

Pokroky v imunoanalýzách s luminiscenční a elektrochemickou detekcí

P. Štern

Mimoňská 637/16, 190 00 Praha 9

SOUHRN

Edukační publikace se zabývá v první části luminiscenčními metodami: luminiscencí lanthanidů rozloženou v čase, luminiscencí lanthanidů zesílenou enzymem, homogenní imunoanalýzou s pohlcením luminiscence, chemiluminiscencí, elektrochemiluminiscencí (kompetitivní i sendvičové uspořádání a metoda přímé interakce) a možnostmi simultánních imunoanalýz s elektrochemiluminiscenční detekcí. Druhá část je věnována imunoanalýzám s elektrochemickou detekcí, zejména anodickou rozpouštěcí voltametrií a square-wave voltametrií. Jako značky se používají různé nanomateriály: zlato, stříbro, polovodiče (CdS, PbS, ZnS, CuS), uhlíkové nanotrubičky (plněné enzymem), apoferritin (plněný ferokyanidem nebo ionty Cd^{2+} nebo Pb^{2+}), liposomy (plněné ferokyanidem), křemenné částice (s kovalentně vázaným polyguaninem, nebo plněné peroxidázou a thioninem), mikrokrystaly ferrocenu a jiné.

Klíčová slova: Luminiscence lanthanidů, chemiluminiscence, elektrochemiluminiscence, elektrochemické imunoanalýzy, nanomateriály.

SUMMARY

Štern P.: Advances in immunoassays by luminescence and electrochemical detection

The first part of the educational article deals with luminescence methods as follows: lanthanide-based time-resolved luminescence, enzyme-amplified lanthanide luminescence, homogeneous immunoassays with luminescence quenching, chemiluminescence, electrochemiluminescence (competitive assay, sandwich-type assay, and direct interaction) and simultaneous immunoassays options with electrochemical luminescence detection. The second part covers immunoassays with electrochemical detection, particularly anodic stripping voltammetry and square-wave voltammetry. Many kinds of nanomaterials are used as labels, e.g. gold, silver, semiconductors (CdS, PbS, ZnS, CuS), carbon nanotubes (enzyme-loaded), apoferritin (hexacyanoferrate loaded, in some cases Cd^{2+} or Pb^{2+} ions are used), liposomes (hexacyanoferrate loaded), silica particles (by covalently binding polyguanine or with peroxidase & thionine loaded), ferrocene microcrystals, etc.

Keywords: Lanthanide-based luminescence, chemiluminescence, electrochemiluminescence, electrochemical immunoassays, nanomaterials.

Luminiscenční metody

Přístrojová technika k detekci luminiscence byla vyřešena již před 20 roky. Pro automatizaci na mikrotitračních destičkách bylo nutné zdolat následující problémy [1]: nástřik vzorku s činidlem nesmí znehodnotit měření luminiscence, nutno zabránit vystříknutí vzorku a činidla z jamky, umístění nástřikové trysky a hlavy detektoru mají být taková, aby nebylo třeba míchání, a zavlečená chyba vlivem světelné kontaminace ze sousedních jamek musí být zanedbatelná. Pro měření ve zkumavkách je k dispozici automatický luminometr s kapacitou 160 zkumavek. V 21. století ale můžeme pozorovat pokrok v oblasti imunometod s luminiscenční detekcí a tomu se bude věnovat tato práce.

Luminiscence lanthanidů rozložená v čase

se využívá již delší dobu zejména proto, že umožňuje prokázat antigen (Ag) i v přebytku interferujících látek, jejichž fluorescence je v době měření již vyhaslá. Rozsah měření dosahuje dvanácti řádů [2], a lze tak stanovit např. proteiny ve stopové i ve vysoké koncentraci. Tato technologie využívá Stokesův posun (rozdíl mezi emisní a excitační vlnovou délkou) > 150 nm, takže i opticky nepřilíš kvalitní fluorimetr může poskytnout měření bez interferencí. Na druhé straně musí mít fotonásobič fluorimetru výjimečně nízký temný proud, protože vyza-

řování lanthanidů je vzhledem k fluoroforům relativně malé. Podle použité metody je detekční limit (LOD) např. pro PSA 0,21 ng/l (chelát Eu^{3+} uvnitř nanočástice o průměru 107 nm, která je potažena Ab vůči fPSA) [3], AFP 0,15 ng/l (značka ALP uvolňuje 5-fluorsalicylovou kyselinu z fosfátu, která poté tvoří vysoce fluoreskující ternární komplex s Tb^{3+} a EDTA) [4] nebo 2,5 $\mu\text{g/l}$ pro Lp(a) (chelát Eu^{3+}) [5].

Nejběžnější heterogenní varianta stanovení Ag používá trojmocný kation lanthanidu jako značku druhé Ab pro sendvičové uspořádání imunoreakce (obr. 1) a fluorescenční detekce se provede po přidání zesilovacího roztoku. Tyto metody mohou poskytovat lineární odezvu v rozsahu až 5 řádů, ale běžně používané postupy jsou lineární v rozsahu 2 až 3 řády [2]. Homogenní postup s rezonančním přenosem luminiscenční energie (TRACE = time-resolved amplification by cryptate emission) používá v nekompetitivním (sendvičovém) uspořádání Ab značenou obvykle Eu^{3+} a další Ab značenou allofykocyaninem. Jestliže Abs obklopí Ag, značky se k sobě přiblíží a nastane rezonanční přenos, např. z Eu^{3+} (337 nm) na allofykocyanin, který vyzáří fluorescenci rozloženou v čase (životnost 0,25 ms) při 665 nm (obr. 2). Kompetitivní varianta používá značený Ag, obvykle Eu^{3+} , který je vytlačován stanoveným Ag z vazby na Ab značenou allofykocyaninem –

proto se možnost rezonančního přenosu luminiscence snižuje, a tedy výsledný signál bude tím slabší, čím více bude stanovovaného Ag. V případě, že nejde označit Ab přímo, lze použít biotinylovanou Ab, na kterou se naváže značený streptavidin.

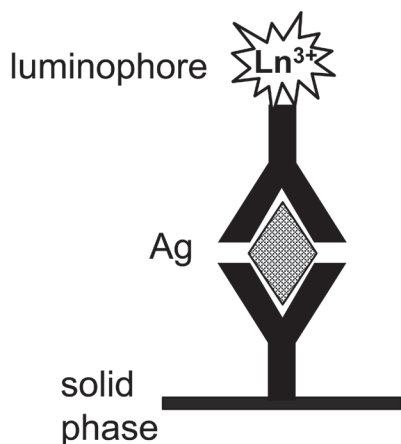


Fig. 1. Heterogeneous sandwich immunoassay

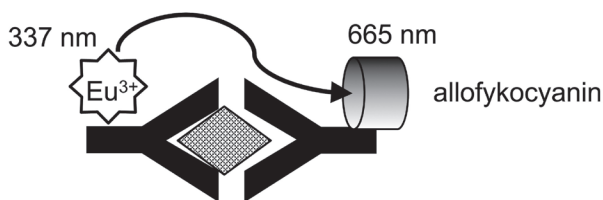


Fig. 2. Homogeneous competitive immunoassay: luminescence resonance energy transfer

Vysoká hodnota Stokesova posunu u lanthanidů je dána tzv. anténovým efektem chelátů iontů lanthanidů (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Sm^{3+}), který vysvětluje obr. 3. Absorbovaná energie excituje molekulu ze základního singletového stavu na vyšší singletovou hladinu, ze které se částečně vrací do základního stavu s vyzářením fluorescence, a částečně přechází do nestabilního tripletového stavu. Z něj pak přechází opět do základního stavu fosforescencí a (pokud je to možné) anténovým účinkem na ionty chelátů lanthanidů, které poskytují poměrně intenzivní luminiscenci při několika vlnových délkách (585, 615, 655, 688 nm) při svém návratu do základního stavu. Přenosem energie z excitovaného singletu na triplet a na cheláty iontů lanthanidů dochází ke ztrátě energie teplem, a proto je vlnová délka vyzářované luminiscence o > 150 nm vyšší, než u původního excitačního záření. Cheláty chrání ionty lanthanidů před zhasacími účinky vody (pro vytlačení vody z okolí lanthanidu se používá trioktylfosfinoxid a neionogenní detergent Triton X-100). K excitaci chelátů Eu^{3+} se nejvíce využívá intenzivní spektrální čára dusíkového laseru 337 nm. Jako cheláty se používají, kromě dobře známé etylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), také silnější chelát dietylenetriaminpentaoctová kyselina (DTPA) a ještě silnější 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (DOTA). Čím je chelát silnější, tím je komplex s kationem lanthanidu stabilnější. V komerčních DELFIA soupravách se jako cheláty

používají β -diketony, ačkoliv jsou méně stabilní, protože dávají velmi intenzivní luminiscenci [2]. Pro zajištění anténového efektu je potřebné dodat do roztoku látky, které mají aromatické π -elektrony, jako jsou naftalen, 1,10-fenantrolin nebo 2,2'-bipyridin (molární absorpční koeficient se může zvýšit až 100 000krát).

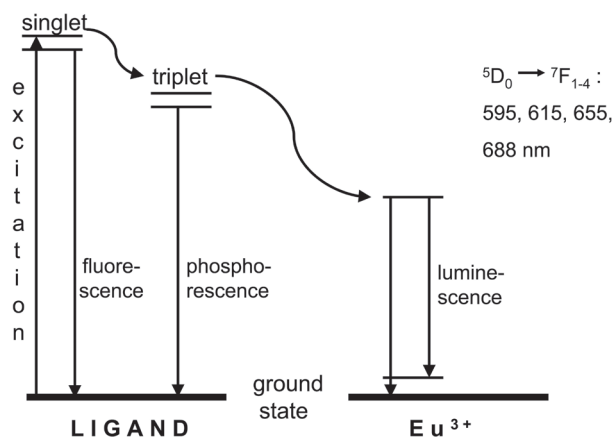


Fig. 3. An antenna ligand luminescence

Použití luminiscenčních nanočástic potažených streptavidinem snižuje hodnotu LOD vůči běžným metodám stokrát [3]. Současné použití Eu^{3+} a Tb^{3+} , jako značek, umožňuje paralelní stanovení, např. Abs vůči HBsAg a HIV-1 [6]. Polystyrénové nanočástice nejsou optimální, protože jsou relativně velké, bobtnají a často z nich vytéká náplň. Výhodnější jsou křemenné nanočástice, které jsou díky silanolové vrstvě lépe rozpustné ve vodě, a také rozpustnější než latex. Kromě toho má silanol lepší vazebné schopnosti [7].

Luminiscence lanthanidů zesílená enzymem
je postup, kdy se enzym používá jako značka, která převádí substrát na produkt s odlišnými chelatačními nebo spektroskopickými vlastnostmi. Zesílení signálu je natolik přínosné, že je akceptován reakční krok navíc. Většina metod používá jako značku ALP, štěpící fosfát substituované kyseliny salicylové na volnou substituovanou kyselinu, která tvoří luminiscenční komplex s Tb^{3+} a EDTA (obr. 4). Nejnižší LOD poskytuje substituent 5-(2',4'-difluorfenyl), kdy lze detekovat 0,2 amol ALP [8]. Jiné enzymové značky se používají zřídka, protože mají horší senzitivitu.

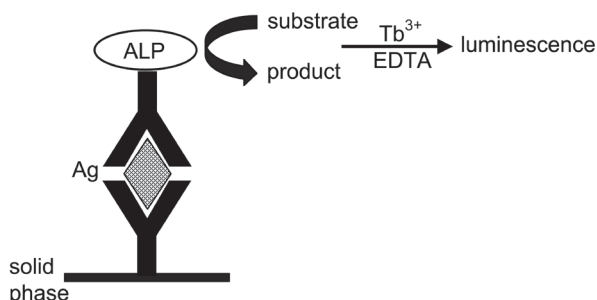


Fig. 4. Enzyme-amplified lanthanide luminescence

Homogenní imunoanalýza s pohlcením luminescence se provádí buď v kompetitivním uspořádání, kde Ag značený FITC (fluorescein izothiokyanát) a stanovovaný Ag soutěží o Ab. V následujícím kroku se přidá zhášedlo TRITC (tetrametylrhodamin izothiokyanát) vázané na Ab. Toto činidlo se naváže na Ag značený FITC a zhášedlo jeho fluorescence zhasne. Produkt první reakce Ab-Ag-FITC se z prostorových důvodů nemůže navázat na Ab-TRITC a jeho fluorescence je zachována. Intenzita signálu je přímo úměrná množství stanovovaného Ag. V heterogenní konfiguraci se použijí dvě Abs (jedna je značená FITC a druhá TRITC). Po připojení na obě vazebná místa Ag fluorescence zhasne. Útlum fluorescence (Ab₁-FITC je v přebytku) je přímo úměrný množství stanovovaného Ag. Místo TRITC lze použít ke značení druhé Ab koloidní Au, které zakryje fluorescence Ab₁-FITC. Zhášení se může využít i při získávání luminescence chemickou cestou. Je-li první Ab značena peroxidázou (POD) a druhá koloidním zlatem, pak je v imunokomplexu aktivní centrum enzymu zakryto, reakce POD s luminolem neprobíhá a chemiluminiscence je utlumena. Obecně platí, že čím jsou nanočástice Au menší (používají se částice o průměru 2 až 100 nm), tím je účinnost zhášedla vyšší [9]. Imunochemická aktivita Ab zůstává při vazbě na koloidní Au zachována. Nanočástice Au lze snadno detekovat také elektronovou mikroskopií [10].

V **chemiluminiscenční** variantě lze Au značku po sendvičové imunoreakci (kotvící Ab na magnetické kuličce – Ag – druhá Ab značená Au) oxidovat bromem (obr. 5) na kation Au³⁺, který s luminolem poskytuje chemiluminiscenci s LOD pro IgG 3,1 pmol/l [10].

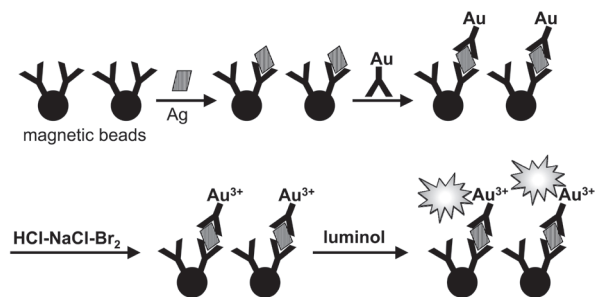


Fig. 5. Magnetic beads and colloidal Au on noncompetitive CLIA

Běžně používané chemiluminiscenční technologie byly značně vylepšeny [11]. Tak zesilovače, které zvyšují kvantový výtěžek reakce a prodlužují dobu trvání luminescence, byly doplněny o nukleofilní acylační katalyzátory (např. 4-aminopyridiny) [12], umožňující snížit LOD pro POD z 50 na 8 amol/l. Chemiluminiscence esterů akridinu je známa už více než 50 let, ale vztah mezi strukturou molekuly a kvantovým výtěžkem luminescence není dosud zcela vysvětlený, takže inovace stále probíhají. Připojení hexaethylglykolových skupin na akridin umožnilo zvýšit citlivost stanovení TSH pětikrát, takže funkční senzitivita byla 0,002 mU/l [13].

Použití Au nanočástic pro chemiluminiscenci předchází sendvičová reakce, kdy se na kotvící Ab naváže *Salmonella* a na ní pak druhá Ab značená Au. Redukcí hydrochinonem se z roztoku AgNO₃ vylučuje Ag, a usa-

zuje se na Au nanočásticích imunokomplexu [14]. Po vymytí přebytku Ag vodou se Ag usazené na Au nanočásticích rozpustí kyselinou dusičnou na Ag⁺ kationty, které katalyzují chemiluminiscenční reakci persíranu draselného (K₂S₂O₈) s luminolem za přítomnosti kationtů Mn²⁺ a v prostředí kyseliny fosforečné. Ultracitlivé stanovení umožňuje dosáhnout LOD 5 cfu/ml (colony forming units).

Elektrochemiluminiscence (ECL) je oblíbená metoda, jejíž výhodou je absence optické excitace, takže nedochází ke vzniku pozadí rozptylem světla a autofluorescencí vzorku. LOD je < 10 pmol/l při použití Ru-chelátů, generovaných in situ na povrchu elektrody [15]. Koncentrace bipyridylrutheniových kationtů Ru(bpy)₃²⁺ je při měření konstantní a intenzita emise tedy závisí na dalších reaktantech (vysoká selektivita ve srovnání s luminolem). Doba měření je několik sekund a technologie umožňuje paralelní měření několika analytů modifikacemi čtyř parametrů: okamžiku startu ECL, napětí na elektrodě, intenzity ECL a vlnové délky. Současné automaty zajišťují časovou i prostorovou kontrolu ECL reakce na povrchu elektrody.

Heterogenní ECL má tři obvyklé varianty analytického postupu: kompetitivní ECL, sendvičovou ECL a přímou interakci. **Kompetitivní ECL** (obr. 6A) má výhodu v tom, že je možné použít i nevyčištěnou primární Ab. Nevýhodou je ale podstatně více: omezená citlivost a pracovní rozsah, pomalá reakční kinetika, nižší preciznost, a riziko falešně nižších naměřených hodnot při vysokých koncentracích. Tato metoda se většinou používá pro hapteny, ale někdy i pro velké molekuly, např. IgG [17], ovšem s mnohem menší citlivostí než při sendvičové variantě. Tak LOD je pro stanovení IgG kompetitivní ECL 7,2 μg/l, zatímco při sendvičové ECL 87 pg/l [15]. Nejširší využití našla **sendvičová ECL** (obr. 6B). Výhodou je specifitější postup než u ostatních variant, protože k rozpoznávání analytu se používají dvě Abs místo jedné. Stanovovaný analyt by měl mít molekulovou hmotnost > 1000. Nevýhodou sendvičového uspořádání je delší inkubační čas a více separačních kroků pro oddělení volných a vázaných Ag a Ab. Méně známá **metoda přímé interakce** (obr. 6C) se zabývá měřením vazby receptor (značená Ab) – analyt bez dalšího značení (obvykle v reálném čase), a pokles signálu je přímo úměrný koncentraci analytu. Výhodou postupu je, že se eliminuje možnost křížové reaktivity druhé Ab. Stanovení je rychlé, protože se používá jediná Ab. Tato varianta má ale četné nevýhody: náhodné ECL vlastnosti cílového analytu, značení primární Ab je zdlouhavé a drahé, neexistuje flexibilita ve výběru značení Ab mezi analýzami, imunoreaktivita Ab může být po označení snižena a zeslabení signálu po imunoreakci je malé. Několik postupů na tomto principu bylo vypracováno pro α-fetoprotein (AFP) [15], který blokuje přestup elektronů po navázání na Ab, značené např. Ru(bpy)₃²⁺ [18]. Jak už bylo uvedeno, je senzitivita metod přímé interakce menší než u sendvičových postupů; konkrétně pro AFP [15] je LOD 0,2 pg/l (přímá interakce), resp. 20 fg/l (sendvičové uspořádání). Také rozsah linearit stanovení α-fetoproteinu je odlišný, a to pro metodu přímé interakce 0,5 pg/l – 50 ng/l, zatímco při sendvičové variantě 50 fg/l – 500 pg/l. Obecným problémem ECL je špatná rozpustnost luminoforů ve vodě.

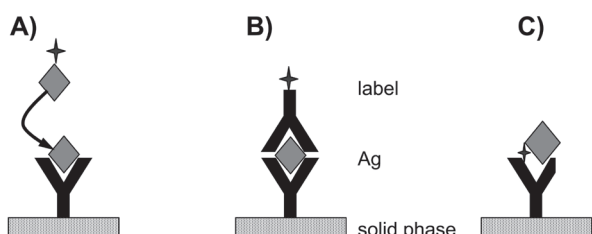


Fig. 6. Type of electrochemiluminescence: A) competitive, B) sandwich, C) direct interaction

V sendvičové ECL byla publikována řada nových postupů, jak bude ilustrováno na třech příkladech. Prvním postupem je **ECL stanovení CRP**. Úvodem je potažení povrchu liposomu streptavidinem. Liposom je naplněný $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Na streptavidin se váže biotinylovaná Ab vůči lidskému CRP. V paralelní reakci se identická biotinylovaná Ab váže přes streptavidinový můstek na magnetickou mikrokuličku. Obě Abs obklopí CRP a vytvoří sendvič. Stanovení CRP (po lýze liposomů Tritonem X-100) se uskuteční obvyklou ECL detekcí signálu $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (pracovní disková Pt elektroda, pomocná elektroda Pt drát, referenční Ag/AgCl elektroda) v přítomnosti tri-n-propylaminu [19]. LOD metody je 100 $\mu\text{g/l}$ CRP. Jiné uspořádání, využívající liposomy plněné $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, je **ECL stanovení AFP**. Příprava imunosenzoru probíhá tak, že na Au elektrodu jsou elektrolyticky nanášeny nanočástice Au, aby byl zajištěn velký povrch. Ponořením Au elektrody do polyetyleniminu se připojí aminoskupiny. Přes můstek glutaraldehydu se kovalentní vazbou naváže primární Ab a na ní AFP. Následně vzniká sendvič se sekundární Ab, značenou liposomy. Triton X-100 uvolní $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ z liposomů a provede se ECL detekce [20]. LOD metody je 1 pg/l a rozsah linearit 5 – 200 pg/l AFP. Třetím příkladem je **stanovení AFP zhasením ECL**. Imunosenzor se připravuje na uhlíkové elektrodě potažené grafenem (přes CdS můstek). Grafen má hexagonální strukturu grafitu, ale odlišné vlastnosti: je nejtvrďší známý materiál, má dvojrozměrnou strukturu (tloušťka 1 atom), vynikající vodivost, velký dostupný povrch, dokonale rovnou plochu a dobrou biokompatibilitu. Na grafen se (přes CdS můstek) připojí alginátové vlákno (z hnědých mořských řas), které zajistí souvislou hranu sestávající z hydroxylových skupin. Jednotlivé trojice hydroxylových skupin reagují s aminopropylsilanem; výsledkem je produkt s volnými aminoskupinami, na které se váže kovalentní vazbou (přes glutaraldehyd) primární Ab. Neobsazená vazebná místa glutaraldehydu se vysytí hovězím albuminem. Provede se imunoreakce s AFP a následně se přidá sekundární Ab, značená černým tělesem polovodičového nanokrystalu CdSe/ZnS, pohlcujícím emitované fotony CdS. Po inkubaci se sleduje ECL, která je nepřímě úměrná množství AFP [21]. LOD metody je 0,2 pg/l a rozsah linearit 0,5 – 50000 pg/l AFP.

V přístrojové technice se objevují, kromě dobře známých a široce využívaných analyzátorů Elecsys, zařízení používající k imobilizaci místo magnetických mikrokuliček uhlíkovou elektrodu (obr. 7). Tyto elek-

trody tvoří dno 96 jamek jednoúčelových mikrotitračních destiček. Sítotiskem se do každé jamky vpraví pracovní elektroda, která je od pomocné elektrody oddělena dielektrikem. Po imobilizaci primární Ab na uhlíkové elektrodě (96 elektrod na destičce), proběhne sendvičová imunoreakce s Ag a následně se sekundární Ab, značenou $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Světelný signál se získává obvyklou ECL technologií reakcí s tripropylaminem (obr. 7). Uhlíková elektroda má 10x vyšší

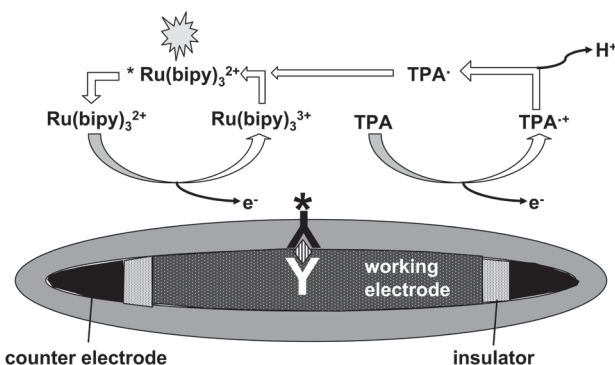


Fig. 7. Electrochemiluminescence on carbon electrodes

vazebnou kapacitu než polystyrén a na každé elektrodě lze stanovit až 10 různých antigenů. Měření destičky trvá 70 s [15].

Rozvoj nanostrukturních materiálů umožňuje navrhovat vysoce kapacitní ECL imunosenzory, neboť nanočástice mohou nést mnoho ECL značek, slouží jako akceptory energie a zhasedla ECL, dále jako neobvyklé značky pro ECL, elektrokatalyzátory ECL reakcí, také zlepšují přenos elektronů na rozhraní elektrody, jakož i elektrokatalytickou aktivitu [22]. Polovodičové nanokrystaly jsou slabší luminofory než Ru-komplexy nebo luminol. Na nanokrystaly lze připojit četné ligandy po jejich potažení karboxylem nebo aminem [23] (např. funkční skupiny navázané přes polyetylenglykol), elektrostatická uskupení, ligandy Ni^{2+} s histidinem, aktivní estery a další komplexy. Na nanostruktury lze navázat přímo thiol, imidazol, histidin, nebo použít streptavidin-biotinový můstek s možností připojení široké palety malých i velkých molekul.

Simultánní imunoanalýzy s ECL detekcí se ubírají dvěma směry [15]: využití více značek současně, nebo plošně rozlišení ukotvených specifických reaktantů. Využití více značek má delší tradici. Stanovení více analytů je umožněno odlišnými podmínkami startu (rozdílné optimální napětí), odlišnou intenzitou ECL, nebo různou vlnovou délkou detekce. Tento postup má ale řadu nevýhod: obtíže s nalezením vhodné značky, nelze použít organické luminofory (vadí překryv jejich širokých emisních spekter), a počet současně detekovatelných analytů je omezený. Plošně rozlišená analýza využívá univerzální značku pro detekci všech analytů na základě jejich umístění na ploše, takže se otevírá možnost použití některého organického luminoforu. Tento postup je vhodnější v případě simultánních analýz většího počtu analytů, než varianta využívající několik značek.

Elektrochemické metody

Značky pro imunoanalýzy s elektrochemickou detekcí se připravují z mnoha druhů nanomateriálů. Sem patří kovové nanočástice (Au, Ag), polovodičové nanočástice, enzymem plněné uhlíkové nanotrubičky, nebo částice plněné elektroaktivními složkami (nanočástice oxidu křemičitého, kuličky polymerů anebo liposomů) [24].

Au částice se používají buď samotné, nebo jsou potažené stříbrem. Koloidní Au lze stanovit v 35 μ l vzorku **anodickou rozpouštěcí voltametrií** na jednocílové uhlíkové elektrodě vytvořené síťotiskem [25]. Nekompetitivní imunoreakci se na přebytek zakotvené specifické Ab naváže stanovený IgG. Druhá Ab značená Au pak vytvoří sendvič. Au se v kyselém prostředí (HBr) oxiduje bromem na Au^{3+} a stanoví se anodickou rozpouštěcí voltametrií na C-elektrodě proti Pt-elektrodě s Ag/AgBr referenční elektrodou (obr. 8). LOD metody pro IgG je 3 pmol/l. Jiný postup vychází z toho, že po obdobné sendvičové imunoreakci je povrch Au mikročástic potažený stříbrem, po redukci dusičnanu stříbrného hydrochinonem [26]. Stříbro se pak rozpustí ve zředěné kyselině dusičné a stanoví anodickou rozpouštěcí voltametrií na elektrodě ze sklovitého uhlíku proti Pt-elektrodě (referenční je kalomelová elektroda). LOD metody je 6 pmol/l IgG.

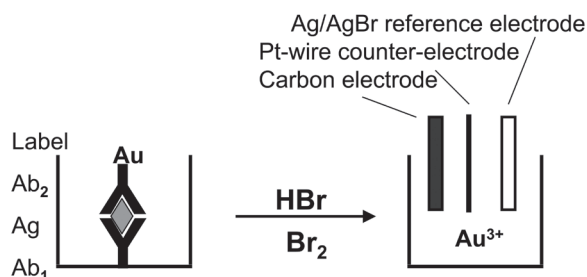


Fig. 8. Anodic stripping voltammetry

Polovodičové nanočástice jsou vytvořeny z CdS, PbS, ZnS, nebo CuS. Lze také použít všechny čtyři značky simultánně [27] a stanovit současně β_2 -mikroglobulin, hovězí albumin, IgG a CRP. Všechny čtyři nanokrystaly vykazují srovnatelnou senzitivitu. Na magnetické kuličky potažené streptavidinem jsou navázány odpovídající biotinylované primární Abs, které reagují s jednotlivými bílkovinami. Druhé specifické Abs se označí jednotlivými nanokrystaly, přes karbamátový můstek, a vytvoří s příslušným Ag sendvič. Proveďte se magnetická separace, nanokrystaly se rozpustí ve zředěné kyselině dusičné a ionty Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} se stanoví anodickou rozpouštěcí voltametrií na elektrodě ze sklovitého uhlíku (s filmem rtuti) proti Pt elektrodě (s Ag/AgCl referenční elektrodou). LOD pro jednotlivé proteiny je kolem 10 μ g/l.

Předností **uhlíkových nanotrubiček** je jejich rozsáhlý povrch vzhledem k hmotnosti (imunoreakce se uskutečňují především na povrchu), vynikající mechanické vlastnosti a schopnost rychlého přenosu elektronů [24]. Primární Ab zakotvená na magnetické kuličce vytvoří sendvič s Ag (IgG) a sekundární Ab, značenou

uhlíkovou nanotrubičkou plněnou enzymem. Nanotrubička o délce 1 μ m obsahuje 9600 molekul ALP [28] a LOD pro IgG je 500 pg/l, tj. 100x nižší než u běžného značení enzymem. Detekce produktu enzymové reakce α -naftolu se provádí elektrochemickým detektorem plynového chromatografu na uhlíkové elektrodě.

Apoferitinové nanočástice obsahují kulovitý protein o průměru 12,5 nm (obsahující 24 sousedících podjednotek) s vnitřním průměrem 8 nm, kde je umístěno 4500 atomů Fe [24]. Apoferitinová klec se při pH 2 rozpadne na 24 podjednotek a při pH 8,5 se zase znovu složí. Takto lze do dutiny apoferitinu zabudovat 150 molekul feroxyanidu draselného a použít jej jako značku, přes můstek ester N-hydroxysukcinimid – biotin. Tři biotinové koncovky (tj. 3 molekuly apoferitinu s naplněnými dutinami) se mohou navázat na streptavidin, který se opět přes biotin váže na druhou Ab. První Ab je zakotvena na magnetické kuličce a vytvoří s druhou značenou Ab sendvič kolem Ag (např. IgG). Elektrochemická detekce se provádí metodou **square-wave voltametrie** [29], kdy se pravidelná obdélníková vlna potenciálu skládá s podkladovým stupňovitým potenciálem. Pro měření byly použity síťotiskové jednocílové elektrody (uhlíková pracovní, uhlíková pomocná elektroda a referenční Ag/AgCl elektroda). LOD pro IgG je 80 ng/l, tj. 0,52 pmol/l.

Apoferitin má 14 kanálků, které spojují jeho dutinu s vnějším prostorem (6 kanálků je hydrofobních a 8 kanálků je hydrofilních). Toho lze využít při tzv. difuzním postupu [30]. Roztok dusičnanu kademnatého nebo olovnatého se přidává k roztoku apoferitinu a ionty Cd^{2+} , resp. Pb^{2+} difundují do dutiny apoferitinu. Pak se pipetuje fosfátový pufr, který vytvoří s přebytečnými ionty Cd^{2+} , resp. Pb^{2+} sraženinu fosforečnanu, která se odstředí. Supernatant obsahuje apoferitin plněný fosforečnanem kademnatým nebo olovnatým. Elektrochemická detekce se provádí metodou square-wave voltametrie. Pro měření byly použity uhlíková pracovní elektroda, Pt pomocná elektroda a referenční Ag/AgCl elektroda.

Liposomy se mohou použít také jako značky pro elektrochemickou detekci. Velikost liposomů je v rozsahu nm až několika μ m, takže mají značný vnitřní objem, který se může naplnit elektrochemicky aktivní značkou. Liposomy se plní např. tetrapentylamoniovými ionty, draselnými ionty nebo kyselinou askorbovou [24]. Liposomy plněné feroxyanidem draselným byly použity jako značka pro elektrochemickou detekci teofylinu [31]. Imunosenzor sestává ze dvou částí, a to síťotiskové elektrody, a proužku nitrocelulózy membrány pro imunochromatografii. Na membráně je imobilizovaná Ab vůči teofylinu v kompetiční zóně; liposomy plněné feroxyanidem draselným jsou imobilizovány v zóně generující signál. V zóně pro vzorek je fixován konjugát teofylin-melitin. Melitin je peptidický toxin, složený z 26 aminokyselin, který porušuje biologické membrány. Po přidání vzorku soutěží stanovený teofylin s konjugátem teofylin-melitin o vazebná místa na Ab. Nenavázaný konjugát teofylin-melitin migruje dále do signální zóny, kde rozruší zakotvené liposomy a uvolněné feroxyanidové ionty se stanoví amperometricky (pracovní

a pomocná elektroda jsou uhlíkové, referenční je Ag/AgCl elektroda). Vznikající proud je přímo úměrný koncentraci ferokyanidových iontů, a to odpovídá koncentraci stanovovaného teofylinu. LOD metody je 5 mg/l teofylinu a jednostupňová analýza trvá 20 min.

Křemenné nanočástice lze učinit elektroaktivními pomocí polyguaninových vláken. Každé vlákno sestává z 20 molekul guaninu; na každou nanočástici lze navázat přibližně 60 vláken [32]. Křemenná nanočástice se připojí na druhou Ab přes konjugační činidla 1-etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid a N-hydroxysukcinimid. Na uhlíkové elektrodě je zakotvená první biotinylovaná Ab přes avidinový můstek. Tak lze vytvořit sendvič (např. s IgG) a elektrochemické stanovení provést sledováním oxidace guaninu $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, který se přitom redukuje na $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Na uhlíkové anodě odevzdá $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ elektron a jako $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ je opět použitelný k oxidaci dalších molekul guaninu (obr. 9). Vznikající proud je přímo úměrný logaritmu koncentrace IgG. LOD pro IgG je 0,2 $\mu\text{g/l}$, tj. 1,3 pmol/l [32]. Elektrochemická detekce se provádí metodou square-wave voltametrie (pracovní a pomocná elektroda jsou uhlíkové, referenční je Ag/AgCl elektroda).

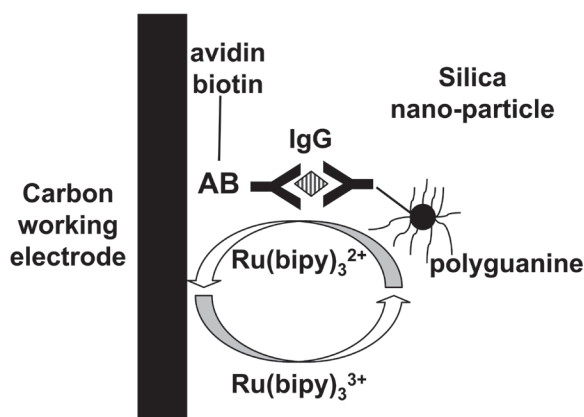


Fig. 9. Square-wave voltammetry based on the polyguanine-coated silica nanoparticle

Nanočástice oxidu křemičitého lze použít na povrchu, nebo se mohou vyplnit jejich dutiny POD a mediátorem elektronů thioninem [33], zesilujícím signál. Takto naplněné křemenné nanočástice se přes (3-glycidyloxypropyl)trimetoxysilanový můstek připojí na druhou Ab vůči CA 125, značenou POD. První (kotvící) Ab je přes (3-glycidyloxypropyl)trimetoxysilanový můstek připojena k magnetitovým kuličkám. Stanovovaný CA 125 vytvoří s oběma Abs sendvič. Pro jeho separaci se využívá externí magnet. Pro získání elektrochemického signálu slouží redukce H_2O_2 , katalyzovaná POD, s thioninem jako mediátorem elektronů (z dutin nanočástic SiO_2). Pracovní elektrodu tvoří $\text{In}_2\text{O}_3 + \text{SnO}_2$, pomocnou elektrodu Pt drát a referenční je Ag/AgCl elektroda. LOD pro CA 125 je 0,1 kU/l a rozsah měření 0,1 – 450 kU/l.

Jiný příklad utilizace elektrochemické detekce je značení pomocí **obalovaných mikrokryсталů ferrocenu**. Koloidní krystaly ferrocenu jsou obaleny vrstvou polyallylaminu a po promytí následně vrstvou 4-styren sulfonátu. Obě vrstvy mají opačný náboj a mohou být nanášeny opakovaně (obvykle 8 vrstev) [34]. Obalené

mikrokrystaly ferrocenu jsou konjugovány s kozí Ab vůči myšímú IgG. Mikrotitrační destičky jsou potaženy kotvící Ab vůči myšímú IgG. Poté se přidá stanovovaný myší IgG a druhá Ab, značená obalovanými krystaly ferrocenu. Vzniklý sendvič se propláchne, aby byly odstraněny přebytky reaktantů. Pak se přidá dimetylsulfoxid, který rozpustí krystaly ferrocenu, a jeho molekuly se detekují amperometricky nebo voltametricky. V obou případech se používá stejná konfigurace tří elektrod: pracovní uhlíková, Pt pomocná a referenční Ag/AgCl elektroda. LOD metody pro myší IgG je 2,82 $\mu\text{g/l}$, tj. 20 pmol/l.

Popsané technologie využívající elektrochemickou detekci nejsou jednoduché, avšak předpokládá se [24], že zdokonalené nanomateriály umožní v budoucnu konstruovat snadno použitelná příruční zařízení pro rychlou, citlivou a levnou detekci biomarkerů.

Literatura

1. **Berthold, F., Tarkkanen, V.** Luminometer development in the last four decades: recollections of two entrepreneurs. *Luminescence*, 2013, Vol. 28 (1), p. 1–6.
2. **Hagan, A. K., Zuchner, T.** Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, Vol. 400(9), p. 2847–2864.
3. **Soukka, T., Anttonen, K., Härmä, H., Pelkkikangas, A. M., Huhtinen, P., Lövgren, T.** Highly sensitive immunoassay of free prostatespecific antigen in serum using europium(III) nanoparticle label technology. *Clin. Chim. Acta*, 2003, Vol. 328(1-2), p. 45–58.
4. **Christopoulos, T. K., Diamandis, E. P.** Enzymatically amplified time-resolved fluorescence immunoassay with terbium chelates. *Anal. Chem.*, 1992, Vol. 64(4), p. 342–346.
5. **Jürgens, G., Hermann, A., Aktuna, D., Petek, W.** Dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay of lipoprotein(a) in serum. *Clin. Chem.*, 1992, Vol. 38(6), p. 853–859.
6. **Myryläinen, T., Talha, S., Swaminathan, S., et al.** Simultaneous detection of human immunodeficiency virus 1 and hepatitis B virus infections using a dual-label time-resolved fluorometric assay. *J. Nanobiotechnol.*, 2010, Vol. 8(1), p. 27–32.
7. **Wang, F., Tan, W., Zhang, Y., Fan, X., Wang, M.** Luminescent nanomaterials for biological labelling. *Nanotechnology*, 2006, Vol. 17(1), p. R1–R13.
8. **Gudgin Dickson, E. F., Pollak, A., Diamandis, E. P.** Time-resolved detection of lanthanide luminescence for ultrasensitive bioanalytical assays. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 1995, Vol. 27(1), p. 3–19.
9. **Xue, Ch., Xue, Y., Dai, L., Urbas, A., Li, Q.** Size- and shape-dependent fluorescence quenching of gold nanoparticles on perylene dye. *Adv. Optical Mater.*, 2013, Vol. 1(8), p. 581–587.
10. **Fan, A., Cao, Z., Li, H., Kai, M., Lu, J.** Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses. *Anal. Sci.*, 2009, Vol. 25 (5), p. 587–597.
11. **Roda, A., Guardigli, M.** Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, Vol. 402(1), p. 69–76.
12. **Marzocchi, E., Grilli, S., Della, C. L., Prodi, L., Mirasoli, M., Roda, A.** Chemiluminescent detection systems of horseradish peroxidase employing nucleophilic acylation catalysts. *Anal. Biochem.*, 2008, Vol. 377(2), p. 189–194.

13. **Natrajan, A., Sharpe, D., Costello, J., Jiang, Q.** Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. *Anal. Biochem.*, 2010, Vol. 406(2), p. 204–213.
14. **Wang, Z., Duan, N., Li, J., Ye, J., Ma, S., Le, G.** Ultra-sensitive chemiluminescent immunoassay of Salmonella with silver enhancement of nanogold labels. *Luminescence*, 2011, Vol. 26(2), p. 136–141.
15. **Muzyka K.** Current trends in the development of the electrochemiluminescent immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, Vol. 54, p. 393–407.
16. **Wei, H., Wang, E.** Solid-state electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium. *Trends in Anal. Chem.*, 2008, Vol. 27(5), p. 447–459.
17. **Wang, L., Wei, W., Han, J., Fu, Z.** Individually addressable electrode array for multianalyte electrochemiluminescent immunoassay based on a sequential triggering strategy. *Analyst*, 2012, Vol. 137(6), p. 735–740.
18. **Cao, Y., Yuan, R., Chai, Y., et al.** A solid-state electrochemiluminescence immunosensor based on MWCNTs-nafion and Ru(bpy)₃²⁺/nano-Pt nanocomposites for detection of α -fetoprotein. *Electroanal.*, 2011, Vol. 23(6), p. 1418–1426.
19. **Zhan, W., Bard, A. J.** Electrogenated chemiluminescence. Immunoassay of human C-reactive protein by using Ru(bpy)₃²⁺- encapsulated liposomes as labels. *Anal. Chem.*, 2007, Vol. 79(2), 459–463.
20. **Wang, H., Sun, D., Tan, Z., Gong, W., Wang, L.** Electrochemiluminescence immunosensor for α -fetoprotein using Ru(bpy)₃²⁺- encapsulated liposome as labels. *Colloids Surf. B*, 2011, Vol. 84(2), p. 515–519.
21. **Guo, Z., Hao, T., Duan, J., Wang, S., Wei, D.** Electrochemiluminescence immunosensor based on graphene–CdS quantum dots–agarose composite for the ultrasensitive detection of alpha fetoprotein. *Talanta*, 2012, Vol. 89(1), p. 27–32.
22. **Pei, X., Zhang, B., Tang, J., Liu, B., Lai, W., Tang, D.** Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Anal. Chim. Acta*, 2013, Vol. 758(1), p. 1–18.
23. **Algar, W. R., Tavares, A. J., Krull, U. J.** Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. *Anal. Chim. Acta*, 2010, Vol. 673(1), p. 1–25.
24. **Liu, G., Lin, Y.** Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. *Talanta*, 2007, Vol. 74(3), p. 308–317.
25. **Dequaire, M., Degrand, C., Limoges, B.** An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Anal. Chem.*, 2000, Vol. 72(22), p. 5521–5528.
26. **Chu, X., Fu, X., Chen, K., Shen, G., Yu, R.** *Biosens. Bioelectron.*, 2005, Vol. 20(9), p. 1805–1812.
27. **Liu, G., Wang, J., Kim, J., Jan, M. R., Collins, G. E.** Electrochemical coding for multiplexed immunoassays of proteins. *Anal. Chem.*, 2004, Vol. 76(23), p. 7126–7130.
28. **Wang, J., Liu, G., Jan, M. R. J.** *Am. Chem. Soc.*, Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: Carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. 2004, Vol. 126(10), p. 3010–3011.
29. **Liu, G., Wang, J., Wu, H., Lin, Y.** *Anal. Chem.*, Versatile apoferritin nanoparticle labels for assay of protein. 2006, Vol. 78(21), p. 7417–7423.
30. **Liu, G., Wu, H., Dohnalkova, A., Lin, Y.** Apoferritin-templated synthesis of encoded metallic phosphate nanoparticle tags. *Anal. Chem.*, 2007, Vol. 79(15), p. 5614–5619.
31. **Lee, K. S., Kim, T., Shin, M., Lee, W., Park, J.** Disposable liposome immunosensor for theophylline combining an immunochromatographic membrane and a thick-@Im electrode. *Anal. Chim. Acta*, 1999, Vol. 380(1), p. 17–26.
32. **Wang, J., Liu, G., Lin, Y.** Electroactive silica nanoparticles for biological labeling. *Small*, 2006, Vol. 2(10), p. 1134–1138.
33. **Tang, D., Su, B., Tang, J., Ren, J., Chen, G.** Nanoparticle-based sandwich electrochemical immunoassay for carbohydrate antigen 125 with signal enhancement using enzyme-coated nanometer-sized enzyme-doped silica beads. *Anal. Chem.*, 2010, Vol. 82(4), p. 1527–1534.
34. **Mak, W. C., Cheung, K. Y., Trau, D., Warsinke, A., Scheller, F., Renneberg, R.** Electrochemical bioassay utilizing encapsulated electrochemical active microcrystal biolabels. *Anal. Chem.*, 2005, Vol. 77(9), p. 2835–2841.

Do redakce došlo 4. 4. 2016

Adresa pro korespondenci
Doc. RNDr. Petr Štern, CSc.
Mimoňská 637/16
190 00 Praha 9
e-mail: petr.stern@atlas.cz