

## Multiplexní analýza s využitím proteinových čipů

Vašatová M., Tichý M., Vávrová J.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Karlovy univerzity a Fakultní nemocnice, Hradec Králové

### SOUHRN

Sdělení podává informace o novém přístupu k biochemickým analýzám. Dále shrnuje principy, použití, možné výhody či nevýhody nových multiplexních technologií. Většina prezentovaných metod je v současné době buď ve fázi vývoje, nebo je již používána v rámci výzkumných projektů. Pouze některé technologie postupně pronikají do laboratoří klinické biochemie.

*Klíčová slova:* biočip, multiplexní analýza, protein, imunochemie.

### SUMMARY

**Vašatová M., Tichý M., Vávrová J.: Multiplex analysis with use of protein chips**

The publication reports recent approach to biochemical analyses. There are summarized data about principles, usages, advantages or disadvantages of new multiplex technologies. Although, in the meantime, the most of presented methods are in development or they are used in research projects some technologies already expand to clinical biochemistry laboratories.

*Key words:* biochip, multiplex analysis, protein, immunochemistry.

## Úvod

V posledních letech se použití biočipové technologie rozšiřuje z oblasti výzkumu genomiky a proteomiky i do klinických laboratoří. Proteinové čipy mohou být využity pro kvalitativní i kvantitativní analýzy a studium vzájemných interakcí proteinů. Z pohledu biochemie jsou čipy používány pro výzkum nových a analýzy současných diagnostických a prognostických markerů.

Při pohledu do historie začal vývoj metod proteomiky již v polovině 19. století. Jeden z prvních laboratorních testů na stanovení proteinu byl průkaz Bence-Jonesovy bílkoviny v moči. Od té doby byly vyvinuty různé analytické testy pro stovky proteinů v biologických materiálech, přičemž se jednalo jak o metody separační či fotometrické, tak o metody založené na imunologických principech. V roce 1994 pak vznikl pojem proteomika jako název samostatného vědního oboru.

Nové postupy proteomiky, využívající technik chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (např. MALDI-TOF MS), umožňují analýzu stovek proteinů, jejich identifikaci, kvantifikaci a také odhalení jejich strukturálních modifikací [1]. Preamalytická příprava vzorků je však obtížná. Jednotlivé složky proteinového komplexu v biologickém materiálu je nejprve nutné separovat, k čemuž se využívají elektroforetické, či chromatografické postupy, nebo je možné jednotlivé proteiny ze směsi vylučovat pomocí vazby s protilátkami. Získané proteiny je dále nutné štěpit na menší fragmenty. Upravený vzorek se nakonec vnáší do analytického systému. Tyto postupy jsou z pohledu biochemie vhodné pro identifikování nových neznámých potenciálních biomarkerů, ale využití těchto technik je v praxi zdoluhavé. Vzhledem k rychlosti provedení jsou hledány postupy jednoduché a dobře automatizovatelné, které by bylo možné využívat případně i ve statimo-

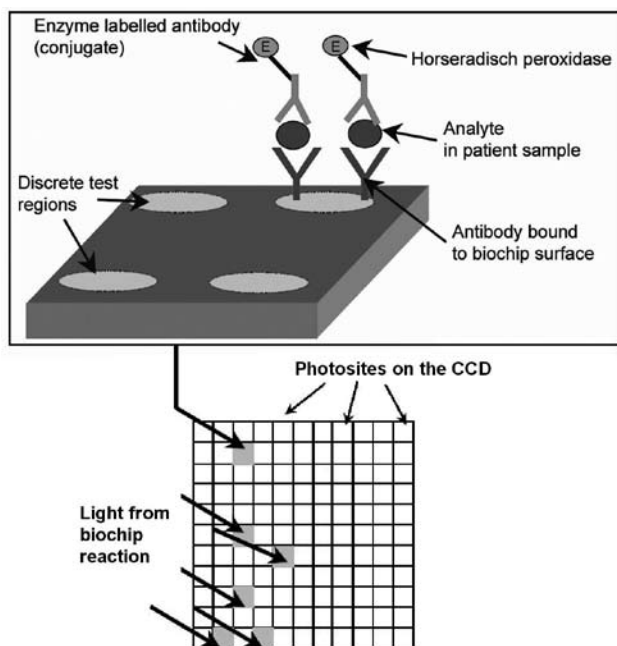
vém režimu laboratoří. Do této kategorie metod patří různé techniky, mezi něž můžeme zahrnout také proteinové biočipy. Cílem této práce je poskytnout přehled o těchto metodách a jejich možném použití v laboratorních klinické biochemie.

## Multiplexní analýza s využitím proteinových čipů

Podstatnou výhodou analýzy proteinů s využitím biočipových technologií je simultánní stanovení několika analytů z minimálního množství vzorku za spotřeby minimálního množství reagentů. Metody využívající klasické proteinové biočipy umožňují rychlé kvalitativní či kvantitativní stanovení se snadnou preanalytickou přípravou vzorku. Rychlý rozvoj metod v posledních letech již také nabízí v některých případech možnost automatizace analýzy.

Imunochemické čipy využívající jak kompetitivní, tak sendvičové techniky jsou již několik let komerčně dostupné. Na malé destičce jsou v miniaturních, přesně definovaných pozicích (spotech) imobilizované proteiny sloužící k vyvázání analytu ze vzorku. Pro detekci signálu se nejčastěji používají chemiluminiscenční nebo fluorescenční reakce. Záření z jednotlivých spotů snímají tzv. CCD kamery (charge-coupled device) – obrázek 1.

V rámci výzkumných projektů jsme měli možnost vyzkoušet několik panelů metod na imunochemickém biočipovém analyzátoru Evidence Investigator (Randox Laboratories). Je to zařízení vybavené CCD kamerou, která je určena pouze pro detekci luminiscenčního signálu z jednotlivých spotů na biočipu. Imunochemické reakce je nutné provádět manuálně pipetováním příslušných reagentů do jamky s biočipem. Princip je



**Fig. 1.** Principle of protein biochip technology

založen na enzymoimunoanalýze (křenová peroxidáza) a na reakci s peroxidem vodíku a luminolem. Je nutné pracovat v sérii po nejméně 9 vzorcích. Délka analýzy se pohybuje okolo 2 hodin v závislosti na použitém diagnostickém panelu. Z těchto důvodů není přístroj zatím využitelný pro statimové vzorky.

Naproti zmiňovaným nevýhodám je zde zajímavé široké spektrum nabízených panelů metod. Měli jsme možnost vyzkoušet soupravy pro stanovení kardiálních markerů (CKMB, MYO, cTnI, h-FABP, GPBB a CAIII) [2, 3, 4, 5], tyroidních hormonů (TSH, T3, T4 – volné nebo celkové) [6], cytokinů (IL-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2, 4, 6, 8, 10, 12, VEGF, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , EGF a MCP-1) a adhezních molekul (E-sel, L-sel, P-sel, ICAM, VCAM). Dále jsou k dispozici sety pro pohlavní hormony, nádorové markery nebo toxikologické analýzy. Pro všechny tyto panely jsou dodávány směsné kalibrátory a vzorky pro vnitřní kontrolu kvality na třech koncentračních úrovních. Výrobce uvádí sérum jako materiál první volby.

Druhou verzí přístroje firmy Randox je již automatický analyzátor s názvem Evidence. U této verze odpadá nutnost manuální přípravy vzorku, ale stejně jako Evidence Investigator pracuje tento automat s panely pro 9 biočipů. Reagencie pro oba přístroje jsou totožné, a tudíž nedochází ke zkrácení času potřebného k inkubaci. Statimové využití tak opět není možné.

Nejnovější variantou analyzátoru je automatický Evidence Multistat, který umožňuje statimový provoz. Došlo zde ke zkrácení doby inkubace přibližně na 20 minut, přístroj je vybaven systémem pro práci s jednotlivými čipy. Bohužel spektrum možných biočipových panelů je zatím pro tento typ analyzátoru omezeno pouze na stanovení kardiálních markerů a toxikologických nox [7].

V rozvoji techniky imunochemických biočipů neustávají pozadu ani další firmy. Společnost Roche diagnostics má ve vývoji panel pro stanovení kostních markerů (osteokalcin, PTH, PINP a  $\beta$ -CrossLaps).

Technologie je označována názvem IMPACT – Immunological MultiParameter Chip Technology. Na polystyrenový čip s vrstvou streptavidinu jsou naspotované biotinylované protilátky, druhá monoklonální protilátka je značená digoxinem a detekce je zajištěna díky fluorescenčně značené protilátce proti digoxinu. Pro každý marker je na biočipu připraveno 10–12 spotů a koncentrace je pak vypočtena z průměrné hodnoty signálu naměřené na jednotlivých spotech. Využití opakovaného měření zlepšuje reprodukovatelnost výsledků [8].

## NALIA

Thermo Fisher Scientific a Meso Scale Discovery dodávají kity pro imunochemická stanovení pracující na principu NALIA (Nanodot Array Luminometric Immunoassay). Tyto metody využívají, stejně jako klasické imunochemické biočipy, kompetitivní a sendvičové imunochemické reakce. Protilátky jsou však u metod označovaných NALIA naspotované na dno mikrotitračních destiček (maximum 16 spotů)

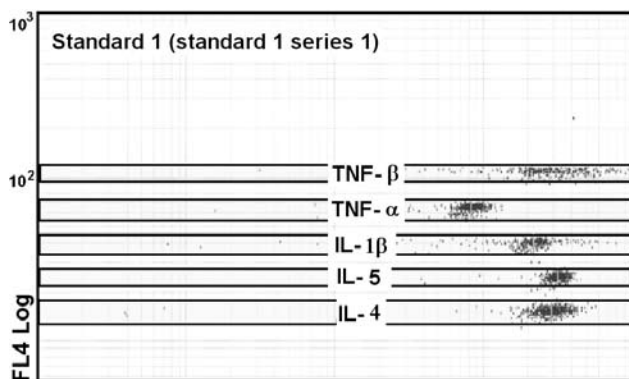
Vlastní principy těchto metod, stejně jako u klasických proteinových biočipů, využívají rozdílné způsoby značení protilátek. Detekční systémy (fluorescence, chemiluminiscence, IČ fotometrie) jsou vybaveny CCD systémy pro skenování jednotlivých jamek v destičce. SearchLight Protein Array Technology (Thermo Fisher Scientific) umožňuje detekci až 300 cytokinů a biomarkerů a nabízí výrobu (printing) na zakázku. Metody jsou testovány pro různé materiály (sérum, plazma, bronchoalveolární laváž, likvor, tkáňové homogenáty, mikrodialyzáty atd.) [9, 10, 11].

## Technologie FlowCytomix

Mezi imunochemické metody multiplexní analýzy můžeme zahrnout i další techniky, které využívají kombinace imunoanalýzy a jiných analytických postupů.

Technologie nazvaná FlowCytomix (Bender MedSystems, Thermo Fisher Scientific) umožňuje multiplexní analýzu proteinů na principu sendvičové imunoanalýzy v kombinaci s průtokovou cytometrií. Výhodou této multimarkerové techniky je možnost využití klasických průtokových cytometrů.

Základem je imunochemická reakce mezi měřenými analyty a specifickými protilátkami. Pro každý marker je v souboru daná určitá velikost částic, na nichž jsou navázané protilátky proti danému analytu. Během imunochemických reakcí se každý měřený marker dostane mezi protilátku navázanou na částici a protilátku fluorescenčně značenou. Vzniklý imuno-komplex pak prochází průtokovým cytometrem, který je dokáže rozdělit podle původní velikosti částic pro jednotlivé analyty (obr. 2). Spektrum měřených látek zahrnuje hlavně cytokiny a adhezní molekuly. Analýza touto technologií je rychlá, bez nutnosti sběru série vzorků a nevyžaduje žádnou speciální přístrojovou techniku [12].



**Fig. 2.** Cytokines separated by FlowCytomix system. The colored regions represent the different analytes.

## Biobarcode assay

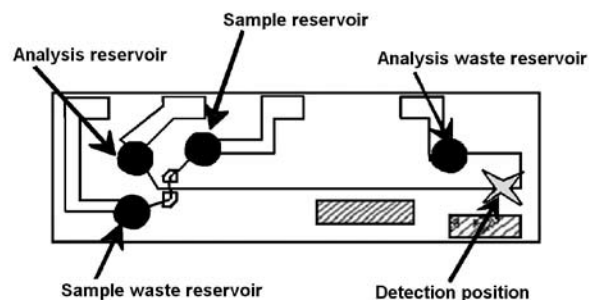
Pod názvem biobarcode assay se ukrývá technologie, která je kombinací imunochemických reakcí a polymerázové řetězové reakce. Rozhodně se jedná o metodu časově náročnou, ale na druhou stranu je její nespornou výhodou vysoká citlivost (cca 100krát větší než ELISA metody). Metoda je založena na sendvičové imunoreakci. Sledovaný analyt se váže pomocí specifických protilátek mezi magnetickou partikulí a částicí značenou určitou DNA sekvencí (barcode DNA). Pro multiplexní analýzu má každý měřený parametr svou vlastní dvojici partikulí. Vzniklý imunokomplex se z roztoku separuje působením magnetického pole. K detekci se využívá pro analyt specifická nukleotidová sekvence uvolněná z partikulí. Pro stanovení barkódové DNA je možné využít běžných metod a modifikací PCR techniky [13].

## Mikrofluidní čipové technologie

Kromě technologií využívajících k multiplexní analýze proteinů imunochemické principy se stále častěji objevují mikrofluidní čipy.

Jsou to skleněné nebo polymerové miniaturizované systémy pro separační techniky založené na principech kapilární elektroforézy nebo kapalinové chromatografie s různými způsoby detekce. Výhodou čipových separací je jednoduchost použití, rychlost, malé objemy vzorků a automatizace. V současné době se také začínají objevovat tzv. Lab-on-chip (laboratoře na čipu), což jsou systémy spojující několik různých principů v jenom čipu. Problémem mikrofluidních technologií zůstává nutnost extrémní čistoty chemikálií a prostředí vzhledem k náchylnosti těchto systémů k zanášení nečistotami.

Příkladem čipové kapilární elektroforézy je systém MultiNA firmy Shimadzu s aplikacemi pro separaci nukleových kyselin. Tyto čipy obsahují miniaturizované jamky s elektrodami a systém kanálků s okénkem pro detekci (obr. 3). Po nadávkování vzorku do příslušné jamky se elektroforetický čip vkládá do přístroje a spustí se separační proces. Výsledkem je klasický elektroforeogram [14].



**Fig. 3.** Capillary electrophoresis on the chip

Jako ukázkou systémů, využívajících mikrofluidní čipy pracující na principu kapalinové chromatografie, uvádíme Agilent HPLC-Chip / MS System (Agilent). Chromatografický čip sjednocuje dávkování vzorku a separaci na koloně ve spojení s ionizační technologií (elektrosprej) pro detekci hmotnostní spektrometrií [15].

Dalším možným a velice zajímavým využitím mikrofluidních čipů je použití pro polymerázovou řetězovou reakci. Vzorek je dávkován do jamky na PCR čipu, následně je tlakem poháněn mikrofluidním systémem a přichází do jednotlivých termobloků, kde probíhají jednotlivé kroky PCR reakce – denaturace, annealing a extenze. Trvání jednotlivých kroků PCR reakce závisí na délce kapiláry v termobloku a na rychlosti toku systémem [16].

## Problémy proteinových biočipů

Nově vznikající postupy přinášejí samozřejmě mnoho výhod, ale i řadu problémů. Mezi nevýhody imunochemických biočipů patří obtížná analytická optimalizace metod. Tyto problémy by měl řešit výrobce. Pro všechny markery v měřeném panelu je třeba sjednotit podmínky detekce, délku inkubace, promývání a zvolit vhodné ředění. Dalším parametrem, kterým je třeba se zabývat, je srovnání biočipových metod s klasickými imunochemickými technikami a kontrola kvality.

Výsledky kardiálních markerů (CKMB mass a MYO) měřených systémem Evidence Investigátor (Randox) jsme porovnali s hodnotami koncentrací získaných na analyzátoru Elecsys 2010 (Roche). Vzorky byly vybrány jak ze skupin dárců krve, tak od pacientů s různými kardiologickými diagnózami (celkem 75 vzorků). K hodnocení výsledků byla použita Passingova-Bablokova regrese. Výsledky měřené na obou systémech vykazovaly statisticky významné rozdíly. Absolutní naměřené hodnoty byly číselně nesrovnatelné, ale v rozlišení normálních a patologických koncentrací se metody dobře shodovaly. Z našich výsledků vyplývá, že pro diagnostiku lze použít metody obě, ale nelze kombinovat výsledky měření z jednotlivých analyzátorů mezi sebou. Tomu také odpovídá skutečnost, že jsou rozdílné hodnoty cut-off udávané jednotlivými výrobci [2].

Kromě nedokonalé standardizace metod jsme u měření kardiálních markerů narazili také na problémy s kontrolou kvality. Naměřená mezilehlá přesnost u myoglobinu byla 11,6–15,6% (n = 10) [3].

Další publikované studie zabývající se reprodukovatelností imunochemických biočipů ukazují podobné výsledky. Di Serio et al. [17] rovněž prezentují mezilehlou přesnost u Evidence Investigator Cardiac Array s variačními koeficienty: 16,4 – 18,7 % pro MYO, 17,1 – 19,0 % pro CAILL a 23,7–34,0 % pro GPBB.

Ellington et al. [18] ve své práci sledovali opakovatelnost u SearchLight Protein Array Technology (Thermo Fisher Scientific). Byly měřeny 2 panely cytokinů (15 markerů) a byla hodnocena nepřesnost měření v dubletech. Použity byly směsné kontroly a plazmatické vzorky. Procentuální zastoupení vzorků s nepřesností (CV%) větší než 10, 20 a 30 % bylo průměrně 35,2 v 18,2 a 11,6 % pozorování.

## Závěr

Cílem práce bylo poskytnout přehled o možnostech a metodách multiplexní analýzy. Většina těchto metod je zatím ve světě používána v oblasti výzkumu, ale v dnešní době dochází k rychlému rozvoji technologií, které stále více pronikají do běžného použití v laboratorní praxi. Využití proteomiky a čipové analýzy v diagnostice umožňuje komplexní pohled na stav pacienta a jsme přesvědčeni, že v budoucnu pravděpodobně najdou tyto techniky širší uplatnění i v klinické biochemii. Přes všechny současné problémy, které budou jistě postupně překonány, to určitě znamená krok vpřed.

## Literatura

1. **Hortin, G. L.** The MALDI-TOF Mass Spectrometric View of the Plasma Proteome and Peptidome. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 1223–1237.
2. **Ulrychová, M., Tichý, M., Horáček, J. M., Pudil, R., Horáková, L., Palička, V.** Multianalytový přístup k diagnostice srdečních chorob technologií proteinových biočipů. *Čas. Lék. čes.*, 2009, 148, 12, s. 591–596.
3. **Ulrychová, M., Horáková, L., Tichý, M., Horáček, J. M., Pudil, R.** Využití technologie proteinových biočipů pro stanovení kardiálních markerů u pacientů s akutním infarktem myokardu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2008, 4, s. 248–251.
4. **Horacek, J. M., Tichy, M., Jebavy, L., Pudil, R., Ulrychova, M., Maly, J.** Use of multiple biomarkers for evaluation of anthracycline-induced cardiotoxicity in patients with acute myeloid leukemia. *Exp. Oncol.*, 2008, 30, 2, p. 157–159.

5. **Pudil, R., Pařízek, P., Tichý, M., Haman, L., Horáková, L., Ulrychová, M., Vojáček, J., Palička, V.** Use of the biochip microarray system in detection of myocardial injury cause by radiofrequency catheter ablation. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008, 46, 12, p. 1726–1728.
6. **Vávrová, J., Friedecký, B., Ulrychová, M., Licbinská, E., Palička, V.** Vyšetřování tyreoidních hormonů na systému Randox Evidence Investigator technikou microarray. *Klin. Biochem. Metab.*, 2007, 4, s. 225–227.
7. Firemní materiály [online]. Dostupný na: <www.randox.com>
8. **Claudon, A., Vergnaud, P., Valverde, C., Mayr, A., Klause, U., Garnero, P.** New Automated Multiplex Assay for Bone Turnover Markers in Osteoporosis. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 1554–1563.
9. **Backen, A. C., Cummings, J., Mitchell, C., Jayson, G., Ward, T. H., Dive, C.** 'Fit-for-purpose' validation of SearchLight multiplex ELISAs of angiogenesis for clinical trial use. *J. Immun. Methods*, 2009, 342, p.106–114.
10. Firemní materiály [online]. Dostupný na: <www.aushon.com>
11. Firemní materiály [online]. Dostupný na: <www.meso-scale.com>
12. Firemní materiály [online]. Dostupný na: <www.bendermedsystems.com>
13. **Nam, J. M., Thaxton, C. S., Mirkin, C. A.** Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*, 2003, 301, p. 1884–1886.
14. Firemní materiály [online]. Dostupný na: <www.shimadzu.com>
15. Firemní materiály [online]. Dostupný na: <www.agilent.com>
16. **Zhang, Y., Ozdemir, P.** Microfluidic DNA amplification – A review. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 638, p. 115–125.
17. **Di Serio, F., Amodio, G., Ruggieri, E. et al.** Proteomic approach to the diagnosis of acute coronary syndrome: Preliminary results. *Clin. Chim. Acta*, 2005, 357, p. 226–235.
18. **Ellington, A., Kullo, I. J., Bailey, K. R., Klee, G. G.** Measurement and Quality Control Issues in Multiplex Protein Assays: A Case Study. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1092–1099.

Práce byla podpořena výzkumnými záměry MZO 00179906 a MSM 0021620817.

Do redakce došlo 5. 1. 2010.

Adresa pro korespondenci:  
RNDr. Martina Vašatová  
ÚKBD LF UK a FN  
Fakultní nemocnice  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: ulrycmar@fnhk.cz