

Nové trendy v imunochemii

Štern P.

Mimoňská 637/16, 190 00 Praha 9

SOUHRN

Edukační publikace se zabývá některými postupy, které rozšířily aplikaci imunochemie v posledním desetiletí. Fluorescenční imunochromatografie spojuje výhody chromatografických a imunochemických metod značených fluoroforem. Nejvíce se používá průtoková horizontální analýza s fluoroforem Alexa 647 nebo sulforhodaminem B (může být i v liposomech). Dalšími fluorofory jsou nanočástice s ionty europia, křemenem potažené či polovodičové nanokrystaly. Imunochromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií má zatím větší uplatnění ve výzkumu než v klinické laboratorní praxi. K obohacení stanoveného analytu se využívá imunoafinitní chromatografie. Ke standardizaci slouží inkorporace stabilních izotopů do cílových peptidů. V poloprovozní fázi je zavádění ultracitlivých metod: aplikace senzoru obřího elektrického odporu magnetického pole a technologie tranzistoru řízeného polem.

Klíčová slova: fluorescenční imunochromatografie, hmotnostní spektrometrie, senzor obřího elektrického odporu magnetického pole, tranzistor řízený polem.

SUMMARY

Štern P.: New trends in immunochemistry

The educational article deals with some procedures that extended applications of immunochemistry in the last decade. Fluorescence immunochromatography combines advantages of chromatographic methods and immunoassays with fluorophore labels. Flow horizontal detection using a fluorophore such as Alexa 647 or sulfo-rhodamine B (also incorporated in liposomes) is most widely used. Nanoparticles combined with europium ions, silica coated or semiconductor nanocrystals are also used as fluorophores. Immunochromatography in connection with tandem mass spectrometry has been used in research rather than in clinical laboratory practice. For enrichment of determined analyte immunoaffinity chromatography is used. For standardization incorporating stable-isotopes into the specific peptides of interest is applied. Implementing of ultrasensitive methods, such as application of giant electrical magnetoresistive sensor or field-effect transistor technology, is in a pilot stage.

Keywords: fluorescence immunochromatography, mass spectrometry, giant electrical magnetoresistive sensor, field-effect transistor.

Fluorescenční imunochromatografie

Imunochromatografie spojuje výhody chromatografických a imunochemických technik a uplatňuje se zejména při urgentních vyšetřeních. Imunochromatografie je podobná technice ELISA, pouze s tím rozdílem, že imunochemická reakce probíhá na chromatografickém papíře během kapilární migrace. Analytický systém sestává ze čtyř částí: podložky pro vzorek, absorpční podložky, nitrocelulózkové membrány a konjugační podložky [1] obsahující detekční pufr. Antigen (Ag), obsažený ve vzorku po nanesení na podložku difunduje přes absorpční podložku do nitrocelulózkové membrány, kde tvoří imunokomplex se zakotvenou protilátkou (Ab), která je značená fluoroforem. Během několika minut se imunokomplex posune na fluorescenční linii, kde se kvantitativně měří fluorescence [2]. S fluorescenční značkou se nejvíce používá **průtoková horizontální imunoanalýza** [3]. Vnitřním standardem je králičí Ab a jako fluorofory se používají buď Alexa 647 nebo sulforhodamin B. Detekce se provádí laserovým fluorescenčním skenerem. Proužky pro stanovení lidského sérového albuminu mohou mít dvojí uspořádání. Při kompetitivním postupu obsahuje detekční pufr lidský albumin a králičí anti-IgG; oba značené fluoroforem. Monoklonální Ab vůči lidskému albuminu je imobi-

lizována na linii testu a králičí IgG na kontrolní linii. Značený a neznačený lidský albumin soutěží o vazebná místa specifické Ab, která je k dispozici v omezeném množství (obr. 1) a měřený signál je nepřímo úměrný koncentraci albuminu. Při inhibiční imunoanalýze obsahuje detekční pufr králičí anti-IgG Ab a monoklonální Ab vůči lidskému albuminu, obě značené fluoroforem. Lidský albumin je zakotvený na linii testu a králičí IgG na kontrolní linii. Stanovovaný sérový albumin inhibuje odpovídající značenou monoklonální Ab při vazbě na albumin v linii testu (obr. 2) a měřený signál je nepřímo úměrný koncentraci albuminu. Kompetitivní fluorescenční imunochromatografie byla použita také ke stanovení albuminu v moči [4]. Při stanovení mikrocystinu

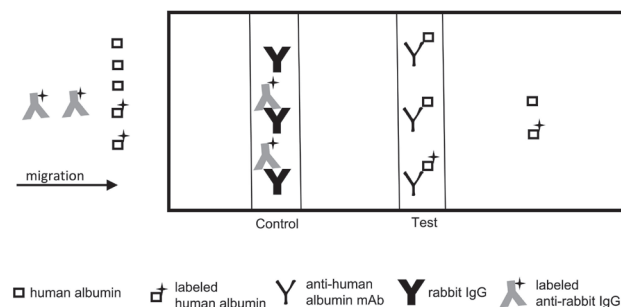


Fig. 1. Competitive immunoassay

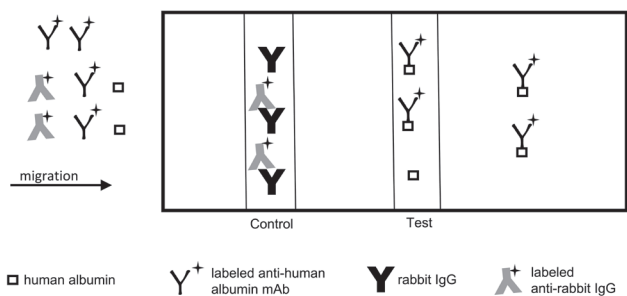


Fig. 2. Inhibitive immunoassay

[5] bylo zjištěno, že detekční limit (LOD) je pro inhibiční postup o polovinu nižší, než v kompetitivním provedení. Pro stanovení C-reaktivního proteinu (CRP) v séru [6] byl LOD 0,133 mg/l a rozsah linearity 0 – 10 mg/l. Prostatický sérový antigen (PSA) lze stanovit imunochromatografií v sendvičovém uspořádání s fluorescenčním barvivem Alexa 647 [3] a laserovým skenerem za 15 min v rozsahu 2,5 – 8 µg/l. Preciznost v sérii je < 6,5 %, mezi sériemi 4,5 %. Později [7] byl postup vylepšen a je použitelný v rozsahu 0,72 – 46 µg/l. Vzorek se smíchá s detekčním roztokem, který obsahuje monoklonální Ab vůči PSA značenou fluoroforem a biotin konjugovaný přes hovězí albumin s fluoroforem (jako vnitřní standard). Laserovým skenerem se hodnotí fluorescence vzniklého sendviče (obr. 3) proti značenému biotinu na streptavidinové kotvě. Sendvičový postup byl také popsán pro fluorescenční imunochromatografii β-podjednotky choriového gonadotropinu (β-hCG) [8] v rozsahu 0 – 1000 IU/l a pro tyreotropin (TSH) [9] v rozsahu 1 – 40 mU/l.

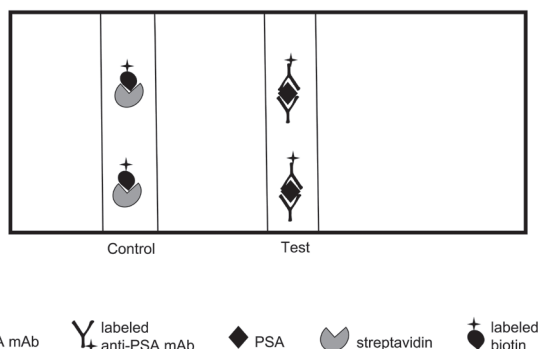


Fig. 3. Sandwich immunoassay

Monoklonální Ab značená **liposomy, plněnými sulforhodaminem B** (emituje světlo 520 nm), byla použita při imunochromatografickém stanovení produktů kyanobakteriálních toxinů: mikrocystinů a nodularinů [10]. Citlivost metody byla 10x lepší než při značení koloidním Au. Dosažený LOD pro mikrocystiny byl 60 ng/l při preciznosti < 13 %.

Nanočástice obsahující Eu³⁺ byly využity při imunochromatografickém stanovení CRP [11]. LOD metody byl < 0,2 µg/l a rozsah linearity 0,2 – 200 µg/l. Cheláty Eu³⁺ s křemennými nanočásticemi umožňují stanovit povrchový Ag hepatitidy B (HBsAg) [12]. Na nanočástici je přes dextran kovalentně vázáno velké množství iontů Eu³⁺ (6,86x10⁵), poskytujících intenzivní fluorescenci při 615 nm. Tak byl dosažen LOD 30 ng/l,

což je 100x nižší hodnota než při aplikaci koloidního Au. Metoda je lineární v rozsahu 50 – 3130 ng/l s precizností 2,3 – 10,4 %.

Anorganické **nanokrystaly fluoreskujících oxysulfidů potažené SiO₂** se mohou uplatnit jako zesilovací luminofory (oxysulfidy Er nebo Tm), které jsou excitovány infračerveným zářením (laser 980 nm) a emitují fotony ve viditelném spektru (Er 550 nm, Tm 480 nm) [13]. Tak lze detekovat 10 ng/l hCG (rozsah měření přesahuje tři řády), přičemž LOD je 10x nižší než při imunochromatografii s koloidním Au. Vzorek po nanesení na nitrocelulózovou membránu difunduje přes proužek s luminiscenčními nanočásticemi, které unášejí k linii specifické Ab. Fluorescence linie testu se ještě koriguje na pozadí (fluorescence membrány po ukončení difuze) a na kontrolní linii (obsahuje kontrolní Ab). Při použití obou luminoforů (Er a Tm) lze stanovit dva imunogeny současně a detekci provést při dvou vlnových délkách.

Imunochromatografie se provádí také s **polovodičovými nanokrystaly** [14]. Nanočástice mají ve srovnání s konvenčními fluorofory vynikající fluorescenční vlastnosti: fluorescence je nastavitelná podle velikosti částice, absorpční (excitační) spektrum je široké, emisní spektrum je úzké a symetrické, intenzita fluorescence je vysoká a nanokrystaly zabraňují zeslabování světla. Na tomto principu byl stanoven nitrovaný ceruloplazmin s LOD 8 µg/l [15]. Používá se sendvičová varianta, kdy vzorek difunduje membránou do konjugací zóny, kde se nitrovaný ceruloplazmin naváže na anti-tyrosin, značený polovodičovými nanokrystaly. Konjugát dále migruje k zóně s Ab vůči ceruloplazminu. Zde vzniká sendvič a přebytek volného značeného anti-tyrosinu odchází do odpadu. Fluorescence sendvičové zóny se měří při 585 nm. Kompetitivní postup byl aplikován při stanovení 3,5,6-trichlorpyridinolu [16]. Vzorek difunduje k zóně s Ag značeným polovodičovými nanokrystaly (CdS-ZnS). Značený a volný Ag pak při další migraci dosáhnou zóny s Ab a soutěží o její vazebná místa. Přebytek značeného Ag odchází do odpadu a měřený signál (v zóně Ab excitace 330 nm, emise 655 nm) je nepřímo úměrný množství 3,5,6-trichlorpyridinolu ve

Oligomers polymaleic acid n-hexadecanol ester

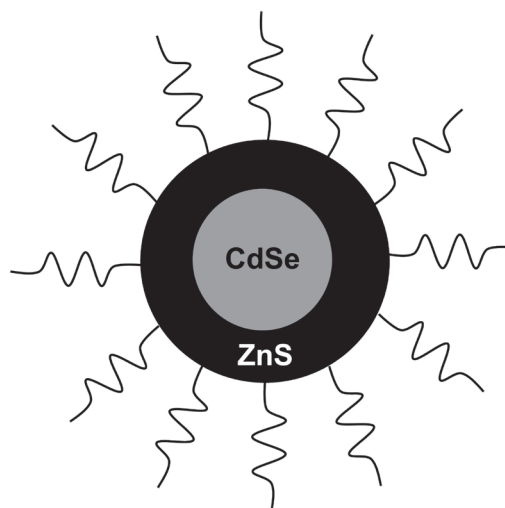


Fig. 4. Microspheres of semiconductor nanocrystals

vzorku. Provedení imunoreakce trvá 15 min, LOD metody je 1 µg/l, rozsah linearity 1 – 50 µg/l, preciznost 6,3 – 12,9 % a zpětný výtěžek 102 %. Fluoreskující polovodičové nanokrystaly CdSe/ZnS (průměr 50 – 150 nm) umožňují stanovit hCG s 20x lepší citlivostí (0,5 IU/l) než běžně používaný barevný latex nebo koloidní Au [17]. Hydrofobní nanokrystaly jsou potažené oligomery (molekulová hmotnost < 2000) n-hexadekanolesteru polymaleinové kyseliny (obr. 4), které mají amfifilní (tj. současně hydrofilní i lipofilní) vlastnosti. Ab vůči hCG je připojena k oligomerům karbodiimidem a ukotvena v zóně testu na nitrocelulóзовou membránu. Fluorescence se sleduje při 370 nm za 10 min od pipetování vzorku na začátek membrány.

Hmotnostní spektroskopie

Klasické imunoanalytické metody umožňují stanovit velké množství jednotlivých proteinů a jiných látek, ale výsledky nemusí být spolehlivé v důsledku matrice, autoproti látek, Abs vůči reagentům a vlivem nadbytku Ag. **Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS)** může projevy těchto nedostatků zmenšit [18]. Kvantifikace proteinů začíná jejich účinnou degradací proteázou (obvykle trypsinem) a následnou separací vzniklých peptidů vysokou účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Potom hmotnostní spektrometr na základě poměru hmotnosti iontu a jeho náboje (m/z) separuje cílový peptid, provede jeho fragmentaci a kvantifikuje cílový fragment. Specifita tohoto postupu je dána třístupňovou separací: rozdělení peptidů HPLC na základě hydrofobicity (UV detektor sleduje eluované peptidy); 1. kvadrupól (obr. 5) na základě poměru m/z vybere peptidy se stejným m/z a kolizní 2. kvadrupól štěpí peptidy na fragmenty; 3. kvadrupól vybere cílový fragment a ionty, které dosáhnou detektoru, pak mají přiřazeny prekurzor ke stanovenému fragmentu. V prvním kroku probíhá chromatografie obvykle na reverzní fázi, která je nepolární a silně váže hydrofobní molekuly. To umožňuje intenzivní promytí peptidů před jejich postupným uvolňováním organickým rozpouštědlem. Ve druhém kroku peptidy přecházejí do elektrického pole hmotnostního spektrometru, kde jsou rozdělovány na základě poměru m/z . Ionty jsou vychylovány konstantní silou a urychlení každého iontu je nepřímě úměrné jeho m/z . Tak je separován cílový peptid a další látky s nastaveným poměrem m/z , které prochází prvním kvadrupólem. Ve druhém kvadrupólu jsou např. dva peptidy (obr. 5). K odlišení cílového peptidu od irrelevantních molekul je druhý kvadrupól naplněn inertním kolizním plynem, aby se zajistila fragmentace molekul. Vzniklé peptidové fragmenty jsou pak separovány ve třetím kvadrupólu; fragment s nastaveným poměrem m/z dopadá na detektor a jeho signál je registrován. Když je vybrán v prvním kvadrupólu prekurzor se specifickým m/z a ve třetím kvadrupólu fragment se specifickým m/z – toto spojení se označuje jako přechod (transition). Eluční program HPLC ve spojení s trojitým kvadrupólem umožňuje sledovat v jednom vzorku velké množství analytů a řadu jejich přechodů současně (mul-

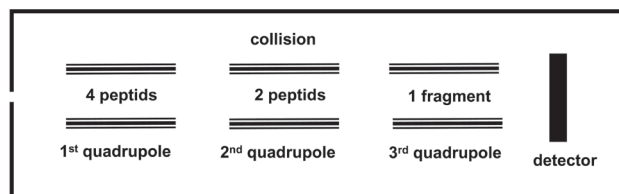


Fig. 5. Tandem mass spectrometry

tiple reaction monitoring – MRM) [19]. Určitým omezením je to, že některé peptidy neposkytují přechody, při kterých vzniká silný signál v poměru k šumu.

Nejjednodušší metoda stanovení proteinů MS je zahájena proteolýzou enzymem a změřením plochy píku jednoho nebo více takto vzniklých peptidů po separaci HPLC. Zatímco se chromatograficky účinně oddělí cílový analyt od mnoha příměsí, některé molekuly jsou vymývány současně s cílovým analytem (jejich koncentrace kolísá mezi jednotlivými pacienty) a mohou potlačovat jeho ionizaci [20] při následné detekci MS. Kromě toho odezva spektrometru během dne kolísá, a proto je nutné vztahovat plochu měřeného píku k ploše píku vnitřního standardu, aby se eliminovalo možné potlačení ionizace. K tomu se obvykle používají **stabilní izotopy cílových peptidů**, obsahující deuterium, ^{13}C nebo ^{15}N . Tyto izotopy jsou chemicky identické s měřenými peptidy, ale spektrometr je na základě rozdílu v jejich hmotnosti rozliší. Proteolýza a přímé stanovení po izotopovém ředění byly využity např. ke stanovení Zn- α -glykoproteinu (LOD 0,08 mg/l, rozsah linearity 0,32 až 10,2 mg/l, preciznost v sérii 5,0 až 6,3 %, mezi sériemi 4,4 až 5,9 %) [21] nebo ceruloplazminu u novorozenců v krevních skvrnách (LOD 7 mg/l, rozsah linearity 200 až 950 mg/l, preciznost v sérii 9,2 až 10,7 %, mezi sériemi 5,8 až 8,9 %) [22].

Nejdůležitějším postupem při detekci proteinů, vyskytujících se ve velmi nízkých koncentracích v séru, je technika zvýšení množství cílových peptidů po proteolýze séra a jejich detekce tandemovou MS. Tak byl pro CRP po proteolýze trypsinem dosažen LOD 1 nmol/l [23]. Ke značení peptidů se použil ^{13}C -leucin. Kalibrace byla v rozsahu 1 – 1000 nmol/l ^{12}C -CRP peptidu. Za nejvíce specifické se považuje **obohacení cílového analytu imunoafinitní chromatografií** [24]. Cílový protein, tj. lehký řetězec myozinu I, byl izolován imunoafinitní purifikací specifickou Ab, následovala proteolýza na kuličkách potažených trypsinem a MS detekce odpovídajícího peptidu s využitím trojitého kvadrupólu. Proměnlivost imunoafinitního obohacení lze regulovat v tomto kroku přidáním peptidu značeného stabilním izotopem [25]. Metodika využití standardů se stabilními izotopy a záchytu Abs vůči peptidům se označuje jako SISCAPA (Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies). Abs jsou imobilizovány na 100 nl kolonkách z litého křemene a zachytí jak přirozené peptidy, tak vnitřní standardy syntetických peptidů značených stabilním izotopem ^{13}C . Kolonky se mohou recyklovat s malou ztrátou vazebné kapacity a variační koeficient mezi cykly je přibližně 5 %. Imunoafinitní chromatografií lze dosáhnout 120násobného obohacení antigenů ve srovnání s jinými MS separačními meto-

dami, jako je monitorování vybraného iontu (selected ion monitoring = SIM) nebo reakce (selected reaction monitoring = SRM) elektrospreji. Postup je výhodný zejména pro stanovení proteinů, které se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Kombinace MS imunoanalýzy a MRM je perspektivní, protože umožní spolehlivou kvalitativní i kvantitativní analýzu, mezilaboratorní standardizaci a vytvoření atlasu standardů, značených stabilními izotopy [26].

Ve srovnání s postupy ELISA a RIA umožňuje MS jednoznačně určit známé analyty, simultánně detekovat analyty s podobnou imunoreaktivitou a identifikovat izoformy proteinů, zachycené na Abs.

Kvantitativní stanovení proteinů LC-MS/MS má řadu úskalí, takže stále nepatří mezi rutinní laboratorní metody. Koncentrace proteinů se pohybuje v rozsahu deseti řádů, ale odstranění hojně se vyskytujících proteinů imunoafinitní chromatografií nemusí být dobré řešení [27], protože cílové proteiny se mohou vázat na imunoglobuliny (např. tyreoglobulin na autoprotilátky), nebo na albumin (35 proteinů). Dalším problémem, souvisejícím se složitostí plazmy, je dostatečné množství výchozího materiálu pro získání peptidů v koncentraci potřebné ke stanovení MS (fmol), tedy 20 – 100 μ l plazmy nebo > 1 mg proteinu [22 – 24, 28]. Mimoto se může projevit nečekaná interference homologických peptidů při imunoafinitním obohacení. Přestože je dostupná kompletní sekvence lidského genomu, nelze předvídat rozsah soupeření podobných peptidů o vazebná místa Ab. Plazmatický proteom dosud není z velké části definovaný, a pravděpodobnost výskytu peptidů podobných cílovým peptidům je značná, zejména při studiu velmi nízkých koncentrací peptidů. Lidský genom je z 99 % identický, ale přesto existují > 3 miliony individuálních rozdílů. Polymorfismus exonů vede k substituci aminokyselin (AA), a následkem je diskrepance mezi laboratořemi při imunoanalýze proteinů [18], která ovlivňuje také MS analýzy. Jakékoliv změny AA v cílových peptidech způsobují problémy při jejich detekci MS. Pro důvěryhodnou kvantifikaci proteinu se doporučuje paralelní stanovení alespoň tří peptidů; optimální je použití monoklonálních Abs vůči pěti peptidům. Zajímavé je použití MS pro cílové analyty, které mají mezi sebou nepolymorfní peptidy. Vedle polymorfismu ovlivňují imunoanalýzy a MS také posttranslační modifikace, např. u tyreoglobulinu ovlivňují glykosylace, jodace, fosforylace, oxidace a sulfatace až 10 % tohoto proteinu [28]. Další komplikací jsou četné izoformy u mnoha proteinů. K tomu dochází při spojování u transkripce nebo při posttranslačním proteolytickém štěpení, a navíc jsou některé posttranslační produkty nestabilní (např. karbonylové adukty).

I když se MS v klinických laboratořích používá delší dobu, sledování peptidů při stanovení proteinů vyžaduje některé úpravy pracovních postupů. Je třeba monitorovat potlačení tvorby iontů analytu v případě, že ve stejném okamžiku vznikají konkurenční ionty z látek, které jsou přítomny v řádově vyšších koncentracích (např. soli ze vzorku) [29]. Při sekundární iontové MS se sleduje vznik izobarické interference mezi rozprašovanými molekulárními ionty a cílovými ionty. Také se

hodnotí zavlečená chyba (0,01 – 1 %) podle použitého automatického dávkovače a analytu [18]; je třeba si uvědomit, že hodnoty koncentrace, např. CA 19-9 a hCG, kolísají v rozpětí až osmi řádů. Při detekci koncentrace syntetických peptidů MS získáváme obecně lineární odezvu signálu, ale to nemusí platit pro analýzy klinických vzorků. Použité Abs musí mít vysokou čistotu a reakční pufr nesmí obsahovat funkční skupiny ovlivňující ukotvení Ab na její nosič [30]. Příkladem je jemná ionizační technika podobná ionizaci elektrosprejem, označovaná jako **iMALDI** (imunoanalýza a maticí zprostředkovaná laserová desorpce s následnou ionizací). Vzorek se smíchá s maticí a aplikuje na kovovou porézní podložku se zakotvenou Ab. Po promytí se ozáří pulzním laserem, a tím se desorbuje. Analyt se rychle převede do plynné fáze, ionizuje a detekuje MS. LOD je 0,5 – 1,0 % cílového analytu v analyzované směsi látek.

Ultracitlivé metody

Do tohoto souboru se počítají kromě už uvedených imunochromatografických metod, známých elektrochemických a optických metod (včetně těch vyžadujících vlnovody), také magnetorestriktivní metody a postupy využívající tranzistor řízený polem (obsahující nanovlákná, nanotyčinky nebo nanopásku) [31], které budou blíže vysvětleny.

Senzor obřího elektrického odporu magnetického pole (GMR = giant magnetoresistive) pracuje na principu přeladění spinu elektronů v magnetickém poli. Jak vyplývá z kvantového stavu, vyvolává malá změna v magnetickém poli velký pokles elektrického odporu (proto je v názvu „obří“). Tento postup se používá již řadu let ke kódování harddisků. GMR senzor tvoří magneticky velmi uniformní nanočástice. Destička (o délce 13 – 300 nm) má na krajích ferromagnetické Co lišty, které jsou spojeny nemagnetickým Cu proužkem. Ferromagnetické části jsou potaženy Ab. Při vyrovnání směru spinů externím magnetickým polem dochází v magnetických vrstvách ke změně odporu za Cu vrstvou: bez magnetizace je elektrický odpor nekonečný, po zavedení magnetického pole je 50% (obr. 6). Elektrony se správným směrem spinu procházejí mezi jednotlivými vrstvami bez rozptylu, elektrony s nesprávným

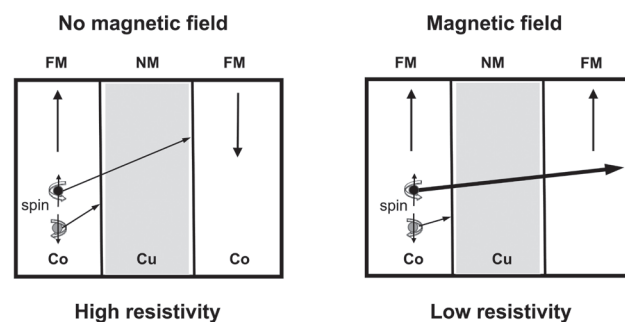


Fig. 6. Giant magnetoresistive effect: FM – ferromagnetic layer, NM – non-magnetic layer

ným směrem spinu jsou zadržovány – proto je elektrický odpor 50%. LOD dosažený GMR senzorem je 5 fmol/l [32], přičemž je možné stanovit 64 analytů simultánně během 4 s. Většina publikací popisuje obvykle analýzu jednoho analytu. Interleukin-6 byl stanoven jak sendvičovým (LOD 10 amol/l), tak kompetitivním (LOD 50 fmol/l) postupem [31]. Stanovení parathormonu lze provést za 15 min jednostupňovou reakcí bez promývání [33]. LOD závisí na velikosti nanočástice pro 500 nm je 0,8 pmol/l, ale pro 300 nm jen 10 pmol/l.

Technologie tranzistoru řízeného polem využívá unipolární tranzistory. Unipolární tranzistor je polovodičový prvek, jehož označení vyjadřuje, že přenos náboje se v něm uskutečňuje pouze většinovými nosiči náboje (na rozdíl od bipolárního tranzistoru). Menšinové nosiče náboje jsou pro funkci tranzistoru nežádoucí – jsou parazitního charakteru (vzniká Joulovo teplo, které mikročip není schopen odvést).

Pro velký vstupní odpor se těmto tranzistorům také říká tranzistory řízené elektrickým polem. Velký vstupní odpor je sice velkou výhodou unipolárních tranzistorů, ale nutno mít na paměti, že vysoká vstupní impedance může vést k jejich poškození statickým nábojem.

Tranzistor řízený polem (FET) sestává ze tří částí: kolektoru, báze (tj. vstupního hradla s Ab) a emitoru. V polovodiči (obr. 7) je proud veden elektrony (negativní částice – n kanál) nebo děrami v místech chybějících

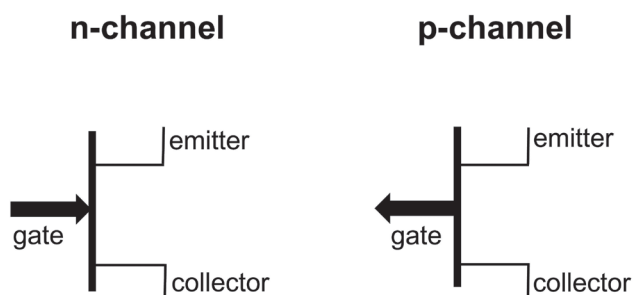


Fig. 7. Field-Effect Transistor

elektronů (kde je kladný náboj – p kanál). Tranzistor se skládá z polovodičů typu n a p, přičemž výrazně převládá jeden z nich. Náboj na povrchu hradla způsobuje odpuzování elektronů nebo volných děr v oblasti substrátu pod hradlem a dochází k vyčerpání nosiče (Ab). Je-li náboj dostatečný, dochází k propojení kolektoru s emitorem. Výhodou FET oproti elektrochemickým metodám je to, že se nepoužívá značek. Proud v tranzistoru je ovlivňován povrchovým nábojem. Protein má charakteristický náboj a vazebná reakce je stanovena přímo jako funkce náboje navázané látky. Nevýhodou tohoto postupu je, že detekce náboje imunogenu na hradle velmi závisí na iontové síle a pH. Značně se uplatňuje také vliv matrice. Systém je citlivý na prostorové rozdělení náboje, takže molekuly vzdálenější od hradla se uplatňují méně [31]. Technologie FET byla použita při stanovení CRP, karcinoembryonálního Ag (CEA), PSA, troponinu I, imunoglobulinu G (IgG) a simultánně lze stanovit i dva analyty (hemoglobin – Hb a glykovaný hemoglobin – HbA_{1c}) [31].

Předností FET je, že citlivost stanovení roste při zmenšení velikosti zařízení. Kolektor s emitorem může spojit křemíkové nanovláknko o délce 2 μm. Při elektroforetickém nanášení Ab na nanovláknko lze pro PSA dosáhnout LOD 1 amol/l [34]. Uhlíkové nanotyčinky jsou menší než nanovláknka a umožňují dosáhnout ještě nižší LOD. Nanovláknka jsou vyráběna sedmistupňovým procesem a jejich zabudování do FET je další devítistupňový postup [35]. Široké použití je výhodné při nízké ceně komponentů, ale toho lze dosáhnout jen při velkovýrobě FET.

Literatura

1. **Pyo, D., Yoo, J.** New trends in fluorescence immuno-chromatography. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2012, Vol. 33 (1), p. 203–222.
2. **Ho, J. A. A., Wauchope, R. D.** A strip liposome immunoassay for aflatoxin B1. *Anal. Chem.*, 2002, Vol. 74 (7), p. 1493–1496.
3. **Choi, S., Choi, E. Y., Kim, D. J., Kim, T. S., Oh, S. W.** A rapid simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I). *Clin. Chim. Acta*, 2004, Vol. 339 (1-2), 147–156.
4. **Choi, S., Choi, E. Y., Kim, H. S., Oh, S. W.** On-site quantification of human urinary albumin by a fluorescence immunoassay. *Clin. Chem.*, 2004, Vol. 50 (6), p. 1052–1055.
5. **Kim, Y. M., Oh, S. W., Joeng, S. Y., Pyo, D. J., Choi, E. Y.** Development of an ultrarapid one-step fluorescence immunochemical assay system for the quantification of microcystins. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, Vol. 39 (9), p. 1899–1904.
6. **Ahn, J. S., Choi, S., Jang, S. H., et al.** Development of a point-of-care assay system for high-sensitivity C-reactive protein in whole blood. *Clin. Chim. Acta*, 2003, Vol. 332 (1-2), p. 51–59.
7. **Yoo, J., Jung, Y. M., Hahn, J. H., Pyo, D. J.** Quantitative analysis of a prostate-specific antigen in serum using fluorescence immunochemical assay. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2010, Vol. 31 (4), p. 259–265.
8. **Kim, K. J., Cho, Y., Choi, E. Y.** Development of a fluorescence immunochemical assay for rapid quantification of beta-hCG in serum sample. *Korean J. Obstet. Gynecol.*, 2003, Vol. 46 (6), p. 1195–1201.
9. **Jeong, D. S., Kang, S. H., Choi, M. G., Choi, E. Y.** Preliminary study on the development of a fluorescence immunochemical assay for the rapid quantification of the thyroid stimulating hormone in serum sample. *Korean J. Lab. Med.*, 2003, Vol. 23 (6), p. 375–381.
10. **Khreich, N., Lamourette, P., Lagoutte, B., et al.** A fluorescent immunochemical test using immunoliposomes for detecting microcystins and nodularins. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, Vol. 397 (5), p. 1733–1742.
11. **Song, X., Knotts, M.** Time-resolved luminescent lateral flow assay technology. *Anal. Chim. Acta*, 2008, Vol. 626 (2), p. 186–192.
12. **Xia, X., Xu, Y., Zhao, X., Li, Q.** Lateral flow immunoassay using europium chelate-loaded silica nanoparticles as labels. *Clin. Chem.*, 2009, Vol. 55 (1), p. 179–182.
13. **Hampel, J., Hall, M., Mufti, N. A., et al.** Upconverting phosphor reporters in immunochemical assays. *Anal. Biochem.*, 2001, Vol. 288 (2), p. 176–187.

14. **Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A. P.** Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, Vol. 281 (5385), p. 2013–2016.
15. **Li, Z., Wang, Y., Wang, J., Tang, Z., Pounds, J. G., Lin, Y.** Rapid and sensitive detection of protein biomarker using a portable fluorescence biosensor based on quantum dots and a lateral flow test strip. *Anal. Chem.*, 2010, Vol. 82 (16), p. 7008–7014.
16. **Zou, Z., Dan, D., Jun, W., et al.** Quantum dot-based immunochromatographic fluorescent biosensor for biomonitoring trichloropyridinol, a biomarker of exposure to chlorpyrifos. *Anal. Chem.*, 2010, Vol. 82 (12), p. 5125–5133.
17. **Zhou, C., Yuan, H., Shen, H. et al.** Synthesis of size-tunable photoluminescent aqueous CdSe/ZnS microspheres via a phase transfer method with amphiphilic oligomer and their application for detection of HCG antigen. *J. Mater. Chem.*, 2011, Vol. 21 (20), p. 7393–7400.
18. **Hoofnagle, A. N., Wener, M. H.** The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J. Immunol. Methods*, 2009, Vol. 347(1-2), p. 3–11.
19. **Anderson, L., Hunter, C. L.** Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, 2006, Vol. 5 (4), p. 573–588.
20. **Annesley, T. M.** Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2003, Vol. 49 (7), p. 1041–1044.
21. **Bondar, O. P., Barnidge, D. R., Klee, E. W., Davis, B. J., Klee, G. G.** LC-MS/MS quantification of Zn- α 2 glycoprotein: a potential serum biomarker for prostate cancer. *Clin. Chem.*, 2007, Vol. 53 (4), p. 673–678.
22. **deWilde, A., Sadilkova, K., Sadilek, M., Vasta, V., Hahn, S. H.** Tryptic peptide analysis of ceruloplasmin in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to newborn screening. *Clin. Chem.*, 2008, Vol. 54(12), p. 1961–1968.
23. **Kuhn, E., Wu, J., Karl, J., Liao, H., Zolg, W., Guild, B.** Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ^{13}C -labeled peptide standards. *Proteomics*, 2004, Vol. 4 (4), p. 1175–1186.
24. **Berna, M. J., Zhen, Y., Watson, D. E., Hale, J. E., Ackermann, B. L.** Strategic use of immunoprecipitation and LC/MS/MS for trace-level protein quantification: myosin light chain 1, a biomarker of cardiac necrosis. *Anal. Chem.*, 2007, Vol. 79 (11), p. 4199–4205.
25. **Anderson, N. L., Anderson, N. G., Haines, L. R., Hardie, D. B., Olafson, R. W., Pearson, T. W.** Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res.*, 2004, Vol. 3 (2), p. 235–244.
26. **Parker, C. E., Pearson, T. W., Anderson, N. L., Borchers, C. H.** Mass-spectrometry-based clinical proteomics – a review and prospective. *Analyst*, 2010, Vol. 135 (8), p. 1830–1838.
27. **Gundry, R. L., Fu, Q., Jelinek, C. A., Van Eyk, J. E., Cotter, R. J.** Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics: Clin. Appl.*, 2007, Vol. 1 (1), p. 73–88.
28. **Hoofnagle, A. N., Becker, J. O., Wener, M. H., Heinecke, J. W.** Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2008, Vol. 54 (11), p. 1796–1804.
29. **Friedecký, D., Lemr, K.** Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.*, 2012, Vol. 20 (3), p. 152–157.
30. **Yassine, H., Borges, C. R., Schaab, M. R., et al.** Mass spectrometric immunoassay and multiple reaction monitoring as targeted ms-based quantitative approaches in biomarker development: potential applications to cardiovascular disease and diabetes. *Proteomics Clin. Appl.*, 2013, Vol. 7(7-8), p. 528–540.
31. **Gordon, J., Michel, G.** Discerning trends in multiplex immunoassay technology with potential for resource-limited settings. *Clin. Chem.*, 2012, Vol. 58 (4), p. 690–698.
32. **Hall, D. A., Gaster, R. S., Lin, T., et al.** GMR biosensor arrays: a system perspective. *Biosens. Bioelectron.*, 2010, Vol. 25 (9), p. 2051–2057.
33. **Dittmer, W. U., de Kievit, P., Prins, M. W. J., Vissers, J. L. M., Mersch, M. E. C., Martens, M.** Sensitive and rapid immunoassay for parathyroid hormone using magnetic particle labels and magnetic actuation. *J. Immunol. Methods*, 2008, Vol. 338 (1-2), p. 40–46.
34. **Gong, J. R.** Label-free attomolar detection of proteins using integrated nanoelectronic and electrokinetic devices. *Small*, 2010, Vol. 6 (8), p. 967–973.
35. **Patolsky, F., Zheng, G. F., Lieber, C. M.** Fabrication of silicon nanowire devices for ultrasensitive, label-free, real-time detection of biological and chemical species. *Nat. Protoc.*, 2006, Vol. 1 (4), p. 1711–1724.

Do redakce došlo 7. 7. 2016

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