



**Vilnius
universitetas**

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS**

Neda Zenkevičiūtė

Farmacinės chemijos studijų programa

**NANODALELIŲ IR ANTIKŪNŲ KONJUGACIJOS ATLIKIMAS IR
ĮVERTINIMAS**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas:

Doc. Dr. Anton Popov

Vilnius 2023



**Vilnius
universitetas**

**VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY**

Neda Zenkevičiūtė

Pharmaceutical chemistry study programme

**PERFORMANCE AND EVALUATION OF
NANOPARTICLE - ANTIBODY CONJUGATION**

Master Thesis

Scientific adviser:

Doc. Dr. Anton Popov

Vilnius 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Kvantiniai taškai	8
1.2 Kvantinių taškų konjugavimas su biologinėmis molekulėmis	9
1.3 Kvantinių taškų sintezė	9
1.4 Kvantinių taškų funkcionalizavimas	10
1.5 Aukso nanodalelės	11
1.6 Aukso nanodalelių pritaikymas paviršiaus plazmonų rezonanso biologiniuose jutikliuose	13
1.7 Aukso nanodalelių pritaikymas terapiniais tikslais	14
1.8 Aukso nanodalelių toksiškumas	14
1.9 Antikūnai	15
1.10 Antikūnų struktūra	15
1.11 Pagrindinės antikūnų funkcijos	16
1.13 Antikūnų panaudojimas imunoanalizėje	18
1.14 CD44	19
1.15 Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija	20
1.16 SARS-CoV-2	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	22
2.1 Reagentai ir medžiagos	22
2.1.1. Etaloninių tirpalų ruošimas	23
2.1.2 Prietaisai ir priemonės	24
2.1.3. Programinė įranga	25
2.2. Metodai	25
2.2.1. Kvantinių taškų ir anti-CD44 konjugatų paruošimas	25
2.2.2. PPR jutiklio lusto plovimas	25
2.2.3. SAM paruošimas PPR jutiklio lusto paviršiuje	26
2.2.4. MUR monosluoksniu modifikuoto PPR jutiklio lusto paruošimas modifikavimui	26
2.2.5. Paviršiaus stabilizavimas/rehidracija prieš CD44 biožymens imobilizaciją	26
2.2.6. CD44 biožymens imobilizacija MUR modifikuoto PPR jutiklio paviršiuje	26
2.2.7. Stabilizavimas	27

2.2.8. Imobilizuotų KT-anti-CD44 sąveika su Au/CD44.....	27
2.2.9 Aukso nanostrypelių (AuNS) sintezė	27
2.2.10 AuNS ir antrinių IgG antikūnų konjugacija	28
2.2.11 Paviršiaus stabilizavimas/rehidracija prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymo imobilizaciją	28
2.2.12 N baltymo imobilizacija MUR modifikuoto PPR jutiklio paviršiuje.....	28
2.2.13 Imobilizuoto Au/N baltymo sąveika su antikūnais.....	29
2.2.14 AuNS ir antrinių IgG antikūnų konjugatų sąveika su Au/N/Anti-N).....	29
2.2.15. Skaičiavimai.....	29
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1 CD44 imobilizavimas ant MUR SAM paviršiaus.....	30
3.2 KT pasirinkimas ir įvertinimas.....	31
3.3 KT parinkimas konjugacijai su antikūnais	32
3.4 Optimalių konjugacijos sąlygų parinkimas.....	33
3.5 KT-NH ₂ ir anti-CD44 konjugacijos įvertinimas.....	35
3.6 Aukso nanostrypelių sintezė ir charakterizavimas	36
3.7 AuNS ir antrinių antikūnų konjugacija	36
3.8 N baltymo imobilizavimas ir jo sąveikos su specifiniais monokloniniais antikūnais įvertinimas.....	38
3.9 AuNS ir antrinių antikūnų konjugacijos įvertinimas	40
IŠVADOS	42
SANTRAUKA	43
SUMMARY.....	44
PADĖKA	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS	46

SANTRUMPOS

AuND – aukso nanodalelės,

AuNS – aukso nanostrypeliai,

CdSe – Kadmio selenidas,

CdTe – kadmio teluridas,

CTAB – cetiltrimetilamonio bromidas,

EDC – 1-etil-3-(dimetilaminopropil) karbodiimido hidrochloridas,

ELISA (*angl.* Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) – su fermentu surišta imunosorbentinė analizė,

His – histaminas,

IR – infraraudonasis bangų diapazonas,

KT – kvantiniai taškai,

ND – nanodalelės,

NHS – N-hidroksisukcinimidas,

PbS – Švino sulfidas,

PEG – polietilenglikolis,

PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas,

SAM – savitvarkis monosluoksnius,

SMCC – 4-(N-maleimidometil)-cikloheksankarboksirūgšties N-hidroksisukcinimido esteris,

TOPO – trioktilfosfino oksidas,

D_H – hidrodinaminis skersmuo,

DŠS – dinaminė šviesos sklaida,

ZnS – Cinko sulfidas,

MUR– 11-merkaptio undekano rūgštis

ROS – reaktyvios deguonies rūšys,

Ig – imunoglobulinas,

SEM – skenuojanti elektroninė mikroskopija.

ĮVADAS

Vėžys yra pagrindinė mirties priežastis visame pasaulyje, dėl kurios 2020 m. mirė beveik 10 mln. žmonių ir tai yra kas šešta mirtis pasaulyje. Šios ligos gydymo būdai apima citotoksinius vaistus kartu su tiksline terapija [1]. Pagrindiniai gydymo apribojimai yra toksiškumas dėl prasto specifiškumo bei atsparumas terapijai. Nanomedicina kelia didžiulius lūkesčius milijonams pacientų, nes ji gali teikti geresnę, veiksmingesnę ir įperkama sveikatos priežiūrą, be to, ji gali sukurti naujus terapinius metodus navikams gydyti. Šiuo atžvilgiu tiksliniai vaistai gali būti įkapsuliuoti į nanonešiklius, o šios nanotransporto priemonės nukreipiamos į navikus konjuguojant su antikūnais - vadinamosiomis su antikūnais konjuguotomis nanodalelėmis. Šios dalelės gali išsaugoti cheminę vaistų struktūrą, tiekti juos kontroliuojamu būdu ir sumažinti toksiškumą [2]. Nanodalelių (ND) privalumai yra tai, kad jos gali veikti kaip vaistų nešikliai, įskaitant tuos, kurie susiję su nanoskalės dydžiu, didelis paviršiaus ir tūrio santykis, galimybe aptikti taikinius ir kontroliuoti vaisto išsiskyrimą [3]. ND turi didžiulį potencialą vėžio diagnozavime ir gydyme dėl savo paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) reiškinio padidintos šviesos sklaidos ir absorbcijos [4].

Įvairios ND gali būti pritaikytos ir kitų ligų diagnozavimui ar gydymui, pavyzdžiui, sunkaus ūminio kvėpavimo sindromo koronaviruso 2 (SARS-CoV-2) viruso diagnostikai. Labai maži ND matmenys leidžia efektyviai patekti į gyvas organizacijas. Sidabro, aukso, sidabro sulfido, titano oksido, cirkonio ND gali būti panaudotos kaip vakcinų tiekimo sistema, kuri, palyginti su įprastomis antigenų pagrindu pagamintomis vakcinomis, pasižymi išskirtinėmis savybėmis tokiomis kaip virusinių ligų prevencija, nes slopina viruso prisijungimą ir patekimą į ląstelę, viruso replikacijos slopinimas ir tiesioginis virusų deaktyvavimas [5]. Nanodalelės gali padėti SARS-CoV-2 gydymui ir vakcinų veiksmingumui bei saugumui sukurti. Nanonešikliai padidina vakcinų kūrimo greitį ir vakcinų efektyvumą. Dėl to, norint slopinti SARS-CoV-2 infekciją, būtinas didesnis nanodalelių, kaip nano tiekimo sistemų ir nanoterapijos virusinės infekcijos atveju, tyrimas ir naujų bei veiksmingų metodų kūrimas [6].

Įvairių biomolekulių konjugacija su nanodalelėmis išplečia jų taikymo sritis. Antikūnai yra dažniausiai naudojami ligandai, skirti aktyviai aptikti naviko ląsteles dėl jų didelio specifiškumo ir afiniteto [7]. Antikūnai gali būti konjuguoti su nanodalelėmis įvairiais būdais, įskaitant adsorbciją, kovalentiniais ryšiais arba naudojant adapterio molekules. Šis konjugavimas turi būti efektyvus norint pasiekti stabilią asociaciją ir kontroliuoti imobilizuotų antikūnų kiekį bei užtikrinti, kad antikūnai neprarastų savo aktyvumo [8]. Todėl konjugacijos įvertinimas yra svarbus žingsnis, norint pagerinti tokių konjugatų taikymo efektyvumą.

Darbo tikslas:

Atlikti bei įvertinti kvantinių taškų ir aukso nanostrypelių konjugaciją su antikūnais.

Darbo uždaviniai:

1. Imobilizuoti CD44 ir SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymus PPR jutiklio lusto paviršiuje nanodalelių ir antikūnų konjugacijos įvertinimui.

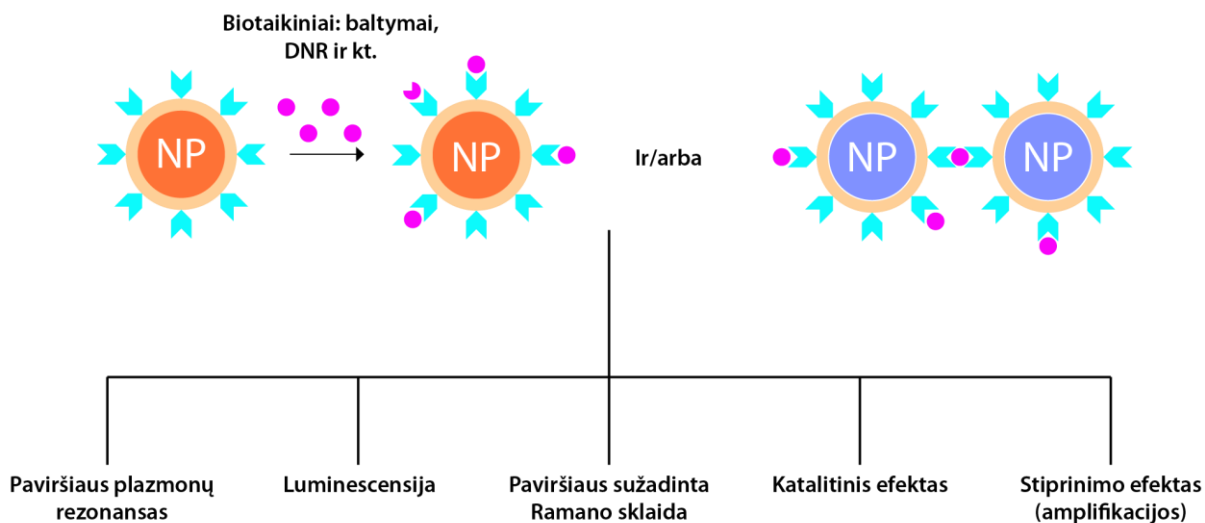
2. Pasirinkti bei charakterizuoti kvantinius taškus, kurie bus naudojami konjugacijai su antikūnais.
3. Atlikti kvantinių taškų, modifikuotų polietilenglikoliu derivatizuotu su amino grupėmis, konjugaciją su specifiniais antikūnais prieš CD44 baltymą.
4. Susintetinti bei apibūdinti aukso nanostrypelius.
5. Atlikti aukso nanostrypelių konjugaciją su specifiniais antriniais antikūnais.
6. Patikrinti paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopijos metodo tinkamumą antikūnų su kvantiniais taškais ar aukso nanostrypeliais konjugacijos įvertinimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Kvantiniai taškai

Kvantiniai taškai yra 1-10 nanometrų mažos puslaidininkų dalelės, kurios dėl savo ryškumo ir stabilumo yra naudojamos kaip fluoroforai [9]. Kvantiniai taškai pasižymi įdomiomis fizinėmis ir optinėmis savybėmis, kurios yra naudingos baltymų žymėjimui ir vaizdavimui ląstelėse. Jie pasižymi tuo, kad yra stabilesni už įprastus fluoroforus (tokius kaip cianiną, fluoresceiną) ir gali šviesti 20 kartų ryškiau [10]. Švitinami kvantiniai taškai neblukšta net keletą valandų, todėl yra labai tinkami viduląstelių vyksmų tyrimams. Kai kvantiniai taškai apšviečiami šviesa, kvantiniame taške esantys elektronai gali būti sužadinti iki didesnės energijos būsenos. Puslaidininkio kvantinio taško atveju šis procesas atitinka elektrono perėjimą iš valentinės juostos į laidumo juostą. Sužadintas elektronas gali grįžti atgal į valentinę juostą, išleisdamas savo energiją kaip šviesą. Šviesos spalva priklauso nuo dalelės dydžio ir formos. Didėsni taškai skleidžia šviesą ilgesnių bangos ilgių ruože rausvame spektre (maždaug 620–750 nm); mažesni taškai skleidžia trumpesnių bangos ilgių ruože arčiau violetinio matomos šviesos spektro galo (maždaug 380–450 nm) [11].

Galima paruošti fluorescencinius žymenis, konjuguojant puslaidininkinių kvantinius taškus su biologinio atpažinimo molekulėmis. Tyrimai parodė, kad prie kvantinių taškų galima kovalentiškai prijungti nukleorūgštis [12], peptidus [13] ar antikūnus [14], o tokie dariniai gali būti naudojami kaip fluorescenciniai žymenys ląstelėse ar audiniuose (1 pav.). Antikūnais konjuguoti kvantiniai taškai yra technologija, kuri leidžia pažymėti didelę raišką biologines sistemas [15]. Kvantinių taškų ir antikūnų konjugatai gali būti panaudojami kaip perspektyvūs biologiniai žymenys dėl efektyvios kvantinių taškų fluorescencijos ir didelės antigeno-antikūno sąveikos specifiškumo [16].



1 pav. Nanodalelių savybės, kurios gali būti pritaikytos kuriant biologinius jutiklius

Konjuguotos nanodalelės ir kvantiniai taškai turi daug žadančių pritaikymo galimybių nanomedicinoje, kurios apima biologinių analizių aptikimą, biologinį vaizdavimą, tikslinį vaistų tiekimą ir naujų terapinių preparatų ar metodų kūrimą. Nors dauguma šių pritaikymų yra pagrįsti optinėmis nanodalelių medžiagų savybėmis, tokiomis kaip paviršiaus plazmonų rezonansas, paviršiuje sustiprinta

Ramano sklaida ir stipri fotoluminescencija, kiti nanodalelių aspektai, tokie kaip katalizinis ir stiprinimo efektas irgi yra svarbūs [17].

1.2 Kvantinių taškų konjugavimas su biologinėmis molekulėmis

Kad būtų galima naudoti kvantinius taškus įvairiuose biologiniuose tyrimuose, biologinės molekulės turi būti stabiliai pritvirtintos prie kvantinio taško paviršiaus. Gali būti naudojamos įvairios biologinės molekulės, įskaitant nukleino rūgštis, baltymus (avidiną arba streptavidiną, albuminą, adapterio baltymus ir antikūnus), polisacharidus ir peptidus. Kvantiniai taškai gali būti konjuguojami su biologinėmis molekulėmis keliais metodais:

1. Kovalentinis kryžminis ryšys, kuris susidaro sujungiant karboksilo grupes kvantinio taško paviršiuje su aminais naudojant 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidą (EDC) arba 4-(N-maleimidometil)-cikloheksanokarboksirūgšties N-hidroksisukcinimido esterį (SMCC), kuris jungia pirmines aminių ir sulfhidrilo grupes. Kovalentinė konjugacija užtikrina stiprų negrižtamą surišimą, tačiau antikūnai yra atsitiktinai orientuoti. Be to, galimi konformaciniai pokyčiai [18].
2. Tiesioginė tioluotų peptidų (cisteino liekanų) konjugacija su kvantinio taško paviršiumi per afinitetą cinko sulfido (ZnS) apvalkalo sluoksniui.
3. Adsorbcija arba nekonvalentinis savaiminis surinkimas naudojant baltymus (pvz., teigiamai įkrautą domeną, His žymes). Dėl didelio paviršiaus ploto ir tūrio santykio prie vieno kvantinio taško galima prijungti keletą skirtingų tipų biomolekulių. Kiekviena iš šių biomolekulių gali atlikti pageidaujamą funkciją, kuri užtikrina daugiafunkciškumą [19].

1.3 Kvantinių taškų sintezė

Kvantinių taškų dydis svyruoja nuo 1 iki 10 nm ir jie gali būti sintetinami įvairiais metodais [20]. Kvantinių taškų sintezėje svarbu kontroliuoti jų dydį, formą ir sudėtį, siekiant pagerinti jų veikimą ir pritaikymo galimbes. Sintezę galima suskirstyti į dvi kategorijas: „iš viršaus į apačią“ (*angl.* „top-down“) ir „iš apačios į viršų“ (*angl.* „bottom up“). „Iš viršaus į apačią“ metodas apima gamybą iš birių medžiagų, tokių kaip litografija ar ėsdinimas, o „iš apačios į viršų“ metodas apima kvantinių taškų sintezę iš atomų ar molekulių. Taikant „iš viršaus į apačią“ metodą puslaidininkis yra ploninamas. Norint susintetinti maždaug 30 nm skersmens kvantinių tašką, dažniausiai „iš viršaus į apačią“ metodai apima molekulinio pluošto epitaksiją, jonų implantavimą, elektroninio pluošto litografiją ir rentgeno litografiją [21]. Pagrindiniai šių procesų trūkumai yra priemaišų atsiradimas kvantiniuose taškuose bei struktūriniai neatitikimai [22].

Taikant alternatyvų „iš apačios į viršų“ metodą, koloidiniai kvantiniai taškai yra savaime surenkami tirpale po cheminės redukcijos [22]. Metodo pasirinkimas priklauso nuo norimo dalelių dydžio, reikalingų savybių, įrangos ir išteklių prieinamumo.

Koloidinė sintezė yra labiausiai paplitęs kvantinių taškų sintezės metodas. Šiame metode naudojamas tirpalas, kuriame yra metalo jonų ir redukuojantis agentas, kuris gali redukuoti metalo jonus, kad susidarytų kvantiniai taškai. Reduktorius gali būti metalo druska, paviršiaus aktyvioji medžiaga arba abiejų derinys. Koloidinė sintezė gali būti atliekama organiniuose arba vandeniniuose tirpaluose. Organinėje fazėje kvantiniai taškai gali būti padengti apvalkalu, kuris užtikrina stabilumą ir taip pat gali būti naudojamas jų optinėms savybėms sureguliuoti [23]. Koloidinės sintezės pranašumai yra jos paprastumas, maža kaina ir galimybė gaminti kvantinius taškus su didele išeiga. Šio metodo trūkumai yra mažas dalelių dydžio atkuriamumas ir sunkumai kontroliuojant dalelių dydį [24].

Cheminis nusodinimas garais yra dar vienas kvantinių taškų sintezės metodas. Šis metodas apima plonos kvantinių taškų plėvelės nusodinimą ant substrato cheminės reakcijos tarp dujų fazės pirmtako ir substrato paviršiaus būdu. Substratas gali būti šildomas, kad padidėtų reakcijos greitis ir susidarytų siauro

dydžio pasiskirstymo kvantiniai taškai [25]. Cheminio nusodinimo garais pranašumai yra galimybė gaminti aukštos kokybės kvantinius taškus su siauru dydžio pasiskirstymu bei galimybė kontroliuoti dalelių dydį. Šio metodo trūkumai yra didelė kaina ir specializuotos įrangos poreikis [26].

Elektrocheminė sintezė yra metodas, naudojamas kvantiniams taškams sintetinti elektrocheminiu būdu, nusodinant metalo jonus ant elektrodo paviršiaus [27]. Elektrocheminės sintezės pranašumai yra jos paprastumas, maža kaina ir galimybė gaminti kvantinius taškus su didele išeiga. Šio metodo trūkumai yra tai, kad sunku kontroliuoti dalelių dydį bei formą [28].

1.4 Kvantinių taškų funkcionalizavimas

Paviršiaus chemija yra labai svarbus kvantinių taškų sintezės ir funkcionalizavimo aspektas. Kvantiniai taškai gali būti hidrofilingi, hidrofobiniai, padengti silicio dioksidu, polimerais arba baltymais [29]. Nuo kvantinio taško paviršiaus chemijos priklauso jų savybės, tokios kaip stabilumas ir biologinis suderinamumas [30].

Hidrofilingi kvantiniai taškai, kurie padengti hidrofilingomis funkcinėmis grupėmis, leidžia naudoti juos vandeniniuose tirpaluose [30]. Jie dažniausiai naudojami biologiniam vaizdui gauti ir jutikliuose dėl savo savybės mažiau agreguoti ir sulipti lyginant su hidrofobiniais kvantiniams taškais. Norint, kad kvantiniai taškai būtų hidrofilingi, paprastai reikalingas paviršiaus funkcionalizavimas. Tai apima kvantinio taško paviršiaus modifikavimą hidrofilingomis grupėmis (pvz. amino grupėmis) arba molekulėmis, tokiomis kaip karboksirūgštys, kurios leidžia naudoti kvantinius taškus vandeniniuose tirpaluose ir sąveikauti su vandeniu [31]. Auksu dengti hidrofilingi kvantiniai taškai turi šerdį, pagamintą iš puslaidininkinės medžiagos, tokios kaip CdSe, ir yra padengta aukso apvalkalu. Vėliau vyksta funkcionalizavimas hidrofilingomis molekulėmis, tokiomis kaip tioliuotas polietilenglikolis (PEG). PEG yra vandenyje tirpus, biologiškai suderinamas polimeras, kuris modifikuoja nanodalelių paviršių, kad pagerintų jų stabilumą ir sumažintų jų imunogeniškumą. Nustatyta, kad PEG dengtos nanodalelės pasižymi pagerintu cirkuliacijos laiku in vivo ir sumažintu toksiškumu, todėl puikiai tinka naudoti biomedicinoje [32]. PEG danga ant kvantinių taškų padeda pagerinti jų stabilumą biologiniuose skysčiuose, todėl jie yra naudingi vaizdavimui, įskaitant ląstelių žymėjimą ir sekimą, nukreipimą į naviką bei fototerminę terapiją. Auksu padengtas kvantinių taškų apvalkalas pagerina jų optines ir elektronines savybes, todėl jie yra naudingi aptikti, pavyzdžiui, biologines molekules ar aplinkos teršalus. PEG danga ant kvantinių taškų gali padėti pagerinti jų biologinį suderinamumą ir sumažinti imunogeniškumą, todėl ji yra naudinga kaip vaistų tiekimo priemonė [33].

Hidrofobiniai kvantiniai taškai yra suderinami su nepoliniais tirpikliais ir agreguoja vandenyje, todėl norint juos naudoti vandeniniuose tirpaluose reikia atlikti enkapsuliavimą, ligandų mainus arba paviršiaus modifikacijas, padengiant jų paviršių organinėmis molekulėmis, tokiomis kaip alkilo grandinės arba aromatinės grupės [33]. Šios molekulės aplink kvantinius taškus sukuria hidrofobinį barjerą, neleidžiantį vandeniui sąveikauti su dalelės paviršiumi. Hidrofobiniai kvantiniai taškai turi keletą pranašumų, palyginti su hidrofilingais, įskaitant didesnę stabilumą tirpale ir didesnę atsparumą skilimui. Tačiau hidrofobinis kvantinių taškų pobūdis taip pat gali kelti tam tikrų iššūkių. Pavyzdžiui, dėl to gali būti sunkiau tolygiai paskirstyti daleles tirpale ir tai gali apriboti jų pritaikymą biologinėse srityse, kur dažnai reikalingi hidrofilingi paviršiai, kad būtų suderinamos su gyvomis ląstelėmis ir audiniais [34]. Hidrofobiniai PbS kvantiniai taškai netirpsta vandenyje ir reikalauja hidrofobinio paviršiaus, kad apsaugotų juos nuo drėgmės ir leistų juos naudoti nepolinuose tirpikliuose. Tai gali būti organiniai ligandai, kaip oleino rūgštis, oleilaminas arba trioktilfosfino oksidas (TOPO). Šie ligandai adsorbuojasi į kvantinių taškų paviršių koordinuodami su Pb arba S atomais, sukurdami hidrofobinį apvalkalą, kuris stabilizuoja nanokristalus ir neleidžia jiems agreguotis [35].

Silicio dioksidu dengti kvantiniai taškai – turi silicio dioksido apvalkalą, kuris užtikrina stabilumą, tirpumą vandenyje ir apsaugą nuo skilimo. Jie dažniausiai naudojami vaistų pernešimui, ligų

diagnozavime, kaip fluorescuojantys zondai. Kvantinių taškų dydį ir silicio dioksido dangos storį galima reguliuoti pagal norimas kvantinių taškų savybes [36]. Pavyzdžiui, mažesni kvantiniai taškai skleidžia didesnės energijos (trumpesnio bangos ilgio) šviesą nei didesni, o storesnės silicio dioksido dangos gali sumažinti emisijos intensyvumą, bet taip pat padidinti dalelių stabilumą. CdTe kvantiniai taškai su silicio dioksido apvalkalu turi didesnę stabilumą, galimybę pritaikyti vandeniniuose tirpaluose bei fluorescencijos intensyvumą [37].

Polimerais dengti kvantiniai taškai – turi polimerinę dangą, kuri užtikrina stabilumą ir apsaugą, taip pat funkcinių grupių buvimą biokonjugacijai. Jie dažniausiai naudojami kaip fluorescuojantys zondai bei biologiniai jutikliai aptikti biologinėms molekulėms. Polimerais dengtas paviršius padeda kontroliuoti kvantinių taškų dydį, formą ir optines savybes. Taip pat gali pagerinti kvantinių taškų galimybę tirpti organiniuose tirpikliuose, kas padidina pritaikymo galimybes [38]. PEG padengti CdSe arba ZnS kvantiniai taškai yra labiau atsparūs agregacijai ir degradacijai, pasižymi didesniu stabilumu, kas gali būti pritaikyta biologiniam vaizdai gauti ir vaistų tiekimui [19].

Baltymais padengti kvantiniai taškai yra padengti baltymais, kurie užtikrina stabilumą, biologinį suderinamumą ir geresnę taikinių atpažinimą. Jie dažniausiai naudojami biokatalizėje, kaip fluorescuojantys zondai, biologiniai jutikliai aptikti biomolekulėms. Be to, baltymais padengti kvantiniai taškai taip pat gali būti naudojami biologiniuose jutikliuose, nes supančios aplinkos pokyčiai gali sukelti baltymų dangos pokyčius, o tai savo ruožtu turi įtakos kvantinių taškų fluorescencijai [39]. Dėl to jie naudingi nustatant pH vertę, temperatūros pokyčius arba konkrečių molekulių buvimą. CdSe/ZnS kvantiniai taškai padengti streptavidinu gali būti konjuguoti su biotinilintomis molekulėmis, tokiomis kaip antikūnai arba DNR zondai, kad būtų nukreiptos į specifines ląsteles arba biomolekules. Tai leidžia vizualizuoti ir aptikti šiuos taikinius naudojant fluorescencinę mikroskopiją ar kitus vaizdo gavimo metodus [39], [40]. Streptavidinu padengti kvantiniai taškai taip pat gali būti naudojami biologiniuose jutikliuose, tėkmės citometrijoje, baltymų žymėjime. Konjuguojant juos su biotilintais ligandais, tokiais kaip aptamerai arba peptidai, jie gali būti naudojami specifinėms biomolekulėms ar patogenams aptikti. Kai streptavidinu padengti kvantiniai taškai prisijungia prie biotilintų ligandų, pasikeičia jų fluorescencija, kuri gali būti naudojama tikslinės biomolekulės ar patogeno buvimui nustatyti [41].

Nanomedžiagų mokslų pažanga padeda išplėtoti ir siekti pažangos įvairių sudėtingų ligų diagnostikoje, aptikime ir gydyme, kas lemia didelį šios srities potencialą. Kvantiniai taškai turi didelį potencialą biomedicinos, biologinio vaizdo gavimo ir fotoluminescencinėse srityse, ir jie gali būti panaudoti kaip perspektyvūs fluorescenciniai zondai vaizdavimui, nes jie rodo nepaprastą ateitį bioanalizės, mėginių analizės, *in vivo* ląstelių, sergančių ligomis įvertinimui ir susijusiose srityse [42].

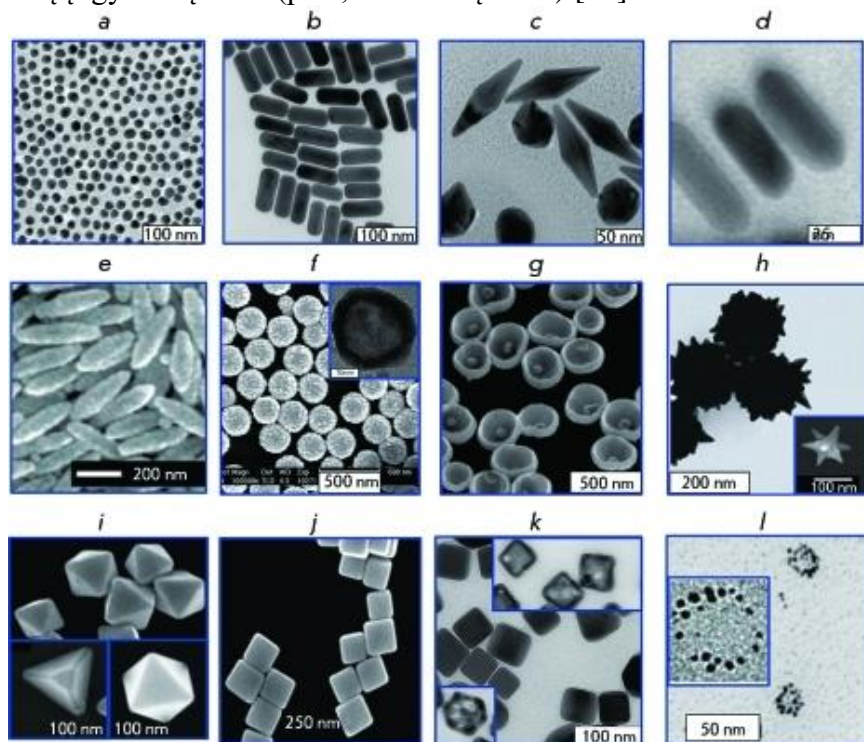
1.5 Aukso nanodalelės

Aukšas yra vienas iš pirmųjų atrastų metalų, jo tyrimo ir taikymo istorija apima mažiausiai kelis tūkstančius metų. Pirmieji duomenys apie koloidinį auksą rasti kinų, arabų ir indų mokslininkų traktatuose, kuriems koloidinį auksą pavyko gauti dar V–IV amžiuje prieš Kristų. Jie naudojo jį medicininiams tikslais (kinų „auksinis tirpalas“ ir indišką „skystas auksas“) [43]. Europoje viduramžiais koloidinis auksas buvo tiriamas ir naudojamas alchemikų laboratorijose. Paracelcijus naudojo „geriamą auksą“ daugeliui psichinių ligų ir sifiliui gydyti [44]. Giovanni Andrea naudojo „aurum potabile“ kaip vaistą pacientams, sergantiems raupsais, maru, epilepsija ir viduriavimu. Nepaisant šimtmečių senumo istorijos, „imunochemijos revoliucija“, susijusi su aukso nanodalelių naudojimu biologiniuose tyrimuose, įvyko tik 1971 m., kai britų mokslininkai Faulkas ir Tayloras [45] aprašė antikūnų konjugacijos su koloidiniu auksu metodą tiesioginei salmonelių paviršiaus antigenų elektroninei mikroskopijai vizualizuoti [46].

Per pastaruosius 40 metų buvo atlikta daug tyrimų skirtų funkcionalizuotų nanodalelių – konjugatų su atpažįstančiomis biomakromolekulėmis (antikūnais [47], lektiniais [48], baltymais [49],

aptameris [50] ir kt.) pritaikymui biochemijoje, mikrobiologijoje, imunologijoje, citologijoje, augalų fiziologijoje ir t.t. Šiuolaikinės medicinos ir biologijos studijose aukso nanodalelių panaudojimo spektras itin platus. Tai apima genomiką [51], biosensoriką [52], imuninę analizę [53], klinikinę chemiją [54], mikroorganizmų [55] ir vėžio ląstelių aptikimą [56] ir fototermolizę [57], tikslingą vaistų [58], DNR [59] ir antigenų [60] tiekimą, optinį biologinį vaizdavimą ir ląstelių bei audinių stebėjimą naudojant modernias registravimo sistemas [43]. Teigiama, kad aukso nanodalelės gali būti naudojamos beveik visose medicinos srityse tokiose kaip diagnostika, terapija, profilaktika bei higiena (pvz., vandens gryninime) [61]. Platus aukso dalelių pritaikymo spektras grindžiamas jų unikaliomis fizinėmis ir cheminėmis savybėmis [46]. Visų pirma, aukso nanodalelių optines savybes lemia jų plazmonų rezonansas, kuris yra susijęs su kolektyviniu laidumo elektronų sužadiniu ir yra lokalizuotas plačioje srityje, nuo matomos iki infraraudonosios (IR) srities, priklausomai nuo dalelių dydžio, formos ir struktūros [62].

Aukso nanodalelės buvo aktyviai naudojamos identifikuojant cheminius ir biologinius veiksnius. Be įprastų koloidinių aukso su kvazi sferinėmis dalelėmis (nanosferomis), taip pat yra ir ne sferinės dalelės, tokios kaip nanovamzdeliai, nanoapvalkalai, nanonarvai, nanožvaigždės ir kitų tipų dalelės (ši dalelių grupė buvo pavadinta „tauriųjų metalų plazmoninio rezonanso dalelėmis“) (2 pav.). Naudojant aukso nanodaleles ir antikūnų – aukso nanodalelių konjugatus, galima realiu laiku stebėti aukso nanodalelių patekimą į gyvas ląsteles (pvz., vėžines ląsteles) [46].



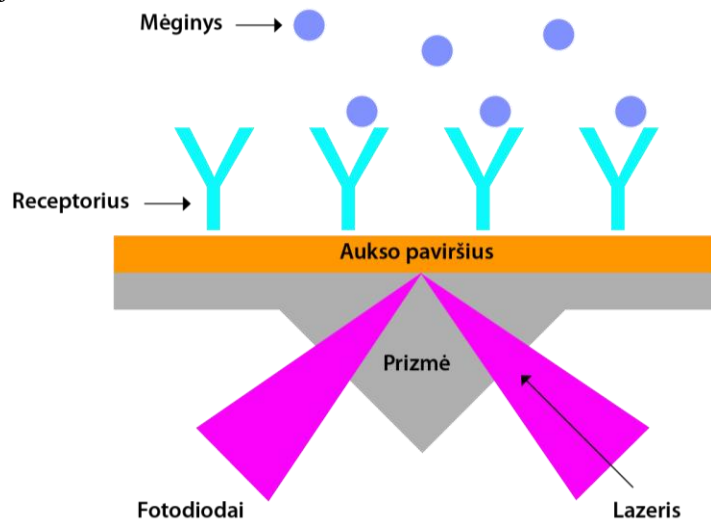
2 pav. Įvairių tipų aukso plazmonų rezonanso nanodalelės: 16 nm nanosferos (a), nanovamzdeliai (b), bipiramidės (c), aukso nanostrypai su sidabro danga (d), „nanorice“ – Fe_2O_3 nanostypeliai, padengti aukso nanoapvalkalu (e), auksiniai nanoapvalkalai ant silicio dioksido šerdies, SiO_2/Au (f) (pavaizduotas tuščiaviduris auksinis nanoapvalkalas), nanodubenėliai su aukso sėkla apačioje (g), „smailūs nanoapvalkalai“ su SiO_2/Au šerdimis (pavaizduota „nanožvaigždės“ dalelė) (h), tetraedrai, oktaedrai ir kubooktaedrai (i), nanokubai (j), sidabriniai nanokubeliai ir aukso-sidabro nanonarvai, gauti naudojant sidabro kubo šablonus (k), nanokaklai (l) [46]

1.6 Aukso nanodalelių pritaikymas paviršiaus plazmonų rezonanso biologiniuose jutikliuose

Visų pirma, nanometro dydžio metalo dalelių rezonansinės optinės savybės buvo sėkmingai pritaikytos kuriant biologinius jutiklius. Tokie jutikliai kaip: kolorimetrinis, refraktometrinis, elektrocheminis, pjezoelektrinis ir kt. [52], [63],[64]. Šie prietaisai gali būti pritaikyti biologijoje (nukleorūgščių, baltymų ir metabolitų nustatyme), medicinoje (vaistų patikroje, antikūnų ir antigenų analizėje, infekcinių ligų diagnostikoje) bei chemijoje (aplinkos stebėjime) [46].

Daugiau nei dešimtmetį yra tiriama aukso nanodalelių biologinės specifinės sąveikos tvarkingose struktūrose (savaiame susirenkančios plonos plėvelės) [65] arba polimerinėse [66]. Šiuo atveju naudojamas optinio signalo iš konjugato stiprinimas dėl jaudinančio vietinio lauko stiprinimo agregate, kuris buvo suformuotas iš aukso nanoklasterių. Biologinių jutiklių projektavimui naudojamos naujos unikalios technologijos, įskaitant monosluoksnį metalo dalelių savaiminį surinkimą [67], nanolitografiją [68], vakuuminį garinimą [69] ir kt. Svarbu pažymėti, kad dalelių dydis, forma [70], atstumas tarp dalelių [71] ir vietinės aplinkos optinės savybės [72] turi didelę įtaką optiniam signalui, gaunamam iš nanodalelių ar jų agregatų, kuri suteikia galimybę valdyti jutiklio „derinimą“. Šios metalų klasterių savybės buvo pagrindas kuriant naujas perspektyvias plazmonų rezonanso biologinių jutiklių sistemas (paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) – biologinius jutiklius), pagrįstus biospecifinių sąveikų pavertimu optiniu signalu [46].

Paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) jutiklio jautrumas, stabilumas ir atrankumas tiesiogiai priklauso nuo optinės registracijos sistemos charakteristikų [73]. Matavimo principas plokštuminiuose, prizminiuose ar veidrodiniuose biologiniuose jutikliuose yra analogiškas principui, kuris naudojamas viso vidinio atspindžio metode. Šis metodas įprastai naudojamas matuojant itin plonų organinių plėvelių ant metalinių (atspindinčių) paviršių storį ir lūžio rodiklį [64]. Plazmonų rezonanso sužadinimas plokščiam aukso sluoksnyje atsiranda, kai poliarizuota šviesa krenta į paviršių tam tikru kampu. Elektromagnetiniai laukai, einantys išilgai paviršiaus ribos ir lokalizuoti arti jo dėl eksponentinio dielektrikai statmenos amplitudės sumažėjimo, yra sužadinami metalo/dielektriko sąsajoje (visiškas vidaus atspindys, 3 pav.). Lūžio rodiklis tam tikru kampu ir tam tikru bangos ilgiu priklauso nuo plono sluoksnio dielektrinių savybių ant sąsajos, kurias galutinėje analizėje lemia taikinio molekulių koncentracija sluoksnyje [46].



3 pav. Molekulių taikinių aptikimo schema pagrįsta prizmės visišku vidiniu atspindžiu, kuri yra padengta plonu aukso sluoksniu

Yra sukurti įvairių tipų biologiniai jutikliai naudojantys aukso nanodaleles, kurie pritaikyti erkinio encefalito [74], žmogaus papilomos [75] ir su imunodeficitu susijusių virusų [76], Alzheimerio ligos [77], fosforo organinių junginių ir pesticidų imunodiagnostikoje [78], antibiotikams [79], alergenams [80], citokinams [81], angliavandeniliams [82], imunoglobulinams [83], skirti aptikti naviko [84] ir bakterijų ląsteles [85] bei nustatyti smegenų ląstelių aktyvumą [86].

1.7 Aukso nanodalelių pritaikymas terapiniais tikslais

Aukso nanodalelės (AuND) yra pritaikomos fototerminėje terapijoje. Fototerminių ląstelių pažeidimai yra perspektyvi kryptis tiek navikų terapijoje [87], tiek intensyviai besivystančioje infekcinių ligų terapijoje. AuND pasiekia savo sugerties maksimumą matomoje arba artimoje infraraudonųjų spindulių srityje ir įkaista, kai apšvitinamos atitinkamu šviesos bangos ilgiu. Jei jie yra taikinių ląstelių viduje arba aplink juos (tai galima pasiekti sujungiant aukso daleles su antikūnais ar kitomis molekulėmis), šios ląstelės miršta [46].

Kitas AuND pritaikymas yra fotodinaminėje terapijoje. Fotodinaminis metodas [88] taikomas onkologinių ligų, tam tikrų odos ar infekcinių ligų terapijoje, pagrįstas šviesai jautrių agentų – fotosensibilizatorių (įskaitant dažus) ir paprastai tam tikro bangos ilgio matomos šviesos naudojimu. Dažniausiai sensibilizatoriai į organizmą patenka per veną, taip pat gali būti vartojamas aplikaciniu būdu arba peroraliniu būdu. Fotodinaminės terapijos medžiagos gali selektyviai kauptis navikuose ar kituose tiksliniuose audiniuose (ląstelėse). Pažeisti audiniai apšviečiami lazerio šviesa, kurios bangos ilgis atitinka dažų sugerties maksimumą. Be įprasto šilumos išsiskyrimo dėl sugerties [89], reikšmingas ir antrasis mechanizmas. Tai siejama su fotocheminiu pavienio deguonies susidarymu ir labai aktyvių radikalų, sukeliančių naviko ląstelių nekrozę ir apoptozę, susidarymu. Fotodinaminė terapija sukelia netinkamą auglio mitybą ir mirtį dėl mikrokraujagyslėms padarytos žalos. Pagrindinis fotodinaminės terapijos trūkumas yra tas, kad fotosensibilizatoriai organizme išlieka ilgą laiką, dėl to paciento audiniai išlieka labai jautrūs šviesai [46].

AuND taip pat panaudojami kaip terapiniai agentai. AuND vis aktyviau naudojamos ne tik diagnostikos ir ląstelių fototermolizės eksperimentuose, bet ir gydymo tikslais. 1997 m. pirmą kartą buvo pranešta apie sėkmingą koloidinio aukso panaudojimą reumatoidiniu artritu sergantiems pacientams [90]. 2008 m. buvo paskelbta daugybė duomenų apie dešimt metų trukusius klinikinius preparato „Aurasol“, skirto peroraliniam vartojimui sergant sunkiomis reumatoidinio artrito formomis, klinikinius tyrimus [91]. Buvo aprašyti teigiami rezultatai, gauti į sąnarį įvedus koloidinio aukso žiurkėms, sergančioms kolageno sukeltu artritu [92].

1.8 Aukso nanodalelių toksiškumas

AuND kelia didelį susidomėjimą dėl savo elektrinių, mechaninių, termininių, cheminių ir optinių savybių. Šie dideli užmojai atsirado dėl jų galimos sąveikos su biologiniais audiniais ir molekulėmis, kas taip pat gali sukelti ir toksiškumą [93].

Tyrimuose [94] pateikta, kad susintetintos AuND gali cirkuliuoti organizme ilgesnį laiką be organizmo imuninės sistemos atmetimo. Šias savybes paaštrina jų paviršiaus krūviai, mažas dydis ir tai kelia didelį susirūpinimą, ypač sintezės ir taikymo metu [95]. AuND, keliančių pavojų sveikatai, yra įvairių formų, dydžių ir paviršiaus krūvių. Tačiau didžiulė fizinių ir cheminių savybių įtaka kelia naujų klausimų dėl būsimos sveikatos būklės. Pastaruoju metu yra mažai informacijos apie aukso nanodalelių poveikį sveikatai ir nėra reglamentuojančių saugos gairių, siejančių jų savybes su toksiškumu [93].

AuND poveikis gali įvykti kūrimo ir sintezės metu arba naudojant juos tiesiogiai nurijus arba įpurškus į sistemą, šalinant atliekas [96], [97]. Kiti poveikio būdai yra absorbcija per odą, įkvėpimas, iš implantų, ore esančių ir paviršiaus medžiagų sukibimas, kuri sunku aptikti [96], [97], [98]. Toks

poveikis gali atsirasti dėl jų išlikimo ir kaupimosi aplinkoje, todėl jie gali patekti į maisto grandinę, o tai galiausiai paveikia abiotinius ir biotinius aspektus [99]. AuND patekimas į maisto grandinę padidina kitų aplinkos organizmų, tokių kaip dumbliai ir žuvis, aukso nanodalelių įsisavinimą, kuriuos toliau gali vartoti gyvūnai ir žmonės [100].

Plačiai manoma, kad AuND kaupiasi kepenyse ir blužnyje, o tai dar labiau pažeidžia organizmą [101]. Aukso nanovamzdeliai (AuNV) buvo švirkščiami po oda pelėms. Didžioji jų dalis liko injekcijos vietoje. Tačiau į sistemą patekę aukso jonai sukėlė audinių oksidacinį pažeidimą [102]. Tyrimai parodė, kad aukso nanodalelės gali sukelti toksiškumą dėl kelių mechanizmų, įskaitant oksidacinį stresą, uždegimą, DNR pažeidimus ir trukdymą ląstelių procesams [93].

Aukso nanodalelės gali sutrikdyti ląstelių funkcijas ir pažeisti ląsteles, kas sukelia citotoksiškumą. Tai gali sukelti ląstelių mirtį arba sumažėti ląstelių gyvybingumas, kuris gali priklausyti nuo nanodalelių dydžio ir koncentracijos [60]. Be to, aukso nanodalelės gali sąveikauti ir pažeisti DNR, o tai gali sukelti genotoksiškumą [103]. Genotoksiškumas gali sukelti mutacijas, chromosomų aberacijas ir kitus genetinius pakitimus, kurie gali turėti ilgalaikių pasekmių ląstelių sveikatai ir funkcijoms [104]. Aukso nanodalelės taip pat gali generuoti reaktyviausias deguonies rūšis (ROS) [105] ir sukelti oksidacinį stresą ląstelėse [106], [107], todėl gali būti pažeisti ląstelių komponentai, tokie kaip baltymai, lipidai ir DNR. Oksidacinis stresas gali sutrikdyti ląstelių homeostazę ir sukelti įvairius toksinius poveikius [108]. Be jau išvardintų, aukso nanodalelės dar gali kauptis skirtinguose organuose, kaip kepenyse [109], blužnyje ar inkstuose ir sukelti jų toksiškumą. Dėl to gali pablogėti organų funkcija, būti pažeisti audiniai ir sukelti ilgalaikį poveikį sveikatai [93].

Svarbu pažymėti, kad AuND toksiškumas gali skirtis priklausomai nuo specifinių nanodalelių savybių, taip pat nuo poveikio sąlygų ir tiriamos biologinės sistemos [95]. Reikia daugiau tyrimų, kad būtų galima visiškai suprasti aukso nanodalelių toksiškumą ir nustatyti saugias gaires dėl jų naudojimo įvairiose srityse. Norint sumažinti galimą toksiškumo riziką, reikia tinkamai tvarkyti, naudoti ir šalinti aukso nanodaleles pagal nustatytus saugos protokolus ir taisykles [93], [110].

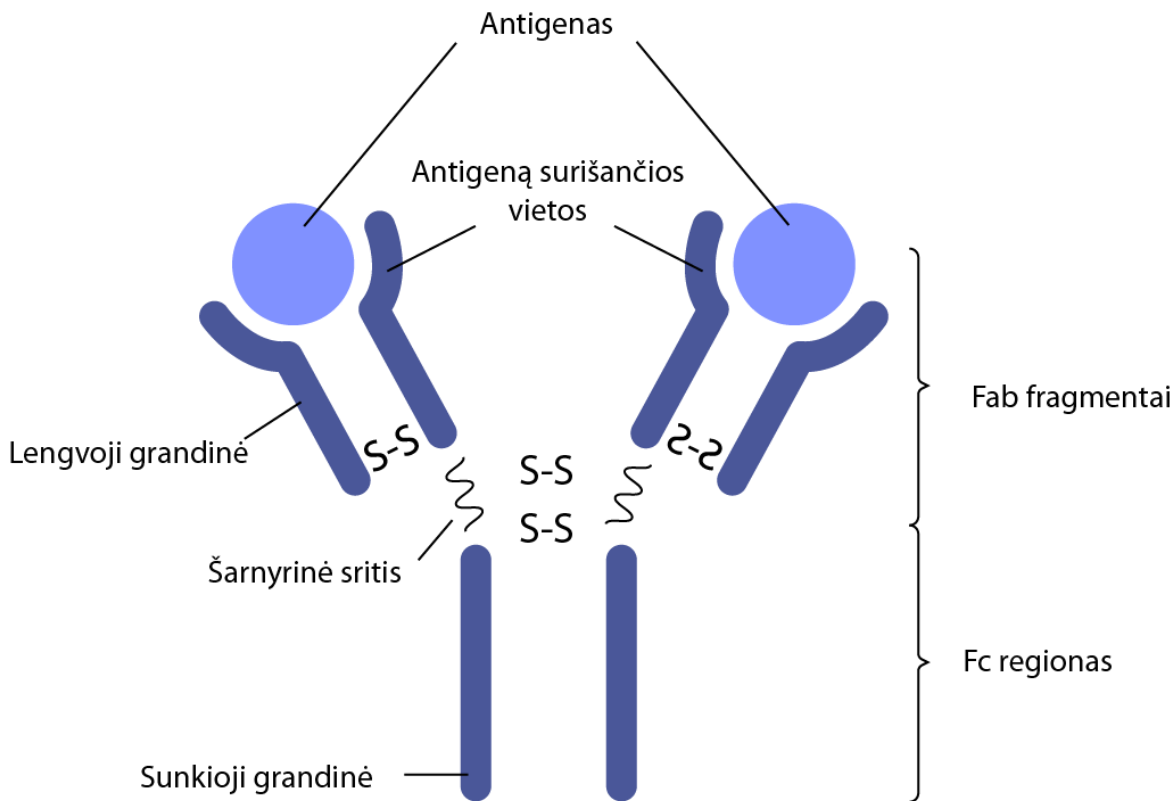
1.9 Antikūnai

Antikūnas, taip pat žinomas kaip imunoglobulinas (Ig), yra didelis Y formos baltymas [111], kurį imuninė sistema naudoja svetimiams objektams, pvz., patogeninėms bakterijoms ir virusams, nustatyti ir neutralizuoti [112]. Antikūnas atpažįsta unikalią patogeno molekulę, vadinamą antigenu [113]. Kiekviename antikūno Y gale yra paratopas, kuris yra specifinis vienam konkrečiam antigeno epitopui, leidžiantis šioms dviem struktūroms tiksliai susijungti. Naudojant šį surišimo mechanizmą, antikūnas gali pažymėti mikroba ar užkrėstą ląstelę, kad kitos imuninės sistemos dalys atakuotų, arba gali ją tiesiogiai neutralizuoti (pvz., blokuodamas viruso dalį, kuri yra būtina jo invazijai). Antikūnai yra išskiriama B ląstelių receptoriaus forma [114]. Be baltymų vaistų terapijos, antikūnai vaidina svarbų vaidmenį kontroliuojant tokias ligas kaip vėžys, infekcinės ligos, alergijos, autoimuninės ligos ir uždegimai [115].

1.10 Antikūnų struktūra

Natūrali antikūno molekulė susideda iš keturių peptidinių grandinių, dvejų lengvųjų ir dvejų sunkiųjų, kurios sudaro simetrišką Y formą (4 pav.). Jų struktūra suskirstyta į du regionus - kintamoji sritis (V) (Y raidės viršuje), apibrėžianti antigenų surišimo savybes, ir pastovioji sritis (C) (Y kamienas), sąveikaujantis su efektorinėmis ląstelėmis ir molekulėmis. Du fragmentai yra identiški ir turi antigeno surišimo aktyvumą. Fragmento antigeno surišimui jie vadinami Fab fragmentais. Fab fragmentai atitinka dvi identiškas antikūno molekulės šakas, kuriose yra visos lengvosios grandinės, suporuotos su sunkiųjų grandinių domenais [116]. Kitas fragmentas neturi antigeno surišimo aktyvumo, bet buvo pastebėta, kad

jis lengvai kristalizuojasi, todėl buvo pavadintas Fc fragmentu, nes fragmentas kristalizuojamas. Šis fragmentas yra antikūno molekulės dalis, kuri sąveikauja su efektorinėmis molekulėmis ir ląstelėmis. Funkciniai skirtumai tarp sunkiosios grandinės izotipų daugiausia yra Fc fragmente [117]. Šarnyrinė (angl. hinge) sritis, jungianti antikūno molekulės Fc ir Fab dalis, yra lankstus diržas, leidžiantis nepriklausomai judėti dviem Fab sritims [118].



4 pav. Antikūno struktūra

1.11 Pagrindinės antikūnų funkcijos

Infekcinių ligų atveju antikūnų funkcija yra sukelti biologinį antikūnų poveikį patogenui arba jo toksinui. Pagrindinė antikūnų funkcija yra atpažinti ir prisijungti prie specifinių antigenų, siekiant juos neutralizuoti arba pašalinti iš organizmo. Kai kurie antikūnai gali slopinti tolesnį užkrečiamumą, prisijungdami prie organizmų ir paskatindami juos agreguotis [58]. Antikūnai gali neutralizuoti patogenus, tokius kaip bakterijos, virusai ir toksinai, prisijungdami prie jų paviršiaus ir neleisdami jiems patekti į šeimininko ląsteles arba užkrėsti jas. Tai gali slopinti patogenų gebėjimą pakenkti ir padėti jiems pašalinti iš organizmo [119]. Antikūnai taip pat gali pažymėti patogenus, kuriuos sunaikina fagocitai. Antikūnai gali prisijungti prie patogenų ir pagerinti jų atpažinimą bei įsisavinimą fagocituose, todėl jie pašalinami [120]. Antikūnai gali prisijungti prie patogenų ir suaktyvinti komplemento kaskadą, todėl susidaro membranos atakos kompleksai, galintys tiesiogiai sunaikinti patogenus arba pažymėti, kad juos sunaikintų fagocitai [121]. Dar viena antikūnų funkcija yra ta, kad jie gali įdARBINTI ir suaktyvinti imunines ląsteles, pvz., ląsteles žudikes, kad nužudytų užkrėstas arba vėžines ląsteles. Antikūnai gali prisijungti prie tikslinių ląstelių ir sukelti ląsteles žudikes, kad išskirtų citotoksines molekules, kurios sukelia ląstelių mirtį [122]. Be to antikūnai gali būti perduodami iš motinos kūdikiui per motinos pieną arba per placentą nėštumo metu, užtikrinant pasyvų imunitetą naujagimiui ir apsaugant juos nuo tam tikrų infekcijų ankstyvame gyvenime [123]. Šiuo metu antikūnai plačiai naudojami atliekant

diagnostinius tyrimus, tokius kaip su fermentais susiję imunisorbento tyrimai (ELISA) ir greitieji diagnostikos testai, siekiant nustatyti specifinių antigenų ar antikūnų buvimą mėginiuose. Antikūnai taip pat naudojami įvairioms terapinėms reikmėms, įskaitant monokloninių antikūnų pagrindu sukurtą vėžio, autoimuninių ligų ir kitų ligų gydymą [124].

Imunoglobulinai turi bendrą keturių grandinių struktūrą ir jas galima suskirstyti į skirtingas klases (ir poklasius) pagal sunkiosios grandinės izotipą. Sunkiosios grandinės izotipas suteiks skirtingas struktūrines ir funkcines savybes kiekvienoje antikūnų klasėje, kad kiekvienas izotipas būtų tam tikroje kūno vietoje ir atliktų specifinį vaidmenį imuninėje sistemoje. Priklausomai nuo sunkiosios grandinės pastovių regionų struktūrinių skirtumų, antikūnai skirstomi į skirtingas klases. Žinduolių rūšyse yra aptiktos penkios klasės – IgA (α), IgD (δ), IgE (ϵ), IgG (γ) ir IgM (μ) (5 pav.) [125].

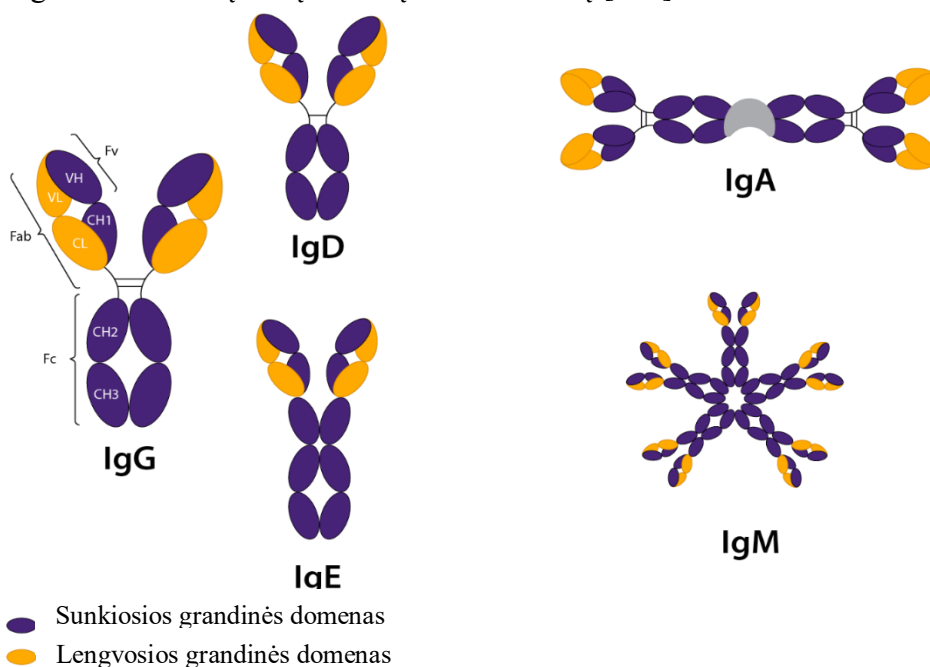
IgG yra pagrindinė antrinio atsako antikūnų klasė ir paprastai yra didesnio afiniteto nei IgM, kuris dominuoja pirminiame atsake. IgG yra randamas kraujyje ir tarpląsteliniam skystyje, gali veiksmingai neutralizuoti toksinus, virusus ir bakterijas, aktyvuoti komplementą [125].

Gleivinės paviršiuose **IgA** suteikia pirminę apsaugą nuo įkvėptų ir prarytų patogenų. Aptinkama gleivinėse, pvz., žarnyne, kvėpavimo takuose ir urogenitaliniame trakte, ir apsaugo nuo patogenų kolonizacijos. Taip pat randama seilėse, ašarose ir motinos piene [126]. IgA yra pirmasis humoralinės apsaugos atsakas gleivinės paviršiuose, kur jis neutralizuoja toksinus ir virusus bei blokuoja bakterijų patekimą per žarnyno epitelį [125].

IgM yra didžiausias antikūnas ir dėl didelio dydžio IgM daugiausia yra intravaskulinis ir turi mažesnę afinitetą antigenams. IgM neprasiskverbia pro placentą, kas suteikia pranašumą apsaugant vaisių nuo kraujo grupių nesuderinamumo tarp vaisiaus ir motinos [125].

IgE koncentracija žymiai padidėja sergant alerginėmis ir parazitinėmis ligomis. B ląstelės, kurios išskiria IgE yra randamos kraujotakoje, odoje, plaučiuose ir žarnyne. Alergiją sukelia perteklinė IgE gamyba, kas yra organizmo reakcija į aplinkos veiksnius, tokius kaip žiedadulkės, namų dulkės, erkės, gyvūnų pleiskanos, maisto ir vabzdžių nuodai, sukeliantys astmą, alerginį rinitą, atopinį dermatitą, o blogiausiu atveju – anafilaksinį šoką [127].

IgD veikia kaip ląstelių antigeno receptorius ir gali dalyvauti B ląstelių auginime, palaikyme, aktyvacijoje ir nutildymo procese. Nors tiksli funkcija vis dar neiški, IgD gali būti įtraukti į humoralinį imuninį atsaką, reguliuodami B ląstelių atranką ir homeostazę [128].



5 pav. Antikūnų klasės

1.13 Antikūnų panaudojimas imunoanalizėje

Antikūnai, kurie gali atpažinti specifinius biologinius taikinius, gali būti konjuguojami su organiniais dažais ar kvantiniais taškais ir naudojami imunofluorescencijoje [129]. Tokiu atveju antikūnai sąveikauja su ląstele šeimininke (-angl.: *host cell*) ir išlieka prisijungę prie jos paviršiaus [130]. Imobilizuoto antikūno gebėjimas surišti tikslinį biologinį žymenį priklauso nuo antikūno Fab fragmento prieinamumo (orientacijos paviršiuje) ir likusio biologinio aktyvumo [131].

Antikūnai gali būti konjuguojami su kvantiniais taškais skirtingais metodais, pvz.: tiesioginiu ir netiesioginiu konjugavimu. Tiesioginis konjugavimas (kovalentinė sąveika) vyksta, kai kvantinio taško karboksilo arba amino grupės yra sujungiamos su sulfhidrilo arba amino grupėmis ant antikūno. Kovalentinis antikūnų imobilizavimas ant nanodalelių naudojant savarankiškai surinktus monosluoksnius (SAM, n-anglies atomų alkilo grandines su tam tikromis funkcinėmis grupėmis) yra metodas, kuris neužtikrina į vietą nukreiptų antikūnų imobilizavimo. Nanodalelių modifikacija su SAM atsiranda dėl to, kad jų struktūroje yra tiolio grupė, kuri chemisorbcijos būdu prisijungia prie nanodalelių paviršiaus. Po to įvairios funkcinės grupės, susidaranti paviršiuje (daugiausia karboksilo arba aminių), nukreipiamos į tarpą ir naudojamos kovalentiniam antikūnų imobilizavimui. Grandinės ilgis reguliuoja atstumą nuo antikūno iki paviršiaus ir nanodalelių mobilumą. Labai dažnai 11-merkaptoundekano rūgštis SAM naudojama kovalentiniam antikūnų imobilizavimui po karboksilo grupės aktyvinimo su 1-etil-3-(3-diaminopropil)karbodiimido hidroklorido ir N-hidroksisukcinimido mišiniu (EDC/NHS sujungimo reakcija) [132]. Susidaręs funkciškai aktyvus NHS-esteris sąveikauja su antikūnų amino grupėmis ir susidaro stabili amido jungtis. Tas pats protokolas gali būti taikomas ir kvantiniams taškams, kurių paviršiuje yra karboksilo grupių [133]. Be to, kovalentiniam antikūnų imobilizavimui kvantiniais taškais gali būti naudojami cheminiai jungikliai (glutaraldehidai, N, N'-karbonildiimidazolas) [130]. SAM su silano galvūčių grupėmis, dažniausiai amino silanais, yra naudojami metalo oksido nanodalelių paviršiaus funkcionalizavimui, tolimesniam kovalentiniam antikūnų imobilizavimui [131]. Alkilsilanai su aminais, aldehydais, tioliais arba karboksilo funkcinėmis grupėmis gali būti sėkmingai naudojami kovalentiniam antikūnų imobilizavimui po funkcinės grupės aktyvavimo arba per kryžminį ryšį. Nepaisant atsitiktinės antikūnų imobilizacijos nanodalelių paviršiuje, buvo sukurti gerai veikiantys elektrocheminiai biologiniai jutikliai, pagrįsti šiuo antikūnų imobilizavimo metodu [134]. Kovalentinis antikūnų imobilizavimas naudojant SAM yra gerai žinomas ir gana paprastas, todėl stabilus biologinis sluoksnis yra tinkamas pakartotiniam biožymens aptikimui regeneracijos etapo metu. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra atsitiktinė antikūnų orientacija, kuri gali sumažinti biologinių jutiklių jautrumą [135].

Netiesioginio (nekovalentinio) konjugavimo metu ant kvantinio taško paviršiaus yra streptavidino molekulės, kurios jungiasi su biotinu, esančiu antikūnų paviršiuje. Pasyvi adsorbcija yra paprastas ir tradicinis kvantinio taško ir antikūno konjugavimo būdas. Šiuo atveju gali būti naudojami ir hidrofiliniai ir hidrofobiniai kvantiniai taškai. Hidrofobinių kvantinių taškų atveju adsorbcija vyksta dėl aromatinių aminorūgščių arba nepolinių molekulių susiejimo su kvantinio taško paviršiumi [136]. Lygiai taip pat hidrofilinių dalelių adsorbcija vyksta dėl elektrostatinės sąveikos tarp polinių molekulių ir kvantinio taško paviršiaus. Prieš prisijungdami prie hidrofobinių ar nepolinių dalelių, baltymai gali patirti konformacinius pokyčius, nes baltymai turi išorinius hidrofilinius fragmentus [18]. Tai dažniausiai naudojamas metodas - kai sąveika vyksta tarp teigiamą krūvį turinčių biomolekulių ir neigiamą krūvį turinčių kvantinių taškų. Tiesioginio prisirišimo prie paviršiaus sąveikos metu, tokios kaip tiolio sąveika ir metalo giminingumo koordinavimas, gali būti naudojama norint tiesiogiai susieti kvantinio taško paviršius su biomolekule. Šie ryšiai paprastai turi didesnę ilgį ir mažiau energijos nei kovalentinis ryšys [136]. Didelio afiniškumo sąveika tarp streptavidino ir biotino buvo taip pat plačiai naudojama kvantinių taškų ir biomolekulių konjugacijai. Tai yra stipriausias žinomas nekovalentinis

ryšys. Biotinas turi karboksilo grupes, kurių buvimas leidžia jį prijungti prie skirtingų molekulių, taigi prieš konjugaciją reikia prijungti biotiną prie antikūnų [137] bei padengti kvantinio taško paviršių streptavidinu, kad prie jo būtų galima prijungti biotiniluotą biomolekulę.

Sąveika tarp bakterijų baltymų G arba A ir antikūno Fc srities. Šis palankus antikūnų imobilizacijos ant nanodalelių metodas žymiai pagerina antikūnų ir biožymens surišimo santykį dėl antigeno surišimo vietos prieinamumo ir sumažėjusių sterinių kliūčių [135], [138]. Antikūno imobilizavimas naudojant baltymą G arba A užtikrina teisingą antikūno kryptį. Tačiau norint pakartotinai aptikti biožymenį imunosensoriumi, reikalingas kryžminis antikūno susiejimas su baltymu G, kuris kovalentiškai imobilizuotas paviršiuje [139]. Afininė sąveika tarp biotinilinto antikūno ir paviršiuje imobilizuoto avidino ar streptavidino yra plačiai naudojamas nanodalelių modifikavimo antikūnais metodas, tačiau dažniausiai šis metodas neužtikrina teisingos antikūnų krypties. Pagrindinis šio antikūnų imobilizacijos metodo privalumas yra stipri nekovalentinė biotino ir avidino arba streptavidino sąveika ir šio komplekso atsparumas suirti esant aukštai temperatūrai, ekstremaliam pH ir esant didelei cheminių medžiagų koncentracijai [140], [141]. Be to, avidino arba streptavidino gebėjimas sąveikauti su keturiomis biotino molekulėmis užtikrina didelę antikūnų apkrovą nanodalelių paviršiuje.

Į vietą nukreiptas antikūnų imobilizavimas naudojant šakotus oligosacharidus, kurie yra antikūno Fc fragmente. Oksiduoti imunoglobulino G (IgG) klasės antikūnai gali būti imobilizuoti ant nanodalelių paviršiaus iš anksto modifikuotais aminorais, hidraziniais, hidrazidais ir semikarbazidais [142], [143]. Yra parduodami rinkiniai (Site-ClickTM antikūnų žymėjimo rinkiniai), skirti žymėti antikūnus kvantiniais taškais naudojant modifikuotą antikūno angliavandenių fragmentą, esantį Fc fragmente, skirtingai nei naudojant įprastą amino-tiolio kryžminimo metodą. Nors oksiduojančių ar redukuojančių medžiagų nereikia, konjugato paruošimas yra kelių etapų procesas su keliais išankstinio koncentravimo, modifikavimo (naudojami fermentai) ir atskyrimo etapais. Vienas iš metodo trūkumų yra tas, kad konjugacijos procedūros metu lengva prarasti antikūną. Be to, yra naudojamas ribotas kvantinių taškų kiekis [133].

Paprastos antikūnų adsorbcijos (dėl elektrostatinės, van der Waalso ir hidrofobinės sąveikos, vandenilinio ryšio) metu gaunama atsitiktinė antikūnų orientacija nanodalelių paviršiuje. Tačiau antikūnų orientaciją galima reguliuoti keičiant tirpalo pH, taip kontroliuojant antikūno paviršiaus krūvio pasiskirstymą ir veikiant elektrostatinę sąveiką su neigiamai įkrautomis aukso nanodalelėmis [131]. Sumažinus tirpalo pH nuo 8,5 iki 7,5, antigeno surišimo vietos prieinamumas biožymeniui padidėjo [144]. Adsorbcijos metodas turi trūkumų, tokių kaip maža antikūnų paviršiaus koncentracija, atsitiktinė orientacija, dalinė denatūracija glaudžiai kontaktuojant su metalu ir desorbcija nuo paviršiaus dėl silpnų jungčių. Šis metodas yra naudojamas nanodalelių modifikavimui ir taikomas biologiniams jutikliams kurti dėl savo paprastumo ir nesudėtingos procedūros [131].

1.14 CD44

CD44 antigenas yra ląstelės paviršiaus glikoproteinas, dalyvaujantis ląstelių sąveikoje, adhezijoje ir migracijoje [145]. CD44 yra ląstelės paviršiaus adhezijos receptorius, kuris yra stipriai išreikštas daugelyje vėžio formų ir reguliuoja naviko metastazes, įtraukdamas CD44 į ląstelės paviršių. CD44 sąveika su atitinkamais ekstraląstelinės matricos ligandais skatina metastazių migracijos ir invazijos procesus [146]. Atskirų CD44 izoformų ekspresija yra būtina žmogaus navikų progresavimui [147]. CD44 izoformų ekspresija gali koreliuoti su naviko potipiais ir būti vėžio kamieninių ląstelių žymeniu. CD44 skilimas, išsiskyrimas ir padidėjęs tirpaus CD44 kiekis pacientų serume yra naviko buvimo ir metastazių žymuo sergant gaubtinės žarnos ir skrandžio vėžiu.

1.15 Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija

Per pastarąjį dešimtmetį buvo padaryta didelė pažanga plėtojant įvairių receptorių ir ligandų sąveikos tyrimus. Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija yra vienas iš metodų, kurie padeda įvertinti įvairių molekulių sąveiką ir jos kinetiką. Šis analizės metodas plačiai taikomas ligandų paieškoje bei tiriant šeimininko ir patogeno sąveikas, ląstelių, membranų, nukleorūgščių ir baltymų sąveikas [148], kurios yra stebimos realiu laiku. Šio metodo unikalios charakteristikos lėmė galimą platų pritaikymą mikrobiologijoje, virusologijoje, teranostikoje, farmacijoje ir maisto saugoje [149].

PPR metodo istorija prasidėjo 1902 metais, kai Wood apšvietė poliarizuota šviesa metalinę difrakcijos gardelę ir pirmą kartą pastebėjo anomalinės difrakcijos reiškinį dėl paviršinių plazmoninių bangų sužadavimo [150]. Wood pastebėjo nenormalų tamsių ir šviesių juostų modelį atspindėtoje šviesoje. Fizinę reiškinio interpretaciją inicijavo Rayleigh, o 1968 metais Otto pranešė apie susilpninto visiško atspindžio sujungimo metodą paviršiaus plazmonų sužadavimui. Vėliau 1971 metais Kretschmann pristatė Kretschmann visiško atspindžio jungties konfigūraciją, kuris yra plačiai naudojamas sužadavimo metodas paviršiaus plazmonų rezonanso jutikliuose. 1990 metais Pharmacia Biosensor pristatė pirmąjį PPR Biocore prietaisą, kuris pasižymėjo dideliu pažangumu, jautrumu, tikslumu, patikimumu, atkuriamumu, o PPR tapo „auksiniu“ standartu matuojant realaus laiko biomolekulinę sąveiką [151].

PPR spektroskopija yra optinis metodas, kurio signalas priklauso nuo adsorbuotos medžiagos sluoksnių lūžio rodiklių ant metalo paviršiaus. Šviesos energijos dalis, krintanti ryškiai apibrėžtu kampu gali sąveikauti su delokalizuotais elektronais metalinėje plokštelėje taip sumažindama atspindėtos šviesos intensyvumą. PPR pagrįstas faktu, kad tam tikromis sąlygomis paviršiniai plazmonai ant metalinės plokštelės gali būti sužadunami fotonais, taip fotoną paverčiant paviršiaus plazmonu ir tai priklauso nuo adsorbato lūžio rodiklio. Paviršiaus plazmonai yra paviršiaus elektromagnetinės bangos, sklindančios lygiagrečiai metalo ir dielektriko (stiklo ar vandens) sąsajai. Kadangi banga yra ant metalo ir išorinės terpės (pvz., vandens) ribos, šie svyravimai yra labai jautrūs šios ribos pokyčiams, pavyzdžiui, molekulių adsorbacijai ant metalo paviršiaus [148]. Norint sužadinti PPR būdu, galima naudoti tam tikro bangos ilgio šviesos spindulį. Įeinantis spindulys turi atitikti savo impulsą su plazmono impulsu. P-poliarizuotos šviesos atveju (poliarizacija vyksta lygiagrečiai kritimo plokštumai) tai įmanoma, šviesa praleidžiant per stiklo bloką, kurio viršuje yra išgarintas plonas metalo sluoksnis ir pasiekama rezonanso sąlyga tam tikru bangos ilgiu ir kampu. Tuo tarpu S-poliarizuota šviesa (poliarizacija vyksta statmenai kritimo plokštumai) negali sužadinti paviršiaus plazmonų [151].

Tipiški metalai, palaikantys paviršiaus plazmonus, yra sidabras ir auksas, tačiau buvo naudojami ir kiti metalai, tokie kaip varis, titanas ir chromas. Kretschmann konfigūracijoje metalinė plėvelė išgarinama ant prizmės ir pro metalinę plėvelę prasiskverbia greitai nykstanti banga. Plazmonai sužadunami plonoje metalinėje plėvelėje tarp žemesnės RI terpės (pvz., vandens) ir aukštesnės RI terpės (stiklo). Ši Kretschmann konfigūracija naudojama daugumoje komercinių PPR prietaisų, o pagrindinis veiksnys tampa lūžio rodiklis, esantis netoli metalinės plėvelės, prie kurios ligandų molekulės yra imobilizuojamos ir kreipiamos į analizės molekules judrioje fazėje. Jei įvyksta prisijungimas prie imobilizuoto ligando, lūžio rodiklis pasikeičia, todėl pasikeičia PPR kampas. Tai gali būti stebima realiu laiku, sukuriant sensorgramą. PPR signalo pokyčio dydis yra tiesiogiai proporcingas masei, kurią užfiksuoja specifinės imobilizuotos ligandų molekulės [151].

Devintajame dešimtmetyje PPR ir su juo susiję metodai buvo taikomi tiriant biologinę ir cheminę sąveiką. Dabar PPR biologiniai jutikliai tapo nusistovėjusiu molekulių sąveikų matavimo metodu. Galima tirti ne tik baltymus, tačiau ir DNR-DNR, DNR-baltymų, lipidų-baltymų ir sudėtingų

biomolekulių sąveiką. Biomolekulinės sąveikos analizė gali būti atlikta keliais būdais. Vienas iš būdų yra PPR pagrįstas biologinis jutiklis, kuris gali būti naudojamas įvairiems kokybiniams ir kiekybiniais tikslams. Kokybinis pritaikymas apima mažų molekulių ir vaistų atranką, molekulių surinkimą, epitopų kartografavimą ir specifiškumo analizę. Kaip kiekybinis įrankis, PPR biologiniai jutikliai gali būti naudojami reakcijos kinetikai ir giminingumo konstantoms nustatyti, molekulinės sąveikos pusiausvyros konstantoms rasti bei funkciškai aktyviai koncentracijai, termodinamikai, stochiometrijai ir ligandų sąveikos receptorių mechanizmams įvertinti [148].

PPR metodas yra pritaikomas daugybėje įvairių sričių dėl didelio jautrumo, našumo ir realaus laiko nustatymo charakteristikų. Šis metodas pasižymi plačiu molekulinio jutimo, kuris yra pritaikomas sveikatos priežiūros tyrimuose bei moksle. Ši daug žadanti technologija nuolat tobulinama siekiant pagerinti bendrą paviršiaus plazmonų rezonanso našumą ir ateityje praplėsti metodo pritaikymo sritis [130]. Apibendrinant galima teigti, kad artimiausiu metu PPR metodas pasirodys kaip efektyvi, galinga ir alternatyvi kasdienės klinikinės analizės priemonė, atverianti naujus horizontus būsimai personalizuotos medicinos raidai.

1.16 SARS-CoV-2

Sunkaus ūminio kvėpavimo sindromo koronaviruso 2 (SARS-CoV-2) virusas vis dar yra pasaulinė problema su kuria kovoja dauguma šalių [152]. Nors didžiausias dėmesys buvo skiriamas SARS-CoV-2 spyglio baltymui, neseniai buvo pradėti intensyvūs nukleokapsidės baltymo (SCoV2-N) ir specifinių polikloninių antikūnų (anti-SCoV2) tyrimai. Nukleokapsidės baltymo tyrimai svarbūs dėl jų kritinės įtakos koronaviruso genomo RNR pakavimui ir viruso replikacijai [153]. Imunoglobulino G (IgG) antikūnai prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymą yra aptinkami užsikrėtusiems pacientams. Nustatyta, kad didesnis šių antikūnų titras yra klinikinės ligos eigos prognostinis veiksnys [154]. Todėl reikia daugiau informacijos apie tokią antikūnų sąveiką su SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymu. Pandemijos metu buvo sukurti įvairūs SARS-CoV-2 nustatymo ir COVID-19 infekcijos diagnozavimo metodai, įskaitant įvairius serologinius tyrimus, skirtus antikūnų ir antigenų sąveikai užfiksuoti [155]. Paprastai atlikus testą, aptinkami antikūnai prieš imunogeniškiausią SARS-CoV-2 spyglio baltymą ir (arba) nukleokapsidės baltymą [156], [157]. Be to, buvo nustatyta, kad nukleokapsidės baltymo antikūnai yra jautresni ankstyvos infekcijos diagnozei nei spyglio baltymui būdingi antikūnai [158]. Dėl šios priežasties tyrimai, padedantys suprasti, kaip SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymai sąveikauja su specifiniais anti-SCoV2-N antikūnais, yra labai laukiami pramonėje, kuri gamina virusinius baltymus, antigenų-antikūnų testus ir vakcinas.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Reagentai ir medžiagos

11-Merkaptoundekanoinė rūgštis (11-MUR), ($C_{11}H_{22}O_2S$), („SigmaAldrich“, Vokietija);

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimido hidrochloridas (EDC), („SigmaAldrich“, Japonija);

3,3',5,5'-tetrametilbenzidino tirpalas (TMB), („Thermo Fisher Scientific“, JAV);

Antrinis triušių antikūnas prieš pelės IgG antikūnus („Thermo Fisher Scientific“, JAV);

Askorbo rūgštis ($C_6H_8O_6$), („SigmaAldrich“, Vokietija);

Bis(sulfosukcinimidilo)suberatas (BS^3), („Thermo Fisher Scientific“, JAV);

Boro rūgštis (H_3BO_3), („SigmaAldrich“, Vokietija);

Cetiltrimetilamonio bromidas (CTAB), („Carl Roth“, Vokietija);

Druskos rūgštis (HCl), („Carl Roth“, Vokietija);

Etanolaminas (C_2H_7NO), („Merck“, Vokietija);

Fosfatinio buferinio (PBS) tirpalo tabletės, pH 7,4 („Carl Roth“, Vokietija);

Galvijų serumo albuminas (BSA), („Carl Roth“, Vokietija);

Glicinas (Gly, $C_2H_5NO_2$), („AppliChem“, Vokietija);

Imersinė alyva (lūžio rodiklis $n = 1,518$), („Cargille Laboratories“, JAV);

Kvantiniai taškai - Qdot™ 605 ITK™ amino (PEG) (KT-NH₂) ir Qdot™ 655 ITK™ karboksilo kvantiniai taškai (KT-COOH), („Thermo Fisher Scientific“, JAV);

Magnio chloridas ($MgCl_2$), („Carl Roth“, Vokietija);

Metanolis (CH_3OH), („Carl Roth“, Vokietija);

Monokloninis pelės IgG antikūnai prieš CD44 baltymo (anti-CD44), („R&D Systems“, JK);

Natrio acetatas (CH_3COONa), („SigmaAldrich“, Vokietija);

Natrio dodecilsulfatas (SDS), („Carl Roth“, Vokietija);

Natrio dodecilsulfatas (SDS, $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$), („SigmaAldrich“, Vokietija);

Natrio hidroksidas (NaOH), („Scharlau Chemie“, Ispanija);

N-hidroksisukcinimidas (NHS), („Carl Roth“, Vokietija);

Pelės monokloninis antikūnas prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymą („Baltymas“, Lietuva);

Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas iš E. coli (hGH), („R&D Systems“, JK);

Rekombinantinis žmogaus CD44 baltymas (be nešiklio, His žymuo C-Termus), („R&D Systems“, JK);
SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymas išskirtas iš *S. cerevisiae* („Baltymas“, Lietuva);
Sidabro nitratas (AgNO_3), („SigmaAldrich“, Vokietija);
Sieros rūgštis (H_2SO_4), („Carl Roth“, Vokietija);
Vandenilio peroksidas (H_2O_2), („Carl Roth“, Vokietija);
Vandenilio tetrachloraurato trihidratas ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), („Sigma-Aldrich“, Vokietija);
Mėginiams ruošti buvo naudojamas itin aukštos kokybės vanduo.

2.1.1. Etaloninių tirpalų ruošimas

Boro rūgšties buferinis tirpalas pH 8 buvo gaminamas pasveriant atitinkamą kiekį boro rūgšties ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu. Buferinio tirpalo pH privedimui buvo naudojamas $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH tirpalas. Galiausiai tirpalas buvo perpilamas į matavimo kolbą ir praskiedžiamas iki žymės. Pagaminti buferiai buvo laikomi šaldytuve.

$0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH tirpalas atsveriant reikiamą kiekį NaOH, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

$0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, 1 mmol L^{-1} bei $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ CTAB tirpalai buvo gaminami pasveriant atitinkamą kiekį cetiltrimetilamonio bromido (CTAB) ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu iki žymės.

H_2O tirpalas pH 10 buvo gaminamas įsipilant atitinkamą kiekį distiliuoto vandens ir pH privedimui buvo naudojamas $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH tirpalas. Galiausiai tirpalas buvo perpilamas į matavimo kolbą ir praskiedžiamas iki žymės.

$0,4 \text{ mol L}^{-1}$ EDC tirpalas buvo gaminamas atsveriant reikiamą kiekį EDC, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės. Tirpalas buvo laikomas $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

1 mol L^{-1} etanolamino tirpalas buvo gaminamas atsveriant reikiamą kiekį etanolamino, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės. Tirpalas buvo laikomas $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

10 mmol L^{-1} acetatinis buferis buvo gaminamas atsveriant reikiamą kiekį natrio acetato, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

Regeneravimo tirpalas buvo gaminamas atsveriant reikiamą kiekį NaOH ir SDS, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

$0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NHS tirpalas buvo gaminamas atsveriant reikiamą kiekį NHS, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės. Tirpalas buvo laikomas $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

5 mmol L^{-1} HAuCl_4 tirpalas gaminamas atsveriant reikiamą kiekį $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

10 mmol L⁻¹ NaBH₄ tirpalas gaminamas atsveriant reikiamą kiekį NaBH₄, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

5 mmol L⁻¹ AgNO₃ tirpalas gaminamas atsveriant reikiamą kiekį AgNO₃, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

0,1 mol L⁻¹ askorbo rūgšties tirpalas gaminamas atsveriant reikiamą kiekį askorbo rūgšties, subėrus į matavimo kolbą ir praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki žymės.

1 mmol L⁻¹ MUR tirpalas pH 10 gaminamas pasveriant atitinkamą kiekį 11-MUR ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu. Tirpalo pH privedimui buvo naudojamas 0,1 mol L⁻¹ NaOH tirpalas. Galiausiai tirpalas buvo perpilamas į matavimo kolbą ir praskiedžiamas iki žymės.

10 mmol L⁻¹ glicino tirpalas pH 3,0 gaminamas pasveriant atitinkamą kiekį glicino ir praskiedžiant distiliuotu vandeniu. Tirpalo pH privedimui buvo naudojamas 0,1 mol L⁻¹ NaOH tirpalas. Galiausiai tirpalas buvo perpilamas į matavimo kolbą ir praskiedžiamas iki žymės.

2.1.2 Prietaisai ir priemonės

Analizinės svarstyklės KERN ABJ220 – 4NM („Kern & Sohn GmbH“, Vokietija);
Auksu dengti PPR lustai („AUTOLAB“, Olandija);
Automatinės pipetės („Eppendorf“, Vokietija);
Centrifuga „Megafuge™ 8 Small Benchtop“ („Thermo Fisher Scientific“, Vokietija);
Inkubatorius „Heratherm IGS60“ („Thermo Fisher Scientific“, Vokietija);
Magnetinė maišyklė „MyPlate“ („IKA“, Vokietija);
Maišyklė „Tube Revolver Rotator“ („Thermo Fisher Scientific“, Kinija);
Mikroplokštelių skaitytuvas „Infinite 200 PRO“ („Tecan“, Šveicarija);
pH matuoklis „FiveEasy F20“ („Mettler-Toledo“, Kinija);
PPR spektroskopijos prietaisas „SPR Twingle“ („Metrohm Autolab“, Olandija);
Skenuojantis elektroninis mikroskopas SU-70 („Hitachi“, Japonija) (SEM);
Spektrofotometras „Lambda 25 UV/Vis spectrometer“ („PerkinElmer“, JAV);
Termostatas „Bio TDB-100“ („Biosan SIA“, Latvija);
Vortex „Mini Vortex Mixer“ („ISOLAB“, Kinija);
Zetasizer Nano ZS 3600 instrumentas („Malvern“, JK).

2.1.3. Programinė įranga

Baigiamajo darbo matavimams buvo naudojama „Autolab Data Acquisition“ programinė įranga. Rezultatams apdoroti buvo naudojamos „Microsoft Word 2023“, „Microsoft Excell 2023“ bei „Origin 2023“ programos.

2.2. Metodai

2.2.1. Kvantinių taškų ir anti-CD44 konjugatų paruošimas

Prieš modifikavimą kvantiniai taškai, modifikuoti polietilenglikoliu derivatizuotu su amino grupėmis (KT-NH₂), buvo centrifuguojami 2000×g 3 min. norint išvengti dalelių agregatų. Tada nupilamas tirpalas ir užpilama 10 mmol L⁻¹ fosfatinio PBS tirpalo, pH 7,4. KT-NH₂ esantys PBS pH 7,4 tirpale buvo sumaišyti „LoBind“ mikrocentrifugavimo mėgintuvėliuose („Eppendorf“, Vokietija) su BS³ reagentu moliniu santykiu 1:1000. Tirpalas buvo maišomas maišyklėje 30 min kambario temperatūroje. Norint pašalinti BS³ perteklių buvo naudojami 100 K Nanosep filtravimo mėgintuvėliai („Pall“, Puerto Rikas). Kvantiniai taškai buvo plaunami tris kartus su 500 μL PBS, pH 7,4. Gautas tirpalas buvo sumaišytas su anti-CD44 antikūnais moliniu santykiu 1:5. Paruoštas tirpalas buvo lėtai maišomas 2 valandas kambario temperatūroje. Toliau įpilamas 100 μL 1 mol L⁻¹ glicino tirpalo ir dar pamaišoma 15 min. KT-anti-CD44 konjugatai buvo gryninami naudojant 300 K Nanosep išcentrinį filtrą („Pall“, Puerto Rico). Filtravimas buvo atliktas mažiausiai 3 kartus naudojant PBS, pH 7,4. Surinktas filtratas naudojamas įvertinti antikūnų konjugacijos efektyvumą. Išgrynintų konjugatų tirpalai laikomi 4 °C temperatūroje.

Naudojantis mikroplokštelių skaitytuvą buvo matuojama KT-NH₂ sugertis esant 405 nm bangos ilgiui bei sudaryta KT-NH₂ kalibracinė kreivė 5 – 80 nmol L⁻¹ intervale. Naudojantis didelės raiškos lauko emisijos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu SU-70 („Hitachi“, Japonija) (SEM) buvo nustatyta KT forma bei dydis. Anti-CD44, KT bei funkcionalizuotų KT hidrodinaminiai skersmenys buvo įvertinti naudojant Zetasizer Nano ZS 3600 instrumentą („Malvern“, JK). Hidrodinaminis skersmuo buvo matuojamas PBS tirpale.

2.2.2. PPR jutiklio lusto plovimas

PPR jutiklio lustas, kuris yra padengtas plonu aukso sluoksniu, yra kruopščiai nuvalomas prieš formuojant MUR SAM. Lustas buvo laikomas 5 min. 60 °C piranijos tirpale (3:1 H₂SO₄ ir 30 % H₂O₂) ir toliau plaunamas etanoliu ir dejonizuotu vandeniu.

2.2.3. SAM paruošimas PPR jutiklio lusto paviršiuje

Išvalytas lustas dedamas 24 valandoms į indą su 1 mmol L⁻¹ MUR tirpalu metanolyje. Modifikuotas lustas buvo papildomai nuplautas etanoliumi bei dejonizuotu vandeniu ir džiovinamas N₂ dujomis.

2.2.4. MUR monosluoksniu modifikuoto PPR jutiklio lusto paruošimas modifikavimui

Ant laikiklyje esančios pusiau cilindrinės prizmės užlašinamas lašas imersinės alyvos ir atsargiai, auksiniu paviršiumi į viršų, uždedamas paruoštas PPR jutiklio lustas su modifikuotu MUR (Au/MUR). Tuomet patikrinama, ar tarp jutiklio lusto ir prietaiso prizmės nėra susidariusių oro tarpų. Jei tokių nerandama, laikiklis įstatomas į PPR analizatorių, uždedama ir pritvirtinama PPR kiuvetė. PPR instrumentas leidžia vienu metu atlikti matavimus 2 atskiruose kanaluose (paviršiaus plotas viename kanale – 7,9 mm²).

2.2.5. Paviršiaus stabilizavimas/rehidracija prieš CD44 biožymens imobilizaciją

Tam buvo naudojamas 10 mmol L⁻¹ acetatinis buferis, pH 4,5 bei regeneravimo tirpalas (50 mmol L⁻¹ NaOH ir 0,5 % SDS vandeninis tirpalas). Šie tirpalai paimami paeiliui automatiškai. Stabilizavimas vykdomas 2 min. intervalais 45 min, kol bazinė linija stabilizuojasi.

2.2.6. CD44 biožymens imobilizacija MUR modifikuoto PPR jutiklio paviršiuje

Imobilizacija buvo atlikta abiejuose PPR kiuvetės kanaluose. Pirma, registruojama bazinė linija 10 mmol L⁻¹ acetatiniame buferyje, pH 4,5 įšvirksčiant į kanalus buferio ir maišoma 200 s. Tuomet į 384 mikrošulinėlių plokštelę yra įpilami tirpalai reikalingi sekantiems etapams, kuriuos PPR analizatoriaus adatos automatiškai paims ir perkels po 50 μL į PPR kiuvetę. Į pirmus du šulinėlius įpilama šviežiai paruoštą 0,4 mol L⁻¹ EDC ir 0,1 mol L⁻¹ NHS tirpalų. Jie automatiškai sumaišomi tarpusavyje trečiame šulinėlyje tūrio santykiu 1:1 ir yra įpilami į PPR kiuvetę. Šviežiai paruoštą EDC/NHS tirpalų mišinį 600 s vykdoma MUR SAM karboksilo grupių aktyvavimas, kurio metu susidaro sukcinimido esteriai. Išplovus PPR kiuvetę, 600 nmol L⁻¹ CD44 tirpalas buvo įleistas į ketvirtą šulinėlį. 1200 s atliekama kovalentinė imobilizacija. Imobilizavimo reakcijos metu pirminės CD44 amino grupės reaguoja su SAM sukcinimido esterinėmis funkcinėmis grupėmis, kurios metu susidaro amidinė jungtis (Au/MUR-CD44). Neimobilizuotos CD44 molekulės buvo pašalintos iš abiejų kanalų 10 mmol L⁻¹ acetatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5. Likusių aktyvuotų karboksilo grupių deaktyvavimas buvo atliktas inkubuojant 1 mol L⁻¹ etanolamino tirpale 600 s. Po imobilizacijos proceso CD44

biožymuo buvo imobilizuotas ant PPR jutiklio paviršiaus (Au/CD44) per amidinę jungtį ir paruoštas tolimesniems matavimams.

2.2.7. Stabilizavimas

Stabilizavimas vykdomas naudojant 10 mmol L^{-1} PBS buferinį tirpalą pH 7,4 bei regeneracinį tirpalą. Stabilizavimas atliekamas 2 min. intervalais 1800 s ir yra stebimas PPR signalo kitimas. Stabilizavimo bei rehidracijos žingsniai buvo kartojami kol gaunama stabili bazinė linija.

2.2.8. Imobilizuotų KT-anti-CD44 sąveika su Au/CD44

PPR technika buvo pritaikyta specifiniams anti-CD44 antikūnams apibūdinti, regeneraciniam tirpalui parinkti, KT nespecifinei sąjungai įvertinti bei KT-NH₂ ir antikūnų konjugacijos įvertinimui.

Pirma, stabili pradinė linija buvo pasiekta naudojant 10 mmol L^{-1} fosfatinio PBS tirpalo, pH 7,4 200 s inkubuojant Au/CD44 PBS tirpale. Pirmajame PPR kiuvetės kanale 900 s vykdoma KT-anti-CD44 ir CD44, paruošto naudojant 10 mmol L^{-1} PBS buferinį tirpalą pH 7,4, gimininga sąveika. Antrasis kanalas naudojamas kaip palyginamasis kanalas ir į jį įpilamas 10 mmol L^{-1} PBS buferinis tirpalas pH 7,4, kuris naudojamas palyginimui. Nesudariusios giminingos sąveikos su KT-anti-CD44 CD44 molekulės yra nuplaunamos inkubuojant PBS tirpale 200 s. Norint suardyti giminingą sąveiką, paviršius yra regeneruojamas naudojant regeneracinį tirpalą. PPR jutiklio lusto paviršiaus regeneravimas (iki Au/CD44) buvo atliktas naudojant 10 mmol L^{-1} acetatinį tirpalą, pH 4,5 bei regeneracinį tirpalą (50 mmol L^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS) 45 min 2 min intervalais, kol bazinė linija stabilizuojasi. Tolimesniuose tyrimuose pradinė linija buvo registruota naudojant PBS. Analitinis signalas buvo įrašytas kaip skirtumas tarp matavimo ir palyginamojo kanalų. Kontroliniai eksperimentai su skirtingomis anti-CD44 koncentracijomis arba KT buvo atlikti tomis pačiomis sąlygomis. Visi skiedimai buvo atlikti naudojant PBS.

2.2.9 Aukso nanostrypelių (AuNS) sintezė

Sintezė buvo atlikta trimis etapais 35 °C temperatūroje. Pirmasis etapas buvo sėklų tirpalo paruošimas. Pirmiausia į 5 mL $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ CTAB tirpalo buvo įpilta 1 mL 5 mmol L^{-1} HAuCl₄ tirpalo. Laikoma 5 min inkubatoriuje. Po kelių minučių įpilta 800 μL šviežiai paruošto šalto 10 mmol L^{-1} NaBH₄ tirpalo ir tada laikoma 1 val. Antrame etape augimo tirpalas buvo paruoštas: į CTAB (5 mL, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) tirpalą pridendant HAuCl₄ (5 mL, 1 mmol L^{-1}) ir AgNO₃ (600 μL, 5 mmol L^{-1}) tirpalus. Lengvai pamaišant buvo įlašinamas askorbo rūgšties (55 μL, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) tirpalas. Paskutiniame etape 12 μL sėklų tirpalo buvo pilama į auginimo tirpalą, kelis kartus pamaišoma apverčiant ranka ir paliekama 24 val. Pabaigoje, plaunama 2 kartus $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ CTAB tirpalu ir paliekama.

2.2.10 AuNS ir antrinių IgG antikūnų konjugacija

Modifikavimui paimami 2 mL AuNS tirpalo ir centrifuguojama $1000\times g$ greičiu 10 min. Tada mėginiai plaunami 1 mL vandens, kurio pH 10,0 ir vėl centrifuguojami $10000\times g$ greičiu 10 min. Galiausiai mėginiai užpilami 1 mL 1 mmol L^{-1} CTAB tirpalu. Ant paruoštų AuNS pilamas 0,5 mL 1 mmol L^{-1} MUR tirpalas ir paliekama 4 val. šildant $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po inkubacinio laikotarpio mėginiai centrifuguojami $10000\times g$ greičiu 10 min. ir po to plaunami 2 mL vandens, kurio pH 10,0 ir vėl centrifuguojami $10000\times g$ greičiu 10 min. Ant viršaus pilama iki 0,2 mL boratinio buferiu pH 8,0. Gautas AuNS tirpalas veikiami 4 μL EDC/NHS tirpalais, santykiu 4:1. Laikoma 10 min. kambario temperatūroje. Centrifuguojama 5 min $12000\times g$ greičiu. Užpilama 98 μL boratinio buferio pH 8,0. Užpilama 2 μL $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ antrinių antikūnų tirpalo. Palaikoma 1 val. ir po to prieš naudojama laikoma šaldytuve.

2.2.11 Paviršiaus stabilizavimas/rehidracija prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymo imobilizaciją

Tam buvo naudojamas 10 mmol L^{-1} acetatinis buferis, pH 4,5 bei regeneracinis tirpalas (25 mmol L^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS vandeninis tirpalas). Šie tirpalai paimami paeiliui automatiškai. Stabilizavimas vykdomas 2 min. intervalais 45 min, kol bazinė linija stabilizuojasi.

2.2.12 N baltymo imobilizacija MUR modifikuoto PPR jutiklio paviršiuje

Imobilizacija buvo atlikta abiejuose PPR kiuvetės kanaluose. Pirma, registruojama bazinė linija 10 mmol L^{-1} acetatiniame buferyje, pH 4,5 įsvirkščiant į kanalus buferio ir maišant 200 s. Tuomet į 384 mikrošulinėlių plokštelę yra įpilami tirpalai reikalingi sekantiems etapams, kuriuos PPR analizatoriaus adatos automatiškai paims ir perkels po 50 μl į PPR kiuvetę. Į pirmus du šulinėlius įpilami šviežiai paruošti $0,4\text{ mol L}^{-1}$ EDC ir $0,1\text{ mol L}^{-1}$ NHS tirpalai. Jie automatiškai sumaišomi tarpusavyje trečiame šulinėlyje tūrio santykiu 1:1 ir yra įpilami į PPR kiuvetę. Šviežiai paruoštų EDC/NHS tirpalų mišiniu 600 s vykdoma 11-MUR SAM karboksilo grupių aktyvavimas, kurio metu susidaro sukcinimido esteriai. Išplovus PPR kiuvetę, 500 nmol L^{-1} N baltymo tirpalas 10 mmol L^{-1} acetatiniame buferyje pH 5,3 buvo įleistas, paimant iš ketvirto šulinėlio. 1200 s atliekama kovalentinė imobilizacija. Neimobilizuotos N baltymo molekulės buvo pašalintos iš abiejų kanalų 10 mmol L^{-1} acetatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5. Likusių aktyvuotų karboksilo grupių deaktivavimas buvo atliktas inkubuojant 1 mol L^{-1} etanolamino tirpale 600 s.

2.2.13 Imobilizuoto Au/N baltymo sąveika su antikūnais

Pirma, stabili pradinė linija buvo pasiekta naudojant 10 mmol L⁻¹ fosfatinio PBS tirpalo, pH 7,4 200 s inkubuojant Au/N baltymo PBS tirpale. Pirmajame PPR kiuvetės kanale 900 s vykdoma N baltymo ir 5 nmol L⁻¹ monokloninių antikūnų prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymą (Anti-N), paruoštų naudojant 10 mmol L⁻¹ PBS buferinį tirpalą pH 7,4, gimininga sąveika. Antrasis kanalas naudojamas kaip palyginamasis kanalas ir į jį įpilamas 10 mmol L⁻¹ PBS buferinis tirpalas pH 7,4, kuris naudojamas palyginimui. Tokiu būdu ant paviršiaus formuojasi specifinių antikūnų ir imobilizuoto baltymo kompleksas (Au/N/Anti-N).

2.2.14 AuNS ir antrinių IgG antikūnų konjugatų sąveika su Au/N/Anti-N

Pirma, stabili pradinė linija buvo pasiekta naudojant 10 mmol L⁻¹ fosfatinio PBS tirpalą, pH 7,4 200 s inkubuojant Au/N baltymo PBS tirpale. Pirmajame PPR kiuvetės kanale 900 s vykdoma Au/N/Anti-N bei AuNS konjugatų, paruoštų naudojant 10 mmol L⁻¹ PBS buferinį tirpalą pH 7,4, gimininga sąveika. Antrasis kanalas naudojamas kaip palyginamasis kanalas ir į jį įpilamas 10 mmol L⁻¹ PBS buferinis tirpalas pH 7,4, kuris naudojamas palyginimui. Nesudariusios giminingos sąveikos molekulės yra nuplaunamos inkubuojant PBS tirpale 200 s. Norint suardyti giminingą sąveiką, paviršius yra regeneruojamas naudojant regeneracinį tirpalą. PPR jutiklio lusto paviršiaus regeneravimas buvo atliktas naudojant 10 mmol L⁻¹ glicino tirpalą, pH 3,0.

2.2.15. Skaičiavimai

Lūžio rodiklio pokytis, kurį sukelia molekulių prisijungimas prie PPR jutiklio lusto paviršiaus, lemia PPR kampo poslinkį. Paviršiaus koncentracija įvertinama iš imobilizavimo metu registruotos sensogramos pagal prielaidą, kad PPR 120 m° kampo poslinkis, prilygsta apie 1 ng/mm² paviršiaus masės koncentracijos pokyčiui. CD44 bei N baltymo paviršiaus masės koncentracija buvo apskaičiuota remiantis šia tiesine priklausomybe.

PPR atsakas į KT-anti-CD44 konjugatų sąveiką su imobilizuotais CD44 bei buvo apskaičiuotas kaip didžiausias signalo stiprumas ant Au/CD44/KT-anti-CD44 paviršiaus pastovios būsenos sąlygomis [159]. Atsakas buvo apskaičiuotas pritaikant KT-anti-CD44 asociacijos fazės duomenis pagal hiperbolinę funkciją:

$$y = \frac{ax}{b + x}$$

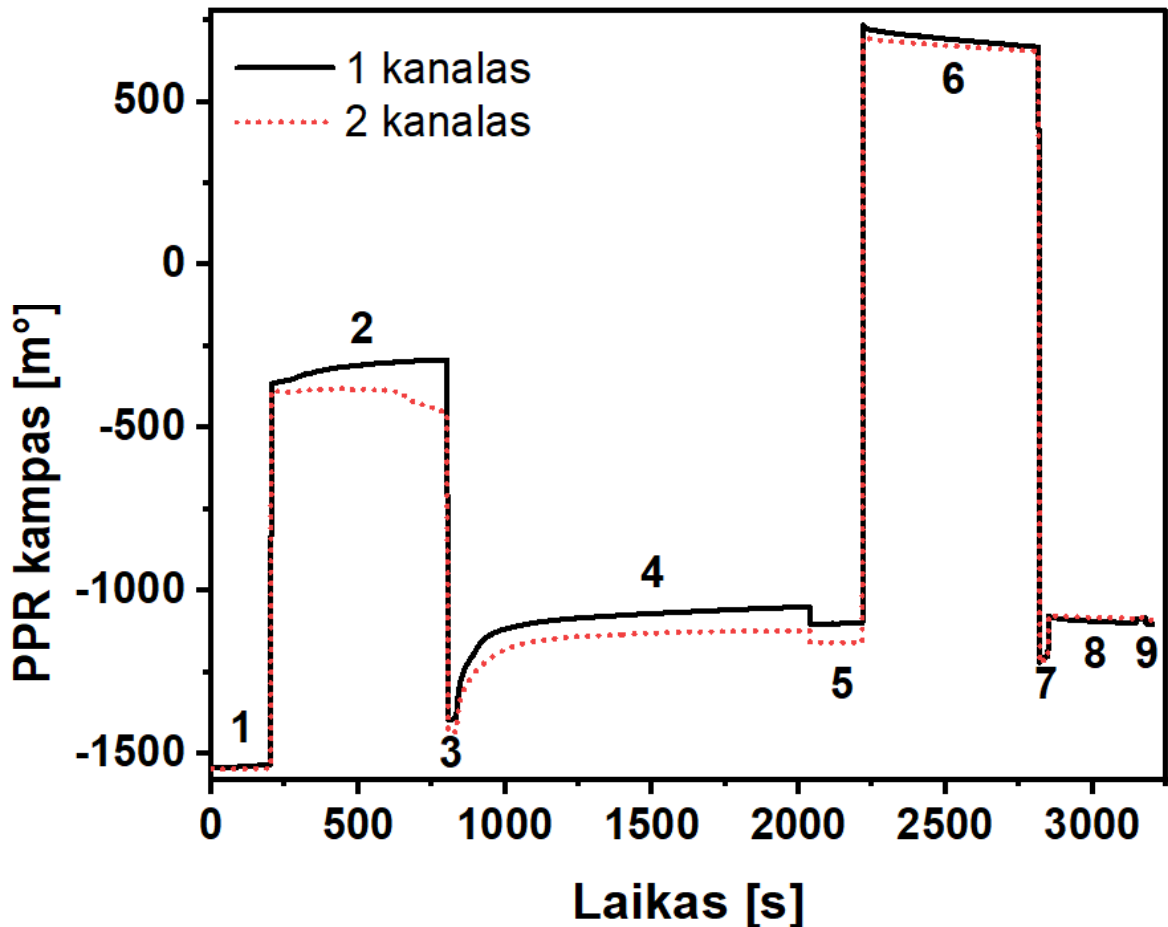
kur parametras a – pusiausvyros kampas [m°], t.y. maksimalus analizinis signalas nusistovėjus pusiausvyrai tarp asociacijos ir disociacijos. Paklaidos buvo apskaičiuotos kaip standartinis nuokrypis 3–5 nepriklausomų matavimų.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Baltymo imobilizavimas yra vienas svarbiausių žingsnių, nes imobilizavimo metodo pasirinkimas lemia antikūno – antigeno sąveiką. Tai yra dėl atsitiktinės imobilizuotų antikūnų orientacijos ant paviršiaus, taip pat jų koncentracija lemia PPR jutiklio jautrumą. Tam, kad būtų galima atlikti kovalentinį imobilizavimą, reikia PPR jutiklio lusto auksinį paviršių modifikuoti MUR SAM. Baltymų sujungimas per alkantiolius aukso paviršiuje puikiai tinka PPR matavimams atlikti dėl mažos nesavitosios sąveikos su baltymais ir kitomis medžiagomis, kas yra itin svarbu dirbant su tikrais mėginiais [160]. Aukso paviršiuje suformuotos SAM suteikia platų galimų funkcinių grupių spektrą, bet taip pat ir kovalentinio prisijungimo galimybę įvairioms molekulėms [161], [162]. Be to, alkantioliai yra termiškai stabilūs, gali būti naudojami plačiame pH diapazone, ir jų SAM yra lengvai suformuojamas ant aukso paviršiaus chemisorbcijos metu [163]. Tada MUR karboksilo grupės buvo aktyvuotos EDC/NHS vandeniniu mišiniu [164]. EDC ir NHS tirpalai aktyvuoja karboksilo funkcines grupes ir imobilizavimas vyksta pagal karboimidinę-sukcinimidinę imobilizacijos metodiką. Dėl antikūnų nesimetrinės struktūros jie paviršiuje gali būti imobilizuoti nekryptingai ir dalis epitopų gali būti neprieinami analitei. Ši imobilizacija yra paprasta ir plačiai taikoma, nes leidžia lengvai ir nemodifikuojant antikūnų prijungti juos prie paviršiaus. Šios reakcijos metu susidaro reaktyvūs N-hidroksisukcinimido esteriai, kurie reaguoja su baltymų pirminėmis amino funkcinėmis grupėmis susidarant amidiniui ryšiui. Po imobilizavimo ant paviršiaus lieka N-hidroksisukcinimido esterinių grupių, kurios nesureaguoja. Šios grupės yra veikiamos etanolamino tirpalu, kad prie jų neprisijungtų kiti baltymai.

3.1 CD44 imobilizavimas ant MUR SAM paviršiaus

6 paveiksle pavaizduota sensograma, kuri gauta CD44 kovalentinio imobilizavimo ant MUR SAM paviršiaus metu abejuose kanaluose. Procesas pradedamas į PPR kiuvetę pritvirtintą virš Au/MUR įpilant acetatinio buferio, pH 4,5 (6 pav. 1). Kai bazinė linija stabilizuojasi, pilami EDC/NHS tirpalai, kurie aktyvuoja MUR (6 pav. 2). Aktyvacijos metu susidaro N-hidroksisukcinimido esteriai, kurie reaguoja su CD44 pirminėmis amino grupėmis ir susidaro kovalentinė jungtis. Tokiu būdu CD44 yra prijungiamas prie PPR jutiklio paviršiaus (6 pav. 4). CD44 imobilizacijos metu stebimas PPR kampo kitimas laike. Praėjus imobilizacijai lieka aktyvių karboksilinių grupių, kurios neprisijungė imobilizuojamos molekulės, todėl yra naudojamas etanolaminamo tirpalas. Jis neleidžia analitei prisijungti prie likusių aktyvių paviršiaus grupių (6 pav. 6). Po dezaktyvacijos etanolamino perteklius išplaunamas iš PPR kiuvetės ją plaunant acetatiniu buferiu, pH 4,5 (6 pav. 7). Iš grafiko matosi, kad PPR signalas padidėjo po CD44 injekcijos ir tolesnio inkubavimo metu. Stabilus PPR kampas, kuris signalizuoja apie pasiektą prisotinimą, buvo užregistruotas maždaug po 900 s. CD44 imobilizacijos PPR kampo pokytis yra lygus $265 \pm 9 \text{ m}^\circ$, kas atitinka $2,17 \pm 0,07 \text{ ng/mm}^2$ paviršinę imobilizuoto CD44 koncentraciją.



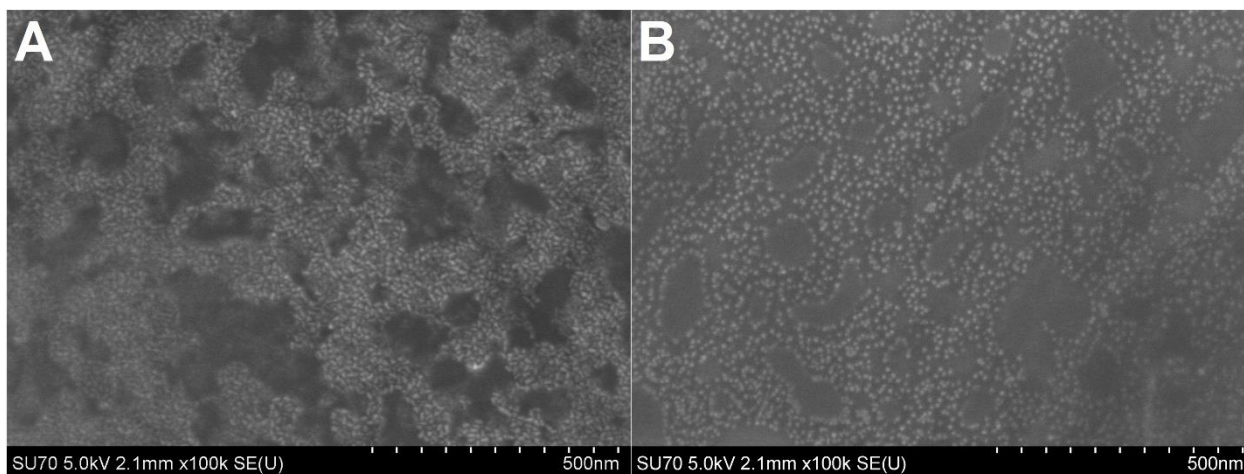
6 pav. CD44 imobilizavimo metu registruota MUR modifikuota PPR sensograma abejuose kanaluose. 1, 3, 5, 7 – bazinė linija, acetatinio buferio paėmimas, pH 4,5; 2 – MUR karboksilo grupių aktyvavimas su EDC/NHS mišiniu; 4 – CD44 imobilizavimas; 6 – likusių aktyvių karboksilo grupių deaktyvavimas 1 mol L⁻¹ etanolamino tirpalu; 8 - regeneracinio buferio paėmimas (50 mmol L⁻¹ NaOH ir 0,5 % SDS); 9 – PBS buferio paėmimas. CD44 koncentracijai apskaičiuoti buvo imtas PPR kampo pokytis kaip skirtumas tarp analitinių signalų CD44 imobilizacijos pradžioje (4) ir plovimo etapo pabaigoje (5)

3.2 KT pasirinkimas ir įvertinimas

Norint atlikti tolesnę kovalentinę konjugaciją su specifiniais antikūnais buvo pasirinkti dvejų tipų KT su karboksilo grupėmis (KT-COOH) bei su amino grupėmis (KT-NH₂). KT-NH₂ yra modifikuoti polietilenglikoliu derivatizuotu su amino grupėmis sluoksniu. Ši modifikacija suteikia galimybę kovalentiškai imobilizuoti biomolekules bei sumažina nespecifinę sąveiką ant modifikuoto paviršiaus [18].

Pasirinkti KT buvo ištirti naudojant skenuojančią elektroninę mikroskopiją (SEM) (7 pav.). Kvantiniai taškai su amino grupėmis buvo 8,96 ± 0,85 nm skersmens, sferinės formos (7B pav.), o KT su karboksilo grupėmis buvo labiau sferoidiniai (7A pav.). Didesnis vaizdo priartinimas SEM bei

aukštos įtampos pritaikymas buvo apsunkintas dėl KT organinės paviršinės dangos. KT hidrodinaminis skersmuo (D_H) buvo išmatuotas naudojant dinaminės šviesos sklaidos (DŠS) metodą (1 lentelė). DŠS analizė leidžia saugiai išmatuoti dalelių dydį ir pasiskirstymą submikroniniame diapazone. Tai yra ne invazinis, jautrus metodas, kuriam reikia nedidelio mėginio kiekio. Šis tyrimas remiasi tirpalo makromolekulių smūgiais, kurie išjudina tirpiklio molekules ir yra žinomas kaip Brauno judesiai. Judėdamos tam tikrą laiką makromolekulės išsklaido šviesą ir matuojamas šviesos intensyvumo fluktuacijos nustatytu kampu – išsklaidytos šviesos intensyvumas. Monochromatinė šviesa susiduria su tiriamų KT suspensija, kuri išsklaido šviesą. Iš 1 lentelės galima pasakyti, kad abu naudoti KT buvo apie 30 nm dydžio, stabilūs, bei nelinkę agreguotis.



7 pav. Kvantinių taškų su karboksilo grupėmis (KT-COOH) (A) bei amino grupėmis (KT-NH₂) (B) vaizdai gauti naudojant skenuojančią elektroninę mikroskopiją (SEM)

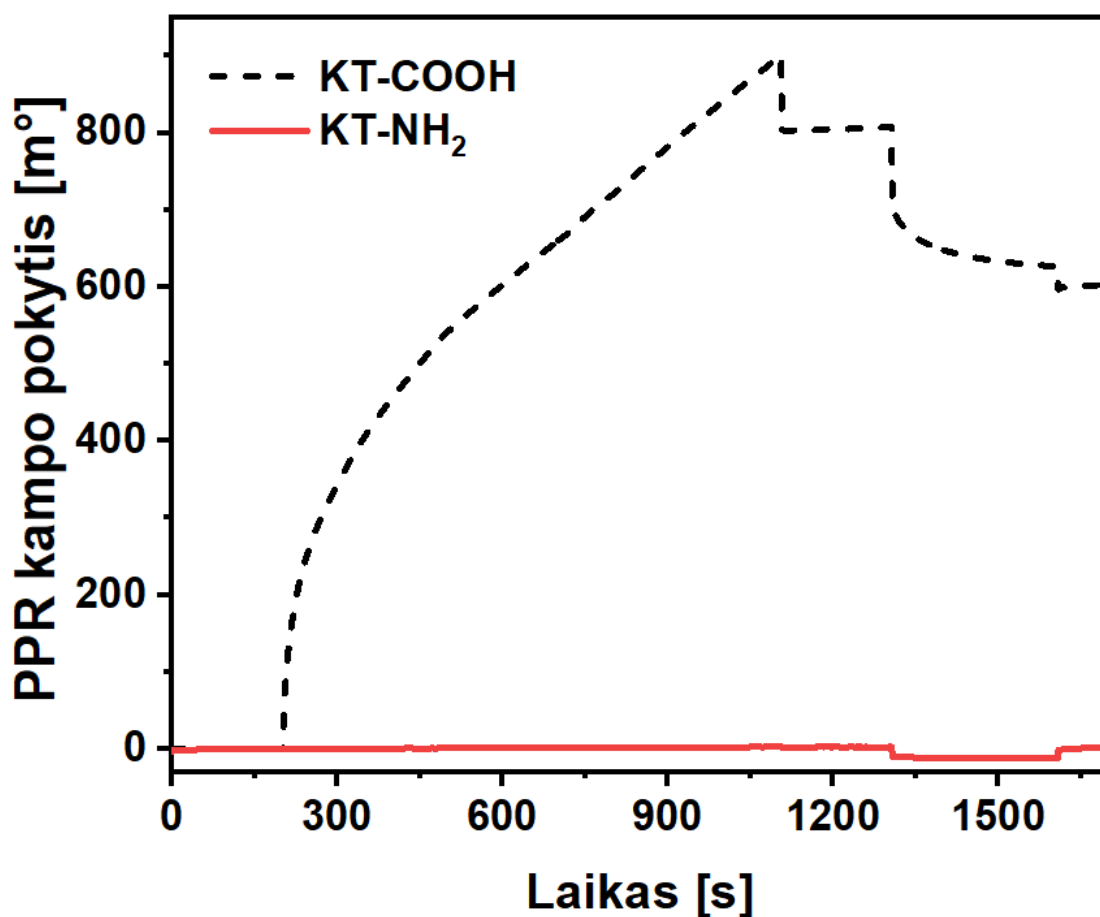
1 lentelė. Dinaminės šviesos sklaidos metodu išmatuotas modifikuotų ir nmodifikuotų KT hidrodinaminis skersmuo

Nr.	Mėginys	Hidrodinaminis skersmuo, D_H [nm]
1.	KT-COOH	$29,54 \pm 1,25$
2.	KT-NH ₂	$30,21 \pm 1,80$
3.	Anti-CD44	$12,98 \pm 1,08$
5.	KT-anti-CD44	$38,09 \pm 1,62$

3.3 KT parinkimas konjugacijai su antikūnais

Specifinių antikūnų ir KT konjugatai gali pasižymėti didele nespecifine sąveika su analite. Antikūnų ir KT konjugatų naudojimas gali būti sudėtingas ar net neįmanomas dėl analizės molekulių adsorbcijos laisvo KT paviršiuje. Taip pat, nespecifinės sąveikos tarp KT ir konkretaus baltymo metu galima ir kitų panašių molekulių adsorbcija. Tai gali apsunkinti KT konjugatų naudojimą realių mėginių analizei [18]. Buvo tiriama KT-COOH ir KT-NH₂ nespecifinė sąveika su imobilizuotu CD44 baltymu Au/MUR paviršiuje (8 pav.). Eksperimentams buvo naudojami 10 nmol L⁻¹ koncentracijos KT. Iš pradžių buvo atliekamas bazinės linijos stabilizavimas acetatiniu buferiu, po kurio į PPR kiuvetę buvo pilama 10 nmol L⁻¹ KT tirpalo. Sensogramoje buvo pastebėtas nedidelis, apie 2 m° signalo padidėjimas

KT-NH₂ atveju. Atlikus disociaciją ir vėliau regeneraciją, PPR signalas beveik grįžo į lygį, stebėtą prieš įpilant KT-NH₂. Pakeitus KT-NH₂ tirpalo koncentraciją į 100 nmol L⁻¹ ir atlikus tokią pačią analizę buvo gauti panašūs rezultatai. Priešingai, po KT-COOH injekcijos, tolesnio inkubavimo metu buvo užregistruotas sistemingas intensyvus PPR signalo poslinkis. Be to, po disociacijos buvo užregistruotas apie 800 m° PPR signalo pokytis. Toliau buvo atliktas Au/CD44 paviršiaus regeneravimas, tačiau KT-COOH nenusiplovė nuo paviršiaus. Tai aiškiai parodo didelę nespecifinę KT-COOH sąveiką su imobilizuotu CD44 baltymu, kai su KT-NH₂ nespecifinė sąveika buvo nereikšminga. Remiantis šiais rezultatais, KT-NH₂ buvo atrinkti tolimesnei konjugacijai su specifiniais antikūnais.

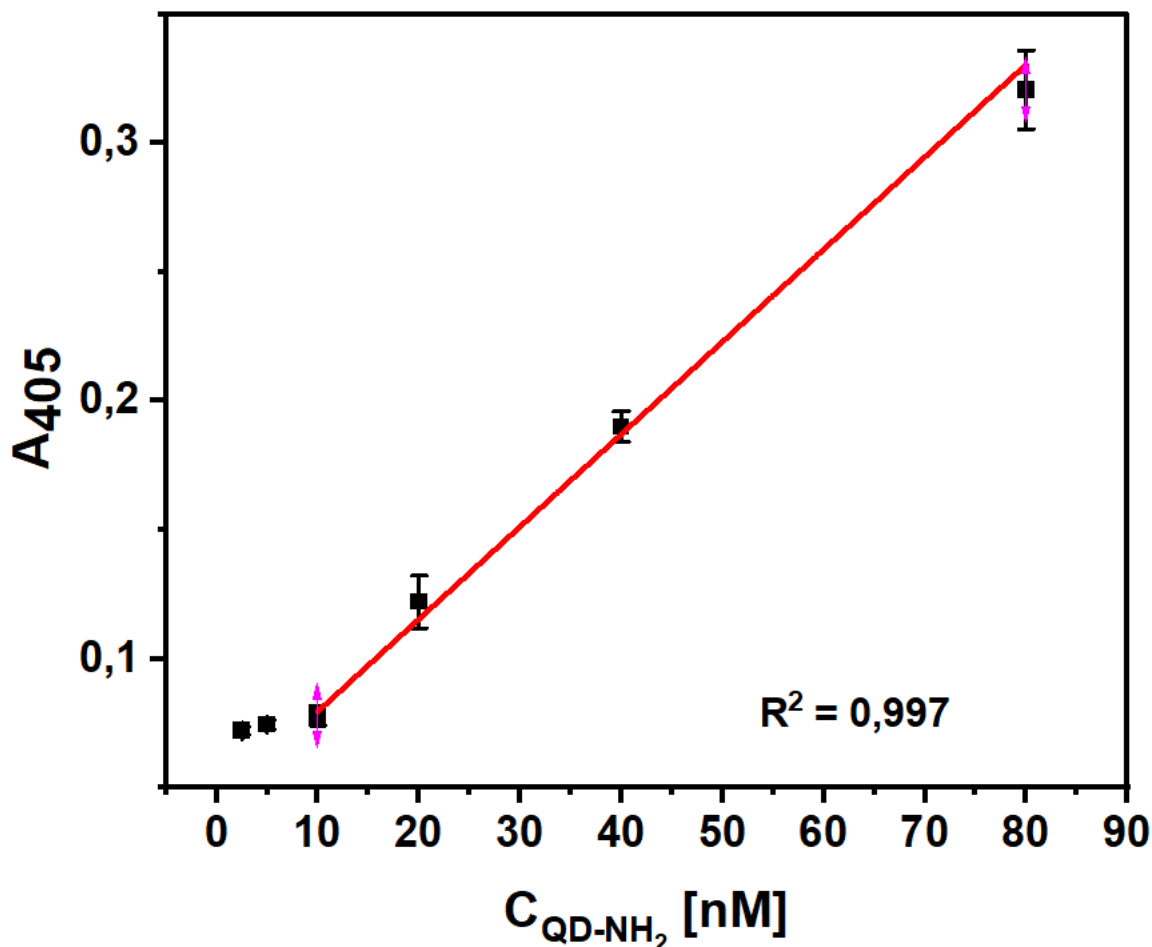


8 pav. Nespecifinė KT-COOH ir KT-NH₂ sąveika su CD44 baltymu, imobilizuotu Au/MUR paviršiuje

3.4 Optimalių konjugacijos sąlygų parinkimas

Anti-CD44 ir KT-NH₂ konjugacijai buvo pasirinktas kovalentinis prijungimas naudojant BS³ reagentą. Šis būdas buvo pasirinktas, nes KT-NH₂ modifikuoti polietilenglikoliu derivatizuotu su amino grupėmis, kuri leidžia išvengti nespecifinės sąveikos su antikūnais susidarymo kovalentinio prijungimo metu. Vandenyje tirpus BS³ kryžminio ryšio reagentas yra plačiai naudojamas, kai N-hidroksisulfosukcinimido (NHS) esterių grupės sąveikauja su pirminiais aminorais polipeptidų N-galo ir lizino liekanų šoninėmis grandinėmis amidinio ryšio susidarymo metu esant pH 7–9 [165]. Anksčiau

BS³ buvo naudojamas KT ir antikūnų konjugacijai, kurie vėliau buvo sėkmingai panaudoti gyvoje ląstelėse [166], [167], [168]. Be to, biomolekulių prijungimas per kryžminį ryšį suteikia papildomos erdvinės laisvės imobilizuotoms molekulėms ir užtikrina efektyvią afininę sąveiką [18]. Siekiant atlikti KT-NH₂:anti-CD44 konjugaciją buvo naudojamas 1:5 molinis santykis. Konjugacijos metu reikšmingos KT-NH₂ agregacijos ar praradimo nepastebėta. Gauti konjugatai buvo surinkti ir jų koncentracija nustatoma prieš tolimesnius tyrimus, remiantis KT-NH₂ kalibracine kreive (9 pav.). Šis tyrimas buvo atliekamas norint užtikrinti tikslų KT-NH₂ konjugatų kiekį, įnešama į PPR ceļ.



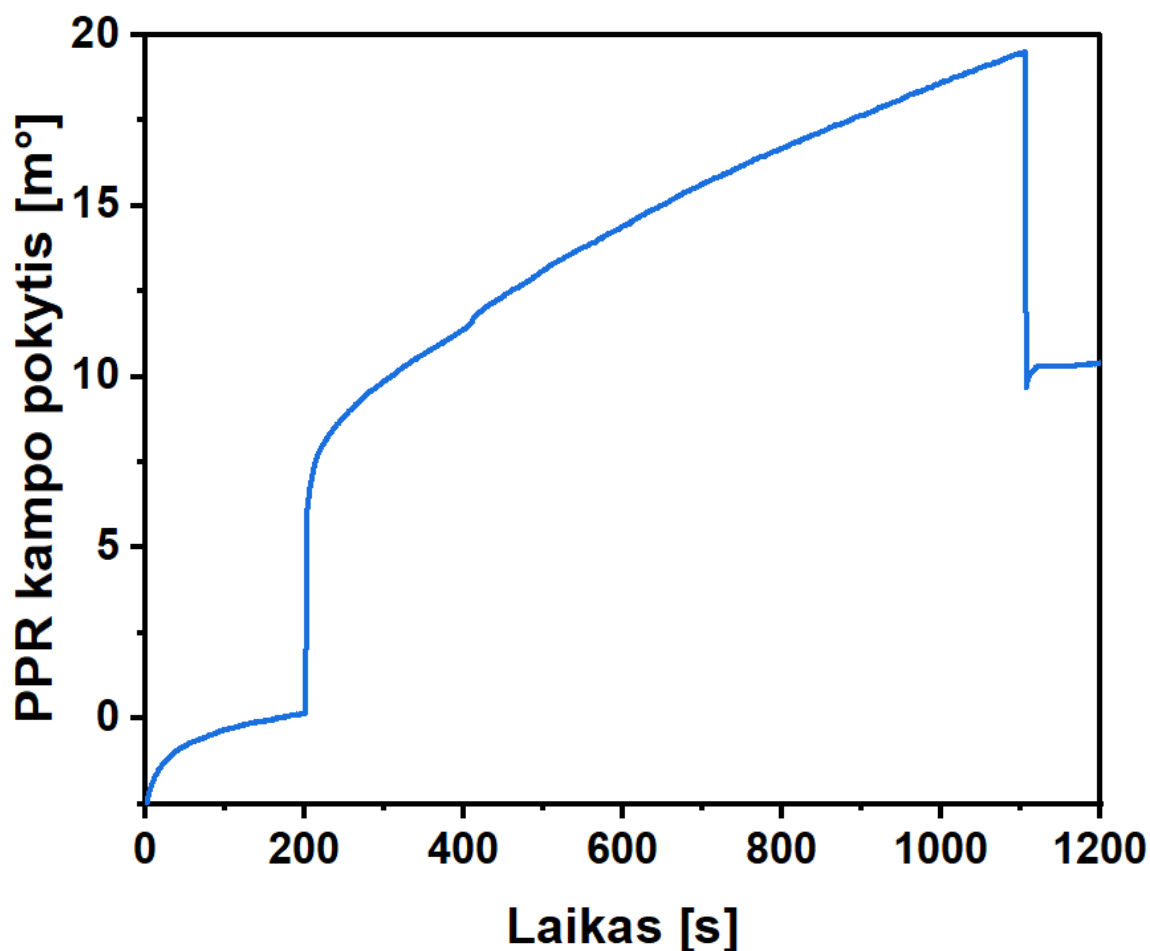
9 pav. KT-NH₂ absorbcijos ties 405 nm priklausomybė nuo jų koncentracijos

Konjugatai buvo apibūdinti remiantis DŠS (1 lentelė). Nustatyta, kad hidrodinaminis konjugatų skersmuo buvo didesnis nei nemodifikuotų KT-NH₂. Tuo atveju, kai KT-NH₂ ir anti-CD44 konjugatai yra sujungiami moliniu santykiu 1:5, D_H padidėjo nuo 30,21 ± 1,80 iki 38,09 ± 1,62 nm. Literatūroje buvo stebimas panašus D_H padidėjimas (13,2 ± 1,0 nm) antikūnų adsorbcijos ant aukso nanodalelių paviršiaus, kai pH 7,5 [144]. Be to, šiame darbe buvo naudojamas anti-CD44 antikūnas, kuris yra imunoglobulinas G ir jo matmenys yra 14 × 8,5 × 4,5 nm [169]. Teorinis D_H padidėjimas priklauso nuo antikūnų orientacijos ir gali būti nuo 9 iki 28 nm, o tai atitinka „plokščią“ (-angl. *flat on*) ir „vertikalią“

(-angl. *head on*) orientacijas [144]. Šis pastebėjimas rodo, kad eksperimentų metu yra gauti konjugatai su mišria antikūnų orientacija, kurios būtų galima tikėtis, kai yra naudojama kovalentinė konjugacija.

3.5 KT-NH₂ ir anti-CD44 konjugacijos įvertinimas

KT-NH₂ ir anti-CD44 konjugacijos įvertinimas buvo atliktas registruojant imobilizuoto CD44 baltymo sąveiką su įpiltais konjugatais (5 nmol L⁻¹ koncentracijos tirpalas) (10 pav.). Paveiksle matoma KT-anti-CD44 konjugatų PPR sąveikos su imobilizuotu CD44 baltymu sensograma. Matoma, kad pradžioje buvo įleistas fosfatinis buferis pH 7,4, kad pasiekti stabilią bazinę liniją prieš sąveiką. Tada į celę įleidžiamas KT-anti-CD44 tirpalas. Kuo daugiau konjugatų prisijungs, tuo didesnis PPR signalas yra registruojamas. Po asociacijos fazės, kuri trunka 900 s, seka disociacijos fazė, kurios metu neprisijungę konjugatai yra nuplaunami nuo paviršiaus.



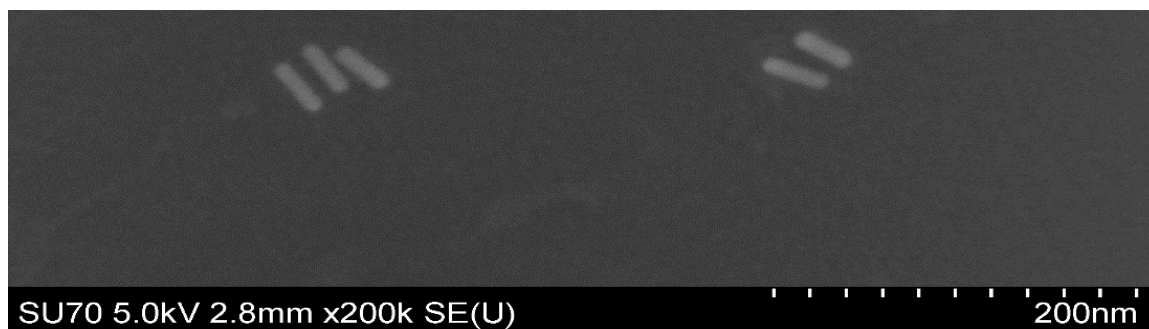
10 pav. KT-anti-CD44 konjugatų sąveikos su imobilizuotu CD44 baltymu PPR sensograma

Rezultatai parodė, kad paruošti konjugatai sėkmingai sąveikavo su kovalentiškai imobilizuotu CD44 per MUR SAM modifikuoto PPR jutiklio lustą. Asociacijos fazės metu buvo užregistruotas nuolatinis didėjantis PPR signalo pokytis. Naudojant KT-NH₂: anti-CD44 moliniu santykiu 1:5,

pusiausvyros kampas buvo registruojamas $31,83 \pm 3,58$ m°. Tuo metu po disociacijos fazės PPR kampo pokytis sumažėjo iki 10,4 m°. Taigi dalis konjugatų yra nuplaunama nuo paviršiaus, bet kita dalis lieka prisijungusi prie imobilizuoto CD44 baltymo. Tai parodo sėkmingą KT-NH₂ ir anti-CD44 baltymo konjugaciją. Pasirinktas konjugacijos metodas gali būti naudojamas atliekant kvantinių taškų ir antikūnų konjugaciją. Tuo metu PPR spektroskopija gali būti pritaikyta tokiai konjugacijai įvertinti.

3.6 Aukso nanostrypelių sintezė ir charakterizavimas

Pagal poskyryje 2.2.9 pateiktą metodiką buvo susintetinti aukso nanostrypeliai (AuNS). Susintetintų AuNS suspensija buvo rausvos spalvos. Gauti AuNS buvo ištirti panaudojus skenuojančią elektroninę mikroskopiją (11 pav.). Gauti aukso nanostrypeliai yra pailgos formos. Tuo metu nustatytas jų ilgis buvo lygus $34,98 \pm 3,41$ nm bei storis - $10,75 \pm 1,29$ nm.



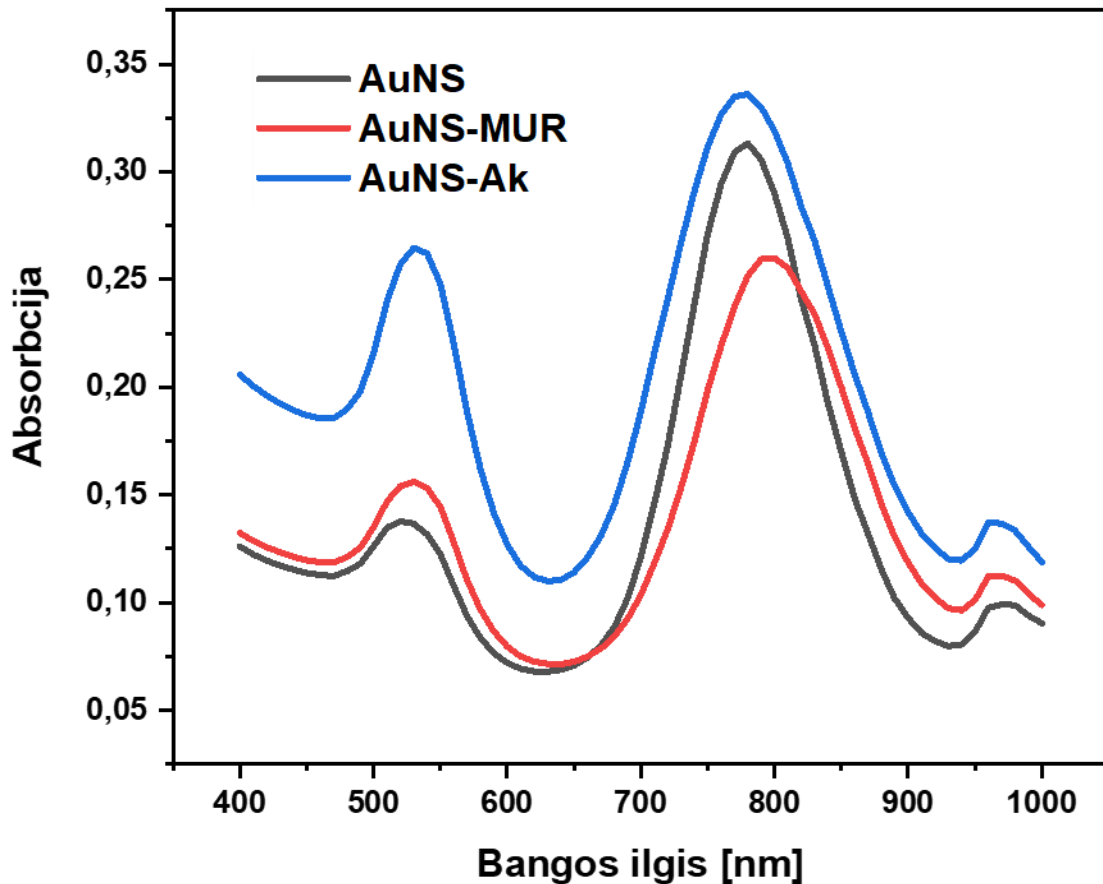
11 pav. AuNS gauta SEM nuotrauka

3.7 AuNS ir antrinių antikūnų konjugacija

Susintetintos AuNS buvo konjuguojamos su antriniais antikūnais. Konjuguojant antrinius antikūnus su aukso nanodalelėmis, signalas, gaunamas iš pirminės antikūno ir antigeno sąveikos, gali būti labai sustiprintas. Šis sustiprintas signalas padidina aptikimo metodų jautrumą. Taip pat, antriniai antikūnai skirti atpažinti pirminius skirtingų rūšių antikūnus ir prie jų prisijungti. Konjuguojant antrinius antikūnus su aukso nanodalelėmis, tampa lengviau atskirti ir vizualizuoti konkretų dominantį taikinį - SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymo antikūnų sąveiką su AuNS-Ak konjugatais. Konjugacijos metu UV-VIS spektroskopijos metodu buvo matuojami AuNS, AuNS po paveikimo MUR reagentu (AuNS-MUR) bei susidariusių AuNS ir antrinių antikūnų konjugatų (AuNS-Ak) spektrai (12 pav.). Absorbcijos spektras buvo matuojamas 400-1000 nm bangos ilgyje, spektruose matomos 2 smailės, kas rodo, kad dalelės buvo matuojamos išilgai (per visą savo ilgį) arba vertikaliai (per plotį). Toliau bus aptartas smailių pokytis per visą dalelės ilgį, t.y. ilgesnių bangos ilgių link. UV-VIS matavimu galima stebėti antrinių antikūnų konjugacija su AuNS, kuria matoma pagal absorbcijos smailės pasikeitimą. Dėl koloidinio aukso paviršiaus plazmonų rezonanso stipri absorbcijos smailė yra tarp 700-800 nm ir šios smailės pasislinkimai priklauso nuo nanodalelių dydžio. Mūsų susintetintų AuNS dalelių absorbcijos smailė buvo ties 770 nm (juoda kreivė).

Nors aukso nanostrypeliai bei jų taikymas jau yra ilgai ir nuodugniai tiriami, jų naudojimas gyvose sistemose yra ribotas dėl to, kad vieno jų iš dažniausiai naudojamo sintezės metu tirpalo, sėklų tirpalo, yra naudojamos didelės paviršinio aktyvumo medžiagos - cetiltrimetilamonio bromido (CTAB) koncentracijos, o šis reagentas gali būti toksiškas. CTAB AuNS paviršiuje sudaro tvirtai surišą dvisluoksnį, kas leidžia jam įsiterpti į ląstelių membranas, todėl norint AuNS panaudoti biologinėse sistemose būtina jį pašalinti. Tam buvo atlikti 2 žingsniai: kruopštus centrifugavimas bei plovimas ir ligandų mainai. Dažniausiai naudojamas budas pašalinti CTAB yra centrifugavimas bei plovimas, tačiau po šio proceso paviršiuje vistiek lieka šiek tiek CTAB ir dalelės yra linkusios greičiau agreguoti [170]. Dėl šios priežasties buvo pasirinktas 2 žingsnių CTAB pašalinimas. Pirma buvo atliktas centrifugavimas. Centrifugavimas yra plačiai naudojamas metodas nanodalelėms atskirti nuo CTAB pertekliaus. Procesas apima kelis centrifugavimo etapus ir pakartotinį suspendavimą tinkamame tirpiklyje, pavyzdžiui, vandenyje arba atitinkamame buferyje. Dėl išcentrinės jėgos nanodalelės kaupiasi centrifugos mėgintuvėlio apačioje, o CTAB turintis supernatantas gali būti atsargiai pašalintas. Procesas kartojamas keletą kartų, kad būtų užtikrintas CTAB pašalinimas [171]. Antras žingsnis buvo ligandų mainai. Tai yra CTAB pakeitimas kita molekule, kuri turi didesnę afinitetą aukso nanodalelių paviršiumi. Įprasti ligandai, naudojami ligandų mainams, yra tiolio turintys junginiai, toks kaip merkaptoundekano rūgštis (MUR). Ligandų mainų procesas paprastai apima ligando pridėjimą prie CTAB padengtų aukso nanodalelių ir leidžiant jam išstumti CTAB dėl cheminės sąveikos su aukso paviršiumi. Paviršiaus funkcionalizavimas tiolio dariniais nėra būtinas tik siekiant pagerinti dalelių PPR savybes, bet ir suteikti koloidinį stabilumą. Ši strategija yra universalus AuND paviršiaus modifikavimo metodas, kuris padeda išsaugoti jų koloidinį stabilumą, dydį ir dalelių formą [172]. Taip pat MUR buvimas aukso paviršiuje leidžia atlikti kovalentinį baltymų prijungimą prie AuNS paviršiaus.

Paveikus daleles MUR yra matomas antros smailės pokytis (raudona kreivė), kai smailė pasislenka nuo 770 nm iki 800 nm. Tai rodo, kad CTAB buvo pakeistas kitu ligandu, MUR, kas yra matoma spektre. Konjugavus daleles su antriniais antikūnais matomas smailės pokytis, kas rodo aukso nanodalelių ir antikūnų sąveiką. Spektre matoma, kad smailė pasislinko ir pasiekė aukščiausią vertę ties 780 nm (mėlyna kreivė). Taip pat matoma, kad AuNS-Ak absorbcija yra didesnė, tai yra todėl, kad tirpalas buvo sukonzentruotas mažesniame tūryje taip paruošiant tolimesniems tyrimams.

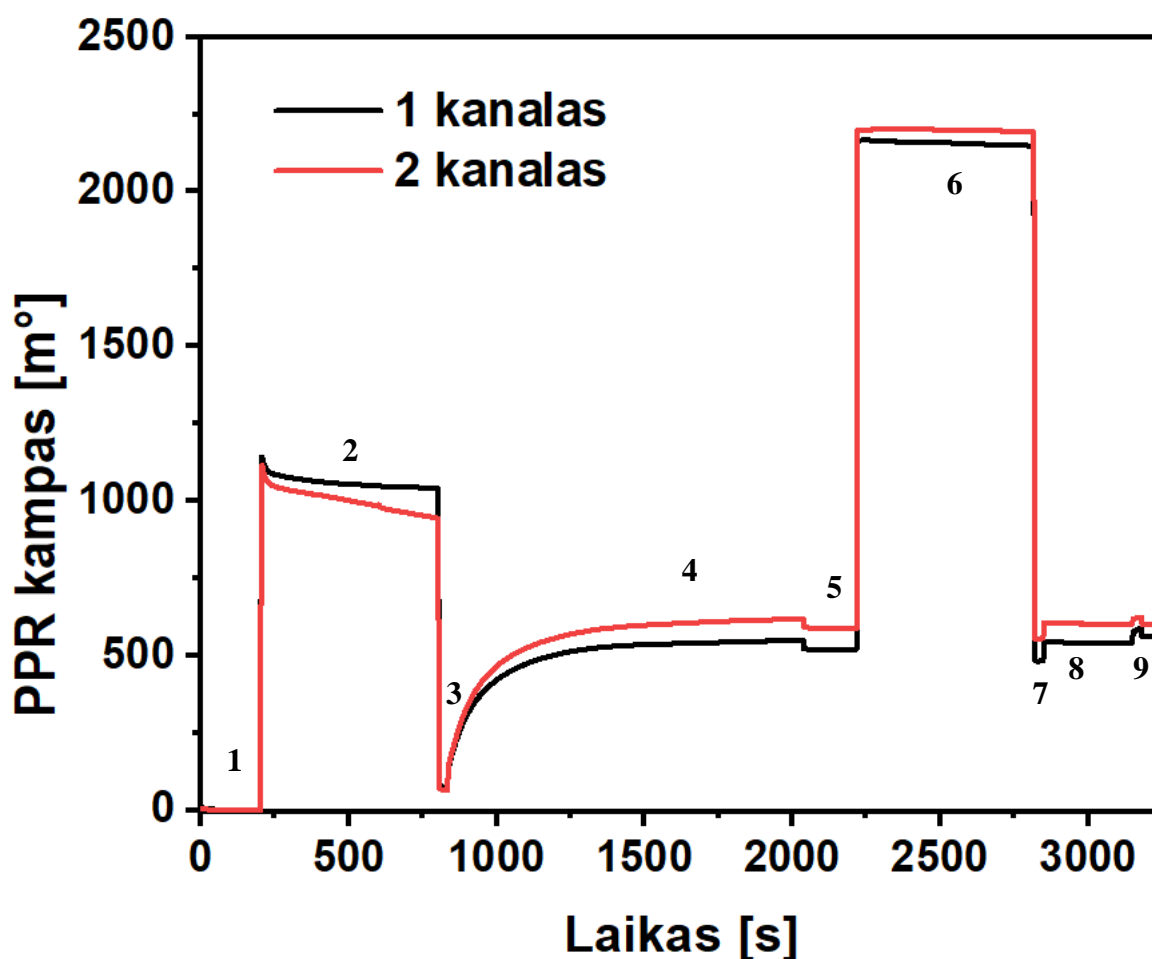


12 pav. AuNS, AuNS-MUR bei AuNS-Ak UV-VIS spektrai

3.8 N baltymo imobilizavimas ir jo sąveikos su specifiniais monokloniniais antikūnais įvertinimas

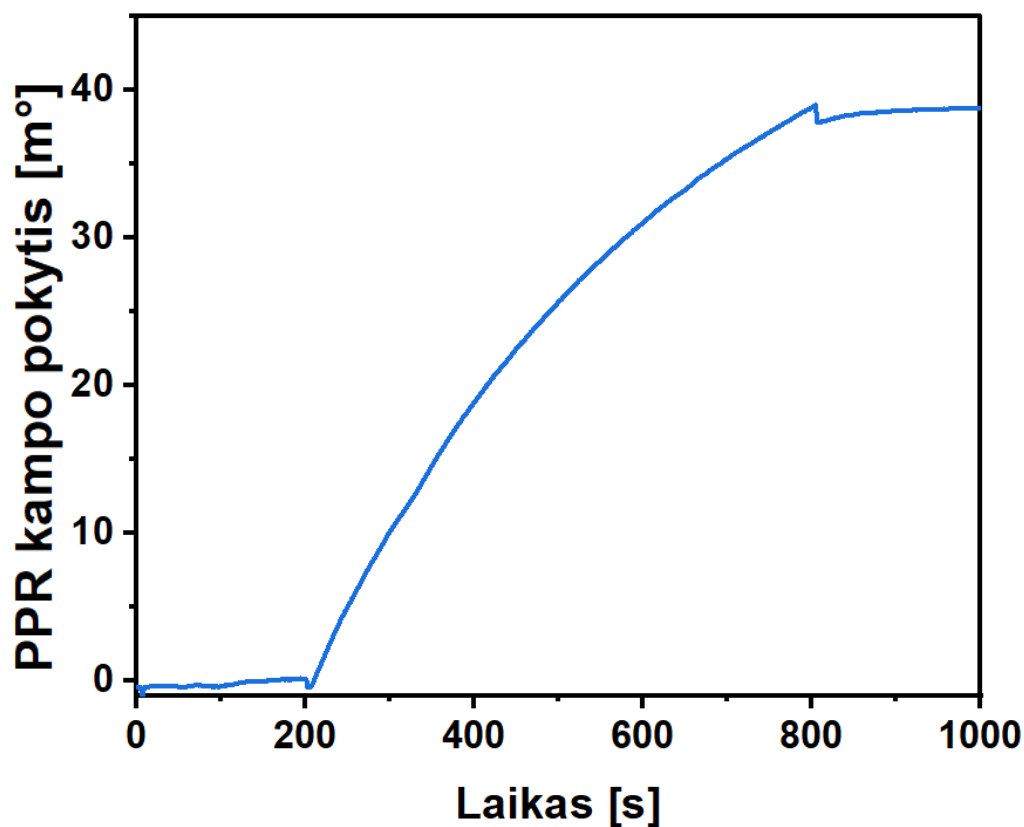
Norint įvertinti AuNS ir antrinių antikūnų konjugacija pirmiausia buvo atlikta N baltymo imobilizacija PPR lusto paviršiuje. Imobilizacijos sensograma yra pateikta 13 paveiksle. Procesas pradedamas į PPR celę įpilant acetatinio buferio, pH 4,5 (13 pav. 1). Kai bazinė linija stabilizuojasi, pilami EDC/NHS tirpalai, kurie aktyvuoja karboskilo grupes MUR paviršiuje (13 pav. 2). Aktyvacijos metu susidaro N-hidroksisukcinimido esteriai, kurie reaguoja su N baltymo pirminėmis amino grupėmis ir susidaro kovalentinė jungtis. Tokiu būdu N baltymas yra prijungiamas prie PPR jutiklio paviršiaus (13 pav. 4). N baltymo imobilizacijos metu stebimas PPR kampo kitimas laike. Praėjus imobilizacijai lieka aktyvių karboksilinių grupių, kurios neprisijungė imobilizuojamos molekulės, todėl yra naudojamas etanolaminamo tirpalas. Jis neleidžia analitei ir kitiems baltymams prisijungti prie paviršiaus (13 pav. 6). Po šio žingsnio etanolamino perteklius išplaunamas iš PPR kiuvetės ją plaunant acetatinio buferiu, pH 4,5 (6 pav. 7). Iš grafiko matosi, kad PPR signalas padidėjo po N baltymo injekcijos ir tolesnio inkubavimo metu. Stabilus PPR kampas, kuris signalizuoja apie pasiektą prisotinimą, buvo

užregistruotas maždaug po 900 s. N baltymo imobilizacijos PPR kampo pokytis yra lygus 500 m° , kas atitinka $4,17 \text{ ng/mm}^2$ paviršinę imobilizuoto N baltymo koncentraciją.



13 pav. N baltymo imobilizavimo MUR modifikuoto PPR lusto paviršiuje sensograma. 1, 3, 5, 7, 9 – bazinė linija, acetatinis buferis, pH 4,5; 2 – MUR karboksilo grupių aktyvavimas su EDC/NHS mišiniu; 4 – N baltymo imobilizavimas; 6 – likusių aktyvių karboksilo grupių deaktyvavimas 1 mol L^{-1} etanolamino tirpalu; 8 – regeneracija (25 mmol L^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS)

Tolimesniame žingsnyje buvo stebima imobilizuoto N baltymo sąveika su specifiniais pelės antikūnais prieš jį. Tam tikslui 5 nmol L^{-1} koncentracijos antikūnų tirpalas buvo įpiltas į celę ir stebimas procesas panaudojus PPR spektroskopiją (14 pav.). Paveiksle matoma monokloninių antikūnų prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymą (Anti-N) sąveikos su imobilizuotu N baltymu PPR sensograma.

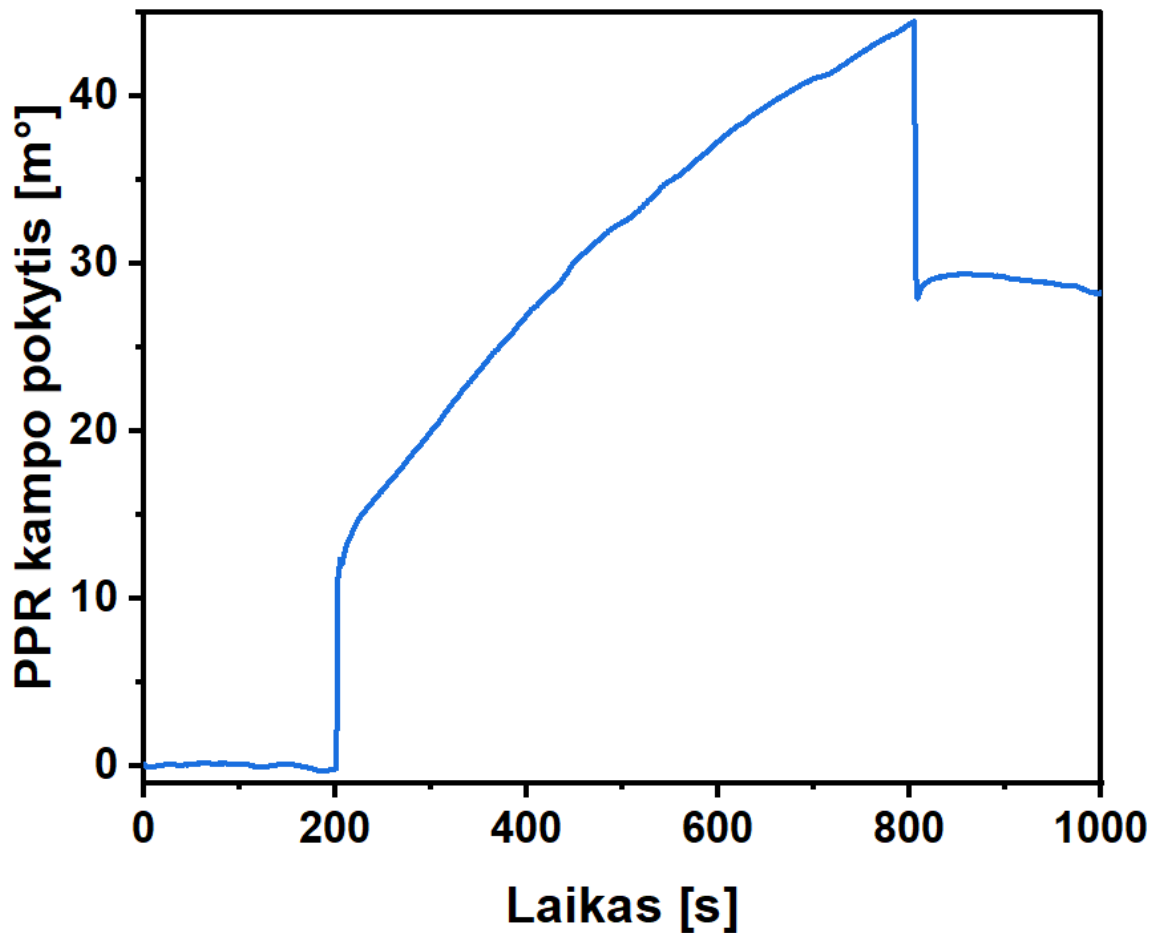


14 pav. Anti-N sąveikos su imobilizuotu N baltymu PPR sensograma

Paveiksle matoma, kad pradžioje buvo įleistas fosfatinis buferis pH 7,4, kad pasiekti stabilią bazinę liniją prieš sąveiką. Tada į celę įleidžiami antikūnai prieš N baltymą. Kuo daugiau antikūnų prisijungs, tuo didesnis PPR signalas yra registruojamas. Asociacijos fazė prasideda tyrimo 200 s ir trunka 600 s. Po asociacijos seka disociacijos fazė, kurios metu neprisijungę antikūnai yra nuplaunami nuo paviršiaus. Iš grafiko matyti, kad beveik visi antikūnai prisijungė prie N baltymo, nes disociacijos metu PPR kampo pokytis beveik nesumažėjo. Disociacijos pabaigoje buvo registruojamas 39 m° PPR kampo pokytis. Atsižvelgus į gautus rezultatus galima teigti, kad paviršius buvo sėkmingai paruoštas tolimesniam tyrimui.

3.9 AuNS ir antrinių antikūnų konjugacijos įvertinimas

Norint įvertinti konjugaciją buvo registruojama specifinių antikūnų, esančių komplekse su N baltymu, sąveiką su įpiltais AuNS-Ak konjugatais (15 pav.). Paveiksle matoma AuNS-Ak konjugatų sąveikos su specifiniais pelės antikūnais, prisijungusiais prie imobilizuoto N baltymo, PPR sensograma. Matoma, kad pradžioje buvo įleistas boratinis buferis pH 8,0, kad pasiekti stabilią bazinę liniją prieš sąveiką. Tada į celę įleidžiamas AuNS-Ak konjugatų tirpalas. Kuo daugiau konjugatų yra prijungiama, tuo didesnis PPR signalas užregistruojamas. Asociacijos fazė prasideda po 200 s ir trunka 600 s, pasibaigia ties 800 s. Po asociacijos seka disociacijos fazė, kurios metu neprisijungę konjugatai yra nuplaunami nuo paviršiaus.



15 pav. AuNS-Ak konjugatų sąveikos su specifiniais pelės antikūnais, prisijungusiais prie imobilizuoto N baltymo, PPR sensograma

Iš gautų rezultatų galima pasakyti, kad paruošti konjugatai sėkmingai sąveikavo su specifiniais pelės antikūnais, kurie buvo prisijungę prie imobilizuoto N baltymo. Asociacijos fazės metu buvo užregistruotas nuolatinis didėjantis PPR signalas, o PPR kampo pokytis pasiekė daugiau nei 40 m° . Po disociacijos fazės PPR kampo pokytis sumažėjo iki $29,31 \pm 2,31\text{ m}^\circ$. Taigi dalis konjugatų yra nuplaunama nuo paviršiaus, bet kita dalis lieka prisijungusi. Tai parodo sėkmingą konjugacijos proceso įvykdymą.

Apibendrinant galima pasakyti, kad pasirinktas konjugacijos metodas yra tinkamas tirti SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymo ir specifinių antikūnų prieš jį sąveiką ir įvertinti AuNS ir antrinių antikūnų konjugaciją. N baltymas yra vienas iš diagnostinių žymenų, kurį galima nustatyti anksčiau, nei pasireiškia klinikiniai simptomai užsikrėtusiems pacientams [173]. Ir atvirkščiai, specifinių antikūnų prieš N baltymą aptikimas gali padidinti diagnostinį atpažinimą. Remdamiesi savo rezultatais, parodėme, kad PPR metodu galima įvertinti AuNS ir antikūnų konjugaciją.

IŠVADOS

1. CD44 ir SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymai buvo sėkmingai imobilizuoti PPR jutiklių lusto paviršiuje per 11-merkaptio undekano rūgšties savitvarkio monosluoksnį. Paviršinės CD44 žymens ir N baltymo koncentracijos PPR jutiklių lusto paviršiuje buvo atitinkamai lygios 2,17 ir 4,17 ng/mm².
2. KT-NH₂ dėl mažesnės nespecifinės sąveikos su imobilizuotu CD44 baltymu buvo pasirinkti konjugacijai su specifiniais antikūnais. Nustatytas KT-NH₂ dydis buvo $8,96 \pm 0,85$ nm, o hidrodinaminis skersmuo - $30,21 \pm 1,80$ nm.
3. Atlikta KT-NH₂ bei specifinių antikūnų konjugacija. Po konjugacijos dalelių hidrodinaminis skersmuo padidėjo iki $38,09 \pm 1,62$ nm. Sėkminga konjugacija buvo patvirtinta, registruojant KT-anti-CD44 konjugatų sąveiką su imobilizuotu CD44 baltymu.
4. Susintetinti aukso nanostrypeliai. Nustatytas AuNS ilgis buvo lygus $34,98 \pm 3,41$ nm ir storis - $10,75 \pm 1,29$ nm.
5. Atlikta aukso nanostrypelių ir specifinių antikūnų konjugacija. Sėkminga konjugacija buvo patvirtinta, registruojant AuNS-Ak konjugatų sąveiką su specifiniais pelės antikūnais, prisijungusiais prie imobilizuoto N baltymo.
6. PPR spektroskopija yra tinkamas metodas norint įvertinti kvantinių taškų ir antikūnų ar aukso nanostrypelių ir antikūnų konjugaciją.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

NEDA ZENKEVIČIŪTĖ

NANODALELIŲ IR ANTIKŪNŲ KONJUGACIJOS ATLIKIMAS IR ĮVERTINIMAS

Nanodalelės yra 1-100 nm dydžio dalelės, kurios domina mokslininkus dėl savo cheminio stabilumo, unikalių optinių savybių, sintezės ir funkcionalizavimo paprastumo. Nanodalelių ir antikūnų konjugacija – tai tyrimų sritis, kurioje pagrindinis dėmesys skiriamas unikalių nanodalelių savybių ir antikūnų specifškumo derinimui įvairiems biomedicininiam tikslams. Šiuo darbu buvo siekiama atlikti bei įvertinti kvantinių taškų ir aukso nanodalelių konjugaciją su antikūnais.

CD44 yra ląstelės paviršiaus glikoproteinas, kuris susijęs su įvairiais fiziologiniais ir patologiniais procesais, įskaitant uždegimą, audinių regeneraciją ir vėžį. SARS-CoV-2, viruso, atsakingo už COVID-19 pandemiją, nukleokapsidės (N) baltymas yra pagrindinis komponentas, apimantis viruso RNR genomą. CD44 ir SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymai buvo sėkmingai imobilizuoti paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) jutiklių lusto paviršiuje per 11-merkapto undekano rūgšties (MUR) savitvarkio monosluoksnį (SAM). Paviršinės CD44 žymens ir SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymo koncentracijos PPR jutiklių lusto paviršiuje buvo atitinkamai lygios 2,17 ir 4,17 ng/mm².

Konjugacijai su specifiniais antikūnais buvo pasirinkti kvantiniai taškai, modifikuoti polietilenglikoliu derivatizuotu su amino grupėmis (KT-NH₂) dėl mažesnės nespecifinės sąveikos su imobilizuotu CD44 baltymu. Nustatytas KT-NH₂ dydis buvo 8,96 ± 0,85 nm, o hidrodinaminis skersmuo - 30,21 ± 1,80 nm. Po konjugacijos su antikūnais dalelių hidrodinaminis skersmuo padidėjo iki 38,09 ± 1,62 nm. Sėkminga konjugacija buvo patvirtinta, registruojant KT-anti-CD44 konjugatų sąveiką su imobilizuotu CD44 baltymu.

Tai pat buvo susintetinti aukso nanostrypeliai (AuNS) bei atlikta jų konjugacija su antriniais antikūnais. Konjugacija buvo patvirtinta, registruojant aukso nanostrypelių ir antikūnų konjugatų sąveiką su specifiniais pelės antikūnais, prisijungusiais prie imobilizuoto SARS-CoV-2 nukleokapsidės (N) baltymo. Galima teigti, kad PPR spektroskopija yra tinkamas metodas norint įvertinti kvantinių taškų ir antikūnų ar aukso nanostrypelių ir antikūnų konjugaciją.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY

FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

NEDA ZENKEVIČIŪTĖ

PERFORMANCE AND EVALUATION OF NANOPARTICLE - ANTIBODY CONJUGATION

Nanoparticles are particles with a size of 1-100 nm that are of interest to scientists due to their chemical stability, unique optical properties, and ease of synthesis and functionalization. Nanoparticle-antibody conjugation is an area of research that focuses on the unique properties of nanoparticles and tailoring the specificity of antibodies for various biomedical applications. This work aimed to perform and evaluate the conjugation of quantum dots and gold nanorods with antibodies.

CD44 is an observed glycoprotein involved in various physiological and pathological processes, including inflammation, tissue regeneration, and cancer. The nucleocapsid (N) protein of SARS-CoV-2, the virus responsible for the COVID-19 pandemic, is a major component that encapsulates the viral RNA genome. CD44 and SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) proteins were successfully immobilized on the surface of a surface plasmon resonance (PPR) sensor chip via an 11-mercapto-undecanoic acid (MUR) self-assembled monolayer (SAM). The surface concentrations of the CD44 marker and the SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein on the surface of the PPR sensor chip were equal to 2.17 and 4.17 ng/mm², respectively.

Quantum dots modified with polyethylene glycol derivatized with amino groups (KT-NH₂) were selected for conjugation with specific antibodies due to lower non-specific interactions with immobilized CD44 protein. The determined size of KT-NH₂ was 8.96 ± 0.85 nm and the hydrodynamic diameter was 30.21 ± 1.80 nm. After conjugation with antibodies, the hydrodynamic diameter of the particles increased to 38.09 ± 1.62 nm. Successful conjugation was confirmed by recording the interaction of KT-anti-CD44 conjugates with immobilized CD44 protein.

Gold nanorods (AuNS) were also synthesized and their conjugation with secondary antibodies was performed. Conjugation was confirmed by recording the interaction of gold nanorods and antibody conjugates with specific mouse antibodies bound to the immobilized SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein. Arguably, PPR spectroscopy is a suitable method to evaluate the conjugation of quantum dots and antibodies or gold nanorods and antibodies.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti Doc. Dr. Anton Popov už galimybę atlikti tiriamąjį mokslinį baigiamąjį darbą, suteiktas žinias, kantrybę, nuoširdumą, supratingumą bei padaršinimą magistro studijų baigiamojo darbo tyrimų ir rašymo metu. Taip pat esu nuoširdžiai dėkinga Viktorijai Lisytei už atsidavimą, kompetenciją, suteiktas vertingas išvalgas bei visokeriopą pagalbą, kuri žymiai pagerino mano darbo kokybę.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast Cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 66, doi:10.1038/s41572-019-0111-2.
2. Juan, A.; Cimas, F.J.; Bravo, I.; Pandiella, A.; Ocaña, A.; Alonso-Moreno, C. Antibody Conjugation of Nanoparticles as Therapeutics for Breast Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21176018.
3. Duncan, R.; Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the Microscope. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 2101–2141, doi:10.1021/mp200394t.
4. Jain, P.K.; ElSayed, I.H.; El-Sayed, M.A. Au Nanoparticles Target Cancer. *Nano Today* **2007**, *2*, 18–29, doi:10.1016/S1748-0132(07)70016-6.
5. Sahu, A.K.; Sreepadmanabh, M.; Rai, M.; Chande, A. SARS-CoV-2: Phylogenetic Origins, Pathogenesis, Modes of Transmission, and the Potential Role of Nanotechnology. *Virusdisease* **2021**, *32*, 1–12.
6. Yasamineh, S.; Kalajahi, H.G.; Yasamineh, P.; Yazdani, Y.; Gholizadeh, O.; Tabatabaie, R.; Afkhami, H.; Davodabadi, F.; farkhad, A.K.; Pahlevan, D.; et al. An Overview on Nanoparticle-Based Strategies to Fight Viral Infections with a Focus on COVID-19. *J. Nanobiotechnology* **2022**, *20*, 440, doi:10.1186/s12951-022-01625-0.
7. Bregoli, L.; Movia, D.; Gavigan-Imedio, J.D.; Lysaght, J.; Reynolds, J.; Prina-Mello, A. Nanomedicine Applied to Translational Oncology: A Future Perspective on Cancer Treatment. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 81–103, doi:10.1016/j.nano.2015.08.006.
8. M. Cardoso, M.; N. Peca, I.; C. A. Roque, A. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3103–3127, doi:10.2174/092986712800784667.
9. Chan, W.C.W.; Maxwell, D.J.; Gao, X.; Bailey, R.E.; Han, M.; Nie, S. Luminescent Quantum Dots for Multiplexed Biological Detection and Imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 40–46, doi:10.1016/S0958-1669(02)00282-3.
10. Walling, M.A.; Novak, J.A.; Shepard, J.R.E. Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 441–491, doi:10.3390/ijms10020441.
11. Brkić, S. Applicability of Quantum Dots in Biomedical Science. *Ioniz. Radiat. Eff. Appl.* **2018**, doi:10.5772/intechopen.71428.
12. Wang, H.; Yang, R.; Yang, L.; Tan, W. Wang2009.Pdf. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *3*, 19021–19027.
13. Kobori, T.; Iwamoto, S.; Takeyasu, K.; Ohtani, T. Biopolymers Volume 85 / Number 4 295. *Biopolymers* **2007**, *85*, 392–406, doi:10.1002/bip.
14. Esteve-Turrillas, F.A.; Abad-Fuentes, A. Applications of Quantum Dots as Probes in Immunosensing of Small-Sized Analytes. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 12–29, doi:10.1016/j.bios.2012.09.025.
15. Pathak, S.; Davidson, M.C.; Silva, G.A. Characterization of the Functional Binding Properties of Antibody Conjugated Quantum Dots. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1839–1845, doi:10.1021/nl062706i.
16. Umakoshi, T.; Udaka, H.; Uchihashi, T.; Ando, T.; Suzuki, M.; Fukuda, T. Quantum-Dot Antibody Conjugation Visualized at the Single-Molecule Scale with High-Speed Atomic Force Microscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *167*, 267–274, doi:10.1016/j.colsurfb.2018.04.015.
17. Huo, Q. A Perspective on Bioconjugated Nanoparticles and Quantum Dots. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2007**, *59*, 1–10, doi:10.1016/j.colsurfb.2007.04.019.

18. Foubert, A.; Beloglazova, N. V.; Rajkovic, A.; Sas, B.; Madder, A.; Goryacheva, I.Y.; De Saeger, S. Bioconjugation of Quantum Dots: Review & Impact on Future Application. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, *83*, 31–48, doi:10.1016/j.trac.2016.07.008.
19. Zhang, Y.; Clapp, A. Overview of Stabilizing Ligands for Biocompatible Quantum Dot Nanocrystals. *Sensors* **2011**, *11*, 11036–11055, doi:10.3390/s111211036.
20. Haque, E.; Kim, J.; Malgras, V.; Reddy, K.R.; Ward, A.C.; You, J.; Bando, Y.; Hossain, S.A. Recent Advances in Graphene Quantum Dots : Synthesis , Properties , and Applications. **2018**, *1800050*, 1–14, doi:10.1002/smt.201800050.
21. Wang, Y.; Hu, A. Carbon Quantum Dots : Synthesis , Properties and Applications. **2014**, 6921–6939, doi:10.1039/c4tc00988f.
22. Valizadeh, A.; Mikaeili, H.; Samiei, M.; Farkhani, S.M.; Zarghami, N. Quantum Dots : Synthesis , Bioapplications , and Toxicity. **2012**, 19–21.
23. Pu, Y.; Cai, F.; Wang, D.; Wang, J.; Chen, J. Colloidal Synthesis of Semiconductor Quantum Dots Towards Large-Scale Production : A Review. **2018**, doi:10.1021/acs.iecr.7b04836.
24. Heights, Y. S YNTHESIS AND C HARACTERIZATION OF M ONODISPERSE N ANOCRYSTALS AND C LOSE -P ACKED N ANOCRYSTAL A SSEMBLIES. **2000**, 545–610.
25. Danek, M.; Jensen, K.F.; Murray, C.B.; Bawendi, M.G. Electro spray Organometallic Chemical Vapor Deposition — A Novel Technique for Preparation of II – VI Quantum Dot Composites Electro spray Organometallic Chemical Vapor Deposition — A Novel Technique for Preparation of II – VI Quantum Dot Composites. **2012**, 2795, 1–4, doi:10.1063/1.112568.
26. Mok, J.; Eun, N.; Jun, Y.; Ho, S.; Seok, Y.; Kwon, J.; Young, C.; Rong, C.; Yeo, S. Universal Dry Synthesis and Patterning of High-Quality and -Purity Graphene Quantum Dots by Ion-Beam Assisted Chemical Vapor Deposition. *Carbon N. Y.* **2022**, *186*, 28–35, doi:10.1016/j.carbon.2021.09.071.
27. Tan, X.; Li, Y.; Li, X.; Zhou, S.; Fan, L.; Yang, S. Electrochemical Synthesis of Small-Sized Red Fluorescent Graphene Quantum Dots as a Bioimaging Platform. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2544–2546, doi:10.1039/c4cc09332a.
28. Fu, Y.; Gao, G.; Zhi, J. Electrochemical Synthesis of Multicolor Fluorescent N-Doped Graphene Quantum Dots as a Ferric Ion Sensor and Their Application in Bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 1494–1502, doi:10.1039/c8tb03103g.
29. Knittel, F.; Gravel, E.; Cassette, E.; Pons, T.; Pillon, F.; Dubertret, B.; Doris, E. On the Characterization of the Surface Chemistry of Quantum Dots. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 5075–5078, doi:10.1021/nl402192d.
30. Shao, L.; Gao, Y.; Yan, F. Semiconductor Quantum Dots for Biomedical Applications. *Sensors* **2011**, *11*, 11736–11751, doi:10.3390/s111211736.
31. Larson, D.R.; Zipfel, W.R.; Williams, R.M.; Clark, S.W.; Bruchez, M.P.; Wise, F.W.; Webb, W.W. Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science (80-.)*. **2003**, *300*, 1434–1436, doi:10.1126/science.1083780.
32. Rosenthal, S.J.; Chang, J.C.; Kovtun, O.; McBride, J.R.; Tomlinson, I.D. Biocompatible Quantum Dots for Biological Applications. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 10–24, doi:10.1016/j.chembiol.2010.11.013.
33. Etc, M.C.S.; Das C, Lucia MS, H.K. and T.J. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **2019**, *176*, 139–148, doi:10.1016/j.actbio.2019.05.022.Quantum.
34. Wagner, A.M.; Knipe, J.M.; Orive, G.; Peppas, N.A. Quantum Dots in Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 44–63, doi:10.1016/j.actbio.2019.05.022.

35. Ding, X.; Cai, M.; Liu, X.; Ding, Y.; Liu, X.; Wu, Y.; Hayat, T.; Alsaedi, A.; Dai, S. Lead Sulfide Quantum Dots as a Bifunctional Layer for Efficient and Stable All-Inorganic Cesium Lead Iodide Perovskite Solar Cells. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 13143–13148, doi:10.1002/slct.201904141.
36. Ma, Y.; Li, Y.; Zhong, X. Silica Coating of Luminescent Quantum Dots Prepared in Aqueous Media for Cellular Labeling. *Mater. Res. Bull.* **2014**, *60*, 543–551, doi:10.1016/j.materresbull.2014.08.033.
37. Yang, Y.; Jing, L.; Yu, X.; Yan, D.; Gao, M. Coating Aqueous Quantum Dots with Silica via Reverse Microemulsion Method: Toward Size-Controllable and Robust Fluorescent Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4123–4128, doi:10.1021/cm070798m.
38. Zentel, R. Polymer Coated Semiconducting Nanoparticles for Hybrid Materials. *Inorganics* **2020**, *8*, doi:10.3390/inorganics8030020.
39. Medintz, I.L.; Uyeda, H.T.; Goldman, E.R.; Mattoussi, H. Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446, doi:10.1038/nmat1390.
40. Zrazhevskiy, P.; Gao, X. Multifunctional Quantum Dots for Personalized Medicine. *Nano Today* **2009**, *4*, 414–428, doi:10.1016/j.nantod.2009.07.004.
41. Jung, S.; Chen, X. Quantum Dot–Dye Conjugates for Biosensing, Imaging, and Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1–14, doi:10.1002/adhm.201800252.
42. Irvani, S.; Varma, R.S. Green Synthesis, Biomedical and Biotechnological Applications of Carbon and Graphene Quantum Dots. A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *18*, 703–727, doi:10.1007/s10311-020-00984-0.
43. Hammami, I.; Alabdallah, N.M.; jomaa, A. Al; kamoun, M. Gold Nanoparticles: Synthesis Properties and Applications. *J. King Saud Univ. - Sci.* **2021**, *33*, doi:10.1016/j.jksus.2021.101560.
44. Bansal, S.A.; Kumar, V.; Karimi, J.; Singh, A.P.; Kumar, S. Role of Gold Nanoparticles in Advanced Biomedical Applications. *Nanoscale Adv.* **2020**, *2*, 3764–3787, doi:10.1039/d0na00472c.
45. Faulk, W.P.; Taylor, G.M. An Immunocolloid Method for the Electron Microscope. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 1081–1083, doi:10.1016/0019-2791(71)90496-4.
46. Dykman, L.A.; Khlebtsov, N.G. Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects. *Acta Naturae* **2011**, *3*, 34–55.
47. Mukherjee, P.; Bhattacharya, R.; Bone, N.; Lee, Y.K.; Patra, C.R.; Wang, S.; Lu, L.; Secreto, C.; Banerjee, P.C.; Yaszemski, M.J.; et al. Potential Therapeutic Application of Gold Nanoparticles in B-Chronic Lymphocytic Leukemia (BCLL): Enhancing Apoptosis. *J. Nanobiotechnology* **2007**, *5*, 4, doi:10.1186/1477-3155-5-4.
48. Hone, D.C.; Haines, A.H.; Russell, D.A. Rapid, Quantitative Colorimetric Detection of a Lectin Using Mannose-Stabilized Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2003**, *19*, 7141–7144, doi:10.1021/la034358v.
49. Calzolari, L.; Franchini, F.; Gilliland, D.; Rossi, F. Protein--Nanoparticle Interaction: Identification of the Ubiquitin--Gold Nanoparticle Interaction Site. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3101–3105, doi:10.1021/nl101746v.
50. Zhang, F.; Liu, J. Label-Free Colorimetric Biosensors Based on Aptamers and Gold Nanoparticles: A Critical Review. *Anal. Sens.* **2021**, *1*, 30–43, doi:10.1002/anse.202000023.
51. Larginho, M.; Baptista, P. V. Gold and Silver Nanoparticles for Clinical Diagnostics - From Genomics to Proteomics. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 2811–2823, doi:10.1016/j.jprot.2011.11.007.
52. Zhu, Z. Gold Nanoparticle Based Biosensors. *New Dev. Gold Nanomater. Res.* **2016**, *43*, 95–116.
53. Dykman, L.A.; Staroverov, S.A.; Bogatyrev, V.A.; Shchyogolev, S.Y. Adjuvant Properties of Gold

- Nanoparticles. *Nanotechnologies Russ.* **2010**, *5*, 748–761, doi:10.1134/S1995078010110029.
54. AS Thakor, J Jokerst, C Zaveleta, TF Massoud, S.G. Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients. **2015**, *25*, 713–724.
 55. Li, B.; Li, X.; Dong, Y.; Wang, B.; Li, D.; Shi, Y.; Wu, Y. Colorimetric Sensor Array Based on Gold Nanoparticles with Diverse Surface Charges for Microorganisms Identification. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 10639–10643, doi:10.1021/acs.analchem.7b02594.
 56. Lim, Z.Z.J.; Li, J.E.J.; Ng, C.T.; Yung, L.Y.L.; Bay, B.H. Gold Nanoparticles in Cancer Therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **2011**, *32*, 983–990, doi:10.1038/aps.2011.82.
 57. Derussy, B.M.; Aylward, M.A.; Fan, Z.; Ray, P.C.; Tandon, R. Inhibition of Cytomegalovirus Infection and Photothermolysis of Infected Cells Using Bioconjugated Gold Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–7, doi:10.1038/srep05550.
 58. Thambiraj, S.; Hema, S.; Ravi Shankaran, D. Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Mater. Today Proc.* **2018**, *5*, 16763–16773, doi:10.1016/j.matpr.2018.06.030.
 59. Zhang, Y.; R Nayak, T.; Hong, H.; Cai, W. Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials. *Curr. Mol. Med.* **2013**, *13*, 1633–1645.
 60. Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahn-Dechent, W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **2007**, *3*, 1941–1949, doi:10.1002/sml.200700378.
 61. Pradeep, T.; Anshup Noble Metal Nanoparticles for Water Purification: A Critical Review. *Thin Solid Films* **2009**, *517*, 6441–6478, doi:https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.03.195.
 62. Khlebtsov, N.G. Optics and Biophotonics of Nanoparticles with a Plasmon Resonance. *Quantum Electron.* **2008**, *38*, 504–529, doi:10.1070/qe2008v038n06abeh013829.
 63. Budnikov, H.C. Chemical Analysis in Medicinal Diagnostics: Evolution in Russia in 1991–2010. *J. Anal. Chem.* **2011**, *66*, 1113–1120, doi:10.1134/S1061934811110037.
 64. Rasooly, A.; Herold, K.E. Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols. Preface. *Methods Mol. Biol.* 2009, *503*, v–ix.
 65. Musick, M.D.; Keating, C.D.; Lyon, L.A.; Botsko, S.L.; Pena, D.J.; Holliway, W.D.; McEvoy, T.M.; Richardson, J.N.; Natan, M.J. Metal Films Prepared by Stepwise Assembly. 2. Construction and Characterization of Colloidal Au and Ag Multilayers. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 2869–2881, doi:10.1021/cm990714c.
 66. Shipway, A.N.; Katz, E.; Willner, I. Nanoparticle Arrays on Surfaces for Electronic, Optical, and Sensor Applications. *Chemphyschem* **2000**, *1*, 18–52, doi:10.1002/1439-7641(20000804)1:1<18::AID-CPHC18>3.0.CO;2-L.
 67. Nath, N.; Chilkoti, A. Label Free Colorimetric Biosensing Using Nanoparticles. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 377–389, doi:10.1023/b:jofl.0000031819.45448.dc.
 68. Haynes, C.; Duynes, R. Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5599–5611, doi:10.1021/jp010657m.
 69. Lyon, L.A.; Musick, M.D.; Natan, M.J. Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance Immunosensing. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5177–5183, doi:10.1021/ac9809940.
 70. Miller, M.M.; Lazarides, A.A. Sensitivity of Metal Nanoparticle Surface Plasmon Resonance to the Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 21556–21565, doi:10.1021/jp054227y.

71. Khlebtsov, B.; Melnikov, A.; Zharov, V.; Khlebtsov, N. Absorption and Scattering of Light by a Dimer of Metal Nanospheres: Comparison of Dipole and Multipole Approaches. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 1437–1445, doi:10.1088/0957-4484/17/5/045.
72. Templeton, A.C.; Pietron, J.J.; Murray, R.W.; Mulvaney, P. Solvent Refractive Index and Core Charge Influences on the Surface Plasmon Absorbance of Alkanethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 564–570, doi:10.1021/jp991889c.
73. Jason-Moller, L.; Murphy, M.; Bruno, J. Overview of Biacore Systems and Their Applications. *Curr. Protoc. protein Sci.* **2006**, *Chapter 19*, Unit 19.13, doi:10.1002/0471140864.ps1913s45.
74. Brainina, K.; Kozitsina, A.; Beikin, J. Electrochemical Immunosensor for Forest-Spring Encephalitis Based on Protein A Labeled with Colloidal Gold. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 481–485, doi:10.1007/s00216-003-1912-3.
75. Baek, T.J.; Park, P.Y.; Han, K.N.; Kwon, H.T.; Seong, G.H. Development of a Photodiode Array Biochip Using a Bipolar Semiconductor and Its Application to Detection of Human Papilloma Virus. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1373–1378, doi:10.1007/s00216-007-1814-x.
76. Mahmoud, K.A.; Luong, J.H.T. Impedance Method for Detecting HIV-1 Protease and Screening for Its Inhibitors Using Ferrocene-Peptide Conjugate/Au Nanoparticle/Single-Walled Carbon Nanotube Modified Electrode. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7056–7062, doi:10.1021/ac801174r.
77. Haes, A.J.; Chang, L.; Klein, W.L.; Van Duyne, R.P. Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2264–2271, doi:10.1021/ja044087q.
78. Simonian, A.L.; Good, T.A.; Wang, S.S.; Wild, J.R. Nanoparticle-Based Optical Biosensors for the Direct Detection of Organophosphate Chemical Warfare Agents and Pesticides. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *534*, 69–77, doi:10.1016/j.aca.2004.06.056.
79. Boghaert, E.R.; Khandke, K.M.; Sridharan, L.; Dougher, M.; DiJoseph, J.F.; Kunz, A.; Hamann, P.R.; Moran, J.; Chaudhary, I.; Damle, N.K. Determination of Pharmacokinetic Values of Calicheamicin-Antibody Conjugates in Mice by Plasmon Resonance Analysis of Small (5 Microl) Blood Samples. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *61*, 1027–1035, doi:10.1007/s00280-007-0560-2.
80. Maier, I.; Morgan, M.R.A.; Lindner, W.; Pittner, F. Optical Resonance-Enhanced Absorption-Based near-Field ImmunoChip Biosensor for Allergen Detection. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2694–2703, doi:10.1021/ac702107k.
81. Huang, T.; Nallathamby, P.D.; Xu, X.-H.N. Photostable Single-Molecule Nanoparticle Optical Biosensors for Real-Time Sensing of Single Cytokine Molecules and Their Binding Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17095–17105, doi:10.1021/ja8068853.
82. Aslan, K.; Zhang, J.; Lakowicz, J.R.; Geddes, C.D. Saccharide Sensing Using Gold and Silver Nanoparticles--a Review. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 391–400, doi:10.1023/b:jofl.0000031820.17358.28.
83. Wang, L.; Jia, X.; Zhou, Y.; Xie, Q.; Yao, S. Sandwich-Type Amperometric Immunosensor for Human Immunoglobulin G Using Antibody-Adsorbed Au/SiO₂ Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2010**, *168*, 245–251, doi:10.1007/s00604-009-0281-9.
84. de la Escosura-Muñiz, A.; Sánchez-Espinel, C.; Díaz-Freitas, B.; González-Fernández, A.; Maltez-da Costa, M.; Merkoçi, A. Rapid Identification and Quantification of Tumor Cells Using an Electrocatalytic Method Based on Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10268–10274, doi:10.1021/ac902087k.
85. Eum, N.S.; Yeom, S.H.; Kwon, D.H.; Kim, H.R.; Kang, S.W. Enhancement of Sensitivity Using Gold Nanorods-Antibody Conjugator for Detection of E. Coli O157:H7. *Sensors Actuators, B Chem.* **2010**, *143*, 784–788, doi:10.1016/j.snb.2009.09.054.

86. Zhang, J.; Atay, T.; Nurmikko, A. V Optical Detection of Brain Cell Activity Using Plasmonic Gold Nanoparticles. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 519–524, doi:10.1021/nl801891q.
87. Kennedy, L.C.; Bickford, L.R.; Lewinski, N.A.; Coughlin, A.J.; Hu, Y.; Day, E.S.; West, J.L.; Drezek, R.A. A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small* **2011**, *7*, 169–183, doi:10.1002/sml.201000134.
88. *Handbook of Photonics for Biomedical Science*; -, V.V.T.S.E., Ed.; CRC Press, 2010; ISBN 9781439806296.
89. Wilson, R. The Use of Gold Nanoparticles in Diagnostics and Detection. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2028–2045, doi:10.1039/b712179m.
90. Abraham, G.E.; Himmel, P.B. Management of Rheumatoid Arthritis: Rationale for the Use of Colloidal Metallic Gold. *J. Nutr. Environ. Med.* **1997**, *7*, 295–305, doi:10.1080/13590849762411.
91. Abraham, G.E. Clinical Applications of Gold and Silver Nanocolloids. *Orig. Internist* **2008**, *15*, 132–157.
92. Brown, C.L.; Whitehouse, M.W.; Tiekink, E.R.T.; Bushell, G.R. Colloidal Metallic Gold Is Not Bio-Inert. *Inflammopharmacology* **2008**, *16*, 133–137, doi:10.1007/s10787-007-0017-6.
93. Sani, A.; Cao, C.; Cui, D. Toxicity of Gold Nanoparticles (AuNPs): A Review. *Biochem. Biophys. reports* **2021**, *26*, 100991, doi:10.1016/j.bbrep.2021.100991.
94. Yah, C.S. The Toxicity of Gold Nanoparticles in Relation to Their Physiochemical Properties. *Biomed. Res.* **2013**, *24*, 400–413.
95. Jia, Y.P.; Ma, B.Y.; Wei, X.W.; Qian, Z.Y. The in Vitro and in Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Chinese Chem. Lett.* **2017**, *28*, 691–702, doi:10.1016/j.ccl.2017.01.021.
96. Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **2008**, *4*, 26–49, doi:10.1002/sml.200700595.
97. Yah, C.S.; Simate, G.S.; Iyuke, S.E. Nanoparticles Toxicity and Their Routes of Exposures. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2012**, *25*, 477–491.
98. Byrne, H.J.; Lynch, I.; De Jong, W.H.; Kreyling, W.G.; Loft, S.; Park, M.; Riediker, M.; Warheit, D. Protocols for Assessment of Biological Hazards of Engineered Nanomaterials. *NanoImpactNet Reports* **2010**.
99. Renault, S.; Baudrimont, M.; Mesmer-Dudons, N.; S., M.; Brisson, A. Impacts of Gold Nanoparticle Exposure on Two Freshwater Species a Phytoplanktonic Alga *Cenedesmus Subspicatus* and a Benthic Bivalve. *Gold Bull.* **2008**, *41*, 116–126.
100. Weinberg, H.; Galyean, A.; Leopold, M. Evaluating Engineered Nanoparticles in Natural Waters. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 72–83.
101. Zhrebetsky, D.; Scheele, M.; Zhang, Y.; Bronstein, N.; Thompson, C.; Britt, D.; Salmeron, M.; Alivisatos, P.; Wang, L.W. Hydroxylation of the Surface of PbS Nanocrystals Passivated with Oleic Acid. *Science (80-.)*. **2014**, *344*, 1380–1384, doi:10.1126/science.1252727.
102. Chen, Y.S.; Hung, Y.C.; Liao, I.; Huang, G.S. Assessment of the in Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 858–864, doi:10.1007/s11671-009-9334-6.
103. Paino, I.M.M.; Marangoni, V.S.; de Oliveira, R. de C.S.; Antunes, L.M.G.; Zucolotto, V. Cyto and Genotoxicity of Gold Nanoparticles in Human Hepatocellular Carcinoma and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxicol. Lett.* **2012**, *215*, 119–125, doi:10.1016/j.toxlet.2012.09.025.
104. Xia, Q.; Li, H.; Liu, Y.; Zhang, S.; Feng, Q.; Xiao, K. The Effect of Particle Size on the Genotoxicity of

- Gold Nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2017**, *105*, 710–719, doi:10.1002/jbm.a.35944.
105. Das, S.; Debnath, N.; Mitra, S.; Datta, A.; Goswami, A. Comparative Analysis of Stability and Toxicity Profile of Three Differently Capped Gold Nanoparticles for Biomedical Usage. *Biometals an Int. J. role Met. ions Biol. Biochem. Med.* **2012**, *25*, 1009–1022, doi:10.1007/s10534-012-9567-1.
 106. Piryazev, A.P.; Azizova, O.A.; Aseichev, A. V; Dudnik, L.B.; Sergienko, V.I. Effect of Gold Nanoparticles on Production of Reactive Oxygen Species by Human Peripheral Blood Leukocytes Stimulated with Opsonized Zymosan. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2013**, *156*, 101–103, doi:10.1007/s10517-013-2288-9.
 107. Mateo, D.; Morales, P.; Ávalos, A.; Haza, A.I. Oxidative Stress Contributes to Gold Nanoparticle-Induced Cytotoxicity in Human Tumor Cells. *Toxicol. Mech. Methods* **2014**, *24*, 161–172, doi:10.3109/15376516.2013.869783.
 108. Li, J.J.; Hartono, D.; Ong, C.N.; Bay, B.H.; Yung, L.Y.L. Autophagy and Oxidative Stress Associated with Gold Nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5996–6003, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.014.
 109. Khan, H.A.; Abdelhalim, M.A.K.; Al-Ayed, M.S.; Alhomida, A.S. Effect of Gold Nanoparticles on Glutathione and Malondialdehyde Levels in Liver, Lung and Heart of Rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *19*, 461–464, doi:10.1016/j.sjbs.2012.06.005.
 110. Caballero-Díaz, E.; Valcárcel, M. *Toxicity of Gold Nanoparticles*; 2014; Vol. 66; ISBN 9780444632852.
 111. CHUSED, T.M. 20 - Flow Cytometric Measurements of Physiologic Cell Responses. In; KOHEN, E.B.T.-C.S. and F. by M., Ed.; Academic Press, 1989; pp. 377–389 ISBN 978-0-12-417760-4.
 112. Nicholson, L.B. The Immune System. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 275–301.
 113. Litman, G.W.; Rast, J.P.; Shambloot, M.J.; Haire, R.N.; Hulst, M.; Roess, W.; Litman, R.T.; Hinds-Frey, K.R.; Zilch, A.; Amemiya, C.T. Phylogenetic Diversification of Immunoglobulin Genes and the Antibody Repertoire. *Mol. Biol. Evol.* **1993**, *10*, 60–72.
 114. Hoffman, W.; Lakkis, F.G.; Chalasani, G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *11*, 137–154.
 115. Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D.L.; King, K.; Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 1–26, doi:10.1002/jps.20727.
 116. Mótyán, J.A.; Tóth, F.; Tózsér, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* **2013**, *3*, 923–942, doi:10.3390/biom3040923.
 117. NORMAN, P. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*; 1995; Vol. 96;.
 118. Chiu, M.L.; Goulet, D.R.; Teplyakov, A.; Gilliland, G.L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* **2019**, *8*, 1–78, doi:10.3390/antib8040055.
 119. Burton, D.R.; Williamson, R.A.; Parren, P.W.H.I. Antibody and Virus: Binding and Neutralization. *Virology* **2000**, *270*, 1–3, doi:10.1006/viro.2000.0239.
 120. Lee, C.Y.; Herant, M.; Heinrich, V. Target-Specific Mechanics of Phagocytosis: Protrusive Neutrophil Response to Zymosan Differs from the Uptake of Antibody-Tagged Pathogens. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 1106–1114, doi:10.1242/jcs.078592.
 121. Daha, N.A.; Banda, N.K.; Roos, A.; Beurskens, F.J.; Bakker, J.M.; Daha, M.R.; Trouw, L.A. Complement Activation by (Auto-) Antibodies. *Mol. Immunol.* **2011**, *48*, 1656–1665, doi:10.1016/j.molimm.2011.04.024.
 122. Behar, G.; Sibénil, S.; Groulet, A.; Chames, P.; Pugnière, M.; Boix, C.; Sautès-Fridman, C.; Teillaud,

- J.L.; Baty, D. Isolation and Characterization of Anti-Fc γ RIII (CD16) Llama Single-Domain Antibodies That Activate Natural Killer Cells. *Protein Eng. Des. Sel.* **2008**, *21*, 1–10, doi:10.1093/protein/gzm064.
123. Grindstaff, J.L.; Brodie, E.D.; Ketterson, E.D. Immune Function across Generations: Integrating Mechanism and Evolutionary Process in Maternal Antibody Transmission. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2003**, *270*, 2309–2319, doi:10.1098/rspb.2003.2485.
 124. Tetin, S.; Stroupe, S. Antibodies in Diagnostic Applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2005**, *5*, 9–16, doi:10.2174/1389201043489602.
 125. Wingren, C.; Alkner, U.; Hansson, U. Antibody Classes. *eLS* **2005**, 1–8, doi:10.1038/npg.els.0003985.
 126. Lorin, V.; Mouquet, H. Efficient Generation of Human IgA Monoclonal Antibodies. *J. Immunol. Methods* **2015**, *422*, 102–110, doi:10.1016/j.jim.2015.04.010.
 127. Sutton, B.J.; Davies, A.M.; Bax, H.J.; Karagiannis, S.N. IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies* **2019**, *8*, doi:10.3390/antib8010019.
 128. Gutzeit, C.; Chen, K.; Cerutti, A. The Enigmatic Function of IgD: Some Answers at Last. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 1101–1113, doi:10.1002/eji.201646547.
 129. Francis, J.E.; Mason, D.; Lévy, R. Evaluation of Quantum Dot Conjugated Antibodies for Immunofluorescent Labelling of Cellular Targets. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2017**, *8*, 1238–1249, doi:10.3762/bjnano.8.125.
 130. Sahoo, S.L.; Liu, C.H.; Kumari, M.; Wu, W.C.; Wang, C.C. Biocompatible Quantum Dot-Antibody Conjugate for Cell Imaging, Targeting and Fluorometric Immunoassay: Crosslinking, Characterization and Applications. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 32791–32803, doi:10.1039/c9ra07352c.
 131. Popov, A.; Brasiunas, B.; Kausaite-Minkstimiene, A.; Ramanaviciene, A. Metal Nanoparticle and Quantum Dot Tags for Signal Amplification in Electrochemical Immunosensors for Biomarker Detection. *Chemosensors* **2021**, *9*, doi:10.3390/chemosensors9040085.
 132. Baniukevic, J.; Hakki Boyaci, I.; Goktug Bozkurt, A.; Tamer, U.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Magnetic Gold Nanoparticles in SERS-Based Sandwich Immunoassay for Antigen Detection by Well Oriented Antibodies. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 281–288, doi:10.1016/j.bios.2012.12.014.
 133. Dvorakova, V.; Cadkova, M.; Datinska, V.; Kleparnik, K.; Foret, F.; Bilkova, Z.; Korecka, L. An Advanced Conjugation Strategy for the Preparation of Quantum Dot-Antibody Immunoprobes. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 1991–1997, doi:10.1039/c6ay03322a.
 134. Jampasa, S.; Siangproh, W.; Laocharoensuk, R.; Vilaivan, T.; Chailapakul, O. Electrochemical Detection of C-Reactive Protein Based on Anthraquinone-Labeled Antibody Using a Screen-Printed Graphene Electrode. *Talanta* **2018**, *183*, 311–319, doi:10.1016/j.talanta.2018.02.075.
 135. Kausaite-Minkstimiene, A.; Ramanaviciene, A.; Kirlyte, J.; Ramanavicius, A. Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6401–6408, doi:10.1021/ac100468k.
 136. Fatima, I.; Rahdar, A.; Sargazi, S.; Barani, M.; Hassanisaadi, M. Quantum Dots : Synthesis , Antibody Conjugation , and HER2-Receptor Targeting for Breast Cancer Therapy. **2021**.
 137. Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*; Academic press, 2013; ISBN 0123822408.
 138. Makaraviciute, A.; Ramanaviciene, A. Site-Directed Antibody Immobilization Techniques for Immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 460–471, doi:10.1016/j.bios.2013.06.060.
 139. Makaraviciute, A.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Development of a Reusable Protein G Based SPR Immunosensor for Direct Human Growth Hormone Detection in Real Samples. *Anal. Methods* **2015**,

- 7, 9875–9884, doi:10.1039/c5ay01651g.
140. Bodanszky, A.; Bodanszky, M. Sepharose-Avidin Column for the Binding of Biotin or Biotin-Containing Peptides. *Experientia* **1970**, *26*, 327, doi:10.1007/BF01900128.
 141. Deng, L.; Kitova, E.N.; Klassen, J.S. Dissociation Kinetics of the Streptavidin-Biotin Interaction Measured Using Direct Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24*, 49–56, doi:10.1007/s13361-012-0533-5.
 142. Melnyk, O.; Duburcq, X.; Olivier, C.; Urbès, F.; Auriault, C.; Gras-Masse, H. Peptide Arrays for Highly Sensitive and Specific Antibody-Binding Fluorescence Assays. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 713–720, doi:10.1021/bc015584o.
 143. Quash, G.; Roch, A.-M.; Niveleau, A.; Grange, J.; Keolouangkhot, T.; Huppert, J. THE PREPARATION OF LATEX PARTICLES WITH COVALENTLY Alipathic Amine Substitution. *J. Immunol. Methods* **1978**, *22*, 165–174.
 144. Ruiz, G.; Tripathi, K.; Okyem, S.; Driskell, J.D. PH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 1182–1191, doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00123.
 145. Spring, F.A.; Dalchau, R.; Daniels, G.L.; Mallinson, G.; Judson, P.A.; Parsons, S.F.; Fabre, J.W.; Anstee, D.J. The Ina and Inb Blood Group Antigens Are Located on a Glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 Glycoprotein) Whose Expression Is Influenced by the In(Lu) Gene. *Immunology* **1988**, *64*, 37–43.
 146. Senbanjo, L.T.; Chellaiah, M.A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front. cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 18, doi:10.3389/fcell.2017.00018.
 147. Wang, S.J.; Wong, G.; de Heer, A.-M.; Xia, W.; Bourguignon, L.Y.W. CD44 Variant Isoforms in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. *Laryngoscope* **2009**, *119*, 1518–1530, doi:10.1002/lary.20506.
 148. Pattnaik, P. Surface Plasmon Resonance: Applications in Understanding Receptor-Ligand Interaction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *126*, 79–92, doi:10.1385/abab:126:2:079.
 149. Zeng, S.; Baillargeat, D.; Ho, H.P.; Yong, K.T. Nanomaterials Enhanced Surface Plasmon Resonance for Biological and Chemical Sensing Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3426–3452, doi:10.1039/c3cs60479a.
 150. Wood, R.W. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proc. Phys. Soc. London* **1901**, *18*, 269–275, doi:10.1088/1478-7814/18/1/325.
 151. Canovi, M.; Lucchetti, J.; Stravalaci, M.; Re, F.; Moscatelli, D.; Bigini, P.; Salmona, M.; Gobbi, M. Applications of Surface Plasmon Resonance (SPR) for the Characterization of Nanoparticles Developed for Biomedical Purposes. *Sensors (Switzerland)* **2012**, *12*, 16420–16432, doi:10.3390/s121216420.
 152. Zukauskas, S.; Rucinskiene, A.; Ratautaite, V.; Ramanaviciene, A.; Pilvenyte, G.; Bechelany, M.; Ramanavicius, A. Electrochemical Biosensor for the Determination of Specific Antibodies against SARS-CoV-2 Spike Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24010718.
 153. Masters, P.S. Coronavirus Genomic RNA Packaging. *Virology* **2019**, *537*, 198–207, doi:https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.031.
 154. Batra, I.; Hamatta, H.S.A.; Malik, A.; Baz, M.; Albogamy, F.R.; Goyal, V.; Alshamrani, S.S. LLSFIoT: Lightweight Logical Security Framework for Internet of Things. *Wirel. Commun. Mob. Comput.* **2021**, *2021*, 8526206, doi:10.1155/2021/8526206.
 155. Drobysh, M.; Ramanaviciene, A.; Viter, R.; Ramanavicius, A. Affinity Sensors for the Diagnosis of

COVID-19. *Micromachines* **2021**, *12*, doi:10.3390/mi12040390.

156. Guevara-Hoyer, K.; Fuentes-Antrás, J.; la Fuente-Muñoz, E.; de la Peña, A.; Viñuela, M.; Cabello-Clotet, N.; Estrada, V.; Culebras, E.; Delgado-Iribarren, A.; Martínez-Novillo, M.; et al. Serological Tests in the Detection of SARS-CoV-2 Antibodies. *Diagnostics* **2021**, *11*, doi:10.3390/diagnostics11040678.
157. Dobaño, C.; Santano, R.; Jiménez, A.; Vidal, M.; Chi, J.; Rodrigo Melero, N.; Popovic, M.; López-Aladid, R.; Fernández-Barat, L.; Tortajada, M.; et al. Immunogenicity and Crossreactivity of Antibodies to the Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: Utility and Limitations in Seroprevalence and Immunity Studies. *Transl. Res.* **2021**, *232*, 60–74, doi:10.1016/j.trsl.2021.02.006.
158. Burbelo, P.D.; Riedo, F.X.; Morishima, C.; Rawlings, S.; Smith, D.; Das, S.; Strich, J.R.; Chertow, D.S.; Davey Jr, R.T.; Cohen, J.I. Sensitivity in Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* **2020**, *222*, 206–213, doi:10.1093/infdis/jiaa273.
159. Kausaite-Minkstimiene, A.; Popov, A.; Ramanaviciene, A. Surface Plasmon Resonance Immunosensor with Antibody-Functionalized Magnetoplasmonic Nanoparticles for Ultrasensitive Quantification of the CD5 Biomarker. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, doi:10.1021/acsami.2c02936.
160. Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G.M. A Strategy for the Generation of Surfaces. Pdf. **1999**, *71*, 777–790.
161. Schwartz, D.K. MECHANISMS AND KINETICS OF SELF-ASSEMBLED MONOLAYER FORMATION. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 107–137, doi:10.1146/annurev.physchem.52.1.107.
162. RIZZO, H.F.; BIDWELL, L.R. Formation and Structure of SiB₄. *J. Am. Ceram. Soc.* **1960**, *43*, 550–552, doi:10.1111/j.1151-2916.1960.tb13612.x.
163. Jadhav, S. Self-Assembled Monolayers (SAMs) of Carboxylic Acids: An Overview. **2011**, *9*, 369–378, doi:doi:10.2478/s11532-011-0024-8.
164. Parracino, M.A.; Martín, B.; Grazú, V. Chapter 9 - State-of-the-Art Strategies for the Biofunctionalization of Photoactive Inorganic Nanoparticles for Nanomedicine. In *Micro and Nano Technologies*; Prieto, J.P., Béjar, M.G.B.T.-P.I.N., Eds.; Elsevier, 2019; pp. 211–257 ISBN 978-0-12-814531-9.
165. Maadi, H.; Nami, B.; Wang, Z. Dimerization Assessment of Epithelial Growth Factor Family of Receptor Tyrosine Kinases by Using Cross-Linking Reagent. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1652*, 101–108, doi:10.1007/978-1-4939-7219-7_6.
166. Liu, B.R.; Huang, Y.W.; Chiang, H.J.; Lee, H.J. Cell-Penetrating Peptide-Functionalized Quantum Dots for Intracellular Delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 7897–7905, doi:10.1166/jnn.2010.3012.
167. Zrazhevskiy, P.; True, L.D.; Gao, X. Multicolor Multicycle Molecular Profiling with Quantum Dots for Single-Cell Analysis. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1852–1869, doi:10.1038/nprot.2013.112.
168. Yakovlev, A.A. Crosslinkers and Their Utilization for Studies of Intermolecular Interactions. *Neurochem. J.* **2009**, *3*, 139–144, doi:10.1134/S181971240902010X.
169. Terryi, D.D.; Sarma, A.; Silverton, E.W.; From, W.; Biology, M.; Institutes, M.; Branch, I.; Institutes, N. Human Three-Dimensional Immunoglobulin Structure at 6 Å Resolution Molecule. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3753–3759, doi:10.1016/S0021-9258(18)62192-1.
170. Del Caño, R.; Gisbert-González, J.M.; González-Rodríguez, J.; Sánchez-Obrero, G.; Madueño, R.; Blázquez, M.; Pineda, T. Effective Replacement of Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) by Mercaptoalkanoic Acids on Gold Nanorod (AuNR) Surfaces in Aqueous Solutions. *Nanoscale* **2020**, *12*, 658–668, doi:10.1039/c9nr09137h.

171. Bhardwaj, H.; Sumana, G.; Marquette, C.A. A Label-Free Ultrasensitive Microfluidic Surface Plasmon Resonance Biosensor for Aflatoxin B1 Detection Using Nanoparticles Integrated Gold Chip. *Food Chem.* **2020**, *307*, 125530, doi:10.1016/j.foodchem.2019.125530.
172. Dewi, M.R.; Laufersky, G.; Nann, T. A Highly Efficient Ligand Exchange Reaction on Gold Nanoparticles: Preserving Their Size, Shape and Colloidal Stability. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 34217–34220, doi:10.1039/c4ra05035e.
173. Hodge, C.D.; Rosenberg, D.J.; Grob, P.; Wilamowski, M.; Joachimiak, A.; Hura, G.L.; Hammel, M. Rigid Monoclonal Antibodies Improve Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein. *MAbs* **2021**, *13*, doi:10.1080/19420862.2021.1905978.