

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2022

Nina Milivojević



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

OPTIMALIZACE MAGNETICKÉ SEPARACE PRO "POINT-OF-NEED" ELEKTROCHEMICKOU DETEKCI

OPTIMIZATION OF MAGNETIC SEPARATION FOR "POINT-OF-NEED" ELECTROCHEMICAL DETECTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nina Milivojević

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Kudr, Ph.D.

BRNO 2022

Bakalářská práce

bakalářský studijní program **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Nina Milivojević

ID: 200881

Ročník: 3

Akademický rok: 2021/22

NÁZEV TÉMATU:

Optimalizace magnetické separace pro "point-of-need" elektrochemickou detekci

POKyny PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši zaměřenou na použití magnetických materiálů použitých v oblasti separací se zaměřením na "point-of-need" elektrochemické detekční systémy. 2) Vyberte jeden relevantní analyt a navrhnete optimální metodiku jeho elektrochemického stanovení za pomoci magnetické separace. 3) Optimalizujte metodiku pro získání vhodných analytických parametrů. 4) Funkčnost metodiky ověřte na sériích standardních roztoků. 5) Funkčnost metodiky ověřte pomocí analýzy reálných vzorků a vyhodnoťte matricový efekt. 6) Proveďte diskusi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] Kudr, J.; Klejdus, B.; Adam, V.; Zitka, O., Magnetic solids in electrochemical analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2018, 98, 104-113.
- [2] Pashchenko, O.; Shelby, T.; Banerjee, T.; Santra, S., A Comparison of Optical, Electrochemical, Magnetic, and Colorimetric Point-of-Care Biosensors for Infectious Disease Diagnosis. Acs Infectious Diseases 2018, 4 (8), 1162-1178.
- [3] Schrittwieser, S.; Pelaz, B.; Parak, W. J.; Lentijo-Mozo, S.; Soulantica, K.; Dieckhoff, J.; Ludwig, F.; Guenther, A.; Tschope, A.; Schotter, J., Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels. Sensors 2016, 16 (6).

Termín zadání: 7.2.2022

Termín odevzdání: 27.5.2022

Vedoucí práce: Ing. Jiří Kudr, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Ondřej Zítka, Ph.D.

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou separace protilátek proti adhezinu A bakterie *Helicobacter pylori* (HpaA) za pomoci magnetických částic. Zahrnuje informace o různých způsobech detekce a stanovení patogenů, v našem případě *Helicobacter pylori*, a zároveň obsahuje optimalizaci podmínek pro stanovení zmíněných protilátek.

KLÍČOVÁ SLOVA

elektroda, izolace, magnetické částice, nanočástice, point-of-care, point-of-need, separace

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the issue of separation of antibody against adhesin A of the bacterium *Helicobacter pylori* (HpaA) using magnetic particles. It includes information about various methods of detection and determination of pathogens, in our case *Helicobacter pylori* and at the same time, contains optimization of conditions for determination of the mentioned antibodies.

KEYWORDS

electrode, isolation, magnetic particles, nanoparticles, point-of-care, point-of-need, separation

MILIVOJEVIĆ, Nina. *Optimalizace magnetické separace pro "point-of-need" elektrochemickou detekci*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2022, 48 s. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Ing. Jiří Kudr, Ph.D.

Prohlášení autora o původnosti díla

Jméno a příjmení autora: Nina Milivojević
VUT ID autora: 200881
Typ práce: Bakalářská práce
Akademický rok: 2021/22
Téma závěrečné práce: Optimalizace magnetické separace pro "point-of-need" elektrochemickou detekci

Prohlašuji, že svou závěrečnou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autorky*

*Autor podepisuje pouze v tištěné verzi.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Jiřímu Kudrovi, Ph.D. a konzultantovi panu doc. RNDr. Ondřeji Zítkovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci.

Obsah

Úvod	10
1 Magnetické nanomateriály pro “point-of-need” testování	11
1.1 “Point-of-need” testování	11
1.2 Elektrochemické biosenzory	13
1.3 Magnetické nanočástice	15
2 <i>Helicobacter pylori</i>	18
3 Optimalizace metodiky pro získání vhodných analytických parametrů	20
3.1 Kalibrace a příprava standardů	20
3.2 Vliv pH pufru na vazbu proteinu na magnetické částice	22
3.3 Vliv množství EDC na vazbu proteinu na magnetické částice	24
3.4 Vliv vstupní koncentrace proteinu na efektivitu vazby na magnetické částice	25
3.5 Ověření velikostí magnetických částic	26
4 Detekce <i>H. pylori</i>	27
4.1 Optimalizace podmínek pro elektrochemickou detekci	27
4.2 Elektrochemická detekce <i>H. pylori</i>	31
4.3 Optimalizace podmínek pro spektrofotometrickou detekci	35
4.4 Spektrofotometrická detekce <i>H. pylori</i>	39
Závěr a shrnutí	41
Literatura	42
Seznam symbolů a zkratk	48

Seznam obrázků

1.1	Výhody POCT	12
1.2	Obecný princip elektrochemického stanovení	16
1.3	Přímá ELISA	17
2.1	Karbodiimidová metoda povrchové modifikace	19
3.1	Kalibrační křivka BSA	21
3.2	Závislost množství zachyceného BSA na pH vazebného pufru	23
3.3	Závislost množství zachyceného BSA na aplikovaném množství EDC	24
3.4	Závislost účinnosti záchytu proteinu na množství vloženého proteinu	25
3.5	Velikostní distribuce magnetických částic stanovená metodou dynamického rozptylu světla (DLS).	26
4.1	Hydrolyza 1-NP alkalickou fosfatázou za vzniku 1-N	27
4.2	Uživatelské prostředí Autolab NOVA	28
4.3	Elektroda výrobce MicruX Technologies	28
4.4	Voltametrické záznamy v softwaru NOVA	29
4.5	Voltametrické záznamy v softwaru NOVA	30
4.6	Voltametrické záznamy v softwaru NOVA	30
4.7	Ukázka elektrochemické odezvy metody na pozitivní vzorek séra	32
4.8	Ukázka elektrochemické odezvy metody na negativní vzorek séra	32
4.9	Ukázka odezvy optimalizované DPV na vzorek substrátu a vody	33
4.10	Ukázka odezvy optimalizované DPV na vzorek substrátu a produktu	34
4.11	Ukázka odezvy optimalizované DPV na vzorek substrátu	34
4.12	Ukázka odezvy vzorku při různých vlnových délkách	35
4.13	Závislost absorpance na čase	36
4.14	Křivka Michaelis-Mentenové	37
4.15	Lineweaver-Burkův graf	38
4.16	Odezva na pozitivní vzorek	39
4.17	Odezva na negativní vzorek	40
4.18	Sloupcový graf porovnání průměru hodnot odezvy pozitivního a negativního vzorku	40

Úvod

S rozvojem nanotechnologií se magnetické nanočástice (MNPs) ukázaly být slibným nástrojem pro vývoj biosenzorů pro měření v místě péče. Tento přehled nastiňuje vývoj elektrochemických biosenzorů, které používají magnetické částice, pro detekci biomolekul. Magnetické částice v mikro- a nanoměřítku, napodobující velikost molekul v přírodě, mají zajímavé vlastnosti, které usnadňují čištění a detekci biomolekul v široké škále vzorků. Zejména velký povrch a paramagnetické nebo superparamagnetické vlastnosti těchto drobných částic poskytují atraktivní technologickou platformu pro návrh elektrochemických biosenzorů. Tento analytický přístup je vhodný k miniaturizaci a lze tak vytvořit elektroanalytický nástroj malý jako mobilní telefon, který lidem umožňuje provádět experimenty v terénu bez speciálního školení. Praktická část se zabývá optimalizací podmínek pro tvorbu elektrochemického biosenzoru pro detekci HpaA založeného na MNPs a jsou zde popsány příklady elektrochemických přístupů k dosažení separace a detekce analytu využívajících MNPs.

1 Magnetické nanomateriály pro “point-of-need” testování

1.1 “Point-of-need” testování

Termín point-of-care (POC) byl poprvé zmíněn před třiceti lety v textu Laboratory Improvement Amendments of 1988, který zahrnuje federální normy platné pro všechna americká zařízení nebo místa, která testují lidské vzorky pro posouzení zdravotního stavu nebo pro diagnostiku, prevenci nebo léčbu onemocnění. Tehdy byla definována budoucnost analýz v rámci zdravotnictví, která má směřovat k provedení nezbytných úkonů v místě péče.

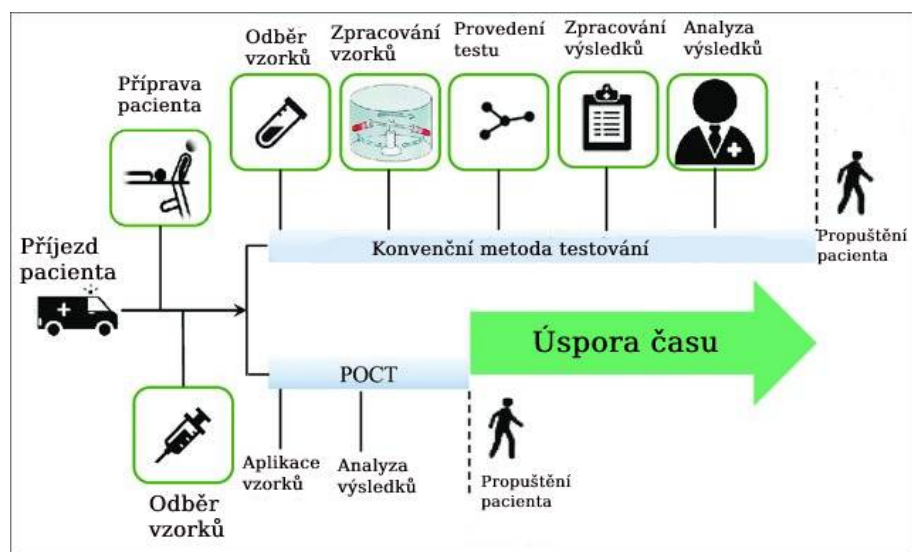
Point-of-care testy (POCT) jsou lékařské testy, které se provádí kdekoli, kde se pacient nachází a umožňují okamžitého získání a odeslání výsledků lékaři ke klinickému rozhodnutí. Se zvyšující se potřebou pacientů získat co nejpřesnější výsledky co nejrychleji, poptávka po POCT v dnešní době stále roste. Velký technologický pokrok, mobilní telefony, internet dostupný téměř každému, mimořádný vývoj ve světě senzorů a miniaturizace zařízení umožňují provést test bez významných lékařských znalostí a získat výsledky v krátkém čase. [1]

Rozdíl mezi POCT a point-of-need testy (PONT) ještě není přesně definován, i když PONT má širší význam a zahrnuje také analýzy v oblasti životního prostředí, veterinární péče a bezpečnosti potravin. Světová zdravotnická organizace (WHO) definovala POCT a PONT jako snadno dostupné, citlivé, přesné, uživatelsky přívětivé, miniaturizované a rychlé, použitelné bez speciálního vybavení a dosažitelné těm, kteří je potřebují. Pro aplikace mimo zdravotnická zařízení byly POCT a PONT také někdy označovány jako point-of-use nebo point-of-collection. Ve srovnání s velkými stolními zařízeními jsou ruční a přenosné analytické nástroje integrovanější, snadno se s nimi manipuluje, nevyžadují odbornou obsluhu a šetří čas, aniž by došlo ke značné ztrátě přesnosti a citlivosti. [2] [3] [4]

Velkou výhodou diagnostiky POCT a PONT je identifikace patogenů přímo na lůžku nemocného člověka nebo v místě chovu zájmových zvířat a samozřejmě také v krátkém čase. Osoby odpovědné za léčbu tak mohou reagovat rychleji podle výsledku. Tato diagnostická zařízení lze také snadno odeslat na místo, kde jsou potřeba, a mohou představovat řešení pro méně rozvinuté země s nedostatky v dopravní infrastruktuře a zejména v prostředí s omezenými zdroji. Výsledky analýz se ukládají do paměti zařízení nebo se bezdrátově přenášejí a nahrávají na centrální servery nebo jiné databáze přes Bluetooth, bezdrátové místní sítě (WLAN) a pomocí mobilní komunikace. Vzniká tak možnost poskytovat dálkově efektivní péči, např. vzdálené sledování stavu pacientů, personalizace léčby a snížení počtu potřebných návštěv v

nemocnici. Tyto schopnosti dělají z POCT a PONT důležitý nástroj prevence šíření nemocí. Použití POCT a PONT na letištích, v přístavech a karanténních stanicích může zabránit celosvětovému šíření mnoha infekčních nemocí jako např. COVID-19. [2] [4] [5]

Obecně, ruční zařízení jako jsou POCT a PONT systémy obsahují integrované senzory a jednotku pro přenos a vyhodnocování signálu. Sběrem a analýzou vzorků, jako je krev, sérum, moč, sliny a další jsou POCT zařízení, založená na biosenzorech, schopna specificky detekovat stopové hladiny analytů biologického i anorganického původu. Tyto analyty zahrnují DNA, RNA, protilátky, proteiny, toxiny, hormony, ionty, cytokiny, buňky, viry a bakterie. [1] [4] [2]



Obr. 1.1: Výhody POCT [8]

1.2 Elektrochemické biosenzory

Biosenzory jsou analytická zařízení pro detekci analytů, založena na principu kombinace biologické složky (biorekogniční element) se složkou fyzikálně-chemického detektoru, ve kterých k rozpoznání analytu dochází na základě biochemických reakcí s biomolekulami, jako jsou protilátky, proteiny, enzymy, buňky atd. K tomu obecně dochází pomocí miniaturizovaných analytických systémů, kde jsou biologické složky imobilizovány na povrchu v pevné fázi, který interaguje s analytem. Tyto interakce lze detekovat pomocí elektrochemických, optických a jiných metod. Tímto způsobem mohou zařízení POCT a PONT integrující specifické bioafinitní elementy a citlivé, jednoduché a levné elektroanalytické techniky poskytnout včasnou detekci patogenů, umožnit rychlou léčbu nemocí, a tak pomoci zvýšit míru přežití pacientů. [6] [1]

Vývoj diagnostických technologií POCT a PONT má největší potenciál pro miniaturizaci a přenositelnost, ale samotný její vývoj může trvat dlouho a být velmi nákladný. Velké množství studií vyvinulo prototypy zařízení, které jsou přenosné a přesné, ale tyto technologie čeká dlouhá doba testování a hodnocení analytických parametrů.

Glukometr je dobrým příkladem přenosné elektrochemické diagnostické platformy, která je v dnešní době již komerčně dostupná. Slouží pro měření hladiny glukózy v krvi a nebude překvapením, když podobné platformy v blízké budoucnosti dosáhnou obdobných výsledků v detekci různých analytů. Také chytré telefony poslední dobou získaly velkou pozornost jako potenciální řídicí jednotky pro různé POCT a PONT zařízení. [1] [7]

Mezi různými dosud používanými detekcemi představuje elektrochemická detekce značnou část publikovaných prací v této oblasti. Elektrochemické biosenzory jsou často navrženy pro POCT nejen díky jejich vysoké specifičnosti, citlivosti, přesnosti a nízkým detekčním limitům, ale také díky jejich rychlé odezvě, možnostem miniaturizace, přenositelnosti, relativně nízké ceně a pohodlnému ovládní.

Elektrochemické biosenzory lze také snadno přizpůsobit jako součást mikrofluidních čipů, přenositelných systémů nebo je lze připojit k systémům čtení digitálních signálů, jako jsou chytré telefony, což umožňuje skutečnou detekci cílového analytu na místě a okamžité sdílení výsledků testů s lékařem. [1]

Základní princip imunosenzorů je založen na specifickém rozpoznání mezi protilátkami a antigeny. Cílový antigen (např. protein) lze zachytit na povrchu senzoru, na který byly dříve imobilizovány protilátky. V elektrochemickém senzoru může analýza probíhat prostřednictvím sendvičové struktury, kde potom následuje měření elektrochemického signálu. [9]

Elektrochemický biosenzor obvykle obsahuje tři elektrody, hlavní měřící tzv. pra-

covní elektrodu, pomocnou elektrodu a referenční elektrodu. Elektrochemické biosenzory v podstatě měří elektrické nebo elektrochemické změny na povrchu elektrody po navázání cílového analytu na biorekogniční prvek uložený na povrchu pracovní elektrody. Elektrochemická detekce využívá jako materiál hlavně uhlíkové nebo kovové elektrody, nezářídka povrchově modifikované pomocí nanomateriálů. Účelem elektrod je převést informace biologického rozpoznání na užitečný elektrický signál, který ovlivňuje měřitelné elektrické vlastnosti na rozhraní elektrody a elektrolytu (např. elektrický proud nebo potenciál). Potenciál se měří mezi pracovní elektrodou a referenční elektrodou, zatímco proud se měří mezi pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou. Právě amperometrické a potenciometrické metody se nejčastěji používají ve spojení s elektrochemickými biosenzory. [1] [10] [11] [12]

V poslední době zaznamenal obor nanotechnologií zaměřených na nanočástice a nanomateriály velký rozmach. V současné době se k navrhování ultracitlivých platforem pro biosenzory používají různé druhy funkčních nanomateriálů, jako jsou kovové nanočástice, kvantové tečky, nanoporézní materiály, nanomateriály na bázi uhlíku a MNPs, o kterých bude řeč v následující kapitole. [13]

1.3 Magnetické nanočástice

V posledních dekáдах byly syntetizovány nanomateriály různých tvarů, velikostí a složení, jako jsou kovové nanočástice (zlato, stříbro apod.), kvantové tečky (polovodičové nanočástice), mezoporézní nanočástice oxidu křemičitého, uhlíkové nanomateriály (grafen, fulereny, grafenové tečky) a MNPs, které se dneska široce používají nejen v elektrochemických senzorech a biosenzorech.

Díky svým jedinečným fyzikálním a chemickým vlastnostem se tyto nanomateriály stále častěji používají při testování v místě péče a v místě potřeby, aby se zlepšil analytický výkon a zjednodušil proces detekce. Přestože tyto nanočástice hrají v různých elektrochemických systémech různé role, lze základní funkce MNPs klasifikovat především jako: 1) imobilizace biomolekul; 2) katalýza elektrochemických reakcí; 3) zlepšení přenosu elektronů; 4) značení biomolekul a 5) působení jako reaktant. [14] [12]

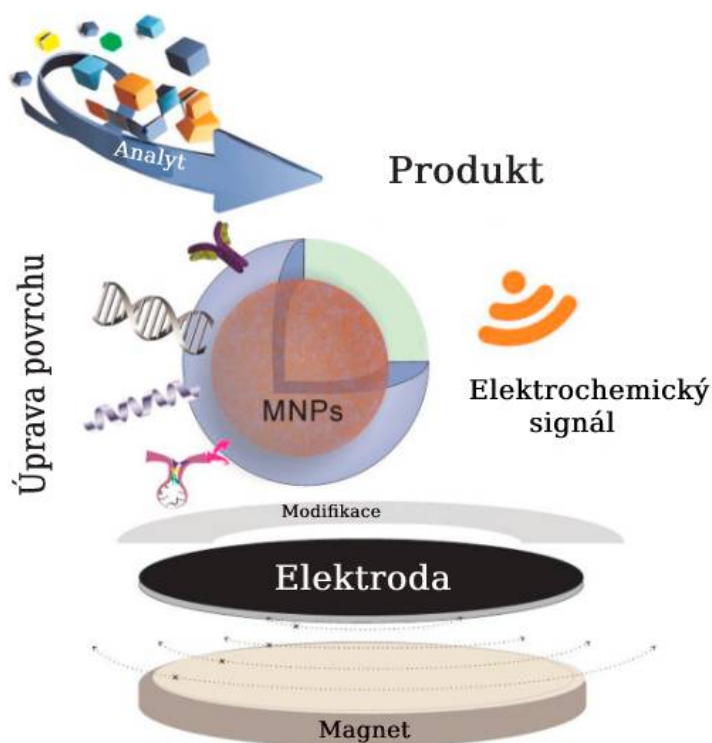
Obecně platí, že kovové nanočástice mají vynikající vodivost a katalytické vlastnosti, díky nimž jsou vhodné pro posílení přenosu elektronů mezi redoxními centry v proteinech a povrchem elektrod. Taky slouží jako katalyzátory pro zesílení elektrochemických reakcí. [14]

Mezi hlavní výhody použití MNPs patří jejich velká plocha povrchu, snadná modifikace povrchu, nízká toxicita pro lidský organismus a jednoduchá manipulace pomocí externího magnetického pole. Fyzikálně-chemické vlastnosti MNPs, jako je velikost, úroveň magnetizace, jsou důležité při definování jejich užitečnosti v biologických aplikacích. Stejně důležité je, že povrchové vlastnosti částic by měly být optimalizovány, aby se omezily nespecifické interakce a aby byly testy na bázi částic vhodné pro použití v komplikovaných maticích, jako jsou tělní tekutiny. Obvykle představují MNPs používané v biosenzorech superparamagnetické nanočástice na bázi oxidu železa, včetně maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a magnetitu (Fe_3O_4). Je známo, že malé částice oxidů železa velikosti od 1 do 10 nm vykazují superparamagnetismus, zatímco větší (v řádu μm) vykazují feromagnetismus. [13] [5] [9]

Alternativní materiál magnetických nanočástic, představuje MFe_2O_4 a FePt . Postupy syntézy těchto částic jsou však relativně složité a drahé ve srovnání s nanočásticemi oxidu železa. Magnetické nanočástice oxidu železa vykazují dostatečnou fyzikální a chemickou stabilitu, jakož i biokompatibilitu a jsou bezpečné pro životní prostředí. Důležitým aspektem je však možnost jejich specifických biologických aplikací, které zahrnují magnetickou separaci, cílené dopravování léků, zobrazování magnetickou rezonancí, termoablace a biosenzory.

MNPs se obecně používají k usnadnění transportu látek na snímací povrch sensorů přitahováním vnějším magnetickým polem. MNPs rozptýlené ve vzorku, a modifikované vhodnými rozpoznávacími molekulami (protilátky, oligonukleotidové próby

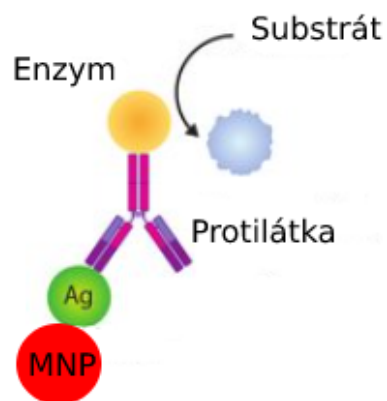
apod.) mohou specificky zachytit cílové molekuly a poté být přitaženy pomocí aplikovaného magnetického pole, jak je vidět na obrázku 1.2. Konjugát analytu a MNPs může být buď izolován ze zbytku vzorku, kdy je přiveden na snímací povrch biosenzoru za účelem detekce nebo může být odstraněn (separován) ze vzorku. [15] [16]



Obr. 1.2: Obecný princip fungování elektrochemické analýzy na bázi MNPs [15]

Samotná detekce může probíhat na základě tzv. přímé ELISY, jak je zobrazeno na obrázku 1.3. V tomto případě dochází k modifikaci částic antigenem, na který se specifický váže protilátka značená enzymem, který ve vhodném prostředí ze substrátu produkuje detekovatelný produkt. [17]

Přímá ELISA



Obr. 1.3: Přímá ELISA [18]

2 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je druh bakterií, infikující organismus lidí a zvířat, zejména kolonizující oblast žaludku a dvanáctníku. Úzce souvisí se žaludečními chorobami, jako jsou peptické vředy ve výstelce žaludku nebo horní části střeva a rakovinou žaludku. Rakovina žaludku se běžně projevuje u osob, které trpí chronickými infekcemi *H. pylori*. Infekce může být přenesena přímým kontaktem prostřednictvím slin, stolice nebo zvratků infikovaných osob, avšak přesná cesta přenosu není dosud známa. Kontaminované potraviny a voda jsou hlavními faktory, které se podílejí na šíření bakteriální infekce. Ačkoli *H. pylori* může postihnout všechny věkové skupiny, dospělí nad 60 let jsou zvláště náchylní k infekci. Zároveň se předpokládá, že počáteční infekce se vyskytuje hlavně u dětí do 5 roků věku. Podle statistiky se infekce *H. pylori* vyskytuje výrazně méně u populace v rozvinutých zemích než v zemích rozvojových. [20]

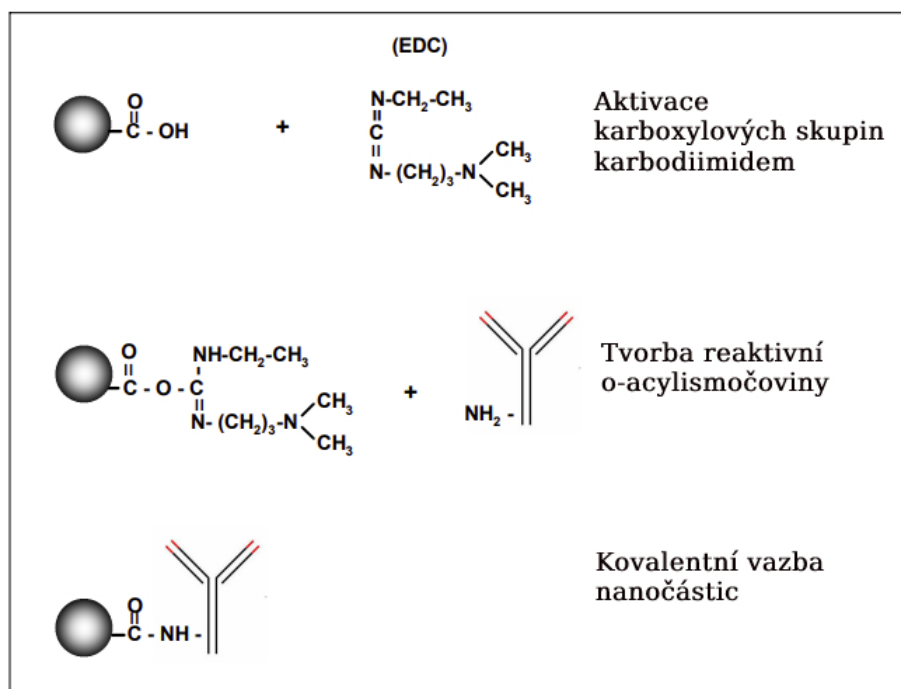
H. pylori je mikroaerofilní bičíkovitá bakterie ve tvaru šroubovice o průměrné velikosti 3 μm a délce 0,5 μm . Bakterie vylučuje několik základních enzymů, jako je oxidáza, ureáza a kataláza, které hrají důležitou roli při jejím přežití v kyselých podmínkách žaludečního prostředí. *H. pylori* může používat různé adheziny k navázání na žaludeční epiteliální buňky a jeden z nich je adhesin A (HpaA). Ve všech sérech pacientů infikovaných *H. pylori* je značné množství protilátek proti HpaA. Kvůli tomu HpaA je slibným kandidátem pro vývoj vakcíny proti *H. pylori*.

Byla vyvinuta řada testů s různou přesností a citlivostí k identifikaci infekce *H. pylori*. Diagnostické metody pro identifikaci *H. pylori* se obecně dělí na invazivní a neinvazivní testy. Invazivní metody, jako je rychlý ureázový test (RUT) a polymerázová řetězová reakce (PCR) jsou založeny na přímé identifikaci mikroorganismu endoskopií horní části gastrointestinálního traktu a biopsií žaludku. Pro počáteční diagnostiku infekce *H. pylori* lze použít neinvazivní testy, které lze provést na vzorcích séra, slin, stolice nebo dechu. Sérologii (průkaz protilátek proti *H. pylori*), dechový test ^{13}C -urea (^{13}C -UBT), test antigenu stolice (SAT) nebo test fekálního antigenu (FAT) a test antigenu *H. pylori* slin (HPS) lze provést neinvazivními metodami. Invazivní testy lze použít pro sledování stupně poranění žaludku, zatímco neinvazivní testy lze použít pouze k identifikaci *H. pylori* ve vzorku. Test sérových protilátek a invazivní endoskopie nejsou vhodné pro děti a těhotné ženy kvůli radiační expozici a z důvodu nízké citlivosti a přijatelnosti. Současné testy na antigen ve stolici však někdy poskytují falešně negativní výsledky a to zejména v případech nízkého počtu bakterií a nebo v případě že byly u pacientů nedávno použity inhibitory protonové pumpy nebo antibiotika. [19] [20] [21]

K překonání těchto problémů může být vyvinuta řada biosenzorů jako vysoce účinná metoda pro detekci bakterií *H. pylori* a rakoviny žaludku v jeho raném stádiu.

Po spojení s nanomateriály poskytují biosenzory a mikrofluidní systémy vhodné analytické platformy pro diagnostiku *H. pylori* v místě péče. První ultracitlivý senzor pro celobuněčnou detekci *H. pylori* z lidských fekálních vzorků byl vyvinut v roce 2019. Pracuje v „sendvičovém“ režimu a využívá monoklonální protilátky proti *H. pylori* konjugované s magnetickými částicemi pro zachycení bakteriálních buněk a polyklonální protilátky proti *H. pylori* konjugované s fluorescenčními kvantovými tečkami pro přenos signálu. [21]

Tento „sendvičový“ postup popisuje kovalentní spojení aminoskupin ligandů, jako jsou protilátky, proteiny nebo nízkomolekulární látky, na magnetické částice karbodiimidovou metodou. Karbodiimidová metoda je kovalentní vazebný systém a zaručuje proto dobrou reprodukovatelnost imobilizace. Karbodiimidy reagují s koncovými karboxylátovými skupinami z magnetických částic na vysoce reaktivní deriváty O-acylisomočoviny a snadno reagují s aminoskupinami ligandů. Magnetické částice mohou kovalentně vázat protein prostřednictvím aktivace ethyl (dimethylaminopropyl) karbodiimidu (EDC), který byl použit v předložené práci. [19] [20] [22]



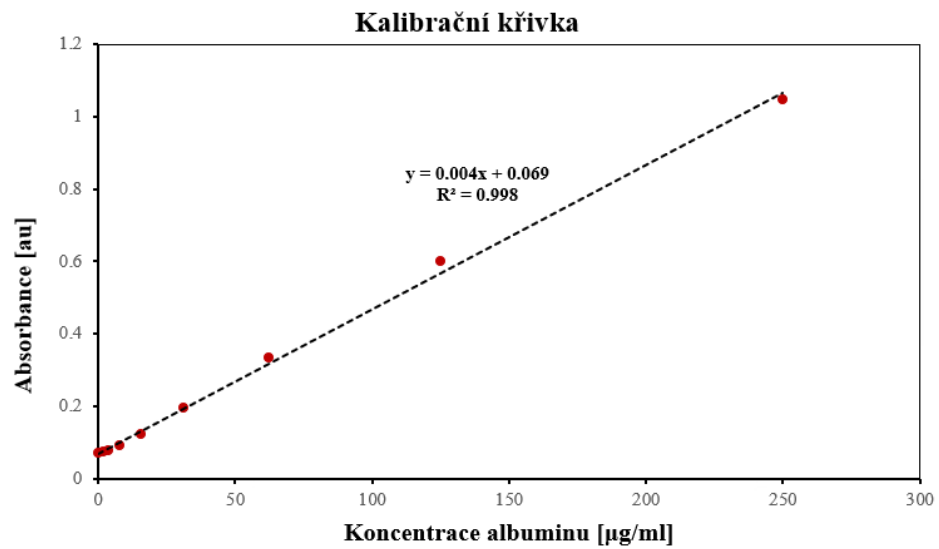
Obr. 2.1: Postup kovalentní vazby protilátky IgG na magnetické částice karbodiimidovou metodou

3 Optimalizace metodiky pro získání vhodných analytických parametrů

3.1 Kalibrace a příprava standardů

V analytické chemii standardní roztok obsahuje přesně známou koncentraci látky. Známa hmotnost látky se rozpustí v požadovaném rozpouštědle, aby se vytvořil specifický objem. Standardní roztoky se používají ke stanovení koncentrací neznámého analyzovaného vzorku. Jednoduchý standard se získá zředěním jednotlivého prvku nebo látky v rozpouštědle (obvykle destilovaná voda popř. vodný pufr). Kvalita bioanalytické metody je vysoce závislá na linearitě výsledné kalibrační křivky, která představuje vztah mezi koncentrací a odezvou dané metody. Právě tento vztah se pak použije k transformaci měření provedených na zkušebních vzorcích na výpočty množství přítomného analytu. Lineární kalibrační křivka je pozitivní indikací účinnosti testu ve validovaném analytickém rozsahu.

V našem experimentu byl zvolen jako standard hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA). Bylo smícháno 2 mg BSA do 4 ml destilované vody (výsledná koncentrace 0,5 mg/ml). Následně bylo provedeno půlové ředění do 10 zkumavek 0.1 M MES puforem, desátá zůstala prázdná (nulový vzorek). Následně byly vzorky o různých koncentracích BSA smíchány v poměru 1:8 se směsí reagensů A a B (50:1) z testovací sady PierceTM BCA Protein Assay Kit od firmy ThermoFischer. Vzorky jsme nechali inkubovat 30 minut při 60°C na přístroji Phoenix Instrument HB-100. V přístroji Infinite M200 Pro při vlnové délce 562 nm jsme pak byli schopni získat absorbanci a následně zobrazit graficky získané výsledky pomocí kalibrační křivky na obrázku 3.1.



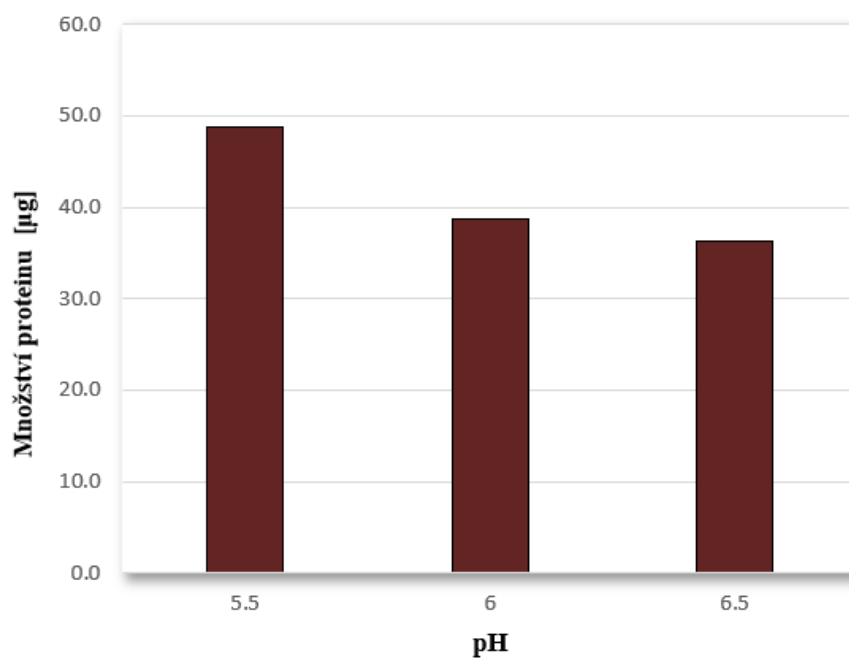
Obr. 3.1: Kalibrační křivka závislosti koncentrace BSA na absorbanci při 562nm

Danou kalibrační křivku budeme používat v dalších měřeních pro stanovení koncentrace proteinu zachyceného na magnetické částice.

3.2 Vliv pH pufru na vazbu proteinu na magnetické částice

V tomto měření bylo testováno pH 0,1 M MES pufru tvořeného kyselinou 2-(N-morfolino)-ethansulfonovou a hydroxidem sodným. Použili jsme hodnoty: pH 5,5, 6,0 a 6,5. Jako protein jsme použili BSA v koncentraci 50 μ g/250 μ l. Postup byl následující. 5 mg částic bylo promyto dvakrát v 1 ml MES pufru o příslušném pH. Následně bylo k částicím přidáno 0,25 ml MES pufru obsahující 10 mg EDC. Připravený vzorek jsme nechali rotovat v přístroji Multi Bio RS-24 po dobu 10 minut. Po uplynutí doby byly částice promyty dvakrát v 1 ml MES pufru o příslušném pH. Po promytí byly částice resuspendované v 0,25 ml MES pufru o různých pH. Do vzorku pak bylo přidáno 250 μ l roztoku BSA a pak jsme vzorek nechali rotovat 2 hodiny. Po 2 hodinách, byl z částic odebrán eluát a byl smíchán v poměru 1:8 s reagenty A a B (poměr 50:1) z testovací sady PierceTM BCA Protein Assay Kit od firmy ThermoFisher. Vzorek jsme nechali inkubovat 30 minut na 60°C stupňů na přístroji Phoenix Instrument HB-100. V přístroji Infinite M200 Pro jsme pak byli schopni získat absorbanci při vlnové délce 562 nm a následně z kalibrační křivky do počítat jaké množství proteinu se vážalo na magnetické částice. Z výsledného grafu 3.2 vyplývá, že optimální pH pro vazbu proteinu na magnetické částice bylo 5,5. Při této hodnotě pH došlo k nejvyššímu zachycení proteinu, a proto byl pufr o pH 5,5 používán v navazujících experimentech.

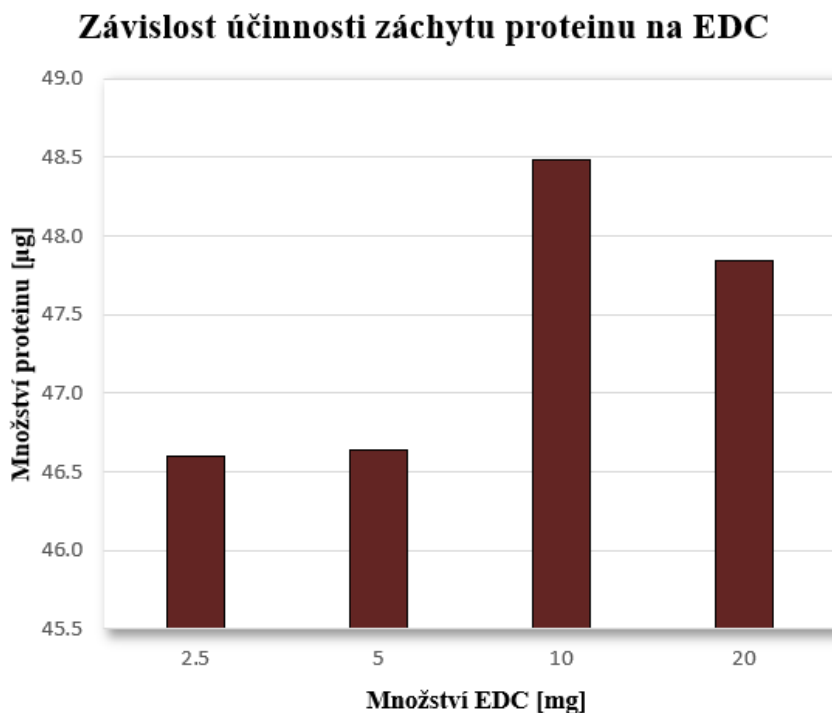
Závislost účinnosti záchytu proteinu na pH



Obr. 3.2: Závislost množství zachyceného BSA na pH vazebného puftru

3.3 Vliv množství EDC na vazbu proteinu na magnetické částice

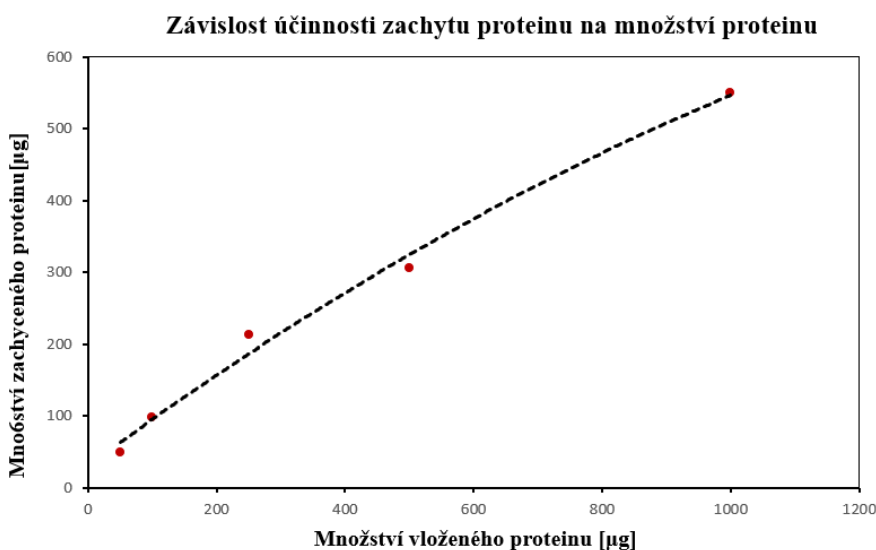
Dalším parametrem, který jsme sledovali, bylo množství EDC. Cílem bylo zjistit jestli množství EDC ovlivňuje účinnost vazby proteinu na MNPs. Množství EDC, které bylo použito je 2,5 mg, 5,0 mg, 10,0 mg a 20,0 mg. K měření byl použit 0.1 M MES pufr o pH 5,5. Postup byl stejný jako v kapitole 3.2, ovšem měli jsme 4 různé vzorky s odlišným množstvím EDC a stejným pH MES pufru. V přístroji Infinite M200 Pro jsme opět byli schopni získat absorbanci při vlnové délce 562 nm a následně z kalibrační křivky dopočítat, jaké množství proteinu se vážalo na magnetické částice. Z výsledného grafu 3.3 vyplývá, že optimální množství EDC na izolaci proteinu byl 10 mg. Ačkoli ostatní hodnoty se nijak výrazně neliší, při hodnotě 10 mg bylo zachyceno nejvyšší množství BSA (48.5 μg) a proto toto množství EDC bylo dále používáno.



Obr. 3.3: Závislost množství zachyceného BSA na aplikovaném množství EDC

3.4 Vliv vstupní koncentrace proteinu na efektivitu vazby na magnetické částice

Následně, byly provedeny experimenty s různými koncentracemi daného proteinu. Aplikovaná množství BSA byly 50 μg , 100 μg , 250 μg , 500 μg , 1000 μg . Byl použit MES pufr o pH 5,5, a množství EDC 10 mg na reakci. Opět byl proveden stejný postup podle kapitoly 3.2. Po změření absorbance v přístroji Infinite M200 Pro jsme získali 5 různých hodnot, z kterých jsme pomocí kalibrační křivky z kapitoly 3.1 byli schopní vypočítat množství proteinu, které se vázalo na MNPs. Z tabulky je vidět že největší procento zachyceného proteinu částicím bylo při množství proteinu 100 μg .



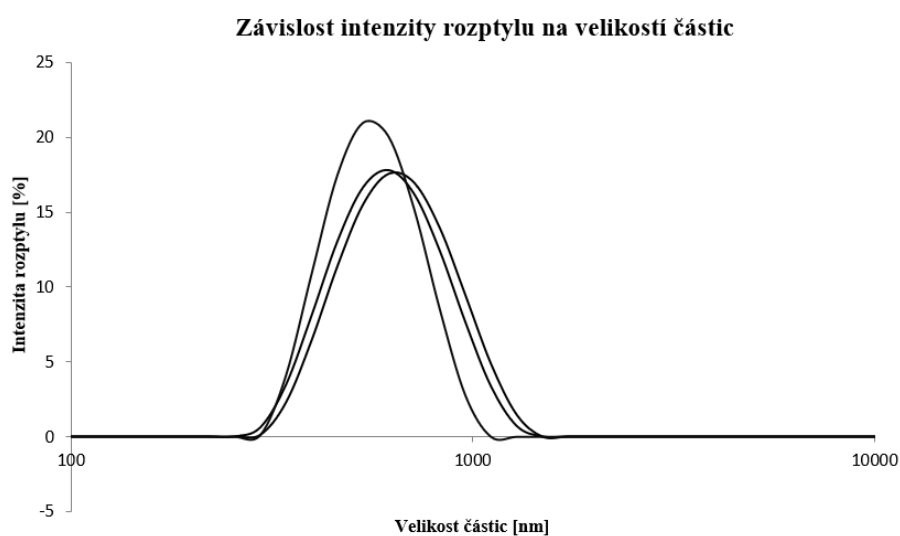
Obr. 3.4: Závislost účinnosti záchytu proteinu na množství vloženého proteinu

Tab. 3.1: Procentuální závislost zachycení proteinu na částice.

Množství aplikovaného BSA [μg]	Množství zachyceného BSA [μg]	Procento záchytu[%]
50	48,5	97,1
100	98,5	98,5
250	212,4	84,9
500	306,4	61,3
1000	549,7	54,9

3.5 Ověření velikostí magnetických částic

Si-MAG-Carboxyl nanočástice od firmy Chemicell byly měřeny v přístroji Zetasizer Nano od firmy Malvern. Přístroj měří velikost částic obsažených ve vzorku a prezentuje data podle potřeb uživatele. Částice byly smíchány s roztokem KCl o koncentraci 5 mmol/l. Měření bylo provedeno při teplotě 25 °C. Měření bylo provedeno třikrát. Jak je vidět na obrázku 3.5 průměrná velikost MNPs vyšla 640.9 nm s polydisperzním indexem 0,210. Polydisperzní index (PI) je bezrozměrná veličina, která měří distribuci částic podle velikostí. PI se může pohybovat od 0 do 1, zatímco hodnoty blíží se 1 naznačují, že distribuce částic je tak polydisperzní, že vzorek není vhodný pro měření.

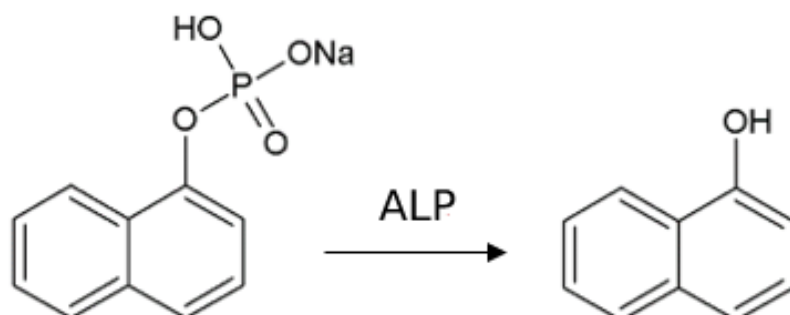


Obr. 3.5: Velikostní distribuce magnetických částic stanovená metodou dynamického rozptylu světla (DLS).

4 Detekce *H. pylori*

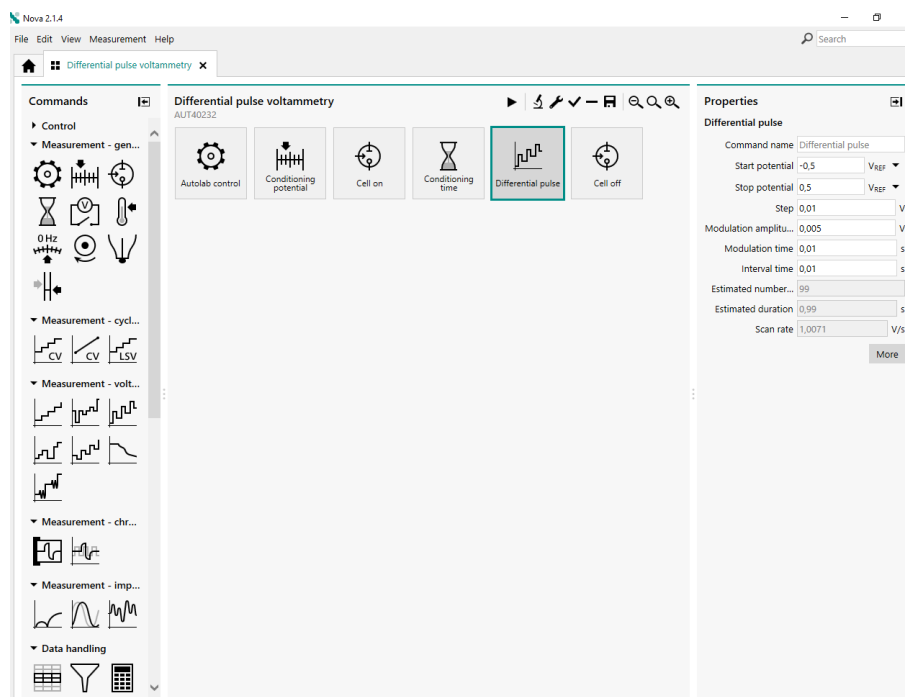
4.1 Optimalizace podmínek pro elektrochemickou detekci

Jak už bylo zmíněno v předchozích kapitolách, samotná detekce probíhá pomocí přímé ELISY (částice značena antigenem - protilátka značená enzymem - substrát - produkt), kde produkt je detekován elektrochemicky. To znamená, že výsledkem je elektrochemický signál, který nám naznačuje přítomnost měřeného analytu. Prvním krokem je modifikace částic antigenem HpaA, na který se specificky váže primární protilátka značená enzymem, který se substrátem produkuje detekovatelný produkt. Pro elektrochemické měření se používá protilátka značená enzymem alkalickou fosfatázou (ALP), která s 1-naftylfosfátem (1-NP) jako enzymatickým substrátem, reaguje za vzniku 1-naftolu (1-N) (enzymatického vedlejšího produktu). Tento produkt je následně elektrochemicky oxidován pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV).[41]

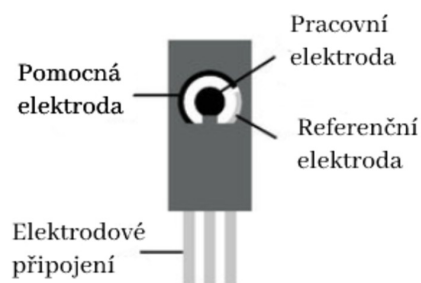


Obr. 4.1: Hydrolýza 1-NP alkalickou fosfatázou za vzniku 1-N [23]

K samotné detekci byl použit software Autolab NOVA 4.2, ve kterém nejdřív byly ponechány přednastavené parametry jako je amplituda, modulační čas a intervalový čas. Abychom mohli nastavit optimální parametry v softwaru NOVA, bylo potřeba měřit produkt elektrochemické reakce což je 1-naphtol za různých podmínek. Nejdřív byl připraven roztok naphtolu s diethanolaminovým (DEA) pufrem o pH 9,8 o koncentraci 250 μ M. Na elektrodu výrobce MicruX Technologies 4.3 bylo nanášeno 50 μ l daného roztoku a byla měřena jeho odezva diferenční pulzní voltametří.



Obr. 4.2: Uživatelské prostředí Autolab NOVA

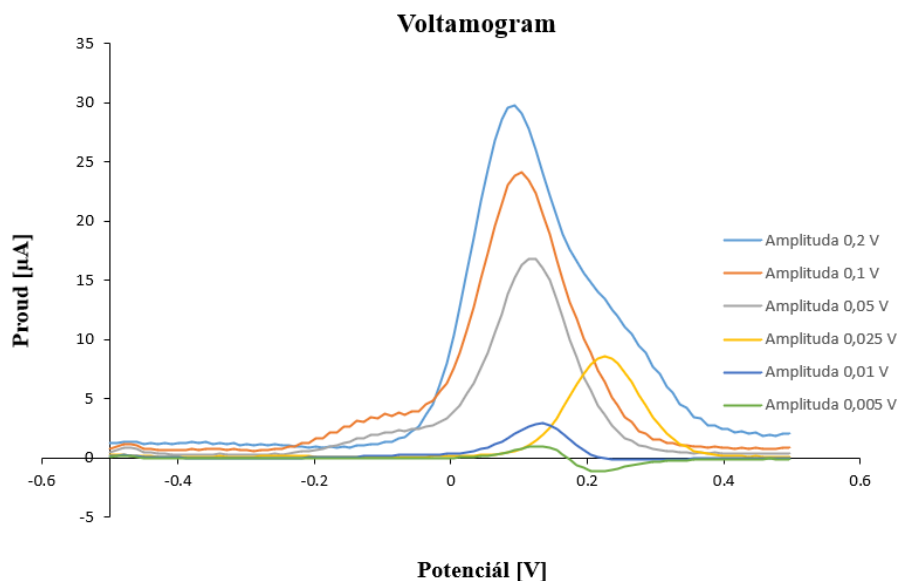


Obr. 4.3: Elektroda výrobce MicruX Technologies

Prvním parametrem, který byl optimalizován je modulační amplituda, kde byly použity hodnoty 0,2 V; 0,1 V; 0,05 V; 0,025 V; 0,01 V; 0,005 V.

Hodnoty modulačního času a časového intervalu byly nastaveny na 0,01 s. Jak je

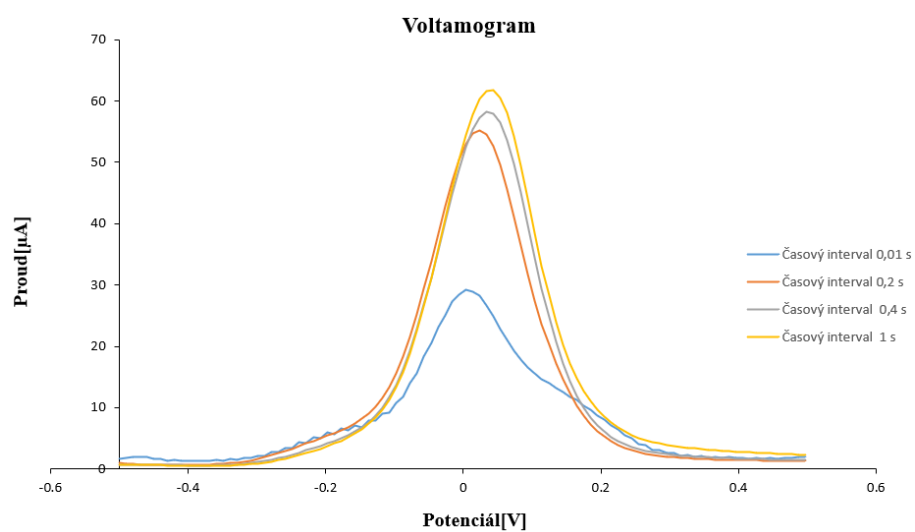
vidět na obrázku 4.4, největší odezva byla získána při amplitudě 0,2 V. Tato hodnota byla dále používána v následných měřeních.



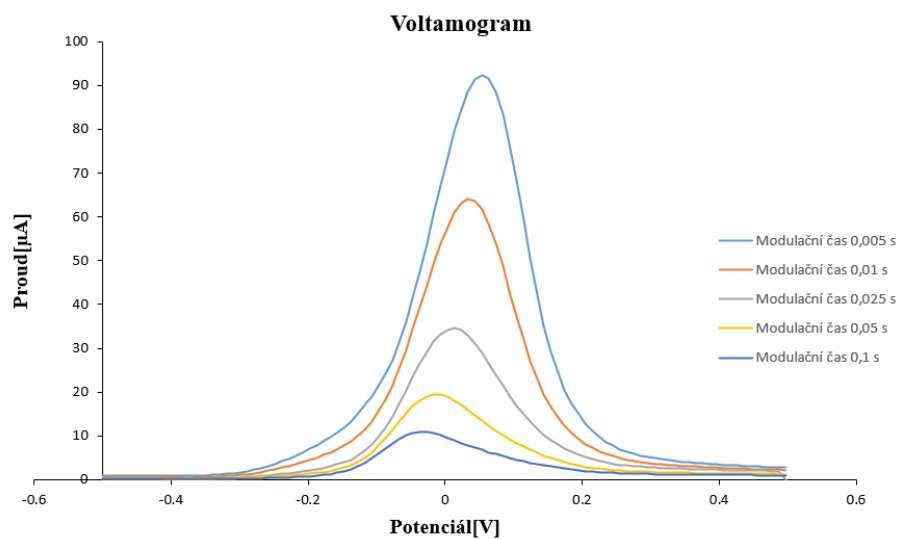
Obr. 4.4: Voltametrické záznamy 0,25 mM 1-naphtholu v DEA pufru (pH 9,8, 0,1 M) při nastavení různých modulačních amplitud (0,005 – 0,2 V) a časového intervalu 0,01 s a modulačního času 0,01 s.

Druhým parametrem, který byl optimalizován je časový interval, kde byly použité hodnoty 0,01 s; 0,2 s; 0,4 s; 1 s. Hodnota amplitudy byla nastavena na 0,2 V, zatímco hodnota modulačního času byla 0,01 s. Na obrázku 4.5 je vidět, že největší odezva byla při hodnotě časového intervalu 1 s. Proto tato hodnota byla používána v následujících experimentech.

Posledním parametrem byl modulační čas, kde byly použité hodnoty 0,005 s; 0,01 s; 0,025 s; 0,05 s; 0,1 s. Hodnota amplitudy byla nastavena na 0,2 V, zatímco hodnota časového intervalu byla 1 s. Na obrázku 4.6 je vidět, že největší odezva byla dosažena při hodnotě 0,005 s. Proto tato hodnota byla následně používána v dalších měřeních.



Obr. 4.5: Voltametrické záznamy 0,25 mM 1-naphtholu v DEA pufru (pH 9,8, 0,1 M) při nastavení různých časových intervalů (0,01 – 1 s) a modulační amplitudě 0,2 V a modulačním časem 0,01 s

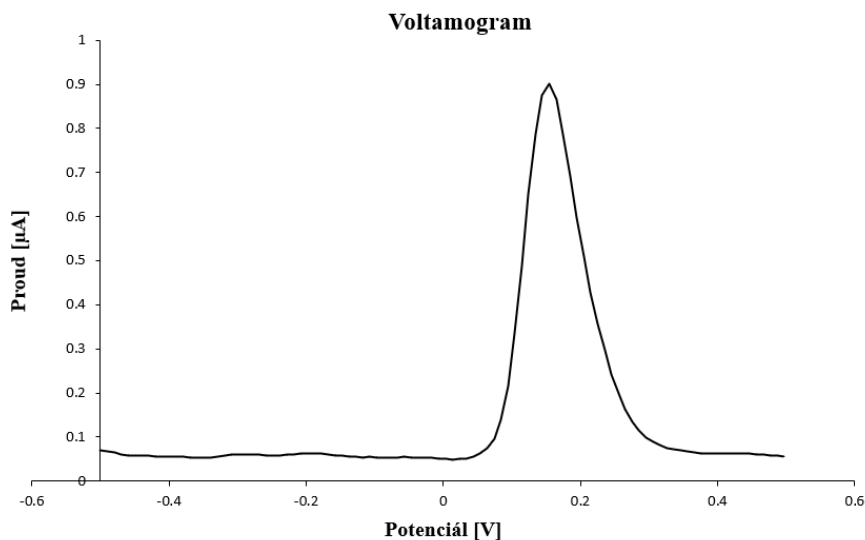


Obr. 4.6: Voltametrické záznamy 0,25 mM 1-naphtholu v DEA pufru (pH 9,8, 0,1 M) při nastavení různých modulačních časů (0,005 – 0,1 s) a modulační amplitudě 0,2 V a časovém intervalu 1 s

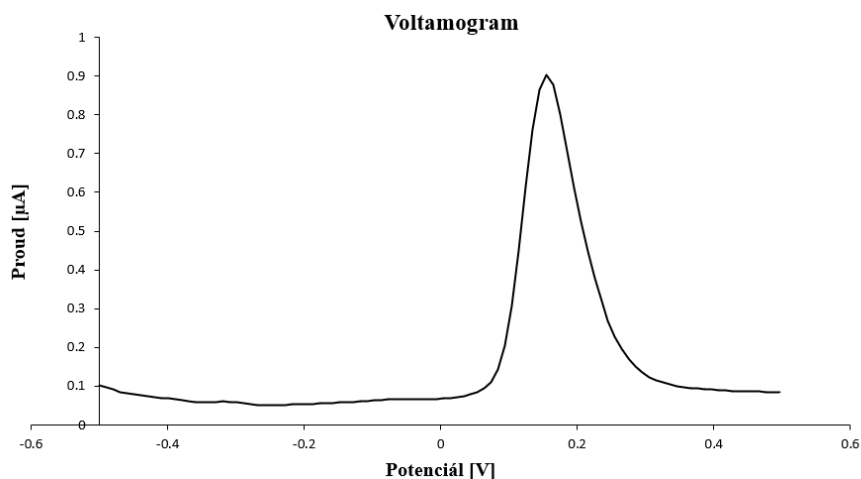
4.2 Elektrochemická detekce *H. pylori*

K samotné detekci musely být nejdříve na povrch MNPs imobilizován antigen (HpaA). Postup byl následující. 5 mg částic bylo promyto dvakrát v 1 ml MES pufru o pH 5,5. Následně bylo k částicím přidáno 0,25 ml MES pufru obsahující 10 mg EDC. Připravený vzorek byl nechán rotovat v přístroji Multi Bio RS-24 po dobu 10 minut. Po uplynutí doby byly částice promyty dvakrát v 1 ml MES pufru. Po promytí byly částice resuspendované v 0,25 ml MES pufru a do vzorku pak bylo přidáno 100 µg/250 µl antigenu HpaA. Vzorek byl nechán rotovat 2 hodiny. Po dvou hodinách částice byly promyty třikrát MES puforem a byly uchovány v 1 ml PBS (phosphate buffered saline) pufru obsahujícím 0,05% TWEEN a 1% BSA.

Tímto postupem byly získány částice modifikované antigenem. V dalším kroku, 50 µl modifikovaných částic bylo třikrát promyto 200 µl TRIS pufru. Promytí TRIS puforem je nezbytný krok, kvůli jeho specifickým vlastnostem. Aminoskupina tris (hydroxymethyl) aminomethan je schopna reagovat s karboxylovými skupinami magnetických částic aktivovaných pomocí EDC, na které se nenavázal antigen, a tak zabraňuje dalším nespecifickým reakcím. Po promytí TRIS puforem, bylo k částicím přidáno 50 µl séra (pozitivní, negativní vzorek a kontrola představovaná destilovanou vodou) s 50 µl PBS. Částice jsme nechali rotovat 60 minut. Po inkubaci, byly částice pětkrát promyty 200 µl PBS+TWEEN. K částicím bylo následně přidáno 50 µl konjugátu (protilátka + značená enzymem) a 50 µl PBS. Po inkubaci 1 hodinu, byly částice pětkrát promyty 200 µl PBS+TWEEN. K částicím pak bylo přidáno 200 µl substrátu (1-NP) rozpuštěného v DEA pufru v koncentraci 1mM. Po inkubaci 20 minut, vzorek byl připraven k měření. Nakonec byla provedena elektrochemická detekce a vyhodnocení získaných dat.



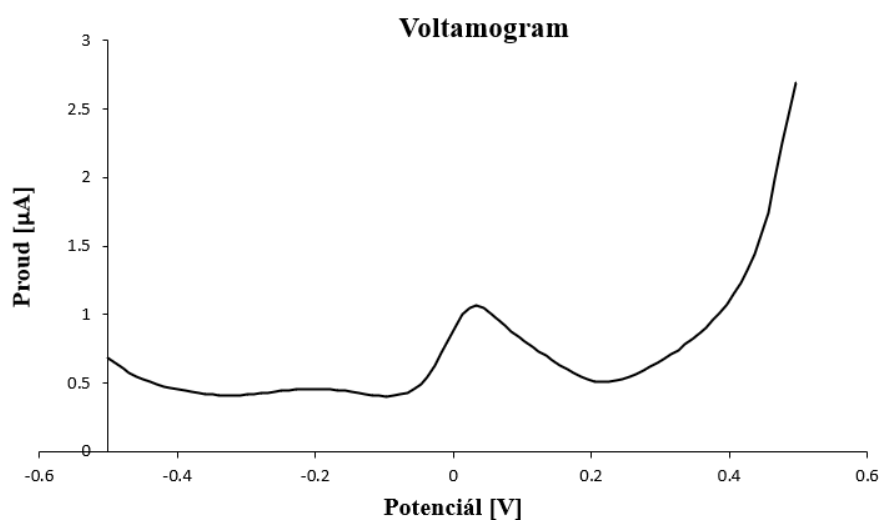
Obr. 4.7: Ukázka elektrochemické odezvy metody na pozitivní vzorek séra



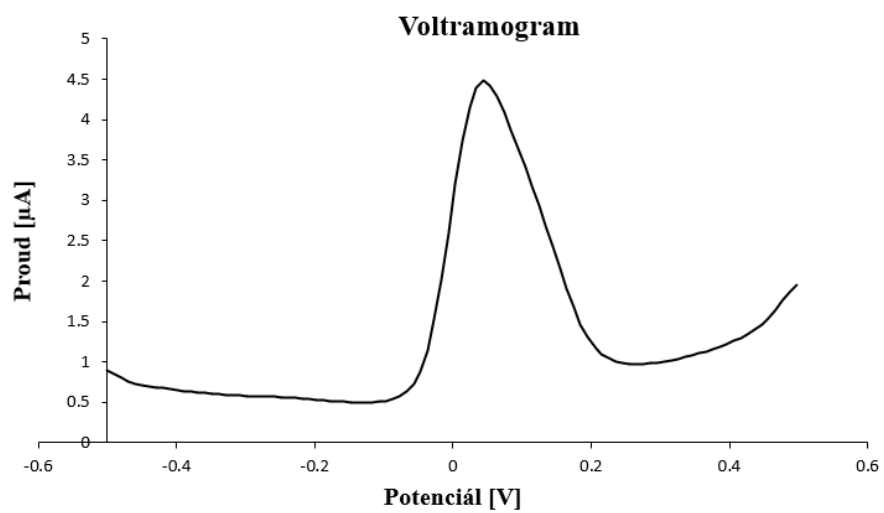
Obr. 4.8: Ukázka elektrochemické odezvy metody na negativní vzorek séra

Z obrázků 4.7 a 4.8 je vidět, že signál je téměř shodný u obou vzorků, což nám naznačuje, že použitý postup elektrochemického stanovení HpaA není vhodný. Silná odezva byla detekována u negativního vzorku, což by znamenalo, že máme falešně pozitivní výsledek. Jedním z důvodů by mohl být ten, že magnetické částice SiMAG Carboxyl jsou samovolně schopny katalyzovat přeměnu 1-NP na 1-N. To bylo ověřeno následujícím způsobem. Do jedné mikrozkušavky bylo přidáno 5 μl antigenem nemodifikovaných částic o koncentraci 50 mg/ml se 100 μl 1mM substrátu a 0.5 μl vody. Do další mikrozkušavky bylo přidáno k stejné koncentraci částic 100 μl 1 mM substrátu s 0.5 μl produktu (1-naftolu). Do třetí mikrozkušavky bylo

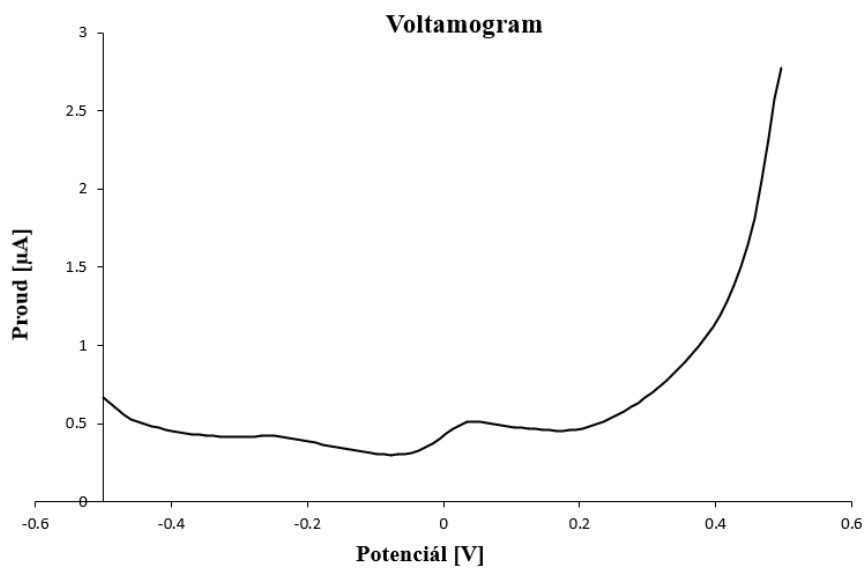
přidáno pouze 100 μl 1mM substrátu. Po inkubaci vzorku s částicemi po dobu 10 minut byly částice odebrány a eluát elektrochemický analyzován na elektrodě. Z obrázku 4.9 je vidět odezvu u prvního vzorku a ikdyž by v něm neměl být přítomen 1-N, je zde viditelný oxidační pík při potenciálu +0.044 V, který odpovídá 1-N 4.10. Tento pík je navíc oproti kontrolnímu vzorku výrazně vyšší. To by mohlo vysvětlovat odezvu u našeho negativního vzorku resp. falešně pozitivní výsledek, který pravděpodobně byl způsoben samotným typem částic, které můžou v sobě obsahovat různé modifikátory, známé pouze výrobcí, kvůli kterým metoda nebude fungovat pro elektrochemickou detekci. Řešením je metodu zopakovat a přítomnost produktu enzymatického štěpení měřit spektrofotometricky.



Obr. 4.9: Ukázka odezvy optimalizované DPV na vzorek substrátu a vody



Obr. 4.10: Ukázka odezvy optimalizované DPV na vzorek substrátu a produktu

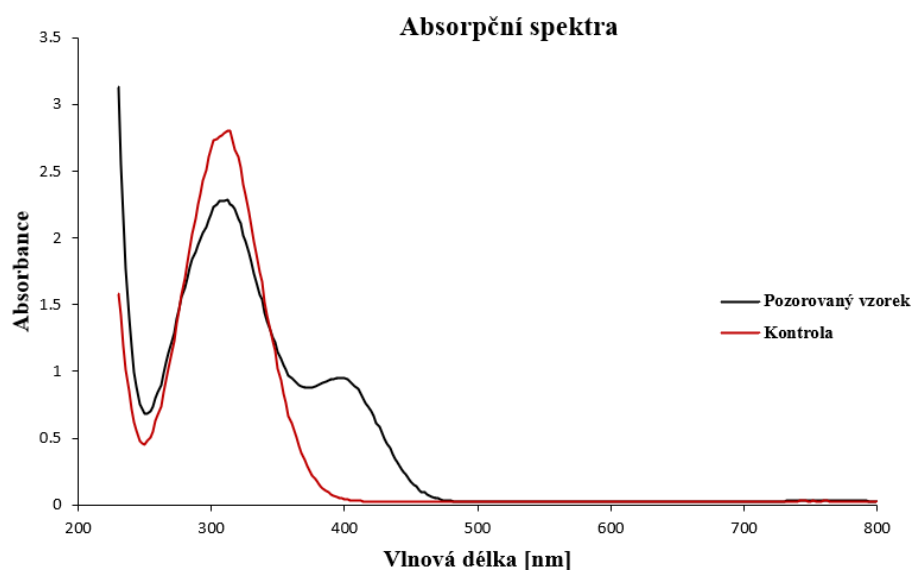


Obr. 4.11: Ukázka odezvy optimalizované DPV na vzorek substrátu

4.3 Optimalizace podmínek pro spektrofotometrickou detekci

Pro spektrofotometrické měření na rozdíl od elektrochemického měření, kde jako substrát byl použit 1-NP, tady jako substrát použijeme p-nitrofenylfosfát (p-NPP). P-NPP po ztrátě fosfátové skupiny katalyzované alkalickou fosfatázou za alkalických podmínek vytvoří žlutý produkt p4-nitrophenol (p-NP), který jsme schopni fotometricky detekovat. [42] Prvním krokem bude stanovit vlnovou délku absorpčního maxima p-NP. Obvykle se tato hodnota pohybuje od 390 nm do 410 nm, my avšak chceme stanovit přesnou hodnotu.

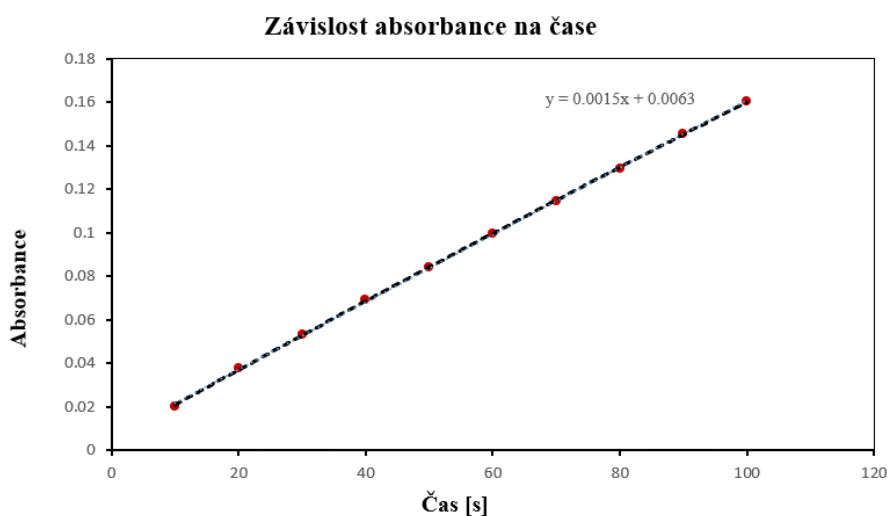
Vzorek, který byl měřen, obsahoval 100 μ l 100 mM substrátu p-NPP, 90 μ l DEA pufru a 10 μ l 900x naředěného konjugátu protilátky a ALP. Byl navíc připraven kontrolní vzorek, kde místo konjugátu byla přidána voda. Vzorky byly změřeny v spektrofotometru Infinite 200 PRO v mikrotitrační destičce CORNING při vlnové délce v rozsahu od 230 nm do 800 nm. Z výsledného obrázku 4.12 lze pozorovat, že největší odezva je při vlnové délce 396 nm, a proto tuto vlnovou délku budeme používat pro hodnocení přítomnosti analytu ve vzorku. U kontrolního vzorku, odezvu mezi vlnovou délkou 390 nm až 410 nm nemáme.



Obr. 4.12: Ukázka odezvy vzorku při různých vlnových délkách

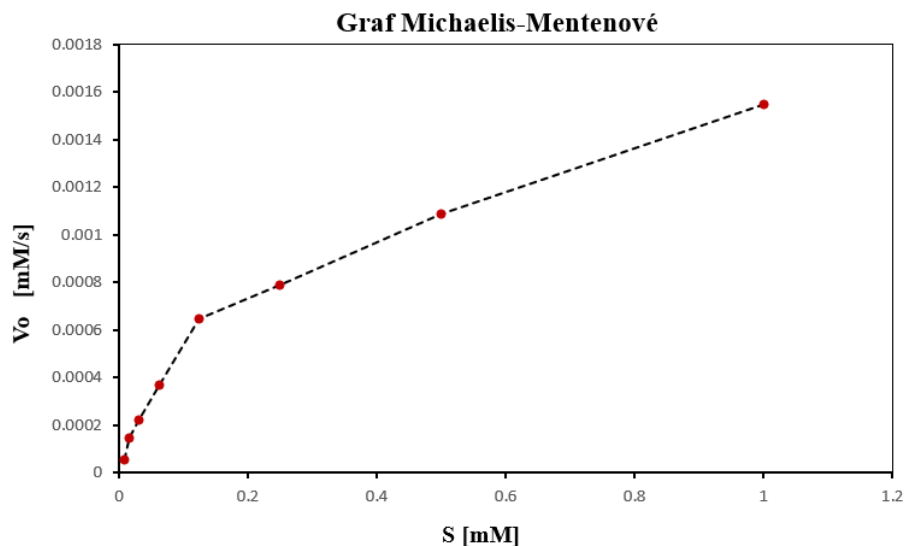
Jak už bylo zmíněno, konkrétní reakcí, kterou budeme zkoumat, je odstranění fosfátu z molekuly p-NPP. Toto není přirozený substrát pro enzym, ale má vlastnosti, díky kterým je pro nás obzvláště užitečný. Enzym odstraní fosfát a vytváří volný fosfát a p-NP. Zatímco substrát, p-NPP, je bezbarvý, produkt p-NP je žlutý,

takže můžeme sledovat průběh reakce měřením tvorby žluté barvy. [43] P-NP, jak bylo zjištěno, má absorpční maximum při 396 nm, takže můžeme sledovat rychlost reakce sledováním zvýšení absorpce při 396 nm pomocí spektrofotometru. Aktivitu alkalické fosfatázy lze testovat přidáním 100 μ l 100mM substrátu a 10 μ l konjugátu ředěného 900x do 90 μ l DEA pufru. Měřením absorbance při 396 nm získáme graf závislosti absorbance na čase, který bude ukazovat průběh vytvoření p-NP v čase. Na obrázku 4.13 je vidět, že absorbance se zvyšuje lineárně, jak se tvoří stále více p-NP. Absorbance se však může nakonec přiblížit plató fázi, protože se reakce zpomaluje a tvoří se méně produktu.



Obr. 4.13: Závislost absorbance na čase

Počáteční lineární rychlost tvorby produktu se nazývá počáteční rychlost nebo V_0 . Hodnota V_0 , odpovídá hodnotě u x-osy rovnice trendu tj. hodnotě 0,0015. Je to jedna z nejdůležitějších charakteristik jakékoli enzymaticky katalyzované reakce. Jedním z faktorů, který ovlivňuje V_0 , je koncentrace substrátu. Pokud vyneseme do grafu závislost V_0 na koncentraci substrátu, dostaneme následující křivku 4.14, nazývanou křivka Michaelis-Mentenové.

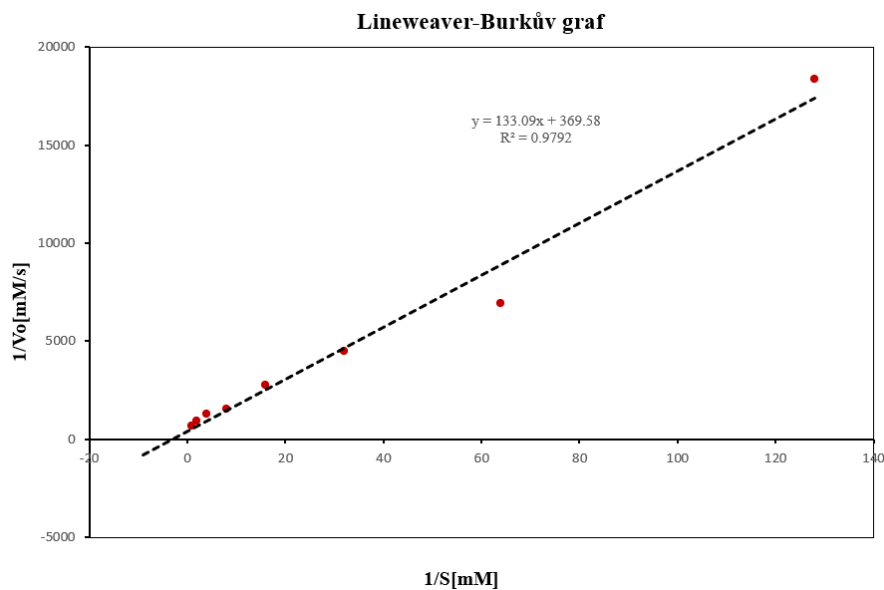


Obr. 4.14: Křivka Michaelis-Mentenové

Tato křivka popisuje vztah mezi enzymem při konstantní koncentraci a koncentrací substrátu [S]. Jak se koncentrace substrátu zvyšuje, V_o nakonec se stává na ní nezávislým. Rychlost, při které k tomu dochází, se nazývá V_{max} a je to nejrychlejší, jakou může dané množství enzymu operovat. Koncentraci substrátu, které odpovídá $1/2 V_{max}$, je dalším důležitým kinetickým parametrem zvaným Michaelis-Mentenova konstanta, označená K_m . K_m je důležitá v tom, že označuje koncentraci substrátu, při které je enzym nejúčinnější při změně rychlosti reakce.

Abychom co nejjednodušším způsobem získali tyto dva parametry, byl sestaven reciproční graf ($1/V_o$ a $1/[S]$) grafu předchozímu, který nazýváme Lineweaver-Burkeův graf 4.15. Ze vztahu 4.1 a z rovnice trendu grafu 4.15, kde K_m/V_{max} odpovídá hodnotě 133,09 a $1/V_{max}$ odpovídá hodnotě 369,58. Z rovnice trendu jsme schopni vypočítat hodnoty K_m a V_{max} . Hodnota K_m vyšla 0,36 mM zatím co hodnota V_{max} vyšla 0,0027 mM/s což odpovídá optimálním hodnotám.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} \times [S]} \quad (4.1)$$



Obr. 4.15: Lineweaver-Burkův graf

Ještě jedním parametrem, který umožňuje porovnávat výsledky je koncentrace [c], která umožňuje vyjádřit rychlost ve smyslu skutečného množství p-NP vytvořeného za jednotku času. Výsledek může být uveden v milimolech za minutu (mM/min) nebo mikromolech za minutu ($\mu\text{M}/\text{min}$). Ze vzorce 4.2 byla vypočtena výsledná koncentrace $c = 0,000149 \text{ mM}/\text{min}$ tj. $0,149 \mu\text{M}/\text{min}$.

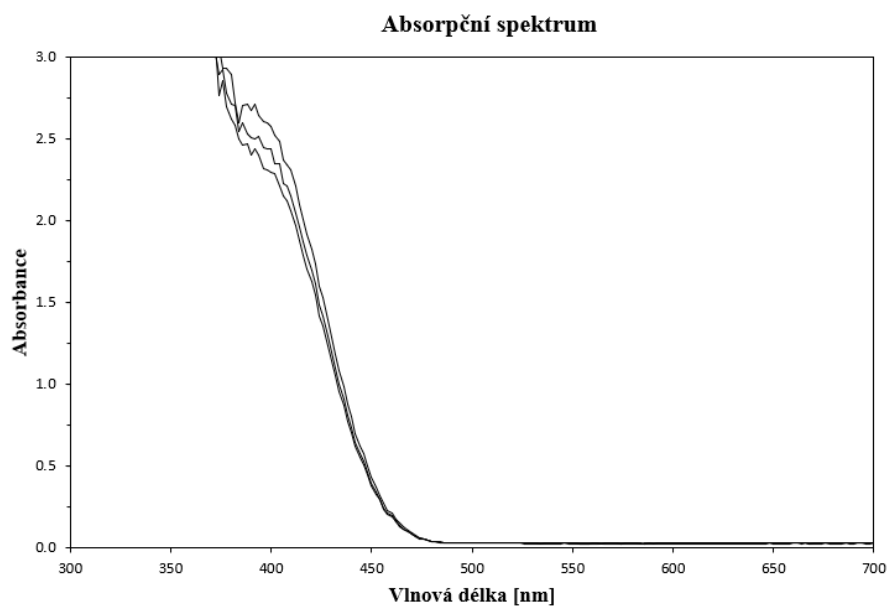
$$c = \frac{A}{\varepsilon \times l} \quad (4.2)$$

A je absorbance měřená při 396 nm, l je délka optické dráhy (0,56 cm pro naši destičku při objemu jamky 200 μl), koeficient ε pro p-NP při 396 nm je $18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

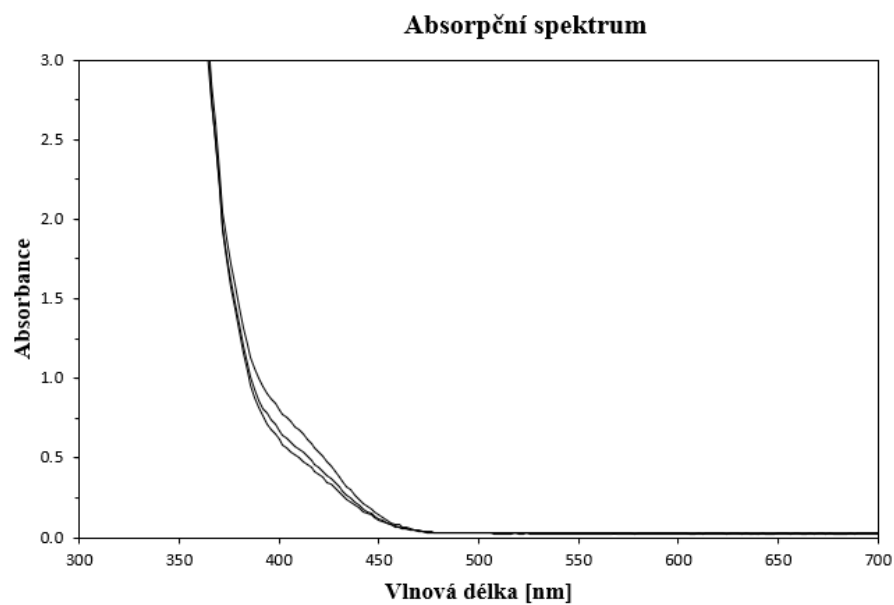
My ale chceme celkové množství vytvořeného produktu, ne jeho koncentraci. Násobením výsledné koncentrace 0,2 ml (objem naší směsi) dostaneme množství vytvořeného produktu: $0,149 \mu\text{M}/\text{min} \times 0,2 \text{ ml} = 0,029 \text{ nm}/\text{min}$. To je množství p-NP, které bylo zodpovědné za žlutou barvu a představuje, kolik p-NP bylo vytvořeno enzymem za jednu minutu.

4.4 Spektrofotometrická detekce *H. pylori*

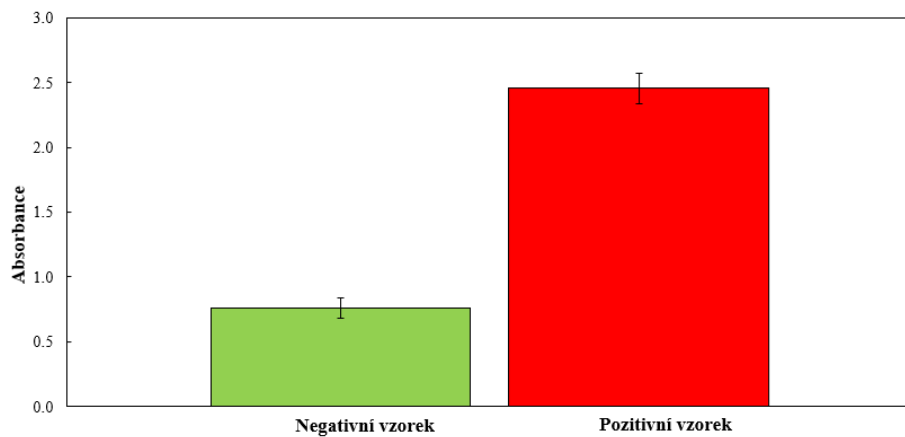
Po optimalizaci podmínek, jsme byly schopni provést detekci našeho analytu ve vzorku za použití jak pozitivního, tak negativního séra. Všechny vzorky byly měřeny třikrát. Proces přípravy vzorku probíhal následovně. 50 μ l částic modifikovaných antigenem o koncentraci 5 mg/ml bylo promyty s 200 μ l TRIS pufru. Po promytí, bylo k částicím přidáno 100 μ l séra (pozitivní a negativní vzorek) a 100 μ l PBS. Částice jsme nechali inkubovat 30 minut. Po inkubaci, byl supernatant odstraněn a k částicím bylo přidáno 100 μ l konjugátu ředěného 1:1000. Částice byly znova inkubované 30 minut. Po inkubaci, byly částice promyty čtyřikrát 200 μ l PBS+0,05%TWEEN. K částicím pak bylo přidáno 200 μ l substrátu rozpuštěného v DEA pufru v koncentraci 1mg/ml. Po inkubaci 20 minut, a odstranění magnetických částic ze vzorku pomocí externího magnetického pole (magnetu), byl vzorek připraven k spektrofotometrickému měření. Z graficky zobrazených výsledků, je vidět že odezva v druhém grafu 4.17 při 396nm je velmi malá vzhledem k odezvě v prvním grafu 4.16, což odpovídá skutečnosti. Odezva na pozitivní vzorek je opticky výraznější než odezva na negativní vzorek.



Obr. 4.16: Odezva na pozitivní vzorek



Obr. 4.17: Odezva na negativní vzorek



Obr. 4.18: Sloupcový graf porovnání průměru hodnot odezvy pozitivního a negativního vzorku

Závěr

Tato práce byla zaměřena na literární analýzu v oblasti detekce a separace pomocí magnetických částic a senzorů, jejich vývoji v posledních letech a využití v oblasti elektrochemické detekce patogenů. Pro získání vhodných analytických parametrů a co nejlepších výsledků byla provedena optimalizace podmínek při imobilizaci proteinů na povrch magnetických částic. Mezi nejdůležitější parametry patří pH. Podle našich výsledků je nejvhodnější pH 5,5. Dále množství aplikovaného EDC, kdy výsledné optimální množství je 10 mg, a množství aplikovaného proteinu které podle výsledků největší procento zachytu je při použití 100 mg proteinu. Velikost částic vyšla 640.9 nm, nicméně výrobce SiMAG-Carboxyl nanočástic uvádí jejich velikost 1000 nm. Dalším cílem bylo provést imobilizaci antigenu HpaA bakterie *H. pylori* povrch MNPs a pomocí elektrochemické detekce detekovat protilátky proti HpaA. Pro elektrochemické měření byly použity elektrody připojené k softwaru NOVA, ve kterém bylo nutné nejdříve zoptimalizovat podmínky parametrů DPV. Po elektrochemickém měření bylo stanoveno, že odezva jak na pozitivní, tak i na negativní vzorek je podobná. Z obdržných výsledků jsem usoudila, že některá ze složek použitých MNPs SiMAG Carboxyl interferuje s elektrochemickým stanovením 1-N, což neumožňuje elektrochemické stanovení samotného HpaA. Proto byla detekce HpaA převedena do fotometrického formátu. Nejdříve byly zoptimalizovaný parametry pro spektrofotometrickou detekci a byla provedena detekce na spektrofotometru, kde odezva odpovídala očekávaným výsledkům.

Literatura

- [1] CAMPUZANO, Susana, María PEDRERO, Paloma YÁÑEZ-SEDEÑO a José M. PINGARR-N. New challenges in point of care electrochemical detection of clinical biomarkers. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2021, **345** [cit. 2021-12-06]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2021.130349
- [2] HANSEN, Sören a Ahmed ABD EL WAHED. Point-Of-Care or Point-Of-Need Diagnostic Tests: Time to Change Outbreak Investigation and Pathogen Detection. *Tropical Medicine and Infectious Disease* [online]. 2020, **5**(4) [cit. 2021-12-06]. ISSN 2414-6366. Dostupné z: doi:10.3390/tropicalmed5040151
- [3] NGUYEN, Trieu, Vinayaka Aaydha CHIDAMBARA, Sune Zoëga ANDREASEN, Mohsen GOLABI, Van Ngoc HUYNH, Quyen Than LINH, Dang Duong BANG a Anders WOLFF. Point-of-care devices for pathogen detections: The three most important factors to realise towards commercialization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **131** [cit. 2021-12-06]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2020.116004
- [4] YANG, Jinchuan, Kan WANG, Hao XU, Wenqiang YAN, Qinghui JIN a Daxiang CUI. Detection platforms for point-of-care testing based on colorimetric, luminescent and magnetic assays: A review. *Talanta* [online]. 2019, **202**, 96-110 [cit. 2021-12-06]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.04.054
- [5] VAN REENEN, Alexander, Arthur M. DE JONG, Jaap M. J. DEN TONDER a Menno W. J. PRINS. Integrated lab-on-chip biosensing systems based on magnetic particle actuation — a comprehensive review. *Lab Chip* [online]. 2014, **14**(12), 1966-1986 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C3LC51454D
- [6] LUPPA, Peter B., Carolin MÜLLER, Alice SCHLICHTIGER a Harald SCHLEBUSCH. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, **30**(6), 887-898 [cit. 2021-12-06]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2011.01.019
- [7] DA-SILVA, Everson T. S. G., Dênio E. P. SOUTO, José T. C. BARRAGAN, Juliana DE-F.-GIAROLA, Ana C. M. DE-MORAES a Lauro T. KUBOTA. Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem* [online]. 2017, **4**(4), 778-794 [cit. 2021-12-06]. ISSN 21960216. Dostupné z: doi:10.1002/celec.201600758

- [8] SRINIVASAN, Balaji a Steve TUNG. Development and Applications of Portable Biosensors. *Journal of Laboratory Automation* [online]. 2015, **20**(4), 365-389 [cit. 2022-01-04]. ISSN 2211-0682. Dostupné z: doi:10.1177/2211068215581349
- [9] HSING, I-Ming, Ying XU a Wenting ZHAO. Micro- and Nano- Magnetic Particles for Applications in Biosensing. *Electroanalysis* [online]. 2007, **19**(7-8), 755-768 [cit. 2021-12-06]. ISSN 10400397. Dostupné z: doi:10.1002/elan.200603785
- [10] WANG, Joseph. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2006, **21**(10), 1887-1892 [cit. 2021-12-06]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2005.10.027
- [11] HASANZADEH, Mohammad, Nasrin SHADJOU a Miguel DE LA GUARDIA. Iron and iron-oxide magnetic nanoparticles as signal-amplification elements in electrochemical biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **72**, 1-9 [cit. 2021-12-06]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.03.016
- [12] WANG, Xu, Feng LI a Yirong GUO. Recent Trends in Nanomaterial-Based Biosensors for Point-of-Care Testing. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2020, **8** [cit. 2021-12-06]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2020.586702
- [13] RAJEEV, Gayathri, Allison J. COWIN, Nicolas H. VOELCKER a Beatriz PRIETO SIMON. Magnetic Nanoparticles Enhance Pore Blockage-Based Electrochemical Detection of a Wound Biomarker. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2019, **7** [cit. 2021-12-06]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00438
- [14] LUO, Xiliang, Aoife MORRIN, Anthony-J. KILLARD a Malcolm-R. SMYTH. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis* [online]. 2006, **18**(4), 319-326 [cit. 2021-12-06]. ISSN 1040-0397. Dostupné z: doi:10.1002/elan.200503415
- [15] MOLLARASOULI, Fariba, Erhan ZOR, Goksu OZCELIKAY a Sibel A. OZKAN. Magnetic nanoparticles in developing electrochemical sensors for pharmaceutical and biomedical applications. *Talanta* [online]. 2021, **226** [cit. 2021-12-06]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122108
- [16] ROCHA-SANTOS, Teresa A.P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **62**, 28-36 [cit. 2021-12-06]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.06.016
- [17] DENMARK, Daniel J., Xiomar BUSTOS-PEREZ, Anand SWAIN, Manh-Huong PHAN, Subhra MOHAPATRA a Shyam S. MOHAPATRA. Readiness

- of Magnetic Nanobiosensors for Point-of-Care Commercialization. *Journal of Electronic Materials* [online]. 2019, **48**(8), 4749-4761 [cit. 2021-12-06]. ISSN 0361-5235. Dostupné z: doi:10.1007/s11664-019-07275-7
- [18] SALAZAR, Alberto, Henry VELÁZQUEZ-SOTO, Julio AYALA-BALBOA a María C. JIMÉNEZ-MARTÍNEZ. Allergen-Based Diagnostic: Novel and Old Methodologies with New Approaches. ATHARI, Seyyed Shamsadin, ed. *Allergen* [online]. InTech, 2017, 2017-10-04 [cit. 2022-05-22]. ISBN 978-953-51-3567-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.69276
- [19] WANG, Zhuangzhuang, Hongying WANG, Xiaohong CHENG, et al. Aptamer-superparamagnetic nanoparticles capture coupling siderophore-Fe³⁺ scavenging actuated with carbon dots to confer an “off-on” mechanism for the ultrasensitive detection of *Helicobacter pylori*. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, **193** [cit. 2021-12-10]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2021.113551
- [20] SAXENA, Kirti, Nidhi CHAUHAN a Utkarsh JAIN. Advances in diagnosis of *Helicobacter pylori* through biosensors: Point of care devices. *Analytical Biochemistry* [online]. 2021, **630** [cit. 2021-12-10]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2021.114325
- [21] ZHANG, Junwang, Meixia WANG, Ying SHI, Qi WANG a Wubo ZHAO. Rapid detection of *Helicobacter pylori* using cytotoxin-associated gene A based on loop-mediated isothermal amplification assay and magnetic nanoparticles. *Materials Express* [online]. 2020, **10**(2), 283-289 [cit. 2021-12-10]. ISSN 2158-5849. Dostupné z: doi:10.1166/mex.2020.1629
- [22] WANG, Tzu-Hsien a Wen-Chien LEE. Immobilization of proteins on magnetic nanoparticles. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. 2003, **8**(4), 263-267 [cit. 2021-12-10]. ISSN 1226-8372. Dostupné z: doi:10.1007/BF02942276
- [23] O’HARA, Tony, Brian SEDDON, Siobhán MCCLEAN a Eithne DEMPSEY. TOXOR: Design and Application of an Electrochemical Toxicity Biosensor for Environmental Monitoring. *Electroanalysis* [online]. 2015, **27**(1), 58-66 [cit. 2022-05-22]. ISSN 10400397. Dostupné z: doi:10.1002/elan.201400433
- [24] KUDR, Jiri, Borivoj KLEJDUS, Vojtech ADAM a Ondrej ZITKA. Magnetic solids in electrochemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **98**, 104-113 [cit. 2021-12-06]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2017.10.023

- [25] PASHCHENKO, Oleksandra, Tyler SHELBY, Tuhina BANERJEE a Santimukul SANTRA. A Comparison of Optical, Electrochemical, Magnetic, and Colorimetric Point-of-Care Biosensors for Infectious Disease Diagnosis. *ACS Infectious Diseases* [online]. 2018, **4**(8), 1162-1178 [cit. 2021-12-06]. ISSN 2373-8227. Dostupné z: doi:10.1021/acsinfecdis.8b00023
- [26] SCHRITTWIESER, Stefan, Beatriz PELAZ, Wolfgang PARAK, et al. Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels. *Sensors* [online]. 2016, **16**(6) [cit. 2021-12-06]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16060828
- [27] XIANYU, Yunlei, Qiaoling WANG a Yiping CHEN. Magnetic particles-enabled biosensors for point-of-care testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **106**(1), 213-224 [cit. 2021-12-03]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.07.010
- [28] HERRASTI, Zorione, Erica de la SERNA, Gisela RUIZ-VEGA a Eva BALDRICH. Developing enhanced magnetoimmunosensors based on low-cost screen-printed electrode devices. *Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **35**(2), 53-85 [cit. 2021-12-06]. ISSN 2191-0189. Dostupné z: doi:10.1515/revac-2016-0004
- [29] CAO, Bo, Kan WANG, Hao XU, Qi QIN, Jinchuan YANG, Wei ZHENG, Qinghui JIN a Daxiang CUI. Development of magnetic sensor technologies for point-of-care testing: Fundamentals, methodologies and applications. *Sensors and Actuators A: Physical* [online]. 2020, **312** [cit. 2021-12-06]. ISSN 09244247. Dostupné z: doi:10.1016/j.sna.2020.112130
- [30] KUDR, Jiri, Petr MICHALEK, Lada ILIEVA, Vojtech ADAM a Ondrej ZITKA. COVID-19: A challenge for electrochemical biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2021, **136** [cit. 2021-12-06]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2021.116192
- [31] KUDR, Jiri, Yazan HADDAD, Lukas RICHTER, Zbynek HEGER, Mirko CERNAK, Vojtech ADAM a Ondrej ZITKA. Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials* [online]. 2017, **7**(9) [cit. 2021-12-06]. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano7090243
- [32] ZHU, Chengzhou, Guohai YANG, He LI, Dan DU a Yuehe LIN. Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, **87**(1), 230-249 [cit. 2021-12-06]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac5039863

- [33] HAUN, Jered B., Tae-Jong YOON, Hakho LEE a Ralph WEISSLEDER. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* [online]. 2010, **2**(3), 291-304 [cit. 2021-12-06]. ISSN 19395116. Dostupné z: doi:10.1002/wnan.84
- [34] SCHRITTWIESER, Stefan, Beatriz PELAZ, Wolfgang PARAK, et al. Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels. *Sensors* [online]. 2016, **16**(6) [cit. 2021-12-06]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16060828
- [35] CHIRCOV, Cristina, Alexandru Mihai GRUMEZESCU a Alina Maria HOLBAN. Magnetic Particles for Advanced Molecular Diagnosis. *Materials* [online]. 2019, **12**(13) [cit. 2021-12-06]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12132158
- [36] OMIDFAR, Kobra, Anita AHMADI, Leila SYEDMORADI, Seyyed Mehdi KHOSHFETRAT a Bagher LARIJANI. Point-of-care biosensors in medicine: a brief overview of our achievements in this field based on the conducted research in EMRI (endocrinology and metabolism research Institute of Tehran University of medical sciences) over the past fourteen years. *Journal of Diabetes Metabolic Disorders* [online]. [cit. 2021-12-06]. ISSN 2251-6581. Dostupné z: doi:10.1007/s40200-020-00668-0
- [37] SYEDMORADI, Leila, Maryam DANESHPOUR, Mehrdad ALVANDIPOUR, Frank A. GOMEZ, Hassan HAJGHASSEM a Kobra OMIDFAR. Point of care testing: The impact of nanotechnology. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, **87**, 373-387 [cit. 2021-12-06]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2016.08.084
- [38] STEGE, Patricia W., Julio RABA a Germán A. MESSINA. Online immunoaffinity assay-CE using magnetic nanobeads for the determination of anti-Helicobacter pylori IgG in human serum. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2010, **31**(20), 3475-3481 [cit. 2021-12-10]. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201000123
- [39] ALELJUNG, Pär, Hans-Olof NILSSON, Xin WANG, Patrik NYBERG, Torsten MÖRNER, Ibrahim WARSAME a Torkel WADSTRÖM. Gastrointestinal colonisation of BALB/cA mice by Helicobacter pylori monitored by heparin magnetic separation. *FEMS Immunology Medical Microbiology* [online]. 1996, **13**(4), 303-309 [cit. 2021-12-10]. ISSN 0928-8244. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-695X.1996.tb00255.x

- [40] LI, Yunjie, Xiaoxiao HU, Ding DING, et al. In situ targeted MRI detection of *Helicobacter pylori* with stable magnetic graphitic nanocapsules. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**(1) [cit. 2021-12-10]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms15653
- [41] FABIANI, Laura, Marco SAROGLIA, Giuseppe GALATI, et al. Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, **171** [cit. 2022-05-05]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2020.112686
- [42] *Accurate Results in the Clinical Laboratory* [online]. Elsevier, 2019 [cit. 2022-05-05]. ISBN 9780128137765. Dostupné z: doi:10.1016/C2016-0-04205-5
- [43] SAKHAROV, Ivan Yu., Irene E. MAKAROVA a Gennadiy A. ERMOLIN. Purification and characterization of intestinal alkaline phosphatase from harp seal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* [online]. 1988, **90**(4), 709-714 [cit. 2022-05-11]. ISSN 03050491. Dostupné z: doi:10.1016/0305-0491(88)90324-0

Seznam symbolů a zkratek

DNA	Deoxyribonukleová kyselina – Deoxyribonucleic acid
EDC	Ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid – 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
MES	Kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MNPs	Magnetické nanočástice – Magnetic nanoparticles
MPs	Magnetické částice – Magnetic particles
PCR	Polymerázová řetězová reakce – Polymerase chain reaction
PI	Polydisperzní index – Polydispersity index
DEA	Diethanolamin – Diethanolamine
p-NP	P4-nitrophenol – 4-nitrophenol
p-NPP	P-nitrofenylfosfát – P-nitrophenyl phosphate
1-N	1-naftol – 1-naphtol
PBS	Fosfátový pufr – Phosphate buffered saline
ELISA	Enzymatická imunoanalýza – Enzyme-linked immuno sorbent assay
HpaA	<i>Helicobacter pylori</i> adhesin A – <i>Helicobacter pylori</i> adhesin A
WHO	Světová zdravotnická organizace – World Health Organization
BSA	Hovězí sérový albumin – Bovine Serum Albumin
PONT	Point-of-need testy – Point-of-need tests
POC	Point-of-care – Point-of-care
POCT	Point-of-care testy – Point-of-care tests