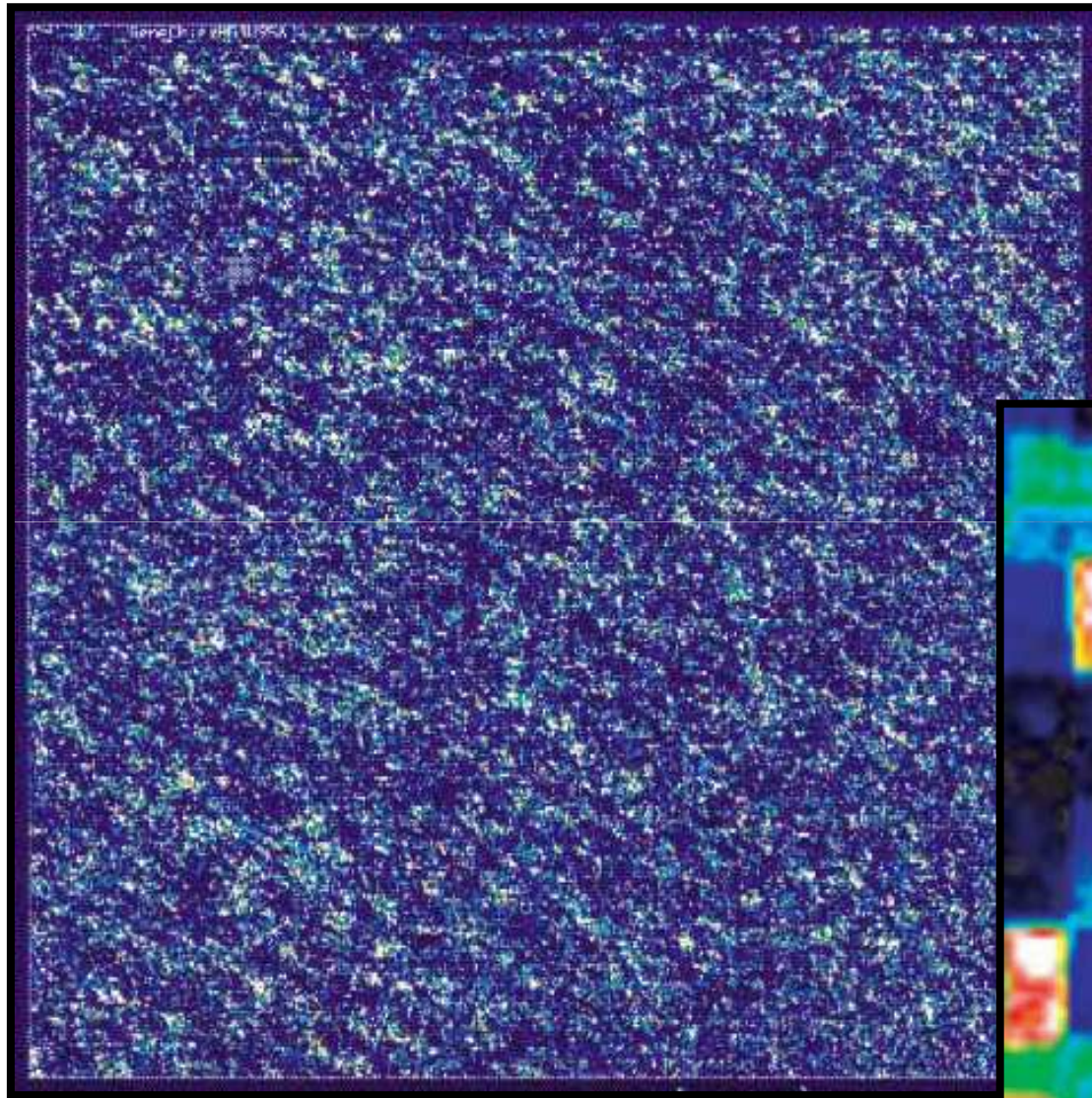
## Hotovo!

- konečný stav po odstranění „capping agents“ a protekt. skupin, následuje zabalení „packaging“ do „cartridge“
- pro 25-mer potřeba obvykle méně než 100 masek (teor. maximum)
- problém: přesahy mezi jednotlivými zónami (odrazy, rozptyl, vnitřní ozáření, ...)



ukázka části oblasti proby po hybridizaci (AFM, šířka obrázku je 2  $\mu\text{m}$ )

# Výsledek použití

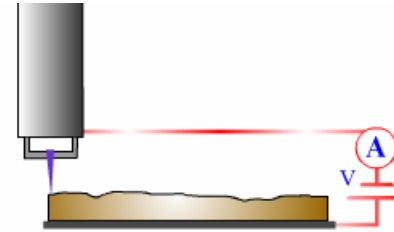


# Nanostrukturace povrchů pomocí SPM

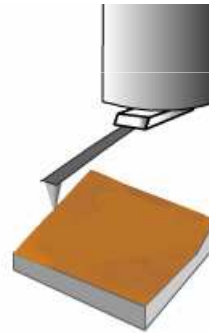
- skenovací raménko s hrotem slouží k vytváření obrazců na modifikovaném povrchu

- techniky:

- STM litografie - aplikuje se proudový puls



- AFM litografie
  - škrábání, scratching
  - "t'ukání", dynamic plowing

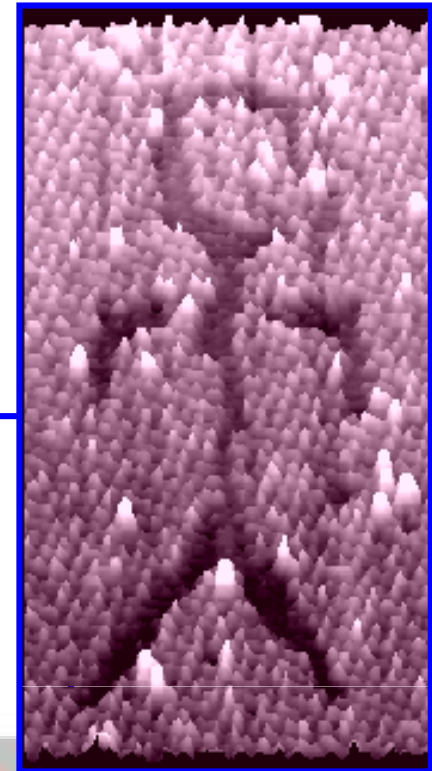


- AFM oxidační litografie

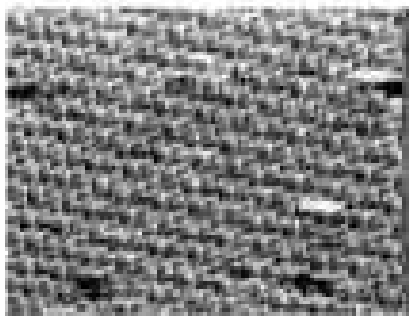
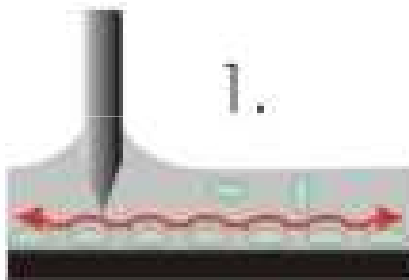
- AFM konstrukční litografie

# AFM scratching

- AFM zařízení jako nástroj pro modifikace povrchů
- vyškrábání motivu v polymerní vrstvě pomocí ostrého hrotu
  - PTCDA, 3,4,9,10-perylentetrakarboxydianhydrid



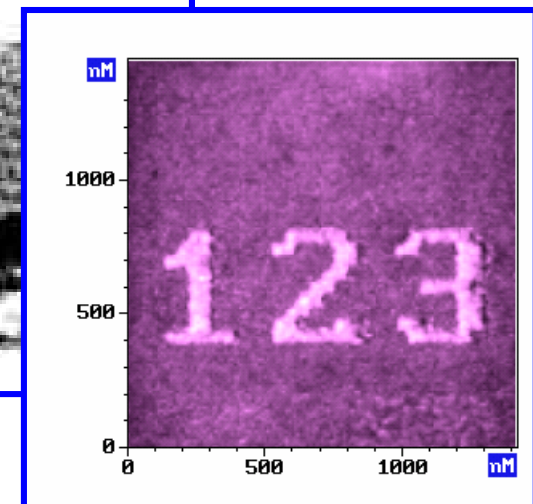
skenování



zápis

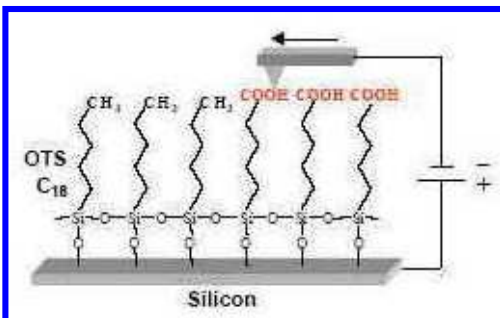
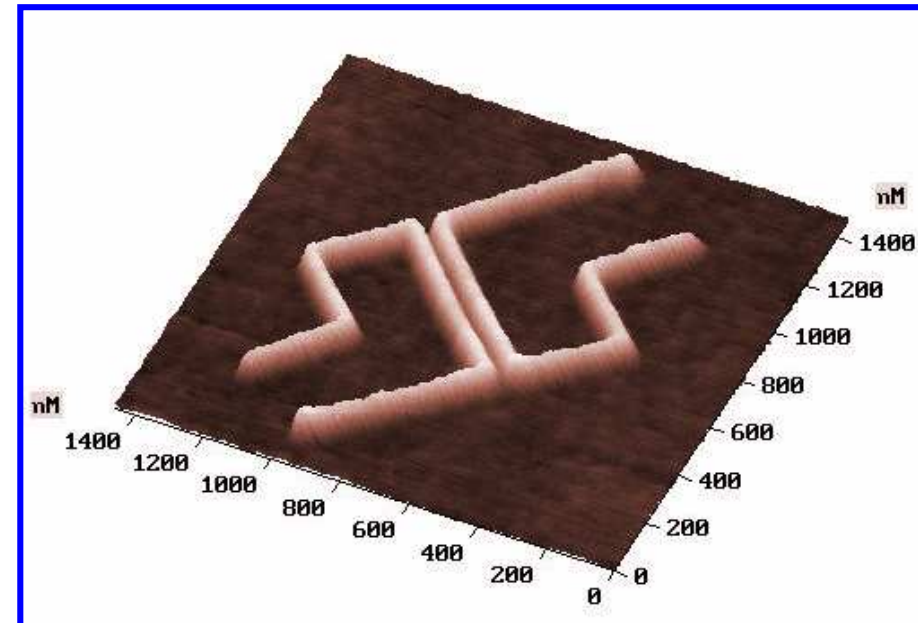
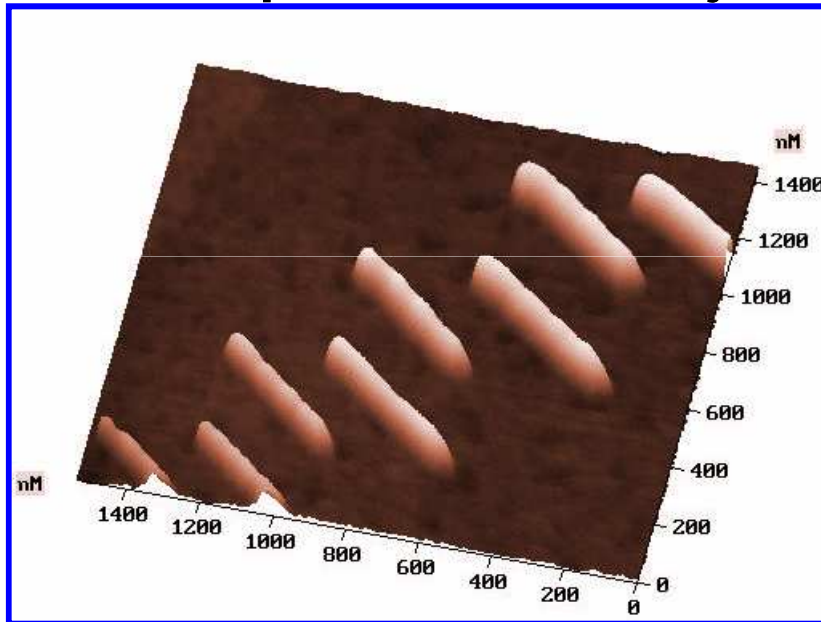
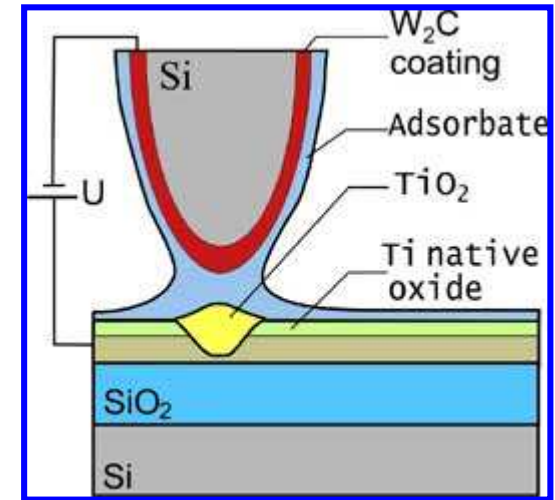


skenování



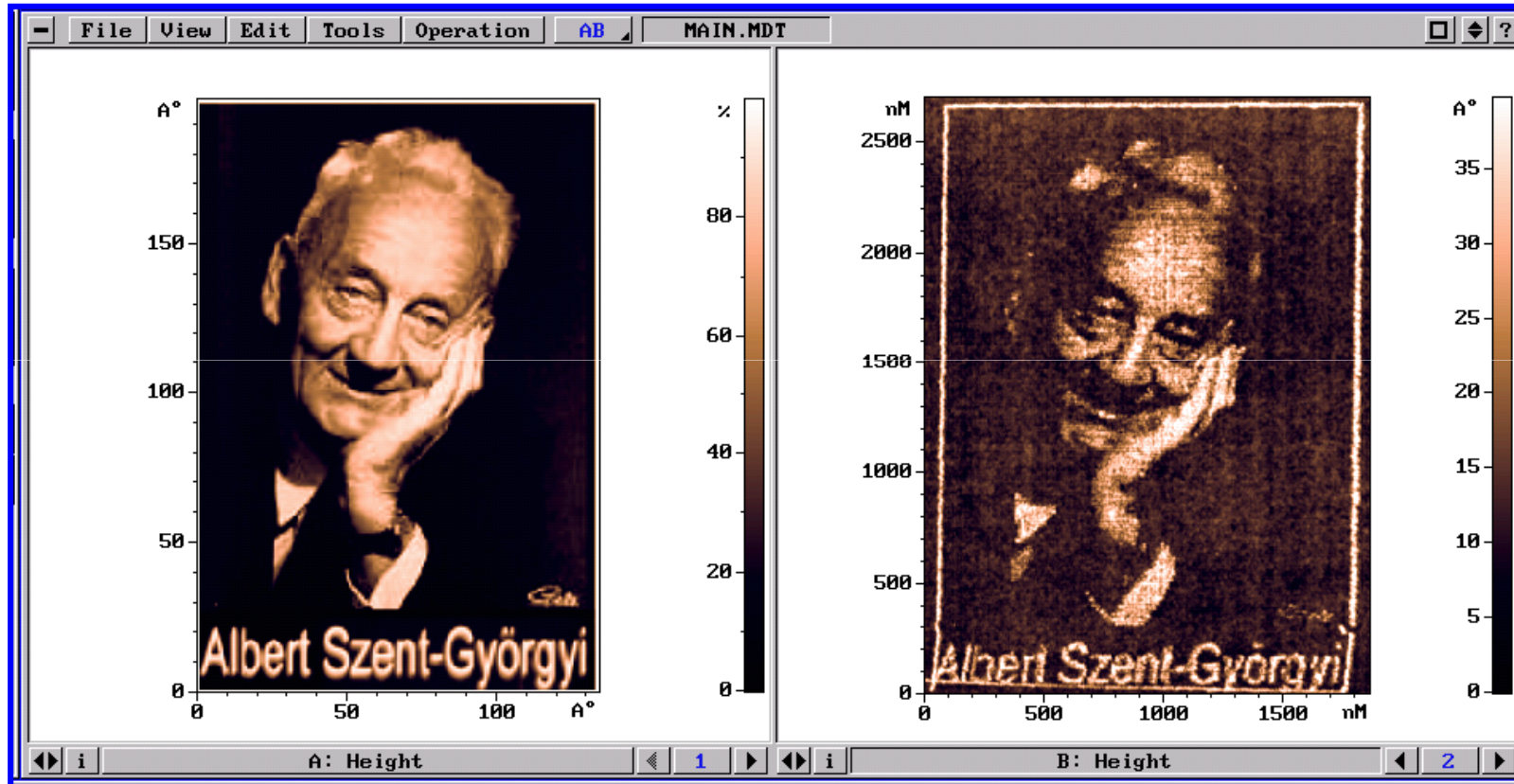
# Lokální anodická oxidace

- na povrch AFM hrotu se aplikuje potenciál
- v místě přiblížení hrotu k povrchu dojde k elektrochemickému vytvoření struktury
- oxidace povrchu titanu nejčastěji

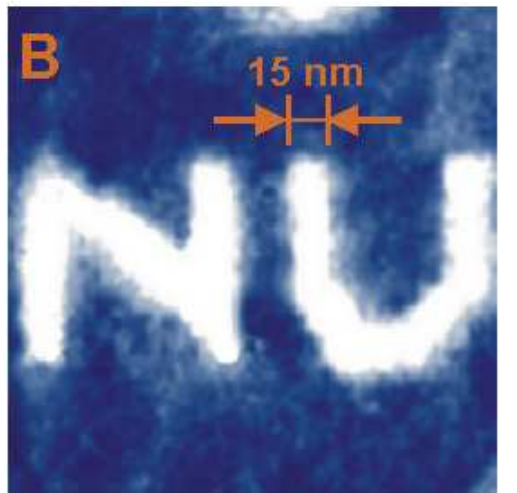
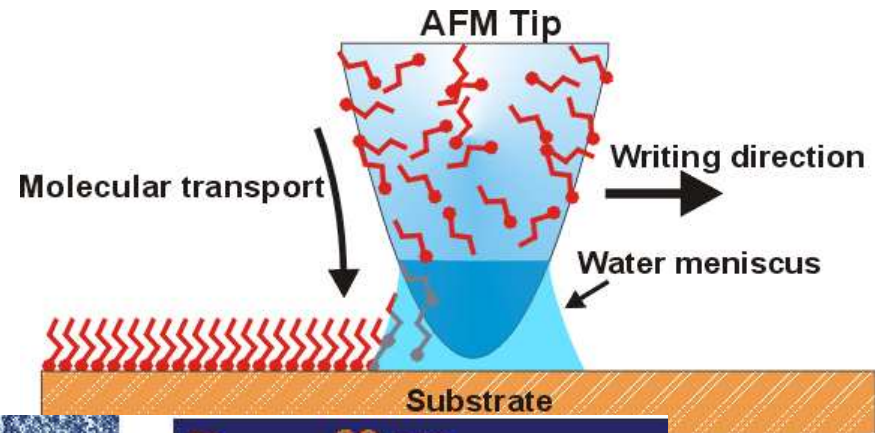


# Fantazii se meze nekladou ...

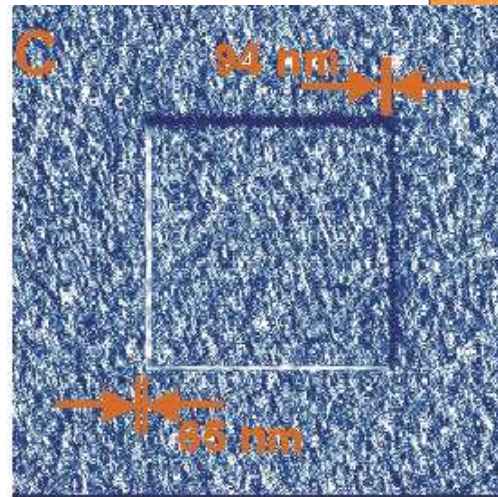
- "nanoobrázky", ...



# AFM dip pen lithography



0 nm 180

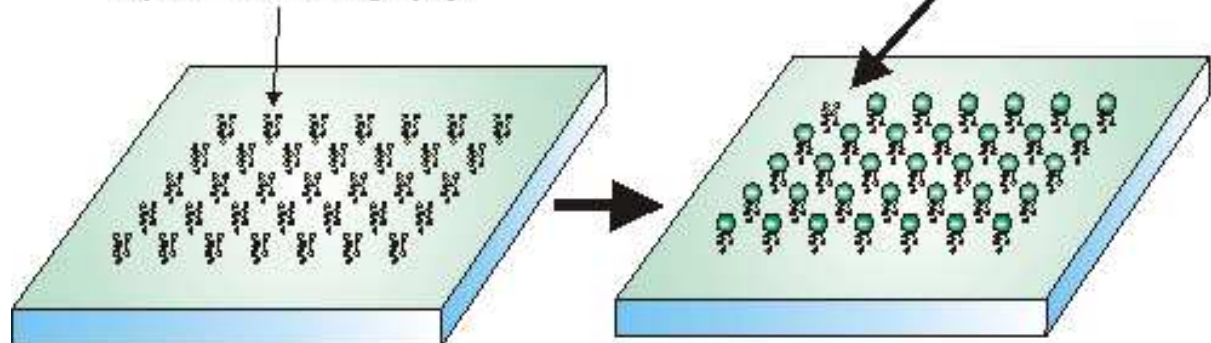


0 μm 8



Molecular Patterns generated via Dip-Pen Nanolithography

Specific binding of nanostructures



## Srovnání technik pro cílenou imobilizaci

Techniky vhodné pro rozlišení pod 100 nm	Přímá kovalentní vazba biomolekul	Řízený proces v kapalině	Různé typy povrchů a modifikačních činidel	Nízká cena	Vhodné pro rozlišení až 10 nm
Chemomechanical Patterning/Nanografting	ano	ano	ano	ano	ano
Dip Pen Nanolithography	spíše ne	ne	ano	ano	difúzní limitace
Microcontact Printing	spíše ne	ne	ano	ano	asi ne
AFM Mechanical Scribing and Nanoindenting	ne	ne	ne	ano	ano
c-AFM Oxidation	ne	ne	ano	ano	ano
UHV STM Patterning	ne	ne	ne	ne	ano
E-beam Lithography	ne	ne	ano	ne	asi ne
UV Photolithography	ne	ne	ano	ne	asi ne



# Kam to směřuje...



- **představivost a fantazie, definování cíle**



- **výběr vhodných detekčních elementů**
  - z čeho budeme stavět (aminokyseliny, nukleotidy, ...)



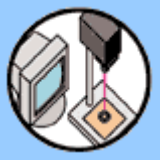
- **vytvoření knihovny na základě kombinatorických postupů**
  - všechny možné variace z daných stavebních kamenů



- **paralelní testování vlastností molekul z knihovny**
  - nalezení vhodných detekčních



- **zpracování a výroba analytického systému**
  - optimalizace výrobního procesu



- **vysoce paralelní analytický proces**
  - citlivé elementy ve formě 2D pole, oskenování (opticky, elektricky, magneticky, ...), začlenění dat do databáze



- **matematické prohledání a prezentace, rozhodnutí**
  - zpřístupnění výsledku uživateli v pochopitelné formě

# **Příprava imunokonjugátů**

- **imunogeny - nosné bílkoviny modifikované nízkomolekulárním antigenem (= haptén, sám o sobě nevyvolá imunitní odpověď)**
- **značené protilátky a antigeny - **tracery** pro imunostanovení**

# Imunogeny

- **imunogenicita** - schopnost molekuly stimulovat imunologickou odpověď a následně tvorbu specifických protilátek
- **imunogen**
  - cizorodost pro organismus, nevlastní původ, aby nebyl imunitním systémem ignorován
  - dostatečná velikost - aspoň 6 kDa, jinak se pouze naváže na receptorové mIgM na membráně B lymfocytu, ale není pohlcen endocytosou
  - chemická komplexnost - např. velké homopolymery z aminokyselin a jednoduché polysacharidy jsou zřídka imunogenní
- **biomakromolekuly jako imunogeny**
  - sacharidy - jen pokud jsou dostatečně komplexní, nebo jako součást glykoproteinů
  - proteiny - dostatečně imunogenní; peptidy - příliš malé, je třeba je navázat na nosnou bílkovinu
  - lipidy, nukleové kyseliny - neimunogenní, musí být navázány na nosnou bílkovinu
- **malé molekuly - hapteny**
  - fungují jako antigeny (epitop, váží je protilátka)
  - nefungují jako imunogeny, musí být konjugovány s nosičem

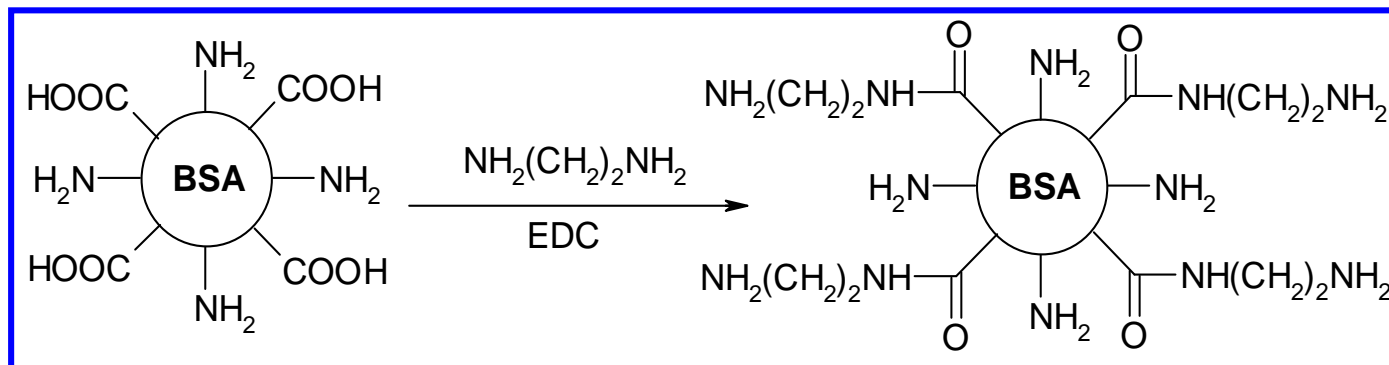
# Nosné bílkoviny

- volba dle imunogenicity, velikosti a dostupnosti funkčních skupin pro navázání haptenu
- **KLH**, keyhole limpet **hemocyanin**
  - z přílepky (měkýš) *Megathura crenullata*, kuproprotein vážící kyslík
  - mcKLH - z uměle pěstovaného organismu (mariculture) - lepší homogenita preparátu, lepší rozpustnost, v roztoku opalescentně namodralý
  - velikost 450 kDa až 8 MDa, je agregátem, stupeň agregace závisí na pH, nad pH 8,9 disociován na podjednotky
  - může být hůře rozpustný, roztoky často se zákalem, NaCl zlepšuje rozpustnost
  - má k dispozici hodně lyzinových zbytků
  - fylogeneticky vzdálený savcům
- **OVA**, ovalbumin
  - z vaječného bílku, 45 kDa, dobře rozpustný, i v DMSO
  - využíván hojně i při screeningu protilátek



## ■ BSA, bovine serum albumin

- albumin tvoří asi polovinu proteinů plasmy, stabilní a dobře rozpustný
- 67 kDa, pl 5.1, jediný polypeptid obsahující 59 lyzinových zbytků, z nichž 30 až 35 je využitelných pro imunokonjugační postupy
- pro konjgace je nejlepší frakce V, vysoce přečištěná
- využíván nejen jako nosič v imunogenu, ale i při screeningu protilátek a při blokování pracovních povrchů
- cBSA, cationized BSA - povrchové karboxyly derivatizovány ethylendiaminem pomocí EDC, zvýšení pl na 11



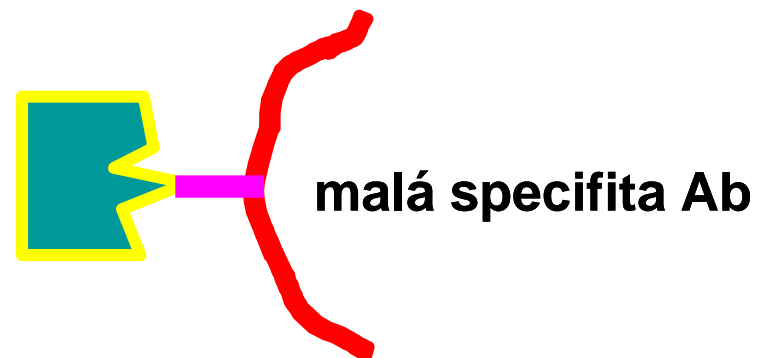
- lepší imunogen než nativní BSA (stačí ho méně), netřeba kompletní Freudovo adjuvans
- vyšší afinita k záporně nabitě membráně antigen-prezentujících buněk
- pro konjgace lze využívat EDC bez nebezpečí postranních reakcí

## Konjugace haptenu

- protilátky jsou produkovány proti navázanému haptenu, ale i proti epitopům nosiče - význam selekční procedury pro nalezení těch správných
- optimalizace imunogenu - zkusit různé nosné proteiny a různé hustoty navázaného haptenu
- obvykle se využívá povrchová aminoskupina nosné bílkoviny, ke které se pomocí heterobifunkčního crosslinkeru připojí haptenu
  - inkubace nosiče s crosslinkerem (nadbytek)
  - odstranění přebytku crosslinkeru
  - inkubace s molekulou haptenu
  - jednoznačný průběh reakce
- pozor při volbě reagující skupiny haptenu
- mimo oblast epitopu



v oblasti epitopu

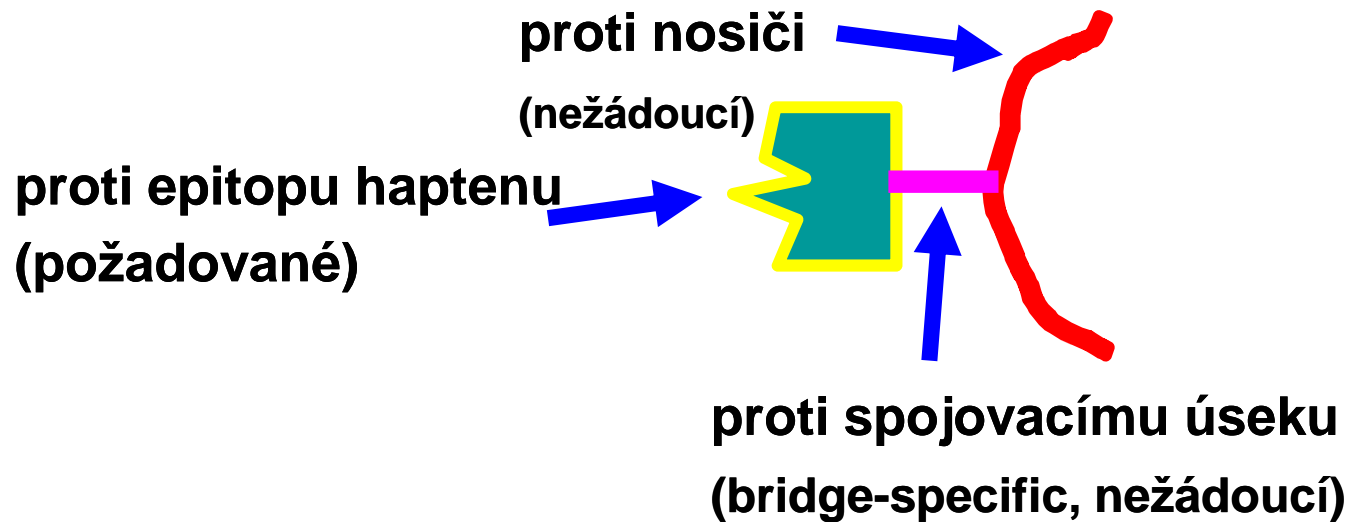


# Imunizace

- imunogen se aplikuje experimentálnímu zvířeti (myš, morče, králík, koza, kůň, ...) injekčně v přítomnosti tzv. adjuvans
  - přípravek stimulující imunitní odpověď
  - FCA, **Freudovo** kompletní **adjuvans** - emulze vody v oleji plus mrtvé buňky *Mycobacteria*
    - emulze zadržuje imunogen v místě aplikace po delší dobu
    - buňky *Mykobacteria* přitahují do daného místa makrofágy a další imunitní buňky
  - FIA, **Freudovo** inkompletní adjuvans - jako FCA, bez *Mykobacteria*
  - ve vodě rozpustné polysacharidy - méně účinné než FCA, méně zatěžující pro organismus
  - Alum - hydroxidy hlinitý a hořečnatý

# Screening protilátek

- konjugát haptenu s nosičem vyvolá tvorbu různých druhů protilátek, specifických proti různým částem imunogenu



- nalezení vhodné protilátky zajistí screening pomocí haptenu imobilizovaného na jiný nosič a jiným způsobem, než v případě imunogenu (opakuje se pouze epitop)

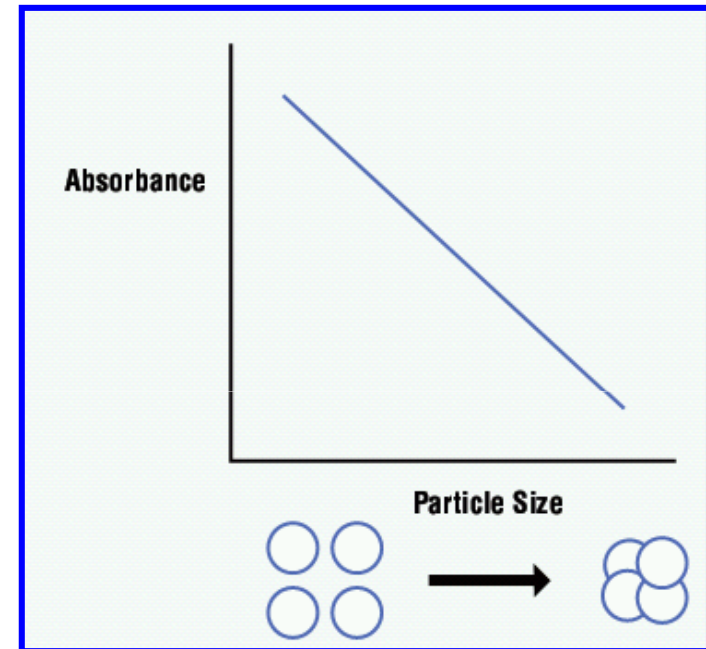
- **protilátky**

- koncentrace vs. titr - různé pojmy
- celková **koncentrace** molekul protilátky (molární, mg/ml, ...) bez zahrnutí funkčních parametrů (i poškozené či částečně denaturované neaktivní),
- **titr** = zředění dané protilátky vhodné pro daný typ imunostanovení



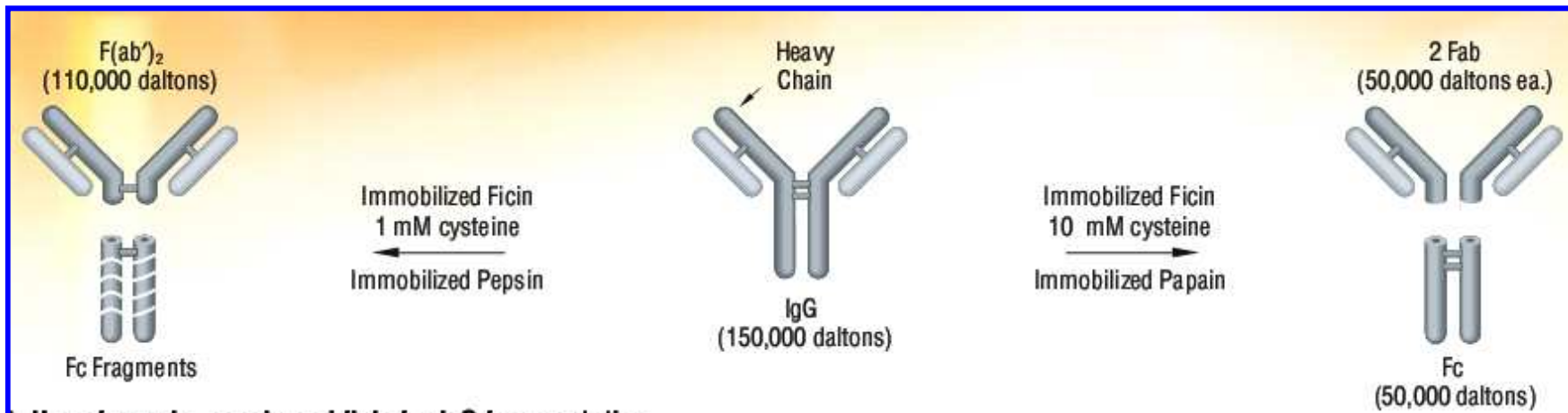
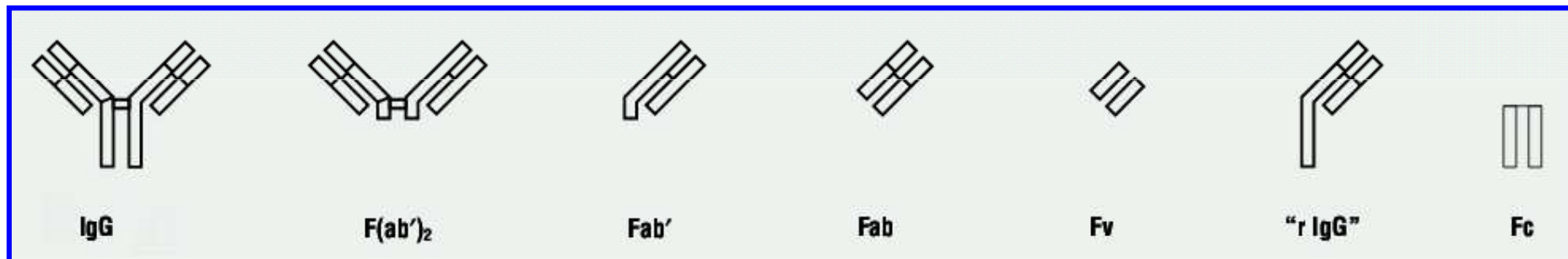
## Určení koncentrace protilátky

- při 280 nm má roztok čistého IgG 1 mg/ml absorbanci 1,35
- stanovení IgG v komplexních roztocích (sérum, ascitická tekutina, extrakt z tkáňové kultury, ...)
  - použije se latexové **precipitační stanovení**
  - latexové částice potažené protilátkou proti měřenému IgG (např. anti myší, ...)
  - monodisperzní částice volně v roztoku vykazují vysokou absorbanci při 340 nebo 405 nm
  - v přítomnosti cílové protilátky dochází k agregaci částic a k poklesu absorpance
  - rychlost - 5 min
  - vysoká citlivost - rozsah 10 - 300 ng/ml



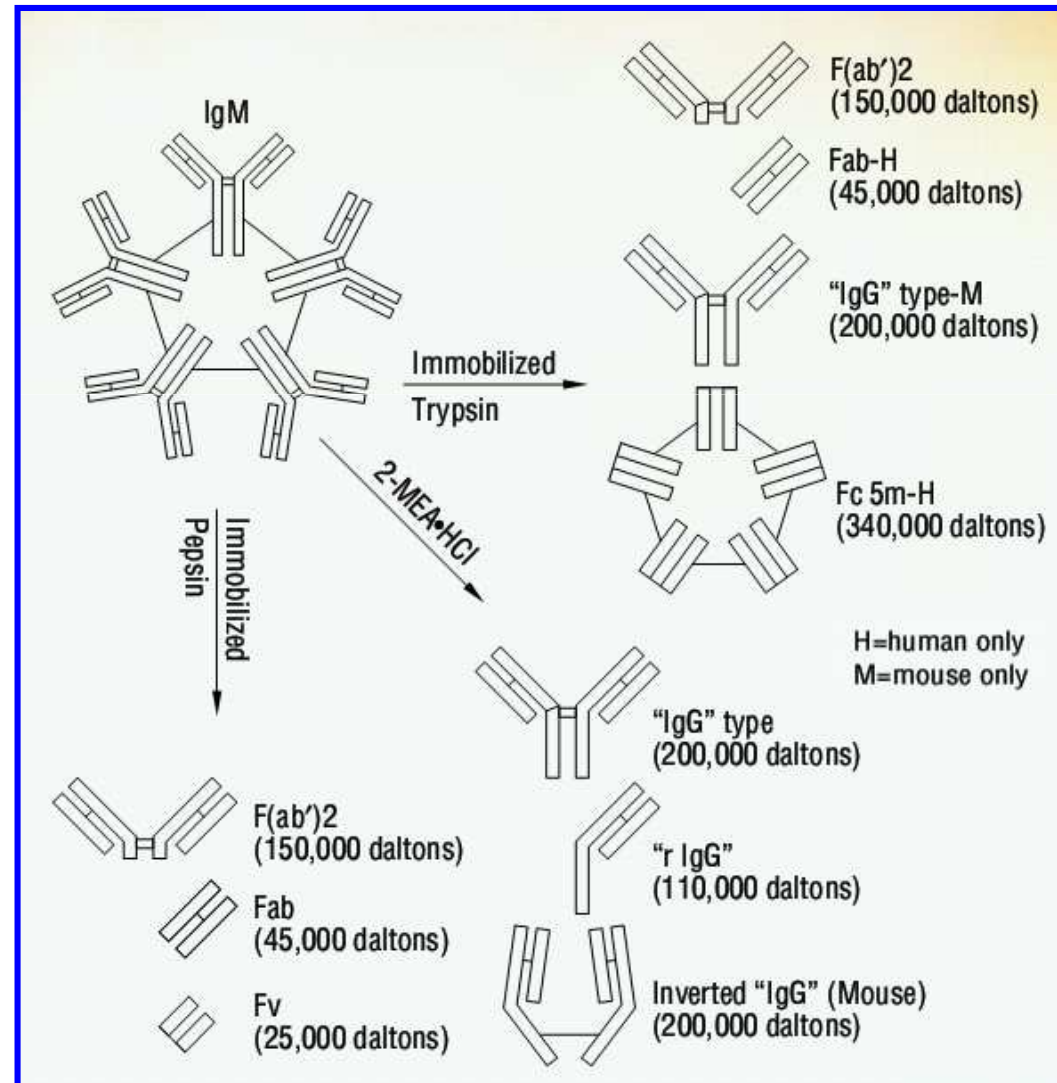
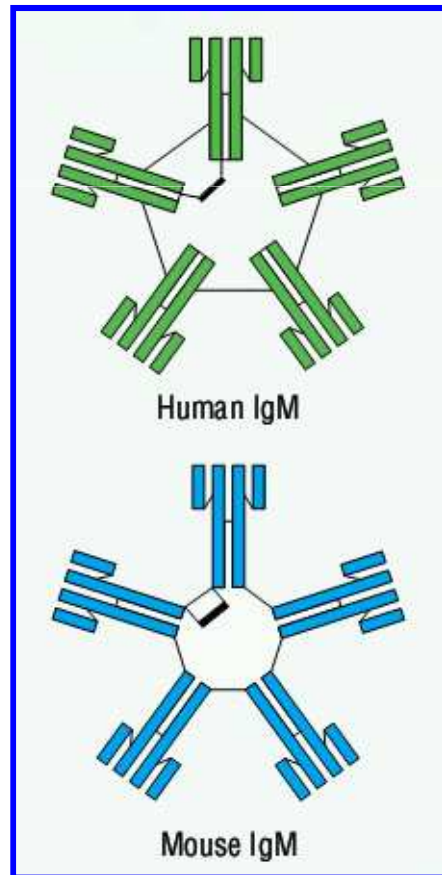
# Fragmentace protilátek

- pro mnoho účelů nepotřebujeme celou molekulu protilátky, ale stačí nám pouze menší část nesoucí vazné místo
  - menší molekula - méně nespecifických interakcí
  - snazší konjugační reakce, menší enzymové konjugáty
  - fragmenty vznikají štěpením proteinasami, nejlépe immobilizovanými na vhodný nosič
- fragmenty z molekuly imonoglobulinu G



# Fragmentace IgM

- IgM ... příliš velká molekula náchylná k nespecifickým vazbám, špatná penetrace v histochemických aplikacích - potřeba vytvořit menší vazné molekuly
- poněkud odlišné výsledky pro IgM různých organismů



# Zlepšení specificity biointerakce

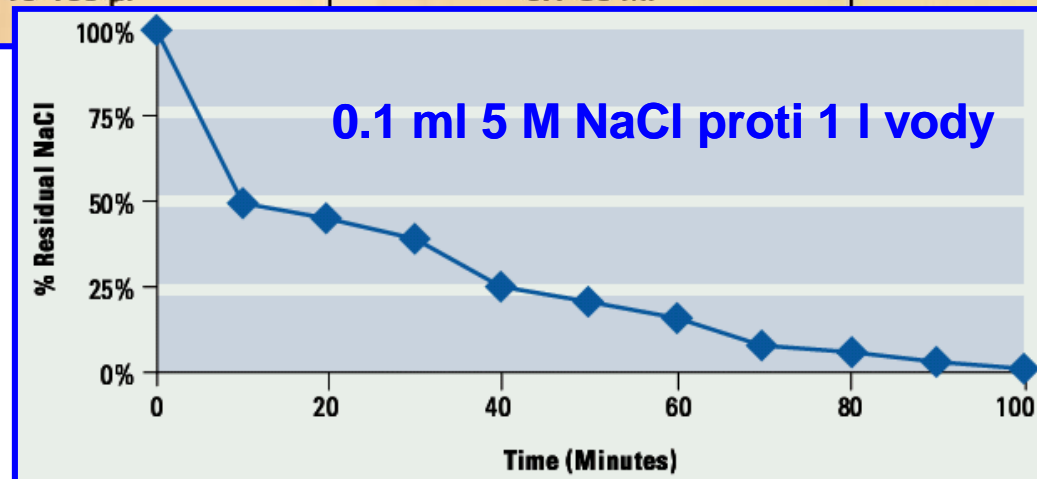
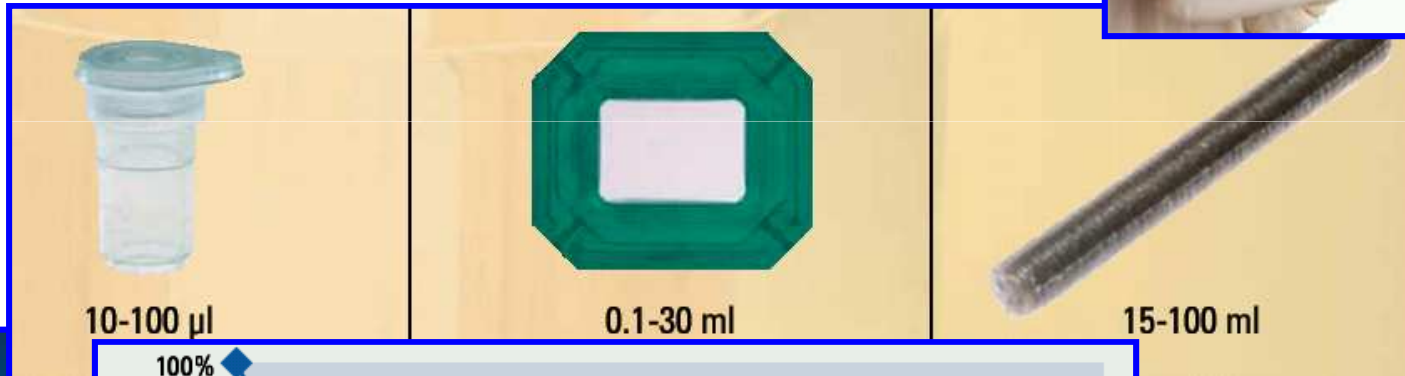
- **blokování pracovního povrchu**
  - cílem vysytit nesespecifická vazebná místa (nosiče, sensoru, mikrodestičky, ...) vhodnou inertní látkou
  - dosáhnout nižšího pozadí signálu
  - na interakci se účastní řada faktorů, úspěšné blokování je tedy výsledkem empirických pokusů
- **blokovací roztoky**
  - buď v PBS (phosphate buffered saline) nebo v TBS (tris buffered saline; ALP jako značka nemá ráda fosfát)
  - inertní proteiny: 1% kasein, 1 až 3% albumin (BSA)
  - komplexní směsi: sušené beztučné mléko (může obsahovat biotin), rybí sérum (steelhead salmon serum, fylogeneticky vzdálené savčím bílkovinám)
  - detergenty - Tween 20 nebo Tween 80 - adsorbují se na hydrofobní povrchy a tím je učiní hydrofilní
- **promývání afinitních komplexů**
  - roztoky obsahující nízké koncentrace (kolem 0,05%) detergentů - přeruší pouze nesespecifické interakce proteinů
  - Tween 20 a 80, Triton X-100, Nonidet P-40, Brij-35, CHAPS, CHAPSO

# **Charakterizace biokonjugátů a imobilizovaných nosičů**

- **separace z reakční směsi**
- **určení stupně substituce**
- **další charakteristiky**
- **uchovávání**

# Izolace biokonjugátu

- separace od nezreagovaných složek konjugační směsi
- odstranění nízkomolekulárních komponent
  - nejjednodušší je dialýza v celulosovém střívků - přes noc, v chladu, vyměnit několikrát dialyzační roztok
  - rychlejší s centrifugačními či jinými mikrodialyzátory, konjugát málo stabilní, vhodné pro malé objemy
  - rychlá separace na vhodné odsolovací koloně



# Zakoncentrování biokonjugátu

- **zahuštění**
  - tlakové ultrafiltrační systémy
  - dialyzační trubice a vně činidla odnímající vodu (PEG, Sephadex)
  - centrifugační evaporátory - šetrné podmínky
  - lyofilizace - použit zředěný nebo těkavý pufř
  - vakuová pomůcka na obrázku...
- **konjugáty tvořené dvěma biomakromolekulami**
  - chromatografické přečištění
  - vhodná afinitní separační technika
  - izolace protilátkových konjugátů od zbylého enzymu (vadí!)
    - imobilizovaný antigen
    - protein A/G/L



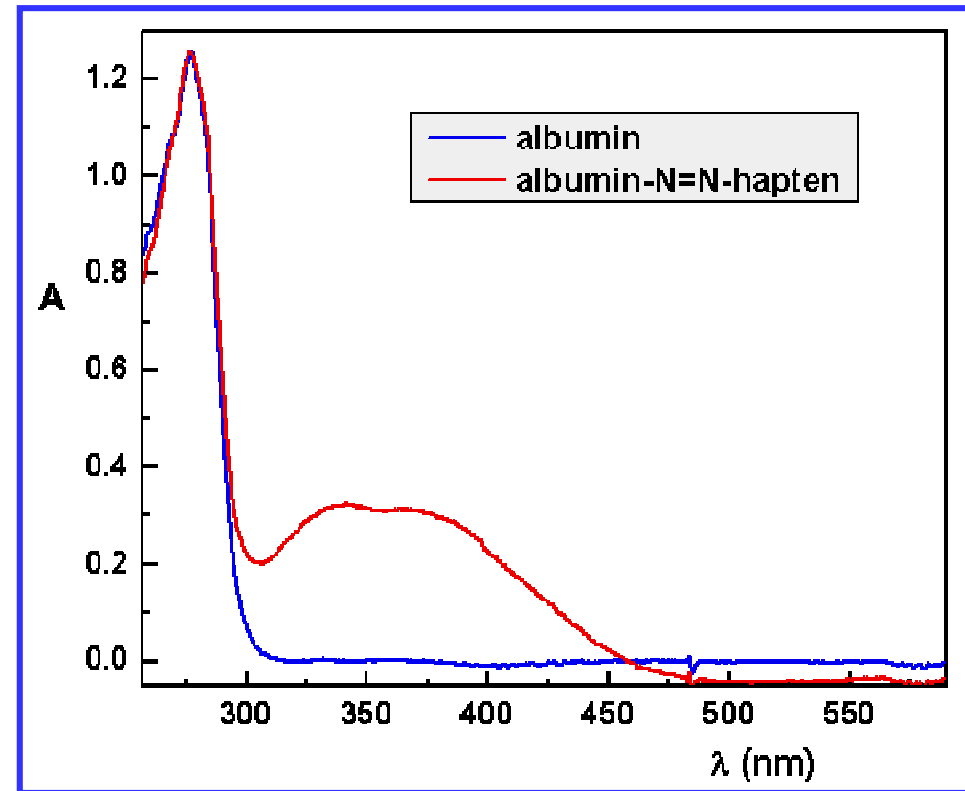
# Stupeň substituce

- vzniká barevný či fluoreskující produkt - spektrální vlastnosti
- diferenciální metoda, stanovení:
  - zbylého nenavázaného ligandu
  - zbylých neobsazených skupin biomakromolekuly (jen pro "malé" ligandy)
- stanovení navázaných molekul ligandu vhodnou specifickou reakcí
- změření změny molekulové hmotnosti konjugátu oproti výchozí biomakromolekule
  - gelová permeační chromatografie
  - elektroforesa v PAG v nedenaturujícím uspořádání
  - hmotnostní spektroskopie
- hydrolýza a charakterizace vzniklých produktů
  - proteolytické štěpení, mapování štěpů
  - úplná hydrolýza, stanovení aa či detekce uvolněného ligandu
- detekce barevného postranního produktu konjugační reakce
  - žlutý *p*-nitrofenol při použití *p*-nitrofenylkarboxylesteru jako aktivované matrice
  - pyridin-2-thion ( $\epsilon_{343} = 8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) při vazbě -SH na pyridyl-2-thioaktivované nosiče



## Absorbance

- při výrobě biokonjugátu dojde ke změně spektrální vlastnosti produktu (navázání barviva nebo fluoroforu na nosnou bílkovinu)
- kvalitu konjugátu lze posoudit na základě změných spektrálních vlastností
- některé konjugační reakce poskytují barevné produkty díky vzniklému můstku
  - diazotační postupy

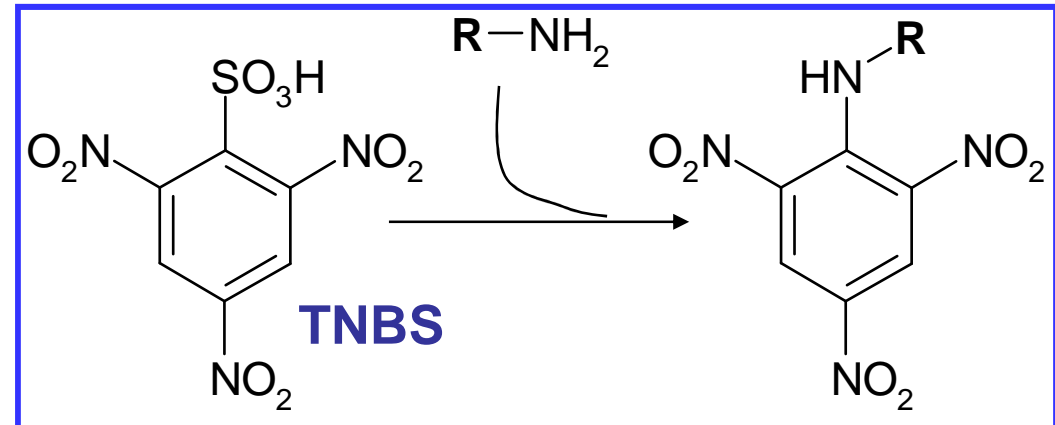


UV-VIS spektra albuminu a konjugátu albuminu s haptinem, připravený diazotační metodou. Měřeno v 50 mM fosfátu pH 7.0, koncentrace bílkovin 1,5 mg/ml.

# Stanovení aminoskupin

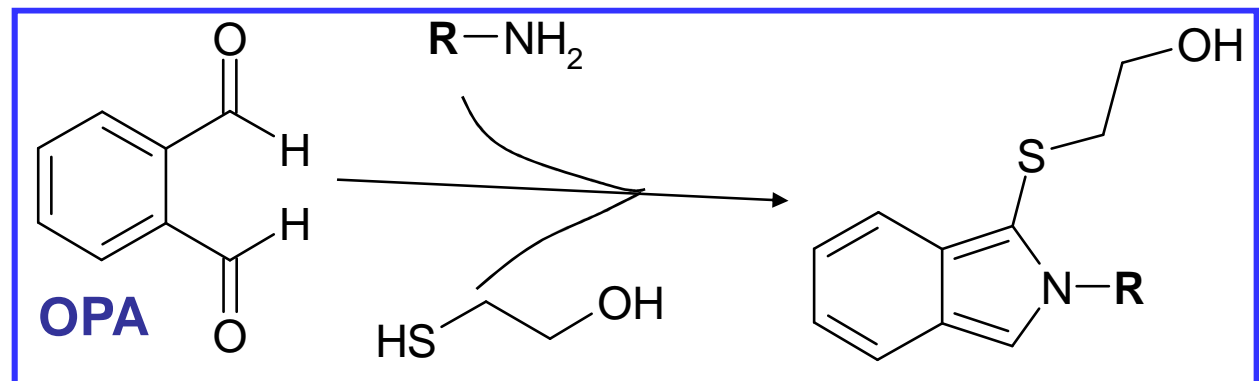
- volná aminoskupina s kyselinou 2,4,6- trinitrobenzensulfonovou (**TNBS**) dává barevný oranžový produkt

- měřitelný při 335 nm (v 200 mM HCl s 2% SDS)
- změřená absorbance se porovná s kalibrací pro vhodný standard, např. aa



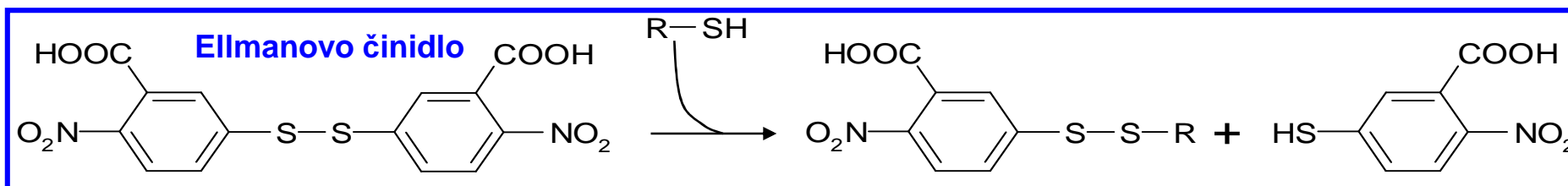
- pro vysoce citlivou fluorescenční detekci volných aminoskupin lze použít o-ftaldialdehyd (**OPA**) v přítomnosti 2-merkaptoethanolu

- produktem je fluoreskující sloučenina (360 / 455 nm)
- použije se opět kalibrace na standard



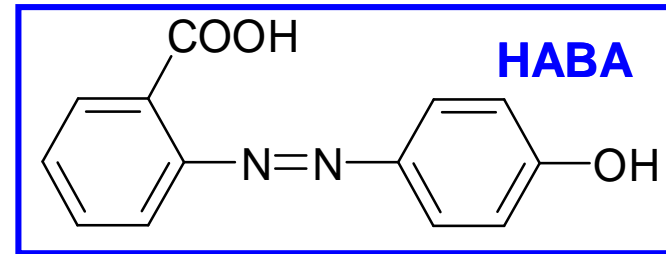
# Sulfhydrylové skupiny

- Ellmanovo činidlo, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
  - reaguje s volnými SH skupinami za vzniku disulfidu
  - uvolní se kyselina thionitrobenzoová - intenzívně žlutá barva
  - $\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



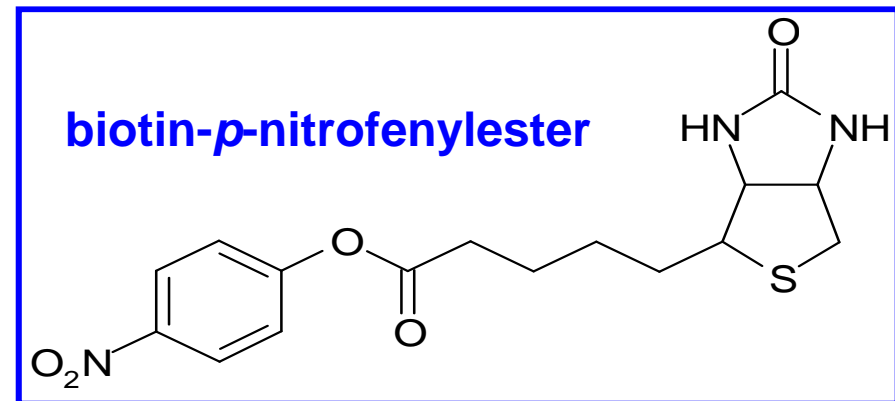
## Biotinové zbytky

- stanovení úrovně biotinylace má význam při hodnocení průběhu konjugace a při kontrole reprodukovatelnosti procesu
- využívá se **2-(4'-hydroxyazobenzen)-benzoová kyselina (HABA)**
  - po navázání na avidin vykazuje silnou absorpci při 500 nm
  - $\epsilon = 3,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (HABA<sub>4</sub>:avidin)
- pokud se v prostředí nachází volný nebo vázaný biotin, vytěsňuje molekulu HABA z vazebného místa a proporcionálně se sníží absorpce
- principem je rozdíl afinit obou molekul k avidinu,  $K_a$  je
  - $1,3 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$  pro avidin
  - $6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  pro HABA
- může být zajímavé porovnat získané hodnoty pro celý nativní biotinylovaný protein a pro stejný konjugát předem hydrolyzovaný např. pronasou na menší fragmenty
  - lze tak posoudit množství celkového a snadno dostupného biotinu v molekule konjugátu



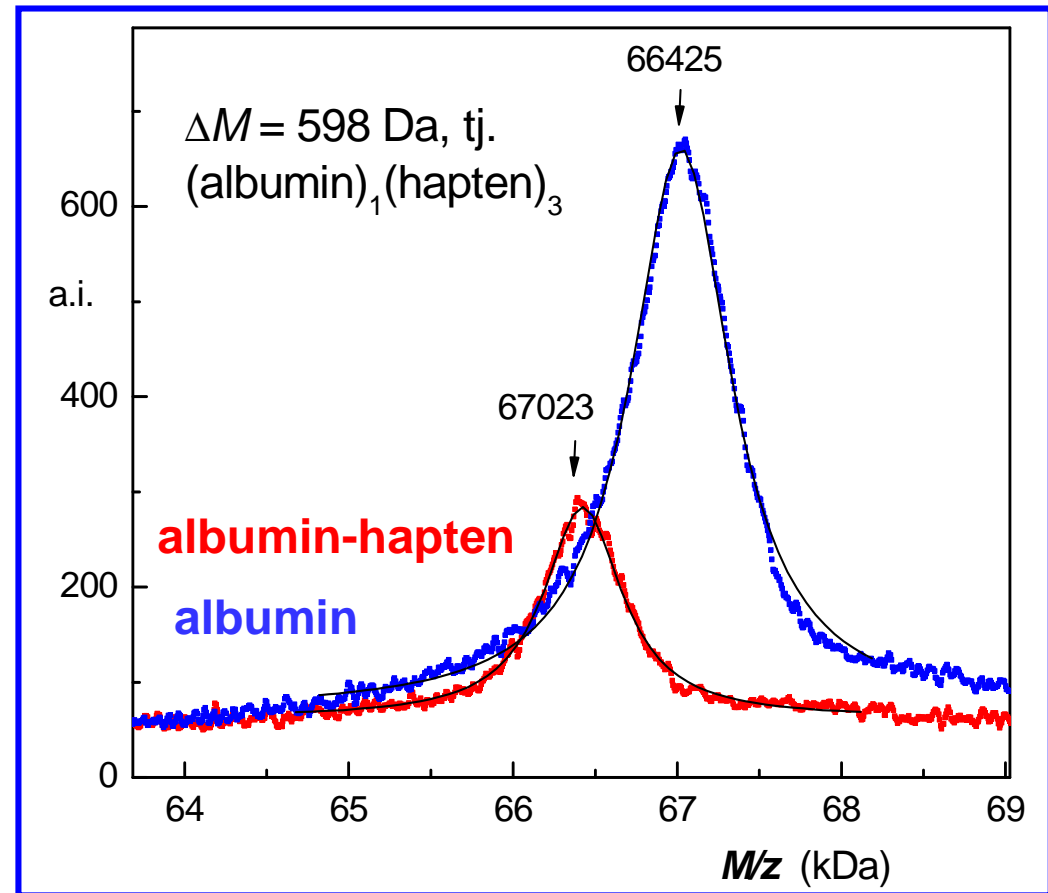
## Biotin vážící místa

- Velmi užitečné může být stanovení vazebných míst pro biotin na immobilizovaných molekulách avidinu nebo streptavidinu
- derivát biotinu s *p*-nitrofenolem je bezbarvé činidlo, které se naváže na immobilizovaný avidin
- po opláchnutí nosiče se v alkalickém prostředí zhydrolyzuje esterová vazba a uvolněný nitrofenol je v tomto prostředí intenzívně žlutý
- jeho množství odpovídá biotin-vážícím místům,  $\epsilon_{410} = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



## MALDI

- **matrix assisted laser desorption ionization**
- **v přítomnosti pomocné molekuly lze ionizovat i proteinové konjugáty**
  - do asi 100 kDa
  - z MS spektra se určí mol. hmotnost konjugátu
  - porovnáním s mol.hmotností výchozí bílkoviny se dá určit stupeň substituce



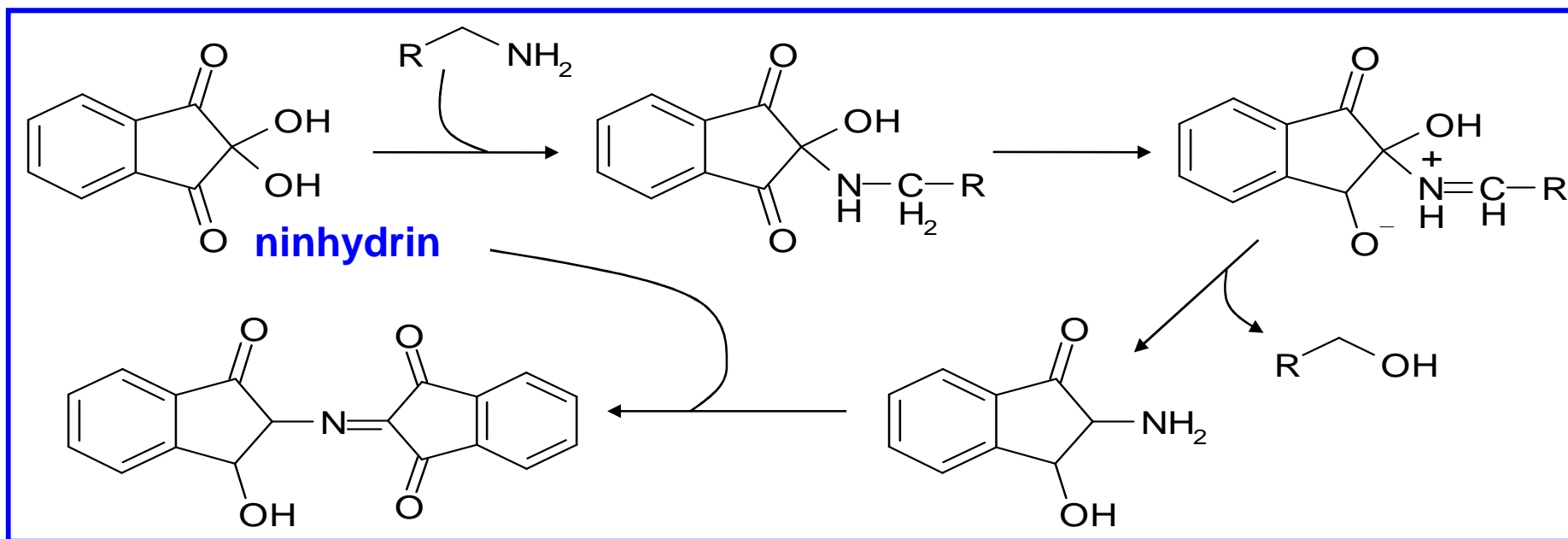
- **naštěpení konjugátu a výchozího proteinu sekvenčně specifickou endoproteasou (trypsin, štěpí na karboxy konci Arg a Lys)**
  - úprava štěpů - redukce a alkylace
  - MALDI analýza štěpných produktů - "vymizení" určitého peptidu u konjugátu svědčí o modifikaci v jeho aminokyselinách
  - místo srovnávacího proteinu lze použít "teoretické" štěpení známé sekvence z proteinové databáze

# Enzymy jako bioligandy

- mohou být barevné
  - peroxidasa - červená
  - flavinové oxidasy - žluté
- v imunokonjugátech spolu s protilátkou či antigenem = **tracer**
  - vždy změřit enzymovou aktivitu konjugátu (kolik procent z původně přítomné aktivity se zachovalo = vhodnost způsobu konjugace)
  - stanovit také koncentraci bílkoviny (specifická enzymová aktivita)
  - v literatuře velmi často údaje typu X-krát zředěný tracer, aniž by se uvedla výchozí koncentrace...

# Chromatografické nosiče

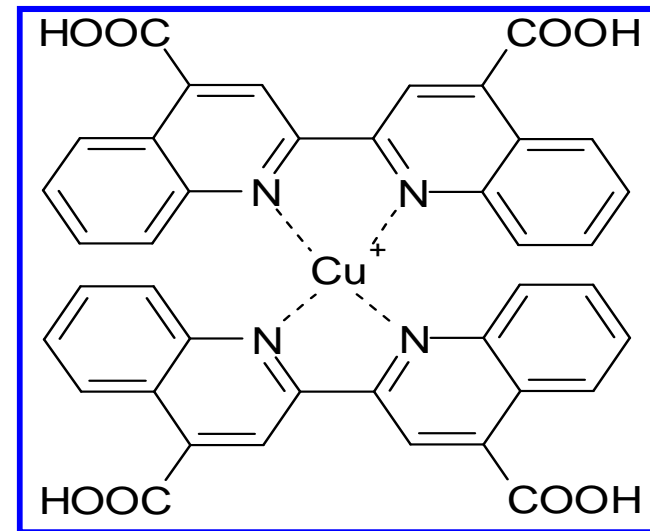
- běžné nosiče - schopné vázat volné aminoskupiny ligandů či biomolekul; určení výchozí vazebná kapacity:
  - derivatizace nosiče diaminem (ethylendiamin, 1,3-diaminopropan)
  - stanoví se množství získaných aminoskupin pomocí ninhydrinové reakce
  - slouží obecně pro kvantifikaci aminoskupin, zejména v případě aminokyselin
  - vzniká růžovofialové zbarvení,  $\epsilon_{570} = 8750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$





# Stanovení imobilizovaných bílkovin

- u bílkovin je výhodné použít jejich redukční vlastnosti v alkalickém prostředí vůči iontům  $\text{Cu}^{2+}$ 
  - vzniklá jednomocná měď  $\text{Cu}^+$  se pak stanoví jako barevný komplex pomocí kyseliny bichoninové (BCA),  $\text{Cu}^+(\text{BCA})_2$
  - reakce není příliš specifická a reagují také jiné redukující látky (aminy, hydrazidy, redukující cukry aj.)
  - zbarvení se měří při 560 nm



- kvalitativní průkaz přítomnosti bílkovin na modifikovaném nosiči lze také provést použitím Coomassie Blue 250 (Bradfordové činidlo), kdy vzniká adsorpční modrý komplex (595 nm) s imobilizovanými proteiny

# Imobilizace na povrch

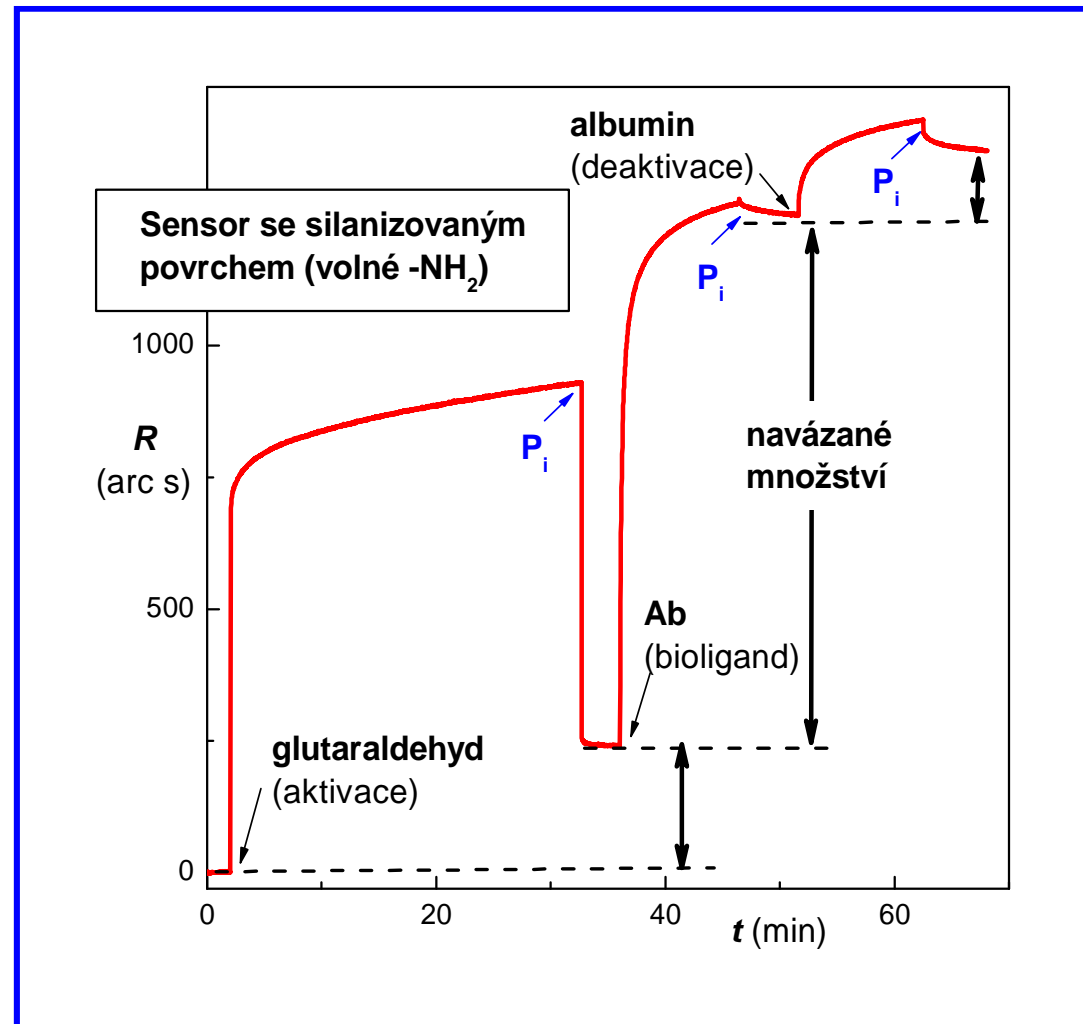
## sensorů

- pro stanovení množství navázaného ligandu omezeně použitelné i metody zmíněné pro pro biokonjugáty nebo chromatografické nosiče
  - komplikací je velmi omezená vazebná kapacita poskytující pouze malá množství stanovitelných barevných produktů
- imobilizace biomolekul na povrch přímých afinitních sensorů se ale velmi často provádí „online“:
  - sleduje se změna specifického signálu v reálném čase
  - signál odpovídá množství biomolekul vázaných na povrch, je tak přímo výsledek imobilizace „vidět“ a je ihned známo, jaké množství bioligandu se imobilizovalo
  - výhodou je jednoduchá možnost připravit citlivé povrchy s požadovanou hustotou bioligandu
- tímto způsobem fungují optické sensory na bázi rezonance povrchovým plazmonů (SPR) nebo piezoelektrické sensory (křemenné chemické mikrováčky, QCM)
- u QCM lze navázaný bioligand pohodlně přímo „zvážit“ stanovením rozdílu rezonanční frekvence sensoru v suchém stavu před a po imobilizačním kroku
- rozdíl je přímo úměrný změně hmotnosti po navázání biomolekul

# Imobilizace v reálném čase

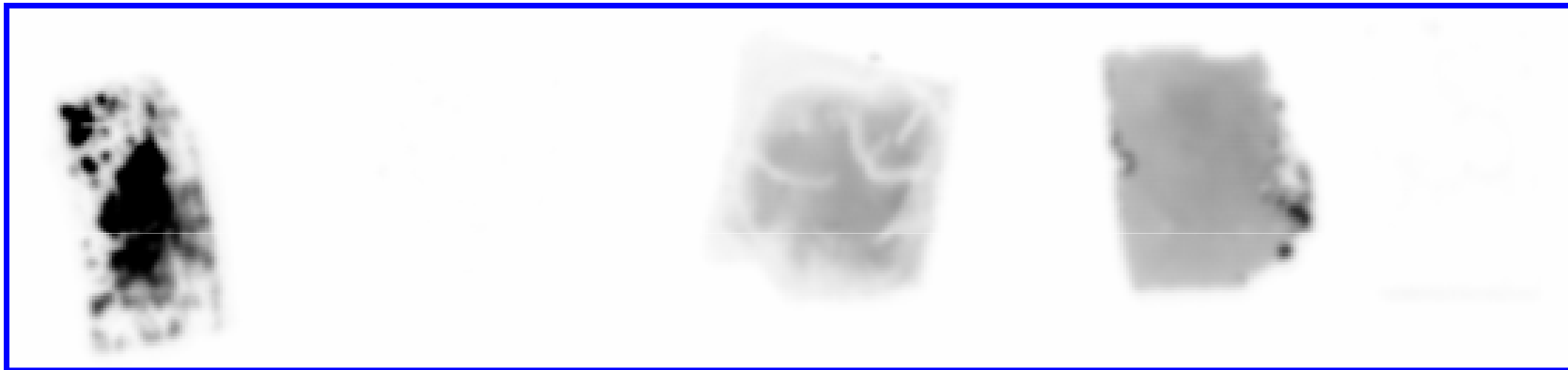
- signál sensoru je úměrný množství navázaných biomolekul - záznam imobilizace tedy poskytne přesné informace o navázaném množství

- ukázka imobilizace protilátky na sensor IAsys (optický systém rezonančního zrcadla)
  - aktivace glutaraldehydem
  - vazba protilátky
  - vysycení zbylých vazeb. míst inertní bílkovinou
  - rozdíl signálu se bere v přítomnosti pufru, tím se vyloučí skoky signálu dané různým složením imobilizačních roztoků

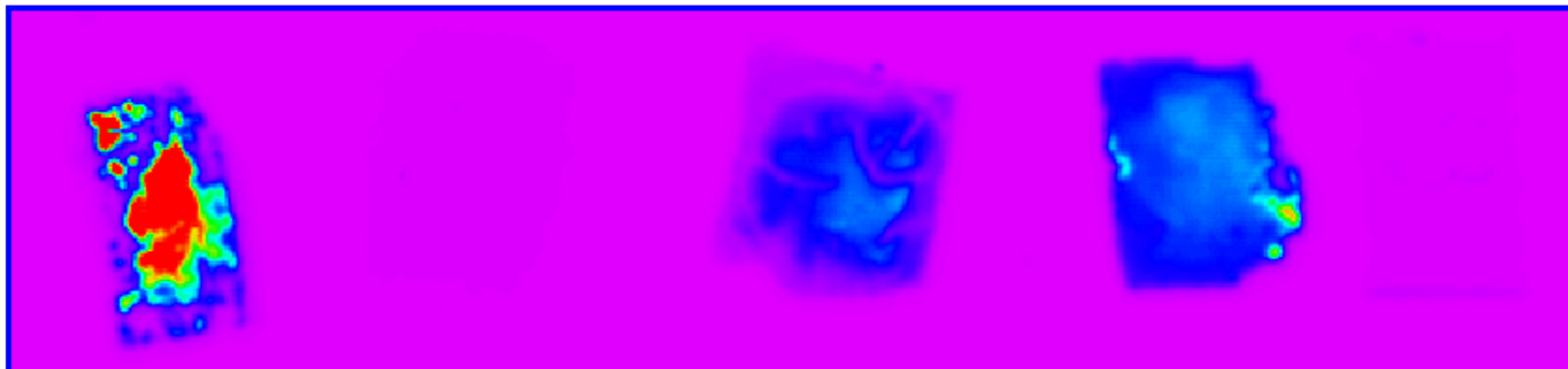


## Zobrazení označeného ligandu

- imobilizovaný ligand se označí pomocí např. fluorescenčně značené protilátky, obraz povrchu se získá pomocí fluorescečního mikroskopu nebo skeneru (nižší rozlišení)
- ukázka zviditelnění imobilizovaného proteinu pomocí specifické protilátky značené fluoresceinem, sken intenzity a pseudoobarvení

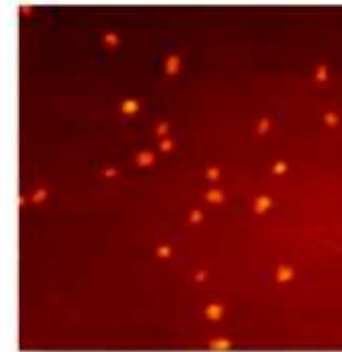
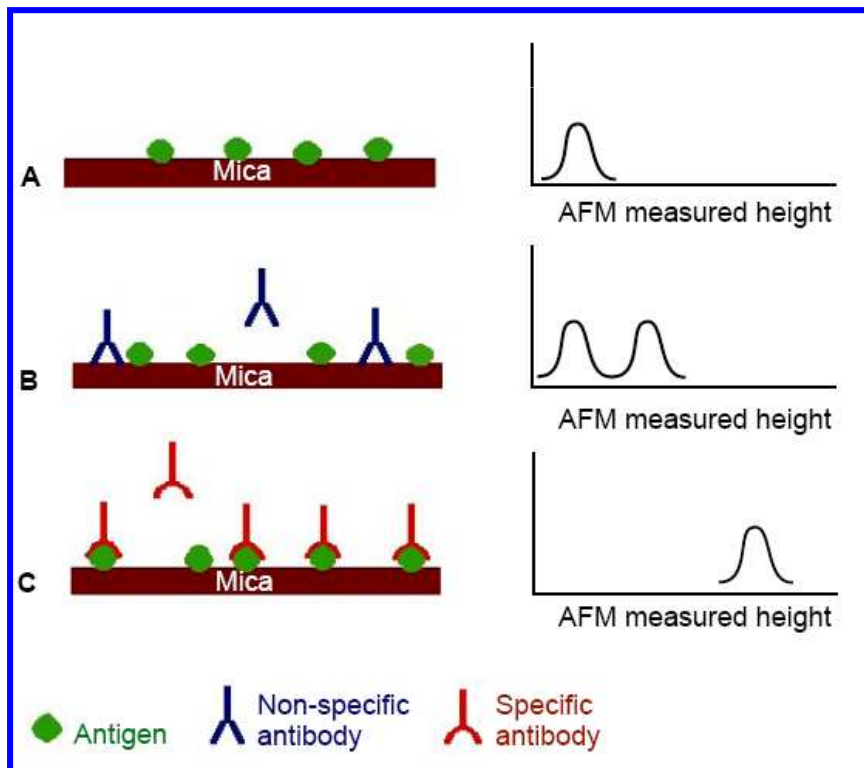


- porezní kontrolní porezní porezní kontrolní  
(elchem. oxidace) (ox. parami HF) povrchy Si

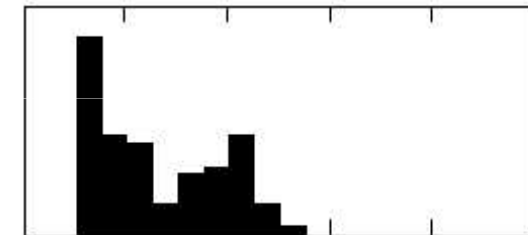
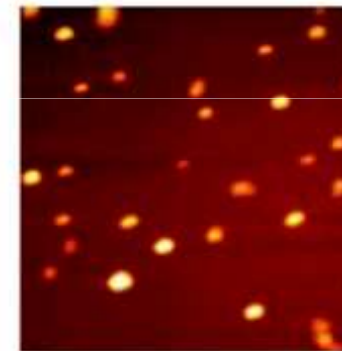


# Zobrazení modifikovaného povrchu

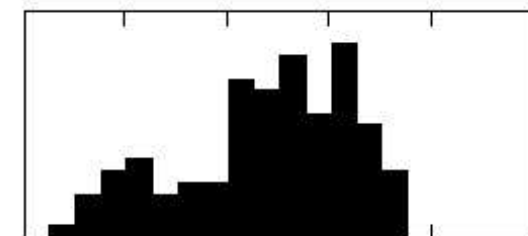
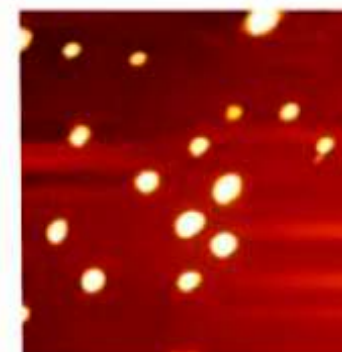
- mikroskopie na bázi meziatomových sil (AFM) poskytuje 3D „plastický“ pohled na povrch
  - přítomnost imobilizovaných biomolekul lze hodnotit na základě profilometrické analýzy AFM obrazů
- tapping mod, image xy 500x500 nm histogram pro Z, z osa 0 až 5 nm



A. HSA



B. HSA exposed to IgG



C. HSA exposed to a-HSA

**To je konec této přednášky...**

