



VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZIKINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRO CHEMIJOS
INSTITUTAS

JUSTINA RUKŠNAITĖ

**PAVIRŠIAUS PLAZMONŲ REZONANSO IR ELEKTROCHEMINIAI IMUNINIAI
JUTIKLIAI ŽMOGAUS AUGIMO HORMONO IR ANTIKŪNŲ PRIEŠ ŽMOGAUS
AUGIMO HORMONĄ NUSTATYMOI**

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

VILNIUS, 2014 metai

Disertacija rengta 2009 – 2013 metais Vilniaus universitete, Chemijos fakultete,
Analizinėje ir aplinkos chemijos katedroje.

Mokslinis vadovas:

Doc. dr. Asta Kaušaitė-Minkštimienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, chemija –
03P)

TURINYS

SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1 BIOLOGINIAI JUTIKLIAI	12
1.2 BIOLOGINIŲ MEDŽIAGŲ IMOBILIZAVIMAS	15
1.2.1 Paviršiai.....	15
1.2.2 Imobilizavimo būdai.....	18
1.3 ANTIKŪNAS – BIOLOGINIO JUTIKLIO KOMPONENTAS	25
1.3.1 Struktūra	26
1.3.2 Antikūnų fragmentai.....	29
1.4 ANTIGENAS – ŽMOGAUS AUGIMO HORMONAS	30
1.5 OPTINIAI IMUNINIAI JUTIKLIAI.....	34
1.5.1 PPR imuniniai jutikliai.....	34
1.6 ELEKTROCHEMINIAI IMUNINIAI JUTIKLIAI	39
1.6.1 Voltamperometriniai imuniniai jutikliai	39
1.7 PPR DETEKCIJOS BŪDAI	43
1.7.1 Tiesioginė detekcija.....	44
1.7.2 Daugiapakopė detekcija	45
1.7.3 Konkurencinis (pakaitinis) metodas	46
1.8 IMUNINIŲ JUTIKLIŲ PRITAIKOMUMAS.....	47
1.8.1 Komerciniai imuniniai jutikliai.....	47
1.8.2 Klinikinė diagnostika.....	47

1.8.3	<i>Maisto produktų analizė</i>	49
1.8.4	<i>Sprogstamųjų medžiagų likučių paieška</i>	49
2.	EKSPERIMENTO METODIKA	51
2.1	PRIETAISAI IR PRIEMONĖS	51
2.2	MEDŽIAGOS IR REAGENTAI.....	51
2.3	METODIKA	52
2.3.1	<i>Antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną redukavimas</i>	52
2.3.2	<i>Antikūnų fragmentų charakterizavimas</i>	52
2.3.3	<i>PPR jutiklio lusto valymas</i>	53
2.3.4	<i>Savitvarkio monosluoksnio suformavimas PPR jutiklio lusto paviršiuje</i>	53
2.3.5	<i>MUR monosluoksniu arba KMD hidrogeliu modifikuoto jutiklio lusto paruošimas modifikavimui biologiškai aktyviomis medžiagomis..</i>	53
2.3.6	<i>ŽAH arba anti-ŽAH imobilizavimas MUR monosluoksniu arba KMD hidrogeliu modifikuoto jutiklio paviršiuje</i>	54
2.3.7	<i>Baltymo G imobilizavimas PPR jutiklio lusto paviršiuje</i>	54
2.3.8	<i>Anti-ŽAH imobilizavimas baltymu G modifikuoto PPR jutiklio lusto paviršiuje</i>	55
2.3.9	<i>Aktyvaus paviršiaus dezaktyvavimas</i>	55
2.3.10	<i>Frag-anti-ŽAH imobilizavimas jutiklio paviršiuje</i>	55
2.3.11	<i>Modifikuoto PPR jutiklio lusto paviršiaus regeneravimas</i>	56
2.3.12	<i>PPR analizatoriaus paruošimas darbui</i>	56
2.3.13	<i>Elektrocheminiai matavimai</i>	57
2.3.14	<i>Atominės jėgų mikroskopijos analizė (PPR lusto analizė)</i>	57
2.3.15	<i>Matavimų duomenų apibendrinimas</i>	58
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	59

3.1 ANTI-ŽAH IMOBILIZAVIMAS PPR JUTIKLIO LUSTO PAVIRŠIUJE	59
3.2 ANTI-ŽAH REDUKAVIMAS IR FRAG-ANTI-ŽAH IMOBILIZAVIMA	64
3.3 IMOBILIZUOTŲ ANTIKŪNŲ IR ANTIGENO SĄVEIKOS TYRIMAS	69
3.4 FRAG-ANTI-ŽAH IR ŽAH KOMPLEKSO FORMAVIMOSI TYRIMAS	73
3.5 AJM ANALIZĖ.....	76
3.6 OPTIMALIŲ SĄLYGŲ PARINKIMAS ŽAH NUSTATYMOI	78
3.7 ŽAH IMOBILIZAVIMO PPR JUTIKLIO LUSTO PAVIRŠIUJE TYRIMAS.....	84
3.8 SĄVEIKOS TARP IMOBILIZUOTO ŽAH, ANTI-ŽAH IR ANTRINIO ANTIKŪNO ŽYMĖTO KRIENŲ PEROKSIDAZE (ANTI-ŽAH-KP) TYRIMAS.....	86
3.9 EL TYRIMŲ SĄLYGŲ OPTIMIZAVIMAS	90
3.10 PPR IR EL METODŲ PALYGINIMAS.....	94
3.11 ANTI-ŽAH NUSTATYMAS REALIUOSE MĖGINIUOSE	96
IŠVADOS	98
AUTORIAUS MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	100
KONFERENCIJŲ TEZĖS.....	100
PADĖKOS.....	102
LITERATŪROS SĄRAŠAS	103

SANTRUMPOS

2-MEA – 2-merkaptoetilaminas;

Ak – antikūnas;

anti-ŽAH – antikūnai prieš žmogaus augimo hormoną;

anti-ŽAH/KP – antikūnai prieš žmogaus augimo hormoną modifikuoti krienų peroksidaze;

anti-ŽAH/ŽAH – antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną ir žmogaus augimo hormono imuninis kompleksas;

anti-ŽSA – antikūnai prieš žmogaus serumo albuminą;

bA – baltymas A;

BAM – biologinio atpažinimo medžiaga;

bG – baltymas G;

EDS – *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimido hidrochloridas;

EL – elektrocheminė analizė;

IFA – imunofermentinė analizė;

F(ab')₂ – antikūno molekulės fragmentas, atpažįstatntisir sujungiantis du antigenus;

Fab – antikūno molekulės fragmentas;

Fc – antikūno molekulės efektorinė sritis;

frag-anti-ŽAH – redukuoti antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną fragmentai;

hCG – žmogaus choriongonadotropinas;

IgG – imunoglobulinų klasė;

JSA – jaučio serumo albuminas;

KAH – kiaulės augimo hormonas;

KMD – karboksimetildekstrano hidrogelis;

LB – Langmuir-Blodgett plėvelių metodika;

MUR – merkaptoundekano rūgštis;

NHS – *N*-hidroksisukcinimidas;

PBS– fosfatinis buferinis tirpalas;

PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas;

SDS – natrio dodecilsulfatas;

SDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;

SMS – savitvarkis monosluoksnis;

TMB–3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas;

ŽAH – žmogaus augimo hormonas;

ŽSA – žmogaus serumo albuminas.

IVADAS

Imuniniai jutikliai naudojami jau daugiau nei tris dešimtmečius ir susidomėjimas jais vis didėja dėl plataus šių jutiklių pritaikomumo įvairiose srityse, tokiose kaip klinikinė diagnostika [1, 2, 3], maisto produktų analizė [4], aplinkos taršos tyrimai [5, 6] ar net sprogstamųjų medžiagų likučių paieška [7]. Analizių nustatymui biomedicinoje naudojami įvairūs analizės metodai: elektrocheminiai (EL) [8], chemoluminescenciniai [9], elipsometriniai [10], pjezoelektriniai [11], paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) [12] ir kt. Šie metodai skiriasi jautriu, atrankumu, metodikos bei aparatūros sudėtingumu, analizės trukme ir kaina. Pagrindiniai reikalavimai keliami imuniniams jutikliams yra atrankumas, trumpa analizės trukmė, geras signalo stabilumas ir atsikartojamumas bei didelis jautris, kuris gali būti pasiektas naudojant tiesioginį ar netiesioginį (reikalingi papildomi reagentai) analitės nustatymo būdą. Dažnai vienu analizės metodu pagrįstos analizinės sistemos pasižymi sąlyginai mažu ar nepakankamu jautriu analizei. Viena iš galimybių padidinti imuninių jutiklių jautrį yra kelių skirtingų analizės metodų sujungimas. Analizės metu užregistruotas analizinis signalas praplės imuninio jutiklio detekcijos galimybes, nes leis patvirtinti analitės buvimą ir jos koncentraciją mėginyje skirtingais analizės metodais, suteiks daugiau informacijos apie imuninio komplekso susidarymo kinetiką, bei užtikrins rezultatų patikimumą.

Tiriamą antikūno-antigeno sąveiką labai perspektyvūs yra PPR imuniniai jutikliai [13]. Lyginant su tradiciniais metodais, PPR imuniniai jutikliai turi keletą privalumų: nėra būtinybės papildomai žymėti sąveikaujančių molekulių, analitės detektavimas atliekamas realiu laiku, daugeliu atvejų nėra būtinybės ruošti mėginio prieš analizę, pakanka labai mažo mėginio kiekio, nustatomos tik tos analitės, kurios atrankiai sąveikauja su PPR jutiklio paviršiuje imobilizuota biologinio atpažinimo medžiaga (BAM). PPR imuniniai jutikliai, sėkmingai

parinkus susidariusio antikūno-antigeno komplekso disociacijos sąlygas, daugeliu atvejų gali būti naudojami net kelioms dešimtims matavimų iš naujo neimobilizuojant BAM [14, 15, 16]. Imuninio jutiklio jautris labai priklauso nuo imobilizuoto antikūno kiekio ir tinkamos jo orientacijos jutiklio paviršiuje. Antikūnus imobilizavus kryptingai, jutikliai pasižymi didesniu jautriu ir stabilumu. Be to, jais galima nustatyti mažesnes analičių koncentracijas [17].

Darbo tikslas:

Sukurti paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) ir elektrocheminius imuninius jutiklius žmogaus augimo hormono (ŽAH) ir antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną (anti-ŽAH) nustatymui bei pritaikyti juos realių mėginių analizei.

Darbo uždaviniai:

1. Imobilizuoti anti-ŽAH PPR jutiklio lusto paviršiuje keliais skirtingais imobilizavimo būdais ir įvertinti imobilizuotų antikūnų gebėjimą sąveikauti su ŽAH.
2. Suradus tinkamiausią anti-ŽAH imobilizavimo būdą, parinkti optimalias sąlygas imobilizavimui.
3. Ištirti ir įvertinti PPR imuninių jutiklių ŽAH ir anti-ŽAH koncentracijos nustatymo intervalą, aptikimo ribą, atrankumą, analizinio signalo atsikartojamumą ir stabilumą.
4. Nustatyti optimalias anti-ŽAH nustatymo sąlygas impulsinės amperometrijos (PA) ir ciklinės voltamperometrijos (CV) analizės metodais.
5. Ištirti ir įvertinti PA ir CV imuninių jutiklių anti-ŽAH koncentracijos nustatymo intervalą, aptikimo ribą ir analizinio signalo atsikartojamumą.
6. Patikrinti sukurtų imuninių jutiklių veikimą realiuose žmogaus serumo mėginiuose.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

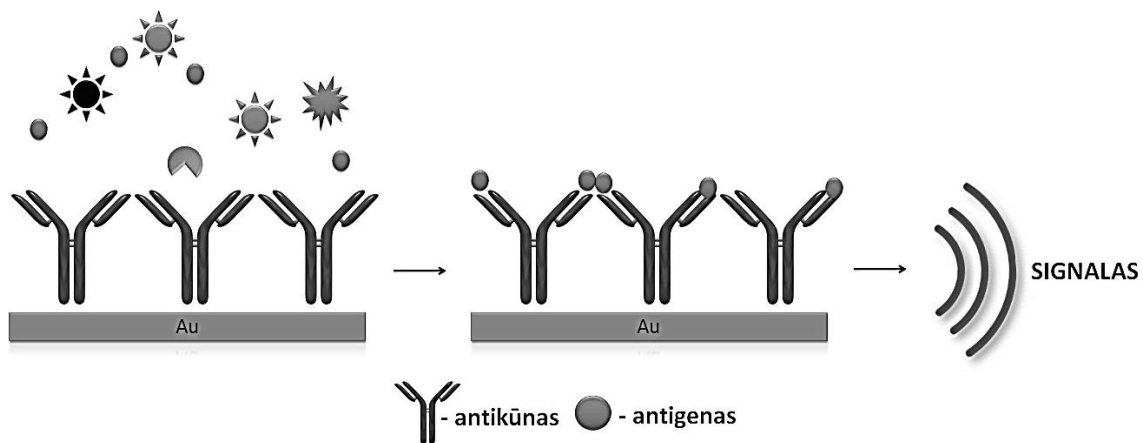
1. Kryptingas antikūnų imobilizavimas padidina PPR imuninio jutiklio jautrinustatant ŽAH.
2. Netiesioginio nustatymo formatas padidina PPR imuninio jutiklio jautrį nustatant anti-ŽAH.

3. Sukurti imuniniai jutikliai pasižymi geru atrankumu, analizinio signalo atsikartojamumu ir stabilumu bei pakankamu jautriu.
4. Sukurti imuniniai jutikliai yra tinkami realių mėginių analizei.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 *Biologiniai jutikliai*

Biologinis jutiklis – tai daugiakomponentė analizinė sistema, susidedanti iš BAM, signalo keitiklio ir signalą registruojančio įrenginio. Signalo keitiklio paviršiuje imobilizuota BAM atrankiai sąveikauja su tirpale esančia nustatoma medžiaga – analite, o dėl jų sąveikos atsiradęs signalas perduodamas signalo keitikliui [18]. Ši biologinės sistemos signalą keitiklis paverčia lengvai išmatuojamu (pvz.: lūžio rodiklio, masės, paviršiaus tankio ar elektrinio potencialo pokyčiu), proporcingu nustatomos medžiagos koncentracijai [19, 20, 21, 22]. Biologinio jutiklio veikimo principą iliustruoja 1 paveikslas, vaizduojantis signalo keitiklio paviršiuje imobilizuotą antikūną atrankiai sąveikaujantį tik su jam giminingu antigenu. Susidarius antikūno-antigeno kompleksui registruojamas analizinis signalas.



1 pav. Principinė biologinio jutiklio veikimo schema.

Biologiniuose jutikliuose naudojamos įvairios BAM: baltymai [23], ląstelių receptoriai [24], nukleorūgštys [25], mikroorganizmai [26], minėti antikūnai ar jų fragmentai [10, 27]. Taip pat naudojami ir įvairių tipų signalo keitikliai: optiniai

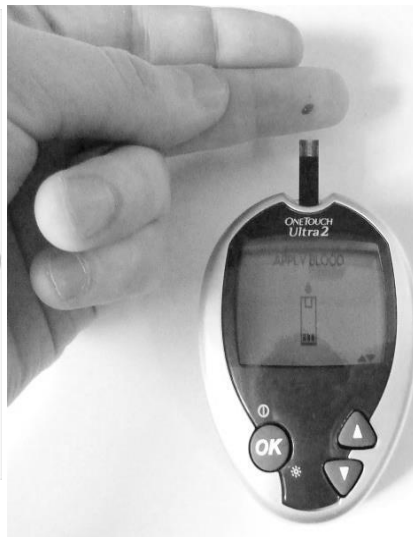
[13], elektrocheminiai [28, 29] ar piezoelektriniai [11]. Pvz., cheminių jutiklių esminis principas yra tai, kad daugumos cheminių reakcijų metu susidaro arba susinaudoja jonai arba elektronai, o tai, savo ruožtu, lemia tam tikrą analizuojamo tirpalo elektrinių savybių pokytį, kuris gali būti registruojamas ir naudojamas analiziniu signalu [30]. Minėtasis elektrinių savybių pokytis atsiranda dėl įvairių sistemos fizikinių savybių pokyčių arba dėl sistemoje vykstančių cheminių reakcijų.

Pirmieji fermentiniai biologiniai jutikliai literatūroje aprašyti 1962 metais [31]. Idėja biologiniuose jutikliuose BAM naudoti imunologinius komponentus literatūroje paminėta dar anksčiau: 1959 metais aprašytas jutiklis, skirtas nustatyti žmogaus insulinui kraujo plazmoje [32]. Biologiniai jutikliai, kuriuose BAM yra antikūnai – vadinami imuniniais jutikliais. 1972 metais sukonstruotas pirmasis komercinis imuninis jutiklis – nėštumo testas, skirtas nustatyti žmogaus choriongonadotropinui (hCG) šlapime (2 pav. A) [33].

A)



B)

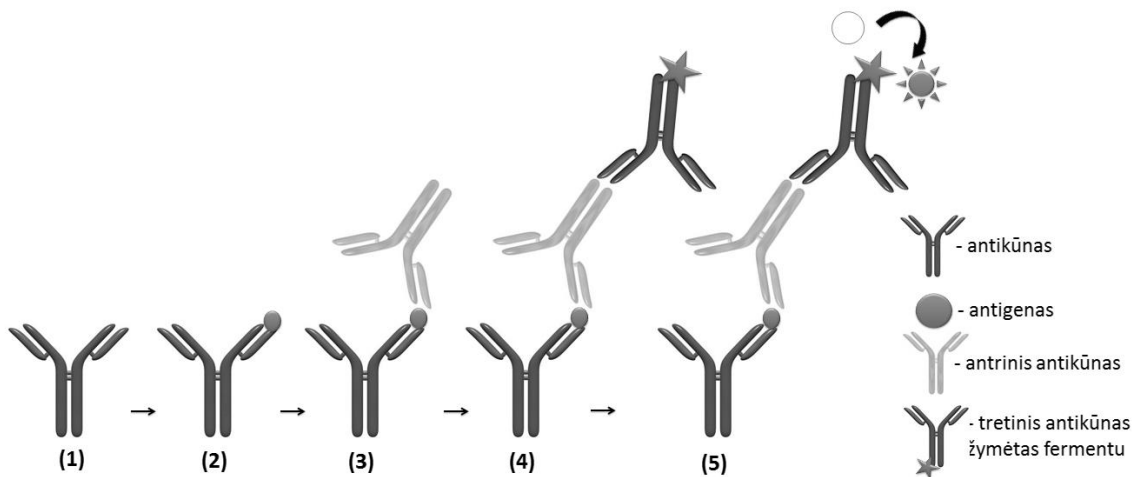


2 pav. Biologinių jutiklių pavyzdžiai: (A) įvairių tipų biologiniai jutikliai (nėštumo testas hCG nustatymui šlapime), (B) invazinio tipo biologinis jutiklis (gliukozės kiekio kraujyje nustatymui).

Pagrindiniai reikalavimai keliami imuniniams jutikliams yra atrankumas, didelis stabilumas ir jautris, trumpa analizės trukmė, maža kaina ir galimybė ta

pačia analizine sistema atlikti daug matavimų. Visus šiuos reikalavimus tenkina tiesioginio ar netiesioginio analizės nustatymo būdai [34]. Tiesioginio analizės nustatymo metu registruojama antikūno ir antigeno sąveika be jokios pagalbinės medžiagos. Tuo tarpu nustatant analizės netiesioginiu būdu reikalingos papildomos medžiagos – žymenys. Jais gali būti, pavyzdžiui, šermentai ar nanodalelės [35], kuriais modifikuoti antriniai antikūnai.

Vienas iš netiesioginės analizės pavyzdžių yra plačiai naudojama tvirtafazė imunofermentinė analizė – IFA (*angl. ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay*) [36] (3 pav.). Tai daugiapakopė analizė, kurios metu siekiant nustatyti ar formuojasi antikūno-antigeno kompleksas naudojami antriniai antikūnai žymėti fermentu [37, 38, 39].



3 pav. Principinė penkių etapų IFA schema: (1) ant IFA lėkštelės imobilizuoti priminiai antikūnai, (2) antikūno ir antigeno sąveika, (3) antigeno sąveika su antriniais antikūnais, (4) antrinių antikūnų sąveiką su tretiniais antikūnais žymėtai fermentu, (5) fermentinės reakcijos analizinio signalo registravimas.

Dar vienas svarbus aspektas, kuriant biologinius jutiklius, yra mėginio paėmimas, kuris gali būti invazinis (kraujas ir įvairūs audiniai) (2 pav. B) arba neinvazinis (šlapimas, prakaitas ar seilės) (2 pav. A). Jei taikomas invazinis mėginio paėmimo būdas, tai reikalingas mėginio kiekis turi būti minimalus. Pvz., plačiai naudojamam gliukozės jutikliui reikalingas minimalus kraujo tūris yra 0,3 μ L [40], o tokioms analizėms kaip baltymai nuo 1 μ L ir daugiau. Mažinant

įrenginio (biologinio jutiklio) dydį, automatiškai galima sumažinti ir mėginio tūrį, tuo pačiu sumažėja ir „skausmo faktorius“ bei analizės kaina.

1.2 *Biologinių medžiagų imobilizavimas*

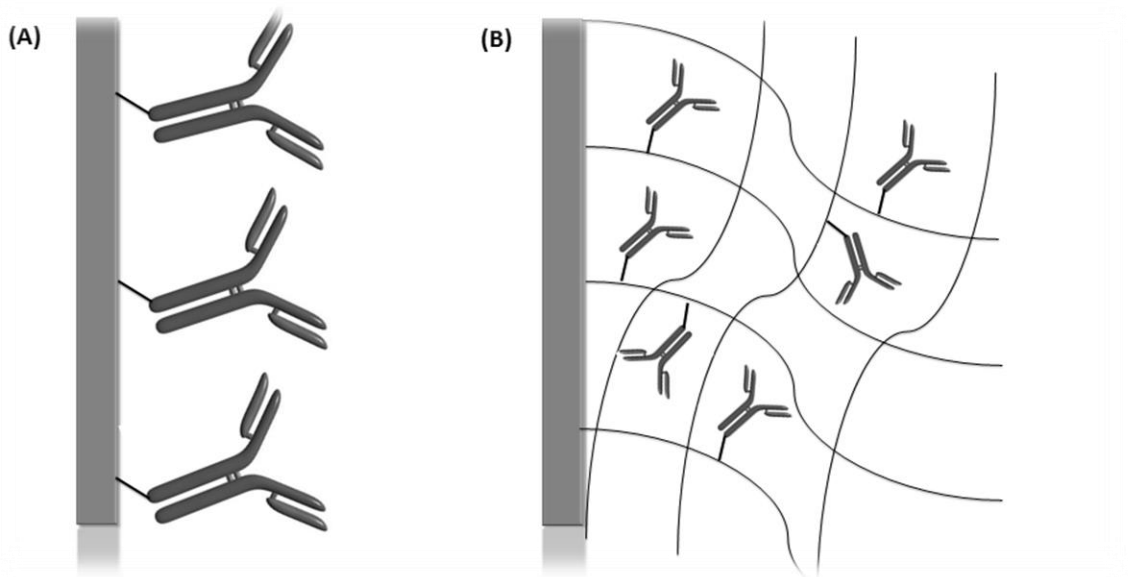
Imobilizavimas gali būti įvardintas kaip molekulės prijungimas prie kieto paviršiaus, pilnai arba dalinai apribojant molekulės mobilumą. Biologinės molekulės, imobilizuotos ant kieto paviršiaus, gali prarasti dalį biologinio aktyvumo. Aktyvumas sumažėja dėl kelių priežasčių: molekulės konformacijos pakitimų, nepalankios orientacijos paviršiuje ar cheminio aktyviųjų centrų modifikavimo imobilizavimo metu. Labai svarbus faktorius konstruojant biologinius jutiklius yra neatrankioji biologinių molekulių adsorbcija. Dažnai analitė ne tik atrankiai sąveikauja su imobilizuotomis biologinėmis molekulėmis, bet ir adsorbuojasi jutiklio paviršiuje. Todėl konstruojant biologinius jutiklius siekiama išvengti neatrankiosios adsorbcijos. Taip pat didelę įtaką turi tinkamo biologinės molekulės imobilizavimo metodo parinkimas, jos koncentracijos, aktyvumo ir orientacijos kontrolė [41]. Tinkamai pasirinktas biologinių molekulių imobilizavimo metodas turi didelę įtaką analizinės sistemos jautriui, analizinio signalo atsikartojamumui ir sistemos stabilumui.

1.2.1 *Paviršiai*

Vienas iš svarbiausių faktorių konstruojant biologinius jutiklius yra tinkamo paviršiaus parinkimas biologinių molekulių imobilizavimui. Visus paviršius galima suskirstyti į dvi grupes:

1) plokštuminiai – biologinės molekulės imobilizuojamos ant plokščio paviršiaus, pvz., stiklo [42], plastiko [43] ar metalo [15] (4 pav. (A));

2) erdviniai (3D) paviršiai – biologinių molekulių imobilizavimui naudojamos pagalbinės medžiagos tokios, kaip mikro/nano dalelės [44, 45], hidrogeliai [46], zoliai-geliai [47], įvairūs polimerai (pvz., *gamtinės kilmės polimerai* – polisacharidai (celiuliozė, dekstranai, agaras, agarozė, chitinas ir kt.), pluoštiniai baltymai (fibrinas, keratinas ir kt.); *sintetiniai polimerai* – poliolefinai (polistirenas), akriliniai polimerai (poliakrilatas), polivinilo alkoholiai, polivinilchloridas, silikonas) [48, 49, 50] ar membranos [51] (4 pav. (B)).



4 pav. Principinė antikūnų imobilizavimo schema plokščiame (A) ir 3D (B) paviršiuje.

Silicis yra plačiai naudojamas pagrindas turintis reikiamų savybių biologinių molekulių imobilizavimui. Dėka technologijų raidos atsirado galimybė pagaminti iki 22 nm storio silicio sluoksnį [52], kurį galima integruoti į vis mažėjančius analizinius įrenginius. Taip pat silicis gali būti kombinuojamas su kitomis medžiagomis, pvz., suformavus oksido sluoksnį ant silicio paviršiaus atsiranda galimybė imobilizuoti biologines molekules per silanolines funkcinės grupes [53]. Silicis, kaip pagrindas biologinių molekulių imobilizavimui, plačiai naudojamas elektrocheminėje [54] ir PPR analizėje [55].

Stiklas ir *kvarcas* taip pat plačiai taikomi biologinių molekulių imobilizavimui įvairiais metodais, pvz., kovalentinis imobilizavimas panaudojant stiklo ar kvarco silanolines funkcines grupes [56].

Įvairių *metalų* (aukso, sidabro ar platinos) sluoksniai formuojami ant silicio ar stiklo paviršiaus. Biologinių molekulių imobilizavimas metalo paviršiuje atliekamas panaudojant biologinių molekulių tiolines funkcinę grupę, tačiau susiformavęs ryšys kovalentinis, nors pagal stiprumą prilyginamas kovalentiniam ryšiui [57]. Biologinių molekulių imobilizavimas metalų paviršiuje naudojamas elektrocheminėje [58], Ramano spektroskopinėje [59] ir PPR [60] analizėse.

Mikro/nano dalelės skirtos biologinių molekulių imobilizavimui gali būti gaunamos iš plataus spektro medžiagų, tokių kaip polistirenas, silicis, agarozė ar įvairūs metalai. Šie paviršiai biologinių molekulių imobilizavimui plačiai taikomi chromatografijoje [61], SPR, EL ir kt.

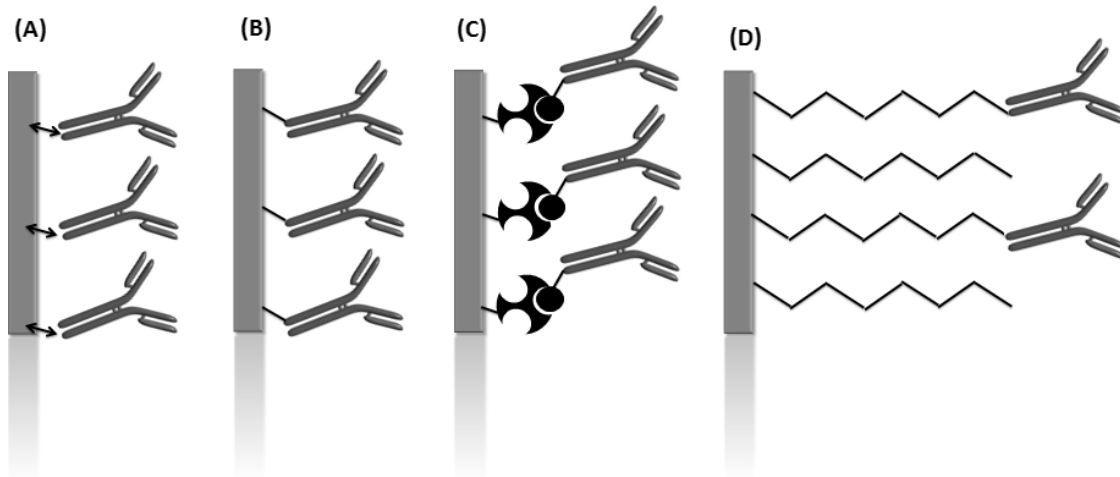
Hidrogelis – tai polimero grandinių tinklas pasižymintis lankstumu ir stangrumu. Polimerai gali būti gamtinės kilmės, kaip chitozanas, agarozė ir celiuliozė arba sintetiniai, kaip pvz., polistirenas. Dažniausiai hidrogeliai yra skaidrūs, dėl to jie dažnai taikomi fluorescencinėje analizėje. Taip pat hidrogeliai gali būti naudojami kaip molekuliniai sietai biologinių molekulių skirstymui pagal dydį, nedarant įtakos molekulės struktūrai [62] (pvz., SDS-PAGE elektroforezė). Hidrogeliai biologinių molekulių imobilizavimui panaudojami įvairiais būdais: gali būti atliekama baltymų kopolimerizacija su hidrogelio monomerais [63], biologinės molekulės prie hidrogelio gali būti prijungiamos kovalentiškai [64] ar elektrostatškai suteikus hidrogeliui ir biologinėms molekulėms atitinkamą krūvį [65]. Hidrogeliai pasižymi hidrofilinėmis savybėmis ir suteikia tinkamą aplinką biologinėms molekulėms, todėl nekinta baltymų natyvios funkcijos, tokios kaip aktyvumas [66]. Hidrogeliai gali pasižymėti nestabilumu elektriniame lauke, o jų struktūra linkusi suirti [67]. Be to, susidariusią hidrogelio-biologinių molekulių struktūrą gali būti sudėtinga pašalinti nuo biologinio jutiklio paviršiaus, jei tai būtų reikalinga analizės metu [68].

Zoliai-geliai – tai sistemos perėjimas nuo skystos (koloidinės) fazės prie kietos fazės. Šio proceso metu dažniausiai formuojasi metalų oksidai. Pridedant baltymų jie yra inkapsuliuojami į skaidrią 3D nanostruktūrą. Dažniausiai zoliai-geliai formuojami iš silicio oksido [69], rečiau iš titano oksido [70]. Biologinių molekulių imobilizavimas vykdomas „švelniomis“ sąlygomis, todėl nekinta baltymų natyvos funkcijos.

Membranos yra porėtos plėvelės, suteikiančios didelį paviršių biologinių molekulių imobilizavimui. Membranos gali būti komercinės, pvz., polikarbonatas ar nitroceliuliozė, taip pat membranos gali būti suformuotos ir *in situ* būdu – kondensacijos [71] ar elektrosukimo [72, 73] metodais. Pastaruoju metu membranos yra plačiai naudojamos biochemijoje ir analizinėje chemijoje baltymų adsorbicijai. Baltymų imobilizavimui adsorbicijos būdu nereikalinga nei paviršiaus cheminė aktyvacija, nei cheminė biologinių komponentų modifikacija. Adsorbicija paprastai vyksta dėka tarp molekulinę sąveikų (hidrofobinė, elektrostatinė, Van der Valso).

1.2.2 Imobilizavimo būdai

Imobilizavimo strategijos pasirinkimas dažniausiai priklauso nuo imobilizuojamosios BAM ir paviršiaus, ant kurio bus atliekama imobilizacija, fiziko-cheminių ir cheminių savybių. Pastaraisiais metais buvo ištirti ir aprašyta daugybė imobilizavimo būdų, tačiau galima išskirti tris pagrindinius būdus: fizikinį, cheminį ir biologinio giminingumo (5 pav.).



5 pav. BAM imobilizavimo būdai: (A) fizikinis, (B ir D) cheminis ir (C) biologinio giminingumo.

1.2.2.1 Fizikinis BAM imobilizavimo būdas

Fizikiniams imobilizavimo būdams priskiriami tokie būdai, kai biologinės molekulės prie paviršiaus prijungiamos nesusiformuojant cheminiams ryšiams (pvz.: fizinė adsorbcija, įterpimas į polimerinį sluoksnį, mikrokapsuliavimas). Iš fizikinių imobilizavimo būdų dažniausiai naudojama fizinė adsorbcija (5 pav. A). Tai pats paprasčiausias imobilizavimo būdas. Jis remiasi hidrofobinių, elektrostatiinių, Van der Valso jėgų, bei vandenilinių ryšių sudarymu tarp kieto paviršiaus (elektrodo), ant kurio vykdoma BAM imobilizacija, ir BAM. Imobilizavimas atliekamas užlašinant BAM tirpalą ant elektrodo paviršiaus ir leidžiant išgaruoti tirpikliui. Nepaisant savo paprastumo, šis imobilizavimo būdas turi ir trūkumų: nepalanki atsitiktinė biologinių molekulių orientacija ant paviršiaus ar galima biologinių molekulių denatūracijos po tiesioginio jų kontakto su metalo paviršiumi [27]. Šio imobilizavimo būdo trūkumas taip pat yra silpni susiformavę ryšiai tarp imobilizuotų biologinių molekulių ir paviršiaus, todėl jos gali būti lengvai nuplaunamos nuo paviršiaus buferiu ar kitais tirpalais. Taip pat

dėl nespecifinės sąveikos su paviršiumi gali būti klaidingai įvertintos kinetinės biologinių molekulių savybės, ypač tiriant PPR įrenginiu realiu laiku.

Biologinių molekulių adsorbcijos talpa plokščiam jutiklio paviršiuje yra ribota dėl biologinių molekulių geometrinio dydžio. Didelis imobilizuotų biologinių molekulių tankis biologinio jutiklio paviršiuje gali turėti įtakos funkcinėms biologinių molekulių savybėms. Dažnai dėl steriškai nepasiekiamų imobilizuotos biologinės molekulės aktyviųjų centrų arba sąveikos sričių, sąveika tarp biologinės molekulės ir analitės nevyksta arba vyksta tik dalinė sąveika. Biologinio jutiklio talpą, biologinėms molekulėms imobilizuoti, galima padidinti jo paviršiuje suformuojant savitvarkį monosluoksnį (SMS), o ant SMS dekstrano sluoksnį [74].

1.2.2.2 Cheminis BAM imobilizavimo būdas

Cheminiam imobilizavimo būdui priskiriamas BAM imobilizavimas jutiklio paviršiuje susidarant bent vienam cheminiam ryšiui tarp paviršiaus ir biomedžiagos (pvz., fermento prijungimas prie vandenyje netirpių polimerų ar SMS), bei molekulių tarpusavio „susiuvimas“ panaudojant daugiafunkcinius reagentus (glutaro aldehidą, karbodiimidą ir kt.). Siekiant kuo stipriau prijungti biologines molekules prie paviršiaus, dažnai naudojama fizikinių bei cheminių metodų kombinacija. Vienas iš šio būdo privalumų yra kryptingas biologinių molekulių imobilizavimas [75].

Biologinės molekulės hidrofilinio aukso paviršiuje gali būti imobilizuotos panaudojant jų funkcines –SH arba –S–S– grupes. Šis imobilizavimo būdas pagrįstas stipriu laisvų tiolinių funkcinų grupių prisijungimu prie aukso paviršiaus (5 pav. B). Pagrindinis šio metodo trūkumas yra tas, kad ne visi baltymai jų turi. Jei natūraliai baltymas tokių grupių neturi, jos gali būti sukurtos cheminių reakcijų pagalba arba genų inžineriniais metodais.

Imunoglobulino G (IgG) imobilizavimas šiuo būdu atliekamas naudojant jo natyvias tiolines grupes, kurios yra išlaisvinamos redukuojant IgG disulfidinius tiltelius, jungiančius sunkiąsias grandines, 2-merkaptoetilaminu (2-MEA) ar ditionitritoliu (DTT). Po redukcijos susidaro du IgG antikūnų fragmentai, o antigenų prijungimo vietos - aktyvieji centrai, lieka nepažeisti. Antikūnų fragmentai aukso paviršiuje imobilizuojami chemisorbcijos būdu. Tiolinių grupių išlaisvinimas redukuojant IgG antikūnus užtikrina stiprią fragmentų sąveiką su aukso paviršiumi. Imobilizuojant šiuo būdu jutiklio paviršiuje susidaro tvarkingai orientuotų antikūnų fragmentų sluoksnis. Be to, šiuo būdu imobilizuoti antikūnai išlaiko aukštą antigeno prijungimą bei didelį stabilumą, o dėl didelio kryptingai orientuotų fragmentų tankio jutiklio paviršiuje, formuojantis antikūno-antigeno kompleksui, registruojamas didelis analizinis signalas. Imobilizuoti antikūnų fragmentai aukso paviršiuje yra taip išsidėstę, kad atstumas tarp aktyviojo centro ir aukso paviršiaus yra vienodas [76].

BAM prijungiant cheminiais imobilizavimo būdais, biologinės molekulės dažniausiai prijungiamos kovalentiškai. Tam paprastai naudojama tarpinė medžiaga, jungianti jutiklio paviršių ir biologinę molekulę (5 pav. D). BAM gali būti prijungiamas per amino, karboksi, tiolio ar aldehydines funkcines grupes. Prijungimas per amino grupes naudojamas plačiausiai, nes daugelis biologinių molekulių turi šių grupių. Prijungimas per tiolines funkcines grupes galimas tuomet, jei turi laisvų tiolinių grupių arba disulfidinių tiltelių, šios grupės gali būti lengvai įvedamos į biologinės molekulės. Polisacharidus ir glikojunginius, turinčius cis-diolių ir salicilo rūgščių šoninių radikalų, galima prijungti per aldehydines funkcines grupes, nes cis-diolių ir salicilo rūgščių šoniniai radikalai gali būti lengvai suoksiduoti iki aldehydų. N-hidroksisukcinimidas (NHS) yra dažniausiai naudojama medžiaga norint imobilizuoti biologines molekules per amino funkcines grupes ir suformuoti stiprų ryšį su paviršiumi [77]. Imobilizuojant baltymus šiuo būdu juos reikia ištirpinti mažos joninės jėgos buferiniame tirpale ir praleisti per aktyvuotą paviršių. NHS esteriai reaguoja su

nukleofilinėmis baltymo pirminėmis amino grupėmis, susiformuojant stipriam ryšiui. Imobilizavimo efektyvumas priklauso nuo kelių faktorių: pH, baltymo koncentracijos, buferinio tirpalo joninės jėgos ir reakcijos laiko, bet kiekvienai biologinei molekulei optimalios imobilizavimo sąlygos yra skirtingos. Patel mokslinė grupė 1997 metais publikavo mokslinį darbą, kuriame NHS buvo panaudotas aktyvuoti 11-merkaptoundekono rūgšties (MUR) SMS karboksilo funkcinėms grupėms ir imobilizuoti baltymui katalazei [78].

Biologinių molekulių imobilizavimui plačiai naudojami SMS, kuris susiformuoja plona ir tvarkinga monomolekulių plėvelė [52], kuri naudojama kaip jungtis, jungianti metalo sluoksnį su biologine molekule, gebančia atrankiai sąveikauti su analite [41]. SMS formavimas yra nepaprastai universalus ir lankstus metodas dėl terminalinių grupių funkcionalumo, dydžio ir imobilizuojamų BAM molekulių orientacijos ant jutiklio paviršiaus. Be to, didelis stabilumas esant ekstremalioms pH ir temperatūros sąlygoms, taip pat daugkartinio panaudojimo ir pritaikymo pratekamosiose sistemose galimybė padaro SMS paviršių tinkamu įrankiu imuniniuose PPR tyrimuose [79]. SMS formavimui aukso paviršiuje dažniausiai naudojami tiolines funkcines grupes turintys junginiai, pavyzdžiui, n-alkantioliai ($\text{SH}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, $n > 10$). Galinės tiolines funkcinės grupės prisijungia prie aukso sluoksnio chemisorbcijos būdu [41].

Norint gauti hidrofilinį sluoksnį, aukso sluoksnių padengiamas ~ 100 nm storio karboksimetildekstrano (KMD) plėvele. Prie aukso paviršiaus KMD molekulės prijungiamos per alkantiolių jungiamąjį sluoksnį [80]. Šis jungiamasis sluoksnis apsaugo aukso sluoksnį nuo nepageidaujamų sąveikų su baltymais. Hidrofiliniai KMD hidrogeliai pasižymi dideliu paviršiaus plotu. Tai padidina jutiklio paviršiaus imobilizavimo talpą penkis kartus, lyginant su hidrogeliu nepadengtu jutiklio paviršiumi ir padidina metodo jautrį [41]. Prie KMD biologinės molekulės prijungiamos kovalentiškai. Karboksi grupės KMD paviršiui suteikia neigiamą krūvį, tuo tarpudauguma BAM turi suminį teigiamą krūvį esant konkrečiam pH. Todėl imobilizavimas taip pat vyksta ir elektrostatinės sąveikos

dėka, tarp neigiamą krūvį turinčių karboksi funkcinių grupių dekstrano matricoje ir teigiamą krūvį turinčių amino rūgšties liekanų BAM molekulėse. Neigiamai įkrautas KMD sluoksnis gali būti labai naudingas ir tokiais atvejais, kai imobilizuojamų BAM koncentracija yra maža, kadangi dėl elektrostatinės sąveikos teigiamą krūvį turinčios molekulės bus pritraukiamos iš tirpalo ir tokiu būdu sukonzentruojamos hidrogelyje. KMD hidrogeliams būdinga silpna nespecifinė biologinių molekulių adsorbcija, kai analizė atliekama tokiose daug pašalinių komponentų turinčiose terpėse, kaip kraujo plazma ar serumas. Kiti tikėtini sunkumai galėtų būti didelių BAM (baltymų ar mikroorganizmų) analizė dėl sferinių trukdžių ir masės pernešimo įtaka kinetikai [41].

Langmuir'o-Blodgett'o (LB) plėvelių metodika įgalina membraninių struktūrų formavimą perkeltant amfifilines molekules (riebalų rūgštis, fosfolipidus) iš oro-vandens sandūros ant kieto pagrindo. LB plėvelės suteikia keletą privalumų mikrobiologinių jutiklių kūrimui, tokių kaip struktūrinė organizacija (labai tvarkingas molekulinis išsidėstymas), ultraplonas sluoksnis (keli nanometrai), galima suformuoti ant įvairių pagrindų ir labai trumpas atsako laikas [41].

Zoliai-geliai yra naujas būdas biologinių molekulių imobilizavimui PPR imunologiniams tyrimams. Metodus leidžia įterpti biologinius komponentus į neorganinių silikatų matricas, suformuotas žemoje temperatūroje zolių-gelių susidarymo proceso metu. Sąveika tarp BAM ir neorganinės, organinės ar hibridinės nanokompozitinės medžiagos nulemia laipsnį, kuriuo biologinės molekulės išlaiko savo natyvias savybes. Yra keletas privalumų naudojant zolių-gelių metodą biologinių jutiklių gamybai, pavyzdžiui, paprastas procesas, imobilizuojamas didelis biologinių molekulių kiekis ir išsaugomas jų aktyvumas. Tačiau, nepaisant plataus zolių-gelių metodo naudojimo konstruojant elektrocheminius biologinius jutiklius, jo naudojimas PPR imunologiniuose tyrimuose yra ribotas [41].

1.2.2.3 BAM imobilizavimas panaudojant giminingai sąveikaujančius baltymus

Būdas imobilizuoti BAM panaudojant giminingai sąveikaujančius baltymus (5 pav. C) leidžia kryptingai imobilizuoti biologines molekules jutiklio paviršiuje, tuo pačiu nepažeidžiant biologinių molekulių struktūros ir nesumažinant jų aktyvumo.

Imobilizuojant BAM dažnai naudojama avidino-biotino jungtis. Avidinas yra baltymas tirpus vandeniniuose tirpaluose ir stabilus plačiame pH intervale. Avidinas gali prisijungti 4 biotino molekules. Ryšio susidarymas yra greitas, jo susidarymui neturi įtakos pH, temperatūra, organiniai tirpikliai ir kiti veiksniai sukeltantys biologinių molekulių denatūraciją. Streptavidinas yra baltymas panašus į avidiną ir giminingas biotinui. Streptavidinas nuo avidino skiriasi molekuline mase, amino rūgščių sudėtimi ir pI. Avidino ir streptavidino savybės buvo patobulintos chemiais ir rekombinantiniais metodais. Buvo padidintas šių biologinių molekulių stabilumas ir/arba kontroliuojamas biotino prijungimas. Pvz., NeutrAvidino baltymas yra specifinis biotinui. Stipri sąveika tarp NeutrAvidino ir biotino vyksta esant terpės pH 4,0 – 5,0, o susidariusio komplekso disociacija – prie aukštesnių pH reikšmių [81].

Biotinas (vitaminas H) yra randamas gyvoje ląstelėje. Biotinas yra palyginti mažos molekulinės masės junginys, todėl jungdamasis prie makromolekulių neturi įtakos jų konformacijai, dydžiui ar funkcijoms. Norint BAM prijungti prie biotino panaudojant jų amino grupes, biotino karboksi grupės dažniausiai aktyvuojamos NHS [82] arba panaudojant hidraziną jungimasis vyksta per BAM karboksi grupes [83].

Streptavidino-biotino jungtis dažnai pasirenkama, kai BAM prijungimas per amino ar tiolines funkcines grupes yra nepakankamas arba netinkamas. Šis imobilizavimo būdas plačiai naudojamas DNR hibridizacijos ir PPR

imunologiniuose tyrimuose, ypač atliekant kiekybinę analizę „sumuštinio“ metodu. Ši sistema yra paprasta ir netgi labai efektyvi dėl didelės prijungimo talpos, atkuriamumo ir cheminio atsparumo. Vienas iš pranašiausių šios sistemos bruožų yra tai, kad nepaisant to, kad giminingumo konstanta tarp streptavidino ir biotino yra gana didelė, ryšys yra nekovalentinio pobūdžio. Tai leidžia paviršiaus regeneravimą denatūruojant streptavidiną tinkamais regeneruojančiais tirpalais, pavyzdžiui, 6 mol/L guanidino hidrokloridu. Galimi šio imobilizavimo būdo trūkumai yra didelė reagentų kaina ir, tam tikrais atvejais, tinkamo jungiamojo sluoksnio būtinumas (SMS ar KMD) streptavidinui prijungti prie aukso paviršiaus [41].

Biologinių molekulių prijungimas jutiklio paviršiuje per baltymą A (bA) arba baltymą G (bG) yra puikus pasirinkimas kryptingam antikūnų imobilizavimui. Abu baltymai dalyvauja atrankiojoje sąveikoje su antikūno Fc fragmentu. Kadangi kiekviena bA ar bG molekulė turi daugiau nei vieną vietą prisijungti antikūno Fc fragmentui, tai antikūnų prisijungimas prie šių baltymų priklauso nuo baltymo G orientacijos. Kadangi antikūnų jungimasis pasireiškia per biochemines giminingumo reakcijas, baltymų struktūra nėra suardoma. Tokiu būdu, antikūnų imobilizavimas per bA ar bG lemia tolygų, stabilų ir steriškai prieinamą antikūnų sluoksnį PPR jutiklio lusto paviršiuje. Galimi šio imobilizavimo trūkumai yra didelė reagentų kaina ir tai, kad bA ir bG prijungimui jutiklio paviršiuje reikia papildomo jungiamojo sluoksnio (SMS) [41].

1.3 Antikūnas – biologinio jutiklio komponentas

Antikūnai yra sudėtiniai baltymai priklausantys glikoproteinų klasei ir susidarantys gyvūnų ar žmogaus organizme. Antikūnai organizme sintetinami tuomet, kai į jį ne per virškinamąjį traktą patenka antigenų. Antikūnų gamyba – dalis organizmo imuninio atsako, kai infekcijos ar imunizacijos metu, dalyvaujant

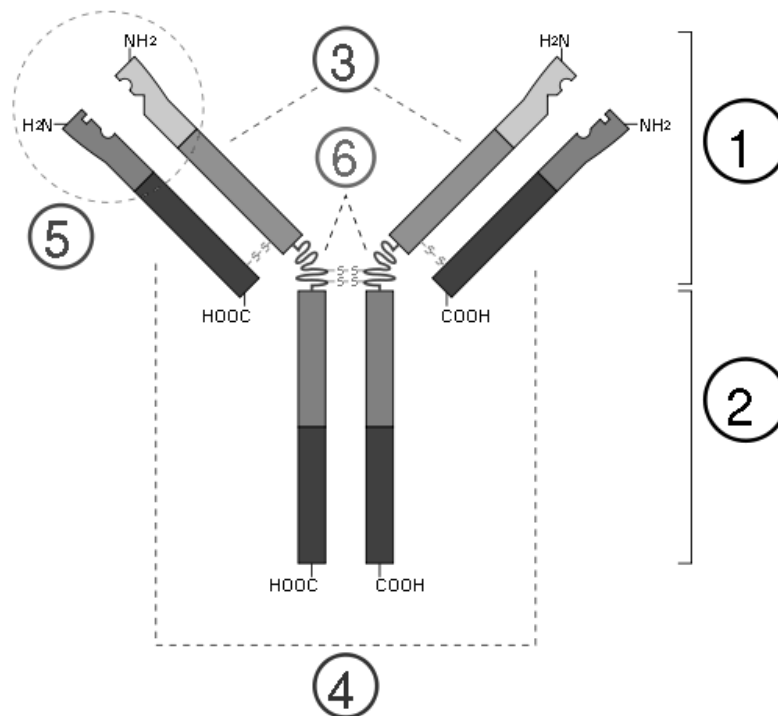
antigeną pateikiančioms ląstelėms ir T limfocitams, stimuliuojamos B ląstelės iš kurių vystosi plazminės ląstelės. Antikūnai nulemia humoralinį imunitetą [84]. Antikūnai – tai cirkuliuojantys kraujyje humoralinio imuniteto efektoriai, kurie „ieško“, neutralizuoja arba pašalina antigenus iš organizmo. Visų antikūnų struktūra, sąveikos su antigenu tipai ir specifiškas dalyvavimas antigeno atpažinime yra panašus [41]. Antikūnai yra plazmos globulinų γ frakcijos pagrindinė dalis. Tačiau ne visi γ globulinai yra antikūnai. Norint juos atskirti nuo kitų baltymų jie yra vadinami imunoglobulinais (Ig). Tai glikoproteinai, kuriuose yra nuo 2 iki 14 % angliavandenių. Imunoglobulinai surado apie 20 % plazmos baltymų [85].

Dauguma antigenų yra kompleksiniai junginiai, turintys kelias antigenines determinantes, kurias atpažįsta antikūnai ir per kurias vyksta antikūno-antigeno sąveika. Dėl įvairių antigeninių determinančių, imuninės sistemos atsakas į vieną antigeno molekulę, gali būti net keli antikūnų tipai [86].

1.3.1 Struktūra

1972 m. Rodney R. Porteriui ir Geraldui M. Edelmanui buvo skirta Nobelio premija už pasiekimus fiziologijos ir medicinos srityse, nustatant antikūnų cheminę struktūrą [87]. Tad antikūnai, kaip biologinė medžiaga, yra senai žinomi ir tiriami.

Antikūnai yra heterodimerai, kurių molekulę sudaro 4 grandinės – identiškios dvi lengvosios grandinės, kurių molekulių masė apie 25 kDa (6 pav. 4) ir dvi identiškios sunkiosios grandinės, kurių molekulinė masė 50 kDa ir daugiau (6 pav. 3). Sritis, kurios sąveikauja su antigenu, vadinamos Fab' fragmentais (*angl. fragment antigen binding*) (6 pav. 1), o antikūno dalis, kuri nereaguoja su antigenu vadinama Fc fragmentu (*angl. fragment crystallizable*) (6 pav. 2) [17]. Fc fragmentai turi sritis prie kurių gali prisijungti ląstelių paviršiaus receptoriai, serumas ir bakteriniai baltymai.



6 pav. Principinė antikūno struktūra [86]: 1 – Fab', 2 – Fc, 3 – sunkioji grandinė, 4 – lengvoji grandinė, 5 – aktyvusis centras, 6 – šarnyrinė sritis.

Kiekviena lengvoji grandinė, prisijungusi prie sunkiosios grandinės per disulfidinius tiltelius, taip pat nekovalentiniais, vandenilniais ir hidrofobiniais ryšiais, sudaro sunkiųjų ir lengvųjų grandinių heterodimerą. Nekovalentiniais ir disulfidiniais ryšiais yra sujungtos dvi heterodimerų molekulės. Tikslus disulfidiniu jungčių kiekis ir jų vieta yra būdinga kiekvienai antikūnų klasei [17].

Biochemiškai ir imunologiškai galima išskirti penkis sunkiųjų grandinių tipus, kurie skiriasi amino rūgščių kiekiu ir jų seka polipeptidinėje grandinėje, krūvio tankiu, anglivandenių kiekiu, disulfidinių jungčių skaičiumi ir išdėstymu, imunogeniškumu [41]. Atsižvelgiant į sunkiosios grandinės ypatumus skiriamos penkios imunoglobulinų klasės: **IgG** – sunkioji grandinė γ ; **IgA** – α ; **IgE** – ϵ ; **IgM** – μ ; **IgD** – δ (žr. lentelė 1). Lengvosios grandinės skirstomos į λ ir κ . Kiekvienos klasės imunoglobulinų molekulėje būna arba λ , arba κ lengvosios grandinės.

IgG – pagrindinis antikūnų tipas. Sveiko žmogaus serume jie sudaro apie 80 % visų antikūnų. Dalyvauja imuniniame atsake, lemia infekcinį humoralinį imunitetą – intensyviausiai iš antikūnų prisijungia ir neutralizuoja tirpius bakterijų antigenus, egzotoksinius, virusus. Tai vieninteliai antikūnai perduodami iš motinos organizmo per placentą – naujagimis įgyja natūralų pasyvųjį įgimtą imunitetą;

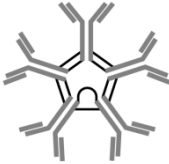
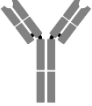

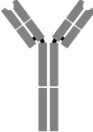

IgA – galima suskirstyti į tris grupes: monomerus (blužnies plazmocitai), dimerus (sekrecijos liaukų plazmocitai) ir sekretinius (viršutinių kvėpavimo takų, žarnų gleivinių, šlapimo, lyties organų, limfinio audinio plazmocitai). Žmogaus serume jie sudaro apie 13 % visų antikūnų. Šios klasės antikūnų funkcijos: gleivinių apsauga nuo mikroorganizmų (slopina jų dauginimąsi), virusų neutralizavimas, fermentų ir toksinų neutralizavimas. IgA dimeras dengia gleivinės paviršių, taip neleisdamas mikroorganizmams patekti į organizmą. Sekretinis IgA stabdo makromolekulių prasiskverbimą pro gleivinę, taip sumažindamas alergijos tikimybę;

IgE – svarbiausias imunoglobulinas alerginių reakcijų slopinimui (sintetinamas plazminėse gleivinės bei limfoidinių organų ląstelėse). Žmogaus serume jie sudaro apie 0,002 % visų antikūnų. Šios klasės antikūnų funkcijos: skatinti histamino išskyrimą iš putliųjų ląstelių, apsaugoti ir neutralizuoti žarnyno parazitus, sujungti daugialąsčių parazitų antigenus, taip padedant pašalinti parazitus;

IgM – pentameras, svarbus pirminio imuninio atsako formavimuisi. Žmogaus serume jie sudaro apie 6 % visų antikūnų. IgM labai aktyviai veikia mikroorganizmus. Tai pirmieji antikūnai, kurie sintetinami paveikus imunogenu. Svarbiausia funkcija – agliutinuoti molekules ir daleles;

IgD – membraninis, svarbus B limfocitų brendimui. Šie antikūnai padeda neutralizuoti ir pašalinti kraujyje nuolat esančius antigenus, taip pat gali aktyvuoti komplemento sistemą, neutralizuoti virusus, dalyvauja autoalerginėse reakcijose. Žmogaus serume jie sudaro apie 1 % visų antikūnų [86].

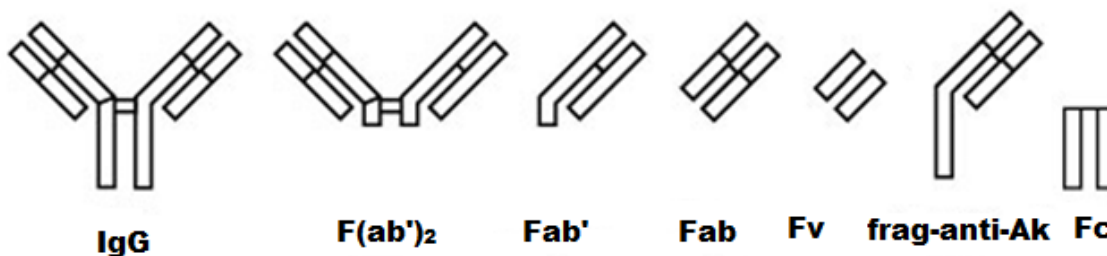
1 lentelė. Atikūnų klasių palyginimas.

	<i>Pavadinimas</i>	<i>Sunkiosios grandinės</i>	<i>Aktyviųjų centrų skaičius</i>	<i>Molekulinė masė, kDa</i>	<i>Procentinė vertė, lyginant su visais antikūnais serume</i>
	<i>IgM pentameras</i>	M	10	900	6 %
	<i>IgG monomeras</i>	Γ	2	150	80 %
	<i>IgA dimeras</i>	A	4	385	13 %
	<i>IgE monomeras</i>	E	2	200	0,002 %
	<i>IgD monomeras</i>	Δ	2	180	1 %

1.3.2 Antikūnų fragmentai

Antikūnų molekulės paveikus tam tikromomis medžiagomis yra galimybė jas suskaldyti į fragmentus, kurie turėtų konkrečias savybes (7 pav.). Antikūnų fragmentų galimi keli tipai, bet kiekvienas iš jų turi antigeną surišančią sritį (išskyrus Fc), t.y. sunkiosios ir lengvosios grandinių kintamuosius regionus (V_H ir V_L atitinkamai). Skaldant IgG ir IgM antikūnų molekules galima gauti $F(ab')_2$, Fab,

Fab', frag-anti-Ak ir Fv fragmentus. Šie antikūno fragmentai, surišantys antigeną, skiriasi molekuline mase ir valentingumu. Fc fragmentas gaunamas iš antikūno sunkiųjų grandinių. Vienas F(ab')₂ fragmentas ir begalės trumpų peptidinių fragmentų iš Fc IgG regiono yra gaunami imunoglobulino molekulę paveikus fermentu pepsinu (EC 3.4.23.2), kuris yra aktyvus prie rūgštinio pH. Šis fermentas negrįžtamai denatūruoja neutralioje arba šarminėje terpėje [88]. Kai IgG molekulė paveikiama fermentu papainu (EC 3.4.22.2) yra paveikiamos disulfidinės jungtys, kurios skyla sudarydamos vienodos molekulinės masės fragmentus: du Fab ir vieną Fc fragmentą (7 pav.) [89]. Kiekvienas Fab fragmentas susideda iš vienos lengvosios grandinės ir maždaug pusės sunkiosios grandinės. Fab fragmento gale yra aktyvusis centras. Tai svarbiausia molekulės dalis. Ji jungiasi su antigenu. Iš to ir kilęs Fab pavadinimas (*angl. fragment antigen binding*) [90]. Ficinas yra fermentas (EC 3.4.22.3) redukuojantis monokloninius pelės IgG1 antikūnus į F(ab')₂ arba Fab' fragmentus, tai priklauso nuopriedo cisteino koncentracijos (4 mmol/L ir 25 mmol/L) atitinkamai [91].

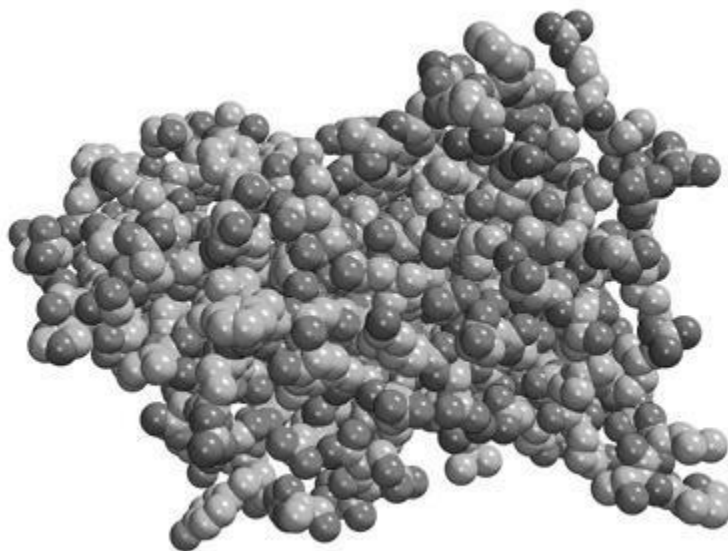


7 pav. Galimi antikūnų fragmentai [92].

1.4 Antigenas – žmogaus augimo hormonas

Žmogaus augimo hormonas – dar vadinamas somatotropinu, tai neglikozilintas polipeptidinis hormonas, sudarytas iš 191 amino rūgšties polipeptidinės grandinės, sujungtos dviem disulfidiniais tilteliais. ŽAH molekulinė masė yra 22 kDa, o jo molekulės struktūra sudaryta iš keturių spiralių

būtinų sąveikavimui su ŽAH receptoriais. ŽAH sintetinamas, saugomas ir sekretuojamas endokrininės pogumburio liaukos – hipofizės acidofilinės ląstelės somatotrofai. Šios ląstelės į veninį kraują taip pat išskiria dviejų tipų peptidus ŽAH išskirimo hormoną somatocriną ir ŽAH inhibavimo hormoną somatostatina [93].



8 pav. Žmogaus augimo hormono molekulė [94].

Didžiausias kiekis kraujo plazmoje siekiantis 13 – 72 ng/mL aptinkamas apytiksliai valanda po užmigimo. Kitu metu ŽAH kiekis yra apie 5 ng/mL [95]. Kiti šaltiniai teigia, kad bazinis ŽAH kiekis yra apie 1 ng/mL, o stebimas padidėjimo metu - 10 – 20 ng/mL [96, 97].

ŽAH sekreciją įtakoja daug veiksnių, tokių kaip individo amžius, lytis, mityba, fizinė veikla, stresas ir kiti hormonai [98]. Pavyzdžiui, pauglių organizmas per para išskiria iki 700 μg ŽAH, o sveiko suaugusio žmogaus – 400 μg [99].

Žmogaus augimo hormonas yra būtinas normaliam organizmo augimui ir vystymuisi. ŽAH trūkumui gydyti naudojami augimo hormono pakaitai. Augimo hormonas pirmą kartą buvo išskirtas 1944 m. C.H. Li ir H.M. Evans iš galvijų

hipofizių. Tačiau viltys, kad galvijų augimo hormonas bus veiksmingas žmonėms, nepasiteisino. Žmogaus augimo hormonas iš mirusių žmonių hipofizių pirmą kartą buvo išskirtas šiek tiek vėliau – 1956 m., o 1958 m. M.S. Raben pirmą kartą paskelbė apie sėkmingą hipofiziniu nanizmu sergančio vaiko gydymą ŽAH. Tačiau, 1976 m. pasaulinėje mokslinėje literatūroje prasidėjo diskusijos, kad ŽAH išskirtas iš žmonių hipofizių gali būti Creutzfeldt-Jacob ligos priežastimi. Tai paskatino nutraukti natūralių ŽAH preparatų naudojimą klinikinėje praktikoje [103]. Tai paskatino sintetinės ŽAH formos, vadinamos somatropinu, kūrimą ir vystimą pasaulyje. 1981 m. prasidėjo somatropino gaminamas rekombinantinės DNR technologijos principu. Į bakterijos DNR buvo įterpti žmogaus genai. DNR technologijos leido gaminti neribotą kiekį baltymo. Pirmą kartą rekombinantinis žmogaus augimo hormonas (rŽAH) iškristalintas 1991 m. [100]. Vėliau buvo atlikti ikiklinikiniai ir klinikiniai tyrimai, leidę naudoti rŽAH medicinoje. Šiuo metu ŽAH trūkumas gydomas rekombinantiniu žmogaus augimo hormonu. Keli pavyzdžiai komerciškai prieinamų rekombinantinių ŽAH:

Norditropin Pen Set. 1982 m. „Novo Nordisk“ pradėjo tobulinti rekombinantinę DNR technologiją biosintetiniam žmogaus augimo hormonui sukurti. Šis preparatas 1988 m. buvo registruotas Danijoje, keliose Europos šalyse ir Japonijoje, o 1995 m. ir JAV. Norditropinas sudarytas iš 191 amino rūgšties polipeptidinės grandinės, o jų seka identiška natūraliam žmogaus hipofizės ŽAH, molekulinė masė apie 22 kDa.

Humatrope su inektoriumi Humatro-Pen II. 1985 m. JAV kompanija „Lilly“ pradėjo ŽAH DNR technologijos tyrimus ir 1987 m. pagamino preparatą Humatropą. Humatropas sudarytas iš 191 amino rūgšties polipeptidinės grandinės, o jų seka identiška natūraliam žmogaus hipofizės ŽAH, molekulinė masė yra apie 22,125 kDa.

Somatogenas-L. Tai rekombinantinio ŽAH preparatas 1994 m. sukurtas, iširtas ir užregistruotas Lietuvoje (Institutas „Fermentas“, AB „Biofa“). Somatogenas – tai polipeptidas, susidedantis iš 190 aminorūgščių likučių,

analogiškas ŽAH, tik N-gale trūkstafenilalanino. Preparatas buvo tirtas 11-oje mokslo įstaigoje, kurios patvirtino jo saugumą ir veiksmingumą skatinant augimą pacientams, sergantiems augimo hormono deficitu ir Turnerio sindromu.

Biosioma. Tai rekombinantinio ŽAH gaminamas nuo 1997 m. UAB „Sicor Biotech“.

Saizen. Gaminamas „Serono“ firmos (Italija, Šveicarija). Vaikų ŽAH deficitui ir Turnerio sindromu gydyti. Nuo 1998 m. patvirtintas augimo atsilikimui dėl inkstų nepakankamumo gydyti.

Genotropin. Genotropiną gamina švedų kompanija „Pharmacia Upjohn“. Tai polipeptidas sudarytas iš 191 aminorūgščių likučių, kurio molekulinė masė 22,124 kDa.

Zomacton. Cheminė sudėtis yra identiška hipofiziniam augimo hormonui ir susideda iš 191 aminorūgščių likučių. Gamina „Ferring“ (Vokietija) [101].

ŽAH reguliuoja organizmo anabolinius procesus, baltymų sintezę, ląstelių, dalinimąsi bei organizmo augimą. Ypač svarbus jo poveikis intensyvaus organizmo augimo metu, todėl nuo 1959-ųjų naudojamas vaikų žemaūgiškumui, sąlygojamam hipofizio nepakankumumu, gydyti. Ilgalaikis ŽAH perteklius gali sukelti akromegaliją, veido, galūnių, kaulų bei minkštųjų audinių padidėjimą, neretai kraujyje padidėja cukraus kiekis (cukrinis diabetas). Šiuo metu atliekami bandymai siekiant pritaikyti ŽAH nudegimams, sužalojimams ir kitoms ligoms gydyti.

ŽAH, kaip anabolinis agentas, vartojamas siekiant geresnių rezultatų sporto varžybose. Dėl piktnaudžiavimo ŽAH preparatai buvo uždrausti Tarptautinio Olimpino Komiteto (*angl. International Olympic Committee*) ir Nacionalinės Akademinės Atletų Asociacijos (*angl. National Collegiate Athletic Association*). Tačiau tradiciniais šlapimo testais nebuvo galima aptikti ŽAH dopingo, tad šis draudimas buvo bevertis. Nuo 2000 m. pradžios sporto medicinoje buvo pradėti plėtoti kraujo testai, kuriais buvo galima nustatyti tiek natūralaus, tiek rekombinantinio ŽAH kiekį. 2004 m. Atėnų vasaros olimpinėse žaidynėse

pasaulinė anti-dopingo agentūra (*angl. World Anti-Doping Agency*) atliko kraujo tyrimus siekiant nustatyti ŽAH [102]. Tačiau nei vienas kraujo tyrimas nebuvo paskelbtas teigiamu. Taip įvyko dėl per trumpo ŽAH gyvavimo ciklo organizme (apie 20 min.) [103]. Tyrimai parodė, kad ŽAH koncentracija grįžta į pradinį lygį po 8 – 16 valandų, kai preparato injekcija suleidžiama į raumenis ir po 11 – 20 valandų, kai preparato injekcija suleidžiama į poodinį sluoksnį [104].

1.5 Optiniai imuniniai jutikliai

Optiniai biologiniai jutikliai yra svarbus analitinis įrankis taikomas biomedicinoje, farmacijoje, aplinkosaugoje [105]. Šio tipo jutiklio veikimo principas pagrįstas visiškojo vidaus atspindžio (VVA) reiškiniu elektromagnetinei bangai sklindant per optinį pluoštą. Pagrindiniai optinių biologinių jutiklių privalumai, palyginus su elektrocheminiais biologiniais jutikliais, yra tai, kad jiems neturi įtakos elektromagnetiniai trukdžiai, didelis jautris bei galimybė atlikti multidetekciją vienu prietaisu. Galima išskirti tris pagrindines detekcijos rūšis: (1) detekcija be žymės, (2) naudojant žymę (fluorescencinė detekcija) ir (3) spalvinės reakcijos, kai naudojami žymėti fermentai [106, 107].

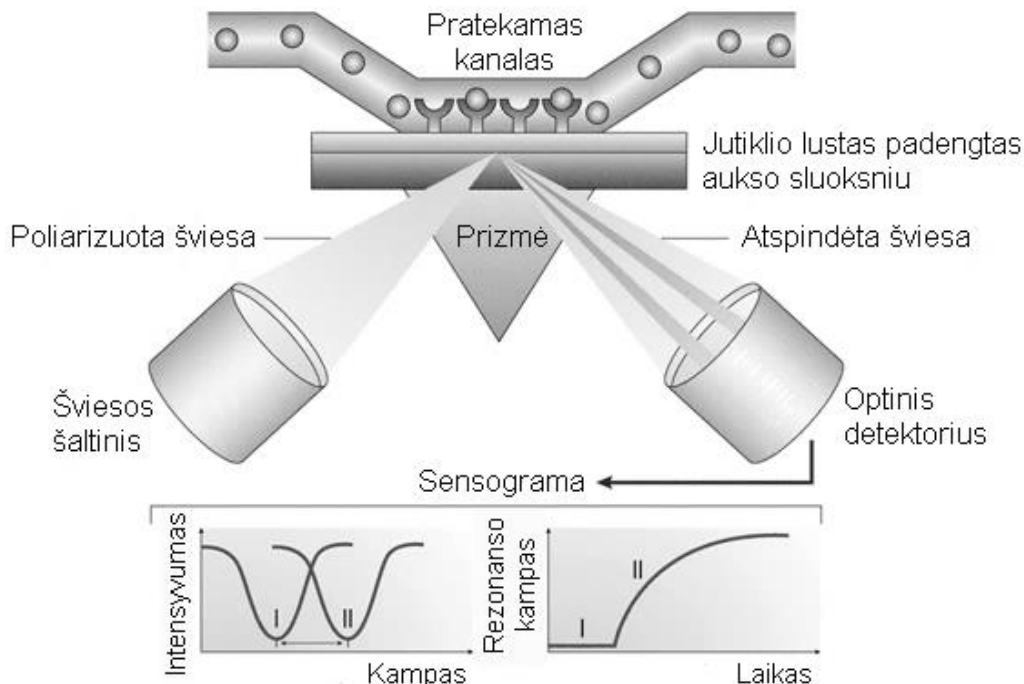
Optiniais biologiniais jutikliais matuojamas signalas yra šviesos signalas. Biologiniai jutikliai gali būti pagaminti optinės difrakcijos arba chemiliuminescencijos principu.

1.5.1 PPR imuniniai jutikliai

Paviršiaus plazmonų rezonansas (PPR) yra optinis–elektrinis reiškinys pagrįstas VVA reiškiniu. PPR registruojamas, kai plokščiai poliarizuotos šviesos bangos atsispindi nuo metalo (pvz., aukso ar sidabro) sluoksnio esant VVA

sąlygoms. VVA stebimas tik sąlyčio riboje tarp dviejų medžiagų, pvz., stiklas ir oras, turinčių skirtingus lūžio rodiklius n_1 ir n_2 ($n_1 > n_2$) ir tik esant tam tikram šviesos kritimo kampui, kuriam esant šviesos spindulys medžiagų sąlyčio riboje nebelūžta ir nebepereina į retesnę medžiagą, o praktiškai visa įeinanti šviesa yra atspindima pirmoje aplinkoje. Taigi, PPR reiškinys atsiranda dėl šviesos bangų sąveikos su metalo paviršiumi. Esant VVA sąlygoms, šviesos energija, pernešama fotonais, metalo paviršiuje perduodama laisviems, metalo paviršiuje esantiems išorinio sluoksnio elektronams ir taip sukuriama paviršiniai plazmonai, kurie priverčiami osciliuoti tam tikru dažniu. Šie virpesiai ir vadinami paviršiaus plazmonų rezonansu. Taigi, paviršiniai plazmonai, tai bangos turinčios krūvį ir tankį, ir sklindančios sąlyčio paviršiuje tarp metalo ir dielektriko.

Pagal kvantų mechanikos teoriją, plazmonas yra dalelė turinti elektroninio tankio bangas. Taigi, jei vykstant VVA fotonų kvantinė energija yra pakankama, tai jų energija absorbuojama laisvųjų metalo elektronų. Energijos perdavimas metalo elektronams įvyksta tik esant tam tikram rezonansą sukeliančiam šviesos bangos ilgiui – tai toks bangos ilgis, kuriam esant energijos kvantas perneštas fotonu tiksliai atitinka plazmonų kvantinę energijos lygmenį. Kai krintančios šviesos bangos kampas atitinka kampą, kuriam esant galimas PPR, krintančio fotono ir plazmono energija bei judesio kiekio momentas sutampa ir fotono energija perduodama plazmonui (8 pav.). Kadangi energija yra absorbuojama, tai vykstant PPR stebimas ryškus atsispindėjusios šviesos stiprio sumažėjimas [108].



9 pav. PPR taikymas biologiškai aktyvių medžiagų tarpusavio sąveikos analizei [109].

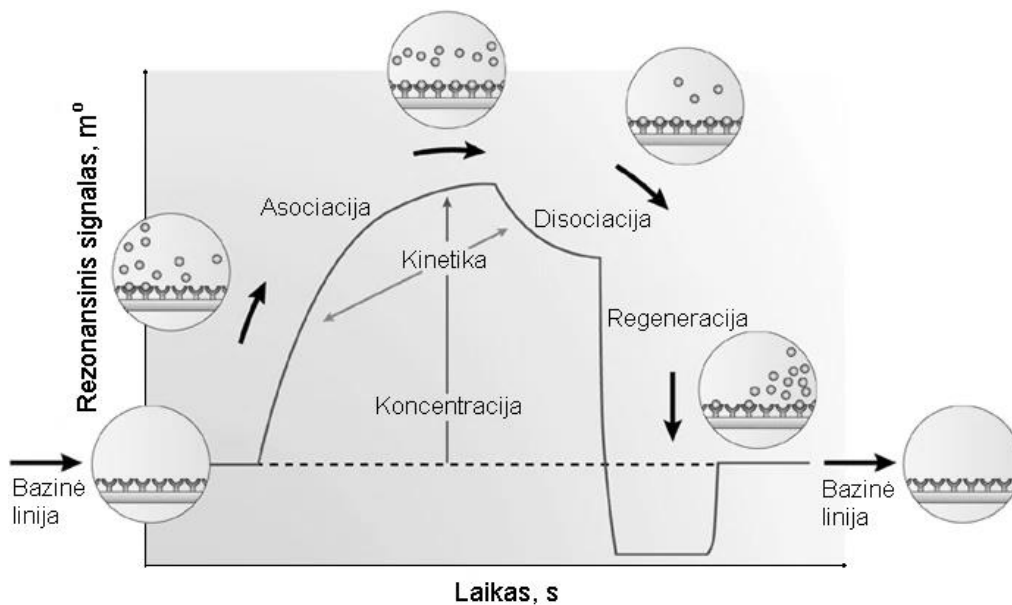
Vykstant VVA, atspindėtieji fotonai sukuria elektrinį lauką. Paviršiaus plazmonai, nors ir sudaryti iš didelio osciliuojančių elektronų skaičiaus, elgiasi taip lyg būtų atskiros krūvį turinčios dalelės. Jų judėjimas, panašiai kaip bet kurių elektringųjų dalelių, taip pat sukuria elektrinį lauką. Šis laukas vadinamas greitai nykstančia banga, nes bangos amplitudė mažėja eksponentiškai didėjant atstumui nuo sąlyčio ribos. Greitai nykstanti banga, kuri tęsiasi apie 300 – 400 nm nuo metalo paviršiaus, puikiai tinka biologinėms sąveikoms tyrinėti, nes dažniausiai afiniškai sąveikaujančių BAM molekulių dydžiai būna iki 300 nm [110]. Plazmonų elektrinis laukas sąveikauja su metalu. Prie metalinio paviršiaus prisijungus ar atsijungus molekulėms pasikeičia paviršinių plazmonų rezonansinis dažnis. Todėl keičiasi paviršinių plazmonų judesio kiekio momentas, taigi, keičiasi ir rezonanso kampas, kuriuo krintanti šviesa (kai bangos ilgis yra pastovus) sukelia PPR (matuojant paviršinių plazmonų rezonanso kampą), arba bangos ilgis ((kai krintančios į metalo plėvelę šviesos kampas yra pastovus), kuriam esant sukliamas PPR (matuojant PPR spektrą). Būtent šie pokyčiai ir

matuojami taikant PPR biologiniuose jutikliuose, nes rezonansinio bangos ilgio pokytis, o taip pat ir rezonanso kampo pokytis arba taip vadinamas PPR poslinkis, yra tiesiogiai proporcingas plazmonų poveikio zonoje esančios terpės arba metalo paviršiaus sudėties pokyčiui. Todėl specifiskai sąveikaujančių medžiagų koncentracijos gali būti kiekybiškai išmatuotos stebint PPR signalo pokyčius.

PPR kampas priklauso nuo metalo sluoksnio savybių, krintančios šviesos bangos ilgio ir medžiagų abiejuose metalo sluoksnio pusėse lūžio rodiklių. Kadangi lūžio rodiklis priklauso nuo temperatūros, tai matavimus reikia atlikti pastovioje temperatūroje. Labai svarbu, kad krintanti šviesa būtų monochromatinė ir p-polarizuota, nes nepolarizuota šviesa PPR nesukelia [111].

10 paveikslas vaizduoja principinę PPR biologinio jutiklio sensogramą (jutiklio atsako priklausomė nuo laiko) užregistruotą atlikus pilną tarpmolekulinio komplekso susidarymo ir to komplekso disociacijos tyrimo bei jutiklio regeneravimo ciklą. Tyrimas pradedamas PPR kiuvetę plaunant grynu buferiniu tirpalu. Nusistovėjus bazinei linijai į kiuvetę įleidžiamas mėginys su analite, kuri prisijungia prie PPR jutiklio paviršiuje imobilizuotos BAM (asociacijos stadija). Analitės prisijungimas prie jutiklio lusto paviršiuje imobilizuotos BAM sukelia terpės, esančios arti jutiklio paviršiaus (~ 300 nm), lūžio rodiklio padidėjimą, o tai sukelia rezonansinio signalo padidėjimą. Šios sensogramos dalies analizė leidžiamas apskaičiuoti stebimą asociacijos greičio konstantą. Jei yra žinoma analitės koncentracija, tai galima nustatyti ir asociacijos greičio konstantą. Esant pusiausvyrai, prisijungusios prie ligando ir disocijavusios analitės kiekiai yra lygūs ir PPR jutiklio atsakas priklauso tik nuo aktyvios analitės, esančios tirpale, koncentracijos. Pasiekus pusiausvyrą tarp asociacijos ir disociacijos, kiuvetę plaunant buferiniu tirpalu (disociacijos stadija), analitės tirpalas yra pakeičiamas buferiniu tirpalu. Kiuvetę plaunant buferiniu tirpalu ši pusiausvyra suardoma ir analitės-BAM kompleksas disocijuoja. Vykstant disociacijai stebimas signalo sumažėjimas. Analizuojant šiuos duomenis galima sužinoti disociacijos greičio konstantą. Siekiant suardyti BAM-analitės jungtis naudojama PPR jutiklių

regeneracija. PPR jutiklio paviršius regeneruojamas (regeneracijos stadija) praleidžiant pro gardelę regeneruojanti tirpalą. Dažnai juo naudojama 100 mmol/L HCl. Po to, siekiant atstatyti bazinę liniją, kiuvetė vėl plaunama grynu buferiniu tirpalu. Kaip matyti iš paveikslėlio vykstant disociacijai ir regeneracijai PPR signalas mažėja ir galiausiai grįžta iki pradinės vertės užregistruotos analizės paradžioje.



10 pav. Tipinė PPR biologinio jutiklio sensograma, registruojama atliekant visą tarpmolekulinio kompleksų susidarymo ir jo disociacijos tyrimo ir jutiklio paviršiaus regeneravimo ciklą.

Visas šis ciklas paprastai gali būti kartojamas keletą kartų naudojant skirtingas analitės koncentracijas. Atlikus biologinių molekulių sąveikos analizę galima nustatyti šios sąveikos afiniškumą ir kinetiką. Taip pat yra galima ir biologinės molekulinės sąveikos termodinaminė analizė taikant van Hoff'o lygtis sąveikų afiniškumui ir kinetikai eksperimentą atlikus prie skirtingų temperatūrų.

1.6 Elektrocheminiai imuniniai jutikliai

Elektrocheminiuose imuniniuose jutikliuose antikūnai arba antigenai imobilizuojamie elektrodo paviršiuje ir matuojamas elektrocheminis analizinis signalas. Pagal elektrocheminį signalo registravimo būdą šie jutikliai skirstomi į voltamperometrinius, potenciometrinius ir konduktometrinius. Elektrocheminiai jutikliai pasižymi atrankumu, paprastumu naudoti, žema aptikimo riba ir galimybe mažinti įrenginio dydį.

1.6.1 Voltamperometriniai imuniniai jutikliai

Voltamperometrija – tai grupė elektrocheminės analizės metodų, kai kintant indikatorinio elektrodo potencialui arba esant pastoviam indikatorinio elektrodo potencialui registruojama per elektrolitinę celę tekanti srovė. Elektrolitine cele tekanti srovė matuojama naudojant dvielektrodes ar trielektrodes elektrochemines schemas. Dažniausiai naudojama trijų elektrodų schema, kurią sudaro mažo paviršiaus ploto poliarizuojamas indikatorinis elektrodas bei didelio paviršiaus ploto nepoliarizuojantis lyginamasis ir pagalbinis elektrodas. Kadangi dvielektrodinėje sistemoje per abu elektrodus (indikatorinį ir palyginamąjį) teka pakankamai didelės srovės, tai kinta lyginamojo elektrodo varža ir potencialas. Dvielektrodėje sistemoje potencialas indikatoriniam elektrodui suteikiamas lyginamojo elektrodo atžvilgiu, tai kintant lyginamojo elektrodo potencialui neįmanoma palaikyti pastovaus indikatorinio elektrodo potencialo [112]. Tuo tarpu trielektrodėje sistemoje srovė teka ne per lyginamąjį elektrodą, o tik tarp indikatorinio ir pagalbinio, tačiau potencialas indikatoriniam elektrodui suteikiamas lyginamojo elektrodo atžvilgiu. Taigi, trielektrodė sistema kompensuoja potencialo kritimą, atsirandantį srovei tekant per tirpalą, išvengiama lyginamojo elektrodo poliarizacijos. Todėl šiuo atveju analizės rezultatai gaunami

tikslesni nei naudojant dvielektrodę sistemą [113]. Lyginamuoju elektrodu dažniausiai naudojamas Ag/AgCl,Cl⁻ elektrodas, o indikatoriniu ir pagalbinu – Au, Pt, Ag, C, elektrai laidūs polimerai. Indikatoriniai elektrodai turi būti chemiškai inertiški ir galintys greitai paimti elektronus iš elektroaktyvaus junginio arba jam perduoti.

Naudojami įvairūs voltamperometrijos metodai, kurių jautris bei atrankumas padidėja, optimizavus darbinius šių metodų parametrus. Tiriant antikūno-antigeno sąveiką dažniausiai yra naudojami šie voltamperometrinės analizės metodai: amperometrija, ciklinė voltamperometrija (CV), impulsinė amperometrija (PA) ir voltamperometrija (PV) bei kvadratinės bangos voltamperometrija (KBV), kurie gali būti kombinuojami su paviršiaus plazmono rezonanso įranga [114, 115, 116].

Bene labiausiai paplitęs voltamperometrinės analizės metodas yra **amperometrija**. Amperometrinių imuninių jutiklių veikimas pagrįstas elektrochemiškai aktyvaus junginio oksidacija arba redukcija ant indikatorinio elektrodo paviršiaus, esant pastoviam jo potencialui. Indikatorinio elektrodo potencialas turi būti pasirenkamas atsižvelgiant į elektrochemiškai aktyvios medžiagos bei interferentinio elektrolito prigimtį. Indikatoriniam elektrodui suteikus pastovų potencialą elektrodinės red-oks reakcijos greitis bei srovės stipris elektrinėje grandinėje priklauso nuo dalyvaujančių reakcijoje komponentų koncentracijos. Tai heterogeninės prigimties procesai, todėl vykstančių reakcijų greitis taip pat priklauso nuo elektronų pernašos greičio elektrodo paviršiuje ir analitės masės transporto prie elektrodo paviršiaus. Šių procesų visumą ir atspindi indikatoriniu elektrodu tekanti srovė.

Amperometriniai imuniniai jutikliai turi kelis privalumus, tai didelis analizinės sistemos jautris, tiesinė analitės koncentracijos ir analizinio signalo priklausomybė, atrankumas prie skirtingų potencialų ir taip pat didelis atrankumas imunologinėms reakcijoms. Pagrindinis amperometrinio imuninio jutiklio veikimo principas yra elektroaktyvių medžiagų koncentracijos nustatymas vykstant

fermentinei reakcijai arba BAM elektroaktyvaus žymens koncentracijos kopyčio nustatymas.

Tam tikrais atvejais, fiksuoto potencialo naudojimas gali sąlygoti prastą analizinio signalo atkuriamumą ir jautrio sumažėjimą dėl indikatorinio elektrodo užsiteršimo elektrodinės redukcijos arba oksidacijos produktais. To išvengti galima naudojant *impulsinės amperometrijos* (PA) metodą. Suteikiant elektrodai pasikartojančių, tam tikros trukmės, potencialų seriją galima indikatorinio elektrodo paviršių nuvalyti elektrochemiškai. Tai pasiekama šiam elektrodai, tam tikram laikui, suteikiant tokio dydžio potencialą (E_1), kad vyktyjo paviršiuje adsorbuojtų analitės elektoredukcijos arba elektrooksidacijos produktų desorbciją. Po to, tam tikram laikui, elektrodai suteikiamas potencialas, pakankamas kad vykty, pvz., analitės elektrooksidacija (E_2). Vėliau vėl kartojama valymo stadija (E_3) ir t.t. Tokiu būdu registruojama amperograma – srovės stiprio kitimas laike. Analizinis signalas sukeltas analitės oksidacijos išmatuojamas kaip srovės stiprio išmatuoto įvykus analitės oksidacijai ir srovės stiprio išmatuoto valymo stadijos pabaigoje skirtumas. Esant mažoms analitės koncentracijoms, registruojamas analizinis signalas yra tiesiogiai proporcingas analitės koncentracijai.

Viena iš paprasčiausių elektrocheminio signalo nustatymo metodikų yra tiesinio skleidimo voltamperometrija, kurios pagrindą sudaro indikatorinio elektrodo poliarizacija įtampa kintančia dideliu greičiu. Svarbi tiesinio skleidimo voltamperometrijos atmaina yra *ciklinė voltamperometrija*, kurioje naudojamas trikampio formos potencialo skleidimas: potencialas tolygiai keičiamas nuo pradinio E_{pr} ir galutinio E_g potencialo [117]. Kadangi elektoredukcijos (elektrooksidacijos) metu medžiaga dėl spartaus potencialo kitimo nespėja difuzijos būdu pasišalinti iš prie elektrodinio sluoksnio, tai ji oksiduojasi (redukuojasi) vykstant anodinei (katodinei) elektrodo poliarizacijai. Smailių skaičius ciklinėje voltamperogramoje priklauso nuo elektrochemiškai aktyvių junginių skaičiaus tiriamame tirpale, medžiagos prigimties ir eksperimentinių

sąlygų. Dažnai ciklinė voltamperometrija taikoma tyrinėti elektrocheminių vyksmų grįžtamumą.

Vienas iš labiausiai paplitusių voltamperometrinių analizės metodų yra **impulsinė voltamperometrija**. Skiriamos dvi impulsinės voltamperometrijos rūšys: normalioji ir diferencinė. Normaliojoje impulsinėje (arba tiesiog impulsinėje) voltamperometrijoje (NIV) indikatorinis elektrodas poliarizuojamas stačiakampiais 40 – 60 ms trukmės aukštėjančiais impulsais. Kiekvienas impulsas prasideda nuo tos pačios pradinio potencialo vertės. Taip elektrodui suteikiama vis didėjanti įtampa, o srovės stipris registruojamas kiekvieno impulso pabaigoje. Impulso kartojimo periodas 0,5 – 5 s. Registruojama impulsinė voltamperograma yra pakopinio pobūdžio, o registruojamos ribinės difuzinės srovės stipris tiesiogiai proporcingas analitės koncentracijai analizuojamame tirpale.

Diferencinėje impulsinėje voltamperometrijoje (DIV) indikatoriniui elektrodui kartu su lėtai kintančia įtampa ($0,002 - 0,01 \text{ V s}^{-1}$) suteikiamas papildomas pastovaus dydžio įtampos impulsas. Dažniausiai naudojami tokie DIV režimai: 0,025 – 0,05 V impulso amplitudė, apie 50 ms impulso trukmė, 0,5 – 5 s laiko intervalas tarp impulsų. Šiame metode srovės stipris registruojamas prieš pat suteikiant kiekvieną impulsą ir kiekvieno impulso pabaigoje. Todėl registruojamas srovės, tekančios prieš impulsą ir po impulso, stiprių skirtumas. Taigi, registruojamas srovės stiprio padidėjimas atitinkantis nuolatinį indikatoriniam elektrodui suteikto potencialo padidėjimą. Užregistruota poliarograma yra smailės formos. Smailės aukštis atitinka ribinę difuzinę srovę ir yra proporcingas analitės koncentracijai.

Dideliu nustatymo jautriu pasižymi ir **kvadratinės bangos voltamperometrija** (KBV). KBV savo esme panaši diferencinę impulsinę voltamperometriją, nors dažnai ji priskiriama į aukšto dažnio kintamos srovės voltamperometrijos metodams. Elektrodui suteikiamas potencialas formuojamas sumuojant laiptinės formos potencialo skleidimą su kvadratinės bangos kintamąja įtampa, kurios periodas yra lygus potencialo laiptelio trukmei [118]. Dažniausiai naudojami

kvadratinės bangos voltamperometrijos režimai: kintamos įtampos dažnis – iki kelių šimtų hercų, o amplitudė 0,01 – 0,1 V. Srovės stipris registruojamas kiekvieno teigiamo ir neigiamo įtampos impulsų pabaigoje, o skirtumo priklausomybė nuo skleidimo potencialo atvaizduojama KVB voltamperograma. Vienas svarbių KVB privalumų, padariusių šį metodą populiariesnį už DIV, yra foninių srovių kompensavimas. Pvz.: KBV leidžia dirbti katodinių potencialų srityje iš analizuojamų tirpalų nepašalinus deguonies, kuris netrukdo analizei, nes yra kompensuojamos palyginti didelės ir nestabilios jo redukcijos srovės [119,120].

PA imuniniai jutikliai lyginant su DIV, KBV ir CV imuniniais jutikliais pasižymi žymiai didesniu jautriu ir mažesne nustatymo riba.

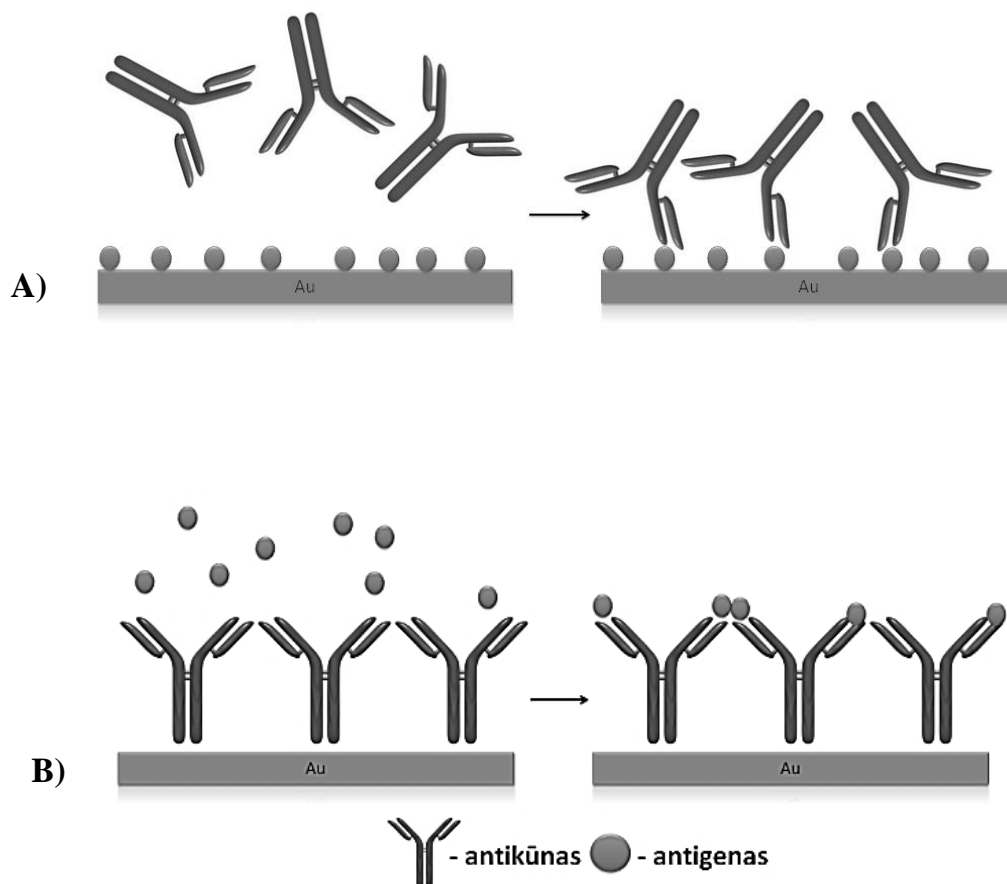
Voltamperometrijos metodų jautrį ir analizės rezultatų atsikartojamumą dažnai nulemia tinkamo indikatorinio elektrodo parinkimas. Pagrindiniai reikalavimai indikatoriniams elektrodams – mažos foninės srovės, greitos tiriamų analičių elektrocheminės reakcijos, geras rezultatų atsikartojamumas bei nesudėtingas elektrodo pagaminimas.

1.7 PPR detekcijos būdai

PPR analizėje detekcijos būdas yra pasirenkamas remiantis įvairiais faktoriais tokiais, kaip pvz.: mėginio matrica, analizės molekulės dydis ar jos koncentracija mėginyje, sąveikos charakteristikos (ar analizė bus detektuojama tiesiogiai ar bus naudojamos papildomos medžiagos pvz., antriniai antikūnai žymėti fermentu). Šiame skyriuje aptariami pagrindiniai detekcijos būdai: tiesioginė detekcija, daugiapakopė detekcija, konkurencinis (pakeitimo) metodas.

1.7.1 Tiesioginė detekcija

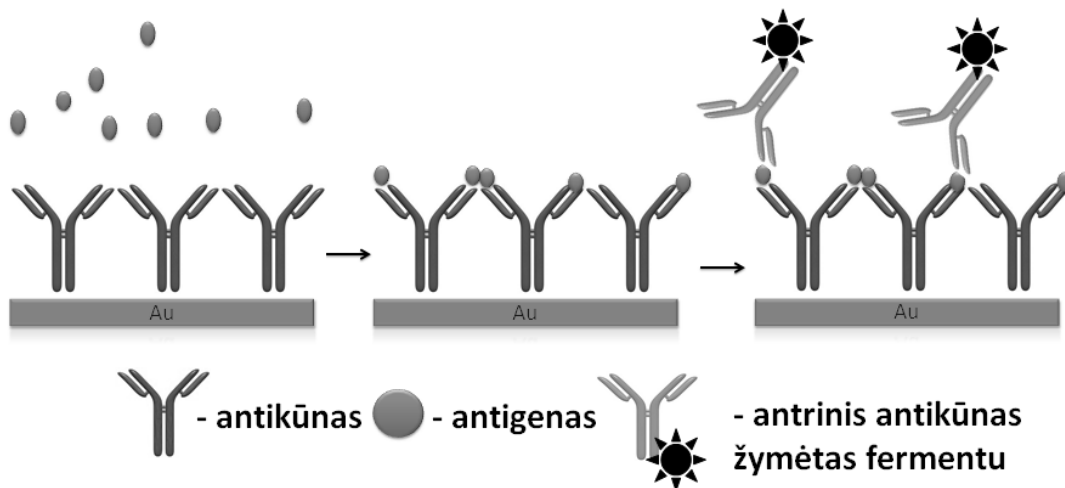
Taikant tiesioginės detekcijos metodą, biologinio atpažinimo elementas imobilizuojamas PPR jutiklio paviršiuje. Nustatomoji analizė yra tirpale ir sąveikauja su imobilizuota BAM. Ši tiesioginė biologinių molekulių sąveika yra detekuojama kaip kitimas tam tikro kampo, kuriam esant paviršiaus plazmonų rezonansas sukelia atspindėtos šviesos stiprio sumažėjimą PPR jutiklio signalas yra tiesiogiai proporcingas analizės koncentracijai. Vienas iš pagrindinių šios detekcijos būdo privalumų yra greita analizė ir sistemos paprastumas, kai sąveika vyksta tarp dviejų analizės elementų - analizės ir biologinio atpažinimo elemento. Tačiau šiuo būdu ne visada galima pasiekti nustatomas mažiausias analizės aptikimo ribas.



11 pav. (A) ir (B) tiesioginis detekcijos PPR metodu formatas.

1.7.2 Daugiapakopė detekcija

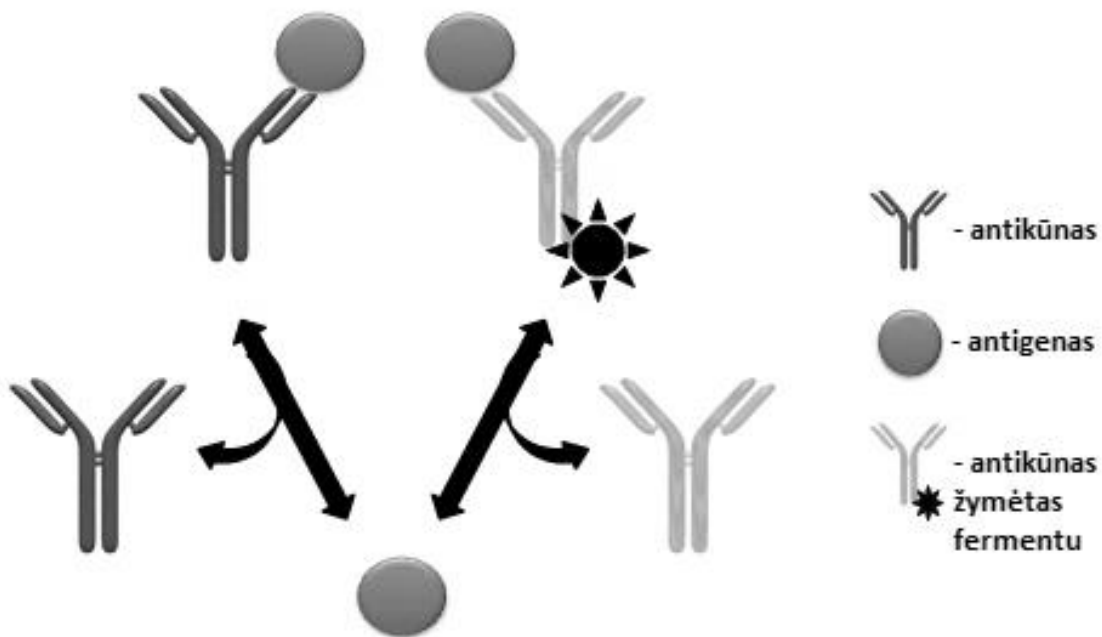
Daugiapakopė detekcija taikoma, kai analitės koncentracija yra labai maža ir analizinė sistema jos nedetektuoja. Šios netiesioginės analizės metu vyksta kelios sąveikos tarp mažiausiai tryjų analizės elementų ir kai vienas iš elementų yra pagalbinė medžiaga, kaip antriniai antikūnai žymėti fermentu [121, 122]. Vienas iš geriausiai žinomų tokios detekcijos pavyzdžių yra IFA metodas. Daugiapakopė detekcija plačiai naudojama PPR ir EL analizėje [27], taip pat taikant šį detekcijos būdą yra apjungiami keli analiziniai metodai, kaip PPR ir EL [8]. Kadangi pirminiai antikūnai turi kelis epitopus sąveikaujančius su antriniais antikūnais žymėtais fermentu yra galimybė padidinti šio būdo jautrį ir sustiprinti analizinį signalą. Taip pat tai yra sudėtingesnis ir ilgiau trunkantis detekcijos būdas dėl daugiapakopės analizės [123].



12 pav. Daugiapakopės detekcijos PPR metodu formatas.

1.7.3 Konkurencinis (pakaitinis) metodas

Konkurencinė detekcija yra pagrįsta dviejų biologinių molekulių (BAM) konkurencija prisijungti prie vienos sąveikos vietos (toks detekcijos metodo taikymas būdingas esant mažiems antigenams turintiems vieną epitopą ar antikūnams turintiems vieną sąveikos vietą). Dažniausiai konkuruoja žinomos koncentracijos žymėta molekulė su nežinomos koncentracijos analite. Po konkurencinės sąveikos nežymėtos analizės kiekis nustatomas pagal žymtos BAM prisijungimą. Šis detekcijos būdas yra jautrus ir plačiai pritaikomas tiek tiesioginės, tiek ir netiesioginės analizės metu.



13 pav. Konkurencinis detekcijos PPR metodu formatas.

1.8 Imuniniu jutikliu pritaikomumas

Susidomėjimas imuniniais jutikliais didėja kiekvienais metais dėl jų plataus pritaikomumo įvairiose srityse – klinikinėje diagnostikoje, maisto produktų analizėje, aplinkos taršos stebėjimuose.

1.8.1 Komerciniai imuniniai jutikliai

Pirmasis komercinis imuninis jutiklis buvo nėštumo testas skirtas nustatyti žmogaus choriongonadotropino hormonui. Šio jutiklio sukūrimas parodė, kai jutikliai skirti naudoti namų sąlygomis turi būti pigūs, paprasti naudojimui, o jų atsakas turi būti gerai suprantamas. Keli plataus vartojimo imuninių jutiklių pavyzdžiai yra pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė. Plataus vartojimo imuninių jutiklių pavyzdžiai.

Analitė	Metodas
Gliukozė	Potenciometrinis [124]
Žmogaus choriongonadotropinas	Optinis (fluorescencinis) [125]
Folio rūgštis maisto produktuose	IFA [126]
Kokainas	Optinis [127]
Vėžys	Elektrocheminis [128]
<i>Escherichia coli</i>	Kalorimetrinis [2]

1.8.2 Klinikinė diagnostika

Naujovių diegimas gamtos moksluose, tokiuose kaip biochemija, imunologija ar molekulinė inžinerija, paskatino daugelio ligų gydymo metodų tobulėjimą. Inovacijų taikymo rezultatas yra geresnė visuomenės sveikata ir

ilgesnė vidutinė gyvenimo trukmė. Pagrindinės šiuolaikinės ligos yra įvairūs kraujotakos sutrikimai, širdies ligos bei vėžiniai susirgimai. Ankstyva šių ligų diagnostika yra raktas į sėkmingą išgyjimą. Tad reikalingas greitas ir jautrus detekcijos metodas, toks kaip PPR.

Vėžio diagnostika ir gydymas yra daug iššūkių kelianti medicininė priemonė. Daug mokslininkų dirba šioje srityje, siekdami sukurti biologinius jutiklius nustatančius ypač mažas vėžio žymenų koncentracijas, naudojant ypač mažus mėginio kiekius (kraujo, audinio ar kaulo). Imuniniuose jutikliuose antikūnai yra naudojami prostatos, krūties, kiaušidžių, gaubtinės ir tiesios žarnos vėžio žymenims nustatyti ankstyvosiose stadijose [88]. Carrara mokslinė grupė aprašo elektrocheminį įrenginį, sugebantį atpažinti hepatokarcinomos (kepenų vėžio) žymenį (SCCA) pagal pacientų serumo IgM frakciją. Buvo sukurtas mikro-bio-lustelis pasižymintis labai žema aptikimo riba – 2,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kuriame antikūnai prieš žymenį mobilizuojami ant auksu dengto paviršiaus [129].

Imuninių jutiklių pritaikymo medicinoje pavyzdžiais gali būti E.coli [2], hcg- β [3], mioglobulinų, susijusių su pofinfarkto būsenomis [130], antikūnų prieš anticholeros toksiną [131] bei baltymų sąveikaujančių su riebiosiomis rūgštimis ir susijusių su audinių pažeidimais [132] analizė.

Imuninio jutiklio, naudojamo klinikinėje diagnostikoje, privalumai yra ligos nustatymas ankstyvojoje stadijoje ir didesnė sėkmingo ankstyvojo gydymo tikimybė. Dažnai yra sujungiami keli analizės metodai, jau esami ir naujai sukurti imuniniai jutikliai. Vienas iš pavyzdžių – skysčių chromatografija su masių detektoriumi (SC-MD), neabejojama šio metodo patikimumu diagnozuojant vėžinius susirgimus [133].

1.8.3 Maisto produktų analizė

Pastaraisiais metais išaugo susidomėjimas imuniniais jutikliais ir galimybė juos taikyti maisto produktų analizei, kuriai taikoma vis didesni reikalavimai ir griežtesnis rizikos vertinimas [134, 135, 136]. Yra žinoma daugiau nei 200 ligų, plintančių per maisto produktus ar gėrimus. Per maistą plintančių ligų pagrindiniai sukėlėjai yra virusai (67 %), toliau seka bakterijos (30 %) ir įvairūs parazitai (3 %). Taip pat galima išskirti ir 5 pagrindinius patogenus – *Salmonella*, *Listeria*, *Toxoplasma*, *Campylobacter* ir *Escherichia coli* O157:H7.

Pastaruoju metu užkrėstų maisto produktų identifikavimas tampa vis svaresne užduotimi tiek maisto pramonėje, tiek sveikatos priežiūros organizacijose. Patogenų identifikavimui maisto produktuose naudojami įvairūs analizės metodai – mikroorganizmų kultūrų auginimas ant įvairių terpių [137], polimerazinė grandininė reakcija (PGR) [138] ir IFA imunofermentinė analizė [139]. Tačiau šie metodai turi kelis minusus– brangi, sudėtingo naudojimo laboratorinė įranga, sudėtingas mėginių paruošimas, bei ilga analizės trukmė. Siekiant pašalinti šiuos trūkumus, buvo ieškoma naujo analizės metodo. Biologiniai jutikliai, veikiantys PPR fenomenu pagrindu, turi daug privalumų, lyginant su ankščiau išvardintais analizės metodais, taikomais maisto analizei: greita ir jautri detekcija, nenaudojamos pagalbinės medžiagos – žymenys.

1.8.4 Sprogstamųjų medžiagų likučių paieška

PPR analizės metodas yra pritaikomas ir sprogstamųjų medžiagų likučių paieškoms [7]. Vienas iš pavyzdžių yra 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) nustatymas [140]. Analizėje buvo panaudota TNT atmaina (2,4,6-trinitrofenil hemocianinas) ir netiesioginio konkurencinio tipo jutiklio formatas, leidęs nustatyti TNT su aptikimo riba 2 pg/mL. TNT taip pat buvo tiriamas modifikavus PPR jutiklio

paviršių dendrimerais [141]. Šiame tyrime tiolinis SMS buvo kombinuojamas su poli(amidoaminu) (PAMAM), kuris leido imobilizuoti TNT atmainą PPR jutiklio paviršiuje ir sąveikauti su monokloniniais antikūnais (aptikimo ribos – 110 pg/mL). Dar vienas iš pavyzdžių yra heksahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazino (RDX) detekcija, kurioje yra panaudojamos ir aukso nanodalelės, besijungiančios prie sprogių detektuojamos medžiagos. Šiuo metodu nustatomos analitės aptikimo ribos yra 12 fmol/L [142].

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1 *Prietaisai ir priemonės*

- PPR analizatorius Autolab ESPRIT (ECO-Chemie, Olandija)
- PPR jutiklių lustai (XanTec bioanalytics GmbH, Vokietija);
- Potenciostatas PGSTAT 302N/Autolab, EcoChemie (Utrechtas, Olandija);
- Atominių jėgų mikroskopas AFM BioScope II, Veeco Instruments LTD. (Santa Barbara, JAV);
- Fotodaugintuvas Hamamatsu H7468-01, Hamamatsu Photonics K. K. (Japonija);
- Šviesolaidis Ocean Optics (JAV).

2.2 *Medžiagos ir reagentai*

Darbe buvo naudoti: žmogaus augimo hormonas (ŽAH) ir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas (TMB) iš Calbiochem (La Jolla, CA, USA) ir Clinical Science Products Inc. (Mansfield, MA, JAV). Monokloniniai pelės antikūnai prieš ŽAH (anti-ŽAH), monokloniniai antikūnai prieš kiaulės augimo hormoną (anti-KAH), antriniai ožkos anti-pelės IgG (Fc specifiniai) antikūnai, žymėti krienų peroksidaze (KP), buvo gauti iš AbD serotec (Oxford, JK). Antriniai antikūnai, žymėti KP, ir specifiniai galvijų antikūnai iš Pourquier instituto (Montpellier, Prancūzija). NHS, *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC), natrio dodecilsulfatas (SDS), 2-MEAgauti iš Sigma-Aldrich (Steinheim, Vokietija) ir ethanolaminas – iš Merck KGaA (Darmstadt, Vokietija). PBS tabletės, ledinė acto rūgštis ir metanolis (Merck Biosciences, Jungtinė Karalystė), natrio acetatas ir natrio šarmas (Sigma,

Vokietija). Darbe buvo naudojamas 30% H₂O₂ tirpalas iš AppliChem (Darmstadt, Vokietija). Visi kiti naudojami tyrimuose reagentai buvo analizinio grynumo ir aukštos kokybės. Vandeniniai tirpalai buvo pagaminti iš HRPC-laipsnio vandens, distiliuoto per Purator-B Glas Ceramic (Berlin, Vokietija). Darbe buvo naudojamas refrakcinio rodiklio skystis (n = 1,518) iš Cargille Labs (Cedar Grove, Naujasis Džersis).

2.3 Metodika

2.3.1 Antikūnų prieš žmogaus augomo hormoną redukavimas

Antikūnų prieš žmogaus augomo hormoną (anti-ŽAH) fragmentai (frag-anti-ŽAH) buvo gauti redukuojant minėtus antikūnus 2-MEA. Redukcija atlikta 10 mmol/L Na acetatiniame buferiniame tirpale, pH 4,5 Pradinė anti-ŽAH koncentracija – 3,7 mg/ml. Antikūnų redukcija atlikta naudojant tris skirtingas 2-MEA koncentracijas – 15, 35 ir 70 mmol/L. Atliekant redukciją anti-ŽAH ir 2-MEA tirpalai buvo termostatuojami 37 °C temperatūroje 90 min. Atliekant redukciją antikūnų molekulės buvo padalintos pusiau, įvykus disulfidinių tiltelių jungiančių sunkiasias grandines redukcijai, nepažeidžiant antikūnų aktyviųjų centrų sąveikaujančių su antigenu.

2.3.2 Antikūnų fragmentų charakterizavimas

Antikūnų fragmentai buvo charakterizuojami atliekant elektroforezę pusiau redukuojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE elektroforezė). Tam buvo naudojama dviejų skirtingų koncentracijų (4 % ir 12 %) poliakrilamido gelių sistema, aprašyta Laemmli [143]. Kontrolei buvo naudojamas standartinis baltymų

mišinys sudarytas iš skirtingos molekulinės masės baltymų. Baltymų fragmentai buvo dažomi Coomasie brilliant G-250 dažu.

2.3.3 PPR jutiklio lusto valymas

Naujas PPR jutiklio lustas (plonu aukso sluoksniu padengta stiklinė plokštelė) buvo valomas NaOH ir HCl. Tam jutiklio lustas 20 min. pamerkiamas į 1 mol/L NaOH tirpalą, nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir pamerkiamas 5 min. į 1 mol/L HCl tirpalą. Po 5 min. ištraukiamas, plaunamas distiliuotu vandeniu ir nudžiovinamas.

2.3.4 Savitvarkio monosluoksniu suformavimas PPR jutiklio lusto paviršiuje

Nuvalytas PPR jutiklio lustas 24 val. panardinamas į 1 mmol/L 11-merkaptoundekano rūgšties tirpalą metanolyje. Po to, jutiklio lustas nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir stiklinis paviršius kruopščiai nuvalomas specialia servetėle optikai.

2.3.5 MUR monosluoksniu arba KMD hidrogeliu modifikuoto jutiklio lusto paruošimas modifikavimui biologiškai aktyviomis medžiagomis

Ant laikiklyje esančios pusiau cilindrinės prizmės užlašinamas lašas imersinės alyvos ir atsargiai, auksiniu paviršiumi į viršų, uždedamas jutiklio lustas. Laikiklis įstatomas į PPR analizatorių, uždedama ir pritvirtinama PPR kiuvetė. Tada atliekamas jutiklio paviršiaus stabilizavimas/sudrėkinimas. Tam

buvo naudojamas buferinis tirpalas, kuriame ruošiami ligando tirpalai ir 0,5 % SDS bei 50 mmol/L NaOH tirpalas. Šie tirpalai paimami paeiliui automatiškai. Stabilizavimas vykdomas 2 min. intervalais apie 1 val.

MUR monosluoksniu arba KMD hidrogelio aktyvavimas. MUR arba KMD hidrogelio karboksilo grupės buvo aktyvuojamos 0,1 mmol/L NHS ir 0,4 mmol/L EDC tirpalų vandenyje mišiniu santykiu 1:1. Aktyvavimo procedūra atliekama 5 min. Po to NHS ir EDC tirpalų mišinys iš PPR kiuvetės pašalinamas plaunant tuo pačiu buferiniu tirpalu, kuriame bus ruošiami ligando tirpalai.

2.3.6 ŽAH arba anti-ŽAH imobilizavimas MUR monosluoksniu arba KMD hidrogeliu modifikuoto jutiklio paviršiuje

Imobilizavimas atliekamas abiejuose PPRkiuvetės kanaluose. Naudota 3,03 $\mu\text{mol/L}$ ŽAH tirpalas arba 1,64 $\mu\text{mol/L}$ anti-ŽAH tirpalas 10 mmol/L Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,5. Imobilizavimas buvo vykdomas 25 min. Neprisijungusios biologinės medžiagos iš PPR kiuvetės pašalinamos ją plaunant 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5.

2.3.7 Baltymo G imobilizavimas PPR jutiklio lusto paviršiuje

Imobilizavimas buvo atliktas abiejuose PPR kiuvetės kanaluose. Prie MUR monosluoksniu aktyvuotų karboksilo funkcinių grupių baltymas G buvo prijungtas kovalentiniu būdu panaudojus jo pirmines amino funkcines grupes. Imobilizavimui buvo naudotas 42,67 $\mu\text{mol/L}$ baltymo G tirpalas Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,5. Imobilizavimas buvo vykdomas 25 min.

2.3.8 Anti-ŽAH imobilizavimas baltymuG modifikuoto PPR jutiklio lusto paviršiuje

Imobilizavimas buvo atliekamas abiejuose PPR kiuvetės kanaluose. Imobilizavimui buvo naudotas 1,64 anti-ŽAH tirpalas 10 mmol/L PBS tirpale, pH 7,4. Imobilizavimas buvo vykdomas 25 min. Neprisijungę anti-ŽAH iš PPR kiuvetės pašalinamos ją plaunant PBS tirpalu, pH 7,4.

2.3.9 Aktyvaus paviršiaus dezaktyvavimas

Po anti-ŽAH, ŽAH ar baltymoG prijungimo PPR jutiklio lusto paviršiuje yra būtina dezaktyvuoti aktyvias MUR monosluoksnio ar KMD hidrogelio NHS esterijų grupes. Likę aktyvūs esteriai dezaktyvuojami 1 mol/L etanolamino tirpalu, pH 8,5. Dezaktyvavimas buvo vykdomas 10 min.

2.3.10 Frag-anti-ŽAH imobilizavimas jutiklio paviršiuje

Imobilizavimas atliekamas abiejuose PPR kiuvetės kanaluose. Imobilizavimui buvo naudotas pradinės 0,44 $\mu\text{mol/L}$ anti-ŽAH koncentracijos tirpalas 10 mmol/L Na acetatinio buferiniame tirpale, pH 4,5. Antikūnų fragmentai prie PPR jutiklio lusto auksinio paviršiaus prijungiami tiesiogiai panaudojant jų tiolines funkcines grupes. Imobilizavimas buvo vykdomas 25 min. Po frag-anti-ŽAH imobilizavimo būtina blokuoti nemodifikuotą PPR jutiklio lusto auksinį paviršių. Šiam tikslui jutiklio lustas inkubuojamas 1 mg/mL jaučio serumo albumino (JSA) 10 mmol/L PBS tirpale, pH 7,4. Blokavimas buvo atliktas kambario temperatūroje ir vykdytas 8 val.

2.3.11 Modifikuoto PPR jutiklio lusto paviršiaus regeneravimas

Tam, kad tą patį jutiklį galėtume panaudoti dar kartą, jutiklio paviršius buvo regeneruojamas plaunant PPR kiuvetę regeneruojančiu tirpalu – 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH tirpalu. Regeneravimas buvo vykdomas 5 min. Regeneravimo metu turi būti pilnai suardomas imobilizuoto ligando-analitės kompleksas.

2.3.12 PPR analizatoriaus paruošimas darbui

PPR tyrimai buvo atliekami dvikanaliu PPR analizatoriumi „Autolab ESPRIT“, kuriame vienas kanalas naudojamas PPR signalo registravimui, o kitas kanalas naudojamas kaip palyginamasis, jo pagalba išvengiama nespecifinės sąveikos įtakos.

Prieš pradėdant tyrimą į pusiau cilindrinę prizmę yra nukreipiamas lazerio spinduliuojamas p-poliarizuotos 670 nm bangos ilgio monochromatinės šviesos spindulys. Šviesos kritimo kampą galima keisti nuo 62° iki 78°. Pusiaucilindrinė prizmė eliminuoja spindulio „vaikščiojimą“ ir pasklidimą po jutiklio paviršiuje esantį ploną aukso sluoksnį. Krintančios į foto diodą šviesos intensyvumas priklauso nuo šviesos kritimo į jutiklį kampo. Esant PPR kampui, PPR registruojamas kaip ryškus atspindėtos šviesos stiprio sumažėjimas. PPR kampas yra matuojamas be pertraukos visą laiką ir užregistruojama jutiklio atsako priklausomybė nuo laiko, vadinama sensograma.

2.3.13 Elektrocheminiai matavimai

Tyrimuose PPR analizatoriaus elektrocheminė celė buvo kombinuojama su kompiuterizuotu potenciostatu PGSTAT 302N/Autolab (EcoChemie, Olandija), kuriame įdiegta GPES 4.9 programinė įranga. Elektrocheminiai matavimai atlikti naudojant impulsinę amperometriją ($E_{app} = +200$ mV, $t_p = 1$ s) ir ciklinę voltamperometriją ($E = -75 - (+650)$ mV), $v = 50$ mV s⁻¹). Darbe buvo naudojama trijų elektrodų sistema: indikatorinis elektrodas – Au jutiklio lustas, pagalbinis – platinos viela ir lyginamasis – Ag/AgCl. Visi matavimai atlikti 24 °C temperatūroje 50mmol/L fosfato buferiniame tirpale, pH 7,4, esant 0,1 mol KCl (indiferentinis elektrolitas). Analiziniai signalai buvo įvertinti naudojant skirtingas anti-ŽAH koncentracijas, įvykus ŽAH ir anti-ŽAH komplekso sąveikai su antriniais anti-ŽAH/KP, esant 0,25 mmol/L TMBir 0,1 mmol/L H₂O₂.

2.3.14 Atominės jėgų mikroskopijos analizė (PPR lusto analizė)

Jutiklio lusto paviršiaus vaizdai buvo gauti atominių jėgų mikroskopu (AJM). Buvo analizuojami 3 skirtingi paviršiai: (1) PPR jutiklio lusto aukso paviršius, (2) jutiklio lusto paviršiuje imobilizuoti frag-anti-ŽAH, (3) ŽAH ir frag-anti-ŽAH suformavę imunini kompleksą jutiklio lusto paviršiuje. Analizė buvo atliekama tapšnojimo režimu, kambario temperatūroje ir ore. Buvo naudojama silicio adata, 10 μm/s skanavimo greitis. Visų vaizdų rezoliucija 200 x 200 pikselių. AJM duomenys buvo apdorojami naudojant NanoScope 8.10 programinę įrangą.

2.3.15 Matavimų duomenų apibendrinimas

Atlikus pakartotinių (3 kartus) matavimų serijas, analizinių signalų vidurkiai, PPR pusiausvyrinis kampas, nuolinkio kampas, koreliacijos koeficientas buvo apskaičiuoti naudojant programinės įrangos įprastines formules. Matavimo duomenų apdorojime nagrinėjamos voltamperogramos ir impulsinės amperogramos yra taisyklingos formos ir be triukšmų. Aptikimo riba apibrėžiama ir skaičiuojama kaip koncentracija, atitinkanti tris analizinio signalo standartinius nuokrypius (3 δ).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

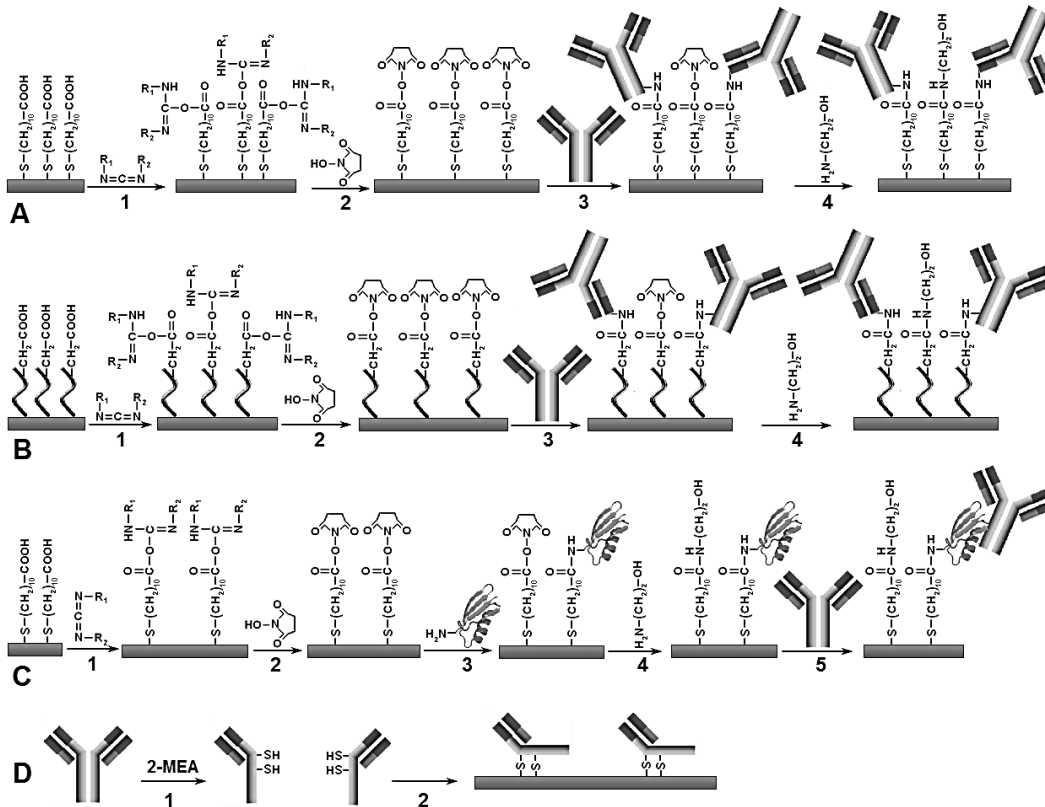
Šiame darbe antikūno-antigeno sąveikai tirti buvo pasirinktas žmogaus augimo hormonas ir antikūnai prieš žmogaus augimo hormoną. Žmogaus augimo hormonas, dar vadinamas somatotropinu, yra paprastas neglikozilintas baltymas. Labiausiai jo paplitusi forma sudaryta iš 191 amino rūgšties polipeptidinės grandinės, sujungtos dviem disulfidiniais tilteliais [144]. ŽAH molekulinė masė yra 21,7 kDa, o pI = 4,9. ŽAH gaminasi posmegeninėje liaukoje – hipofizėje, iš kur yra išskiriamas į kraują. Hipofizėje ŽAH yra 5,0 – 10 mg. Per dieną vyrams šio hormono išsiskiria 0,4 – 1,0 mg, paaugliams ir moterims šiek tiek daugiau [145].

3.1 Anti-ŽAH imobilizavimas PPR jutiklio lusto paviršiuje

Antikūnų imobilizavimas yra vienas iš svarbiausių etapų konstruojant imuninius jutiklius, nes imobilizavimo būdo pasirinkimas daro didelę įtaką antikūno-antigeno sąveikai. Viena iš pagrindinių to priežasčių – atsitiktinė antikūnų orientacija ant paviršiaus. Be to, imobilizuotų antikūnų orientacija ir paviršinė jų koncentracija yra svarbūs faktoriai veikiantys PPR imuninio jutiklio jautrį.

Siekiant surasti tinkamiausią anti-ŽAH imobilizavimo PPR jutiklio lusto paviršiuje būdą, buvo lyginami keturi skirtingi imobilizavimo metodai. Trys iš jų buvo pagrįsti natyvių anti-ŽAH antikūnų imobilizavimu, o ketvirtasis metodas buvo pagrįstas anti-ŽAH fragmentų imobilizavimu. Šie keturi imobilizavimo būdai yra: (1) atsitiktinis (nekryptingas) anti-ŽAH imobilizavimas 11-merkaptoundekano rūgšties SMS modifikuoto PPR lusto paviršiuje (14 pav. A); (2) atsitiktinis anti-ŽAH imobilizavimas KMD hidrogeliu modifikuoto PPR lusto paviršiuje (14 pav. B); (3) orientuotas (kryptingas) anti-ŽAH imobilizavimas

per baltymą G prijungtą MUR monosluoksniu pagalba (14 pav. C); (4) orientuotas frag-anti-ŽAH imobilizavimas ant aukso jų funkcinių tiolinių grupių chemisorbcijos aukso paviršiuje dėka (14 pav. D).



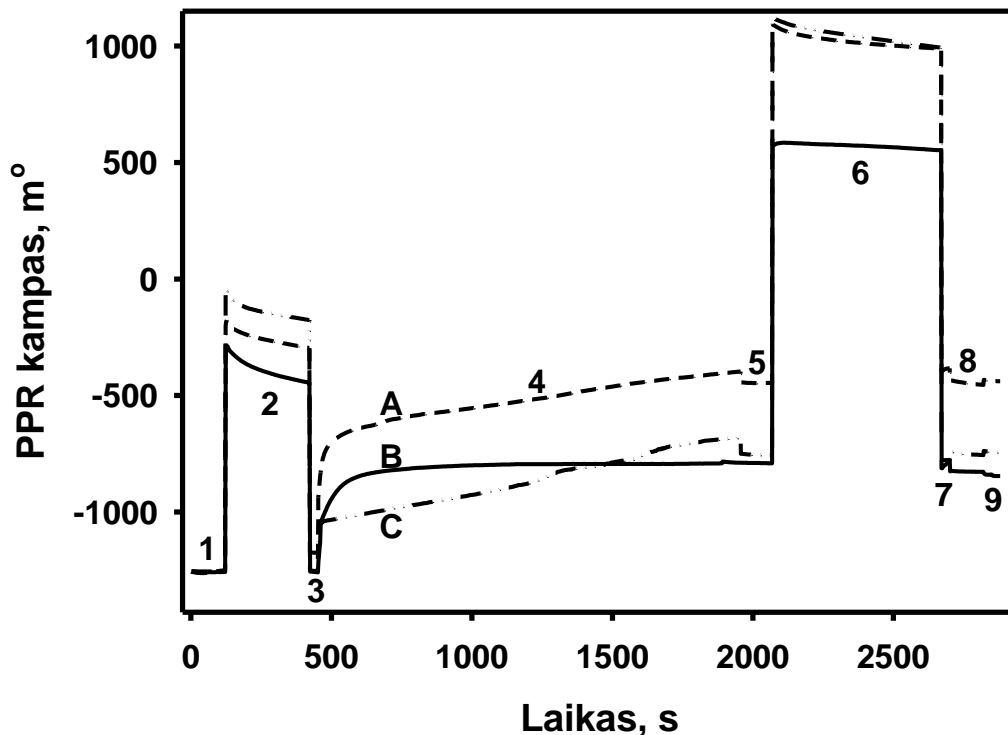
14 pav. Principinė anti-ŽAH(A-C) ir frag-anti-ŽAH (D) imobilizavimo schema. (A) anti-ŽAH imobilizuoti per MUR monosluoksni, (B) per KMDhidrogelį, (C) per prie MUR prijungtą baltymąG. R₁ = CH₂CH₃, R₂ = (CH₂)₃N(CH₃)₂, 2-MEA = 2-merkptoetilaminas.

Viena iš labiausiai paplitusių antikūnų imobilizavimo elektrodo paviršiuje strategijų yra kovalentinis antikūnų imobilizavimas panaudojant jų pirmines amino funkcines grupes. Dėl daugybės privalumų, tokių kaip stabilumas vandeniniuose tirpaluose, pH ir temperatūros pokyčiams, maža neatrankioji sorbcija ir kt., biologinių molekulių kovalentinis imobilizavimas per SMS yra plačiai naudojamas konstruojant imuninius jutiklius. Kovalentinis antikūnų prijungimas prie dekstrano hidrogelių populiarus dėl pakankamai mažos neatrankiosios sorbcijos PPR lustų paviršiuje. Be to, hidrofiliniai dekstrano

hidrogeliai, lyginant su SMS modifikuotais paviršiais, turi žymiai didesnę paviršiaus plotą ir todėl pasižymi žymiai didesne imobilizavimo talpa.

15 paveiksle pateikti eksperimentiniai anti-ŽAH antikūnų imobilizavimo PPR jutiklio lusto paviršiuje per MUR monosluoksnį (A) ir KMD hidrogelį (B) duomenys. Šis imobilizavimas pagrįstas elektrostatische sąveika tarp neigiamą krūvį turinčių MUR arba KMD karboksilo grupių ir teigiamą krūvį turinčių anti-ŽAH pirminių amino funkcinių grupių. Taigi, šiuo atveju anti-ŽAH imobilizuojami kovalentiškai. Prieš imobilizavimą modifikuotas PPR lusto paviršiuje veikiamas 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5, kol nusistovi stabilus rezonansinis kampas (bazinė linija) (15 pav. A-B, 1). Tuomet karboksilo grupės aktyvuojamos EDC ir NHS tirpalų vandenyje mišiniu santykiu 1:1 (15 pav. A-B, 2). Aktyvavimas vykdomas 5 min. Šiame etape karboksilo grupės paverčiamos į labai reaktyvius N-hidroksisukcinimido esterius, kuriems reaguojant su anti-ŽAH pirminėmis amino grupėmis, vyksta anti-ŽAH imobilizavimas. Aktyvacijos stadija yra esminė imobilizavimui, nes reaktyvių N-hidroksisukcinimido esterių susidarymas įgalina stabilų anti-ŽAH prijungimą. Po aktyvacijos paviršius plaunamas 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5. (15 pav. A-B, 3) ir į PPR kiuvetę įleidžiamas 1,64 μmol/L anti-ŽAH tirpalas 10 mmol/L Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,5. Tuo metu registruotos sensogramos parodė laipsnišką PPR kampo didėjimą, reiškiantį anti-ŽAH prisijungimą ant aktyvuoto paviršiaus (15 pav. A-B, 4). PPR kampas laikui bėgant didėjo ir pasiekė pusiausvyrą po 25 min. Neprisijungusio anti-ŽAH molekulės išplaunamos iš PPR kiuvetės plaunant ją 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5 (15 pav. A-B, 5). Po anti-ŽAH imobilizavimo kažkiek N-hidroksisukcinimido esterinių grupių lieka nesureagavusių. Kad išvengti kitų baltymų prisijungimo prie šių grupių, jas reikia užblokuoti transformuojant į amidus. Todėl, po anti-ŽAH imobilizavimo likusios nesureagavusios N-hidroksisukcinimido esterinių grupės užblokuojamos etanolaminu (15 pav. A-B, 6). Po dezaktyvacijos etanolamino perteklius išplaunamas iš PPR kiuvetės plaunant 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu,

pH 4,5 (15 pav. A-B, 7). Tyrimo rezultatai rodo, kad likusias nesureagavusias N-hidroksisukcinimido esterių grupes sėkmingai blokavo etanolaminas. Po plovimo PPR lustas veikiamas regeneruojančiu tirpalu (50 mmol/L NaOH ir 0,5 % SDS) (15 pav. A-B, 8), o po to 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4 (15 pav. A-B, 9).

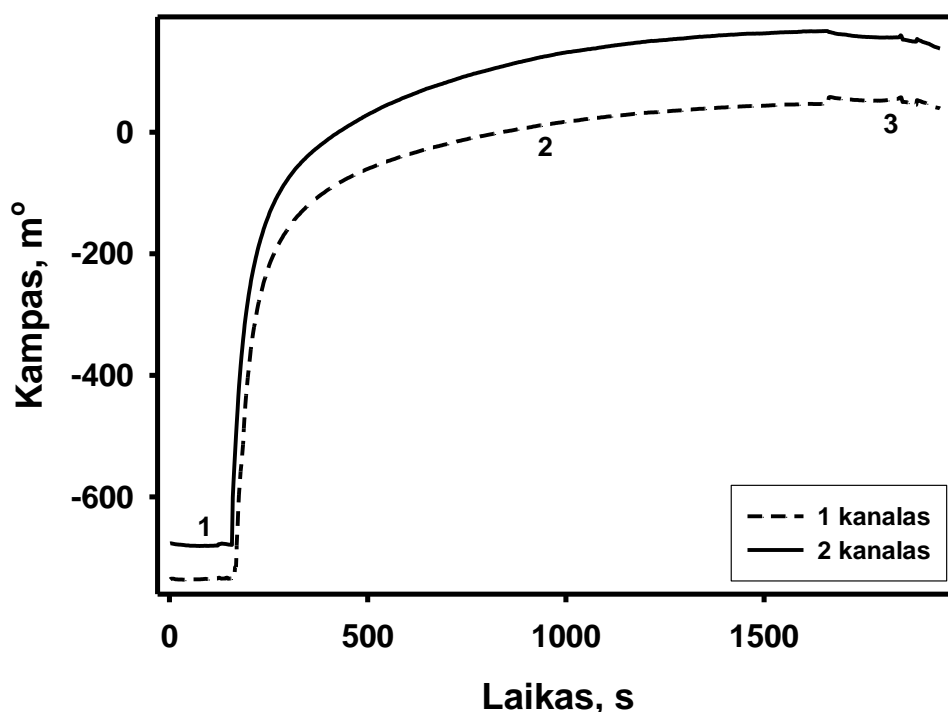


15 pav. PPR sensogramos vaizduojančios anti-ŽAH imobilizavimą per KMD hidrogelį (A) ir MUR SMS (B) bei baltymo G prijungimą prie MUR SMS (C): 1 – bazinė linija (10 mmol/L Na acetato buferinis tirpalas, pH 4,5), 2 – MUR arba KMD-hidrogelio aktyvavimas EDC/NHS mišiniu, 3, 5, 7 – kiuvetės plovimas 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5, 4 – anti-ŽAH imobilizavimas arba baltymo G prijungimas, 6 – likusių aktyvių esterinių grupių dezaktyvavimas etanolaminu, 8 – kiuvetės plovimas regeneruojamuoju 50 mmol/L NaOH ir 0,5 % SDS tirpalų mišiniu, 9 – kiuvetės plovimas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4.

Antikūnų jungimas per baltymą A arba baltymą G prie jutiklio lusto paviršiaus yra perspektyvi priemonė kryptingam antikūnų imobilizavimui. Abu baltymai specifiškai sąveikauja su antikūnų Fc fragmentais, o aktyvusis antikūnų centras lieka laisvas (15 pav. C, 5). Tokiu būdu šis imobilizavimo būdas įgalina

antikūnus imobilizuoti kryptingai. Tačiau tiesioginis baltymų A ir G imobilizavimas PPR jutiklių lustų paviršiuje yra mažiau stabilus, todėl jie paprastai imobilizuojami per tarpinį sluoksnį.

15 paveikslo C kreivė iliustruoja baltymoG prisijungimo prie MUR modifikuoto PPR jutiklio lusto realius duomenis. Baltymui G prisijungus prie MUR modifikuoto PPR jutiklio lusto buvo gautas $418,43 \pm 5$ m° PPR kampo poslinkis. Kadangi tarp prijungtų molekulių kiekio ir PPR kampo pokyčio egzistuoja tiesinė priklausomybė, o 120 m° PPR kampo pokytis atitinka 1 ng/mm² baltymo paviršinės koncentracijos pokytį, tai pagal PPR kampo poslinkį apskaičiuota baltymoG paviršinė koncentracija yra $3,49 \pm 0,04$ ng/mm².



16 pav. PPR sensograma vaizduojanti anti-ŽAH imobilizavimą per baltymą G prijungtą prie MUR SAM: 1 – bazinė linija (10 mmol/L PBS buferinis tirpalas pH 6,0), 2 – anti-ŽAH prijungimas prie baltymo G, 3 – kiuvetes plovimas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu pH 6,0.

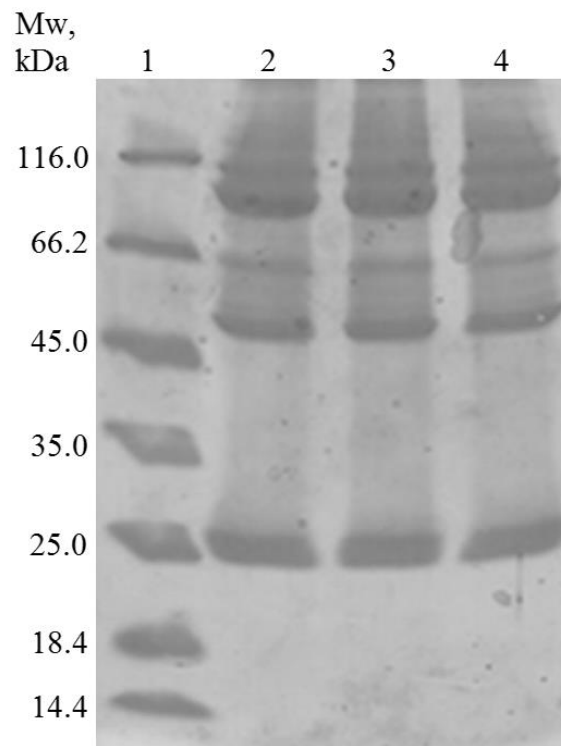
Pirmas, anti-ŽAH imobilizavimo per MUR/bG sluoksnį, etapas remiasi jutiklio lusto plovimu 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 6,0, kol nusistovi stabilus rezonansinis kampas (bazinė linija) (16 pav. 1). Į PPR kiuvetę įleidus 1,64 μmol/L anti-ŽAH tirpalo PBS buferiniame tirpale, pH 6,0, buvo matyti laipsniškas PPR kampo didėjimas, parodantis anti-ŽAH jungimąsi ant MUR/bG modifikuoto jutiklio paviršiaus (16 pav. 2). PPR kampas didėjo laikui bėgant ir pasiekė pusiausvyrą po 25 min. Neprisijungusios prie PPR jutiklio lusto anti-ŽAH molekulės iš PPR kiuvetės išplaunamos plaunant ją PBS buferiniu tirpalu, pH 6,0.

3.2 Anti-ŽAH redukavimas ir anti-ŽAH fragmentų imobilizavimas

Biologinės molekulės ant auksinių paviršių taip pat gali būti imobilizuotos panaudojant jų natyvias funkcines –SH arba –S–S– grupes. Šis imobilizavimo būdas pagrįstas stipriu laisvų tiolinių funkcinių grupių prisijungimu prie aukso paviršiaus. Anti-ŽAH priklauso IgG klasei. Anti-ŽAH molekulinė masė yra apie 150 kDa. IgG molekulė savyje turi dvi polipeptidinių grandinių poras. Kiekviena pora turi sunkiąją grandinę ir lengvąją grandinę. Sunkiosios grandinės sujungtos disulfidinėmis jungtimis, kurias galima redukuoti imunoglobuliną veikiant 2-MEA ar DTT.

Siekiant gauti laisvas funkcines –SH grupes, anti-ŽAH disulfidiniai tilteliai buvo redukuojami naudojant skirtingas 2-MEA koncentracijas (15, 35 ir 70 mmol/L) ir kaitinama 37 °C termostate 90 min. Anti-ŽAH redukavimo efektyvumas buvo išanalizuotas panaudojant SDS-PAGE elektroforezę. Elektroforegramoje (17 pav.) 2, 3 ir 4 takeliuose matyti trys ryškios anti-ŽAH fragmentų juostos, kurios pagal molekulinės masės standartus (17 pav. 1 takelis) atitiktų apie 25, 50 ir 80 kDa. 80 kDa juosta prilygsta redukuoto fragmento anti-ŽAH antikūno molekulinėmasei ir gali būti priskirta pusiau perskeltam anti-ŽAH (frag-anti-ŽAH). Tai įrodo, kad dalyje anti-ŽAH molekulių buvo

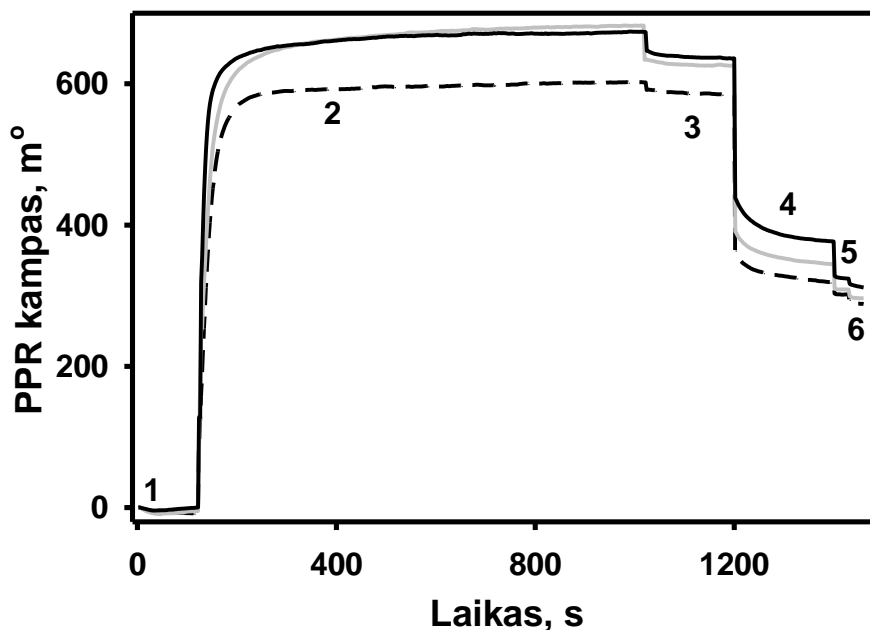
redukuoti disulfidiniai tilteliai, jungiantys sunkiąsias anti-ŽAH grandines. Elektroforezės gelio nuotraukoje taip pat matyti ir 25 bei 50 kDa molekulinės masės anti-ŽAH fragmentų juostos, kurių atsiradimas gali būti paaiškintas tuo, kad dalyje anti-ŽAH molekulių buvo redukuoti ne tik disulfidiniai tilteliai, jungiantys sunkiąsias grandines, bet taip pat ir jungiantys sunkiąsias, ir lengvasias grandines.



17 pav. Redukuotų anti-ŽAH antikūnų fragmentų įvertinimas SDS-PAGE: 1 takelis – baltymų molekulinės masės standartas, 2 takelis – frag-anti-ŽAH gauti naudojant 15, 35 (3 takelis) ir 70 mmol/L (4 stulpelis) 2-MEA koncentracijas.

Vertinant anti-ŽAH redukavimo efektyvumo priklausomybę nuo 2-MEA koncentracijos pagal elektroforezės gelio nuotrauką matyti, kad anti-ŽAH fragmentai, gauti esant skirtingoms 2-MEA koncentracijoms, vizualiai nesiskiria. Todėl papildomai buvo atlikti imobilizuotų anti-ŽAH fragmentų paviršinės koncentracijos ir jų sąveikos su antigenu efektyvumo tyrimai PPR. Tam PPR jutiklio lusto paviršiuje buvo imobilizuoti anti-ŽAH fragmentai, gauti

redukavimui naudojant skirtingas 2-MEA koncentracijas – 15, 35 ir 70 mmol/L. Anti-ŽAH fragmentų imobilizavimas pradedamas PPR jutiklio lusto paviršių plaunant 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5, kol nusistovi stabilus rezonansinis kampas (bazinė linija) (18 pav. 1). Po anti-ŽAH fragmentų tirpalo 10 mmol/L Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,5, įleidimo į PPR kiuvetę buvo matyti laipsniškas PPR kampo didėjimas, parodantis anti-ŽAH fragmentų jungimąsi prie lusto paviršiaus (18 pav. 2). PPR kampas didėjo laikui bėgant ir pasiekė pusiausvyrą po 25 min. Neprisijungę anti-ŽAH fragmentai išplaunami iš PPRkiuvetės ją plaunant 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4.5 (18 pav. 3). PPR kampo pokyčiai dėl anti-ŽAH fragmentų prisijungimo, gautų anti-ŽAH redukuojant 15, 35 ir 70 mmol/L 2-MEA buvo $583,95 \pm 9$, $625,41 \pm 10$ ir $636,08 \pm 10$ m° atitinkamai. Frag-anti-ŽAH fragmentų paviršinė koncentracija apskaičiuota iš šių rezultatų yra $4,87 \pm 0,08$, $5,21 \pm 0,08$ ir $5,30 \pm 0,08$ ng/mm² atitinkamai 15, 35 ir 70 mmol/L 2-MEA koncentracijai.

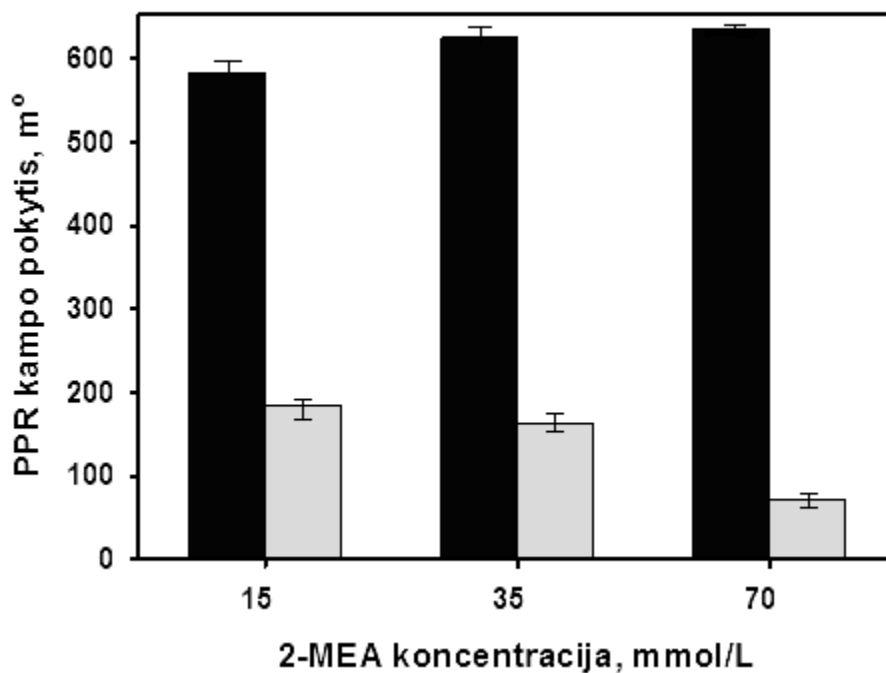


18 pav. Imobilizavimo priklausomybė nuo 2-MEA koncentracijos: 1 – bazinė linija (Na acetato buferinis tirpalas, pH 4,5), 2 – anti-ŽAH fragmentų imobilizavimas, 3, 5 – plovimas 10 mmol/L Na acetate buferiniu tirpalu, pH 4,5, 4 – plovimas 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH, 6 – plovimas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4.

Kaip matyti 17 paveiksle pateiktoje anti-ŽAH fragmentų elektroforeogramoje, anti-ŽAH redukcija 2-MEA lemia įvairių antikūnų prieš ŽAH fragmentų susidarymą. Tačiau mūsų atveju svarbūs yra tik tie anti-ŽAH fragmentai, kurie susidaro skilus disulfidiniams tilteliams tik tarp anti-ŽAH sunkiųjų grandinių (frag-anti-ŽAH), tik tuomet išsaugomas aktyvusis antikūno prieš žmogaus augimo hormoną centras ir toks imobilizuotas anti-ŽAH fragmentas dalyvauja sąveikoje su ŽAH. Anti-ŽAH disulfidinių jungčių, esančių tarp sunkiųjų grandinių, skilimas padidina tinkamos imobilizuotų anti-ŽAH fragmentų orientacijos ant PPR jutiklio lusto paviršiaus tikimybę ir sumažina jutiklio atrankumo praradimą dėl atsitiktinės anti-ŽAH orientacijos. Tiolinių grupių išlaisvinimas redukuojant anti-ŽAH antikūnus užtikrina stiprią frag-anti-ŽAH sąveiką su aukso paviršiumi. Šio imobilizavimo būdo privalumas prieš kitus imobilizavimo būdus yra tas, kad šiuo būdu imobilizuoti antikūnai pasižymi aukštas antigeno prisijungimo konstantas bei didelį stabilumą, o imobilizuoti antikūnų fragmentai aukso paviršiuje yra taip orientuoti, kad atstumas tarp aktyviojo centro ir aukso paviršiaus yra vienodas [10].

19 paveikslas iliustruoja PPR kampo pokyčius, kuriuos sukelia anti-ŽAH fragmentų prisijungimas PPR lusto paviršiuje (juodi stulpeliai) ir imuninio komplekso susidarymas tarp imobilizuotų frag-anti-ŽAH ir ŽAH esančio mėginyje (pilki stulpeliai), atsižvelgiant į 2-MEA koncentraciją. Atlikus anti-ŽAH fragmentų imobilizavimą pastebėta, kad kuo didesnė 2-MEA koncentracija, tuo anti-ŽAH fragmentų imobilizuojama daugiau (19 pav. juodi stulpeliai). Mažiausias PPR kampo pokytis, lygus 583,95 m°, buvo užregistruotas imobilizuojant anti-ŽAH fragmentus gautus anti-ŽAH redukcijai naudojant 15 mmol/L 2-MEA. 2-MEA koncentracijai padidėjus, padidėjo ir imobilizuotų anti-ŽAH fragmentų paviršinė koncentracija, o dėl to ir PPR kampo pokytis. 625,41 ir 636,08 m° PPR kampo pokytis buvo registruotas atitinkamai 35 ir 70 mmol/L 2-MEA koncentracijai. Tačiau atlikus imobilizuotų anti-ŽAH fragmentų sąveikos su ŽAH tyrimus, nustatytas priešingas rezultatas – kuo

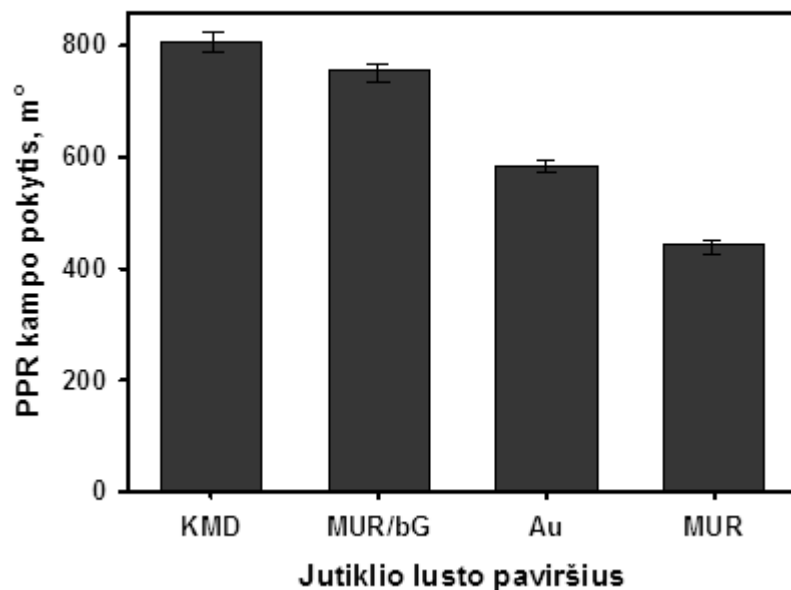
redukavimui naudojama didesnė 2-MEA koncentracija, tuo imobilizuotų anti-ŽAH fragmentų sąveikos su ŽAH signalas (PPR kampo poslinkis) gaunamas mažesnis. Tai galėtų būti paaiškinama tuo, kad kuo didesnė 2-MEA koncentracija, tuo daugiau anti-ŽAH molekulių redukuojami disulfidiniai tilteliai ne tik jungiantys sunkiąsias grandines, bet ir jungiantys sunkiąsias ir lengvąsias grandines. Dėl to aktyvusis centras suardomas ir sąveika tarp tokių imobilizuotų anti-ŽAH fragmentų ir ŽAH nevyksta. Atsižvelgiant į tai, optimali 2-MEA koncentracija, ruošiant anti-ŽAH fragmentus, buvo nustatyta 15 mmol/L, nes esant šiai 2-MEA koncentracijai didžiausia anti-ŽAH molekulių dalis redukuojama nepažeidžiant jų aktyviojo centro ir tokiu būdu išlaikoma didelė ŽAH prisijungimo geba.



19 pav. PPR kampo pokytis, kurį sukelia anti-ŽAH fragmentų prijungimas ant PPR lusto paviršiaus (juodi stulpeliai) ir imuninio komplekso susidarymas tarp imobilizuotų frag-anti-ŽAH fragmentų ir ŽAH (pilki stulpeliai), atsižvelgiant į 2-MEA koncentraciją.

3.3 Imobilizuotų antikūnų ir antigeno sąveikos tyrimas

20 paveiksle matyti skirtingų imobilizavimo metodų įtaka paviršinei imobilizuotų antikūnų koncentracijai. PPR kampo pokytis, antikūnams prisijungus PPR jutiklio lusto paviršiuje, apskaičiuojamas kaip skirtumas tarp PPR signalų prieš imobilizavimo stadiją ir po PPR kiuvetės praplovimo buferiniu tirpalu, siekiant iš PPR kiuvetės pašalinti neimobilizuotus antikūnus (15 pav. 3 ir 5 etapai).

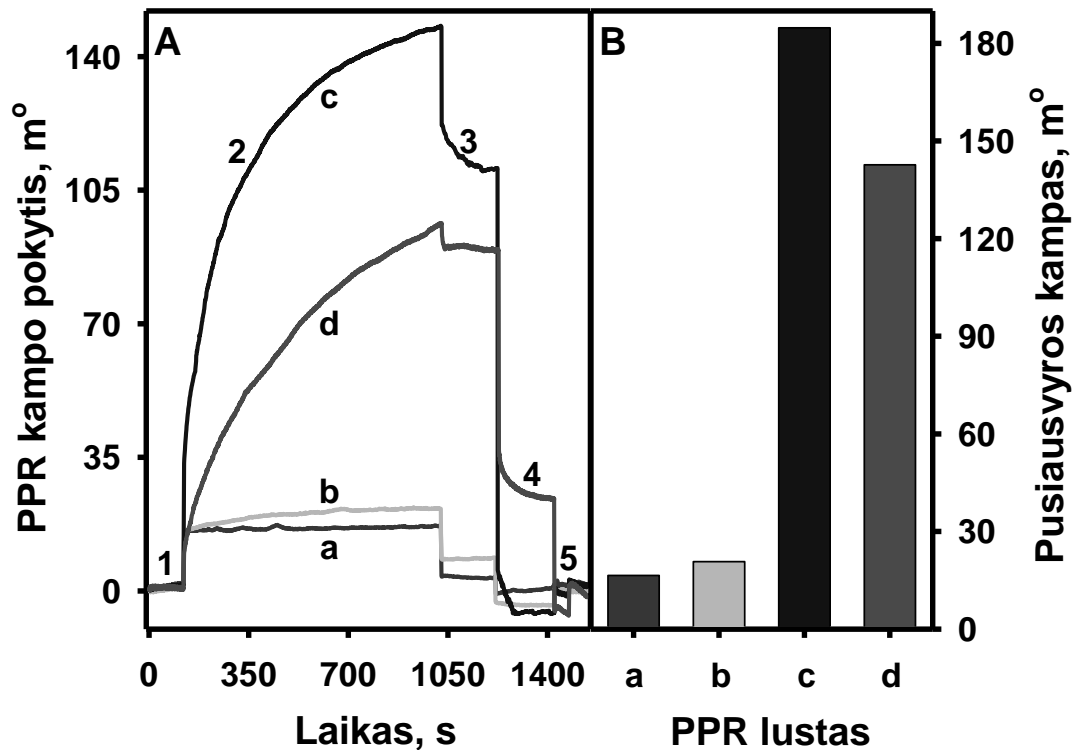


20 pav. PPR kampo poslinkio priklausomybė nuo jutiklio lusto modifikavimo būdo: KMD – nekryptingas anti-ŽAH imobilizavimas per KMD-hidrogelį, MUR/bG – kryptinga anti-ŽAH sąveika per Fc sritis su baltymuG, Au – kryptingas antikūnų fragmentų imobilizavimas per aktyvias tiolines grupes, MUR – nekryptingas anti-ŽAH imobilizavimas ant MUR monosluoksnio.

PPR kampo pokytis atitinkantis anti-ŽAH imobilizavimą KMD hidrogeliu (KMD/anti-ŽAH), MUR/bG (MUR/bG/anti-ŽAH) ir MUR monosluoksniu (MUR/anti-ŽAH) modifikuotų PPR lustų paviršiuje bei frag-anti-ŽAH fragmentų (Au/frag-anti-ŽAH) imobilizavimą PPR lusto aukso paviršiuje buvo atitinkamai $807,53 \pm 10$, $754,88 \pm 9$, $443,01 \pm 5$ ir $583,95 \pm 6$ m° (20 pav.). Tai atitinka

$6,73 \pm 0,08$, $6,29 \pm 0,08$, $3,69 \pm 0,04$ ir $4,87 \pm 0,05$ ng/mm² imobilizuotų antikūnų paviršinę koncentraciją, nes tarp prijungtų molekulių kiekio ir PPR kampo pokyčio egzistuoja tiesinė priklausomybė: 120 m° kampo pokytis atitinka 1 ng/mm² baltymo paviršinės koncentracijos pokytį.

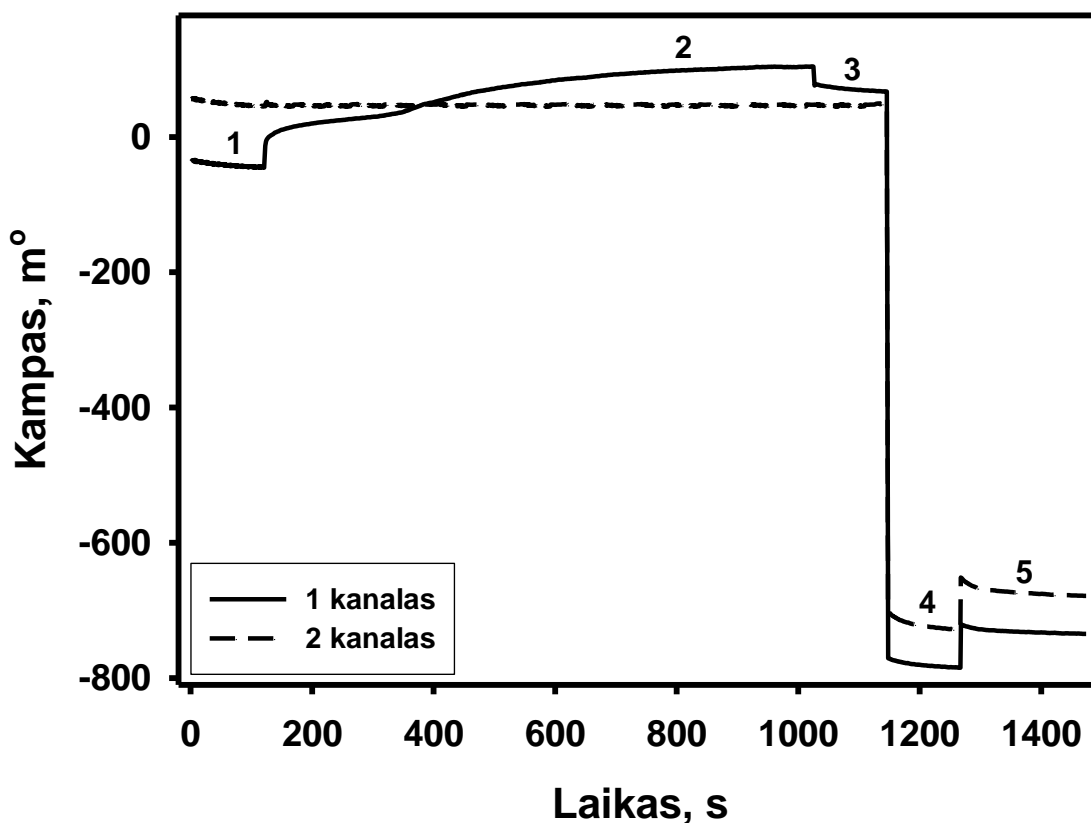
Iš eksperimentinių duomenų, pateiktų 21 paveiksle matyti, kad didžiausias antikūnų kiekis gaunamas nekryptingo anti-ŽAH imobilizavimo per KMD hidrogelį atveju. Tuo tarpu mažiausias anti-ŽAH kiekis imobilizuojamas nekryptingos imobilizacijos per MUR savitvarkį monosluoksnį metu. Šie rezultatai patvirtina, kad dekstrano hidrogeliai turi didelį paviršiaus plotą, kuris leidžia imobilizuoti žymiai didesnę antikūnų kiekį, lyginant su SMS. Tačiau nepaisant to, kad daugiausiai anti-ŽAH antikūnų buvo imobilizuota KMD hidrogeliu modifikuoto PPR jutiklio lusto paviršiuje, didžiausias 184,75 m° PPR signalas buvo stebėtas vykstant ŽAH sąveikai su anti-ŽAH imobilizuotais per MUR/bG (21 pav. c). PPR signalas sukeltas vykstant ŽAH sąveikai su anti-ŽAH antikūnais imobilizuotais KMD hidrogeliui ir MUR modifikuotų PPR lustų paviršiuje buvo atitinkamai 20,73 ir 16,51 m° (21 pav. a ir b). Tai reiškia, kad šie signalai buvo atitinkamai 11,2 ir 8,9 karto mažesni. Stebėtas PPR kampo pokytis vykstant sąveikai tarp imobilizuotų frag-anti-ŽAH ir ŽAH buvo 142,68 m°. Taigi, didžiausias analizinis signalas gaunamas augimo hormonui sąveikaujant su anti-ŽAH imobilizuotais PPR jutiklio lusto paviršiuje per baltymą G, o mažiausias sąveikaujant su anti-ŽAH imobilizuotais per MUR SMS.



21 pav. (A) PPR sensogramos. (B) Pusiausvyros kampo priklausomybė nuo antikūnų imobilizavimo būdo. a – MUR/anti-ŽAH, b – KMD/anti-ŽAH, c – MUR/bG/anti-ŽAH, d – Au/frag-anti-ŽAH. ŽAH koncentracija– 1.59 $\mu\text{mol/L}$.

Šie rezultatai rodo, kad nepaisant to, kad didžiausias anti-ŽAH kiekis imobilizuojamas KMD hidrogeliu modifikuotų PPR lustų lustų paviršiuje, jų sąveika su ŽAH praktiškai nevyksta, dėl to, kad didžioji dalis anti-ŽAH imobilizuojama per amino grupes, esančias aktyviajame centre ir tokiu būdu taip imobilizuoti antikūnai netenka savo biologinio aktyvumo. Vis dėl to, tikėtina, kad mažiau nei 10 % antikūnų išlieka aktyvūs, kai imobilizuojama nekryptingu imobilizavimo būdu. Tuo tarpu prijungtas baltymo G sluoksnis suteikia kryptingą anti-ŽAH imobilizavimą jautriam ŽAH detektavimui. Kadangi kiekviena baltymo G molekulė turi daugiau nei vieną prisijungimo vietą antikūnų prijungimui per Fc fragmentą, tai anti-ŽAH prijungimas prie baltymo G, nepriklausomai nuo baltymo G orientacijos, yra galimas. Kadangi anti-ŽAH prijungimas įvyko per antikūnų Fc fragmentą, tai antikūnų aktyvieji centrai nebuvo deformuoti. Taigi,

anti-ŽAH antikūnų imobilizavimas per MUR/bG duodą tolygų, stabilų ir steriškai prieinamą biologinio atpažinimo sluoksnį. Tačiau anti-ŽAH imobilizavimo per MUR/bG trūkumas yra būtinybė imobilizuoti baltymoG sluoksnį. Be to, nepavyko surasti tokio regeneruojančio tirpalo, kuris suardytų antikūno-antigeno kompleksą ir neturėtų įtakos anti-ŽAH ir bG kompleksui. Visais atvejais nuo paviršiaus buvo pašalintas ne tik ŽAH, bet ir anti-ŽAH (22 pav.). Taigi, tokio jutiklio daugkartiniams tyrimams naudoti negalima.



22 pav. PPR signalo kitimas: 1 – bazinė linija, 2 – anti-ŽAH sąveika su ŽAH, 3,5 – kiuvetės plovimas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4, 4 – regeneravimas 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH tirpalu.

Kitas pagal intensyvumą PPR signalas, lygus 142,68 m°, stebėtas vykstant ŽAH sąveikai su PPR jutiklio lusto paviršiuje imobilizuotais frag-anti-ŽAH (21 pav. d). Šis signalas buvo tik 1,3 karto mažesnis, nei signalas, gautas PPR jutiklio

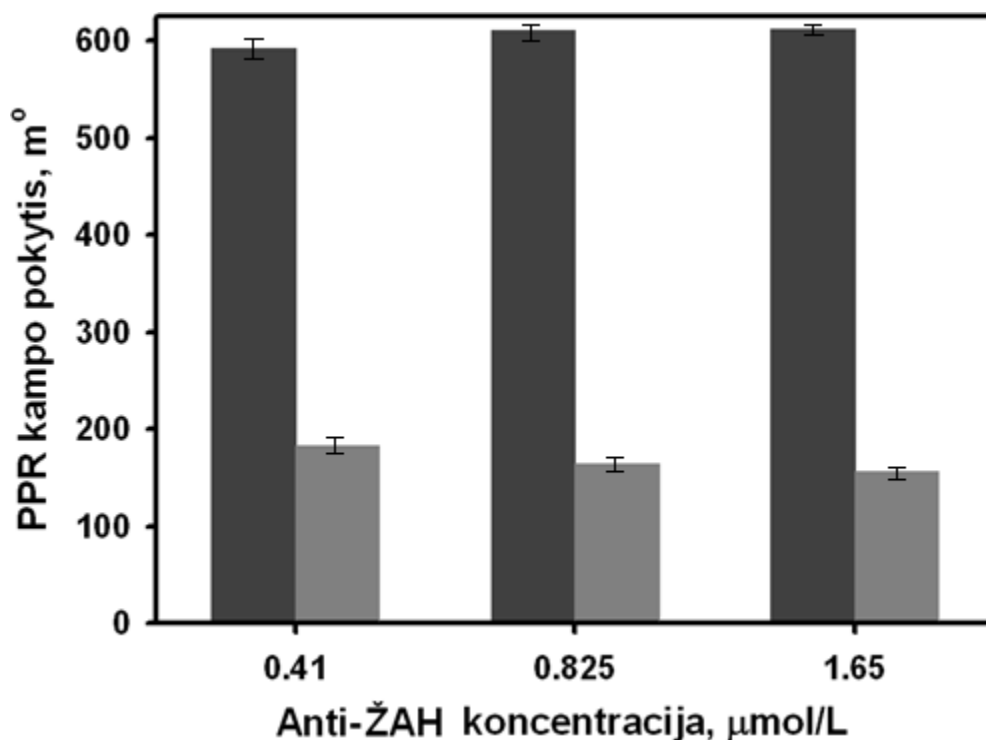
lusto modifikuoto MUR/bG/anti-ŽAH atveju. Tai atitinka kitų mokslininkų publikuotus duomenis, kurie teigia, kad imunojautrūs paviršiai gauti imobilizuojant redukuotus IgG pasižymi didesniu antigeno prisijungimo aktyvumu, negu paviršiai su imobilizuotais natyviais IgG. Mažesnis frag-anti-ŽAH fragmentų antigeno prisijungimo aktyvumas, palyginus su anti-ŽAH imobilizavimu per MUR/bG, galėjo būti įtakotas dalinės antikūnų jungimosi vietų dezaktyvacijos frag-anti-ŽAH paruošimo metu ir/arba dėl vėlesnės frag-anti-ŽAH modifikuotų PPR jutiklių lustų inkubacijos JSA tirpale, siekiant užblokuoti aktyvias baltymų sorbcijos vietas PPR jutiklio lusto paviršiuje. Vis dėlto imobilizavimo metodas, pagrįstas sąveika tarp IgG fragmentų tiolinių grupių ir aukso paviršiaus, turi pranašumų, nes imobilizuoti antikūnai išlaiko tiek aukštas antigeno prisijungimo konstantas, tiek didelį stabilumą. Šis imobilizavimo metodas pasižymi tinkama IgG fragmentų orientacija, vienodu atstumu tarp antikūno aktyviojo centro ir PPR jutiklio lusto paviršiaus, nesukelia tariamų afiniškumo konstantų išsibarstymo. Dėl pakankamai didelės imobilizavimo talpos, atlikimo paprastumo bei mažos kainos, lyginant su kitais naudotais būdais, imobilizavimo būdas pagrįstas frag-anti-ŽAH panaudojimu buvo nustatytas tinkamiausiu imobilizavimo būdu, konstruojant PPR imuninį jutiklį skirtą ŽAH nustatymui.

3.4 Frag-anti-ŽAH ir ŽAH komplekso formavimosi tyrimas

Ištirta optimali anti-ŽAH koncentracija frag-anti-ŽAH fragmentų gavimui redukuojant 15 mmol/L 2-MEA PPR jutiklio lusto modifikavimui. Redukcijos reakcija sukėlė S–S tiltelių tarp sunkiųjų grandinių skylimą, o antikūno aktyvusis centras liko nepalietas. Frag-anti-ŽAH, ant auksinio PPR jutiklio lusto paviršiaus, buvo imobilizuoti inkubuojant jutiklio lustą frag-anti-ŽAH tirpale. Frag-anti-ŽAH prie jutiklio paviršiaus prisijungė per išlaisvintas antikūno lanksto srities tiolines

grupės. Siekiant išvengti nespecifinės adsorbcijos, po imobilizavimo likę prisijungimo centrai PPR jutiklio lusto aukso paviršiuje buvo užblokuoti JSA. Tam anti-ŽAH fragmentais modifikuotas jutiklio lustas buvo inkubuojamas 8 val. kambario temperatūroje 10 mmol/L PBS buferiniame tirpale pH 7,4 turinčame 1 mg/mL JSA.

23 paveikslas iliustruoja PPR kampo pokyčius, kuriuos sukelia anti-ŽAH fragmentų prisijungimas ant PPR lusto paviršiaus (tamsiai pilki stulpeliai) ir imuninio komplekso susidarymas tarp imobilizuotų frag-anti-ŽAH ir ŽAH esančio mėginyje (šviesiai pilki stulpeliai), atsižvelgiant į redukcijai naudotą anti-ŽAH koncentraciją. ŽAH koncentracija 5 $\mu\text{mol/L}$. 23 paveikslo apibendrinti duomenys pateikti 3 lentelėje.



23 pav. PPR kampo pokytis, kurį sukelia anti-ŽAH fragmentų prisijungimas ant PPR lusto paviršiaus (tamsiai pilki stulpeliai) ir imuninio komplekso susidarymas tarp imobilizuotų frag-anti-ŽAH ir ŽAH (šviesiai pilki stulpeliai), atsižvelgiant į pradinę anti-ŽAH koncentraciją.

3 lentelė. PPR kampo pokyčio priklausomybė nuo anti-ŽAH koncentracijos naudotos frag-anti-ŽAH paruošimui.

Anti-ŽAH koncentracija, μmol/L	PPR kampo pokytis po frag-anti-ŽAH imobilizavimo, m°	PPR kampo pokytis po frag-anti-ŽAH ir ŽAH sąveikos, m°
0,41	583,95 ± 6,10	174,20 ± 5,99
0,83	610,61 ± 7,20	155,57 ± 5,55
1,65	612,19 ± 7,32	147,37 ± 4,79

*Standartinis nuokrypis (STDEV) buvo paskaičiuotas iš 3 vienodai modifikuotų PPR jutiklio lustų.

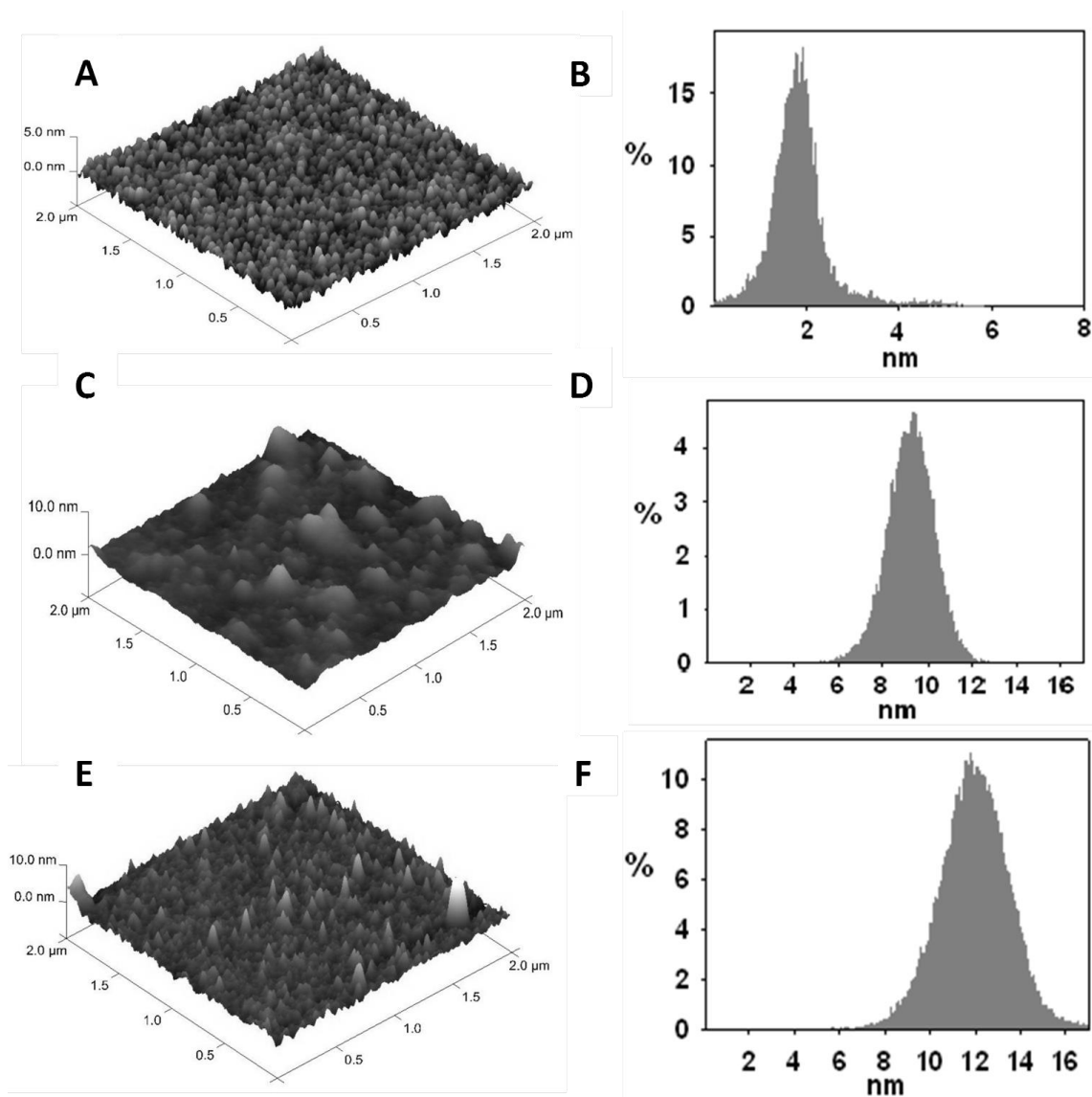
Kaip matyti iš 23 paveikslo bei 3 lentelės, didžiausias PPR kampo pokytis (612,19 m°), kurį sukėlė anti-ŽAH fragmentų prisijungimas prie PPR jutiklio lusto paviršiaus, buvo gautas jų paruošimui naudojant didžiausią anti-ŽAH koncentraciją (1,65 μmol/L), o mažiausias PPR kampo pokytis (583,95 m°) buvo gautas naudojant mažiausią anti-ŽAH koncentraciją (0,41 μmol/L). Šie gauti rezultatai parodė, kad didėjant anti-ŽAH koncentracijai, paviršinė imobilizuotų frag-anti-ŽAH koncentracija didėja, nes didėja registruojamas PPR kampo pokytis. Tačiau didžiausias PPR signalas (174,2 m°), užregistruotas formuojantis frag-anti-ŽAH ir ŽAH kompleksui, buvo stebėtas anti-ŽAH fragmentų paruošimui naudojant mažiausią (0,41 μmol/L) anti-ŽAH koncentraciją. Didėjant anti-ŽAH koncentracijai, PPR kampo pokytis vykstant sąveikai mažėjo ir buvo 155,6 ir 147,4 m° atitinkamai 0,83 ir 1,65 μmol/L anti-ŽAH koncentracijai. Todėl 0,41 μmol/L anti-ŽAH koncentracija buvo pripažinta optimaliausia anti-ŽAH fragmentų gavimui ir PPR jutiklio lusto paviršiaus modifikavimui, ir buvo naudojama tolimesnių tyrimų metu.

3.5 AJM analizė

Pastaraisiais metais labai domimasi PPR ir kitų papildomų analizės metodų apjungimu, siekiant patvirtinti biologinių molekulių prisijungimą ar išsidėstymą paviršiuje [146, 147]. Šiame darbe, skirtingai modifikuotiems PPR jutiklių lustų paviršiams charakterizuoti, buvo sėkmingai panaudota atominių jėgų mikroskopija. PPR jutiklių lustų, modifikuotų frag-anti-ŽAH ir frag-anti-ŽAH imuno kompleksais su ŽAH (frag-anti-ŽAH/ŽAH), paviršių vaizdai buvo palyginti su PPR jutiklio lusto aukso paviršiaus vaizdu (24 pav.). AJM gali padėti tiesiogiai pažvelgti į molekulinio lygio topografiją ir tai galima pritaikyti paviršiaus modifikavimo charakterizavimui ar kaip patvirtinamąjį metodą antikūno-antigeno komplekso susidarymui [9, 148].

Buvo palyginti AJM vaizdai (24 pav. A, C ir E) ir iš šių vaizdų sudarytos aukščio pasiskirstymo diagramos (24 pav. B, D ir F). Gauti rezultatai akivaizdžiai demonstruoja morfologijos pokyčius po auksinio paviršiaus modifikavimo anti-ŽAH fragmentais ir po imuninio komplekso su ŽAH susidarymo. Kaip atskaitinis paviršius buvo naudojamas PPR jutiklio lusto auksinio paviršiaus topografinis vaizdas (24 pav. A). Aukso paviršiuje buvo stebėtos tik periodinės, daugiausiai 1,89 nm aukščio, struktūros (24 pav. B). Frag-anti-ŽAH (molekulinė masė yra 80 kDa) PPR jutiklio lusto paviršiuje buvo imobilizuoti per natyvias tiolines funkcines grupes ir taisąlygojo labai didelį jutiklio paviršiaus padengimą. Susidariusio baltymų monosluoksnio topografijos analizė parodė daug 9,25 nm aukščio struktūrų (24 pav. C ir D). Gauti rezultatai sutampa su kitų autorių publikuotais rezultatais, pagal kuriuos IgG molekulės matmenys yra 14,5 x 8,5 x 4,0 nm [149, 150]. Vadinas, po anti-ŽAH redukcijos susidarantys frag-anti-ŽAH imobilizuoti lusto paviršiuje turėtų būti apytiksliai 7,25 nm aukščio. Atsižvelgus į jutiklio lusto aukso paviršiaus nelygumus (1,89 nm aukščio), imobilizuotų frag-anti-ŽAH aukštis turėtų būti apie 7,10 nm. Gautas dydis yra truputi mažesnis

nei teorinis frag-Ak dydis. Po specifinės frag-anti-ŽAH sąveikos su ŽAH buvo stebėtos 11,90 nm aukščio struktūros (24 pav. E ir F).



24 pav. PPR jutiklių lustų paviršių AJM vaizdai (A,C ir E) ir aukščio pasiskirstymo diagramos (B,D ir F) aukso paviršiaus (A ir B), modifikuoto frag-anti-ŽAH (C ir D), modifikuoto frag-anti-ŽAH/ŽAH (E ir F).

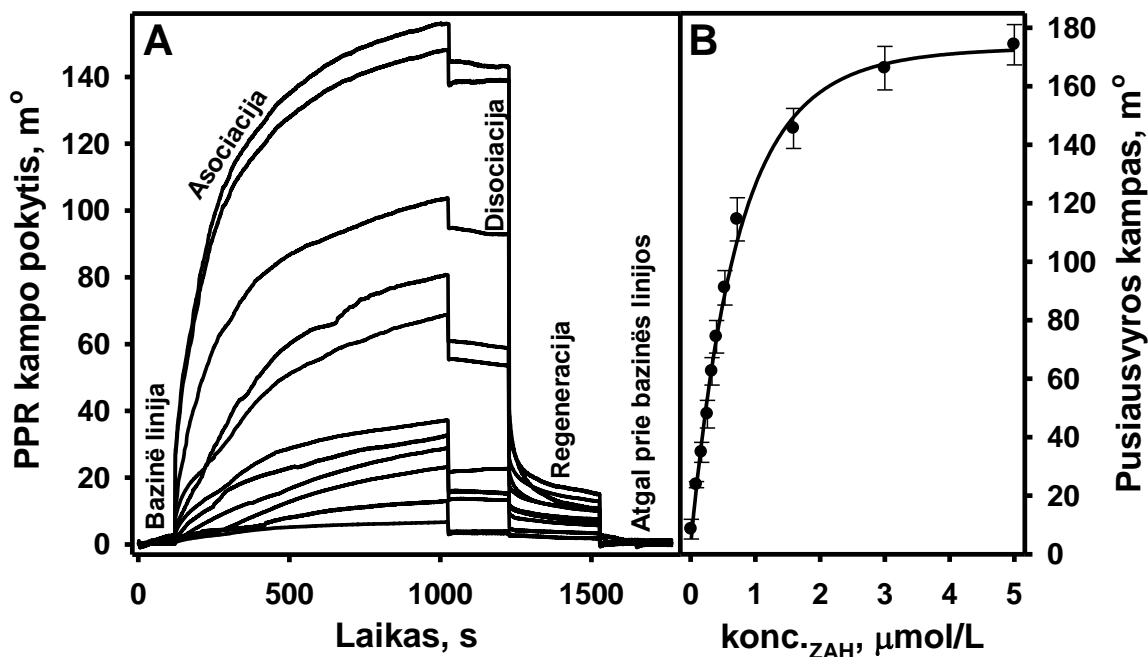
Šie santykinai maži paviršiaus morfologijos pokyčiai gali būti aiškinami tuo, kad susiformuoja imobilizuotų frag-anti-ŽAH ir mažos molekulinės masės ŽAH (22 kDa; 5,3 x 3,1 nm [151]) kompleksas. Frag-anti-ŽAH aktyviųjų centrų atstumas nuo jutiklio paviršiaus galėjo pakisti po sąveikos su ŽAH, todėl struktūrų

aukščio padidėjimas 2,65 nm, buvo truputi mažesnis, nei teoriniai ŽAH matmenys. Stebėti trijų skirtingai modifikuotų paviršių skirtumai rodo, kad frag-anti-ŽAH buvotinkamai prijungti prie auksinio PPR jutiklio lusto paviršiaus, o imuninis kompleksas susiformavo dėl specifinės antikūno-antigeno sąveikos.

3.6 Optimalių sąlygų parinkimas ŽAH nustatymui

Buvo ištirtas sukonstruoto PPR jutiklio jautris ŽAH. Frag-anti-ŽAH gavimui buvo naudoti 0,41 $\mu\text{mol/L}$ anti-ŽAH tirpalai. Siekiant išvengti nespecifinės adsorbcijos, po imobilizavimo likę prisijungimo centrai PPR jutiklio lusto aukso paviršiuje buvo užblokuoti JSA. PPR signalas buvo registruojamas tiesiogiai (nenaudojant žymenų) realiu laiku. Frag-anti-ŽAH modifikuotas PPR jutiklio lustas buvo plaunamas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4, kol nusistovistabilus PPR signalas (25 pav. „Bazinė linija“). Tuomet į PPR kiuvetę įleidžiamas ŽAH tirpalas 10 mmol/L PBS buferiniame tirpale, pH 7,4. Po ŽAH įleidimo į PPR kiuvetę buvo matyti laipsniškas PPR kampo didėjimas, parodantis ŽAH ir frag-anti-ŽAH komplekso susidarymą (ŽAH ir frag-anti-ŽAH sąveiką vyko tik viename PPR kiuvetės kanale, antras kanalas buvo naudojamas buvo palyginamasis) (25 pav. „Asociacija“). Po asociacijos fazės PPR kiuvetė buvo plaunama 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4. Tai sukėlė dalinę frag-anti-ŽAH/ŽAH komplekso disociaciją, tai sąlygojo nedidelį PPR kampo sumažėjimą (25 pav. „Disociacija“). Siekiant PPR jutiklį panaudoti daugkartinei analizei, ŽAH turi būti pašalintas nuo paviršiaus suardant frag-anti-ŽAH/ŽAH kompleksą, tačiau imobilizuoti frag-anti-ŽAH privalo išlikti nepaliesti ir išlaikyti prisijungimo gebą. Todėl po disociacijos fazės, PPR jutiklio lustas buvo paveiktas regeneruojančiu tirpalu sudarytu iš 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH. Šiame etape PPR kampas sumažėjo ryškiai (25 pav. „Regeneracija“). Galiausiai, kiuvetę praplovus 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4, PPR signalas pasiekė savo

pradinį lygį, kuris buvo stebėtas prieš į PPR kiuvetę įleidžiant ŽAH tirpalą (25 pav. „Atgal prie bazinės linijos“). Stebėtas PPR kampo pokytis reiškė visišką ŽAH pašalinimą nuo PPR jutiklio lusto paviršiaus. 25 (A) paveikslas iliustruoja, kad aktyvus PPR jutiklio lusto paviršius buvo visiškai regeneruotas 5 min. jį veikiant regeneruojančiu tirpalu ir po to 3 min. 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4. Imuninio jutiklio panaudojimas daugkartinėje analizėje padaro analizę daug pigesnę, be to dažnai sutrumpėja analizės trukmė. Todėl PPR imunotyrimuose regeneracijos etapas yra labai svarbus.



25 pav. (A) PPRsensogramos užregistruotos vykstant imobilizuotų frag-anti-ŽAH sąveikai su ŽAH(ŽAH koncentracija 0,01, 0,09, 0,17, 0,26, 0,33, 0,40, 0,53, 0,72, 1,59 ir 5 $\mu\text{mol/L}$). (B) Pusiausvyros kampo priklausomybė nuo ŽAH koncentracijos.

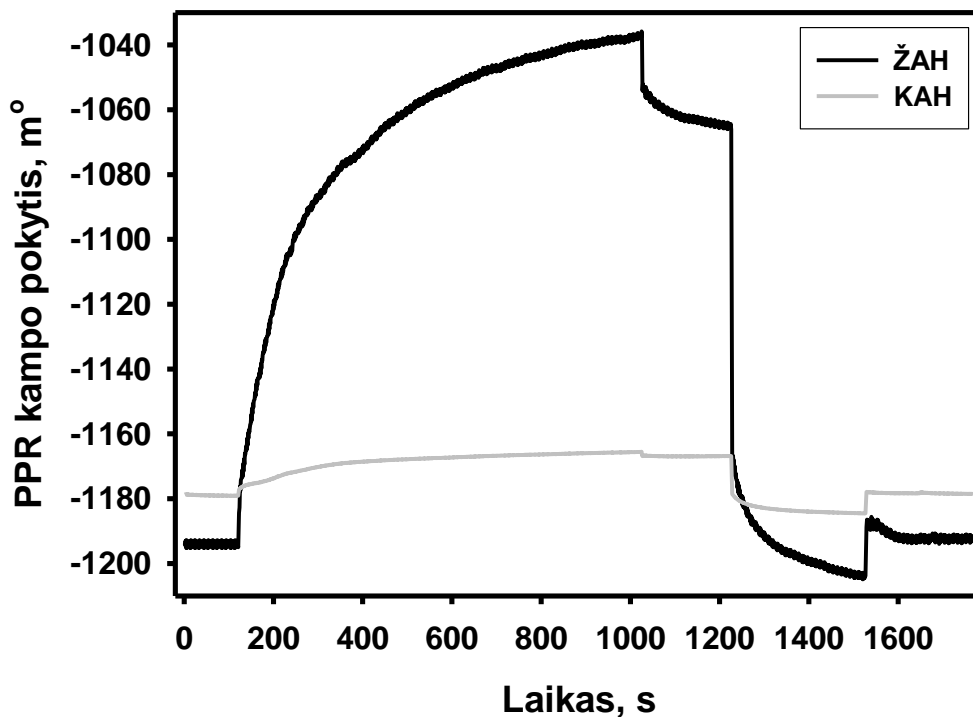
25 paveikslo (A) dalyje pateikiamos sensogramos gautos esant skirtingoms ŽAH koncentracijoms nuo 0,01 iki 5 $\mu\text{mol/L}$. Kaip matyti iš paveikslo, kiekvienos PPR jutiklio lusto regeneracijos stadijos pabaigoje, stebimas PPR signalas grįžta iki pradinės vertės, registruotos prieš ŽAH įpilimą į kiuvetę. Gauti rezultatai

leidžia daryti išvadą, kad ŽAH nuo paviršiaus buvo pašalintas suardant frag-anti-ŽAH/ŽAH kompleksą, o imobilizuoti frag-anti-ŽAH išliko nepaliesti ir neprarado antigeno prisijungimo gebos.

PPR kampo pokytis priklauso nuo ŽAH koncentracijos tiriamajame tirpale. Buvo sudaryta PPR signalo pasiekus nuostoviąją būseną – pusiausvyros kampo priklausomybė nuo ŽAH koncentracijos mėginyje (25 pav. B). Esant 0,01 $\mu\text{mol/L}$ ŽAH koncentracijai mėginyje PPR signalas buvo apie 8,6 m°. Šis PPR signalas buvo ganėtinai reikšmingas, nes signalo-triukšmo santykis buvo 86 (8,6 m°/0,1 m°). Didėjant ŽAH koncentracijai 0,01 – 0,72 $\mu\text{mol/L}$ ribose buvo gauta tiesinė PPR kampo pokyčio priklausomybė nuo ŽAH koncentracijos. PPR signalas pasiekė soties lygį ir daugiau nebedidėjo didėjant ŽAH koncentracijai, kai ŽAH koncentracija buvo didesnė nei 5 $\mu\text{mol/L}$.

Analizinis signalas esant mažiausiai analitės koncentracijai plius trys jos standartinio nuokrypio dydžiai buvo panaudoti apskaičiuojant ŽAH aptikimo ribą sukonstruotu PPR imuniniu jutikliu. Buvo nustatyta, kad aptikimo riba yra 0,0034 $\mu\text{mol/L}$. Trevino ir bendraautoriai [152] publikavo PPR ŽAH imuninį jutiklį, kuriuo ŽAH koncentracija buvo nustatoma konkurentinės infibicijos metodu. Šis jutiklis buvo tinkamas nustatyti ŽAH koncentracijai žmogaus serumo mėginiuose. Šių autorių sukonstruoto jutiklio aptikimo riba buvo 6 ng/mL (0,00027 $\mu\text{mol/L}$). Šio imuninio jutiklio mažesnė atikimo riba gali būti paaiškinama pasirinktu ŽAH detekcijos būdu. Mūsų tyrime buvo pasirinktas tiesioginis antigeno nustatymo formatas, t.y., analizinis signalas didėjo didėjant ŽAH koncentracijai. Atliekant analizę konkurentinės inhibicijos metodu, analizinis signalas yra atvirkščiai proporcingas ŽAH koncentracijai, t.y., kuo tiriamajame tirpale yra mažesnė ŽAH koncentracija, tuo registruojamas didesnis PPR signalas. Tačiau nepaisant truputi mažesnio jautrio PPR imuninis jutiklis su imobilizuotais anti-ŽAH fragmentais labai perspektyvus, nes ŽAH koncentracija nustatoma tiesiogiai.

Imuninio jutiklio atrankumas ir kryžminis reaktyvumas buvo iširtas tuo pačiu metu į PPR gradelės 1 kanalą įleidus 5 $\mu\text{mol/L}$ ŽAH 10 mmol/L PBS buferiniame tirpale, pH7,4, o ir į 2 kanalą – 5 $\mu\text{mol/L}$ kiaulės augimo hormono (KAH) 10 mmol/L PBS buferiniame tirpale, pH 7,4. Tyrimo rezultatai pateikti 26 paveiksle iliustruoja, kad signalas registruotas vykstant frag-anti-ŽAH sąveikai su ŽAH (157,14 m°) buvo 11,57 karto didesnis lyginant su signalu užregistruotu vykstant imobilizuotų frag-anti-ŽAH sąveikai su KAH (13,58 m°).



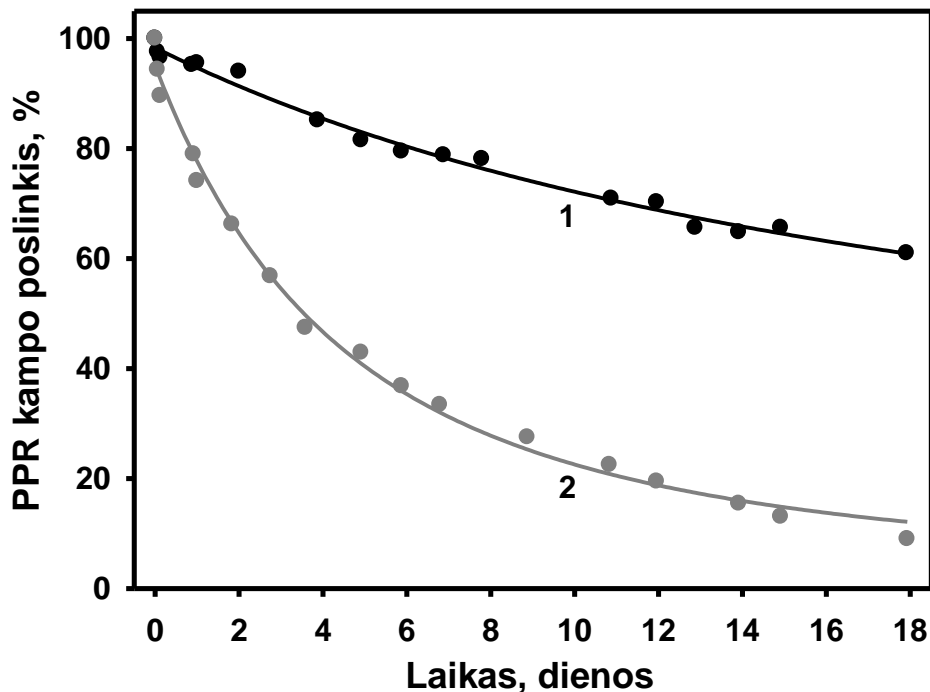
26 pav. PPR sensogramos užregistruotos vykstant frag-anti-ŽAH sąveikai su ŽAH ir KAH.

Analizinio signalo atsikartojamumas yra vienas iš svarbiausių etapų konstruojant imuninius jutiklius. Todėl buvo atlikti vienas po kito 3 nustatymo-regeneravimo ciklai į PPR kiuvetę įleidžiant tą patį ŽAH kiekį (0,4 $\mu\text{mol/L}$). Eksperimento metu užregistruotos sensogramos rodė beveik tokį patį PPR kampo poslinkį. Šie rezultatai leidžia teigti, kad PPR jutiklio lusto paviršius, modifikuotas anti-frag-ŽAH fragmentais, po sąveikos su ŽAH praktiškai yra

visiškai regeneruojamas, nedarant įtakos jutiklio jautriui. PPR atsako standartinė paklaida (STDEV) apskaičiuota tam pačiam jutiklio lustui buvo 2,28, o variacijos koeficientas (CV) – 3,7 %. Todėl matavimų atsikartojamumas lygus 96,3 %. Tai reiškia, kad imobilizuotų frag-anti-ŽAH sluoksnio destrukcija regeneracijos metu buvo minimali. STDEV apskaičiuota trims vienodai paruoštiems PPR jutikliams buvo šiek tiek didesnė – 2,45. Apskaičiuotas CV buvo 6,2 %. Vadinasi matavimo atsikartojamumas buvo 93,8 %. Šis nežymus netikslumas tarp skirtingų PPR jutiklių gali būti sąlygotas nežymaus imobilizuotų frag-anti-ŽAH paviršinės koncentracijos kitimo.

Jutiklio stabilumas buvo tirtas naudojant 1,59 $\mu\text{mol/L}$ ŽAH 10 mmol/L PBS buferiniame tirpale, pH 7,4. Po kiekvieno sąveikos signalo registravimo buvo atliekama jutiklio lusto regeneracija 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH tirpalu. Šie eksperimentai palyginimui buvo atlikti naudojant du jutiklius vieno iš kurių paviršius po frag-anti-ŽAH imobilizavimo buvo blokuotas JSA (27 pav. 1 kreivė), o kito ne (27 pav. 2 kreivė). Pakartotiniai nustatymo regeneravimo ciklai buvo atlikti 22 kartus PPR jutiklio lustą saugant 18 dienų kontroliuojamoje aplinkoje (10 mmol/L PBS buferinis tirpalas pH 7,4, 20 °C temperatūra). Pirmą dieną atlikus penkis nustatymo-regeneravimo ciklus, skirtumas tarp pirmo ir penkto analizinio signalo buvo tik 4 % (27 pav. 1 kreivė). Tuo atveju kai aktyvūs centrai aukso paviršiuje nebuvo blokuoti, PPR signalo kritimas buvo reikšmingesnis ir siekė 26 % (27 pav. 2 kreivė). Po pirmųjų 2 dienų, lyginant su pirmu matavimu, buvo stebimas 6 % ir 36 % PPR jutiklių signalo sumažėjimas atitinkamai blokuotam ir neblokuotam PPR jutikliui. Vėliau PPR atsako sumažėjimas tapo dar reikšmingesnis ir po 7, 12 ir 18 dienų buvo stebimas 20, 30 ir 38 % JSA blokuoto (27 pav. 1 kreivė) ir 66, 80 ir 91 % JSA neblokuoto (27 pav. 2 kreivė) PPR jutiklio signalo sumažėjimas. Taigi, iš šio eksperimento duomenų galima teigti, kad kai JSA užblokavopo anti-ŽAH fragmentų imobilizavimo likusius aktyvius centrus PPR jutiklio lusto aukso paviršiuje, tai sumažino nespecifines sąveikas jutiklio

paviršiuje, padidino frag-anti-ŽAH sluoksnio stabilumą bei jo gebėjimą sąveikauti su ŽAH ilgesnį laiką.



27 pav. ŽAH jutiklio veikimo stabilumas kai po anti-ŽAH fragmentų imobilizavimo likę aukso paviršiaus aktyvūs centrai užblokuoti JSA (1) ir neblokuoti (2).

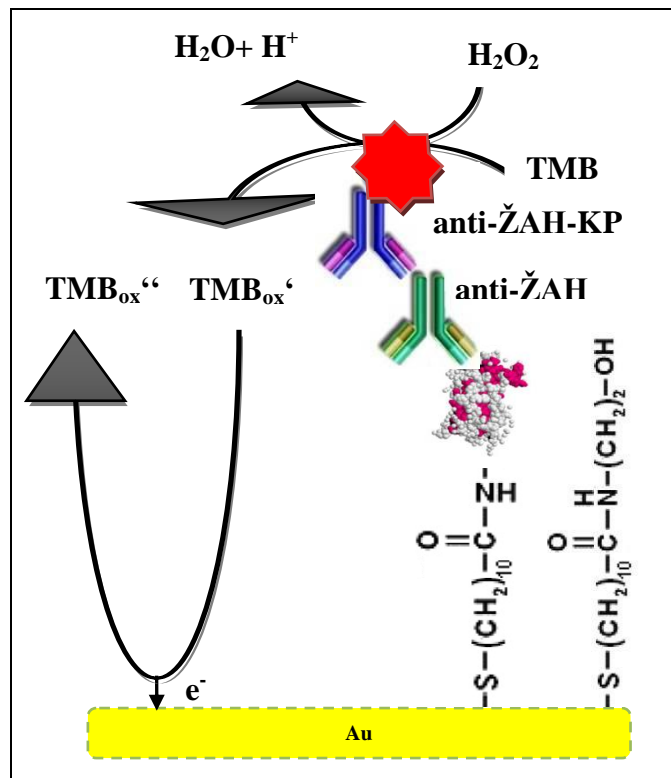
Nustačius optimalias sąlygas ŽAH nustatyti, jutiklio veikimas buvo patikrintas realiuose žmogaus serumo mėginiuose, kuriuose buvo 0,26 $\mu\text{mol/L}$ ŽAH. Gauti rezultatai parodė, kad STDEV yra 4,8 %, o išgava – 109,6 %.

Apžvelgiant aukščiau aptartus eksperimentų rezultatus galima daryti išvadą, kad aprašytas PPR imuninis jutiklis pasižymi perspektyviomis charakteristikomis (geras atsikartojamumas ir stabilumas, efektyvus paviršiaus regeneravimas ir didelis atrankumas) greitam ir patikimam ŽAH nustatymui. Pasiūlytas imuninis jutiklis turi keletą privalumų, tokių kaip: tiesioginis analitės koncentracijos nustatymo formatas, paprasta jautraus paviršiaus paruošimo procedūra, paprasta priežiūra, mažas mėginio tūris ir lengvai automatizuojamas

metodas. Dėl šių privalumų sukonstruotas jutiklis gali būti labai patrauklus praktiniam taikymui biomedicinoje.

3.7 ŽAH imobilizavimo PPR jutiklio lusto paviršiuje tyrimas

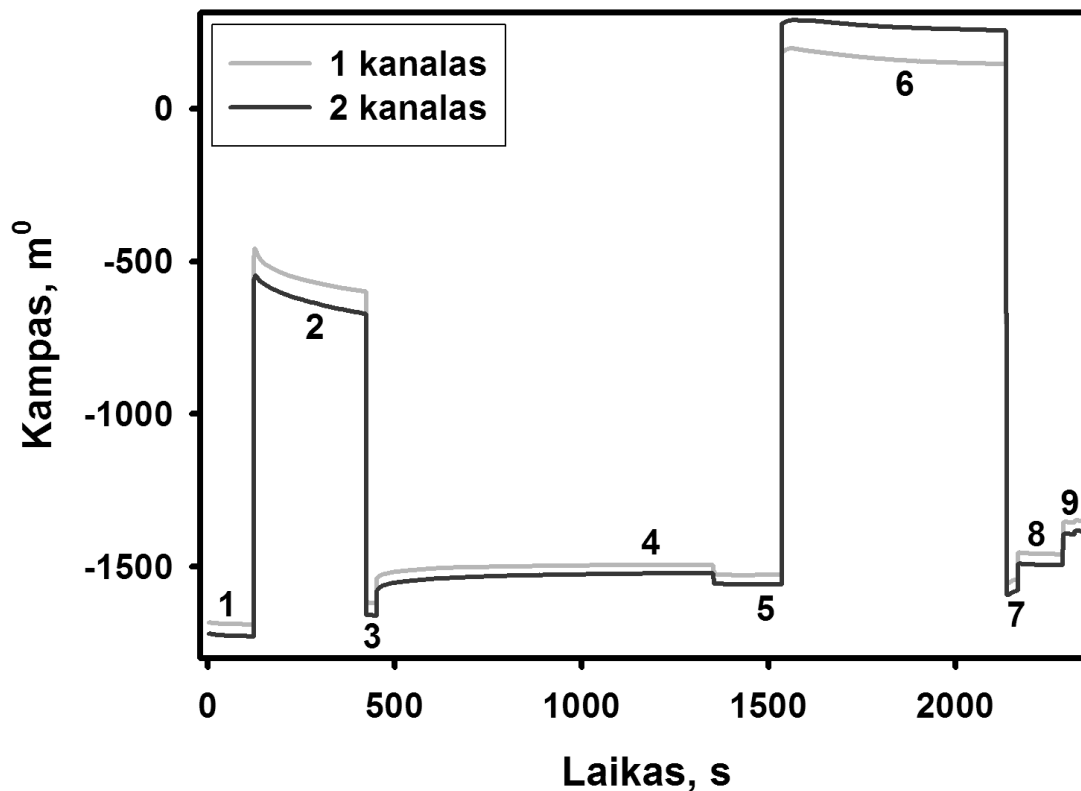
Somatropinas yra sintetinė žmogaus augimo hormono forma, gaminama rekombinantinės DNR technologijos principu. Jo aminorūgščių seka yra identiška natūraliam žmogaus augimo hormonui. Tačiau ŽAH trūkumą gydant rekombinantiniu ŽAH organizme gali susidaryti antikūnų prieš augimo hormoną. Šie antikūnai gali neutralizuoti hormoną ir slopinti jo terapinį poveikį, todėl gydymas neduos laukiamų rezultatų. Tam, kad galėtume įvertinti organizmo atsaką į gydymą būtina nustatyti anti-ŽAH.



28 pav. Principinė imuninio jutiklio schema analizės (anti-ŽAH) koncentracijai nustatyti sujungiant du analizės metodus – elektrocheminę analizę ir PPR.

Dėl šios priežasties svarbu sukurti greitos, atrankios ir jautrios analizės atlikimo metodiką anti-ŽAH nustatymui. 2009 metais mūsų laboratorijoje buvo sukurtas PPR imuninis jutiklis anti-ŽAH nustatymui [15]. Tačiau sukonstruoto imuninio jutiklio aptikimo riba mūsų netenkino, todėl mūsų tolimesnių darbų tikslas buvo patobulinti PPR jutiklį ir nustatyti mažesnes anti-ŽAH koncentracijas. Todėl tolimesniuose tyrimuose PPR jutiklio lusto paviršiuje buvo imobilizuotas žmogaus augimo hormonas, o nustatomas anti-ŽAH PPR ir elektrocheminės analizės metodais (28 pav.).

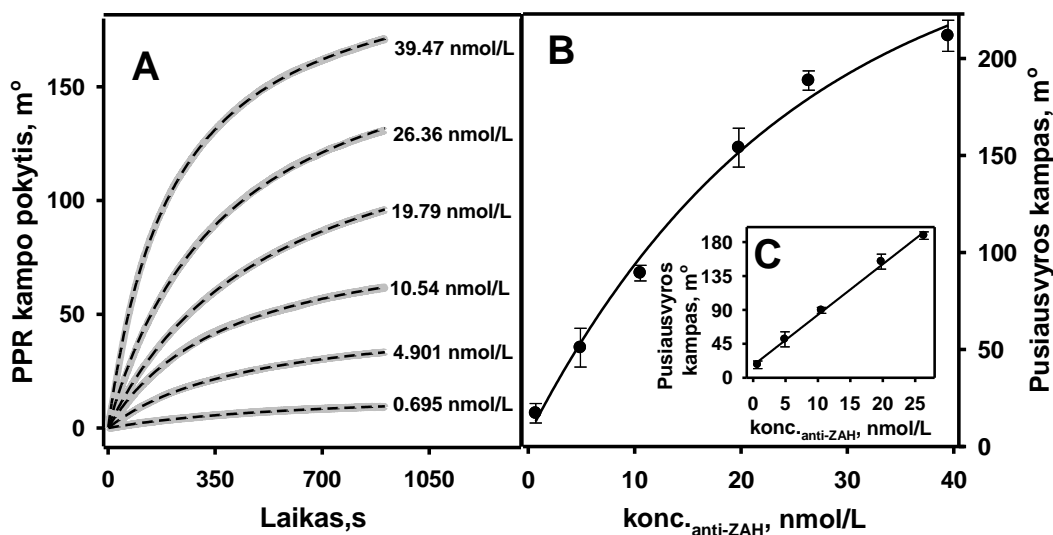
ŽAH buvo imobilizuojamas ant PPR jutiklio lusto paviršiaus per MUR monosluoksnį, kurio formavimas ant PPR jutiklio lusto paviršiaus buvo aptartas 2.3.4 skyriuje. Prieš ŽAH imobilizavimą MUR monosluoksnio stabilizavimas/drėkinimas atliktas 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5 ir regeneruojančių 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH tirpalu. ŽAH imobilizavimui PPR jutiklio lusto paviršiuje buvo naudotas 3,73 $\mu\text{mol/L}$ ŽAH tirpalą 10 mmol/L Na acetato buferiniame tirpale, pH 4,5. Tyrimas pradedamas į PPR kiuvetę įleidžiant 10 mmol/L Na acetato buferinį tirpalą, pH 4,5 (29 pav. 1). Nusistovėjus stabiliam rezonansiniam signalui, atliekamas MUR karboksilo grupių aktyvavimas EDC ir NHS mišiniu (29 pav. 2), ŽAH imobilizavimas (29 pav. 4) ir likusių aktyvių esterinių grupių dezaktyvavimas etanolaminu (29 pav. 6). Atlikus imobilizavimą pagal PPR signalą po ŽAH imobilizavimo (29 pav. 5), lyginant su signalu registruotu prieš imobilizavimą (29 pav. 3) buvo gautas $370 \pm 10 \text{ m}^\circ$ PPR kampo pokytis. Iš šio pokyčio buvo apskaičiuota, kad PPR jutiklio paviršiuje įsimobilizavo $3,08 \pm 0,8 \text{ ng/mm}^2$ ŽAH (29 pav.).



29 pav. PPR signalo kitimas: 1 – bazinė linija (10 mmol/L Na acetato buferinis tirpalas, pH 4.5), 2 – MUR aktyvavimas EDC/NHS mišiniu, 3, 5, 8 – kiuvetės plovimas 10 mmol/L Na acetato buferiniu tirpalu, pH 4,5, 4 – ŽAH imobilizavimas, 6 – aktyvių esterinių grupių dezaktyvavimas etanolaminu, 7 – jutiklio lusto paviršiaus regeneravimas 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH tirpalu, 9 – kiuvetės plovimas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4.

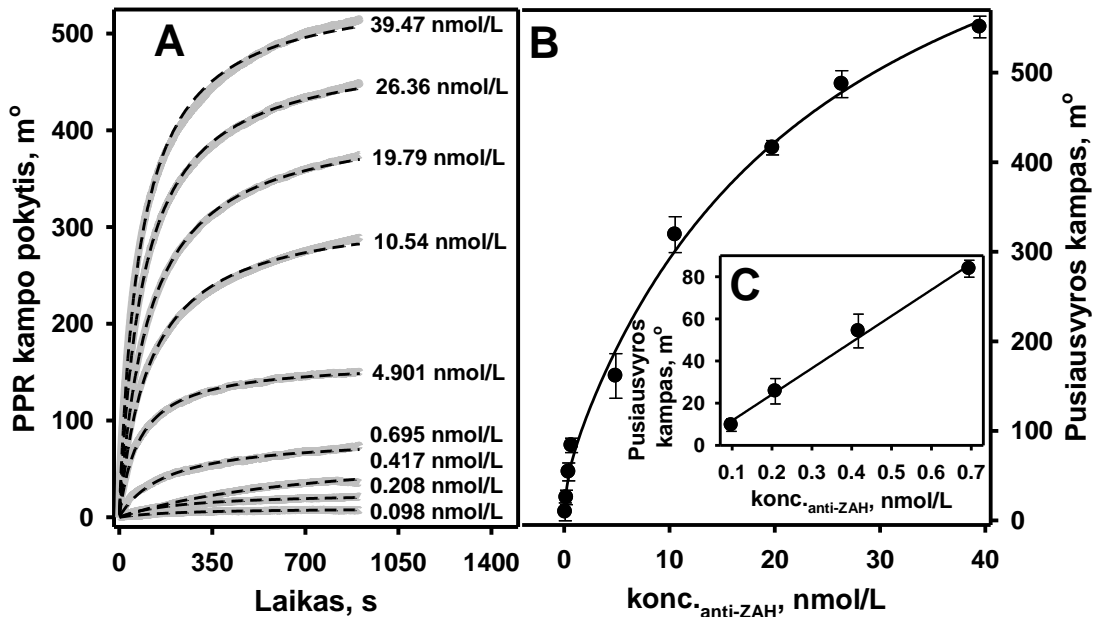
3.8 Sąveikos tarp imobilizuoto ŽAH, anti-ŽAH ir antrinio antikūno žymėto krienų peroksidaze (anti-ŽAH-KP) tyrimas

Prieš pradėdant imobilizuoto ŽAH ir anti-ŽAH sąveikos tyrimus, buvo atliktas MUR monosluoksnio su imobilizuotu ŽAH paviršiaus stabilizavimas/drėkinimas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu pH 7,4 bei regeneruojančiu 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH tirpalu.



30 pav. (A) Imobilizuotų ŽAH sąveikos su anti-ŽAH PPR analizė. Ištinė linija atspindi realius duomenis, brūkšninė linija buvo gauta šiuos duomenis apdorojant SigmaPlot programa. (B) ir (C) Anti-ŽAH koncentracijos priklausomybė nuo pusiausvyros kampo.

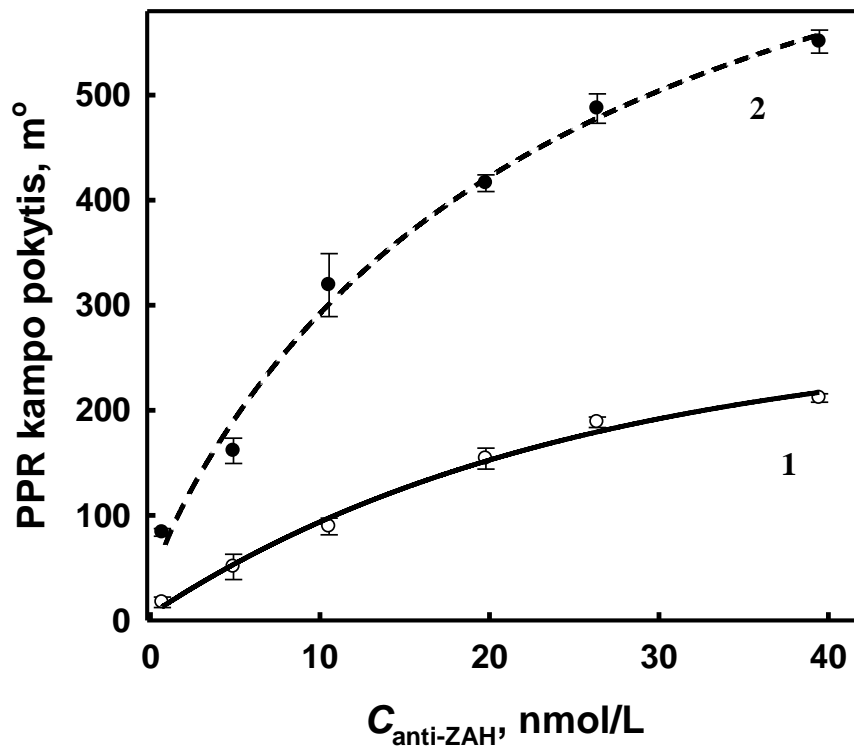
Imobilizuoto ŽAH ir anti-ŽAH esančio tirpale sąveikos tyrimams buvo naudotos 9 skirtingos anti-ŽAH koncentracijos (0,09, 0,208, 0,417, 0,695, 4,901, 10,54, 19,79, 26,36 ir 39,47 nmol/L) PBS buferiniame tirpale, pH 7,4 (30 ir 31 pav.). Tačiau PPR jutikliu buvo galima užregistruoti patikimą signalą tik esant 0,695 nmol/L koncentracijai. Mažesnės koncentracijos buvo nedetektuojamos. Kitame analizės žingsnyje buvo panaudotas netiesioginės imunoanalizės formatas ištirta sąveika tarp susidariusio ŽAH/anti-ŽAH imuninio komplekso ir antrinių antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną, žymėtų krienų peroksidaze (anti-ŽAH-KP).



31 pav. (A) Anti-ŽAH/KP sąveika su ŽAH/anti-ŽAH imuniniu kompleksu. Ištinė linija atspindi realius duomenis, brūkšninė linija buvo gauta šiuos duomenis apdorojant SigmaPlot programa. (B) ir (C) Anti-ŽAH koncentracijos priklausomybė nuo pusiausvyros kampo.

Visuose tyrimuose buvo naudota 0,181 $\mu\text{mol/L}$ anti-ŽAH-KP koncentracija PBS buferiniame tirpale, pH 7,4. Paveiksle (31 pav. B) matyti, kad tirtame anti-ŽAH koncentracijų intervale nebuvo pasiektas jutiklio paviršiaus įsisotinimas. Sąveikaujant anti-ŽAH-KP su PPR jutiklio lusto paviršiuje susiformavusiu ŽAH/anti-ŽAH imuniniu kompleksu, matyti PPR signalo didėjimas (31 pav.). Esant 0,695 nmol/L anti-ŽAH PPR kampo pokytis užregistruotas atliekant netiesioginio tipo nustatymą buvo 4,9 karto didesnis, lyginant su tiesioginio tipo detekcija (32 pav.). Taip pat, kaip jau minėta, ši anti-ŽAH koncentracija buvo mažiausia nustatoma koncentracija tiesioginio tipo imunoanalize. Mažiausia išmatuojama anti-ŽAH koncentracija, naudojant anti-ŽAH-KP, buvo 0,098 nmol/L. Esant šiai koncentracijai buvo gautas 9,60 m° PPR kampo pokytis. Šis PPR signalas buvo ganėtinai reikšmingas, nes signalo-triukšmo santykis buvo 96 (9,6 m°/0,1 m°). Netiesioginio tipo imuninio PPR

jutiklio signalas priklausė nuo anti-ŽAH koncentracijos. Buvo sudaryta signalo esant nuostoviai būsenai (pusiausvyros kampo) priklausomybė nuo anti-ŽAH koncentracijos (31 pav. B). 0,098 – 0,695 nmol/L anti-ŽAH koncentracijų intervale PPR kampo pokytis nuo anti-ŽAH koncentracijos priklausė tiesiškai (31 pav. C), o koreliacijos koeficientas buvo lygus 0,9927 (n=3). Santykinis standartinis nuokrypis (RSD) PPR signalo, išmatuoto tiriant skirtingus PPR jutiklių lustus, buvo lygus 0,12.



32 pav. PPR signalai registruoti tiesioginio ir netiesioginio anti-ŽAH nustatymo metu. (1) ŽAH/anti-ŽAH komplekso formavimasis, (2) anti-ŽAH-KP sąveika su ŽAH/anti-ŽAH.

Dviejų kanalų PPR analizatorius leidžia atlikti matavimus vienu metu dviejuose kanaluose. Šiame tyrime 1 kanalas buvo naudotas imuniniam atsakui analizuoti, o 2 – kryžminiam reaktyvumui tirti. Buvo tiriama ŽAH sąveika su jam nespecifiniais antikūnais prieš kiaulės augimo hormoną (anti-KAH) ir antriniais antikūnais, specifiniais galvijų antikūnams. Tolimesniuose tyrimuose buvo

atsižvelgta į gautus rezultatus tiriant kryžminį reaktyvumą ir PPR kampo pokytis užregistruotas šio tyrimo metu buvo išeliminuoti iš PPR kampo pokyčio registruojamo vykstant specifinei sąveikai. PPR signalas, užregistruotas antriniams antikūnams jungiantis prie ŽAH/anti-ŽAH komplekso, buvo daugiau nei 12 kartų didesnis, lyginant su signalu užregistruotu vykstant nespecifiniam jungimuisi.

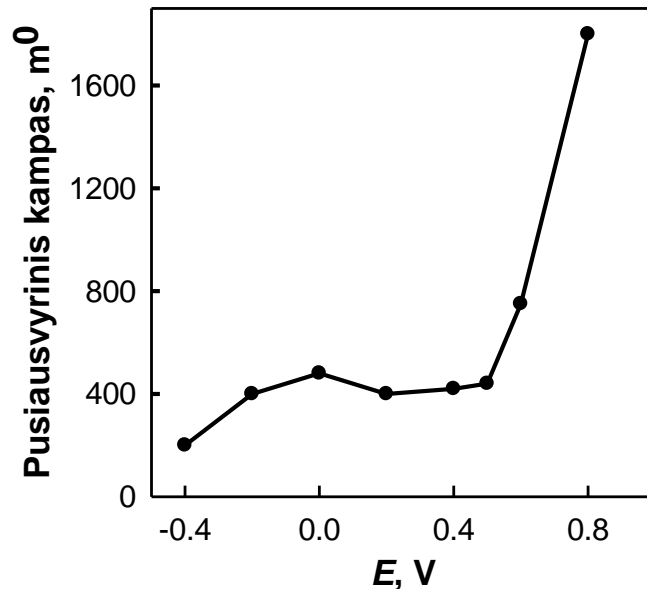
Minimali netiesioginės imunoanalizės būdu nustatyta anti-ŽAH koncentracija buvo 0,098 nmol/L. Ši minimali netiesioginės imunoanalizės būdu nustatoma anti-ŽAH koncentracija gali būti sumažinta, nes registruotamas PPR kampo pokytis, esant 0,098 nmol/L anti-ŽAH koncentracijai, yra gana didelis (signalų-triukšmo santykis yra 96,0).

Jutiklio regeneravimas buvo galimas atliekant tiesioginio tipo imunoanalizę. Tam buvo kartojami nustatymo-regeneracijos ciklai, PPR jutiklio lustus saugant 21 dieną kontroliuojamoje aplinkoje (10 mmol/L PBS buferinis tirpalas pH 7,4, 20 °C temperatūra). Atlikus 40 nustatymo-regeneracijos ciklų jokių pradinės bazinės linijos lygio pokyčių nebuvo stebėta. Tai parodo, kad jutiklio lusto regeneracijos metu, jo paviršiuje imobilizuoto ŽAH sluoksniui buvo padaryta tik minimali žala. Todėl, galima daryti išvadą, kad sukonstruotas PPR jutiklis gali būti saugomas 21 dieną, nes per šį laikotarpį jo jautris anti-ŽAH sumažėjo nežymiai.

3.9 EL tyrimų sąlygų optimizavimas

Antikūnų prieš žmogaus augimo hormoną nustatymas buvo atliktas sujungus netiesioginio tipo PPR imunoanalizės ir elektrocheminės analizės metodus. Fermento aktyvumas gali būti nustatytas registruojant elektrochemiškai aktyvaus produkto, susidariusio vykstant fermentinei reakcijai, signalą [153]. Krienu peroksidazės katalizuojamos reakcijos amperometriniam registravimui labai

svarbus yra red-oks mediatorius. TMB buvo pasirinktas, kaip tinkamiausias red-oks mediatorius konstruojant amperometrini \acute{e} imunini \acute{e} jutikli \acute{e} . Kit \acute{u} autori \acute{u} publikuoti duomenys taip pat teigia, kad TMB yra efektyviausias red-oks mediatorius KP katalizuojamos reakcijos registravimui [29]. Principin \acute{e} elektrocheminio imuninio jutiklio schema pavaizduota 28 paveiksle. Po \check{Z} AH/anti- \check{Z} AH/anti- \check{Z} AH-KP komplekso susidarymo TMB yra oksiduojamas KP iki labai reaktyvaus katijonradikalo (TMBox $^{\cdot}$), kuris elektrodo pavir \check{s} iuje labai greitai oksiduojamas iki stabilesn \acute{e} s formos (TMBox $^{+}$).

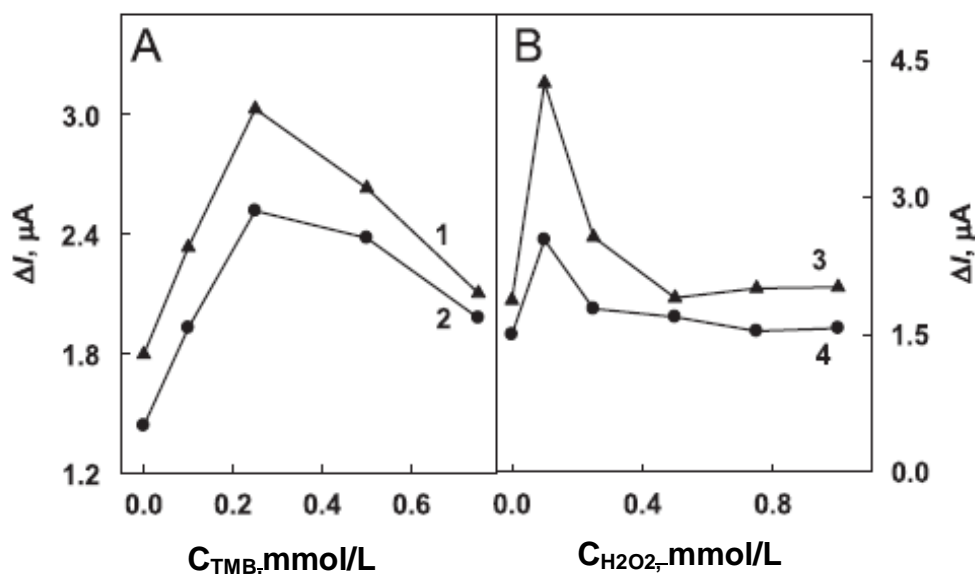


33 pav. Pusiausvyros kampo priklausomyb \acute{e} nuo potencialo.

Buvo i \check{s} tirtos optimalios elektrochemin \acute{e} s imunoanaliz \acute{e} s s \acute{a} lygos. Siekiant nustatyti optimal \acute{u} potencial \acute{a} anti- \check{Z} AH nustatymui buvo atlikti ciklin \acute{e} s voltamperometrijos tyrimai. Buvo nustatyta, kad optimalus potencialas anti- \check{Z} AH detekcijai yra +200 mV (33 pav.).

Buvo i \check{s} tirta TMB ir H $_2$ O $_2$ koncentracij \acute{u} įtaka elektrocheminio imuninio jutiklio atsakui. Tam, buvo tiriamas šio jutiklio signalas, po anti- \check{Z} AH ir antrini \acute{u} antik \acute{u} n \acute{u} s \acute{a} veikos, pulsini \acute{e} s amperometrijos (PA) ir ciklin \acute{e} s voltamperometrijos (CV) metodais (34 pav. A ir B). Kaip matyti iš eksperimentini \acute{u} rezultat \acute{u} pateikt \acute{u}

34 A paveiksle, analizinis signalas didėja didinant TMB koncentracija nuo 0,1 iki 0,25 mmol/L, o toliau didinant koncentraciją signalas mažėja. Kaip matyti iš paveikslo, abiem atvejais, 0,25 mmol/L TMB koncentracija 1,7 karto padidino analizinės sistemos jautrį. Elektrocheminio signalo intensyvumas taip pat priklauso ir nuo H_2O_2 koncentracijos. Analizinio signalo intensyvumo priklausomybė nuo H_2O_2 koncentracijos parodyta 34 B paveiksle. Iš šio paveikslo matyti, kad 0,1 mmol/L H_2O_2 koncentracija padidina analizinį signalą registruotą PA metodu 2,37 karto, o CV metodu – 1,77 karto. Todėl, 0,25 mmol/L TMB ir 0,1 mmol/L H_2O_2 koncentracijos buvo pasirinktos tolimesniems tyrimams, nes jos sąlygojo didžiausią analizinės sistemos signalą.



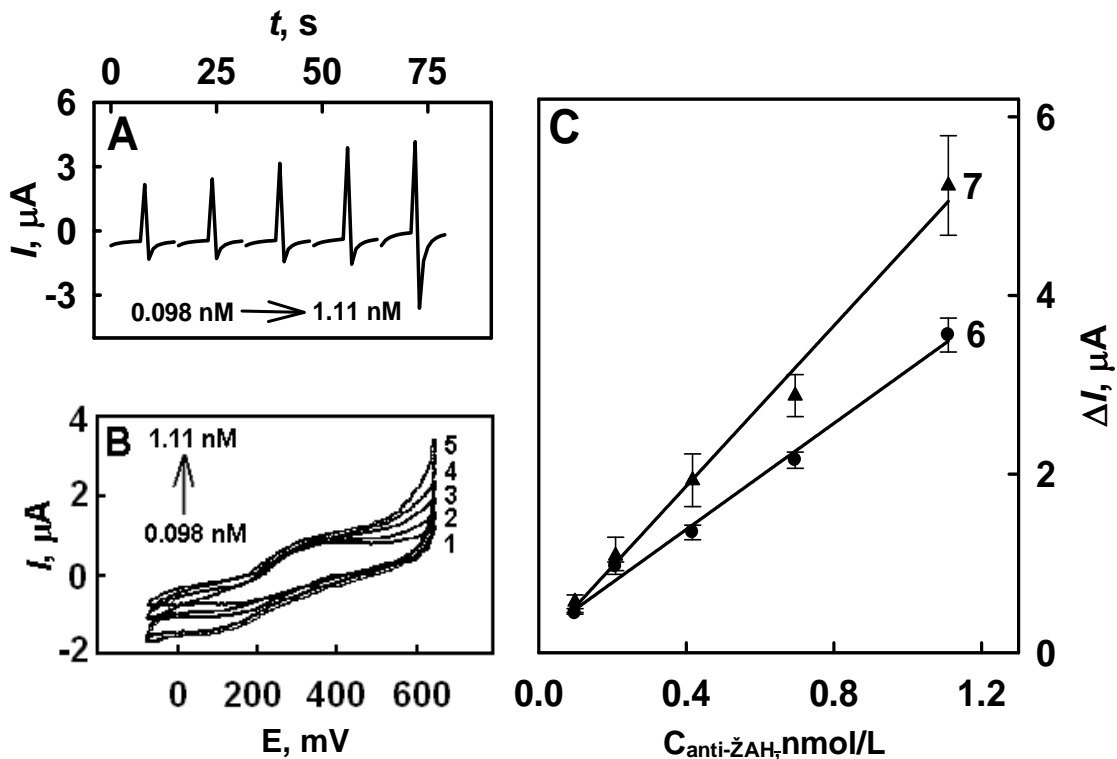
34 pav. TMB (A) ir H_2O_2 (B) koncentracijos įtaka analiziniam signalui registruojamam po anti-ŽAH/KP prisijungimo prie ŽAH/anti-ŽAH komplekso (1,3 – PA kreivės, 2,4 – CV kreivės). Anti-ŽAH, anti-ŽAH/KP ir TMB koncentracijos atitinkamai – 0,019, 0,18 ir 0,25 mmol/L.

Pagal analizinio signalo, registruoto skirtingais elektrocheminiais metodais, rezultatus matyti, kad PA metodas yra žymiai jautresnis (34 pav. B 3 kreivė), nes analizinis signalas buvo 1,68 karto didesnis, lyginant su CV (34 pav. B 4 kreivė).

Atliekant elektrocheminius matavimus optimaliomis sąlygomis buvo nustatyta, kad naudojant mediatorių (TMB), registruojamas analizinis signalas užregistruotas po ŽAH/anti-ŽAH/anti-ŽAH-KP komplekso susidarymo nuo anti-ŽAH koncentracijos. Siekiant eliminuoti kryžminio reaktyvumo įtaką jutiklio analiziniam signalui, buvo įvertintas signalas registruotas vykstant kryžminei sąveikai su nespecifiniais anti-KAH ir antriniais antikūnais, specifiniais galvijų antikūnams. Elektrocheminis signalas užregistruotas po antrinių antikūnų prisijungimo prie ŽAH/anti-ŽAH komplekso buvo 23,0 ir 32,9 karto didesnis lyginant su nespecifinio prisijungimo analiziniu signalu registruotu atitinkamai CV ir PA metodais.

Buvo palyginti rezultatai gauti, prieš ir po antrinių antikūnų prisijungimo, naudojant PA metodą (35 pav.), o srovių smailių verčių skirtumai buvo interpretuoti kaip analizinis signalas. CV metodo atveju analiziniu signalu buvo laikomas (35 B pav.) skirtumas tarp didžiausios ir mažiausios srovės vertės esant +650 ir -75 mV potencialui. Šis potencialų diapazonas buvo pasirinktas stipriausiam imuninio jutiklio jautriui padidinti, todėl, kad jis suteikė didesnę tikslumą, lyginant su tradiciniu TMB redukcijos ir oksidacijos smailių įvertinimu, nes šios TMB oksidacijos-redukcijos smailės nėra labai informatyvios ypač esant mažoms analitės koncentracijoms.

Analizinio signalo priklausomybė nuo anti-ŽAH koncentracijos 0,098 – 1,11 nmol/L intervale buvo registruojama PA (35 C pav. 7 kreivė) ir CV (35 C pav. 6 kreivė) metodais. Kaip matyti iš 35 paveikslėlio C dalies, elektrocheminio signalo priklausomybė nuo analitės koncentracijos esant mažoms jos koncentracijoms yra tiesinė. Koreliacijos koeficientas lygus 0,9920 (n=3) ir 0,9886 (n=3), atitinkamai CV ir PA metodams. Analiziniai signalai yra gerai atsikartojantys – testuotoms anti-ŽAH koncentracijoms RSD buvo 0,11 ir 0,06, atitinkamai CV ir PA metodams.



35 pav. Elektrocheminis antrinių antikūnų prisijungimo prie ŽAH/anti-ŽAH kompleksų tyrimas. (A) Impulsinės momentinės amperogramos ($E_{\text{app}} = +200 \text{ mV}$, $t_p = 1 \text{ s}$). (B) Ciklinės voltapmerogramos ($E = -75-(+650) \text{ mV}$, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$) (anti-ŽAH koncentracijos: 1 – 0,098, 2 – 0,208, 3 – 0,417, 4 – 0,695 ir 5 – 1,11 nmol/L). (C) Analizinio signalo intensyvumo priklausomybės nuo anti-ŽAH koncentracijos kalibracinės kreivės (6 – CV ir 7 – PA kreivės). Anti-ŽAH koncentracijos nuo 0,098 iki 1,11 nmol/L , TMB koncentracija – 0,25 mmol/L , o H_2O_2 – 0,1 mmol/L , anti-ŽAH/KP koncentracija – 0,181 mmol/L .

3.10 PPR ir EL metodų palyginimas

Imuniniai jutikliai yra tiesioginio ir netiesioginio tipo analizinės sistemos, gebančios aptikti ir nustatyti dominančias analites esant pakankamai mažoms jų koncentracijoms [8]. Šiame darbe aprašyti netiesioginio tipo PPR ir EL imuniniai jutikliai buvo naudojami anti-ŽAH antikūnams nustatyti. Buvo palygintas

sukonstruotų imuninių jutiklių jautris, analizinio signalo priklausomybės nuo analitės koncentracijos tiesinis intervalas ir kiti parametrai (4 lentelė). Analizinis signalas, nesant analitės, plius trys jo standartiniai nuokrypiai gali būti panaudojamas įvertinti aptikimo ribą analitei. Buvo nustatyta, kad PPR netiesioginio tipo imuninio jutiklio aptikimo riba yra 0,051 nmol/L. Nustatant anti-ŽAH koncentraciją PA metodu aptikimo riba buvo mažiausia– 0,027 nmol/L. Mažesnis analizinio signalo atsikartojamumas ir didesnė aptikimo riba (0,056 nmol/L) buvo stebėta naudojant CV metodą. PA metodo jautris buvo 1,89 ir 2,07 karto didesnę lyginant su PPR ir CV metodais, atitinkamai. EL imunoanalizės privalumai, lyginant su PPR buvo aprašyti ir kitų autorių [8, 113]. EL metodai yra mažiau jautrūs nespecificinei pašalinių medžiagų adsorbcijai ir pasižymi mažesne aptikimo riba, lyginant su PPR metodu.

4 lentelė. PPR ir EL analizės parametru palyginimas.

	PPR		EL	
	Tiesioginis*	Netiesioginis	PA	CV
Tiesinė priklausomybė (nmol/L)	2,47 – 250	0,098 – 0,695	0,098 – 1,11	
Aptikimo riba (nmol/L)	–	0,051	0,027	0,056
Analizės laikas (min)	15	25	1	5
Sistemos regeneravimas	Taip	Taip	Ne	Ne

*Kausaite-Minkstimiene et al. (2009)

Lyginant mūsų gautus rezultatus su Rosales-Rivera grupės darbais, atliktais naudojant afininės chromatografijos metodą su fluorescenciniu detektavimu, aptikimo riba PPR yra 32,7, PA – 29,8, o CV – 61,9 karto didesnė [8].

Netiesioginio tipo imuninis jutiklis pasižymėjo didesniu jautriu ir gebėjimu aptikti analitę esant tokioms jos koncentracijoms, kurios tiesioginio tipo imuniniu jutikliu nenustatomos. Tačiau, tiesioginio tipo imuninio jutiklio PPR kampo

pokyčio priklausomybė nuo anti-ŽAH koncentracijos yra tiesinė platesniame analitės koncentracijų intervale (2,47 – 250 nmol/L) [14]. Naudojant netiesioginio tipo imuninį jutiklį ir atliekant analizę PA ar CV metodais, tiesinė priklausomybė buvo žymiai siauresnė (0,098 – 1,11 nmol/L).

3.11 Anti-ŽAH nustatymas realiuose mėginiuose

Pagrindinis reikalavimas kuriant biologinį jutiklį yra galimybė jį pritaikyti analizuojant realius mėginius (šlapimas, seilės, kraujo plazma). Tai reiškia, kad jutiklio aptikimo ribos turi būti ne didesnė nei realiuose mėginiuose aptinkama analitės koncentracija. Taip pat reikia įvertinti tokius faktorius, kaip matricos ar medžiagų, esančių realiuose mėginiuose, nespecifinė sąveika.

Elektrocheminio PA imuninio jutiklio gebėjimas nustatyti anti-ŽAH buvo iširtas žmogaus serumo mėginiuose, kurie buvo gauti iš Vilniaus universiteto Santariškių klinikų. Serumai buvo praskiestas 10 kartų PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4 ir į tokį serumo tirpalą buvo įpilti skirtingi anti-ŽAH tirpalo tūriai (5 lentelė).

5 lentelė. Anti-ŽAH nustatymo PA metodu realiuose mėginiuose duomenys.

Pradinė koncentracija, nmol/L	Pridėta koncentracija, nmol/L	Nustatyta koncentracija, nmol/L	RSD, %	Atsilartojamumas, %
0,8	0	0,74	8,57	93
0,8	2,5	3,2	8,06	97
0,8	4,8	5,5	7,29	98

*Potencialas +200 mV, 0,25 mmol/L TMB, 0,1 mmol/L H₂O₂, 0,181 μmol/L anti-ŽAH-KP

Ankstesniame skyriuje aprašytas (2.3.13) PA imunoanalizės protokolas buvo panaudotas realių mėginių analizėje. Buvo nustatyta, kad išgava yra 93 – 98 % ribose. Iš gautų rezultatų galima teigti, kad PA imuninis jutiklis gali būti pritaikytas anti-ŽAH nustatyti realiuose mėginiuose.

IŠVADOS

1. Tinkamiausias iš tirtų anti-ŽAH imobilizavimo PPR jutiklio lusto paviršiuje būdų yra anti-ŽAH fragmentų gautų redukuojant anti-ŽAH 2-merkaptoetilaminu imobilizavimas. Lyginant su kitais, šis mobilizavimo būdas pasižymi pakankamai didele imobilizavimo talpa, atlikimo paprastumu bei maža kaina, o antikūnai imobilizuojamai kryptingai.
2. Optimalios sąlygos anti-ŽAH fragmentų gavimui yra 15 mmol/L 2-merkaptoetilamino ir 0,41 $\mu\text{mol/L}$ anti-ŽAH koncentracijos, nes esant šioms sąlygoms didžiausia anti-ŽAH molekulių dalis redukuojama nepažeidžiant jų aktyviojo centro ir gaunamas didžiausias PPR kampo pokytis vykstant imobilizuotų frag-anti-ŽAH ir ŽAH sąveikai.
3. JSA užblokuoja po anti-ŽAH fragmentų imobilizavimo likusius aktyvius centrus PPR jutiklio lusto aukso paviršiuje, tai sumažina nespecifinę sąveiką, padidina frag-anti-ŽAH sluoksnio stabilumą bei jo gebėjimą sąveikauti su ŽAH ilgesnį laiką.
4. PPR ŽAH imuninis jutiklis pasižymi maža aptikimo riba (3,4 nmol/L), pakankamu analizinio signalo atsikartojamumu (96,3 % ir 93,8 %, atitinkamai tam pačiam ir skirtingiems jutikliams) ir stabilumu, plačiu analizuojamų koncentracijų intervalu (0,01 – 0,72 $\mu\text{mol/L}$) bei dideliu atrankumu. Aktyvus PPR jutiklio lusto paviršius visiškai regeneruojamas jį 5 minutes veikiant 0,5 % SDS ir 50 mmol/L NaOH tirpalu, o po to 3 minutes 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7,4.
5. Optimali elektrocheminei imunoanalizei TMB ir H_2O_2 koncentracija yra 0,25 ir 0,1 mmol/L atitinkamai. Esant 0,25 mmol/L TMB koncentracijai PA ir CV analizės metodais registruojamas analizinis signalas padidėja 1,7 karto. 0,1 mmol/L H_2O_2 koncentracija padidina analizinį signalą 2,37 ir 1,77 karto, atitinkamai PA ir CV atveju.

6. Anti-ŽAH imuniniai jutikliai pasižymi maža aptikimo riba (0,056, 0,051 ir 0,027 nmol/L, atitinkamai CV, PPR ir PA), pakankamu analizinio signalo atsikartojamumu (RSD = 0,06, 0,11 ir 0,12, atitinkamai PA, CV ir PPR) ir stabilumu, dideliu atrankumu ir trumpa analizės trukme (1, 5 ir 25 min., atitinkamai PA, CV ir PPR). Elektrocheminių imuninių jutiklių regeneracija negalima.
7. PA ir PPR imuniniai jutikliai gali būti taikomi atitinkamai anti-ŽAH ir ŽAH koncentracijos nustatymui realiuose mėginiuose.

AUTORIAUS MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

1. A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, A. Ramanavicius. A Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor. *Anal Chem.* **2010**, *82(15)*, 6401-6408.
2. A. Ramanaviciene, N. German, A. Kausaite-Minkstimiene, J. Voronovic, **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, A. Ramanavicius. Comparative Study of Surface Plasmon Resonance, Electrochemical and Electroassisted Chemiluminescence Methods Based Immunosensor for the Determination of Antibodies Against Human Growth Hormone. *Biosens Bioelectron.* **2012**, *36(1)*, 48-55.
3. A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanavicius, **J. Ruksnaite**, A. Ramanaviciene. A surface plasmon resonance immunosensor for human growth hormone based on fragmented antibodies. *Analytical Methods*, **2013**, *5(18)*, 4757-4763.

KONFERENCIJŲ TEZĖS

1. **J. Kirlytė (Rukšnaitė)**, A. Rapkauskaitė, A. Kaušaitė-Minkštīmienė. Sąveikos tarp skirtingai imobilizuotų anti-HGH antikūnų ir HGH tyrimas PPR metodu. *Neorganinių junginių chemija ir technologija: konferencijos pranešimų medžiaga.* 2010, balandžio 21– 22 d, Kaunas, Lietuva, p. 63–66.
2. **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius. The Impact of Antibody Immobilization Technique on the Binding Capacity of SPR Immunosensor. 12oji tarptautinė konferencija-mokykla. *Advanced Materials and Technologies 2010*, rugpjūčio 27 – 31, Palanga, Lietuva, p. 39.

3. A. Ramanaviciene, A. Kausaite, **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, Z. Balevicius, I. Baleviciute, A. Makareviciute, Y. Oztekin, A. Ramanavicius. Evaluation of Immobilization Techniques on the Efficiency of Immunosensors. PITTCON 2011. CD-ROM abstraktas, 2011, kovo 13-18, Atlanta, JAV, p. 2200-12.
4. **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, P. Nadal, T. Mairal, V. Beni, A. Kausaite-Minkstimiene, C.K.O'Sullivan. Aptasensors for Allergen Lupin Detection. 10-oji tarptautinė lietuvių chemikų konferencija – Chemija 2011. CD-ROM abstraktas, 2011, spalio 14–15, Vilnius, Lietuva, p. 70.
5. A. Ramanaviciene, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Makareviciute, **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, I. Baleviciute, Y. Oztekin, A. Ramanavicius, J. Voronovic, N. German. Immunosensors Based on Surface Plasmon Resonance and Electrochemical Techniques. PITTCON 2012. CD-ROM abstraktas, 2012, kovo 11-15, Orlando, JAV, p. 550-10.
6. N. German, A. Kausaite-Minkstimiene, J. Voronovic, **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. The Creation of Immunosensors Based on Antigen-Antibodies Against Human Growth Hormone Interaction and the Application for the Analysis in Real Samples. 3-iasis Europos imunologų kongresas 2012. CD-ROM abstraktas, 2012, rugsėjo 5–8, Glasgow, Škotija, p. 652–653.
7. J. Baniukevic, **J. Kirlyte (Rukšnaitė)**, A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene. Comparison of Oriented and Random Antibody Immobilization Technique on the Efficiency of Immunosensor. EUROSENSORS 2012. CD-ROM abstraktas, 2012, rugsėjo 9–12, Krokva, Lenkija, PM2 – 21.

PADĖKOS

Esu dėkinga daugeliui žmonių, kurie yra prisidėję prie šios disertacijos atsiradimo. Dėkinga už jų pagalbą, bendradarbiavimą vykdant tyrimus ir žinoma palaikymą visais gyvenimo klausimais.

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei doc. dr. Astai Kaušaitėi-Minkštimienei, už galimybę atlikti mokslinį darbą bei visapusišką pagalbą ruošiant disertaciją, už kantrybę bei supratimą.

VU Chemijos fakulteto doc. dr. (HP) Almyrai Ramanavičienei ir Inovatyvios Medicinos centro mokslinei darbuotojai dr. Natalijai German norėčiau padėkoti už idėjas, patarimus bei pastabas vykdant mokslinius tyrimus.

Prof. Arūnui Ramanavičiui už kritinio mąstymo skatinimą.

Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui ir Lietuvos Mokslo Tarybai už suteiktą finansinę paramą vykdant šį darbą.

Visam Nanotechno ir VU chemijos fakulteto kolektyvui už pagalbą ir palaikymą.

Savo mylimai šeimai ir draugams už paramą, kantrybę ir supratingą meilę.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Saerens, D., Ghassabeh, G.H, Muyldermans, S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*. **2008**, 8(5), 600-608.
2. Lin, F.Y., Sherman, P.M., Li, D. Development of a novel hand-held immunoassay for the detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biomedical Microdevices*. **2004**, 6(2), 125-130.
3. Kassanos, P., Iles, R.K., Bayford, R.H., Demosthenous, A. Towards the development of an electrochemical biosensor for hCGbeta detection. *Physiological Measurements*. **2008**, 29(6), 241-254.
4. Mitchell, J. Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance. *Sensors (Basel)*. **2010**, 10(8), 7323-7346.
5. Schofield, D.A., Westwater, C., Barth, J.L., DiNovo, A.A. Development of a yeast biosensor-biocatalyst for the detection and biodegradation of the organophosphate paraoxon. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2007**, 76(6), 1383-1394.
6. Goryacheva, I., DeSaeger, S., Eremin, S., VanPeteghem, C. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: a review. *Food Additives and Contaminants*. **2007**, 24(10), 1169-1183.
7. Smith, R.G., D'Souza, N., Nicklin, S. A review of biosensors and biologically-inspired systems for explosives detection. *Analyst*. **2008**, 133(5), 571-584.
8. Rosales-Rivera, L.C., Acero-Sánchez, J.L., Lozano-Sánchez, P., Katakis, I., O'Sullivan, C.K. Electrochemical immunosensor detection of antigliadin antibodies from real human serum. *Biosensors and Bioelectronics*. **2011**, 26(11), 4471-4476.

-
9. Grosso, P., Carrara, S., Stagnia, C., Benini, L. Cancer marker detection in human serum with a point-of-care low-cost system. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2010**, *147(2)*, 475-480.
 10. Balevicius, Z., Ramanaviciene, A., Baleviciute, I., Makaraviciute, A., Mikoliunaite, L., Ramanavicius, A. Evaluation of intact-and fragmented-antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2011**, *160*, 555-562.
 11. Xu, T., Miao, J.M., Wang, Z.H., Yu, L., Li, C.M. Micro-piezoelectric immunoassay chip for simultaneous detection of Hepatitis B virus and α -fetoprotein. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2011**, *151(2)*, 370-376.
 12. Englebienne, P., Van Hoonacker, A., Verhas, M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical science. *Journal of Spectroscopy*. **2003**, *17(2-3)*, 255-273.
 13. Kaušaitė, A., Ramanavičienė, A., Mostovojus, V., Ramanavičius, A. Surface plasmon resonance and its application to biomedical research. *Medicina Lithuania*. **2007**, *43(5)*, 355-365.
 14. Kausaite, A., van Dijk, M., Castrop, J., Ramanaviciene, A., Baltrus, J.P., Acaite, P., Ramanavicius, A. Surface plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. **2007**, *35(1)*, 57-63.
 15. Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibodies against human growth hormone. *The Analyst*. **2009**, *134*, 2051-2057.
 16. Hu, W., Li, C.M., Dong, H. Poly(pyrrole-co-pyrrole propylic acid) film and its application in label-free surface plasmon resonance immunosensors. *Analytica Chimica Acta*. **2008**, *630(1)*, 67-74.

-
17. Brogan, K.L., Wolfe, W.N., Jones, P.A., Schoenfish, M.H. Direct oriented immobilization of F(ab') antibody fragments on gold. *Analytica Chimica Acta*. **2003**, *496*, 73-80.
 18. Kress-Rogers, E. In *Handbook of biosensors and electronic noses - Medicine, food, and the environment*, Kress-Rogers, E. (Ed), CRC Press, Inc, Frankfurt. **1997**, 3-39.
 19. Schaertel, B.J., Firstenbergden, R. Biosensors in the food industry: present and future. *Journal of Food Protection*. **1988**, *51(10)*, 811-820.
 20. Sethi, R.S. Transducer aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. **1994**, *9(3)*, 243-264.
 21. Patel, P.D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **2002**, *21(2)*, 96-115.
 22. Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O'Kennedy, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*. **2003**, *32(1)*, 3-13.
 23. Kyprianou, D., Chianella, I., Guerreiro, A., Piletska, E.V., Piletsky, S.A. Development of optical immunosensors for detection of proteins in serum. *Talanta*. **2013**, *103*, 260-266.
 24. Lohse, M.J., Calebiro, D. Cell biology: receptor signals come in waves. *Nature*. **2013**, *495(7442)*, 457-458.
 25. Candiani, A., Bertucci, A., Giannetti, S., Konstantaki, M., Manicardi, A., Pissadakis, S., Cucinotta, A., Corradini, R., Selleri, S. J. Label-free DNA biosensor based on a peptide nucleic acid-functionalized microstructured optical fiber-Bragg grating. *Journal of Biomedical Optics*. **2013**, *18(5)*, 57004.
 26. Paredes, J., Becerro, S., Arizti, F., Aguinaga, A., Del Pozo, J.L., Arana, S. Real time monitoring of the impedance characteristics of Staphylococcal bacterial biofilm cultures with a modified CDC reactor system. *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, *38(1)*, 226-232.

-
27. 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. *Biosensors and Bioelectronics*. **2013**, *43*, 281-288.
28. Hennessey, H., Afara, N., Omanovic, S., Padjen, A.L. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. *Analitica Chimica Acta*. **2009**, *643(1-2)*, 45-53.
29. Kurtinaitiene, B., Ambrozaite, D., Laurinavicius, V., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. Amperometric immunosensor for diagnosis of BLV infection. *Biosensors and Bioelectronics*. **2008**, *23(10)*, 1547-1554.
30. Ahmed, M.U., Hossain, M.M., Tamiyaa, E. Electrochemical biosensors for medical and food applications. *Electroanalysis*. **2008**, *20(6)*, 616-626.
31. Clark, L.C. Jr., Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1962**, *102*, 29-45.
32. Yalow, R.S., Berson, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*. **1959**, *184(21)*, 1648-1649.
33. Vaitukaitis, J.L., Braunstein, G.D., Ross, G.T. A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **1972**, *113(6)*, 751-758.
34. Minh Canh, T. *Biosensors*. Springer US. **1994**, 153-162.
35. Bedford, E.E, Spadavecchia, J., Pradier, C.M., Gu, G.X. Surface plasmon resonance biosensors incorporating gold nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*. **2012**, *12(6)*, 724-739.
36. Engvall, E., Perlman, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin. *Immunochemistry*. **1971**, *8(9)*, 871-874.

-
37. Hage, D. S. Immunoassays. *Analytical Chemistry*. **1999**, *71(12)*, 294-304.
38. Mello, L.D., Kubota, L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*. **2002**,*77(2)*, 237-256.
39. Butler, J.E. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Journal of Immunoassay*. **2000**, *21(1)*, 165-209.
40. Warsinke, A. Point-of-care testing of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2009**, *393(5)*, 1393-1405.
41. Shankaran, D., Miura, N. Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **2007**, *40(23)*, 7187-7200.
42. Iles, A., Oki, A., Pamme, N. Bonding of soda-lime glass microchips at low temperature. *Microfluid. Nanofluid.* **2007**, *3(1)*, 119-122.
43. Becker, H., Locascio, L.E. Polymer microfluidic devices. *Talanta*. **2002**, *56(2)*, 267-287.
44. Hughes, A.J., Lin, R.K., Peehl, D.M., Herr, A.E. Microfluidic integration for automated targeted proteomic assays. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. **2012**, *109(16)*, 5972-5977.
45. Yang, N.Y., Lin, H.I., Wang, J.H., Shiesh, S.C., Lee, G.B. An integrated microfluidic system for C-reactive protein measurement. *Biosensors and Bioelectronics*. **2009**, *24(10)*, 3091-3096.
46. Drury, J.L., Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. **2003**, *24(24)*, 4337-4351.
47. Wu, H., Tian, Y., Liu, B., Lu, H., Wang, X., Zhai, J., Jin, H., Yang, P., Xu, Y., Wang, H. Titania and alumina sol-gel-derived microfluidics enzymatic-reactors for peptide mapping: design, characterization, and performance. *Journal of Proteome Research*. **2004**, *3(6)*, 1201-1209.
48. Nollet, L.M.L. *Handbook of food analysis*. Taylor & Francis Group, LLC. **2004**, 2142-2145.

-
49. Narayanaswamy, R, Wolfbeis, O.S. Design, quality control and normalization of biosensor chips. *Optical Sensors*. Springer. **2005**, 33-40.
50. Ramanavicius, A., Kausaite, A., Ramanaviciene, A., Acaite, J., Malinauskas, A. Redox enzyme–glucose oxidase-initiated synthesis of polypyrrole. *Synthetic Metals*. **2006**, *156*, 409-413.
51. Gao, J., Xu, J., Locascio, L.E., Lee, C.S. Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification. *Analytical Chemistry*. **2001**, *73(11)*, 2648-2655.
52. Li, M. Review of advanced CMOS technology for post-Moore era. *Science China Physics, Mechanics and Astronomy*. **2012**, *55(12)*, 2316 -2325.
53. Yakovleva, J., Davidsson, R., Lobanova, A., Bengtsson, M., Eremin, S., Laurell, T., Emneus, J. Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection. *Analytical Chemistry*. **2002**, *74(13)*, 2994-3004.
54. Lee, J.A., Hwang, S., Kwak, J., Park, S.I., Lee, S.S., Lee, K.C. An electrochemical impedance biosensor with aptamer-modified pyrolyzed carbon electrode for label-free protein detection. *Sensors and Actuators B:Chemical*. **2008**, *129(1)*, 372-379.
55. Jo, K., Heien, M.L., Thompson, L.B., Zhong, M., Nuzzo, R.G., Sweedler, J.V. Mass spectrometric imaging of peptide release from neuronal cells within microfluidic devices. *Lab Chip*. **2007**, *7(11)*, 1454-1460.
56. Glass, N.R., Tjeung, R., Chan, P., Yeo, L.Y., Friend, J.R. Organosilane deposition for microfluidic applications. *Biomicrofluidics*. **2011**, *5(3)*, 036501
57. Hermansson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed. Academic Press, San Diego. **2008**.

-
58. Wang, H., Liu, Y., Liu, C., Huang, J., Yang, P., Liu, B. Microfluidic chip-based aptasensor for amplified electrochemical detection of human thrombin. *Electrochemistry Communications*. **2010**, *12(2)*, 258-261.
59. Huh, S.Y., Chung, A.J., Erickson, D. Surface enhanced raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis. *Microfluidics and Nanofluidics*. **2009**, *6(3)*, 285-297.
60. Uddayasankar, A.H., Ng, U., Wheeler, A.R. Immunoassays in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, *397(3)*, 991-1007.
61. Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*. **2001**, *10(4-5)*, 163-188.
62. Tewksbury, D.A., Dart, R.A. Human plasma angiotensinogen: a review of purification procedures. *Molecular and cellular biochemistry*. **1979**, *27(1)*, 47-56.
63. Nath, S.D., Linh, N.T., Sadiasa, A., Lee, B.T. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bonetissue regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*. **2013**.
64. Verheyen, E., van der Wal, S., Deschout, H., Braeckmans, K., de Smedt, S., Barendregt, A., Hennink, W.E., van Nostrum, C.F. Protein macromonomers containing reduction-sensitive linkers for covalent immobilization and glutathione triggered release from dextran hydrogels. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. **2011**, *156(3)*, 329-336.
65. Kim, D., Karns, K., Tia, S.Q., He, M., Herr, E. Electrostatic protein immobilization using charged polyacrylamide gels and cationic detergent microfluidic western blotting. *Analytical Chemistry*. **2012**, *84(5)*, 2533-2540.
66. Zhang, S. Hydrogels: Wet or let die. *Nature Materials*. **2004**, *3*, 7-8.
67. Sommer, G.J., Hatch, A.V. IEF in microfluidic devices. *Electrophoresis*. **2009**, *30(5)*, 742-757.

-
68. Karns, K., Herr, A.E. Human tear protein analysis enabled by an alkaline microfluidic homogeneous immunoassay. *Analytical Chemistry*. **2011**, *83(21)*, 8115-8122.
69. Sakai-Kato, K., Kato, M., Toyo'oka, T. Creation of an on-chip enzyme reactor by encapsulating trypsin in sol-gel on a plastic microchip. *Analytical Chemistry*. **2003**, *75(3)*, 388-393.
70. Wu, H., Tian, Y., Liu, B., Lu, H., Wang, X., Zhai, J., Jin, H., Yang, P., Xu, Y., Wang, H. Titania and alumina sol-gel-derived microfluidics enzymatic-reactors for peptide mapping: design, characterization, and performance. *Journal of Proteome Research*. **2004**, *3(6)*, 1201-1209.
71. Hisamoto, H., Shimizu, Y., Uchiyama, K., Tokeshi, M., Kikutani, Y., Hibara, A., Kitamori, T. Chemicofunctional membrane for integrated chemical processes on a microchip. *Analytical Chemistry*. **2003**, *75(2)*, 350-354.
72. Yang, D., Niu, X., Liu, Y., Wang, Y., Gu, X., Song, L., Zhao, R., Ma, L., Shao, Y., Jiang, X. Electrospun nanofibrous membranes: a novel solid substrate for microfluidic immunoassays for HIV. *Advanced Materials*. **2008**, *20(24)*, 4770-4775.
73. Liu, Y., Yang, D., Yu, T., Jiang, X. Incorporation of electrospun nanofibrous PVDF membranes into a microfluidic chip assembled by PDMS and scotch tape for immunoassays. *Electrophoresis*. **2009**, *30(18)*, 3269-3275.
74. Piletsky, S., Pletska, E., Bossi, A., Turner, A. Surface functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*. **2003**, *82(1)*, 86-92.
75. Srivatsa, V., Kimberly, W., Leonidas, G. Oriented immobilization of proteins. *Microchimica Acta*. **1998**, *128(3-4)*, 127-143.
76. Karyakin, A.A., Presnova, G.V., Rubtsova, M.Y., Egorov, A.M. Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol groups. *Analytical Chemistry*. **2000**, *72(16)*, 3805-3811.

-
77. Yam, C.M., Deluge, M., Tang, D., Kumar, A., Cai, C. Preparation, characterization, resistance to protein adsorption, and specific avidin-biotin binding of poly(amidoamine) dendrimers functionalized with oligo(ethylene glycol) on gold. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2006**, *296(1)*, 118-130.
78. Patel, N., Davies, M.C., Hartshorne, M., Heaton, R.J., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B., Williams, P.M. Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*. **1997**, *13(24)*, 6845-6490.
79. Quinn, J.G., O'Neill, S., Doyle, A., McAtamney, C., Diamond, D., MacCraith, B.D. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Analytical Biochemistry*. **2000**, *281(2)*, 135-143.
80. Johnsson, B., Lofas, S., Lindquist, G., Edstrom, A., Muller Hillgren, R.M., Hansson, A. Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies. *Journal of Molecular Recognition : JMR*. **1995**, *8(1-2)*, 125-131.
81. Interaktyvi nuoroda: <http://www.piercenet.com/product/neutraavidin-protein-conjugates>. 2014-02-07.
82. Deibel, M.R., Lobl, T.J., Yem, A.W. A technique for rapid purification of low yield products: biotinylation of chemically synthesized proteins on-resin. *International Journal of Peptide and Protein Research*. **1989**, *2(2)*, 189-194.
83. Orth, R.N., Clark, T.G., Craighead, H.G. Avidin-biotin micropatterning methods for biosensor application. *Biomedical Microdevices*. **2003**, *5(1)*, 29-34.
84. Antikūnai, imunoglobulinai, Ig. Visuotinė lietuvių enciklopedija, T. I (A-Ar). Mokslo ir enciklopedijų leidybos institutas, Vilnius. **2001**, 582-583.
85. Adomaitiene, D., Januleviciute N., Kazakevicius, R., Vaizciuvenas, V. *Imunologijos įvadas*. **2000**, 76-92.

-
86. Osborne, J.K., Thomas, J., Kindt, R. A., Goldsby, B. A. Kuby immunology (6th edition). **2006**, 76-88, 60-65.
87. Interaktyvi nuoroda: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1972/. 2014-05-04.
88. Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N., Woernley, D.L. Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1960**, 89(2), 230-244.
89. Avrameas, S., Ternynck, T., Guesdon, J., L. Coupling of Enzymes to antibodies and antigens. *Scandinavian Journal of Immunology*. **1978**, 8(7), 7-23.
90. Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochemical Journal*. **1959**, 73, 119-126.
91. Mariani, M., Camagna, M., Tarditi, L., Seccamani, E. A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab)₂ suitable for clinical use from mouse IgG. *Journal Article, In Vitro*. **1991**, 28(1-2), 69-77.
92. Maneesh, J., Kamal, N., Surinder, K.B. Engineering antibodies for clinical applications. *Trends in Biotechnology*. **2007**, 25(7), 307-316.
93. Baumann, G. Growth-hormone heterogeneity – genes, isohormones, variants, and binding-proteins. *Endocrine Reviews*. **1991**, 12, 424-49.
94. Interaktyvi nuoroda: <http://www.sciencephoto.com/media/470781/view>. 2014-05-01.
95. Takahashi, Y., Kipnis, D., Daughaday, W. Growth hormone secretion during sleep. *Journal of Clinical Investigation*. **1967**, 47(9), 2079-2090.
96. Nindl, B.C., Hymer, W.C., Deaver, D.R., Kraemer, W.J. Growth hormone pulsatility profile characteristics following acute heavy resistance exercise. *Journal of Applied Physiology*. **2001**, 91(1), 163-172.
97. Juul, A., Jørgensen, J.,O., Christiansen, J.,S., Müller, J., Skakkeboek, N.,E. Metabolic effects of GH: a rationale for continued GH treatment of GH-deficient adults after cessation of linear growth. *Hormone Research*. **1995**, 3(3), 64-72.

-
98. Saugy, M., Robinson, N., Saudan, C., Baume, N., Avois, L., Mangin, P. Human growth hormone doping in sports. *British Journal of Sports Medicine*. **2006**, *40(1)*, 35-39.
99. Gardner, D.G., Shoback, D. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology* (8th ed.). New York: McGraw-Hill Medical. **2007**, 193-201.
100. Cunningham, B.C., Ultsch, M., Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R., Wells, J.A. Dimerization of the extracellular domains of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*. **1991**, *254*, 821-825.
101. Lašienė, D., Lašas, L. Žmogaus augimo hormonas, jo deficitas ir gydymas. Kaunas, **2003**.
102. Wu, Z., Bidlingmaier, M., Dall, R. Detection of doping with human growth hormone. *Lancet*. **1999**, *353(9156)*, 895.
103. Holl, R.W., Schwarz, U., Schauwecker, P. Diurnal variation in the elimination rate of human growth hormone (GH): the half-life of serum GH is prolonged in the evening, and affected by the source of the hormone, as well as by body size and serum estradiol. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. **1993**, *77(1)*, 216-220.
104. Bidlingmaier, M., Wu, Z., Strasburger, C.J. Test method: HG. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **2000**, *14(1)*, 99-109.
105. D'Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. **2003**, *334(1-2)*, 41-69.
106. Leung, A., Shankar, P. M., Mutharasan, R., A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2007**, *125(2)*, 688-703.
107. Jacobson, K., Garcia, R., Libshitz, H., Whimbey, E., Rolston, K., Abi-Said, D., Raad, I. Clinical and radiological features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria in cancer patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **1998**, *17(9)*, 615-621.

-
108. Ramanavicius, A., Kausaite, A., Ramanaviciene, A. Potentiometric study of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase immobilized on the carbon rod electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2006**, *113(1)*, 435-444.
109. Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2002**, *1(7)*, 515-528.
110. Mawre, A.P. Surface plasmon resonance. Oxford University Press. **2001**, 137-170.
111. Homola, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews*. **2008**, *108(2)*, 462-493.
112. Benedetto, G. E., Palmisano, F., Zambonin, P.G. One-step fabrication of a bienzyme glucose sensor based on glucose oxidase and peroxidase immobilized onto a poly(pyrrole) modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. **1996**, *11(10)*, 1001-1008.
113. Lan, G., Congjuan, L., Xiaohong, L., Heinz-Bernhard, K. Electrochemical impedance study of the interaction of metal ions with unlabeled PNA. *Chemical Communications*. **2010**, *46(34)*, 6344-6346.
114. Nicholson, M.M. Diffusion currents at cylindrical electrodes. A Study of Organic Sulfides *Journal of the American Chemical Society*. **1954**, *76*, 2539-2545.
115. Nicholson, R.S., Shain, I. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Analytical Chemistry*. **1964**, *36*, 706-723.
116. Nicholson, M.M. Polarography of metallic monolayers. *Journal of the American Chemical Society*. **1957**, *79*, 7-12.
117. Mickevičius, D. Cheminės analizės metodai (2 dalis). Žiburio leidykla, Vilnius. **1999**.
118. Ramaley, L., Krause, M.S. Theory of square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*. **1969**, *41*, 1362-1365.

-
119. Osteryoung, J.G., Osteryoung, R.A. Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*. **1985**, *57(1)*, 101-110.
120. Wojciechowski, M.,G.,W., Osteryoung, J. Square-wave anodic stripping analysis in the presence of dissolved oxygen. *Analytical Chemistry*. **1985**, *57(1)*, 155-158.
121. Engvall, E., Perlman, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. **1971**, *8*, 871-874.
122. Yalow, R.,S., Berson, S.,A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*. **1959**, *184(21)*, 1648-1649.
123. Burtis, C., Geary, TD. Glossary of bioanalytical nomenclature. *Pure and Applied Chemistry*. **1994**, *66*, 2587-2604.
124. Ghindilis, A.L., Atanasov, P., Wilkins, E. Potentiometric immunoelectrode for fast assay based on direct electron transfer catalyzed by peroxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **1996**, *34(1-3)*, 528-532.
125. Deacon, J.K., Thomson, A., Page, A., Stops, J., Roberts, P., Whiteley, S. An assay for human chorionic gonadotrophin using the capillary fill immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. **1991**, *6(3)*, 193-199.
126. Hoegger, D., Morier, P., Vollet, C., Heini, D., Reymond, F., Rossier, J.S. Disposable microfluidic ELISA for the rapid determination of folic acid content in food products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2007**, *387(1)*, 267-275.
127. Ruano López, J.M., Agirregabiria, M., Olabarria, G., Verdoy, D., Bang, D.D., Bu, M. "The SmartBioPhone, a point of care vision under development through two European projects: OPTOLABCARD and LABONFOIL". *Lab Chip*. **2009**, 1495-1499.
128. Rusling, J.F., Sotzing, G., Papadimitrakopoulo, F. Designing nanomaterial-enhanced electrochemical immunosensors for cancer biomarker proteins. *Bioelectrochemistry*. **2009**, *76(1-2)*, 189-194.

-
129. Carrara, S., Bhalla, V., Stagni, C., Benini, L., Ferretti, A., Valle, F., Gallotta, A., Riccò, B., Samorì, B. Label-free cancer markers detection by capacitance biochip. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2009**, *136*, 163-172.
130. Billah, M., Hays, H.C.W., Millner, P.A. Development of a myoglobin impedimetric immunosensor based on mixed self-assembled monolayer onto gold. *Microchimica Acta*. **2008**, *160*, 447-454.
131. Haddour, N., Chauvin, J., Gondran, C., Cosnier, S. Photoelectrochemical immunosensor for label-free detection and quantification of anti-cholera toxin antibody. *Journal of the American Chemical Society*. **2006**, *128(30)*, 9693-9698.
132. Chan, C.P., Wan, T.S., Watkins, K.L., Pelsers, M.M., Vander Voort, D., Tang, F.P., Lam, K.H., Mill, J., Yuan, Y., Lehmann, M., Hemple, A., Sanderson, J.E., Glatz, J.F., Renneberg, R. Rapid analysis of fatty acid-binding proteins with immunosensors and immunotests for early monitoring of tissue injury. *Biosensors and Bioelectronics*. **2005**, *20(12)*, 2566-2580.
133. Stevens, E., Liotta, L., Kohn, E. Proteomic analysis for early detection of ovarian cancer: a realistic approach. *International Journal of Gynecological Cancer*. **2003**, *13(2)*, 133-139.
134. Pattnaik, P., Srivastav, A. Surface plasmon resonance-applications in food science research: A review. *Journal of Food Science and Technology*. **2006**, *43*, 329-336.
135. Homola, J. Surface Plasmon resonance (SPR) biosensors and their applications in food safety and security. *Sci. Ser. II Math*. **2006**, *216*, 101-118.
136. Petz, M. Recent applications of surface plasmon resonance biosensors for analyzing residues and contaminants in food. *Monatshefte fur Chemie - Chemical*. **2009**, *140(8)*, 953-964.
137. Ouchterlony, O. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. **1948**, *25(1-2)*, 186-191.

-
138. Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., Hunter, N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. **2002**, *148(1)*, 257-266.
139. Magliulo, M., Simoni, P., Guardigli, M., Michelini, M., Luciani, M., Lelli, R., Roda, A. A Rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*. *Pathogen Bacteria*. **2007**, *55(13)*, 4933-4939.
140. Shankaran, D.R., Kawaguchi, D.R., Kim, S.J., Matsumoto, K., Toko, K., Miura, N. Evaluation of the molecular recognition of monoclonal and polyclonal antibodies for sensitive detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by indirect competitive surface plasmon resonance immunoassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2006**, *386(5)*, 1313-1320.
141. Singh, P., Onodera, T., Mizuta, Y., Matsumoto, K., Miura, N., Toko, K. Dendrimer modified biochip for detection of 2,4,6-trinitrotoluene on SPR immunosensor: fabrication and advantages. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2009**, *137*, 403-409.
142. Riskin, M., Tel-Vered, R., Willner, I. Imprinted Au-nanoparticle composites for the ultrasensitive surface plasmon resonance detection of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) *Advanced Materials*. **2010**, *22(12)*, 1387-1391.
143. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, *227(5259)*, 680-685.
144. Wroblewski, V.J., Masnyk, M., Becker, G.W. Proteolytic cleavage of human growth hormone (hGH) by rat tissues in vitro: influence on the kinetics of exogenously administered hGH. *Endocrinology*. **1991**, *129(1)*, 465-474.
145. Macintyre, J.G. Growth hormone and athletes. *Sports Medicine*. **1987**, *4(2)*, 129-142.

-
146. Abbas, A., Linman, M.J., Cheng, Q. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. **2011**, *26(5)*, 1815-1824.
147. Mrksich, M., Sigal, G.B., Whitesides, G.M. Surface plasmon resonance permits in situ measurement of protein adsorption on self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Langmuir*. **1995**, *11*, 4383-4385.
148. Suchodolskis, A., Stirke, A., Timonina, A., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A. Baker's yeast transformation studies by atomic force microscopy. *Advance Science Letters*. **2011**, *4*, 171-173.
149. Sarma, V.R., Silverton, E.W., Davies, D.R., Terry, W.D. Three-dimensional structure of a human immunoglobulin with a hinge deletion. *Journal of Biological Chemistry*. **1971**, *246*, 3753-3759.
150. Saphire, E.O., Standeld, R.L., Crispin, M.D.M., Parren, P.W.H.I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton, D.R., Wilson, I.A. Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *Journal of Molecular Biology*. **2002**, *319(1)*, 9-18.
151. Chantalat, L., Jones, N.D., Korber, F., Navaza, J., Pavlovsky, A.G. Protein and Peptide Letters. **1995**, *2*, 2333-2340.
152. Trevino, J., Calle, A., Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., Lechuga, L.M. Determination of human growth hormone in human serum samples by surface plasmon resonance immunoassay. *Talanta*. **2009**, *78(3)*, 1011-1016.
153. Garay, F., Kisiel, G., Fang, A., Lindner, E. Surface plasmon resonance aided electrochemical immunosensor for CK-MB determination in undiluted serum samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, *397(5)*, 1873-1881.