https://doi.org/10.15388/vu.thesis.899
https://orcid.org/0000-0002-6296-7570

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

Viktorija Lisytė

Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija biokonjugatų analizei ir tiesioginiam antikūnų aptikimui

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai
Chemija N 003

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2021–2025 metais Vilniaus universitete, Chemijos ir geomokslų fakultete.

Mokslinis vadovas – doc. dr. Anton Popov (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

Gynimo taryba:
Pirmininkas – prof. dr. Evaldas Naujalis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003).
Nariai:
dr. Vincentas Mindaugas Mačiulis (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003),
prof. dr. Rasa Pauliukaitė (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, chemija – N 003),
dr. Germanas Peleckis (Wollongong universitetas, Australija, gamtos mokslai, chemija – N 003),
prof. dr. Vida Vičkačkaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. kovo mėn. 27 d. 14 val. Vilniaus universiteto, Chemijos ir geomokslų fakulteto, Neorganinės chemijos auditorijoje. Adresas: Naugarduko g. 24, 141, Vilnius, Lietuva. Tel. +370 5 219 3105; el. paštas info@chgf.vu.lt

https://doi.org/10.15388/vu.thesis.899
https://orcid.org/0000-0002-6296-7570

VILNIUS UNIVERSITY
CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

Viktorija Lisyte

Surface Plasmon Resonance Spectroscopy for Bioconjugate Analysis and Direct Antibody Detection

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Chemistry N 003

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2021 and 2025 Vilnius University, Faculty of Chemistry and Geosciences.

Academic Supervisor – Assoc. Prof. Dr. Anton Popov (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Evaldas Naujalis (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry, N 003).
Members:
Dr. Vincentas Mindaugas Mačiulis (Centre for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry – N 003),
Prof. Dr. Rasa Pauliukaitė (Centre for Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Chemistry – N 003),
Dr. Germanas Peleckis (University of Wollongong, Australia, Natural Sciences, Chemistry – N 003),
Prof. Dr. Vida Vičkačkaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Chemistry – N 003).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 2 p.m. on 27th March 2026 in the Inorganic chemistry auditorium of the Faculty of Chemistry and Geosciences, Vilnius University.
Address: Naugarduko st. 24, 141, Vilnius, Lithuania.
Tel. +370 5 219 3105; e-mail: info@chgf.vu.lt

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti savo mokslų vadovui, doc. dr. Anton Popov, už nuolatinę paramą, kantrybę ir įkvėpimą. Jūsų vadovavimas, patarimai ir konstruktyvus grįžtamasis ryšys leido man nepasiduoti net susidūrus su sudėtingiausiais tyrimų iššūkiais, o kiekviena diskusija skatino gilinti žinias ir siekti naujų mokslo tikslų. Esu dėkinga prof. (HP) dr. Almirai Ramanavičienei, „Nanotechno“ laboratorijos vadovei, už suteiktą galimybę dirbti laboratorijoje, profesionalų pavyzdį ir praktines žinias, kurios neįkainojamos mano mokslinėje kelionėje. Jūsų pagalba ir patarimai laboratorijoje leido sėkmingai įgyvendinti tyrimus ir įgyti vertingą patirtį dirbant su įvairiomis nanotechnologijų metodikomis. Didelė padėka skiriama mano laboratorijos kolegoms už draugišką bendradarbiavimą, konstruktyvias diskusijas, pagalbą eksperimentuose ir kasdieniniame darbe. Jūsų entuziazmas ir bendruomeniškumas padėjo sukurti malonią ir motyvuojančią darbo aplinką. Taip pat dėkoju buvusiems studentams už smagius, įsimintinus momentus laboratorijoje, kurie prisidėjo prie džiugių ir pozityvių prisiminimų šioje kelionėje. Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai už nuolatinę paramą, supratimą ir palaikymą net pačiuose sudėtingiausiuose gyvenimo momentuose. Jūsų tikėjimas manimi, patarimai ir meilė buvo neįkainojami, suteikė drąsos ir jėgų įveikti kiekvieną iššūkį. Galiausiai dėkoju savo sužadėtiniui, su kuriuo visa ši kelionė buvo kartu – už kantrybę, meilę ir moralinę paramą kiekviename žingsnyje. Jūsų buvimas šalia darė šią kelionę prasmingesnę ir džiaugsmingesnę.

SANTRUMPOS

AgND – sidabro nanodalelės,
AKF-2 - angiotenziną konvertuojantis fermentas,
ARG – argininas,
AuND – aukso nanodalelės,
BAE – biologinis atpažinimo elementas,
BS_3 – bis(sulfosukcinimidilo)suberatas,
CdS – kadmio sulfidas,
CdSe – kadmio selenidas,
CdTe – kadmio telūridas,
CoV – koronavirusas,
CTD – C-terminalinis domenas,
DCC - 1,3-dicikloheksilkarbodiimidas,
DHLR – dihidrolipo rūgštis,
DSP - 3,3′-ditiodipropiono rūgšties di(N-hidroksisukcinimido esteris,
EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidas,
F_{ab} – antigeną atpažįstantis fragmentas,
FBR – fenilborono rūgštis,
F_c – efektorinis antikūno fragmentas..
FREP - fluorescencinio rezonanso energijos pernaša,
HIS – histidinas,
HR – hialurono rūgtis,
IFA – imunofermentinė analizė,
JSA – jaučio srumo albuminas,
K_D – disociacijos konstanta,
KT – kvantiniai taškai,
LJS – lanksčioji jungiamoji sritis,
LOD – aptikimo riba,
LPPR – lokalizuotas paviršiaus plazmonų rezonansas,
LR – lipo rūgštis,
MCH - 6-merkapto-1-heksanolis,
Me – metalas;
MeO – metalo oksidas;
MUR – 11-merkaptoudekano rūgštis,
ND – nanodalelės;
NH_4OH – amonio hidroksidas,
NHS - N-hidroksisuksinimidashidroksisukcinimidas,
NHS-HyNic - NHS esterio 6-hidrazinonikotinamidas,

NIR – atimoji infraraudonoji spindulių sritis,
NTD – N-terminalinis domenas,
PEG – polietilenglikolis,
PMMA – polimetilmetakrilatas,
PNR – peptidinės nukleorūgtšys,
PP – paviršiaus plazmonai,
PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas,
PPT – plazmoninis fototerminis,
RBD – receptorių jungimosi domenas,
RMJB – rekombinantinis maltozę jungiantis baltymas,
RNK – ribonukleoproteinų kompleksas,
RT–PCR - atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija,
RU – rezonanso vienetas,
SAM – savitvarkis monosluoksnis,
SARS-CoV-2 - Sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas 2,
scFv – viengrandžių antikūnų fragmentai,.
SCoV2-rN – SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymas,
SER – serinas,
UV – ultravioletinė,
VVA – visiškas vidaus atspindys.

TURINYS

PADĖKA **5**
SANTRUMPOS **6**
ĮVADAS **11**
1 LITERATŪROS APŽVALGA **14**
1.1 Paviršiaus plazmonų rezonansas 14
1.1.1 PPR spektroskopijos principas 15
1.1.2 PPR spektroskopijos prietaisas 16
1.1.3 PPR lusto modifikavimas 17
1.1.4 PPR lusto paruošimas 18
1.1.5 PPR lusto padengimas tioliais 18
1.1.6 Biomolekulių prijungimas 20
1.1.7 PPR biologiniai jutikliai 21
1.2 Nanodalelės ir jų taikymas biologiniuose jutikliuose 24
1.2.1 Nanodalelių optinės savybės 25
1.2.2 Nanodalelių elektrinės savybės 26
1.2.3 Nanodalelių funkcionalizavimas 28
1.2.4 Nanodalelių taikymas biologiniuose jutikliuose 31
1.2.4.1 Nanodalelių panaudojimas optiniuose jutikliuose 33
1.3 Kvantiniai taškai 34
1.3.1 Kvantinių taškų cheminė sudėtis ir struktūra 34
1.3.2 Kvantinių taškų optinės savybės 36
1.3.3 Kvantinių taškų pritaikymas biologinėse sistemose 37
1.3.4 Kvantinių taškų funcionalizavimas 39
1.3.4.1 KT paviršiaus funkcionalizavimas ir stabilizavimas 40
1.3.4.2 KT konjugavimas biomolekulėmis 42
1.3.4.3 KT konjugacija naudojant elektrostatinę sąveiką 43
1.3.4.4 KT konjugacija per ligandų ir receptorių sąveiką 44
1.4 SARS-CoV-2 virusas 44

1.4.1 SCoV2-rN sudėtis ir struktūra 45
1.4.2 SCoV2-rN imuninės savybės 46
1.4.3 SARS-CoV-2 viruso aptikimas 47
1.5 SARS-CoV-2 imuniniai jutikliai 48
1.5.1 Antikūnų tyrimai 49
1.5.2 Antigenų tyrimai 50
1.5.3 SARS-CoV-2 imuniniai jutikliai 51
1.6 CD44 baltymas 53
1.6.1 CD44 baltymo struktūra 54
1.6.2 CD44 baltymo ekspresija audiniuose 55
1.6.3 CD44 baltymo ekspresija navikuose 56
1.6.4 CD44 baltymo biologiniai jutikliai 57
2 EKSPERIMENTO METODIKA 58
2.1 Naudojami reagentai ir tirpalai 58
2.2 Prietaisai ir priemonės 59
2.3 Tirpalų paruošimas 61
2.4 Kvantinių taškų ir anti-CD44 konjugavimas 61
2.5 PPR spektroskopijos lusto paruošimas 62
2.6 PPR spektroskopijos lusto stabilizavimas 63
2.7 CD44 baltymo imobilizavimas PPR spektroskopijos lusto paviršiuje 64
2.8 Sąveikos su Au/MUR/CD44 tyrimai 65
2.9 Anti-CD44 koncentracijos nustatymas 66
2.10 KT-NH_2-anti-CD44 koncentracijos nustatymas 66
2.11 SCoV2-rN baltymo imobilizavimas 67
2.12 SCoV2-rN baltymo sąveika su specifiniais antikūnais 68
2.13 SCoV2-rN baltymo koncentracijos optimizavimas 68
2.14 Skaičiavimai 69
TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 70

3 Kvantinių taškų ir antikūnų konjugacijos įvertinimas PPR spektroskopija ... 70
3.1 CD44 baltymo imobilizavimas ... 70
3.2 Kvantinių taškų pasirinkimas ... 71
3.3 Regeneracinio tirpalo parinkimas ... 73
3.4 Anti-CD44 sąveikos su imobilizuotu CD44 baltymu įvertinimas 75
3.5 Anti-CD44 ir kvantinių taškų konjugacijos įvertinimas ... 76
3.6 KT-anti-CD44 konjugatų specifiškumo tyrimas ... 81
4 Tyrimai su anti-SCoV2-rN ... 83
4.1 Regeneracinio tirpalo parinkimas ... 83
4.2 Optimalios SCoV2-rN baltymo tirpalo pH vertės parinkimas ... 85
4.3 SCoV2-rN baltymo koncentracijos parinkimas ... 86
4.4 Analizinių parametrų nustatymas ... 87
5 IŠVADOS ... 91
6 LITERATŪROS SĄRAŠAS ... 92
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA ... 127
PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS ... 127
GYVENIMO APRAŠYMAS ... 130
SUMMARY ... 131

ĮVADAS

Molekulinio lygmens sąveikos sudaro gyvybės pagrindą: baltymai jungiasi prie receptorių, antikūnai atpažįsta svetimkūnius, o nanodalelės (ND) vis dažniau tampa ne tik pasyviais nešikliais, bet ir aktyviais sąveikos dalyviais. Šiuolaikinis mokslas siekia ne tik suprasti šiuos procesus, bet ir sukurti metodus, leidžiančius juos tiesiogiai stebėti – be papildomų žymėjimų, realiomis sąlygomis, dideliu jautrumu ir greičiu. Vienas iš tokių metodų, kurio reikšmė sparčiai auga tiek fundamentiniuose tyrimuose, tiek taikomojoje analizėje, yra paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) spektroskopija.

PPR metodas leidžia fiksuoti realiu laiku vykstančias biomolekulines sąveikas, stebint lūžio rodiklio pokyčius prie jutiklio paviršiaus, kai viena molekulė yra imobilizuota, o kita laisvai cirkuliuoja tirpale. Tai leidžia stebėti, kaip greitai įvyksta sąveika, kiek ji stipri, ar ji grįžtama [1]. Kadangi nereikia naudoti fluoroforų, fermentų ar kitų žymenų, išvengiama papildomo triukšmo ir galimų trikdžių, išlaikoma natūrali sąveikos būsena. Dėl šių savybių PPR plačiai taikomas tiek kuriant jautrius biologinius jutiklius, tiek tiriant sudėtingas biologines sistemas.

Parengtoje disertacijoje pristatomi du tyrimai, kuriuos jungia bendras naudojamas metodas – PPR spektroskopija. Vienu atveju PPR metodas pasitelkiamas siekiant aptikti COVID-19 žymenis, kitu – įvertinti ND ir antikūnų konjugaciją. Abu tyrimai parodo. Kad tas pats metodas gali būti pritaikytas skirtingiems praktiškai reikšmingiems tikslams.

Pirmojo tyrimo objektu buvo kvantiniai taškai (KT) ir antikūnai**,** siekiant įvertinti jų konjugacijos efektyvumą. CD44 – tai membraninis glikoproteinas, dalyvaujantis ląstelių adhezijoje, migracijoje, taip pat žinomas kaip vėžio kamieninių ląstelių ir su uždegimu susijęs biožymuo [2]. Tyrimo metu aminogrupių paviršiuje turintys kvantiniai taškai (KT-NH_2) buvo konjuguoti su antikūnais prieš CD44 baltymą (anti-CD44) naudojant bifunkcinį kryžminio sujungimo reagentą bis(sulfosukcinimidilo)suberatą (BS_3). Siekiant įvertinti ar konjugatai geba atpažinti biologinį taikinį PPR metodas buvo panaudotas jų sąveikos su CD44 baltymu tyrimui. Analizė atskleidė konjugacijos sėkmingumą bei efektyvumą, leidžiančius vertinti tokių nanokonjugatų tinkamumą praktiniam taikymui.

Antrasis tyrimas buvo nukreiptas į antikūnus prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymą (anti-SCoV2-rN), kuris yra vienas iš pagrindinių struktūrinių viruso komponentų, pasižymintis stipriomis imunogeninėmis savybėmis. Nustatyta, kad pacientų organizmas reaguoja į šį baltymą gamindamas specifinius antikūnus, todėl jo atpažinimas yra patikimas

infekcijos žymuo [3]. Tyrime buvo sukurtas imuninis jutiklis, kuriame SCoV2-rN buvo imobilizuotas ant auksu padengto PPR jutiklio paviršiaus, padengto 11-merkaptoundekano rūgšties (MUR) savitvarkiu monosluoksniu. Imobilizacijai naudota karbodiimido sujungimo reakcija, kad susidarytų kovalentiniai ryšiai tarp MUR ir baltymo aminogrupių. Tokiu metodu buvo efektyviai imobilizuotas baltymas ant jutiklio paviršiaus. Gautas jutiklis leido jautriai atlikti tiesioginį anti-SCoV2-rN aptikimą. Tyrimas parodė, kad jutiklis pasižymi geru pakartojamu, aukštu specifiškumu ir gali būti naudojamas pakartotinai**,** o tai itin svarbu klinikiniam pritaikymui ir serologiniams tyrimams.

Nors abu tyrimai orientuoti į skirtingus taikinius – antikūnus ir vėžio biožymenį – jie atskleidžia vieną esminę idėją: PPR spektroskopija yra universali, galinga technologija, leidžianti ištirti itin subtilias sąveikas tarp biologinių molekulių ar funkcionalizuotų nanostruktūrų. Vienu atveju tai – žingsnis link greitesnės ir paprastesnės virusinių infekcijų diagnostikos, kitu – link pažangių nanomedžiagų konjugavimo strategijų, skirtų ligų biožymenų atpažinimui.

Ši disertacija rodo, kad pažangūs analizės metodai, tokie kaip PPR spektroskopija, gali sujungti skirtingas mokslo kryptis – virusologiją, imunologiją, nanotechnologijas – į bendrą tyrimų visumą, kurioje svarbiausia tampa ne tik ką aptinkame, bet ir kaip tiksliai, jautriai ir greitai galime tai padaryti. Tokiu būdu sukuriamos galimybės kurti naujos kartos biologinius jutiklius ir analitines sistemas, kurios atitiktų šiuolaikinių sveikatos, tyrimų ir inovacijų poreikius.

DARBO TIKSLAS

Pritaikyti paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopiją kvantinių taškų modifikavimo antikūnais įvertinimui ir antikūnų prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymą nustatymui.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Atlikti kvantinių taškų ir antikūnų prieš CD44 baltymą konjugavimą. Optimizuoti kvantinių taškų modifikavimo antikūnais prieš CD44 baltymą sąlygas ir įvertinti gautų biokonjugatų efektyvumą analizėje, taikant PPR spektroskopiją.
2. Sukurti PPR imuninį jutiklį skirtą tiesioginiam antikūnų prieš SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymą aptikimui.

DARBO GINAMIEJI TEIGINIAI

1. PPR spektroskopija yra tinkamas metodas kvantinių taškų modifikavimo antikūnais efektyvumo ir tinkamumo analizei įvertinimui.
2. SARS-CoV-2 nukleokapsidės baltymo tiesioginis nustatymas gali būti sėkmingai atliekamas taikant PPR spektroskopiją.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Paviršiaus plazmonų rezonansas

Paviršiaus plazmonų rezonansas (PPR) yra optinis reiškinys, leidžiantis tirti nanomedžiagų ir biomolekulių savybes. Jis pagrįstas paviršiaus plazmonų (PP) susidarymu – tai kolektyvinis laisvųjų elektronų judėjimas metalo paviršiuje, kuris įvyksta, kai poliarizuota šviesa krinta į sąsają tarp metalo ir dielektriko esant visiško vidaus atspindžio (VVA) sąlygoms. PPR metodas registruoja molekulinių sąveikų sukeltus optinius pokyčius metalo (Au arba Ag) sluoksnio paviršiuje. Dėl savo jautrumo jie plačiai taikomi maisto saugoje, vaistų kūrime, aplinkos apsaugos ir medicininės diagnostikos srityse. Kadangi šie jutikliai turi didelį potencialą, mokslininkai nuolat ieško būdų, kaip pagerinti jų jautrumą, kuriant naujas struktūras ir veikimo principus [4]. Šio reiškinio pagrindai buvo nagrinėjami jau XX a. pradžioje, kai R. W. Wood pastebėjo, kad poliarizuota šviesa, krisdama ant difrakcinės gardelės, atspindėdama sudaro nelygią šviesių ir tamsių juostų seką [5]. 1907 m. J. Zenneck su kolegomis pasiūlė paviršinių bangų sprendinius Maksvelo lygtims, nustatydami, kad elektromagnetinės bangos susidaro dviejų skirtingo elektrinio laidumo medžiagų sandūroje dėl plazmonų svyravimų. Jie taip pat išsiaiškino, kad elektromagnetinės bangos gali būti sujungtos su paviršiumi, jei viena iš medžiagų turi tam tikrą kompleksinę (įsivaizduojamąją) dielektrinę funkciją, kuri būtina jų susidarymui [6]. Vėliau A. Sommerfeld papildė šiuos tyrimus, pastebėdamas, kad J. Zennecko aprašytų paviršinių bangų lauko stipris mažėja atvirkščiai proporcingai šaltinio atstumo kvadratui [7]. Taip pat buvo nustatyta, kad šios bangos sklinda dideliu greičiu ir jų intensyvumas eksponentiškai mažėja tolstant nuo paviršiaus. 1957 m. R. H. Ritchie teoriškai įrodė, kad metalų paviršiuose gali susidaryti plazmonų sužadinimai [8]. Vėliau C. H. Powell su kolegomis nustatė, kad šie PP gali būti sužadinami elektronų poveikiu metalinių paviršių sandūroje [9]. E. A. Stern su bendradarbiais ištyrė, kaip elektromagnetinės bangos metalo paviršiuje sąveikauja su plazmonais, ir apskaičiavo jų dispersijos kreives [10]. 1968 m. A. Otto sukūrė susilpninto visiško atspindžio (angl. *attenuated total reflection*) metodą, kuris leido optiniu būdu sužadinti didelio ilgio elektromagnetines bangas paviršinių bangų forma [11]. Šio metodo veikimas grindžiamas tuo, kad tarp prizmės ir metalo sluoksnio paliekamas nedidelis tarpas, todėl šviesa gali sąveikauti su metaliniu paviršiumi be tiesioginio kontakto. Tuo tarpu E. Kretschmann pasiūlė kitą PPR konfigūraciją, kurioje ant prizmės paviršiaus padengiamas 10-100 nm

storio metaliniu sluoksniu. Šioje struktūroje plazmonai sužadinami tiesiogiai šiame metaliniame sluoksnyje [12]. X. D. Hoa ir J. Homola su kolegomis pateikė išsamias apžvalgas apie PPR jutiklių technologiją [13,14], apibendrindami jų pagrindines taikymo sritis ir skirtingus veikimo metodus, tokius kaip interferometrija ir liuminescencija [15], naudojamus cheminių ir biologinių jutiklių charakteristikoms nustatyti. Taip pat buvo išanalizuotos optinių jutiklių fizinės, cheminės ir morfologinės savybės bei jų veikimo principai. Kiti tyrimai nagrinėjo cheminių ir biologinių jutiklių, pagrįstų optinėmis skaidulomis, veikimo ypatumus [16]. Be to, A. K. Sharma su kolegomis išsamiai išanalizavo šviesolaidžių pagrindu sukurtus jutiklius [17].

1.1.1 PPR spektroskopijos principas

Paviršiniai plazmonai susiformuoja, kai poliarizuota šviesa sužadina metalo paviršiuje esančius laisvuosius laidumo elektronus sandūroje su dielektriku. Esant tam tikroms sąlygoms, šviesos fotonų energija perduodama šiems elektronams, kurie ima kolektyviai osciliuoti tam tikru dažniu [18,19]. Šie virpesiai vadinami PP, o jų sužadinimas – PPR. Energijos perdavimas vyksta tik tada, kai fotonų energija ir impulso kiekis tiksliai atitinka PP energijos lygmenį, t.y. kai tenkinamos rezonanso sąlygos [19,20]. Kai šviesa krinta į metalinio sluoksnio ir dielektriko sąsają kritiniu kampu, įvyksta VVA – visa šviesa atsispidi toje pačioje terpėje, tačiau dalis jos elektrinio lauko prasiskverbia į mažesnio lūžio rodiklio terpę ir sukuria greitai nykstančią bangą (angl. *evanescent wave*). Šios bangos intensyvumas mažėja eksponentiškai, o jos įsiskverbimo gylis priklauso nuo šviesos bangos ilgio bei terpės optinių savybių [20]. Greitai nykstanti banga paprastai tęsiasi iki ~300 nm nuo metalo paviršiaus, todėl puikiai tinka biomolekulių sąveikų stebėjimui, nes daugelio biologiškai aktyvių molekulių (baltymų, DNR, antigenų) dydis neviršija šio atstumo [21]. Kai greitai nykstančios bangos fotonų dažnis sutampa su PP svyravimo dažniu, susidaro rezonansinė būsena, dėl kurios įvyksta energijos perdavimas ir PP sužadinimas. Šis reiškinys pasireiškia kaip atspindėtos šviesos intensyvumo sumažėjimas – rezonansinis minimumas, kuris stebimas spektre arba kampo priklausomybės kreivėje [20].

Efektyviam PP generavimui metalo sluoksnis nusodinamas ant skaidraus pagrindo, pavyzdžiui, stiklo ar silicio ir kontaktuoja su dielektriku [18]. Dažniausiai naudojamas Au sluoksnis, kurio storis siekia apie 50 nm [22]. Au pasižymi dideliu cheminiu stabilumu, inertiškumu ir suderinamumu su biocheminėmis sistemomis, todėl jis plačiai taikomas PPR jutikliuose [23]. Ag pasižymi didesniu PPR jautrumu aplinkos lūžio rodiklio pokyčiams ir

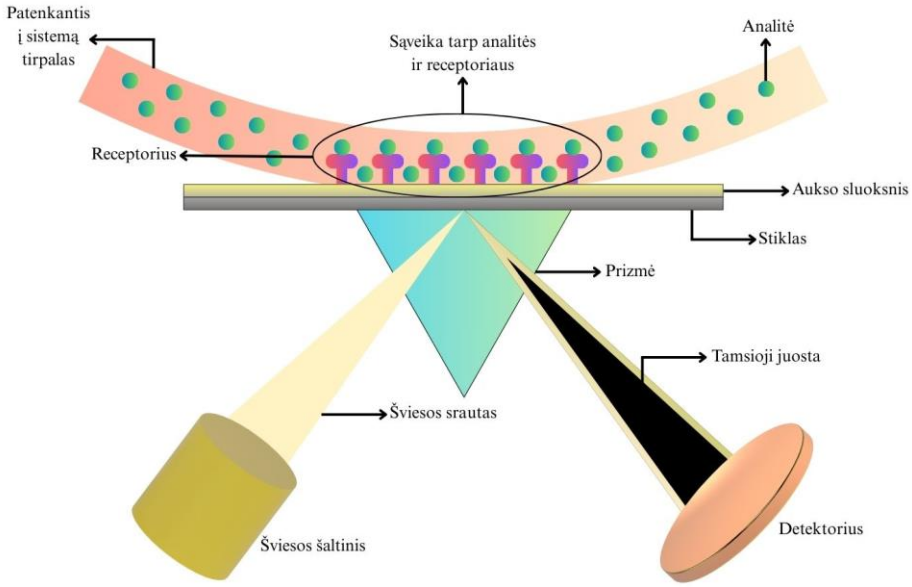
mažesniu plazmonų slopinimu, todėl generuoja siauresnę rezonanso kreivę. Tačiau dėl oksidacijos ir sulfidacijos (angl. *sulfidation*) jis yra mažiau stabilus, todėl praktiniuose jutikliuose taikomas rečiau [24]. Stabilumo pagerinimui gali būti naudojami Au dengti Ag sluoksniai, dielektriniai tarpsluoksniai arba savaime susiformuojantys monosluoksniai (SAM) [25,26]. Be metalo rūšies, svarbus ir sluoksnio storis: per storas sluoksnis mažina rezonanso intensyvumą, o per plonas – išsklaido kreivę, todėl sumažėja jutiklio jautrumas. Optimalus Au sluoksnio storis yra apie 50 ± 2 nm [22]. PPR jutikliuose naudojama šviesa turi būti monochromatinė ir/ar poliarizuota, nes tik taip įmanoma efektyviai sužadinti PP [27].

PPR kampas priklauso nuo metalo sluoksnio optinių savybių, krintančios šviesos bangos ilgio ir su metalu kontaktuojančios terpės lūžio rodiklio [28]. Kadangi lūžio rodiklis priklauso ir nuo temperatūros, PPR matavimai paprastai atliekami pastovioje temperatūroje, nors kai kuriais atvejais temperatūros priklausomybė gali būti panaudota papildomai informacijai gauti [29]. Kai prie jutiklio paviršiaus prisijungia biomolekulės, jos pakeičia lūžio rodiklį, o tai sukelia rezonansinio kampo arba bangos ilgio poslinkį, proporcingą prisijungusių biomolekulių masei [30], [29]. Tokiu būdu PPR leidžia stebėti biomolekulines sąveikas be jokių žymenų – signalas fiksuojamas sensogramoje, kur rezonansas pasireiškia kaip kreivės minimumas [20]. Pokyčiai matuojami rezonanso vienetais (RU), kurių kitimas yra tiesiogiai proporcingas paviršiuje prisijungusios masės pokyčiui (pavyzdžiui, $1000\ \text{RU} \approx 1\ \text{pg/}\mu\text{m}^2$) [31]. Sąveikos pradžioje biomolekulių prisijungimas prie paviršiaus yra intensyvus, vėliau procesas lėtėja ir pasiekia pusiausvyrą tarp asociacijos ir disociacijos [32]. Šių kinetinių procesų analizė leidžia nustatyti jungimosi stiprumą, specifiškumą ir analitės koncentraciją, todėl PPR metodas plačiai taikomas biocheminėje analizėje, biomedicinoje ir aplinkos tyrimuose [33].

1.1.2 PPR spektroskopijos prietaisas

Nuo to laiko, kai buvo sukonstruotas pirmas PPR spektroskopijos prietaisas, tokie instrumentai smarkiai patobulėjo tiek technologijų, tiek jų pritaikymo srityse. PPR spektroskopijos prietaisai skirstomi pagal matavimo principą, kai matuojamas rezonansinis kampas ar bangos ilgis. Be Otto ir Kretschmann konfiguracijų preitaisų egzistuoja instrumentai, paremti šviesolaidžių (angl. *fiber-optic*) arba difrakcinių gardelių (angl. *grating-coupled*) taikymu [34]. Praktikoje dažniausiai naudojami Kretschmann konfiguracijos prietaisai, kuriuose stebimas rezonansinio kampo pokytis. Paprastai jie susideda iš kelių

pagrindinių dalių. Pirmiausia, reikalingas optinis šviesos šaltinis – dažniausiai tai aukšto efektyvumo šviesos diodas (LED), skleidžiantis artimosios infraraudonosios šviesos spindulius, kurie yra nukreipiami naudojant optinę sujungimo dalį. Jutiklio pagrindą PPR instrumente paprastai sudaro stiklinė ar plastikinė plokštelė, padengta plonu metaliniu sluoksniu, ant kurio imobilizuojamos molekulės. Šviesos pokyčius fiksuoja detekcijos sistema, dažniausiai naudojanti krūvio sąsajos įtaisą (angl. *charge-coupled device*, CCD). Norint užtikrinti matavimų tikslumą ir stabilumą, prietaise yra automatinė skysčių padavimo sistema [35]. Žemiau 1 pav. pateikiama PPR matavimo sistema.



1 pav. PPR matavimo sistema [36].

1.1.3 PPR lusto modifikavimas

Atliekant PPR spektroskopijos eksperimentus, vienas svarbiausių etapų yra metalinio paviršiaus padengimas įvairiais sluoksniais, kad būtų paruoštas PPR lustas biomolekulių imobilizacijai. Prieš naudojimą metalinis paviršius turi būti kruopščiai išvalytas ir funkcionalizuotas. PPR spektroskopijos lustuose dažniausiai naudojamas Au, nes jis yra chemiškai stabilus ir atsparus korozijai. Be to, junginiai, turintys tiolio grupes, gali savaime prisijungti prie Au paviršiaus dėl stiprios Au ir sieros sąveikos. Kai kuriuose tyrimuose, kaip PPR spektroskopijos lusto metalo sluoksnis yra naudojamas Ag, tačiau pagrindiniai trūkumai yra cheminis nestabilumas ir greita oksidacija

kontaktuojant su oru [37]. Dėl šių priežasčių Au išlieka pagrindiniu pasirinkimu PPR tyrimuose.

1.1.4 PPR lusto paruošimas

Prieš dengiant metalo paviršių organiniu sluoksniu, būtina jį nuvalyti, siekiant pašalinti visus nešvarumus – tiek neorganinius, tiek organinius – ir sudaryti tinkamas sąlygas tolimesnei paviršiaus modifikacijai. Dažniausiai naudojami paviršiaus paruošimo metodai yra šie: panardinimas į „Piranijos“ mišinį (H_2SO_4/H_2O_2), panardinimas į koncentruotą NaOH tirpalą (2,5 mol l^{-1}), panardinimas į amoniako-peroksido vandeninį mišinį ($NH_4OH/H_2O_2/H_2O$) ir apdorojimas deguonies plazma [38]. P. Rodríguez-Franco su kolegomis tyrė, kaip skirtingi paviršiaus paruošimo metodai veikia PPR jutiklių funkcionalizaciją ir optines savybes. Modeliu buvo pasirinktas trombiną atpažįstantis aptameras, kuris buvo imobilizuotas tiolinto aptamero SAM arba naudojant neutravidino ir biotilinto aptamero sąveiką. Labiausiai nelygus paviršius buvo gautas po apdorojimo „Piranijos“ ir amoniako-peroksido vandeniniais mišiniais. Be to, pastebėta, kad naudojant „Piranijos“ tirpalą, organofosforo rūgštys adsorbuojasi didžiausiu laipsniu. Nors metodas veiksmingas, Au paviršiaus paruošimui jis taip pat turi savų apribojimų – gali pakisti morfologinė Au struktūra, padidėti paviršiaus hidrofilinės savybės dėl hidroksigrupių prisijungimo, o po kelių panaudojimų gali atsirasti defektų ir netgi Au sluoksnis gali pradėti irti. Tuo tarpu deguonies plazma taip pat veiksmingai pašalina organinius nešvarumus kaip ir „Piranijos“ mišinys, tačiau gali būti taikoma pakartotinai, nesukeldama reikšmingų paviršiaus pokyčių [39]. Be to, ji suformuoja lygesnį ir tolygesnės struktūros paviršių. Po aktyvavimo ant Au paviršiaus yra nusodinamos jungiančiosios molekulės, kurios atlieka skirtingas funkcijas, kaip bus aptarta toliau.

1.1.5 PPR lusto padengimas tioliais

Aukso paviršius pasižymi dideliu specifiškumu tioliams, todėl jų pagalba galima suformuoti SAM paviršiuje. SAM susidaro spontaniškai išsidėstant alkanotioliams ant Au paviršiaus. Priklausomai nuo keliamų reikalavimų gali būti naudojami skirtingi alkantioliai su įvairiomis galinėmis funkcinėmis grupėmis (-CH_3, -COOH, -NH_2, -OH), metilo grupių skaičiumi bei aromatine ar alifatine struktūra [40]. Viena dažniausiai naudojamų jungiamųjų medžiagų yra 11-merkaptoundekano rūgštis (MUR), kuri pasižymi hidrofilinėmis savybėmis. Jos karboksigrupė gali lengvai reaguoti su pirminėmis

aminogrupėmis, esančiomis antikūnuose [41] ir baltymuose [42], naudojant EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidą ir N-hidroksisukcinimidą), formuojant stabilų kovalentinį ryšį. Didinant paviršiaus sąlyčio plotą su biologiniais receptoriais, taikoma strategija, kai MUR maišoma su trumpesnės grandinės tioliais, tokiais kaip 1-oktanotiolis [41] arba 3-merkaptopropiono rūgštis [43]. Mišrus SAM iš 3,3′-ditiodipropiono rūgšties di(N-hidroksisukcinimido esterio) (DSP) ir 6-merkapto-1-heksanolio (MCH) sumažina sterines kliūtis ir nespecifines sąveikas [44]. Nepaisant to, kad DSP ir MCH turi vienodą grandinės ilgį, buvo nustatyta, jog DSP geriau suriša jaučio serumo albuminą (JSA) ir lizocimą. Naudojant tokį SAM buvo sukurtas trombino imuninis jutiklis. Trombino antikūnai buvo imobilizuojami ant DSP/MCH sluoksnio. Jutiklio aptikimo diapazonas buvo 1,0–500,0 nmol l^{-1} [44,45]. Vis dėlto, tiolinių SAM sluoksnių formavimas turi ir trūkumų. Pirma, jie nėra stabilūs ilgai laikant kambario temperatūroje, nes tiolų grupės linkusios oksiduotis. Be to, pats procesas yra ilgas, nes tiolinių SAM sluoksnių formavimas paprastai trunka ≥12 valandų [46].

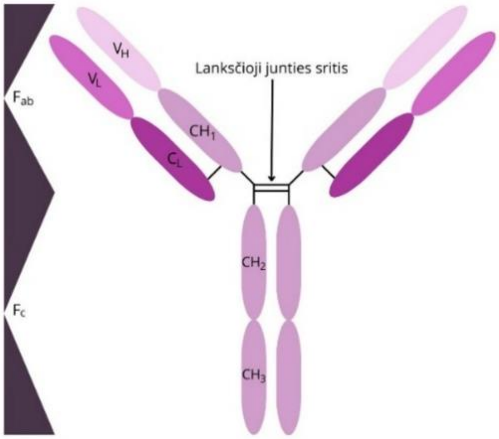
Kita alternatyva – tiesioginė biomolekulių, kurios viename gale jau turi tiolio funkcines grupes, imobilizacija ant Au paviršiaus. W. W. Wang su kolegomis tyrė specifinio aptamero tiesioginį prisijungimą prie Au, siekiant aptikti *E. coli* ir *S. aureus*. Jie analizavo imobilizuoto trumpos grandinės aptamero su tiolio funkcinėmis grupėmis gale sluoksnio storį, esant skirtingoms NaCl koncentracijoms, ir nustatė, kad mažesnės druskos koncentracijos sąlygomis aptamero sluoksnio storis didėjo. Taip pat buvo pastebėta, jog NaBr pridėjimas padidino aptamero tankį ant paviršiaus [47]. Kitame tyrime buvo palygintos tris skirtingas ssDNR imobilizavimo strategijas ant Au paviršiaus: tiolių chemosorbcija (DNR-SH), ditiokarbamatų chemisorbcija (DNR-DTC) ir fizinė adsorbcija. Siekiant sumažinti nespecifinę adsorbciją ir užblokuoti defektus, vėliau buvo pridėtas MCH. Rezultatai parodė, kad DNR-SH sluoksnis pasižymėjo didžiausiu stabilumu tiek homogeniškame, tiek mišriame su MCH sluoksnyje, o DNR-DTC buvo linkęs desorbuotis MCH aplinkoje [48].

L. Simon su kolegomis mikrospotingo būdu (angl. *microspotting method*) suformavo peptidinių nukleorūgščių (PNR) sluoksnį, tiesiogiai prijungdami tiolintą PNR prie Au paviršiaus. Jie stebėjo aukšto specifiškumo sąveikas tarp PNR ir mirkoribonukleino rūgštimi (mikroRNR). Palyginus iš anksto su komplementaria DNR grandine hibridizuotus PNR fragmentus su viengrandžiais ssPNR, buvo nustatyta, kad hibridizuoti PNR fragmentai pasižymėjo platesniu mikroRNR aptikimo diapazonu, o mažiausia aptikta koncentracija siekė 140 fmol l^{-1} [49].

Tiesioginė biomolekulių imobilizacija ant Au paviršiaus turi tam tikrų trūkumų, įskaitant nespecifines sąveikas ir galimą fizinę adsorbciją, tačiau šis metodas yra mažiau laiko reikalaujantis ir apima mažiau reagentų nei tradiciniai SAM metodai ir leidžia tiesiogiai panaudoti funkcionalizuotas biomolekules. Jei molekulės neturi tiolinės grupės savo sudėtyje, reikia atlikti jų funkcionalizacija. Šio procesas reikalauja papildomu laiko ir reagentų sąnaudų bei gali sumažėti biomolekulių aktyvumas.

1.1.6 Biomolekulių prijungimas

Yra įvairių biomolekulių ir jų imobilizacijos metodų, leidžiančių sukurti biologinius jutiklius. Dažniausiai naudojamos biomolekulės yra antikūnai, peptidai ir aptamerai [50]. Antikūnai – tai dideli Y formos baltymai, kuriuos imuninė sistema naudoja atpažinti ir neutralizuoti svetimus patogenus, tokius kaip bakterijos ir virusai. Antikūno molekulė (2 pav.) susideda iš trijų funkcinių komponentų: dviejų antigeną atpažįstančių fragmentų (F_{ab}) ir efektorinio antikūno fragmento (F_c). Kiekvieną F_{ab} fragmentą sudaro lengvoji grandinė (V_L ir C_L sritys) ir dalis sunkiosios grandinės (V_H ir CH_1 sritys). V_H ir V_L domenai sudaro F_{ab} fragmento viršūnę, kurioje lokalizuotas paratopas – antigeno prisijungimo vieta, atsakinga už atrankų prisijungimą prie specifinės antigeno struktūros, vadinamos epitopu (antigeniniu determinantu) [51]. Paratopų lokalizacija antikūno kintamosiose srityse bei didelė galimų F_{ab} struktūrinių konfigūracijų įvairovė paaiškina didelę antigenų atpažinimo variaciją, stebimą tarp skirtingų antikūnų [52]. F_{ab} fragmentai yra sujungti su F_c sritimi per lanksčią jungties sritį, kuri suteikia F_{ab} fragmentams didelį konformacinį lankstumą F_c atžvilgiu ir leidžia efektyviai sąveikauti su tiksliniais antigenais. Dėl šios struktūrinės sandaros F_{ab} sritis yra pagrindinis funkcinis elementas biologinių jutiklių sistemose. Tuo tarpu glikozilinta F_c sritis, sudaryta iš identiškų CH_2 ir CH_3 domenų porų, sąveikauja su F_c receptoriais, esančiais įvairių tipų ląstelėse, įskaitant makrofagus ar B limfocitus ir yra atsakinga už efektorinių imuninės sistemos mechanizmų aktyvavimą [53].



2 pav. Antikūno struktūra [52].

PPR pagrindu veikiančiuose biologiniuose jutikliuose antikūnai dažnai imobilizuojami ant jutiklio paviršiaus atsitiktiniu būdu, kai jų prijungimas nėra orientuotas konkrečios molekulės dalies atžvilgiu. Tokiu atveju antikūno molekulės prie paviršiaus gali būti prisijungusios įvairiomis dalimis, tačiau antigeno atpažinimas ir prisijungimas vis tiek vyksta per F_{ab} fragmentų antigeno atpažinimo vietas, išliekančias biologiškai aktyvias [54].

Net ir esant atsitiktiniam imobilizavimui, PPR metodas leidžia registruoti antikūno-antigeno sąveiką, nes prisijungus antigenui prie Fab fragmentų padidėja paviršiaus masė ir pasikeičia lūžio rodiklis prie jutiklio paviršiaus. Šie pokyčiai sukelia PPR poslinkį, kuris yra proporcingas prie paviršiaus prisijungusių antigenų kiekiui [4]. Nors dalis F_{ab} fragmentų gali būti steriškai ribojami dėl atsitiktinės orientacijos, pakankamas aktyvių F_{ab} vietų skaičius užtikrina patikimą ir pakartojamą antigeno aptikimą [55].

1.1.7 PPR biologiniai jutikliai

PPR yra viena plačiausiai tiriamų technologijų kuriant biologinius jutiklius medicininei diagnostikai. Jie pasižymi dideliu jautrumu, greita reakcija, lengva integracija, geru stabilumu ir puikiu atkuriamumu imunologiniuose tyrimuose. Pavyzdžiui, W. T. Hsu su kolegomis sujungė PPR spektroskopiją su difrakcinių gardelių šviesolaidžiu. Šiame jutiklyje AuND imobilizuotos ant stiklo paviršiaus, o priešingoje pusėje įmontuota difrakcinė gardelė, suformuota šviesai jautraus reljefinio štampavimo metodo (angl. *UV-assisted embossing*). Aptikimas grindžiamas difrakcijos maksimumo poslinkio stebėjimu, kuris kinta priklausomai nuo aplinkos lūžio rodiklio ir biomolekulių prisijungimo prie AuND paviršiaus. Jutiklis pasiekė

3,1 x 10^{-4} RIU (angl. *refractive index unit*)ir 4,4 pmol l^{-1} dinitrofenilo antikūno aptikimo ribą [56].

PPR metodą galima naudoti ir su kitomis technikomis. Mokslininkas J. Wang su kolegomis pristatė dvigubos funkcijos plazmoninį biologinį jutiklį, kuriame naudojamos dvimatės nanosalelės (AuNIs) struktūros, sujungiančios plazmoninį fototerminį (PPT) efektą ir lokalizuotą paviršiaus plazmonų rezonansą (LPPR). Tai siūlo alternatyvų ir perspektyvų sprendimą Covid-19 diagnozei, pasižymintį dideliu jautrumu ir tikslumu. Siekiant įvertinti jutiklio veikimą, buvo atlikti testai su RdRp-COVID (angl. *RNA-dependent RNA polymerase protein of COVID*) baltymu skirtingose koncentracijose (nuo 0,01 pmol l^{-1} iki 50 μmol l^{-1}). Taip pat buvo įvertinta, kaip šis LPPR jutiklis geba atpažinti skirtingas SARS-CoV-2 ir SARS-CoV genomines sekas, įskaitant SARS-CoV-2 ORF1ab (angl. *SARS-CoV-2 open reading frame 1ab*) bei SARS-CoV RdRp seką. Kadangi klinikinėje diagnostikoje kvėpavimo takų mėginiai po viruso lizės (suardymo) ir RNR išskyrimo gali turėti kelias to paties viruso nukleorūgščių sekas, jutiklio gebėjimas tiksliai aptikti specifinę seką, nepaisant kitų nespecifinių sekų trikdžių, parodo jo pritaikymo realioms klinikinėms analizėms galimybes. Eksperimentiniai duomenys parodė, kad, dvigubos funkcijos LPPR biologinis jutiklis su *in situ* PPT sustiprinimu pasiekė 96 % aptikimo tikslumą, patvirtindamas didelį šio metodo jautrumą ir patikimumą nustatant SARS-CoV-2 [57].

PPR spektroskopijos biologiniai jutikliai taip pat naudojami temperatūros matavimams. S. Wu su kolegomis aprašė jutiklį, kuris ne tik matuoja temperatūrą, bet ir pritaikomas gliukozės koncentracijos aptikimui, kad būtų galima kompensuoti aplinkos temperatūros pokyčius matavimo metu. Jutiklis turi dvikanalę struktūrą su šoniniu pluoštu, kur vienas kanalas yra padengtas polidimetilsiloksanu aplinkos temperatūros matavimui, o kitas – gliukozės oksidaze (GOx) gliukozės koncentracijos aptikimui. Tokia konstrukcija leidžia tiksliai ir realiuoju laiku matuoti gliukozės kiekį su aptikimo riba iki 16,24 μmol l^{-1} [58].

PPR jutikliai taip pat naudojami pavojingoms infekcijoms, pavyzdžiui, dengės karštinei, diagnozuoti. P. M. P. Gouvêa su kolegomis sukūrė optinį šviesolaidinį jutiklį, pagrįstą LPPR ir aukso nanodalelėmis (AuND). Ant šių ND buvo imobilizuoti antikūnai prieš dengės viruso N baltymą 1 (anti-NS1). Antikūnais padengtos ND buvo pritvirtintos ant standartinio pluošto (62,5 μm/125 μm) galo. Jutiklis leido aptikti įvairias dengės viruso N baltymo koncentracijas kraujo mėginiuose, kurių aptikimo riba siekė 0,074 μg ml^{-1} (1,54 nmol l^{-1}). Aptikimas buvo atliekamas naudojant vos vieną kraujo lašą,

todėl šis jutiklis laikomas perspektyviu įrankiu ankstyvai dengės karštinės diagnostikai [59].

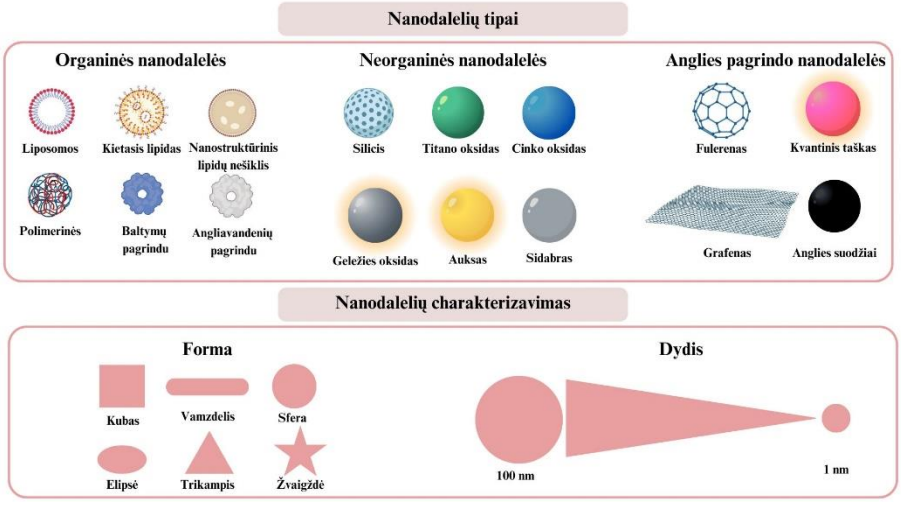
Kitas svarbus PPR biologinių jutiklių tyrimų laukas – vėžio diagnostika. S. Song su kolegomis [60] sukūrė pažangų PPR biologinį jutiklį, kuris gebėjo aptikti mutavusius baltymus paciento mėginiuose. Jutiklis buvo skirtas mutavusio p53 baltymo nustatymui, analizuojant DNR ir baltymo sąveiką ant aukso nanostrypeliais dengto paviršiaus. Šis biologinis jutiklis leido realiu laiku stebėti DNR ir baltymo sąveikas, todėl galima buvo įvertinti disociacijos konstantas (K_D) ir transkripcijos aktyvumą tiek normaliems, tiek mutavusiems baltymams. Sujungus kinetinę DNR-baltymo sąveikos analizę su LPPR spektrų maksimumo poslinkių stebėjimu, buvo sukurtas itin dideliu specifiškumu bei labai maža aptikimo riba (11,47 fmol l^{-1}) pasižymintis mutavusių baltymų aptikimo metodas. Šis labai patikimas jutiklis turi potencialą būti taikomas vėžio diagnostikai ir prognozei, tiksliai atskiriant klinikinę reikšmę turinčius mutavusius baltymus žmogaus mėginiuose.

Galiausiai, PPR spektroskopijos biologiniai jutikliai yra pritaikyti ir įvairių biomolekulių, tokių kaip DNR, nustatymui. Mokslininkas W. Gong su kolegomis sukūrė D-formos plastikinio šviesolaidžio (D-POF) PPR spektroskopijos biologinį jutiklį, kuris pagrįstas grafeno/aukso plėvele (G/Au), skirta DNR hibridizacijos proceso aptikimui. Norint pagerinti PPR jutiklių jautrumą, buvo naudojamas fizinio garų nusodinimo (PVD) metodas, kuriuo auksinė plėvelė buvo tiesiogiai užgarinta ant grafeno, augančio ant vario folijos. Auksinė plėvelė atliko tradicinio polimetilmetakrilato (PMMA) funkciją, užtikrindama lygų paviršių ir tolygų kontaktą su grafenu. Šis procesas leido grafenui ir auksinei plėvelei sukurti tolygų kontaktą. Vėliau G/Au struktūra buvo perkeliama ant D-formos pluošto. Palyginus su kitais jutikliais pagrįstais plastikinio šviesolaidžio naudojimu, pasiūlyto jutiklio jautrumas buvo žymiai pagerintas ir apskaičiuotas kaip 1227 nm RIU^{-1}, matuojant gliukozės tirpale. Be to, stebint rezonanso bangos ilgio pokyčius, jutiklis galėjo tiksliai nustatyti DNR hibridizaciją ir aptikti vieno nukleotido polimorfizmus, pabrėžiant šio metodo plačias galimybes medicininėje diagsnotikoje [61].

PPR spektroskopija, tiek atskirai, tiek derinant su kitais metodais, leidžia sukurti įvairias metodikas, skirtas naudoti ne tik medicinoje, bet ir kitose srityse. Panaudojant įvairias ND bei jų dangas, galima išgauti itin jautrius ir specifiškumu pasižyminčius metodus, kurie išplečia PPR taikymo galimybes tiek moksliniuose tiek pramoniniuose tyrimuose.

1.2 Nanodalelės ir jų taikymas biologiniuose jutikliuose

Nanodalelės – tai itin mažos dalelės, kurių dydis yra mažesnis nei 100 nm. Jos gali būti sudarytos iš skirtingų medžiagų, pavyzdžiui anglies, metalų (Me), metalų oksidų (MeO) arba organinių medžiagų [62]. ND pasižymi unikaliomis fizikinėmis, cheminėmis ir biologinėmis savybėmis, kurios skiriasi nuo didesnių dalelių savybių. Tai gali lemti tokius privalumus kaip didesnis cheminis aktyvumas, stabilumas, didesnis paviršiaus plotas, tenkantis tūriniam vienetui, bei didesnis mechaninis stiprumas. ND skiriasi dydžiu, forma ir erdviniais matmenimis. Pavyzdžiui, nanotaškai ir klasteriai priskiriami prie nulinio matmens (0D) ND, nes visi jų matmenys yra nanometrų diapazone. Nanovamzdeliai, nanostrypai ir nanovielos yra vieno matmens (1D) ND, nes du matmenys yra nanometrų diapazone [63]. Dviejų matmenų (2D) medžiagos, tokios kaip grafito anglies nitrido plėvelės ar fosforenų lapeliai, yra itin plonos ir vienas jų matmuo (storis) yra nanometrų diapazone [3],[4]. Trimatės (3D) nanostruktūros, tokios kaip tankios polikristalinės arba porėtos struktūros, yra sudarytos iš 0D, 1D ir 2D komponentų [66,67]. ND gali skirtis ne tik dydžiu, bet ir forma – jos gali būti rutulio, cilindro, vamzdinės, kūginės, spiralinės ar plokščios formos. Paviršiai gali būti lygūs arba nelygūs arba banguoti. Kai kurios ND turi kristalinė struktūrą (sudarytą iš vieno arba kelių kristalų), o kitos amorfinės (neturinčios griežtos tvarkos). Jos gali būti pavienės arba susijungusios į grupes (agregatus) [68]. Galimi ND klasifikacijos variantai yra pavaizduoti 3 paveiksle.



3 pav. Įvairių ND klasifikavimas [69].

Per pastaruosius 20-30 m. nanotechnologijos pasiekė didelę pažangą tiek plėtros, tiek praktinio taikymo srityse. Tuo tarpu sukurta daugybė ND, kurios padeda pagerinti biologinių jutiklių veikimą [70]. Pavyzdžiui, 3 paveiksle pavaizduotos įvairios nanomedžiagos, naudojamos biologiniuose jutikliuose.

ND kuriamos pasitelkiant įvairias technologijas, tokias kaip „iš viršaus į apačią“ (kai didesnės medžiagos perdirbamos iki nanolygmens) ir „iš apačios į viršų“ (kai nanometrinės dalelės ar struktūros formuojamos iš atomų ar molekulių). Šios metodikos apima įvairias technikas, pavyzdžiui, cheminį garų nusodinimą, biosintezę, hidroterminę sintezę („iš apačios į viršų“) arba mechaninį malimą, litografiją, lazerinį abliavimą („iš viršaus į apačią“) [70].

Taip pat daug dėmesio skiriama MeO pagrindu sukurtoms nanomedžiagoms, tokioms kaip nanovielos, nanostrypai, anglies nanovamzdeliai, KT ir nanokompozitai. Šios medžiagos gali atverti naujas biologinių jutiklių tobulinimo galimybes. Jas galima pritaikyti ir taip, kad atitiktų specifinius biologinių jutiklių poreikius [70]. ND gali būti naudojamos nuotekų valymui [71], aplinkos stebėjimui [72], kaip priedai maisto produktams gerinti [73] ar kaip antimikrobinės medžiagos kovai su bakterijomis [74]. ND išsiskiria priešuždegiminėmis ar antibakterinėmis savybėmis bei gebėjimu efektyviai pernešti vaistus. Būtent šios savybės lemia, kad ND tampa nepakeičiamos biotechnologijų ir mikrobiologijos srityse [75].

1.2.1 Nanodalelių optinės savybės

Nanomedžiagų optinės savybės – tokios kaip šviesos sklaida, pralaidumas, sugertis ir spinduliavimas – priklauso nuo jų elektroninės struktūros, kuri gali pasikeisti atsižvelgiant į ND formą, dydį ir paviršiaus ypatybes. Kadangi elektroninė ND struktūra labai priklauso nuo paviršiuje esančių atomų, dvi pagrindinės priežastys, dėl kurių nanomedžiagų optinės savybės keičiasi priklausomai nuo dydžio, yra padidėjęs energetinių lygmenų skirtumas (kvantinis efektas) ir PPR [76]. Šie nuo dydžio priklausomi optinių savybių pokyčiai pasireiškia, kai ND dydis sumažėja iki mažiau nei 10 nm [77]. Tokiose mažose dalelėse elektronai nebegali judėti, kaip tai vyksta su mikrometrinėmis ar makrometrinėmis dalelėmis. Dėl šios priežasties ND šviesą sugeria ir skleidžia kitaip nei įprastos medžiagos. Pagrindinis poveikis atsiranda elektroninėje struktūroje – valentinėje juostoje ir laidumo juostoje [78]. Elektronui pereinant iš vienos juostos į kitą, įvyksta šviesos sugertis arba spinduliavimas. Šviesos bangos ilgis (λ) yra susijęs su energijos skirtumu (ΔE) tarp šių lygmenų pagal formulę:

$$\lambda = \frac{hc}{\Delta E}, \quad (1)$$

kur h – Planko konstanta, c – šviesos greitis.

Didesnis energijos skirtumas ΔE lemia trumpesnės bangos ilgio šviesos spinduliavimą, o mažesnis – ilgesnės bangos ilgio šviesos skleidimą. Ši savybė ypač ryški puslaidininkių medžiagose, kuriose draustinės juostos plotis didėja mažėjant dalelės dydžiui. ND emisijos spektro ilgis priklauso nuo jų dydžio ir sudėties, todėl šių parametrų modifikavimas leidžia reguliuoti šviesos emisijos spektrą – nuo ultravioletinės iki matomosios ir infraraudonosios srities. Pavyzdžiui, koloidinių CdSe–CdS šerdies–apvalkalo ND emisijos spektro bangos ilgis gali būti valdomas keičiant jų dydį intervale nuo 2 iki 6 nm, o tai leidžia emisijos maksimumą perkelti per visą matomosios šviesos spektrą: mažesnės dalelės spinduliuoja mėlyną, o didesnės – raudoną šviesą [79].

Kai ND dydis tampa mažesnis už šviesos bangos ilgį, jų optinėse savybėse pradeda dominuoti PPR efektas. Šis reiškinys atsiranda, kai laisvieji elektronai laidumo juostoje rezonuoja kartu su šviesos energija. PPR intensyvumas priklauso nuo sužadintų elektronų skaičiaus ir terpės dielektrinės konstantos, kurioje yra ND. Skirtingai nei didesnių dalelių atveju, ND, ypač metalinės, dėl savo mažo dydžio gali generuoti LPPR. Jų laisvieji elektrodai natūraliai rezonuoja tam tikru dažniu, kuris priklauso nuo ND sudėties, dydžio ir formos. Pavyzdžiui, skiriasi koloidinių Au ar Ag ND tirpalų spalvos priklausomai nuo jų dydžio ir formos [80].

Tiek kvantinis efektas, tiek PPR yra pagrindiniai veiksniai, leidžiantys ND pasižymėti unikaliomis optinėmis savybėmis. Atsižvelgiant į jų savybes, ND gali būti pritaikytos įvairiose srityse, tokiose kaip biomedicina, fotonika ir biotechnologija.

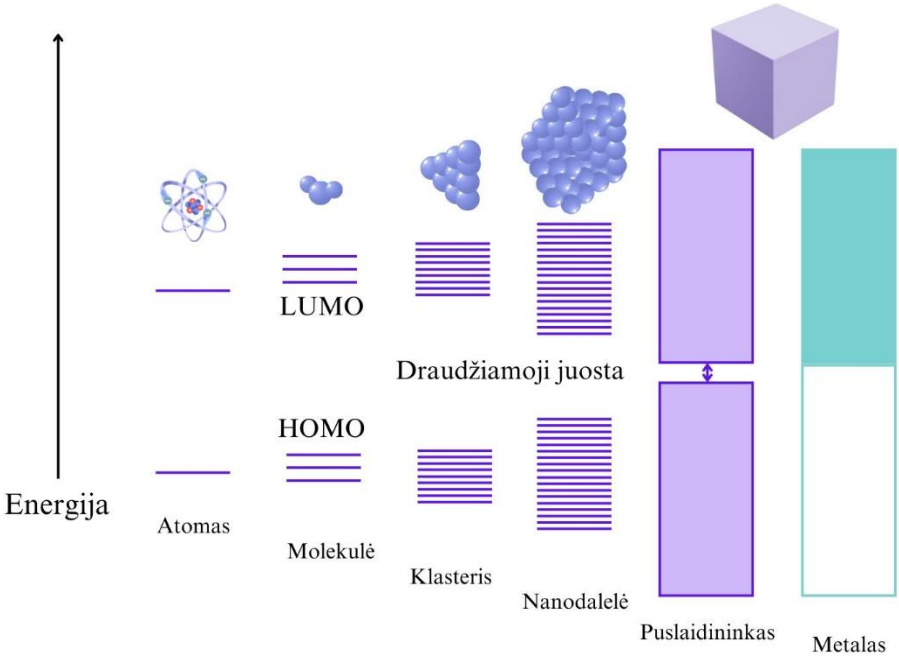
1.2.2 Nanodalelių elektrinės savybės

Elektrinės savybės, tokios kaip laidumas ir varža, apibūdina medžiagos gebėjimą praleisti elektros srovę. Kaip ir optinės savybės, šios savybės reikšmingai keičiasi nanomatmenų diapazone. ND elektrinės savybės daugiausiai susijusios su krūvio nešiklių judrumu. Kai dalelių dydis sumažėja iki nanometrinio lygmens, pasireiškia kvantinio dydžio ir kvantinio suvaržymo efektai. Dėl energijos kvantavimo, kai kurių metalų ND tam tikroje įtampoje gali tapti nelaidžiomis. Pavyzdžiui, varis (Cu) yra puikus elektros laidininkas, tačiau Cu kelių nanometrų ND gali prarasti savo laidumą [81]. Priešingai izoliacinės medžiagos, tokios kaip silicio dioksidas (SiO_2), ND gali tapti laidžiomis [82].

ND dielektrinės savybės, varža ir elektronų pernašos savybės taip pat priklauso nuo paviršiuje esančių atomų arba jonų skaičiaus, defektų skaičiaus

ir legiravimo [83]. Bendru atveju ND laidumas yra mažesnis nei mikrometrinių ar makrometrinių dalelių dėl padidėjusios draustinės juostos energijos, mažėjant dalelių dydžiui [84]. Pavyzdžiui, sumažinus AuND dydį iki 2-3 nm, jų energijos juostos nustoja persidengti, todėl nors Au yra metalas, tokios ND įgyja izoliatoriams būdingas savybes [85].

Draustinės juostos terminas reiškia energijos intervalą, kuriame elektronų būsenos yra negalimos. Elektrinė draustinė juosta nurodo skirtumą tarp valentinės juostos viršaus ir laidumo juostos apačios [86]. Šis skirtumas lemia elektrinį laidumą – mažėjant energijos būsenų kiekiui mažose dalelėse, didėja atstumas tarp gretimų energijos lygių, o tai keičia ND laidumo savybes – jos pereina iš metalinių į puslaidininkes arba izoliacines [77]. Elektroninių būsenų priklausomybė nuo medžiagos struktūros pateikta 4 paveiksle.



4 pav. Elektroninių būsenų perėjimas nuo atomo iki puslaidininkių dalelių ar didesnio dydžio metalų [87].

Nanoklasteriuose, kuriuos sudaro vos keli atomai, laidumo savybės kinta mažėjant dydžiui. Metalinės savybės gali pereiti į puslaidininkės ar net izoliacines. Vis dėlto, 1D ir 2D ND gali pasižymėti padidėjusiu laidumu dėl struktūros tvarkingumo ir geometrinių santykių. Pavyzdžiui, kai nanovielų skersmuo sumažėja iki mažiau nei 20 nm, elektronų ir fononų paviršinė sklaida padidėja, o laidumas dėl didelio paviršiaus ploto ir elektronų būsenų

tankio gali reikšmingai išaugti [88]. Anglies nanovamzdeliai taip pat demonstruoja įvairų elektrinį elgesį - jie gali būti izoliatoriai, puslaidininkiai, metalai ar net superlaidininkai, priklausomai nuo cheminės sudėties, kristalinės struktūros ir dydžio [89].
Kai medžiagos dydis sumažėja iki nanometrinio lygmens, jų kristalai tampa tvarkingesni, nes defektų kiekis reikšmingai sumažėja. Dėl to elektronai gali laisviau judėti, mažėja varža ir pagerėja medžiagos laidumo savybės.

1.2.3 Nanodalelių funkcionalizavimas

Norint išnaudoti ND potencialą biomedicinoje, vaizdinimo technologijose, jutikliuose, energijos saugojime, elektronikoje ir kitose srityse, būtina kontroliuoti jų pasiskirstymą skirtingose terpėse bei sąveiką su kitomis molekulėmis. Tai įmanoma tik tinkamai modifikuojant ND paviršių ir suteikiant jam specifines funkcines savybes, kurios pagerina jų sąveiką su aplinka. Tokia funkcionalizacija daro įtaką ND pasiskirstymui, koloidiniam stabilumui ir jų išsidėstymui. Pavyzdžiui, medicinoje paviršiaus funkcionalizacija gali padėti išvengti imuninės sistemos atpažinimo, užtikrinti efektyvesnę vaistų pernašą į ląsteles, padidinti jų įsisavinimą bei pagerinti biosuderinamumą [90,91]. Be to, paviršiaus modifikacija leidžia tiksliai pernešti vaistus ar medžiagas į reikamą vietą organizme [92] bei atpažinti molekules jutikliuose [93]. Keisdami ND paviršiaus savybes, galima kontroliuoti jų hidrofobiškumą, hidrofiliškumą, laidumą ar atsparumą korozijai.

Hidrofobinės ND gali būti susintetintos panaudojant hidrofobines molekules, tokias kaip oleino rūgštis ar oleilaminas [94], dodekantiolis [95], trioctilfofino oksidas [96] ir kitos. Hidrofilinės ND gaminamos su hidrofilinėmis medžiagomis, pavyzdžiui, polietilenglikoliu (PEG) [97], padengtu aminogrupėmis PEG [98] ar merkaptosukcinine rūgštimi [99].

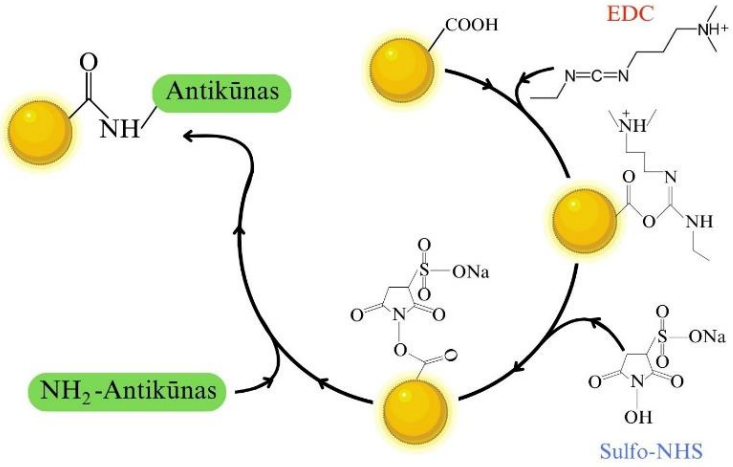
ND paviršiaus funkcionalizacija atliekama dviem būdais: sintezės metu arba po sintezės. Mokslininkai naudoja įvairias medžiagas, tokias kaip paviršiaus aktyviosios medžiagos, polimerai, dendrimetai, biomolekulės ir neorganinės medžiagos [90]. ND funkcionalizacijai dažnai naudojama kovalentinė sąveika, kai nanomedžiagų paviršius modifikuojamas įvairiomis molekulėmis, turinčiomis tam tikras chemines grupes, pavyzdžiui, aminogrupes ar karboksigrupes, savo struktūroje. Tokiu būdu prie ND paviršiaus gali būti prijungiamos biomolekulės, polimerai, organinės ir neorganinės molekulės, suteikiant joms geresnį pasiskirstymą tirpiklyje bei didesnį koloidinį stabilumą. Kovalentinis prijungimas plačiai taikomas MeO

ND, 2D nanomedžiagoms (pavyzdžiui, grafeno oksidui, anglies nanovamzdeliams, molibdeno disulfidui ir boro nitridui), taip pat sluoksniuotoms mineralinių silikatų ND, siekiant optimizuoti jų savybes konkrečioms reikmėms [100].

ND funkcionalizacijai naudojami įvairūs metodai, įskaitant hetero-bifunkcinių kryžminių jungiklių molekules. Dažniausiai taikomi metodai grindžiami organofunkciniais alkoksisilanais, tokiais kaip (3-merkaptopropil)-dimetil-etoksisilanas, taip pat naudojami NHS, glutaro aldehidas ir EDC. Šių molekulių taikymas leidžia kovalentiškai prijungti oligonukleotidus, peptidus ir baltymus prie įvairių ND [100].

Kovalentinė konjugacija dažniausiai grindžiama baltymų pirminių aminogrupių prijungimu prie ND paviršiaus [101]. Pavyzdžiui, pirminės aminogrupės yra plačiai paplitusios antikūnų struktūroje ir gali būti naudojamos prisijungimui prie įvairių funkcinių grupių, esančių ND paviršiuje. Tai reiškia, kad šis metodas leidžia efektyviai sujungti antikūnus su ND, nes nereikia papildomai keisti antikūnų struktūros, įvedant specifinių reaktyvių grupių [102]. Naudojant aminogrupes, molekules gali būti prijungiamos prie ND paviršiuje esančių aldehidinių ar epoksidinių grupių bei cianogeno bromidu aktyvuotų paviršių, formuojant kovalentinius ryšius [103].

Tačiau dažniau naudojama metodika pagrįsta karboksigrupių aktyvavimu [104]. Tam naudojamas EDC – vandenyje tirpus reagentas, kuris leidžia sujungti karboksigrupes ar fosfatines grupes su pirminėmis aminogrupėmis [105]. EDC suaktyvina ND paviršiuje esančias karboksigrupes, suformuodamas nestabilų tarpinį O-acilizourėja (angl. *O-acyllisourea*) junginį. Vis dėlto, šis tarpinis junginys yra labai nestabilus vandenyje ir jei nespėja įvykti reakcija su aminogrupėmis, greitai hidrolizuojasi, atkurdamas pradinę karboksigrupę. Kad reakcija būtų stabilesnė ir efektyvesnė, dažniausiai į procesą įtraukiamas NHS arba jo analogas sulfo-NHS. Šie reagentai paverčia tarpinį junginį į pusiau stabilų aktyvųjį esterį, kuris yra daug patvaresnis ir lengviau reaguoja su aminogrupėmis antikūnuose. Tokiu būdu susidaro stiprūs amidiniai ryšiai tarp ND ir antikūnų [106,107]. Nors literatūroje dažnai minimas sulfo-NHS, tyrimuose sėkmingai naudojamas ir NHS, kuris taip pat užtikrina efektyvų antikūnų prisijungimą. Žemiau pateiktame 5 paveiksle pateikiama ND ir antikūnų jungimosi reakcija, panaudojant EDC/sulfo-NHS.



5 pav. Schematinis ND ir antikūnų jungimosi vaizdavimas, naudojant EDC ir sulfo-NHS [108].

Atlikti tyrimai parodė, kad efektyviausias antikūnų imobilizavimas pasiekiamas, kai ND paviršius aktyvuojamas naudojant EDC ir sulfo-NHS kombinaciją. Pavyzdžiui, mokslininkas Z. Pei su kolegomis [109] tyrė antikūnų imobilizaciją ant 2D karboksigrupėmis dengtų biologinių jutiklių paviršių, lygindami skirtingus aktyvacijos reagentų mišinius: vieną EDC, EDC su NHS ir EDC su sulfo-NHS. Jų eksperimentai parodė, kad efektyviausias aktyvavimas buvo pasiektas naudojant EDC/sulfo-NHS kombinaciją, po to sekė EDC/NHS, o vienas EDC davė mažiausią konjugacijos efektyvumą. Šie rezultatai paaiškinami elektrostatinėmis sąveikomis: naudojant EDC/sulfo-NHS metodą, neigiamas sulfo-NHS krūvis padeda išlaikyti ND stabilumą, mažinant jų agregaciją.

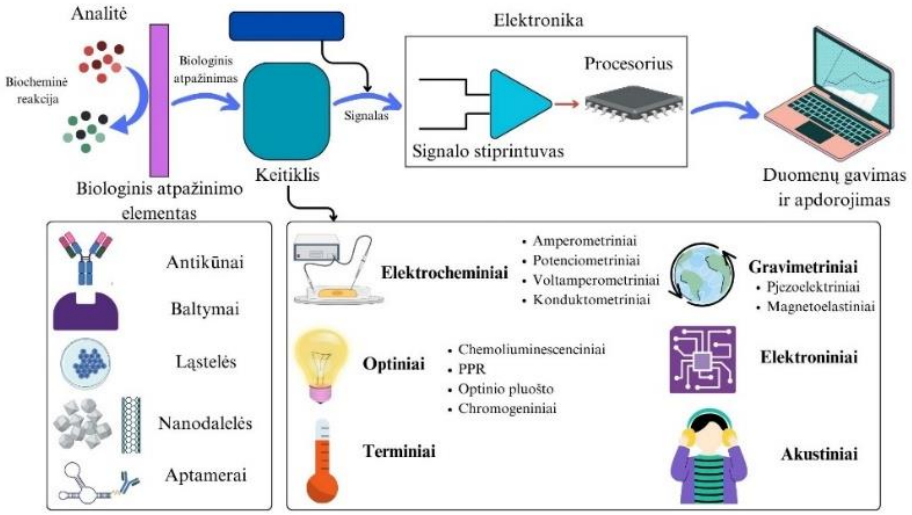
Vienas iš pagrindinių karbamido reakcijos trūkumų yra tas, kad antikūnai turi ir karboksigrupes, ir aminogrupes visame savo paviršiuje. Jei EDC perteklius nėra pašalinamas prieš pridedant antikūnus, gali įvykti jų nekontroliuojamas tarpusavio susijungimas [110]. Dėl to būtina dviejų etapų reakcija, kurioje perteklinis EDC pašalinamas prieš antrąjį žingsnį. Nors ši kovalentinė prijungimo metodika nereikalauja cheminės antikūnų modifikacijos, jos pagrindinis trūkumas yra atsitiktinė antikūnų orentacija ant ND paviršiaus. Kadangi aminogrupės yra gausiai paplitusios visoje antikūnų molekulėje, kovalentinės jungtys su ND gali susidaryti įvairiose srityse, įskaitant antigeno atpažinimo vietas. Dėl to gali sumažėti antikūnų biologinis aktyvumas. Kovalentinės jungtys per aminogrupes gali lemti atsitiktinę antikūnų orientaciją, nes aminogrupės yra prieinamos skirtingose antikūno

srityse. Tai gali sumažinti biologinį aktyvumą, jei antigeno atpažinimo vietos bus uždengtos [49], [50]. Dėl šios priežasties dažniausiai pirmenybė teikiama metodams, kurie užtikrina kryptingą antikūnų prisijungimą.

1.2.4 Nanodalelių taikymas biologiniuose jutikliuose

Nanotechnologijų pažanga atvėrė galimybes kurti nanometrinio lygmens įrenginius, kuriuose naudojamos įvairios nanomedžiagos, tiesiogiai sąveikaujančios su biomolekulėmis. Kaip minėta anksčiau, ND pagrindu sukurti jutikliai išsiskiria geru laidumu, aukštu jautrumu ir greitu reakcijos laiku, lyginant su įprastais biologiniais jutikliais. Dėl šių privalumų nanotechnologijomis pagrįsti jutikliai yra itin perspektyvūs įvairiose bioinžinerijos srityse, pavyzdžiui, vaistų pernešimo sistemose [52], [53].

Amerikos biochemikas L.L. Clarkas 1956 metais pirmasis sukūrė biologinį jutiklį, kuris buvo naudojamas deguonies kiekiui kraujyje nustatyti. Šis jutiklis naudojo elektrodą, kuris buvo pavadintas Clarko elektrodu arba deguonies elektrodu. Terminas "biologinis jutiklis" pirmą kartą buvo naudojamas K. Cammanno 1977 m. [70]. Biologinis jutiklis paprastai susideda iš kelių pagrindinių komponentų. Biologinis atpažinimo elementas (BAE) yra molekulė, kuri specifiškai atpažįsta analites, tokias kaip fermentai, ląstelės, aptamerai, DNR ar antikūnai. Kai BAE sąveikauja su analite, generuojamas signalas, kurį galima interpretuoti, pavyzdžiui, šviesos, šilumos ar pH pokyčių pavidalu. Signalo keitiklis paverčia šį biologinį atsaką į matuojamą elektrinį signalą. Elektronikos dalis sustiprina ir apdoroja signalą, paversdama jį skaitmeniniu formatu. Galiausiai ekranas pateikia vartotojui suprantamą rezultatą – skaičių, grafiką ar kitą vizualizaciją [115]. Žemiau 6 paveikle pateikta biologinio jutiklio schema.



6 pav. Biologinio jutiklio schema [116].

Nanotechnologijos įrodė savo svarbą medicinoje, ypač ligų diagnostikoje, kur jos pritaikomos rezonansiniam (pvz., PPR jutikliai), elektrocheminiam (gliukozės biologiniai jutikliai), magnetiniam (magnetinių ND pagrindu sukurti imuniniai jutikliai), kalorimetriniam (ND sukeltas šilumos signalų aptikimas) ir optiniam (fluorescenciniai ND žymenys) aptikimui [117]. Be to, nanotechnologijų integracija biologinių jutiklių srityje suteikia daugybę privalumų, įskaitant didelį paviršiaus ir tūrio santykį, biologinius signalo perdavimo mechanizmus bei elektrochemines savybes. Šios pažangios technologijos ne tik pagerina jutiklių veikimą, bet ir leidžia tiksliau bei efektyviau aptikti įvairius biologinius rodiklius [118].

ND yra įtraukiamos gamybos proceso metu, todėl tokie biologiniai jutikliai vadinasi ND pagrįstais biologiniais jutikliais. Nanomedžiagos yra nuolat tiriamos, nes jos suteikia plačias galimybes biologinėms analizėms tokiose srityse kaip bioatvaizdavimas, diagnostika, vaistų tiekimas ir įvairių ligų gydymas [56], [57]. Pavyzdžiui, amperometriniai prietaisai naudojami fermentinėms reakcijoms tirti, o fluorescenciniai KT padeda vertinti sąveikos efektyvumą ir atliekant imuninio žymėjimo tyrimus. ND optinės savybės ir funkcionalizavimas su fluorescenciniais žymenimis daro jas itin perspektyviomis biologinių jutiklių kūrimui. Nanomedžiagos plačiai naudojamos elektrocheminiuose, chemiliuminescenciniuose, fluorescenciniuose bei biologinio lauko efekto tranzistorių tyrimuose. Pavyzdžiui, anglies nanovamzdeliai, redukuotas grafeno oksidas, grafenas ir jo darinių sluoksniai gali būti taikomi įvairiuose biologiniuose jutikliuose.

Fluorescenciniai tyrimai dažniausiai grindžiami grafeno fluorescencijos slopinimo savybėmis [121,122]. Nanomedžiagos buvo plačiai tiriamos ir naudojamos diagnostikoje bei biologiniuose jutikliuose per pastarąjį dešimtmetį. Tačiau šių technologijų pažanga taip pat kelia tam tikrų klausimų, pavyzdžiui, susijusių su įvairių nanomedžiagų saugumu, į kuriuos būtina atsakyti ir išspręsti, prieš pasiekiant, kad šios technologijos būtų plačiai naudojamos kasdieniam vartojimui [123].

1.2.4.1 Nanodalelių panaudojimas optiniuose jutikliuose

Optinių biologinių jutiklių technologinė pažanga per pastarąjį laikmetį išaugo eksponentiškai. Pagrindiniai pasiekimai buvo padaryti sveikatos, aplinkosaugos ir biotechnologijų srityse. Optiniai biologiniai jutikliai yra dažniausiai publikuojama biologinių jutiklių įrenginių grupė [124]. Optiniai biologiniai jutikliai pasižymi puikiais rezultatais medicininių jutiklių srityje, kai jų konstrukcijoje naudojamos įvairios ND. Dėl savo unikalių optinių savybių ir biologinio suderinamumo, AuND, AgND, bimetalinės ir magnetinės ND plačiai taikomos kuriant šiuos jutiklius [125].

Optiniai biologiniai jutikliai yra analiziniai prietaisai, kuriuose biologinio atpažinimo elementas yra integruotas į optinio keitiklio sistemą. Jų veikimo principas pagrįstas signalų generavimu, kurie yra proporcingi analitės koncentracijai, leidžiant atlikti matavimus realiu laiku be papildomų žymenų. Tai reiškia, kad šie jutikliai gali tiesiogiai aptikti biomolekules, kartais nereikalaujant papildomų fluorescencinių ar chemiliuminescencinių žymėjimų. Optiniuose biologiniuose jutikliuose kaip BAE naudojami fermentai, antikūnai, aptamerai ir ląstelės. Jutiklio veikimo metu keitiklis reaguoja į BAE sukeltus fizinius ar cheminius pokyčius ir atitinkamai paverčia optiniu signalu. Tai gali būti šviesos sugerties, sklidimo, atspindžio, lūžio, fazes, amplitudes, dažnio ar poliarizacijos pokyčiai, kurie registruojami ir analizuojami. Optiniai biologiniai jutikliai skirstomi į dvi pagrindines kategorijas: be žymenų (angl. *label-free*) ir su žymenimis (angl. *label-based*). Biologiniuose jutikliuose, kuriuose nenaudojami žymenys, signalas susidaro dėl tiesioginės analitės sąveikos su BAE, todėl nereikia papildomų žymenų ar indikatorinių medžiagų. Priešingai, biologiniai jutikliai su žymenimis naudoja spalvinius (kolorimetrinius), fluorescencinius ar chemiliuminescencinius metodus optiniam signalui generuoti. Tokie biologiniai jutikliai gali būti sukurti remiantis skirtingais optiniais principais, tarp kurių yra PPR, gęstančios bangos fluorescencija (angl. *evanescent wave fluorescence*), optinio bangolaidžio interferometrija (angl. *optical waveguide*

interferometry), chemiliuminescencija, fluorescencija, lūžio rodiklio pokyčiai ir sustiprintos Ramano sklaidos spektroskopija [126]. Atsižvelgiant į pastarųjų metų pažangą, optiniai biologiniai jutikliai tampa vis svarbesni medicininiuose ir aplinkosauginiuose tyrimuose. Jų gebėjimas tiksliai ir realiu laiku aptikti biomolekules be papildomų žymenų leidžia jiems pasižymėti tiek praktiškumu, tiek efektyvumu.

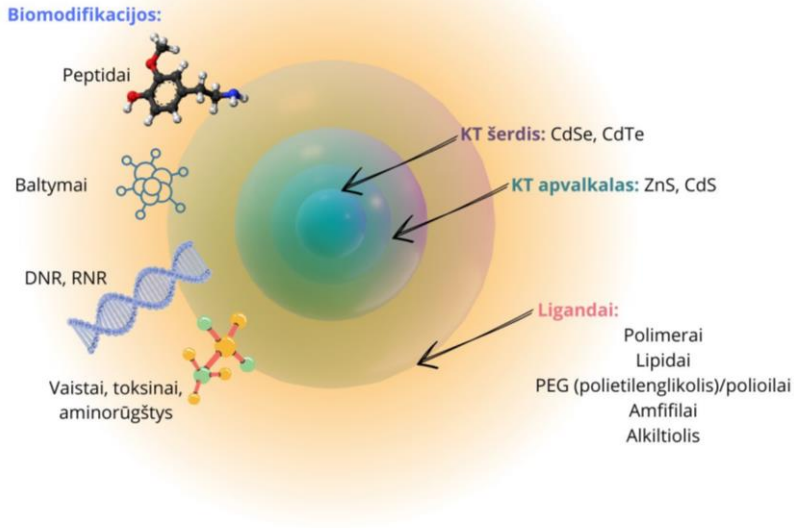
1.3 Kvantiniai taškai

Kvantiniai taškai – tai 0D nanomedžiagos, kurių atradimas pakeitė daugelio sričių, nuo medžiagotyros iki biomedicinos. Beveik prieš keturis dešimtmečius A. Ekimovas kartu su kolegomis pradėjo tirti puslaidininkiais modifikuotą stiklą ir kūrė teoriją, siekdami paaiškinti stebimas savybes. Tuo pačiu metu L. E. Brusas laboratorijose Jungtinėse Amerikos Valstijose tyrinėjo puslaidininkių daleles skystuose koloiduose. Nors šie tyrimai vyko skirtingose pasaulio vietose, jie nepriklausomai atvedė abi mokslininkų grupes prie KT atradimo ir teorinio jų dydžio įtakos optinėms savybėms paaiškinimo [127]. Dėl šių atradimų, kurie suteikė naujas galimybes nanotechnologijų taikymui, 2023 m. Nobelio chemijos premija kartu su minėtais mokslininkais gavo M. G. Bawendis, tyręs pažangius KT sintezės metodus [127,128]. Šiandien KT yra ne tik svarbus fundamentinių tyrimų objektas, bet ir modernus diagnostikos įrankis.

1.3.1 Kvantinių taškų cheminė sudėtis ir struktūra

KT yra ND, kurios intensyviai tiriamos dėl savo ypatingų savybių. Dėl vadinamojo kvantinio uždarymo efekto, kuris atsiranda, kai dalelė tampa tokia maža, kad riboja elektronų judėjimą tam tikrose energijos būsenose ir priklauso nuo medžiagos savybių. Pavyzdžiui, Cd junginiuose šis efektas pasireiškia esant 2,34 - 10 nm dalelių dydžiui, dėl to šios dalelės pasižymi unikaliomis optinėmis, fotocheminėmis, puslaidininkinėmis ir katalizinėmis savybėmis [129]. Pirmą kartą apie šį efektą pranešė mokslininkai A. Ekimovas ir A. Onuščenka 1981 m. Jie pastebėjo, kad šviesos sugertis CuCl kristalais pasklidusiems silikatinio stiklo struktūroje priklauso nuo jų dydžio [130]. KT sudėtyje yra santykinai nedidelis atomų skaičius (paprastai nuo 100 iki 10000 atomų) [131]. Jie dažniausiai gaminami iš cheminių elementų, priklausančių periodinės lentelės II-VI, III-IV ir IV-VI grupėms [132]. KT turi specifišką struktūrą, sudarytą iš šerdies ir ją dengiančio apvalkalo (7 pav.). KT dažnu atveju turi kadmio (Cd) junginių

šerdį, pavyzdžiui, CdTe, CdSe arba CdS. Jie laikomi ypač tinkamais biologiniam vaizdavimui dėl savo efektyvių liuminescencinių savybių [133].



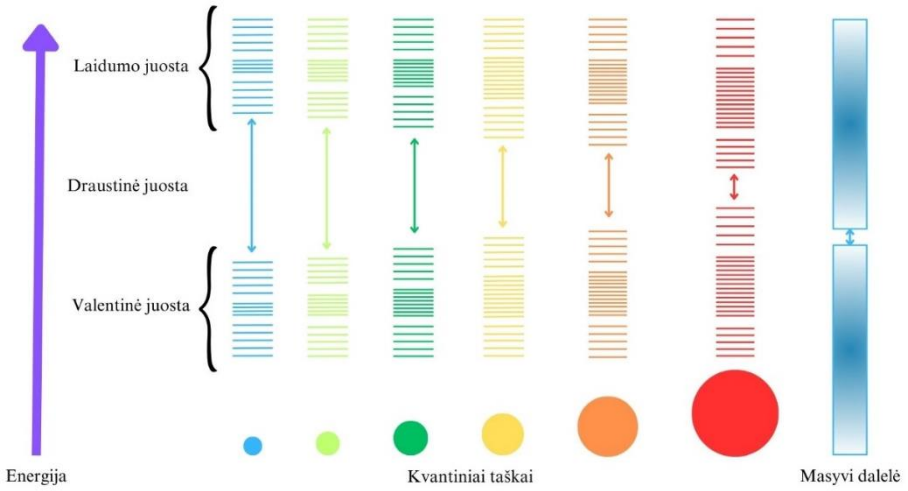
7 pav. KT struktūra, jos pagrindiniai elementai [133].

Vis dėlto, Cd pagrindo šerdis yra toksiška, nes išskiria Cd^{2+} jonus. Nors apsauginiai sluoksniai ir paviršiaus modifikacijos gali sumažinti toksiškumą, jų visiškai pašalinti neįmanoma, nes ilgainiui šios medžiagos gali suirti ir išskirti pavojingus elementus ląstelėse, todėl jų taikymas biologinėse sistemose vis dar tiriamas. Atsižvelgiant į tai, buvo pradėta sintetinti KT neturinčius Cd^{2+} jonų savo sudėtyje. Tokių KT šerdys gali būti sudarytos iš kitų junginių, pavyzdžiui, sidabro selenido, indžio fosfido, vario indžio sulfido ar cinko oksido. Taip pat, buvo sukurti KT, pavyzdžiui, pagaminti iš silicio ar anglies. Anglies pagrindu sukurti KT, tokie kaip anglies KT, grafeno KT ir grafeno oksido KT, pasižymi itin mažu toksiškumu ir puikiu biologiniu suderinamumu [133]. P. Shen su kolegomis sukūrė naują fluorescuojančių, boro rūgštimi modifikuotų anglies pagrindo KT sintezės metodą, skirtą gliukozės aptikimui kraujyje. Sukurti KT gebėjo specifiškai sąveikauti su gliukoze, leidžiant nustatyti jos koncentraciją 9 – 900 μmol l^{-1} intervale. Ši metodika pasižymėjo dideliu specifiškumu kitų biomolekulių atžvilgiu ir buvo sėkmingai pritaikyta gliukozės nustatymui žmogaus serume, todėl turi reikšmingą potencialą klinikinėje diagnostikoje [134].

1.3.2 Kvantinių taškų optinės savybės

KT pasižymi unikaliomis optinėmis savybėmis, kurios atsiranda dėl elektronų ir skylių porų (eksitonų) apribojimo nanokristalų struktūroje. Šios fotofizinės savybės apima reguliuojamą šviesos spinduliavimą pagal dydį ir sudėtį, platų absorbcijos spektrą, siaurą emisijos spektrą, didelius sugerties gesinimo koeficientus, aukštą fluorescencijos kvantinį našumą, atsparumą fotocheminiams pažeidimams ir sumažintą fluorescencijos gesinimą. Dėl šių savybių KT yra plačiai pritaikomi biomedicinoje, pavyzdžiui, vaistų pernešimui ar genų terapijai [135].

KT taškų dydis svyruoja nuo 2 iki 10 nm. Keisdami jų dydį, galima reguliuoti fluorescenciją plačiame bangos ilgių diapazone (400 - 1600 nm), leidžiančiame matuoti matomųjų ir artimųjų infraraudonųjų spindulių srityse. Mažėjant KT dydžiui, sustiprėja elektronų apribojimas, todėl susidaro didesnės energijos eksitonai, o juostos pločio energija padidėja. Dėl to emisija pereina į trumpesniųjų bangų sritį, nes energija yra atvirkščiai proporcinga šviesos bangos ilgiui. Palyginti su masyvios formos puslaidininkiais, kuriuose elektronai turi nepertraukiamą energijos lygmenį, ND energijos lygiai tampa diskretūs dėl kvantinio apribojimo [135,136]. KT optinių savybių priklausomybė nuo jų dydžio parodyta 8 pav.



8 pav. KT ir masyvių dalelių optinių savybių palyginimas, pagal jų dydį [136].

Šviesos emisiją taip pat lemia KT šerdies cheminė sudėtis. Panaudojant skirtingus cheminius elementus KT sintezei, gaunama skirtinga emisija. CdS emisija yra trumpesniųjų bangų spektro srityje, CdSe – matomojoje spektro

srityje, o CdTe - tolimajame raudonajame ir artimųjų infraraudonųjų spindulių srityje [136].

Absorbcijos spektras parodo, kaip atomuose ar molekulėse vyksta perėjimai iš žemesnių energijos lygmenų į aukštesnius, sugeriant fotonų energiją. Tuo tarpu emisijos spektras atsiranda, kai atomai ar molekulės išskiria fotonų energiją pereidamos iš aukštesnio energijos lygmens į žemesnį. Dėl plataus absorbcijos spektro keli KT gali būti sužadinti vienu šviesos šaltiniu, kurio bangos ilgis trumpesnis už jų emisijos bangos ilgį. KT emisijos spektras matomojoje srityje gali būti itin siauras - vos 20 nm, todėl galima vienu metu aptikti kelis skirtingus signalus [136,137].

1.3.3 Kvantinių taškų pritaikymas biologinėse sistemose

Istoriškai KT buvo plačiai naudojami nebiologinėse srityse dėl jų dydžio ir sudėties reguliuojamų optinių bei elektrinių savybių. Kai KT naudojami kontaktui su biologinėmis sistemomis, būtina atsižvelgti į tam tikras savybes, tokias kaip stabilumas vandeniniuose tirpaluose ar biosuderinamumas [138].

KT turi keletą pranašumų, kurie juos daro tinkamus daugelyje biomedicinos sričių. Palyginti su įprastais organiniais dažais ir fluorescuojančiais baltymais, KT pasižymi plačiais sužadinimo ir siaurais emisijos spektrais. Be to, jie turi puikias optines savybes, tokias kaip didesnė šviesos emisija (iki 100 kartų ryškesni nei įprasti dažai) ir žymiai didesnis atsparumas šviesos išblukimui (angl. *photo-bleaching*) [139,140]. Klasikiniai organiniai dažai linkę greitai prarasti savo gebėjimą švytėti, o KT kvantinis išeigos koeficientas dažnai viršija 15 % biologinėje aplinkoje [141]. Be to, skirtingai nei dauguma įprastų organinių dažų, KT turi platų fluorescencijos spektrą – nuo ultravioletinės (UV) iki artimųjų infraraudonųjų spindulių (NIR). Ypač KT, kurie skleidžia šviesą NIR diapozone, padidina fluorescencijos taikymo galimybes biomedicinoje, nes NIR šviesa mažiau absorbuojama audiniuose, todėl jos poveikis audiniams yra mažesnis, o savaimine fluorescencija – palyginti maža [141,142]. KT dydis lemia įvairias sužadinimo ir emisijos savybes, patrauklu taikymui biomedicinoje. Pavyzdžiui, pacientui galima suleisti KT mišinius, kurių dalelės skiriasi dydžiu. Vienos bangos ilgiu sužadinti KT skleidžia siaurą, specifinę emsiiją, todėl skirtingų KT signalai minimaliai persidengia ir beveik nesukelia kryžminės interferencijos [143]. Tai ypač svarbu, nes mažesnis signalų persidengimas leidžia tiksliau aptikti kiekvieną signalą, padidina aptikimo jautrumą ir suteikia galimybę vykdyti daugiaspalvį aptikimą. Tuo tarpu įprastų organinių dažų spektrinius parametrus sunku kontroliuoti ar keisti, nes

jie priklauso nuo cheminės struktūros, molekulinės konformacijos ir reaktyvumo, todėl juos sudėtinga pritaikyti skirtingoms emisijos bangos ilgiams. Dėl to jų taikymas kelių analičių tuo pačiu metu nustatymui yra ribotas [140,141].

KT gali būti naudojami kamieninių ląstelių stebėjimui, padedant suprasti jų judėjimą ir paskirtį organizme. Šiuo metu labai svarbu sukurti veiksmingus metodus, leidžiančius stebėti ląsteles nuo jų suleidimo iki galutinės paskirties vietos, nes tai lemia gydymo ir diagnostikos sėkmę. KT yra vienos iš dažniausiai naudojamų ND ląstelių žymėjimui, nes didžioji dalis jų nėra toksiški ir nesukelia imuninės reakcijos. Be to, kaip minėta anksčiau, jie pasižymi unikaliomis fluorescencinėmis savybėmis, kurios padeda išvengti problemų, susijusių su natūralia audinių fluorescencija. Dėl to, pažymėtos ląstelės tampa aiškiau matomos, o derinant KT su kitais vaizdinimo metodais, pavyzdžiui, emisijos skenavimo mikroskopija, galima detaliai analizuoti, kaip jos sąveikauja su aplinkiniais audiniais. Tačiau, viena iš pagrindinių KT naudojimo problemų yra jų paviršiaus savybės – jie yra hidrofobiški, todėl jų paviršių būtina modifikuoti specialiomis medžiagomis [144]. Mokslininkas P. Wuttisarnwattana su kolegomis pritaikė daugiaspektrinį krio-vaizdinimą (angl. *cryo-imaging*) kartu su specialia programine įranga, pavyko ištirti žmogaus mezenchiminių strominių ląstelių (kurios buvo pažymėtos KT, skleidžiančiais raudoną fluorescenciją) pasiskirstymą pelėse, kurioms buvo atlikta kaulų čiulpų transplantacija. Šis metodas leido tiksliai stebėti ląstelių judėjimą organizme net vienos ląstelės lygiu. Tokie tyrimai yra itin svarbūs tobulinant kamieninių ir strominių ląstelių terapiją bei regeneracinę mediciną [145].

KT taip pat plačiai naudojami baltymų, esančių ląstelėse, fluorescenciniam žymėjimui, padedant stebėti jų elgseną gyvuose organizmuose. Per pastarąjį dešimtmetį jų taikymas tokių baltymų bei įvairių molekulių žymėjimui atvėrė naujas galimybes biologiniuose tyrimuose. KT leidžia tiksliai analizuoti specifinių baltymų judėjimą gyvose ląstelėse ir suprasti jų funkciją. Pavyzdžiui, KT naudojami neuroninių baltymų žymėjimui leidžia vienu metu stebėti atskiras molekules, o tai padėjo mokslininkams ištirti jų judėjimą natūraliose membranose ir geriau suprasti jų elgseną smegenyse [146]. Vis dėlto, siekiant gauti patikimus rezultatus svarbu sumažinti nespecifinį KT prisijungimą prie baltymų ar ląstelių. Z. Han su kolegomis šiai problemai spręsti sukūrė specialius KT, kurių šerdis sudaryta iš (CdSe)CdZnS, o paviršius padengtas dviejų tipų dangomis: cviterioniniais polimerais ir nejoninėmis mažomis molekulėmis – oligoetilenglikoliu. Naudojant abi medžiagas kartu paviršiuje, pasireiškia sinerginis efektas, kuris

mažina nespecifinį KT prisijungimą prie ląstelių ir baltymų bei kartu leidžia jungtis prie specifinių baltymų. Tokie modifikuoti KT yra stabilūs ir gali būti sėkmingai naudojami tiksliniam baltymų žymėjimui ląstelėse suteikdami galimybę tiksliai stebėti jų elgseną [147]. Be to, pavienių KT stebėjimo metodas leidžia detaliai tirti įvairius membranos baltymus. Pavyzdžiui, Zhang su kolegomis sukūrė specialius grafito anglies nitrido fluorescencinius KT, funkcionalizuotus fenilborono rūgštimi, kurie sėkmingai buvo pritaikyti sialo rūgšties aptikimui ant ląstelių ir audinių paviršiaus. Tokie tyrimai svarbūs siekiant geriau suprasti ląstelių sąveiką su aplinka bei jų atliekamas funkcijas vykstančiuose biologiniuose procesuose [148].

KT galima panaudoti patogenų ir toksinų aptikimui. Patogeninių bakterijų nustatymas kraujyje yra itin svarbus ankstyvoje ligos stadijoje, nes jos gali turėti stiprų neigiamą poveikį organizmui. Įprastiniai metodai, tokie kaip polimerazės grandininė reakcija, imunofermentinė analizė ar fluorescencinė diagnostika, dažnai susiduria su ribotu jautrumu, specifiškumu bei užima daug laiko. Šiuolaikiniai tyrimai rodo, kad KT gali atlikti svarbų vaidmenį patogenų aptikime. Neseniai buvo sukurti labai jautrūs CdSe pagrindu pagaminti KT, skirti biologiniams tyrimams [144]. Per pastarąjį dešimtmetį mokslininkai bandė nustatyti, kaip efektyviai KT gali specifiniu būdu prisijungti prie *E.coli*, tačiau buvo pastebėtos netikėtos spektro pokyčių variacijos, tokios kaip sugerties maksimumo poslinkis, fluorescencijos bangos ilgio pokyčiai ir emisijos intensyvumo padidėjimas. Hahn su kolegomis atliko eksperimentus su *E.coli* bakterijomis ir nustatė, kad šios ląstelės, pažymėtos streptavidinu funkcionalizuotais CdSe/ZnS KT, skleidė ryškią fluorescenciją. Tai įrodė, kad KT gali būti naudojami kaip efektyvi priemonė patogeninių ląstelių aptikimui [149]. Be to, KT pagrindu sukurti biologiniai jutikliai taip pat buvo pritaikyti jautriam maisto priemaišų ir biologinių produktų užterštumo nustatymui. J. Hu ir kolegos neseniai sukūrė KT žymėtas ND (KT-ND), kurias sluoksnis po sluoksnio padengė ant polimerinių nanosferų paviršiaus. Šis metodas padidino fluorescencijos intensyvumą ir stabilumą, o panaudojus KT-ND buvo sukurta metodika, leidžianti greitai aptikti *Salmonella typhimurium* bakterijas [150].

1.3.4 Kvantinių taškų funcionalizavimas

Viena didžiausių problemų, naudojant KT medicinoje ir terapinėse diagnostikos srityse, yra jų nestabilumas vandeniniuose tirpaluose. Kadangi bioatvaizdavimo technologijose būtina, kad KT būtų stabilūs vandenyje, mokslininkai ieško įvairių būdų šiai problemai spręsti. Vienas iš sprendimų –

funkcionalizuoti KT hidrofilinėmis medžiagomis, pavyzdžiui, polimerais ar hidrogeliais. Kitas metodas – ligandų keitimas arba paviršiaus dengimas, kai hidrofobinės grupės pakeičiamos į vandeniniuose tirpaluose stabilesnes grupes. Šia tema H. Mattoussi su kolegomis yra surinkę išsamų literatūroje aprašytų paviršiaus funkcionalizavimo strategijų sąrašą [151]. Taip pat, parinktos dangos tipas priklauso nuo specifinės taikymo srities ir aplinkos veiksnių.

1.3.4.1 KT paviršiaus funkcionalizavimas ir stabilizavimas

Dauguma KT pasižymi hidrofobiškumu, todėl jie yra nestabilūs vandeniniuose tirpaluose – linkę agreguotis ir prarasti savo fluorescencines savybes. Kad jie būtų tinkami biologiniams tyrimams, būtina optimizuoti jų paviršių, juos modifikuojant hidrofiliškomis funkcinėmis grupėmis ar apsauginėmis dangomis, kurios užtikrina geresnį stabilumą vandeniniuose tirpaluose [152]. Vienas iš plačiai naudojamų yra dihidrolipo rūgšties (DHLR) pagrįstas ligando keitimo metodas, kuris reikalauja, kad pradinė lipo rūgštis (LR) būtų redukuota į DHLR naudojant cheminius redukuojančius reagentus, tokius kaip natrio borhidridas. Tačiau šis procesas turi tam tikrų trūkumų. Metodas yra sudėtingas, vyksta keliais etapais, DHLR junginys nėra stabilus, o KT paviršiuje lieka neaktyvios funkcinės grupės. Norėdami įveikti šiuos iššūkius, Mattoussi su kolegomis sukūrė metodą, kuris derina fotoligaciją su DHLR pagrįstu ligando keitimu [153]. Šis metodas leidžia hidrofobinius KT perkelti į vandeninius tirpalus. Jie pasiūlė du skirtingus būdus:

1 Vieno etapo reakcija: Hidrofobiniai KT, esantys nusodinimo būsenoje, sąveikauja iš anksto UV apšvitintais LR dariniais poliniuose tirpikliuose, tokiuose kaip metanolis.

2 Dviejų etapų reakcija: Hidrofobiniai KT, ištirpinti nepoliniame tirpiklyje, pavyzdžiui, heksane, reaguoja su iš anksto apšvitintais LR dariniais, ištirpintais poliniuose tirpikliuose, tokiuose kaip metanolis [154].

Išvalius ir pašalinus organinius tirpiklius, gauti KT lengvai pasiskirsto vandeniniuose tirpaluose. Reakcijai pradėti galima naudoti tiek UV spindulius, tiek saulės šviesą, o pridėjus nedidelį kiekį tetrametilamonio hidroksido, ligando keitimo procesas tampa greitesnis. Tie patys mokslininkai neseniai atliko daugybę tyrimų, siekiant suprasti šios reakcijos mechanizmą, tobulinant reakcijos sąlygas, įvertinant KT, kurie perkeliami į vandeninę fazę, optines savybes bei atrandant naujus šviesai jautrius ligandus [153]. Šio proceso dėka KT tampa biologiškai suderinami ir tinka naudoti gyvų

organizmų tyrimuose, pavyzdžiui, pelės smegenų kraujagyslių stbėjimui ar molekulių įterpimui į ląsteles [155].

Kitas būdas funkcionalizuoti KT paviršių – silanizacija. Tai procesas, kurio metu sukuriamas amorfinis silicio sluoksnis ant ND paviršiaus. Dėl silicio elektrocheminių savybių, KT išlieka stabilūs vandeniniuose tirpaluose, neprarandant savo fluorescencinių savybių. Silicis yra stabilus neutralioje pH aplinkoje net esant dideliems druskos kiekiams ir mažina KT agregaciją, nes užtikrina maždaug 4 nm sterinius atstumus bei elektrostatinę stabilizaciją tarp vandens sluoksnių ant paviršiaus. Silicio sluoksnis ne tik stabilizuoja dispersiją, bet ir nekeičia KT optinių savybių, sumažina paviršiaus sąveiką su deguonimi ir taip padidina fotostabilumą – KT su silicio sluoksniu yra bent 100 kartų stabilesni nei nepadengti KT [156]. Pati silanizacija yra sudėtingas daugiapakopis procesas. Pirmiausiai aktyvuojamas KT paviršius, kad prie jo priliptų pirmasis silano sluoksnis (angl. *primer layer*), pakeičiant nepolinius ligandus, pavyzdžiui, trioktilfosfino oksidą (TOPO), hesadecilaminą (HDA) poliniais, tirpstančiais etanolyje ar vandenyje. Pirmuosiuose tyrimuose, kuriuos atliko M. A. Correa-Duarte su kolegomis, buvo naudojamas (3-sulfanilpropil)trimetoksisilanas (MPS) pirmam silicio sluoksniui, o vėliau Stöber metodu (būdas gaminti vienodo dydžio silikato ND skystyje) storino silicio sluoksnį pridėdami tetraetilortosilikato (TEOS) [157]. Silanizavimą galima atlikti ir kitais būdais. T. Nann ir P. Mulvaney naudojo palaipsniui hidrofobinio-hidrofilinio perėjimo metodą (angl. gradual hydrophobic-hydrophilic phase transfer), keičiant TOPO ir HDA ligandus MPS bei reguliuojant TEOS, vandens bei amoniako koncentraciją, kad būtų sukurti vienodi ir stori silicio sluoksniai aplink KT [158]. Tinkama silanizacija užtikrina vienodus KT silicio matricoje, sumažina aglomeraciją, išlaiko KT optines savybes ir leidžia tolimesnę konjugaciją su biologinėmis molekulėmis [159].

Be auksčiau paminėtų KT paviršiaus optimizavimo būdų, taip pat galima naudoti polietilenglikolį (PEG). PEG junginiai su tiksliai apibrėžta grandinės ilgio struktūra yra žinomi dėl to, kad pagerina dalelių biologinį suderinamumą, sumažina nespecifinį baltymų prisijungimą ir padidina dispersijos stabilumą vandeniniuose tirpaluose [160]. KT, padengti PEG tarpinėmis grandinėmis, sumažina nespecifinį baltymų prisitvirtinimą ir sulėtina jų pašalinimą, todėl dalelės kraujyje cirkuliuoja ilgiau. PEG junginiai gali skirtis galinėmis funkcinėmis grupėmis tokiomis kaip karboksigrupės, tiolio arba lipoamido grupės – ir būti monofunkciniai, bifunkciniai arba heterogeniškai bifunkciniai [161]. Šie reagentai efektyviai sukuria hidrofilines „tiltelio“ jungtis tarp adsorbuojančios dalelės paviršiaus ir

specifinio ligando. Daug pastangų buvo skirta KT pernešimui iš organinės aplinkos į vandeninę naudojant PEG. W. W. Yu su kolegomis aprašė amfifilinės polimero polimaleino anhidrido-alt-1-oktadekano (PMAO)-PEG sintezę, kuri gaunama reakcijoje tarp PMAO ir pirminiu aminu funkcionalizuoto PEG metilo esterio. Gautas junginys buvo sumaišytas su hidrofobiniais KT ir maišomas per naktį. Buvo pastebėta, kad PMAO-PEG padengti KT išlaikė tas pačias optines savybes kaip ir hidrofobiniai KT. Siekiant ištirti šių KT pritaikymo galimybes, jie buvo modifikuoti antikūnais, kad tiksliai atpažintų Her2 receptorius vėžinėse ląstelėse. Tokiu būdu gauti KT tapo stabilūs vandenyje, nesikeičiant optinėms savybėms, ir leido patikimai konjuguoti įvairias biomolekules[162]. PEG padengti KT tampa biologiškai suderinami, stabilūs vandeninėje aplinkoje ir tinkami biomolekulių atpažinimui bei taikymui analitinėse sistemose.

1.3.4.2 KT konjugavimas biomolekulėmis

Kai KT paviršius yra funkcionalizuotas ir pritaikytas reikiamai terpei, toliau gali būti atliekama kovalentinė konjugacija su biologinėmis molekulėmis, siekiant specifinio jų pritaikymo įvairiose biomedicinos srityse. Vienas plačiai taikomų metodų -karboksigrupių aktyvinimas karbodiimido reagentais, tokais kaip kaip EDC, 1,3-dicikloheksilkarbodiimidas (DCC) ir kiti, kurie katalizuoja stabilų kovalentinio ryšio susidarymą su baltymo aminogrupėmis [163]. Kadangi tiek baltymai, tiek peptidai turi daug karboksigrupių ir aminogrupių, aktyvinimas karbodiimido reagentais tapo universaliu metodu biomolekulėms prisitvirtinti prie KT paviršiaus [164].

Be to KT paviršiuje biomolekules galima imobilizuoti naudojant kitas kovalentines konjugacijos reakcijas, pagrįstas aminogrupių arba sulfhidrilo grupių sąveikomis [165], anilino katalizuojamas hidrazono reakcijomis [166] ir fenilborono rūgšties-diolio sąveikomis [167]. Mokslininkas I. L. Medintz ir kolegos sėkmingai taikė aminogrupių ir sulfhidrilo grupių reakcijomis pagrįstą cheminę sąveiką, kad prijungtų aminų ir sulfhidrilų turinčius antikūnus prie KT paviršiaus [165]. Aminogrupių reakcijose heterobifunkcinis NHS esterio 6-hidrazinonikotinamidas (NHS-HyNic) veikia kaip jungtis, kurioje esterinė grupė jungiasi su antikūnų pirminiu aminu, o hidrazino grupė reaguoja su 4-formilbenzamidu modifikuotais KT per anilino katalizuojamą hidrazono reakciją. Sulfhidrilo grupių reakcijose, maleimidu modifikuoti KT reaguoja su antikūnų sulfhidrilų grupėmis, sudarydami stabilų kovalentinį ryšį, kuris leidžia pažymėti ląstelių membranas naudojant KT. Be to, šie du metodai gali būti naudojami konjunguojant

tikslinius antikūnus su įvairiaspalviais KT daugiafunkciniams imunologiniams tyrimams. Kadangi aminogrupės randamos daugelyje baltymų, o sulfhidrilų grupės – antikūnuose, aminų ir sulfhidrilų reakcijos gali tapti bendru metodu ruošiant įvairius KT baltymų konjugatus. H. Duan ir kolegos naudojo aminogrupių ir karboksigrupių aktyvinimo rekaciją kartu su fenilborono rūgšties (FBR)-diolio reakcija, kad tiksliai pažymėtų gyvas ląsteles su KT-FBR konjugatu [167]. Jie paversdavo hidrofobinius KT vandenyje tirpstančiais ir naudodami amfifilinį kopolimero junginį (maleino anhidrido ir oktadeceno), suformuodavo KT su karboksigrupėmis. Šios grupės reaguodavo su 3-amino-fenilborono rūgštimi per EDC katalizuojamą reakciją, suformuojant KT-FBR konjugatus. FBR-diolio reakcija leido žymėti sialo rūgštį su KT, o šie KT leido atlikti kiekybinę sialo rūgšties difuzijos analizę membranoje. Nors kovalentiniai ryšiai tarp KT ir biomolekulių yra stabilūs [168], šios kovalentinio sujungimo reakcijos gali šiek tiek sumažinti KT kvantinę išeigą ir koloidinį stabilumą [169].

1.3.4.3 KT konjugacija naudojant elektrostatinę sąveiką

Be kovalentinio prisijungimo, KT taip pat gali būti konjuguoti su biomolekulėmis naudojant elektrostatinę sąveiką, kuri leidžia lankstesnį ir dažnai paprastesnį konjugavimą, išlaikant biologinį aktyvumą. H. Mattoussi su kolegomis sukūrė KT-RMJB konjugatus, sujundami lipo rūgštimi dengtus CdSe/ZnS KT (neigiamo krūvio) ir rekombinantinį maltozę jungiantį baltymą (RMJB, teigiamo krūvio) [170]. Gauti KT-RMJB konjugatai išlaiko CdSe/ZnS KT optines savybes ir RMJB biologinį aktyvumą. Šie konjugatai gali būti naudojami rezonanso energijos pernašos (REP) jutiklių kūrimui, kuriuose KT veikia kaip energijos donoras, o Cy3 (akceptorinis dažiklis, kuriuo paženklintas baltymas) – kaip energijos akceptorius. FREP efektyvumą galima reguliuoti keičiant KT ir Cy3 spektrinį persidengimą arba RMJB-Cy3 konjugatų kiekį ant KT paviršiaus [171].

Panašiai mokslininkas S. Kim ir kolegos sukūrė hialurono rūgšties (HR) ir KT konjugatus, pasinaudodami elektrostatine sąveika tarp teigiamai įkrautų CdSe/CdS/ZnS KT ir neigiamai įkrautos HR [172]. Teigiamas KT krūvis buvo pasiektas juos padengiant molekulėmis, turinčiomis viename gale ditiolio grupę, o kitame gale – pirminio aminogrupę. Šie teigiamai įkrauti KT pritraukė HR, suformuodami stabilius HR-KT konjugatus, kurių dydis gali būti reguliuojamas. Jie pasižymėjo koloidiniu stabilumu ir buvo tinkami limfinių kraujagyslių žymėjimui gyvame organizme kelias dienas.

Elektrostatinė sąveika suteikia lankstų ir paprastą būdą pritvirtinti biomolekules prie KT paviršiaus, išvengiant agregacijos, kuri gal atsirasti naudojant kovalentinio jungimo metodus. Vis dėlto, šis metodas dažnai būna mažiau specifinis, todėl jo taikymas gali būti ribotas tam tikrose sąlygose.

1.3.4.4 KT konjugacija per ligandų ir receptorių sąveiką

Be jau paminėtų konjugacijų metodų, KT gali būti funkcionalizuoti taip, kad sąveikautų su biomolekulėmis per specifines ligandų ir receptorių sąveikas. Ligandų ir receptorių sąveika vyksta dėl didelio specifinių porų, pavyzdžiui, biotino ir avidino/streptavidino, suderinamumo. E. R. Goldman ir jo komanda sukūrė universalų metodą KT-antikūnų konjugatų sintezei, derindami elektrostatinę sąveiką ir biotino-avidino jungtis. Jie prijungė teigiamai įkrautą avidiną prie DHLR dengtų CdSe/ZnS KT elektrostatiniu būdu, o vėliau šie KT-avidino konjugatai buvo susieti su biotilintais antikūnais [173]. Ši biotino ir avidino/streptavidino sąveika yra itin stipri, todėl ji dažnai naudojama įvairių biomolekulių prijungimui prie KT. Taip pat ši sąveika leidžia paprastai ir efektyviai prijungti biomolekules prie KT paviršiaus, naudojant įvairius biologinius jutiklius diagnostikoje ir terapijoje.

1.4 SARS-CoV-2 virusas

Sunkaus ūminio respiratorinio sindromo koronaviruso 2 (SARS-CoV-2), sukeliančio COVID-19 ligą protrūkis, prasidėjęs 2019 m. Uhano mieste Kinijoje, išplito po visas šalies provincijas ir dar 28 valstybes. Iki 2020 m. vasario 23 d. Kinijoje buvo patvirtinta daugiau nei 77000 SARS-CoV-2 infekcijos atvejų, iš kurių didžioji dalis – 60 % buvo užfiksuota Uhane. Šios ligos sukėlėjas, pavadintas SARS-CoV-2, yra genetiškai artimas SARS-CoV virusui. Nors SARS-CoV-2 dalijasi 79,6 % genomo su SARS-CoV virusu ir naudoja tą patį ląstelių receptorių, klinikiniai ligos požymiai yra įvairesni [174].

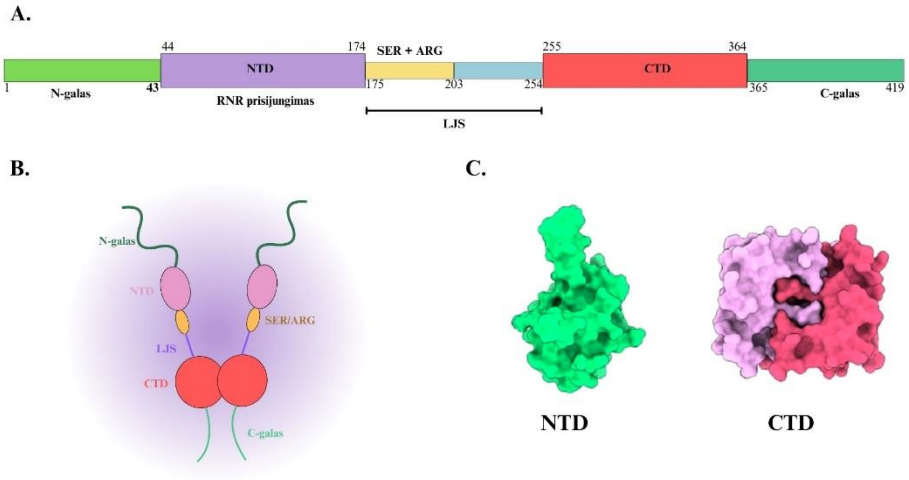
Užsikrėtę SARS-CoV-2 pacientai gali patirti įvairius simptomus – nuo besimptomės ligos iki lengvų ir vidutinių simptomų (lengva pneumonija), sunkių simptomų (dusulys, deguonies trūkumas ar daugiau nei 50 % plaučių pažeidimo požymiai) ar kritinių būklių (ūminis kvėpavimo distreso sindromas, kvėpavimo nepakankamumas, šokas ar daugybinis organų disfunkcijos sindromas). Liga dažniausiai paveikia vyresnio amžiaus žmones, tačiau sunkios formos gali pasireikšti ir jaunesniems pacientams be gretutinių ligų. SARS-CoV-2 virusas dažniausiai pasireiškia kaip apatinių kvėpavimo

takų infekcija, perduodama oro lašeliais, tačiau nauji duomenys rodo, kad liga gali pažeisti kelias organizmo sistemas. Manoma, jog tai susiję su viruso gebėjimo prisijungti prie AKF-2 receptorių (angiotenziną konvertuojantis fermentas), esančių įvairių žmogaus ląstelių paviršiuje. Kiti simptomai gali pasireikšti ne tik kartu su įprastais COVID-19 viruso požymiais, bet ir juos aplenkti [175].

Nors COVID-19 diagnozavimo ir gydymo metodai nuolat atnaujinami ir tampa vis efektyvesni, liga vis dar plinta visame pasaulyje ir jos visiška kontrolė dar nėra pasiekta. Išsamūs tyrimai nuolat gerina gydymo strategijas, tačiau virusas nesustoja mutavęs, todėl kelia vis naujus iššūkius. Mutacijos gali turėti įtakos SARS-CoV-2 viruso atsparumui esamiems gydymo metodams ir vakcinoms, todėl nuolatiniai tyrimai yra būtini, kad būtų galima efektyviai kovoti su šia infekcija ir pritaikyti gydymo būdus pagal kintančias viruso savybes [176].

1.4.1 SCoV2-rN sudėtis ir struktūra

SARS-CoV-2 priskiriamas β-koronavirusų grupei. Kaip ir kiti koronavirusai, šio viruso struktūra sudaryta iš keturių struktūrinių baltymų: spyglio (S), apvalkalo (E), membranos (M) ir nukleopsidės (N) baltymų [177,178]. SARS-CoV-2 nukleopsidės baltymas (SCoV2-rN) yra viena iš viruso sudedamųjų dalių, kurią sudaro 419 aminorūgštys. Kaip ir kituose koronavirusuose (CoV), SCoV2-rN pasižymi moduline struktūrą, kuri pagal sekos savybes yra padalinta į nestruktūrizuotas (lankstesnių ir ne tokios tvirtos struktūros) ir struktūrizuotas (labiau išlaikančias savo formas) sritis. Lankstesnės dalys apima N-galą (baltymo pradžia, kuri yra judri ir mažiau organizuota), lanksčią jungiamąją sritį (LJS, kuri jungia atskiras baltymo dalis ir savo struktūroje turi serino (SER) ir arginino (ARG) aminorūgščių) ir C-galą (baltymo pabaiga, kuri taip pat yra lanksti). Tvirtesnė sritys apima N-terminalinį domeną (NTD), kuris dalyvauja viruso RNR atpažinime ir jungtyje, bei C-terminalinį domeną (CTD), kuris atsakingas už baltymo oligomerizaciją ir viruso ribonukleoproteinų komplekso formavimą. Visa struktūra yra sudėtingai išdėstyta: NTD ir CTD yra sujungti lanksčia LJS, o baltymo kraštus sudaro N-galas ir C-galas [1]. Pagrindinė SCoV2-rN struktūra pateikta 9 pav.



9 pav. SCoV2-rN struktūra. **A** ir **B** schemose pavaizduota SCoV2-rN modulinė sandara. Parodytos trys nestruktūrizuotos sritys – N-galas, centrinė Ser/ARG turinti lanksti jungiamoji sritis, C-galas bei NTD ir CTD. C dalyje pavaizduotos modulinės SARS-CoV-2 NTD ir CTD sritys [3,179].

Kol kas SCoV2-rN NTD ir CTD struktūros dalys buvo ištirtos ir labai primena kitų CoV N baltymo struktūras. SCoV2-rN NTD molekulė yra dešinės rankos kumščio formos, o CTD egzistuoja, kaip tvirtas homodimeras ir turi stačiakampę plokštelės formą. Vis dėlto, dėl įvairių priežasčių, tokių kaip baltymo stabilumo išlaikymas ar netvarkingai išdėstytų vidinių struktūros sričių, išsamiai nustatytų CoV N baltymų struktūrų nėra. Kai kurios bioinformatikos metodikos gali suteikti užuominų, kaip galima geriau suprasti biologines SCoV2-rN baltymo funkcijas ir struktūras [3,180].

1.4.2 SCoV2-rN imuninės savybės

SARS-CoV-2 N baltymo genas yra labai stabilus, jo aminorūgščių seka yra 90 % identiška kitų CoV N baltymo genams ir laikui bėgant fiksuojama nedaug mutacijų [181]. CoV N baltymai pasižymi stipriomis imunologinėmis savybėmis ir yra gausiai gaminami infekcijos metu [182]. COVID-19 sergančių pacientų kraujyje nustatyta daug IgG antikūnų prieš N baltymą, todėl jis laikomas svarbiu antigenu, galinčiu aktyvuoti T ląsteles vakcinos kūrimo procese. Šis baltymas skatina SARS-CoV specifinių T ląstelių dauginimąsi ir gebėjimą sunaikinti užkrėstas ląsteles [183].

Tyrimai įrodė, kad C-galinė arba centrinė SCoV2-rN dalis yra imunogeniška, t.y. organizmas atpažįsta šias baltymo sritis ir sukelia specifinių antikūnų susidarymą. Be to, nauji duomenys rodo, kad SCoV2-rN struktūra yra panaši į kitų CoV N baltymų, tačiau jų paviršiaus elektrostatinio potencialo savybės skiriasi [184]. A. Sheikh su kolegomis tyrė 13 CoV N baltymo geno variacijų veiksnius bei jų poveikį viruso ir šeimininko sąveikai, kurioje pastebėjo didelį AT (adenino ir timino nukleotidinių bazių) ir mažą GC (guanino ir citozino nukleotidinių bazių) kiekį (%) SARS-CoV-2 nukleotidų sekoje [185].

Taip pat, Y. Cong su kolegomis atliko tyrimą su pelės hepatito viruso modeliu ir nustatė, kad viruso N baltymas prisideda prie spiralinių ribonukleoproteinų formavimosi pakuojant RNR genomą, reguliuoja virusinės RNR sintezę replikacijos ir transkripcijos metu bei veikia užkrėsto organizmo medžiagų apykaitą. Šie tyrimai patvirtina, kad N baltymas yra svarbus įvairiuose viruso gyvavimo ciklo etapuose [182].

Sukaupti duomenys pabrėžia SCoV2-rN svarbą kaip potencialaus vakcinos taikinio. Dėl jo stabilios struktūros, gerai ištirtos genetikos ir biochemijos bei stipraus imunologinio atsako, šis baltymas turi reikšmingų pranašumų, palyginti su spyglio (S) baltymu: jis yra labiau konservatyvus palyginus su kitais SARS-CoV-2 baltymais, mažiau linkęs mutuoti ir gali sukelti stiprų imuninės sistemos ląstelių atsaką, kuris svarbus ilgalaikei imuninei apsaugai. Dėl šių savybių N baltymo pagrindu sukurtos vakcinos galėtų papildyti į S baltymą orientuotas vakcinas arba gali būti naudingos universalioms SARS-CoV-2 vakcinoms [178].

1.4.3 SARS-CoV-2 viruso aptikimas

Daugelis kitų SARS-CoV-2 viruso baltymų yra labai svarbūs viruso gyvavimo ciklui, tačiau jų struktūra ir biofizinės savybės nėra dar gerai ištirtos. Iš visų baltymų labiausiai išsiskiria N baltymas, kuris laikomas ypač patraukliu antivirusinių terapijų taikiniu [180]. Be to, SARS-CoV-2 S baltymas, gausiai dengiantis viruso paviršių, atlieka esminę funkciją SARS-CoV-2 prisijungiant prie šeimininko ląstelės AKF2 receptoriaus ir įsiskverbiant į ląstelę, todėl kartu su N baltymu jis yra vienas pagrindinių mokslinių tyrimų objektų [177]. N baltymas ne tik užtikrina viruso RNR genomo supakavimą į ribonukleoproteinų kompleksą ir jo įtraukimą į viruso daleles, bet ir yra labiausiai paplitęs baltymas viruso dalelėse bei pasižymi itin stipriomis imunogeninėmis savybėmis [180].

Siekdami tikslenės SARS-CoV-2 diagnostikos ir veiksmingesnės plitimo kontrolės, mokslininkai remiasi PPR spektroskopijos tyrimais. PPR spektroskopijos metodas suteikia vertingos informacijos apie molekulių sąveikų specifiškumą, kinetiką ir stiprumą. Taikant PPR spektroskopiją SARS-CoV-2 RNR nustatymui, svarbu vystyti greitus, jautrius ir ekonomiškai efektyvius aptikimo sprendimus. Nors šiuo metu egzistuoja įvairūs SARS-CoV-2 viruso diagnostikos metodai, tokie kaip imunofermentinė analizė (IFA) imonologiniai tyrimai ir PGR (polimerazės grandininės reakcijos) analizė, dažnu atveju jie turi trūkumų – aukštą kainą, netikslius rezultatus ar ilgas tyrimų atlikimo trukmes. PPR technologija, jautriai reaguodama į paviršiaus lūžio rodiklio pokyčius, atsirandančius biomolekulėms sąveikaujant su jutikliu, gali pasiūlyti greitesnį ir tikslesnį viruso aptikimą. Be to, šiuolaikiniai PPR įrenginiai yra ekonomiški, reikalauja mažesnių mėginių kiekių ir leidžia atlikti analizę be sudėtingo mėginių paruošimo, kas ypač aktualu diagnostikoje [186].

O. Calvo-Lozano su kolegomis atliko tyrimą, kuris parodė, kad PPR technologija gali būti efektyviai pritaikyta greitam (per mažiau nei 15 min.) SARS-CoV-2 antikūnų nustatymui ir kiekybiniam įvertinimui kraujo serume. Tyrime išbandytos skirtingos strategijos, derinant N baltymą ir RBD (receptorių jungimosi domenas) antigeną ant jutiklio paviršiaus, siekiant didžiausio jautrumo ir specifiškumo. Sukurtas diagnostinis jutiklis pasiekė aukštą jautrumo lygį serume, leidžiantį vienu žingsniu tiksliai atskirti SARS-CoV-2 antikūnų teigiamus ir neigiamus mėginius. Tyrimo duomenys parodė, kad diagnostinis jutiklis beveik visada teisingai identifikuoja mėginius, turinčius SARS-CoV-2 antikūnų ir visiškai tiksliai nustato mėginius, kuriuose antikūnų nėra. Šie rezultatai lenkia tradicinius metodus, tokius kaip imunologiniai tyrimai ar greitieji testai. Taip pat atliktas preliminarus tyrimas, vertinantis humoralinio imuniteto atsaką ir klinikinius ligos sunkumo rodiklius, tačiau didesnės apimties tyrimai būtini patikimesniems rezultatams gauti [187].

1.5 SARS-CoV-2 imuniniai jutikliai

COVID-19 liga, sukelta SARS-CoV-2, dažniausiai yra lengva, tačiau kai kuriems pacientams gali sukelti sunkias ir gyvybei pavojingas komplikacijas. Organizmo pirmoji gynybos linija – įgimtasis imunitetas – atpažįsta virusą per specialius receptorius, suaktyvina uždegimines reakcijas ir padeda pašalinti virusą iš organizmo [188]. Vis dėlto, nuo tada, kai atsirado SARS-CoV-2 virusas, jis mutavo tūkstančius kartų – tai natūralus procesas, vykstantis

virusui dauginantis. Per pandemiją atsirado kelios reikšmingos viruso atmainos, tokios kaip Alfa, Beta, Gama, Delta ir Omikron [189]. Ankstyvas SARS-CoV-2 viruso nustatymas yra itin svarbus, siekiant suvaldyti pandemiją ir sumažinti plitimą. Šis virusas perduodamas oro lašeliniu būdu per kosulį, čiaudulį ar artimą kontaktą, todėl greita diagnostika leidžia laiku imtis prevencinių priemonių ir sumažinti infekcijos paplitimą. Be to, tiksli ir jautri viruso aptikimo sistema yra būtina, siekiant įvertinti visuomenės sergamumo rodiklius, vakcinų veiksmingumą ir užkirsti kelią naujų viruso atmainų plitimui. Dėl šių priežasčių nuolat kuriami ir tobulinami greiti bei patikimi diagnostikos metodai, leidžiantys greitai nustatyti SARS-CoV-2 infekciją [190].

Šiandien virusinėms ligoms diagnozuoti naudojama daugybė alternatyvių technologijų, įskaitant imunologinius tyrimus [191] ir jais pagrįstus biologinius jutiklius [192–194]. Tradiciniai imunologiniai tyrimai nustato tam tikrą medžiagą tirpale naudodami antikūnus arba antigenus – kai antikūnas susijungia su antigenu, sukeliamas signalas, kurį galima išmatuoti. Pastaruoju metu SARS-CoV-2 diagnozei buvo sukurti naujos kartos jutikliai, kurie viruso aptikimą paverčia matomais fizikiniais ar cheminiais pokyčiais tiriamoje medžiagoje ar prietaise. Šie biologiniai jutikliai gali aptikti viruso kiekį matuodami lauko efekto srovės pokyčius [195], paviršiaus plazmonų energijos pokyčius [57,196], optinius pokyčius [57], elektrocheminius procesus [197,198], pjezoelektrinius [199] ar šiluminius svyravimus [57]. Tačiau dauguma šių metodų vis dar yra ankstyvoje vystymo stadijoje arba susiduria su masinio taikymo problemomis, dėl kurių jų praktinis pritaikymas yra ribotas.

1.5.1 Antikūnų tyrimai

Dėl visuotinio socialinio atstumo ir izoliacijos didėjo dėmesys epidemijų prevencijai ir kontrolei, ypač plataus masto serologiniams antikūnų tyrimams. Šie tyrimai leidžia įvertinti populiacijos užsikrėtimo lygį, vakcinų veiksmingumą, imuniteto trukmę bei atrinkti ir surinkti didelės koncentracijos neutralizuojančius antikūnus. Antikūnų nustatymui dažniausiai naudojami tokie metodai kaip imunofermentinė analizė, chemiliuminescencinis imunotyrimas (CLIA), imunofluorescencinis tyrimas ir koloidinio aukso imunochromatografinis tyrimas. Jie leidžia greitai aptikti SARS-CoV-2 infekciją, nustatant IgM ir (arba) IgG antikūnus kraujo serume ar kituose organizmo skysčiuose, orientuojasis į viruso S ir N baltymų antigenus [200]. Atliktas tyrimas Italijoje, išanalizavo 959 kraujo mėginius, paimtus iš

besimptomių asmenų dalyvavusių plaučių vėžio prevencinėje programoje laikotarpiu nuo 2019 m. rugsėjo iki 2020 m. kovo – dar prieš oficialiai užregistruojant pirmąjį COVID-19 atvejį šalyje. Šio tyrimo rezultatai parodė, kad maždaug 11,6 % vietos gyventojų jau buvo užsikrėtę SARS-CoV-2 iki pirmojo oficialaus ligos atvejo paskelbimo [201].

Antikūnų tyrimai padeda įvertinti populiacijos kontaktą su virusu tiek prieš, tiek po didelių epidemijos protrūkių, nustatyti, ar užsikrėtusių asmenų organizme susidaro neutralizuojantys antikūnai - antikūnai, galintys blokuoti viruso patekimo į ląsteles mechanizmą**,** ir sekti jų koncentracijos pokyčius laikui bėgant. Ypač svarbu stebėti neutralizuojančių antikūnų formavimąsi po vakcinacijos, nes SARS-CoV-2 infekcijos prevencijai yra prieinamos įvairių tipų vakcinos plačiajai visuomenei.

1.5.2 Antigenų tyrimai

SARS-CoV-2 atveju pagrindiniai antigenai, sukeliantys imuninį atsaką, yra N ir S baltymai, o antikūnai prieš šiuos baltymus pacientų serume gali išlikti iki 30 savaičių [202]. Naujos kartos antigenų nustatymu pagrįstas greitasis testas parodė aukštą jautrumą ir specifiškumą, ypač per pirmąją simptomų savaitę ir mėginiuose su dideliu viruso kiekiu [203]. Tuo tarpu fluorescencinis imunochromatografinis metodas, skirtas N baltymui aptikti, buvo jautrus tik ankstyvoje infekcijos stadijoje [204]. Masės spektrometrijos analizė parodė N baltymo buvimą COVID-19 pacientų skalavimo tirpaluose [205], o fluorescencinis imunochromatografinis testas aptiko N baltymą 73,6 % diagnozuotų pacientų šlapimo mėginiuose [204]. Kadangi antikūnai prieš S baltymą susidaro vėliau nei prieš kitus viruso baltymus, jo aptikimas yra tinkamesnis sveikimo laikotarpiu [206], o itin jautrus S baltymo antigeno testas gali būti lengvai atliktas naudojant mikroplokštelių skaitytuvą [207].

Be šių įprastų metodų, buvo sukurtas pusiau juostelės šoninio srauto tyrimas (angl. *half-strip lateral flow assay*), skirtas SARS-CoV-2 nukleokapsidės antigenui nustatyti. Šis testas pasižymi geresniu klinikiniu jautrumu nei įprasti serologiniai tyrimai. Naudojant komerciškai prienamą ,,Genscript“ N baltymo standartą, aptikimo riba buvo 3,03 ng ml^{-1}, kas rodo metodo privalumą, nustatant antigeną, esant gana žemoms koncentracijoms [208]. Be to, buvo sukurtas nanozimais (angl. *nanozymes*) pagrįstas chemiliuminescencinis popierinis testas, kurį galima atlikti naudojant įprasto išmaniojo telefono kamerą, o SARS-CoV-2 spyglio antigeno aptikimo riba siekia 0,1 ng ml^{-1} [209].

Antigenų nustatymui taip pat naudojami specifiniai nukleotidiniai aptamerai prieš N baltymą, kurie pasižymi tokiu pačiu specifiškumu kaip antikūnai, tačiau gali turėti didesnį jautrumą. Naudojant SELEX atrankos strategiją [210], buvo sukurti specifiniai ssDNR aptamerai, kurie jautriai atpažįsta SCoV2-rN [211]. Kito tyrimo metu buvo identifikuoti keturi DNR aptamerai, kurių specifiškumas mažesnis nei 5 nmol l^{-1}, sudarantys „sumuštinio“ tipo sąveiką su LOD 1 ng ml^{-1} [212]. Palyginti su IFA testais, kurių aptikimo riba yra 50–100 ng ml^{-1} [213,214], aptamerais pagrįstos technologijos užtikrina gerokai didesnį jautrumą, trumpesnį analizės laiką ir didesnį pakartojamumą bei pritaikomumą. Todėl aptamerais pagrįsti antigenų nustatymo metodai gali būti pranašesni už antikūnais paremtus tyrimus dėl didesnio jautrumo, galimybės juos integruoti į biologinius jutiklius chemiliuminescenciniam ar fluorescenciniam aptikimui bei dėl mažesnių gamybos paklaidų ir didesnio partijų tarpusavio vienodumo [210,215].

Galiausiai, verta paminėti, kad greitųjų antigenų tyrimų jautrumas yra 10^3 kartus mažesnis nei viruso kultūros metodo ir 10^5 kartus mažesnis nei RT-PGR metodo [216]. Ankstesni tyrimai parodė, kad greitųjų antigenų testų jautrumas sudaro tik apie 30 % nukleorūgščių tyrimų jautrumo [217], todėl antigenų tyrimai nėra idealūs greitam diagnostiniam naudojimui, tačiau gali būti taikomi kaip patvirtinantys ar moksliniai tyrimai specifiniams pacientų mėginiams.

1.5.3 SARS-CoV-2 imuniniai jutikliai

Šiuo metu pagrindinis SARS-CoV-2 diagnostikos metodas yra atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija (RT-PCR) [218]. Šis metodas yra patikimas ir pakankamai jautrus ankstyvajam aptikimui [219], tačiau laboratorinės procedūros sudėtingos, todėl rezultatų laukimas gali užtrukti iki 72 val. [220]. Norint sėkmingai atlikti PCR analizę, viruso identifikavimas turi būti atliktas ankstyvoje ligos stadijoje [221]. Kadangi SARS-CoV-2 mutuoja, pokyčiai viruso genome gali atsirasti tose vietose, kurias atpažįsta PCR pradmenys arba kurias jie amplifikuoja. Tokios mutacijos gali sumažinti PCR testo jautrumą ir sukelti klaidingai neigiamus rezultatus, apsunkindamos tikslų diagnozavimą [222].

Palyginus su RT-PCR, greitieji antigenų testai (Ag-RTK) gali būti naudojami tiesioginės priežiūros (angl. *point-of-care,* POC) diagnostikoje ir pateikia rezultatus per 30 min. [223]. Ag-RTK jautrumas priklauso nuo viruso kiekio mėginyje – esant didelei viruso koncentracijai, aptikimo tikslumas siekia 81 %, o esant mažai – tik 11 % [224]. Nors Ag-RTK testai patikimai

nustato viruso buvimą teigiamuose mėginiuose (visiškai specifiški), jų jautrumas nėra pakankamas – kai viruso koncentracija mažesnė, testas gali praleisti infekuotus mėginius. Ideali diagnostinė sistema turėtų ne tik patikimai atskirti neigiamus mėginius, bet ir aptikti visus teigiamus, net jei viruso koncentracija labai maža. Norint pagerinti Ag-RTK jautrumą, reikėtų optimizuoti mėginių surinkimo laiką, procedūrą ir transportavimą [219]. Nors Ag-RTK naudingas POC diagnostikai, masinei patikrai viešose vietose jis yra brangus. Todėl optiniai imuniniai jutikliai tampa patrauklia alternatyva virusų aptikimui realiuoju metu. Jie gali būti integruoti su dirbtinio intelekto sistemomis, yra saugūs, paprasti naudoti ir nereikalauja nukleorūgščių amplifikacijos [225].

Vienas pažangiausių optinių imuninių jutiklių metodų yra PPR, kuris leidžia realiu laiku stebėti biomolekulių sąveiką be papildomų žymenų [226]. Prizmės tipo PPR yra populiarus dėl savo paprastumo – ploną metalinę dangą padengus ant prizmės, galima atlikti jautrią analizę. Tačiau tokie jutikliai yra stambūs ir nepritaikomi nuotoliniam aptikimui, todėl vietoje jų galima būti taikomas LPPR, vykstantis metalinėse ND veikiant šviesai. Mokslininko D. T. Nurrohman su kolegomis atlikti tyrimai parodė, kad 2D ND, tokių kaip grafenas ar molibdeno disulfidas (MoS_2), integravimas į PPR spektroskopijos jutiklius ženkliai padidina jų jautrumą, leidžiant pasiekti pg ml^{-1} koncentracijos aptikimo ribą įvairių biožymenų nustatyme. Nors šių medžiagų praktinis taikymas susiduria su technologiniais iššūkiais, tokie deriniai laikomi viena iš perspektyviausių krypčių diagnostinių biologinių jutiklių kūrime [227].

Dar viena alternatyva – šviedolaidžiai, kurie leidžia sumažinti imuninių jutiklių dydį ir sumažinti kaštus [20]. Skirtingai nuo prizminės PPR technologijos, šviesolaidžių PPR jutikliai gali būti miniatiūrizuoti, todėl yra perspektyvūs POC diagnostikai [228]. Be to, PPR galima įgyvendinti naudojant optines gardeles ir bangolaidžius [229]. Difrakcinės gardelės pagrindu veikiantys PPR jutikliai gali būti integruoti tiek į vienos rūšies, tiek į kelių rūšių šviesolaidžius [230], o bangolaidžio pagrindu veikiantys jutikliai sukelia PPR tiesiai ant jutiminio sluoksnio paviršiaus [231]. Šie metodai leidžia sumažinti jutiklių dydį, palengvindami jų pritaikymą diagnostikoje.

PPR imuniniai jutikliai vis dažniau naudojami virusinių infekcijų nustatymui dėl jų greito veikimo ir žymenų nereikalaujančios analizės galimybės. A. Kaušaitė-Minkštimienė su kolegomis sukūrė PPR imuninį jutiklį, skirtą jautriai SARS-CoV-2 antikūnų prieš SARS-CoV-2 receptorius jungiančio domeno (anti-RBD) kiekybinei analizei. Jutiklio jautrumas buvo sustiprintas naudojant antikūnų ir AuND konjugatus. Naudojant sumuštinio

tipo aptikimo formatą, imuninis jutiklis galėjo nustatyti anti-RBD 0,043–10,66 nmol l^{-1} koncentracijų diapazone, pasiekdamas žemą aptikimo ribą. Tyrimai parodė gerą pakartojamumą, atkuriamumą (santykinis standartinis nuokrypis 4,47 % ir 9,64 %) ir stabilumą (12,31 % signalo sumažėjimas po 10 dienų). Be to, imuninis jutiklis sėkmingai pritaikytas realių serumo mėginių analizei [232]. Taip pat, M. Jiang su kolegomis sukūrė regeneruojamą PPR metodą, skirtą greitam ir jautriam SARS-CoV-2 anti-S1 antikūnų kiekybiniam nustatymui. Naudojant histidino žyma (His) pažymėtą SARS-CoV-2 spyglio baltymą ir tris-nitrilotriacto rūgšties (tris-NTA) jutiklį, sistema leido atlikti daugiau nei 800 serumo mėginių analizes su vienu jutikliu, kurį galima regeneruoti bent 20 kartų. Metodas pasižymėjo aukštu tikslumu (kanalo pakartojamumo standartinis nuokrypis – 1,9 %, jutiklio pakartojamumo standartinis nuokrypis – 2,1 %) ir itin žema aptikimo riba – 0,057 μg ml^{-1} [233]. PPR pagrindu sukurti imuniniai jutikliai užtikrina didesnį jautrumą, greitesnį atsaką ir atkuriamumą, leidžiantį tiksliai aptikti biomolekules be sudėtingų žymėjimo procedūrų. Jie siūlo perspektyvią alternatyvą tradiciniams serologiniams metodams ir gali papildyti RT-PCR reakcijas, suteikdami greitesnį ir ekonomiškesnį sprendimą realiuoju laiku vykdomai virusų diagnostikai.

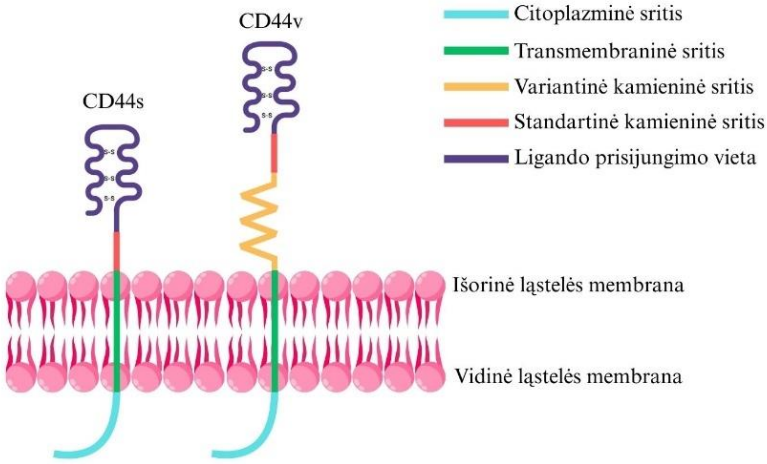
1.6 CD44 baltymas

CD44 yra transmembraninis glikoproteinas [234], kuris aptinkamas įvairiose žmogaus ląstelėse, įskaitant imunines ląsteles, diferencijuotas ląsteles ir vėžines ląsteles [235]. Šis baltymas gali jungtis su daugybe ligandų, tokių kaip HR [236], osteopontinas [237] ir serglicinas [238]. Kai CD44 prisijungia prie šių ligandų, jis aktyvuoja įvairius signalinius kelius, kurie yra svarbūs tiek normaliems fiziologiniams procesams, tiek ligoms, įskaitant vėžį [239]. Ypač didelę reikšmę CD44 turi vėžio vystymuisi, nes jo aktyvacija gali skatinti ląstelių dauginimąsi, migraciją, atsparumą vaistams bei epitelio-mezenchimos transformaciją (EMT) – procesą, kurio metu epitelinės ląstelės įgyja migracijos ir invazijos savybių, būdingų vėžinėms ląstelėms [240–242]. CD44 baltymą koduojančiam genui gali būti atliekamas splaisingas (angl. *splicing*), todėl susidaro dvi pagrindinės izoformos: standartinė CD44 (CD44s) ir variantinė CD44 (CD44v). Šios izoformos gali atlikti panašias arba skirtingas funkcijas vėžinių procesų metu. Paprastai CD44s siejama su naviko augimu [243] ir progresavimu [244], o tam tikros CD44v formos, pavyzdžiui, CD44v3 ir CD44v6, yra susijusios su vėžio ląstelių gebėjimu įsiskverbti į audinius [245] bei atsparumu chemoterapijai [246]. Moksliniai tyrimai vis

dažniau rodo, kad CD44 gali reguliuoti daugelį signalinių kelių, kurie lemia vėžinių ląstelių judėjimą, EMT procesus bei kamieninių ląstelių savybių išlaikymą [247,248]. Pastaraisiais metais buvo atrasta dar daugiau CD44 funkcijų, leidžiančių geriau suprasti jo vaidmenį vėžio biologijoje. Dėl to CD44 pripažįstamas ne tik kaip svarbus vėžinių kamieninių ląstelių (VKL) žymuo, bet ir kaip potencialus terapinis taikinys gydant vėžį [235,249,250]. Onkologijoje svarbu išsiaiškinti, kaip CD44 dalyvauja įvairiuose signaliniuose keliuose, nes tai gali padėti sukurti naujus gydymo metodus, skirtus stabdyti navikų augimą, juos gydyti arba net užkirsti kelią jų susidarymui. Nors CD44 atrodo perspektyvus kaip taikinys vėžio terapijoje, iki šiol atlikta palyginti nedaug klinikinių tyrimų, nagrinėjančių jo terapinį potencialą. Todėl išsamus CD44 veikimo mechanizmų supratimas yra būtinas, kad būtų galima kurti naujas, inovatyvias gydymo strategijas, nukreiptas prieš CD44.

1.6.1 CD44 baltymo struktūra

CD44 genas sudarytas iš 20 egzonų. Iš jų pastovieji egzonai 1-5 ir 16-20 koduoja atitinkamai N-galinį ir C-galinį domenus, kurie yra bendri visiems CD44 šeimos baltymams [251]. Mažiausia ir dažniausiai ekspresuojama CD44 izoforma yra CD44s, kurią sudaro 10 pastovių egzonų ir neturi jokių variantinių egzonų [252]. Kita izoforma – CD44v – nuo CD44s skiriasi tuo, kad tarp N-galinio ir C-galinio domenų gali būti įterpiami arba pašalinami papildomi egzonai, kurie susidaro dėl alternatyvaus splaisingo. Tai procesas, kurio metu iš vieno geno gali susidaryti kelios skirtingos mRNR formos, leidžiančios sintetinti skirtingas baltymo izoformas [253]. Mokslininkė Tölg su kolegomis nustatė, kad pelių ir žiurkių genomuose, be dešimties pastovių egzonų, yra bent dešimt variantinių egzonų, kurie gali būti skirtingai sujungti į CD44 RNR. Jie pasiūlė šiuos variantinius egzonus klasifikuoti nuo v1 iki v10 [254]. Mokslininkas Screaton su bendradarbiais išanalizavo žmogaus CD44 geno struktūrą ir nustatė, kad jis turi 19 egzonų, kurie išsidėstę maždaug 50000 nukleobazių ilgio DNR atkarpoje. Jie nustatė, kad žmogaus CD44 gene yra dešimt pastovių egzonų ir devyni variantiniai egzonai, kurie žymimi v2-v10 [255]. CD44v izoformose gali būti vienas variantinis egzonas, pavyzdžiui, CD44v3 arba CD44v6, arba kelių egzonų deriniai, tokie kaip CD44v3–v7 ar CD44v8–v10. Kadangi ląstelės gali nuolat keisti CD44 pre-mRNR splaisingą, galima suformuoti daugybę skirtingų šių variantinių egzonų kombinacijų, todėl CD44 baltymas gali turėti labai daug skirtingų formų [253]. CD44 baltymo izoformų struktūros pateikiamos 10 pav.



10 pav. CD44 baltymo izoformų struktūra [256].

CD44 baltymas turi keturias pagrindines struktūrines sritis: ekstraląstelinę sritį, kamieninę sritį (standartinę ir/arba variantinę kamieninę sritį), transmembraninę sritį ir trumpą C-galinę citoplazminę sritį [257]. Ekstraląstelinę dalį sudaro septyni ekstraląsteliniai domenai (egzonai 1–5, 6 ir 7), tarp kurių yra N-galinis domenas, atsakingas už ligando prisijungimą. Kamieninė sritis, kurioje vyksta alternatyvus splaisingas, gali turėti vieno ar daugiau variantinių egzonų intarpus tarp 5 ir 6 egzonų. Transmembraninę sritį koduoja vienas egzonas (8 egzonas), o citoplazminę sritį – 10 arba 9 egzonas. Tačiau beveik visose CD44 DNR izoformose 9 egzonas būna iškirptas [253,258]. Keletas žmogaus CD44 baltymo izoformų yra siejamos su vėžio progresavimu ir kamieninių ląstelių savybėmis įvairiuose vėžio tipuose, įskaitant krūties vėžį [259], gliomas [260,261], galvos ir kaklo plokščiųjų ląstelių karcinomą [262], kasos vėžį [30], [31], prostatos vėžį [265] ir kolorektalinį vėžį [266], [267]. CD44 baltymo struktūrinį sudėtingumą dar labiau padidina potransliacinės modifikacijos, tokios kaip įvairių glikozilinimo tipų prisijungimas – O-glikanai, N-glikanai ir glikozaminoglikanai, pavyzdžiui, chondroitino sulfatas ir heparano sulfatas [257]. Dėl šių šoninių grandinių CD44 baltymo molekulinė masė gali padidėti nuo 37 kDa iki 80 – 100 kDa, o kai kurios izoformos gali siekti net daugiau nei 200 kDa dėl intensyvaus glikozilinimo [253].

1.6.2 CD44 baltymo ekspresija audiniuose

CD44 baltymas gausiai randamas limfocituose, lygiųjų raumenų ląstelėse, fibroblastuose ir įvairių tipų epitelio ląstelėse. Jis atlieka svarbų vaidmenį

daugelyje biologinių procesų: padeda limfocitams migruoti į limfmazgius, skatina ląstelių sukibimą ir telkimąsi, dalyvauja ląstelių judėjime, leukocitų aktyvavime, limfocitų ir kraujo ląstelių formavime, naujų kraujagyslių augime (angiogenezėje) bei citokinų išskyrime [253,256]. Standartinė CD44s forma pirmiausia buvo aptikta kraujodaros sistemos ląstelėse, tačiau ji taip pat išreiškiama ir kituose audiniuose, įskaitant kepenis, plaučius, kasą, odą ir centrinę nervų sistemą [253]. CD44s randama tiek suaugusiuose audiniuose, tiek embrione – nuo 9,5 dienos po apvaisinimo [268]. Tuo tarpu CD44v formos turi ribotesnį pasiskirstymą ir pasirodo dar ankstesniame vystymosi etape – maždaug nuo 6,5 embriono dienos. Skirtingai nei CD44s, CD44v variantai yra būdingi tik tam tikroms ląstelėms ir yra išreiškiami tik tam tikrose jų aktyvumo, brendimo ar vystymosi stadijose. Pavyzdžiui, šios izoformos randamos makrofaguose, aktyvuotuose limfocituose, keratinocituose ir kai kuriose epitelio ląstelėse, tokiose kaip skrandžio, šlapimo pūslės ir gimdos kaklelio epitelis. Be to, jos dažnai aptinkamos įvairių rūšių karcinomose [253]. Normaliuose audiniuose CD44 izoformos yra svarbios reguliuojant HR apykaitą. Jei CD44 išraiška sumažėja arba visai išnyksta, tai gali sutrikdyti HR metabolizmą, o dėl to gali sulėtėti plaukų ataugimas, pablogėti žaizdų gijimas ir sumažėti keratinocitų dauginimasis [269].

1.6.3 CD44 baltymo ekspresija navikuose

Daugybė tyrimų rodo, kad limfomos, krūties, storosios žarnos ir endometriumo vėžio ląstelėse aptinkami padidėję CD44 geno mRNR lygiai [270]. Vis daugiau duomenų taip pat rodo, kad CD44 yra smarkiai per daug ekspresuojamas ir kituose vėžio tipuose, įskaitant tulžies pūslės, prostatos, kiaušidžių, burnos plokščialąstelinės karcinomos bei skrandžio vėžį. Ši per didelė CD44 raiška dažnai siejama su agresyvesniu navikų biologiniu elgesiu ir prastesne ligos prognoze [271]. Nors CD44 vaidmuo navikuose nėra iki galo išaiškintas, padidėjęs jo kiekis siejamas su daugybe piktybinių navikų. Fiziologinės CD44 funkcijos rodo, kad jis dalyvauja navikų metastazėse [253]. Pavyzdžiui, plaučių adenokarcinomos ląstelės pasižymi didele CD44v izoformos ekspresija, kuri yra susijusi su stipresnėmis vėžio kamieninių ląstelių savybėmis, greitesniu dauginimusi ir atsparumu chemoterapijai [272]. Be to, kai kurios CD44 izoformos, ypač CD44v6, yra glaudžiai susijusios su kasos vėžio ląstelių metastazėmis [270]. Daugelyje tyrimų buvo analizuojami CD44 raiškos lygiai įvairiuose vėžio tipuose, lyginant juos su greta esančiais sveikais audiniais. Taip pat buvo nagrinėjama

CD44 sąsaja su navikų progresavimu ir klinikiniais bei patologiniais ligos rodikliais.

1.6.4 CD44 baltymo biologiniai jutikliai

CD44 baltymas biologiniuose jutikliuose dažnai pasirenkama kaip tikslinė molekulė, nes jis laikomas vienu iš svarbiausių vėžio kamieninių ląstelių žymenų. Naudojant antikūnus prieš CD44 baltymą (anti-CD44) galima specifiškai aptikti šį baltymą, nustatyti jo ekspresijos lygį bei įvertinti ląstelių heterogeniškumą. Remiantis šiuo principu, yra sukurta įvairių biologinių jutiklių, pasižyminčių dideliu jautrumu ir specifiškumu, kurie gali būti taikomi vežio diagnostikoje ir gydymo stebėsenai [273].

Norint efektyviai naudoti CD44 baltymą kaip tikslinę molekulę biologiniuose jutikliuose, svarbu suprasti, kaip antikūnai jungiasi prie šio baltymo. Antikūnų prisijungimo specifiškumas ir kinetika gali turėti didelės įtakos jutiklio gaunamiems rezultatams. Pavyzdžiui, mokslininkas Y. Kudo su kolegomis imunizavo pelės CD44v3-10 perteklių ekspresuojančiomis ląstelėmis ir sukūrė kelis monokloninių anti-CD44 antikūnų klonus. Vienas jų (C44Mb-3) pasižymėjo dideliu specifiškumu ($1{,}3 \times 10^{-9}$ mol l^{-1}) CD44v5 baltymui kasos vėžinėse ląstelėse, atskirdamas jas nuo kitų vėžinių ląstelių [274].

Remiantis CD44 baltymo ir jam specifinių antikūnų sąveikomis buvo sukurti įvairūs biologinių jutiklių sprendimai. Z. U. Paltusheva su kolegomis sukūrė šviesolaidinį biologinį jutiklį su sferiniu galiuku, padengtu 100 nm storio cinko oksido sluoksniu. Jutiklio paviršius buvo funkcionalizuotas naudojant anti-CD44, leidžiančius specifiškai atpažinti CD44 baltymą. Šis jutiklis leido tiksliai matuoti CD44 baltymo koncentraciją 100 amol l^{-1} – 100 nmol l^{-1} diapozone ir pasižymi itin žema aptikimo riba (0,8 fmol l^{-1}), dideliu jautrumu aplinkos lūžio rodiklio pokyčiams ir galimybe regeneruoti paviršių nepažeidžiant funkcionalizuoto sluoksnio [275]. Taip pat, mokslininkas N. Kumar sukurė elektrocheminį imuninį jutiklį, kuriam buvo naudojami AuND ir grafeno KT konjugatai, skirtą krūties vežio CD44 biožymens aptikimui. Dėl didelio paviršiaus ploto bei paviršiuje esančių aktyvių funkcinių grupių nanokompozitas leido imobilizuoti anti-CD44. Tokio imuninio jutiklio aptikimo CD44 baltymo riba buvo 1,17 fg ml^{-1} [276]. Apibendrinant, tyrimai rodo, kad CD44 baltymo ir atitinkamų antikūnų sąveikos gali būti išnaudotos kuriant biologinius jutiklius, pasižyminčius itin žema aptikimo riba ir dideliu jautrumu. Tokie biologiniai jutikliai suteikia perspektyvą anktyvai vėžio diagnostikai ir tiksliniam biožymens stebėjimui.

2 EKSPERIMENTO METODIKA

2.1 Naudojami reagentai ir tirpalai

Antikūnai ir baltymai:

- Antikūnai prieš kremzlinį oligomerinį matricinį baltymą (monokloniniai pelių IgG1 antikūnai, klonas 16F12, išvalyti afinine chromatografija), „BioVendor", Čekija
- Anti-SCoV2-rN (pelių monokloniniai antikūnai, klonas B12N, išvalyti naudojant baltymą A), „Baltymas", Lietuva
- Jaučio serumo albuminas (JSA), „Carl Roth", Vokietija
- Monokloniniai pelių IgG tipo antikūnai, klonas Nr. 2C5 (anti-CD44), „ R&D Systems", Jungtinė Karalystė
- Ožkos antikūnai prieš pelių IgG (Fc dalį), žymėti krienų peroksidaze (anti-HRP), „Thermo Fisher Scientific", JAV
- Rekombinantinis CD44 baltymas (su His žyme C-gale), „ R&D Systems", Jungtinė Karalystė
- SCoV2-rN (SARS-CoV-2 rekombinantinis nukleokapsidės baltymas, su His6 žyme baltymo C gale), „Baltymas", Lietuva

Kvantiniai taškai:

- Kvantiniai taškai - Qdot™ 605 ITK™ amino (PEG) (KT-NH_2), „Thermo Fisher Scientific'', JAV
- Kvantiniai taškai Qdot™ 655 ITK™ su kaboksigrupėmis (KT-COOH), „Thermo Fisher Scientific'', JAV

Kryžminio sujungimo ir aktyvinimo reagentai:

- Bis(sulfosukcinimidilo) suberatas (BS_3), „ Thermo Fisher Scientific", JAV
- Etanolaminas, „Carl Roth", Vokietija
- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC), „Carl Roth", Vokietija
- N-hidroksisukcinimidas (NHS), „Carl Roth", Vokietija

Buferiniai tirpalai:

- 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etano-1-sulfoninė rūgštis (HEPES), „Carl Roth", Vokietija

- Acetatinis buferinis tirpalas (ABS, pH 4,5) buvo paruoštas naudojant natrio acetato trihidratą (≥99 %, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$) ir acto rūgštį (CH_3COOH), „Carl Roth“, Vokietija
- Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS, pH 7,4), paruoštas iš tablečių, „Carl Roth“, Vokietija

Druskos ir paviršiaus aktyvios medžiagos:

- Glicinas, „ Sigma-Aldrich”, Vokietija
- Magnio chloridas, „Carl Roth“, Vokietija
- Natrio dodecilsulfatas (≥99,0 %, SDS), „Carl Roth“, Vokietija
- Natrio hidroksidas, „Carl Roth“, Vokietija
- Tween-20, „ Sigma-Aldrich”, Vokietija

Organiniai tirpikliai:

- Etanolis (≥99,8 %), „HoneyWell“, JAV
- Metanolis (≥99,9 %), „Carl Roth“, Vokietija

Kiti reagentai ir medžiagos:

- 11-merkaptoudekano rūgštis (99 %, MUR), „ Sigma-Aldrich”, Vokietija
- 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidinas (TMB), „ Thermo Fisher Scientific”, JAV
- Argono dujos, „Esme Messer Gaas”, Lietuva
- Druskos rūgštis (37 %), „Carl Roth“, Vokietija
- Imersinis aliejus (lūžio rodiklis n = 1,518), „Cargille Laboratories“, JAV
- Sieros rūgštis (98 %), „Carl Roth“, Vokietija
- Vandenilio peroksidas (30 %), „Carl Roth“, Vokietija

2.2 Prietaisai ir priemonės

Matavimo prietaisai:

- Dvikanalis PPR analizatorius AUTOLAB Esprit, „AUTOLAB“, Olandija.
- Skenuojantis elektroninis mikroskopas FE-SEM SU-70, „Hitachi“, Japonija.
- Zetasizer Nano ZS 3600 prietaisas, „Malvern“, Jungtinė Karalystė
- Infinite 200 PRO plokštelių skaitytuvas, „Tecan‘‘, Šveicarija

- pH-metras, „XSinstrument“, Italija
- Analizinės svarstyklės, modelis:AS310.R2 PLUS, „Radwag”, Lenkija

Pagalbiniai laboratoriniai prietaisai:

- Automatinės pipetės Research, „Eppendorf“, JAV
- Centrifuga „Megafuge™ 8 Small Benchtop‘‘, „Thermo Fisher Scientific‘‘, Vokietija
- Vortex „Mini Vortex Mixer‘‘, „ISOLAB‘‘, Kinija
- Mėgintuvėlių rotatorius, „Thermo Fisher Scientific‘‘, JAV

Eksploatacinės ir vienkartinės laboratorinės priemonės:

- 100 µl „LoBind‘‘ mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, „Eppendorf‘‘, Vokietija
- 100 K Nanosep filtravimo mėgintuvėliai, „Pall“, Puerto Rikas
- 300 K Nanosep filtravimo mėgintuvėliai, „Pall“, Puerto Rikas
- Auksu dengti PPR spektroskopijos lustai, „AUTOLAB“, Olandija
- MaxiSorp plokštelės, „Thermo Fisher Scientific‘‘, JAV
- Nanosep filtravimo mėgintuvėliai, „Pall“, Puerto Rikas

2.3 Tirpalų paruošimas

PBS tirpalas, kurio koncentracija 10 mmol l^{-1}, buvo ruošiamas ištirpinant PBS tabletę 500 ml distiliuoto vandens. Tabletei visiškai ištirpus, tirpalo pH buvo matuojamas pH-metru ir koreguojamas pridedant nedidelius kiekius 1 mol l^{-1} NaOH arba 1 mol l^{-1} HCl tirpalų, kol pasiekiama galutinė pH vertė 7,4. Paruoštas tirpalas filtruojamas ir laikomas šaldytuve.

ABS skirtingos koncentracijos (10 mmol l^{-1} ir 50 mmol l^{-1}) tirpalai buvo paruošiami ištirpinant apskaičiuotą kiekį natrio acetato trihidrato kiekį distiliuotame vandenyje ir įpilant acto rūgšties. Po to pH buvo reguliuojamas įpilant 1 mol l^{-1} NaOH arba 1 mol l^{-1} HCl tirpalų iki reikiamos pH 4,5 arba 5,3 vertės. Gautas tirpalas filtruojamas ir laikomas šaldytuve.

Skirtingų koncentracijų (10, 25 ir 50 mmol l^{-1}) NaOH ir 0,5 % SDS tirpalai buvo paruošiami, kai atitinkamas kiekis NaOH yra ištirpinmas distiliuotame vandenyje ir į jį pridedama SDS. Viskas maišoma iki visiško ištirpimo ir tirpalai laikomi kambario temperatūroje.

1 mmol l^{-1} MUR etanolinis tirpalas buvo ruošiamas, kai MUR ištirpinamas etanolyje. Gautas tirpalas laikomas šaldytuve.

Paviršiaus aktyvinimo reagentai 0,4 mol l^{-1} EDC ir 0,1 mol l^{-1} NHS buvo ruošiami kai atitinkami kiekiai medžiagų buvo ištirpinami distiliuotame vandenyje. Galiausiai tirpalas buvo pasiskirstytas į mažesnius mėgintuvėlius ir laikomas šaldiklyje.

1 mol l^{-1} etanolamino tirpalas buvo gaminamas ištirpinant reikiamą kiekį medžiagos ir vėliau pH-metru privedamas iki iki pH 8,5. Gautas tirpalas paskirstomas į mažesnius mėgintuvėlius ir laikomas šaldiklyje.

1 mol l^{-1} glicino tirpalas buvo paruoštas ištirpinant reikiamą kiekį glicino distiliuotame vandenyje. Gautas tirpalas laikomas kambario temperatūroje.

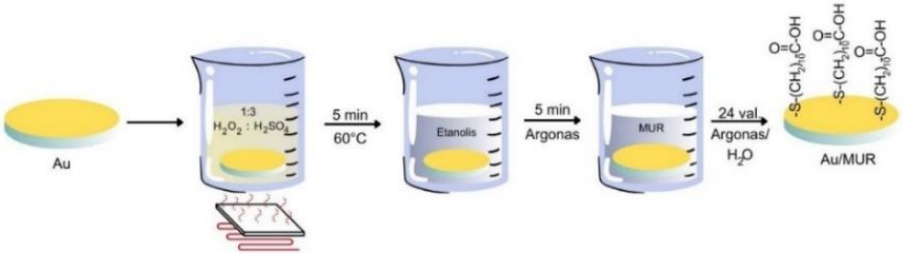
2.4 Kvantinių taškų ir anti-CD44 konjugavimas

Prieš pradedant modifikavimo procesą, KT, kurie padengti PEG turinčiu aminogrupes, (KT-NH_2) buvo centrifuguojami 2000 ×g greičiu 3 min., siekiant išvengti agregatų. Po centrifugavimo tirpalas buvo praskiedžiamas 10 mmol l^{-1} PBS tirpalu (pH 7,4). Toliau buvo pridėta BS_3 reagento tirpalo, naudojant „LoBind‘‘ mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius, išlaikant molinį reagentų santykį 1:1000. Mišinys buvo maišomas 30 min. kambario temperatūroje, naudojant mėgintuvėlių rotorių. Tada, norint pašalinti BS_3 reagento perteklių, buvo naudojami 100 K Nanosep filtravimo mėgintuvėliai, ir atliktos trys plovimo procedūros su 500 µl PBS (pH 7,4) buferiniu tirpalu.

Gautas tirpalas buvo sumaišytas su anti-CD44 skirtingais moliniais santykiais (1:3, 1:5, 1:10 ir 1:12). Tirpalai buvo lėtai maišomi 2 val. kambario temperatūroje. Po to į tirpalus buvo pridedama 100 µl 1 mol l^{-1} glicino ir toliau maišoma dar 15 min. Siekiant išvalyti KT-anti-CD44 konjugatus, buvo naudojami 300 K Nanosep filtravimo mėgintuvėliai. Filtravimas buvo atliktas tris kartus naudojant PBS (pH 7,4) buferinį tirpalą. Filtratas buvo surinktas ir naudojamas antikūnų konjugacijos efektyvumo įvertinimui. Paruošti konjugatai buvo laikomi 4 °C temperatūroje prieš atliekant matavimus. KT-NH_2 sugertis prie 405 nm bangos ilgio buvo išmatuojama naudojant plokštelių skaitytuvą, o KT-NH_2 kalibracinė kreivė buvo sudaryta koncentracijų intervale nuo 5 iki 80 nmol l^{-1}. KT forma buvo analizuojama naudojant didelės raiškos skenuojantį elektroninį mikroskopą (SEM). Anti-CD44, KT ir jų konjugatų hidrodinaminiai skersmenys (D_H) buvo įvertinti naudojant Zetasizer Nano ZS 3600 prietaisą.

2.5 PPR spektroskopijos lusto paruošimas

Tyrimuose buvo naudojami PPR spektroskopijos lustai, kurie padengti plonu Au sluoksniu. Kiekvieno lusto paruošimas pradedamas nuo kruopštaus valymo 11 pav. Tam tikslui, pirmiausiai lustas panardinamas į „Piranijos“ tirpalą, kuris susideda iš vandenilio peroksido ir koncentruotos sieros rūgšties mišinio santykiu 1:3.



11 pav. PPR lusto paruošimo ir modifikavimo MUR SAM schema.

Šiame tirpale lustas laikomas 5 min. 60 °C temperatūroje. Po to jis plaunamas distiliuotu vandeniu, paliekamas 2 min etanolio tirpale, dar kartą plaunamas distiliuotu vandeniu ir galiausiai džiovinamas argono dujomis (Ar). Po kruopštaus valymo etapo, toliau ant lusto paviršiaus formuojamas SAM. Išvalytas ir išdžiovintas lustas dedamas į 4 ml 1 mmol l^{-1} MUR etanolinį tirpalą ir paliekamas inkubuoti 24 val. Po inkubacinio laikotarpio, lustas išimamas iš MUR tirpalo etanolyje, plaunamas distiliuotu vandeniu,

paliekamas 2 min. etanolyje, dar kartą plaunamas distiliuotu vandeniu ir džiovinamas argono dujomis.

2.6 PPR spektroskopijos lusto stabilizavimas

PPR spektroskopijos lusto paviršiaus stabilizavimas yra svarbus žingsnis tiek prieš kovalentinę baltymo CD44 imobilizaciją, tiek prieš šio baltymo sąveikos su specifiniais antikūnais žymėtais KT (KT-anti-CD44) tyrimus. Taip pat stabilizavimas svarbus ir SCoV2-rN baltymo imobilizacijos, bei baltymo sąveikos su specifiniais antikūnais tyrimuose. Stabilizavimo procesas apima regeneracinių ir buferinių tirpalų taikymą, siekiant užtikrinti pakankamą paviršiaus drėkinimą bei bazinės linijos stabilumą.

Stabilizavimas prieš CD44 baltymo imobilizaciją. PPR spektroskopijos lustas, padengtas MUR SAM sluoksniu pagal 2.4 skyriaus metodiką, buvo naudojamas baltymo CD44 kovalentinei imobilizacijai atlikti. Prieš atliekant CD44 baltymo kovalentinę imobilizaciją, lusto paviršius buvo stabilizuojamas 10 mmol l^{-1} ABS (pH 4,5) tirpalu ir 50 mmol l^{-1} su 0,5 % SDS tirpalų mišiniu. Stabilizavimo procesas vyko naudojant PPR įrenginį, valdomą kompiuterine programa. Pasirinkus reikiamą stabilizavimo metodą, tirpalai buvo paeiliui leidžiami į kanalus lusto paviršiuje, kas 120 s. Procedūra buvo tęsiama tol, kol bazinė linija stabilizavosi ir truko maždaug 45 min.

Stabilizavimas prieš CD44 baltymo sąveiką su specifiniais antikūnais modifikuotais KT. Analizuojant CD44 baltymo sąveiką su KT-anti-CD44, PPR lusto paviršius buvo stabilizuojamas 10 mmol l^{-1} PBS (pH 7,4) ir 10 mmol l^{-1} glicino (pH 2,0) tirpalu. Stabilizavimas buvo atliekamas pakaitomis leidžiant šiuos tirpalus kas 120 s ir tęsiamas tol, kol bazinė linija tapo stabili (maždaug 30 min).

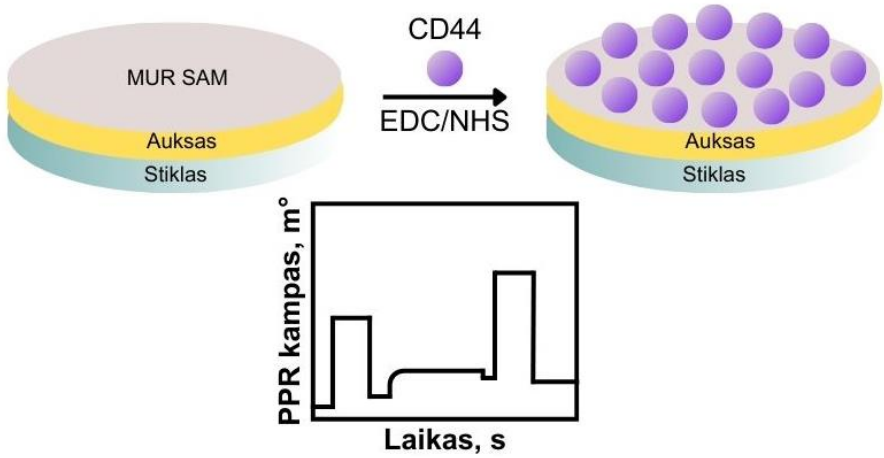
Stabilizavimas prieš SCoV2-rN baltymo imobilizavimą. Kaip ir auksčiau buvo minėta, pirmiausiai PPR spektroskopijos lustas turi būti modifikuotas MUR SAM. Tada prieš kovalentinę SCoV-2-rN baltymo imobilizaciją, PPR spektroskopijos lusto paviršius buvo stabilizuojamas 0,05 mol l^{-1} ABS tirpalu (pH 5,3), bei 10 mmol l^{-1} NaOH ir 0,5 % natrio dodecilsulfato (SDS) tirpalu. Parinkus atitinkamą stabilizavimo metodą, tirpalai buvo po vieną pakaitomis, kas 120 s įleidžiami į kanalus ant PPR spektroskopijos lusto paviršiaus. Stabilizavimas buvo tęsiamas, kol bazinė linija stabilizavosi ir truko ne mažiau nei 30 min.

Stabilizavimas prieš SCoV2-rN baltymo sąveiką su specifiniais antikūnais. Tiriant SCoV2-rN baltymo sąveiką su specifiniais antikūnais, lusto paviršius buvo stabilizuojamas naudojant 10 mmol l^{-1} PBS (pH 7,4) tirpalą bei 10 mmol l^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS tirpalą. Stabilizavimo metu tirpalai buvo

įleidžiami pakaitomis kas 120 s, o procesas buvo tęsiamas tol, kol bazinė linija stabilizavosi (maždaug 30 min.).

2.7 CD44 baltymo imobilizavimas PPR spektroskopijos lusto paviršiuje

Imobilizacija buvo vykdoma abiejuose PPR prietaiso kiuvetės kanaluose, kad PPR spektroskopijos lusto paviršius būtų paruoštas baltymo aptikimui. Procesas prasidėjo bazinės linijos registravimui, naudojant 10 mmol l^{-1} ABS (pH 4,5) tirpalu. Buferinis tirpalas buvo leidžiamas į abu kanalus ir maišomas 200 s, siekiant užtikrinti stabilią bazinę liniją. Toliau PPR prietaiso adatos automatiškai paimdavo ir perkeldavo reikiamus reagentus iš 384 mikrošulinėlių plokštelės. Į pirmuosius du šulinėlius buvo įpilta šviežiai paruoštų 0,4 mol l^{-1} EDC ir 0,1 mol l^{-1} NHS tirpalų. Šie tirpalai buvo automatiškai sumaišyti santykiu 1:1 trečiame šulinėlyje, o po to 50 µl mišinio buvo paimta ir perkelta į PPR spektroskopijos jutiklio kiuvetes. CD44 baltymo imobilizavimo eiga pavaizduota 12 pav.



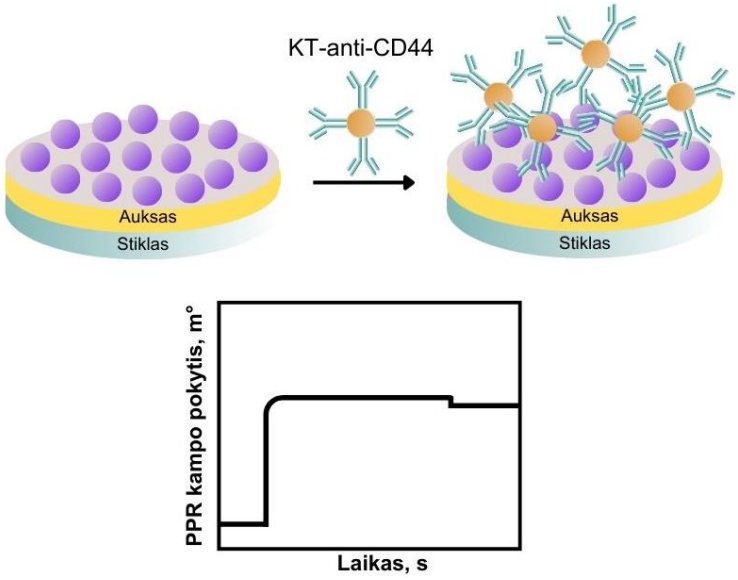
12 pav. CD44 baltymo imobilizavimo schema.

MUR SAM paviršiuje esančios karboksigrupės buvo aktyvuotos naudojant EDC/NHS tirpalų mišinį, kad būtų sukuriamas kovalentinis ryšys su CD44 baltymo aminogrupėmis. Šio proceso metu karboksigrupės virsta į reaktyvias tarpines formas, galinčias susijungti su baltymo aminogrupėmis ir suformuoti amidines jungtis. Po aktyvavimo PPR kiuvetė buvo išplaunama, ir 50 µl 600 nmol l^{-1} CD44 baltymo tirpalo buvo automatiškai įpilami į kiuvetę. Kovalentinė imobilizacija vyko 1200 s, kurios metu CD44 molekulių pirminės aminogrupės reagavo su aktyvuotomis karboksigrupėmis,

sudarydamos amidines jungtis. Tokiu metodu ant PPR jutiklio paviršiaus susidarė CD44 baltymo sluoksnis (Au/MUR/CD44). Po imobilizacijos neprisijungusios CD44 molekulės buvo pašalintos iš abiejų kanalų, praplaunant 10 mmol l^{-1} ABS (pH 4,5) tirpalu. Tuo tarpu likusios aktyvuotos karboksigrupės buvo deaktyvuotos, inkubuojant paviršių 600 s 1 mol l^{-1} etanolamino tirpalu. Pasibaigus visam procesui, CD44 baltymas buvo sėkmingai imobilizuotas ant PPR jutiklio paviršiaus per amidinę jungtį, paruošiant tolimesniems matavimams.

2.8 Sąveikos su Au/MUR/CD44 tyrimai

PPR metodas buvo taikomas siekiant ištirti specifinius anti-CD44, parinkti tinkamą regeneracinį tirpalą, įvertinti KT nespecifinį prisijungimą bei optimizuoti KT-NH_2 ir antikūnų konjugacijos molinį santykį. Eksperimento metu pirmiausia buvo stabilizuojama bazinė linija ant Au/MUR/CD44 paviršiaus, plaunant PBS buferiniu tirpalu 200 s. Po to į vieną iš PPR jutiklio kanalų buvo įleistas anti-CD44 arba KT-anti-CD44 tirpalas, o sąveika truko 900 s. Ši sąveika pavaizduota 13 pav.



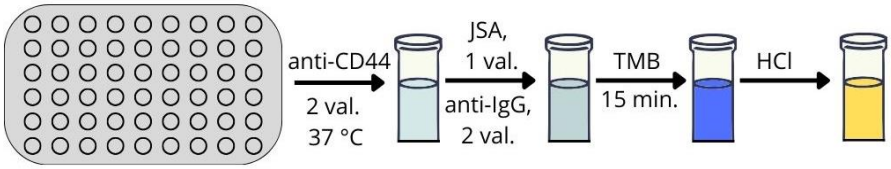
13 pav. Au/CD44 sąveika su KT-anti-CD44.

Antrasis kanalas buvo naudojamas kaip kontrolė, į jį buvo pilamas tik PBS buferinis tirpalas. Toliau buvo atliekamas neprisijungusių antikūnų ar konjugatų pašalinimas plaunant 200 s su PBS buferiniu tirpalu. Lusto paviršiaus (Au/MUR/CD44) regeneracijai buvo naudojamas 10 mmol l^{-1}

glicino/HCl (pH 2,0) tirpalas. Po regeneracijos pradinė signalo linija buvo dar kartą užregistruota PBS buferiniame tirpale. Analizinis signalas buvo skaičiuojamas kaip skirtumas tarp matavimo ir kontrolinio kanalo duomenų.

2.9 Anti-CD44 koncentracijos nustatymas

Anti-CD44 koncentracija buvo nustatoma spektrofotometriškai, panaudojant MaxiSorp plokšteles 14 pav. Eksperimento metu į kiekvieną šulinėlį buvo įpilta po 50 µl anti-CD44 antikūnų tirpalo, kurio koncentracija svyravo nuo 0,01 iki 0,7 µg ml^{-1}. Inkubacija vyko 2 val. 37 °C temperatūroje. Po inkubacinio laikotarpio, kiekvienas šulinėlis buvo plaunamas tris kartus su PBS buferiniu tirpalu, į kurį buvo pridėta 0,05 % Tween 20 tirpalo.



14 pav. Anti-CD44 koncentracijos nustatymas IFA metodu.

Norint užblokuoti likusį laisvą paviršių ir užkirsti kelią nespecifiniam antikūnų prisijungimui, į kiekvieną šulinėlį buvo įpilama 200 µl 2 % JSA tirpalo, kuris buvo laikomas 1 val. Po inkubacinio periodo plokštelė vėl buvo plaunama PBS buferiniu tirpalu, o po to į kiekvieną šulinėlį buvo pridedama 200 µl 100 ng ml^{-1} antrinių antikūnų žymetų krienų peroksidaze (anti-IgG) tirpalo. Inkubavimas vyko 2 val., po kurios šulinėliai vėl buvo išplaunami. Galiausiai į šulinėlius buvo įpilama 100 µl TMB (3,3‘,5,5‘-tetrametilbenzidino) tirpalo, kuris sukėlė spalvinę reakciją. Po 15 min. reakcija buvo sustabdyta pridedant į šulinėlius 100 µl 1 mol l^{-1} HCl. Absorbcija buvo išmatuota ties 450 nm bangos ilgiu, o panaudojant gautus duomenis, buvo sudaryta kalibracinė kreivė. Gauta kalibracinė kreivė buvo taikoma kovalentinio anti-CD44 konjugavimo su KT-NH_2 efektyvumo įvertinimui.

2.10 KT-NH_2-anti-CD44 koncentracijos nustatymas

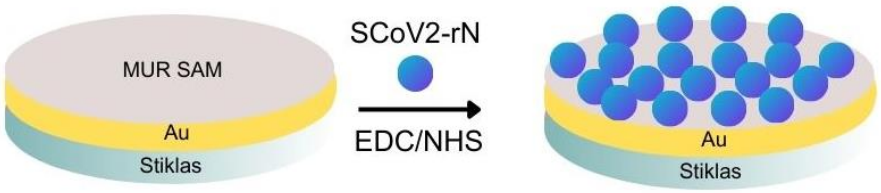
Po konjugacijos gautų KT-anti-CD44 konjugatų koncentracija buvo nustatyta naudojant KT-NH_2 absorbcijos kalibracinę kreivę. Tam tikslui KT-NH_2 buvo praskiesti sudarant tirpalų seriją, kurios koncentracijos intervale nuo 5 iki

80 nmol l^{-1}. Paruoštų tirpalų absorbcija buvo išmatuota spektrofotometru, fiksuojant absorbcijos reikšmes ties 405 nm bangos ilgiu.

Remiantis gautomis absorbcijos reikšmėmis, buvo sudaryta kalibracinė kreivė, vaizduojanti absorbcijos ties 405 nm priklausomybę nuo KT-NH_2 koncentracijos. Po atliktos konjugacijos surinkti KT-NH_2-anti-CD44 konjugatai buvo praskiesti ir jų absorbcija taip pat išmatuota ties 405 nm. Konjugatų koncentracija buvo nustatyta remiantis sudaryta KT-NH_2 kalibraicne kreive.

2.11 SCoV2-rN baltymo imobilizavimas

SCoV2-rN baltymo kovalentinis imobilizavimas buvo atliekamas vienodai abiejuose PPR spektroskopijos prietaiso kanaluose. SCoV2-rN baltymo imobilizavimo schema pavaizduota 15 pav. Pirmiausia lusto paviršius buvo stabilizuojamas leidžiant 50 mmol l^{-1} ABS (pH 5,3) 200 s. Vėliau MUR karboksigrupės buvo aktyvinamos 0,2 mol l^{-1} EDC ir 0,05 mol l^{-1} NHS tirpalu, kuris veikė paviršių 600 s.

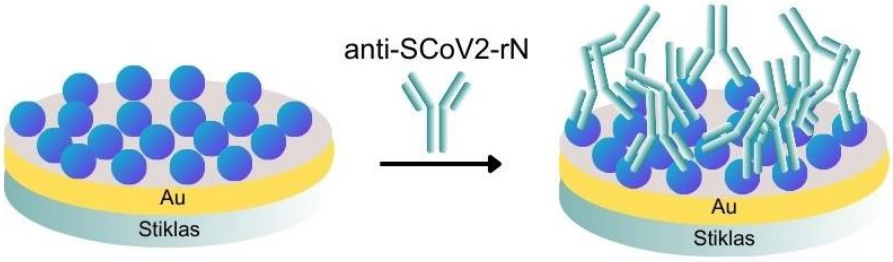


15 pav. SCoV2-rN baltymo mobilizavimas lusto paviršiuje schema.

Šio proceso metu susidarė aktyvi tarpinė medžiaga (angl. *O-acylisourea*), kuri galėjo reaguoti su SCoV2-rN baltymo aminogrupėmis, leidžiančiomis jį tvirtai imobilizuoti paviršiuje. Po to paviršius buvo trumpai praplaunamas, kad būtų pašalinti perteklinės EDC ir NHS molekulės. Ketvirtajame žingsnyje į kanalus buvo leidžiamas tam tikros koncentracijos SCoV2-rN baltymo tirpalas ABS buferiniame tirpale (pH 5,3), Po 1200 s buvo pašalintos neprisitvirtinusios baltymo molekulės. Šeštajame etape paviršius buvo dezaktyvuojamas leidžiant 1 mol l^{-1} etanolamino tirpalą (pH 8,5) 600 s, kad būtų užblokuotos likusios aktyvios karboksigrupės. Galiausiai etanolamino tirpalas buvo pašalintas, paviršius praplaunamas regeneraciniu tirpalu (10 mmol l^{-1} NaOH su 0,5 % SDS), o po to – 50 mmol l^{-1} ABS (pH 5,3). Po šios procedūros buvo užtikrinta, kad SCoV2-rN baltymas yra imobilizuotas, suformuojant Au/MUR/SCoV2-rN struktūrą Au lusto paviršiuje.

2.12 SCoV2-rN baltymo sąveika su specifiniais antikūnais

Kad būtų galima stebėti imobilizuoto SCoV2-rN baltymo sąveiką su anti-SCoV2-rN antikūnais, pradžioje abu jutiklio kanalai buvo stabilizuojami 10 mmol l^{-1} PBS (pH 7,4) tirpalu, kuris buvo leistas 200 s. Vėliau į pirmąjį kanalą buvo įleistas tam tikros koncentracijos antikūnų tirpalas tame pačiame buferyje, o į antrąjį (naudojamą kaip kontrolinį) – tik buferinis tirpalas be antikūnų. Sąveika tarp baltymo ir antikūnų vyko 600 s, jos metu susidarė imuninis kompleksas (Au/MUR/SCoV2-rN/anti-SCoV2-rN) 16 pav.



16 pav. SCoV2-rN sąveikos su specifiniais antikūnais schema.

Po to sekė disociacijos etapas – į kanalus buvo leidžiamas PBS buferinis tirpalas, o papildomas maišymas 200 s padėjo pašalinti neprisijungusius antikūnus. Galiausiai per 500 s buvo atliktas regeneracijos procesas, kurio metu buvo nutraukta sąveika tarp baltymo ir antikūnų, ir stebėtas stabilus signalas, leidžiant tik PBS buferinį tirpalą.

2.13 SCoV2-rN baltymo koncentracijos optimizavimas

Norint nustatyti, kuri baltymo koncentracija yra optimaliausia jutiklio paviršiui, pirmiausia SCoV2-rN baltymas buvo imobilizuotas, kaip aprašyta anksčiau. Po to buvo tiriama, kaip imobilizuotas baltymas sąveikauja su jam specifiniais antikūnais. Siekiant rasti optimalų baltymo kiekį, buvo atlikta serija bandymų, kuriuose naudotos trys skirtingos SCoV2-rN koncentracijos: 250, 500 ir 750 nmol l^{-1}. Visi tirpalai buvo paruošti naudojant 50 mmol l^{-1} ABS (pH 5,3) tirpalą.

2.14 Skaičiavimai

Molekulių prisijungimas prie PPR spektroskopijos lusto lemia PPR kampo poslinkį. Nustatyta, kad 120 m° PPR kampo pokytis atitinka maždaug 1 ng/mm^2 paviršiaus masės koncentracijos pokytį. Šiuo tiesiniu ryšiu buvo remtasi abiejuose tyrimuose skaičiuojant imobilizuoto baltymo paviršinę koncentraciją.

Analizinis signalas buvo apskaičiuotas kaip PPR kampo pokytis, užfiksuotas prieš ir po baltymų imobilizacijos ar jų sąveikos su specifiniais antikūnais molekulių sąveikos su specifiniais antikūnais, o palyginamasis kanalas buvo naudojamas fono signalui eliminuoti. anti-CD44 antikūnų bei jų konjugatų sąveika su imobilizuotu CD44 baltymu buvo įvertinta apskaičiuojant maksimali prisijungimo talpa (B_{max}) ir pusiausvyros disociacijos konstanta (K_D) aproksimuojant asociacijos fazės duomenis pagal hiperbolinę funkciją [277,278]:

$$B_{eq} = B_{max} \cdot \frac{[X]}{[X]+K_D}, \quad (2)$$

kur B_{eq} – atsako reikšmė pusiausvyroje, o $[X]$ – antikūnų ar jų konjugatų su KT koncentracija.

Kiekvienai antikūnų koncentracijai buvo atlikta analizė naudojant kinetinio įvertinimo programinę įrangą (Metrohm Autolab BV, Leusden, Nyderlandai). Be to, kuriant anti-SCoV2-rN jutiklį buvo įvertinti papildomi analitiniai parametrai. Aptikimo riba (LOD) buvo nustatyta kaip tokia anti-SCoV2-rN koncentracija, kuriai esant PPR signalas yra lygus trims standartiniams nuokrypiams nuo triukšmo lygio, o nustatymo riba (LOQ) – kai signalas atitinka 10 standartinių nuokrypių nuo triukšmo. Šie parametrai apibrėžia mažiausias koncentracijas, kurias galima patikimai aptikti (LOD) ir kiekybiškai įvertinti (LOQ).

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3 Kvantinių taškų ir antikūnų konjugacijos įvertinimas PPR spektroskopija

Siekiant įvertinti KT ir anti-CD44 konjugacijos efektyvumą, buvo pasitelkta PPR spektroskopija. Konjugacijos procesas leidžia užtikrinti, kad antikūnai būtų orientuoti taip, jog jų atpažinimo vietos būtų prieinamos sąveikai su CD44 baltymu, o tai gali padidinti biologinio jutiklio jautrumą ir specifiškumą. Konjugacijai buvo naudojamas kryžminio sujungimo reagentas BS_3, kuris reaguoja su pirminėmis aminogrupėmis [279]. BS_3 reagentas leidžia tvirtu ir stabiliu būdu prijungti antikūnus prie KT paviršiaus, išlaikant jų gebėjimą atpažinti tikslinį antigeną.

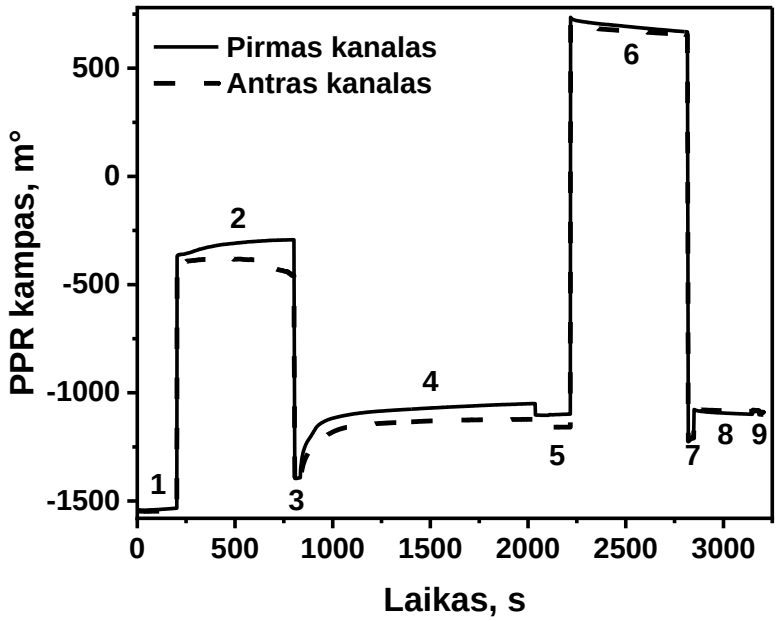
CD44 baltymas buvo pasirinktas dėl jo svarbos fiziologiniuose ir patologiniuose procesuose, įskaitant ląstelių adheziją, migraciją ir navikų progresiją. Nustatant sąveikos kinetiką su CD44 baltymu, galima kiekybiškai įvertinti konjugatų gebėjimą prisijungti prie tikslinio baltymo ir patvirtinti konjugacijos efektyvumą. PPR spektroskopija leidžia stebėti asociacijos ir disociacijos greičius bei sąveikos stiprumą, suteikiant vertingą informaciją tolimesniam eksperimentų planavimui bei konjugacijos optimizavimui.

3.1 CD44 baltymo imobilizavimas

Atliekant tyrimus svarbu, kad ant PPR jutiklio lusto paviršiaus buvo suformuotas MUR SAM sluoksnis. Jis leidžia imobilizuoti CD44 baltymą lusto paviršiuje. Šis prijungimas vykdomas per kovalentinį ryšį, kuris užtikrina, kad baltymas gerai prisitvirtintų ir nenusiplautų atliekant matavimus. CD44 baltymo imobilizavimas pateikiamas 17 pav. Procesas vyko keliais nuosekliais žingsniais.

Pirmajame žingsnyje į sistemą buvo leidžiamas ABS buferinis tirpalas (pH 4,5), kuris paruošia auksu dengto lusto paviršių tolimesniems veiksmams. Tuomet 2 žingsnyje MUR molekulių karboksigrupės buvo aktyvuotos naudojant EDC/NHS reagentų mišinį. Naudojama aktyvacija, kad CD44 baltymas galėtų prisitvirtinti prie lusto paviršiaus. Po to, 3 žingsnyje leidžiamas ABS buferinis tirpalas, kad pašalintų reagentų EDC/NHS perteklių. Tada 4 žingsnyje leidžiamas CD44 baltymas, kuris jungėsi prie aktyvuotų karboksigrupių, taip sudarydamas stabilų sluoksnį ant PPR lusto. CD44 baltymo perteklius nuplaunamas 5 žingsnyje su ABS buferiniu tirpalu.

Kad būtų išvengta nespecifinio jungimosi, 6 žingsnyje likusios neprisijungusios aktyvuotos vietos buvo užbluokotos etanolamino tirpalu.



17 pav. CD44 baltymo imobilizacijos procesas ant MUR sluoksniu padengto PPR lusto abiejuose kanaluose. Visas procesas vyko keliais žingsniais: **(1, 3, 5** ir **7)** stabilizavimas (ABS, pH 4,5); **(2)** MUR molekulių karboksigrupių aktyvacija (EDC/NHS), **(4)** CD44 baltymo imobilizavimas, **(6)** neprisijungusių aktyvuotų vietų blokavimas etanolaminu, **(8)** regeneracija (NaOH ir SDS mišinys), **(9)** stabilizavimas (PBS, pH 6,5).

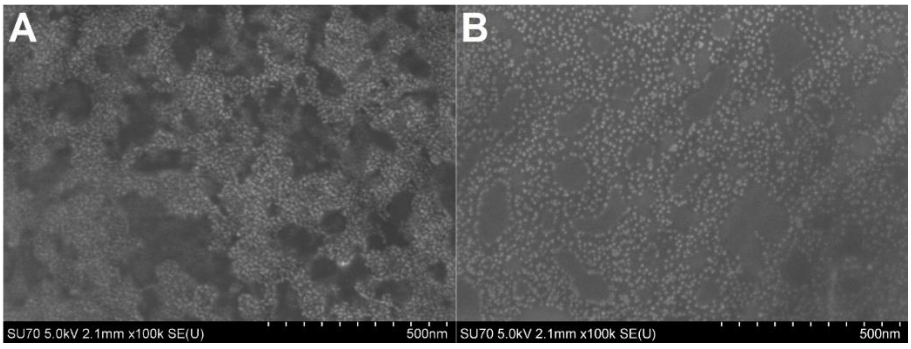
Toliau 7 žingsnyje buvo pašalintos neprisijungusios etanolamino molekulės leidžiant ABS buferinį tirpalą, o 8 žingsnyje buvo panudotas regeneracinis tirpalas (NaOH ir SDS mišinys), siekiant pašalinti silpnai prisijungusias molekules. Galiausiai 9 žingsnyje, paviršius praplaunamas PBS buferiniu tirpalu, kuris atstato neutralią aplinką ir paruošia lustą tolimesniems matavimams.

3.2 Kvantinių taškų pasirinkimas

Buvo pasirinkti du KT tipai – su karboksigrupėmis (KT-COOH) ir aminogrupėmis (KT-NH_2). KT-NH_2 paviršius buvo padengtas PEG polimeru, turinčiu aminogrupių. Ši modifikacija ne tik leidžia kovalentiškai prijungti

biologines molekules, bet ir gali sumažinti nereikalingas, nespecifines sąveikas su anksčiau apdorotais paviršiais [280].

Pasirinkti KT buvo ištirti naudojant skenuojančiosios elektroninės mikroskopijos (SEM) metodą (18 pav). KT-NH_2 dalelės (18B pav.) buvo apvalios formos, jų skersmuo siekė 8,96 ± 0,85 nm, o KT-COOH buvo ovalios formos (18A pav.).



18 pav. (**A**) KT-COOH ir (**B**) KT-NH_2 SEM vaizdai.

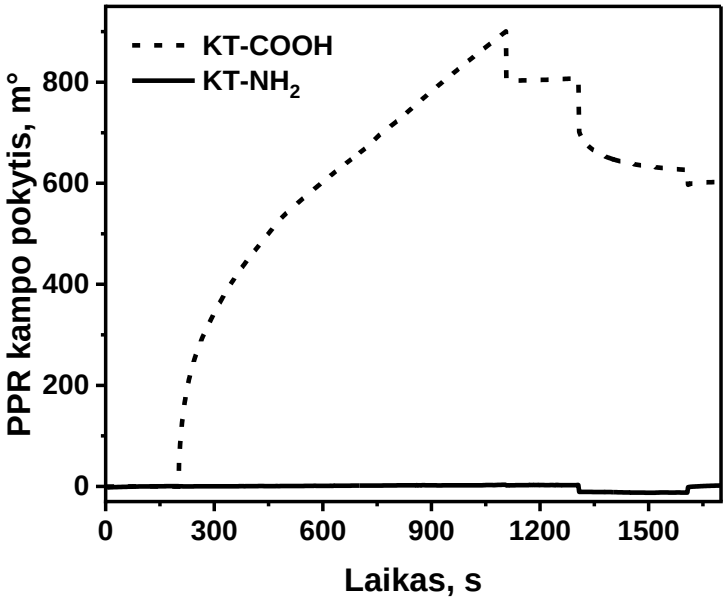
Be to, KT hidrodinaminis skersmuo (D_H) buvo matuotas dinaminės šviesos sklaidos metodu (DLS), ir abiejų tipų KT siekė apie 30 nm (1 lentelėje). Abu KT tipai buvo stabilūs ir nelinkę agreguotis.

1 lentelė. Nemodifikuotų ir modifikuotų KT hidrodinaminiai skersmenys.

Mėginys	**Hidrodinaminis skersmuo, nm**
KT-COOH	29,54 ± 1,25
KT-NH_2	30,21 ± 1,80
Anti-CD44	12,98 ± 1,08
KT-anti-CD44 1:3	35,31 ± 1,14
KT-anti-CD44 1:5	38,09 ± 1,62
KT-anti-CD44 1:10	46,63 ± 3,86
KT-anti-CD44 1:12	42,42 ± 0,80

Specifinių antikūnų ir KT konjugatų naudojimas gali būti sudėtingas arba net neįmanomas, jeigu analitės molekulės adsorbuojasi ant laisvo KT paviršiaus dėl stiprios nespecifinės sąveikos. Be to, jei KT dalelės nespecifiškai sąveikauja su tam tikru baltymu, galima numatyti, kad prie jų gali prisijungti ir kitos panašios molekulės. Tai dar labiau apsunkina tokių KT konjugatų naudojimą realiuose biologiniuose mėginiuose [280]. Todėl toliau buvo tiriama KT-COOH ir KT-NH_2 nespecifinė sąveika su CD44 baltymu,

kuris buvo imobilizuotas ant Au paviršiaus, padengto MUR sluoksniu (19 pav.). Šiems eksperimentams naudota 10 nmol l^{-1} KT koncentracija. Stabilizavus pradinį signalą, į PPR kiuvetę buvo suleista 10 nmol l^{-1} KT tirpalo. Naudojant KT-NH_2, buvo užfiksuotas nedidelis – apie 2 m° – PPR signalo padidėjimas. Po disociacijos ir regeneracijos procedūros, PPR signalas beveik sugrįžo į pradinį lygį, buvusį prieš KT-NH_2 įleidimą. Net ir įleidus 100 nmol l^{-1} KT-NH_2 tirpalo, rezultatas išliko panašus.



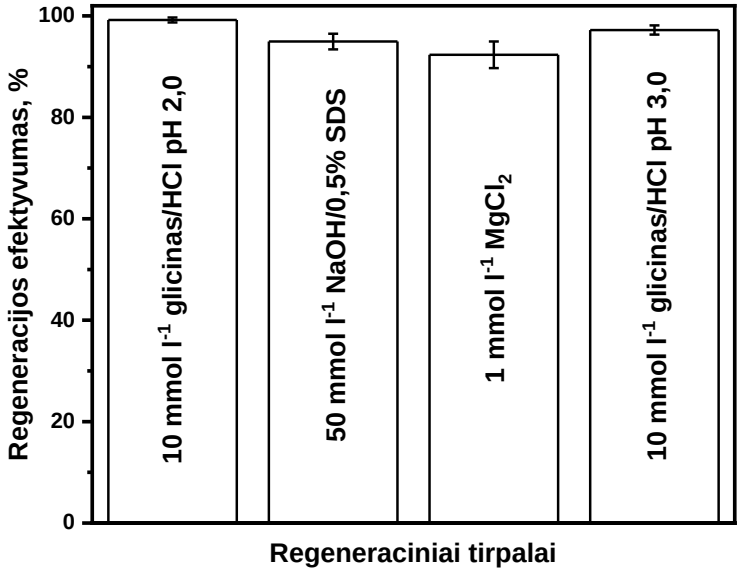
19 pav. Nespecifinė KT-NH_2 ir KT-COOH adsorbcija ant Au/MUR/CD44 paviršiaus.

Tuo tarpu po KT-COOH įleidimo buvo stebimas sistemingas ir intensyvus PPR signalo pokytis, kuris toliau didėdavo inkubacijos metu. Po disociacijos užfiksuotas apie 800 m° signalo poslinkis. Net atlikus paviršiaus regeneraciją, KT-COOH nepavyko visiškai pašalinti nuo CD44 baltymu padengto aukso paviršiaus. Tai aiškiai parodo, kad KT-COOH stipriai nespecifiškai sąveikauja su imobilizuotu CD44 baltymu, o KT-NH_2 adsorbcija buvo nereikšminga. Atsižvelgiant į šiuos rezultatus, tolesniam konjugavimui su specifiniais antikūnais buvo pasirinkti KT-NH_2.

3.3 Regeneracinio tirpalo parinkimas

Regeneracijos procedūra yra svarbi tam, kad PPR lustą būtų galima naudoti pakartotinai. Atliekant regeneraciją, reikia nutraukti antikūno ir antigeno ryšį,

bet nepažeisti imobilizuotų molekulių gebėjimo vėl susijungti. Tai sudėtinga, nes šis ryšys gali būti sudarytas veikiant įvairiomis sąveikomis – pavyzdžiui, tarp Lewis rūgščių ir bazių, elektrostatinėmis, Van der Vals'o jėgomis ar vandeniliniais ryšiais [281]. Regeneracijos tirpalo efektyvumas priklauso nuo to, kokie ryšiai susidaro. Regeneracijos tirpalų pasirinkimo rezultatai parodyti 20 pav. Eksperimentai buvo atlikti inkubuojant Au/MUR/CD44 paviršių 30 nmol l^{-1} anti-CD44 tirpale, o paskui regeneruojant jį pasirinktu tirpalu.

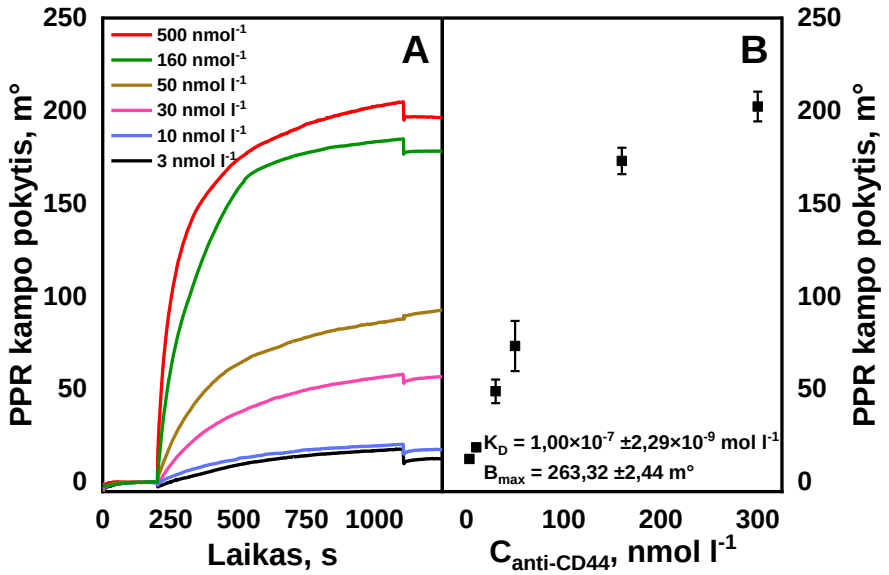


20 pav. Au/MUR/CD44/anti-CD44 komplekso disociacijos ir paviršiaus regeneracijos efektyvumo priklausomybė nuo regeneracinio tirpalo tipo.

Tyrimo rezultatai parodė, kad visi taikyti regeneracijos tirpalai užtikrino aukštą paviršiaus regeneracijos efektyvumą – virš 92 %. Didžiausias efektyvumas (99,22 ± 0,49 %) buvo pasiektas naudojant 10 mmol l^{-1} glicino/HCl tirpalą (pH 2,0). Naudojant 50 mmol l^{-1} NaOH/0,5 % SDS mišinį, 1 mol l^{-1} $MgCl_2$ tirpalą ir 10 mmol l^{-1} glicino/HCl (pH 3,0) tirpalą, regeneracijos efektyvumas siekė atitinkamai 94,95 ± 1,54 %, 92,34 ± 2,63 % ir 97,22 ± 0,91 %. Šie duomenys patvirtina, kad, taikant 10 mmol l^{-1} glicino/HCl (pH 2,0) tirpalą, lusto paviršius gali būti patikimai regeneruojamas ir tinkamas pakartotiniam naudojimui analizės procesuose.

3.4 Anti-CD44 sąveikos su imobilizuotu CD44 baltymu įvertinimas

PPR kinetinis tyrimas leidžia geriau suprasti, kaip vyksta molekulinės sąveikos [282] ir kaip stipriai susijungia antikūnai su antigenais [283]. Tai leidžia įvertinti, ar konkretus antikūnas yra tinkamas tolimesnei konjugacijai su KT, nes stipri antikūno-antigeno sąveika užtikrina efektyvų būsimo konjugato veikimą. Šiame tyrime buvo analizuojama, kaip anti-CD44 sąveikauja su imobilizuotu CD44 baltymu (21 pav.).



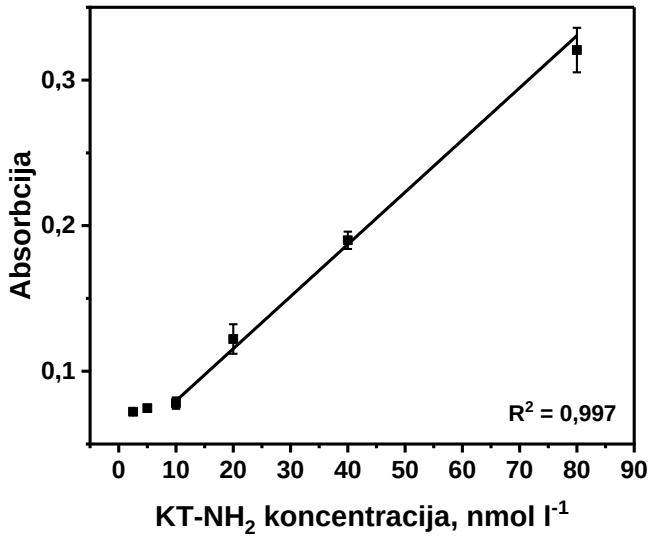
21 pav. (**A**) PPR tyrimas, rodantis imuninių kompleksų formavimąsi tarp imobilizuoto CD44 baltymo ir anti-CD44 skirtingose koncentracijose (3, 10, 30, 50, 160 ir 300 nmol l^{-1}). (**B**) PPR atsako priklausomybė nuo anti-CD44 koncentracijos.

Anti-CD44 koncentracija buvo keičiama nuo 3 iki 500 nmol l^{-1}. Nustatyta, kad didėjant įleistai anti-CD44 koncentracijai, stiprėjo ir PPR kampo pokytis. Naudojant 3 nmol l^{-1} anti-CD44 tirpalą, PPR atsakas siekė 12,57 ± 0,39 m°, o suleidus 300 nmol l^{-1} koncentracijos tirpalą – atsakas padidėjo iki 202,34 ± 8,00 m°. Vėliau buvo apskaičiuoti kinetiniai parametrai, kurie leido įvertinti anti-CD44 sąveikos su CD44 baltymu stiprumą. K_D reikšmė parodo antikūno ir antigeno sąveikos stiprumą: kuo mažesnė K_D reikšmė, tuo stipresnė sąveika. Paprastai antikūnų ir antigenų sąveikų K_D tirpaluose būna tarp 10^{-9} ir 10^{-6} mol l^{-1} [284]. Šiame tyrime apskaičiuotos K_D ir B_{max} reikšmės buvo atitinkamai 1,00 × 10^{-7} ± 2,29 × 10^{-9} mol l^{-1} ir 263,32 ±

2,44 m°. Šie rezultatai parodė, kad anti-CD44 sudaro stiprią sąveiką su imobilizuotu CD44 baltymu, todėl jie gali būti sėkmingai naudojami konjugacijai su KT-NH_2.

3.5 Anti-CD44 ir kvantinių taškų konjugacijos įvertinimas

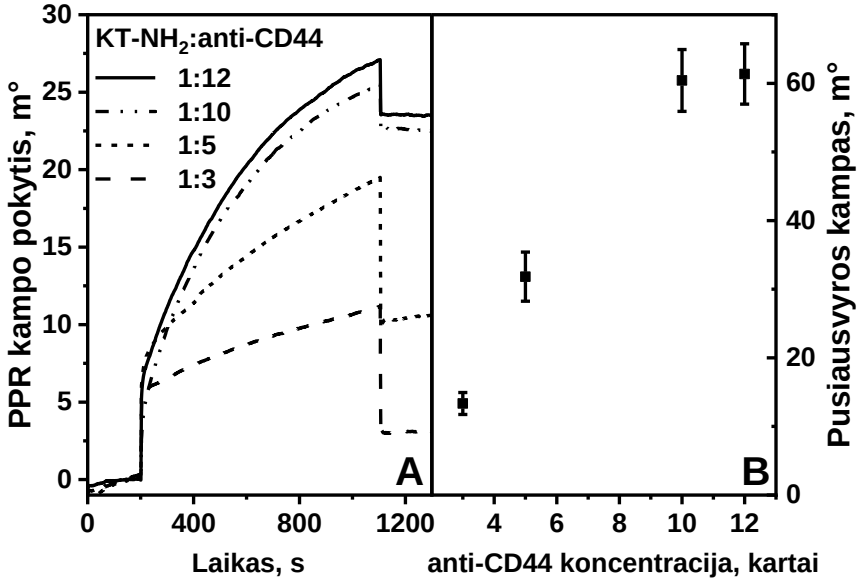
Kovalentinis ryšys buvo pasirinktas anti-CD44 ir KT-NH_2 konjugavimui naudojant BS_3 reagentą. Aminogrupėmis modifikuotas PEG ant KT-NH_2 paviršiaus užtikrina, kad būtų išvengta nespecifinių sąveikų su antikūnais, taip leidžiant suformuoti kovalentinį ryšį. Vandenyje tirpus BS_3 kryžminimo jungimosi reagentas, turintis NHS esterio grupes, gali sąveikauti su pirminėmis aminogrupėmis polipeptidų N-gale ir lizino likučių šoninėmis grandinėmis, formuodamas amidinius ryšius esant pH 7-9 [285]. BS_3 buvo sėkmingai naudojamas KT konjugacijai su antikūnais, kurie vėliau buvo pritaikyti gyvose ląstelėse [286–288]. Be to, biomolekulių imobilizavimas per kryžminimo jungimosi reagentą suteikia papildomą erdvinę laisvę konjuguotoms molekulėms, taip prisidedant prie specifiškesnės sąveikos [280]. Norint nustatyti optimalias konjugavimo sąlygas, buvo ištirti KT-NH_2:anti-CD44 moliniai santykiai 1:3, 1:5, 1:10 ir 1:12. Konjugavimo proceso metu nebuvo pastebėta reikšmingo KT-NH_2 agregacijos ar praradimo. Gauti konjugatai buvo surinkti, o jų koncentracija nustatyta remiantis 2.9 skyrelyje aprašyta metodika, naudojant KT-NH_2 absorbcijos kalibracinę kreivę (22 pav.).



22 pav. KT-NH_2 absorbcijos priklausomybė nuo koncentracijos.

Konjugatai buvo charakterizuoti DLS metodu (1 lentelė). Buvo nustatyta, kad konjugatų D_H buvo didesnis nei nemodifikuotų KT-NH_2. Kai KT-NH_2 ir anti-CD44 moliniai santykiai buvo 1:3 ir 1:5, D_H padidėjo nuo 30,21 ± 1,80 nm (KT-NH_2) iki atitinkamai 35,31 ± 1,14 nm ir 38,09 ± 1,62 nm (KT-anti-CD44). Konjugatų, paruoštų naudojant pradinius KT-NH_2:anti-CD44 molinius santykius 1:10 ir 1:12, D_H buvo 46,63 ± 3,86 nm ir 42,42 ± 0,80 nm, t.y. D_H padidėjo maždaug per 14 nm. Panašus D_H padidėjimas (13,2 ± 1,0 nm) buvo pastebėtas ir adsorbuojant antikūnus ant AuND paviršiaus esant pH 7,5 [289]. Be to, šiam tyrimui naudotas anti-CD44 yra imunoglobulinas G, kurio matmenys 14 × 8,5 × 4,5 nm [290]. Teorinis D_H padidėjimas priklauso nuo antikūnų orientacijos ir gali svyruoti nuo 9 iki 28 nm, atitinkančių "plokštumos" ir "galvutės" orientacijas [289]. Šis pastebėjimas rodo, kad šiame tyrime yra mišri antikūnų orientacija, ko galima tikėtis naudojant kovalentinį prijungimą.

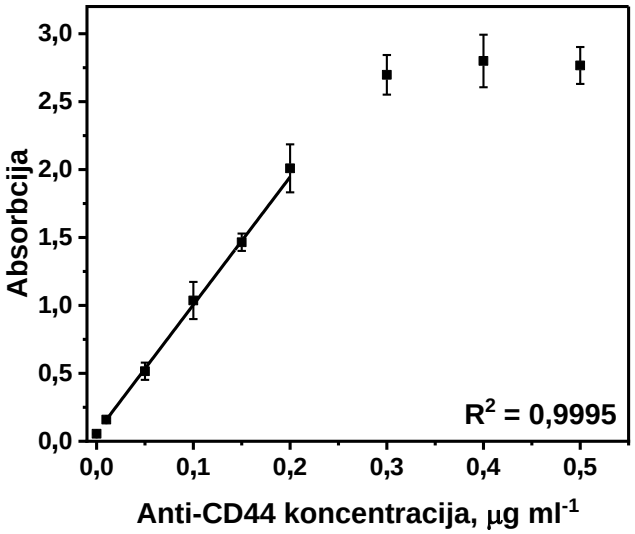
Be to, KT-NH_2 ir anti-CD44 konjugacijos efektyvumas buvo tirtas registruojant imobilizuoto CD44 baltymo sąveiką su konjugatais, naudojant 5 nmol l^{-1} KT-anti-CD44 tirpalus (23A pav.). Tyrimo metu buvo palyginta KT-anti-CD44 konjugatų, paruoštų naudojant skirtingus pradinius KT-NH_2:anti-CD44 molinius santykius, sąveika.



23 pav. (**A**) PPR sensogramos, rodančios KT-anti-CD44 konjugatų, paruoštų naudojant KT-NH_2:anti-CD44 molinius santykius 1:3, 1:5, 1:10 ir 1:12, sąveiką su Au/MUR/CD44. (**B**) Pusiausvyros kampo priklausomybė nuo KT-NH_2 ir anti-CD44 molinio santykio.

Rezultatai parodė, kad paruošti konjugatai sėkmingai prisijungė prie imobilizuoto CD44 baltymo ant MUR SAM modifikuoto PPR lusto paviršiaus. Per visus eksperimentus buvo užfiksuotas nuolatinis PPR signalo padidėjimas asociacijos fazės metu. Mažiausias PPR kampo pokytis buvo stebimas naudojant 1:3 molinį santykį tarp KT-NH_2 ir anti-CD44. Panaudojus 5 kartus didesnę anti-CD44 koncentraciją nei KT-NH_2, PPR signalas ženkliai padidėjo asociacijos fazės metu. Tačiau, signalas stipriai sumažėjo disociacijos fazėje, kas gali rodyti, kad konjugatai adsorbuojasi ant paviršiaus arba susidaro nespecifinė sąveika su CD44 modifikuotu PPR lustu. PPR kampo pokyčiai, stebėti konjugatų sąveikos eksperimentų metu, paruoštų naudojant 1:10 ir 1:12 molinius santykius, buvo labai panašūs. PPR signalo sumažėjimas disociacijos metu buvo minimalus, kas rodo specifinę konjugatų sąveiką su CD44 baltymu. Pusiausvyros kampai buvo apskaičiuoti ir jų vidurkiai buvo pavaizduoti priklausomai nuo anti-CD44 ir KT-NH_2 molinių santykių (23B pav.). Naudojant 1:5 KT-NH_2:anti-CD44 molinį santykį, pusiausvyros kampas buvo 31,83 ± 3,58 m°, t.y. beveik 2,4 karto didesnis nei pusiausvyros kampas (13,34 ± 1,60 m°), gautas esant 1:3 santykiui. Pastarasis pusiausvyros kampas taip pat buvo beveik perpus mažesnis nei signalai (60,43 ± 4,51 ir 61,36 ± 4,40 m°), gauti mėginiuose, kuriuose KT-NH_2:anti-CD44 konjugatų moliniai santykiai buvo atitinkamai 1:10 ir 1:12. Apibendrinant, KT-anti-CD44 ir imobilizuoto CD44 baltymo sąveika buvo panaši mėginiams, paruoštiems naudojant 1:10 ir 1:12 molinius santykius.

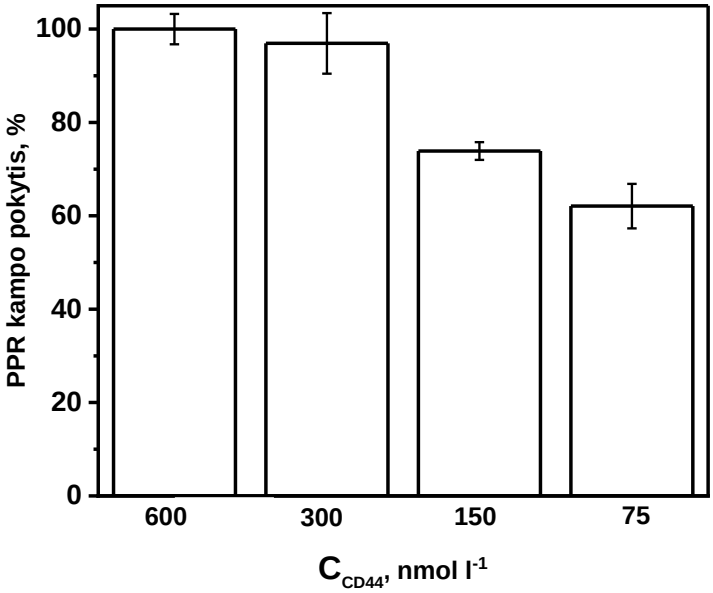
Papildomas KT-anti-CD44 konjugatų paruošimo efektyvumo palyginimas remiasi antikūnų, nesusijungusių su KT-NH_2, koncentracijos įvertinimu. Buvo įvertinti konjugatai, paruošti naudojant pradinius KT-NH_2:anti-CD44 molinius santykius 1:10 ir 1:12. Pirmiausia, anti-CD44 koncentracija buvo nustatyta naudojant tiesioginę IFA metodiką, aprašytą 2.8 poskyryje, pagal kurios duomenis buvo sudarytos kalibravimo kreivės (24 pav.).



24 pav. Anti-CD44 absorbcijos priklausomybė nuo koncentracijos.

Filtratai, surinkti plaunant KT-anti-CD44 konjugatus, buvo atskiesti, o juose neprisijungusių anti-CD44 koncentracija nustatyta remiantis anti-CD44 kalibracine kreive (24 pav.). Kadangi konjugacijos metu buvo naudojamas žinomas pradinis anti-CD44 kiekis, prie KT-NH_2 prisijungusių anti-CD44 molekulių kiekis buvo apskaičiuotas kaip skirtumas tarp pradinės anti-CD44 koncentracijos naudojamos konjugacijai ir filtratuose nustatyto neprisijungusių antikūnų kiekio. KT-anti-CD44 konjugatuose esančių KT-NH_2 koncentracija buvo nustatyta kaip minėta aukščiau pagal KT-NH_2 absorbcijos kalibracinę krevę (22 pav.). Remiantis nustatytais prisijungusių anti-CD44 ir KT-NH_2 moliniais kiekiais, buvo apskaičiuotas vidutinis anti-CD44 molekulių skaičius, tenkantis vienam kvantiniam taškui. Gauti rezultatai parodė, kad vienam kvantiniam taškui vidutiniškai tenka apie keturias anti-CD44 molekules, kai buvo naudotas 1:10 ar 1:12 molinis santykis. Gautos išvados papildė rezultatus, gautus tiriant PPR sąveiką tarp KT-anti-CD44 ir imobilizuoto CD44 baltymo bei matuojant D_H. Panašūs D_H buvo užfiksuoti KT-anti-CD44, paruoštiems naudojant 1:10 ir 1:12 santykius, kas gali rodyti tą patį KT-NH_2 padengimą antikūnais. Atsižvelgiant į šiuos duomenis, buvo padaryta išvada, kad optimalus KT-NH_2:anti-CD44 molinis santykis konjugavimui yra 1:10.

Konjugatų specifiškumo sąveikos su imobilizuotu skirtingos koncentracijos CD44 baltymu tyrimas gali suteikti papildomos informacijos apie konjugavimo efektyvumą 25 pav.

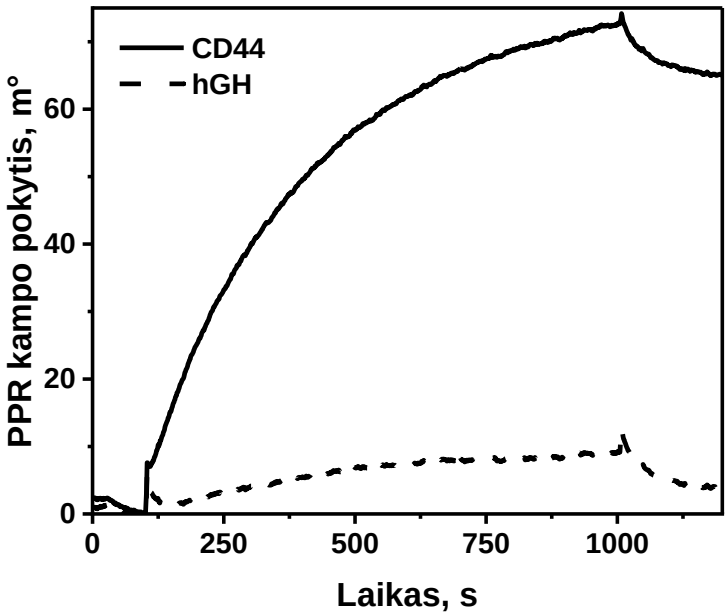


25 pav. KT-NH_2-anti-CD44 konjugatų sąveika su skirtingos koncentracijos CD44 baltymu imobilizuotu lusto paviršiuje. Naudojamos CD44 baltymo koncentracijos – 75, 150, 300 ir 600 nmol l^{-1}.

CD44 baltymas buvo imobilizuotas ant PPR lusto paviršiaus naudojant skirtingas pradines (75, 150, 300 ir 600 nmol l^{-1}) koncentracijas. Tada buvo tiriama konjugatų, paruoštų naudojant optimalų pradinį KT-NH_2:anti-CD44 santykį, sąveika. Pradinės CD44 baltymo koncentracijos sumažinimas nuo 600 iki 300 nmol l^{-1} neturėjo reikšmingos įtakos sąveikai su konjugatais, greičiausiai todėl, kad ant paviršiaus imobilizuoto CD44 baltymo kiekis sumažėjo tik nuo 2,17 iki 1,94 ng/mm². Tolimesnis pradinės CD44 koncentracijos sumažinimas turėjo įtakos imobilizuoto baltymo kiekiui ir jo sąveikai su konjugatais. PPR atsakas sumažėjo 26 ir 38 %, kai buvo atitinkamai naudojamos 150 ir 75 nmol l^{-1} pradinės CD44 baltymo koncentracijos. Šiais atvejais ant paviršiaus imobilizuoto baltymo kiekis sumažėjo daugiau nei 50 %. Taigi, sumažėjus CD44 baltymo kiekiui ant PPR lusto paviršiaus, sumažėjo konjugatų molekulių, sąveikaujančių su imobilizuotais baltymais, kiekis, tačiau signalas vis tiek buvo užfiksuotas. Šis pastebėjimas rodo, kad paruošti konjugatai galėtų sąveikauti su CD44 baltymais, esančiais skirtingu atstumu vieni nuo kitų PPR lusto paviršiuje arba lokalizuotais ląstelės paviršiuje.

3.6 KT-anti-CD44 konjugatų specifiškumo tyrimas

CD44 baltymas randamas ant įvairių ląstelių paviršiaus, kuris taip pat yra padengtas daugybe kitų molekulių ir biologinių žymenų. Norint išvengti klaidingai teigiamų rezultatų, būtina užtikrinti specifinę sąveiką. Buvo tiriamas KT, sujungtų su anti-CD44, prisijungimo specifiškumas prie imobilizuoto CD44 baltymo. Šiam tikslui CD44 baltymas ir žmogaus augimo hormonas (hGH) buvo imobilizuoti atskirose PPR kiuvetės kanaluose. Abu baltymai buvo imobilizuoti tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip aprašyta CD44 atveju. Žmogaus augimo hormonas buvo pasirinktas kaip palyginamasis baltymas – tai polipeptidas, kurio molekulinė masė yra 22 kDa [291], panaši į naudoto CD44 baltymo masę. Į kiuvetę buvo suleistas 15 nmol l^{-1} KT-anti-CD44 konjugatų tirpalas (KT-NH_2 ir anti-CD44 molinis santykis 1:10), o sąveika buvo stebima 900 s (26 pav.).



26 pav. KT-anti-CD44 konjugatų (moliniu santykiu 1:10) sąveika su CD44 ir žmogaus augimo hormonu, kurie buvo imobilizuoti skirtinguose PPR kiuvetės kanaluose ant Au/MUR.

Specifiškumas buvo įvertintas lyginant PPR signalo pokyčius, kai KT-anti-CD44 konjugatai sąveikavo su paviršiumi, kuriame buvo imobilizuotas CD44 baltymas (Au/MUR/CD44) arba nespecifinis hGH baltymas (Au/MUR/hGH). Kai lusto paviršiuje buvo imobilizuotas CD44 baltymas,

sąveikoje su KT-anti-CD44 konjugatu buvo matomas nuosekliai didėjantis PPR signalas. Priešingu atveju, kai KT-anti-CD44 konjugatai sąveikavo su Au/MUR/hGH, buvo stebimas nedidelis signalo padidėjimas, kuris disociacijos fazės pabaigoje beveik visiškai grįžo į pradinę liniją. PPR signalas, kai lusto pavišiuje buvo imobilizuotas CD44 baltymas, siekė 65 m°, t.y. daugiau kaip 16 kartų viršijo atsaką gautą, kai lusto paviršiuje buvo imobilizuotas hGH baltymas. Šį skirtumą galima paaiškinti KT paviršiaus padengimą PEG su aminogrupėmis, kurios slopina nespecifines sąveikas. Gauti rezultatai patvirtina, kad KT-anti-CD44 konjugatai specifiškai atpažįsta imobilizuotą CD44 baltymą lusto paviršiuje. Didelis PPR signalo skirtumas tarp Au/MUR/CD44 ir Au/MUR/hGH paviršių bei signalo grįžimas į bazinę liniją hGH atveju rodo aukštą konjugatų specifiškumą ir jų tinkamumą tiksliam CD44 aptikimui biologiniuose jutikliuose.

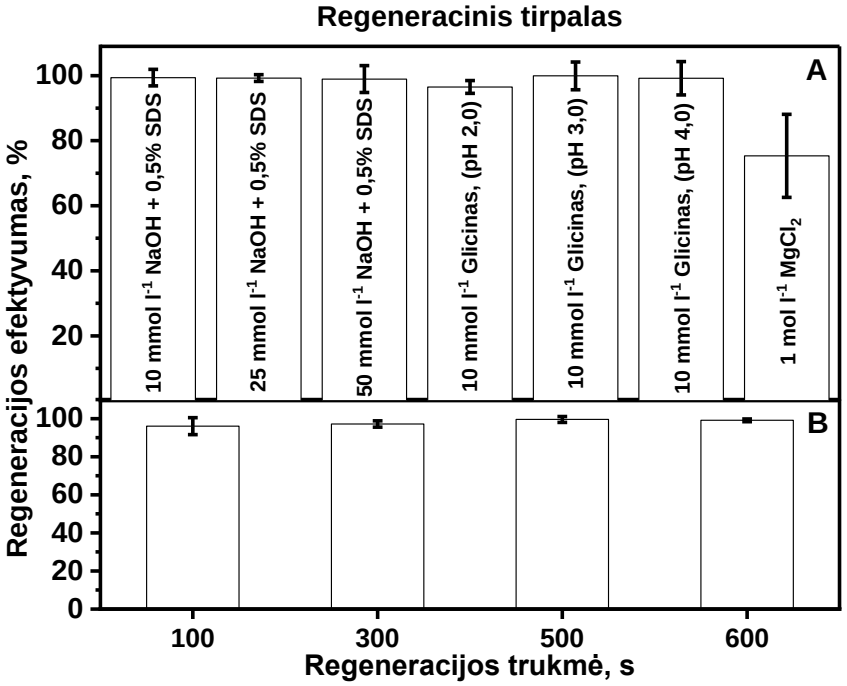
4 Tyrimai su anti-SCoV2-rN

SCoV2-rN baltymas yra vienas pagrindinių viruso struktūrinių baltymų ir pasižymi stipriomis imonogeninėmis savybėmis, todėl organizmo atsakas prieš šį baltymą dažnai atsiranda ankstyvoje infekcijos fazėje. Dėl šių savybių SCoV2-rN antikūnų aptikimas yra itin svarbus COVID-19 diagnostikoje, nes leidžia nustatyti neseniai įvykusią infekciją. Šiame tyrime buvo atliktas tiesioginis anti-SCoV2-rN nustatymas, siekiant įvertinti anti-SCoV2-rN sąveikų specifiškumą ir jautrumą, taikant PPR metodą.

4.1 Regeneracinio tirpalo parinkimas

PPR spektroskopija yra efektyvus metodas, leidžiantis jautriai ir be žymenų aptikti analitę. Norint užtikrinti imuninio jutiklio patikimumą ir rezultatų atkuriamumą daukartiniam panaudojimui, būtina optimizuoti regeneracijos procedūrą. Be to, modifikuoto PPR lusto pakartotinis naudojimas sumažina matavimų kaštus.

Regeneruojant paviršių, susidaręs antikūno ir antigeno imuninis kompleksas gali būti suardytas įveikiant tarpusavio traukos jėgas. Tam naudojami detergentai, stiprūs elektrolitai bei rūgštiniai arba šarminiai tirpalai, tačiau svarbu, kad nebūtų pažeista imobilizuotų molekulių struktūra [292,293]. Šiame tyrime buvo įvertintas septynių dažniausiai naudojamų regeneracijos tirpalų efektyvumas (27 pav.).



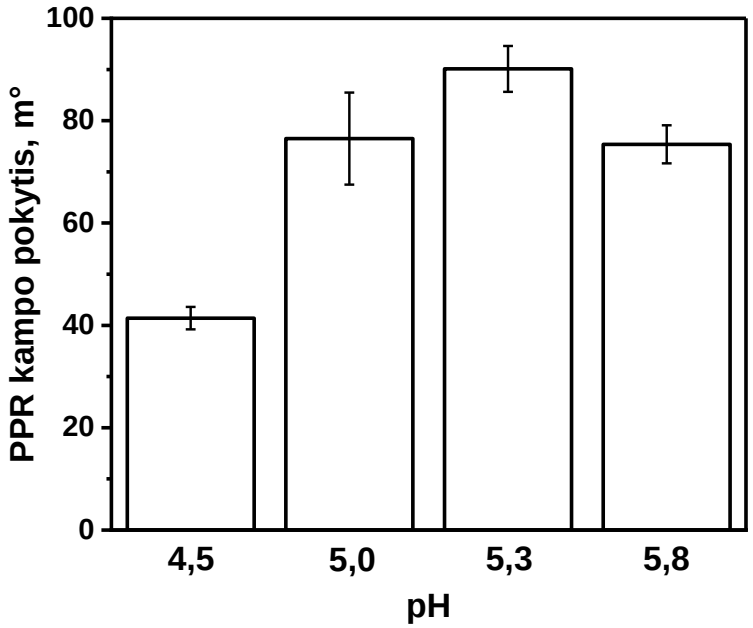
27 pav. Au paviršiuje susidariusio SCoV2-rN ir anti-SCoV2-rN komplekso disociacijos bei regeneracijos efektyvumo priklausomybė nuo (**A**) regeneracijos tirpalo tipo ir (**B**) trukmės, naudojant 10 mmol l^{-1} NaOH bei 0,5 % SDS tirpalą. Tyrimo sąlygos: 500 nmol l^{-1} SCoV2-rN; 10 nmol l^{-1} anti-SCoV2-rN.

Po imuninio komplekso (antigeno-antikūno) susidarymo lusto paviršius buvo regeneruotas, siekiant nutraukti sąveikavusių molekulių jungtis, o regeneracijos trukmė buvo 500 s. Tyrimo rezultatai parodė, kad mažiausias paviršiaus regeneracijos efektyvumas – 75,3 ±12,8 % – buvo pasiektas naudojant 1 mol l^{-1} magnio chlorido ($MgCl_2$) tirpalą. Tai rodo, kad stiprūs elektrolitai, pasižymintys didele jonine jėga, nėra tinkami šiam antigeno ir antikūno kompleksui suardyti. Tuo tarpu regeneracijos tirpalai, sudaryti iš 10 mmol l^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS, ar 25 mmol l^{-1} NaOH su 0,5 % SDS, pasižymėjo labai panašiu ir aukštu efektyvumu – atitinkamai 99,6 ±1,5 % ir 99,3 ±1,0 %. Naudojant 10 mmol l^{-1} glicino tirpalus (pH 3,0 ir pH 4,0) taip pat buvo pasiektas panašus regeneracijos efektyvumas, tačiau pastebėta, kad kartojant regeneravimo procesą su šiais rūgštiniais tirpalais, analiziniai signalai pamažu silpnėjo. Nors statistiškai reikšmingo skirtumo tarp daugumos tirpalų nepastebėta (išskyrus $MgCl_2$), mažiausias rezultato išsibarstymas (standartinis nuokrypis) buvo užfiksuotas naudojant

10 mmol l^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS tirpalą. Todėl tolimesniems bandymams pasirinktas būtent šis tirpalas. Taip pat nustatyta, kad regeneracijos efektyvumas priklauso ir nuo jos trukmės. Norint tai įvertinti, imuninis kompleksas buvo veikiamas 10 mmol l^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS tirpalu įvairius laikotarpius (27B pav.). Po 100 s regeneracijos pasiektas 96,0 ±4,4 % efektyvumas. Pratęsus regeneravimą iki 500 s, efektyvumas padidėjo iki 99,6 ±1,5 %. Ilgesnė regeneracija jau nebedavė geresnio rezultato. Nors statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta, remiantis vidutinėmis reikšmėmis ir siekiant išvengti galimo negrįžtamo signalo sumažėjimo, optimalia regeneracijos trukme buvo pasirinkta 500 s.

4.2 Optimalios SCoV2-rN baltymo tirpalo pH vertės parinkimas

SCoV2-rN baltymas buvo imobilizuotas prie lusto paviršiaus naudojant aktyvavimą karbodiimido reagentais. Tam tikslui buvo aktyvuotos karboksigrupės, esančios ant aukso paviršiaus, padengto MUR sluoksniu, panaudojant EDC ir NHS reagentų mišinį. Labai svarbu, kokio pH yra buferinis tirpalas, naudojamas baltymo imobilizacijai. pH reikšmė turi būti tinkama, kad įvyktų reakcija tarp aktyvuotų MUR karboksigrupių ir baltymo aminogrupių. Prieš patį imobilizavimą taip pat vyksta vadinamoji „koncentracijos kaupimosi“ stadija – jos metu padidinama baltymo koncentracija arti lusto paviršiaus. Jei lusto paviršius ir baltymas turi priešingus krūvius, tarp jų atsiranda elektrostatinė trauka, kuri dar labiau padidina baltymo koncentraciją ant jutiklio paviršiaus. Kad baltymas įgytų teigiamą krūvį, reikalingas pH, kuris būtų maždaug 0,5–1 vienetu mažesnis už baltymo izoelektrinį tašką (pI). Todėl baltymai, kurių pI yra didesnis, geriau tinka šiam imobilizavimo metodui [294]. MUR pKa yra mažesnė nei 4,4 [277], todėl buvo pasirinktas buferinis tirpalas, kurio pH yra didesnis nei 4,4 - taip MUR karboksigrupės įgyja neigiamą krūvį. Eksperimentai buvo atliekami esant pH reikšmėms nuo 4,5 iki 5,8. Šiame pH intervale SCoV2-rN baltymas (kurio pI yra 10,07 [295]) turi teigiamą krūvį, todėl tarp jo ir jutiklio paviršiaus vyksta elektrostatinė sąveika. Optimali pH reikšmė buvo nustatyta stebint, kaip pasikeičia PPR kampas, kai prie imobilizuoto SCoV2-rN baltymo prisijungia anti-SCoV2-rN (28 pav.).



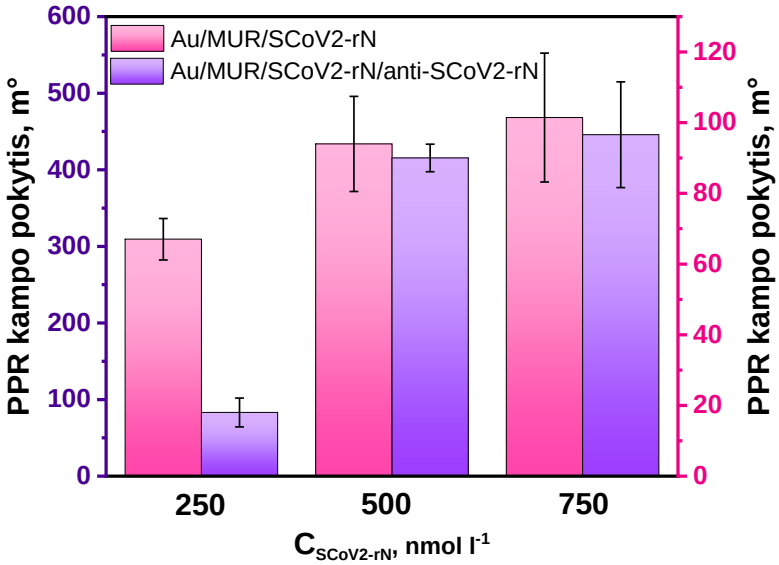
28 pav. Acetatiniu buferiu su skirtingu pH skiesto SCoV2-rN baltymo įtakos imuninio komplekso (SCoV2-rN ir anti-SCoV2-rN) susidarymo signalui įvertinimas. Tyrimo sąlygos: 500 nmol l^{-1} SCoV2-rN; imobilizacijos trukmė – 1200 s; 15 nmol l^{-1} anti-SCoV2-rN; 50 mmol l^{-1} acetatiniai buferiai su skirtingu pH.

Kaip matyti iš rezultatų, buferinio tirpalo pH reikšmė turėjo didelę įtaką PPR signalui, kuris fiksuojamas, kai imobilizuotas SCoV2-rN baltymas sąveikauja su tirpale esančiais specifiniais antikūnais. Didžiausias PPR kampo pokytis (90,1 ± 4,5 m°) buvo užfiksuotas naudojant acetatinį buferį (pH 5,3). Šis signalas reikšmingai skyrėsi nuo tų, kurie buvo gauti naudojant buferius su pH 5,0 (76,5 ± 9,0 m°) ir 5,8 (75,4 ± 3,7 m°). Todėl tolimesniuose eksperimentuose buvo naudojamas 50 mmol l^{-1} acetatinis buferis (pH 5,3).

4.3 SCoV2-rN baltymo koncentracijos parinkimas

Optimalus imobilizuoto baltymo kiekis ant jutiklio paviršiaus yra labai svarbus norint gauti didžiausią PPR analizės signalą. Jei ant paviršiaus imobilizuojama per daug baltymo, tai trukdo antikūnams prisijungti dėl erdvinių apribojimų. Kita vertus, jei baltymo kiekis yra per mažas, susidarius imuniniam kompleksui PPR signalas gali būti per silpnas. Taigi didesnis baltymo kiekis ant paviršiaus nebūtinai reiškia stipresnį PPR signalą. Tam, kad būtų pasiekta optimali baltymo paviršinė koncentracija, svarbu ne tik

pasirinkti tinkamą buferio pH, bet ir pradinę baltymo koncentraciją. SCoV2-rN baltymo koncentracijos įtaka buvo įvertinta analizuojant PPR kampo pokyčius po imobilizacijos ir po sąveikos su anti-SCoV2-rN (29 pav.).



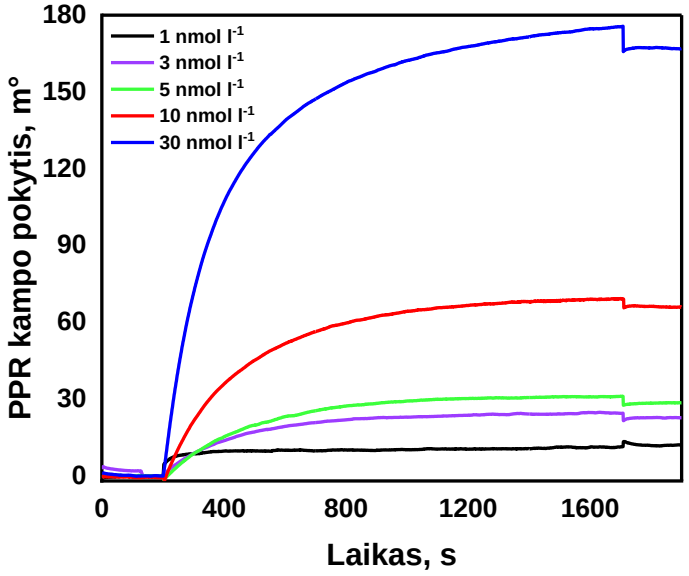
29 pav. Pradinės SCoV2-rN baltymo koncentracijos įtaka PPR signalui po baltymo imobilizacijos ir sąveikos su anti-SCoV2-rN antikūnais. Tyrimo sąlygos: SCoV2-rN buvo skiesta 50 mmol l^{-1} ABS (pH 5,3); anti-SCoV2-rN koncentracija – 15 nmol l^{-1}.

Imobilizuojant 250 nmol l^{-1} SCoV2-rN koncentraciją lusto paviršiuje, fiksuotas PPR signalo pokytis siekė 309 ± 27 m°. Vėliau sąveikos su specifiniais antikūnais metu PPR signalo reikšmė išmatuota 90 ± 3,9 m°. Kai imobilizuojama SCoV2-rN koncentracija lusto paviršiuje buvo padidinta iki 500 nmol l^{-1}, registruojamas PPR signalas padidėjo iki 434 ± 62 m°, o sąveikoje su specifiniais antikūnais PPR signalas padidėjo net penkis kartus. Galiausiai buvo naudota dar didesnė (750 nmol l^{-1}) SCoV2-rN koncentracija, užfiksuoti kampo pokyčiai buvo šiek tiek didesni, bet reikšmingai nesiskyrė palyginus su imobilizuota 500 nmol l^{-1} SCoV2-rN koncentracija, todėl buvo laikoma, kad optimali SCoV2-rN baltymo koncentracija yra 500 nmol l^{-1}. Tokiu atveju ant baltymo paviršinė koncentracija buvo 3,61 ± 0,52 ng/mm^2.

4.4 Analizinių parametrų nustatymas

Kadangi tyrimui buvo pasirinkti pelės monokloniniai antikūnai, nuspręsta įvertinti jų specifiškumą prie imobilizuoto SCoV2-rN baltymo. Antikūnų ir

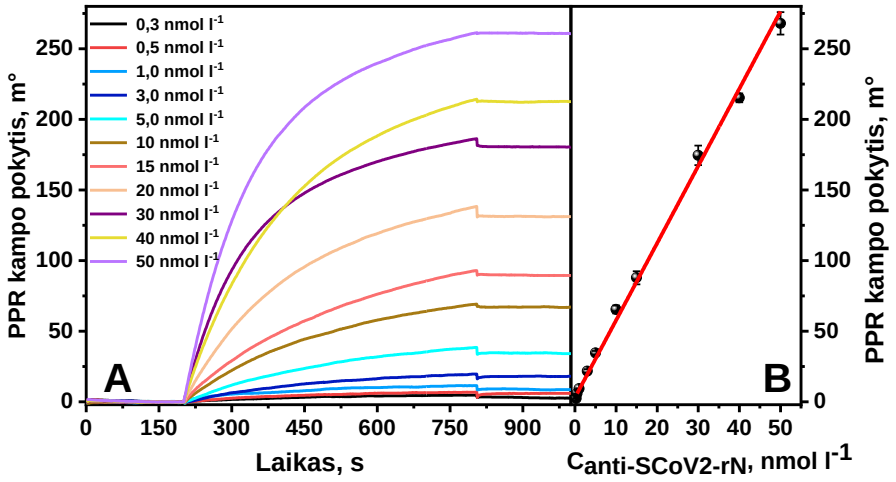
antigenų sąveikos stiprumą galima nustatyti atliekant PPR kinetinę analizę ir apskaičiuojant K_D reikšmę – kuo ji mažesnė, tuo stipresnė sąveika. Buvo tiriama, kaip įvairios anti-SCoV2-rN koncentracijos (nuo 1 iki 30 nmol l^{-1}) sąveikauja su imobilizuotu SCoV2-rN baltymu. Kadangi reikia palaukti, kol sąveika pasieks pusiausvyrą [296], eksperimentas buvo tęsiamas iki 1500 s (30 pav.).



30 pav. PPR tyrimas, kuriuo stebėta, kaip susidaro imuninis kompleksas tarp prie paviršiaus prijungto ScoV2-rN baltymo ir tirpale esančių anti-ScoV2-rN. Tyrimo sąlygos: baltymo koncentracija – 500 nmol l^{-1}, sąveikos trukmė – 1500 s, o anti-ScoV2-rN koncentracijos – 1, 3, 5, 10 ir 30 nmol l^{-1}.

Specifinės SCoV2-rN baltymo su anti-SCoV2-rN sąveikos rezultatai parodė, kad K_D siekė $6{,}49 \times 10^{-8} \pm 5{,}3 \times 10^{-9}$ mol l^{-1}, o maksimalus signalas (B_{max}) – 559 ± 33 m°. Tokios reikšmės rodo, kad tarp šio antigeno ir antikūno poros yra pakankamai stipri sąveika.

Viena iš pagrindinių PPR spektroskopijos privalumų – tai galimybė kiekybiškai nustatyti tirpale esančią medžiagą (analitę) be jokių papildomų žymėjimų. Tai leidžia paprastai, patikimai ir realiu laiku stebėti nustatymo rezultatus. Be to, šis metodas nėra brangus ar reikalaujantis daug laiko [297]. Sukurtu PPR imuniniu jutikliu buvo įvertinta galimybė aptikti anti-SCoV2-rN įvairiomis koncentracijomis – nuo 0,3 iki 50 nmol l^{-1}. Sąveikos fazė (kai antikūnai jungiasi su imobilizuotu baltymu) truko 600 s. 31A paveiksle pavaizduoti sensogramos duomenys, kurie rodo, kaip keitėsi signalas jungiantis antikūnams.

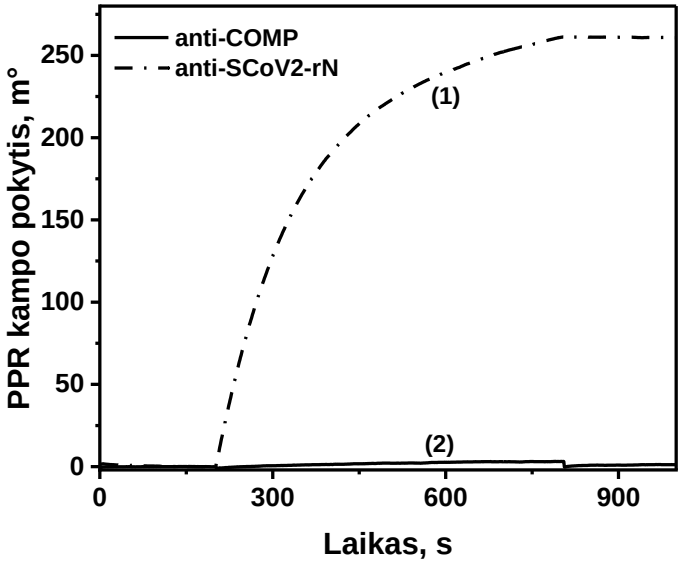


31 pav. (**A**) PPR sensogramos, užfiksuotos naudojant įvairių koncentracijų anti-SCoV2-rN tirpalus; (**B**) Kalibracinė kreivė. Tyrimo sąlygos: 500 nmol l^{-1} koncentracijos SCoV2-rN baltymas, sąveikos trukmė – 600 s, anti-SCoV2-rN koncentracijos: 0,3; 0,5; 1; 3; 5; 10; 15; 20; 30; 40 ir 50 nmol l^{-1}.

Vėliau buvo apskaičiuotas PPR atsakas ir nubraižytas grafikas, parodantis kaip priklausė registruotas signalas nuo anti-SCoV2-rN koncentracijos (31B pav.). Nustatyta, kad didėjant antikūnų koncentracijai, proporcingai didėjo ir PPR kampas. Tiesinis intervalas (R^2 = 0,9958) buvo registruojamas nuo 0,5 iki 50 nmol l^{-1} (75–7500 ng ml^{-1}). Kai koncentracija sumažinta iki 0,3 nmol l^{-1}, signalas tapo nebe toks tikslus. Aptikimo riba buvo apskaičiuota kaip 0,057 nmol l^{-1} (8,55 ng ml^{-1}), o nustatymo riba – 0,19 nmol l^{-1} (28,5 ng ml^{-1}), esant triukšmo ir signalo santykiui atitinkamai 3 ir 10.

Buvo įvertintas pagaminto imuninio jutiklio pakartojamumas. Kai buvo penkis kartus išmatuotas tirpalas su 7 nmol l^{-1} anti-SCoV2-rN, naudojant tą patį PPR jutiklio lustą, buvo apskaičiuotas 4,5 % santykinis standartinis nuokrypis (RSD). Tai rodo, kad jutiklis veikia patikimai ir pakartojamai. Taip pat buvo įvertintas imuninio jutiklio atrankumas – t. y. gebėjimas atskirti tik ieškomus antikūnus nuo kitų analičių. Tam buvo naudojami kiti antikūnai – prieš kremzlės oligomerinį matrikso baltymą (anti-COMP, 50 nmol l^{-1} koncentracijos), kurie yra struktūriškai ir funkcionaliai panašūs į anti-SCoV2-rN (32 pav.). Kai šie antikūnai buvo leidžiami ant jutiklio paviršiaus, buvo užfiksuotas tik labai mažas signalas – 2,8 ± 1,3 m°, palyginti su 267,95 ± 7,99 m°, kai buvo leidžiami tiksliniai anti-SCoV2-rN antikūnai. Tai rodo, kad nespecifinių sąveikų praktiškai nebuvo. Be to, buvo atlikti tyrimai naudojant

0,1 mol l^{-1} HEPES buferį – vieną iš įprastų biologinių buferių. Nustatyta, kad HEPES kaip organinis junginys, turintis du neigiamus krūvius,neturėjo jokios įtakos fiksuojamam signalui. Apibendrinant galima teigti, kad sukurtas imuninis jutiklis pasižymi geru pakartojamumu ir aukštu specifiškumu.



32 pav. Au/MUR/SCoV2-rN sąveika su anti-COMP ir anti-SCoV2-rN. Tyrimui naudoti 50 nmol l^{-1}koncentracijos antikūnai, ištirpinti PBS (pH 7,4).

5 IŠVADOS

1. Sėkmingai susintetinti KT-anti-CD44 konjugatai, panaudojant skirtingus pradinius KT-NH_2 ir anti-CD44 molinius santykius. Pagal paruoštų biokonjugatų sąveiką su imobilizuotu CD44 baltymu įvertintą PPR spekstroskopija, 1:10 molinis KT-NH_2 ir anti-CD44 santykis buvo optimalus konjugavimui. Taip pat buvo parodyta, kad paruošti konjugatai atrankiai sąveikauja su imobilizuotu CD44 baltymu.
2. Pradinė 500 nmol l^{-1} SCoV2-rN baltymo koncentracija ir acetatinis buferinis tirpalas, pH 5,3, yra optimalios sąlygos SCoV2-rN baltymo imobilizavimui ir anti-SCoV2-rN nustatymui PPR imuniniu jutikliu. Tuo metu optimalios regeneracijos sąlygos yra PPR lusto 500 s veikimas 10 mmol l^{-1} NaOH ir 0,5 % SDS tirpalu.
3. PPR tiesioginio formato imuninis jutiklis yra tinkamas anti-SCoV2-rN aptikimui 0,5 - 50 nmol l^{-1} (75 - 7500 ng ml^{-1}) koncentracijų intervale. Sukurtas imuninis jutiklis pasižymi geru pakartojamumu (RSD – 4,5 %) ir atrankumu, o aptikimo ir nustatymo ribos atitinkamai yra 0,057 nmol l^{-1} (8,55 ng ml^{-1}) ir 0,19 nmol l^{-1} (28,5 ng ml^{-1}).

6 LITERATŪROS SĄRAŠAS

[1] M. Puiu, C. Bala, SPR and SPR Imaging: Recent Trends in Developing Nanodevices for Detection and Real-Time Monitoring of Biomolecular Events, Sensors 16 (2016). https://doi.org/10.3390/s16060870.

[2] R. Thapa, G.D. Wilson, The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer, Stem Cells Int. 2016 (2016) 2087204. https://doi.org/10.1155/2016/2087204.

[3] Z. Bai, Y. Cao, W. Liu, J. Li, The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation, Viruses 13 (2021). https://doi.org/10.3390/v13061115.

[4] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, Sensors and Actuators 4 (1983) 299–304. https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7.

[5] R.W. Wood, XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science 4 (1902) 396–402. https://doi.org/10.1080/14786440209462857.

[6] J. Zenneck, Über die Fortpflanzung ebener elektromagnetischer Wellen längs einer ebenen Leiterfläche und ihre Beziehung zur drahtlosen Telegraphie, Ann. Phys. 328 (1907) 846–866. https://doi.org/10.1002/andp.19073281003.

[7] A. Sommerfeld, Über die Ausbreitung der Wellen in der drahtlosen Telegraphie, Ann. Phys. 333 (1909) 665–736. https://doi.org/10.1002/andp.19093330402.

[8] R.H. Ritchie, Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films, Physical Review 106 (1957) 874–881. https://doi.org/10.1103/PhysRev.106.874.

[9] C.J. Powell, J.B. Swan, Effect of Oxidation on the Characteristic Loss Spectra of Aluminum and Magnesium, Physical Review 118 (1960) 640–643. https://doi.org/10.1103/PhysRev.118.640.

[10] E.A. Stern, R.A. Ferrell, Surface Plasma Oscillations of a Degenerate Electron Gas, Physical Review 120 (1960) 130–136. https://doi.org/10.1103/PhysRev.120.130.

[11] A. Otto, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, Zeitschrift Für Physik A

Hadrons and Nuclei 216 (1968) 398–410. https://doi.org/10.1007/BF01391532.

[12] J.J. Foley IV, H. Harutyunyan, D. Rosenmann, R. Divan, G.P. Wiederrecht, S.K. Gray, When are Surface Plasmon Polaritons Excited in the Kretschmann-Raether Configuration?, Sci. Rep. 5 (2015) 9929. https://doi.org/10.1038/srep09929.

[13] X.D. Hoa, A.G. Kirk, M. Tabrizian, Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress, Biosens. Bioelectron. 23 (2007) 151–160. https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.07.001.

[14] J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review, Sens. Actuators B Chem. 54 (1999) 3–15. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00321-9.

[15] R. Ince, R. Narayanaswamy, Analysis of the performance of interferometry, surface plasmon resonance and luminescence as biosensors and chemosensors, Anal. Chim. Acta 569 (2006) 1–20. https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.058.

[16] O.S. Wolfbeis, Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors, Anal. Chem. 78 (2006) 3859–3874. https://doi.org/10.1021/ac060490z.

[17] A.K. Sharma, R. Jha, B.D. Gupta, Fiber-Optic Sensors Based on Surface Plasmon Resonance: A Comprehensive Review, IEEE Sens. J. 7 (2007) 1118–1129. https://doi.org/10.1109/JSEN.2007.897946.

[18] A.S. Kushwaha, A. Kumar, R. Kumar, S.K. Srivastava, A study of surface plasmon resonance (SPR) based biosensor with improved sensitivity, Photonics Nanostruct. 31 (2018) 99–106. https://doi.org/10.1016/j.photonics.2018.06.003.

[19] J. Homola, Electromagnetic Theory of Surface Plasmons BT - Surface Plasmon Resonance Based Sensors, in: J. Homola (Ed.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006: pp. 3–44. https://doi.org/10.1007/5346_013.

[20] D. Michel, F. Xiao, K. Alameh, A compact, flexible fiber-optic Surface Plasmon Resonance sensor with changeable sensor chips, Sens. Actuators B Chem. 246 (2017) 258–261. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.064.

[21] P.B. Garland, Optical evanescent wave methods for the study of biomolecular interactions, Q. Rev. Biophys. 29 (1996) 91–117. https://doi.org/10.1017/S0033583500005758.

[22] P.S. Menon, F.A. Said, G.S. Mei, D.D. Berhanuddin, A.A. Umar, S. Shaari, B.Y. Majlis, Urea and creatinine detection on nano-laminated

gold thin film using Kretschmann-based surface plasmon resonance biosensor, PLoS One 13 (2018) e0201228.

[23] E.P. Rodrigues, L.C. Oliveira, M.L.F. Silva, C.S. Moreira, A.M.N. Lima, Surface Plasmon Resonance Sensing Characteristics of Thin Copper and Gold Films in Aqueous and Gaseous Interfaces, IEEE Sens. J. 20 (2020) 7701–7710. https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.2980388.

[24] N.-H. Kim, M. Choi, T.W. Kim, W. Choi, S.Y. Park, K.M. Byun, Sensitivity and Stability Enhancement of Surface Plasmon Resonance Biosensors based on a Large-Area Ag/MoS2 Substrate, Sensors 19 (2019). https://doi.org/10.3390/s19081894.

[25] N.A.M. Zainuddin, M.M. Ariannejad, P.T. Arasu, S.W. Harun, R. Zakaria, Investigation of cladding thicknesses on silver SPR based side-polished optical fiber refractive-index sensor, Results Phys. 13 (2019) 102255. https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102255.

[26] G. Wang, C. Wang, R. Yang, W. Liu, S. Sun, A Sensitive and Stable Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Monolayer Protected Silver Film, Sensors 17 (2017). https://doi.org/10.3390/s17122777.

[27] B.A. Prabowo, A. Purwidyantri, K.-C. Liu, Surface Plasmon Resonance Optical Sensor: A Review on Light Source Technology, Biosensors (Basel). 8 (2018). https://doi.org/10.3390/bios8030080.

[28] C.R. Zamarreño, P.J. Rivero, M. Hernaez, J. Goicoechea, I.R. Matías, F.J. Arregui, Chapter 18 - Optical Sensors for Corrosion Monitoring, in: A. Tiwari, J. Rawlins, L.H. Hihara (Eds.), Intelligent Coatings for Corrosion Control, Butterworth-Heinemann, Boston, 2015: pp. 603–640. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411467-8.00018-0.

[29] J.H. Grassi, R.M. Georgiadis, Temperature-Dependent Refractive Index Determination from Critical Angle Measurements: Implications for Quantitative SPR Sensing, Anal. Chem. 71 (1999) 4392–4396. https://doi.org/10.1021/ac990125q.

[30] G. Safina, Application of surface plasmon resonance for the detection of carbohydrates, glycoconjugates, and measurement of the carbohydrate-specific interactions: A comparison with conventional analytical techniques. A critical review, Anal. Chim. Acta 712 (2012) 9–29. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.016.

[31] Z. Zhu, M. Feng, L. Zuo, Z. Zhu, F. Wang, L. Chen, J. Li, G. Shan, S.-Z. Luo, An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in wine and peanut oil, Biosens. Bioelectron. 65 (2015) 320–326. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.059.

[32] J. Homola, Present and future of surface plasmon resonance biosensors, Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003) 528–539. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2101-0.

[33] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications, Sensors 15 (2015) 10481–10510. https://doi.org/10.3390/s150510481.

[34] J. Divya, S. Selvendran, A.S. Raja, A. Sivasubramanian, Surface plasmon based plasmonic sensors: A review on their past, present and future, Biosens. Bioelectron. X 11 (2022) 100175. https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100175.

[35] D. Capelli, V. Scognamiglio, R. Montanari, Surface plasmon resonance technology: Recent advances, applications and experimental cases, TrAC Trends in Analytical Chemistry 163 (2023) 117079. https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117079.

[36] N. Ravindran, S. Kumar, Y. M, R. S, M.C. A, N.T. S, S.C. K, Recent advances in Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensors for food analysis: a review, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 63 (2023) 1055–1077. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1958745.

[37] R. Kumar, S. Pal, A. Verma, Y.K. Prajapati, J.P. Saini, Effect of silicon on sensitivity of SPR biosensor using hybrid nanostructure of black phosphorus and MXene, Superlattices Microstruct. 145 (2020) 106591. https://doi.org/10.1016/j.spmi.2020.106591.

[38] K. Niegelhell, S. Leimgruber, T. Grießer, C. Brandl, B. Chernev, R. Schennach, G. Trimmel, S. Spirk, Adsorption Studies of Organophosphonic Acids on Differently Activated Gold Surfaces, Langmuir 32 (2016) 1550–1559. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04467.

[39] P. Rodríguez-Franco, Ll. Abad, F.X. Muñoz-Pascual, M. Moreno, E. Baldrich, Effect of the transducer's surface pre-treatment on SPR aptasensor development, Sens. Actuators B Chem. 191 (2014) 634–642. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.046.

[40] P. Murugan, M. Krishnamurthy, S.N. Jaisankar, D. Samanta, A.B. Mandal, Controlled decoration of the surface with macromolecules: polymerization on a self-assembled monolayer (SAM), Chem. Soc. Rev. 44 (2015) 3212–3243. https://doi.org/10.1039/C4CS00378K.

[41] R.K. Sinha, Wavelength modulation based surface plasmon resonance sensor for detection of cardiac marker proteins troponin I and troponin T, Sens. Actuators A Phys. 332 (2021) 113104. https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.113104.

[42] W. Jia, H. Li, T. Wilkop, X. Liu, X. Yu, Q. Cheng, D. Xu, H.-Y. Chen, Silver decahedral nanoparticles empowered SPR imaging-SELEX for high throughput screening of aptamers with real-time assessment, Biosens. Bioelectron. 109 (2018) 206–213. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.029.

[43] D. Blasi, L. Sarcina, A. Tricase, A. Stefanachi, F. Leonetti, D. Alberga, G.F. Mangiatordi, K. Manoli, G. Scamarcio, R.A. Picca, L. Torsi, Enhancing the Sensitivity of Biotinylated Surfaces by Tailoring the Design of the Mixed Self-Assembled Monolayer Synthesis, ACS Omega 5 (2020) 16762–16771. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01717.

[44] D. Ataman Sadık, H. Eksi-Kocak, G. Ertaş, İ.H. Boyacı, M. Mutlu, Mixed-monolayer of N-hydroxysuccinimide-terminated cross-linker and short alkanethiol to improve the efficiency of biomolecule binding for biosensing, Surface and Interface Analysis 50 (2018) 866–878. https://doi.org/10.1002/sia.6489.

[45] D. Ataman Sadık, İ.H. Boyacı, M. Mutlu, Mixed monolayer decorated SPR sensing surface for thrombin detection, J. Pharm. Biomed. Anal. 176 (2019) 112822. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112822.

[46] J.A. Jones, L.A. Qin, H. Meyerson, I.K. Kwon, T. Matsuda, J.M. Anderson, Instability of self-assembled monolayers as a model material system for macrophage/FBGC cellular behavior, Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials 86 (2008) 261–268. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31660.

[47] W.-W. Wang, X. Han, L.-Q. Chu, Polyadenine-mediated Immobilization of Aptamers on a Gold Substrate for the Direct Detection of Bacterial Pathogens, Analytical Sciences 35 (2019) 967–972. https://doi.org/10.2116/analsci.19P110.

[48] M. Drozd, M.D. Pietrzak, E. Malinowska, SPRi-Based Biosensing Platforms for Detection of Specific DNA Sequences Using Thiolate and Dithiocarbamate Assemblies, Front. Chem. 6 (2018). https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00173.

[49] L. Simon, G. Lautner, R.E. Gyurcsányi, Reliable microspotting methodology for peptide-nucleic acid layers with high hybridization efficiency on gold SPR imaging chips, Anal. Methods 7 (2015) 6077–6082. https://doi.org/10.1039/C5AY01239B.

[50] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, Curr. Issues Mol. Biol. 10 (2008) 1–12. https://doi.org/10.21775/cimb.010.001.

[51] N.S. Lipman, L.R. Jackson, L.J. Trudel, F. Weis-Garcia, Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources, ILAR J. 46 (2005) 258–268. https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258.

[52] S. Baah, M. Laws, K.M. Rahman, Antibody–Drug Conjugates—A Tutorial Review, Molecules 26 (2021). https://doi.org/10.3390/molecules26102943.

[53] M.L. Chiu, D.R. Goulet, A. Teplyakov, G.L. Gilliland, Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics, Antibodies 8 (2019). https://doi.org/10.3390/antib8040055.

[54] J. Homola, Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, Chem. Rev. 108 (2008) 462–493. https://doi.org/10.1021/cr068107d.

[55] P. Peluso, D.S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays, Anal. Biochem. 312 (2003) 113–124. https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00442-6.

[56] W.-T. Hsu, Y.-C. Lin, H.-C. Yang, D. Barshilia, P.-L. Chen, F.-C. Huang, L.-K. Chau, W.-H. Hsieh, G.-E. Chang, Label-free biosensor based on particle plasmon resonance coupled with diffraction grating waveguide, Sensors 24 (2024) 5536. https://doi.org/10.3390/s24175536.

[57] G. Qiu, Z. Gai, Y. Tao, J. Schmitt, G.A. Kullak-Ublick, J. Wang, Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection, ACS Nano 14 (2020) 5268–5277. https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02439.

[58] S. Wu, Q. Tan, E. Forsberg, S. Hu, S. He, In-situ dual-channel surface plasmon resonance fiber sensor for temperature-compensated detection of glucose concentration, Opt. Express 28 (2020) 21046–21061. https://doi.org/10.1364/OE.395524.

[59] A.R. Camara, P.M.P. Gouvêa, A.C.M.S. Dias, A.M.B. Braga, R.F. Dutra, R.E. de Araujo, I.C.S. Carvalho, Dengue immunoassay with an LSPR fiber optic sensor, Opt. Express 21 (2013) 27023–27031. https://doi.org/10.1364/OE.21.027023.

[60] S. Song, J.U. Lee, J. Kang, K.H. Park, S.J. Sim, Real-time monitoring of distinct binding kinetics of hot-spot mutant p53 protein in human cancer cells using an individual nanorod-based plasmonic biosensor, Sens. Actuators B Chem. 322 (2020) 128584. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128584.

[61] W. Gong, S. Jiang, Z. Li, C. Li, J. Xu, J. Pan, Y. Huo, B. Man, A. Liu, C. Zhang, Experimental and theoretical investigation for surface plasmon resonance biosensor based on graphene/Au film/D-POF, Opt. Express 27 (2019) 3483–3495. https://doi.org/10.1364/OE.27.003483.

[62] Y. Khan, H. Sadia, S.Z. Ali Shah, M.N. Khan, A.A. Shah, N. Ullah, M.F. Ullah, H. Bibi, O.T. Bafakeeh, N. Ben Khedher, S.M. Eldin, B.M. Fadhl, M.I. Khan, Classification, Synthetic, and Characterization Approaches to Nanoparticles, and Their Applications in Various Fields of Nanotechnology: A Review, Catalysts 12 (2022). https://doi.org/10.3390/catal12111386.

[63] B. Yang, J. Chen, B. Liu, Y. Ding, Y. Tang, X. Yan, One dimensional graphene nanoscroll-wrapped MnO nanoparticles for high-performance lithium ion hybrid capacitors, J. Mater. Chem. A 9 (2021) 6352–6360. https://doi.org/10.1039/D1TA00404B.

[64] Q. Liu, J. Shen, X. Yu, X. Yang, W. Liu, J. Yang, H. Tang, H. Xu, H. Li, Y. Li, J. Xu, Unveiling the origin of boosted photocatalytic hydrogen evolution in simultaneously (S, P, O)-Codoped and exfoliated ultrathin g-C3N4 nanosheets, Appl. Catal. B 248 (2019) 84–94. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.02.020.

[65] J. Pang, A. Bachmatiuk, Y. Yin, B. Trzebicka, L. Zhao, L. Fu, R.G. Mendes, T. Gemming, Z. Liu, M.H. Rummeli, Applications of Phosphorene and Black Phosphorus in Energy Conversion and Storage Devices, Adv. Energy Mater. 8 (2018) 1702093. https://doi.org/10.1002/aenm.201702093.

[66] S. Tang, M. Zhao, D. Yuan, X. Li, Z. Wang, X. Zhang, T. Jiao, J. Ke, Fe3O4 nanoparticles three-dimensional electro-peroxydisulfate for improving tetracycline degradation, Chemosphere 268 (2021) 129315. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129315.

[67] D. Nunes, A. Pimentel, R. Branquinho, E. Fortunato, R. Martins, Metal Oxide-Based Photocatalytic Paper: A Green Alternative for Environmental Remediation, Catalysts 11 (2021). https://doi.org/10.3390/catal11040504.

[68] S. Machado, J.G. Pacheco, H.P.A. Nouws, J.T. Albergaria, C. Delerue-Matos, Characterization of green zero-valent iron nanoparticles

produced with tree leaf extracts, Science of The Total Environment 533 (2015) 76–81. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.091.

[69] F. Eker, H. Duman, E. Akdaşçi, E. Bolat, S. Sarıtaş, S. Karav, A.M. Witkowska, A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity, Molecules 29 (2024). https://doi.org/10.3390/molecules29153482.

[70] S. Malik, J. Singh, R. Goyat, Y. Saharan, V. Chaudhry, A. Umar, A.A. Ibrahim, S. Akbar, S. Ameen, S. Baskoutas, Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review, Heliyon 9 (2023). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19929.

[71] Z. Zahra, Z. Habib, S. Chung, M.A. Badshah, Exposure Route of TiO2 NPs from Industrial Applications to Wastewater Treatment and Their Impacts on the Agro-Environment, Nanomaterials 10 (2020). https://doi.org/10.3390/nano10081469.

[72] L. Rassaei, F. Marken, M. Sillanpää, M. Amiri, C.M. Cirtiu, M. Sillanpää, Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring, TrAC Trends in Analytical Chemistry 30 (2011) 1704–1715. https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.05.009.

[73] J. Chen, Y. Guo, X. Zhang, J. Liu, P. Gong, Z. Su, L. Fan, G. Li, Emerging Nanoparticles in Food: Sources, Application, and Safety, J. Agric. Food Chem. 71 (2023) 3564–3582. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06740.

[74] F. Islam, S. Shohag, Md.J. Uddin, Md.R. Islam, M.H. Nafady, A. Akter, S. Mitra, A. Roy, T. Bin Emran, S. Cavalu, Exploring the Journey of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) toward Biomedical Applications, Materials 15 (2022). https://doi.org/10.3390/ma15062160.

[75] Y. Huang, X. Guo, Y. Wu, X. Chen, L. Feng, N. Xie, G. Shen, Nanotechnology's frontier in combatting infectious and inflammatory diseases: prevention and treatment, Signal Transduct. Target. Ther. 9 (2024) 34. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01745-z.

[76] A.K. Mittal, U.C. Banerjee, Chapter 5 - Current status and future prospects of nanobiomaterials in drug delivery, in: A.M. Grumezescu (Ed.), Nanobiomaterials in Drug Delivery, William Andrew Publishing, 2016: pp. 147–170. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42866-8.00005-8.

[77] N. Karak, Chapter 1 - Fundamentals of Nanomaterials and Polymer Nanocomposites, in: N. Karak (Ed.), Nanomaterials and Polymer

Nanocomposites, Elsevier, 2019: pp. 1–45. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814615-6.00001-1.

[78] S. Mohan Bhagyaraj, O.S. Oluwafemi, Chapter 1 - Nanotechnology: The Science of the Invisible, in: S. Mohan Bhagyaraj, O.S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas (Eds.), Synthesis of Inorganic Nanomaterials, Woodhead Publishing, 2018: pp. 1–18. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101975-7.00001-4.

[79] E. Roduner, Size matters: why nanomaterials are different, Chem. Soc. Rev. 35 (2006) 583–592. https://doi.org/10.1039/B502142C.

[80] R. Singh, R.K. Soni, Chapter 11 - Laser-Induced Heating Synthesis of Hybrid Nanoparticles, in: S. Mohapatra, T.A. Nguyen, P. Nguyen-Tri (Eds.), Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles, Woodhead Publishing, 2019: pp. 195–238. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814134-2.00011-5.

[81] B. Gwalani, X. Li, A. Nittala, W. Choi, Md. Reza-E-Rabby, J.E. Atehortua, A. Bhattacharjee, M. Pole, J. Silverstein, M. Song, K. Kappagantula, Unprecedented electrical performance of friction-extruded copper-graphene composites, Mater. Des. 237 (2024) 112555. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.112555.

[82] A.N. Guerreiro, I.B. Costa, A.B. Vale, M.H. Braga, Distinctive Electric Properties of Group 14 Oxides: SiO2, SiO, and SnO2, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023). https://doi.org/10.3390/ijms242115985.

[83] A.D. Terna, E.E. Elemike, J.I. Mbonu, O.E. Osafile, R.O. Ezeani, The future of semiconductors nanoparticles: Synthesis, properties and applications, Materials Science and Engineering: B 272 (2021) 115363. https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115363.

[84] M.G. Madan Singh, K. Devlal, Size and shape effects on the band gap of semiconductor compound nanomaterials, Journal of Taibah University for Science 12 (2018) 470–475. https://doi.org/10.1080/16583655.2018.1473946.

[85] L. Liu, A. Corma, Metal Catalysts for Heterogeneous Catalysis: From Single Atoms to Nanoclusters and Nanoparticles, Chem. Rev. 118 (2018) 4981–5079. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00776.

[86] S.C. Singh, H. Zeng, C. Guo, R. Gopal, W. Cai, Introduction of Materials and Architectures at the Nanoscale, in: Nanomaterials, John Wiley & Sons, Ltd, 2012: pp. 35–66. https://doi.org/10.1002/9783527646821.ch2.

[87] Y. Al-Douri, Electrical and Optical Properties of Nanomaterials, in: Nanomaterials: Basics to Applications, Springer, 2022: pp. 75–104. https://doi.org/10.1007/978-981-19-3881-8_5.

[88] S.M. Bergin, Y.-H. Chen, A.R. Rathmell, P. Charbonneau, Z.-Y. Li, B.J. Wiley, The effect of nanowire length and diameter on the properties of transparent{,} conducting nanowire films, Nanoscale 4 (2012) 1996–2004. https://doi.org/10.1039/C2NR30126A.

[89] C. Buzea, I. Pacheco, Electrical Properties of Nanowires and Nanofibers, in: A. Barhoum, M. Bechelany, A.S.H. Makhlouf (Eds.), Handbook of Nanofibers, Springer International Publishing, Cham, 2019: pp. 557–618. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53655-2_14.

[90] R. Mout, D.F. Moyano, S. Rana, V.M. Rotello, Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 2539–2544. https://doi.org/10.1039/C2CS15294K.

[91] R.A. Sperling, W.J. Parak, Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles, Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 368 (2010) 1333–1383. https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273.

[92] A. Abdelkawi, A. Slim, Z. Zinoune, Y. Pathak, Surface Modification of Metallic Nanoparticles for Targeting Drugs, Coatings 13 (2023). https://doi.org/10.3390/coatings13091660.

[93] Y. Fu, T. Liu, H. Wang, Z. Wang, L. Hou, J. Jiang, T. Xu, Applications of nanomaterial technology in biosensing, Journal of Science: Advanced Materials and Devices 9 (2024) 100694. https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2024.100694.

[94] S. Mourdikoudis, M. Menelaou, N. Fiuza-Maneiro, G. Zheng, S. Wei, J. Pérez-Juste, L. Polavarapu, Z. Sofer, Oleic acid/oleylamine ligand pair: a versatile combination in the synthesis of colloidal nanoparticles, Nanoscale Horiz. 7 (2022) 941–1015. https://doi.org/10.1039/D2NH00111J.

[95] C. Leiterer, D. Zopf, B. Seise, F. Jahn, K. Weber, J. Popp, D. Cialla-May, W. Fritzsche, Fast self-assembly of silver nanoparticle monolayer in hydrophobic environment and its application as SERS substrate, Journal of Nanoparticle Research 16 (2014) 2467. https://doi.org/10.1007/s11051-014-2467-2.

[96] Z. Lu, C. Gao, Q. Zhang, M. Chi, J.Y. Howe, Y. Yin, Direct Assembly of Hydrophobic Nanoparticles to Multifunctional Structures, Nano Lett. 11 (2011) 3404–3412. https://doi.org/10.1021/nl201820r.

[97] B. Lin, S. Zhou, Poly(ethylene glycol)-grafted silica nanoparticles for highly hydrophilic acrylic-based polyurethane coatings, Prog. Org. Coat. 106 (2017) 145–154. https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.02.008.

[98] A.H. Al-Nadaf, L.A. Dahabiyeh, S. Bardaweel, N.N. Mahmoud, S. Jawarneh, Functionalized mesoporous silica nanoparticles by lactose and hydrophilic polymer as a hepatocellular carcinoma drug delivery system, J. Drug Deliv. Sci. Technol. 56 (2020) 101504. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101504.

[99] M.J. Penelas, G.J.A.A. Soler-Illia, V. Levi, A. V Bordoni, A. Wolosiuk, Click-based thiol-ene photografting of COOH groups to SiO2 nanoparticles: Strategies comparison, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 562 (2019) 61–70. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.11.023.

[100] M. Rizvi, H. Gerengi, P. Gupta, Functionalization of Nanomaterials: Synthesis and Characterization, in: Functionalized Nanomaterials for Corrosion Mitigation: Synthesis, Characterization, and Applications, American Chemical Society, 2022: p. 1. https://doi.org/10.1021/bk-2022-1418.ch001.

[101] A.J. Sivaram, A. Wardiana, C.B. Howard, S.M. Mahler, K.J. Thurecht, Recent advances in the generation of antibody–nanomaterial conjugates, Adv. Healthc. Mater. 7 (2018) 1700607. https://doi.org/10.1002/adhm.201700607.

[102] E. Polo, S. Puertas, M. Moros, P. Batalla, J.M. Guisán, J.M. de la Fuente, V. Grazú, Tips for the functionalization of nanoparticles with antibodies, Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition (2013) 149–163. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_11.

[103] E. Steen Redeker, D.T. Ta, D. Cortens, B. Billen, W. Guedens, P. Adriaensens, Protein engineering for directed immobilization, Bioconjug. Chem. 24 (2013) 1761–1777. https://doi.org/10.1021/bc4002823.

[104] E.Y. Chen, W.F. Liu, L. Megido, P. Díez, M. Fuentes, C. Fager, E. Olsson, I. Gessner, S. Mathur, Chapter 3 - Understanding and utilizing the biomolecule/nanosystems interface, in: V. Uskoković, D.P. Uskoković (Eds.), Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine, Elsevier, 2018: pp. 207–297. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48063-5.00003-4.

[105] M.P. Wickramathilaka, B.Y. Tao, Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates, J. Biol. Eng. 13 (2019) 63. https://doi.org/10.1186/s13036-019-0191-2.

[106] S.B. Rizvi, S. Rouhi, S. Taniguchi, S.Y. Yang, M. Green, M. Keshtgar, A.M. Seifalian, Near-infrared quantum dots for HER2 localization and imaging of cancer cells, Int. J. Nanomedicine (2014) 1323–1337. https://doi.org/10.2147/IJN.S51535.

[107] S.K. Vashist, Comparison of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide based strategies to crosslink antibodies on amine-functionalized platforms for immunodiagnostic applications, Diagnostics 2 (2012) 23–33. https://doi.org/10.3390/diagnostics2030023.

[108] J. Conde, J.T. Dias, V. Grazú, M. Moros, P. V Baptista, J.M. de la Fuente, Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine, Front. Chem. 2 (2014) 48. https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00048.

[109] Z. Pei, H. Anderson, A. Myrskog, G. Dunér, B. Ingemarsson, T. Aastrup, Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity, Anal. Biochem. 398 (2010) 161–168. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.11.038.

[110] Y.-W. Li, Z.-G. Chen, Z.-S. Zhao, H.-L. Li, J.-C. Wang, Z.-M. Zhang, Preparation of magnetic resonance probes using one-pot method for detection of hepatocellular carcinoma, World Journal of Gastroenterology: WJG 21 (2015) 4275. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i14.4275.

[111] J.-M. Montenegro, V. Grazu, A. Sukhanova, S. Agarwal, J.M. de la Fuente, I. Nabiev, A. Greiner, W.J. Parak, Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (2013) 677–688. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.12.003.

[112] R.M. Fratila, S.G. Mitchell, P. del Pino, V. Grazu, J.M. de la Fuente, Strategies for the biofunctionalization of gold and iron oxide nanoparticles, Langmuir 30 (2014) 15057–15071. https://doi.org/10.1021/la5015658.

[113] W. Mao, H. He, P. Sun, Z. Ye, J. Huang, Three-dimensional porous nickel frameworks anchored with cross-linked Ni (OH) 2 nanosheets as a highly sensitive nonenzymatic glucose sensor, ACS Appl. Mater. Interfaces 10 (2018) 15088–15095. https://doi.org/10.1021/acsami.8b03433.

[114] X. Zhu, Y. Ju, J. Chen, D. Liu, H. Liu, Nonenzymatic wearable sensor for electrochemical analysis of perspiration glucose, ACS Sens. 3 (2018) 1135–1141. https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00168.

[115] B. Nikhil, J. Pawan, F. Nello, E. Pedro, Introduction to biosensors, Essays Biochem 60 (2016) 1–8. https://doi.org/10.1042/EBC20150001.
[116] H. Sable, V. Kumar, V. Singh, S. Rustagi, V. Chaudhary, S. Pandit, Nanosystems-Enhanced Electrochemical Biosensors for Precision in One Health Management, J. Electrochem. Soc. 171 (2024) 37527. https://doi.org/10.1149/1945-7111/ad32a1.
[117] N. Karikalan, M. Velmurugan, S.-M. Chen, C. Karuppiah, Modern approach to the synthesis of Ni (OH) 2 decorated sulfur doped carbon nanoparticles for the nonenzymatic glucose sensor, ACS Appl. Mater. Interfaces 8 (2016) 22545–22553. https://doi.org/10.1021/acsami.6b07260.
[118] K. Rizwan, A. Rahdar, M. Bilal, H.M.N. Iqbal, MXene-based electrochemical and biosensing platforms to detect toxic elements and pesticides pollutants from environmental matrices, Chemosphere 291 (2022) 132820. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132820.
[119] M. Van Tran, A.T. Ha, P.M.L. Le, Nanoflake Manganese Oxide and Nickel-Manganese Oxide Synthesized by Electrodeposition for Electrochemical Capacitor, J. Nanomater. 2015 (2015) 609273. https://doi.org/10.1155/2015/609273.
[120] A. Munawar, Y. Ong, R. Schirhagl, M.A. Tahir, W.S. Khan, S.Z. Bajwa, Nanosensors for diagnosis with optical, electric and mechanical transducers, RSC Adv. 9 (2019) 6793–6803. https://doi.org/10.1039/C8RA10144B.
[121] P. Singh, S.K. Pandey, J. Singh, S. Srivastava, S. Sachan, S.K. Singh, Biomedical perspective of electrochemical nanobiosensor, Nanomicro Lett. 8 (2016) 193–203. https://doi.org/10.1007/s40820-015-0077-x.
[122] T. Rasheed, F. Nabeel, M. Adeel, K. Rizwan, M. Bilal, H.M.N. Iqbal, Carbon nanotubes-based cues: A pathway to future sensing and detection of hazardous pollutants, J. Mol. Liq. 292 (2019) 111425. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111425.
[123] A. Banerjee, S. Maity, C.H. Mastrangelo, Nanotechnology for biosensors: A Review, ArXiv Preprint ArXiv:2101.02430 (2021). https://doi.org/10.48550/arXiv.2101.02430.
[124] S. Akgönüllü, A. Denizli, Recent advances in optical biosensing approaches for biomarkers detection, Biosens. Bioelectron. X 12 (2022) 100269. https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100269.
[125] N. Shahbazi, R. Zare-Dorabei, S.M. Naghib, Multifunctional nanoparticles as optical biosensing probe for breast cancer detection:

A review, Materials Science and Engineering: C 127 (2021) 112249. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112249.

[126] V. Naresh, N. Lee, A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors, Sensors 21 (2021) 1109. https://doi.org/10.3390/s21041109.

[127] A.L. Efros, L.E. Brus, Nanocrystal Quantum Dots: From Discovery to Modern Development, ACS Nano 15 (2021) 6192–6210. https://doi.org/10.1021/acsnano.1c01399.

[128] L.M. Liz-Marzán, N. Artzi, S. Bals, J.M. Buriak, W.C.W. Chan, X. Chen, M.C. Hersam, I.-D. Kim, J.E. Millstone, P. Mulvaney, W.J. Parak, A. Rogach, R.E. Schaak, Celebrating a Nobel Prize to the "Discovery of Quantum Dots, an Essential Milestone in Nanoscience," ACS Nano 17 (2023) 19474–19475. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c09671.

[129] O.D. Neikov, N.A. Yefimov, Chapter 9 - Nanopowders, in: O.D. Neikov, S.S. Naboychenko, N.A. Yefimov (Eds.), Handbook of Non-Ferrous Metal Powders (Second Edition), Second Edi, Elsevier, Oxford, 2019: pp. 271–311. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100543-9.00009-9.

[130] C. Zhu, Z. Chen, S. Gao, B.L. Goh, I. Bin Samsudin, K.W. Lwe, Y. Wu, C. Wu, X. Su, Recent advances in non-toxic quantum dots and their biomedical applications, Progress in Natural Science: Materials International 29 (2019) 628–640. https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2019.11.007.

[131] A. Hamidu, W.G. Pitt, G.A. Husseini, Recent Breakthroughs in Using Quantum Dots for Cancer Imaging and Drug Delivery Purposes, Nanomaterials 13 (2023). https://doi.org/10.3390/nano13182566.

[132] J. Xu, J. Zheng, Chapter 3 - Quantum Dots and Nanoclusters, in: G. Li (Ed.), Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications, Elsevier, 2019: pp. 67–90. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815053-5.00003-9.

[133] X. Huang, M. Tang, Research advance on cell imaging and cytotoxicity of different types of quantum Dots, Journal of Applied Toxicology 41 (2021) 342–361. https://doi.org/10.1002/jat.4083.

[134] P. Shen, Y. Xia, Synthesis-Modification Integration: One-Step Fabrication of Boronic Acid Functionalized Carbon Dots for Fluorescent Blood Sugar Sensing, Anal. Chem. 86 (2014) 5323–5329. https://doi.org/10.1021/ac5001338.

[135] C. Wang, X. Gao, X. Su, In vitro and in vivo imaging with quantum dots, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1397–1415. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3481-6.
[136] V.G. Reshma, P. V Mohanan, Quantum dots: Applications and safety consequences, J. Lumin. 205 (2019) 287–298. https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.09.015.
[137] E.B. Voura, J.K. Jaiswal, H. Mattoussi, S.M. Simon, Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy, Nat. Med. 10 (2004) 993–998. https://doi.org/10.1038/nm1096.
[138] A.M. Wagner, J.M. Knipe, G. Orive, N.A. Peppas, Quantum dots in biomedical applications, Acta Biomater. 94 (2019) 44–63. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.022.
[139] A.M. Smith, H. Duan, A.M. Mohs, S. Nie, Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (2008) 1226–1240. https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.015.
[140] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, Nat. Methods 5 (2008) 763–775. https://doi.org/10.1038/nmeth.1248.
[141] R.G. Aswathy, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1417–1435. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3643-6.
[142] C. Li, Y. Zhang, M. Wang, Y. Zhang, G. Chen, L. Li, D. Wu, Q. Wang, In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag2S quantum dots in the NIR-II window, Biomaterials 35 (2014) 393–400. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.010.
[143] J.L. West, N.J. Halas, Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics, Annu. Rev. Biomed. Eng. 5 (2003) 285–292. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120723.
[144] S. Kargozar, S.J. Hoseini, P.B. Milan, S. Hooshmand, H. Kim, M. Mozafari, Quantum dots: a review from concept to clinic, Biotechnol. J. 15 (2020) 2000117. https://doi.org/10.1002/biot.202000117.
[145] P. Wuttisarnwattana, S. Eid, M. Gargesha, K.R. Cooke, D.L. Wilson, Cryo-imaging of Stem Cell Biodistribution in Mouse Model of Graft-Versus-Host-Disease, Ann. Biomed. Eng. 48 (2020) 1702–1711. https://doi.org/10.1007/s10439-020-02487-z.
[146] L.B. Thal, V.R. Mann, D. Sprinzen, J.R. McBride, K.R. Reid, I.D. Tomlinson, D.G. McMahon, B.E. Cohen, S.J. Rosenthal, Ligand-

conjugated quantum dots for fast sub-diffraction protein tracking in acute brain slices, Biomater. Sci. 8 (2020) 837–845. https://doi.org/10.1039/C9BM01629E.

[147] Z. Han, S. Sarkar, A.M. Smith, Zwitterion and oligo (ethylene glycol) synergy minimizes nonspecific binding of compact quantum dots, ACS Nano 14 (2020) 3227–3241. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08658.

[148] M. Zhang, Q. Wang, Y. Xu, L. Guo, Z. Lai, Z. Li, Graphitic carbon nitride quantum dots as analytical probe for viewing sialic acid on the surface of cells and tissues, Anal. Chim. Acta 1095 (2020) 204–211. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.031.

[149] M.A. Hahn, J.S. Tabb, T.D. Krauss, Detection of Single Bacterial Pathogens with Semiconductor Quantum Dots, Anal. Chem. 77 (2005) 4861–4869. https://doi.org/10.1021/ac050641i.

[150] J. Hu, F. Tang, Y.-Z. Jiang, C. Liu, Rapid screening and quantitative detection of Salmonella using a quantum dot nanobead-based biosensor, Analyst 145 (2020) 2184–2190. https://doi.org/10.1039/D0AN00035C.

[151] H. Mattoussi, G. Palui, H. Bin Na, Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes, Adv. Drug Deliv. Rev. 64 (2012) 138–166. https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.011.

[152] S. Silvi, A. Credi, Luminescent sensors based on quantum dot–molecule conjugates, Chem. Soc. Rev. 44 (2015) 4275–4289. https://doi.org/10.1039/C4CS00400K.

[153] N. Zhan, G. Palui, H. Mattoussi, Preparation of compact biocompatible quantum dots using multicoordinating molecular-scale ligands based on a zwitterionic hydrophilic motif and lipoic acid anchors, Nat. Protoc. 10 (2015) 859–874. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.050.

[154] F. Aldeek, D. Hawkins, V. Palomo, M. Safi, G. Palui, P.E. Dawson, I. Alabugin, H. Mattoussi, UV and Sunlight Driven Photoligation of Quantum Dots: Understanding the Photochemical Transformation of the Ligands, J. Am. Chem. Soc. 137 (2015) 2704–2714. https://doi.org/10.1021/ja512802x.

[155] G. Palui, T. Avellini, N. Zhan, F. Pan, D. Gray, I. Alabugin, H. Mattoussi, Photoinduced Phase Transfer of Luminescent Quantum Dots to Polar and Aqueous Media, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 16370–16378. https://doi.org/10.1021/ja306621n.

[156] M.A. Correa-Duarte, M. Giersig, L.M. Liz-Marzán, Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure, Chem. Phys. Lett. 286 (1998) 497–501. https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00012-8.

[157] M.A. Correa-Duarte, Y. Kobayashi, R.A. Caruso, L.M. Liz-Marzán, Photodegradation of SiO2-coated CdS nanoparticles within silica gels, J. Nanosci. Nanotechnol. 1 (2001) 95–99. https://doi.org/10.1166/jnn.2001.010.

[158] T. Nann, J. Riegler, P. Nick, P. Mulvaney, Quantum dots with silica shells, in: Nanobiophotonics and Biomedical Applications II, SPIE, 2005: pp. 77–84. https://doi.org/10.1117/12.582871.

[159] Z. Zhelev, R. Bakalova, H. Ohba, R. Jose, Y. Imai, Y. Baba, Uncoated, Broad Fluorescent, and Size-Homogeneous CdSe Quantum Dots for Bioanalyses, Anal. Chem. 78 (2006) 321–330. https://doi.org/10.1021/ac0511896.

[160] A.S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan, S. Seal, PEGylated inorganic nanoparticles, Angewandte Chemie International Edition 50 (2011) 1980–1994. https://doi.org/10.1002/anie.201002969.

[161] E.L. Bentzen, I.D. Tomlinson, J. Mason, P. Gresch, M.R. Warnement, D. Wright, E. Sanders-Bush, R. Blakely, S.J. Rosenthal, Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays, Bioconjug. Chem. 16 (2005) 1488–1494. https://doi.org/10.1021/bc0502006.

[162] W.W. Yu, E. Chang, J.C. Falkner, J. Zhang, A.M. Al-Somali, C.M. Sayes, J. Johns, R. Drezek, V.L. Colvin, Forming Biocompatible and Nonaggregated Nanocrystals in Water Using Amphiphilic Polymers, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 2871–2879. https://doi.org/10.1021/ja067184n.

[163] J.J. Gooding, S. Ciampi, The molecular level modification of surfaces: from self-assembled monolayers to complex molecular assemblies, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 2704–2718. https://doi.org/10.1039/C0CS00139B.

[164] J. Blanco-Canosa, M. Wu, K. Susumu, E. Petryayeva, T.L. Jennings, P.E. Dawson, W.R. Algar, I.L. Medintz, Recent Progress in the Bioconjugation of Quantum Dots, Coord. Chem. Rev. 263–264 (2014) 101. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.030.

[165] T.L. Jennings, S.G. Becker-Catania, R.C. Triulzi, G. Tao, B. Scott, K.E. Sapsford, S. Spindel, E. Oh, V. Jain, James.B. Delehanty, D.E. Prasuhn, K. Boeneman, W.R. Algar, I.L. Medintz, Reactive

Semiconductor Nanocrystals for Chemoselective Biolabeling and Multiplexed Analysis, ACS Nano 5 (2011) 5579–5593. https://doi.org/10.1021/nn201050g.

[166] J.B. Blanco-Canosa, I.L. Medintz, D. Farrell, H. Mattoussi, P.E. Dawson, Rapid Covalent Ligation of Fluorescent Peptides to Water Solubilized Quantum Dots, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 10027–10033. https://doi.org/10.1021/ja910988d.

[167] A. Liu, S. Peng, J.C. Soo, M. Kuang, P. Chen, H. Duan, Quantum Dots with Phenylboronic Acid Tags for Specific Labeling of Sialic Acids on Living Cells, Anal. Chem. 83 (2011) 1124–1130. https://doi.org/10.1021/ac1028853.

[168] V. Biju, Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 744–764. https://doi.org/10.1039/C3CS60273G.

[169] H. Shen, A.M. Jawaid, P.T. Snee, Poly(ethylene glycol) Carbodiimide Coupling Reagents for the Biological and Chemical Functionalization of Water-Soluble Nanoparticles, ACS Nano 3 (2009) 915–923. https://doi.org/10.1021/nn800870r.

[170] H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F. V Mikulec, M.G. Bawendi, Self-Assembly of CdSe−ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 12142–12150. https://doi.org/10.1021/ja002535y.

[171] A.R. Clapp, I.L. Medintz, J.M. Mauro, B.R. Fisher, M.G. Bawendi, H. Mattoussi, Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Quantum Dot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 301–310. https://doi.org/10.1021/ja037088b.

[172] S.H. Bhang, N. Won, T.-J. Lee, H. Jin, J. Nam, J. Park, H. Chung, H.-S. Park, Y.-E. Sung, S.K. Hahn, B.-S. Kim, S. Kim, Hyaluronic Acid−Quantum Dot Conjugates for In Vivo Lymphatic Vessel Imaging, ACS Nano 3 (2009) 1389–1398. https://doi.org/10.1021/nn900138d.

[173] E.R. Goldman, E.D. Balighian, H. Mattoussi, M.K. Kuno, J.M. Mauro, P.T. Tran, G.P. Anderson, Avidin: A Natural Bridge for Quantum Dot-Antibody Conjugates, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 6378–6382. https://doi.org/10.1021/ja0125570.

[174] W.-H. Kong, Y. Li, M.-W. Peng, D.-G. Kong, X.-B. Yang, L. Wang, M.-Q. Liu, SARS-CoV-2 detection in patients with influenza-like illness, Nat. Microbiol. 5 (2020) 675–678. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0713-1.

[175] M. Gavriatopoulou, E. Korompoki, D. Fotiou, I. Ntanasis-Stathopoulos, T. Psaltopoulou, E. Kastritis, E. Terpos, M.A. Dimopoulos, Organ-specific manifestations of COVID-19 infection, Clin. Exp. Med. 20 (2020) 493–506. https://doi.org/10.1007/s10238-020-00648-x.

[176] Z. Zhou, Y. Zhu, M. Chu, Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants, Front. Immunol. 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.898192.

[177] Y. Huang, C. Yang, X. Xu, W. Xu, S. Liu, Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19, Acta Pharmacol. Sin. 41 (2020) 1141–1149. https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4.

[178] A. Grifoni, J. Sidney, Y. Zhang, R.H. Scheuermann, B. Peters, A. Sette, A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2, Cell Host Microbe 27 (2020) 671–680. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002.

[179] Y. Peng, N. Du, Y. Lei, S. Dorje, J. Qi, T. Luo, G.F. Gao, H. Song, Structures of the SARS\&\#x2010;CoV\&\#x2010;2 nucleocapsid and their perspectives for drug design, EMBO J. 39 (2020) e105938. https://doi.org/10.15252/embj.2020105938.

[180] W. Wu, Y. Cheng, H. Zhou, C. Sun, S. Zhang, 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, Virol. J. 20 (2023) 6. https://doi.org/10.1186/s12985-023-01968-6.

[181] W. Yan, Y. Zheng, X. Zeng, B. He, W. Cheng, Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies, Signal Transduct. Target. Ther. 7 (2022) 26. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00884-5.

[182] Y. Cong, M. Ulasli, H. Schepers, M. Mauthe, P. V'kovski, F. Kriegenburg, V. Thiel, C.A.M. de Haan, F. Reggiori, Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle, J. Virol. 94 (2020). https://doi.org/10.1128/jvi.01925-19.

[183] M. Okada, Y. Takemoto, Y. Okuno, S. Hashimoto, S. Yoshida, Y. Fukunaga, T. Tanaka, Y. Kita, S. Kuwayama, Y. Muraki, N. Kanamaru, H. Takai, C. Okada, Y. Sakaguchi, I. Furukawa, K. Yamada, M. Matsumoto, T. Kase, D.E. DeMello, J.S.M. Peiris, P.-J. Chen, N. Yamamoto, Y. Yoshinaka, T. Nomura, I. Ishida, S.

Morikawa, M. Tashiro, M. Sakatani, The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice, Vaccine 23 (2005) 2269–2272. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.036.

[184] S. Kang, M. Yang, Z. Hong, L. Zhang, Z. Huang, X. Chen, S. He, Z. Zhou, Z. Zhou, Q. Chen, Y. Yan, C. Zhang, H. Shan, S. Chen, Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites, Acta Pharm. Sin. B 10 (2020) 1228–1238. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.009.

[185] A. Sheikh, A. Al-Taher, M. Al-Nazawi, A.I. Al-Mubarak, M. Kandeel, Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design, J. Virol. Methods 277 (2020) 113806. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113806.

[186] P.S. Pandey, S.K. Raghuwanshi, A. Shadab, M.T.I. Ansari, U.K. Tiwari, S. Kumar, SPR Based Biosensing Chip for COVID-19 Diagnosis—A Review, IEEE Sens. J. 22 (2022) 13800–13810. https://doi.org/10.1109/JSEN.2022.3181423.

[187] O. Calvo-Lozano, M. Sierra, M. Soler, M.C. Estévez, L. Chiscano-Camón, A. Ruiz-Sanmartin, J.C. Ruiz-Rodriguez, R. Ferrer, J.J. González-López, J. Esperalba, C. Fernández-Naval, L. Bueno, R. López-Aladid, A. Torres, L. Fernández-Barat, S. Attoumani, R. Charrel, B. Coutard, L.M. Lechuga, Label-Free Plasmonic Biosensor for Rapid, Quantitative, and Highly Sensitive COVID-19 Serology: Implementation and Clinical Validation, Anal. Chem. 94 (2022) 975–984. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03850.

[188] M.S. Diamond, T.-D. Kanneganti, Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2, Nat. Immunol. 23 (2022) 165–176. https://doi.org/10.1038/s41590-021-01091-0.

[189] F.W.S. Fendi, W.M. Mukhtar, M. Abdullah, Surface plasmon resonance sensor for Covid-19 detection: A review on plasmonic materials, Sens. Actuators A Phys. 362 (2023) 114617. https://doi.org/10.1016/j.sna.2023.114617.

[190] Y. Orooji, H. Sohrabi, N. Hemmat, F. Oroojalian, B. Baradaran, A. Mokhtarzadeh, M. Mohaghegh, H. Karimi-Maleh, An Overview on SARS-CoV-2 (COVID-19) and Other Human Coronaviruses and Their Detection Capability via Amplification Assay, Chemical Sensing, Biosensing, Immunosensing, and Clinical Assays, Nanomicro Lett. 13 (2020) 18. https://doi.org/10.1007/s40820-020-00533-y.

[191] S. Ahmed, N. Jianan, P. Dapeng, C. Ting, A. Ijaz, A. Aashaq, L. Zhixin, A. bakr S. Muhammad, C. Guyue, Z. and Yuan, Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review, Food Agric. Immunol. 31 (2020) 268–290. https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707171.

[192] D.S. Rocha, T.A. Baldo, H.A. Silva-Neto, G.F. Duarte-Junior, G.S. Bazílio, C.L. Borges, J.A. Parente-Rocha, W.R. de Araujo, A. de Siervo, T.R.L.C. Paixão, W.K.T. Coltro, Disposable and eco-friendly electrochemical immunosensor for rapid detection of SARS-CoV-2, Talanta 268 (2024) 125337. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125337.

[193] W.R. de Araujo, H. Lukas, M.D.T. Torres, W. Gao, C. de la Fuente-Nunez, Low-Cost Biosensor Technologies for Rapid Detection of COVID-19 and Future Pandemics, ACS Nano 18 (2024) 1757–1777. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c01629.

[194] Y. Liu, Y. Li, Y. Hang, L. Wang, J. Wang, N. Bao, Y. Kim, H.W. Jang, Rapid assays of SARS-CoV-2 virus and noble biosensors by nanomaterials, Nano Converg. 11 (2024) 2. https://doi.org/10.1186/s40580-023-00408-z.

[195] G. Seo, G. Lee, M.J. Kim, S.-H. Baek, M. Choi, K.B. Ku, C.-S. Lee, S. Jun, D. Park, H.G. Kim, S.-J. Kim, J.-O. Lee, B.T. Kim, E.C. Park, S. Il Kim, Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor, ACS Nano 14 (2020) 5135–5142. https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02823.

[196] J. Cheong, H. Yu, C.Y. Lee, J. Lee, H.-J. Choi, J.-H. Lee, H. Lee, J. Cheon, Fast detection of SARS-CoV-2 RNA via the integration of plasmonic thermocycling and fluorescence detection in a portable device, Nat. Biomed. Eng. 4 (2020) 1159–1167. https://doi.org/10.1038/s41551-020-00654-0.

[197] A.K. Kaushik, J.S. Dhau, H. Gohel, Y.K. Mishra, B. Kateb, N.-Y. Kim, D.Y. Goswami, Electrochemical SARS-CoV-2 Sensing at Point-of-Care and Artificial Intelligence for Intelligent COVID-19 Management, ACS Appl. Bio Mater. 3 (2020) 7306–7325. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01004.

[198] A. Yakoh, U. Pimpitak, S. Rengpipat, N. Hirankarn, O. Chailapakul, S. Chaiyo, Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen, Biosens. Bioelectron. 176 (2021) 112912. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912.

[199] A. Panahi, A. Hassanzadeh, A. Moulavi, Design of a low cost, double triangle, piezoelectric sensor for respiratory monitoring applications, Sens. Biosensing Res. 30 (2020) 100378. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100378.

[200] Y. Zhou, L. Zhang, Y.-H. Xie, J. Wu, Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics, Laboratory Investigation 102 (2022) 4–13. https://doi.org/10.1038/s41374-021-00663-w.

[201] G. Apolone, E. Montomoli, A. Manenti, M. Boeri, F. Sabia, I. Hyseni, L. Mazzini, D. Martinuzzi, L. Cantone, G. Milanese, S. Sestini, P. Suatoni, A. Marchianò, V. Bollati, G. Sozzi, U. Pastorino, Unexpected detection of SARS-CoV-2 antibodies in the prepandemic period in Italy, Tumori Journal 107 (2021) 446–451. https://doi.org/10.1177/0300891620974755.

[202] M. Qiu, Y. Shi, Z. Guo, Z. Chen, R. He, R. Chen, D. Zhou, E. Dai, X. Wang, B. Si, Y. Song, J. Li, L. Yang, J. Wang, H. Wang, X. Pang, J. Zhai, Z. Du, Y. Liu, Y. Zhang, L. Li, J. Wang, B. Sun, R. Yang, Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities, Microbes Infect. 7 (2005) 882–889. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.02.006.

[203] L. Porte, P. Legarraga, V. Vollrath, X. Aguilera, J.M. Munita, R. Araos, G. Pizarro, P. Vial, M. Iruretagoyena, S. Dittrich, T. Weitzel, Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples, International Journal of Infectious Diseases 99 (2020) 328–333. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.098.

[204] B. Diao, K. Wen, J. Zhang, J. Chen, C. Han, Y. Chen, S. Wang, G. Deng, H. Zhou, Y. Wu, Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection, Clinical Microbiology and Infection 27 (2021) 289. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.057.

[205] C. Ihling, D. Tänzler, S. Hagemann, A. Kehlen, S. Hüttelmaier, C. Arlt, A. Sinz, Mass Spectrometric Identification of SARS-CoV-2 Proteins from Gargle Solution Samples of COVID-19 Patients, J. Proteome Res. 19 (2020) 4389–4392. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00280.

[206] Y.-J. Tan, P.-Y. Goh, B.C. Fielding, S. Shen, C.-F. Chou, J.-L. Fu, H.N. Leong, Y.S. Leo, E.E. Ooi, A.E. Ling, S.G. Lim, W. Hong, Profiles of Antibody Responses against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Recombinant Proteins and Their Potential Use

as Diagnostic Markers, Clinical and Vaccine Immunology 11 (2004) 362–371. https://doi.org/10.1128/CDLI.11.2.362-371.2004.

[207] Y. Kyosei, M. Namba, S. Yamura, R. Takeuchi, N. Aoki, K. Nakaishi, S. Watabe, E. Ito, Proposal of De Novo Antigen Test for COVID-19: Ultrasensitive Detection of Spike Proteins of SARS-CoV-2, Diagnostics 10 (2020). https://doi.org/10.3390/diagnostics10080594.

[208] B.D. Grant, C.E. Anderson, J.R. Williford, L.F. Alonzo, V.A. Glukhova, D.S. Boyle, B.H. Weigl, K.P. Nichols, SARS-CoV-2 Coronavirus Nucleocapsid Antigen-Detecting Half-Strip Lateral Flow Assay Toward the Development of Point of Care Tests Using Commercially Available Reagents, Anal. Chem. 92 (2020) 11305–11309. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01975.

[209] D. Liu, C. Ju, C. Han, R. Shi, X. Chen, D. Duan, J. Yan, X. Yan, Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen, Biosens. Bioelectron. 173 (2021) 112817. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112817.

[210] H.-Y. Li, W.-N. Jia, X.-Y. Li, L. Zhang, C. Liu, J. Wu, Advances in detection of infectious agents by aptamer-based technologies, Emerg. Microbes Infect. 9 (2020) 1671–1681. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1792352.

[211] S.-J. Cho, H.-M. Woo, K.-S. Kim, J.-W. Oh, Y.-J. Jeong, Novel system for detecting SARS coronavirus nucleocapsid protein using an ssDNA aptamer, J. Biosci. Bioeng. 112 (2011) 535–540. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.08.014.

[212] L. Zhang, X. Fang, X. Liu, H. Ou, H. Zhang, J. Wang, Q. Li, H. Cheng, W. Zhang, Z. Luo, Discovery of sandwich type COVID-19 nucleocapsid protein DNA aptamers, Chemical Communications 56 (2020) 10235–10238. https://doi.org/10.1039/D0CC03993D.

[213] G.C.K. Mak, S.S.Y. Lau, K.K.Y. Wong, N.L.S. Chow, C.S. Lau, E.T.K. Lam, R.C.W. Chan, D.N.C. Tsang, Evaluation of rapid antigen detection kit from the WHO Emergency Use List for detecting SARS-CoV-2, Journal of Clinical Virology 134 (2021) 104712. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104712.

[214] G.C.K. Mak, S.S.Y. Lau, K.K.Y. Wong, N.L.S. Chow, C.S. Lau, E.T.K. Lam, R.C.W. Chan, D.N.C. Tsang, Analytical sensitivity and clinical sensitivity of the three rapid antigen detection kits for detection of SARS-CoV-2 virus, Journal of Clinical Virology 133 (2020) 104684. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104684.

[215] H.-Y. Li, F.-F. Yin, X.-Y. Li, W.-N. Jia, J. Ding, L. Zhang, Z.-H. Wang, Q.-Q. Hu, J.-L. Zuo, H.-L. Jia, L.-H. Wang, C.-H. Fan, H.-Z. Gu, J. Wu, Novel aptasensor-based assay of sonic hedgehog ligand for detection of portal vein invasion of hepatocellular carcinoma, Biosens. Bioelectron. 174 (2021) 112738. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112738.

[216] G.C.K. Mak, P.K.C. Cheng, S.S.Y. Lau, K.K.Y. Wong, C.S. Lau, E.T.K. Lam, R.C.W. Chan, D.N.C. Tsang, Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus, Journal of Clinical Virology 129 (2020) 104500. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104500.

[217] A. Scohy, A. Anantharajah, M. Bodéus, B. Kabamba-Mukadi, A. Verroken, H. Rodriguez-Villalobos, Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis, Journal of Clinical Virology 129 (2020) 104455. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104455.

[218] V.M. Corman, O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D.K.W. Chu, T. Bleicker, S. Brünink, J. Schneider, M.L. Schmidt, Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, Eurosurveillance 25 (2020) 2000045. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

[219] A. Tahamtan, A. Ardebili, Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results, Expert Rev. Mol. Diagn. 20 (2020) 453–454. https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437.

[220] G.J.D.J.S.K.B.J.S.G.H.D.M.Y.W.P.W.D.B.H.B.B.S.P.K.S.Y.D.C.C.J. D.S.E.D.H.L.L.M.M.G.M.M.D.F.S.R.S. Fox T, J.J. Deeks, Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2, Cochrane Database of Systematic Reviews (2022). https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652.pub2.

[221] F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Z.-G. Song, Y. Hu, Z.-W. Tao, J.-H. Tian, Y.-Y. Pei, M.-L. Yuan, Y.-L. Zhang, F.-H. Dai, Y. Liu, Q.-M. Wang, J.-J. Zheng, L. Xu, E.C. Holmes, Y.-Z. Zhang, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, Nature 579 (2020) 265–269. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3.

[222] C.M. Das, Y. Guo, L. Kang, H. Ho, K.-T. Yong, Investigation of Plasmonic Detection of Human Respiratory Virus, Adv. Theory Simul. 3 (2020) 2000074. https://doi.org/10.1002/adts.202000074.

[223] A. Krüttgen, C.G. Cornelissen, M. Dreher, M.W. Hornef, M. Imöhl, M. Kleines, Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the

real star Sars-CoV-2 RT PCR kit, J. Virol. Methods 288 (2021) 114024. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114024.

[224] S. Villaverde, S. Domínguez-Rodríguez, G. Sabrido, C. Pérez-Jorge, M. Plata, M.P. Romero, C.D. Grasa, A.B. Jiménez, E. Heras, A. Broncano, M. del Mar Núñez, M. Illán, P. Merino, B. Soto, D. Molina-Arana, A. Bermejo, P. Mendoza, M. Gijón, B. Pérez-Moneo, C. Moraleda, A. Tagarro, C. Calvo, M.J. Mellado, P. Rodríguez-Molino, T. del Rosal, M. Santos, M. Navarro, E. Rincón, B. Santiago, J. Saavedra-Lozano, D. Aguilera-Alonso, C. Epalza, D. Blázquez-Gamero, S. Villanueva, P. Rojo, G. Calleja, J.A. Alonso, M. de la Torre, F.J. Sanz-Santaeufemia, M.I. Iglesias, B. Herrero, M. Alonso, T. Soriano-Arandes, J.M. Pujol, S. Melendo, P. Soler-Palacin, S. Simó, V. Fumadó, M. Lanaspa, M. Urretavizcaya, M. Herranz, M. Pareja, F. Ara, S. Cabañas, R. del Valle, A. Barrios, E. Otheo, J.L. Vázquez, L. Falcón, O. Neth, P. Olbrich, W. Goicoechea, L. Martín, L. Figueroa, M. Llorente, M. Penin, C. García, M. García, T. Alvaredo, M.I. Olmedo, A. López, E. Cobo, M. Tovizi, P. Galán, S. Guillén, A. Navas, M.L. García, S. Pérez, M.J. Hernández, A. Berzosa, N. Gallego, A. López, B. Ruiz, S. Alfayate, A. Menasalvas, E. Cervantes, M. Méndez, Á. Hurtado, Y. Ruiz, C. García, I. Amich, M. Oltra, Á. Villaroya, A. Ocaña, I. Romero, M.F. Guzmán, M.J. Pascual, M. Sánchez-Códez, E. Montesinos, J. Jensen, M. Rodríguez, G. Caro, N. Rius, A. Gómez, R. Bretón, M. Rodríguez, J. Romero, A. Campos, M. García, R.M. Velasco, Z. Lobato, F. Centeno, E. Pérez, P. Vidal, C. Rey, A. Vivanco, M. Alonso, P. Alcalá, J.G. de Dios, E. Solé, L. Minguell, I. Astigarraga, M.Á. Vázquez, M. Sánchez, E. Díaz, E. Consuegra, M. Cabanillas, L. Peña, E. Garrote, M. Goicoechea, I. Centelles, S. Lapeña, S. Gutiérrez, S. Gutiérrez, A. Cavalle, J.M. Olmos, A. Cobo, S. Díaz, B. Jiménez, R. González, M. Lafuente, M. Bustillo, N. Pons, J. Morata, E. Segura, Diagnostic Accuracy of the Panbio Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antigen Rapid Test Compared with Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction Testing of Nasopharyngeal Samples in the Pediatric Population, J. Pediatr. 232 (2021) 287-289.e4. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.01.027.

[225] S.A. Lim, T.H. Lim, A.N. Ahmad, The Applications of Biosensing and Artificial Intelligence Technologies for Rapid Detection and Diagnosis of COVID-19 in Remote Setting, in: P. Chandra, S. Roy (Eds.), Diagnostic Strategies for COVID-19 and Other Coronaviruses,

Springer Singapore, Singapore, 2020: pp. 109–134. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6006-4_6.
[226] R.T. Hill, Plasmonic biosensors, WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology 7 (2015) 152–168. https://doi.org/10.1002/wnan.1314.
[227] D.T. Nurrohman, Y.-H. Wang, N.-F. Chiu, Exploring Graphene and MoS2 Chips Based Surface Plasmon Resonance Biosensors for Diagnostic Applications, Front. Chem. 8 (2020). https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00728.
[228] B.D. Gupta, R.K. Verma, Surface Plasmon Resonance-Based Fiber Optic Sensors: Principle, Probe Designs, and Some Applications, J. Sens. 2009 (2009) 979761. https://doi.org/10.1155/2009/979761.
[229] A. Asghari, C. Wang, K.M. Yoo, A. Rostamian, X. Xu, J.-D. Shin, H. Dalir, R.T. Chen, Fast, accurate, point-of-care COVID-19 pandemic diagnosis enabled through advanced lab-on-chip optical biosensors: Opportunities and challenges, Appl. Phys. Rev. 8 (2021) 31313. https://doi.org/10.1063/5.0022211.
[230] P.T. Arasu, Y. Al-Qazwini, B.I. Onn, A.S.M. Noor, Fiber Bragg grating based surface plasmon resonance sensor utilizing FDTD for alcohol detection applications, in: 2012 IEEE 3rd International Conference on Photonics, 2012: pp. 93–97. https://doi.org/10.1109/ICP.2012.6379852.
[231] W. Kei, K. Yu, H. Tatsurou, N. Hidetaka, Recent progress in optical waveguide technologies enabling integration of high-density compact photonics, NTT Technical Review 15 (2017) 11–16. https://doi.org/10.53829/ntr201701fa2.
[232] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Giniunaite, A. Popov, A. Ramanaviciene, Gold nanoparticle-assisted SPR immunosensor for quantification of SARS-CoV-2 anti-RBD antibodies, Sens. Actuators B Chem. 432 (2025) 137465. https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.137465.
[233] M. Jiang, T. Dong, C. Han, L. Liu, T. Zhang, Q. Kang, P. Wang, F. Zhou, Regenerable and high-throughput surface plasmon resonance assay for rapid screening of anti-SARS-CoV-2 antibody in serum samples, Anal. Chim. Acta 1208 (2022) 339830. https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339830.
[234] M.M. Gomari, M. Farsimadan, N. Rostami, Z. Mahmoudi, M. Fadaie, I. Farhani, P. Tarighi, CD44 polymorphisms and its variants, as an inconsistent marker in cancer investigations, Mutation

Research/Reviews in Mutation Research 787 (2021) 108374. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108374.

[235] S. Liu, Z. Liu, A. Shang, J. Xun, Z. Lv, S. Zhou, C. Liu, Q. Zhang, Y. Yang, CD44 is a potential immunotherapeutic target and affects macrophage infiltration leading to poor prognosis, Sci. Rep. 13 (2023) 9657. https://doi.org/10.1038/s41598-023-33915-4.

[236] R.C. Gupta, R. Lall, A. Srivastava, A. Sinha, Hyaluronic acid: Molecular mechanisms and therapeutic trajectory. Front Vet Sci. 2019; 6: 192, (2019). https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00192.

[237] S. Chen, M. Zhang, J. Li, J. Huang, S. Zhou, X. Hou, H. Ye, X. Liu, S. Xiang, W. Shen, J. Miao, F.F. Hou, Y. Liu, L. Zhou, β-catenin-controlled tubular cell-derived exosomes play a key role in fibroblast activation via the OPN-CD44 axis, J. Extracell. Vesicles 11 (2022) e12203. https://doi.org/10.1002/jev2.12203.

[238] Q. Chu, H. Huang, T. Huang, L. Cao, L. Peng, S. Shi, L. Zheng, L. Xu, S. Zhang, J. Huang, X. Li, C. Qian, B. Huang, Extracellular serglycin upregulates the CD44 receptor in an autocrine manner to maintain self-renewal in nasopharyngeal carcinoma cells by reciprocally activating the MAPK/β-catenin axis, Cell Death Dis. 7 (2016) e2456–e2456. https://doi.org/10.1038/cddis.2016.287.

[239] G.-S. Chaudhry, A. Akim, M. Naveed Zafar, N. Safdar, Y.Y. Sung, T.S.T. Muhammad, Understanding Hyaluronan Receptor (CD44) Interaction, HA-CD44 Activated Potential Targets in Cancer Therapeutics, Adv Pharm Bull 11 (n.d.) 426–438. https://doi.org/10.34172/apb.2021.050.

[240] C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, J.W. Freeman, The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications, J. Hematol. Oncol. 11 (2018) 64. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5.

[241] C. Yang, Y. Sheng, X. Shi, Y. Liu, Y. He, Y. Du, G. Zhang, F. Gao, CD44/HA signaling mediates acquired resistance to a PI3Kα inhibitor, Cell Death Dis. 11 (2020) 831. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03037-0.

[242] D.B. Farahani, H. Akrami, B. Moradi, K. Mehdizadeh, M.R. Fattahi, The Effect of hsa-miR-451b Knockdown on Biological Functions of Gastric Cancer Stem-Like Cells, Biochem. Genet. 59 (2021) 1203–1224. https://doi.org/10.1007/s10528-021-10057-8.

[243] L. Li, X. Hao, J. Qin, W. Tang, F. He, A. Smith, M. Zhang, D.M. Simeone, X.T. Qiao, Z.-N. Chen, T.S. Lawrence, L. Xu, Antibody Against CD44s Inhibits Pancreatic Tumor Initiation and Postradiation

Recurrence in Mice, Gastroenterology 146 (2014) 1108-1118.e12. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.035.

[244] R.L. Brown, L.M. Reinke, M.S. Damerow, D. Perez, L.A. Chodosh, J. Yang, C. Cheng, CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression, J. Clin. Invest. 121 (2011) 1064–1074. https://doi.org/10.1172/JCI44540.

[245] M. Todaro, M. Gaggianesi, V. Catalano, A. Benfante, F. Iovino, M. Biffoni, T. Apuzzo, I. Sperduti, S. Volpe, G. Cocorullo, G. Gulotta, F. Dieli, R. De Maria, G. Stassi, CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis, Cell Stem Cell 14 (2014) 342–356. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.009.

[246] S.J. Wang, V.B. Wreesmann, L.Y.W. Bourguignon, Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer, Head Neck 29 (2007) 550–558. https://doi.org/10.1002/hed.20544.

[247] H. Ji, L. Kong, Y. Wang, Z. Hou, W. Kong, J. Qi, Y. Jin, CD44 expression is correlated with osteosarcoma cell progression and immune infiltration and affects the Wnt/β-catenin signaling pathway, J. Bone Oncol. 41 (2023) 100487. https://doi.org/10.1016/j.jbo.2023.100487.

[248] C. Kolliopoulos, C.-Y. Lin, C.-H. Heldin, A. Moustakas, P. Heldin, Has2 natural antisense RNA and Hmga2 promote Has2 expression during TGFβ-induced EMT in breast cancer, Matrix Biology 80 (2019) 29–45. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.09.002.

[249] M.M.R.R.S.R. Salma M S Ahmad Hanan Nazar, A. Ouhtit, ITGB1BP1, a Novel Transcriptional Target of CD44-Downstream Signaling Promoting Cancer Cell Invasion, Breast Cancer: Targets and Therapy 15 (2023) 373–380. https://doi.org/10.2147/BCTT.S404565.

[250] D. Li, X. Wang, K. Han, Y. Sun, T. Ren, G. Sun, N. Zhang, L. Zhao, R. Zhong, Hypoxia and CD44 receptors dual-targeted nano-micelles with AGT-inhibitory activity for the targeting delivery of carmustine, Int. J. Biol. Macromol. 246 (2023) 125657. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125657.

[251] T.J. Loh, H. Moon, S. Cho, H. Jang, Y.C. Liu, H. Tai, D.-W. Jung, D.R. Williams, H.-R. Kim, M.-G. Shin, CD44 alternative splicing and hnRNP A1 expression are associated with the metastasis of breast

cancer, Oncol. Rep. 34 (2015) 1231–1238. https://doi.org/10.3892/or.2015.4110.

[252] H. Imam, B. Eriksson, K. Öberg, Expression of CD44 variant isoforms and association to the benign form of endocrine pancreatic tumours, Annals of Oncology 11 (2000) 295–300. https://doi.org/10.1023/A:1008333812548.

[253] M.N. Mishra, V. Chandavarkar, R. Sharma, D. Bhargava, Structure, function and role of CD44 in neoplasia, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology 23 (2019). https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_246_18.

[254] C. Tölg, M. Hofmann, P. Herrlich, H. Ponta, Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability, Nucleic Acids Res. 21 (1993) 1225–1229. https://doi.org/10.1093/nar/21.5.1225.

[255] G.R. Screaton, M. V Bell, D.G. Jackson, F.B. Cornelis, U. Gerth, J.I. Bell, Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons., Proceedings of the National Academy of Sciences 89 (1992) 12160–12164. https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12160.

[256] M. Hassn Mesrati, S.E. Syafruddin, M.A. Mohtar, A. Syahir, CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression, Biomolecules 11 (2021). https://doi.org/10.3390/biom11121850.

[257] K.-L. Chen, D. Li, T.-X. Lu, S.-W. Chang, Structural Characterization of the CD44 Stem Region for Standard and Cancer-Associated Isoforms, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020). https://doi.org/10.3390/ijms21010336.

[258] S. Misra, V.C. Hascall, R.R. Markwald, S. Ghatak, Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer, Front. Immunol. 6 (2015). https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201.

[259] X. Liu, R. Taftaf, M. Kawaguchi, Y.-F. Chang, W. Chen, D. Entenberg, Y. Zhang, L. Gerratana, S. Huang, D.B. Patel, E. Tsui, V. Adorno-Cruz, S.M. Chirieleison, Y. Cao, A.S. Harney, S. Patel, A. Patsialou, Y. Shen, S. Avril, H.L. Gilmore, J.D. Lathia, D.W. Abbott, M. Cristofanilli, J.S. Condeelis, H. Liu, Homophilic CD44 Interactions Mediate Tumor Cell Aggregation and Polyclonal Metastasis in Patient-Derived Breast Cancer Models, Cancer Discov. 9 (2019) 96–113. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0065.

[260] K.J. Wolf, P. Shukla, K. Springer, S. Lee, J.D. Coombes, C.J. Choy, S.J. Kenny, K. Xu, S. Kumar, A mode of cell adhesion and migration

facilitated by CD44-dependent microtentacles, Proceedings of the National Academy of Sciences 117 (2020) 11432–11443. https://doi.org/10.1073/pnas.1914294117.

[261] M. Hassn Mesrati, A.B. Behrooz, A. Y. Abuhamad, A. Syahir, Understanding Glioblastoma Biomarkers: Knocking a Mountain with a Hammer, Cells 9 (2020). https://doi.org/10.3390/cells9051236.

[262] N. Ludwig, M.J. Szczepanski, A. Gluszko, T. Szafarowski, J.H. Azambuja, L. Dolg, N.-C. Gellrich, A. Kampmann, T.L. Whiteside, R.M. Zimmerer, CD44(+) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma, Cancer Lett. 467 (2019) 85–95. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.010.

[263] A. Gzil, I. Zarębska, W. Bursiewicz, P. Antosik, D. Grzanka, Ł. Szylberg, Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications, Mol. Biol. Rep. 46 (2019) 6629–6645. https://doi.org/10.1007/s11033-019-05058-1.

[264] L. Durko, W. Wlodarski, O. Stasikowska-Kanicka, M. Wagrowska-Danilewicz, M. Danilewicz, P. Hogendorf, J. Strzelczyk, E. Malecka-Panas, Expression and Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers CD24, CD44, and CD133 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis, Dis. Markers 2017 (2017) 3276806. https://doi.org/10.1155/2017/3276806.

[265] W. Li, L. Qian, J. Lin, G. Huang, N. Hao, X. Wei, W. Wang, J. Liang, CD44 regulates prostate cancer proliferation, invasion and migration via PDK1 and PFKFB4, Oncotarget 8 (2017) 65143. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17821.

[266] Z. Wang, Y. Tang, L. Xie, A. Huang, C. Xue, Z. Gu, K. Wang, S. Zong, The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis, Front. Oncol. 9 (2019). https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00309.

[267] A.G. Lasheen, E.A.B. Elkhouly, H.A. Aiad, N.Y. Asaad, N.S. Holah, Evaluation of the Role of ALDH1 as Cancer Stem Cell Marker in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical Study, Menoufia Medical Journal 30 (2017) 174–183. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22671.9291.

[268] P. Ruiz, C. Schwärzler, U. Günthert, CD44 isoforms during differentiation and development, BioEssays 17 (1995) 17–24. https://doi.org/10.1002/bies.950170106.

[269] Q. Yu, I. Stamenkovic, Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor

invasion, Genes Dev. 13 (1999) 35–48. https://doi.org/10.1101/gad.13.1.35.

[270] N. Fujita, N. Yaegashi, Y. Ide, S. Sato, M. Nakamura, I. Ishiwata, A. Yajima, Expression of CD44 in Normal Human versus Tumor Endometrial Tissues: Possible Implication of Reduced Expression of CD44 in Lymph-Vascular Space Involvement of Cancer Cells1, Cancer Res. 54 (1994) 3922–3928.

[271] Y.Y.J.C.X.C.F.R.Z.R.G.C. Yuting He Chen Xue, R. Sun, CD44 is overexpressed and correlated with tumor progression in gallbladder cancer, Cancer Manag. Res. 10 (2018) 3857–3865. https://doi.org/10.2147/CMAR.S175681.

[272] M. Nishino, M. Ozaki, A.E. Hegab, J. Hamamoto, S. Kagawa, D. Arai, H. Yasuda, K. Naoki, K. Soejima, H. Saya, Variant CD44 expression is enriching for a cell population with cancer stem cell-like characteristics in human lung adenocarcinoma, J. Cancer 8 (2017) 1774. https://doi.org/10.7150/jca.19732.

[273] H. Xu, M. Niu, X. Yuan, K. Wu, A. Liu, CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target, Exp. Hematol. Oncol. 9 (2020) 36. https://doi.org/10.1186/s40164-020-00192-0.

[274] Y. Kudo, H. Suzuki, T. Tanaka, M.K. Kaneko, Y. Kato, Development of a Novel Anti-CD44 Variant 5 Monoclonal Antibody C44Mab-3 for Multiple Applications against Pancreatic Carcinomas, Antibodies 12 (2023). https://doi.org/10.3390/antib12020031.

[275] Z.U. Paltusheva, Z. Ashikbayeva, D. Tosi, L. V Gritsenko, Highly sensitive zinc oxide fiber-optic biosensor for the detection of CD44 protein, Biosensors (Basel). 12 (2022) 1015. https://doi.org/10.3390/bios12111015.

[276] N. Kumar, M.A. Sadique, R. Khan, V.S. Gowri, S. Kumar, M. Ashiq, S. Natarajan, Immunosensor for breast cancer CD44 biomarker detection based on exfoliated graphene quantum dots integrated gold nanoparticles, Hybrid Advances 3 (2023) 100065. https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2023.100065.

[277] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Popov, A. Ramanaviciene, Surface Plasmon Resonance Immunosensor with Antibody-Functionalized Magnetoplasmonic Nanoparticles for Ultrasensitive Quantification of the CD5 Biomarker, ACS Appl. Mater. Interfaces 14 (2022) 20720–20728. https://doi.org/10.1021/acsami.2c02936.

[278] D.G. Myszka, M.D. Jonsen, B.J. Graves, Equilibrium Analysis of High Affinity Interactions Using BIACORE, Anal. Biochem. 265 (1998) 326–330. https://doi.org/10.1006/abio.1998.2937.

[279] A.C. Boudreau, M. Milovanovic, K.L. Conrad, C. Nelson, C.R. Ferrario, M.E. Wolf, A protein cross-linking assay for measuring cell surface expression of glutamate receptor subunits in the rodent brain after in vivo treatments, Curr. Protoc. Neurosci. 59 (2012) 5–30. https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0530s59.

[280] A. Foubert, N. V Beloglazova, A. Rajkovic, B. Sas, A. Madder, I.Yu. Goryacheva, S. De Saeger, Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application, TrAC Trends in Analytical Chemistry 83 (2016) 31–48. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.008.

[281] K. Andersson, M. Hämäläinen, M. Malmqvist, Identification and Optimization of Regeneration Conditions for Affinity-Based Biosensor Assays. A Multivariate Cocktail Approach, Anal. Chem. 71 (1999) 2475–2481. https://doi.org/10.1021/ac981271j.

[282] I. Moscetti, S. Cannistraro, A.R. Bizzarri, Surface Plasmon Resonance Sensing of Biorecognition Interactions within the Tumor Suppressor p53 Network, Sensors 17 (2017). https://doi.org/10.3390/s17112680.

[283] M. Malmqvist, Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics, Curr. Opin. Immunol. 5 (1993) 282–286. https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90019-O.

[284] I. Plikusiene, V. Maciulis, S. Juciute, A. Ramanavicius, Z. Balevicius, R. Slibinskas, I. Kucinskaite-Kodze, M. Simanavicius, S. Balevicius, A. Ramanaviciene, Investigation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein interaction with a specific antibody by combined spectroscopic ellipsometry and quartz crystal microbalance with dissipation, J. Colloid Interface Sci. 626 (2022) 113–122. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.06.119.

[285] H. Maadi, B. Nami, Z. Wang, Dimerization Assessment of Epithelial Growth Factor Family of Receptor Tyrosine Kinases by Using Cross-Linking Reagent, in: Z. Wang (Ed.), ErbB Receptor Signaling: Methods and Protocols, Springer New York, New York, NY, 2017: pp. 101–108. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_6.

[286] B.R. Liu, Y.-W. Huang, H.-J. Chiang, H.-J. Lee, Cell-penetrating peptide-functionized quantum dots for intracellular delivery, J. Nanosci. Nanotechnol. 10 (2010) 7897–7905. https://doi.org/10.1166/jnn.2010.3012.

[287] P. Zrazhevskiy, L.D. True, X. Gao, Multicolor multicycle molecular profiling with quantum dots for single-cell analysis, Nat. Protoc. 8 (2013) 1852–1869. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.112.

[288] A.A. Yakovlev, Crosslinkers and their utilization for studies of intermolecular interactions, Neurochemical Journal 3 (2009) 139–144. https://doi.org/10.1134/S181971240902010X.

[289] G. Ruiz, K. Tripathi, S. Okyem, J.D. Driskell, pH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles, Bioconjug. Chem. 30 (2019) 1182–1191. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00123.

[290] V.R. Sarma, E.W. Silverton, D.R. Davies, W.D. Terry, The Three-Dimensional Structure at 6 A Resolution of a Human γG1 Immunoglobulin Molecule, Journal of Biological Chemistry 246 (1971) 3753–3759. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62192-1.

[291] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibodies against human growth hormone, Analyst 134 (2009) 2051–2057. https://doi.org/10.1039/B907315A.

[292] C.K. Dixit, Surface regeneration of gold-coated chip for highly-reproducible surface plasmon resonance immunoassays, J. Biosens. Bioelectron. 5 (2014) 1. https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000149.

[293] J.A. Goode, J.V.H. Rushworth, P.A. Millner, Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes, Langmuir 31 (2015) 6267–6276. https://doi.org/10.1021/la503533g.

[294] M.J.E. Fischer, Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach, in: N.J. Mol, M.J.E. Fischer (Eds.), Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 2010: pp. 55–73. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2_3.

[295] C. Scheller, F. Krebs, R. Minkner, I. Astner, M. Gil-Moles, H. Wätzig, Physicochemical properties of SARS-CoV-2 for drug targeting, virus inactivation and attenuation, vaccine formulation and quality control, Electrophoresis 41 (2020) 1137–1151. https://doi.org/10.1002/elps.202000121.

[296] R.B.M. Schasfoort, Handbook of surface plasmon resonance, Royal Society of Chemistry, 2017. https://doi.org/10.1039/9781788010283.

[297] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Popov, U. Kalvaityte, E. Bernotiene, A. Mobasheri, A. Ramanaviciene, An ultra-sensitive SPR immunosensor for quantitative determination of human cartilage oligomeric matrix

protein biomarker, Biosens. Bioelectron. 234 (2023) 115370. https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115370.

[298] B. Yang, J. Chen, B. Liu, Y. Ding, Y. Tang, X. Yan, One dimensional graphene nanoscroll-wrapped MnO nanoparticles for high-performance lithium ion hybrid capacitors, J. Mater. Chem. A 9 (2021) 6352–6360. https://doi.org/10.1039/D1TA00404B.

[299] Z. Zahra, Z. Habib, S. Chung, M.A. Badshah, Exposure Route of TiO2 NPs from Industrial Applications to Wastewater Treatment and Their Impacts on the Agro-Environment, Nanomaterials 10 (2020). https://doi.org/10.3390/nano10081469.

[300] A.L. Efros, L.E. Brus, Nanocrystal Quantum Dots: From Discovery to Modern Development, ACS Nano 15 (2021) 6192–6210. https://doi.org/10.1021/acsnano.1c01399.

[301] X. Huang, M. Tang, Research advance on cell imaging and cytotoxicity of different types of quantum Dots, Journal of Applied Toxicology 41 (2021) 342–361. https://doi.org/10.1002/jat.4083.

[302] V.G. Reshma, P. V Mohanan, Quantum dots: Applications and safety consequences, J. Lumin. 205 (2019) 287–298. https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.09.015.

[303] R.G. Aswathy, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1417–1435. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3643-6.

[304] Z. Bai, Y. Cao, W. Liu, J. Li, The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation, Viruses 13 (2021). https://doi.org/10.3390/v13061115.

[305] Y. Cong, M. Ulasli, H. Schepers, M. Mauthe, P. V'kovski, F. Kriegenburg, V. Thiel, C.A.M. de Haan, F. Reggiori, Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle, J. Virol. 94 (2020). https://doi.org/10.1128/jvi.01925-19.

[306] A. Grifoni, J. Sidney, Y. Zhang, R.H. Scheuermann, B. Peters, A. Sette, A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2, Cell Host Microbe 27 (2020) 671–680. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002.

[307] S. Liu, Z. Liu, A. Shang, J. Xun, Z. Lv, S. Zhou, C. Liu, Q. Zhang, Y. Yang, CD44 is a potential immunotherapeutic target and affects

macrophage infiltration leading to poor prognosis, Sci. Rep. 13 (2023) 9657. https://doi.org/10.1038/s41598-023-33915-4.

[308] M.N. Mishra, V. Chandavarkar, R. Sharma, D. Bhargava, Structure, function and role of CD44 in neoplasia, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology 23 (2019). https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_246_18.

[309] K.-L. Chen, D. Li, T.-X. Lu, S.-W. Chang, Structural Characterization of the CD44 Stem Region for Standard and Cancer-Associated Isoforms, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020). https://doi.org/10.3390/ijms21010336.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. A. Popov, **V. Lisyte**, A. Kausaite-Minkstimiene, E. Bernotiene, A. Ramanaviciene, Experimental Evaluation of Quantum Dots and Antibodies Conjugation by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20):12626. DOI: 10.3390/ijms232012626
2. **V. Lisyte**, A. Kausaite-Minkstimiene, B. Brasiunas, A. Popov, A. Ramanaviciene. Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Direct Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25.16: 8574. DOI: 10.3390/ijms25168574

KITOS PUBLIKACIJOS PASKELBTOS DOKTORANTŪROS STUDIJŲ METU

1. I. Uzieliene, A. Popov, **V. Lisyte**, G. Kugaudaite, P. Bialaglovyte, R. Vaiciuleviciute, G. Kvederas, E. Bernotiene, A. Ramanaviciene. Stimulation of chondrocyte and bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenic response by polypyrrole and polypyrrole/gold nanoparticles. **Polymers**, 2023, 15, 2571. DOI: 10.3390/polym15112571
2. B. Brasiunas, A. Popov, **V. Lisyte**, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene. ZnO nanostructures: A promising frontier in immunosensor development. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023, 115848. DOI: 10.1016/j.bios.2023.115848
3. A. Popov., **V. Lisyte**, M. Sapauskiene, M., S. Ramanavicius, S. Zukauskas, N. Slekiene, I. Baginskiy, V. Zahorodna, O. Gogotsi, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene. MXene-Based Electrochemical Glucose Biosensors: Comparative Enhancement with Aquivion and Nafion. *Materials Today Nano*, 2025, 100712. DOI: 10.1016/j.mtnano.2025.100712

PRANEŠIMŲ MOKSLINĖSE KONFERENCIJOSE TEZĖS

1. **V. Lisyte**, E. Bucmys, A. Popov, A. Ramanaviciene, Multicolor colorimetric assay for cyanide detection, Open readings 2022 : 65nd international conference for students of physics and natural sciences, Kovo 15-18, 2022, Vilnius, Lietuva, p. 184.

2. **V. Lisyte**, E. Bucmys, A. Popov, A. Ramanaviciene, Investigation of horseradish peroxidase inhibition based on lateral AuNR etching, Advances in Surfaces, Interfaces and Interphases Conference, Gegužės 15-18, 2022, Live and On-demand.
3. **V. Lisyte**, E. Bucmys, A. Popov, A. Ramanaviciene, Detection of cyanide ions by gold nanorods etching, 24-th International Conference – School ,,Advanced Materials and Technologies", Rugpjūčio 22-26, 2022, Palanga, Lietuva, p. 70.
4. **V. Lisyte**, A. Popov, A. Ramanaviciene, Harnessing the power of gold nanorods: a journey through synthesis and characterization, Open readings 2023 : 66th international conference for students of physics and natural sciences, Balandžio 18-21, 2023, Vilnius, Lietuva: abstract book, p. 222.
5. **V. Lisyte**, A. Popov, Comparative Analysis of Structure, Synthesis, and Properties of Polyaniline and Polypyrrole: Insights into Conductive Polymer Variability, The 27th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, Lapkričio 15-30, 2023 (Virtuali konferencija).
6. **V. Lisyte**, A. Popov, A. Ramanaviciene. Multicolor colorimetric method for cyanide detection, Chemija ir geomokslai : I-osios nacionalinės chemijos ir geomokslų konferencijos tezės, 2024, Vilnius, Lietuva, p. 60.
7. **V. Lisyte**, A. Ramanaviciene, A. Popov. Surface plasmon resonance immunosensor for accurate detection of antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, Open Readings 2024. The 67th international conference for students of physics and natural sciences, Balandžio 23-26, 2024 : book of abstracts

BENDRAAUTORIŲ PASKELBTOS KONFERENCIJŲ TEZĖS

1. A. Popov, **V. Lisyte**, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, Evaluation of antibody immobilization on the surface of Qdots, 7th International Conference on Bio-Sensing Technology, Gegužės 22-25, 2022, P1.27
2. A. Popov, **V. Lisyte**, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, Conjugation of quantum dots with specific antibody, Advances in Surfaces, Interfaces and Interphases 2022, Gegužės 15-18, 2022, Virtuali konferencija.
3. A. Popov, G. Agasarjanaite, N. Zenkeviciute, **V. Lisyte**, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, The investigation of specific antibodies

interaction with CD44 protein, Open readings 2022, Kovo 15-18, 2022, Online conference, p. 313.

4. A. Popov, **V. Lisyte,** A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, Surface plasmon resonance spectroscopy as a key to the development of sensitive biosensors, International Conference Functional Inorganic Materials 2022, Spalio 6-8, 2022, Vilnius, Lietuva, abstract book, p. 27.
5. A. Popov, **V. Lisyte**, A. Treimakas, B. Brasiunas, A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, Nanoparticles and Immunosensors: a Promising Combination for Sensitive Biomarker Detection, Advanced materials and technologies, Rugpjūčio 21-25, 2023, Palanga, Lietuva, abstract book, p. 33.
6. A. Popov, **V. Lisyte**, A. Treimakas, B. Brasiunas, A. Ramanaviciene, Employing $Ti_3C_2T_x$ MXenes for the advancement of an amperometric glucose biosensor, 8th International Conference on Bio-Sensing Technology, Gegužės 12-15, 2024 Seville, Spain.
7. A. Popov, A. Treimakas, **V. Lisyte**, S. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, $Ti_3C_2T_x$ Mxenes for the development of an amperometric glucose biosensor, 24-28 Vasario 2024, San Diego, USA.

STAŽUOTĖS

1. 2 mėn. stažuotė įmonėje „3D STRONG SIA“, Ryga, Latvija.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Išsilavinimas

2021-2025 Vilniaus universitetas - Chemijos ir geomokslų fakultetas, Analizinės ir aplinkos chemijos katedra, chemijos mokslų daktaro išsilavinimas.
Baigiamojo darbo tema: *Paviršiaus plazmonų rezonanso spektroskopija biokonjugatų analizei ir tiesioginiam antikūnų aptikimui.*

2021 Vilniaus universitetas – Chemijos ir geomokslų fakultetas, Analizinės ir aplinkos chemijos katedra, magistro išsilavinimas.
Darbo tema: *Redukuoto grafeno oksido ir polianilino nanopluoštų nanokompozito taikymas elektrocheminiuose gliukozės biologiniuose jutikliuose.*

2019 Vilniaus universitetas – Chemijos ir geomokslų fakultetas, Analizinės ir aplinkos chemijos katedra, bakalauro išsilavinimas.
Darbo tema: *Polianilino nanopluoštų taikymas elektrocheminiuose gliukozės biologiniuose jutikliuose*

2015 Biržų „Saulės" gimnazija, vidurinis išsilavinimas.

2011 Biržų „Atžalyno" vidurinė mokykla, pagrindinis išsilavinimas.

Dalyvavimas projektinėje veikloje:

2019 07 – 08 LMT finansuojamas studentų mokslinių tyrimų vykdymo projektas. Darbo tema: Polianilino nanostruktūrų ir grafeno oskido taikymas gliukozės biologiniuose jutikliuose. Nr. 09.3.3-LMT-K-712-15-0212.

2021 – 2023 LMT finansuojamas ir EU mokslinių tyrimų projektas (SMART). Darbo tema: SARS-CoV-2 viruso baltymų sąveikos su specifiniais antikūnais tyrimas, įvertinimas ir praktinis taikymas. Nr. 01.2.2-LMT-K718-05-0038.

Profesinė patirtis:

2019.09-2021.11 Grožio konsultantė, „Eurovaistinė"

SUMMARY

INTRODUCTION

Molecular-level interactions form the foundation of life: proteins bind to receptors, antibodies recognize foreign invaders, and nanoparticles are increasingly becoming not only passive carriers but also active participants in molecular recognition processes. Modern science aims not only to understand these interactions but also to develop techniques that allow their direct observation without additional labels, under physiological conditions, and with high sensitivity and speed. One such technique, whose importance is rapidly growing in both fundamental and applied research, is surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy.

SPR enables real-time monitoring of biomolecular interactions by detecting changes in the refractive index at the sensor surface when one molecule is immobilized and the other freely circulates in solution. This allows for the analysis of how quickly interactions occur, how strong they are, and whether they are reversible [1]. Since SPR does not require fluorescent dyes, enzymes, or other labeling agents, it avoids unnecessary background noise and preserves the natural state of the interaction. Because of these features, SPR remains widely used for both the development of sensitive biosensors and the investigation of complex biological systems.

This dissertation presents two studies connected by a shared methodological approach - SPR spectroscopy. In one case, the method is employed to detect biomarkers of an infectious disease (COVID-19), and in the other, to evaluate nanoparticle conjugation. Both studies demonstrate that a single technique can be applied to diverse, practically significant areas.

The first study focuses on nanoparticles and antibodies, specifically aiming to assess the efficiency of conjugation between quantum dots (QD) and antibodies, as well as the interaction of these conjugates with the CD44 protein. CD44 is a membrane glycoprotein involved in cell adhesion and migration, and is recognized as a biomarker for cancer stem cells and inflammatory conditions [2]. In this study, quantum dots functionalized with amine groups (QD-NH_2) were conjugated to anti-CD44 using the bifunctional cross-linking reagent BS_3. To determine whether the conjugates could recognize their biological target, SPR was used to study their interaction with the CD44 protein. The analysis confirmed successful conjugation and specific binding, allowing for the evaluation of the suitability of these nanoconjugates for practical application.

The second study focuses on the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (SCoV2-rN), a key structural component of the virus known for its strong immunogenic properties. It has been established that the human immune system produces specific antibodies in response to this protein, making it a reliable marker of infection [3]. In this study, an immunosensor was developed by immobilizing recombinant SCoV2-rN onto a gold SPR sensor surface coated with a self-assembled monolayer of 11-mercaptoundecanoic acid (MUA). Carbodiimide chemistry (EDC/NHS) was used for covalent immobilization of the protein. The resulting sensor enabled the direct and sensitive detection of anti-SCoV2-rN antibodies. The system demonstrated high reproducibility, strong specificity, and reusability - important features for clinical and serological applications.

Although the two studies target different analytes - viral antibodies and a cancer biomarker - they both underscore a key idea: SPR spectroscopy is a versatile and powerful technique for probing highly specific interactions between biological molecules or functionalized nanostructures, in one case, the method brings us closer to faster and more accessible viral diagnostics; in the other, it supports the development of targeted nanomaterials for biomarker detection.

This dissertation demonstrates that advanced analytical techniques such as SPR can integrate traditionally distinct fields - virology, immunology, and nanotechnology - into a cohesive research framework. In this context, it is not only important what we detect, but also how accurately, sensitively, and quickly we can do so. Such methodological convergence opens up opportunities for designing next-generation biosensors and analytical systems that meet the demands of modern healthcare, research, and innovation.

The aim of the study:

To apply surface plasmon resonance spectroscopy for the evaluation of quantum dots modification with antibodies and for the detection of antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein.

The objectives of this study:

1. To perform the conjugation of quantum dots with antibodies against the CD44 protein. To optimize the conditions for the modification of quantum dots with anti-CD44 antibodies and to evaluate the efficiency of the resulting bioconjugates in analysis using SPR spectroscopy.
2. To develop an SPR immunosensor for the direct detection of antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein.

The statements for the defense:

1. SPR spectroscopy is a suitable method for evaluating the efficiency and applicability of quantum dots modification with antibodies.
2. The direct detection of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein can be successfully performed using SPR spectroscopy.

LITERATURE REVIEW

Surface plasmon resonance spectroscopy

Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy is an optical technique based on the excitation of surface plasmons, commonly applied to investigate the properties and interactions of nanomaterials and biomolecules. SPR arises from oscillations of conduction electrons at the interface between a metal and a dielectric material with different dielectric constants when exposed to polarized light. SPR spectroscopy monitors interactions near the metal layer (commonly Au or Ag) with high sensitivity, finding applications in food safety, drug development, environmental protection, and medical diagnostics. Researchers continuously seek ways to enhance SPR sensitivity by designing new structures and operational methods [4].

SPR occurs when polarized light excites free electrons at a metal-dielectric interface, generating surface plasmons that propagate as electromagnetic waves [18]. At the critical angle, the internally reflected light generates an evanescent field, which couples with surface plasmons and induces a resonance, observed as a dip in reflected light intensity (resonance angle) [20]. This angle shifts proportionally to the mass of biomolecules adsorbed on the sensor surface [30], typically measured in resonance units (RU) where 1000 RU equals a 0.1° change [4]. Even changes in mass at the nanogram level cause detectable changes in refractive index [31]. It depends on metal properties, incident light wavelength, temperature [33], and dielectric refractive index [28]. Silver provides sharp resonance curves and high sensitivity but suffers from chemical instability, while gold offers chemical inertness and stability, making it the preferred metal [23–26]. The optimal gold layer thickness for achieving the highest resonance sharpness is approximately 50 nm [22].

SPR sensors are used for detection of biomolecular interactions (proteins, enzymes, antigens, antibodies, nucleic acids, etc.) through refractive index changes caused by mass accumulation and chemical reactions on the sensor surface [32]. These interactions initially occur rapidly, then stabilize as equilibrium is reached between association and dissociation. Thus, SPR enables the real-time analysis of the kinetics, affinity, specificity, and concentration of biomolecules, which is widely used in various fields, including biomedicine and the food industry.

Typical SPR instruments employ a light source (e.g., NIR LED), an optical coupling element (such as a prism, diffraction grating, waveguide, or

fiber), and a glass substrate coated with a thin metal film. Detection relies on CCD cameras capturing reflected light at different angles. A continuous buffer flow over the sensor surface is maintained by the fluid delivery system, ensuring measurement stability and reproducibility during the experiment [35]. Commercial systems, such as Biacore, provide detailed characterization of molecular interactions [4].

Before use, the metal surface (usually gold) requires thorough cleaning and activation to remove contaminants, employing methods like piranha solution, NaOH, ammonia-peroxide mixtures, or oxygen plasma. Plasma treatment offers repeatable cleaning without damaging the surface morphology [38,39]. Self-assembled monolayer (SAM) of thiols forms spontaneously on gold surfaces, facilitating functionalization due to strong Au–S bonds [37].

Nanoparticles

Nanotechnology, one of the most significant scientific advances of the 21st century [71], is fundamentally based on nanoparticles (NPs) materials smaller than 100 nm, made, for instance, from carbon, metals, metal oxides (MeO), or organic substances [62]. Their unique properties, which depend on their size, such as enhanced surface area, reactivity, and mechanical strength, make them highly versatile. Depending on dimensions, NPs can be classified as 0D (e.g., quantum dots (QD)), 1D (e.g., nanorods, nanotubes) [63], 2D (e.g., graphene-type layers) [64,298], or 3D (e.g., porous composites) [66,67]. NPs vary in shape (spheres, rods, spirals, etc.), surface morphology, and crystalline structure [68].

NPs can be synthesized using “top-down” or “bottom-up” methods, including chemical vapor deposition, biosynthesis, milling, and laser ablation. Among widely studied materials are MeO-based nanowires, nanorods, QD, and nanocomposites, which can be tailored for specific biosensor applications [70]. Their uses span wastewater treatment [299], environmental monitoring [72], food enhancement [73], antimicrobial technologies, etc. [74]. Biocompatibility, anti-inflammatory, drug delivery capabilities, and selectivity for disease markers make NPs indispensable in biotechnology and microbiology [75].

NPs can exhibit distinct optical properties - reflection, absorption, and emission - governed by quantum confinement and surface plasmon resonance (SPR) [76–78]. For example, in quantum dots, as the particle size decreases, the energy bandgap increases, resulting in a shift of the emitted light from red

to blue [79]. In metals like Au or Ag, SPR enables tunable coloration depending on NPs size and shape [80], enabling applications in biosensing and photonics.

Conductivity is affected by charge carrier mobility, surface atom density, and doping. Some metallic NPs lose conductivity when reduced to a few nanometers (e.g., Cu) [81], while insulators like SiO_2 may become conductive [82]. In many NPs, as the particle size decreases, the bandgap widens, causing materials to transition from conductors to semiconductors or insulators [84,85]. However, some 1D/2D nanostructures may retain high conductivity due to crystallinity and surface states [88,89].

For biomedical and technological applications, NPs require surface functionalization to control dispersion, stability, and molecular interactions.

Quantum dots

Quantum dots are zero-dimensional nanomaterials that have revolutionized various fields, including materials science and biomedicine. Independently discovered in the early 1980s by Alexei Ekimov and Louis E. Brus, QD exhibit size-dependent optical properties due to quantum confinement [127]. For their contributions to QD research and synthesis methods, Ekimov, Brus, and Moungi G. Bawendi were awarded the 2023 Nobel Prize in Chemistry [128,300].

Quantum dots usually consist of semiconductor compounds composed of elements from groups II–VI, III–V, or IV–VI. QD possess a core–shell structure. Cadmium-based QD (e.g., CdTe, CdSe, CdS) are known for their strong luminescence but raise concerns due to Cd^{2+} toxicity [129–133]. As a result, cadmium-free alternatives like Ag_2Se, InP, $CuInS_2$, ZnO, Si, and carbon-based QD (CQD, GQD, GOQD) have been developed, offering lower toxicity and excellent biocompatibility [301]. For instance, Shen et al. synthesized boronic acid-modified carbon QD for glucose detection, achieving high sensitivity and selectivity in human serum [134].

QD demonstrate unique optical features such as size- and composition-tunable emission, broad absorption, narrow emission bandwidth, high quantum yield, and resistance to photobleaching [135,136]. By altering their size (2–10 nm), QD can emit light across the UV to near-infrared ranges. CdS, CdSe, and CdTe QD can emit in UV–blue, visible, and red–NIR regions, respectively [302]. Their broad absorption enables multiplexed imaging with a single excitation source, while narrow emission minimizes signal overlap [137,302].

In biomedical applications, QD outperform traditional dyes due to brighter fluorescence, superior photostability, and broader spectral coverage [138–141]. NIR-emitting QD, in particular, reduce tissue autofluorescence and enhance imaging depth [142,303]. Their emission can be tuned by size, enabling simultaneous detection of multiple signals with minimal spectral interference [143].

QD have been successfully used in cell tracking, especially stem cells, due to their strong luminescence and relatively low toxicity. Cryo-imaging combined with QD has allowed single-cell-level tracking in animal models [144]. However, surface hydrophobicity can limit biocompatibility, necessitating ligand-based modifications to improve solubility and cellular compatibility.

SARS-CoV-2 virus

The outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), causing COVID-19, began in Wuhan, China, in 2019 and rapidly spread across China and 28 other countries. By February 23, 2020, over 77,000 cases had been confirmed in China, with 60% of them in Wuhan. SARS-CoV-2 is genetically similar to the SARS virus, sharing 79.6% genome identity and using the same cellular receptor, yet clinical manifestations are more diverse [174]. Infection symptoms range from asymptomatic to mild or severe respiratory illness and critical conditions like acute respiratory distress syndrome. The virus primarily affects the lower respiratory tract and transmits via respiratory droplets, but emerging data suggest multisystem involvement linked to the virus's ability to bind ACE2 receptors on various human cells [175]. Despite continuous improvements in diagnostics and treatments, COVID-19 remains widespread, complicated by ongoing viral mutations that impact resistance to therapies and vaccines, necessitating ongoing research [176].

SARS-CoV-2 belongs to the β-coronaviruses, with four structural proteins: spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N) [177,178]. The N protein, composed of 419 amino acids, features both structured (N-terminal domain (NTD) and C-terminal domain (CTD)) and intrinsically disordered regions (N- and C-termini, flexible linker region rich in serine and arginine) [299]. The NTD and CTD share a high structural similarity with other coronavirus N proteins. The CTD forms a stable homodimer, while the overall structure remains partially unresolved due to intrinsic flexibility [180,304].

The N protein is highly immunogenic and stable, with 90% amino acid sequence identity to other CoV N proteins and few mutations over time [181,182]. It elicits strong IgG antibody responses in COVID-19 patients and plays a crucial role in T cell activation, viral RNA packaging, replication, and host metabolism regulation [183,305]. Its conserved structure and immune profile make it a promising target for vaccines and therapeutic interventions [306].

Due to its abundance in viral particles and strong immunogenic properties, the N protein is particularly prominent among SARS-CoV-2 proteins. It is essential for packaging the viral RNA genome into ribonucleoprotein complexes and incorporating it into new virions, making it an attractive target for antiviral therapies and diagnostic development [180]. Together with the spike (S) protein, which mediates viral entry via the ACE2 receptor, the N protein is one of the primary antigens studied for serological testing and immune response monitoring [177,180]

Antibodies against the N protein can persist in patient serum for up to 30 weeks, making it a reliable biomarker for SARS-CoV-2 infection [202]. Serological assays, including ELISA, CLIA, IFA, and lateral flow tests, often target N and S antigens to detect IgM and IgG antibodies, providing valuable information on population exposure, vaccine efficacy, and the development of neutralizing antibodies [200]. N protein-based detection methods, including advanced plasmonic biosensors, offer high sensitivity and specificity, supporting rapid and accurate diagnostics that complement conventional PCR testing [208–210].

CD44 protein

CD44 is a transmembrane glycoprotein [234] expressed in various human cells, including immune, differentiated, and cancer cells [235]. It binds multiple ligands, such as hyaluronic acid (HA) [236], osteopontin [254], and serglycin [255], thereby activating signaling pathways involved in both normal physiology and diseases, notably cancer [239]. CD44 plays a key role in cancer progression by promoting cell proliferation, migration, drug resistance, and epithelial-mesenchymal transition [240–242]. The CD44 gene undergoes alternative splicing, producing the standard isoform CD44s and multiple variant isoforms (CD44v), which have distinct functions in tumors. CD44s is generally linked to tumor growth [243,244], while variants like CD44v3 and CD44v6 associate with tissue invasion and chemotherapy resistance [245,246]. Increasing evidence shows CD44 regulates cancer cell

motility, EMT, and stemness [247,248], making it a recognized cancer stem cell marker and a potential therapeutic target [249,250,307]. However, clinical studies on CD44-targeted therapies remain limited, underscoring the need for a deeper understanding of its mechanisms.

The CD44 gene contains 20 exons, with exons 1-5 and 16-20 encoding the conserved N- and C-terminal domains shared across isoforms [251]. The most common isoform, CD44s, lacks variant exons, while CD44v isoforms include alternative exon inserts (v1-v10) due to alternative splicing [254,255]. CD44 protein consists of four domains: extracellular, stem (standard or variant), transmembrane, and cytoplasmic [257]. Post-translational glycosylation further diversifies its molecular weight and function [308,309]. Various CD44 isoforms are implicated in progression and stemness of multiple cancers, including breast, glioma, head and neck, pancreatic, prostate, and colorectal cancers [259–267].

CD44 is widely expressed in lymphocytes, smooth muscle cells, fibroblasts, and epithelial cells, playing roles in lymphocyte migration, cell adhesion, leukocyte activation, angiogenesis, and cytokine release [256,308]. CD44s is found in hematopoietic and multiple adult tissues [268,308], while CD44v isoforms show more restricted, stage- and cell type-specific expression, often elevated in carcinomas [308]. Regular CD44 expression regulates HA metabolism, and its loss can impair hair growth, wound healing, and keratinocyte proliferation [269].

In tumors, elevated CD44 mRNA and protein levels have been reported in lymphomas, breast, colon, endometrial, bladder, prostate, ovarian, oral squamous cell carcinoma, and gastric cancers, frequently correlating with aggressive behavior and poor prognosis [256,271]. CD44 variants, especially CD44v6, are linked to metastasis and chemoresistance in cancers such as lung adenocarcinoma and pancreatic cancer [256,272,308].

CD44 is frequently selected as a target molecule in biosensors due to its role as a key marker of cancer stem cells. Anti-CD44 antibodies enable the specific detection of the protein, quantification of its expression, and assessment of cellular heterogeneity, supporting the development of highly sensitive and specific cancer diagnostic and monitoring platforms [273]. Effective biosensor design requires understanding antibody-CD44 interactions, as binding specificity and kinetics directly influence sensor performance. For example, Kudo et al. generated monoclonal anti-CD44 clones by immunizing mice with cells overexpressing CD44v3-10. One clone (CD44Mb-3) showed high specificity for CD44v5 (1.3×10^{-9} mol L^{-1}) in pancreatic cancer cells, enabling their distinction from other cancer cell

types [274]. Leveraging these interactions, Paltusheva et al. developed an optical fiber biosensor with a spherical tip coated with a 100 nm zinc oxide layer, functionalized with anti-CD44 antibodies, achieving detection in the 100 amol L^{-1} – 100 nmol L^{-1} range, a detection limit of 0.8 fmol L^{-1}, high sensitivity to refractive index changes, and surface regenerability [275]. Similarly, Kumar et al. reported an electrochemical immunosensor using AuND and graphene composites for the detection of breast cancer CD44, with immobilized antibodies enabling an ultrasensitive detection limit of 1.17 fg mL^{-1} [276]. Collectively, these studies demonstrate that exploiting the specific interactions between CD44 and its antibodies facilitates the fabrication of biosensors with ultralow detection limits and high sensitivity, offering promising tools for early cancer diagnosis and precise biomarker monitoring.

LIST OF ABBREVIATIONS

ABS – acetate buffer
ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2
Anti-IgG – secondary antibody against horseradish peroxidase antibody
Anti-SCoV2-rN – antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein
ATR – attenuated total reflectance
BS_3 – bis(sulfosuccinimidyl)suberate
BSA – bovine serum albumin
CQD – carbon-based QD
CTD – C-terminal domain
DLS – dynamic light scattering
EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
Et – ethanolamine
H_2O_2 – hydrogen peroxide
H_2SO_4 – sulfuric acid
HA – hyaluronic acid
HCl – hydrogen chloride
HD - hydrodynamic diameter
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
Ip – isoelectric point
LED – light emitting diode
LOD – limit of detection
LOQ – limit of quantification
MeO – metal oxides
MUA – 11-mercaptoundecanoic acid
NaOH – sodium hydroxide
NHS – N-hydroxysuccinimide
NIR – near infrared range
NPs – nanoparticles
NTD – N-terminal domain
PBS – phosphate-buffered saline
PCR – polymerase chain reaction
PEG – polyethylene glycol
QD-COOH – carboxyl-functionalized QD
QD-NH_2 –Amino-functionalized QD
QD – quantum dots
RSD – relative standard deviation

SAM – self-assembled monolayer
SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SCoV2–rN – Recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein expressed in the yeast species *Saccharomyces cerevisiae*, with a His6 tag at the C-terminus of the protein
SDS – sodium dodecyl sulfate
SPR – surface plasmon resonance
TMB – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
UV – ultraviolet range

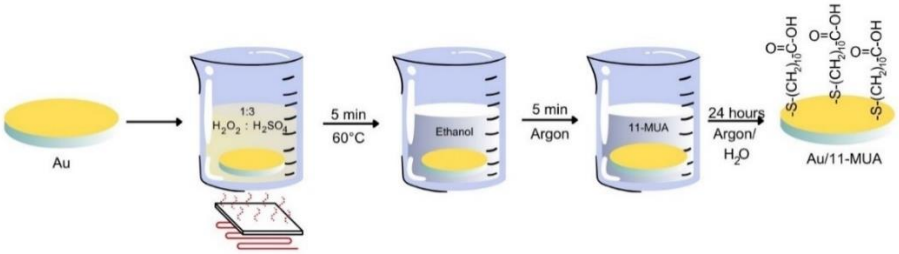
EXPERIMENTAL METHODOLOGY

General methodology of the research

Two experimental studies were conducted as part of the dissertation work at the Institute of Chemistry, Faculty of Chemistry and Geosciences, Vilnius University. The first study aimed to evaluate the efficiency of conjugation and the activity of antibodies by modifying QD with anti-CD44 antibodies specific to the CD44 protein. The second study focused on the detection of antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (anti-SCoV2-rN). In both experiments, surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy was used to analyze the interactions, allowing real-time evaluation of biomolecular interaction kinetics and specificity.

Preparation of a gold chip

The preparation of each Au chip began with thorough cleaning. S.1. Initially, the chip was immersed in a Piranha solution, consisting of hydrogen peroxide (H_2O_2) and concentrated sulfuric acid (H_2SO_4) in a 1:3 ratio. The gold chip was kept in this solution for 5 minutes at 60 °C. Afterward, it was rinsed with distilled water, immersed in ethanol for 2 minutes, rinsed again with distilled water, and finally dried using argon gas. Following the cleaning process, a self-assembled monolayer (SAM) was formed on the surface of the gold chip. The cleaned and dried chip was placed in 4 mL of a 1 mmol L^{-1} ethanolic solution of 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) and incubated for 24 hours. After incubation, the chip was removed from the MUA solution, rinsed with distilled water, immersed in ethanol for 2 minutes, rinsed again with distilled water, and dried under argon gas.



S.1. Au chip preparation and modification with MUA SAM.

Calculations

The binding of molecules to the SPR spectroscopy chip leads to a shift in the SPR angle. It has been established that a 120 m° SPR angle shift corresponds approximately a change of 1 ng/mm^2 in surface mass concentration. This linear relationship was used in both studies to calculate the surface concentration of the immobilized protein.
The analytical SPR signal was calculated as the change in the PPR angle recorded before and after protein immobilization or during their interaction with specific antibodies, while a reference channel was used to eliminate the background signal. The interaction of anti-CD44 and their conjugates with immobilized CD44 protein was evaluated by calculating the maximum binding capacity (B_{max}) and the equilibrium dissociation constatnt (K_D) by approximating the association phase data using a hyperbolic function [277,278]:

$$B_{eq} = B_{max} \cdot \frac{[X]}{[X]+K_D}, \quad (2)$$

where B_{eq} is the equilibrium response value and [X] is the concentrationantibodies or their QD conjugates.

For each antibody concentration, the analysis was performed using kinetic evaluation software (Metrohm Autolab BV, Leusden, The Netherlands). In addition, during the development of the anti-SCoV2-rN sensor, additional analytical parameters were evaluated. The limit of detection (LOD) was defined as the anti-SCoV2-rN concentration at which the PPR signal corresponds to three standard deviations above the noise level, while the limit of quantification (LOQ) was defined as the concentration corresponding to ten standard deviations above the noise level. These parameters define the lowest concentrations that can be reliably detected (LOD) and quantitatively determined (LOQ).

Evaluation of QD-antibody conjugation using SPR spectroscopy

Quantum dots functionalized with antibodies have been widely studied across various scientific fields. However, a standardized method to assess the efficiency of antibody conjugation - the specific interaction with a target antigen - is still lacking. In this PhD study, SPR spectroscopy was employed to evaluate the effectiveness of conjugation.

Gold sensor chips were first modified with a SAM of MUA, followed by covalent immobilization of the CD44 biomarker using carbodiimide chemistry (Au/MUA/CD44). Amino-functionalized QD (QD-NH_2), modified with polyethylene glycol (PEG), were selected for conjugation due to their reduced non-specific adsorption to the Au/MUA/CD44 surface.

Conjugation of QD with anti-CD44 antibodies

Before conjugation, PEG-coated QD-NH_2 nanoparticles were centrifuged at 2000×g for 3 minutes to minimize aggregation. The supernatant was replaced with 10 mmol L^{-1} PBS buffer (pH 7.4). QD-NH_2 were then mixed with BS_3 crosslinker at a molar ratio of 1:1000 in low-binding microtubes and incubated at room temperature for 30 minutes using a tube rotator.

Excess BS_3 was removed using 100 kDa Nanosep filters, washed three times with PBS. The activated QD were then mixed with anti-CD44 antibodies at molar ratios of 1:3, 1:5, 1:10, and 1:12, and gently stirred for 2 hours at room temperature. The reaction was quenched with 100 µL of 1 mol L^{-1} glycine and stirred for an additional 15 minutes. Unreacted components were removed using 300 kDa Nanosep filters and washing with PBS. The conjugates were stored at 4 °C.

QD-NH_2 absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader, and a calibration curve was generated in the range of 5–80 nmol L^{-1}. The QD morphology was analyzed using a high-resolution field emission scanning electron microscope (FE-SEM). Hydrodynamic diameters (HD) of anti-CD44, QD, and QD-antibody conjugates were measured in PBS using a Zetasizer Nano ZS 3600.

Determination of anti-CD44 concentration

The concentration of anti-CD44 was determined spectrophotometrically using MaxiSorp microplates. Briefly, 50 µL of anti-CD44 solutions with concentrations ranging from 0.1 to 0.7 µg mL^{-1} were added to each well and incubated for 2 h at 37°C. After incubation, the wells were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 and blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) for 1 h to prevent nonspecific binding. Subsequently, horseradish peroxidase labeled secondary antibodies (anti-IgG, 100 ng mL^{-1}) were added and incubated for 2 h. Following washing, TMB substrate was added to initiate a colorimetric reaction, which was stopped after 15 min with 1 mol L^{-1} HCl. Absorbance was measured at 450 nm, and the obtained data were used

to construct a calibration curve. This calibration curve was applied to evaluate the efficiency of covalent conjugation of anti-CD44 and QD-NH_2.

Determination of QD-NH_2-anti-CD44 concentration

The concentration of QD-NH_2-anti-CD44 conjugates obtained after conjugation was determined using an absorption calibration curve of QD-NH_2. For this purpose, QD-NH_2 were diluted to prepare a series of standard solutions in the concentration range of 5-80 nmol L^{-1}, and their absorbance was measured at 405 nm. Based on these measurements, a calibration curve representing the dependence of absorbance at 405 nm of QD-NH_2 concentration was constructed. The collected QD-NH_2-anti-CD44 conjugates were diluted accordingly, and their absorbance was measured at 405 nm. The conjugate concentration was determined using the QD-NH_2 calibration curve.

Stabilization of the gold SPR sensor surface

Surface stabilization is crucial for the covalent immobilization of CD44 and subsequent interaction studies with QD-anti-CD44 conjugates, as well as for studies involving the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. The stabilization process included buffer and regeneration steps to ensure surface hydration and baseline stability.

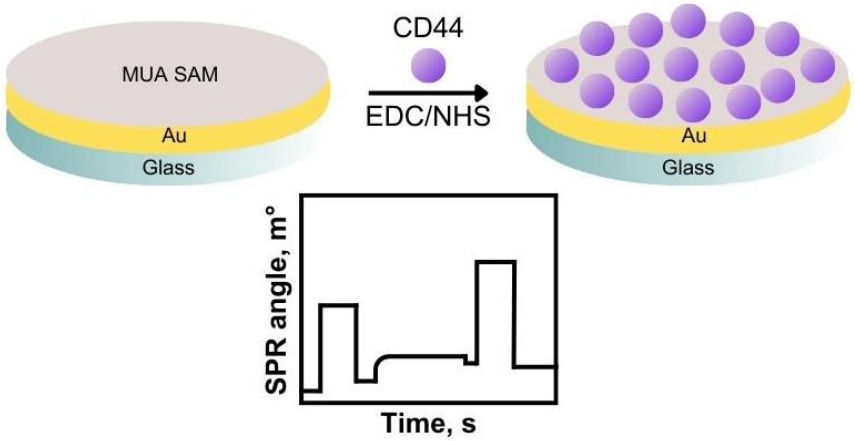
Surface stabilization to CD44 immobilization

Before CD44 immobilization, the gold chip surface was stabilized using a mixture of 10 mmol L^{-1} acetate buffer (ABS, pH 4.5) and 50 mmol L^{-1} SDS (0.5%). Solutions were sequentially injected every 120 seconds using the SPR instrument, and stabilization continued until a steady baseline was achieved (approximately 45 minutes).

Immobilization of CD44 on the SPR gold surface

Immobilization was carried out in both flow channels of the SPR instrument S.2. After registering a stable baseline using 10 mmol L^{-1} ABS (pH 4.5), fresh 0.4 mol L^{-1} EDC and 0.1 mol L^{-1} NHS were mixed 1:1, and 50 µL of the mixture was injected. This activated the carboxyl groups of the SAM layer, forming reactive NHS esters. After rinsing, 600 nmol L^{-1} CD44

was introduced for 1200 seconds, allowing its primary amines to react and form covalent amide bonds.



S.2. The immobilization scheme of the CD44 biomarker.

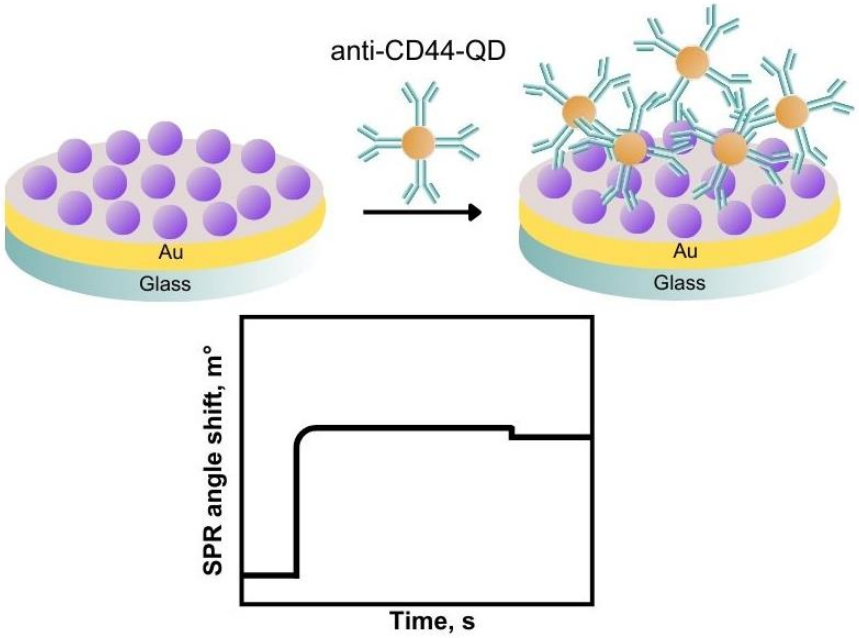
Unbound CD44 was washed off with ABS buffer, and remaining reactive sites were deactivated using 1 mol L^{-1} ethanolamine (Et) for 600 seconds. This resulted in a stable Au/MUA/CD44 biosensor surface, ready for further measurements.

Stabilization of the interaction of the CD44 biomarker with quantum dots modified with specific antibodies

To analyze the interaction between the CD44 biomarker and QD-anti-CD44, the surface of the gold chip was stabilized using a 10 mmol L^{-1} phosphate-buffered saline (PBS) solution at pH 7.4 and a 10 mmol L^{-1} glycine solution at pH 2. The stabilization was performed by alternately injecting these solutions every 120 seconds and continued until the baseline became stable (approximately 30 minutes).

SPR-based detection of QD-anti-CD44 binding

SPR was used to examine specific anti-CD44 antibody interactions, optimize the QD-to-antibody ratio, assess non-specific binding, and evaluate regeneration protocols S. 3. The baseline was stabilized with PBS for 200 seconds. Then, QD–anti-CD44 conjugates in PBS were introduced into one flow channel (900 seconds), while PBS alone was passed through the control channel.



S. 3. Interaction of Au/MUA/CD44 with anti-CD44-QD.

The resulting CD44/anti-CD44-QD complex was dissociated by rinsing with PBS for 200 seconds. Regeneration was achieved with 10 mmol L^{-1} glycine/HCl buffer (pH 2). The signal was calculated by subtracting the control from the experimental response. Control experiments with various antibody concentrations and QD batches were also conducted.

Spectrophotometric determination of anti-CD44 concentration

A direct ELISA was used to quantify anti-CD44 using MaxiSorp plates. Wells were coated with 50 µL of antibody solutions (0.01–0.7 µg mL^{-1}) and incubated for 2 hours at 37 °C. After washing with PBS containing 0.05% Tween 20, wells were blocked with 2% BSA for 1 hour.

After another wash, 200 µL of 100 ng mL^{-1} anti-IgG antibody was added and incubated for 2 hours. Following washing, 100 µL of TMB substrate was added. After 15 minutes, the reaction was stopped with 100 µL of 1 mol L^{-1} HCl, and absorbance was measured at 450 nm. A calibration curve was generated and used to evaluate the efficiency of covalent conjugation between QD-NH_2 and anti-CD44.

Direct detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies with SPR

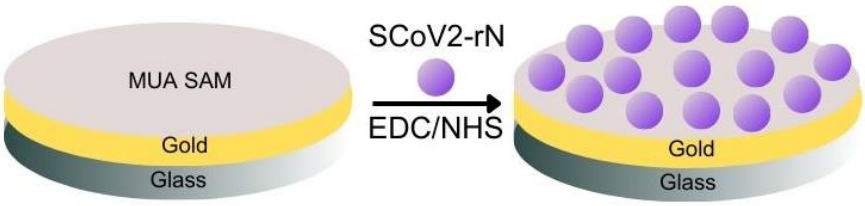
The SCoV2-rN is known for its strong immunogenicity, making the detection of specific antibodies against this protein highly relevant for the diagnosis of COVID-19. In this study, a direct, label-free, and sensitive SPR method was developed for the detection of anti-SCoV2-rN. Recombinant SCoV2-rN protein was covalently immobilized on a SPR sensor gold chip modified with a SAM of MUA via carbodiimide coupling chemistry. The optimal surface concentration of the immobilized protein was determined to ensure the efficient performance of the immunosensor. The resulting biosensor demonstrated good repeatability, specificity, and was suitable for repeated use in the detection of anti-SCoV2-rN.

Surface stabilization to SCoV2-rN immobilization

Before covalent immobilization of the SCoV2-rN protein, the gold chip surface was stabilized using alternating injections of 0.05 mol L^{-1} ABS (pH 5.3), 10 mmol L^{-1} NaOH, and 0.5% SDS. These solutions were injected sequentially every 120 seconds into both channels of the sensor chip. Stabilization continued until a steady baseline was achieved and lasted for no less than 30 minutes.

Immobilization of the nucleocapsid protein on the SPR sensor surface

Covalent attachment of the SCoV2-rN protein was performed simultaneously in both flow channels. The sensor surface was first stabilized with 50 mmol L^{-1} ABS (pH 5.3) for 200 seconds. Then, the carboxyl groups of the MUA SAM were activated by injecting a freshly prepared solution of 0.2 mol L^{-1} EDC and 0.05 mol L^{-1} NHS for 600 seconds (S.4).



S.4. Scheme of SARS-CoV-2 nucleopside protein immobilization on the sensor chip surface.

This step generated reactive O-acilizourea intermediates that reacted with the primary amine groups of the SCoV2-rN protein, enabling covalent binding

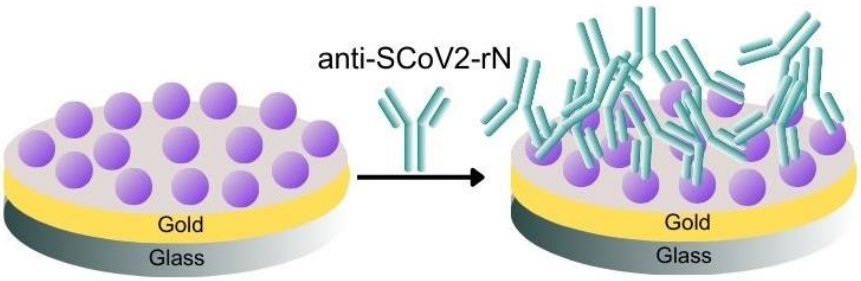
to the surface. Following activation, the surface was briefly rinsed to remove excess EDC/NHS. A solution of SCoV2-rN protein in acetate buffer (pH 5.3) was then injected and incubated for 1200 seconds, allowing sufficient time for protein immobilization. Unbound protein molecules were washed away, and remaining active carboxyl groups were deactivated by injecting 1 mol L^{-1} Et (pH 8.5) for 600 seconds. The Et was then removed, and the surface was rinsed with a regeneration solution consisting of 10 mmol L^{-1} NaOH and 0.5% SDS, followed by 50 mmol L^{-1} ABS (pH 5.3). This procedure ensured stable and efficient immobilization of SCoV2-rN, forming a functional Au/MUA/SCoV2-rN sensing surface.

Surface stabilization before antibody interaction

To investigate the interaction between immobilized SCoV2-rN protein and specific antibodies, the sensor surface was preconditioned using alternating injections of 10 mmol L^{-1} PBS (pH 7.4), 10 mmol L^{-1} NaOH, and 0.5% SDS. Injections were applied every 120 seconds until the baseline signal stabilized, which typically required around 30 minutes.

Interaction of SCoV2-rN with specific antibodies

To assess the binding between the immobilized SCoV2-rN protein and anti-SCoV2-rN antibodies, both sensor channels were first stabilized with 10 mmol L^{-1} PBS (pH 7.4) for 200 seconds. Then, an antibody solution of defined concentration in the same buffer was injected into the experimental channel, while the control channel received only buffer. The interaction was monitored over 600 seconds, during which a stable immune complex (Au/MUA/SCoV2-rN/anti-SCoV2-rN) formed on the surface S.5.



S.5. Scheme of the interaction between the SCoV2-rN protein and specific antibodies.

This was followed by a dissociation phase, where PBS buffer was injected to remove unbound antibodies, with additional mixing for 200 seconds to ensure complete removal. A regeneration step was then carried out for 500 seconds to disrupt the immune complex and regenerate the surface, followed by PBS rinsing to confirm a new stable baseline.

Optimization of SCoV2-rN protein concentration

To determine the optimal concentration of the SCoV2-rN protein for effective immobilization, a series of experiments was conducted. The protein was immobilized on the sensor surface as previously described, and its interaction with specific antibodies was then evaluated. Three concentrations of SCoV2-rN - 250, 500, and 750 nmol L^{-1} were tested, all prepared in 50 mmol L^{-1} ABS (pH 5.3). The concentration that yielded the highest and most consistent signal upon antibody binding was selected for subsequent measurements.

RESULTS

Evaluation of quantum dots–antibody conjugation using SPR spectroscopy

To assess the conjugation efficiency between OD and anti-CD44, surface SPR spectroscopy was employed. This sensitive, label-free method enables the real-time monitoring of biomolecular interactions. In this study, the formation of QD–antibody conjugates was carried out using a crosslinking agent, followed by interaction studies with immobilized CD44 protein.

CD44 protein immobilization

CD44 protein was immobilized on the surface of the SPR sensor chip via a SAM composed of MUA. The carboxyl groups of MUA were activated using a mixture of EDC/NHS, allowing covalent attachment of CD44. The MUA layer ensured strong protein anchoring and reduced nonspecific adsorption due to its chemical stability and compatibility with different pH conditions. This immobilization strategy was essential for accurate SPR-based interaction studies.

QD interaction with CD44 protein

Quantum dots functionalized with amino (QD-NH_2) and carboxyl (QD-COOH) groups were characterized by DLS. Their hydrodynamic diameters were approximately 30 nm. Both types of QD were stable and showed no tendency to aggregate. To evaluate nonspecific interactions, the adsorption of QD onto the sensor surface immobilized with CD44 protein was investigated. Upon injection of 10 nmol L^{-1} QD-NH_2 solution into the SPR flow cell, only a minor increase in SPR signal (~2 m°) was observed, and the signal returned to baseline after dissociation and regeneration. Even at 100 nmol L^{-1}, QD-NH_2 showed minimal adsorption, confirming low nonspecific binding to CD44 protein.

In contrast, 10 nmol L^{-1} concentration QD-COOH caused a significant, concentration-dependent increase in the SPR signal. After dissociation, a persistent shift of ~800 m° remained, indicating strong nonspecific adsorption to the CD44 surface. This nonspecific interaction made QD-COOH unsuitable for further conjugation. Therefore, QD-NH_2 particles were selected for coupling with anti-CD44 antibodies.

Selection of regeneration solution

To allow sensor reuse, various regeneration solutions were tested for their ability to dissociate the antibody-antigen complex without impairing biomolecular activity. Following incubation of the CD44-modified surface with 30 nmol L^{-1} anti-CD44, regeneration was performed using selected reagents.

The results of the study showed that all tested regeneration solutions ensured high surface regeneration efficiency, exceeding 92%. The most effective was 10 mmol L^{-1} glycine/HCl (pH 2), which restored the surface with 99.22 ± 0.49% efficiency. These results confirmed the reliability of 10 mmol L^{-1} glycine/HCl (pH 2.0) for multiple regeneration cycles.

SPR study of anti-CD44 antibody

SPR kinetic studies were conducted to optimize the anti-CD44 concentration for efficient interaction with immobilized CD44 protein. Concentrations from 3 to 500 nmol L^{-1} were tested. A clear concentration-dependent response was observed: at 3 nmol L^{-1}, the SPR signal was 12.57 ± 0.39 m°, increasing to 202.34 ± 8.00 m° at 300 nmol L^{-1}.

The calculated dissociation constant (K_D) was $1.00 \times 10^{-7} \pm 2.29 \times 10^{-9}$ mol L^{-1}, with a maximum binding capacity (B_{max}) of 263.32 ± 2.44 m°, indicating strong binding affinity. These data confirmed that the anti-CD44 antibody was suitable for covalent conjugation with QD-NH_2.

Evaluation of anti-CD44 and QD-NH_2 conjugation

Covalent conjugation of QD-NH_2 and anti-CD44 was carried out using the BS_3 crosslinker. This water-soluble reagent forms stable amide bonds between NHS ester groups and primary amines on the antibody. The process avoided QD aggregation and preserved colloidal stability.

Four QD:antibody molar ratios (1:3, 1:5, 1:10, and 1:12) were tested. Dynamic light scattering revealed increased hydrodynamic sizes for all conjugates. For 1:3 and 1:5 ratios, sizes increased to 35.31 ± 1.14 nm and 38.09 ± 1.62 nm, respectively. For 1:10 and 1:12 ratios, diameters reached 46.63 ± 3.86 nm and 42.42 ± 0.80 nm.

Given the initial QD-NH_2 size of 30.21 ± 1.80 nm and the dimensions of the IgG antibody (14 × 8.5 × 4.5 nm), the observed increase of ~14 nm was consistent with partial end-on and side-on orientations of antibodies on the QD surface. These findings confirm successful conjugation and suggest proper structural arrangement of the antibodies for further bioanalytical applications.

Direct detection of anti-SCoV2-rN with SPR

The SCoV2-rN nucleocapsid protein is well-known for its strong immunogenic properties, making the detection of specific antibodies against it crucial for COVID-19 diagnosis. In this study, a direct, label-free, and sensitive method was developed to detect antibodies against the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (anti-SCoV2-rN). Recombinant SCoV2-rN was immobilized on a SPR sensor chip modified with a self-assembled monolayer of MUA via carbodiimide chemistry. The resulting immunosensor demonstrated high reproducibility and specificity, suitable for repeated antibody detection.

Selection of regeneration solution

Regeneration of the sensor surface is essential to ensure reusability and reliable results. Seven regeneration solutions were tested to disrupt the antibody-antigen complex without damaging the immobilized protein. Magnesium chloride (1 mol L^{-1} $MgCl_2$) showed the lowest regeneration efficiency of 75.3% ± 12.8%, indicating that strong electrolytes with high ionic strength are unsuitable for the regeneration. In contrast, NaOH with SDS (10 mmol L^{-1} NaOH + 0.5% SDS) achieved a regeneration efficiency of 99.4% ± 2.5%, or a similar solution (25 mmol L^{-1} NaOH + 0.5% SDS) achieved 99.3% ± 1.0%. Glycine solutions with pH values of 3.0 and 4.0 also showed good results, but after repeated regenerations caused a gradual loss of signal. The 10 mmol L^{-1} NaOH + 0.5% SDS solution was selected due to its high efficiency and low signal variability. Optimization of the regeneration time showed that 500 s is optimal, ensuring 99.6 ± 1.5% regeneration efficiency with no further improvement at longer times.

Optimization of solution pH value

The pH of the buffer used for protein immobilization is critical for effective coupling via carbodiimide chemistry. Since the isoelectric point (Ip) of SCoV2-rN is 10.07, the protein carries a positive charge below this pH value. Experiments across pH 4.5 to 5.8 showed that the highest SPR angle change upon antibody binding occurred at pH 5.3, using a 50 mmol L^{-1} ABS, with a signal of 90.1 ± 4.5 m°. This was significantly higher compared to signals at pH 5.0 (76.5 ± 9.0 m°) and pH 5.8 (75.4 ± 3.7 m°), making pH 5.3 optimal for immobilization.

Optimization of protein concentration

Balancing protein density on the sensor surface is crucial to maximize antibody binding without steric hindrance. Increasing the initial SCoV2-rN concentration from 250 to 500 nmol L^{-1} raised the SPR signal from 309 ± 27 to 434 ± 62 m°, while the antibody binding signal increased fivefold to 90 ± 3.9 m°. Increasing the concentration further to 750 nmol L^{-1} did not result in a statistically significant improvement in the signal. The optimal protein density was 3.61 ± 0.52 ng/mm^2 on the sensor surface, with each 1 ng/mm^2 corresponding to ~120 m° SPR angle change.

Analytical performance evaluation

The specificity of mouse monoclonal antibodies toward immobilized SARS-CoV-2 recombinant nucleocapsid protein (SCoV2-rN) was evaluated using PPR spectroscopy. The interaction strength between anti-SCoV2-rN and the immobilized antigen was determined by kinetic analysis, and the equilibrium dissociation constant (K_D) was calculated. Antibody concentrations ranging from 1 to 30 nmol L^{-1} were investigated, and the interaction was monitored until equilibrium was reached. The calculated K_D value was 6.49×10^{-8} mol L^{-1}, indicating a strong and specific antigen–antibody interaction, with a maximum response (B_{max}) of 559 ± 33 m°.

The analytical performance of the developed PPR immunosensor was further assessed by detecting anti-SCoV2-rN in the concentration range of 0.3–50 nmol L^{-1}. A linear response ($R^2 = 0.9958$) was obtained between 0.5 and 50 nmol L^{-1}. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined to be 0.057 nmol L^{-1} and 0.19 nmol L^{-1}, respectively. The immunosensor demonstrated good repeatability, with a relative standard deviation (RSD) of 4.5% for five consecutive measurements at 7 nmol L^{-1}.

Selectivity studies performed using non-target anti-COMP showed negligible nonspecific binding compared to the target antibodies, confirming high sensor specificity. Additionally, no interference was observed in the presence of 0.1 mol L^{-1} HEPES buffer. Overall, the developed PPR immunosensor exhibits high specificity, good repeatability, and suitable analytical performance for the label-free detection of anti-SCoV2-rN.

CONCLUSIONS

1. QD-anti-CD44 conjugates were successfully synthesized using different initial molar ratios of QD-NH_2 and anti-CD44. Based on the interaction of the prepared bioconjugates with immobilized CD44 protein, evaluated by SPR spectroscopy, a 1:10 molar ratio of QD-NH_2 to anti-CD44 was found to be optimal for conjugation. It was also demonstrated that the prepared conjugates selectively interact with immobilized CD44 protein.
2. An initial SCoV2-rN protein concentration of 500 nmol L^{-1} and an acetate buffer solution, pH 5.3, were identified as the optimal conditions for SCoV2-rN protein immobilization and for the detection of anti-SCoV2-rN using the SPR immunosensor. The optimal regeneration conditions were found to be treatment of the SPR chip for 500 s with a solution of 10 mmol L^{-1} NaOH and 0.5% SDS.
3. The SPR direct-format immunosensor is suitable for the detection of anti-SCoV2-rN antibodies in the concentration range of 0.5–50 nmol L^{-1} (75–7500 ng mL^{-1}). The developed immunosensor exhibits good repeatability (RSD = 4.5%) and selectivity, with the limits of detection and quantification being 0.057 nmol L^{-1} (8.55 ng mL^{-1}) and 0.19 nmol L^{-1} (28.5 ng mL^{-1}), respectively.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.