

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Katri Vesi

**Immunobiosensorsüsteemis kasutatavate mikrokolonnide
optimeerimine erinevate mastiiti põhjustavate bakterite
üheaegseks määramiseks**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendaja: Toonika Rinke, PhD

Tartu 2021

Immunobiosensorsüsteemis kasutatavate mikrokolonnide optimeerimine erinevate mastiiti põhjustavate bakterite üheaegseks määramiseks

Käesolevas bakalaureusetöös määrati, kuidas muutub immunobiosensori väljundsignaal peamisi mastiiti põhjustavate patogeene (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ja *Streptococcus uberis*) määramisel, kui vähendada moodustatavas mikrokolonnis bioaktiveeritud geeli osakaalu. Patogeene üheaegselt määrates on võimalik mastiidi tekitaja kiiresti identifitseerida. Immunobiosensorites kasutatakse mikrokolonne patogeene sidumiseks ja kontsentreerimiseks uuritavatest proovidest. Kasutades erinevalt aktiveeritud graanulite segusid on võimalik tuvastada mastiiti põhjustavaid baktereid üheaegselt. Töö tulemusena leiti, et kasutatud biosensorsüsteemi mõõteprotokoll võimaldab peamisi Eestis mastiiti põhjustavaid patogeene määrata sama tundlikkusega isegi siis kui konkreetset patogeeni siduvat geeli on geelide segus vähem kui 20%.

Märksõnad: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, biosensor, patogeene üheaegne määramine

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

Optimisation of microcolumns used for multiplex determination of mastitis-causing pathogens with immunosensing systems

The aim of the present study was to determine how the signal of an immunosensor changes when reducing the percentage of bioactivated gel used in the microcolumn when measuring main mastitis causing pathogens like *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*. Nowadays several biosensors have been created that could measure mastitis-causing pathogens within minutes. Nonetheless, most of the biosensors can only detect one pathogen. With multiplex determining of pathogens the time can be reduced even more. In immunobiosensing units microcolumns are formed to capture the desired mastitis-causing bacteria. Due to pathogens interacting with differently activated gel, multiple can be determined when mixing the said gels. Main mastitis-causing pathogens can be measured using at least 21% of gels activated with lactoferrin and Fc fragment.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, biosensor, multiplex determining of pathogens

CERCS: T270 Environmental technology, pollution control

Sisukord

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Mastiiti põhjustavad patogeenid	6
1.2 Olulisemate mastiiti põhjustavate patogeenide üldiseloomustus	7
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.2.2 <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.3 <i>Streptococcus uberis</i>	8
1.3 Meetodid patogeenide määramiseks.....	9
1.4 Valkude immobiliseerimismeetodid Sephadex geelile.....	11
1.4.1 Epikloorhüdriiniga graanulite aktiveerimine	12
1.4.2 Glutaaraldehüüdiga graanulite aktiveerimine	12
1.4.3 Karbodiimiidiga graanulite aktiveerimine	13
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid.....	15
2.2 Kasutatud seadmed	15
2.3 Metoodika.....	16
2.3.1 Inimese IgG Fc fragmendi sidumine Sephadex geelile.....	16
2.3.2 Laktoferriini sidumine Sephadex geelile.....	16
2.3.3 Mõõtmiste teostamine biosensoriga	17
2.3.4 Funktsionaliseeritud geelide segude valmistamine	19
3 TULEMUSED JA ARUTELU	20
3.1 <i>S. aureus</i> 'e määramine kasutades laktoferriiniga funktsionaliseeritud graanuleid ...	20
3.2 <i>S. aureus</i> 'e mõõtmine Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geeliga.....	22
3.3 <i>E. coli</i> määramine kasutades Fc fragmendiga aktiveeritud graanuleid	23
3.4 <i>E. coli</i> määramine laktoferriiniga aktiveeritud geeli kasutades.....	25
3.5 <i>Str. uberis</i> 'e mõõtmine laktoferriini ning Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geelidega.....	25
3.6 <i>Str. uberis</i> 'e määramine kasutades Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geeli	27
KOKKUVÕTE.....	28
SUMMARY	29
KASUTATUD KIRJANDUS	30

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

BIA – graanulisestusanalüüs (*bead injection analysis*)

CFU – kolooniat moodustav ühik (*colony forming unit*)

EDC – 1-etüül-3-(dimetüülanimopropüül)karbodiimiid

E. coli – *Escherichia coli*

Fc fragment – immunoglobuliin G kristalliseeruv fragment (*fragment crystallizable*)

FITC – fluorestseiniisotiotsüanaat

IgG – immunoglobuliin G

OmpA – välismembraani valk A (*outer membrane protein A*)

PCR - polümeraasiahelreaktsioon

PBS – fosfaatpuhver soolaga

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

Str. uberis – *Streptococcus uberis*

SUAM – *Str. uberis*'e adhesiooni molekul (*Str. uberis* adhesion molecule)

SISSEJUHATUS

Mastiit ehk udarapõletik on üks enimlevinuid haiguseid piimalehmade seas, mida tavaliselt põhjustavad mitmete bakterite patogeensed tüved. Mastiidi tulemusena langeb piimatoodang ja kvaliteet, lisaks suurenevad loomade ravikulud, mis teeb antud infektsiooni piimatootjatele finantsiliselt väga koormavaks. 2019. aasta andmeil põhjustasid *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) ja *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*) ligikaudu 45% mastiidi juhtumitest Eestis [1].

Bakteriaalse infektsiooni tekitaja kiire tuvastamine ja ravi määramine on mastiidi kiire leviku tõttu oluline. Üheks võimaluseks patogeeni kiireks määramiseks piimas on kasutada immunobiosensorsüsteemi, mis põhineb määratavate patogeeni sidumisel tahkele kandjale ja seondunud patogeeni selektiivsel määramisel detekteeriva antikehaga. Detekteerivad antikehad on uuritud biosensorsüsteemis märgistatud fluorestsentsmarkeritega.

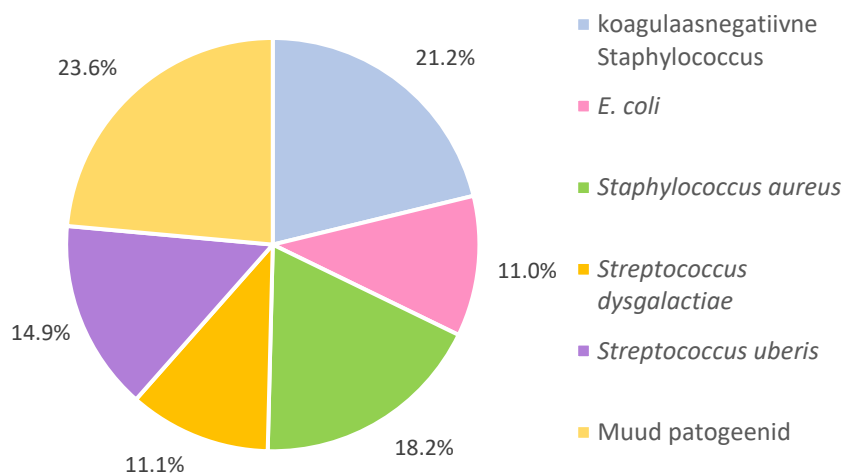
Tartu Ülikoolis on välja töötatud biosensorsüsteemid *S. aureus*'e, *E. coli* ja *Str. uberis*'e määramiseks. Kuigi nende biosensoritega on võimalik tuvastada patogeene väga kiiresti, saab antud süsteemiga mõõta korraga vaid ühte mastiiti põhjustavat bakterit.

Eelpool mainitud patogeeni sidumiseks kasutatakse erinevalt funktsionaliseeritud geele. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli erinevate patogeeni üheaegseks määramiseks leida vähim immunobiosensoris patogeeni sidumiseks kasutatava bioaktiveeritud geeli osakaal mikrokolonnis, ilma et biosensori tundlikkus väheneks.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mastiiti põhjustavad patogeenid

Mastiit ehk udarapõletik on haigus, mida põhjustavad patogeensed mikroorganismid. Kõige suuremal määral põhjustavad piimalehmadel mastiiti stafülokokkide perekonda kuuluvad erinevad patogeenid. Samas rohkem kui 40% kõigist mastiidi juhtumitest Eestis põhjustasid kolm bakterit: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ja *Streptococcus uberis* (Joonis 1). [1]



Joonis 1. Levinuimad mastiiti põhjustavad patogeenis Eestis 2019. aastal [1].

Piimatootjatele on mastiit väga kulukas probleem, sest karjas levib infektsioon kiiresti, mis põhjustab piimatoodangu hüppelist langust ja kulude suurenemist [2]. Mastiit on piimatootmise kõige levinum haigus ning hinnanguliselt põeb iga aasta mastiiti 1/3 lehmadest maailmas [3]. Mastiiti haigestunud loomal vähenevad piimakogused. Samuti halveneb piima kvaliteet: selle koostises toimuvad muutused, laktoosi hulk piimas väheneb, lisaks toimub piimas kaseiini proteolüüs [4]. Kuna mastiiti võivad põhjustada mitmed erinevad patogeenid, on oluline tuvastada infektsiooni põhjustav patogeen võimalikult kiiresti ning määrata täpne ravi antud patogeeni vastu.

1.2 Olulisemate mastiiti põhjustavate patogeenide üldiseloostus

1.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) on gram-positiivne bakter, mis kuulub stafülokokkide perekonda. *S. aureus*'e bakter on ümmarguse kujuga, bakteri diameetrik on 1 µm. Bakterit leidub inimeste mikroflooras, tavaliselt leidub nahal ja juustes, lisaks imetajate ninades ja kurgus [5].

S. aureus on üks levinumaid patogeene lehmakarjades, põhjustades nii subkliinilist, haiguse tunnuseid ei näe, kui ka kliinilist mastiiti. Eestis põhjustas antud bakter 2019. aastal 18,2% mastiidi juhtumitest [1]. Mastiitsetes piimaproovides võib *S. aureus* bakterit leiduda kontsentratsioonivahemikes $10^4 - 10^7$ CFU/ml [6].

Valk A (SpA, *surface protein A*) on üks *S. aureus*'e rakumembraanil leiduvaid valke, mis leidub samuti patogeensetel *S. aureus*'e bakteri tüvedel, mistõttu kasutatakse antud pinnavalku *S. aureus*'e määramiseks [7–9]. Hinnanguliselt on *S. aureus*'e rakupinnal 10^4 pinnavalk A valku [10]. Valk A molekul interakteerub Fc fragmendiga, mis on üks regioon imetajate immunoglobuliinis (IgG), mistõttu saab antud valku kasutada *S. aureus*'e määramiseks. SpA afiinsus Fc fragmendi suhtes on väga suur, sidumiskonstandiks (K_a) on $10^7 - 10^8$ M⁻¹ [11, 12]. Samuti on valk A-1 suur afiinsus laktoferriini, piimas leiduva glükoproteiini, suhtes, sidumiskonstandiks on $1,4 \times 10^7$ M⁻¹ [13].

1.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) on gram-negatiivne bakter [14]. Kujult on *E. coli* bakter piklik, bakteri diameetrik on 0,5 µm, pikkuseks 2 µm [15]. Paljud *E. coli* tüved on kahjutud, kuna antud bakterit leidub loomulikult nii inimeste kui ka loomade seedetraktis. Keskkonnas leidub *E. coli* bakterit nii pinnases kui ka vees, loomadel ja taimedel, *E. coli* on võimeline kohanema väga erinevates keskkondades. [16]

E. coli on üks peamisi keskkonnast pärit mastiidi põhjustajaid, 2019. aastal 11% mastiidi juhtumitest Eestis põhjustas patogeenne *E. coli* tüvi [1]. Kliiniline *E. coli* mastiit on tihti lehmale surmav [17]. Mastiitsetes piimaproovides on *E. coli* kontsentratsioon vahemikus $10^3 - 10^7$ CFU/ml [6].

E. coli bakteri välismembraani üheks olulisimaks valguliseks komponendiks on samuti valk A (OmpA, *outer membrane protein A*). OmpA ulatub bakteri välismembraanist välja ning antud valku leidub bakteri välispinnal laialdaselt, 10^5 valgu molekuli. *E. coli* bakteril on suur

afiinsus nii laktoferrini kui ka Fc fragmendi suhtes, sidumiskonstantideks on vastavalt $2,6 \times 10^6$ ja $(5 - 20) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ [18, 19].

1.2.3 Streptococcus uberis

Streptococcus uberis (*Str. uberis*) on streptokokkide perekonda kuuluv gram-positiivne bakter. *Str. uberis*'e bakter on kerakujuline, bakteri diameeteriks on 0,5 – 1 μm . Bakter esineb tavaliselt paaris või ketina. *Str. uberis*'t võib leiduda mullas, vees ning loomade väljaheidetes, huultel ja nahal. [20, 21]

Str. uberis kuulub samuti olulisemate udarapõletikku põhjustavate patogeenide hulka, tekitades nii subkliinilist, kliinilist kui ka kroonilist mastiiti [22]. Eestis põhjustas *Str. uberis* 2019. aastal 14,9% mastiidi juhtumitest [1]. Antud bakterit võib mastiitsetes piimaproovides leida vahemikus $10^3 - 10^7 \text{ CFU/ml}$ [6].

Str. uberis'e rakumembraanil on eksponeeritud *Str. uberis*'e adhesiooni valk (SUAM). Antud pinnavalk on oluline bakteri määramisel, kuna SUAM seondub laktoferrinile, mille kaudu *Str. uberis* omakorda seondub veise udara epiteelkoele [23]. Immuunvastusest tekkivad antikehad vähendavad suurel määral SUAM-i seondumist laktoferrinile [24]. On leitud, et *Str. uberis*'e rakumembraanil on ligikaudu 7800 detekteeriva valgu molekuli seondumissaiti, dissotsiatsioonikonstandiks (K_d) on 1×10^{-7} [10]. Allpool on kokkuvõtvalt toodud tabel (Tabel 1) antud töös uuritavate patogeenide ja nende sidumiseks kasutatud valkude (Fc fragment ja laktoferrin) vahelised assotsiatsioonikonstandid ja dissotsiatsioonikonstandid.

Tabel 1. Uuritavate patogeenide ja nende seondamiseks kasutatud valkude vahelised sidumiskonstandid (K_a) ja dissotsiatsioonikonstandid (K_d). Rasvases kirjas on välja toodud kirjanduses toodud väärtused.

		$K_a(\text{M}^{-1})$	$K_d(\text{M})$	Viide
1.	SpA (<i>S. aureus</i>) ja inimese IgG Fc fragment	$10^7 - 10^8$	$10^{-8} - 10^{-7}$	[11, 12]
2.	SpA (<i>S. aureus</i>) ja veise laktoferrin	$1,4 \times 10^7$	7×10^{-8}	[13]
3.	OmpA (<i>E. coli</i>) ja inimese IgG Fc fragment	$(5 - 20) \times 10^6$	$(5 - 20) \times 10^{-8}$	[18]
4.	OmpA (<i>E. coli</i>) ja veise laktoferrin	$2,6 \times 10^6$	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	[19]

5.	SUAM (<i>Str. uberis</i>) ja inimese IgG Fc fragment	Kirjanduses andmed puuduvad		
6.	SUAM (<i>Str. uberis</i>) ja veise laktoferriin	10^7	1×10^{-7}	[10, 25]

1.3 Meetodid patogeene määramiseks

Kõige vanem ja tuntum meetod patogeene määramiseks on uuritavate proovide mikrobioloogiline kultiveerimine ja väljakasvatavate kolooniate loendamine. Proovid külvatakse spetsiaalsele söötmele, mis sisaldab inhibiitoreid peatamaks või pärssimaks analüüsi segavate mikroorganismide kasvu. Detekteerimaks määratavat bakterit kasutatakse substraati, mida suudab metaboliseerida vaid huvipakkuv bakter. Söötmele kasvanud bakterikolooniaid on võimalik määrata optiliste meetoditega ning visuaalsel vaatlusel, vaadeldakse näiteks kolooniate morfoloogiat ja kasvu. [26] Mikrobioloogilise meetodiga määratakse vaid elus bakterirakke, meetodi määramispiiriks on 100 CFU/ml [27].

Antud meetodi suurimateks puudusteks on suur ajakulu, määramisprotsess võib kesta kaks päeva või enam. Lisaks võivad tekkida visuaalsel vaatlusel ebatäpsused kolooniate loendamisel. [28]

Teine enamkasutatud meetod patogeene määramiseks on polümeraasiaahelreaktsioon ehk PCR, mis töötati välja 1980-ndatel aastatel. Bakterile iseloomuliku DNA lõigu järjestus isoleeritakse ja amplifitseeritakse. Sõltuvalt PCR-i spetsiifisusest võib analüüsile kuluda 5 – 24 tundi. [29]

Meetod on väga tundlik – patogeene on võimalik määrata madalatel kontsentratsioonidel ($<10^3$ CFU/ml), tavaliselt kestab analüüs kuni kuus tundi [30]. PCR meetod on kiirem kui mikrobioloogiliste külvide meetod, samas ei ole antud analüüsimeetod sobilik kohapeal analüüsides sooritamiseks, kuna PCR-i läbiviimiseks on vaja geneetilise materjali olemasolu [31]. PCR analüüsiga ei suudeta eristada elus ja surnud mikroorganismi, mistõttu määramispiir on alati suurem võrreldes mikrobioloogiliste testidega. PCR analüüs on kulukas, eriti suuremate karjade korral. [32]

Välja on töötatud kommertsiaalsed PCR testid, millega on võimalik määrata mitut patogeeni üheaegselt. Mastitis Complete-16 testiga on võimalik määrata kokku 15 erinevat mastiiti põhjustavat patogeeni ja penitsilliiniresistentsust näitavat beetalaktamaasgeeni [33]. Veel loodi multipleksne PCR-i kiip, millega on võimalik määrata seitset patogeeni:

Streptococcus bovis't, *Streptococcus uberis*'t, *Streptococcus agalactiae*'d, *Streptococcus dysgalactiae*'d, *Corynebacterium bovis*'t, *Staphylococcus aureus*'t ja *Mycoplasma bovis*'t. Testi kestvuseks oli kuus tundi, meetodi määramispiiriks on 10³ CFU /ml [30].

Viimasel ajal on eelpool nimetatud meetodite kõrval järjest enam tähelepanu pööratud biosensorite väljaarendamisele. Biosensor võimaldab mõõta proove otse bioloogilise proovi maatriksist. Biosensorid on analüütilised seadmed, mis koosnevad kolmest osast: analüüti ära tunde element, äratundmisreaktsiooni signaali detekteeriv andur ja üksus, mis töötleb saadud andmeid. Bioäratundvaks elemendiks on bioloogiliselt aktiivne materjal, näiteks ensüümid ja antikehad, mis reageerib selektiivselt analüüdiga. Analüüdi ja bioäratundva elemendi vastastiktoimel tekkiva signaali iseloomust sõltuvalt registreeritakse see optilise, elektrokeemilise, magnetilise või piesoelektrilise anduriga, enimkasutatud tuvastamismeetodid on elektrokeemilised ja optilised. [34]

Sageli kasutatakse patogeenide määramisel biosensorite bioäratundva elemendina antikehi, antud biosensoreid kutsutakse immunobiosensoreteks [35]. Immunobiosensori korral toimub antikeha-antigeen vaheline interaktsioon.

Biosensorite eeliseks võrreldes eelpool mainitud analüüsimeetoditega on proovide eeltötluse puudumine ning lühike analüüsiaeg, mille tõttu saab mõõtmisi teostada reaalajas, kohapeal. Lisaks on biosensoreitel kõrge selektiivsus määratava analüüdi suhtes. [36] Biosensorite puuduseks on bioäratundmiselemendi väike stabiilsus ja suur tundlikkus välistingimuste muutustele [37].

Käesoleval ajal on välja pakutud mitmeid biosensoreid patogeenide ühekaupa määramiseks, kusjuures põhiliselt määratakse *S. aureus* ja *E. coli* baktereid [38]. *Str. uberis*'e tuvastamiseks on loodud meie töörühmas biosensor [39].

Kuna mastiiti võivad põhjustada erinevad patogeenid, on oluline määrata mitme bakteri olemasolu proovis ning seda võimalikult kiiresti, et määrata õige antibiootikum konkreetse patogeeni vastu. Biosensorite suur eelis on lühike mõõtmisaeg, kuid seda on veel võimalik lühendada, määrates põhilisi udarapõletikku põhjustavaid baktereid üheaegselt. Biosensorite kasutamine on suurenenud, kuid biosensoreid patogeenide üheaegseks määramiseks on väga vähe. Biosensoreid mitme patogeeni samaaegseks määramiseks on välja toodud tabelis 2.

Tabel 2. Biosensorid patogeenide üheaegseks määramiseks

Biosensorid	Patogeenid	Analüüdi äratundmissüsteem	Määramispiir, CFU/ml	Analüüsi aeg, min	Viide
Kemoluminesentsil põhinev antikeha järjestus	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>	Antikeha	8×10^4 5×10^7	75 min	[40]
Impedants-immunosensor	<i>E. coli O157:H7</i> , <i>S. aureus</i>	Antikeha	10^2	2 h	[41]
Fluorestsentsi mõõtmise voolupõhiseel kineetilise eristamise	<i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Antikeha	$5,2 \times 10^4$ $4,1 \times 10^5$	<15 min	[42]

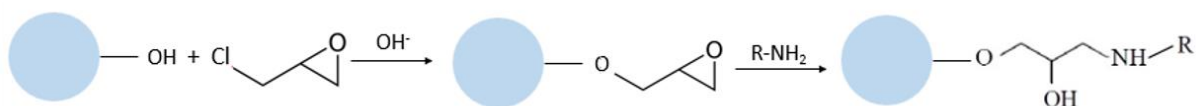
1.4 Valkude immobiliseerimismeetodid Sephadex geelile

Määramaks patogeene on vajalik seondamiseks kasutatava valgu eelne immobiliseerimine kandjale, antud töös vaadeldakse lähemalt erinevaid kovalentse sideme moodustamise võimalusi. [43]

Kovalentse sideme moodustamine valgu ja tahke kandja vahel on üks levinumaid meetodeid valkude pöördumatuks sidumiseks. Valk immobiliseeritakse erinevate aminohapete kõrvalrühmade kaudu, kõige sagedamini lüsiini aminorühma kaudu. Veel on võimalik siduda valke karboksüül- (asparagiinhape, Asp; glutamiinhape, Glu), hüdroksüül-, tiol- (tsüsteiin, Cys) ja teiste aminohapete jääkides leiduvate kõrvalrühmade kaudu. Kandjatena kasutatakse tavaliselt CNBr-aktiveeritud (tsüaanbromiid) Sephadex või Sepharose geeli, agarosi või tselluloosi. [44, 45] Antud töös immobiliseeriti laktoferrin ja Fc fragment Sephadex geelile, mis koosneb dekstraani (glükaan) molekulidest, mis on omavahel ristseotud epikloorhüdriniga [46]. Sidumaks valke geelile on geel vaja eelnevalt aktiveerida, modifitseerida kandjal olevaid funktsionaalrühmi nii, et kandja saaks moodustada kovalentse sideme vajaliku valguga [47]. Olenevalt geelil olevatest funktsionaalrühmadest kasutatakse aktiveerimiseks erinevaid substraate. Meetodeid valkude kovalentseks sidumiseks kandjale on mitmeid, järgnevatel alapeatükkides on toodud välja kolm põhilisemat [48].

1.4.1 Epikloorhüdriniiga graanulite aktiveerimine

Üks kõige levinumaid meetodeid valkude immobiliseerimiseks on epikloorhüdrini kasutamine tänu epoksürühma kõrgele reaktsioonivõimele. Epoksürühm võib reageerida valgul asuvate amino- ja tiolrühmadega kõrgemal pH-l kui ka karboksüülrühmadega madalamal pH-l. Halogeeni sisaldavaid epoksiide kasutatakse väga tihti, kui mitte alati, hüdroksüülrühmi sisaldavate tahkete kandajate aktiveerimiseks. [49] Epikloorhüdrin reageerib geelis olevate hüdroksüülrühmadega kloori aatomi kaudu, moodustades monoetri [50]. Epoksürühm reageerib valgus oleva aminorühmaga S_N2 tüüp II reaktsioonimehhanismi alusel. Antud reaktsioon võib toimuda nii katalüsaatori puudumisel kui katalüsaatori juuresolekul. [51, 52] Reaktsiooniskeem on kujutatud joonisel 2.



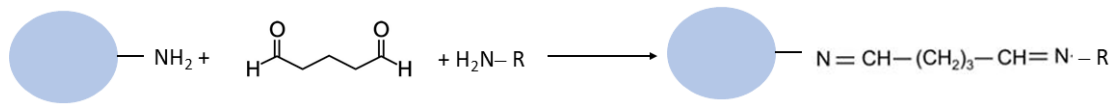
Joonis 2. Epikloorhüdriniiga valgu sidumine tahkele kandjale.

Epoksürühmaga aktiveeritud kandja suureks eeliseks on kõrge stabiilsus neutraalsel pH-l, mis on võimeline reageerima erinevate valgul leiduvate funktsionaalrühmadega [53]. Sephadex-i ja teiste glükoosil baseeruvate kandjate korral puudub vajadus kandja modifitseerimiseks. Suureks puuduseks on polüsahhariidi, glükaani (kandja) glükosüülimine, mille tulemusena võib kandja katta immobiliseeritava biomolekulil aktiivseid rühmi, mis omakorda vähendab analüüdi seondumist. [49]

1.4.2 Glutaaraldehüüdiga graanulite aktiveerimine

Glutaaraldehüüd on dialaldehüüd, kasutatakse tihti tahkete kandjate aktiveerimiseks valkude immobiliseerimisel. Erinevalt epikloorhüdriniiga aktiveerimiseks, on glutaaraldehüüdi kasutamiseks kandja aktiveerijana vajalik, et geelil oleksid aminorühmad. [54]

Täpset glutaaraldehüüdi ja valkude vahelist reaktsioonimehhanismi ei teata. Pakutakse, et enne valguga kovalentse sideme moodustumist omab glutaaraldehüüd tsüklilist kuju ning võib reageerida nii monomeeri kui ka polümeerina. Glutaaraldehüüd reageerib põhiliselt valgul olevate aminorühmadega, harva tiolrühmaga. [55] Reaktsiooniskeemi on näha joonisel 3.



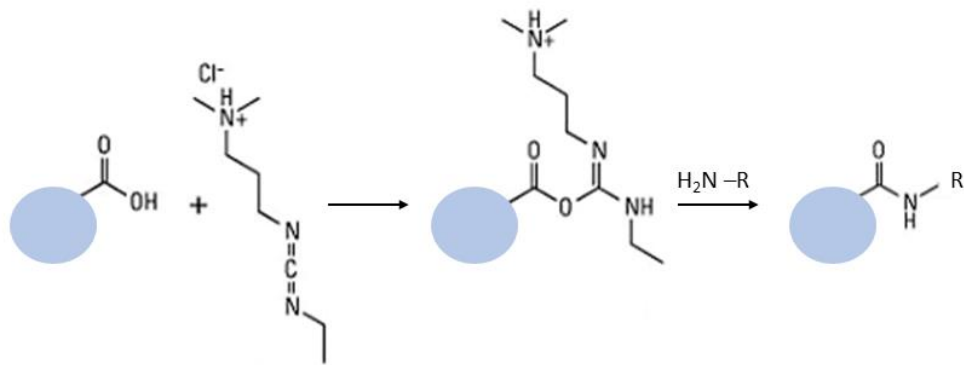
Joonis 3. Glutaaraldehüüdiga valgu sidumine tahkele kandjale.

Glutaaraldehüüdi kasutamise eelised on meetodikate lihtsus ja efektiivsus. Samas glutaaraldehüüdiga aktiveeritud kandja stabiilsus aluselises keskkonnas on suhteliselt väike. [55, 56] Sephadex geelil puuduvad aminorühmad, mistõttu on vaja geeli modifitseerida, kõige lihtsam meetod on hüdroksüülrühma esterdamine [49].

1.4.3 Karbodiimiidiga graanulite aktiveerimine

Kolmas meetod tahke kandja ja valgu omavaheliseks sidumiseks on karbodiimiini kasutamine. Karbodiimiini puhul on tegu funktsionaalrühmaga, kõige enam kasutatud karbodiimiid on EDC ehk 1-etüül-3-(dimetüülanimopropüül)karbodiimiid. Erinevalt eelpool mainitud immobiliseerimismeetoditest, kasutatakse EDC-d reaktsiooni käivitajana, kuid aine ise reaktsioonis ei osale. Antud reaktsiooni on valkude immobiliseerimiseks kasutatud kümneid aastaid. [57]

EDC-d kasutatakse aktiveerimaks karboksüül- ja aminorühma vahelist peptiidsideme tekke reaktsiooni, EDC seondub graanulitel olevate karboksüülrühmadega. Tekib vaheühend O-atsüüluurea. Valgul asuvad aminorühmad ründavad tekkinud vaheühendit, moodustades peptiidsideme karboksüülrühmaga ning tõrjudes eemale aktiveerimiseks kasutatud karbodiimiidi. [57, 58] Reaktsiooniskeem on välja toodud joonisel 4. Antud reaktsioonimeetod on robustne, samas tekkiv vaheühend on vesilahustes ebastabiilne, kui aminorühmaga reageerimist ei toimu, vaheühend hüdrolyüsib. Kuna Sephadex geelil puuduvad karboksüülrühmad, peaks tegema lisaetappe modifitseerimaks geeli graanuleid, ühe ainega saaks kasutada näiteks TEMPO-t (2, 2, 6, 6-tetrametüülpiperidiin-1-oksüül) [49].



Joonis 4. EDC-ga valgu immobiliseerimine tahkele kandale.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid

1. Sephadex G50 Medium, (Pharmacia Fine Chemicals, osakeste suurus 80 – 150 μm)
2. Epikloorhüdriin ($\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$), Acros Organics, 99%
3. Naatriumkloriid (NaCl), Sigma Aldrich; 99,8%
4. Naatriumkarbonaat (Na_2CO_3), AppliChem; 99,5%
5. Naatriumhüdrosiid (NaOH), AppliChem; 99%
6. Naatriumdivesinikfosfaatdihüdraat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), AppliChem; 99%
7. Kaaliumdivesinikfosfaat (KH_2PO_4), AppliChem; 99,5%
8. Vesinikkloriidhape (HCl), Reachim, 35 – 38 %
9. Etanoolamiin ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$), Sigma Aldrich, 99,5%
10. Dialüüsimembraan Spectra/Por $\text{\textcircled{R}}$ 6 – 8 kDa
11. Coomassie brilliant blue G-250, Sigma Aldrich
12. Kaaliumkloriid (KCl), AppliChem; 99,5%
13. Kitse polüklooraalne proteiin A antikeha, märgitstatud Texas Red-iga, NB120-7243, 2 mg/ml, Novus Biologicals
14. Küüliku polüklooraalne *E. coli* antikeha, märgitstatud FITC-iga, NB100-64448, 2 mg/ml, Novus Biologicals
15. Küüliku polüklooraalne *Str. uberis*'e antikeha, märgitstatud markeriga Dylight 550
16. Inimese IgG Fc fragment, puhastatud vereseerumist, seerum saadi Tartu Ülikooli Verekeskusest
17. Laktoferriin, Sigma Aldrich, $\geq 85\%$

2.2 Kasutatud seadmed

1. FIALab 3500B (FIALab Industries)
2. Halogeenlamp DH-2000 (Ocean Optics)
3. Spektromeeter USB2000+ (Ocean Optics)
4. UV 1800 UV-Vis Spektrofotomeeter (Shimadzu corporation)
5. Loksuti MS-3000 (Biosan)
6. Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
7. pH-meeter (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,02$ pH ühikut
8. Analüütiline kaal XS105 Dual Range (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ mg
9. Tehniline kaal PB602-S/FACT (Mettler Toledo), täpsus $\pm 0,01$ g

10. Magnetsegaja MS 3000 (Biosan)

11. Vortex segaja (Heidolph)

2.3 Metoodika

2.3.1 Inimese IgG Fc fragmendi sidumine Sephadex geelile

Bioaktiveeritud geelide valmistamisel kasutati meie töögrupis varasemalt kasutusel olnud metoodikaid [59]. Inimese IgG Fc fragmendi sidumiseks graanulitele lisati 47,3 mg Sephadex G50 Medium geelile 1 ml Milli-Q vett. Geeli segati ja jäeti punduma vähemalt 24 tunniks 4 °C juures. Pundunud geelile lisati 400 ml 0,4 M NaOH lahust ning segati. Seejärel lisati geelile 5% epikloorhüdriini lahust ning asetati kolmeks tunniks loksutule toatemperatuuril.

Geeli tsentrifuugiti 5 minutit (2450 x g) ning pesti kaks korda Milli-Q veega ning üks kord Na₂CO₃ (pH 9,50) puhvriga. Iga pesu etapi järel geel eraldati tsentrifuugimise teel (5 min, 2450 x g). Geelile lisati inimese IgG Fc fragmendi lahust Na₂CO₃ puhvris (pH 9,50), kus Fc fragmenti sisaldus kokku 1,4 mg, maksimum kontsentratsiooniks oli 2 mg/ml. Segu loksutati ja inkubeeriti 24 tundi 4 °C juures. Kui Fc fragment oli hoiustatud -20 °C juures glütseroolis, tehti eelnevalt Fc fragmendi lahuse dialüüs Na₂CO₃ (0,5 M Na₂CO₃, pH 9,50) puhvri vastu 4 °C juures 3 h.

Mitteseondunud valgu lahuse eemaldamiseks geeli tsentrifuugiti ja pesti kaks korda Na₂CO₃ puhvriga (pH 9,50). Pärast esimest tsentrifuugimist mõõdeti supernatandis UV-Vis spektromeetriga valgu kontsentratsioon lahuses hindamaks, kui palju Fc fragmenti oli graanulitele seondunud. Spektromeetri lainepikkuseks seati 280 nm. Lisaks kontrolliti biomolekuli seondumist geelile visuaalselt Coomassie Brilliant Blue abil. Seejärel blokeeriti geelil olevad vabad sidumiskohad etanoolamiini lahusega Na₂CO₃ puhvris (pH 9,50, 85 µl/ml) inkubeerides geeli loksutil 2 h 4 °C juures. Üleliigse etanoolamiini eraldamiseks geeli tsentrifuugiti viis minutit (2450 x g) ja pesti kaks korda 685 µl MilliQ veega. Seejärel pesti geeli PBS puhvriga (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) kuus korda. Iga pesu järel eraldati graanulid tsentrifuugimise teel (5 min, 2450 x g). Bioaktiveeritud geeli hoiustati PBS puhvris (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) 4 °C juures.

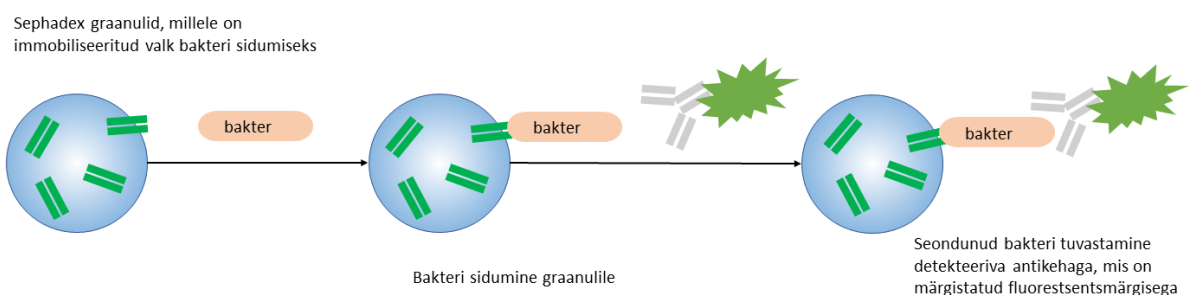
2.3.2 Laktoferrini sidumine Sephadex geelile

Laktoferrini seoti geelile sama metoodika alusel, mida kirjeldati peatükis 2.3.1, paari muudatusega. Võeti 47,3 mg Sephadex G50 Medium geeli, millele lisati 1 ml MilliQ vett, geel jäeti 24 h punduma 4 °C juures. Pundunud geelile lisati 400 µl 0,4M NaOH lahust ja 5%

epikloorhüdrini lahust. Eppendorfi segati vaikselt ja pandi loksutale 3 h toatemperatuuril. Geeli pesti seejärel 2 korda Milli-Q veega ja üks kord kaaliumkloriidi ja naatriumhüdroksiidilahusega (0,2M KCl + 0,2M NaOH, pH 13,00). Seejärel kaaluti laktoferrin ning lahustati see samas kaaliumkloriidi ja naatriumhüdroksiidi lahuses (1 mg/ml). 685 µl antud laktoferrini lahust lisati geelile, segu loksutati ja jäeti loksutale inkubeerima 24 h 4 °C juures. Geeli tsentrifugiti ja geeli kohal olev lahus eemaldati ning pesti 2 korda kaaliumkloriidi ja naatriumhüdroksiidi lahusega. Tsentrifugimist korrati pärast iga pesu. UV-Vis spektromeetriga mõõdeti valgu kontsentratsioon supernatandis, hindamaks laktoferrini seostumist geelile. Lisaks määrati laktoferrini seostumist visuaalselt Coomassie Brilliant Blue värvi abil. Seejärel blokeeriti graanulitel olevad vabad sidumiskohad etanoolamiini lahusega kaaliumkloriidi ja naatriumhüdroksiidilahuses (pH 13,00, 85 µl/ml), milleks loksutati geeli 2 h 4 °C juures. Bioaktiveeritud geeli pesti eelmises alapeatükis kirjeldatud meetodika alusel. Bioaktiveeritud geeli hoiustati PBS puhvris (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20) 4 °C juures.

2.3.3 Mõõtmiste teostamine biosensoriga

Mõõtmiste läbiviimiseks kasutati graanulsisesusanalüüsi (BIA, *Bead Injection Analysis*) süsteemi. Kõik mõõtmised viidi läbi varasemalt välja töötatud protokollil alusel (joonis 5) [59]. Esmalt voolutati süsteemi voolukanalisse 20 µL bioaktiveeritud mikrograanuleid, mis moodustasid ühekordselt kasutatava patogeene siduva mikrokolonni. Voolukiiruseks valiti 1 µl/sek. Voolukanal oli osaliselt suletud kanali läbimõõdult 0,2 mm kitsama liigutatava korgiga, mis võimaldas mõõtmisi läbi viia, kuid hoidis mikrokolonni voolukanalis .



Joonis 5. Üldine skeem patogeene mõõtmiseks.

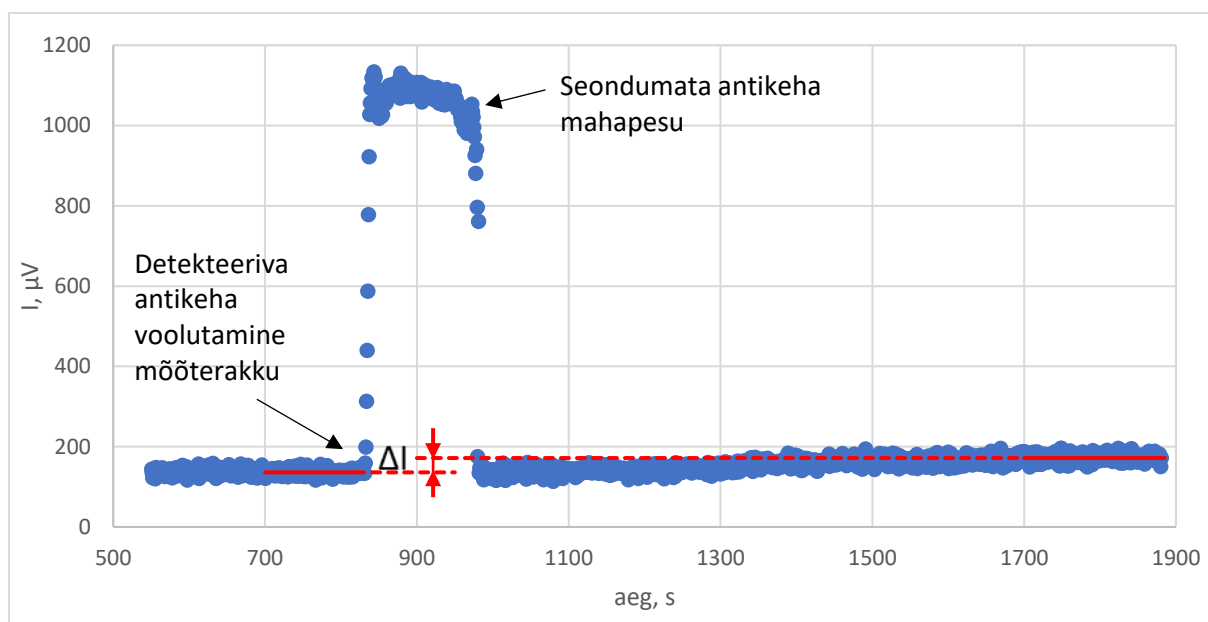
Tagamaks bioaktiveeritud graanulite jõudmist mõõtekanalisse ning tagamaks nende ühtlast pakitust voolutati mõõterakku 30 µl PBS puhvrit (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20), voolukiirusega 2 µl/sek. Seejärel viidi mõõterakku 150 µl, voolukiirusega 1 µl/sek kas *S.aureus*, *Str. Uberis* või *E.coli* bakteri lahused. Proovi inkubeeriti 3 minutit tagamaks võimalikult suure hulga proovis leiduvate bakterite seondumist bioaktiveeritud molekulidele. Seondumata

analüüdi ja proovi maatriksi eemaldamiseks kolonnist pestakse mõõterakku 150 µl-i PBS puhvriga voolukiirusel 2 µl/sek.

Seejärel sisestati mõõterakku 30 µl fluorestsentsmarkeriga märgistatud detekteerivat antikeha, voolukiirusega 1 µl/sek. Detekteeriva komponendi selektiivsel seondumisel kolonnil oleva analüüdiga tekib detekteeritav kompleks. *E. coli* antikeha ja *S. aureus*'e antikehi inkubeeriti mõõterakus üks minut, *Str. uberis*'e antikeha inkubeerimisajaks oli kaks minutit. Mitteseondunud detekteeriv antikeha pesti süsteemist välja 150 µl PBS puhvriga (10 mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20), voolukiirusel 2 µl/sek. Seejärel oodati biosensori signaali stabiliseerumist, määramaks kui suur signaal vastab antud bakteri kontsentratsioonile.

S.aureus'e määramiseks kasutati proteiin A vastast antikeha, mis oli märgistatud Texas Red fluorestsentsmarkeriga, *E. coli* puhul kasutati FITC-iga märgistatud anti-*E.coli* polükloonaalset antikeha, *Str. Uberis*'e korral anti-*S. uberis* antikeha, mis oli märgistatud fluorestsentsmarkeriga DyLight 550. Iga bakteri kontsentratsiooni mõõdeti eraldi lainepikkusel vastavalt detekteeriva antikehaga konjugeeritud fluorestsentsmarkeri emissiooni lainepikkusele. Fluorestsentsmarkerite ergastamiseks sobiv valguse lainepikkus, mis vastas mõõdetava fluorestsentsmarkeri ergastusmaksimumi lainepikkusele, seadistati filtri abil. *E. coli* bakterit detekteeriti lainepikkusel 520 nm (FITC), *Str. uberis* bakterit lainepikkusel 572 nm (DyLight 550) ja *S. aureus* bakterit lainepikkusel 610 nm (Texas Red).

Kõik mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril. Iga mõõtmist korrati vähemalt 3 korda ning arvutati välja keskmine tulemus ja standardhälve. Näide keskmise tulemuse arvutamise kohta on toodud joonisel 6. Mõõtmisi teostati bakterite kontsentratsioonide vahemikus 0 – 10⁸ CFU/ml. Kõigi bakterite (*E.coli*, *S.aureus* ja *Str. uberis*) puhul leiti iga mõõtmise kohta väärtus ΔI , mis kirjeldab stabiliseerinud signaali keskmise intensiivsuse vahet enne ja pärast märgistatud antikeha voolutamist kolonni.



Joonis 6. Signaali keskmise arvutamine. Vasakul pool on kujutatud stabiilne signaal enne detekteeriva antikeha lisamist, paremal pool pärast antikeha maha pesemist. Pideva joonega on kujutatud stabiilne signaal, mis keskmistati biosensori signaali saamiseks. ΔI väärtus on saadud lahutades pärast seondumata antikeha pesu signaalist enne detekteeriva antikeha süstimist mõõdetud signaal.

2.3.4 Funktsionaliseeritud geelide segude valmistamine

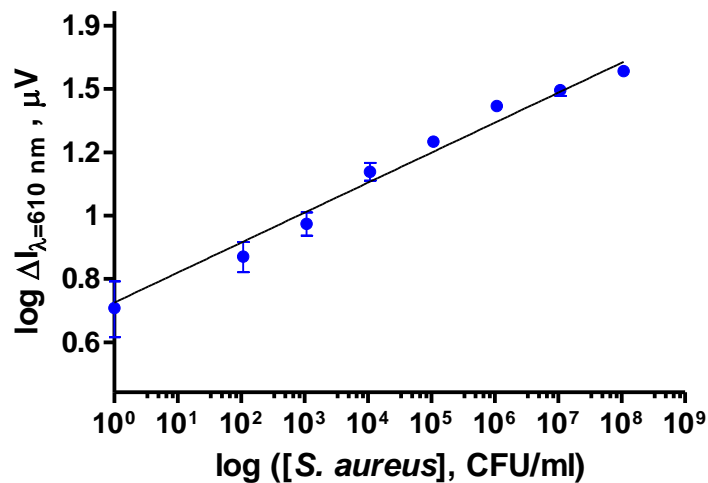
Erinevad bakterid võivad seonduda kas ühele või mitmele bioaktiveeritud graanulile, seetõttu on vaja erinevate patogeenide üheaegseks detekteerimiseks segada erinevaid biomolekulidega aktiveeritud graanuleid. Erinevate bioaktiveeritud graanulite koguse muutmise uurimiseks segati bioaktiveeritud graanuleid erinevates vahekordades aktiveerimata Sephadex G50 Medium graanulitega. Seega muutus aktiveeritud geeli hulk mõõterakus, aga kolonni moodustavate graanulite koguruumala ei muutunud

Geelide segud valmistati arvestusega, et nendes oleks 5 – 60% (*S. aureus*'e puhul kasutati vahemikku 5 – 30%) bioaktiveeritud geeli, millele on immobiliseeritud kas inimese IgG Fc fragment või laktoferriin, ülejäänud osa moodustas aktiveerimata geel.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 *S. aureus*'e määramine kasutades laktoferriniiga funktsionaliseeritud graanuleid

S. aureus'e määramiseks kasutatava laktoferriniiga funktsionaliseeritud graanulitel põhineva biosensorsüsteemi (milles mikrokolonni moodustamisel oli geel 100%-selt aktiveeritud laktoferriniiga) iseloomustamiseks koostati esmalt sõltuvus $\Delta I = 10^{A+B \cdot \log[S. aureus]}$, kus A on $\log \Delta I$ telglõik ning B selle sõltuvuse tõus (joonis 7).

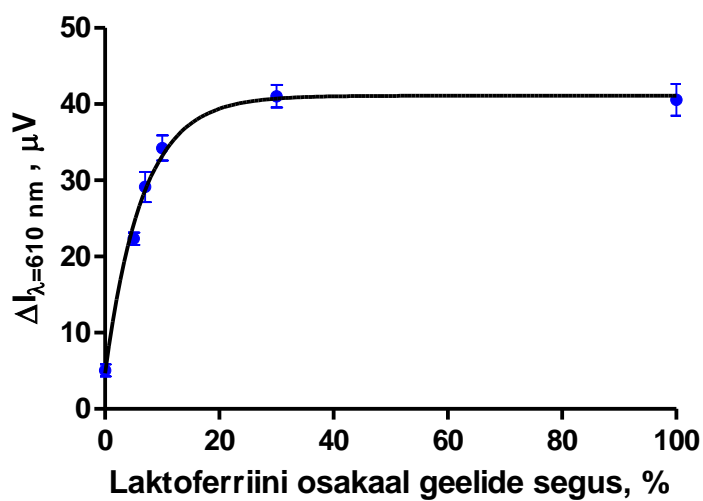


Joonis 7. *S. aureus*'e kalibreerimisgraafik laktoferriniiga funktsionaliseeritud geelil logaritmilises skaalas.

Mõõtmised viidi läbi PBS puhvris seitsmel erineval patogeeni kontsentratsioonil vahemikus $1,1 \times 10^2 - 1,1 \times 10^8$ CFU/ml. Logaritmilises teljestikus sõltub biosensori signaal patogeeni kontsentratsioonist lineaarselt kogu uuritud patogeeni kontsentratsioonivahemikus, kusjuures sirge tõus, mis iseloomustab süsteemi tundlikkust, on $0,048 \pm 0,002$. Biosensori taustasignaali eksperimentaalseks määramiseks mõõdeti signaal PBS puhvris, kuhu ei olnud eelnevalt lisatud *S. aureus*'e lahust. Taustasignaali väärtuseks saadi $4,8 \pm 1,1$ μV, mis langeb kokku ka arvatud kalibreerimisgraafiku telglõigu väärtusega $4,9 \pm 0,5$ μV. Selle biosensori detekteerimispiiri (taustasignaali + 3-kordne standardhälve) väärtus, oli 155 CFU/ml.

Seejärel teostati mõõtmised kasutades bioaktiveeritud geeli ja nn puhta geeli segusid, hindamaks kui suure osahulga bioaktiveeritud geeliga on võimalik saavutada sama signaali kui sama kontsentratsiooniga bakteri lahusega ainult funktsionaliseeritud geeliga. Selleks

valmistati erinevad geelide segud, kus laktoferriniiga immobiliseeritud geeli osahulka varieeriti vahemikus 5% – 30%. Mõõdeti ka biosensori taustasignaali, kui mõõterakku viidi funktsionaliseerimata geel, taustasignaali väärtuseks saadi $5,1 \pm 0,8 \mu\text{V}$, mis ei erine laktoferriniiga aktiveeritud graanulitest moodustatud kolonni taustasignaalist. Võrdlusemõõtmised tehti *S. aureus*'e kontsentratsioonil $1,1 \times 10^8$ CFU/ml, sest siis oli biosensori signaal võrreldes eksperimentaalsete müradega suurim. Saadud tulemused on toodud joonisel 8,



Joonis 8. Biosensori väljundsignaali sõltuvus laktoferriniiga funktsionaliseeritud geeli osakaalust mikrokolonni moodustavas geelide segus *S. aureus*'e kontsentratsioonil $1,1 \times 10^8$ CFU/ml. Mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril PBS puhvis.

Jooniselt 8 on näha, et biosensori signaal jõuab teatud laktoferrini osakaalu korral platoole ning bioaktiveeritud geeli hulka tõstes biosensori signaal enam ei suurene vaid jääb konstantseks. Leidmaks vähim geeli osahulk, kus signaal on jõudnud platoole, kirjeldati saadud sõltuvust esimest järku sidumist kirjeldava võrrandi abil

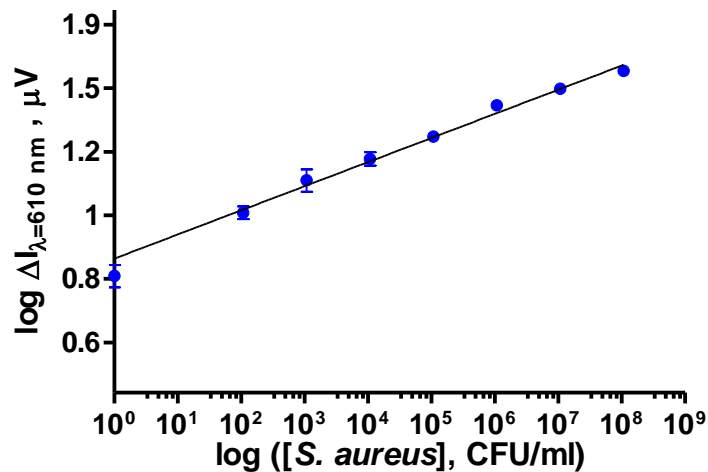
$$Y = Y_0 + (Y_{\text{plato}} - Y_0) * (1 - e^{-K*x}) \quad (1)$$

kus x on laktoferrini geeli kogus protsentides, Y on vabalt valitud y -telje väärtus, milleks antud töös kasutati 95% Y_{plato} väärtusest, Y_{plato} on Y -i väärtus kui $x = \infty$, K on kiiruskonstant. Y_0 on ΔI , antud töös valiti Y -i väärtuseks 95% Y_{plato} väärtusest, et platoon (signaal enam ei muutu

geeli osakaalu tõstes) oleks saavutatud 95%-se tõenäosusega. Rakendades valemit 1 leiti, et *S. aureus*'e määramiseks ilma biosensori tundlikkust kaotamata, on laktoferriniga aktiveeritud geeli vajalik osakaal mikrokolonni moodustavas geelis 17,5%.

3.2 *S. aureus*'e mõõtmine Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geeliga

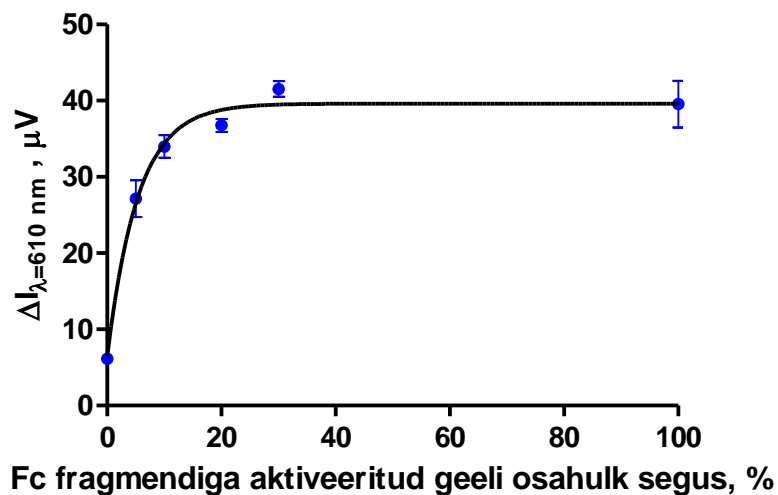
Lisaks *S. aureus*'e määramisele laktoferriniga immobiliseeritud geeli mikrokolonniga, mõõdeti biosensori signaali ka süsteemis, kus graanulitele oli immobiliseeritud Fc fragment. Antud biosensorsüsteemi korral saadi samasugune sõltuvus nagu peatükis 3.1. *S. aureus*'e kalibreerimisgraafik logaritmilises teljestikus, on kujutatud joonisel 9, kui mikrokolonni moodustamisel kasutati geeli, mis oli 100%-selt aktiveeritud Fc fragmendiga.



Joonis 9. *S. aureus*'e kalibreerimisgraafik Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geelil. Graafik on logaritmilises skaalas

Mõõtmised viidi läbi PBS puhvris seitsmel erineval bakteri kontsentratsioonil vahemikus $1,1 \times 10^2 - 1,1 \times 10^8$ CFU/ml. Biosensori taustsignaali mõõdeti eksperimentaalselt PBS puhvris, kus puudus bakteri lahus, taustsignaaliks saadi $5,8 \pm 0,6$ μV, kalibreerimisgraafiku põhjal arvutati taustsignaali väärtuseks $6,5 \pm 0,5$ μV. Antud biosensori määramispiiriks saadi 180 CFU/ml. Biosensori signaal sõltub lineaarselt terve uuritud *S. aureus*'e kontsentratsioonivahemikus, sirge tõus, mis kirjeldab biosensori tundlikkust, on $0,038 \pm 0,001$. Võrreldes *S. aureus*'e mõõtmist laktoferriniga ja inimese IgG Fc fragmendiga aktiveeritud geeli abil, selgus et suurema tundlikkusega süsteem *S. aureus*'e määramiseks saadi kasutades laktoferriniga aktiveeritud geeli.

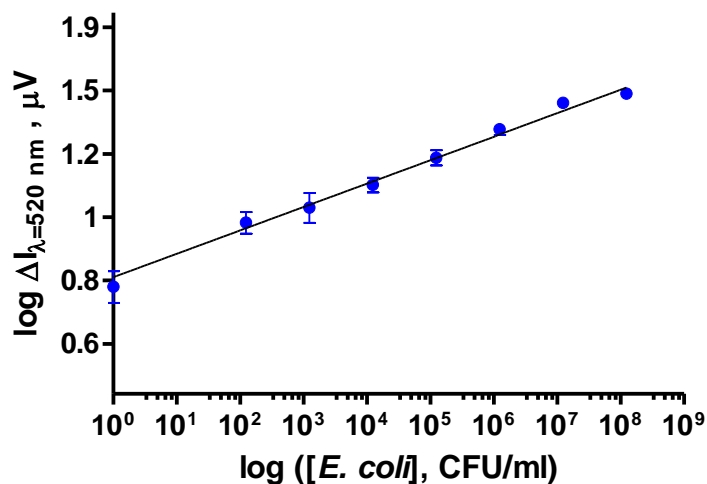
Järgmisena sooritati mõõtmisi, kus kasutati Fc fragmendiga aktiveeritud geeli ja nn puhta geeli segusid, leidmaks kas antud biosensori signaal muutub bioaktiveeritud geeli osakaalu vähendamisel. Mõõdeti erinevat geelide segu, milles aktiveeritud geeli osahulk oli vahemikus 5 – 30%, ülejäänud osa moodustas puhas ainult punduma pandud geel. Mõõtmised tehti bakterilahuse kontsentratsioonil $1,1 \times 10^8$ CFU/ml. Saadud tulemused on toodud joonisel 10. Antud jooniselt on näha sarnaselt alapeatükis 3.1 kujutatule, et biosensori signaal mingil Fc fragmendi osakaalul jääb konstantseks. Saadud sõltuvus vastab samuti esimest järku sidumisreaktsiooni kirjeldavale võrrandile. Leidmaks vähim geeli osahulk, kus signaal enam ei muutu, rakendati valemit 1. Kasutades saadud väärtusi leiti, et vähim Fc fragmendiga aktiveeritud geeli osakaal geelide segus mõõtmaks bakterit *S. aureus* signaali tundlikkust kaotamata on 15,3%.



Joonis 10. Biosensori signaali sõltuvus Fc fragmendiga aktiveeritud geeli osahulgast geelide segus. *S. aureus*'e kontsentratsiooniks oli $1,1 \times 10^8$ CFU/ml. Mõõtmised viidi läbi PBS puhvril toatemperatuuril.

3.3 *E. coli* määramine kasutades Fc fragmendiga aktiveeritud graanuleid

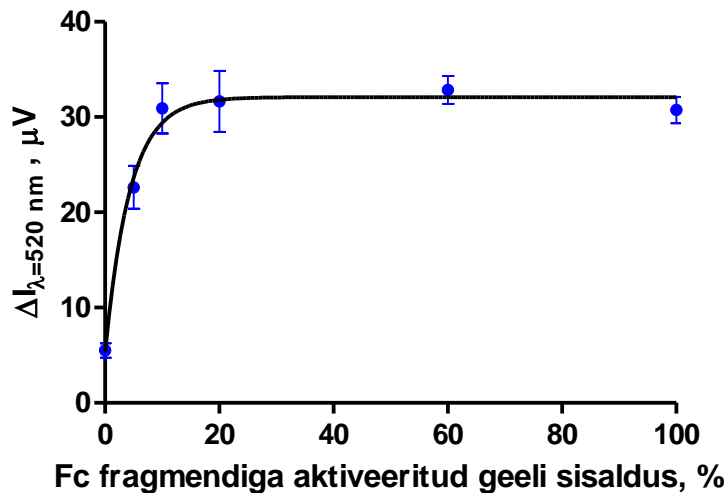
E. coli bakterit määrati kasutades Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geelil põhinevat biosensorit, kus mikrokolonn moodustati täielikult bioaktiveeritud geelist. Saadud graafikut iseloomustab sõltuvus $\Delta I = 10^{A+B \cdot \log[E. coli]}$, kalibreerimisgraafik on kujutatud joonisel 11.



Joonis 11. *E. coli* kalibreerimisgraafik logaritmilises skaalas. *E. coli* bakterit mõõdeti Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geeliga.

Mõõtmisi tehti seitsmel erineval patogeeni kontsentratsioonil vahemikus $1,2 \times 10^2$ – $1,2 \times 10^8$ CFU/ml, mõõtmised viidi läbi PBS puhvril. Eksperimentaalselt saadi biosensori taustasignaalsiks $5,5 \pm 0,8$ μV . Arvututaud kalibreerimisgraafiku telglõigu väärtuseks saadi $5,8 \pm 0,5$ μV , mis vastab eksperimentaalselt saadud väärtusele. Antud biosensori detekteerimispiiriks saadi 190 CFU/ml. Kalibreerimisgraafikult on näha, et biosensori signaal on lineaarne terves mõõtetud kontsentratsioonivahemikus, süsteemitundlikkuseks on $0,037 \pm 0,002$.

Lisaks 100% funktsionaliseeritud geelile sooritati mõõtmisi ka aktiveeritud geeli ja puhta geeli segudega. Valmistati neli erinevat graanulite segu vahemikus 5 – 60%. *E. coli* kontsentratsiooniks oli $1,2 \times 10^8$ CFU/ml. Saadud tulemused on toodud joonisel 12.



Joonis 12. Biosensori signaali sõltuvus Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geeli osakaalust mikrokolonni moodustavas geelide segus *E. coli* kontsentratsioonil $1,2 \times 10^8$ CFU/ml.

Jooniselt 12 on näha, et biosensori väljundsignaal jõuab teatud ajahetkel jääb stabiilseks. Biosensori taustasignaalsiks saadi $5,5 \pm 0,8 \mu\text{V}$. Saadud sõltuvus vastab esimest järku sidumisreaktsiooni kirjeldavale võrrandile. Valemit 1 kasutades leiti vähim geeli hulk, kus biosensori väljundsignaal on jõudnud platoole. Saadud valemi põhjal leiti, et vähim Fc fragmendiga aktiveeritud geeli hulk mõõtmaks bakterit *E. coli*, on 12,3 %.

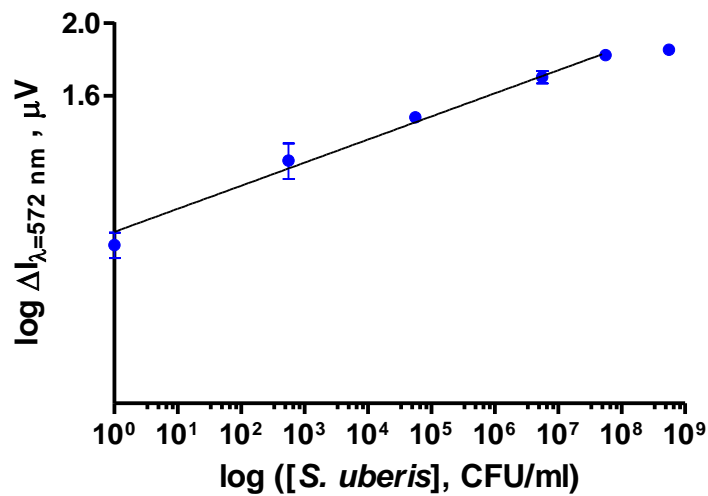
3.4 *E. coli* määramine laktoferriiniga aktiveeritud geeli kasutades

E. coli bakterit mõõdeti immunobiosensoriga, kus kasutati geeli, mis oli funktsionaliseeritud laktoferriiniga. Esmalt mõõdeti biosensori taustasignaali, mille väärtuseks saadi $5,8 \pm 1,2 \mu\text{V}$. Seejärel mõõdeti signaali, kui mõõterakku süstiti *E. coli* bakteri lahust, mille kontsentratsiooniks oli $1,2 \times 10^8$ CFU/ml, signaali väärtuseks saadi $5,7 \pm 1,4 \mu\text{V}$. Kuna taustasignaali ja kõrgeima bakteri lahuse kontsentratsioonil saavutatavad immunobiosensori signaalid langevad kokku, siis järeldati, et ka madalamatel bakteri lahuste kontsentratsioonidel on biosensori signaal sama. Saadud tulemuste põhjal *E. coli* bakter ei seonu laktoferriinile, millest võib järeldada et, *E. coli* ei seonu laktoferriinile ka geelide segus.

3.5 *Str. uberis*'e mõõtmine laktoferriini ning Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geelidega

Str. uberis't määrati biosensoriga kasutades laktoferriiniga funktsionaliseeritud geeli. Mõõdeti kõigepealt, kui kasutatud geel oli 100% aktiveeritud laktoferriiniga. Biosensori

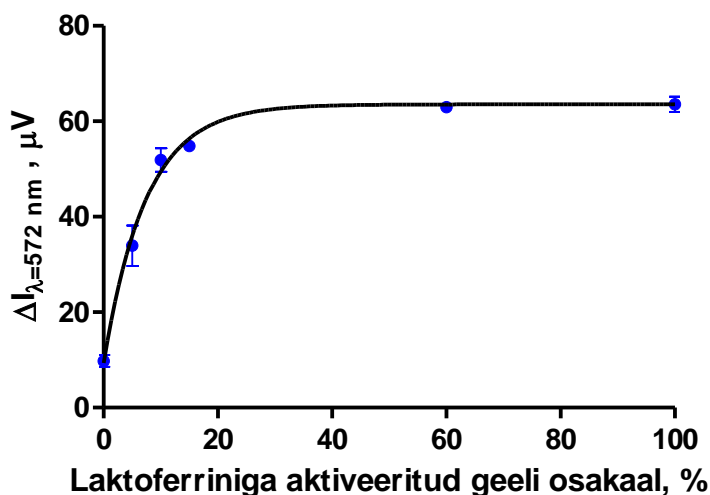
iseloomustamiseks koostati sõltuvus $\Delta I = 10^{A+B \cdot \log[S. \text{uberis}]}$, kus A on $\log \Delta I$ telglõik ja B selle sõltuvuse tõus (joonis 13).



Joonis 13. *Str. uberis*'e kalibreerimisgraafik laktoferriniga funktsionaliseeritud geelil logaritmilises skaalas.

Str. uberis't mõõdeti viiel erineval patogeeni kontsentratsioonil vahemikus $5,6 \times 10^2$ – $5,6 \times 10^8$ CFU/ml. Kõik mõõtmised toimusid PBS puhverlahuses (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,20). Biosensori taustasignaals mõõdeti $9,8 \pm 1,3$ μV , arvatatud telglõigu väärtuseks saadi $10,7 \pm 0,5$ μV . Taustasignaal mõõdeti PBS puhvrts, kuhu ei olnud ühtegi patogeeni lisatud. Antud biosensori detekteerimispiiriks (patogeeni kontsentratsioon, kui biosensori signaal vastab signaalile taustasignaal + 3-kordne standardhälve) on 400 CFU/ml. Joonisel 13 on näha, et biosensori signaal on lineaarne vahemikus $5,6 \times 10^2$ – $5,6 \times 10^7$ CFU/ml, sirge tõusuks on $0,032 \pm 0,002$.

Seejärel teostati mõõtmised kasutades bioaktiveeritud geeli ja nn puhta geeli segusid, eesmärgiga hinnata, kui suure osa bioaktiveeritud geeliga on võimalik saavutada samas suurusjärgus signaal, kui bakterit mõõdeti ainult funktsionaliseeritud geeliga. Valmistati neli erinevat geelide segu, kus laktoferriniga immobiliseeritud geeli hulka varieeriti vahemikus 5% – 60%. Mõõtmised tehti *Str. uberis*'e kontsentratsioonil $8,5 \times 10^7$ CFU/ml, sest siis oli biosensori signaal suurim. Saadud tulemustest tehti joonis 14.



Joonis 14. Biosensori signaali sõltuvus laktoferriniga aktiveeritud geeli osakaalust mikrokolonni moodustavas geelide segus *Str. uberis*'e kontsentratsioonil $8,5 \times 10^7$ CFU/ml. Mõõtmised viidi läbi PBS puhvril toatemperatuuril.

Jooniselt 14 on näha, et biosensori signaal on teatud laktoferriniga aktiveeritud geeli osakaaluni konstantne ning bioaktiveeritud geeli osakaalu segus veel vähendades, biosensori signaal *Str. uberis*'e kontsentratsioonil $8,5 \times 10^7$ CFU/ml langeb. Leidmaks vähim geeli osahulk, kus signaal on samas suurusjärgus kalibreerimisgraafiku väärtustega, kirjeldati saadud sõltuvust valemi 1 (peatükk 3.1) abil. Rakendades valemit 1 leiti, et *Str. uberis*'e määramiseks kaotamata biosensori tundlikkust, on laktoferriniga aktiveeritud geeli vajalik osakaal mikrokolonni moodustas geelis 21%.

3.6 *Str. uberis*'e määramine kasutades Fc fragmendiga funktsionaliseeritud geeli

Str. uberis'e määramiseks kasutati laktoferriniga aktiveeritud geelil põhineva biosensori kõrval ka Fc fragmendiga aktiveeritud geeli laktoferrini asemel. Esmalt mõõdeti biosensori taustasignaali PBS puhvril, kui mõõterakku ei ole voolutatud patogeeni lahust, milleks saadi $8,9 \mu\text{V}$. Seejärel mõõdeti biosensori signaali väärtus *Str. uberis*'e kontsentratsioonil $8,5 \times 10^7$ CFU/ml, milleks saadi $8,3 \pm 0,9 \mu\text{V}$. Sellest võib järeldada, et *Str. uberis*'t ei saa määrata antud aktiveeritud geeliga ning *Str. uberis* seondub geelide segust vaid laktoferriniile.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli määrata, kuidas muutub antikeha-antigeen äratundmisreaktsioonil põhineva biosensori väljundsignaal peamisi mastiiti põhjustavate patogeenide (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ja *Streptococcus uberis*) määramisel, kui vähendada patogeenide sidumiseks kasutatavas mikrokolonnis bioaktiveeritud geeli osakaalu.

Immunobiosensoriga koostati kalibreerimisgraafikud kolme enamlevinud mastiiti põhjustava patogeeni määramiseks kahe erineva bioaktiveeritud geeli kasutamisel. Geeli bioaktiveerimiseks kasutati laktoferriini ja inimese IgG Fc fragmenti, mis on võimelised ühte või mitut uuritud bakteritest siduma tänu nende bakterite välismembraanil olevatele pinnavalkudele. Erinevate biosensorsüsteemide avastamispiirideks saadi 150 – 400 CFU/ml. Mõlemale bioaktiveeritud geelile seondus *S. aureus*, laktoferriiniga aktiveeritud geelile seondus *Str. uberis*, inimese IgG Fc fragmendiga funktsionaliseeritud graanulitele seondus *E. coli*.

Vähendades aktiveeritud geelide osakaalu mikrokolonna moodustamiseks kasutatavas geelis, selgus, et biosensori väljundsignaal on kõrgematel funktsionaliseeritud geeli osakaaludel mikrokolonnis sarnases suurusjärgus biosensorsüsteemi väljundsignaaliga, kus oli kasutatud ainult bioaktiveeritud geeli. Selgus, et bioaktiveeritud geeli osakaal mikrokolonna moodustamiseks kasutatavas geelisegus peab laktoferriiniga aktiveeritud geeli korral olema vähemalt 21% ja inimese IgG fc fragmendiga aktiveeritud geeli korral 16%, ilma et biosensori tundlikkus määratava patogeeni suhtes väheneks.

Tööd on võimalik edasi arendada, kasutades kolonna moodustamiseks kasutatavas geelisegus lisaks teiste olulisemate patogeenide, näiteks *Mycoplasma bovis* ja *Streptococcus dysgalactiae* sidumiseks sobivaid bioaktiveeritud geele.

SUMMARY

Optimisation of microcolumns used for multiplex detection of mastitis-causing pathogens with immunosensing systems

The aim of the current study was to determine how does the immunosensing system's signal change when measuring different mastitis-causing pathogens with a reduced percentage of bioactivated gels forming capturing microcolumns for the targeted bacteria. The most common mastitis-causing pathogens in Estonia are *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus uberis*.

The major mastitis-causing pathogens were determined using two differently bioactivated gels - with lactoferrin and human IgG Fc fragment, selected due to high affinity of the aforementioned pathogens towards these proteins. In total, six different biosensing combinations were studied. The limit of detection (LOD) for the used sensors was 150 to 400 CFU/ml. Of the three pathogens studied, only *S. aureus* interacted with both types of bioactivated gels, *E. coli* was bound only to the gel functionalised with human IgG Fc fragment, and *Str. uberis* interacted with gel onto which lactoferrin was immobilised.

Lowering of the percentage of the bioactivated gels decreased the biosensor signal drastically when the amount of the functionalised gel was very low. The signal dependencies showed that all the interactions between the biosensor signal and the percentage of activated beads in the gel mixture followed one phase association model. In order to conduct multiplex measuring of the three bacteria with the immunosensor, a microcolumn should contain at least 21% of beads activated with lactoferrin and 16% of beads activated with human IgG Fc fragment.

The studied biosensing system can be further developed by using different bioactivated beads in the gel mixture used to form the microcolumn allowing to extend the selection of pathogens detected.

KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] Veterinaar- ja Toidulaboratoorium. *Veterinaar- Ja Toidulaboratooriumi Töö Aruanne; Mastiiti Põhjustavad Patogeenid*; 2019; 12–13. viimati vaadatud 18.05.2021
- [2] Kitchen, B. J. Bovine Mastitis: Milk Compositional Changes and Related Diagnostic Tests. *J. Dairy Res.*, **1981**, 48 (1), 167–188.
- [3] Kibebew, K. Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View. *J. Biol. Agric. Healthc.*, **2017**, 7 (2), 1–14.
- [4] Ogola, H.; Shitandi, A.; Nanua, J. Effect of Mastitis on Raw Milk Compositional Quality. *J. Vet. Sci.*, **2007**, 8 (3), 237–242.
- [5] Foster, T. Staphylococcus. In *Medical Microbiology*; Baron, S., Ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston (TX), 1996.
- [6] Gey, A.; Werckenthin, C.; Poppert, S.; Straubinger, R. K. Identification of Pathogens in Mastitis Milk Samples with Fluorescent in Situ Hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2013**, 25 (3), 386–394.
- [7] Sjö Dahl, J. Repetitive Sequences in Protein A from Staphylococcus Aureus. *Eur. J. Biochem.*, **1977**, 73 (2), 343–351. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11324.x>.
- [8] Silverman, G. J.; Goodyear, C. S.; Siegel, D. L. On the Mechanism of Staphylococcal Protein A Immunomodulation. *Transfusion (Paris)*, **2005**, 45 (2), 274–280.
- [9] Chang, Y. H.; Chang, T. C.; Kao, E. F.; Chou, C. Detection of Protein A Produced by Staphylococcus Aureus with a Fiber-Optic-Based Biosensor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1996**, 60 (10), 1571–1574.
- [10] Moshynskyy, I.; Jiang, M.; Fontaine, M. C.; Perez-Casal, J.; Babiuk, L. A.; Potter, A. A. Characterization of a Bovine Lactoferrin Binding Protein of Streptococcus Uberis. *Microb. Pathog.*, **2003**, 35 (5), 203–215..
- [11] Schröder, A. K.; Nardella, F. A.; Mannik, M.; Svensson, M. L.; Christensen, P. Interaction between Streptococcal IgG Fc Receptors and Human and Rabbit IgG Domains. *Immunology*, **1986**, 57 (2), 305–309.
- [12] Zhang, Y.; Islam, N.; Carbonell, R. G.; Rojas, O. J. Specific Binding of Immunoglobulin G with Bioactive Short Peptides Supported on Antifouling Copolymer Layers for Detection in Quartz Crystal Microgravimetry and Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (2), 1106–1113.
- [13] Naidu, A. S.; Andersson, M.; Miedzobrodzki, J.; Forsgren, A.; Watts, J. L. Bovine Lactoferrin Receptors in Staphylococcus Aureus Isolated from Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci.*, **1991**, 74 (4), 1218–1226.
- [14] Lim, J. Y.; Yoon, J.; Hovde, C. J. A Brief Overview of Escherichia Coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 20 (1), 5–14.
- [15] Gangan, M. S.; Athale, C. A. Threshold Effect of Growth Rate on Population Variability of Escherichia Coli Cell Lengths. *R. Soc. Open Sci.*, **2017**, 4 (2), 160417.
- [16] Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. Pathogenic Escherichia Coli. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2004**, 2 (2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- [17] Hagiwara, S.; Mori, K.; Okada, H.; Oikawa, S.; Nagahata, H. Acute Escherichia Coli Mastitis in Dairy Cattle: Diagnostic Parameters Associated with Poor Prognosis. *J. Vet. Med. Sci.*, **2014**, 76 (11), 1431–1436.
- [18] Leo, J. C.; Goldman, A. The Immunoglobulin-Binding Eib Proteins from Escherichia Coli Are Receptors for IgG Fc. *Mol. Immunol.*, **2009**, 46 (8), 1860–1866.

- [19] Ellass-Rochard, E.; Roseanu, A.; Legrand, D.; Trif, M.; Salmon, V.; Motas, C.; Montreuil, J.; Spik, G. Lactoferrin-Lipopolysaccharide Interaction: Involvement of the 28-34 Loop Region of Human Lactoferrin in the High-Affinity Binding to Escherichia Coli 055B5 Lipopolysaccharide. *Biochem. J.*, **1995**, *312* (3), 839–845.
- [20] Kromker, V.; Reinecke, F.; Paduch, J.-H.; Grabowski, N. Bovine Streptococcus Uberis Intramammary Infections and Mastitis. *Clin. Microbiol. Open Access*, **2014**, *3* (4), 1–7.
- [21] Phuektes, P.; Mansell, P. D.; Dyson, R. S.; Hooper, N. D.; Dick, J. S.; Browning, G. F. Molecular Epidemiology of Streptococcus Uberis Isolates from Dairy Cows with Mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, **2001**, *39* (4), 1460–1466.
- [22] Nielsen, C.; Ostergaard, S.; Emanuelson, U.; Andersson, H.; Berglund, B.; Strandberg, E. Economic Consequences of Mastitis and Withdrawal of Milk with High Somatic Cell Count in Swedish Dairy Herds. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.*, **2010**, *4* (10), 1758–1770.
- [23] Patel, D.; Almeida, R. A.; Dunlap, J. R.; Oliver, S. P. Bovine Lactoferrin Serves as a Molecular Bridge for Internalization of Streptococcus Uberis into Bovine Mammary Epithelial Cells. *Vet. Microbiol.*, **2009**, *137* (3–4), 297–301.
- [24] Almeida, R. A.; Luther, D. A.; Patel, D.; Oliver, S. P. Predicted Antigenic Regions of Streptococcus Uberis Adhesion Molecule (SUAM) Are Involved in Adherence to and Internalization into Mammary Epithelial Cells. *Vet. Microbiol.*, **2011**, *148* (2–4), 323–328.
- [25] Jiang, M.; Potter, A. A.; Maclachlan, P. R. Streptococcus Uberis Lactoferrin-Binding Protein. WO 1998021231 A2 (EP 0948528 A2), May 22, 1998.
- [26] Bascomb, S.; Manafi, M. Use of Enzyme Tests in Characterization and Identification of Aerobic and Facultatively Anaerobic Gram-Positive Cocci. *Clin. Microbiol. Rev.*, **1998**, *11* (2), 318–340.
- [27] Oliver, J. D. Recent Findings on the Viable but Nonculturable State in Pathogenic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2010**, *34* (4), 415–425.
- [28] Lazcka, O.; Del Campo, F. J.; Muñoz, F. X. Pathogen Detection: A Perspective of Traditional Methods and Biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22* (7), 1205–1217.
- [29] Kobras AS. *Anne Kanal I Seisundi Uuring Suplusvee Kvaliteedi Tagamiseks*; Keskkonnauuring; Tartu, 2014. viimati vaadatud 20.05.2021
- [30] Lee, K.-H.; Lee, J.-W.; Wang, S.-W.; Liu, L.-Y.; Lee, M.-F.; Chuang, S.-T.; Shy, Y.-M.; Chang, C.-L.; Wu, M.-C.; Chi, C.-H. Development of a Novel Biochip for Rapid Multiplex Detection of Seven Mastitis-Causing Pathogens in Bovine Milk Samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2008**, *20* (4), 463–471.
- [31] Vidic, J.; Manzano, M.; Chang, C.-M.; Jaffrezic-Renault, N. Advanced Biosensors for Detection of Pathogens Related to Livestock and Poultry. *Vet. Res.*, **2017**, *48* (1), 11.
- [32] Riffon, R.; Sayasith, K.; Khalil, H.; Dubreuil, P.; Drolet, M.; Lagacé, J. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **2001**, *39* (7), 2584–2589.
- [33] Thermo Scientific. *PF1600 Thermo Scientific PathoProof Mastitis Complete-16 Assay*; Thermo Scientific; pp 1–15. viimati vaadatud 25.05.2021
- [34] Goode, J. A.; Rushworth, J. V. H.; Millner, P. A. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, **2015**, *31* (23), 6267–6276.
- [35] Sharma, S.; Byrne, H.; O’Kennedy, R. J. Antibodies and Antibody-Derived Analytical Biosensors. *Essays Biochem.*, **2016**, *60* (1), 9–18.
- [36] Caygill, R. L.; Blair, G. E.; Millner, P. A. A Review on Viral Biosensors to Detect Human Pathogens. *Anal. Chim. Acta*, **2010**, *681* (1–2), 8–15.

- [37] Sangadkit, W.; Rattanabumrung, O.; Supanivatin, P.; Thipayarat, A. Practical Coliforms and Escherichia Coli Detection and Enumeration for Industrial Food Samples Using Low-Cost Digital Microscopy. *ISEEC*, **2012**, *32*, 126–133.
- [38] Ramirez, N. B.; Salgado, A. M.; Valdman, B. The Evolution and Developments of Immunosensors for Health and Environmental Monitoring: Problems and Perspectives. *Braz J Chem Eng*, **2009**, *26* (2), 227–249.
- [39] Juronen, D.; Kuusk, A.; Kivirand, K.; Rincken, A.; Rincken, T. Immunosensing System for Rapid Multiplex Detection of Mastitis-Causing Pathogens in Milk. *Talanta*, **2018**, *178*, 949–954.
- [40] Charlermroj, R.; Gajanandana, O.; Barnett, C.; Kirtikara, K.; Karoonuthaisiri, N. A Chemiluminescent Antibody Array System for Detection of Foodborne Pathogens in Milk. *Anal Lett*, **2011**, *44*, 1085–1099.
- [41] Tian, F.; Lyu, J.; Shi, J.; Tan, F.; Yang, M. A Polymeric Microfluidic Device Integrated with Nano Porous Alumina Membranes for Simultaneous Detection of Multiple Food-Borne Pathogens. *Sens. Actuators B Chem.*, **2016**, *225*, 312–318.
- [42] Su, F.; Endo, Y.; Saiki, H.; Xing, X.-H.; Ohmura, N. Simple and Sensitive Bacterial Quantification by a Flow-Based Kinetic Exclusion Fluorescence Immunoassay. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22* (11), 2500–2507.
- [43] Mustafa, A. Immobilization Method Review. **2015**.
- [44] Jonkheijm, P.; Weinrich, D.; Schröder, H.; Niemeyer, C.; Waldmann, H. Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **2008**, *47*, 9618–9647.
- [45] Krishnamoorthi, S.; Banerjee, A.; Roychoudhury, A. Immobilized Enzyme Technology: Potentiality and Prospects. *J Enzym. Metab*, **2015**, *1*.
- [46] Porath, J.; Flodin, P. Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature*, **1959**, *183* (4676), 1657–1659.
- [47] Sabotič, J.; Koruza, K.; Gabor, B.; Peterka, M.; Barut, M.; Kos, J.; Brzin, J. The Value of Fungal Protease Inhibitors in Affinity Chromatography; 2012.
- [48] Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. *Biotechnol. Adv.*, **2012**, *30* (3), 489–511.
- [49] Liu, Y.; Chen, J. Y. Enzyme Immobilization on Cellulose Matrixes. *J. Bioact. Compat. Polym.*, **2016**, *31* (6), 553–567.
- [50] Hamerstrand, G. E.; Hofreiter, B. T.; Mehlretter, C. L. Determination of the Extent of Reaction between Epichlorohydrin and Starch. *Cereal Chem.*, **1960**, *37*, 519–524.
- [51] Matsumoto, I.; Mizuno, Y.; Seno, N. Activation of Sepharose with Epichlorohydrin and Subsequent Immobilization of Ligand for Affinity Adsorbent. *J. Biochem. (Tokyo)*, **1979**, *85* (4), 1091–1098.
- [52] Ehlers, J.-E.; Rondan, N. G.; Huynh, L. K.; Pham, H.; Marks, M.; Truong, T. N. Theoretical Study on Mechanisms of the Epoxy–Amine Curing Reaction. *Macromolecules*, **2007**, *40* (12), 4370–4377.
- [53] Lei, L.; Bai, Y.; Li, Y.; Yi, L.; Yang, Y.; Xia, C. Study on Immobilization of Lipase onto Magnetic Microspheres with Epoxy Groups. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2009**, *321* (4), 252–258.
- [54] Betancor, L.; López-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Mateo, G. D.-O. C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Different Mechanisms of Protein Immobilization on Glutaraldehyde Activated Supports: Effect of Support Activation and Immobilization Conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, *39* (4), 877–882.

- [55] Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Glutaraldehyde in Bio-Catalysts Design: A Useful Crosslinker and a Versatile Tool in Enzyme Immobilization. *RSC Adv.*, **2014**, *4* (4), 1583–1600.
- [56] Salas, P.; del Monte-Martínez, A.; Cutiño-Avila, B.; Rodríguez Colinas, B.; Alcalde, M.; Ballesteros, A.; Plou, F. Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla*, **2011**, *23*, 5275–5282.
- [57] Kim, D.; Herr, A. E. Protein Immobilization Techniques for Microfluidic Assays. *Biomicrofluidics*, **2013**, *7* (4).
- [58] Sun, Y.; Du, H.; Feng, C.; Lan, Y. Oriented Immobilization of Antibody through Carbodiimide Reaction and Controlling Electric Field. *J. Solid State Electrochem.*, **2015**, *19* (10), 3035–3043.
- [59] Peedel, D.; Rinken, T. Rapid Biosensing of Staphylococcus Aureus Bacteria in Milk. *Anal. Methods*, **2014**, *6* (8), 2642–2647.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katri Vesi,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Immunobiosensorsüsteemis kasutatavate mikrokolonnide optimeerimine erinevate mastiiti põhjustavate bakterite üheaegseks määramiseks,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Toonika Rincken,

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **04.06.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Katri Vesi

26.05.2021