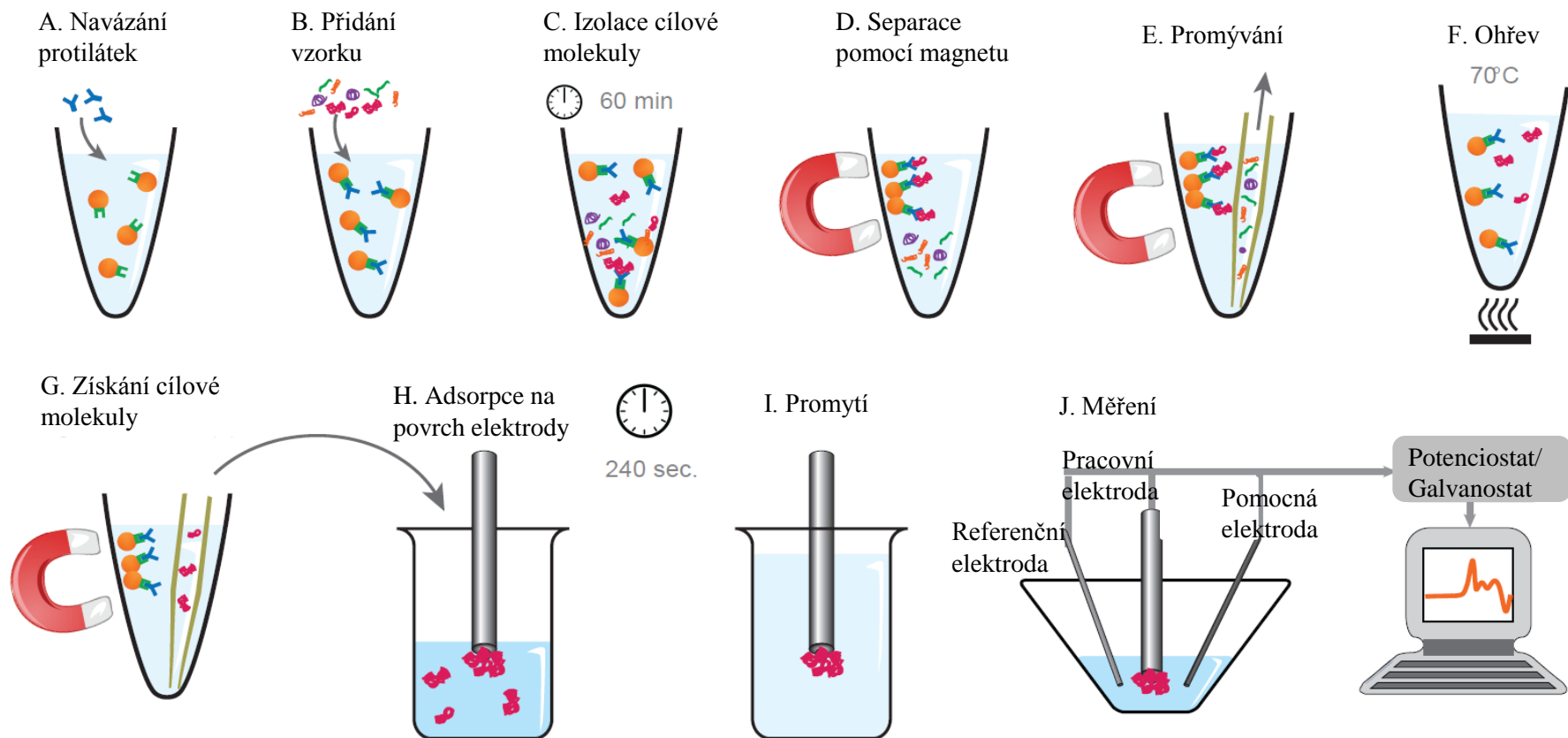


Název: Magnetické částice pro detekci  
nádorových onemocnění, založené na  
protilátkách

Školitel: Vojtěch Adam

Datum: 7.11.2013

# Metodika stanovení MT

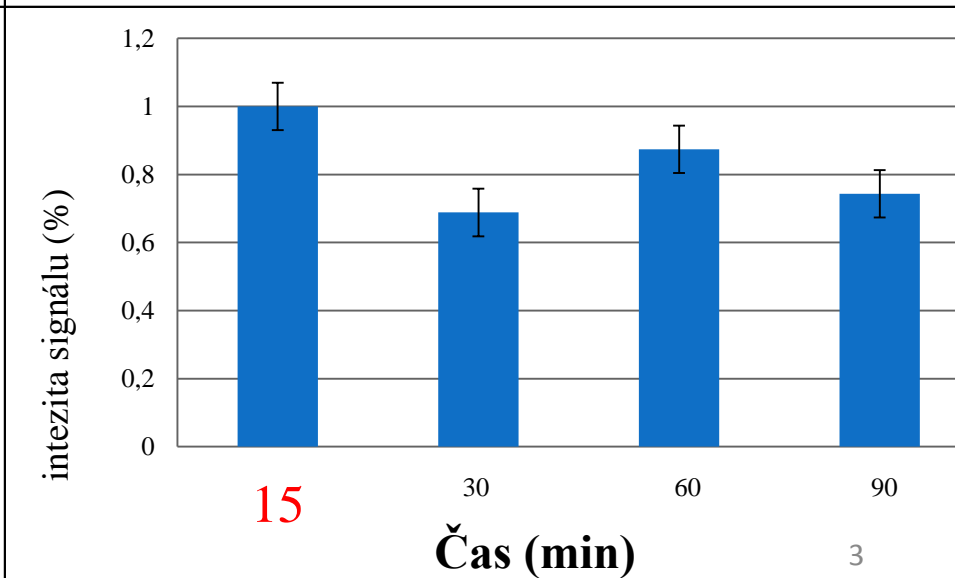
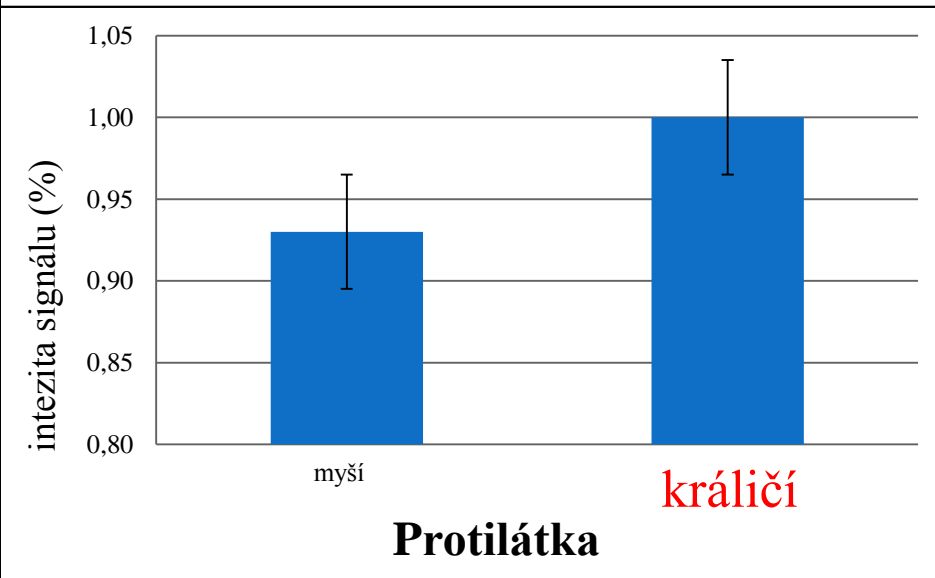
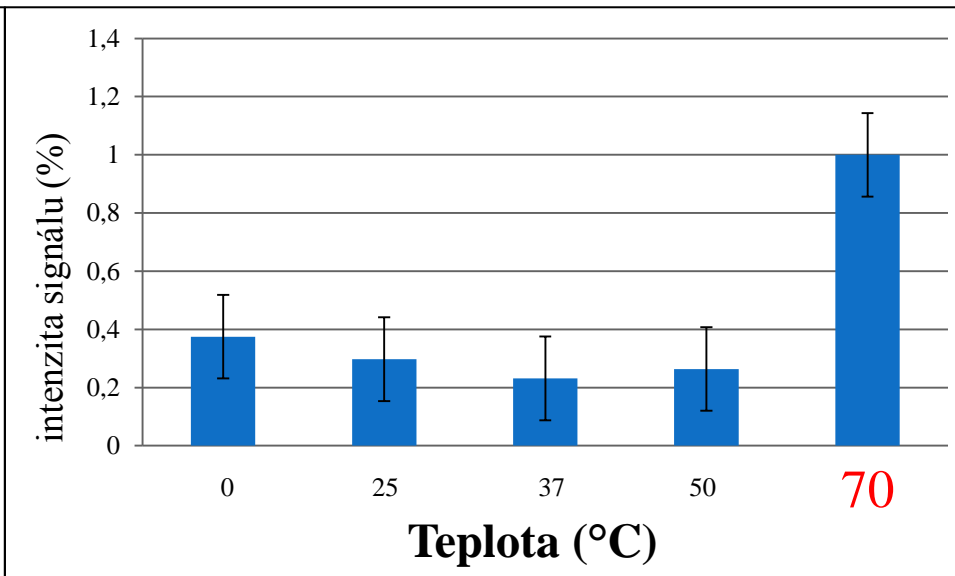
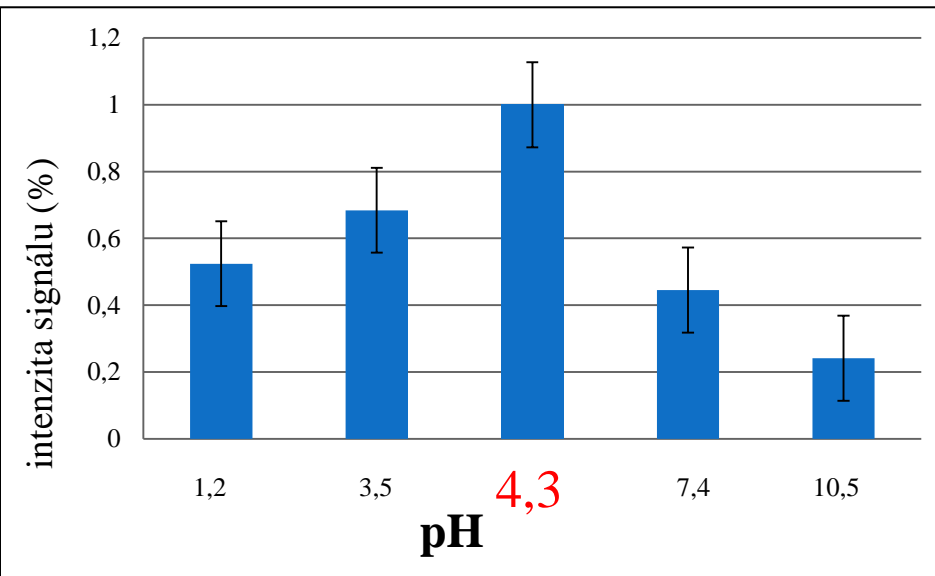


- Polyklonální králičí protilátka, acetátový pufr, inkubace 15 minut při 70°C
- Elektrochemické stanovení (tzv. Brdičkova reakce-limit detekce 100 pM)

Isolation of metallothionein from cells derived from aggressive form of high-grade prostate carcinoma using paramagnetic antibody-modified microbeads off-line coupled with electrochemical and electrophoretic analysis

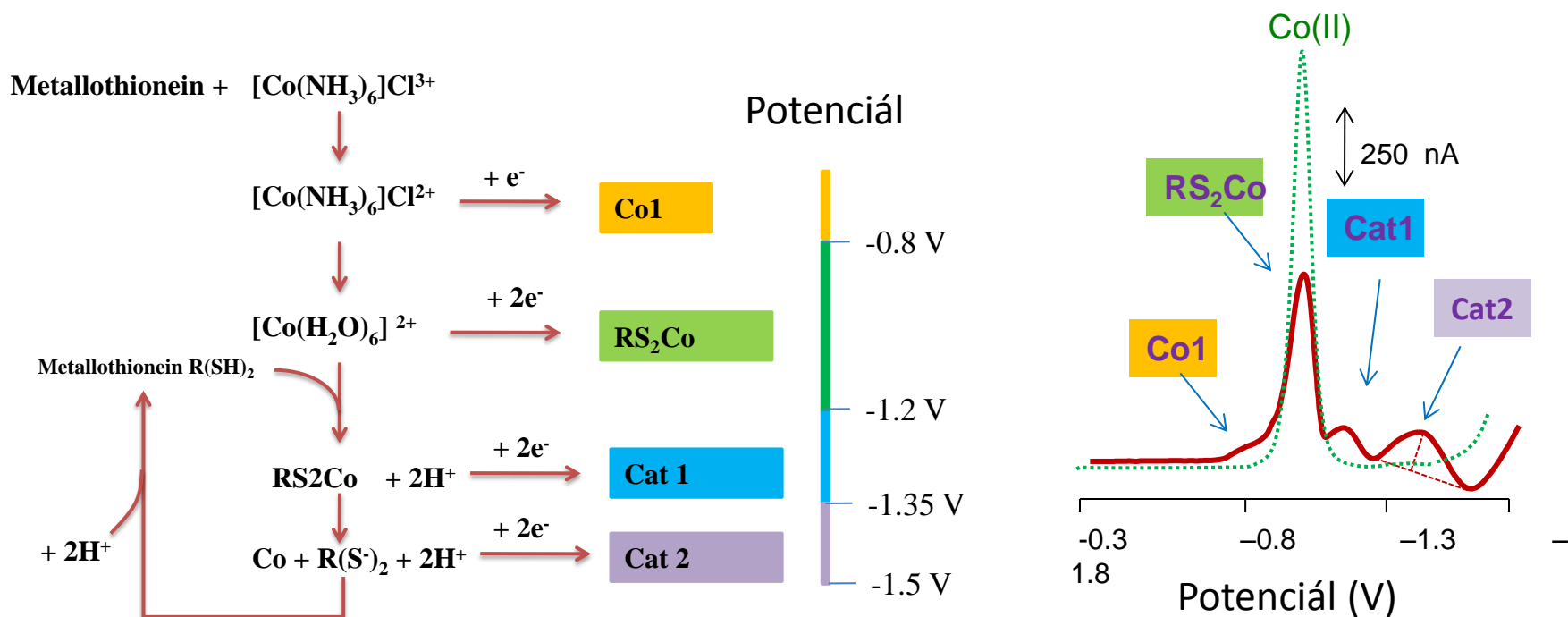
Masařík, M., Gumulec J., Sztalmachová, M., Hlavna, M., Babula, P., Křížková, S., Ryvolová, M., Jurajda, M., Sochor, J., Adam, V., Kizek, R., Electrophoresis 2011, 32, 1–13

# Metodika stanovení MT

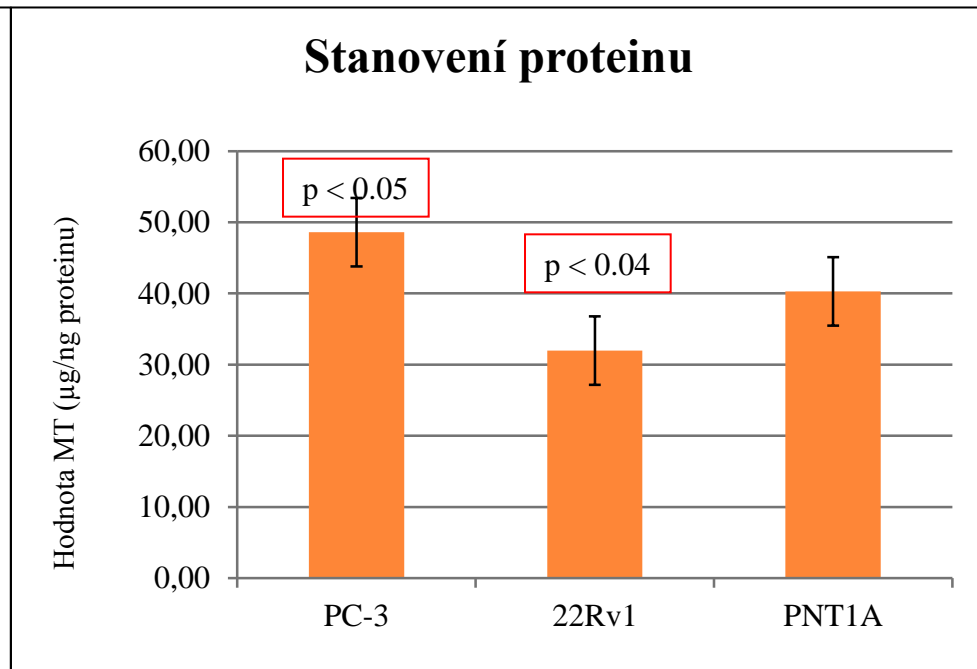
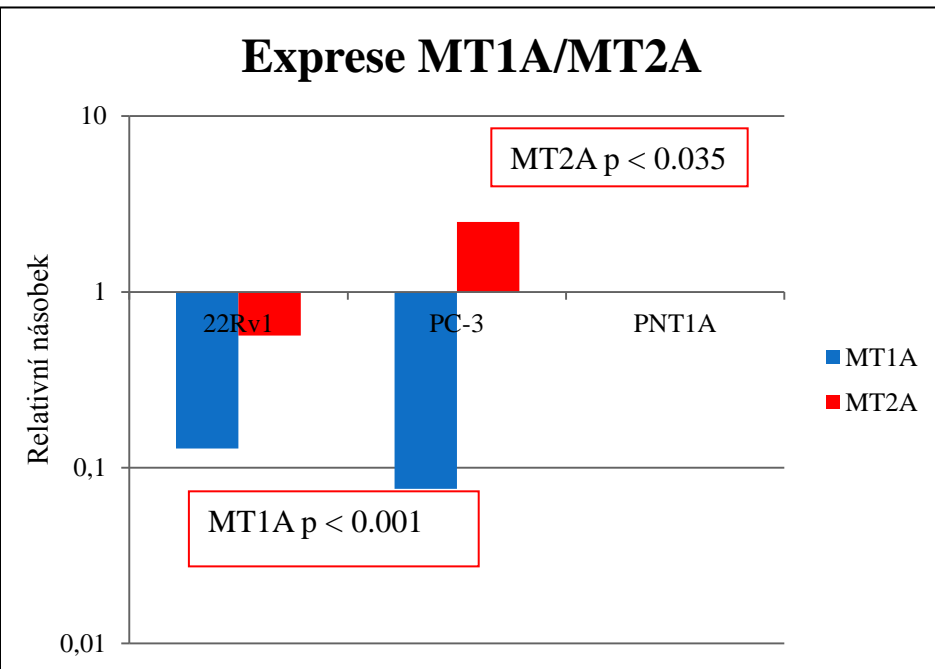


# Brdičkova reakce

- Adsorptivní přenosová technika ve spojení s diferenční pulzní voltametrií – Brdičkova reakce
- Vylučování vodíku ze základního elektrolytu (Brdičkova soluce – 1 mM  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  a 1 M amonný pufr ( $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ , pH = 9.6) v přítomnosti proteinů obsahujících –SH skupinu
- Sledujeme katalytický signál – Cat2



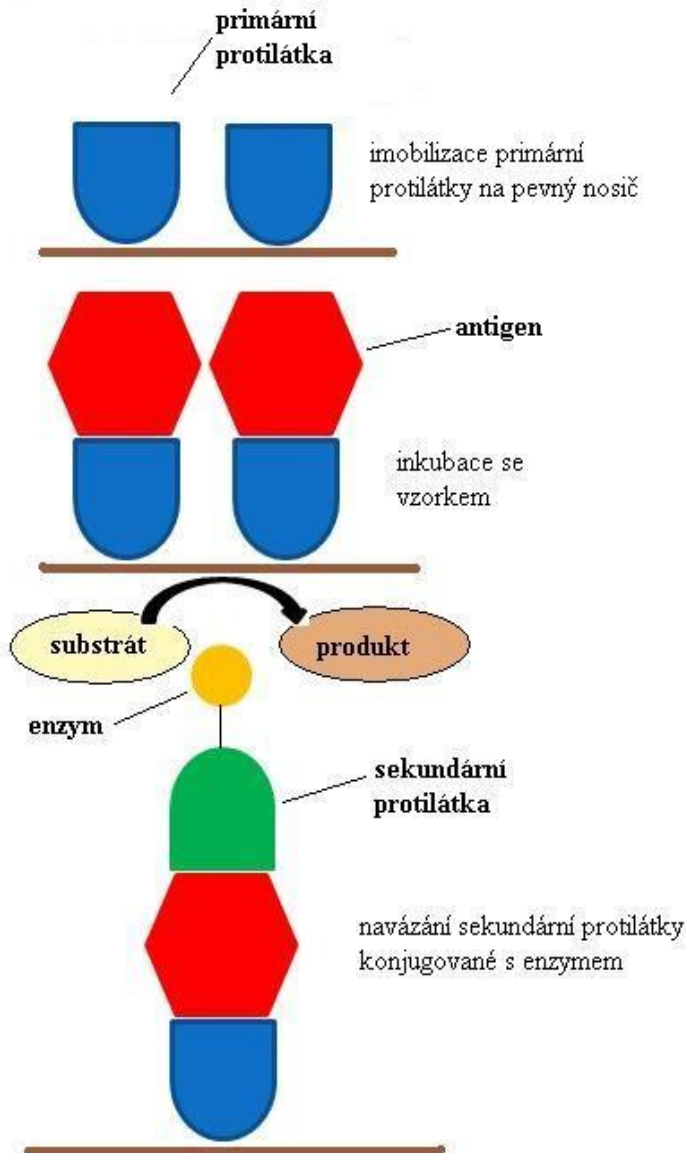
# Stanovení MT



Determination of metallothioneins and alpha-methylacyl-CoA recemase in tumor prostate diseases

Masařík, M., Gumulec, J., Sztalmachová, M., Hlavna, M., Kuchtíčková, Š., Rovný, A., Hrabec, R., Eckschlager, T., Křížková, S., Adam V., Kizek, R., 7.Symposium a workshop molekulární patologie a histo-cyto-chemie. 2011.ISBN 978-80-87327-59-3.

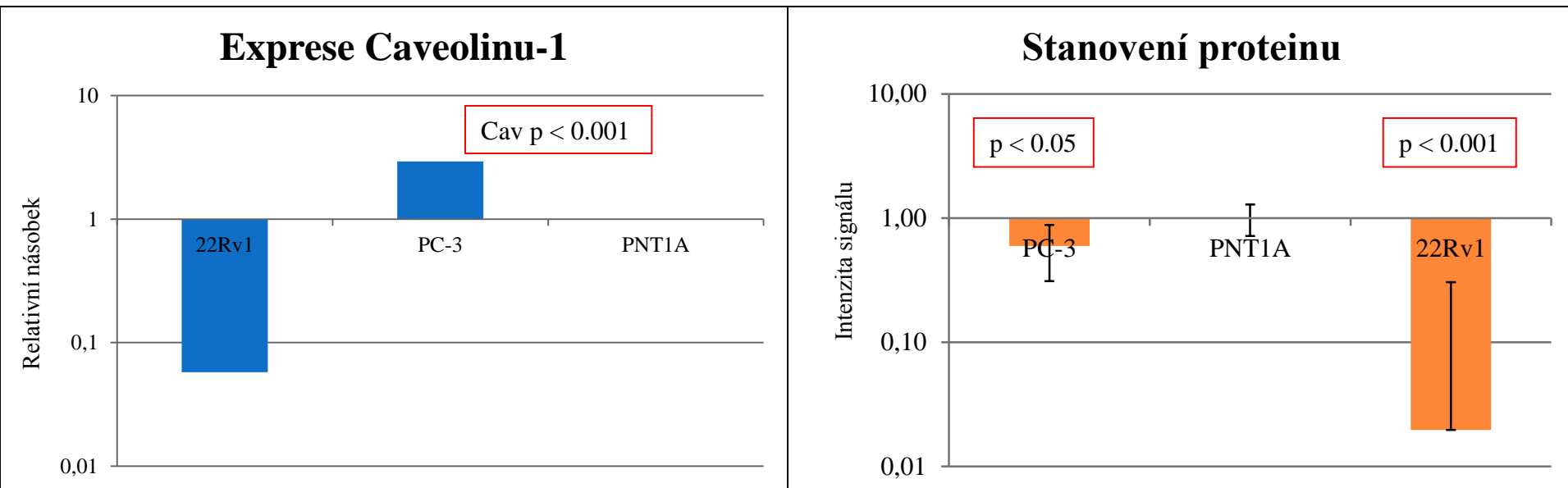
# Metodika stanovení Caveolinu-1



- ELISA (imunologická metoda založena na specifické reakci antigenu s protilátkou)
- Byl použit set pro stanovení caveolin-1 od firmy USCN Life Science Inc.

- Monoklonální protilátka proti caveolinu-1
- Testovaný vzorek (antigen), na který se naváže polyklonální protilátka konjugovaná s biotinem
- Avidin konjugovaný s peroxidázou
- TMB substrát (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) → dochází k barevné změně
- Stop reagensie ( $H_2SO_4$ )
- Fotometrická detekce při 450 nm

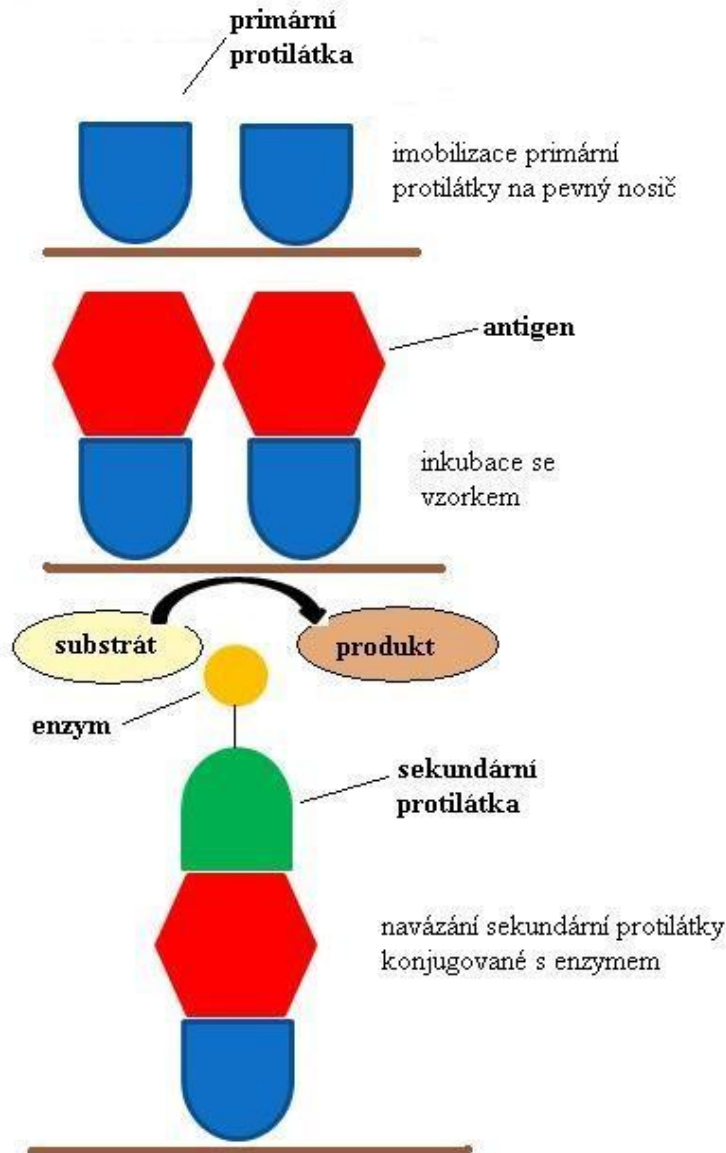
# Stanovení Caveolinu-1



Apoptický proliferační expresní profil u nádorových prostatických buněk

Gumulec, J., Hlavna, M., Sztalmachová, M., Pávková –Goldbergová, M., Křížková, S., Adam, V., Kizek, R., Masaříková, M., Masařík, M., XXXV. Brněnské onkologické dny. 2011, ISBN 978-80-86793-17-7.

# Metodika stanovení PSA



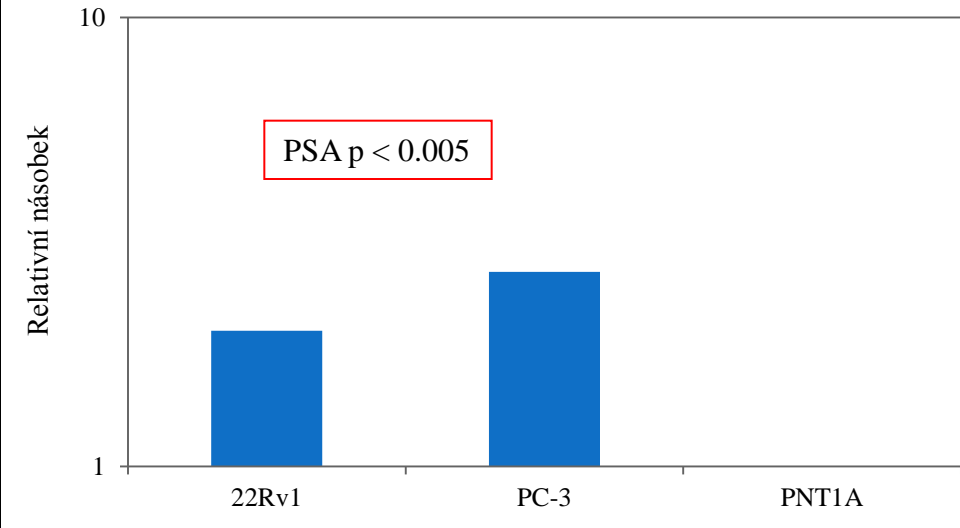
- Pro analýzu PSA byla použita ELISA metoda . Stanovení se provádělo pomocí automatického analyzátoru AIA 600 II
- Myší monoklonální protilátka proti PSA→testovaný vzorek (antigen)
- Sekundární monoklonální protilátka konjugovaná s hovězí alkalickou fosfatázou
- Přidán fluorogenní substrát (4-methylumbelliferyl fosfát)
- Pomocí fluorescenční intenzity změřena aktivita enzymu



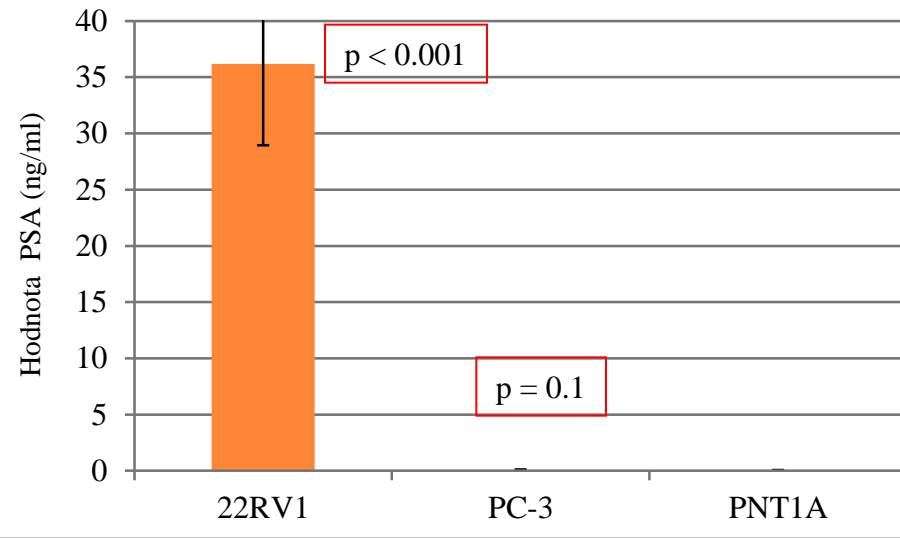
# Stanovení PSA

682 krát  
zvýšeno oproti  
PNT1A

## Exprese PSA



## Stanovení proteinu



# Výsledky

		PNT1A	PC-3	22RV1
Na úrovni proteinu	<i>Caveolin-1</i>	kontrola	1,6x snižená	50x snižená
	<i>MT</i>	kontrola	1,2x zvýšená	1,2x snižená
	<i>PSA</i>	kontrola	nezměněná	682x zvýšená
Na úrovni RNA	<i>Caveolin-1</i>	kontrola	2,9x zvýšená	17,5x snižená
	<i>MT1A</i>	kontrola	14,3x snižená	8,3x snižená
	<i>MT2A</i>	kontrola	2,5x zvýšená	1,7x snižená
	<i>PSA</i>	kontrola	2,7x zvýšená	2x zvýšená

- Výsledky byly vyhodnoceny v softwaru Statistica 9
- K porovnání hladiny mezi kontrolní a nádorovými liniemi bylo použito t-testů

# Děkuji Vám za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.4.00/31.0023

Název projektu: Partnerská síť centra excelentního bionanotechnologického výzkumu