

Aplikace imunochemické metody ELISA v analytice životního prostředí

Bc. Petr Cviček

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Petr Cviček

Osobní číslo: T090178

Studijní program: B 2808 Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: Chemie a technologie materiálů

Téma práce: Aplikace Imunochemické metody ELISA v analytice životního prostředí

Zásady pro vypracování:

Shromážděte dostupné údaje především s využitím internetových zdrojů informací

Popište princip metody její výhody, potencionální aplikace

Uvedte přehled komerčně dostupných aplikací metody v oblasti ŽP

Na závěr kriticky zhodnoťte výhody a nevýhody metody, její proveditelnost v laboratoři ústavu a možné přínosy.

Uvedené body sepište v předepsané formě BP

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Základy buněčné biologie, B. Alberts a kol. nakl.: Espero Publishing, 2005, ISBN-10:
80-902906-2-0 - A User's Guide to Environmental Immunochemical Analysis
www.epa.gov/heasd/edrb/chemistry/immochem/user-guide.html

Laboratorní metody

<http://www.pr-lab.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>

Overview of ELISA

<http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>

Practice and theory of enzyme immunoassays, 1985, P. Tijssen

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

10. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

1. června 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně: 30.5.2012


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá popisem laboratorní metody ELISA. Úvodní část se věnuje rozboru jednotlivých složek testu. Od použitých chemikálií až po přístrojové vybavení. Dále jsou vysvětlena různá uspořádání metody.

Možné využití metody ELISA pro analýzu a detekci látek v oblasti životního prostředí je cílem závěrečné části práce. Jsou popsány možnosti detekce toxinů, endokrinních disruptorů, léčiv, alergenů a GMO. Výsledky testů ELISA jsou srovnávány s alternativními metodami.

Klíčová slova: ELISA, environmentální analýza, laboratorní metoda, detekce, toxiny, endokrinní disruptory, alergeny, GMO, léčiva, pesticidy

ABSTRACT

This bachelor thesis is concerned to the description of the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). The first part is devoted to analysis of individual components of the test. From used chemicals to the instrumentation. In addition, various configurations of ELISA are explained.

The final aim of the work is the possible use of ELISA for the analysis and detection of substances in the environment. The possibility of detection of toxins, endocrine disruptors, pharmaceuticals, allergens and GMOs is described and compared with alternative methods.

Keywords: ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, environmental analysis, detection, toxins, GMO, endocrine disruptors, allergens

Poděkování

Chtěl bych poděkovat doc. Mgr. Markovi Koutnému Ph.D. za odborné vedení a za cenné rady, podněty a připomínky při zpracování mé bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

Ve Zlíně: 30.5.2012

.....

Podpis

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| 1 LABORATORNÍ METODA ELISA | 11 |
| 1.1 HISTORIE METODY ELISA | 11 |
| 1.2 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) – SLOŽKY TESTU | 11 |
| 1.2.1 Požadavky na metodu | 12 |
| 1.2.2 Mikrotitrační destička | 13 |
| 1.2.3 Čtečka destiček (microplate reader)..... | 14 |
| 1.2.4 Myčka destiček (microplate washer) | 15 |
| 1.2.5 Antigen a epitop | 15 |
| 1.2.6 Antibody – protilátky | 16 |
| 1.2.7 Hovězí sérový albumin (BSA) | 17 |
| 1.2.8 Konjugát..... | 17 |
| 1.2.9 Hapten | 18 |
| 1.2.10 Biotin, Biotinylace | 18 |
| 1.2.11 Avidin..... | 19 |
| 1.2.12 Křenuv peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase) | 20 |
| 1.2.13 Alkalická fosfatáza (AP) | 21 |
| 1.2.14 HRP substrát..... | 21 |
| 1.2.15 Substrát pro alkalickou fosfatázu (AP) | 22 |
| 2 ELISA – POSTUP | 23 |
| 2.1 ELISA - VARIANTY | 23 |
| 2.1.1 Přímá ELISA | 23 |
| 2.1.2 Nepřímá ELISA | 24 |
| 2.1.3 Sendvičová ELISA | 24 |
| 2.1.4 Kompetitivní ELISA | 24 |
| 2.2 MOŽNOST POUŽITÍ V LABORATOŘÍCH UTB | 25 |
| 3 ALTERNATIVNÍ A KONKURENČNÍ METODY | 26 |
| 3.1 WESTERN BLOT..... | 26 |
| 3.2 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION), REAL-TIME PCR..... | 27 |
| 3.3 BIOSENZORY – OKAMŽITÉ NAMĚŘENÉ HODNOTY | 28 |
| 3.4 KAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIE – HMOTOVÁ SPEKTROMETRIE (LC/MS) | 29 |
| 4 DETEKCE LÁTEK V ENVIRONMENTÁLNÍ PRAXI | 30 |
| 4.1 TOXINY | 30 |
| 4.1.1 Cyanotoxiny | 30 |
| 4.1.2 Mykotoxiny..... | 31 |
| 4.1.3 Detekce toxinů | 32 |
| 4.2 HORMONY A ENDOKRINNÍ DISRUPTORY | 33 |
| 4.2.1 Vliv na ryby a vodní živočichy | 34 |
| 4.2.2 Detekce disruptorů | 35 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 4.3 | PESTICIDY | 36 |
| 4.4 | LÉČIVA V PITNÉ VODĚ | 37 |
| 4.5 | ANTIBIOTIKA..... | 39 |
| 4.6 | ALERGENY V POTRAVINÁCH..... | 39 |
| 4.7 | GMO POTRAVINY | 40 |
| 4.7.1 | Jaké jsou výhody GMO potravin?..... | 40 |
| 4.7.2 | Detekce GMO | 41 |
| | ZÁVĚR | 42 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 43 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 49 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 50 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 51 |

ÚVOD

Problém se znečištěním životního prostředí patří v dnešní době k široce diskutovanému a je mu věnována vysoká pozornost. K určení stupně znečištění je nutné přesné a rychlé měření škodlivých látek. Rychlost a snadnost použití je důležitá zvláště při analýze přímo v terénu, kde nelze očekávat používání složitých laboratorních zařízení ve srovnání s praxí v oblasti medicíny.

Aplikace imunochemických metod při analýze životního prostředí je relativně nová. Tyto metody jsou založeny na použití specifických protilátek jako detektoru požadované látky. Vlastností metody jsou rychlé, citlivé a obecně nákladově efektivní výsledky při větším množství vzorků. Testy je možné aplikovat na různé skupiny látek a tyto vlastnosti dělají z ELISA metody hodnotný nástroj při environmentální analýze.

Cílem této bakalářské práce je popsat fungování a podmínky provedení testu ELISA. Rozebrat různé konfigurace testu. Zjistit aktuální možnosti ELISA metody při analýze škodlivin v oblasti environmentální analýzy. Zaměřuje se na seznam možných analyzovatelných látek, s cílem srovnat výhody a nevýhody metody ELISA proti alternativním metodám.

1 LABORATORNÍ METODA ELISA

1.1 Historie metody ELISA

EIA byla vyvinuta v polovině 60-ých let pro identifikaci a lokalizaci enzymů v histologických preparátech analogicky k imunofluorescenční metodě a pro identifikaci sraženin získaných při imunodifuzi a imuno elektroforéze. Tyto enzymo imunohistologické metody byly rozpoznány jako výhodné i v dalších oblastech. [1]

Pozorování, že antigeny nebo protilátky mohou být imobilizovány na pevnou podložku vedlo k využití při kvantitativní detekci imunoreaktivních látek a tím nejen enormě zvětšilo množství haptenu, antigenů a protilátek, které mohly být analyzovány, ale zároveň poskytlo mnohem vyšší koncentraci imobilizovaných antigenů než z obtížně připravovaných buněčných kultur. Rubenstein následně v roce 1972 vyvinul systém v kterém je enzym označen, většinou haptenu bez toho, aniž by to ovlivnilo jeho aktivitu. [1]

Rozvoj metody na produkci monoklonálních protilátek (Kohler, Milstein) nejen rozšířil možnost přesné standardizace s vyšší specifičností, ale měl vliv na nový design testů.

V případě detekce antigenů a protilátek hraje dnes ELISA důležitou roli v molekulární biologii. [1]

Úspěch na poli klinické praxe brzy vedl k rozšíření využití i do oblasti analýzy životního prostředí. V 70-tých letech tak byly vyvinuty první protilátky k pesticidům. Dnes mají laboratoře k dispozici široce dostupné komerční laboratorní kity. [2]

1.2 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) – složky testu

Analytická metoda ELISA je určena k detekci, kvalitativní a kvantitativní analýze protilátek a antigenů v tekutém vzorku pomocí posloupnosti biochemických reakcí, jejichž výsledkem je zjištění množství nebo přítomnosti analyzované látky. Celá metoda probíhá v tekutém stavu na rozdíl od suchých metod např. reagenčních proužků.

Na testy se většinou používá 96 jamková destička z polystyrénu, ačkoliv mohou být použity i jiné materiály. Funkcí destičky je imobilizovat antigen nebo protilátku ve vzorku je-

jich navázáním na podložku. Po inkubaci se destička promyje a tím odstraní nenavázaný materiál. Pak je přidán konjugát a ponechán na z reagování. Enzymová část konjugátu umožňuje detekci. Z toho vychází i název metody „Enzyme linked“. Destička je znovu propláchnuta a přidá se substrát pro enzym, který pomocí barevné změny poskytne důkaz přítomnosti látky. Vyhodnocení se provádí spektrofotometricky na čtečce ELISA destiček [3]

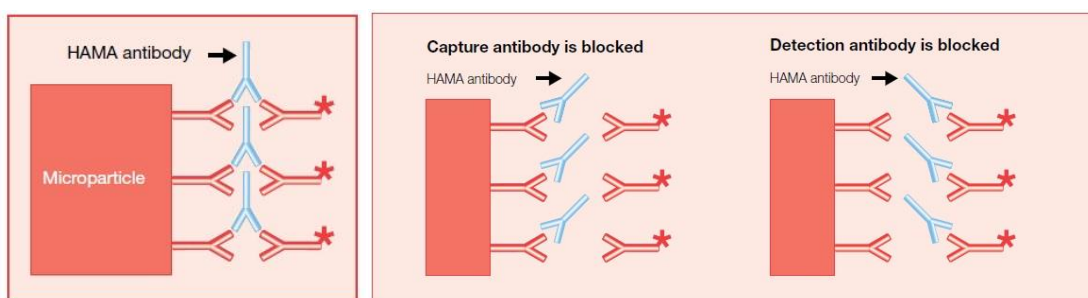
1.2.1 Požadavky na metodu

Metoda musí poskytovat výsledky, které jsou:

- přesné, tj. naměřené hodnoty koncentrace musí odpovídat skutečnosti
- reprodukovatelné, tj. při použití stejných reagensí, vybavení a měřících zařízení musí být výsledky opakovatelně stejné
- citlivá, tj. měřit hodnoty v rozsahu, který je potřebný
- specifická, tj. dokáže vyloučit falešné výsledky

Falešné výsledky mohou být dvou druhů:

- falešně pozitivní výsledek – pozitivní test, přestože vzorek neobsahoval hledanou látku
- falešně negativní výsledek – negativní test, přestože vzorek obsahoval hledanou látku



Obr. 1 Vznik HAMA falešně pozitivního a negativního výsledku

Tyto chyby vznikají například při použití myších (HAMA, Human Anti-Mouse Antibodies, protilátky produkované v lidském těle v reakci v reakci na vystavení myším protilátkám) nebo králíčních protilátek v případě, že lidský organismus byl vystaven přítomnosti myši nebo králíků a jeho tělo pak produkuje lidské anti-myší nebo anti-králíčí protilátky.

To může nastat např. po klinickém použití myších protilátek (např. při léčbě rakoviny) nebo u veterinářů, zemědělců, zpracovatelů potravin nebo u domácích chovatelů. Nejnáchylnější je v tomto ohledu sendvičová ELISA. [4]

Příkladem je chybná diagnóza rakoviny u 22-leté pacientky, která absolvovala desítku testů, které ukazovaly zvýšenou hladinu HCG (Choriogonadotropin). Ten signalizuje těhotenství. Když však lékaři neobjevili plod, předpokládali, že se jedná o vzácnou formu rakoviny. Pacientka pak absolvovala zbytečnou chemoterapii a několik operací. Teprve pak se přišlo na to, že pacientka patří mezi 10% populace, jejichž krev obsahuje látky reagující na test falešně pozitivním výsledkem. [5]

1.2.2 Mikrotitrační destička

Pro laboratorní titraci se používají 96 a 384 jamkové mikrotitrační destičky.

Barva destičky se vybírá dle zvolené značkovací látky:

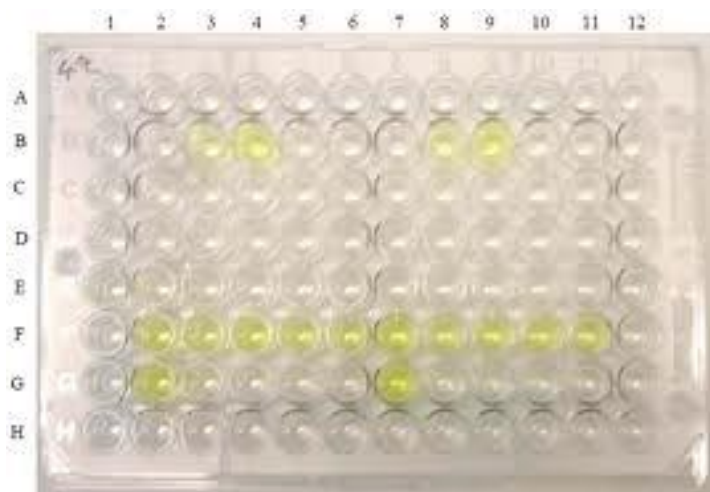
- černá, při značkování pomocí fluorescence
- bílá, při měření absorbance /pohlcení/ světelného záření nebo při využití luminiscence (spontánní záření).

Povrch bývá po lisování fyzikálně nebo chemicky upraven (je pak více hydrofilní) pro zlepšení interakce s vazebnými molekulami. Výrobním materiálem je nejčastěji polystyren, protože:

- adsorbuje (váže molekuly na pevný povrch) snadno biologické sloučeniny
- má výborné optické vlastnosti (průhlednost, optická uniformita)
- má nízkou absorbanci (pohlcuje jen minimálně optické záření)
- je odolný k mnoha chemikáliím
- se dobře zpracovává [6]

Povrch titrační destičky musí být hladký bez poruch, které by mohly znehodnotit optické měření. Jamky mohou být různého tvaru:

- s plochým dnem (ideální optické vlastnosti)
- dno do V (vhodné při centrifugaci nebo koncentraci vzorků)
- dno do U (jednodušší proplachování)



Obr. 2 ELISA destička

Biologické molekuly se na destičku vážou adsorpcí, nekovalentní vazbou (hydrofobní interakce, pro vysoce vazebné povrchy zároveň i polárními vazbami). Množství na povrch destičky navázaného antigenu nebo protilátky je kriticky důležité pro citlivost metody. [6]

1.2.3 Čtečka destiček (microplate reader)

Čtečky destiček jsou běžně používané laboratorní zařízení sloužící k detekci optických změn na titračních destičkách. Používají se při výzkumu nebo při kontrole kvality výroby v biotechnologických, farmaceutických nebo medicínských provozech. Čtečky slouží ke zvýšení produktivity při odečtu optických změn a zároveň vytvářejí dokumentaci měřených veličin (vestavěná tiskárna nebo propojení na počítač). Nejběžnější jsou čtečky na 96-ti jamkové destičky, ale existují i čtečky na 1536 jamek.

Čtečky využívají různé metody detekce látek.

Absorbance – nejběžnější metoda, světelný zdroj specifické vlnové délky prosvítí jamku z jedné strany a měří množství procházejícího světla (0-100%)

Fluorescence – optický zdroj ozařuje vzorek na specifické vlnové délce, vzorek pak vyzáří světlo (na jiné vlnové délce) a detektor toto záření měří



Obr. 3 Čtečka destiček [yongchuang.com]

Luminiscence – detektor měří množství záření, které vznikne chemickou cestou (na rozdíl od excitace světlem u fluorescence) ve vzorku

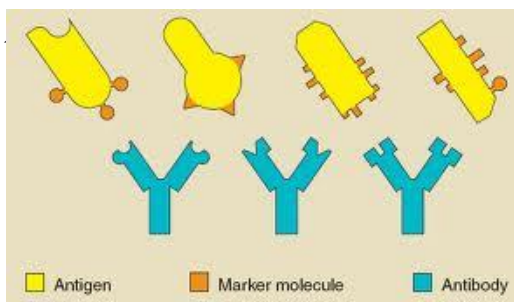
1.2.4 Myčka destiček (microplate washer)

Zařízení slouží k odstranění (vymytí) látek z destičky v průběhu měřicího cyklu testu. V případě požadavku na zvýšení produktivity lze použít a připojit podavač destiček. Správné mytí destiček je kritický a důležitý aspekt při provádění ELISA testu. Příliš rychlé nebo pomalé mytí jamek, stejně jako vyschnutí jamky, znemožní přesné měření koncentrace látek. Nebo může úplně znehodnotit měření.

1.2.5 Antigen a epitop

Antigeny jsou molekuly, které v organismech vyvolávají tvorbu specifických protilátek (antibody) nebo specifickou imunitní buněčnou odpověď. Jedná se většinou o proteiny, polysacharidy nebo nukleové kyseliny. Reakcí imunitního systému je snaha antigen zničit nebo neutralizovat. Příkladem antigenů jsou i vakcíny, které po aplikaci vyvolají tvorbu protilátek. Exogenní antigeny pocházejí z vnějšího prostředí, např. alergeny, viry. Do organismu se pak dostávají vdechnutím, pozřením, vypitím nebo přes kůži.

Endogenní antigeny vznikají v organismu jako výsledek buněčného metabolismu (normálního nebo poškozeného u autoimunitních nemocí – revma, diabetes atd.) nebo po infekci buňky viry nebo bakteriemi.

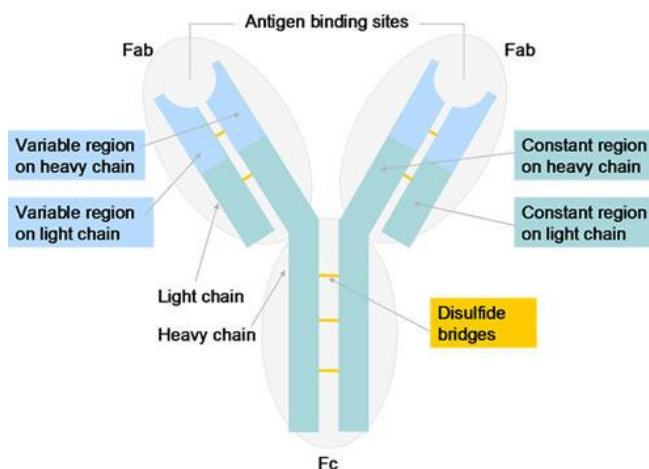


Obr. 4 Antigen

Na chemické úrovni jsou antigeny charakterizovány schopností vázat se na specifické protilátky. Jedná se často o povrchové struktury (buněčné stěny, obaly virů, krvinky dárce při transfúzích), toxiny (hadi, hmyz) nebo alergeny (pyly, prachové částice – substance vyvolávající alergickou reakci). Konkrétní oblast na kterou se navazují protilátky nazýváme epitop. Množství epitopů těsně souvisí s velikostí proteinu.

1.2.6 Antibody – protilátky

Protilátky (imunoglobuliny) jsou glykoproteiny, které jako součást imunitního systému obratlovců slouží k identifikaci a zneškodnění tělu cizích látek (bakterií, virů). Jedná se o



Obr. 5 Struktura protilátky

proteiny ve tvaru Y, které jsou produkovány B-lymfocyty. Protilátky formují vícenásobné nekovalentní vazby s antigenem. Vazebné místo je obvykle komplementární k cílovému antigenu, přesto může docházet ke křížové reakci pokud antigeny sdílejí části molekul.

Základní strukturou protilátek jsou dva identické krátké polypeptidy (lehké řetězce) a dva identické dlouhé polypeptidy (těžké řetězce), které jsou propojeny disulfidovými můstky. Oba typy řetězců mají konstantní a variabilní část. Horní část tzv. Fab (fragment, antigen binding) region je tvořen konstantní a variabilní částí lehkého i těžkého řetězce, zatímco

základna tzv. Fc (fragment, crystallizable) region tvoří konstantní část dvou těžkých řetězců. Ačkoli je obecná struktura protilátek velmi podobná, malý region variabilní části je vysoce specifický pro každou protilátku a vytváří vazebné místo pro jeden konkrétní antigen. [7]

Specifickou formou protilátek jsou tzv. monoklonální protilátky (mAb – monoclonal Antibody). Jedná se o chemicky čisté látky, které reagují jen s jedním epitopem v molekule antigenu. Dříve se protilátky získávaly z imunizovaných zvířat, kterým byla podána cizorodná látka. Kromě požadované protilátky (například proti hadímu jedu) však sérum obsahovalo velké množství jiných protilátek, což způsobovalo řadu komplikací. Dnes se průmyslově vyrábějí protilátky vytvářené jedním buněčným klonem (monoklonální protilátky) zaměřené specificky proti jednomu antigenu, například proti buněčnému receptoru. Protilátka je však bílkovinné povahy, a proto pokud člověku podáme protilátku vytvořenou zvířecími buňkami, může být lidským organismem rozpoznána jako cizí antigen. To vede k nežádoucím reakcím. Vědci již umí kombinovat malou část zvířecí protilátky (část rozpoznávající antigen) a větší část lidské protilátky - takovým protilátkám se říká humanizovaná protilátka. Při jejím použití je riziko reakce na podanou protilátku výrazně sníženo. Postup výroby monoklonálních protilátek byl vyřešen technikou fúze myelomu a B-lymfocytu, za kterou Kohler, Milstein a Kaj Jerne získali v roce 1975 Nobelovu cenu. V roce 1988 Greg Winter a jeho tým objevili metodu humanizace monoklonálních protilátek a tím odstranili nežádoucí reakce pacientů na tyto protilátky. [8]

1.2.7 Hovězí sérový albumin (BSA)

BSA je protein získaný z krve hovězího dobytka. Nachází uplatnění při biochemických aplikacích. V případě ELISA testů slouží jako blokovací pufr, který obsadí a zablokuje volné vazebné pozice na destičce.

1.2.8 Konjugát

Bio konjugace je proces spojení dvou bio molekul kovalentní vazbou. Nejběžnější formou bio konjugace je spojení biotinu nebo fluorescentních barviv s proteinem nebo napojení protilátek na enzym.

Konjugát obsahuje antigen nebo protilátku označenou enzymem. V závislosti na druhu a postupu ELISA testu se konjugát spojí s destičkou nebo vzorkem. Enzymová část konjugátu pak umožňuje detekci. Například je ke směsi přidána protilátka s navázaným biotinem.

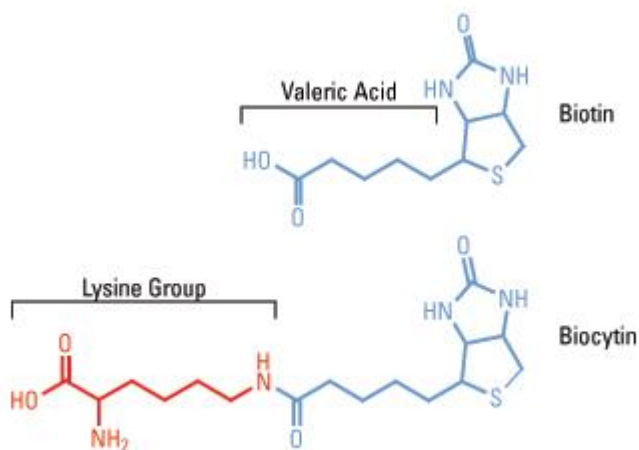
Následně je přidána další složka, streptavidin v komplexu s peroxidázou. Avidin se naváže na biotin, a vázaná peroxidáza poté přemění substrát na barevný produkt

1.2.9 Hapten

Malá molekula, která stimuluje produkci protilátek jen, pokud je konjugována na větší přenosovou molekulu. Hapteny se mohou těsně navázat na přenosovou molekulu (nejčastěji protein) kovalentní vazbou. Sám hapten nevyvolává imunitní odpověď z důvodu své malé velikosti (<5kDa). Jakmile je protilátka vytvořena, může se navázat na hapten. Proto mohou být hapteny využity při konstrukci nákladově efektivních detekčních kitů v široké oblasti využití (pesticidy, herbicidy, léčiva, vitamíny, steroidy, hormony, toxiny, barviva, výbušniny). Například databáze haptenu „HaptenDB“ obsahuje přes 2000 protilátek k haptenu. [9] [10]

1.2.10 Biotin, Biotinylace

Interakce mezi Biotinem (vitamin H) a avidinem je užitečným nástrojem pro detekci a značení látek. Výjimečná afinita avidinu k biotinu je jedna z nejsilnějších nekovalentních interakcí proteinů a ligandů (molekula formující s centrálním kovovým atomem koordinační komplex) a umožňuje tak molekulám obsahujícím ve směsi biotin, být selektivně navázána na avidinový konjugát. Vytvoření vazby mezi biotinem a avidinem je velmi rychlé a jakmile je vazba navázána, je odolná extrémním hodnotám pH, teplotám a organickým rozpouštědly. Proteiny, které jsou označeny biotinem (tzv. biotinylované) jsou běžně detekovány nebo čištěny za pomoci avidin konjugátů. To je využíváno při výzkumu proteinů, v postupu ELISA metody, při Western Blot analýze a dalších metodách. Kromě silné afinity k avidinu má biotin další dvě vlastnosti, které ho dělají ideálním pro značení proteinů a makromolekul. Za prvé je biotin poměrně menší než globulární bílkoviny což minimalizuje ovlivnění vlastností proteinů a umožňuje vícenásobnou konjugaci biotinu na jeden protein. Čímž umožňuje maximální možnost detekce avidinem. Za druhé jak je vidět na obrázku níže, biotin má vedlejší řetězec kyseliny valerové (pentanová) který může být snadno upraven a konjugován s funkčními skupinami bez vlivu na jeho schopnost vazby na avidin. Tato vlastnost usnadňuje vytvoření mnoha užitečných biotinylovaných sloučenin. [11]

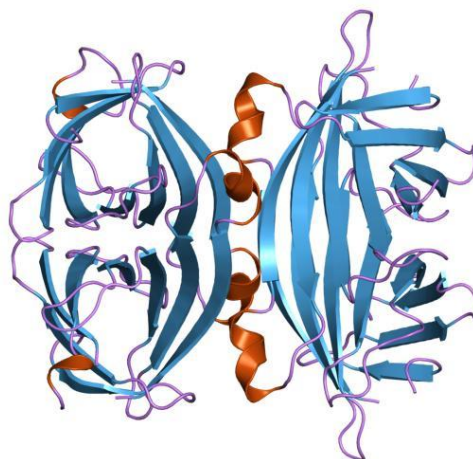


Obr. 6 Biotin versus biocytin

K rozrušení vazby biotinu na avidin/streptavidin jsou nutné extrémní hodnoty pH 1,5 a proto není tak vhodný při využití pro purifikaci (čištění) proteinů za pomoci afinitní chromatografie. Při rozrušení vazby by tak pravděpodobně došlo k denaturaci a tedy ke znehodnocení vyčištěného proteinu. Pro tyto účely se proto používá analog iminobiotin, který se na avidin váže při alkalickém pH, ale po snížení pH (kolem 4) je afinita redukována a protein uvolněn. [12]

1.2.11 Avidin

Avidin je glykoprotein skládající se ze čtyřech identických částí. Každá tato část řetězce pak dokáže vázat jednu molekulu biotinu. Ačkoliv avidin sdílí takřka identickou sekundární, terciární i kvartérní strukturu s dalším biotin vázajícím proteinem – streptavidinem, není streptavidin glykosylován (glykosylace nebo glykace - vazba cukru na jinou molekulu, obvykle bílkovinu) a je méně náchylný k agregaci. Avidin má vyšší afinitu pro nekonjugovaný biotin než streptavidin, ale nižší afinitu pro konjugovaný biotin. Vyskytuje se v malém množství v bílku vejcí plazů, ptáků a obojživelníků (cca 1,8mg ve slepičím vejci). Avidin se váže na biotin, který potřebují bakterie k růstu a je tak považován za obranný protein proti jejich množení.



Obr. 7 Streptavidin

V roce 1916 Bateman jako první zjišťoval toxický efekt surového bílku na zvířatech. Boas ukázal v roce 1927, že zvířata krmená bílkem trpí nedostatkem biotinu (vitaminu H), přesto, že ho jejich strava obsahovala dostatek (tzv. „egg white injury“). Příčinou byl podle něho protein obsažený v bílku. Bylo zjištěno, že tento protein váže biotin do nestravitelného komplexu, který pak nemůže být stráven v tenkém střevu zvířat. [13]

1.2.12 Křenová peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase)

Na značící enzymy existují dané požadavky. Enzymy, které slouží ke značení protilátek by měly mít vysokou stabilitu, vysokou enzymovou aktivitu a dobrou schopnost vázat se na protilátky. Enzym by měl být také ekonomicky dostupný.

Křenová peroxidáza (HRp) je hemo-glykoprotein. Tzn., že obsahuje hem (skupina s centrálním atomem železa Fe^{2+} , která je také součástí hemoglobinu v červených krvinkách) a sacharidy (glycidy). Katalyzuje oxidaci pomocí peroxidu na množství substrátů. Protein má hmotnost cca 40000 Daltonů. Peroxidáza je nejčastěji vyráběna z kořene křenu selského. Bylo objeveno, že peroxidáza je velmi vhodná k přípravě konjugátů enzymů a protilátek díky její schopnosti vytvořit barevný produkt a také její relativně dobré stabilitě. Peroxidázou označené imunoglobuliny se úspěšně používají k demonstraci tkáňových antigenů a v laboratorních metodách detekce pomocí enzymů (EIA - enzyme immunoassay). [14]

HRP je nejčastěji používaná značka pro protilátky, protože je nejmenší a nejstabilnější z tří nejpopulárnějších enzymových markerů (HRP, AP, Beta-galaktosidáza) a její glykosylace vede k méně nespecifickým vazbám. [15]

1.2.13 Alkalická fosfatáza (AP)

Alkalická fosfatáza je protein izolovaný z telecího střeva. Má hmotnost 140000 Daltonů. Katalyzuje hydrolýzu fosfátových skupin z molekuly substrátu a výsledkem je barevný produkt nebo uvolnění světla. AP má optimální enzymatickou aktivitu v zásaditém pH (pH 8-10). Významnou výhodou je, že reakce je lineární takže detekční citlivost může být zlepšena prodloužením reakční doby. Při využití v ELISA je rozpustný substrát použit k vygenerování signálu v roztoku. Kolorimetrický substrát produkuje barevný konečný produkt a chemiluminiscentní substrát emituje světlo. [16]

1.2.14 HRP substrát

ELISA substrát je látka, která reaguje s enzymem a tím mění svou barvu nebo vyzařuje světlo. Různé aromatické fenoly a aminy mohou sloužit jako donory vodíku. 2,2-azino-di (3-ethyl-benzathiazoline) sulphonic acid (ABTS) a 3,5,3',5'- tetramethylbenzidine (TMB) jsou dva nejpopulárnější chromogenní substráty. ABTS dává rozpustný modro-zelený produkt s maximem absorpance na vlnové délce 405nm. ABTS má pomalejší rychlost obratu (turnover rate) než TMB a jeho reakční rychlost je významně nižší. Přesto dynamický rozsah je velmi široký a je tak vhodnou volbou pokud není citlivost důležitá. TMB poskytuje modře zbarvený výsledný produkt s absorpací na 650 nm. Pokud je TMB okyseleno k zastavení reakce, změní barvu na žlutou s maximální absorpací na 450 nm a dvojnásobným až trojnásobným zvýšením citlivosti. Běžně má TMB detekční limit 10 – 50x nižší než ABTS. Vzhledem k tomu, že je detekční limit hlavně funkcí použité protilátky, může TMB snadno detekovat v rozsahu 0,1 – 0,3 ng/ml HRP-IgG (Imunoglobulin G). HRP chemiluminiscentní substráty jsou většinou založeny na luminolu nebo acridiniovém esteru (acridinium esters). [17]



Obr. 8 Luminol

Luminol je známý také z forenzní praxe kde slouží k detekci krve na místě činu. Pokud nejsou na místě činu zrakem viditelné stopy krve je využití chemiluminiscence luminolu užitečným pomocníkem. Luminol v tomto případě reaguje na hemoglobin. Katalyzátorem je železo, přítomné v hemoglobinu. [18]

Reakce substrátu založeného na luminolu začíná oxidací HRP pomocí H_2O_2 . Luminol je pak oxidován HRP na radikál a při návratu do základního stavu vyzáří foton. Emise má maximum na vlnové délce 425 nm, kde může být zachyceno pomocí fotodiody nebo luminometrem. [17]

1.2.15 Substrát pro alkalickou fosfatázu (AP)

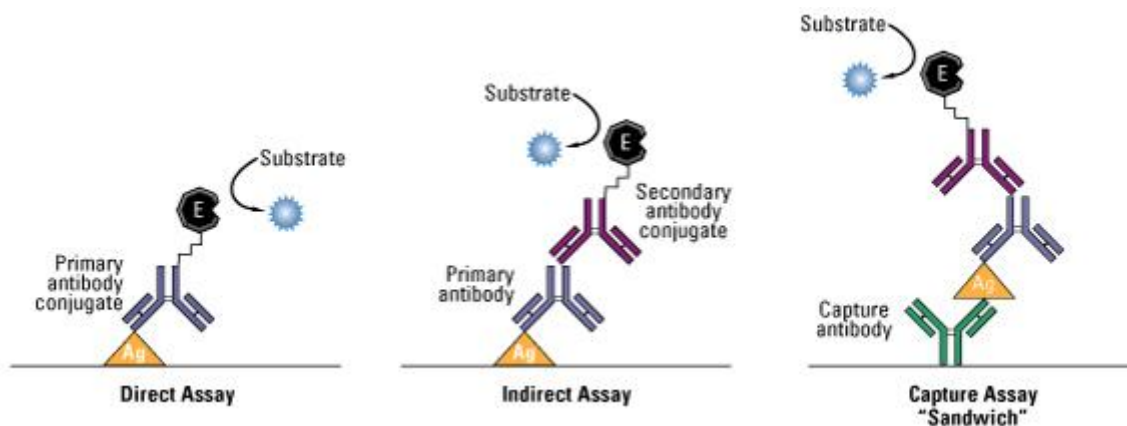
Typickým substrátem pro AP jsou p-nitrofenyl fosfáty (p-nitrophenyl phosphate - pNPP), jejichž výsledkem je žlutý rozpustný produkt s absorpčním maximem na 450 nm. Většina tekutých přípravků pNPP jsou slabě nestabilní a zežloutnou při skladování již při teplotě 40 °C. Může tak dosáhnout absorpance 0,1-0,2 během 1-2 měsíců. K zabránění tomuto problému by měl být substrát skladovaný ve zmraženém stavu. Alternativně je možné použít pNPP ve formě tablet a rozpustit je v pufru až před použitím. Při nutnosti vyšší citlivosti je možné použít Bromo-chloro-indoxyl fosfát (BCIP), který je také stabilnější (i při 40 °C) a je přibližně 2x citlivější než pNPP. [17]

2 ELISA – POSTUP

ELISA je na destičkách založená metoda určená k detekci a kvantifikaci takových látek, jako jsou peptidy, protilátky a hormony. Většinou je prováděna na 96 jamkové nebo 384 jamkové polystyrenové destičce, která pasivně váže protilátky a proteiny. Je to právě vazba a imobilizace činidel, která dělá Elisu snadno použitelnou. Vazba reagujících látek na destičku umožňuje snadno oddělit navázaný a nenavázaný materiál během testu. Možnost vymýt nespecificky vázané látky vytváří výkonný nástroj pro měření specifických analytů. Detekční enzym nebo jiná značka může být navázána přímo na primární protilátku nebo napojena přes sekundární protilátku, která identifikuje primární protilátku. Může být také navázán na protein jako např. streptavidin, pokud je primární protilátka označena biotinem. Nejčastěji se na značení enzymů používá křenová peroxidáza (HRP) a alkalická fosfatáza (AP). Široký výběr substrátů je dostupný pro použití při ELISA k reakci s HRP a AP konjugáty. Volba substrátu závisí na požadované citlivosti testu a dostupném zařízení pro detekci signálu (spektrofotometr, fluorometr, luminometr). [19]

2.1 ELISA - varianty

ELISA může být prováděna několika variantami základní metody.



Obr. 9 Formáty testu ELISA

2.1.1 Přímá ELISA

Vzorek s antigenem je vložen do jamky destičky a přímou adsorpcí dochází k navázání antigenu na stěnu destičku. Pomocí nadbytku jiného proteinu (BSA) dojde k blokaci dal-

ších vazebných míst. Poté je antigen detekován přidáním označené primární protilátky. Protilátka konjugovaná s enzymem se naváže na antigen a po přidání substrátu dojde ke zbarvení vzorku v jamce. Přímá detekce není běžně v ELISA testech využívána, ale je často používána v imunohistologii k obarvení histologických preparátů tkání a buněk.

2.1.2 Nepřímá ELISA

Antigen ze vzorku je imobilizován na destičku. Dále je u tohoto uspořádání postup podobný, ale místo značené se používá neznačená primární protilátka. Po odstranění (vymytí) nenavázaného zbytku primární protilátky se přidá konjugovaná označená sekundární protilátka. Sekundární protilátka je specifická na primární protilátku. Použití substrátu se potom projeví změnou barvy vzorku. Jedná se o nejpoužívanější formát testu.

2.1.3 Sendvičová ELISA

Nejvýkonnější varianta je sendvičová ELISA. Tento typ testu je nazýván sendvičový, protože měřený analyt je vázán mezi dvě primární protilátky (protilátku k zachycení a protilátku k detekci). Sendvičová ELISA je používána, protože je citlivá a robustní.

V sendvičovém uspořádání testu je kritické to, aby sekundární protilátka byla specifická pouze pro detekci primární protilátky a ne k protilátce, která zachytí antigen k podložce. Je toho dosaženo použitím protilátky k zachycení a primární protilátky z různých druhů hostitelských druhů (např. myš a králík). viz také 1.2.1 [19]

2.1.4 Kompetitivní ELISA

ELISA může být prováděna jako nepřímá kompetitivní ELISA. Ta je běžná když je antigen malý a má jen jeden epitop.

Neznačená primární protilátka se inkubuje s antigenem (ve vzorku). Tento komplex je pak přidán do jamky s imobilizovaným antigenem. Primární protilátky, které se navázaly na antigen ve vzorku, se již nemohou navázat na antigen v jamce a jsou při vymytí destičky odstraněny. Přidaná označená sekundární protilátka se pak naváže na primární protilátku, která nebyla vymyta. Barva pak signalizuje nepřítomnost antigenu ve vzorku.

Existuje i varianta s označeným čistým antigenem namísto protilátky. Protilátka je uchytcena (imobilizována) na destičku. Neznačený antigen ze vzorku a označený antigen spolu soupeří o vazbu na protilátku. Signálu z čistého značeného antigenu pak indikuje nepřítomnost antigenu ve vzorku. [19]

2.2 Možnost použití v laboratořích UTB

S ohledem na snadnost použití není problém s laboratorní aplikací ELISA testů i ve školních laboratořích.

V laboratořích UTB je k dispozici čtečka (reader) Tecan Sunrise, v kterém lze zpracovávat standardní 96 jamkové ELISA destičky. Měří absorbanci v rozsahu 400-750 nm.

K aplikaci testů při výzkumu na půdě UTB je tak pouze třeba zajištění financování nákupu vhodných detekčních kitů pro vybranou oblast měření.

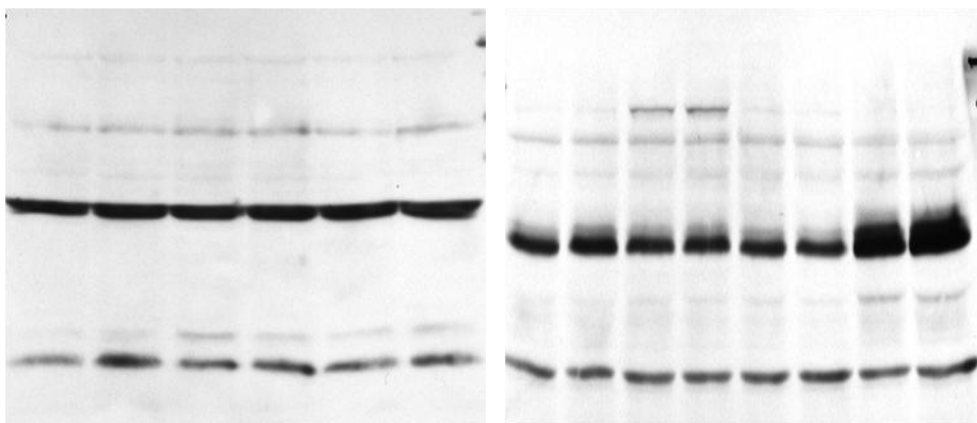
3 ALTERNATIVNÍ A KONKURENČNÍ METODY

Metoda ELISA má tyto výhody:

- vysokou sensibilitu, detekovatelnou a specifickou
- zařízení je relativně levné
- metoda může být rychlá a jednoduchá
- reprodukovatelnost je vysoká a hodnocení objektivní
- možnost využití v „polních“ podmínkách
- bez radiačního rizika
- chemikálie jsou relativně levné a mají obecně dlouhou životnost
- rozsah využití může být významně rozšířen vysokou variabilitou enzymů a jejich vlastností
- plné využití vlastností monoklonálních protilátek [1]

3.1 Western Blot

Je laboratorní metoda sloužící k identifikaci specifických protilátek ve vzorku z homogenizované tkáně nebo extraktu. Používá gelovou elektroforézu k separaci proteinů dle 3D struktury nebo délky polypeptidu.



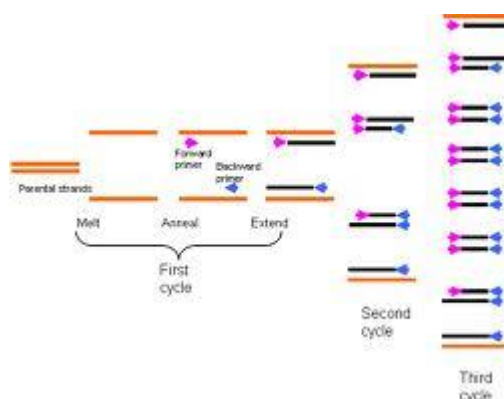
Obr. 10 Western Blot

Test začíná přípravou vzorku. Tkáň je nutno homogenizovat. Vyvolat lýzi (rozklad) buněk a rozpustit proteiny. Příprava probíhá za nízkých teplot, aby nedošlo k degradaci proteinů. Poté probíhá gelová elektroforéza vzorku, která rozdělí bílkoviny v gelu dle izoelektrického bodu, molekulové hmotnosti, elektrického náboje nebo dle kombinace těchto faktorů. Jeden vzorek je obvykle směs definovaných označených proteinů, které pak slouží

k identifikaci. Aby bylo možné proteiny identifikovat, je nutné pomocí elektrického proudu přenést proteiny z gelu na nitrocelulóзовou membránu. Při přenosu se zachová poloha, kterou proteiny získaly v gelu. Poté se přidá zředěný protein, většinou hovězí sérový albumin (BSA, bovine serum albumine), který zablokuje všechna zbývající místa na membráně. Po přidání modifikovaných protilátek s navázaným signálním enzymem dojde po expozici příslušným substrátem k barevné změně, která umožní identifikaci proteinů. [20]

3.2 PCR (Polymerase chain reaction), Real-time PCR

PCR je dnes základním kamenem moderní molekulární biologie. Metoda funguje na základě znásobení (replikace) molekul DNA. Tento postup objevil Kary Mullis, biochemik pracující pro společnost CETUS Corp. Za tento objev obdržel později Nobelovu cenu. Při PCR dochází pomocí zvýšení teploty na 95°C k rozdělení (denaturaci) dvojšroubovice DNA na 2 řetězce. Teplota je pak snížena na cca 50°C to umožní připojení specifických primerů. Primery jsou krátké řetězce DNA, které slouží k označení začátku replikace DNA. Primer se napojí na komplementární části řetězce DNA a polymeráza (optimálně při teplotě 70-80°C) začne vytvářet kopii řetězce DNA. Po skončení cyklu máme dvojnásobek požadovaného řetězce DNA. Opakovanou (cca 30-50x) změnou teploty na termocykleru postupně znásobíme počet molekul DNA ve vzorku. Znásobenou DNA potom přeneseme na gel a označíme barvivem. Pomocí elektroforézy potom dojde k zobrazení čárových sloupečků. [21] [22]



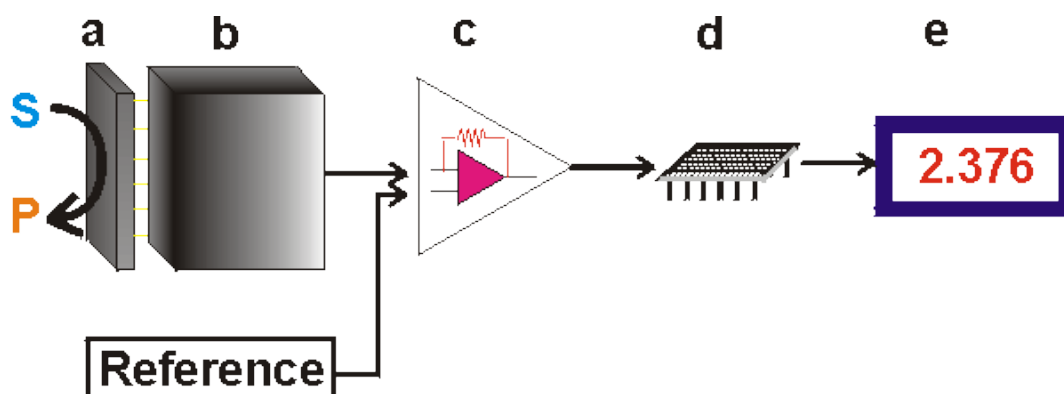
Obr. 11 Princip PCR

Real-time PCR je v principu stejná jako PCR, kromě toho, že průběh reakce je monitorován detektorem v reálném čase. Výhodou je, že průběžně vidíme účinnost a rychlost reakce. Není také nutné přenášet produkt na gel.

Metoda se používá k analýze DNA v kriminalistice, zdravotnictví nebo při kontrole potravin (GMO). [21]

3.3 Biosenzory – okamžité naměřené hodnoty

Biosenzory jsou analytická zařízení, která konvertují biologickou reakci na elektrický signál viz obr. níže. Termín biosenzor je často používán v případě senzorů určujících koncentraci látek. Biosenzory reprezentují v současnosti rychle se rozvíjející oblast, kde hlavní motor vývoje přichází z oblasti zdravotnictví (např. 6% západní populace má diabetes a pacienti by tak získali výhodu dostupnosti rychlého, přesného a jednoduchého senzoru na měření glukózy). Většina dnešního úsilí směřuje do potenciometrických (mění se náboj), amperometrických (mění proud) biosenzorů a kolorimetrických papírových proužků na bázi enzymů.



Obr. 12 Schéma biosenzoru

Obrázek ukazuje schéma biosenzoru. Biokatalyzátor a konvertuje substrát na produkt. Tato reakce je zpracována převodníkem (detektorem) b, zesílена zesilovačem c, zpracována d a zobrazena e. Klíčovou částí je detektor, který detekuje fyzickou změnu na základě reakce, např.:

- vytvořené (nebo pohlcené) teplo
- změnu v distribuci náboje a vznik elektrického potenciálu
- pohyb elektronů při REDOX reakcích
- vyzáření (pohlcení) světla
- změna objemu (piezo-elektrický jev), vznik povrchové akustické vlny (surface acoustic wave, SAW) [23]

3.4 Kapalinová chromatografie – hmotová spektrometrie (LC/MS)

Kapalinová chromatografie (LC) byla vyvinuta koncem šedesátých a počátkem sedmdesátých let. Dnes je široce používána pro separaci a purifikaci v různých oblastech zahrnujících farmaceutiku, biotechnologie, životní prostředí, polymery a potravinářský průmysl.

HPLC se stala metodou volby při analýze širokého spektra sloučenin. Hlavní výhodou proti plynové chromatografii (GC) je, že analyty nemusí být plynné, takže je možné analyzovat i makromolekuly. Metoda je založená na injekci malého množství vzorku do proudu tekutiny (pohyblivá – mobilní fáze), která prochází pod vysokým tlakem kolonou s částicemi (pevná fáze). Separace směsi látek závisí na různé schopnosti zadržení v koloně. Rozsah v kterém je látka zadržena v koloně je určena rozdělením mezi pohyblivou fází a pevnou fází. V případě LC je toto rozdělení ovlivněno reakcí rozpuštěné látky na mobilní a pevnou fází. Proto má na rozdíl od GC změna v mobilní fázi enormní vliv na separaci. Protože složky mají rozdílnou pohyblivost, opouštějí kolonu v různém čase (mají rozdílný retenční čas). Pro identifikaci složek od mobilní fáze slouží různé druhy detektorů, které změny ve složení převádějí na elektrický signál. Pro kvantitativní analýzu je třeba znát retenční časy standardních složek. Proto je LC většinou používána když hledáme ve směsi očekávanou složku a tedy máme připravený standard. Při analýze vzorku neznámého složení je možné použít LC-MS (liquid chromatography-mass spektrometry) a vrcholky chromatogramu hmotového spektra pak srovnáme s knihovnou spekter v počítači. Je nutné zdůraznit, že LC-MS systémy jsou značně složité a nákladné zařízení, které nejsou běžnou součástí laboratoří. [24]

4 DETEKCE LÁTEK V ENVIRONMENTÁLNÍ PRAXI

Metoda ELISA je dnes nejčastěji používána v lékařské a veterinární praxi, ale využití v environmentální oblasti se vzhledem k možnostem, množství detekovatelných látek, cenám a snadnosti použití rychle rozšiřuje. To například dokumentuje počet hesel na google.com

Tab. 1 Srovnání počtu dokumentů

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| ELISA enzyme human tests | 6 milionů dokumentů |
| ELISA enzyme veterinary tests | 904 tisíc dokumentů |
| ELISA enzyme environmental tests | 1,9 milionů dokumentů |

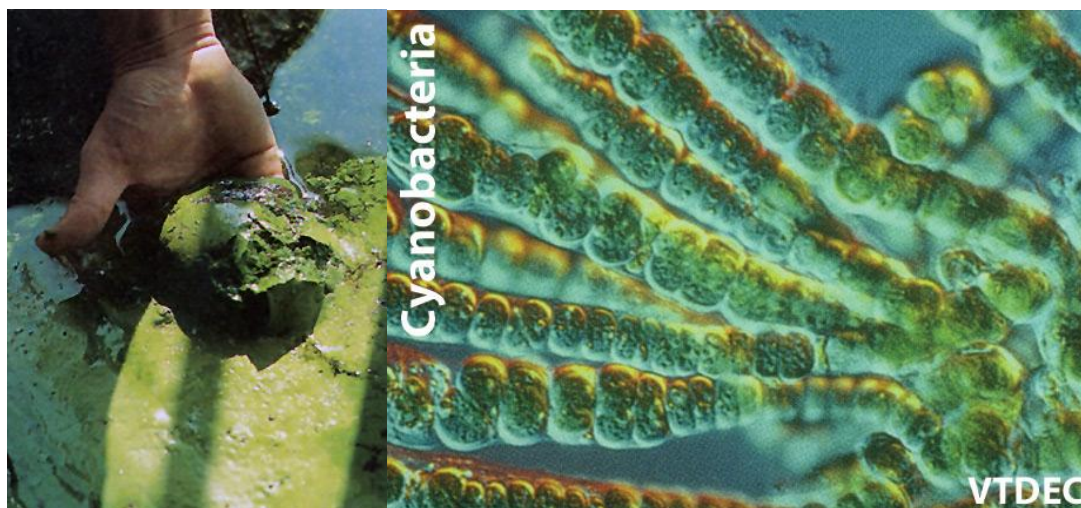
Problémy se znečištěním životního prostředí se projevují v každé z jeho složek: vodě (hydrosféra), půdě (pedosféra) a ovzduší (atmosféra). V této práci se chci zaměřit na možnosti detekce znečištění toxiny, endokrinními disruptory, pesticidy, léčivy, antibiotikami, alergeny a určení kontaminace potravin GMO.

4.1 Toxiny

Za toxiny jsou považovány jedy, které jsou produkovány určitou biologickou funkcí v přírodě např. buňkami a organismy. Jedná se o malé molekuly, peptidy nebo bílkoviny, které mohou působit malé problémy (píchnutí včely), ale i smrt (otrava botulotoxinem, uštknutí hadem). V oblasti životního prostředí jsou hlavním cílem zjišťování cyanotoxiny a mykotoxiny.

4.1.1 Cyanotoxiny

Cyanotoxiny jsou jedy produkované sekundárním metabolismem sinic (cyanobakterií), tedy nejsou využívány organismem pro jeho primární metabolismus. Nejvíce rizikové pro rozvoj sinicového vodního květu jsou zejména vodní plochy znečištěné vysokým obsahem živin (hlavně fosfor z nečištěných odpadních vod a vyplavená hnojiva z polí).



Obr. 13 Vodní květ, sinice

Riziko se zvyšuje při vyšších teplotách v letním období. Příkladem je stav Luhačovické přehrady před vyčištěním. [25] [26]

Srovnáváme-li cytotoxiny s ostatními přírodními toxiny, jsou toxičtější než toxiny vyšších rostlin a hub, avšak méně toxické než bakteriální toxiny viz tabulka níže.

Tab. 2 Srovnání toxicity

| Toxin | Zdroj | Skupina | LD ₅₀ µg/kg při inj. i.p. myš |
|----------------|-------------------------------|----------|--|
| botulin | <i>Clostridium botulinum</i> | bakterie | 0,00003 |
| microcystin LR | <i>Microcystis aeruginosa</i> | sinice | 43 |
| strychnin | <i>Strychnos nux-vomica</i> | rostlina | 2000 |

LD₅₀ – medián smrtelné dávky, kdy látka usmrtí právě polovinu sledovaných členů testované populace po stanovené době trvání testu

Ačkoliv otravy domácích zvířat a lovné zvěře sinicemi vodního květu jsou známy již z 19. století, teprve v posledních letech byl umožněn detailní výzkum cyanotoxinů, jejich molekulární struktury a principu účinku. Obecně se ve světě rozšiřuje frekvence vodního květu sinic na vodních plochách a Česká republika není výjimkou. [25] [27]

4.1.2 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou látky produkované zejména plísněmi (tzn. mikroskopickými vláknitými houbami). Mykotoxiny jsou často členěny podle hlavních producentů, kterými jsou plísně rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. K významným skupinám mykotoxinů patří aflatoxiny (extrémně vysoká toxicita) produkované plísněmi *Aspergillus* (nejčastěji v araší-

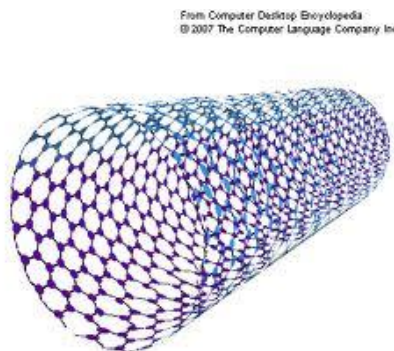
dech, kukuřici a skořápkových plodech), ochratoxiny produkované plísněmi *Aspergillus* (ochratoxin A) či *Penicillium* (nejčastěji v obilovinách) nebo patulin produkovaný plísněmi *Penicillium* (nejčastěji v jablečných a jiných ovocných výrobcích). K výskytu mykotoxinů na zemědělských produktech (krmivech i potravinách rostlinného původu) dochází v důsledku nepříznivých teplot a vlhkosti při sklizni, skladování, přepravě a dalším zpracování. Téměř všechny mykotoxiny poškozují játra a ledviny a negativně působí na imunitní systém, některé jsou potenciálně karcinogenní. Příjem určitých mykotoxinů lidmi a zvířaty může vést k poškození jater, trávicího traktu, k rakovině a odumírání svaloviny. Mykotoxiny náhle vyvolávají halucinace a svalové křeče. Dalším důsledkem jsou poruchy krevního oběhu, které po delší době mohou vést k odumírání končetin. K zabránění vzniku toxinů je důležité chránit potraviny a krmiva před plesnivěním. [28]

4.1.3 Detekce toxinů

Identifikace a kvantifikace cyanotoxinů ve vodě se především provádí pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotovou spektrometrií. Metoda ELISA se stále častěji používá jako běžná technika pro screening. ELISA typicky reaguje s několika analyty uvnitř dané chemické skupiny. Každý ELISA kit reaguje unikátně na danou skupinu analytů v závislosti na použitých protilátkách. Jinými slovy reakce na Microcystin-LR nebude pravděpodobně stejná jako na Microcystin-LA apod. Tato cross-reaktivita je však výhodou při určení celkového množství více variant toxinu. Při měření byly použity ELISA kity Abraxis-DM a Abraxis-ADDA společnosti Abraxis, Warminster, PA, USA [29] [30]

Dave Perkins shrnuje a srovnává metody pro detekci toxinů sinic. Jako nejvýhodnější považuje PPIA (protein phosphatase inhibition assay) a na druhém místě ELISA. [31]

Při hledání jednoduché, rychlé a nenákladné metody je možným směrem vytvoření biosenzoru využitím disperze jednotlivých nanotrubiček (SWNT) a protilátek na microcystin nanosené na papír, který se tak stane vodivým. Změny v koncentraci microcystinu pak určují jeho koncentraci rychle a přesně. [32]



Obr. 14 SWNT – jednostěnná uhlíková nanotrubička

Detekce mykotoxinů je možná mnoha metodami. Výhody ELISA testu jsou jednoduchá příprava vzorku, nenákladné zařízení, vysoká senzitivita, simultánní analýza více vzorků, vhodnost pro screening a omezené použití organických rozpouštědel. Nevýhodou je křížová reakce a doporučené potvrzení výsledků kapalinovou chromatografií. [33]

4.2 Hormony a endokrinní disruptory

Hormony jsou přirozeně produkovány v lidech a zvířatech a uvolňovány do prostředí. Významné úrovně steroidních hormonů byly zaznamenány v odpadních vodách ve světě. Kontaminace vodního prostředí hormony však může narušit reprodukční a vývojové procesy zvláště vodních živočichů (ryby, obojživelníci).

Kromě hormonů mohou vývoj vodních živočichů ovlivnit i endokrinní disruptory. To jsou látky, které narušují funkci endokrinního systému organismu nebo iniciují procesy v abnormálním časovém období životního cyklu. Chemikálie toho dosahují různými způsoby:

- mohou napodobovat biologickou aktivitu hormonů napojením na buněčné receptory a iniciovat buněčnou odpověď ve špatný okamžik nebo v nadměrném rozsahu
- mohou se napojit na buněčné receptory, ale neaktivovat je. Obsazením receptoru pak blokují přirozený hormon
- mohou reagovat s metabolickými procesy v těle a mít tak vliv na syntézu nebo rozpad přirozených hormonů.

Chemikálie s hormonální aktivitou a tedy potenciální endokrinní disruptory zahrnují:

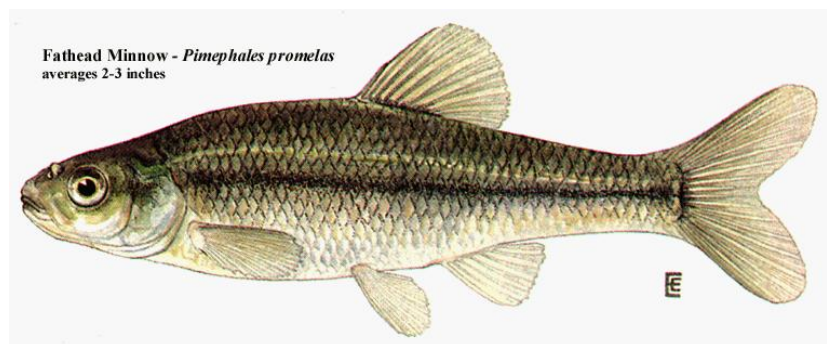
- přirozené hormony ze zvířat, uvolněné do prostředí
- přírodní látky, zahrnující toxiny produkované částmi rostlin (fytoestrogeny)

- synteticky produkovávané léčiva, která jsou určena pro hormonální léčbu (antikoncepce)
- člověkem vyrobené chemikálie a vedlejší produkty uvolněné do prostředí (pesticidy, DDT, PCB, dioxiny, bisphenol A-monomer epoxidových pryskyřic). Hormonální aktivita těchto látek je mnohem slabší než přirozených hormonů [34]

Jedním ze zdrojů hormonů ve vodním prostředí jsou přirozené a syntetické hormony přítomné v hnoji hospodářských zvířat. Přibližně 58 mil. tun hnoje je ročně vyprodukováno v USA. Hormony přítomné v hnoji a na polích, kde byl hnůj rozvezen, se mohou snadno dostat do povrchových nebo podzemních zdrojů vody při deštích nebo tání sněhu. Měření koncentrace hormonů je náročné s ohledem na jejich rychlou degradaci. To může vést k podcenění skutečné koncentrace hormonů v místě a čase odběru. Proto je nutná konzervace vzorků s hormony a jejich metabolity během odběru, přepravy a uskladnění až do změření. [35]

4.2.1 Vliv na ryby a vodní živočichy

Vědci z University of Florida zkoumali vliv dobytka na vývoj a změny ryby z čeledi kaprovitých (*Pimephales promelas*) a zjistili významné změny v jejich reprodukční biologii. Samci byli „demaskulizováni“ (změna tvaru hlavy, menší produkce testosteronu, menší varlata), zatímco samice „defeminizovány“ (snížený poměr estrogen:testosteron). [36]



Obr. 15 *Pimephales promelas*

Vzhledem k tomu, že hormony nejsou odstraněny na čističkách vody, existuje nejasné nebezpečí jejich vlivu na člověka. Filtrace odpadních vod použitím pískové filtrace nebo mikrofiltrace, odstraní přibližně 70% hormonů a pouze pokročilá úprava vody použitím reverzní osmózy více než 95% hormonů. [37]

4.2.2 Detekce disruptorů

Pro kvantitativní detekci estrogenů jsou obecně používány metody HPLC, LC-MS. Tyto analytické metody jsou vysoce spolehlivé, přesto mají několik nevýhod:

- drahé zařízení
- nutnost velkého objemu vzorku
- nutnost vyčištění vzorku
- spotřebu velkých objemů rozpouštědel
- nároky na odborně proškolenou obsluhu

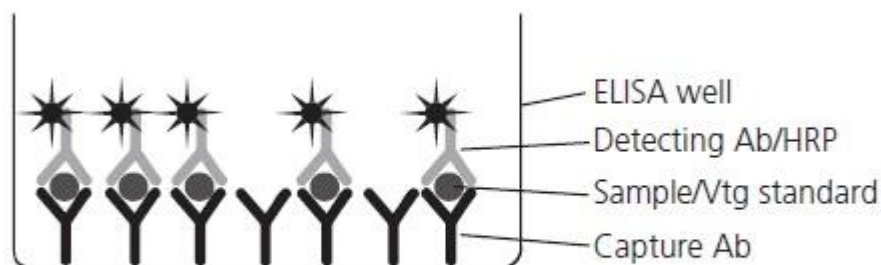
Kvůli těmto nedostatkům může být analýza většího počtu vzorků zároveň drahá a časově náročná. Proto existuje silná poptávka po rychlém, jednoduchém a nákladově efektivním testu jako je ELISA [38]

Příkladem je test Estrogen (E1/E2/E3) EIA kit společnosti Biosense (www.biosense.com) pro detekci Estrogenu. Kit detekuje estrogení hormony estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) a estriol (E3) s podobnou specifičností. Tento hormon lze nalézt v krvi různých živočichů, stejně jako ve vodním prostředí v blízkosti čistíren odpadních vod. Analýza je založena na kompetitivní reakci, kdy enzymem značený standard E2 soupeří s volným estrogenem ve vzorku o vazbu na specifickou monoklonální protilátku na povrchu destičky. Množství značeného estrogenu je určeno po reakci se substrátem barvou výsledného produktu. Intenzita barvy je měřena na vlnové délce 450nm a je inverzně proporcí k množství estrogenu ve vzorku. Test je kalibrován použitím standardního roztoku E2 dodaného v kitu. [39]

Detekce estrogeních hormonů pomocí ELISA testu je citlivá. Limit pro estrogení hormony je přibližně 0.1 ng/L v odpadních vodách a 0.05 ng/L v povrchových vodách. ELISA tak poskytuje relativně jednoduchou a praktickou metodu posouzení škodlivosti estrogeních hormonů v umělém i přírodním prostředí. [37]

Alternativně je možné endokrinní disruptory detekovat pomocí bioindikátoru vitellogeninu (Vtg) v krvi nebo tkáňových vzorcích nedospělých nebo samčích ryb. Vitellogenin je prekurzor proteinů vaječného žloutku a vyskytuje se normálně pouze u vejcorodých samic. Jeho přítomnost u samců tak prokazuje ovlivnění endokrinního systému organismu. Principem metody je specifická vazba protilátka - vitellogenin (Vtg). Destička je potažena protilátkou, která váže vzorek Vtg a standardní Vtg. Rozdílná Vtg-specifická detekční protilátka označená HRP enzymem je přidána tak, aby vytvořila sendvič mezi Vtg a protilátkou. Enzymová aktivita je určena přidáním substrátu, který produkuje barevný výsledek.

Barevná intenzita je přímo úměrná množství přítomného Vtg. Pomocí různě naředěného standardního vitellogeninu vytvoříme kalibrační křivku, z které pak odečteme koncentraci vzorku. [40]



Obr. 16 Detekce Vtg - sendvič ELISA

4.3 Pesticidy

Pesticidy jsou nejčastěji používány v zemědělství k ochraně rostlin před škůdci (rostlinnými a živočišnými) a k ochraně skladových zásob. Bohužel část aktivních substancí neskonečí na rostlinách, ale vypaří se do vzduchu nebo se uloží do půdy. Vzhledem k jejich chemické odolnosti, mohou být jejich stopy detekovány v povrchových i hloubkových zdrojích vody, potravinách i živých organismech. Pesticidy způsobují zdravotní problémy, proto je jejich sledování v prostředí důležité.

Detekce pesticidů pomocí ELISA není přímo možná, protože pesticidy jsou obvykle příliš malé molekuly (hapteny) na to, aby vyvolaly imunitní reakci. Proto musí být nejprve konjugovány s proteinem.

Příkladem aplikace ELISA je kvantifikace clomazonu v půdě. Protilátky byly připraveny proti BSA-clomazone konjugátu. Senzitivita dosáhla 12ng/mL a protilátky byly specifické ke clomazonu a neprojevila se křížová reakce k jiným herbicidům. Výsledky ELISA byly srovnatelné s plynovou chromatografií. [41]

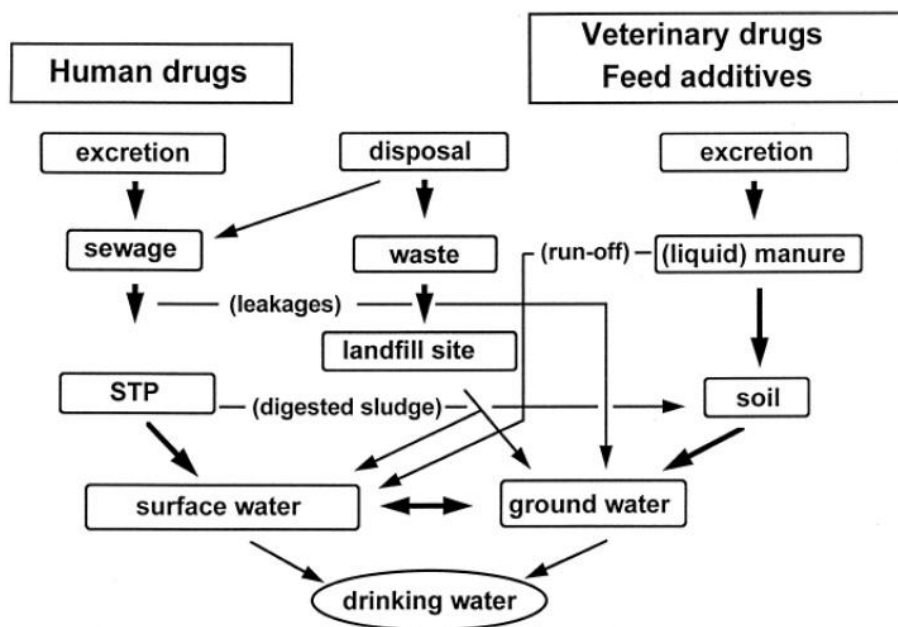
Další demonstrací je detekce glyfosátu (Roundup) pomocí ELISA kitu Abraxis. Výsledky ukázaly srovnatelnost s LC-MS. Přestože ELISA měla několik falešně pozitivních výsledků a ukazovala vyšší hodnoty. Při srovnání cenové náročnosti 100 vzorků, by však tradiční analýza stála 30000\$ proti 1000\$ pro ELISA testy. [42]

4.4 Léčiva v pitné vodě

V českých médiích se občas objeví články o výskytu zbytků léčiv v pitné vodě. Léčiva se mohou do vody dostat buď vyloučením z lidského nebo zvířecího organismu (především v moči) nebo přímo z léčiv, které byly spláchnuty do odpadu. Tak se samozřejmě mohou dostat přes úpravnu vody znovu do rozvodů pitné vody. Odborníci si tento potenciální problém uvědomili a v rámci výzkumného projektu Grantové agentury ČR se jím zabýval Státní zdravotní ústav (SZÚ), který v letech 2009-2011 provedl první systematický screening léčiv v pitných vodách v ČR. Cílem bylo zmapování výskytu zbytků léčiv v pitných vodách a zhodnocení lidské expozice a z ní plynoucí zdravotní riziko. Pro screening bylo vybráno 5 látek. U čtyř – naproxen, ibuprofen, diclofenac (vše protizánětlivé a antirevmatické přípravky) a carbamazepin (antiepileptikum) – se na základě nálezů ze zahraničí a struktury spotřeby léčiv v ČR jevil jejich pozitivní záchyt jako nejvíce pravděpodobný; pátou byla hormonálně aktivní látka 17 α -ethinylestradiol (steroidní kontraceptivum), která má sice dosud nízký záchyt v pitných vodách, ale mediálně i mezi laiky je nejvíce diskutována. Pro stanovení byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s mezí stanovitelnosti (MS) na úrovni 0,5 ng/l, pro 17 α -ethinylestradiol ve druhé a třetí etapě pak 2 ng/l. [43]

V první etapě probíhající v roce 2010 nebyla nalezena koncentrace nad MS (0,5 ng/l) žádné ze sledovaných látek. Ve druhé etapě se SZÚ zaměřil na 23 kritických lokalit (úpravny vod využívající povrchové vody dolních toků řek zatížené odpadními vodami). Nejvíce záchytů bylo u ibuprofenu (12 v koncentračním rozmezí 0,7 až 20,7 ng/l, s mediánem na úrovni 2,0 ng/l). Třetí etapa vzorkování byla zaměřena na ověření vyšších koncentrací nalezených ve druhé etapě a na ověření, zda se látky nalezené na výstupu z úpravny vody objevuje také v síti. Na některých místech se totiž voda dále míchá s vodou z podzemních zdrojů, navíc díky dezinfekci, která se u povrchových vod používá, dochází k oxidaci a částečnému rozkladu těchto látek. Vzorky byly proto odebírány jak na výstupu z úpravny, tak dále v distribuční síti. V této etapě bylo odebráno 15 vzorků vody z 8 různých vodovodů. V naprosté většině případů byly nálezy nižší než ve druhé etapě. Celkově u vzorků odebíraných ze sítě více než 100 vodovodů byl jen ve 3 případech zjištěn pozitivní nález – třikrát se jednalo o ibuprofen (0,5 – 1,2 ng/l), jednou o carbamazepin (4,0 ng/l). Koncentrace 17 α -ethinylestradiolu byly ve všech vzorcích druhé a třetí etapy menší než mez stanovitelnosti (2 ng/l). Na základě výsledků je možné usuzovat na to, že

výskyt léčiv v pitných vodách ČR je buď velmi nízký (nedetekovatelný současnými analytickými postupy) nebo velmi málo pravděpodobný. [43]



Note: STP is sewage treatment plant.

Obr. 17 Cesta léčiv do pitné vody

Pro přiblížení pokud vezmeme nalezené maximum ibuprofenu (20,7 ng/l), člověk by při denní spotřebě 2 l vody musel pít tuto vodu cca 26 tisíc let (!), aby přijal dávku ibuprofenu odpovídající jedné tabletě (400 mg), což je minimální léčebná dávka, kterou nikdo nepovažuje za zdraví škodlivou a v ČR ji běžně a dobrovolně konzumují statisíce osob. Pokud bychom porovnali expozici estrogenům z pitné vody (ten nejhorší zjištěný případ v zahraničí) s expozicí estrogenům z běžné diety (naše strava totiž přirozeně obsahuje určité množství estrogenních látek rostlinného i živočišného původu), např. z mléka, zjistíme, že denní expozice dětí estrogenům z pitné vody je stále asi 150 x nižší než expozice z půl litru vypitého mléka. Expozice dospělých estrogenům z pitné vody byla odhadnuta 82x nižší než expozice estrogenům z běžné stravy. [44]

Možnost detekce ibuprofenu a naproxenu popisuje práce „Immunochemical detection methods for bioactive pollutants“. V rámci výzkumu byly připraveny králičí protilátky proti ibuprofenu a naproxenu pro přípravu ELISA testu. Výsledný pracovní rozsah pro detekci ibuprofenu byl 0,1-146nM, který je dostatečný pro monitorovací účely. [45]

4.5 Antibiotika

Antibiotika jsou běžně používány ve veterinární praxi při chovu hospodářských zvířat k léčení a prevenci nemocí, ale také na podporu růstu. Z toho vyplývá, že jejich zbytky a metabolity se mohou objevit v odpadních vodách. Odhaduje se, že z antibiotik podaných dobytku je 75% vyloučeno a pro některá běžná antibiotika to může být až 90%. Protože i malá množství antibiotik mohou vyvolat tvorbu rezistence u bakterií, je sledování antibiotik v prostředí užitečné.

Vědci vedení Kuldipem Kumarem z Univerzity Minnesota použily ELISA kity pro hledání reziduí léčiv v povrchových vodách. Tyto kity běžně používají potravinářští kontrolóři při testech masa a mléka. Podařilo se jim zjistit stopy tylosinu a tetracyklinu ve vodě a prasečím hnoji. Tyto výsledky potvrdili pomocí LC-MS. Dále konstatovali, že ELISA se stejně citlivá jako LC-MS v částicích na milion, ale je rychlejší, snadnější a levnější (5-15\$ za vzorek proti 150\$ u LC-MS). Přesto je spíše vhodnější jako screeningová metoda z důvodu křížové reaktivity mezi podobnými antibiotiky a jejich metabolity. [46] [47]

Dalším směrem pro rychlou detekci jsou biosenzory. Vědci z Hong-Kongské Polytechnické univerzity použili enzym, který v přítomnosti antibiotik mění barvu. Bylo to umožněno navázáním fluoreskující molekuly na enzym. [48]

4.6 Alergeny v potravinách

Potravinové alergie se objevují u 6% dětí a méně než 4% dospělých. Jejich výskyt se však v posledních letech zvýšil. Navíc mají závažné důsledky a ohrožují život pacientů. Vzhledem k tomu, že alergeny jsou téměř bez výjimky proteiny, jsou cílem hledání alergenů právě ony. Tzv. osmička nejdůležitějších alergenů zahrnuje ořechy (lískové), buráky, soju, vejce, mléko (kasein), ryby, lepek a korýše. [49]

Pro detekci alergenů jsou běžné metody ELISA, hmotová spektrometrie, případně i PCR. Nejčastěji se používají imunochemické metody pro jejich vysokou specifickou a citlivost.

| | | | |
|--------------|---|----------------|---------------|
| Limity ELISA | - | lískové ořechy | 0,5 – 100 ppm |
| | - | gluten (lepek) | 1,5- 80 ppm |

Jsou využívány v laboratořích potravinářského průmyslu a u státních kontrolních zařízení k detekci a kvantifikaci alergenů přítomných v potravinách. Existují ELISA kity pro buráky a lískové oříšky. Výhodou ELISA testů je vysoká citlivost, možnost kvantifikace množství enzymu, jednoduchá a rychlá příprava vzorku. Nevýhodou je nemožnost detekce v případě zpracovaných bílkovin (po denaturaci, enzymatické modifikaci). [49] [50]

4.7 GMO potraviny

V průběhu několika posledních dekad byly vyvinuty metody pro klonování genů a jejich transfer do živých organismů (zvířat a rostlin). Tyto organismy nazýváme GMO (genetically modified organism). Organismy tak mohou získat vlastnosti, které jsou běžnými šlechtitelskými postupy nedosažitelné nebo jen realizovatelné velmi obtížně. [51]

4.7.1 Jaké jsou výhody GMO potravin?

Odolnost proti škůdcům a herbicidům

Ztráty způsobené hmyzem mohou způsobit škody zemědělcům, ale v rozvojových zemích i hladomory. Farmáři proto spotřebují tuny pesticidů ročně. Zákazníci však nechtějí jíst potraviny, které byly ošetřeny pesticidy kvůli možným zdravotním rizikům. Pesticidy se také mohou z polí dostat do vody a znečistit zdroje pitné vody. Proto je výhodné pěstovat např. geneticky upravenou kukuřici (bt corn). Ta obsahuje geny, které způsobují produkci toxinu a tím odolnost proti hmyzu. Nebo RR soja (Roundup Ready) společnosti Monsanto, která je rezistentní proti velmi silnému herbicidu (Roundup - glyfosát). Tak je možné docílit vyšší výnosy a zároveň nižší spotřebu herbicidů. [51]

Odolnost proti nemocem

Existuje mnoho virů, hub a bakterií, které způsobují nemoci rostlin. Vědci proto pracují na vytvoření odolných druhů rostlin proti těmto nemocem. Např. geneticky upravená švestka, odolná proti šarce. [52]

Odolnost proti chladu, suchu, obsahu soli v půdě

Gen pro zvýšení odolnosti proti mrazu od ryby žijící v chladných vodách byl přenesen na rostliny tabáku a brambor. Existují geneticky upravená rajčata schopná akumulovat sůl do listů, ale plody zůstávají nezměněné.

Lepší nutriční hodnoty

Slepota způsobená nedostatkem vitamínu A je běžný problém v rozvojovém světě. Tzv. zlatá rýže má zvýšený obsah beta-karotenu (vitamin A) a mohla by tak zachránit hodně lidí. Bohužel iracionální strach z GMO potravin v Evropě blokuje její další vývoj. [51]

4.7.2 Detekce GMO

Právě možná zdravotní rizika, aplikace předběžné opatrnosti, strach ze spotřeby GMO potravin a zákonné překážky na trzích vedou k nutnosti značení těchto potravin. To zároveň vyžaduje kontrolu a detekci genetických modifikací.

Vývozci testují RR odrůdy pomocí klíčení s přidaným herbicidem. Pokud klíčky odumřou nebo mají defekty je odrůda non-GMO, v opačném případě se jedná o RR odrůdu. V dnešní době existují 2 základní chemické metody pro identifikaci GMO v semenech, rostlinách a potravinách.

ELISA testy na protilátky k bílkovinám, které umožňují rychlou identifikaci a rozlišení GMO a non-GMO zrní. Test však je specifický jen na jeden specifický druh (např Bt - *Bacillus thuringiensis* nebo RR) a není ho tak možné použít na určení bez/s GMO. Druhou možností je DNA/PCR používaná také při rozhodnutí v silech ohledně separace GMO, ale spíše při vývoji, šlechtění a výrobě. PCR je přesnější, citlivější a je preferována pro detekci obsahu GMO. Velkou výhodou PCR je možnost procentní kvantifikace GMO v ne GMO vzorcích. PCR je jediná metoda umožňující detekci GMO v tepelně zpracovaných potravinách.

ELISA testy se používají ve formě proužků (podobné jako těhotenské testy) pro orientační zkoušky. Délka testu je cca 2-5 minut. Výhodou je relativní snadnost použití a nízká cena. Druhou možností jsou standardní ELISA destičky, které umožňují i přibližnou kvantifikaci GMO ve vzorku a výsledek je zjištěn za 2-4 hodiny. ELISA testy mají omezenou možnost využití u zpracovaných potravin, protože vysoké teploty denaturují bílkoviny a tím znesnadňují jejich detekci. [53] [54]

Pozitivní výsledky detekce proteinů geneticky modifikované sóji byly získány do teplot pod 65 °C. Při ohřátí po dobu 15 minut nad touto teplotou již nebyly specifické proteiny protilátkami detekovány. [55]

Přehled dostupných GMO ELISA testů uvádí zdroj [56] a zároveň upozorňuje na další nevýhody:

- neumí rozlišit mezi různými transgeními projevy jejichž výsledkem je podobný protein
- dlouhý čas nutný k vývoji kitu
- protein ovlivněný GMO může být produkován jen v některém vegetačním období nebo jen v určité části rostliny

ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo na základě získané literatury popsat fungování a podmínky provedení metody ELISA a možnosti její aplikace při detekci látek v oblasti životního prostředí, kterému je v dnešní době věnována zvýšená pozornost.

Práce je rozdělena do několika částí.

První část se zaměřuje na problematiku metody ELISA. Začíná historií vzniku metody a pokračuje popisem jednotlivých složek testu. Poté jsem rozebral různé varianty ELISA metody včetně jejich výhod a nevýhod. Pro srovnání jsem krátce uvedl i alternativní metody a jejich využití.

Další část obsahuje přehled látek a možnosti jejich detekce pomocí ELISA testů a srovnání s dalšími metodami. Z práce vyplývá, že ELISA má značně široké možnosti využití při detekci škodlivých látek v environmentální analýze a je zvláště vhodná pro produktivní a nenákladný screening i přímo v terénu.

Problémy nastávají při nutnosti přesných měření koncentrací, analýze tepelně zpracovaných vzorků, při detekci širší skupiny podobných proteinů nebo v případě křížové reakce protilátek. V těchto případech je vhodné doplnit ELISA testy zkouškami LC-MS, případně pomocí DNA-PCR.

Množství nalezených zdrojů umožňuje další rozšíření znalostí o možnostech aplikace metody v různých oblastech.

Zajímavým rozšířením práce by mohlo být praktické ověření detekce přímo v terénu např. v rámci diplomové práce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. TIJSSEN, P. *Practise and theory enzyme immunoassays*. s.l. : Elsevier, 1985. ISBN 978-0444806338.
2. *A User's Guide to Environmental Immunochemical Analysis*. US EPA, Office of research and Development, 1994 [online] [cit. 2012-4-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.epa.gov/heads/edrb/chemistry/immochem/user-guide.html>>
3. *ELISA Technical Guide*. [online] [cit. 2012-4-1]. Dostupný z WWW: <http://www.idexx.fr/pubwebresources/pdf/en_us/livestock-poultry/0965846.pdf>
4. *Learning Guide Immunoassay*. Abbott. [online] [cit. 2012-5-1]. Dostupný z WWW: <http://uqu.edu.sa/files2/tiny_mce/plugins/filemanager/files/4180098/solomn/learning_immunoassay.pdf>
5. *Misdiagnosis of Cancer*. abcnews.go.com. [online] [cit. 2012-5-1]. Dostupný z WWW: <<http://abcnews.go.com/Primetime/story?id=132213&page=1#.T6DNodVqjPZ>>
6. *Thermo Scientific Microtiter Plate Guide*. www.thermo.com. [online] [cit. 2012-4-27]. Dostupný z WWW: <http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_25447.pdf>
7. *Antibody basics*. Proteintech Group Inc. [online] [cit. 2012-3-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.ptglab.com/Support/TechnicalSupport/LearningCenter/AntibodyBasics.aspx>>
8. *Slovníček - monoklonální protilátky*. [online] [cit. 2012-4-1]. Dostupný z WWW: <<http://www.linkos.cz/slovnicek/monoklonalni-protilatky/>>
9. *HaptenDB. A Database of Haptens and Their Carriers*. [online] [cit. 2012-4-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.imtech.res.in/raghava/haptendb/>>
10. *hapten (biochemistry)*. Encyclopedia Britannica. [online] [cit. 2012-4-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/254765/hapten>>
11. *Biotinylation*. Piercenet.com. [online] [cit. 2012-4-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=84EBE112-F871-4CA5-807F-47327153CFCB#introduction>>
12. *Pierce Iminobiotin Agarose*. Thermo Fisher Scientific. [online] [cit. 2012-4-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01021201>>

13. *Avidin* - Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Company. [online] [cit. 2012-4-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.worthington-biochem.com/av/default.html>>
14. *Peroxidase* - Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corp. [online] [cit. 2012-4-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.worthington-biochem.com/hpo/default.html>>.
15. *Enzyme explorer - Peroxidase enzymes*. Sigma-Aldrich. [online] [cit. 2012-4-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/peroxidase-enzymes.html>>
16. *ELISA AP Substrates*. www.kpl.com. [online] [cit. 2012-4-21]. Dostupný z WWW: <http://www.kpl.com/catalog/categories.cfm?Catalog_ID=17&Category_ID=451>
17. *KPL ELISA Technical Guide*. www.kpl.com. [online] [cit. 2012-4-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.kpl.com/docs/techdocs/KPL%20ELISA%20Technical%20Guide.pdf>>
18. NILSSON, Anders. *The forensic luminol test for blood: unwanted interference and the effect on subsequent analysis*. www.imprimus.net. [online] [cit. 2012-4-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.imprimus.net/PDF%20Files/Downloadable%20Files%20Page/Luminol%20Test%20for%20Blood%20-%20Interference%20and%20Effect%20on%20Analysis.pdf>>
19. *Overview of ELISA*. Thermo Fisher Scientific. [online] [cit. 2012-4-3]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>>
20. *Western blotting - A beginner's guide*. www.abcam.com. [online] [cit. 2012-4-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>>
21. *Beginner's guide to real-time PCR*. Primerdesign.co.uk. [online] [cit. 2012-4-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.primerdesign.co.uk/Download%20material/Beginners%20guide%20to%20real-time%20PCR.pdf>>
22. TAMARIN, Robert. *Principles of genetics* 6th ed., WCB/McGraw-Hill, 1999. ISBN 0-697-35462-8.

23. *What are biosensors?* <http://www.lsbu.ac.uk>. [online] [cit. 2012-4-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>>
24. *High-Performance liquid Chromatography*. www.ux1.eiu.edu. [online] [cit. 2012-4-28]. Dostupný z WWW: <<http://www.ux1.eiu.edu/~cfjpb/teaching/ia/iaprojects/hplc.pdf>>
25. *Toxikon*. www.biotox.cz. [online] [cit. 2012-4-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.biotox.cz/toxikon/sinice/index.php#toxiny>>
26. *Sinice opět na postupu*. www.tyden.cz. [online] [cit. 2012-4-23]. Dostupný z WWW: <http://www.tyden.cz/rubriky/cestovani/sinice-opet-na-postupu-luhacovice-jen-pro-zdrave_174211.html>
27. STEWART, Ian, A., SEAWRIGHT Alan a R., SHAW Glen. *Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview*. www.epa.gov. [online] [cit. 2012-4-20]. Dostupný z WWW: <http://www.epa.gov/cyano_habs_symposium/monograph/Ch28.pdf>
28. *Mykotoxiny*. www.agronavigator.cz. [online] [cit. 2012-4-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76672>>
29. LOFTIN, Keith, GRAHAM, Jennifer a ROSEN, Barry. *Analytical methods for Cyanotoxin Detection and Impacts on Data Interpretation*. www.usgs.gov. [online] [cit. 2012-4-25]. Dostupný z WWW: <<http://ks.water.usgs.gov/studies/qw/cyanobacteria/loftin-analytical-Methods.pdf>>
30. *Algal Toxins - ELISA Kits*. Abraxis kits. [online] [cit. 2012-4-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.abraxiskits.com/productByCat.php?catId=36>>
31. PERKINS, Dawn. *Detection of Cyanobacteria and Cyanotoxins: Current Methodologies*. www.noaa.gov. [online] [cit. 2012-4-10]. Dostupný z WWW: <http://www.glerl.noaa.gov/res/Centers/HumanHealth/docs/wisconsin_workshop/perkins_hab_wis.pdf>
32. WANG, Libing, a další. *Simple, Rapid, Sensitive, and Versatile SWNT–Paper Sensor for Environmental Toxin Detection Competitive with ELISA*. *NANO letters*. [online] 2009 [cit. 2012-4-6]. Dostupný z WWW: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl902368r>>
33. PASCALE, Michelangelo. *Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products*. www.doiserbia.nb.rs. [online] [cit. 2012-4-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-4906/2009/0352-49060917015P.pdf>>

34. *What are endocrine disruptors?* ec.europa.eu. [online] [cit. 2012-4-10]. Dostupný z WWW: <http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis_en.htm>
35. *Preservation and Quantification of Hormones in Surface Water.* www.gilson.com. [online] [cit. 2012-4-10]. Dostupný z WWW: <http://www.gilson.com/Resources/Hormones_Water_SPE_Note_ENV_0410_AUG_2010.pdf>
36. ORLANDO, Edward F., a další. *Endocrine-Disrupting Effects of Cattle Feedlot Effluent on an Aquatic Sentinel Species, the Fathead Minnow.* www.nih.gov. [online] [cit. 2012-4-14]. Dostupný z WWW: <<http://ehp03.niehs.nih.gov/article/info:doi/10.1289/ehp.6591>>
37. HUANG, Ching-Hua a SEDLAK, David L. *Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using ELISA and gas chromatography/tandem mass spectrometry.* swrcb2.swrcb.ca.gov. [online] [cit. 2012-4-25]. Dostupný z WWW: <http://swrcb2.swrcb.ca.gov/waterrights/water_issues/programs/bay_delta/deltaflow/docs/exhibits/sfwc/spprt_docs/sfwc_exh3_huang.pdf>
38. *Importance of E2 Determination.* ABRAXIS. [online] [cit. 2012-4-23]. Dostupný z WWW: <http://www.abraxiskits.com/uploads/products/docfiles/284_AE2%20PL%20ABX%20Users%20Guide.pdf>
39. *Estrogen (E1/E2/E3) EIA kit - product description.* Biosense laboratories. [online] [cit. 2012-4-13]. Dostupný z WWW: <http://www.biosense.com/docs/Estrogen-E1_E2_E3-ELISA.pdf>
40. *FATHEAD MINNOW VITELLOGENIN ELISA KIT.* www.biosense.com. [online] [cit. 2012-4-10]. Dostupný z WWW: <http://www.biosense.com/docs/FHM_%282005.1%29.pdf>
41. KOPPATSCHKEK, Fritz K. *Enzyme-linked immunosorbent assay for herbicide detection.* University of Illinois at Urbana-Champaign. [online] [cit. 2012-5-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.ideals.illinois.edu/handle/2142/21758>>
42. *Low cost monitoring of glyphosate in surface waters using ELISA method: an evaluation.* Abraxis. [online] [cit. 2012-5-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.abraxiskits.com/moreinfo/PN500081pub.pdf>>

43. *Jak je to s výskytem léčiv v pitné vodě v České republice.* www.vodarenstvi.cz. [online] [cit. 2012-3-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.vodarenstvi.cz/clanky/jak-je-to-s-vyskytem-leciv-v-pitne-vode-v-ceske-republice>>
44. *Výskyt humánních léčiv v pitných vodách v České republice.* www.szu.cz. [online] [cit. 2012-4-1]. Dostupný z WWW: <http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr_leciva/Vyskyt_leciv_v_pitne_vode_CR_zprava_na_www_szu_verze_4.pdf>.
45. MEULENBERG, Eline, a další. *Immunochemical detection methods for bioactive pollutants.* www.ingentaconnect.com. [online] [cit. 2012-5-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.ingentaconnect.com/content/tandf/geac/2005/00000085/F0020012/art00006>>
46. BARRET, Julia R. *Agriculture: Tracking Antibiotics in Groundwater.* US National Library of medicine. [online] [cit. 2012-5-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247553/>>
47. *Water pollution.* Sustainable table. [online] [cit. 2012-5-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.sustainabletable.org/issues/waterpollution/>>
48. WONG, Kwok-yin. *World-first biosensors tests food antibiotics.* Newsletter of the Research Grants Council of Hong Kong, China. [online] [cit. 2012-5-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.ugc.edu.hk/rgc/rgcnews12/Pages/5%20Biosensor-E.html>>
49. ALIMKULOV, Arman. *Detection of Food Allergens using ELISA.* [online] [cit. 2012-5-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.traceorganic.com/2006/presentations/Detection%20of%20Food%20Allergens%20using%20ELISA-%20Arman%20Alimkulov.pdf>>
50. *Methods for allergen detection.* MoniQA, Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain. [online] [cit. 2012-5-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.moniqua.org/node/1193>>
51. WHITMAN, Deborah. *Genetically Modified Foods: Harmful or Helpful?* [online] [cit. 2012-5-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.csa.com/discoveryguides/gmfood/overview.php#n15>>
52. *GM Crop Database.* Center for Environmental Risk Assessment. [online] [cit. 2012-5-18]. Dostupný z WWW: <http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=Submit&evidcode=C5>

53. *ELISA GMO Testing of Seed, Grain, Feed and Food*. Biogenetic services, Inc. [online] [cit. 2012-5-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.biogeneticservices.com/elisagmo.htm>>
54. *Commonly Used Methods for Detecting GMOs in Grain Crops*. Ohio State University. [online] [cit. 2012-5-21]. Dostupný z WWW: <<http://ohioline.osu.edu/agf-fact/0149.html>>
55. URBANEK-KARLOWSKA, B, a další. *Usefulness of an immunoassay test TRAIT for detection of genetically modified Roundup ready soybean in food products*. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA. [online] [cit. 2012-5-5]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11878012>>
56. CHALAM, V.C. a KHETARPAL, R.K. *ELISA-based Detection of GMO*. National Bureau of Plant Genetic resources. [online] [cit. 2012-5-23]. Dostupný z WWW: <http://www.envfor.nic.in/divisions/csurv/biosafety/Gef2/T5/12%20Dr.%20Celia_ELISA%20based%20detection%20of%20LMOs.pdf>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| AP | Alkaline phosphatase |
| BSA | Bovine serum albumine |
| ECL | Enhanced chemiluminiscence |
| EIA | Enzyme immunoassay |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| HPLC | High-performance liquid chromatography |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| PPi | Protein Phosphatase Inhibition Assay |
| SWNT | Single-walled carbon nanotubes |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1 Vznik HAMA falešně pozitivního a negativního výsledku..... | 12 |
| Obr. 2 ELISA destička..... | 14 |
| Obr. 3 Čtečka destiček [yongchuang.com] | 15 |
| Obr. 5 Struktura protilátky..... | 16 |
| Obr. 4 Antigen | 16 |
| Obr. 6 Biotin versus biocytin | 19 |
| Obr. 7 Streptavidin..... | 20 |
| Obr. 8 Luminol | 22 |
| Obr. 9 Formáty testu ELISA..... | 23 |
| Obr. 10 Western Blot..... | 26 |
| Obr. 11 Princip PCR | 27 |
| Obr. 12 Schéma biosenzoru | 28 |
| Obr. 13 Vodní květ, sinice | 31 |
| Obr. 14 SWNT – jednotěnná uhlíková nanotrubička..... | 33 |
| Obr. 15 Pimephales promelas | 34 |
| Obr. 16 Detekce Vtg - sendvič ELISA | 36 |
| Obr. 17 Cesta léčiv do pitné vody..... | 38 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--------------------------------------|----|
| Tab. 1 Srovnání počtu dokumentů..... | 30 |
| Tab. 2 Srovnání toxicity..... | 31 |