

BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY IMOBILIZOVANÉ NA MAGNETICKÝCH NOSIČÍCH A JEJICH VYUŽITÍ V BIOCHEMII A BIOTECHNOLOGII

MICHAELA PEČOVÁ^a, LUDMILA ZAJONCOVÁ^a, KATEŘINA POLÁKOVÁ^b, JAN ČUDA^b, MIRKA ŠAFAŘÍKOVÁ^c, MAREK ŠEBELA^a a IVO ŠAFAŘÍK^{b,c}

^a Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, ^b Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů [Katedra fyzikální chemie a Katedra experimentální fyziky], Přírodovědecká Fakulta, Univerzita Palackého, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, ^c Oddělení nanobiotechnologie, Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, v. v. i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice
ivosaf@yahoo.com

Došlo 7.1.10, přepracováno 9.11.10, přijato 25.11.10.

Klíčová slova: magnetické nanočástice a mikročástice, imobilizace, biotechnologie, biologicky aktivní látky, proteiny

Obsah

1. Úvod
2. Syntéza, modifikace a charakterizace magnetických mikročástic a nanočástic
3. Imobilizace biologicky aktivních látek na magnetických nosičích
4. Aplikace biologicky aktivních látek imobilizovaných na magnetických nosičích
 - 4.1. Imobilizované proteiny
 - 4.2. Imobilizované nukleové kyseliny a oligonukleotidy
 - 4.3. Imobilizované sacharidy
 - 4.4. Ostatní imobilizované biologicky aktivní látky
5. Závěr

1. Úvod

Magnetické nanočástice a mikročástice jsou středem velkého zájmu pro své potenciální použití v různých biologických disciplínách, biotechnologiích, environmentálních technologiích, medicíně i v analytických aplikacích. Tyto částice mají většinou charakter kompozitních materiálů, které jsou složeny z vlastní fero- nebo ferimagnetické složky (zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem) a složky většinou diamagnetické (nemagnetické), která zajišťuje požadovanou interakci s biologickými systémy¹.

Obecnou výhodou magnetických kompozitních materiálů je možnost cílené manipulace působením vnějšího magnetického pole. Spojením magnetických nosičů (jak v podobě magnetických nanočástic s rozměrem pod 100 nm, tak i magnetických mikročástic) s biologicky aktivní látkou lze dosáhnout unikátních vlastností vzniklých materiálů využitelných v biochemii, molekulární a buněčné biologii, (nano)biotechnologii, (nano)medicině a jinde. Tyto materiály je možné separovat i ze složitých biologických systémů (např. buněčných suspenzí, homogenátů, fermentačních médií apod.). Nejčastějšími materiály pro přípravu magnetických nosičů biologicky aktivních látek jsou biokompatibilní magnetické oxidy železa magnetit a maghemit (případně jejich směsi) a rovněž různé typy feritů, a to ve formě prášků nebo magnetických kapalin. V současné době se věnuje velká pozornost jednodoménovým a superparamagnetickým nanočásticím. Jednodoménové částice obsahují pouze jednu magnetickou doménu, ve které jsou magnetické momenty uspořádány paralelně a výsledný vektor magnetizace je mnohem vyšší než u multidoménových mikročástic. Unikátní magnetické vlastnosti nanočástic spolu s jejich ohromným povrchem (řádově $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) umožňující navázat velké množství ligandů jsou podstatou jejich využití jako efektivních nosičů pro účinnou a rychlou imobilizaci a separaci biologicky aktivních látek.

Vzhledem k tomu, že imobilizace nejrůznějších biologicky aktivních látek je jednou z klíčových technik v biochemii a biotechnologiích, budou v tomto stručném přehledném článku podány základní informace o přípravě magnetických nosičů biologicky aktivních látek a jejich možném využití.

2. Syntéza, modifikace a charakterizace magnetických mikročástic a nanočástic

V souvislosti s rostoucím uplatněním magnetických částic v biologických vědách či biotechnologiích byla vyvinuta a publikována řada metod jejich syntézy. Obecně se metody syntézy zaměřují na přípravu práškových materiálů, obsahujících především mikročástice či nanočástice maghemitu, magnetitu, směsných oxidů železa nebo feritů, na přípravu magnetických kapalin a na syntézu magnetických částic přímo v prostředí obalového, často (bio)polymerního materiálu, jehož úkolem je jejich stabilizace, dispergace a funkcionalizace jejich povrchu.

Mezi nejčastější metody syntézy magnetických nanočástic a mikročástic pro bioaplikace patří chemické reakce zahrnující např. srážecí reakce solí železa, termické rozklady prekurzorů obsahujících železo, sol-gel reakce, mikroemulzní techniky, sonochemické syntézy aj. V obsáhlém přehledu Laurentové a spol. je uveden podrobný popis

nejrůznějších technik a metod vedoucích k přípravě magnetických nanočástic oxidů železa i s jejich fyzikálními a chemickými vlastnostmi a biologickými aplikacemi². Zajímavou metodou přípravy magnetických částic jednotné velikosti je produkce tzv. magnetosomů (částice magnetitu obalené fosfolipidovou membránou) magnetotaktickými bakteriemi³.

Nejčastěji využívanou metodou k přípravě částic magnetitu či maghemitu ve velkém množství je tzv. spolusrážení². Při této metodě reagují železnaté a železité ionty v zásaditých roztocích. Velikost a tvar vzniklých oxidů železa závisí na typu použité soli, reakční teplotě, pH, iontové síle aj. Touto metodou vznikají většinou částice s různou velikostí. Přídavek chelatujících organických aniontů (např. kyseliny citronové nebo olejové), nebo polymerů jako je dextran, škrob či poly(vinylalkohol) umožňuje dosáhnout monodisperzity nanočástic. Při Massartově procesu přípravy vodných magnetických kapalin⁴ se nanočástice stabilizují přítomností kyseliny chloristé nebo tetramethylamoniumhydroxidu. Pro získání magnetických nanočástic s úzkou distribucí velikosti mohou být využity různé typy syntetických nebo biologických nanoreaktorů, tvořené např. povrchově aktivními látkami, apoferrinem, cyklodextriny, liposomy nebo dendrimery. Účinnou metodou přípravy magnetických nanočástic je mikroemulzní technika, při které termodynamicky stálá disperze dvou nemísitelných fází (např. voda v oleji) vytvoří micely obklopující magnetické nanočástice; velikost vzniklých nanočástic může být řízena úpravou velikosti nitra micely obsahující vodnou fázi. Nanočástice oxidů železa je rovněž možno připravit rozkladem prekurzorů obsahujících železo při zvýšené teplotě⁵ nebo působením ultrazvuku.

Je třeba rovněž zmínit komerčně dostupné vhodné povrchově modifikované magnetické mikročástice a nanočástice. Mezi největší firmy vyrábějící magnetické nosiče patří Invitrogen (mikročástice Dynabeads), Advanced Magnetics (USA) či Miltenyi Biotec (Německo); v České republice je výrobcem celulosových magnetických nosičů firma Iontosorb (Ústí nad Labem). Přehled různých typů komerčních materiálů je možno nalézt ve vybraných přehledných člancích^{6,7}; pro běžné laboratorní účely je ovšem cena většiny těchto produktů vysoká⁸.

Aby se mohly biologicky významné látky navázat na povrch magnetických nanočástic a mikročástic, je třeba jejich povrch modifikovat vhodnými přírodními nebo syntetickými látkami. K tomu se používají zejména přírodní a syntetické polymery, ale je možné využít i některé organické sloučeniny nebo anorganické materiály. Funkcionalizovaná magnetická částice musí splňovat řadu specifických kritérií; mimo jiné musí být biokompatibilní, zároveň musí být potlačeny mezičásticové interakce a musí být umožněna chemická modifikace nezbytná pro následnou imobilizaci biomolekul.

Pro funkcionalizaci povrchu magnetických částic stabilizátory se používá např. kyselina citronová nebo alkansulfonáty². Povrch magnetických nosičů může být rovněž upraven silanizací; jako silanizační činidla se často používají (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES) nebo

glycidylxypropyltriethoxysilan (GOPS). Silanizace se provádí na povrchu částic, který je zbaven organických látek. Je možno použít tři základní metody silanizace, a to z organické fáze, z vodné fáze (kdy vzniká vrstva stabilnější ve vodném prostředí) nebo odpařováním daného silanu⁹. Funkční skupiny silanizovaných magnetických částic (např. NH₂ pro aktivaci glutaraldehydem) je následně možné využít pro imobilizaci různých biomolekul.

Magnetické částice je možno modifikovat vhodnými biopolymery, např. chitosanem, který se vyznačuje výbornými biologickými, chemickými a fyzikálními vlastnostmi¹⁰. Přítomné NH₂ a OH skupiny mohou být využity pro imobilizaci molekul po jejich vhodné aktivaci. Navíc vykazuje chitosan afinitu k řadě biomakromolekul a iontů. Na magnetických částicích obalených chitosanem byla např. imobilizována lakasa z *Pycnopus sanguineus*¹¹.

Pro funkcionalizaci magnetických částic se často využívá dextran, případně karboxydextran a (karboxymethyl) dextran. Aktivace dextranu na povrchu magnetické částice se většinou provádí jodistanem sodným. Přitom vznikají příslušné polyaldehydy dextranu, které mohou dále reagovat se skupinou NH₂ proteinů¹². Vhodným materiálem pro funkcionalizaci magnetických částic jsou i algináty¹³ nebo škrob či želatina. Ze syntetických polymerů jsou pro modifikace používány zejména poly(ethylenglykol) (PEG) a poly(vinylalkohol) (PVA), které jsou netoxické, biokompatibilní a neimunogenní. Velmi zajímavé využití pro modifikaci magnetických částic mají dendrimery, které umožňují zavést do vytvořeného kompozitního materiálu velké množství funkčních skupin, umožňující posléze imobilizovat velké množství biologicky aktivních látek¹⁴.

Vytvořené magnetické nanočástice a mikročástice je nutno obvykle důkladně charakterizovat. Pro studium morfologie a velikosti povrchově modifikovaných magnetických nanočástic a mikročástic lze využít transmisní a skenovací elektronovou mikroskopii (TEM, SEM), které poskytují nejen okamžitou obrazovou kvalitativní informaci o povrchu a velikosti částic, ale s vhodnou výbavou (např. EDS – energiově disperzní spektroskopie) je možno provést i lokální analýzu chemického složení. Tímto způsobem je možné studovat i kvalitu a charakter obalové vrstvy.

Pro další charakterizaci zkoumaných materiálů slouží magnetizační měření, realizovaná s použitím magnetometrů. V současné době se využívají zejména měření na magnetometru založeném na supravodivém kvantovém interferenčním jevu (SQUID). Pro účely zkoumání modifikace povrchu magnetických nanočástic obalených nemagnetickou vrstvou se zjišťuje parametr magnetizačního měření citlivý na změnu mezičásticové interakce dipól-dipólové povahy a výměnného typu. Vymizení mezičásticových interakcí má vliv na dosažení saturační magnetizace nanočásticového systému při výrazně nižších indukcích vnějšího magnetického pole a také na její maximální hodnotu v porovnání s povrchově nemodifikovanými nanočásticemi¹⁵. Saturační magnetizace je fyzikální veličina a je definována jako maximální hodnota magnetizace dosažitelná pro daný materiál. Hodnotná jsou také měření teplotních závislostí magnetizace materiálu, tzv. ZFC a FC křiv-

ky. ZFC křivka vyjadřuje teplotní závislost magnetizace po ochlazení v nulovém magnetickém poli a FC křivka po ochlazení při jisté hodnotě indukce vnějšího magnetického pole. Jejich vzájemným porovnáním pak lze učinit závěr o magnetickém chování systému neinteragujících či interagujících povrchově obalených nanočástic, jelikož ZFC a FC křivky jsou velmi citlivé na dynamiku magnetických relaxačních jevů vyskytujících se zejména u magnetických nanočásticových systémů. Omezení mezičásticových interakcí v důsledku obalování nanočástic je pak patrné z odlišného průběhu zejména FC křivky¹⁶.

Další metodou k charakterizaci povrchové vrstvy a vazby mezi nanočásticemi magnetických materiálů a obalového materiálu slouží infračervená spektroskopie (IČ), což je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také pro stanovení anorganických látek.

Metody termické analýzy (TG/DTA) jsou schopny poskytnout informaci o procentovém zastoupení obalové vrstvy navázané na nanočástice a výsledné tepelné stabilitě studovaného kompozitního materiálu.

3. Imobilizace biologicky aktivních látek na magnetických nosičích

Na magnetických nosičích byla imobilizována řada biologicky aktivních látek, jak vysokomolekulárních, tak nízkomolekulárních. Jejich imobilizaci je možné provést celou řadou způsobů, stejně jako u nemagnetických nosičů^{17,18}, jako jsou např. polymerní nebo anorganické částice a filmy. V některých případech lze pro imobilizaci významných proteinů využít přímou fyzikální sorpci na nosič, která je jednou z nejstarších metod a stala se jednoduchým, ekonomicky výhodným a snadným postupem. Fyzikální sorpce je však méně spolehlivá a málo stabilní ve srovnání s imobilizací kovalentními vazbami, někdy však může být použita pro reverzibilní imobilizaci proteinů¹⁹. Další používanou fyzikální technikou imobilizace je zabudování biologicky aktivních látek, příp. celých buněk, do magnetické gelové matrice. Matrice jsou tvořeny syntetickými polymery, jako jsou polyakrylamid, polyurethany nebo různé typy pryskyřic, a dále proteiny (želatina, kolagen, vaječný bílek) a polysacharidy (agar, agarosa, karagenany nebo algináty). Gelové matrice mají schopnost zadržovat vodu, což je nutné pro uchování biologické aktivity imobilizovaných látek. Měkké, hydratované a z bobtnalé gely umožňují zakotvení biologicky aktivních látek a buněk. Prostředí gelů je blízké fyziologickým podmínkám a je tak minimalizována denaturace těchto látek a jsou zachovány veškeré biologické funkce zakotveného biologického materiálu. Nevýhodou tohoto postupu může být postupné uvolňování imobilizované látky.

Kovalentní imobilizace je nejčastější imobilizační technikou. Vyžaduje, aby nosič obsahoval funkční skupiny, např. NH₂, COOH, OH, SH, nebo CONH₂. Působením různých činidel se funkční skupiny na povrchu nosiče aktivují pro navázání biomolekul. Pro vytvoření kovalentní

vazby se využívají i vhodné funkční skupiny biologicky aktivních látek (NH₂, COOH, SH, OH nebo tyrosin a histidin). Je-li povrch nosiče modifikován karboxylovými skupinami, používají se jako aktivační činidla karbodiimididy (CDI), které umožňují klasickou reakci COOH s aminoskupinou imobilizované látky. Nejčastěji se používá hydrochlorid 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimidu (EDC nebo EDAC), který je rozpustný ve vodě. Dále se pro aktivaci karboxylových skupin používají *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) a *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (DIC). Kovalentní imobilizace citlivějších proteinů se provádí pomocí CDI a *N*-hydroxysukcinimidu (NHS) nebo sulfonovaného NHS (sulfo-NHS). Oproti reakci jen s CDI je průběh reakce daleko mírnější, nevznikají nežádoucí meziprodukty a vzniklý produkt je poměrně stabilní.

Nosič modifikovaný NH₂ skupinou se aktivuje bifunkčními činidly, nejčastěji vodným roztokem glutaraldehydu, který je běžně dostupný, dostatečně reaktivní, rozpustný ve vodě a šetrný k proteinům. Glutaraldehyd vytváří kovalentní vazby mezi nosičem a například enzymem, stabilizuje výslednou strukturu a slouží rovněž k zesílení biomolekul.

Velmi užitečná technika pro imobilizaci celé řady látek je založena na využití magnetických částic s imobilizovaným avidinem nebo streptavidinem, které vykazují vysokou afinitu pro biotin (vitamin B₇, vitamin H). Avidin je glykoprotein vaječného bílku složený ze čtyř stejných podjednotek (homotetramer); každá podjednotka má vazebné místo s vysokou afinitou pro biotin. Častěji se používá streptavidin, což je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*; jedná se také o tetramer, není glykosylovaný a vykazuje nižší nespecifické interakce. Biomolekuly určené k imobilizaci (např. nukleové kyseliny a nukleotidy, proteiny, sacharidy) jsou nejdříve biotinylovány (vnesejí biotinové skupiny na povrch molekuly) a potom vázány na výše zmíněné nosiče s využitím interakce mezi streptavidinem nebo avidinem a biotinem. Komplex biotinu a streptavidinu (resp. avidinu) je velmi pevný ($K_d \sim 10^{-14} - 10^{-15} \text{ mol l}^{-1}$) a odolává i velmi tvrdým reakčním podmínkám²⁰.

Další možností pro imobilizaci biologicky aktivních látek je použití magnetoliposomů, které mohou být využity zejména pro imobilizaci membránově vázaných enzymů, např. hovězí cytochrom c oxidasy, kdy jak aktivita, tak stabilita tohoto enzymu se po imobilizaci na magnetoliposomy výrazně zvýšila ve srovnání s volným enzymem²¹.

4. Aplikace biologicky aktivních látek imobilizovaných na magnetických nosičích

Magnetické nosiče díky svým magnetickým vlastnostem nabízejí rozmanité spektrum aplikací, mimo jiné v různých oblastech biologických věd a biotechnologií^{2,6,22}. Vhodně funkcionalizované magnetické mikročástice či nanočástice slouží jako nosiče enzymů, protilátek, lektinů, ostatních biologicky významných proteinů a pepti-

dů, oligonukleotidů a nukleových kyselin, hormonů, léčiv, buněk, diagnostických látek, afinitních ligandů apod.^{3,22}. V biochemii se nabízí využití magnetických částic (zejména s navázanými afinitními ligandy) při izolaci a čištění proteinů²³. Značné zpřesnění proteinové analýzy metodou MALDI-TOF MS bylo dosaženo navázáním trypsinu na magnetický nosič⁵.

4.1. Imobilizované proteiny

Proteiny patří mezi nejvýznamnější biopolymery, vykonávající řadu funkcí v živých organismech. Pro dosažení optimálních vlastností proteinů, zejména při *in vitro* aplikacích, se často zakotvují na pevné nosiče. Imobilizace na magnetické nosiče umožňuje magnetickou manipulaci a následnou separaci použitého komplexu ve vhodném magnetickém separátoru.

Imobilizace enzymů na magnetických nosičích je velmi významná jak z hlediska laboratorních, tak potenciálních biotechnologických aplikací. Navázáním enzymů na magnetické nosiče mohou získat takto modifikované enzymy výhodnější vlastnosti, např. vyšší stabilitu, rozšířený rozsah optimální teploty, pH apod. Imobilizaci se může zvýšit aktivita enzymů a často dochází ke snížení Michaelisovy konstanty K_m ; nižší hodnoty K_m ukazují na vyšší afinitu enzymu k substrátu. Imobilizované enzymy je možné používat opakovaně, jsou stálejší při skladování a na rozdíl od volných enzymů je možno s nimi lehce manipulovat⁷. Reakce s enzymy imobilizovanými na magnetických částicích probíhají většinou v míchaných reaktorech

s následnou magnetickou separací, nebo v magneticky stabilizovaných fluidních reaktorech. V obou typech reaktorů je možné provádět enzymatické reakce i ve směsích obsahujících částicové nečistoty. Magnetické biokatalyzátory mohou být výhodné zejména v případě, kdy je využit drahý enzym, nebo v situaci, kdy je nežádoucí přítomnost enzymu v hotovém produktu²⁰.

Významnou skupinou enzymů, která nachází široké uplatnění v biotechnologických procesech i v medicíně, jsou proteasy, které štěpí peptidovou vazbu v proteinech.

Proteasy byly imobilizovány na mnoho druhů magnetických nosičů, (typické příklady jsou uvedeny v tabulce I). Zajímavou možností je využití trypsinu (EC 3.4.21.4) imobilizovaného na magnetické částice v proteomice ke štěpení proteinů na směs štěpných peptidů, které jsou dále analyzovány hmotnostní spektrometrií. Použití volného trypsinu v proteomice je rutinní, avšak naráží na jistá omezení. Po imobilizaci na magnetické částice lze trypsin i jiné proteasy použít ve vyšší koncentraci, což vede ke zkrácení doby nutné ke štěpení. Následující magnetická separace umožňuje odstranění imobilizovaného trypsinu ze směsi proteinů před další analýzou štěpných peptidů⁵.

Další významnou skupinou enzymů v biotechnologiích jsou lipasy (EC 3.1.1.3.) produkované různými druhy mikroorganismů. Jejich imobilizace na magnetických nosičích byla využita např. při transesterifikaci sojového oleje methanolem za vzniku methylesterů mastných kyselin (které jsou využívány v pohonných směsích známých pod označením „biodiesel“). Imobilizovaná lipasa byla použita

Tabulka I

Příklady proteolytických enzymů imobilizovaných na magnetických nosičích

| Proteasa | Magnetický nosič | Aplikace | Lit. |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------|
| Chymotrypsin | Magnetic Glyoxal 4% Agarose Beads 20–75 μ m | hydrolýza vepřového pepsinu A | 52 |
| Chymotrypsin | magnetické teplotně citlivé latexové mikročástice | vsádková hydrolýza kaseinu | 53 |
| Keratinasa (<i>Bacillus subtilis</i>) | magnetické nanočástice modifikované poly(ethylenglykolem) | zvýšení enzymové aktivity a termostability | 54 |
| Papain | magnetická perlová celulóza | hydrolýza polyklonálních lidských IgG | 55 |
| Plasmin | magnetický derivát poly(ethylenglykolu) | studium fibrinolýzy | 56 |
| Proteasa (<i>Actinomyces fradiae</i>) | magnetické alginátové částice | studium podmínek pro imobilizaci | 57 |
| Trypsin | nanočástice magnetických oxidů železa | detekce organických a anorganických xenobiotik | 58 |
| Trypsin | magnetické křemičitanové mikročástice | hydrolýza proteinů pro proteomiku | 59 |
| Trypsin (modifikovaný rafinosou) | maghemitové nanočástice pokryté chitosanem | hydrolýza proteinů pro proteomiku | 23 |
| Urokinasa | magnetit modifikovaný polyethylenglykolem | cílená hydrolýza fibrinového koagula | 60 |

opakovaně bez významné ztráty aktivity²⁴.

Na magnetických nosičích byla rovněž imobilizována řada amylolytických enzymů, které byly využity např. při kontinuální hydrolyze maltodextrinů v reaktoru s fluidním ložem²⁵ nebo při hydrolyze škrobu²⁶. Na magnetické nosiče se imobilizují také oxidoreduktasy jako je např. lakasa. Lakasa (EC 1.10.3.2) patří do skupiny polyfenoloxidas obsahujících měď, která oxiduje řadu sloučenin (např. fenoly, polyfenoly, aromatické aminy a další), včetně vybraných organických barviv. V práci Rotkové a spol.²⁷ byla provedena imobilizace lakasy z *Trametes versicolor* a *Pycnoporus cinnabarinus* na magnetické celulosové mikročástice (125–250 μm) s hydroxylovými nebo hydrazidovými funkčními skupinami; největší aktivity navázaného enzymu bylo dosaženo při orientované imobilizaci s využitím sacharidových řetězců enzymu.

Kromě enzymů imobilizovaných na magnetických nosičích je rovněž možno pro katalytické účely využít magneticky modifikované buňky (celobuněčné katalyzátory). Buňky *Saccharomyces cerevisiae*, zabudované do magnetických alginátových mikročástic, nebo modifikované vodnou magnetickou kapalinou, byly použity při rozkladu peroxidu vodíku a konverzi sacharosy na invertní cukr^{28–30}.

Protilátky (imunoglobuliny) jsou proteiny, které jsou důležitou součástí lidského imunitního systému. Imobilizace protilátek na magnetických mikročásticích nebo nanočásticích opět přináší výhodu v tom, že po skončení reakce může být komplex antigen-protilátka z roztoku odstraněn vhodnou magnetickou separací. Při imobilizaci protilátek je důležité, aby rozpoznávací místo (tzv. Fab oblast) bylo vhodně orientováno a byla tak zachována plná biologická funkce. Z tohoto důvodu není většinou výhodná přímá imobilizace protilátek na aktivovaných nosičích. Lepší výsledky je možno dosáhnout, pokud jsou nejdříve na částicích imobilizovány sekundární protilátky a potom protilátky primární. Sekundární protilátky fungují jako spojkové prvky a navíc umožňují optimální orientaci primárních protilátek. Místo sekundárních protilátek je rovněž možno použít protein A.

Protilátky imobilizované na magnetických nosičích je možno s úspěchem využít při vývoji magnetických metod pro imunostanovení biologicky aktivních látek a xenobiotik.

Existují dva základní typy, imunomagnetická stanovení a magnetoimunostanovení. Při prvním z nich je protilátka imobilizována na magnetickém nosiči (místo na klasickém nosiči, např. na stěnách jamek v mikrotitračních destičkách). Imobilizovanou protilátku je možno pipetovat do zkumavek a potom magneticky separovat. Při magnetoimunostanovení slouží magnetické částice jako detekovatelná značka (místo např. enzymů, radionuklidů nebo luminescenčních látek)³¹.

Imobilizované protilátky byly využity pro izolaci a stanovení celé řady antigenů. Jako příklad je možno uvést použití protilátky proti α -fetoproteinu (AFP) imobilizované na magnetických nanočásticích. AFP je důležitý tumorový marker v krevním séru; stanovení jeho koncentrace hraje klíčovou roli v klinické praxi, neboť koncentra-

ce AFP je zvýšena u pacientů s karcinomem jater³². V oblasti environmentální analýzy je zajímavé využití komerčních setů RaPID Assays (Strategic Diagnostics, Inc., USA) a Abraxis kits (Abraxis, USA) pro terénní stanovení asi 15 významných herbicidů, insekticidů, antimikrobiálních látek a uhlovodíků.

Velmi významné je využití imunomagnetických částic při separaci buněk, např. buněk patogenních bakterií z potravin a klinických vzorků (zejména *Salmonella*, verotoxigenních kmenů *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*), nádorových buněk, kmenových buněk, parazitních prvoků (*Cryptosporidium* a *Giardia*) a pod.⁷

Lektiny jsou velkou skupinou proteinů, které se vyznačují schopností rozpoznávat a vázat sacharidové struktury s vysokou specificitou a afinitou. Jde o bílkoviny neimunitního původu. Lektiny imobilizované na magnetických nosičích byly využity při frakcionaci erytrocytů³³. Konkavalin A imobilizovaný na magnetických částicích byl použit při adsorpci kvasničné invertasy³⁴.

Zajímavé využití má celá řada dalších proteinů a peptidů imobilizovaných na magnetických nosičích; např. imobilizované inhibitory enzymů lze využít zejména pro izolaci enzymů, např. pepsinu³⁵ nebo trypsinu³⁶. Imobilizovaný lidský sérový albumin byl použit při odstranění bilirubinu z krevního séra³⁷ a imobilizovaný protein A lze použít pro navázání nebo izolaci protilátek³⁸.

4.2. Imobilizované nukleové kyseliny a oligonukleotidy

Separace nukleových kyselin má nebývalý význam v molekulární biologii. Nukleové kyseliny mohou být separovány s použitím magnetických částic s imobilizovanými oligonukleotidy. Nejčastěji se magneticky separuje eukaryotní mRNA na magnetickém nosiči s navázaným oligodeoxythymidinem. Tento proces je založen na skutečnosti, že většina eukaryotní mRNA obsahuje na svém 3'-konci polyadenylový řetězec (A⁺), a je tedy možné párování²². Velký význam má i imobilizace aptamerů (krátké řetězce molekul DNA nebo RNA) na magnetických nosičích, protože v řadě případů mohou nahradit protilátky při standardních imunomagnetických separacích, např. při izolaci a detekci nádorových buněk³⁹.

4.3. Imobilizované sacharidy

Kovalentní imobilizace sacharidů a jejich derivátů na magnetických nosičích není zcela běžná. Jako příklad můžeme zmínit imobilizaci 4-aminofenyl- β -D-thioglukopyranosidu na silanizovaných magnetických částicích, které byly následně použity pro afinitní separaci β -galaktosidasy⁴⁰. Magnetické nanočástice s imobilizovanou manosou byly využity pro značení kmenových buněk⁴¹. Podstatně významnější jsou magnetické částice modifikované různými polysacharidy, nebo magnetické polysacharidové částice. Tyto částice je možné po vhodné aktivaci použít při imobilizaci vybraných biologicky aktivních látek a rovněž jako specifické adsorbenty pro afinitní chromatografickou separaci různých látek. Magnetický derivát

chitinu nebo chitosanu byl například použit při izolaci lysozymu z vaječného bílku⁴² nebo ze zažívacího traktu klíšťáka *Ornithodoros moubata*⁴³, a rovněž při izolaci lektinu z brambor⁴⁴. Magnetické alginátové mikročástice byly využity při čištění bakteriální a vepřové α -amylasy¹³.

4.4. Ostatní imobilizované biologicky aktivní látky

Na magnetické nosiče byla imobilizována řada dalších biologicky aktivních látek. Jako příklad je možno uvést imobilizaci derivátů porfyrinu, které byly použity při katalýze hydroxylace cyklohexanu⁴⁵. Imobilizovaný norvankomycin umožnil selektivní separaci bakterií *Staphylococcus aureus* ze směsi s gramnegativními bakteriemi⁴⁶. Magnetické nanočástice s imobilizovaným poly-L-lysinem⁴⁷ byly využity pro značení kmenových buněk. Imobilizovaný biotin je možno využít při selektivním navázání avidinu a jeho derivátů⁴⁸. Zajímavé využití má imobilizovaná kyselina 3-aminofenylboritá, specificky reagující se sloučeninami obsahujícími vicinální hydroxyskupiny, která umožňuje separovat různé typy sacharidů a glykoproteinů⁴⁹, včetně klinicky významného glykosylovaného hemoglobinu⁵⁰. Z hlediska potenciálních lékařských aplikací je velice významná imobilizace různých druhů léčiv na magnetické nanočástice⁵¹.

5. Závěr

Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických mikročásticích a nanočásticích, tvořených zejména oxidy železa, nacházejí uplatnění v mnoha oborech přírodních věd, při analytických aplikacích, v medicíně i v biotechnologiích. Zvláště významnou vlastností je jejich magnetické chování, které dovoluje jejich manipulaci vnějším magnetickým polem. Kombinace magnetických nosičů s biologicky aktivní látkou (například enzymem, protilátkou nebo oligonukleotidem) umožňuje získat účinný nástroj pro biochemický výzkum i v chemických a biotechnologických procesech.

Autoři tímto děkují MŠMT za podporu v rámci výzkumného záměru č. MSM 6198959216, projektu Ministerstva průmyslu a obchodu č. 2A-1TP1/094, Operačnímu programu Věda a výzkum pro inovace - Evropský sociální fond (projekt CZ.1.05/2.1.00/03.0058 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky) a Výzkumnému záměru ÚSBE AVČR, v.v.i. (AV0Z60870520).

LITERATURA

- Safarik I., Safarikova M.: *Solid State Phenom.* 151, 88 (2009).
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L. V., Muller R. N.: *Chem. Rev.* 108, 2064 (2008).
- Matsunaga T., Okamura Y., Tanaka T.: *J. Mater. Chem.* 14, 2099 (2004).
- Massart R.: *IEEE Trans. Magn.* 17, 1247 (1981).
- Kluchova K., Zboril R., Tucek J., Pecova M., Zajoncova L., Safarik I., Mashlan M., Markova I., Jancik D., Sebel M., Bartonkova H., Bellesi V., Novak P., Petridis D.: *Biomaterials* 30, 2855 (2009).
- Šafařík I., Šafaříková M.: *Monatsh. Chem.* 133, 737 (2002).
- Šafařík I., Šafaříková M.: *J. Chromatogr., B* 722, 33 (1999).
- Šafaříková M., Šafařík I.: *Chem. Listy* 89, 280 (1995).
- Weetall H. H., Lee M. J.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 22, 311 (1989).
- Krajewska B.: *Enzyme Microb. Technol.* 35, 126 (2004).
- Jiang D. S., Long S. Y., Huang J., Xiao H. Y., Zhou J. Y.: *Biochem. Eng. J.* 25, 15 (2005).
- Hong X., Guo W., Yuang H., Li J., Liu Y. M., Ma L., Bai Y. B., Li T. J.: *J. Magn. Magn. Mater.* 269, 95 (2004).
- Šafaříková M., Roy I., Gupta M. N., Šafařík I.: *J. Biotechnol.* 105, 255 (2003).
- Pan B. F., Gao F., Gu H. C.: *J. Colloid Interface Sci.* 284, 1 (2005).
- Fiorani D., Testa A. M., Lucari F., D'Orazio F., Romero H.: *Physica B* 320, 122 (2002).
- Dormann J. L., Fiorani D., Tronc E.: *Adv. Chem. Phys.* 98, 283 (2007).
- Cao L. Q.: *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design.* Wiley, Weinheim 2005.
- Bickerstaff G. F. (ed.): *Immobilization of Enzymes and Cells.* Humana Press, Totowa 1997.
- Bayramoglu G., Yilmaz M., Senel A. U., Arica M. Y.: *Biochem. Eng. J.* 40, 262 (2008).
- Šafařík I., Šafaříková M., v knize: *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* (Häfeli, U., Schutt, W., Teller, J., Zborowski, M., ed.), str. 323. Plenum Press, New York 1997.
- De Cuyper M., Demeulenaer B., Vandermeeren P., Vanderdeelen J.: *Biotechnol. Bioeng.* 49, 654 (1996).
- Safarik I., Safarikova M.: *Chem. Pap.* 63, 497 (2009).
- Safarik I., Safarikova M.: *Biomagn. Res. Technol.* 2, 7 (2004).
- Xie W. L., Ma N.: *Energy Fuels* 23, 1347 (2009).
- Pieters B. R., Bardeletti G., Coulet P. R.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 32, 37 (1992).
- Namdeo M., Bajpai S. K.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 59, 134 (2009).
- Rotková J., Šuláková, R., Korecká L., Zdražilová P., Jandová M., Lenfeld J., Horák D., Bílková Z.: *J. Magn. Magn. Mater.* 321, 1335 (2009).
- Safarik I., Sabatkova Z., Safarikova M.: *J. Magn. Magn. Mater.* 321, 1478 (2009).
- Safarik I., Sabatkova Z., Safarikova M.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 7925 (2008).
- Safarikova M., Maderová Z., Safarik I.: *Food Res. Int.* 42, 521 (2009).
- Kriz K., Gehrke J., Kriz D.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 817 (1998).

32. Tang D. P., Yuan R., Chai Y. Q.: *Biotechnol. Lett.* 28, 559 (2006).
33. Putnam D. D., Namasivayam V., Burns M. A.: *Biotechnol. Bioeng.* 81, 650 (2003).
34. Akkaya B., Uzun L., Altintas E. B., Candan F., Denizli A.: *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* 46, 232 (2009).
35. Filuszová M., Kučerová Z., Tichá M.: *J. Sep. Sci.* 32, 2017 (2009).
36. Halling P. J., Dunnill P.: *Eur. J. Appl. Microbiol.* 6, 195 (1979).
37. Uzun L., Denizli A.: *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 17, 791 (2006).
38. Cao Y., Tian W., Gao S. Y., Yu Y. S., Yang W. B., Bai G.: *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 35, 467 (2007).
39. Smith J. E., Medley C. D., Tang Z. W., Shangguan D., Lofton C., Tan W. H.: *Anal. Chem.* 79, 3075 (2007).
40. Dunnill P., Lilly M. D.: *Biotechnol. Bioeng.* 16, 987 (1974).
41. Horák D., Babič M., Jendelová P., Herynek V., Trchová M., Pientka Z., Pollert E., Hájek M., Syková E.: *Bioconjugate Chem.* 18, 635 (2007).
42. Šafařík I., Šafaříková M.: *J. Biochem. Biophys Methods* 27, 327 (1993).
43. Kopáček P., Vogt R., Jindrák L., Weise C., Šafařík I.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 989 (1999).
44. Šafaříková M., Šafařík I.: *Biotechnol. Lett.* 22, 941 (2000).
45. Fu B., Zhao P., Yu H. C., Huang J. W., Liu J., Ji L. N.: *Catal. Lett.* 127, 411 (2009).
46. Ke S. J., Ji J.: *Chem. J. Chin. Univ. - Chinese* 28, 26 (2007).
47. Babič M., Horák D., Trchová M., Jendelová P., Glogarová K., Lesný P., Herynek V., Hájek M., Syková M.: *Bioconjugate Chem.* 19, 740 (2008).
48. Choi J., Lee J. I., Lee Y. B., Hong J. H., Kim I. S., Park Y. K., Hur N. H.: *Chem. Phys. Lett.* 428, 125 (2006).
49. Lee J. H., Kim Y. S., Ha M. Y., Lee E. K., Choo J. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 1456 (2005).
50. Müller-Schulte D., Brunner H.: *J. Chromatogr., A* 711, 53 (1995).
51. Namdeo M., Saxena S., Tankhiwale R., Bajpai M., Mohan Y. M., Bajpai S. K.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 3247 (2008).
52. Šustrová B., Novotná L., Kučerová Z., Tichá M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 60, 22 (2009).
53. Chen J. P., Su D. R.: *Biotechnol. Prog.* 17, 369 (2001).
54. Konwarh R., Karak N., Rai S. K., Mukherjee A. K.: *Nanotechnology* 20, 10 (2009).
55. Korecká L., Bílková Z., Holcápek M., Královský J., Beneš M., Lenfeld J., Minc N., Cecal R., Viovy J. L., Przybylski M.: *J. Chromatogr., B* 808, 15 (2004).
56. Takahashi K., Ohwada K., Yoshimoto T., Saito Y., Kodera Y., Matsushima A., Inada Y.: *J. Biotechnol.* 8, 135 (1988).
57. Burns M. A., Kvesitadze G. I., Graves D. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 27, 137 (1985).
58. Šafařík I., Ptáčková L., Koneracká M., Šafaříková M., Timko M., Kopčanský P.: *Biotechnol. Lett.* 24, 355 (2002).
59. Lin S., Yao G. P., Qi D. W., Li Y., Deng C. H., Yang P. Y., Zhang X. M.: *Anal. Chem.* 80, 3655 (2008).
60. Yoshimoto T., Ohwada K., Takahashi K., Matsushima A., Saito Y., Inada Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 739 (1988).

M. Pečová^a, L. Zajoncová^a, K. Poláková^b, J. Čuda^b, M. Šafaříková^c, M. Šebela^a, and I. Šafařík^{b,c}
 (^a*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*, ^b*Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*, ^c*Department of Nanobiotechnology, Institute of Systems Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice*): **Biologically Active Compounds Immobilized on Magnetic Carriers and Their Utilization in Biochemistry and Biotechnology**

Magnetic microparticles and nanoparticles, composed mainly of iron oxides (magnetite, Fe₃O₄ and maghemite, γ-Fe₂O₃), can be utilized in various biochemical and biotechnological applications. The particles can be easily manipulated by an external magnetic field. They are frequently used as magnetically responsive insoluble supports for immobilization of biologically active compounds, such as enzymes, antibodies, streptavidin and oligonucleotides. Examples of their applications are presented.