



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS / GEOMOKSLŲ INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA**

Gabija Agasarjanaitė

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**PPR IMUNINIS JUTIKLIS SPECIFINIŲ ANTIKŪNŲ PRIEŠ
SARS-COV-2 VIRUSO RBD BALTYMĄ NUSTATYMOI**

Darbo vadovas
doc. dr. Anton Popov

Vilnius, 2025



VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY / GEOSCIENCES
DEPARTMENT OF ANALYTICAL AND ENVIRONMENT CHEMISTRY

Gabija Agasarjanaitė

Chemistry
Master thesis

**SPR IMMUNOSENSOR FOR THE DETECTION OF SPECIFIC
ANTIBODIES AGAINST SARS-COV-2 VIRUS RBD PROTEIN**

Scientific adviser
doc. dr. Anton Popov

Vilnius, 2025

TURINYS

IVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	5
1.1. Paviršiaus plazmonų rezonansas	5
1.2. SARS-CoV-2 viruso baltymų struktūra ir funkcijos	6
1.3. Antikūnai ir jų sąveika su antigenais	9
1.4. Imuniniai jutikliai	11
2. EKSPERIMENTO METODIKA	14
2.1. Medžiagos ir reagentai	14
2.2. Prietaisai ir priemonės	14
2.3. Tirpalų gamyba	15
2.4. Lusto paruošimas.....	16
2.5. Lusto paviršiaus stabilizavimas.....	16
2.6. SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimas	16
2.7. SARS-CoV2-RBD baltymo sąveika su specifiniais p-anti-RBD antikūnais prieš SARS-CoV2-RBD baltymą	17
2.8. p-anti-RBD ir m-anti-RBD antikūnų konkurencinė sąveika su SARS-CoV2-RBD baltymu	17
2.9. SARS-CoV2-RBD baltymo nespecifinės sąveikos patikra.....	18
2.10. p-anti-RBD antikūnų sąveika su specifiniais antriniais anti-IgG antikūnais prieš p-anti-RBD antikūnus	18
2.11. Aukso nanodalelių konjugavimas anti-IgG antikūnais ir HRP fermentu	19
2.12. p-anti-RBD antikūnų sąveika su AuND-anti-IgG-HRP konjugatais	19
2.13. p-anti-RBD antikūnų sąveika su specifiniais antriniais anti-IgG antikūnais FBS serume	20
2.14. Skaičiavimai	20
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	21
3.1. SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimas	21
3.2. Tiesioginis p-anti-RBD antikūnų nustatymas.....	21
3.3. Konkurencinis p-anti-RBD nustatymas	22
3.4. SARS-CoV2-RBD baltymo nespecifinės sąveikos patikra.....	24
3.5. p-anti-RBD nustatymas netiesioginiu formatu panaudojus anti-IgG	24
3.6. AuND-anti-IgG-HRP konjugatų taikymas p-anti-RBD antikūnų netiesioginiam nustatymui	25
3.7. Tyrimai realiuose mėginiuose.....	27
IŠVADOS	28
LITERATŪROS SĄRAŠAS	29
SANTRAUKA	32
SUMMARY	33

IVADAS

2019 metais pasaulį sukaustė sunkaus ūminio kvėpavimo sindromo koronaviruso 2 (SARS-CoV-2) sukeliama Koronavirusinė liga (COVID-19), privertusi žmones kardinaliai pakeisti savo gyvenimus. Mokslininkams išradus vakciną nuo šios siaubingos ligos, žmonėms pavyko ištrūkti iš pandemijos gniaužtų [1]. Tačiau 2025 metų kovo 30 d. Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) paskelbė, kad COVID-19 liga iš viso nusinešė daugiau nei 7 mln. žmonių gyvybių 231 šalyje ir privertė iš naujo susimąstyti. Nepaisant to, kad didžioji dalis pasaulio gyventojų yra pasiskiepiję nuo COVID-19, aukų skaičius vis dar auga, todėl tyrimai, susiję su šia liga, išlieka svarbūs ir aktualūs [2].

Paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) principu pagrįsti imuniniai jutikliai suteikia daugkartinio panaudojimo galimybę ir galimybę atlikti daugybę analizių per sąlyginai trumpą laiką. Šie jutikliai suteikia galimybę itin jautriai atlikti analizę nenaudojant žymenų [3]. Pasitelkiant PPR imuninių jutiklių pagalbą, galime stebėti biologinių molekulių, tokių kaip baltymų bei antikūnų, tarpusavio sąveikas realiuoju laiku [4]. Galime tirti sąveikų kinetiką bei analizuoti sąryšio stiprumą tarp analitės ir atpažinimo elemento. Atsižvelgiant į išvardytus privalumus, galima daryti išvadą, kad PPR metodas yra tinkamas būdas analizuoti SARS-CoV-2 viruso baltymus ir šių baltymų sąveikas su specifiniais antikūnais [3].

Darbo tikslas: sukurti PPR imuninį jutiklį specifinių antikūnų prieš SARS-CoV2-RBD baltymą nustatymui, taikant skirtingus nustatymo formatus.

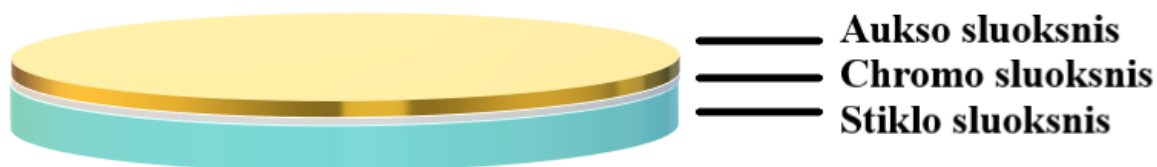
Darbo uždaviniai:

1. Patikrinti skirtingų nustatymo formatų imuninių jutiklių veikimą.
2. Apskaičiuoti tiriamų imuninių jutiklių analizines charakteristikas – tiesinį intervalą, aptikimo ir nustatymo ribas.
3. Įvertinti pasirinkto imuninio jutiklio veikimą realiuose mėginiuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

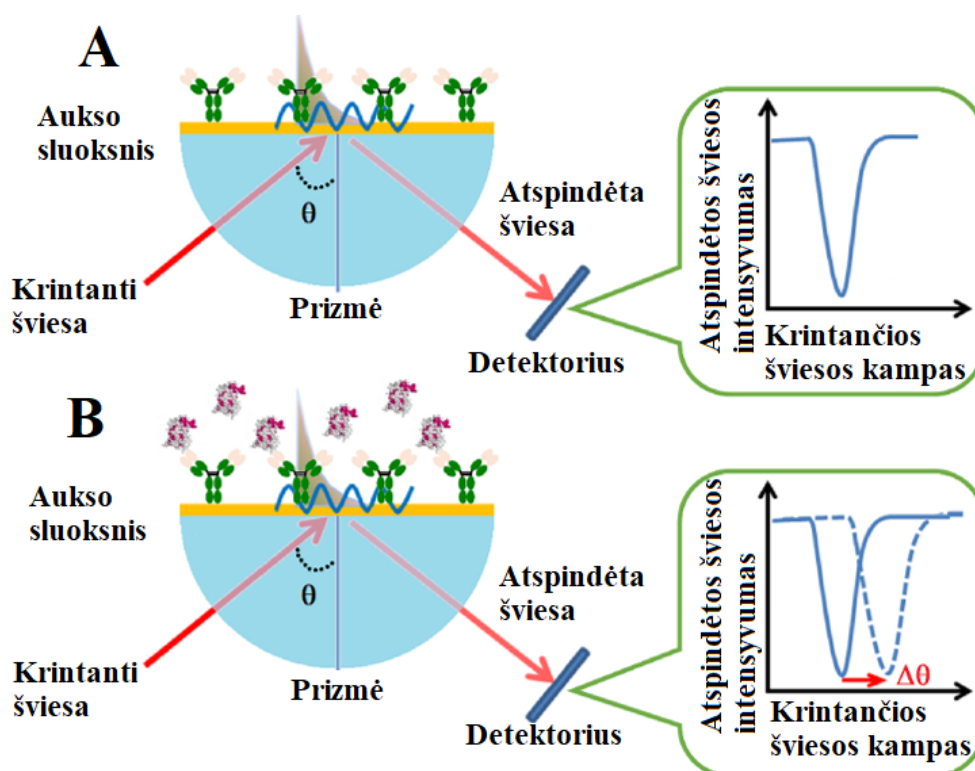
1.1. Paviršiaus plazmonų rezonansas

Paviršiaus plazmonų rezonansas (PPR; *angl. Surface Plasmon Resonance, SPR*) – tai kvantinis optinis-elektrinis reiškinys, pasireiškiantis dėl šviesos sąveikos su aukso ar kito metalo, pavyzdžiui, sidabro, vario, titano, chromo ar / ir kito, turinčio laisvųjų elektronų metalo, sluoksniu, kai yra tenkinamos visiškojo vidaus atspindžio (VVA) sąlygos. Taip pat šis reiškinys priklauso nuo lūžio rodiklio pokyčių prie PPR lusto paviršiaus (1 pav.). Dažnai yra naudojami PPR lustai, kurie yra sudaryti iš stiklo sluoksnio ir aukso sluoksnio bei substrato (tarpsluoksnio), esančio tarp stiklo ir aukso sluoksnių, šis substrato sluoksnis, paprastai, yra chromas. Aukso yra dažniausiai naudojamas PPR lustams gaminti, nes jis yra chemiškai inertiškas tirpalams ir naudojamoms medžiagoms tyrimuose [3–5].



1 pav. PPR lusto sandara [aut.]

Paviršiaus plazmonų rezonanso fenomenai sukelti dažniausiai naudojamos Kretschmann'o prizmės (2 pav.). Kai p-poliarizuota monochromatinė šviesa krenta per prizmę į PPR lustą, plonas metalo sluoksnis, esantis ant stiklo plokštelės, atspindi šviesą kaip veidrodis. Kai visa krintanti šviesa yra atspindima, tai vadinama visiškuoju vidaus atspindžiu (VVA). Keičiant šviesos kritimo kampą, kartu keičiasi ir atsispindėjusios šviesos intensyvumas, o esant tam tikram kritimo kampui, vadinamam rezonansiniu kampui, šviesos intensyvumas yra minimalus. Esant rezonanciniam kampui, krintančios p-poliarizuotos šviesos elektrinio lauko energijos pakanka ir dalis šios energijos yra perduodama laisviesiems tauriojo metalo sluoksnio elektronams. Taip šviesos bangų suteikta energija sužadina laisvuosius metalo elektronus ir sukelia jų kolektyvinius koherentinius virpesius, kurie egzistuoja aukso sluoksnio ir dielektriko sąsajoje. Toks kolektyvinis koherentinis osciliavimas yra vadinamas paviršiaus plazmonais (PP) arba dar kitaip įvardijamas kaip paviršiaus plazmoniniai polaritonai (PPP). Paviršiaus plazmonai sukuria tokį elektromagnetinį lauką, kuris vadinamas greitai nykstančia banga. Ši banga sklinda lygiagrečiai metalo ir dielektrinės sąsajos bei eksponentiškai sunyksta nuo tauriojo metalo sluoksnio į jį supančią dielektrinę terpę. Greitai nykstanti banga yra labai jautri lūžio rodiklio pokyčiams, ties 300 nm nuo metalo sluoksnio paviršiaus. Pasikeitus lūžio rodikliui, kartu pasikeičia ir greitai nykstančios bangos sklidimo konstanta, tai lemia rezonansinio kampo pasikeitimą. Didėjant lūžio rodikliui, rezonancinis kampas taip pat didėja ($\Delta\theta$) [3–5].



2 pav. PPR imuninio jutiklio veikimo principas [3]

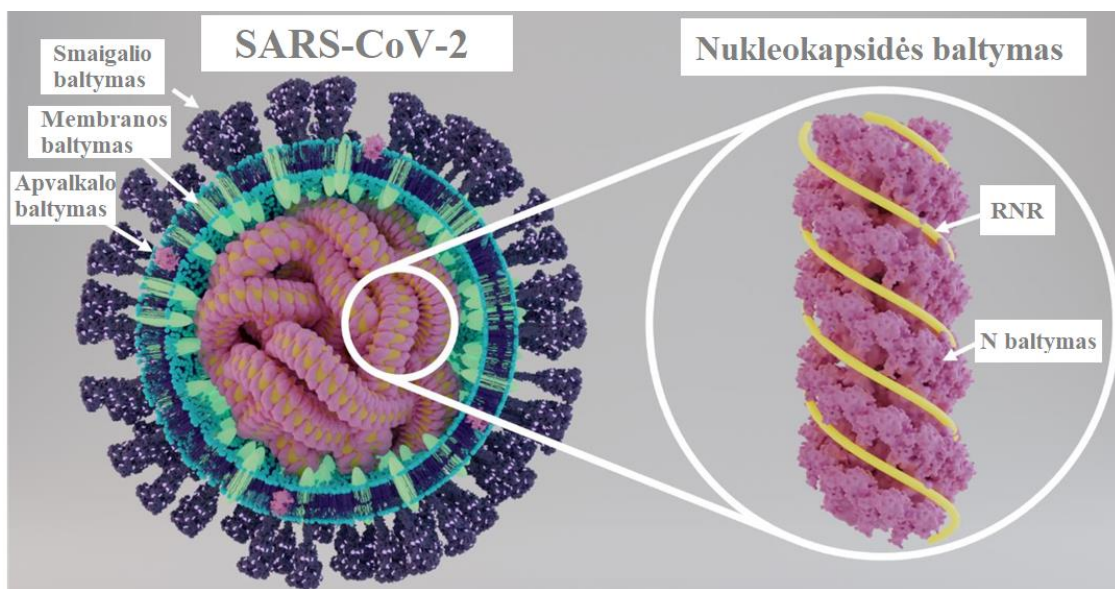
Imuniniai jutikliai, pagrįsti paviršiaus plazmonų rezonanso reiškiniu, yra plačiai naudojami visame pasaulyje. 1990-aisiais metais pirmą kartą buvo panaudotas PPR imuninis jutiklis ir nuo šio laiko sparčiai išaugo mokslinis susidomėjimas PPR imuninių jutiklių galimybėmis. Šis analizinis metodas tampa vienu iš perspektyviausių biologinių analizių kiekybinio nustatymo bei įvertinimo metodų [3]. Imuninių jutiklių pagalba galime tirti įvairias biologines sąveikas, tokias kaip antikūnų ir antigenų, baltymų ir vaistų, fermentų ir baltymų bei įvairias kitas sąveikas. Šis metodas suteikia galimybę sąveikas stebėti realiuoju laiku nenaudojant žymenų. Taip pat galime tirti sąveikų kinetiką, kuri suteikia informacijos apie asociacijos ir disociacijos konstantas, sąryšio stiprumą tarp analitės ir atpažinimo elemento. PPR imuniniai jutikliai suteikia daugkartinio panaudojimo galimybę, todėl tinka plačiai paplitusioms diagnostikos programoms ir leidžia atlikti daugybę analizių per sąlyginai trumpą laiką [3–6]. PPR jutikliai pasižymi dideliu jautrumu, leidžiančiu aptikti analitės iki femtomolines koncentracijas, atsižvelgiant į konkrečias tyrimo sąlygas ir atpažinimo elementų tarpusavio ryšius [4]. Dėl tokio didelio jautrumo, ypač tiriant didelės molekulinės masės biologines molekules, tokias kaip antikūnai, galime aptikti itin mažas koncentracijas santykinai mažame mėginio tūryje. Dėl gausos privalumų PPR imuniniai jutikliai vis dažniau naudojami anazinėje chemijoje, biomedicinoje ar analitinėje toksikologijoje. Taip pat nuolat tobulėjant jutiklių technologijoms ir jų kūrimui, PPR jutikliai duoda daug pažadų toliau plėsti supratimą apie biologines sistemas ir sudaryti sąlygas naujoms diagnostikos bei gydymo strategijoms kovojant su klastingomis ligomis [3–6].

1.2. SARS-CoV-2 viruso baltymų struktūra ir funkcijos

Sunkaus ūminio kvėpavimo takų sindromo koronavirusas 2 (*angl. Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*, SARS-CoV-2) sukėlė koronaviruso ligą (*angl. Coronavirus Disease 2019*, COVID-19), kuri pirmą kartą buvo nustatyta 2019 metų pabaigoje Kinijoje, Hubėjaus provincijoje ir

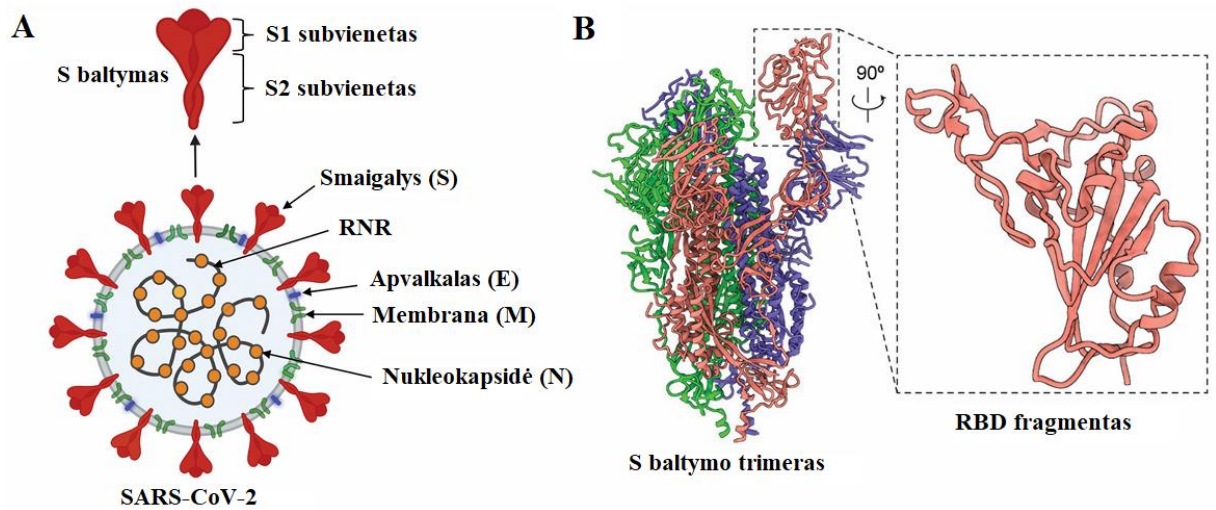
nuo tada išplito visame pasaulyje bei sukėlė pasaulinę pandemiją [1]. Šios ligos pagrindiniai klinikiniai požymiai yra karščiavimas, dusulys, kosulys, galvos skausmas ir nuovargis, galintis sukelti sunkią pneumoniją, plaučių uždegimą, ūminį kvėpavimo ir / ar daugelio organų nepakankamumą ir net mirtį [7]. 2025 metų kovo 30 d. Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) paskelbė, kad COVID-19 liga iš viso nusinešė daugiau nei 7 mln. žmonių gyvybių 231 šalyje. Nepaisant to, kad didžioji dauguma žmonių yra pasiskiepiję nuo šios klastingos ligos ir pandemija jau pamiršta, aukų skaičius vis dar auga [2].

SARS-CoV-2 virusas priklauso *Coronaviridae* šeimos *Betacoronavirus* genčiai *Nidovirales* būryje [7]. Šio viruso dalelė yra pleomorfinė, kurios skersmuo yra maždaug 60–100 nm ilgio. SARS-CoV-2 virusas turi maždaug 30 kilobazės dydžio teigiamai įkrautą vieną RNR grandinę, kuri yra paslėpta po baltyminiu apvalkalu [8]. Virusų genomai koduoja pagrindinius 4 struktūrinius baltymus: smaigalį (S), membraną (M), apvalkalą (E, *angl. Envelope*) ir nukleokapsidę (N) (3 pav.), taip pat 16 nestruktūrinių baltymų bei keletą papildomų baltymų. Nestruktūriniai baltymai sudaro replikacijos-transkripcijos kompleksus ir daugiausiai dalyvauja biologiniuose procesuose, tokiuose kaip viruso replikacija, baltymų informacijos apdorojimas, transkripcija ir baltymų skaidymas [7].



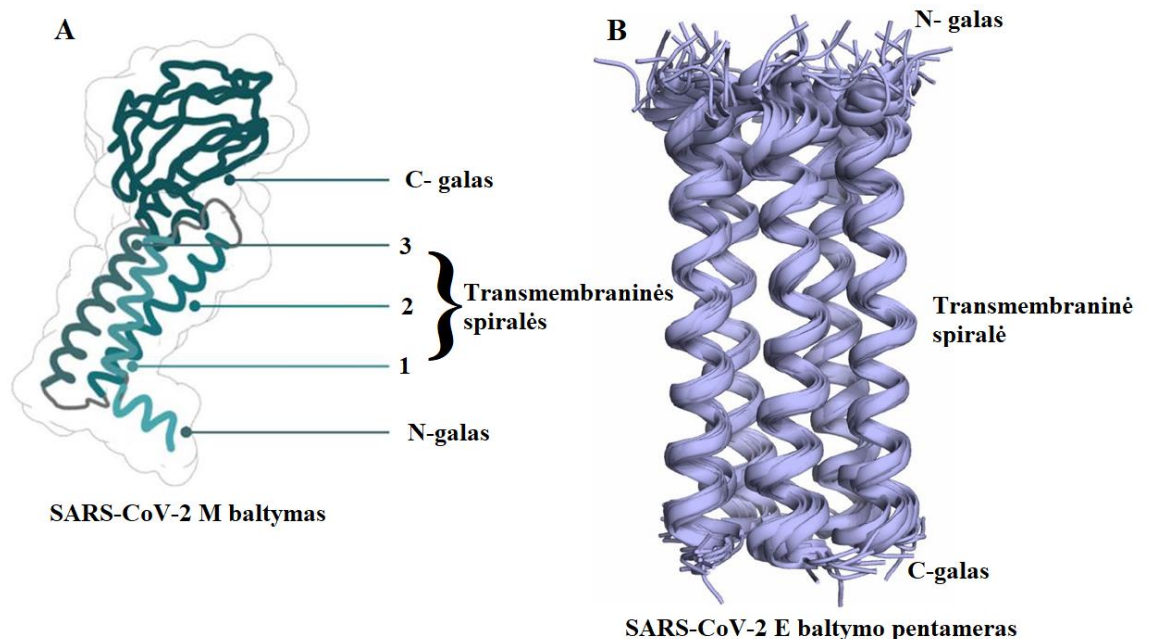
3 pav. SARS-CoV-2 viruso struktūra [9]

SARS-CoV-2 viruso smaigalio (S) baltymas yra transmembraninis glikoproteinas, turintis homotrimerinę struktūrą. Kiekvieno homotrimerio monomeras turi 1273 aminorūgštis ir yra sudarytas iš dviejų subvienetų (S1 ir S2) (4A pav.) [10, 11]. S1 subvienetas sudarytas iš N-galo domeno ir receptorių surišančio domeno (RBD, *angl. receptor binding domain*) (4B pav). Tuo tarpu, S2 subvienetą sudaro keturios struktūrinės dalys: sulietas peptidas, du heptadiniai pasikartojimo domenai ir transmembraninė sritis [10, 12]. S baltymo S1 subvienete esantis struktūrinis RBD fragmentas yra sudarytas iš 273 aminorūgščių ir atlieka esminį vaidmenį virusinėje infekcijoje ir patogenezėje [13]. S baltymas prisijungia prie šeimininko ląstelėje esančio angiotenziną konvertuojančio fragmento 2 (ACE2, *angl. angiotensin-converting enzyme 2*) per S1 subvienete esančią RBD dalį. Susidaręs RBD ir ACE2 kompleksas inicijuoja viruso patekimą į šeimininko ląsteles ir viruso RNR genomo atpalaidavimą [7, 14].



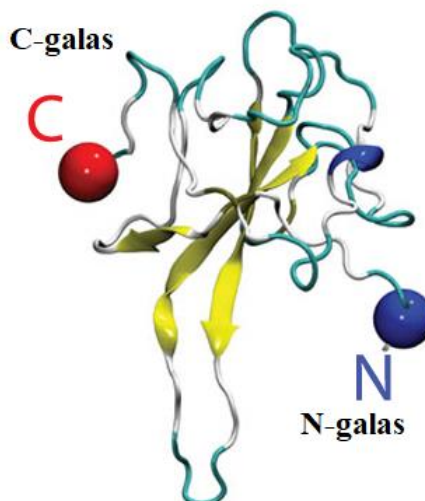
4 pav. SARS-CoV-2 viruso ir S baltymo sudedamosios dalys [10]

Ne ką mažiau svarbūs ir kiti koronaviruso baltymai. Pavyzdžiui, M baltymas, kuris yra sudarytas iš penkių pagrindinių domenų: trumpo N-galo domeno, trijų transmembraninių spiralių ir ilgo C-galo domeno (5A pav.). Visas membraninis M baltymas susideda iš 223 aminorūgščių ir yra labai imunogeniškas. M baltymas atlieka pagrindinį vaidmenį viruso morfogenezeje ir surinkime dėl sąveikos su viruso E, S ir N baltymais [15]. Tuo tarpu koronaviruso transmembraninis E baltymas yra mažas baltymas, bet svarbus viruso gamyboje ir brendime bei gyvavimo ciklo aspektuose, tokiuose kaip viruso surinkimas, apvalkalo formavimasis ir patogenezė. E baltymas gali susijungti į pentamerus ir sudaryti vioporinus, kurie sukuria katijonams selektyvų kanalą. Kiekvieno pentamero monomeras yra sudarytas iš 75 aminorūgščių ilgio transmembraninės spiralinės, kuri susideda iš trumpo N-galo fragmento ir ilgesnio C-galo segmento (5B pav.) [16, 17].



5 pav. SARS-CoV-2 viruso M ir E baltymų struktūros. **A.** M baltymo struktūra [15].
B. E baltymo struktūra [16]

SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymas yra labai imunogeniškas ir susideda iš 419 aminorūgščių [8]. N baltymą struktūriškai galima suskirstyti į penkis domenus: N-galo domeną, RNR surišantį domeną, serinu (Ser) ir argininu (Arg) praturtintą netvarkingą sujungimo (*angl. linker*) domeną, kuris palengvina molekulinis judesius sąveikos metu, taip pat dimerizacijos domeną ir C-galo domeną (6 pav.) [9,18]. N baltymas atsakingas už viruso RNR identifikavimą bei įvyniojimą į spiralinę struktūrą (3 pav.) ir atlieka daugiafunkcinį vaidmenį koronaviruso gyvavimo cikle. Jis prisijungia prie viruso genominės RNR ir sudaro ribonukleoproteino kompleksą. Be išvardytų funkcijų N baltymas atlieka ir kitus svarbius vaidmenis, tokius kaip informacinės RNR transkripcija ir replikacija bei imuninės sistemos reguliavimas virusinės infekcijos metu [8].



6 pav. SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymo struktūra [18]

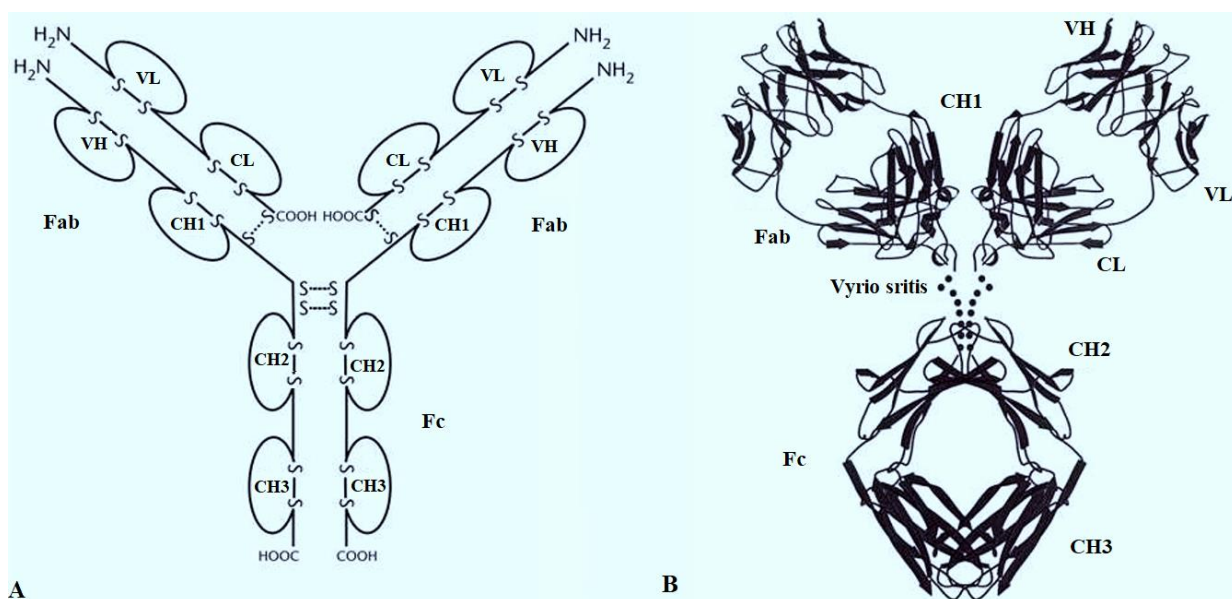
1.3. Antikūnai ir jų sąveika su antigenais

Antikūnai (Ak), taip pat dar vadinami imunoglobulinais, yra dideli „Y“ formos glikoproteinai, veikiantys kaip žmogaus organizmo sargybiniai nuo infekcinių patogenų, įskaitant bakterijas ir virusus [19]. Antikūnai gaminami kaip adaptyvaus humoralinio imuninio atsako į antigeną (Ag) dalis. Infekcijos ar imunizacijos metu T limfocitai stimuliuoja B ląsteles, kurios dalijasi ir bręsta, galiausiai virsdamos plazmine ląstele. Šios išskiria specifinį antigenui imunoglobuliną, kuris patenka į limfą, o vėliau ir į kraujotaką [20]. Antikūnai specifiškai sąveikaudami su antigenais slopina antigeno, būtino patogeno išgyvenimui, funkcijas ir apsaugo imuninę sistemą. Nors žmogaus organizme visi randami antikūnai yra polikloniniai, tai yra gaminami iš skirtingų ląstelių ir atpažįsta įvairius antigenus, terapinėje veikloje dažniausiai yra naudojami monokloniniai antikūnai. Monokloniniai antikūnai, tai tokie antikūnai, kurie yra gaunami iš identiškų tos pačios plazmos ląstelės kopijų, kurios yra specifinės vienam antigenui. Taip yra pasiekiamas tikslesnis poveikis pacientui [19].

Antigenas paprastai yra laikomas medžiaga, kuri inicijuoja imuninį atsaką. Tiksliau, antigenas apibrėžiamas kaip medžiaga, galinti prisijungti prie antigenui specifinio antikūno [20]. Ryškiausias antigeno ir antikūnų sąveikos bruožas yra didelis jų specifiškumas ir giminingumas. Surišimo stiprumas tarp antigeno determinanto antige (epitope) ir antigeno surišimo vietos antikūne (paratope) vadinamas giminingumu. Kiekvienas antikūno vienetas turi bent dvi antigeną surišančias vietas, todėl yra divalentis arba daugiavalentis savo antigenui. Antigeno ir antikūno sąveika vyksta susidarant daugialypiems nekovalentiniais ryšiams, tokiems kaip traukos ir stūmos jėgos, van der

Waals'o sąveika, vandeniliniai ryšiai, druskos tilteliai ir hidrofobinės jėgos [21]. Ak ir Ag sąveika vyksta raktų ir spynos principu, kur spynos vaidmenį atlieka antikūno paratopai, o raktas atlieka antigeno epitopo vaidmenį [20].

Nors kiekvienas antigenas turi sau specifiską antikūną, visi imunoglobulinai turi bendrą pagrindinę struktūrą (7 pav.) [19]. Imunoglobulinai yra sudaryti iš dviejų identiškų lengvųjų grandinių (LC, *angl. light chain*) ir dviejų identiškų sunkiųjų grandinių (HC, *angl. heavy chain*). Lengvoji ir sunkioji grandinės yra sujungtos disulfidiniais tilteliais. Lengvoji grandinė yra sudaryta iš dviejų domenų: pastoviojo domeno (CL, *angl. constant domain*) ir kintamojo domeno (VL, *angl. variable domain*). Sunkioji grandinė yra sudaryta iš keturių domenų: trijų pastoviųjų domenų (CH1, CH2 ir CH3) ir vieno kintamojo domeno (VH) [22]. Lengvoji grandinė asocijuojasi su VH ir CH1 domenais, sudarydama antigeną surišantį fragmentą (Fab, *angl. fragment antigen binding*) [23]. Šio fragmento VL ir VH domenuose yra trys sritys, vadinamos hiperkintamosiomis sritimis. Būtent per šias sritis vyksta antikūno ir antigeno sąveika. Kiekvieno antikūno hiperkintamos sritys specifiskos vienam antigenui ir atitinka kaip raktas spyną [21]. Be Fab dalies yra dar vienas segmentas, kuris vadinamas kristaliniu fragmentu (Fc, *angl. fragment crystallizable*). Šis kristalinis fragmentas yra sudarytas iš CH2 ir CH3 domenų [23]. Fc sritis yra atsakinga už antikūno suliejimą su ląstelėmis, dalyvaujančiomis imuniniame atsake [24]. Du Fab ir Fc fragmentus skiria disulfidiniai tilteliai, kurie vadinami vyrio sritimi [23]. Ši sritis leidžia Fab fragmentams turėti didelį konformacinį lankstumą, palyginti su Fc fragmentu [22].



7 pav. Imunoglobulino struktūra. A. Schematinis imunoglobulino vaizdas. B. Trimatis imunoglobulino vaizdas [21]

Žmogaus serume randami į penkias klases (izotopus) suskirstyti imunoglobulinai: imunoglobulinas G (IgG), IgM, IgA, IgE ir IgD. Serume IgG yra gausiausiai aptinkamas antikūnas, apimantis 75 % visų antikūnų, esančių apyvartoje, po to seka IgA, kurio yra 15 %, IgM yra 10 %, o IgD ir IgE yra mažiausiai. Visi šie antikūnai yra struktūriškai skirtingi ir turi atskiras efektorines funkcijas dėl individualių Fc receptorių [25]. Šie imunoglobulinai skiriasi sunkiosios grandinės pastovių sričių aminorūgščių sekomis. IgM turi sunkias grandines, vadinamas μ grandinėmis, IgD turi δ grandines, IgG turi γ grandines, IgE turi ϵ grandines, o IgA turi α grandines. Taip pat yra skiriami

du lengvosios grandinės tipai: κ ir λ grandinės [19]. IgA, IgD ir IgG ilgosios grandinės turi tris pastovius ir vieną kintamąjį domeną, o IgE ir IgM turi vieną kintamąjį ir keturis pastovius domeną [22]. IgA ir IgM izotopai turi papildomą J grandinę, kuri leidžia formuotis atitinkamai dimerams ir pentamerams, todėl jie yra daugiavalenčiai, o kiti izotipai yra dvivalenčiai, monomeriniai antikūnai [21, 22]. Imunoglobulinas G yra skirstomas į keturis poklasius ir numeruojamas pagal jų paplitimą serume: IgG1, IgG2, IgG3 ir IgG4 [25]. Nors aminorūgščių lygiu jie yra identiški 90 %, remiantis jų struktūriniais skirtumais, tokiais kaip aminorūgščių sekų variacija vyrių ir CH2 regionuose, šie Fc regionų skirtumai suteikia poklasiams įvairų efektorinę funkciją [19, 23].

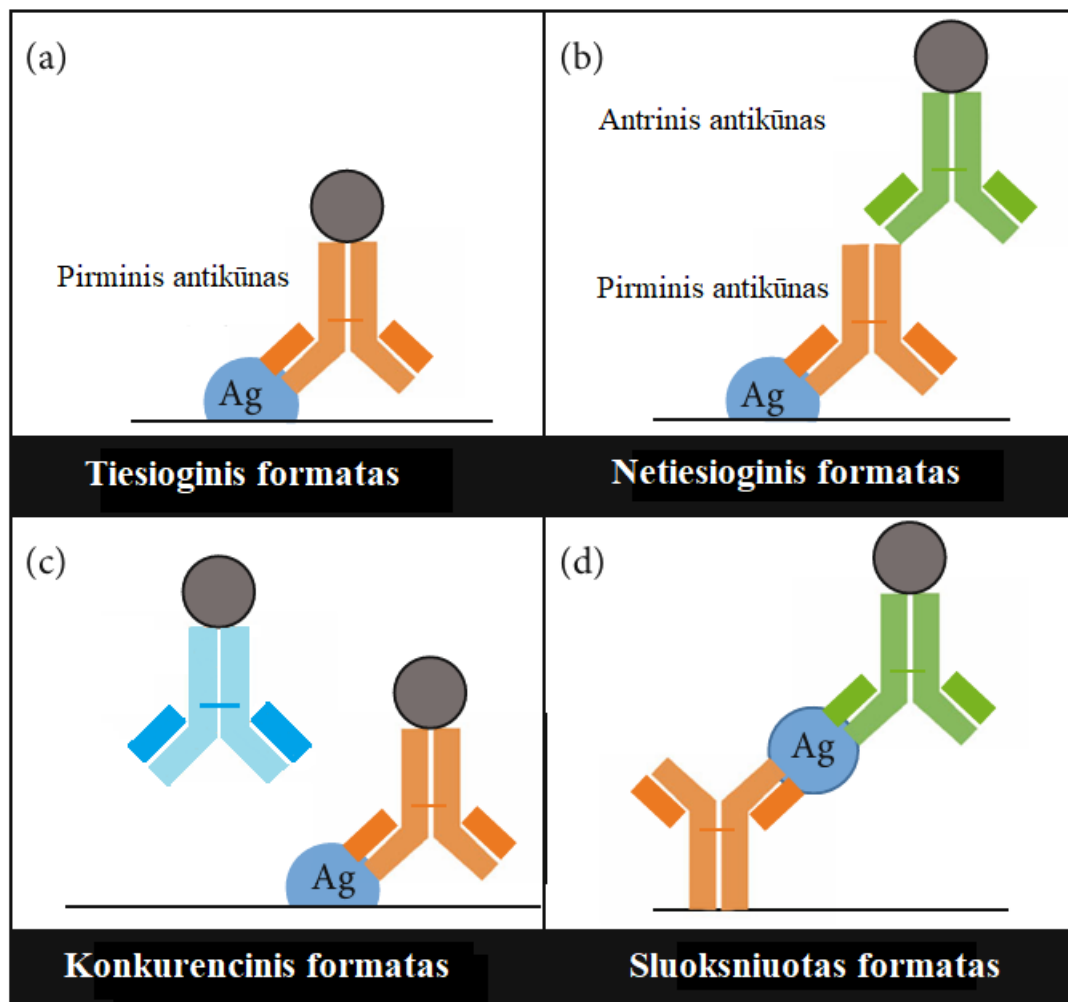
1.4. Imuniniai jutikliai

Biologiniai jutikliai yra analizinės priemonės, naudojamos aptikti specifines analites, tokias kaip vaistiniai preparatai, maistinės medžiagos, antigenai, antikūnai, DNR, ląstelės, fermentai, nukleorūgštys ir daug kitų. Skirtingos biologinės molekulės, tokios kaip nukleorūgštys, baltymai, angliavandeniai ir kt. gali būti taikomos kaip šių analizių biologinis atpažinimo elementas. Kiti pagrindiniai biologinių jutiklių elementai yra signalo keitiklis ir duomenų analizės bei vaizdinimo priemonės [26]. Imuniniai jutikliai yra atskira biologinių jutiklių klasė, pagrįsta antikūno ir antigeno specifinės giminingos sąveikos nustatymu [27, 28].

Pagal naudojamus signalo keitikius, imuniniai / biologiniai jutikliai gali būti klasifikuojami į elektrocheminius, pjezoelektrinius, šiluminius arba optinius [26]. Elektrocheminiuose imuniniuose / biologiniuose jutikliuose tikslinės analizės aptikimas ir prijungimas prie jos specifinės biologinės molekulės, paprastai, sukelia elektronų perdavimo greičio pasikeitimą tarp tinkamai funkcionalizuoto elektrodo paviršiaus ir elektrolito tirpalo [29]. Šių jutiklių privalumai yra didelis analizinis jautrumas ir specifiskumas, greitas tyrimo protokolas, paprasta ir nebrangi įranga ir analizei naudojamas mažas mėginio kiekis [3]. Pjezoelektriniuose imuniniuose / biologiniuose jutikliuose tikslinės analizės atpažinimas bei prijungimas, paprastai, sukelia masės pokytį prietaiso jutiklio paviršiuje. Šie jutikliai nėra taip plačiai naudojami kaip elektrocheminiai ar optiniai dėl tyrimo protokolo sudėtingumo. Šiluminiai jutikliai yra pagrįsti biocheminių reakcijų metu sugerta arba išsiskiriančia šilumos energija ir labai retai naudojami diagnostikos srityje [29]. Optiniai jutikliai, tokie kaip PPR principu paremti imuniniai jutikliai pasižymi dideliu jautrumu, specifiskumu, greita analize, kuriai reikalingi maži mėginio tūriai, taip pat šie jutikliai suteikia galimybę analizę atlikti realiu laiku ir be žymenų. Nors PPR imuniniai / biologiniai jutikliai yra gana brangi analizės priemonė, tačiau šie jutikliai yra bene plačiausiai ištirti ir yra sulaukę didelio mokslininkų susidomėjimo [3].

PPR imuninių jutiklių yra įvairių rūšių: tiesioginiai, netiesioginiai, konkurenciniai bei sluoksniuoti (dviepitopiniai) (8 pav.). 8 pav. (a) dalyje pavaizduotas PPR imuninio jutiklio tiesioginio formato pavyzdys. Jame vaizduojama, kaip auksiniame lusto paviršiuje yra kovalentiškai imobilizuotas antigenas, kurio epitopai tiesiogiai specifiskai sąveikauja su antikūno paratopais [30]. 8 pav. (b) dalyje vaizduojamas netiesioginis sąveikos formatas. Viskas atrodo labai panašu lyginant su (a) dalimi, tačiau šiame imuninio jutiklio formate dalyvauja ne tik pirminiai, bet ir antriniai antikūnai. Pirminiai antikūnai specifiskai sąveikauja su antigenu, imobilizuotu aukso paviršiuje, o antrinių antikūnų paratopai sąveikauja su pirminiais antikūnais. Naudojant antrinius antikūnus yra padidinamas sistemos jautrumas analizei dėl lusto paviršiuje esančios didesnės masės [31]. 8 pav. (c) dalyje vaizduojamas konkurencinis PPR imuninio jutiklio formato pavyzdys. Čia vaizduojami skirtingi antikūnai, bet specifiski tam pačiam antigeno epitopui, t. y. turintys vienodus paratopus, konkuruoja dėl galimos specifinės sąveikos su antigeno epitopais. Tad kuo mažiau prie antigeno prisijungs vienokios rūšies antikūnų, tuo daugiau prisijungs kitokios, ir atvirkščiai [32]. 8 pav. (d)

dalyje vaizduojamas sluoksniuotas imuninio jutiklio formatas. Čia auksiniame lusto paviršiuje yra imobilizuoti antikūnai, kurių paskirtis – „sugauti“ baltymą (antigeną). Šis formatas yra dviepitopinis. Baltymas turi skirtingus epitopus, kur vieni jų sąveikauja su imobilizuotų antikūnų paratopais paviršiuje. Kiti baltymo epitopai sąveikauja su kitų antikūnų paratopais, kurie skirti atpažinti, aptikti analitę (antigeną) [27].



8 pav. Įvairių PPR imuninių jutiklių formatų schemas pavyzdžiai. (a) Tiesioginis formatas; (b) Netiesioginis formatas; (c) Konkurencinis formatas; (d) Sluoksniuotas formatas [30]

Vienas iš PPR imuninių jutiklių taikymo pavyzdžių yra 2022 metais parašytas mokslininkų iš Kinijos straipsnis, kuriame atsispindėjo jų atlikti tyrimai. Jie sukūrė sluoksniuoto formato imuninį jutiklį, skirtą specifiniam SARS-CoV-2 viruso S1 baltymui aptikti. Jutiklį sudarė Ti_3C_2 Maksenų nanosluoksnių modifikuotas lusto paviršius ir polidopamido bei sidabro nanodalelių su specifiniais antikūnais prieš S1 baltymą nanokonjugatai, skirti signalo stiprinimui. Jutiklis pasižymėjo plačiu tiesiniu intervalu nuo $0,0001$ iki 1000 ng mL^{-1} konjugato tirpalo koncentracijos ir žema aptikimo riba, kuri buvo 12 fg mL^{-1} konjugato tirpalo koncentracijos. Analizuojant dirbtinių seilių ir žmogaus serumo mėginius, sukonstruotas imuninis jutiklis pasižymėjo geru atkuriamumu ir dideliu specifiškumu. Tai rodo, kad šis imuninis jutiklis gali būti naudojamas kūno skysčių analizėje [33].

Kitas pavyzdys: 2023 metais Kinijos mokslininkų grupė sukūrė PPR imuninį jutiklį ir pritaikė dvigubą signalo stiprinimo strategiją, tam panaudodami aukso nanodaleles ir grafeno oksidą. Tyrimo

tikslas buvo jautriai ir efektyviai aptikti N baltymą. Šio sukonstruoto sluoksniuoto imuninio jutiklio aptikimo riba buvo $0,083 \text{ ng mL}^{-1}$, o tiesiškumo intervalas buvo nuo 1 iki 1000 ng mL^{-1} [34].

Trečias pavyzdys: 2024 metais Lietuvos mokslininkų grupė išleido straipsnį, kuriame aprašė savo atliktus tyrimus apie tiesioginio imuninio jutiklio formato pritaikymą. Šie mokslininkai suformavo PPR imuninį jutiklį monokloninių anti-SCoV2-rN antikūnų nustatymui. Ant PPR auksinio lusto paviršiaus buvo imobilizuotas nukleokapsidės baltymas (SCoV2-rN) ir tirta sąveika su specifiniais antikūnais prieš SCoV2-rN baltymą. Sukurto imuninio jutiklio tiesinė priklausomybė buvo nuo $0,5$ iki 50 nmol L^{-1} koncentracijos anti-SCoV2-rN antikūno tirpalo. Aptikimo riba buvo $0,057 \text{ nmol L}^{-1}$, o nustatymo riba buvo $0,19 \text{ nmol L}^{-1}$. Sukonstruotas PPR imuninis jutiklis pasižymėjo geru atkuriamumu bei specifiskumu, taip pat šis jutiklis tinka daugkartiniam anti-SCoV2-rN antikūnų aptikimui [35].

Dar vienas pavyzdys: 2025 metais Lietuvos mokslininkai išleido straipsnį apie PPR imuninio jutiklio kūrimą ir tyrimą. Šiame darbe jie sukonstravo imuninį jutiklį, kuris buvo skirtas jautriam antikūnų prieš SARS-CoV-2 RBD domeną (anti-RBD) kiekybiniam įvertinimui. Anti-RBD kiekybiniam įvertinimui buvo naudojami tiek tiesioginis, tiek netiesioginis sluoksniuotas aptikimo formatai. Netiesioginiam sluoksniuotam formatui buvo pritaikyta analizinio signalo stiprinimo strategija, tam naudojant antikūnų ir aukso nanodalelių konjugatus. Imuninis jutiklis galėjo kiekybiškai nustatyti anti-RBD antikūnų tirpalo koncentracijas nuo $0,27$ iki $66,67 \text{ nmol L}^{-1}$ tiesioginio formato atveju ir $0,043$ – $10,66 \text{ nmol L}^{-1}$ netiesioginio sluoksniuoto formato atveju. Imuninio jutiklio netiesioginio sluoksniuoto formato atveju aptikimo ir nustatymo ribos atitinkamai buvo $11,58$ ir $11,64$ karto mažesnės nei tiesioginio formato atveju. Šis jutiklis pasižymėjo geru pakartojamumu, atkuriamumu ir veikimo stabilumu. Taip pat atlikus anti-RBD kiekybinio nustatymo tyrimus serumo mėginiuose, šis sukonstruotas PPR imuninis jutiklis patvirtino tinkamumą realių mėginių analizėje [36].

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Medžiagos ir reagentai

SARS-CoV-2 smaigalio baltymo RBD domenas (SARS-CoV2-RBD) (Baltymas, Lietuva)
Specifiniai pelės monokloniniai antikūnai prieš SARS-CoV2-RBD baltymą (m-anti-RBD) (Baltymas, Lietuva)
Specifiniai triušio polikloniniai antikūnai prieš SARS-CoV2-RBD baltymą (p-anti-RBD) (Thermo Fisher Scientific, JAV)
Specifiniai ožkos antriniai polikloniniai antikūnai prieš p-anti-RBD antikūnus (anti-IgG) (Thermo Fisher Scientific, JAV)
Druskos rūgštis (HCl) (Carl Roth, Vokietija)
Glicinas ($C_2H_5NO_2$) (Sigma-Aldrich, Vokietija)
Natrio dodecilsulfatas (SDS) ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) (Carl Roth, Vokietija)
Natrio hidroksidas (NaOH) (Carl Roth, Vokietija)
Natrio acetato trihidratas ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) (Carl Roth, Vokietija)
Acto rūgštis (CH_3COOH) (Carl Roth, Vokietija)
Etanolis (C_2H_5OH) (Honeywell, Vokietija)
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC) ($C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$) (Carl Roth, Vokietija)
N-hidroksisukcimidas (NHS) ($C_4H_5NO_3$) (Carl Roth, Vokietija)
Etanolaminas (C_2H_7NO) (Sigma-Aldrich, Vokietija)
11-merkaptoundekano rūgštis (11-MUR) ($HS(CH_2)_{10}CO_2H$) (Sigma-Aldrich, Vokietija)
Vandenilio peroksidas (H_2O_2) (Carl Roth, Vokietija)
Sieros rūgštis (H_2SO_4) (Carl Roth, Vokietija)
Fosfatinio buferio (PBS) pH 7,4 tabletės (Carl Roth, Vokietija)
Azoto dujos (N_2) (Elme Messer Gaas, Lietuva)
Konjugacijos rinkinys (Cytodiagnostics, Kanada):

- Liofilizuotos 50 nm skersmens aukso nanodalelės, aktyvuotos NHS (AuND);
- Reakcijos buferinis tirpalas;
- Reakcijos sustabdymo tirpalas;
- Baltymų praskiedimo buferinis tirpalas;
- Konjugacijos kokybės kontrolės testai;
- Praskiedimo buferinis tirpalas.

Jaučio serumo albuminas (BSA) (Carl Roth, Vokietija)
Tris-(hidroksimetil)-aminometano hidrochloridas (TRIS) ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$) (Carl Roth, Vokietija)
Natrio chloridas (NaCl) (Sigma-Aldrich, Vokietija)
Krienų peroksidazės fermentas (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Vokietija)
Viršelių serumas (FBS) (Thermo Fisher Scientific, JAV)

2.2. Prietaisai ir priemonės

PPR prietaisas (Autolab ESPRIT, Olandija)
pH matuoklis (XS instrument, Italija)

Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, JAV)
Svarstyklės (Radwag, Lenkija)
Keičiamo tūrio mechaninės pipetės (Eppendorf, Vokietija)
Kaitinamoji plytelė (Phoenix instrument, Vokietija)
Magnetinė maišyklė (Phoenix instrument, Vokietija)
Popierinis filtras (Macherey-Nagel, Vokietija)

2.3. Tirpalų gamyba

„Pirranijos“ tirpalas:

Koncentruotos sieros rūgšties reagentas pilamas į koncentruotą vandens peroksida, kur medžiagų santykis atitinkamai yra 3:1.

1 mmol L⁻¹ 11-MUR (etanolyje) tirpalas:

Pasveriamas reikiamas kiekis 11-MUR reagento. Medžiaga ištirpinama etanolyje.

0,4 mol L⁻¹ EDC tirpalas:

Pasveriamas reikiamas kiekis EDC reagento. Medžiaga tirpinama distiliuotame vandenyje.

0,1 mol L⁻¹ NHS tirpalas:

Pasveriamas reikiamas kiekis NHS reagento. Medžiaga tirpinama distiliuotame vandenyje.

1 mol L⁻¹ etanolamino pH 8,5 tirpalas:

Paimamas reikiamo tūrio etanolamino reagentas ir skiedžiamas iki reikiamo kiekio su distiliuotu vandeniu. Maišant gautą tirpalą yra privedamas pH iki 8,5, tam naudojant druskos rūgštį.

25 mmol L⁻¹ NaOH + 0,5 % SDS regeneracinis tirpalas:

Pasveriami reikiami kiekiai NaOH ir SDS reagentų. Šios medžiagos tirpinamos distiliuotame vandenyje.

10 mmol L⁻¹ natrio acetato buferis pH 5,24:

Pasveriamas natrio acetato trihidratas. Ši medžiaga ištirpinama ir skiedžiama distiliuotame vandenyje iki reikiamo tūrio. Maišant tirpalą yra privedamas pH iki 5,24, tam naudojant acto rūgštį.

10 mmol L⁻¹ glicino regeneracinis tirpalas pH 2,0:

Pasveriamas reikiamas kiekis glicino. Medžiaga tirpinama ir skiedžiama distiliuotame vandenyje iki reikiamo tūrio. Maišant gautą tirpalą yra privedamas pH iki 2,0, tam naudojant druskos rūgštį.

10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 buferis:

Paimama viena PBS tabletė ir ištirpinama 500 L tūrio distiliuotame vandenyje, kaip yra nurodyta gamintojo rekomendacijose. Gautas tirpalas yra filtruojamas, naudojant popierinį filtrą.

20 mmol L⁻¹ TRIS + 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 8,0 buferis:

Pasveriami reikiami kiekiai TRIS ir NaCl reagentų. Medžiagos ištirpinamos ir skiedžiamos distiliuotame vandenyje iki reikiamo tūrio. Privedamas gauto tirpalo pH iki 8,0.

10 % BSA tirpalas:

Pasveriamas reikiamas BSA kiekis ir ištirpinamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpale.

10 kartų skiestas FBS serumas:

Veršelių serumo 5 mL tūrio mėginys išimamas iš šaldiklio ir atšildomas iki kambario temperatūros. Atšildytas mėginys filtruojamas. Gautas filtratas skiedžiamas 10 kartų su 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalu.

2.4. Lusto paruošimas

Pirmiausia, auksinis lustas yra plaunamas „Piranijos“ tirpale, šildant 60 °C temperatūroje 5 min., kad nuo paviršiaus būtų pašalinti nešvarumai ir galimos organinės medžiagos. Ištraukus lustą iš „Piranijos“ tirpalo, šis yra kruopščiai nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir įmerkiamas į etanolį. Lustas etanolyje išlaikomas 3 min, o praėjus laikui vėl plaunamas distiliuotu vandeniu. Nuplautas lustas yra džiovinamas azoto dujomis. Išdžiovintas lustas yra panardinamas, aukso sluoksniu į viršų, į 4 mL tūrio 1 mmol L⁻¹ 11-MUR paruoštą tirpalą 24 val. inkubacijai kambario temperatūroje, kad susidarytų savitvarkis monosluoksnis. Praėjus inkubacijos laikotarpiui, lustas yra plaunamas distiliuotu vandeniu ir pamerkiamas į etanolį 3 min. Tada lustas vėl plaunamas distiliuotu vandeniu ir, galiausiai, yra nudžiovinamas su azoto dujomis.

2.5. Lusto paviršiaus stabilizavimas

Lusto paviršiaus stabilizavimas yra reikalingas tam, kad nuo paviršiaus pasišalintų visi galimi nešvarumai, susidrėkintų paviršius, ir nusistovėtų matavimų aplinkos temperatūra iki kambario. Lusto paviršiaus stabilizavimas atliekamas dviem atvejais:

1. Prieš SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimą. Lusto paviršiui stabilizuoti yra naudojami 10 mmol L⁻¹ natrio acetato pH 5,24 buferinis ir 25 mmol L⁻¹ NaOH + 0,5 % SDS regeneracinis tirpalai. Automatizuotos programos pagalba, po vieną iš tirpalų, pakaitomis paimamas reikiamas tirpalo tūris ir įpilamas į kiuvetę ant lusto paviršiaus ir maišomas 120 s. Praėjus 30 min. programa yra sustabdoma.

2. Po SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimo. Šiuo atveju, lusto paviršiaus stabilizavimui yra naudojami kiti paruošti tirpalai: 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 buferinis ir 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalai. Naudojant automatinę programą, po vieną iš tirpalų, pakaitomis paimamas reikiamas tirpalo tūris ir įleidžiamas į kiuvetę ant lusto paviršiaus bei maišomas 120 s. Praėjus 15 min. programa yra sustabdoma.

2.6. SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimas

SARS-CoV2-RBD baltymo kovalentinis imobilizavimas vykdomas stadijomis ir yra imobilizuojamas abiejuose kiuvetės kanaluose vienodomis sąlygomis. Pirmoje stadijoje vykdomas 200 s trunkantis paviršiaus stabilizavimas, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ natrio acetato pH 5,24 buferinis tirpalas. Antroje stadijoje vykdomas 11-MUR karboksilinių grupių aktyvavimas, tam naudojami 0,4 mol L⁻¹ EDC ir 0,1 mol L⁻¹ NHS tirpalai, aktyvacijos trukmė – 600 s. Trečios stadijos metu vykdomas trumpas praplovimas, kurio metu nuo suformuoto savitvarkio monosluoksnio paviršiaus yra nuplaunamas EDC/NHS perteklius. Ketvirtos stadijos metu, 1800 s vykdomas

SARS-CoV2-RBD baltymo kovalentinis imobilizavimas, tam į abu kiuvetės kanalus užnešamas $1,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracijos baltymo tirpalas sumaišytas su 10 mmol L^{-1} natrio acetato pH 5,24 buferiniu tirpalu. Penktoje stadijoje yra nuplaunamos neprisijungusios baltymo molekulės, tam naudojamas 10 mmol L^{-1} natrio acetato pH 5,24 buferinis tirpalas. Šeštoje stadijoje vykdoma 600 s trunkanti deaktyvacija, kurios metu į abu kiuvetės kanalus yra įpilamas 1 mol L^{-1} koncentracijos etanolamino pH 8,5 tirpalas. Etanolamino tirpalas užblokuoja (deaktyvuoja) laisvas aktyvias karboksilines grupes, esančias savitvarkio monosluoksniu paviršiuje. Septintos stadijos metu yra nuplaunamas neprisijungęs etanolaminas, tam naudojamas 10 mmol L^{-1} natrio acetato pH 5,24 buferinis tirpalas. Aštuntoje stadijoje vykdomas nekovalentiškai prisijungusio baltymo nuplovimas, tam naudojamas 25 mmol L^{-1} NaOH + 0,5 % SDS regeneracinis tirpalas. Devintos stadijos metu yra nuplaunamas regeneracinis tirpalas ir stabilizuojamas paviršius, tam naudojamas 10 mmol L^{-1} natrio acetato pH 5,24 buferinis tirpalas.

2.7. SARS-CoV2-RBD baltymo sąveika su specifiniais p-anti-RBD antikūnais prieš SARS-CoV2-RBD baltymą

Baltymo sąveika su p-anti-RBD antikūnais yra vykdoma stadijomis. Pirmos stadijos metu, 200 s yra vykdomas paviršiaus (lusto paviršiuje suformuoto 11-MUR savitvarkio monosluoksniu ir jo paviršiuje kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo) stabilizavimas, tam naudojamas 10 mmol L^{-1} PBS pH 7,4 tirpalas. Antroje stadijoje, 900 s vykdoma SARS-CoV2-RBD sąveika su specifiniais antikūnais prieš SARS-CoV2-RBD baltymą, tam į pirmąjį kanalą yra įleidžiamas reikiamos koncentracijos p-anti-RBD antikūnų tirpalas, o į antrąjį kanalą yra įpilamas 10 mmol L^{-1} PBS pH 7,4 tirpalas. Antras kanalas yra naudojamas kaip palyginamasis. Trečios stadijos metu, 200 s vykdoma disociacija, kurios metu nuo paviršiaus yra nuplaunamos neprisijungusios antikūnų molekulės, tam naudojamas 10 mmol L^{-1} PBS pH 7,4 tirpalas. Ketvirtoje stadijoje, 300 s vykdoma regeneracija, kurios metu suardoma baltymo ir antikūno nekovalentinė sąveika, tam naudojamas 10 mmol L^{-1} glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas. Toliau vykdomas regeneracinio tirpalo nuplovimas ir paviršiaus stabilizavimas.

2.8. p-anti-RBD ir m-anti-RBD antikūnų konkurencinė sąveika su SARS-CoV2-RBD baltymu

Pirmiausia vykdoma p-anti-RBD antikūnų (analitės) tiesioginė specifinė sąveika su SARS-CoV2-RBD baltymu, kaip aprašyta 2.7 skyrelyje. Tačiau, automatinė programa nutraukiama pasibaigus trečiai stadijai, jog nebūtų suardyta baltymo ir p-anti-RBD antikūno nekovalentinė sąveika. Toliau paleidžiama automatinė programa m-anti-RBD antikūnų konkurencinei sąveikai su SARS-CoV2-RBD baltymu atlikti. Jai prasidėjus, 200 s vykdomas paviršiaus (lusto paviršiuje suformuoto 11-MUR savitvarkio monosluoksniu ir jo paviršiuje kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo bei prie baltymo prisijungusių p-anti-RBD antikūnų) stabilizavimas, tam naudojamas 10 mmol L^{-1} PBS pH 7,4 tirpalas. Toliau, 900 s vykdoma SARS-CoV2-RBD konkurencinė sąveika su specifiniais m-anti-RBD antikūnais prieš SARS-CoV2-RBD baltymą, tam į pirmąjį kanalą įleidžiamas norimos koncentracijos m-anti-RBD antikūnų tirpalas, o į antrąjį kanalą yra įleidžiamas 10 mmol L^{-1} PBS pH 7,4 tirpalas. Antrasis kanalas naudojamas kaip palyginamasis. Kuo daugiau prie baltymo yra prisijungusių p-anti-RBD antikūnų, tuo mažiau prie baltymo gali prisijungti m-anti-RBD antikūnų, ir atvirkščiai. Toliau 200 s vykdoma disociacijos stadija, kurios metu nuo paviršiaus yra nuplaunamos neprisijungusios m-anti-RBD antikūnų molekulės, tam

naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Ketvirtos stadijos metu, 300 s vykdoma regeneracija, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas. Regeneracijos metu yra suardomos nekovalentinės baltymo ir p-anti-RBD antikūnų bei nekovalentinės baltymo ir m-anti-RBD antikūnų sąveikos. Toliau vykdomas regeneracinio tirpalo nuplovimas ir paviršiaus stabilizavimas.

2.9. SARS-CoV2-RBD baltymo nespecifinės sąveikos patikra

Norėdami dirbti su antriniais anti-IgG antikūnais prieš p-anti-RBD antikūnus ir dirbti su HRP fermentu, pirmiausia turėjome įsitikinti, kad tarp SARS-CoV2-RBD baltymo ir šių komponentų nėra nespecifinės sąveikos. Tuo tikslu, pirmos stadijos metu, 200 s buvo vykdomas paviršiaus (lusto paviršiuje suformuoto 11-MUR savitvarkio monosluoksnio ir prie jo kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo) stabilizavimas, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antros stadijos metu, 900 s buvo vykdoma:

a) baltymo ir antrinių anti-IgG antikūnų nespecifinė sąveika, tam į pirmą kanalą įleidžiamas reikiamos koncentracijos anti-IgG antikūnų tirpalas, o į antrą įleidžiamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antras kanalas naudojamas kaip palyginamasis.

b) baltymo ir HRP fermento nespecifinė sąveika, tam į pirmą kanalą įleidžiamas reikiamos koncentracijos HRP fermento tirpalas, o į antrą įleidžiamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antras kanalas naudojamas kaip palyginamasis.

Toliau, trečioje stadijoje vykdoma 200 s disociacija, kurios metu nuo paviršiaus yra nuplaunamos a) anti-IgG antikūno arba b) HRP fermento molekulės, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Ketvirtoje stadijoje yra vykdoma 300 s regeneracija, kurios metu yra suardoma SARS-CoV2-RBD baltymo nespecifinė sąveika su a) anti-IgG antikūnu arba b) HRP fermento molekulėmis. Regeneracijai atlikti buvo naudojamas 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas. Toliau vykdomas regeneracinio tirpalo nuplovimas ir paviršiaus stabilizavimas.

2.10. p-anti-RBD antikūnų sąveika su specifiniais antriniais anti-IgG antikūnais prieš p-anti-RBD antikūnus

Pirmiausia vykdoma p-anti-RBD antikūnų (analitės) tiesioginė specifinė sąveika su SARS-CoV2-RBD baltymu, kaip aprašyta 2.7 skyrelyje. Tačiau automatinė programa nutraukiama pasibaigus trečiai stadijai, kad nebūtų suardyta baltymo ir p-anti-RBD antikūnų nekovalentinė sąveika. Toliau paleidžiama automatinė programa anti-IgG antikūnų specifinei sąveikai su p-anti-RBD antikūnais atlikti. Jai prasidėjus, 200 s vykdomas paviršiaus (lusto paviršiuje suformuoto 11-MUR savitvarkio monosluoksnio ir jo paviršiuje kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo bei prie baltymo prisijungusių p-anti-RBD antikūnų) stabilizavimas, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antroje stadijoje, 900 s vykdoma analitės ir antrinių anti-IgG antikūnų, specifinių p-anti-RBD antikūnams sąveika, tam į pirmą kanalą yra įleidžiamas reikiamos koncentracijos antrinių antikūnų tirpalas, o į antrąjį yra įpilamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antrasis kanalas yra naudojamas kaip palyginamasis. Trečioje stadijoje 200 s yra vykdoma disociacija, kurios metu nuplaunamos neprisijungusios antrinių antikūnų molekulės, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Ketvirtoje stadijoje 300 s vykdoma regeneracija, kurios metu suardomos nekovalentinės sąveikos, ant lusto paviršiaus paliekant tik prie 11-MUR savitvarkio monosluoksnio kovalentiškai prisijungusį SARS-CoV2-RBD baltymą. Regeneracijos metu

naudojamas 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas. Toliau vykdomas regeneracinio tirpalo nuplovimas ir paviršiaus stabilizavimas.

2.11. Aukso nanodalelių konjugavimas anti-IgG antikūnais ir HRP fermentu

Prieš pradedant 50 nm dydžio aukso nanodalelių konjugavimą buvo reikalingas pasiruošimas darbui. Tuo tikslu iš šaldytuvo išimami reagentai ir leidžiama jiems sušilti iki kambario temperatūros. Toliau buvo paruošiami 0,5 mg mL⁻¹ koncentracijos anti-IgG antikūnų ir 0,2 mg mL⁻¹ koncentracijos HRP fermento tirpalai, kurie buvo maišomi su baltymų praskiedimo buferiniu tirpalu. 40 µL 0,5 mg mL⁻¹ koncentracijos anti-IgG antikūnų tirpalas buvo sumaišytas su 20 µL 0,2 mg mL⁻¹ koncentracijos HRP fermento tirpalu. Paimamas 48 µL gautas baltymų tirpalas ir sumaišomas su 60 µL tūrio reakcijos buferiniu tirpalu. 90 µL šio gauto tirpalo buvo užpilama ant buteliuke esančių liofilizuotų ir NHS aktyvuotų 50 nm dydžio aukso nanodalelių (AuND) ir gerai išmaišoma pipete. Buteliukas su tirpalu 2 val. paliekamas inkubacijai su maišymu. Praėjus šiam laikui, į buteliuką buvo įpilama 10 µL reakciją sustabdančio tirpalo ir 5 min šis tirpalas buvo inkubuojamas, kad konjugacija būtų galutinai sustabdyta. Praėjus šiai trukmei, į buteliuką buvo įpilamas 10 % BSA tirpalas ir paliekamas inkubacijai 5 min., kad būtų užblokuotos NHS aktyvios AuND paviršiaus vietos. Po inkubacijos laikotarpio, 1100 rpm greičiu, 30 min buvo centrifuguojami AuND, IgG antikūnų ir HRP fermento (AuND-anti-IgG-HRP) konjugatai. Supernatantas, kuriame yra neprisijungusių baltymų, išpilamas. Ant surinkto konjugato užpilamas 1 mL 20 mmol L⁻¹ TRIS + 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 8,0 buferis ir pakartojamas 30 min trukmės centrifugavimas. Pašalinamas supernatantas. Galiausiai, ant surinkto AuND-anti-IgG-HRP konjugato užpilamas 100 µL 20 mmol L⁻¹ TRIS + 150 mmol L⁻¹ NaCl pH 8,0 buferis. Pagamintiems AuND-anti-IgG-HRP konjugatams atliekamas konjugacijos kokybės kontrolės testas, įsitikinti ar konjugacijos reakcija buvo sėkminga. Tam į 96 šulinėlių plokštelę buvo įpilamas 75 µL praskiedimo buferinis tirpalas, o į jį 5 µL 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalu skiestas AuND-anti-IgG-HRP konjugatų tirpalas. Supilti tirpalai gerai išmaišomi. Į šulinėlį su paruoštu tirpalu buvo įmerkiama konjugacijos kokybės kontrolės testo juostelė ir inkubuojama 10 min. Atsiradusi aiškiai matomos raudonos testo linijos, būdingos konjuguotai antikūnų rūšiai, vieta rodo sėkmingą konjugaciją.

2.12. p-anti-RBD antikūnų sąveika su AuND-anti-IgG-HRP konjugatais

Pirmiausia vykdoma p-anti-RBD antikūnų (analitės) tiesioginė specifinė nekovalentinė sąveika su SARS-CoV2-RBD baltymu, kaip aprašyta 2.7. skyrelyje. Tačiau automatinė programa nutraukiama pasibaigus trečiai stadijai, kad nebūtų suardyta baltymo ir p-anti-RBD antikūnų nekovalentinė sąveika. Toliau paleidžiama automatinė programa AuND-anti-IgG-HRP konjugatų sąveikai su p-anti-RBD antikūnais atlikti. Jai prasidėjus, 200 s vykdomas paviršiaus (lusto paviršiuje suformuoto 11-MUR savitvarkio monosluoksniu ir jo paviršiuje kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo bei prie baltymo prisijungusių p-anti-RBD antikūnų) stabilizavimas, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antroje stadijoje 900 s vykdoma analitės ir AuND-anti-IgG-HRP konjugatų sąveika, tam į pirmąjį kanalą yra įleidžiamas reikiamos koncentracijos AuND-anti-IgG-HRP konjugatų tirpalas, o į antrąjį yra įpilamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antrasis kanalas yra naudojamas kaip palyginamasis. Trečioje stadijoje 200 s yra vykdoma disociacija, kurios metu yra nuplaunamos neprisijungusios konjugatų molekulės, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Ketvirtoje stadijoje 300 s vykdoma regeneracija, kurios metu suardomos visos nekovalentinės sąveikos, ant lusto paviršiaus paliekant tik prie 11-MUR

savitvarkio monosluoksniu kovalentiškai prisijungusį SARS-CoV2-RBD baltymą. Regeneracijos metu yra naudojamas 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas. Toliau vykdomas regeneracinio tirpalo nuplovimas ir paviršiaus stabilizavimas.

2.13. p-anti-RBD antikūnų sąveika su specifiniais antriniais anti-IgG antikūnais FBS serume

Pirmiausia vykdoma p-anti-RBD antikūnų (analitės) tiesioginė specifinė sąveika su SARS-CoV2-RBD baltymu, kaip aprašyta 2.7. skyrelyje. Tačiau automatinė programa nutraukiama pasibaigus trečiai stadijai, kad nebūtų suardyta baltymo ir p-anti-RBD antikūnų nekovalentinė sąveika. Toliau paleidžiama automatinė programa anti-IgG antikūnų, esančių veršelių serume, specifinei sąveikai su p-anti-RBD antikūnais atlikti. Jai prasidėjus, 200 s vykdomas paviršiaus (lusto paviršiuje suformuoto 11-MUR savitvarkio monosluoksniu ir jo paviršiuje kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo bei prie baltymo prisijungusių p-anti-RBD antikūnų) stabilizavimas, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antroje stadijoje 900 s vykdoma analitės ir antrinių anti-IgG antikūnų, esančių FBS serume bei specifinių p-anti-RBD antikūnams sąveika, tam į pirmąjį kanalą yra įleidžiamas reikiamos koncentracijos antrinių antikūnų tirpalas, sumaišytas su 10 kartų skiestu veršelio serumu, o į antrąjį yra įpilamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Antrasis kanalas yra naudojamas kaip palyginamasis. Trečioje stadijoje 200 s vykdoma disociacija, kurios metu nuplaunamos neprijungusios antrinių antikūnų molekulės, tam naudojamas 10 mmol L⁻¹ PBS pH 7,4 tirpalas. Ketvirtoje stadijoje 300 s vykdoma regeneracija, kurios metu suardomos visos nekovalentinės sąveikos, ant lusto paviršiaus paliekant tik prie 11-MUR savitvarkio monosluoksniu kovalentiškai prisijungusį SARS-CoV2-RBD baltymą. Regeneracijos metu naudojamas 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas. Toliau vykdomas regeneracinio tirpalo nuplovimas ir paviršiaus stabilizavimas.

2.14. Skaičiavimai

Imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo paviršinė koncentracija buvo apskaičiuota pagal tiesinį sąryšį tarp PPR kampo poslinkio ir prisijungusios biologinės molekulės kiekio. 120 m° PPR kampo pokytis atitinka 1 ng mm⁻² baltymo paviršinės koncentracijos pokytį.

PPR kampo pokyčio signalas buvo apskaičiuotas aproksimuojant hiperbolinę funkciją $y = ax/(b + x)$, kur parametras a yra pusiausvyros kampas, m°.

PPR kampo pokyčio priklausomybė p-anti-RBD antikūnų, anti-IgG antikūnų arba AuND-anti-IgG-HRP konjugatų koncentracijos tiesinis intervalas buvo nustatytas pagal kalibravimo kreives, gautas aproksimuojant eksperimentinius duomenis tiesine lygtimi ($y = ax + b$). Taip pat tokiu būdu buvo įvertinti nuolydis (a), perkirtimo taškas (b) bei nustatymo koeficientas (R^2). Aptikimo riba (LOD, angl. *Limit Of Detection*) ir kiekybinio nustatymo riba (LOQ, angl. *Limit of Quantification*) buvo apskaičiuotos taip:

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (2)$$

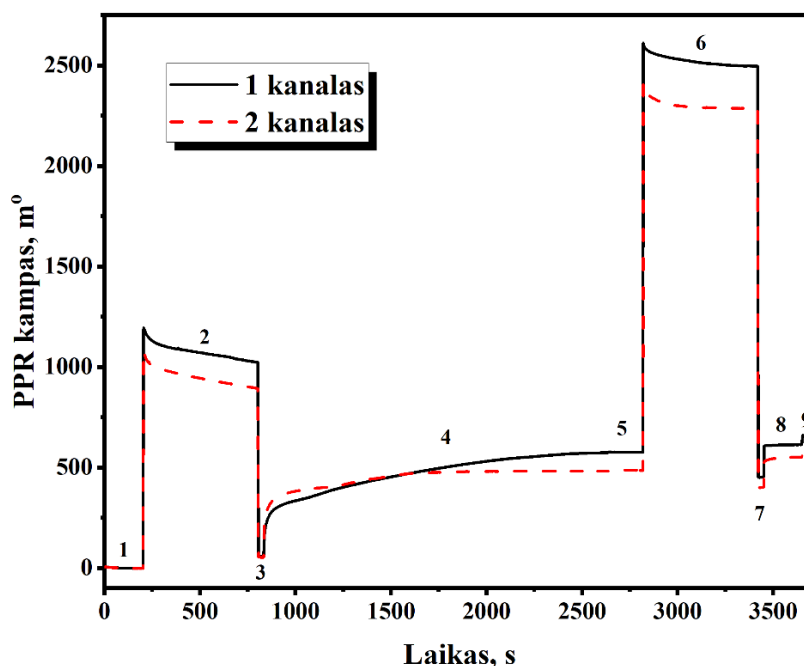
σ – atsako standartinis nuokrypis;

S – kalibravimo kreivės nuolydis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimas

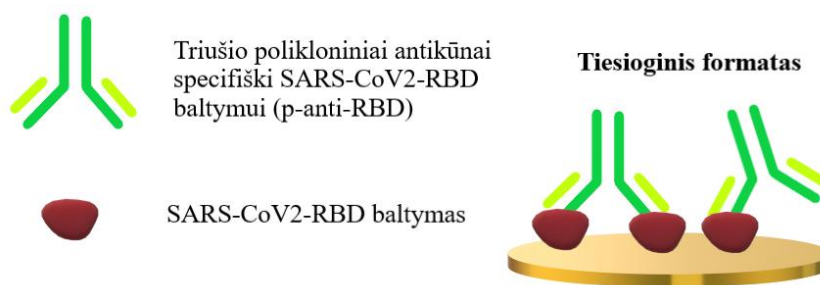
Buvo atliekamas SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimas 11-MUR savitvarkiu monosluoksniu dengtame lusto paviršiuje, abiejuose kiuvetės kanaluose, kaip aprašyta 2.6 skyrelyje (9 pav.). Šiam tyrimui buvo naudojamas $1,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracijos SARS-CoV2-RBD baltymo tirpalas, skiestas su 10 mmol L^{-1} natrio acetato pH 5,24 buferiniu tirpalu. Apskaičiuotas PPR kampo pokytis, imobilizuojant SARS-CoV2-RBD baltymą, buvo lygus $467,5 \pm 33,1 \text{ m}^\circ$. Kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo paviršinė koncentracija buvo $3,9 \pm 0,3 \text{ ng mm}^{-2}$, skaičiavimai yra paaiškinti 2.14 skyrelyje.



9 pav. SARS-CoV2-RBD baltymo kovalentinio imobilizavimo lusto paviršiuje, padengto 11-MUR savitvarkiu monosluoksniu, sensograma. 1, 9 – paviršiaus stabilizavimas su 10 mmol L^{-1} natrio acetato pH 5,24 buferiniu tirpalu; 2 – karboksilinių grupių aktyvavimas; 3, 5, 7 – praplovimas su 10 mmol L^{-1} natrio acetato pH 5,24 buferiniu tirpalu; 4 – SARS-CoV2-RBD baltymo imobilizavimas; 6 – karboksilinių grupių deaktivavimas; 8 – nekovalentiškai prisijungusio baltymo nuplovimas su 25 mmol L^{-1} NaOH + 0,5 % SDS regeneraciniu tirpalu [aut.]

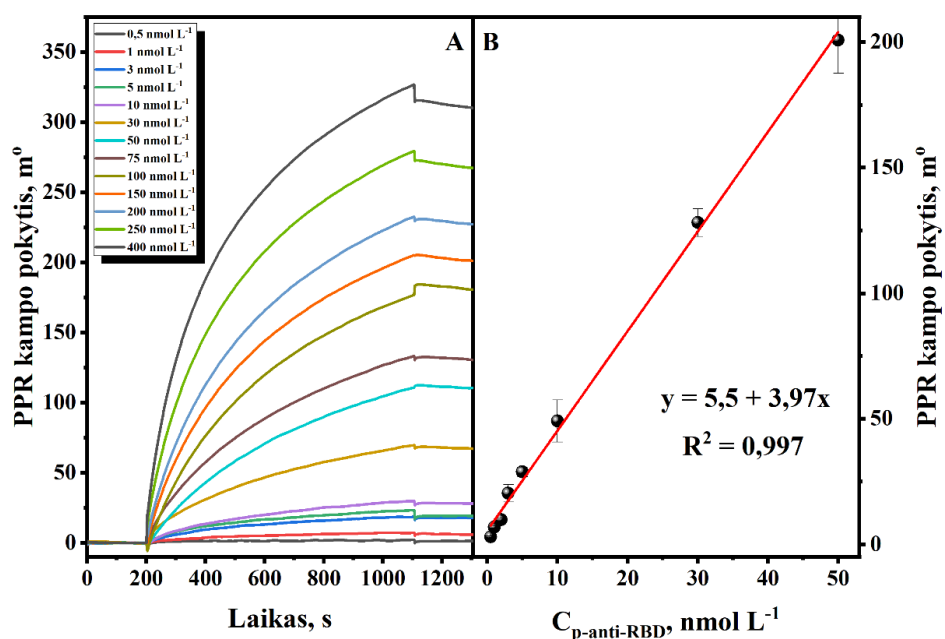
3.2. Tiesioginis p-anti-RBD antikūnų nustatymas

Buvo tiriama kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo specifinė sąveika su p-anti-RBD antikūnais prieš SARS-CoV2-RBD baltymą pagal metodiką aprašytą 2.7 skyrelyje. 10 paveiksle yra pateikta schema, kurioje vaizduojamas tiesioginio formato imuninis jutiklis. Aukso paviršiuje, padengtu 11-MUR savitvarkiu monosluoksniu, yra kovalentiškai imobilizuotas SARS-CoV2-RBD baltymas, prie kurio specifiskai jungiasi p-anti-RBD antikūnai.



10 pav. Tiesioginio imuninio jutiklio formato schema [aut.]

SARS-CoV2-RBD baltymo ir p-anti-RBD specifinės sąveikos tyrimas buvo atliekamas p-anti-RBD antikūnų tirpalų koncentracijos intervale nuo 0,5 iki 400 nmol L⁻¹ (11A pav.). Matoma, kad didėjant antikūnų tirpalo koncentracijai, didėja ir PPR kampo pokytis. Pastebima analizinio signalo, registruojamo p-anti-RBD antikūnams sąveikaujant su SARS-CoV2-RBD baltymu, tiesinė priklausomybė ($R^2 = 0,997$) nuo p-anti-RBD antikūno tirpalo koncentracijų intervale nuo 0,5 iki 50 nmol L⁻¹ (11B pav.). 0,5 nmol L⁻¹ p-anti-RBD antikūnų tirpalo koncentracijos atveju, analizinis signalas buvo lygus $3,06 \pm 0,21$ m°, o 50 nmol L⁻¹ koncentracijos atveju – 201 ± 13 m°. Taip pat buvo apskaičiuota aptikimo riba, kuri buvo lygi 0,17 nmol L⁻¹ ir nustatymo riba, kuri buvo lygi 0,52 nmol L⁻¹.

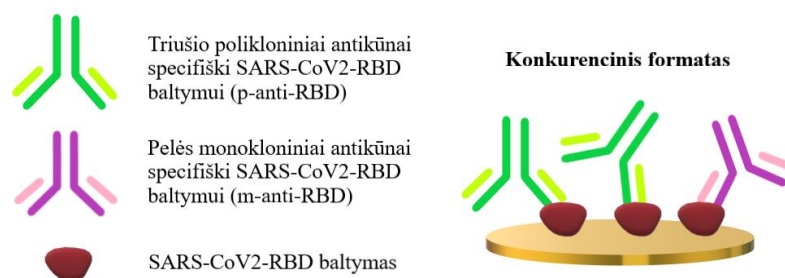


11 pav. PPR sensogramos, įrašytos SARS-CoV2-RBD baltymo sąveikos su specifiniais p-anti-RBD antikūnais tyrimo metu (A); tiesinės priklausomybės kreivė (B). Tyrimo sąlygos: 1,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracijos SARS-CoV2-RBD baltymo tirpalas, 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas ir 300 s regeneracijos trukmė [aut.]

3.3. Konkurencinis p-anti-RBD nustatymas

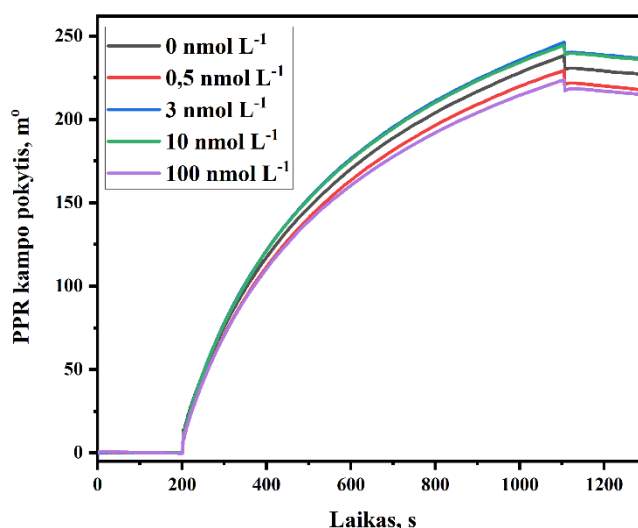
12 paveiksle yra vaizduojama konkurencinio formato imuninio jutiklio schema. Joje vaizduojama kaip analizė (p-anti-RBD antikūnai) konkuruoja su m-anti-RBD antikūnais dėl galimos specifinės sąveikos su SARS-CoV2-RBD baltymu. Iš pradžių vyksta SARS-CoV2-RBD baltymo

sąveika su p-anti-RBD antikūnais, o vėliau vykdoma SARS-CoV2-RBD baltymo sąveika su m-anti-RBD antikūnais, kur m-anti-RBD antikūnai sąveikauja su likusiu laisvu baltymu. Kuo daugiau prie kovalentiškai Au–11-MUR paviršiuje imobilizuoto SARS-CoV2-RBD baltymo prisijungs analizės, tuo mažiau prie baltymo prisijungs m-anti-RBD antikūnų ir atvirkščiai.



12 pav. Konkurencinio imuninio jutiklio formato schema [aut.]

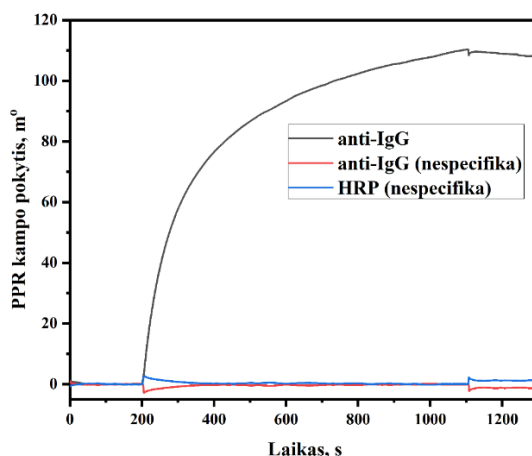
p-anti-RBD nustatymas konkurencinio imuninio jutiklio formatu buvo atliekamas pagal 2.8 skyrelyje aprašytą metodiką p-anti-RBD intervale nuo 0 iki 100 nmol L^{-1} . 13 paveiksle pavaizduota PPR sensogramos, įrašytos m-anti-RBD sąveikos su SARS-CoV2-RBD baltymu, konkurenciniu nustatymo formatu. Tyrimo metu buvo pastebėta, kad nepaisant to, kaip keičiasi analizės koncentracija, PPR kampo pokyčio signalas, registruojamas m-anti-RBD antikūnams jungiantis prie likusių laisvų baltymų paviršiuje, beveik nepakinta. Esant 0 nmol L^{-1} p-anti-RBD antikūnų tirpalo koncentracijai, PPR kampo pokyčio signalas, registruojamas m-anti-RBD antikūnams sąveikaujant su baltymu, buvo lygus $226,5 \text{ m}^\circ$, o 100 nmol L^{-1} analizės koncentracijai – 215 m° . Šie rezultatai rodo, kad priklausomybės nuo analizės koncentracijos nėra. m-anti-RBD antikūnai jungiasi prie SARS-CoV2-RBD baltymo nepriklausomai ar lusto paviršiuje yra prie baltymo prisijungusių p-anti-RBD antikūno molekulių. Todėl buvo nuspręsta netęsti tyrimų su konkurencinio formato imuniniu jutikliu.



13 pav. PPR sensogramos, įrašytos m-anti-RBD antikūnų specifinės sąveikos su SARS-CoV2-RBD baltymu konkurencinio formato tyrimo metu. Analizės sąlygos: $1,56 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracijos SARS-CoV2-RBD baltymo tirpalas, 200 nmol L^{-1} koncentracijos m-anti-RBD antikūnų tirpalas, 10 mmol L^{-1} glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas ir 300 s regeneracijos trukmė [aut.]

3.4. SARS-CoV2-RBD baltymo nespecifinės sąveikos patikra

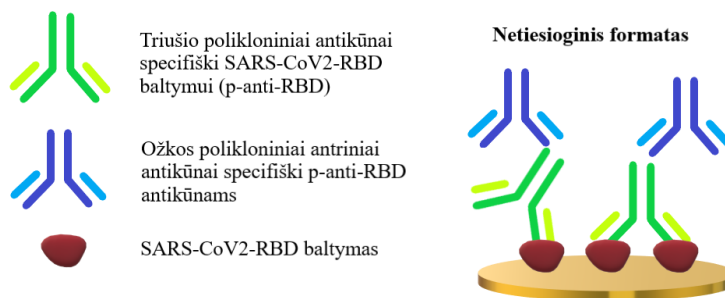
Pagal 2.9 skyrelyje aprašytą metodiką buvo atliktas antrinių anti-IgG antikūnų bei HRP fermento nespecifinės sąveikos su SARS-CoV2-RBD baltymu įvertinimas. Pateiktose sensogramose, 14 paveiksle, matome, kad tarp SARS-CoV2-RBD baltymo ir antrinio anti-IgG antikūno, taip pat ir tarp baltymo bei HRP fermento nespecifinės sąveikos nėra. Sensogramoje pavaizduota analizės ir anti-IgG antikūnų sąveikos kreivė, šio tyrimo tikslas buvo patikrinti ar antriniai anti-IgG antikūnai specifiskai sąveikauja su p-anti-RBD antikūnais. Dėl to, kad nėra nespecifinės sąveikos su SARS-CoV2-RBD baltymu, o anti-IgG antikūnai yra specifiski p-anti-RBD antikūnams, buvo padaryta išvada, kad antriniai anti-IgG antikūnai ir HRP fermentas yra tinkami komponentai konjugatų sintezei.



14 pav. PPR sensogramos, įrašytos anti-IgG specifinės sąveikos su p-anti-RBD antikūnais metu ir anti-IgG bei HRP nespecifinės sąveikos su SARS-CoV2-RBD metu. Analizės sąlygos: 1,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracijos SARS-CoV2-RBD baltymo tirpalas, 10 nmol L^{-1} koncentracijos p-anti-RBD antikūnų tirpalas, 50 nmol L^{-1} koncentracijos anti-IgG antikūnų tirpalas, 200 nmol L^{-1} koncentracijos HRP tirpalas, 10 mmol L^{-1} glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas ir 300 s regeneracijos trukmė [aut.]

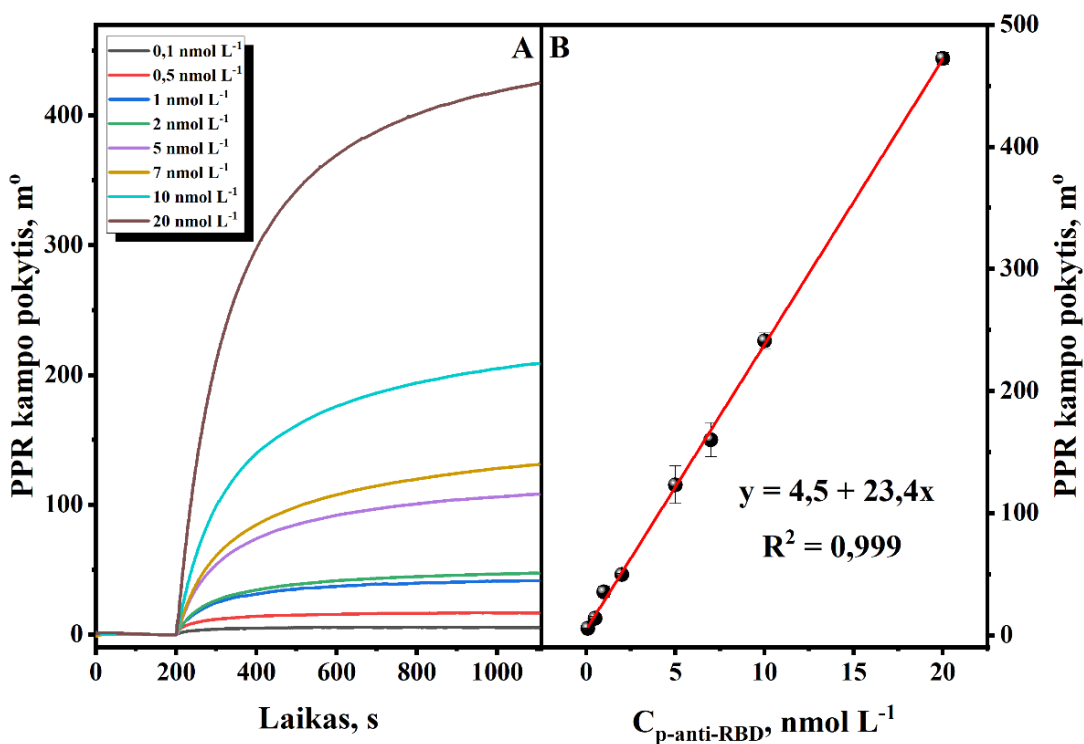
3.5. p-anti-RBD nustatymas netiesioginiu formatu panaudojus anti-IgG

15 paveiksle vaizduojama netiesioginio imuninio jutiklio formato schema. Šioje schemoje pavaizduotas lusto, padengto 11-MUR savitvarkiu monosluoksniu, paviršiuje kovalentiškai imobilizuotas SARS-CoV2-RBD baltymas, su kuriuo sąveikauja analizė. Prie analizės yra specifiskai prisijungę antriniai anti-IgG antikūnai.



15 pav. Netiesioginio imuninio jutiklio formato schema [aut.]

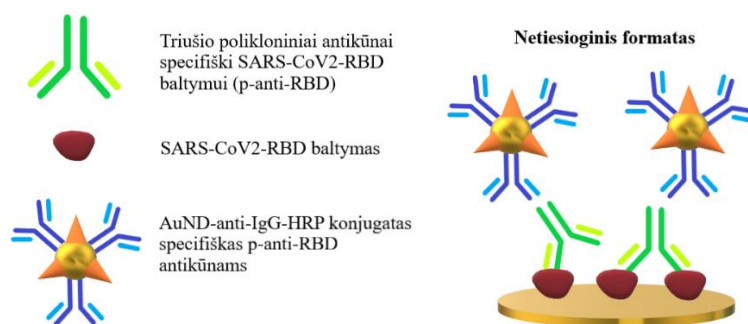
Pagal 2.10 skyrelyje pateiktą metodiką buvo tiriamas netiesioginis imuninis jutiklis, kai analizės detekcijai yra naudojami anti-IgG antikūnai. Tam tikslui buvo registruojama p-anti-RBD sąveika su Au-11-MUR-SARS-CoV-2-RBD, kurios stebėjimas buvo nutraukiamas disociacijos stadijos metu. Toliau buvo įpilamas 50 nmol L⁻¹ koncentracijos anti-IgG tirpalas ir registruojama jų sąveika su p-anti-RBD. Tyrimas buvo atliekamas p-anti-RBD koncentracijų intervale nuo 0,1 iki 20 nmol L⁻¹ (16A pav.). Visame tiriamame p-anti-RBD koncentracijų intervale buvo stebima analizinio signalo, registruojamo anti-IgG prisijungimo metu, tiesinė priklausomybė ($R^2 = 0,999$) nuo p-anti-RBD koncentracijos (16B pav.). 0,1 nmol L⁻¹ p-anti-RBD koncentracijos atveju analizinis signalas buvo lygus $5,51 \pm 0,27$ m°, o 20 nmol L⁻¹ atveju – 472 ± 5 m°. Tuo metu apskaičiuota aptikimo riba buvo 0,08 nmol L⁻¹, o nustatymo riba – 0,24 nmol L⁻¹. Palyginus su tiesioginio nustatymo rezultatais abu parametrai sumažėjo apytiksliai 2,1 karto.



16 pav. PPR sensogramos, įrašytos Au-11-MUR-SARS-CoV2-RBD-p-anti-RBD sąveikos su anti-IgG antikūnais tyrimo metu (A); tiesinės priklausomybės kreivė (B). Tyrimo sąlygos: 1,56 μmol L⁻¹ koncentracijos SARS-CoV2-RBD baltymo tirpalas, 50 nmol L⁻¹ koncentracijos anti-IgG antikūnų tirpalas, 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas ir 300 s regeneracijos trukmė [aut.]

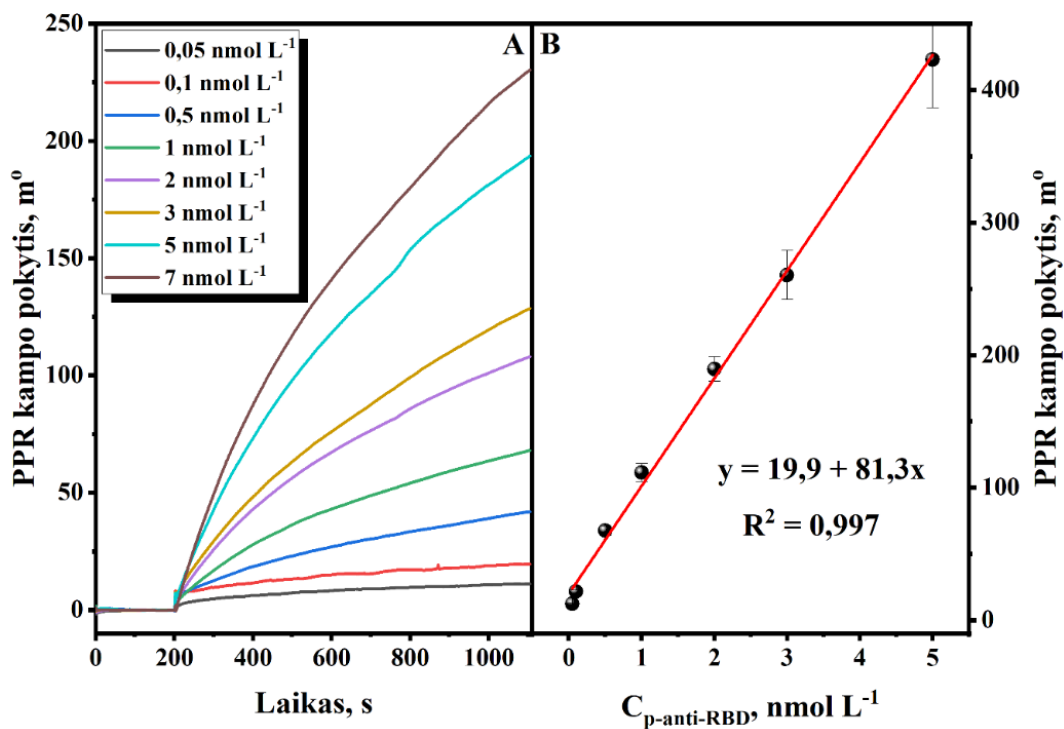
3.6. AuND-anti-IgG-HRP konjugatų taikymas p-anti-RBD antikūnų netiesioginiam nustatymui

17 paveiksle vaizduojama kitokia netiesioginio imuninio jutiklio formato schema, kurioje naudojami AuND-anti-IgG-HRP konjugatai. Ši schema vaizduoja Au-11-MUR paviršiuje kovalentiškai imobilizuotą SARS-CoV2-RBD baltymą, prie kurio yra prisijungusi analizė, o jos aptikimui yra naudojami AuND-anti-IgG-HRP konjugatai.



17 pav. Netiesioginio imuninio jutiklio formato schema su AuND-anti-IgG-HRP konjugatais analitės aptikimui [aut.]

Pagal 2.12 skyrelyje pateiktą metodiką buvo tiriamas netiesioginis imuninis jutiklis, kai analitės detekcijai yra naudojami AuND-anti-IgG-HRP konjugatai. Šiam tikslui buvo registruojama p-anti-RBD sąveika su Au-11-MUR-SARS-CoV2-RBD, kurios matavimas buvo nutraukiamas disociacijos stadijos metu. Toliau buvo įpilamas AuND-anti-IgG-HRP konjugatų tirpalas ir registruojama jų sąveika su p-anti-RBD antikūnais. Tyrimas buvo atliekamas p-anti-RBD koncentracijų intervale nuo 0,05 iki 7 nmol L⁻¹ (18A pav.). Tiriame p-anti-RBD koncentracijų intervale nuo 0,05 iki 5 nmol L⁻¹ buvo stebima analizinio signalo, registruojamo anti-IgG prisijungimo metu, tiesinė priklausomybė ($R^2 = 0,997$) nuo p-anti-RBD koncentracijos (18B pav.). 0,05 nmol L⁻¹ p-anti-RBD koncentracijos atveju analizinis signalas buvo lygus $12,56 \pm 0,13$ m°, o 5 nmol L⁻¹ atveju – 423 ± 37 m°. Tuo metu apskaičiuota aptikimo riba buvo 0,04 nmol L⁻¹, o nustatymo riba – 0,12 nmol L⁻¹. Palyginus su tiesioginio nustatymo rezultatais abu parametrai sumažėjo apytiksliai 4,3 kartų.



18 pav. PPR sensogramos, įrašytos Au-11-MUR-SARS-CoV2-RBD-p-anti-RBD sąveikos su AuND-anti-IgG-HRP konjugatais tyrimo metu (A); tiesinės priklausomybės kreivė (B). Tyrimo sąlygos: 1,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$ koncentracijos SARS-CoV2-RBD baltymo tirpalas, 10 mmol L⁻¹ glicino pH 2,0 regeneracinis tirpalas ir 300 s regeneracijos trukmė [aut.]

3.7. Tyrimai realiuose mėginiuose

Norint sukurti imuninį jutiklį, reikia įvertinti jo veikimą realiuose mėginiuose. Šiam tikslui buvo atlikti tyrimai netiesioginio formato imuniniam jutikliui, su antriniais anti-IgG antikūnais analizės aptikimui, nustatant p-anti-RBD antikūnus filtruotame veršelio serume, praskęstame 10 kartų su 10 mmol L^{-1} PBS, pH 7,4 tirpalu. Tyrimai su paruoštu 1 nmol L^{-1} koncentracijos p-anti-RBD antikūnų tirpalu buvo atliekami tris kartus. Serumo mėginių išgavos vidurkis buvo $98,9 \pm 8,9 \%$, atitinkamai $0,989 \pm 0,089 \text{ nmol L}^{-1}$. Tai rodo, kad sukurtas netiesioginio formato imuninis jutiklis su antriniais anti-IgG antikūnais analizės detekcijai gali būti naudojamas ir realiuose mėginiuose norint aptikti p-anti-RBD antikūnus.

IŠVADOS

1. Parodyta sukurtų tiesioginio ir dvejų tipų netiesioginio nustatymo formato PPR imuninių jutiklių pritaikomumas nustatant specifinių antikūnų prieš SARS-CoV2-RBD baltymą. Pasirinktas konkurencinio formato imuninis jutiklis nėra tinkamas specifinių antikūnų prieš SARS-CoV2-RBD baltymą nustatymui.
2. Taikant tiesioginio nustatymo formatą analitės aptikimui tiesinis priklausomybės intervalas ($R^2 = 0,997$) buvo nuo 0,5 iki 50 nmol L⁻¹. Nustatyta aptikimo riba buvo 0,17 nmol L⁻¹, o nustatymo riba – 0,52 nmol L⁻¹.
3. Netiesioginio formato imuninio jutiklio atveju, kai aptikimui yra naudojami antriniai antikūnai, tiesinis priklausomybės intervalas ($R^2 = 0,999$) buvo nuo 0,1 iki 20 nmol L⁻¹, o aptikimo ir nustatymo ribos atitinkamai buvo 0,08 ir 0,24 nmol L⁻¹.
4. Taikant susintetintus AuND-anti-IgG-HRP konjugatus netiesioginio formato imuninio jutiklio veikimui tiesinis priklausomybės intervalas ($R^2 = 0,997$) buvo nuo 0,05 iki 5 nmol L⁻¹, kai aptikimo ir nustatymo ribos atitinkamai buvo 0,04 ir 0,12 nmol L⁻¹.
5. Netiesioginio formato imuninis jutiklis, naudojant antrinius antikūnus, yra tinkamas specifinių antikūnų prieš SARS-CoV2-RBD baltymą nustatymui realiuose mėginiuose. Išgavos vidurkis buvo lygus $98,9 \pm 8,9$ %, nustatant antikūnus viršelio serume.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. M. O. Pohl, I. Busnadiego, V. Kufner, I. Glas, U. Karakus, S. Schmutz, and et. al. SARS-CoV-2 variants reveal features critical for replication in primary human cells. *PLoS biology*, **19**(3), e3001006, (2021).
2. Pasaulio Sveikatos Organizacijos tinklapis [interaktyvus]. [Žiūrėta 2025 m. balandžio 22 d.]. Prieiga per internetą: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>
3. A. Kausaite-Minkstimiene, A. Popov, A. Ramanaviciene. Ultra-sensitive SPR immunosensors: A comprehensive review of labeling and interface modification using nanostructures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **170**, 117468, (2024).
4. S. KVM, B. K. Pandey, D. Pandey. Design of surface plasmon resonance (SPR) sensors for highly sensitive biomolecular detection in cancer diagnostics. *Plasmonics*, 1-13, (2024).
5. A. Kumari, A. Yadav, O. P. Singh, and P. Sharan. A review of surface plasmon resonance (SPR) technology in biosensing: innovations, applications and future trends. *Journal of Optics*, 1-9, (2024).
6. T. Tene, S. Bellucci, C. V. Gomez. SPR Biosensor Based on Bilayer MoS₂ for SARS-CoV-2 Sensing. *Biosensors*, **15**(1), 21, (2025).
7. L. Du, Y. Yang and X. Zhang. Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19. *Cellular & molecular immunology*, **18**(10), 2293-2306, (2021).
8. W. Wenbing, C. Ying, Z. Hong, S. Changzhen and Z. Shujun. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virology Journal (Web)*, **20**(1), 1-16, (2023).
9. N. T. Supekar, A. Shajahan, A. S. Gleinich, D. Rouhani, C. Heiss and P. Azadi. SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein is decorated with multiple N-and O-glycans. *BioRxiv*, 2020-08, (2020).
10. X. Guan, Y. Yang and L. Du. Advances in SARS-CoV-2 receptor-binding domain-based COVID-19 vaccines. *Expert review of vaccines*, **22**(1), 422-439, (2023).
11. F. Peisahovics, M. A. Rohaim and M. Munir. Structural topological analysis of spike proteins of SARS-CoV-2 variants of concern highlight distinctive amino acid substitution patterns. *European Journal of Cell Biology*, **101**(4), 151275, (2022).
12. K. M. Hastie, H. Li, D. Bedinger, S. L. Schendel, S. M. Dennison, K. Li and et. al. Defining variant-resistant epitopes targeted by SARS-CoV-2 antibodies: A global consortium study. *Science*, **374**(6566), 472-478, (2021).
13. D. Sanyal, S. Chowdhury, V. N. Uversky and K. Chattopadhyay. An exploration of the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain (RBD)—a complex palette of evolutionary and structural features. *BioRxiv*, 2020-05, (2020).
14. D. Ray, L. Le, and I Andricioaei. Distant residues modulate conformational opening in SARS-CoV-2 spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **118**(43), e2100943118, (2021).
15. C. Marques-Pereira, M. N. Pires, R. P. Gouveia, N. N. Pereira, A. B. Caniceiro, N. Rosário-Ferreira and I. S. Moreira. SARS-CoV-2 membrane protein: from genomic data to structural new insights. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(6), 2986, (2022).
16. V. S. Mandala, M. J. McKay, A. A. Shcherbakov, A. J. Dregni, A. Kolocouris and M. Hong. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nature structural & molecular biology*, **27**(12), 1202-1208, (2020).

17. B. Berta, H. Tordai, G. L. Lukács, B. Papp, A. Enyedi, R. Padányi and T. Hegedűs. SARS-CoV-2 envelope protein alters calcium signaling via SERCA interactions. *Scientific Reports*, **14**(1), 21200, (2024).
18. J. Cubuk, J. J. Alston, J. J., Incicco, S. Singh, M. D. Stuchell-Brereton, M. D. Ward and et. al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nature communications*, **12**(1), 1936, (2021).
19. S. Baah, M. Laws and K. M. Rahman. Antibody–drug conjugates—a tutorial review. *Molecules*, **26**(10), 2943, (2021).
20. M. J. Day. Introduction to antigen and antibody assays. *Topics in Companion Animal Medicine*, **30**(4), 128-131, (2015).
21. I. Kumagai and K. Tsumoto. Antigen–antibody binding. *e LS*, (2001).
22. M. L. Chiu, D. R. Goulet, A. Teplyakov and G. L. Gilliland. Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics. *Antibodies*, **8**(4), 55, (2019).
23. G. Vidarsson, G. Dekkers and T. Rispens. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, **5**, 520, (2014).
24. V. Bayer. An overview of monoclonal antibodies. In *Seminars in oncology nursing*. WB Saunders, **35**(5), p. 150927, (2019).
25. R. Vattepu, S. L. Sneed and R. M. Anthony. Sialylation as an important regulator of antibody function. *Frontiers in Immunology*, **13**, 818736, (2022).
26. A. K. Singh, S. Mittal, M. Das, A. Saharia and M. Tiwari. Optical biosensors: A decade in review. *Alexandria Engineering Journal*, **67**, 673-691, (2023).
27. S. Q. Nascimento and F. N. Crespilho. Electrochemical Immunosensor for Diagnosis of COVID-19. In *COVID-19 Metabolomics and Diagnosis: Chemical Science for Prevention and Understanding Outbreaks of Infectious Diseases*. Cham: Springer International Publishing, 63-89, (2023).
28. H. Kumar, R. Dhalaria, S. Guleria, R. Cimler, P. Prerna, D. S. Dhanjal and et. al. Immunosensors in food, health, environment, and agriculture: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **22**(5), 2573-2605, (2024).
29. C. E. Karachaliou and E. Livaniou. Immunosensors for autoimmune-disease-related biomarkers: A literature review. *Sensors*, **23**(15), 6770, (2023).
30. N. C. Japp, J. J. Soucek, A. R. Sasson, M. A. Hollingsworth, S. K. Batra and W. M. Junker. Tumor Biomarker In-Solution Quantification, Standard Production, and Multiplex Detection. *Journal of Immunology Research*, **2021**(1), 9942605, (2021).
31. B. D. Mansuriya and Z. Altintas. Graphene quantum dot-based electrochemical immunosensors for biomedical applications. *Materials*, **13**(1), 96, (2019).
32. J. Fischer, J. O. Kaufmann and M. G. Weller. Simple Determination of Affinity Constants of Antibodies by Competitive Immunoassays. *Methods and protocols*, **7**(3), 49, (2024).
33. Q. Wu, W. Wu, F. Chen and P. Ren. Highly sensitive and selective surface plasmon resonance biosensor for the detection of SARS-CoV-2 spike S1 protein. *Analyst*, **147**(12), 2809-2818, (2022).
34. L. Fan, B. Du, F. Pei, W. Hu, S. Feng, B. Liu and et. al. A novel SPR Immunosensor based on dual signal amplification strategy for detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein. *Biosensors*, **13**(5), 549, (2023).
35. V. Lisyte, A. Kausaite-Minkstiniene, B. Brasiunas, A. Popov and A. Ramanaviciene. Surface plasmon resonance immunosensor for direct detection of antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**(16), 8574, (2024).

36. A. Kausaite-Minkstimiene, A. Giniunaite, A. Popov and A. Ramanaviciene. Gold nanoparticle-assisted SPR immunosensor for quantification of SARS-CoV-2 anti-RBD antibodies. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **432**, 137465, (2025).

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

GABIJA AGASARJANAITĖ

PPR imuninis jutiklis specifinių antikūnų prieš SARS-CoV-2 viruso RBD baltymą nustatymui

SARS-CoV-2 viruso sukeltos COVID-19 ligos pandemija baigėsi ir daugelis žmonių pasiskiepijo nuo šios klastingos ligos, tačiau mirtingumo rodikliai auga toliau. Todėl vis dar svarbu atlikti tyrimus bei analizes, susijusias su SARS-CoV-2 virusu.

Šio darbo tikslas buvo sukurti PPR imuninį jutiklį specifinių antikūnų prieš SARS-CoV2-RBD baltymą nustatymui, taikant skirtingus nustatymo formatus. Buvo parodyti tiesioginio ir dviejų tipų netiesioginio nustatymo formato PPR imuninių jutiklių pritaikomumas analizės detekcijai. Tiesioginio nustatymo formato atveju, analizės aptikimo tiesinis priklausomybės intervalas buvo nuo 0,5 iki 50 nmol L⁻¹, apskaičiuotos aptikimo ir nustatymo ribos atitinkamai buvo 0,17 ir 0,52 nmol L⁻¹. Netiesioginio nustatymo atveju, kur analizės detekcijai buvo naudojami antriniai anti-IgG antikūnai, tiesinis priklausomybės intervalas buvo nuo 0,1 iki 20 nmol L⁻¹. Apskaičiuotos aptikimo ir nustatymo ribos buvo 2,1 karto mažesnės nei tiesioginio nustatymo formato imuninio jutiklio atveju. Kitu, netiesioginio nustatymo formato imuninio jutiklio atveju, kai analizės aptikimui buvo naudojami susintetinti AuND-anti-IgG-HRP konjugatai, tiesinis priklausomybės intervalas buvo nuo 0,05 iki 5 nmol L⁻¹. Apskaičiuotos aptikimo ir nustatymo ribos buvo 4,3 kartų mažesnės nei tiesioginio nustatymo formato atveju. Taip pat buvo patvirtintas netiesioginio imuninio jutiklio su antriniais antikūnais analizės detekcijai tinkamumas analizės nustatymui realiuose mėginiuose.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

GABIJA AGASARJANAITE

SPR Immunosensor for the Detection of Specific Antibodies Against SARS-COV-2 Virus RBD Protein

The COVID-19 pandemic caused by the SARS-COV-2 virus has ended and many people have been vaccinated against this insidious disease, but mortality rates continue to rise. Therefore, it is still important to conduct research and analysis related to the SARS-COV-2 virus.

The aim of this work was to develop a SPR immunosensor for the detection of specific antibodies against SARS-COV2-RBD protein using different detection formats. The applicability of SPR immunosensors of direct and two types of indirect detection formats for analyte detection was demonstrated. In the case of the direct detection format, the linear dependence range of analyte detection was from 0.5 to 50 nmol L⁻¹, the calculated detection and quantification limits were 0.17 and 0.52 nmol L⁻¹, respectively. In the case of indirect detection, where secondary anti-IgG antibodies were used for analyte detection, the linear dependence range was from 0.1 to 20 nmol L⁻¹. The calculated detection and quantification limits were 2.1 times lower than in the case of the direct detection format immunosensor. In another case, an indirect immunosensor, where synthesized AuND-anti-IgG-HRP conjugates were used for analyte detection, the linear dependence range was from 0.05 to 5 nmol L⁻¹. The calculated detection and quantification limits were 4.3 times lower than in the direct detection format. The suitability of the indirect immunosensor, with secondary antibodies for analyte detection, for analyte detection in real samples was also confirmed.