

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
KEEMIA INSTITUUT

Ave Kuusk

**MAHTUVUSLIKU IMMUNOSENSORSÜSTEEMI
KONSTRUEERIMINE BIOMARKERITE
MÄÄRAMISEKS**

Magistritöö

Juhendajad: Toonika Rinke, PhD

Meeme Utt, PhD

Carl-Fredrik Mandenius, Prof

Gunnar Bergström, MSc

Tartu 2015

SISUKORD

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 MAHTUVUSLIKUD BIOSENSORID	6
1.2 ANTIKEHADE IMMOBILISEERIMINE.....	10
1.2.1 Füüsikaline adsorptsioon.....	11
1.2.2 Kovalentne mittesuunatud immobiliseerimine.....	11
1.2.3 Kovalentne suunatud immobiliseerimine.....	12
1.2.3.1 Suunavate või märgistatud valkude kasutamine	12
1.2.3.2 Suunatud sidumine keemiliste ühenditega	13
1.3 BIOMARKERID.....	13
1.3.1 Troponiin T.....	14
1.3.2 Inimese vereseerumi albumiin	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	16
2.1 KASUTATUD SEADMED.....	16
2.2 KASUTATUD REAKTIIVID JA MATERJALID.....	16
2.3 METOODIKA.....	18
2.3.1 Mahtuvuse mõõtmine	18
2.3.2 Elektroodi pinna modifitseerimine ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine	20
2.3.2.1 Polütüramiini aktiveerimine glutaaraldehüüdiga ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine.....	20
2.3.2.2 IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine kulla nanoosakeste pinnale	21
2.3.2.3 SAM aktiveerimine 1-etüül-3-(3'-dimetüülpropüül)karbodiimiid/N-hüdrosüsuktsiinimiid (EDC/NHS) lahusega ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine.....	21
2.3.2.4 SAM aktiveerimine tresüülkloriidiga ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine.....	22
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	23
3.1 MODIFITSEERITUD ELEKTROODIDE VÕRDLUS ANALÜÜDI MÄÄRAMISEKS	23
3.1.1 Polütüramiinile seotud IgG tüüpi antikehadega tööelektrood.....	23

3.1.2 Polütüramiinil olevate kulla nanoosakeste külge seotud IgG tüüpi antikehadega tööelektrood.....	24
3.1.3 16-merkaptotioheksadekaan-1-ool kihile immobiliseeritud IgG tüüpi antikehaga tööelektrood.....	25
3.1.4 16-merkaptotioheksadekaanhappe kihile immobiliseeritud IgG tüüpi antikehaga tööelektrood.....	26
3.2 OPTIMAALSETE MÕÕTMISTINGIMUSTE LEIDMINE	27
3.2.1 IgG tüüpi antikeha immobiliseerimiseks kasutatava puhvri pH optimeerimine	27
3.2.2 Regenereerimispuhvri pH optimeerimine	28
3.3 KALIBREERIMISGRAAFIKU KONSTRUEERIMINE cTnT MÄÄRAMISEKS MAHTUVUSLIKU BIOSENSORIGA	29
3.4 ELEKTROODI KATVA 16-MERKAPTOHEKSADEKAANHAPPE ISOLATSIOONIKIHI PAKSUS	30
3.5 cTnT MÄÄRAMINE SÜDAMERAKU KASVUSUBSTRAADIS	31
3.6 BIOSELEKTIIVSE ELEKTROODI ELUEA HINDAMINE.....	31
KOKKUVÕTE	33
KASUTATUD KIRJANDUS	35
SUMMARY	38

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

AuNP- kulla nanoosake

CCM- raku kasvukeskkond

C_H- Ig ahela konstantne raske domeen

C_L- Ig ahela konstantne kerge domeen

cTnT- kardialne troponiin T

EDC- 1-etüül-3-(3-dimetüülaminopropüül) karbodiimiid

Fab- antigeeni siduv fragment

Fc- Ig kristalliseeruv fragment

HIV- inimese immuunpuudulikkuse viirus

HSA- inimese seerumi albumiin

Ig- immunoglobuliin

IgG- immunoglobuliin G

mAb- monoklonaalne antikeha

NHS- N- hüdroksüsuktsiinimiid

PB- fosfaatpuhver

PrA- valk A

PrG- valk G

SAM- isemoodustuv monokiht

Tn- troponiin

TnC- troponiin C

TnI- troponiin I

TnT- troponiin T

V_H- Ig ahela varieeruv raske domeen

V_L- Ig ahela varieeruv kerge domeen

SISSEJUHATUS

Kiire, kuid samas usaldusväärne analüüdi määramine on tänapäeval äärmiselt oluline nii kliinilises diagnostikas, toiduainetööstuses, keskkonnaseires ning mujal. Enamasti on mõõdetavad analüüdi kontsentratsioonid proovides küllalt väiksed ning seetõttu on vajalik uute, tundlike meetodite väljatöötamine. Viimasel ajal on märgatavalt kasvanud biosensorite, kui selektiivsete analüütiliste seadmete, kasutamine mitmetes eelpool nimetatud valdkondades.

Elektrokeemiliste biosensorite rakendamine kliinilises diagnostikas pakub viimasel ajal üha enam huvi, sest see võimaldab analüüdi määramist keerukates maatriksites ning madala proovi avastamispiiriga. Lisaks on üha enam suurenenud biosensoritel põhinevate toksikoloogiliste uuringute hulk. Hetkel kasutatakse toksiliste ainete toime hindamisel peamiselt siiski loomudeleid. Lisaks sellele, et loomkatsetega on seotud mitmed eetilised piirangud, ei ole loomade kasutamine inimestele mõeldud ravimite võimaliku toksikoloogilise mõju uurimisel efektiivne. Elektrokeemilised biosensorid on üheks alternatiivseks meetodiks, mida on võimalik rakendada ravimikandidaatide testimisel.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli konstrueerida spetsiifilisel antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhinev mahtuvuslik biosensor troponiin T selektiivseks määramiseks, mida saaks rakendada analüüdi *in vitro* kvantitatiivseks mõõtmiseks südamelihase raku kasvukeskkonnas. Troponiin T detekteerimiseks kõige sobivama mõõtmiskeemi leidmiseks uuritakse erineva isoleeriva pinnakattega töödeldud kulla kihiga kaetud ränielekroode.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mahtuvuslikud biosensorid

Biosensor on analüütiline seade, mis muudab bioloogilise reaktsiooni mõõdetavaks signaaliks. Sensor koosneb kahest peamisest komponendist: bioloogilisest analüüti äratundvast materjalist (ensüüm, antikeha, nukleiinhape jms.) ja füsikokeemilisest andurist, mis muudab bioäratundmisreaktsiooni elektriliseks, optiliseks või muuks mõõdetavaks signaaliks. Signaali genereeriva anduri järgi jagunevad biosensorid optilisteks, elektrokeemilisteks, termomeetrilisteks ja piesoelektrilisteks sensoriteks [1].

Elektrokeemilised sensorid mõõdavad analüüdi seondumise tulemusena tekkinud voolu, pinget või mahtuvuse muutust. Mõõdetava parameetri alusel jagatakse antud sensorid vastavalt amperomeetrilisteks, potentsiomeetrilisteks ja impedimeetrilisteks biosensoriteks. Elektrokeemiliste sensorite peamiseks eelisteks on madalad analüüdi määramispiirid, väike proovikulu ja analüüsi lihtsus. Lisaks võimaldavad elektrokeemilised sensorid uuritava aine määramist ka hägustes proovides ning puudub vajadus analüüdi eelnevaks märgistamiseks markeriga [2]. Elektrokeemiliste sensorite efektiivsus ja selektiivsus analüüdi määramiseks sõltub oluliselt pinnakatte valikust ning analüüsitingimustest. Näiteks mõjutab mõõtmise oluliselt proovilahuse pH ja ioontugevus [3].

Mahtuvuslik biosensor kuulub impedimeetriliste sensorite hulka ning baseerub analüüdi seondumise poolt põhjustatud kaksikkihi mahtuvuse muutuse kaudsel mõõtmisel. Lihtsustatult võib mõõterakku ette kujutada kui kahest elektrolüüdilahusesse sukeldatud paralleelsest elektroodist koosnevat süsteemi, mille mahtuvus C avaldub järgmiselt:

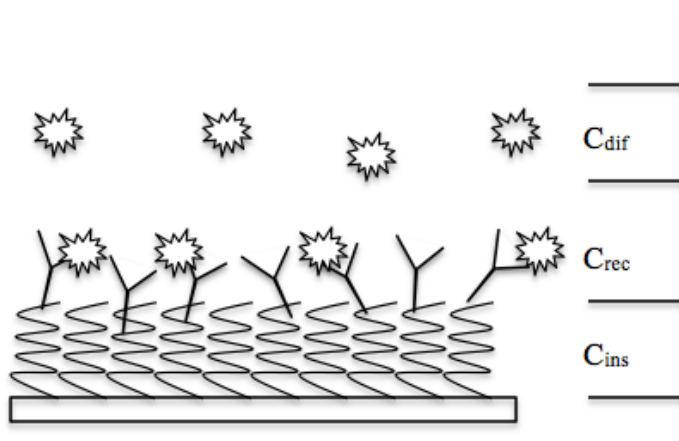
$$C = (\epsilon_r \epsilon_0 A) / d \quad (1),$$

kus ϵ_r on elektrodidevahelise keskkonna dielektriline läbitavus, ϵ_0 vaakumi suhteline dielektriline läbitavus, A elektroodi pindala ja d elektrodidevaheline kaugus. Praktikas mõõdetakse sensoriga elektrodidevahelise kauguse või keskkonna dielektrilise läbitavuse muutusest põhjustatud mahtuvuse muutust [4].

Elektrolüüdilahusesse sukeldatud elektrood käitub kui kondensaator, sest ta on võimeline salvestama laenguid. Kindlal potentsiaalil omandab elektrood laengu q_m ja elektrolüüdilahus sama suurusejärguga, kuid vastasmärgilise laengu $-q_s$. Dipoolmomenti või laengut omavad molekulid ja ioonid kogunevad elektrood – lahus piirpinnale ning moodustub elektriline kaksikkiht, mille mahtuvuse väärtus jääb tavaliselt kümnete nF/cm^2 suuruse järku. Üldiselt oletatakse, et tekkinud kaksikkiht koosneb mitmest järjestikku asetsevast õhemast kihist. Lahuse molekulid ja spetsiifiliselt pinnale adsorbeerunud molekulid moodustavad Helmholtz – Sterni kihi ning mittespesiifiliselt adsorbeerunud osakesed difuusse kihi. Summaarset mahtuvust C_{tot} elektrood – lahus piirpinnal võib vaadelda kui kolme järjestikuse kihi poolt põhjustatud mahtuvust, mille pöördväärtus on võrdne üksikute kihtide pöördväärtuste summaga:

$$1/C_{tot} = 1/C_{ins} + 1/C_{rec} + 1/C_{dif} \quad (2),$$

kus C_{ins} , C_{rec} ja C_{dif} on vastavalt elektroodi katva isoleeriva kihi, bioloogilise kihi ja difuusse kihi mahtuvus (joonis 1). Proovi viimisel mõõterakku asendab hüdrofoobsem analüüdi molekul elektroodilähedases ruumis hüdrofiilsed elektrolüüdi lahuse molekulid, bioloogilise kihi paksus suureneb ning dielektriline läbitavus ning mahtuvus vähenevad vastavalt võrrandile 1.



Joonis 1. Kaksikkihi ehitus elektroodi pinnal, kus C_{dif} , C_{rec} ja C_{ins} märgivad vastavalt difuusse, bioloogilise ja isoleeriva kihi mahtuvusi.

Selleks, et avaldises 2 domineeriks bioloogilise kihi mahtuvuse muutus, on elektroodi pinna efektiivne modifitseerimine äärmiselt oluline. Võrrand 2 kehtib, kui elektroodi

pind on täielikult kaetud ning kihi ebaühtlusest põhjustatud mõjud võib arvestamata jätta. Pinnakihi isoleerivaid omadusi on võimalik uurida tsüklilise voltamperomeetriaga, kasutades redokspaaridena kas $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}/\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ või $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ [5].

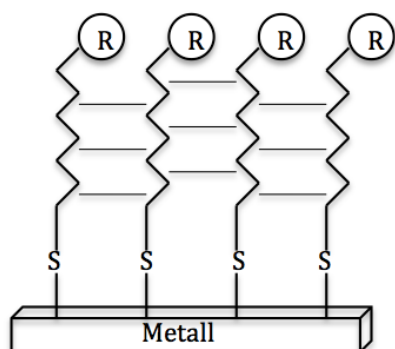
Oluliseks komponendiks mahtuvusliku biosensori konstrueerimise juures on elektroodi materjali koostis. Üldiselt kasutatakse elektroodina kas pooljuhte või metalle. Bioloogilist äratundvat kihti on võimalik immobiliseerida otse metalli pinnale või metallil oleva väevli aatomit sisaldavate monokihi (SAM) molekulide külge [2].

Enamasti kasutatakse elektrokeemilistes sensorites monokihiga kaetud metallpinnaga elektroode. Sellistest monokihti moodustavatest molekulidest on kõige enam levinud tiolid (R-SH) disulfiidid (R-S-S-R) ja sulfiidid (R-S-R), mis interakteeruvad kulla, hõbeda, plaatina ja vaske pinnaga. Pikad alküülhelad, kus metüülrühmade arv on suurem kui 10 ($n > 10$), moodustavad metalli pinnale kompaktselt kristalli laadse struktuuri. Metüülrühmade arvu vähenedes kaob korrapära. Kuna kuld on võrdlemisi inertne metall, siis leiab ta tööpinnana kõige enam rakendust.

Monokihi moodustumise protsess kuldplaadile koosneb kahest erineva kiirusega etapist. Esimeses, kiirel etapil, oksüdeerub tiolrühma väävel, kulla ja väevli aatomi vahele tekib tugevalt kovalentne side ning alküülhelad adsorbeeruvad metalli pinnale.



Järgnevas, aeglases etapil, interakteeruvad tööpinnal olevad alküülhelad omavahel van der Waalsi jõududega ning toimub struktuuri stabiliseerumine [6]. Selle tulemusena moodustub kristalne struktuur, mis on stabiilne nii õhu käes kui ka vee- ja etanooli lahuses (joonis 2).



Joonis 2. SAM metalli pinnal. Molekulid on moodustanud metalli pinnal kompakse struktuuri, kus ahelad on omavahel ühendatud van der Waalsi sidemetega.

Bioloogilise, analüüti siduva, elemendi immobiliseerimiseks aktiveeritakse tavaliselt SAM molekulide vabad funktsionaalrühmad. Näiteks karbosküülrühmade aktiveerimiseks kasutatakse enamasti N-hüdrosüsuktsiinimiidi (NHS) ja 1-etüül-3-(3-dimetüülaminopropüül)- karbodiimiidi (EDC) lahust [5].

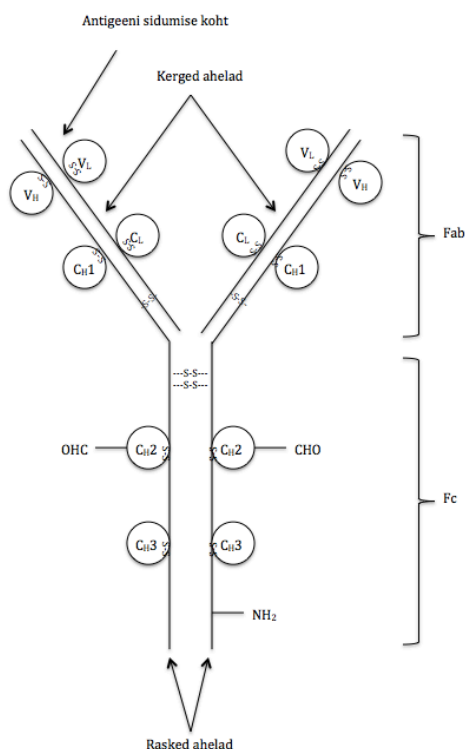
Mahtuvuslikud biosensorid on viimasel ajal laialdaselt rakendust leidnud erinevate biomolekulide määramiseks [4]. Tabelis 1 on toodud lühike ülevaade mahtuvuslike biosensorite kasutamisest erinevate analüütide määramiseks.

Tabel 1. Mahtuvuslikud biosensorid erinevate analüütide määramiseks

Analüüt	Isoleeriv kiht	Bioselektiivne kiht	Keskkond	Lineaarne ala	Avastamispiir	Viide
<i>E. coli</i> proteoom	Lipohape	<i>E.coli</i> (HCP) vastane pAb	10 mM PB pH 7,0	$1,0 \times 10^{-17}$ - $1,0 \times 10^{-13}$ M	$8,0 \times 10^{-18}$ M	[7]
HIV-1 p24 antigeen	Polütüramiin+AuNp	HIV-1 p24 vastane mAb	10 mM PB pH 7,2 0,01% Tween 20	1×10^{-19} - 1×10^{-16} M	$3,3 \times 10^{-21}$ M	[8]
Mikro- tsüstiin	Polütüramiin+AuNp	Adda vastane mAb (AD4G2)	10 mM PB pH 7,2	$1,0 \times 10^{-13}$ - $1,0 \times 10^{-10}$ M	$2,1 \times 10^{-14}$ M	[9]
Veise kalpastatiin	11-merkaptoundetsaan hape	PrA+ kalpastatiini vastane mAb	10 mM PB pH 7,4	$4,3 \times 10^{-10}$ - $3,4 \times 10^{-9}$ M	-	[10]
Koolera toksiin	Lipohape	Koolera toksiini vastane mAb	10 mM PB pH 7,4	$1,0 \times 10^{-13}$ - $1,0 \times 10^{-10}$ M	$1,0 \times 10^{-14}$ M	[11]

1.2 Antikehade immobiliseerimine

Antikehad ehk immunoglobuliinid (Ig) on B-rakkude poolt toodetud glükoproteiinid, mis tunnevad ära kehavõõraid makromolekule ehk antigeene. Neid jagatakse vastavalt raske ahela järgi viite erinevasse klassi: IgG, IgA, IgM, IgE ja IgD. IgG on immunoglobuliinidest kõige levinum ning tema keskmine molekulmass on 150 kDa [12]. Ta koosneb kahest identsest raskest (H) ja kahest identsest kergest (L) ahelast, mis on omavahel disulfiidsidemetega kovalentselt ühendatud. Antikeha raske ahel koosneb varieeruvast domeenist V_H ja kolmest konstantsest domeenist C_{H1} , C_{H2} ja C_{H3} . Kerge ahel koosneb ühest varieeruvast domeenist V_L ja ühest konstantsest domeenist C_L [13]. Immunoglobuliin G skemaatiline struktuur on toodud joonisel 3.



Joonis 3. Immunoglobuliin G struktuur. Antigeeni seondumiskohad asuvad Fab fragmendi V_H ja V_L domeenides. CHO tähistab suhkrujäägi aldehüüdrühma.

Esimesed teated antikehade immobiliseerimisest tahkele kandjale pärinevad 1967. aastast ning alates sellest ajast on see tehnoloogia leidnud laialdast rakendust nii afiinsuskromatograafias, biosensorites, meditsiinilises diagnostikas kui ka terapeutikas [14]. Antikehade immobiliseerimistehnikad võib jagada kolme suuremasse rühma:

1. Füüsikaline adsorptsioon tahkele pinnale
2. Kovalentne mittesuunatud immobiliseerimine

3. Kovalentne suunatud immobiliseerimine

1.2.1 Füüsikaline adsorptsioon

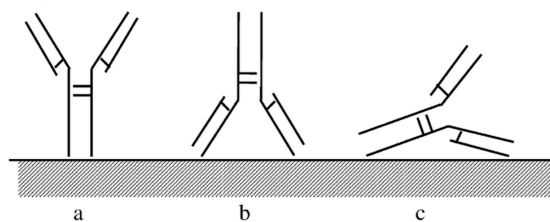
Füüsikaline adsorptsioon põhineb antikehade mitte-spetsiifilisel interaktsioonil pinnaga. Nendeks interaktsioonideks on iooniline- ja vesinikside, hüdrofoobne vastasmõju ja van der Waalsi jõud. Tekkivate sidemete hulk ja ulatus sõltub tahke pinna ning antikeha omadustest [14]. Füüsikaline adsorptsioon on mittesuunatud immobiliseerimismeetod, mis tähendab, et antikeha orientatsioon pinnal on juhuslik ning tema antigeeni siduvad piirkonnad ehk paratoobid ei pruugi olla analüüdi sidumiseks sobivas asendis [15].

1.2.2 Kovalentne mittesuunatud immobiliseerimine

Antikehade kovalentseks immobiliseerimiseks kasutatakse mitmesuguseid keemilisi ühendeid, mis võib jagada kolme suuremasse rühma:

- 1) Lahustuvad aktiveerivad ühendid, näiteks karbodiimiid ja suktsiinimiid, mis aktiveerivad kandja pinnal oleva karboksüülrühma ning võimaldavad antikeha otsest sidumist aminorühma kaudu [16].
- 2) Lahustuvad bifunktsionaalsed ristsiduvad ühendid, mis toimivad funktsionaalrühmi ühendavate sildadena. Sellistest ühenditest kasutatakse kõige enam glutaaraldehüüdi ja maleiinanhydriidi. Eraldi alarühma moodustavad fotoaktiivsed keemilised ühendid, näiteks bensofenooneid ja diasiriinid, mis valgusega ergastamise toime moodustavad immobiliseeritava valguga kovalentse sideme.
- 3) Tahke kandjaga seotud aktiivset rühma sisaldavad polümeerid. Selliselt aktiveeritud tahked pinnad on keemiliselt võrdlemisi stabiilsed ning moodustavad immobiliseeritava valguga $-NH_2$, $-OH$ või $-SH$ funktsionaalrühma vahendusel kovalentse sideme [14].

Kõikide eespool loetletud immobiliseerimismeetodite suurimaks puuduseks on antikehade juhuslik mittesuunatud orientatsioon pinnal, mistõttu ei ole kõik paratoobid antigeenidele seondumiseks vabalt ligipääsetavad (joonis 4).



Joonis 4. Antikehade võimalik asend pinnal kasutades mittesuunatud immobiliseerimismeetodeid. Paratoobid võivad olla kas täielikult antigeenidele seondumiseks kättesaadavad (a), antigeenidele täielikult seondumiseks ligipääsmatud (b) või osaliselt ligipääsetavad (c) [14].

1.2.3 Kovalentne suunatud immobiliseerimine

Viimastel aastakümnetel on palju tähelepanu pälvinud antikehade suunatud immobiliseerimismeetodite väljatöötamine ja rakendamine, mille eesmärgiks on antikehade orienteerimine pinnale nii, et paratoobid on antigeenide sidumiseks sobivas asendis (joonis 3 a) [17]. Suunatud immobiliseerimise läbiviimiseks kasutatakse mitmeid lahendusi, mida järgnevalt lähemalt tutvustatakse.

1.2.3.1 Suunavate või märgistatud valkude kasutamine

Enamasti kasutatakse antikehade suunavaks immobiliseerimiseks mikroobset päritolu valke G (PrG) ja A (PrA), mis pärinevad vastavalt C ja G rühma *Streptococcus*'te ja *Staphylococcus aureus*'e rakumembraanist. Neil on neli antikeha siduvat domeeni, mis interakteeruvad antikeha Fc fragmendi aminorühmaga [18]. Steerilistel põhjustel ei ole kõik PrA ja PrG aminorühma siduvad piirkonnad antikehadele seondumiseks korraga ligipääsetavad. PrG ja PrA immobiliseerimiseks tahke pinna külge kasutatakse eespool loetletud kovalentse sidumise meetodeid [19]. Näiteks PrG immobiliseerimiseks kasutatakse tavaliselt pinna aktiveerimist glutaaraldehüüdiga või valgu sidumist epoksürühmade kaudu [14]. Sarnaselt antikehade kovalentsele immobiliseerimisele, ei ole ka PrA ja PrG sidumine pinnale kasutades eelnimetatud kemikaale suunatud. Seetõttu märgistatakse valgud sageli tsüsteiiniga. Modifitseeritud valgu immobiliseerimisel tööpinnale moodustub tsüsteiini tiolrühmade ja kulla aatomite vahele kovalentne side. Tihti kasutatakse immobiliseerimiseks ka seotavate antikehade eelnevat märgistamist biotiiniga ning selle järgevat sidumist streptavidiini või avidiiniga kaetud pinnale [19].

1.2.3.2 Suunatud sidumine keemiliste ühenditega

Antikehade suunavaks immobiliseerimiseks pinnale kasutatakse laialdaselt ka nende eelnevat töötlemist mitmesuguste keemiliste ühenditega. Üheks võimalikuks suunatud immobiliseerimise meetodiks on antikeha Fc fragmendi glükaani oksüdeerimine naatriumperiodaadiga. Selle tulemusena avaneb suhkru ahel ning tekib vaba aldehüüdrühm, mis võib reageerida tahke kandja pinnal oleva aminorühmaga. Kuna antikehad sisaldavad glükaane ainult raske ahela C_{H2} domeenis, siis see võimaldab antikehal seonduda pinnale nii, et Fab otsad on antigeenide sidumiseks sobivas asendis [20]. Lisaks kasutatakse ka antikeha Fab fragmentide kovalentset sidumist otse kulla kihiga kaetud tööpinna. Selleks lõigatakse immobiliseeritav antikeha papaiiniga kaheks Fab ja üheks Fc fragmentiks. Antigeeni siduva fragmendi ühes otsas olev vaba sulfhüdrüülrühm on võimeline seejärel moodustama pinnal oleva kulla aatomitega tugeva kovalentse sideme [21].

1.3 Biomarkerid

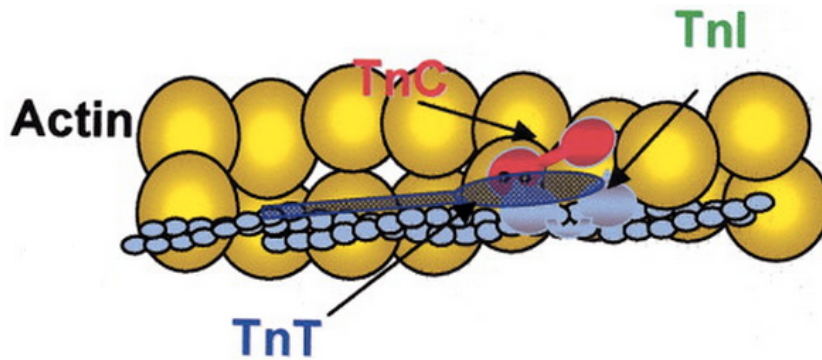
Biomarker on mõõdetav keemiline, füüsikaline või bioloogiline suurus, mis tekib organismis vastusena nt. haigusele, toksilistele ainetele või patogeenidele [22]. Biomarkerite määramist on võimalik kasutada mitmesuguste haiguste diagnoosimiseks ja haiguse kulgemise järgimiseks. Viimasel ajal on biomarkerid lisaks meditsiinile üha enam rakendust leidnud ka ravimite ja teiste ainete toksikoloogilistes uuringutes. Paraku põhinevad tänapäeval veel paljud toksilisuse hindamise meetodid loomudelitel. Loomudelite rakendamisega teaduses kaasnevad mitmed eetilised probleemid, kuid lisaks sellele ei ole loomad kõige sobivamad mudelid inimorganismi kirjeldamiseks. Biomarkerite määramine biosensoriga võib olla alternatiivseks variandiks toksilisuse hindamiseks. Kasutades *in vitro* süsteeme on võimalik uurida ravimite mõju *in vivo* rakutasandil [23]. Üha laialdasemalt kasutatakse biomarkerite määramist ka meditsiinilises diagnostikas, kus enamkasutatavate biomarkerite kohta on toodud näiteid tabelis 2.

Tabel 2. Erinevad biomarkerid ja nende rakendamine meditsiinis [22].

Bioloogiline keskkond	Biomarker	Rakendus
Amnionivedelik (lootevesi)	Alfafetoproteiin (AFP)	Sünnieelne diagnostika
Vereseerum	Kreatiniin	Neeruhaiguste diagnostika
Vereseerum	Troponiin I ja T	Müokardiinfarkti (ÄMI) diagnostika
Tserebrospinaalvedelik (pea- ja seljaaju vedelik)	Amüloid β ja Tau valk	Dementsuse diagnostika
Kõhuõõnevedelik	Amülaas	Pankreatiidi diagnostika
Higi	Kloriid	Tsüstiline fibroos
Uriin	Hematuuria (vererakud uriinis)	Neeru- ja kuseteede haiguste diagnostika

1.3.1 Troponiin T

Troponiin on kolmest alaühikust TnT, TnI ja TnC koosnev südame- ja skeletilihase valk, mis reguleerib lihaste kontraktsiooni. Südamelihase sarnaneb ehituselt skeletilihasega, kuid südamelihase rakud on hargnenud ja moodustavad üksteisega tugevasti ühendatud võrgustiku. Lihaste kokkutõmbevõime tagavad spetsiifilised lihasraku organellid- müofibrillid. Müofibrillid koosnevad peenematest aktiini ja jämedamatest müosiini filamentidest. Lisaks aktiinile sisaldavad peenemad filamendid ka tropomüsiini ja troponiini kompleksvalku. Kõigil kompleksivalgu troponiinidel on lihases kindel ülesanne. Troponiin C (18 kDa) ülesandeks on lihase kontraktsiooni algatamiseks Ca^{2+} ionide sidumine. Troponiin I (24 kDa) inhibeerib lihase puhkeolekus aktiini seondumist müosiiniga ning troponiin T (37 kDa) stabiliseerib aktiini filamendi troponiini kompleksiga ja seob selle tropomüsiiniga. Südamelihase kahjustuse tagajärjel troponiini kompleks laguneb. Südamelihases on TnT ja TnI valkude aminohappeline järjestus võrreldes skeletilihase omaga erinev ning see võimaldab veres eristada skeleti- ja südamelihasest pärinevat TnT ja TnI. Seetõttu on troponiin T ja I väga efektiivsed ja spetsiifilised biomarkerid südamelihase kahjustuse varajasel avastamisel ja müokardiinfarkti diagnoosimisel [24]. Kardialse müofibrilli filamendi illustreeriv skemaatiline struktuur on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Kardiaalse müofibrilli filament. Aktiini monomeerid moodustavad heeliksi sarnase struktuuri. TnC on Ca^{2+} ioone siduv troponiini alaühik, TnI on inhibiitor ning TnT seob kogu troponiini kompleksi aktiini filamendi külge [25].

1.3.2 Inimese vereseerumi albumiin

Inimese vereseerumi albumiin (HSA) on vereplasmas kõige enam esinev ning ühtlasi ka kõige laialdasemalt uuritud valk. HSA on monomeer, mille molekulmass on 66 kDa ja mis koosneb kolmest homoloogilisest alfa heeliksi domeenist [26]. Albumiin sünteesitakse maksas ning selle keskmine sisaldus vereplasmas on 35-50 g/l [27]. Tema peamisteks ülesanneteks organismis on vere pH ja osmootse rõhu säilitamine ja kontrollimine ning mitmesuguste endogeensete ja eksogeensete ligandide transport. Lisaks mõjutab HSA oluliselt ravimite toimeefektiivsust ja nende levimise kiirust organismis. Albumiin on samuti olulise tähtsusega biomarker mitmesuguste haiguste diagnoosimisel. Vähenenud albumiini väärtus võib viidata näiteks mitmesugustele kroonilistele- ja maksahaigustele [26].

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud seadmed

CapSenze biosensorsüsteem (CapSenze HB)

Ellipsomeeter (Rudolph Research AutoEl)

pH meeter Metrohm 744

Analüütiline kaal Denver Instrument Company (täpsus 0,01 mg)

Peristaltiline pump Alitea AB

Ultrahelivann

2.2 Kasutatud reaktiivid ja materjalid

2,2,2-Trifluoroetaansulfonüülkloriid $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$ (Fluka Chemika, min 97%)

Vesinikperoksiidi H_2O_2 30% lahus (VWR International)

Vesinikkloriidi 1 M lahus HCl (Sigma)

Atsetoon CH_3COCH_3 (Merck KGaA, min 99,8%)

Ammooniumhüdrosiidi (NH_4OH) 25% lahus (VWR International)

16-merkaptotseksadekanoidhape (Sigma)

N-hüdrosüsuktsiinimiid (GE Healthcare)

1-etüül-3-(3-dimetüülaminopropüül) kabrodiimiid (GE Healthcare)

Naatriumdivesinikfosfaat NaH_2PO_4 (Sigma, min 98%)

Naatriumvesinikfosfaat Na_2HPO_4 (Sigma, min 98.5%)

Tween 20 10% (GE Healthcare)

Etanool $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (VWR International Ltd, min 99,7%)

Etanoolamiin-HCl 1 M puhverlahus, pH 8,5 (GE Healthcare)

Kardiaalne troponiin T 100 $\mu\text{g/ml}$ (Hytest; Cat.# 8T13)

Kardiaalse troponiin T vastane hiire monoklonaalne antikeha 3,4 mg/ml (Hytest; LOT 13/11-T19-G7)

Inimese albumiini vastane küüliku polüklooraalne antikeha 11 g/l (Dako; Cat.# A 0001)

Inimese vereseerumi albumiin HSA (Sigma, min 96%; Cat.# A1887)

Glütsiin $C_2H_5NO_2$ (Sigma, min 99%)

Glutaaraldehüüdi $OHC(CH_2)_3CHO$ 25% vesilahus (Sigma)

Naatriumatsetaat CH_3COONa pH 4,0 (GE Healthcare)

Naatriumatsetaat CH_3COONa pH 4,5 (GE Healthcare)

Naatriumatsetaat CH_3COONa pH 5,0 (GE Healthcare)

Naatriumatsetaat CH_3COONa pH 5,5 (GE Healthcare)

Kulla nanoosakeste kolloidlahus (1% $HAuCl_4$ lahus 0,8 mM naatriumtsitraadi ja 0,0008% naatriumboorhüdriidi lahuses, Au nanoosakeste suurus 2-10 nm)

Kulla kihiga kaetud ränielektroodid (CapSenze HB, tööpind $0,07\text{ cm}^2$)

Raku kasvukeskkond RPMI 1640 (Gibco, Life technologies)

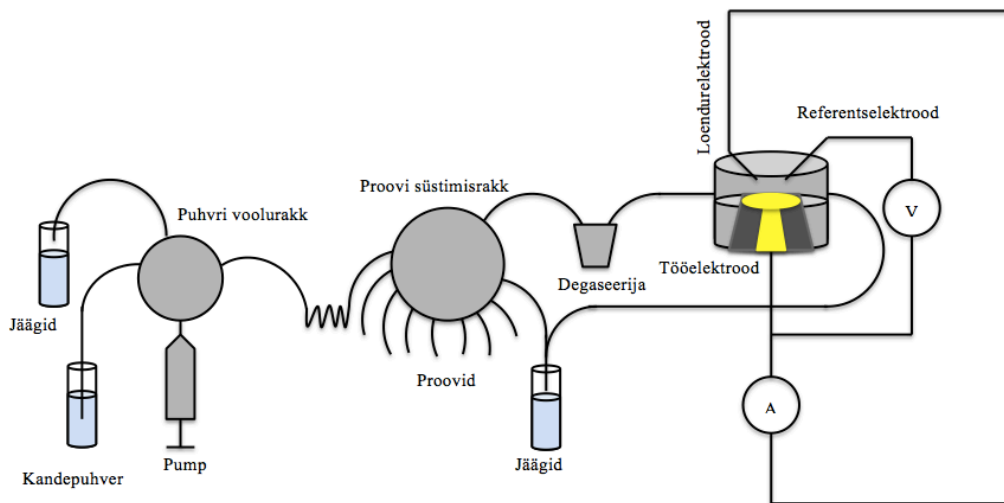
2.3 Metoodika

2.3.1 Mahtuvuse mõõtmine

Analüüdi kontsentratsiooni määramiseks kasutati mahtvuslikku läbivoolusensorit, mille põhimõtteline skeem on toodud joonisel 6. Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril.

Analüüdi määramiseks süstiti voolurakku 250 μl proovi. Pumba abil tagati proovi ja kandepuhvri ühtlane transport mõõterakku kiirusega 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Mõõterakk koosneb kolmest elektrodist: bioselektiivse kihiga modifitseeritud õhukese kulla kihiga kaetud ränielektroodist (tööelektrood) ning kahest platinatraat elektrodist, mida kasutatakse vastavalt referents- ja loendurelektroodina.

Enne mõõterakku jõudmist degaseeritakse proovi lahuse õhumullide eemaldamiseks. Analüüt seondub tööelektroodile immobiliseeritud bioäratundva kihi külge, mille tulemusena elektroodi katva kihi paksus suureneb ning dielektriline läbitavus ning mahtuvus vähenevad vastavalt valemile 1.



Joonis 6. Mõõtesüsteemi põhimõtteline skeem

Mahtuvuse mõõtmisetapp sensoriga koosneb kolmest alaetapist:

1. Esmalt rakendatakse tööelektroodi ja loendurelektroodi vahele 10 μA voolutugevusega voolu seni, kuni pinge tööelektroodi ja referentselektroodi

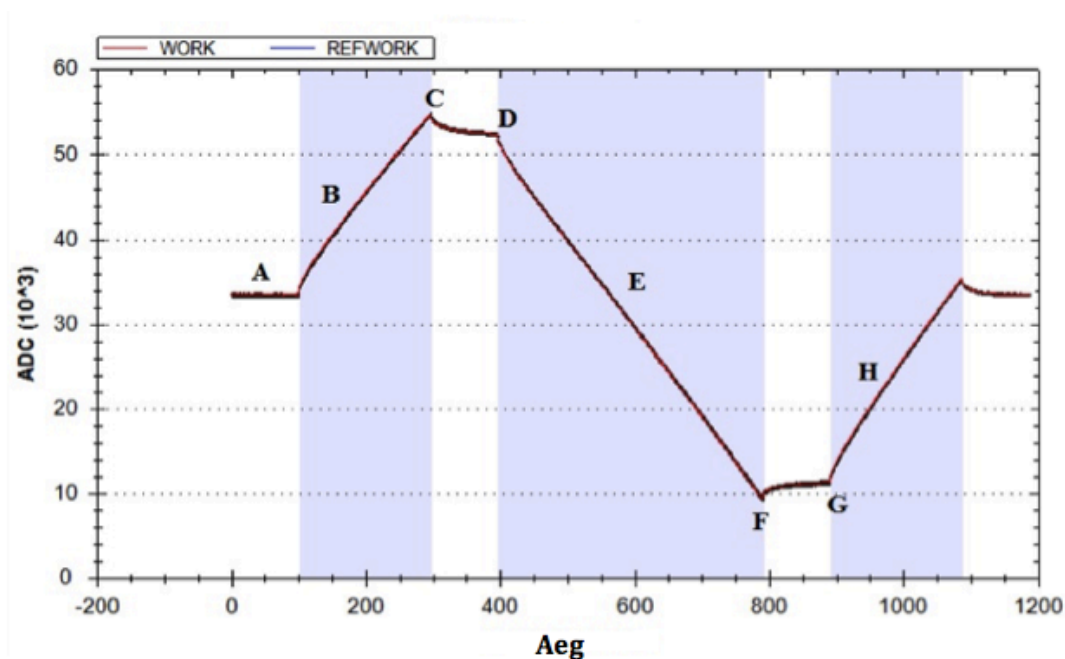
vahel saavutab väärtuse 100 mV (sirge B joonisel 7). Seejärel vool katkestatakse. Lõik CD joonisel 6 tähistab pinge väärtuse langust kui $I=0$.

- Järgnevalt rakendatakse elektrodidele negatiivse väärtusega vool tugevusega $-10 \mu\text{A}$, kusjuures voolu rakendamise aeg on kaks korda pikem kui esimeses alaetapis (sirge E). Lõigul FG on $I=0$.
- Lõpuks rakendatakse elektrodidele positiivse väärtusega konstantne vool tugevusega $10 \mu\text{A}$. Voolu rakendamise aeg on sama, mis esimeses alaetapis.

Ülalkirjeldatud alaetappe korratakse 60 sekundi jooksul viis korda. Mahtuvuse väärtus igas etapis arvutatakse vastavalt valemile 3 ning väljendatakse 5 punkti keskmise mahtuvusena.

$$C = (I \times t) / U \quad (3),$$

kus I on elektrodile rakendatud voolutugevus, t voolu rakendamise aeg ja U pinge, mis arvutatakse jooniselt 7 sirgete B, E ning H keskmistest tõusudest.



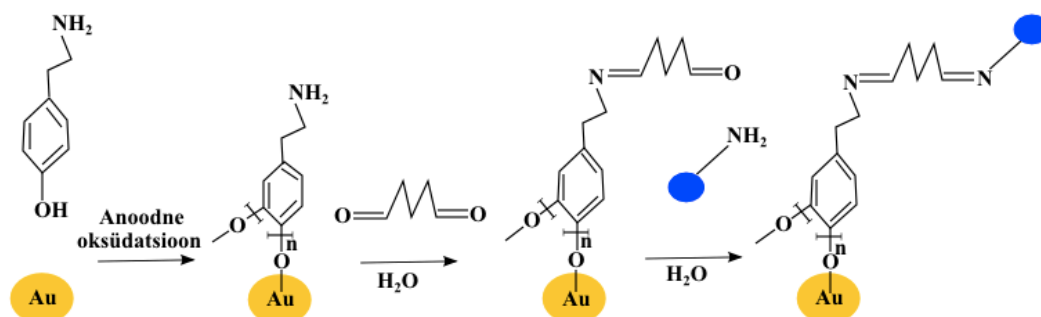
Joonis 7. Pinge muutuse graafik. Halli varjundiga märgitud piirkonnas toimub voolu rakendamine elektrodile.

2.3.2 Elektroodi pinna modifitseerimine ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine

Töö käigus uuriti erinevate pinnakatetega modifitseeritud elektrodide efektiivsust analüüdi määramiseks mahtvusliku biosensoriga. Järgnevalt kirjeldatakse mõõtmiseks kasutatavate elektrodide keemilist modifitseerimist ning hinnatakse nende sobilikkust inimese seerumi albumiini (HSA) ja kardialse troponiin T (cTnT) määramiseks sensoriga.

2.3.2.1 Polütüramiini aktiveerimine glutaaraldehüdiga ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine

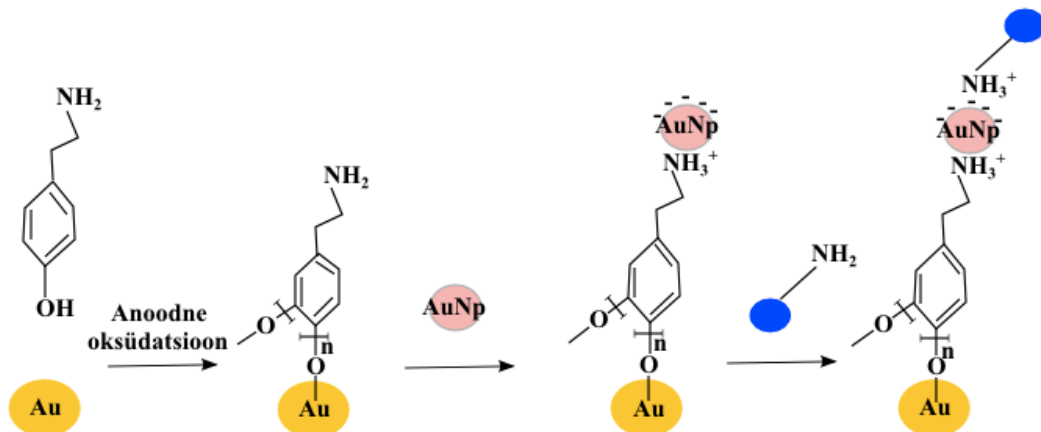
Analüüsiks kasutati õhukese kulla kihiga kaetud ränielektroodi, kuhu oli eelnevalt elektrokeemilise polümeriseerimise meetodil kantud kompaktna polütüramiini kiht. Elektroodi sonikeeriti füüsikaliselt adsorbeerunud türamiini eemaldamiseks 5 minutit, pesti etanooliga ning kuivatati lämmastiku voolus. Türamiinikihiga kaetud elektroodi töödeldi 2,5% glutaaraldehüüdi lahusega fosfaatpuhvril (10 mM pH 7,2) toatemperatuuril 20 min jooksul. Polümeeri vabad aminorühmad reageerivad glutaaraldehüüdi aldehüüdrühmaga ja moodustub Schiffi alus [9]. Pärast seda pesti elektroodi deioniseeritud vee ja fosfaatpuhvriga (10 mM PB pH 7,2). Tööpinnale kanti 20 µl 40 µg/ml inimese albumiini vastast küüliku IgG ning inkubeeriti 4°C juures 24 h. IgG aminorühm reageerib türamiini küljes oleva glutaaraldehüüdi teise vaba aldehüüdrühmaga. Seejärel pesti elektroodi fosfaatpuhvriga (10 mM PB pH 7,2) ning töödeldi vabade aktiivsete aldehüüdrühmade blokeerimiseks etanoolamiini lahusega (1 M pH 8,2) 20 min. Lõpuks pesti elektrood fosfaatpuhvriga (10 mM PB pH 7,2).



Joonis 8. Polütüramiini aminorühmade aktiveerimine glutaaraldehüdiga ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine.

2.3.2.2 IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine kulla nanoosakeste pinnale

Tööelektroodina kasutati polütüramiini kihiga kaetud ränielektroodi. Elektroodi sonikeeriti 5 minutit, pesti etanooliga ja kuivatati lämmastiku voolus. Seejärel kanti tööpinnale 20 µl kulla nanoosakeste kolloidlahust (1% H₂AuCl₄ 0,8 mM naatriumtsitraadi ja 0,0008% naatriumboorhüdriidi lahuses) ning inkubeeriti 4°C juures 6 h. Negatiivse pinnalaenguga nanoosakesed kemisorbeeruvad türamiini vaba aminorühma külge. Nanoosakeste eeliseks on nende suur eripind, mis võimaldab elektroodi pinnale immobiliseerida suuremal hulgal antikehi [9]. Elektrood pesti mitteseondunud nanoosakeste eemaldamiseks deioniseeritud vee ja fosfaatpuhvriga (10 mM PB pH 7,2) ja pinnale kanti 20 µl 40 µg/ml inimese seerumi albumiini vastast küüliku IgG lahust fosfaatpuhvris (10 mM PB pH 7,2) ning inkubeeriti 4°C juures 24 h. Toimub kemosorptsioon ning moodustub bioselektiivne kiht analüüdi sidumiseks. Elektrood pesti fosfaatpuhvriga (10 mM PB pH 7,2) ning aktiivsed vabad rühmad pinnal deaktiveeriti etanoolamiini lahusega (1 M pH 8,2) 20 minuti jooksul.

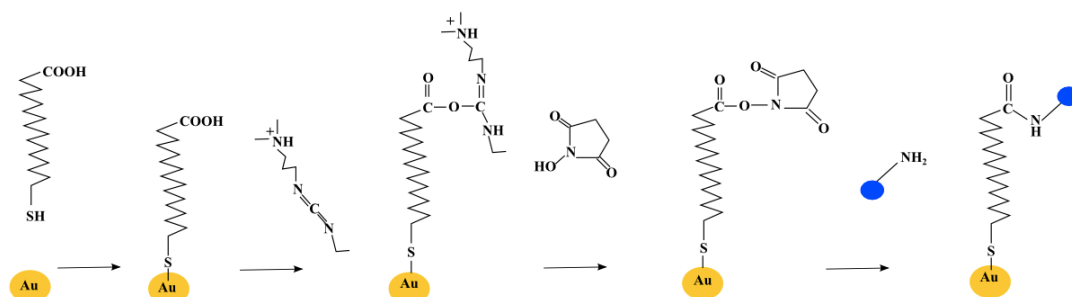


Joonis 9. IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine kulla nanoosakeste pinnale.

2.3.2.3 SAM aktiveerimine 1-etiül-3-(3'-dimetüülpropüül)karbodiimid/N-hüdrosüsuktsiinimiid (EDC/NHS) lahusega ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine

Kulla kihiga kaetud ränielektrood pesti Piranha lahusega (5:1:1 deioniseeritud vee, ammoniaagi ja vesinikperoksiidi lahus) 85°C juures 5 minutit. Pärast pesu mõõdeti ellipsomeetriga pinna optilised parameetrid SAM kihi paksuse mõõtmiseks. Seejärel inkubeeriti elektroodi 110 µM 16-merkaptohexadekanoidhappe ja 5% äädikhappe lahuses etanoolis toatemperatuuril 24 h. Elektrood pesti etanooliga, sonikeeriti 5 minutit ja mõõdeti ellipsomeetriga isoleeriva SAM kihi paksus kasutades varasemalt

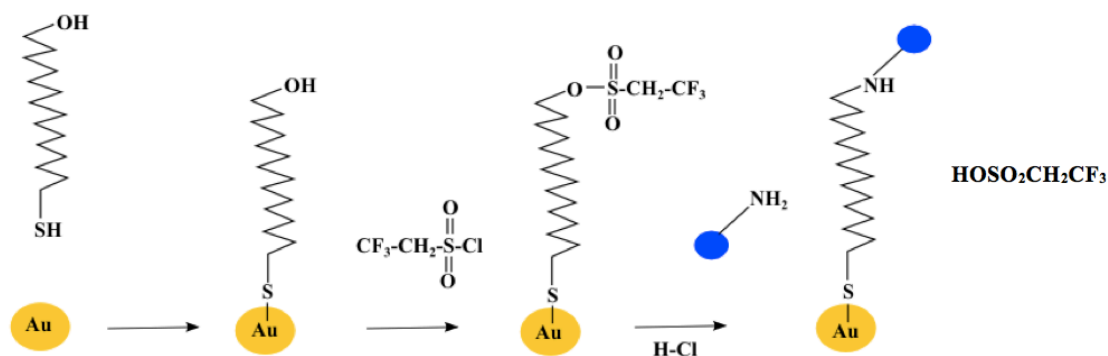
mõõdetud optilisi parameetreid. Elektroodi pesti uuesti etanooliga ja asetati mõõterakku. SAM molekulide vabade karboksüülrühmade aktiveerimiseks kanti mõõterakku EDC/NHS lahust voolutuskiirusega 50 µl/min 20 minuti jooksul. Inimese kardialse troponiin T vastasest hiire monoklonaalsest IgG-st valmistati 10 µg/ml kontsentratsiooniga lahus naatriumatsetaatpuhvis (10 mM pH 5,0) ning kanti rakku voolutuskiirusega 50 µl/min 10 minuti jooksul. Elektroodi pind deaktiveeriti etanoolamiini lahusega (1 M pH 8,5) 20 minuti jooksul.



Joonis 10. SAM aktiveerimine EDC/NHS lahusega ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine.

2.2.2.4 SAM aktiveerimine tresüülkloriidiga ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine

Kulla kihiga kaetud ränielektroodi pesti orgaaniliste jääkide eemaldamiseks Piranha lahusega 85°C juures 5 minutit. Seejärel inkubeeriti elektroodi 110 µM 16-merkaptohexadekaan-1-ool lahuses etanoolis toatemperatuuril 24 h. Elektroodi pesti 3 korda atsetooni ning seejärel 3 korda veevaba atsetooni lahusega. Elektroodi pinnaga nõrgalt seotud molekulide eemaldamiseks sonikeeriti elektroodi 5 minutit. Vabade hüdroksüülrühmade aktiveerimiseks asetati elektrood 30 minutiks 0,01% tresüülkloriidi lahusesse veevabas atsetoonis. Seejärel pesti elektroodi esmalt atsetooni ja seejärel 1 mM HCl lahusega ning modifitseeritud elektrood asetati mõõterakku. IgG tüüpi antikeha immobiliseerimiseks kanti elektroodile 10 µg/ml inimese seerumi albumiini vastast küüliku IgG-d fosfaatpuhvis (10 mM PB pH 7,4) 10 minuti jooksul voolutuskiirusega 50 µl/min. Aktiveeritud vabad hüdroksüülrühmad blokeeriti etanoolamiini lahusega (1 M pH 8,5) 20 minuti jooksul.



Joonis 11. SAM aktiveerimine tresüülkloriidiga ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimine.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

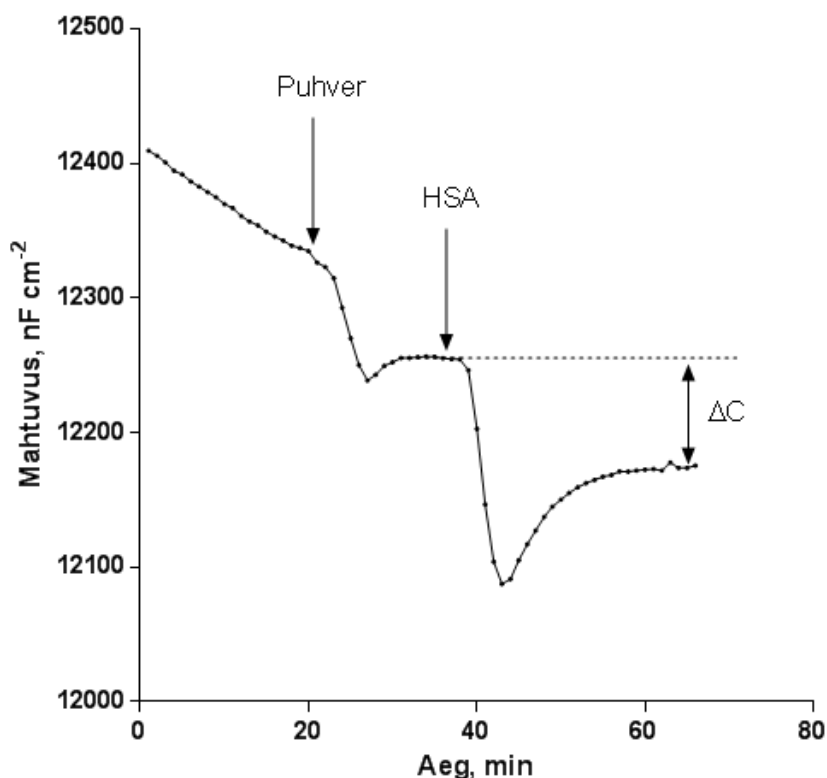
3.1 Modifitseeritud elektrootide võrdlus analüüdi määramiseks

Esmalt võrreldi polütüramiini, 16-merkaptohexadekaan-1-ool ja 16-merkaptohexadekaanhappe ning nendele immobiliseeritud tüüpi antikeha kihiga kaetud elektrootide efektiivsusi. Saadud andmete põhjal valiti välja sobivaima isoleeriva kihiga modifitseeritud elektroot, millega teostati edaspidised analüüdi mõõtmised.

3.1.1 Polütüramiinile seotud IgG tüüpi antikehadega tööelektroot

Inimese seerumi albumiini määramiseks valmistati proovist erineva analüüdi kontsentratsiooniga standardlahused fosfaatpuhvrts (10 mM PB, 0,005 % Tween 20, pH 7,2). Saadud lahused sisestati mõõterakku voolutamiskiirusega 100 µl/min. Kandepuhvrina kasutati 10 mM fosfaatpuhvrts pH-ga 7,2, kuhu oli süsteemi bakteriaalse saastumise ning mittespetsiifilise seondumise vältimiseks lisatud 0,005% Tween 20. Albumiin seondub tööelektrooti külge immobiliseeritud spetsiifiliste IgG tüüpi antikehade külge, moodustub antikeha-antigeen kompleks, mille tulemusena mahtuvus väheneb. Umbes 20 minutit pärast proovi süstimist mõõterakku saavutas mahtuvus stabiilse väärtuse. Elektrooti regenererimiseks eemaldati seondunud albumiin elektrooti pinnalt glütsiinpuhvrtsiga (25 mM pH 2,5). Joonisel 12 on toodud polütüramiini kihiga modifitseeritud elektrooti mahtuvuse muutuse sensorgram. Jooniselt on näha, et mahtuvuse väärtus väheneb konstantselt ning saavutab stabiilse väärtuse alles pärast kandepuhvri ja analüüdi sisestamist mõõterakku. Seega antud

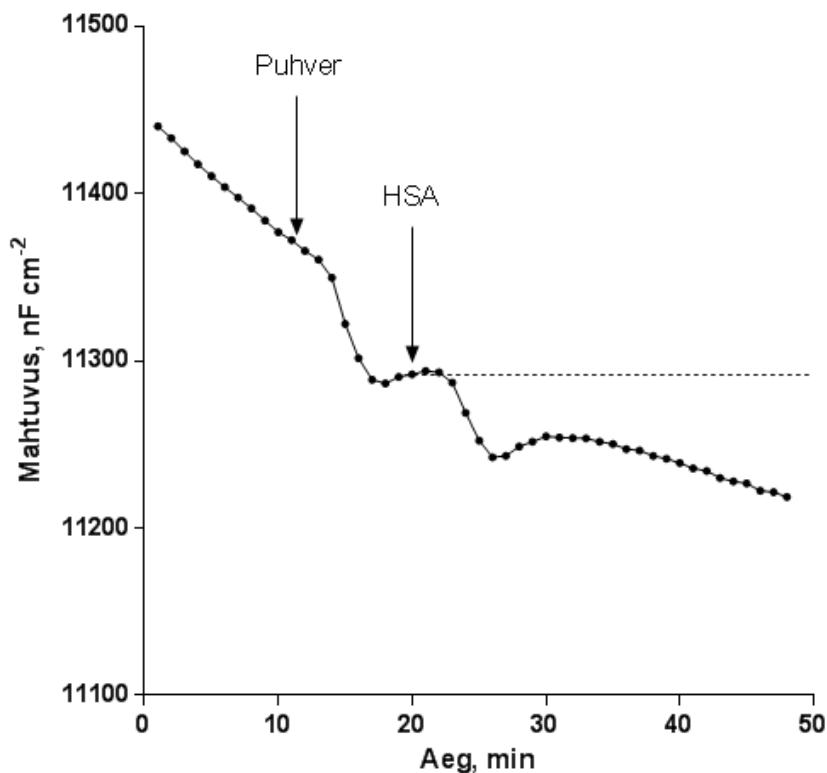
elektrood ei sobinud analüüdi määramiseks, sest katsetulemused ei olnud korratavad ning baasijoon oli väga ebastabiilne.



Joonis 12. HSA sensorgram polütüramiini ja IgG tüüpi antikeha kihiga modifitseeritud elektroodil. Kandepuhvriks oli 10 mM PB, 0,005 % Tween 20, pH 7,2. HSA ja fosfaatpuhvri voolutuskiirus mõõterakku oli 100 μ l/min.

3.1.2 Polütüramiinil olevate kulla nanoosakeste külge seotud IgG tüüpi antikehadega tööelektrood

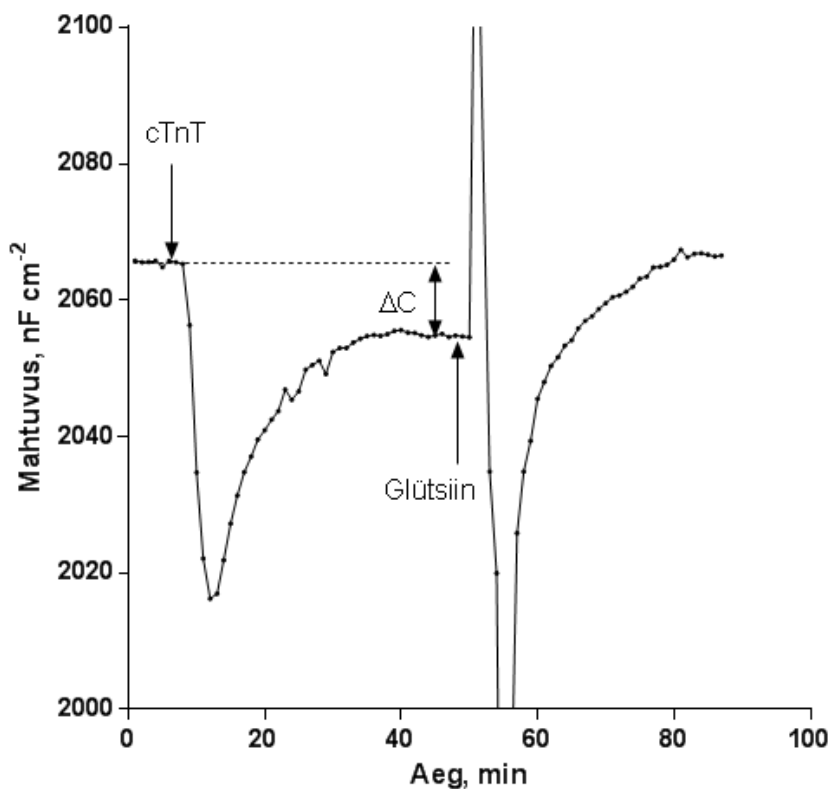
Albumiini analüüs teostati sarnaselt eelmises peatükis kirjeldatud meetodile. Mahtuvus saavutas stabiilse väärtuse pärast kandepuhvri süstimist, kuid hakkas uuesti kiiresti vähenema umbes 10 minutit pärast analüüdi sisestamist (joonis 13). Kuna stabiilseid tulemusi ei saadud, võid järeldada, et IgG tüüpi antikeha ei seondunud elektroodi pinnale püsivalt. Mahtuvuse ebastabiilse väärtuse tõttu ei sobi antud meetod tööelektroodi valmistamiseks analüüdi määramiseks.



Joonis 13. Polütüramiini, kulla nanoosakeste ja IgG tüüpi antikeha kihiga modifitseeritud elektroodi sensorgram. Kandepuhvriks oli 10 mM PB, 0,005 % Tween 20, pH 7,2. HSA ja fosfaatpuhvri voolutuskiirus mõõterakku oli 100 µl/min.

3.1.3 16-merkaptotriaktsüanid-1-ool kihile immobiliseeritud IgG tüüpi antikehaga tööelektrood

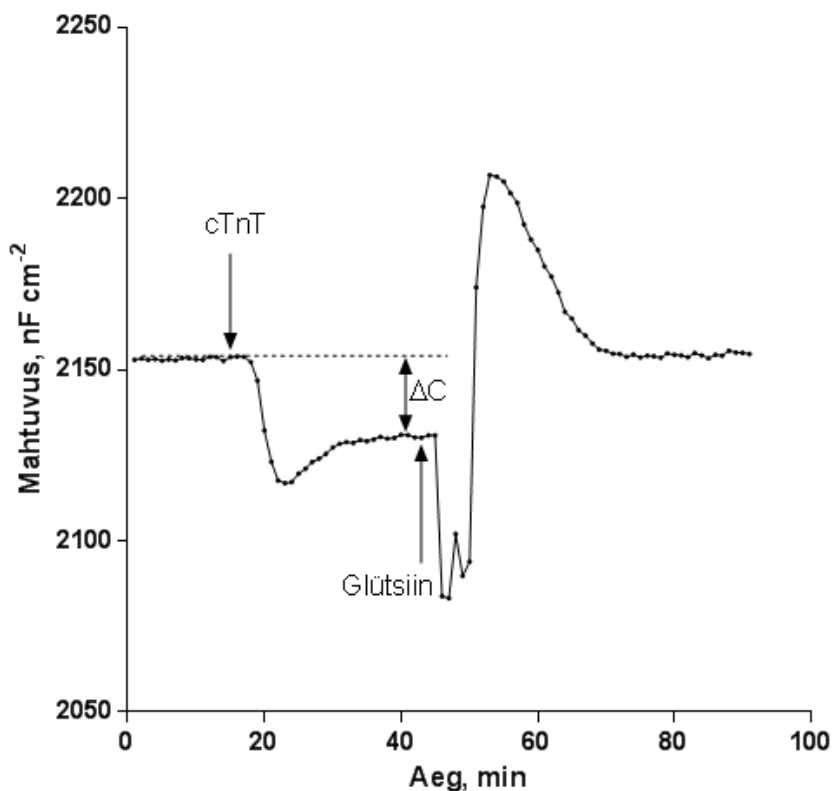
Antud elektroodiga cTnT kvantitatiivse määramise efektiivuse hindamiseks valmistati analüüdist 0,0001-100 ng/ml kontsentratsiooniga lahused fosfaatpuhvris (10 mM PB, 0,005 % Tween 20, pH 7,2). Saadud proovid süstiti mõõterakku voolutuskiirusega 100 µl/min. cTnT seondub elektroodi pinnale immobiliseeritud spetsiifilise IgG tüüpi antikehade külge, mille tulemusena mahtuvuse väärtus väheneb järsult ning saavutab miinimumi umbes 7 minutit pärast proovi süstimist rakku (joonis 14). Seejärel pesti mitteseondunud analüüt süstest välja ja mahtuvuse väärtus stabiliseerus umbes 35 minutit pärast proovi sisestamist. cTnT kontsentratsioonile vastava signaali hindamiseks arvutati 5 punkti keskmine mahtuvuse väärtus enne proovi sisestamist rakku, millest lahutati keskmine mahtuvuse väärtus 30 minutit pärast cTnT süsti. Sensorsüsteemi regenereerimiseks ja antikeha-antigeen kompleksi lõhustamiseks kasutati glütsiinpuhvrit (10 mM pH 2,5). Ühe proovi analüüsimiseks ja tööelektroodi regenereerimiseks kulus keskmiselt 80 min.



Joonis 14. cTnT sensorgram 16-merkaptotseksadekaan-1-ool ja IgG tüüpi antikeha kihiga modifitseeritud elektroodil. ; [cTnT]=10 ng/ml. Kandepuhvriks oli 10 mM PB, 0,005 % Tween 20, pH 7,2. cTnT ja fosfaatpuhvri voolutuskiirus mõõterakku oli 100 µl/min.

3.1.4 16-merkaptotseksadekaanhappe kihile immobiliseeritud IgG tüüpi antikehaga tööelektrood

Mõõterakku sisestati erineva kontsentratsiooniga kardialse troponiin T (cTnT) standardlahused kandepuhvrisk (10 mM PB Tween 20 0,005% pH 7,2) voolutuskiirusega 100 µl/min. Antikeha-antigeen kompleksi moodustumise tulemusena mahtuvus vähenes ning saavutas stabiilse väärtuse 20 minutit pärast proovi süstimist mõõterakku (joonis 15). cTnT seondumise poolt põhjustatud mahtuvuse muutuse arvutamiseks lahutati 5 punkti alusel leitud keskmisest mahtuvuse väärtusest enne analüüdi süsti 5 punkti keskmine väärtus 20 minutit pärast analüüdi süsti. Pärast seda pesti süsteemi antikeha-antigeen kompleksi lagundamiseks glütsiinpuhvriga (10 mM pH 1,5) ning elektroodi kasuti järgmiseks analüüsiks. Üks mõõtmistükkel stabiliseerumisest kuni signaali mõõtmispunktini kestis umbes 55 min; süsteemi regenereerimiseks kulus 30 min.



Joonis 15. cTnT sensorgram 16-merkaptotseksadekaanhappe ja IgG tüüpi antikeha kihiga modifitseeritud elektroodil. Sensorgram on saadud fosfaatpuhvis lahjendatud CCM-s lahustatud 10 ng/ml cTnT süstimisel rakku. Kandepuhvriks oli 10 mM PB Tween 20 0,005% pH 7,2. cTnT ja fosfaatpuhvri voolutuskiirus mõõterakku oli 100 μ l/min.

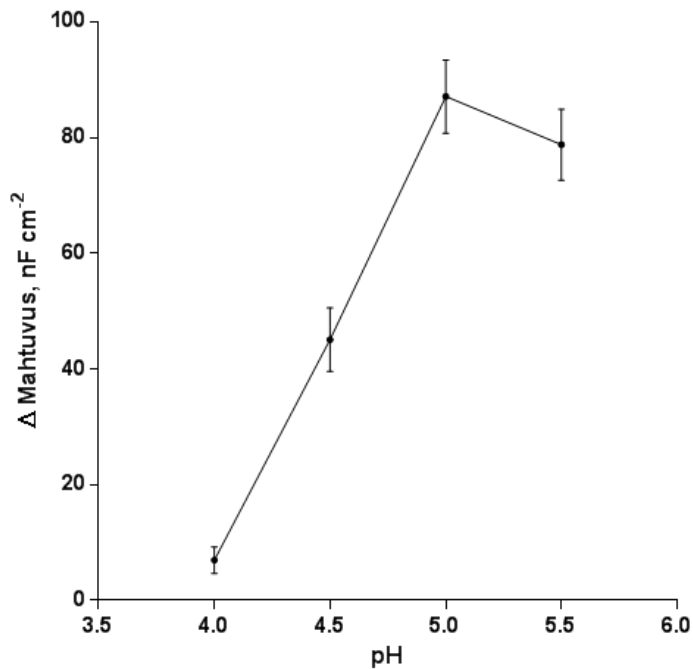
3.2 Optimaalsete mõõtmistingimuste leidmine

Kuna analüüdi määramiseks osutus kõige sobilikumaks 16-merkaptotseksadekaanhappe kihiga modifitseeritud elektrood, siis kasutati järgnevat katset cTnT määramiseks sellel meetodil modifitseeritud elektroode.

3.2.1 IgG tüüpi antikeha immobiliseerimiseks kasutatava puhvri pH optimeerimine

Esmalt hinnati immobiliseerimispuhvri pH mõju IgG tüüpi antikehade immobiliseerimise efektiivusele pinnal olevate karboksüülrühmade külge. Selleks valmistati inimese cTnT vastasest hiire monoklonaalsest IgG-st lahused kontsentratsiooniga 10 μ g/ml 10 mM naatriumatsetaatpuhvis, mille pH varieerus vahemikus 4,0 – 5,5. Elektrood puhastati, modifitseeriti ning aktiveeriti vastavalt peatükis 2.3.2.3 kirjeldatud metoodikale. Saadud lahused süstiti mõõterakku ning sensorgrammilt arvutati mahtuvuse muutused. Joonisel 16 on toodud biosensori

mahtuvuse muutuse sõltuvus IgG tüüpi antikeha immobiliseerimiseks kasutatud lahuse pH väärtusest. Graafiku koostamiseks kasutati kolme korduskatse andmeid.



Joonis 16. Mahtuvuse muutuse sõltuvus cTnT vastase hiire monoklonaalse IgG immobiliseerimiseks kasutava puhvelahuse pH-st. IgG tüüpi antikeha kontsentratsioon puhvelahustes oli 10 µg/ml.

Lähtudes ülaltoodud graafikust, ilmneb, et puhvelahuse pH ja IgG tüüpi antikeha immobiliseerimise efektiivuse vahel esineb sõltuvus. Elektroodi pinnale seonduva IgG tüüpi antikeha hulk on kõige väiksem kasutades immobiliseerimiseks madamalt pH-d ning saavutab maksimaalse väärtuse atsetaatpuhvri pH 5,0 juures. Seega kasutati järevalt IgG tüüpi antikeha immobiliseerimiseks puhvrit, mille pH oli 5,0.

3.2.2 Regeneerimispuhvri pH optimeerimine

Kuna eesmärk oli kasutada ühte elektroodi mitme mõõtmise jaoks, siis oli tööpinna efektiivne regeneerimine äärmiselt oluline. Antikeha-antigeen kompleksi lagundamiseks kasutati 10 mM glütsiinpuhvrit, mille pH väärtust varieeriti vahemikus 1,5 kuni 2,5. Katse läbiviimiseks töödeldi pinda erineva pH-ga glütsiinpuhvriga misjärel sisestati mõõterakku cTnT, mille kontsentratsioon kõikides teostatud katsetes oli 10 ng/ml. Regeneerimise efektiivsust hinnati analüüdi seondumise poolt põhjustatud signaali muutuse võrdlemisel (tabel 3).

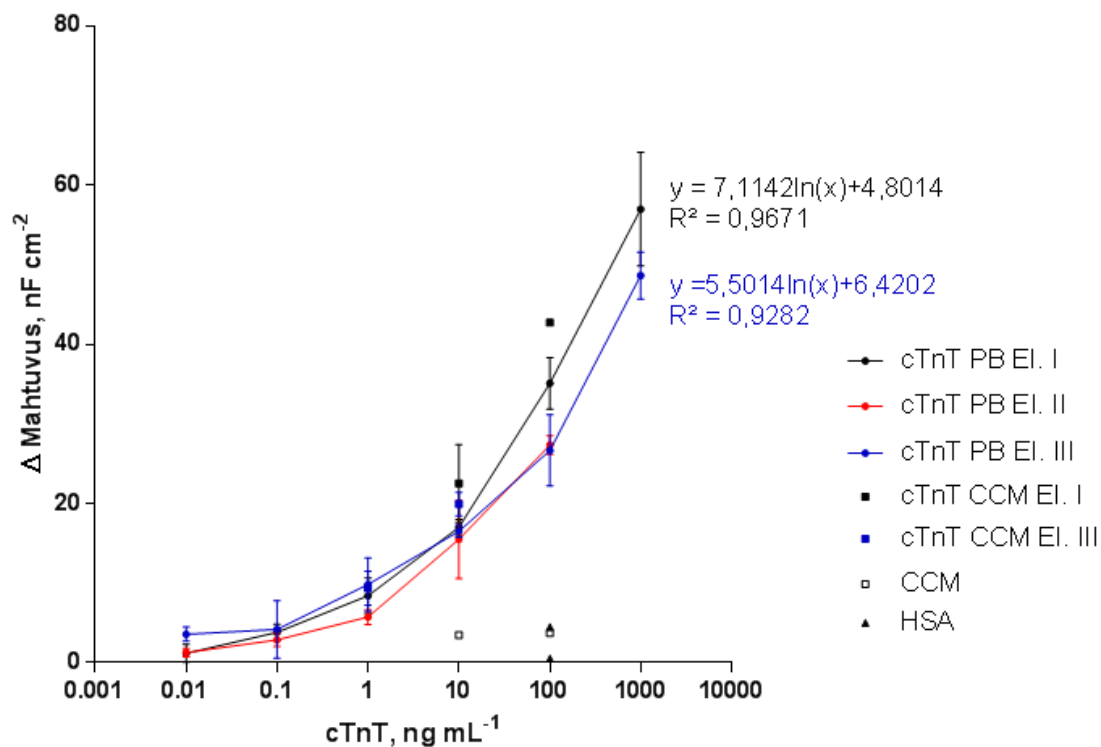
Tabel 3. cTnT biosensori mahtuvuse muutuse sõltuvus regenereerimispuhvri pH-st

Puhvri pH	Mahtuvuse muutus, nF cm ⁻²
2,5	2,9
2,0	5,3
1,5	14,1

Tabelist 3 selgub, et kõrgemal pH-l ei ole cTnT eemaldamine IgG tüüpi antikeha küljest piisavalt efektiivne ning analüüdi täielikuks eemaldamiseks peab kasutama madalamat pH-d. Seega kasutati järgEVates katsetes biosensori pinna regenereerimiseks glütsiinpuhvrit pH-ga 1,5.

3.3 Kalibreerimisgraafiku konstrueerimine cTnT määramiseks mahtuvusliku biosensoriga

Mahtuvusliku immunobiosensori väljundsignaali muutust mõõdeti kolme erineva samal meetodil valmistatud biosensoriga cTnT kontsentratsioonidel 0,01-1000 ng/ml. Saadud tulemused on toodud joonisel 17.



Joonis 17. Mahtuvuse muutuse sõltuvus cTnT kontsentratsioonist. Kandepuhvriks oli 10 mM PB Tween 20 0,005% pH 7,2. cTnT ja fosfaatpuhvri voolutuskiirus mõõterakku oli 100 µl/min. cTnT vastase IgG tüüpi antikeha kontsentratsioonid I, II ja III elektroodil olid vastavalt 10, 7 ja 10 µg/ml.

IgG tüüpi antikeha kontsentratsioon immobiliseerimispuhvril oli I ja III elektroodi valmistamisel 10 µg/ml, II elektroodi puhul 7 µg/ml.

Kalibreerimisgraafik on lineaarne vahemikus 1-1000 ng/ml. Määramisskeemi usaldusväärsuse hindamiseks mõõdeti mittespetsiifilist seondumist elektroodile immobiliseeritud troponiin T vastaste IgG tüüpi antikehade külge. Selleks süstiti mõõterakku 250 µl inimese seerumi albumiini fosfaatpuhvril (10 mM PB Tween 20 0,005% pH 7,2) kontsentratsiooniga 100 ng/ml. Albumiini seondumine IgG külge on võrreldes cTnT-ga nõrk ja saadav signaal on võrreldav sensori signaaliga, mis saadi cTnT kontsentratsioonidel alla 1 ng/ml. Seega võib seniste tulemuste põhjal hinnata antud mõõtesüsteemi määramispiiriks 1 ng/ml.

3.4 Elektroodi katva 16-merkaptotiohappe isoleerimise kihi paksus

Selleks, et hinnata elektroodi katva SAM kihi paksust uuriti pinnakihti ellipsomeetriga enne ja pärast IgG tüüpi antikeha immobiliseerimist tööpinnale. Tabelis 4 on toodud erinevate elektroodide pinnakihi paksuste keskmised väärtused ning mõõtevead, mis on arvutatud viie kordusmõõtmise tulemuste alusel. 16-merkaptotiohappe molekuli keskmine pikkus on ligikaudu 26,1 Å. Selleks, et saavutada molekulide võimalikult tihe ja efektiivne pakkimine pinnal, asetsevad tioolhappe molekulid elektroodil 30° nurga all, mis tähendab, et teoreetiliselt peaks ellipsomeetriga mõõdetav SAM kihi paksus olema ligikaudu 13 Å [28]. Reaalselt mõõdetud tulemus jäi vahemikku 15,2-18,3 Å. Siinkohal on huvitav välja tuua, et väiksema IgG tüüpi antikeha kontsentratsiooniga elektroodil oli bioselektiivse kihi paksus suurem, kuid analüüdi signaal võrreldes teiste elektroodidega väiksem (joonis 17). Kuna IgG hulka pinnal hinnati ellipsomeetriga alles pärast elektroodi korduvat kasutamist, siis võib üheks pinnakihi paksuste suure varieeruvuse põhjuseks olla ka pinna happega töötlemise etappide arvu erinevus.

Tabel 4. SAM- ja IgG tüüpi antikeha kihi paksus elektroodil

cTnT elektrood	SAM (isoleeriv monokiht)	SAM+mAb (IgG)	Δ mAb (IgG)	mAb (IgG) kontsentratsioon immobiliseerimisel
I	15,4±0,6 Å	24,5±2,5 Å	9,1 Å	10 µg/ml
II	15,2±1,6 Å	33,7±2,1 Å	18,5 Å	7 µg/ml
III	18,3±0,6 Å	33,6±2,6 Å	15,3 Å	10 µg/ml

3.5 cTnT määramine südameraku kasvusubstraadis

Inimese kardiomiotsüütide (südamelihase rakkude) kasvukeskkonna lahusest tehti fosfaatpuhvrts (10 mM PB Tween 20 0,005% pH 7,2) 100 ja 1000 kordne lahjendus. Seejärel võeti kummastki saadud lahusest 900 µl ning lisati neile 100 µl fosfaatpuhvrts lahjendatud cTnT lahust kontsentratsiooniga vastavalt 100 ng/ml ning 10 µg/ml. Saadi proovid kontsentratsioonidega vastavalt 10 ja 1 ng/ml ning nende proovide sensorgrammidelt arvutati mahtuvuse muutused. Lisaks teostati ka katsed fosfaatpuhvrts (10 mM PB Tween 20 0,005% pH 7,2) lahjendatud raku kasvukeskkonnaga, kuhu ei olnud analüüti lisatud. Saadud tulemused on toodud nii kalibreerimisgraafikul (joonis 17) kui tabelis 5.

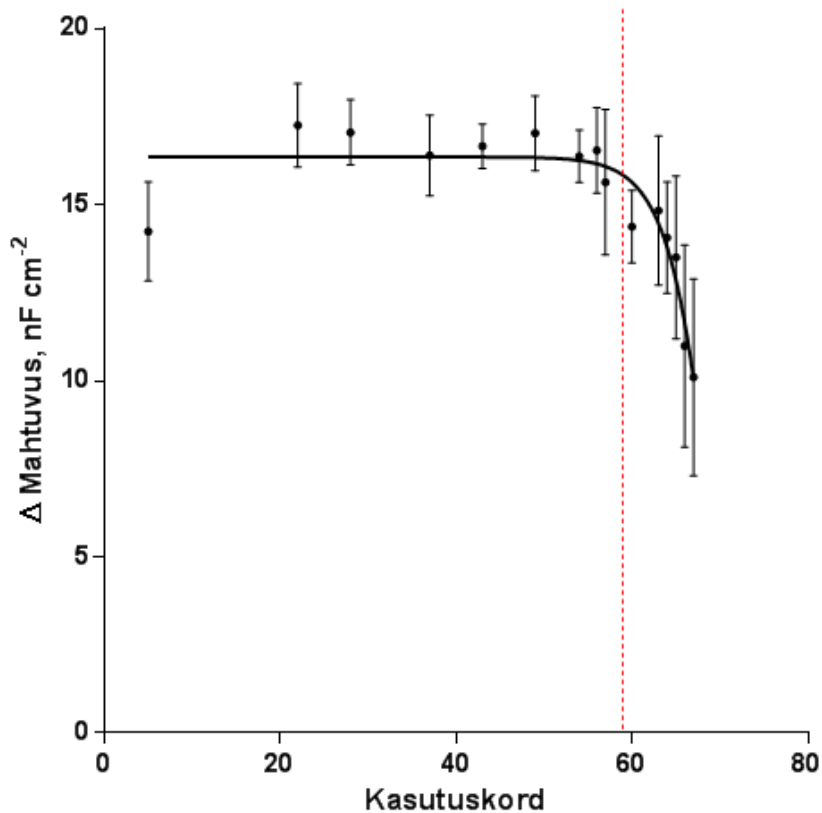
Tabel 5. cTnT signaalid fosfaatpuhvrts ja raku kasvukeskkonnas

Proov	Elektrood	Keskmine mahtvuse muutus, nF cm⁻²
cTnT (10 ng/ml) puhvrts	III	16,52±0,76
cTnT (10 ng/ml) CCM-s	III	19,93±1,46
cTnT (10 ng/ml) puhvrts	I	17,02±0,99
cTnT (10 ng/ml) CCM-s	I	22,53±4,88
cTnT (1 ng/ml) puhvrts	III	9,83±3,33
cTnT (1 ng/ml) CCM-s	III	9,36±2,15
CCM 1000×lahjendus	III	3,47

Selgus, et cTnT-d sisaldava kasvukeskkonna keskmine signaal sarnaneb fosfaatpuhvrts mõõdetud analüüdi signaalile. Samuti ilmnes, et kasvukeskkonna komponendid analüüsi märgatavalt ei sega.

3.6 Bioselektiivse elektroodi eluea hindamine

Pinna regenereerimise käigus glütsiinpuhvrtsiga (10 mM, pH 1,5) kaasneb ajapikku ka pinnale immobiliseeritud IgG tüüpi antikeha hulga vähenemine või inaktiveerumine. Seetõttu väheneb korduvate regenereerimiste käigus bioselektiivse kihi aktiivsus ning analüüti seondub pinnale üha vähem. Elektroodi korduvkasutatavuse hindamiseks uuriti cTnT poolt põhjustatud signaali vähenemist selle korduval kasutamisel (joonis 18).



Joonis 18. cTnT biosensori väljundsignaali suuruse sõltuvus sensori kasutuskorra järjekorranumbrist. Kandepuhvriks oli 10 mM PB Tween 20 0,005% pH 7,2. cTnT ja fosfaatpuhvri voolutuskiirus mõõterakku oli 100 µl/min. cTnT kontsentratsioon on kõikides katsetes 10 ng/ml. Punane joon tähistab piiri, kust edasi hakkab elektroodi efektiivsus langema.

Kõikides katsetes oli cTnT kontsentratsioon 10 ng/ml. Joonisel 18 toodud graafikult on näha, et elektroodi saab analüüdi määramiseks kasutada vähemalt 60 mõõtettsükli, pärast seda kaotab tööpind kiiresti oma aktiivsust.

KOKKUVÕTE

Kliinilises diagnostikas on mitmesuguste bioloogiliste analüütide kiire, kuid samas tundlik määramine äärmiselt oluline. Elektrokeemiliste biosensorite rakendamine diagnostikas võimaldab spetsiifilist biomolekulide määramist ilma proovi mahuka ettevalmistuseta. Antud töös uuritigi spetsiifilisel antigeen-antikeha äratundmisreaktsioonil põhineva mahtvusliku biosensori konstrueerimise võimalusi troponiin T selektiivseks määramiseks, mida saaks kasutada bioloogilistes vedelikes ilma proovide eeltötluseta.

Kuna mahtvusliku biosensori elektroodi pinnakatte omadustest ja tööpinnal olevate vabade funktsionaalrühmade või bioselektiivsete molekulide aktiveerimisest sõltub suuresti analüüsi tundlikkus ja täpsus, uuriti biomolekulide võimalikult efektiivseks määramiseks polütüramiini, kulla nanoosakestega, 16-merkaptotriaktsaadetide ja 16-merkaptotriaktsaadetide poolt moodustatava isolatsioonikihi kaetud ning sellele immobiliseeritud antikehadega kulla kihiga kaetud ränielektroode. Immunoglobuliinide sidumiseks pinnale kasutati isolatsioonikihi funktsionaalrühmade aktiveerimist glutaaraldehüüdi, EDC/NHS lahuse või tresüülkloriidiga. Analüüdi määramiseks osutus kõige sobivamaks 16-merkaptotriaktsaadetide EDC/NHS lahusega aktiveeritud monokihile immobiliseeritud antikehaga kaetud elektrood.

Töö käigus optimeeriti ka antikeha immobiliseerimiseks kasutatava puhverlahuse ja tööpinna regenereerimispuhveri pH väärtusi. Koostati kalibreerimisgraafik inimese kardiaalse troponiin T määramiseks fosfaatpuhvril kolme sama meetodikaga valmistatud bioselektiivse elektroodi jaoks. Saadud graafik oli lineaarne analüüdi kontsentratsioonide vahemikus 1-1000 ng/ml. Madalaim cTnT kontsentratsioon, mida antud mõõtmisreegliga määrata saab, oli 1 ng/ml. Bioselektiivse elektroodi väljundsignaali oli stabiilne 60 järjestikuse mõõtmise korral.

Lisaks mõõdeti sensoriga ka troponiin T kontsentratsiooni raku kasvukeskkonnas, kuhu oli lisatud kindel hulk analüüti. Saadud tulemused näitavad, et keskkond analüüsi tulemusi oluliselt ei mõjuta.

Konstrueeritud mahtuvuslikul biosensorsüsteemil põhinev mõõtmiskeem vajab edaspidist täiendamist, et suurendada sellega saadud tulemuste usaldusväärsust ning alandada troponiin T määramispiiri, et seda sensorit saaks rakendada meditsiinilistes või toksikoloogilistes uuringutes.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 232–254.
- [2] O. Lazcka, F.J. Del Campo, F.X. Muñoz, Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1205–1217.
- [3] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, *Sensors.* 8 (2008) 1400–1458.
- [4] V. Tsouti, C. Boutopoulos, I. Zergioti, S. Chatzandroulis, Capacitive microsystems for biological sensing, *Biosens. Bioelectron.* 27 (2011) 1–11.
- [5] C. Berggren, B. Bjarnason, G. Johansson, Capacitive biosensors, *Electroanalysis.* 13 (2001) 173–180.
- [6] T. Wink, S.J. van Zuilen, a Bult, W.P. van Bennkom, Self-assembled monolayers for biosensors., *Analyst.* 122 (1997) 43R–50R.
- [7] K. Teeparuksapun, M. Hedström, P. Kanatharana, P. Thavarungkul, B. Mattiasson, Capacitive immunosensor for the detection of host cell proteins, *J. Biotechnol.* 157 (2012) 207–213.
- [8] K. Teeparuksapun, M. Hedstrom, E.Y. Wong, S. Tang, I.K. Hewlett, B. Mattiasson, Ultrasensitive Detection of HIV-1 p24 Antigen Using Nanofunctionalized Surfaces in a Capacitive Immunosensor, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8406–8411.
- [9] L. Lebogang, M. Hedström, B. Mattiasson, Development of a real-time capacitive biosensor for cyclic cyanotoxic peptides based on Adda-specific antibodies, *Anal. Chim. Acta.* 826 (2014) 69–76.
- [10] K. Zór, R. Ortiz, E. Saatci, R. Bardsley, T. Parr, E. Csöregi, et al., Label free capacitive immunosensor for detecting calpastatin - A meat tenderness biomarker, *Bioelectrochemistry.* 76 (2009) 93–99.
- [11] M. Labib, M. Hedström, M. Amin, B. Mattiasson, A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin, *Anal. Chim. Acta.* 634 (2009) 255–261.
- [12] M.B. Llewelyn, R.E. Hawkins, S.J. Russell, Discovery of antibodies., *BMJ.* 305 (1992) 1269–1272.
- [13] A.C. Chan, P.J. Carter, Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation., *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 301–316.

- [14] M. Nisnevitch, M. a. Firer, The solid phase in affinity chromatography: Strategies for antibody attachment, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 49 (2001) 467–480.
- [15] A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene, Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 460–471.
- [16] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.N. Chazalviel, a. C. Gouget-Laemmel, et al., Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces, *Langmuir.* 26 (2010) 809–814.
- [17] B. Lu, M.R. Smyth, R. O’Kennedy, Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors., *Analyst.* 121 (1996) 29R–32R.
- [18] G. Bergström, C.F. Mandenius, Orientation and capturing of antibody affinity ligands: Applications to surface plasmon resonance biochips, *Sensors Actuators, B Chem.* 158 (2011) 265–270.
- [19] E. de Juan-Franco, A. Caruz, J.R. Pedrajas, L.M. Lechuga, Site-directed antibody immobilization using a protein A-gold binding domain fusion protein for enhanced SPR immunosensing., *Analyst.* 138 (2013) 2023–31.
- [20] D.S. Hage, C. a C. Wolfe, M.R. Oates, Development of a kinetic model to describe the effective rate of antibody oxidation by periodate, *Bioconjug. Chem.* 8 (1997) 914–920.
- [21] H.M. Nassef, L. Civit, A. Fragoso, C.K. O’Sullivan, Amperometric immunosensor for detection of celiac disease toxic gliadin based on fab fragments, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5299–5307.
- [22] E. Fathi, S.A. Mesbah-namin, *Biomarkers in Medicine : An Overview*, 4 (2014) 1701–1718.
- [23] N. Carolina, S. International, T. Hague, C.P. Safety, t 4 Workshop Report * The Use of Biomarkers of Toxicity for Integrating In Vitro Hazard Estimates Into Risk Assessment for Humans, (n.d.) 411–425.
- [24] M. a. Al-Otaiby, H.S. Al-Amri, A.M. Al-Moghairi, The clinical significance of cardiac troponins in medical practice, *J. Saudi Hear. Assoc.* 23 (2011) 3–11.
- [25] M.S. Parmacek, R.J. Solaro, Biology of the troponin complex in cardiac myocytes, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 47 (2004) 159–176.
- [26] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, et al., The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin., *IUBMB Life.* 57 (2005) 787–796.

- [27] U. Heemann, U. Treichel, J. Loock, T. Philipp, G. Gerken, M. Malago, et al., Albumin dialysis in cirrhosis with superimposed acute liver injury: a prospective, controlled study., *Hepatology*. 36 (2002) 949–958.
- [28] J.C. Love, E. Al, *Self-Assembled Monolayers of Thiols on Metals as a Form of Nanotechnology*, 2005.

SUMMARY

Construction of capacitive immunosensor for the detection of biomarkers

Ave Kuusk

Rapid and sensitive detection of various biomarkers is of utmost importance in clinical diagnostics. For this task, electrochemical biosensors have several advantages like low detection limits and high selectivity. In addition, no laborious sample pretreatment is required in most cases. The aim of the master project was to develop and study a new immunobiosensor assay based on capacitive immunosensor for sensitive and selective detection of troponin T, which serves as a biomarker for myocardial injury in heart failure.

The properties of the surface coating, amount of free functional groups on the surface and the activity of the immobilized biorecognition layer were the key parameters of the performance of the biosensor system. In order to compare the analyte binding efficiency, we studied different electrode surface coatings. The antibodies for selective detection of biomolecules were immobilized onto gold-covered electrodes, modified with 16-mercaptohexadecanoic acid, 16-mercaptohexadecan-1-ol or tyramine. The formed SAM layer was activated using EDC/NHS or trisyl chloride. Based on the obtained results, it can be concluded, that 16-mercaptohexadecanoic acid monolayer-coated and EDC/NHS activated electrode was the most appropriate for the detection.

We also optimized the pH of the buffer solutions, used for the immobilization of antibodies and regeneration of biosensor after analyte binding. A calibration curve was constructed for the detection of human cardiac troponin T. A linear relationship was observed between troponin T concentrations 1-1000 ng/ml and the limit of detection was calculated to be 1 ng/ml. In addition, cTnT concentration was measured in spiked cell culture media.

The constructed biosensor system needs further development to improve its sensitivity and reliability in order to be applicable for clinical and toxicological studies.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ave Kuusk

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Mahtuvusliku immunosensorsüsteemi konstrueerimine biomarkerite määramiseks mille juhendajad on Toonika Rinke, Meeme Utt, Carl-Fredrik Mandenius, Gunnar Bergström

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **02.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, **26.05.2015**