



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Julija Baniukevič

**GALVIJŲ LEUKEMIJOS VIRUSO ANTIGENO SĄVEIKOS
SU SPECIFINIAIS ANTIKŪNAIS AUKSO PAVIRŠIUJE TYRIMAS**

**BOVINE LEUKEMIA VIRUS ANTIGEN INTERACTION
WITH SPECIFIC ANTIBODIES ON GOLD SURFACE**

(lietuvių ir anglų kalba)

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos specializacija

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Vilnius, 2009

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

(Vardas, pavardė)

(Data)

Julija Baniukevič

**GALVIJŲ LEUKEMIJOS VIRUSO ANTIGENO SĄVEIKOS
SU SPECIFINIAIS ANTIKŪNAIS AUKSO PAVIRŠIUJE TYRIMAS**

**BOVINE LEUKEMIA VIRUS ANTIGEN INTERACTION
WITH SPECIFIC ANTIBODIES ON GOLD SURFACE**

(lietuvių ir anglų kalba)

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos specializacija

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Vadovas dr. Almira Ramanavičienė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas prof. Juozas Kulys

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas dr. Angelė Kaulakienė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2009

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-.....-.....

Magistrantūros studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas

Pavadinimas **Galvijų leukemijos viruso antigeno sąveikos su specifiniais antikūnais aukso paviršiuje tyrimas**

Autorius **Julija Baniukevič**

Vadovas **prof. habil. dr. Juozas Kulys**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Baigiamajame magistro darbe nagrinėjama galvijų leukemijos viruso (toliau – GLV) imuninių jutiklių kūrimo svarba, aktualumas, būtinumas, problemos ir jų sprendimo būdai Lietuvos bei pasaulio mastu. Išnagrinėti pagrindiniai tokių jutiklių veikimo principai, kurių pagalba greitai, tiksliai, betarpiškai ir specifiskai galėtų būti nustatytas GLV gp51 antigenas. Baigiamajame darbe pateikta kvarco kristalo mikrogravimetrinių svarstyklių ir paviršiaus plazmono rezonanso imuninių jutiklių efektyvumo palyginamoji analizė. Tokių jutiklių kūrimui buvo panaudotas kryptingas antikūnų imobilizavimas aukso paviršiuje. Nustatyti specifinių antikūnų fragmentų ir GLV gp51 antigeno komplekso susidarymo kinetiniai parametrai ir afiniškumo konstanta. Pritaikytas eksperimentinių, teorinių duomenų atitikimo matematinis modelis. Išnagrinėjus teorinius ir praktinius imuninių jutiklių kūrimo aspektus, pateikiamos baigiamojo darbo išvados ir siūlymai.

Darbą sudaro 7 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūra, priedai. Darbo apimtis – 68 p. teksto (be priedų), 38 paveikslai, 1 lentelė, 114 literatūros šaltinių.

Prasminiai žodžiai

galvijų leukemijos virusas, kryptingas antikūnų imobilizavimas, kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės, paviršiaus plazmono rezonansas, imuninis jutiklis

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-.....-.....

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master's Thesis

Title **Bovine leukemia virus antigen interaction with specific antibodies on gold surface**

Author **Julija Baniukevič**

Academic supervisor **Prof Dr Habil Juozas Kulys**

Thesis language:
Lithuanian

Annotation

This master degree work analyses bovine leukemia virus (BLV) immunosensors design. The study of immunosensors is important in many research fields. Antibody immobilization is an important subject with a variety of purposes such as in diagnostic immunoassays, e.g. BLV. The direct and oriented attachment of antibodies and their fragments to the gold surface seems to be the most important for immunosensors.

During this work we used quartz crystal and surface plazmon resonance electrodes coated with gold for application in immunosensors design. We explored and compared experimental results with mathematic model. By this way reduced antibodies were used successfully to create immunosensor for bovine leukemia antigen detection.

Keywords

oriented immobilization, bovine leukemia virus, quartz crystal microbalance, surface plazmon resonance, immunosensor

TURINYS

Anotacija.....	3
TURINYS	3
Paveikslų, lentelių sąrašas	9
Santrumpų sąrašas	11
ĮVADAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. Galvijų leukemija – vėžinė liga	15
1.2. Galvijų leukemijos viruso (GLV) sandara.....	15
1.2.1. Geno env, koduojančio GLV <i>gp51</i> ir <i>gp30</i> baltymus, sekos savybės	17
1.3. Epidemiologiniai rodikliai ir ekonominė žala	18
1.4. Galvijų leukemijos vystymosi stadijos bei imuninio atsako formavimasis.....	20
1.5. Galvijų leukemijos infekcijos nustatymo metodai	21
1.6. Biologiniai jutikliai.....	22
1.7. Afiniškumo jutikliai.....	23
1.8. Imuniniai jutikliai	23
1.9. Imuninių jutiklių klasifikacija	24
1.9.1. Elektrocheminiai imuniniai jutikliai.....	24
1.9.2. Pjezoelektriniai imuniniai jutikliai	24
1.9.2.1. Kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės	24
1.9.2.2. KKM imuniniai jutikliai	26
1.9.3. Optiniai imuniniai jutikliai	27
1.10. Paviršiaus plazmono rezonanso jutikliai	27
1.10.1. Paviršiaus plazmono rezonanso jutiklių privalumai.....	28
1.10.2. Paviršiaus plazmono rezonanso reiškinyss	28
1.10.3. PPR taikymas bioanaliziniams tikslams.....	30
1.11. Biologiškai aktyvių medžiagų, t.y. antikūnų imobilizavimo būdai aukso paviršiuje.....	32
1.11.1. Antikūnai, jų sandara ir sąveika su antigenais.....	32
1.11.2. Imunoglobulinų klasės ir poklasiai.....	34
1.11.3. Polikloniniai ir monokloniniai antikūnai.....	35
1.11.4. Antikūnų imobilizavimo būdai aukso paviršiuje.....	36
1.11.5. Antikūnų skaldymas	37
1.11.6. Antikūnų fragmentų tipai.....	37
1.11.7. Antikūnų fragmentų imobilizavimo pranašumas	38

1.11.8. Kryptingas antikūnų skaldymas aukso paviršiuje	38
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	40
2.1. Medžiagos.....	40
2.1.1. Prietaisai ir priemonės	40
2.1.2. Medžiagos ir reagentai.....	40
2.2. Metodai	41
2.2.1. Imunoglobulinų nusodinimas	41
2.2.2. Antikūnų skaldymas.	41
2.2.3. Imunodifuzijos reakcija agaro gelyje	41
2.2.4. Spektrofotometriniai matavimai	42
2.2.5. Baltymo koncentracijos nustatymas spektrofotometrinio būdu.	42
2.2.6. Skaldytų antikūnų elektroforezė.....	42
2.2.7. Kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės	43
2.2.8. Paviršiaus plazmono rezonanso jutikliai	43
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	46
3.1. Imunoglobulinų išsodinimas bei baltymo koncentracijos nustatymas	46
3.2. Antikūnų išgryninimo patikrinimas elektroforeziškai.....	46
3.3. Antikūnų skaldymas	47
3.4. Imunodifuzijos reakcija (toliau - IDR)	47
3.5. Antikūnų skaldymo efektyvumo patikrinimas elektroforeziškai.....	48
3.6. Imuninių jutiklių kūrimas	48
3.6.1. KKM imuninis jutiklis.....	50
3.6.2. PPR imuninis jutiklis	51
IŠVADOS	61
LITERATŪRA	62
Priedai	69

Paveikslų, lentelių sąrašas

1.1 pav.	Karvės širdies vėžys, sukeltas GLV	13
1.2 pav.	Galvijų leukemijos viruso struktūra	14
1.3 pav.	Geno <i>env</i> produkto (baltymo) erdvinė struktūra	16
1.4 pav.	Teigiamai reagavusių leukozės atžvilgiu galvijų procentas 2008 metais Lietuvoje	17
1.5 pav.	Padidėjęs nesveikų limfocitų skaičius galvijų, segančių limfosarkoma, limfinio mazgo ląstelėse	18
1.6 pav.	Biologinio jutiklio schema	20
1.7 pav.	Išorinis elektrinis laukas, sukeliantis kvarco kristalo mechaninį rezonansą	23
1.8 pav.	Kvarco kristalo rezonatorius a) kvarco kristalas, b) aukso elektrodas, c) ir d) jungiančios metalinės vielos, e) pagrindas/atrama	24
1.9 pav.	Visiško vidinio atspindžio schema	27
1.10 pav.	Greitai nykstančio elektrinio lauko susidarymas	28
1.11 pav.	Principinė skenuojančio atspindžio PPR biologinio jutiklio schema	29
1.12 pav.	Tipinė PPR biologinio jutiklio sensograma registruojama atliekant pilną tarpmolekulinio komplekso susidarymo ir to komplekso disociacijos tyrimo bei biologinio jutiklio regeneravimo ciklą	29
1.13 pav.	Imunoglobulino molekulės struktūra	31
1.14 pav.	Imunoglobulinų klasės	33
1.15 pav.	IgG klasės poklasiai: IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₃ , IgG ₄	33
1.16 pav.	Imobilizavimo būdų schemos: 1 - adsorbcija, 2 - „Sumedžiojimas“, 3 - Kryžminis prisijungimas, 4 - Kovalentinis prisijungimas, 5 - imobilizavimas, panaudojant bakterinius baltymus, 6 - prisijungimas, panaudojant specifines sąveikas; 7 - panaudojant savaime besiformuojančius monosluoksnius	35
1.17 pav.	Antikūno fragmentų tipai	36
1.18 pav.	Kryptingo antikūnų fragmentų imobilizacijos schema	37
2.1 pav.	Antikūno skaldymo schema	39
2.2 pav.	Kvarco kristalo celė, naudota eksperimentui	41
2.3 pav.	PPR jutiklio lusto uždėjimas ant pusiau cilindrinės prizmės	42
2.4 pav.	PPR analizatorius Autolab ESPRIT (ECO-Chemie, Olandija)	43
3.1 pav.	Serumo, turinčio specifinių anti- <i>gp51</i> antikūnų, elektroforegrama: 2,3 – antikūnai po gryninimo; 4, 5 – serumas; 1,6 – markeris	44
3.2 pav.	Imunoglobulino molekulių skaldymo schema	45

3.3 pav.	Imunodifuzijos reakcija agarų gelyje, naudojant antikūnų fragmentus, gautus juos skaldant 6 mg/ml DDT tirpalu	45
3.4 pav.	Skaldytų antikūnų elektroforegrama: 1 – markeris; 2,3,4,5 – skaldyti antikūnai.	46
3.5 pav.	Imuninio jutiklio kūrimo eiga aukso paviršiuje	47
3.6 pav.	Antikūnų fragmentų imobilizavimo ir jų sąveikos su GLV antigenų efektyvumo įvertinimas pagal dažnio pokyčius Δf , Hz	49
3.7 pav.	Skaldytų antikūnų fragmentų imobilizavimas PPR lusto paviršiuje	50
3.8 pav.	Natyvių ir skaldytų antikūnų imobilizavimo PPR jutiklio aukso paviršiuje palyginimas	50
3.9 pav.	Natyvių ir skaldytų antikūnų imobilizavimo PPR ir KKM jutiklių aukso paviršiuje palyginimas	51
3.10 pav.	Bazinės linijos nusistovėjimas	52
3.11 pav.	PPR signalo kitimas, esant skirtingoms GLV antigeno koncentracijoms: 1 – bazinė linija (10 mmol/L PBS buferinis tirpalas, pH 7.4); 2 – asociacijos stadija; 3 – disociacijos stadija; 4 – regeneracijos stadija	53
3.12 pav.	Specifinių anti-gp51 antikūnų fragmentų ir GLV antigeno sąveikos schema	54
3.13 pav.	Asociacijos stadijos kinetinės kreivės, esant skirtingoms GLV antigeno koncentracijoms	55
3.14 pav.	PPR signalo skirtumo priklausomybės nuo laiko kalibracinė kreivė esant skirtingoms GLV antigeno koncentracijoms	55
3.15 pav.	Tiesinė Ak-Ag komplekso susidarymo priklausomybė. Taškais 1,2,3,4 pažymėtos atitinkamai antigeno koncentracijos: 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL	57
3.16 pav.	PPR jutiklio regeneravimas	58
1 lentelė.	Kinetiniai specifiniai anti-gp51 antikūnų ir GLV gp51 antigeno sąveikos parametrai pagal pseudo pirmos eilės sąveikos modelį	56

Santrumpų sąrašas

Ag – antigenas
Ak – antikūnas
BAE – biologinis atpažinimo elementas
BAM – biologiškai aktyvios medžiagos
BMD – baigiamasis magistro darbas
BP – bazių poros
BSA – albumino baltymas
DTT – ditionitritolas
EBI - Europos bioinformatikos institutas
GEL – galvijų enzootinė leukemija
GLV – galvijų leukemijos virusas
IDR – imunodifuzijos reakcija
KKM – kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės
KU – Klaipėdos universitetas
NAR – Nucleic acids research database
PPR – paviršiaus plazmono rezonansas
SRS - išplėstinės ieškojimo tvarkos įrankis
VGTU – Vilniaus Gedimino technikos universitetas
ŽTLV – žmogaus T ląstelių leukemijos virusas

IVADAS

Gyvenimo kokybė ir jos gerinimas yra vienas iš aktualiausių, svarbiausių žmonijos sprendžiamų uždavinių XXI amžiuje. Tai sunkiai išmatuojamas parametras, tačiau jo lygį rodo pastoviai vykdoma ligų, maisto ir aplinkos taršos kontrolė, sparčiai vystosi vaistų pramonė, daug dėmesio skiriama žmonių saugumui terorizmo užgaidų pilname pasaulyje. Biologinių jutiklių taikymas įvairiose srityse gali padėti žmonijai spręsti šiuos uždavinius.

Pastaraisiais metais sparčiai vystosi imunoanalizinių sistemų, pvz., imuninių jutiklių, kūrimas ir taikymas klinikiniuose, farmakologiniuose tyrimuose ir aplinkos užterštumo kontrolėje. Optiniai paviršiaus plazmono rezonanso ir pjezoelektriniai kvarco kristalo mikrogravimetrinių svarstyklių biologiniai jutikliai vis dažniau yra naudojami tiriant naujų vaistų savybes, maisto ir aplinkos užterštumą, diagnozuojant bakterijų ir virusų sukeltas ligas, nustatant toksinus, alergenų, hormonų, steroidų, imunoglobulinus. Nuo to, kaip greitai ir efektyviai bus nustatytos įvairių ligų priežastys, kartais gali priklausyti mūsų pačių ar auginamų gyvulių gyvybė.

Lietuvos ir viso pasaulio žemės ūkio, gyvulininkystės plėtrai didelę žalą daro galvijų užkrečiamosios, ypač virusinės, ligos, todėl būtina greitai, tiksliai ir efektyviai diagnozuoti galvijų virusines ligas, užkirsti kelią jų tolimesniai plitimui. Laiku nustatant virusines ligas galima būtų išvengti didelių ekonominių nuostolių. Viena iš tokių virusinių ligų yra galvijų enzootinė leukozė (toliau – GEL), kuria sergama visose pasaulio valstybėse. Šios ligos epidemiologinis protrūkis gali sukelti sunkiai sustabdomą epidemiją pasaulio mastu ir padidinti ekonominės krizės rodiklius. Neigiamų veiksnių galima būtų išvengti sukūrus stabilų, jautrų, regeneruojamą, pigų, betarpiškai ir specifiskai sąveikaujantį su nustatoma analize imuninį jutiklį.

Imuninių jutiklių kūrime labai svarbus etapas yra antikūnų (arba kai kuriais atvejais antigeno) imobilizavimas paviršiuje: neužtenka antikūnus imobilizuoti tam tikrame paviršiuje, reikia juos kryptingai orientuoti. Šiuo metu yra naudojamos įvairios antikūnų imobilizavimo skirtinguose paviršiuose technologijos (surišimas bifunkciniais reagentais, panaudojant bakterinius baltymus ir k.t.). Tiesioginis antikūnų prijungimas prie auksu padengtų paviršių ir taip modifikuotų paviršių panaudojimas imuninių jutiklių kūrime yra labai svarbus ir daug žadantis, siekiant sukurti pjezoelektrinius ir optinius imuninius jutiklius. Tokie jutikliai, kuriuose pavyksta kryptingai imobilizuoti antikūnus, yra jautresni, gali sąveikauti su didesniu kiekiu analizės, lyginant su imuniniais jutikliais, kur buvo taikoma atsitiktinė antikūnų orientacija. Šis metodas šiuo metu yra vienas iš pačių perspektyviausių antigeno-antikūno ir kitų afiniškai

sąveikaujančių medžiagų sąveikai nustatyti ir yra vis dažniau taikomas susirgimų diagnostikoje ir biomedicininuose tyrimuose.

Baigiamojo magistro darbo metu buvo tiriamas kryptingas antikūnų imobilizavimas kvarco kristalo ir paviršiaus plazmono rezonanso jutiklio lusto padengtų aukso sluoksniu paviršiuose. Tam buvo naudoti skaldytų specifinių anti-*gp51* imunoglobulinų fragmentai, kurie prisijungia aukso paviršiuje per laisvas tiolines grupes. Tokie imuniniai jutikliai buvo pritaikyti galvijų leukozės antigeno nustatymui ir kinetinei eksperimentinių duomenų analizei. Atsižvelgus į sprendžiamos problemos aktualumą, buvo iškelti atitinkami šiai užduočiai įvykdyti tikslai ir uždaviniai.

Baigiamasis magistro darbas buvo atliktas VU Imunologijos instituto Imunoanalizės ir nanotechnologijų laboratorijoje, Nanotechnologijų ir medžiagotyros centre „Nanotechnas“.

Nuoširdžiai dėkoju Nacionalinei veterinarijos laboratorijai už BMD reikalingų duomenų suteikimą, darbo vadovei dr. (hp) Almirai Ramanavičienei ir darbo konsultantui prof. Juozui Kuliui už visokeriopą pagalbą, VU ChF magistrantei Justinai Kirlytei už bendrų publikacijų rengimą ir savo mamai už meilę ir moralinį palaikymą.

Darbo tikslas – ištirti GLV *gp51* antigenų ir specifinių anti-*gp51* antikūnų sąveiką aukso paviršiuje optiniu ir pjezoelektriniu imuniniu jutikliu

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti natyvių ir skaldytų antikūnų sąveikos su antigenu efektyvumą.
2. Elektroforeziškai įvertinti skaldytų antikūnų fragmentus.
3. Panaudojant kvarco kristalo mikrogravimetrines svarstyklės (toliau – KKM) ir paviršiaus plazmono rezonanso (toliau – PPR) analizatorių ištirti natyvių ir skaldytų antikūnų imobilizavimo aukso paviršiuje efektyvumą.
4. Palyginti KKM ir PPR imuninių jutiklių galimybes antikūno-antigeno komplekso sąveikai tirti.
5. Palyginti eksperimentinių rezultatų atitikimą su teoriniais, panaudojant matematinį modelį.
6. Apskaičiuoti anti-*gp51/gp51* komplekso afiniškumo konstantą ir įvertinti komplekso sąveikos efektyvumą.
7. Nustatyti GLV imuninio jutiklio daugkartinio panaudojimo galimybes.

Šio baigiamojo magistro darbo (toliau – BMD) „Galvijų leukemijos viruso sąveikos su specifiniais antikūnais aukso paviršiuje tyrimas“ dalis rezultatų buvo pristatyta:

1. 12-oje Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Bioinžinerija ir Bioinformatika“, kuri įvyko VGTU 2009 m. balandžio 22 d.
2. Respublikinėje studentų mokslinėje konferencijoje "Chemija ir Cheminė Technologija", kuri įvyko KU 2009 m. gegužės 15 d. Šios konferencijos metu darytas žodinis pranešimas buvo įvertintas antro laipsnio diplomu (žr. Priedus).

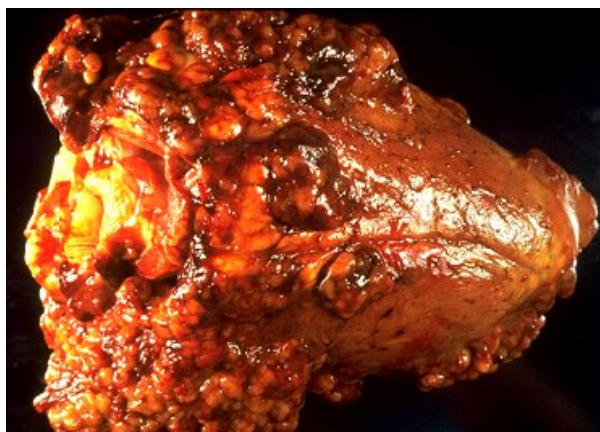
Dalis BMD rezultatų yra publikuota konferencijos pranešimų leidinyje:

1. Baniukevič J, Kirlytė J, Ramanavičienė A, Ramanavičius A. (2009) Kvarco kristalo mikrogravimetrijos metodas antikūnų imobilizavimo bei sąveikos su antigenu tyrimuose. Respublikinės studentų mokslinės konferencijos „Chemija ir Cheminė Technologija“ pranešimų medžiaga, Klaipėda 2009, 14-18 p. (žr. Priedus).
2. Baniukevič J, Kirlytė J, Ramanavičienė A, Ramanavičius A. (2009) Antikūnų imobilizavimas aukso paviršiuje 12-osios Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos „Bioinžinerija ir Bioinformatika“ pranešimų medžiaga, Vilnius 2009 (priimtas spausdinti).

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Galvijų leukemija – vėžinė liga

Galvijų leukemija (galvijų enzootinė leukozė (GEL), limfosarkoma arba piktybinio pobūdžio limfoma) – tai užkrečiama virusinė liga, kurią sukelia galvijų leukemijos virusas (GLV) (Gallo RC, Wong-Staal F. 1989, Gillet et al. 2007, Vetmed [interaktyvus]). Šia liga serga suaugę galvijai. Galvijai gali užsikrėsti bet kokio amžiaus, įskaitant ir infekcijos galimybę embriono stadijoje. (Miller J 2005). Tačiau didžiausia tikimybė užsikrėsti (90%) yra ankstyvajame gyvenimo periode (Vetmed [interaktyvus]). Ši chroniška liga išsivysto per ilgą laikotarpį (1-8 metai) (Gallo RC, Wong-Staal F. 1989). Daug galvijų gali būti užsikrėtę šiuo virusu, tačiau tik 2-5% infekuotų gyvūnų išsivysto vėžys po ilgo inkubacinio periodo. GLV sukeliamas vėžys aptinkamas gimdoje, žarnyne, širdyje (žr. 1.1 pav.) ir išoriniuose limfiniuose mazguose (Vetmed [interaktyvus]).



1.1 pav. Karvės širdies vėžys, sukeltas GLV (Vetmed [interaktyvus])

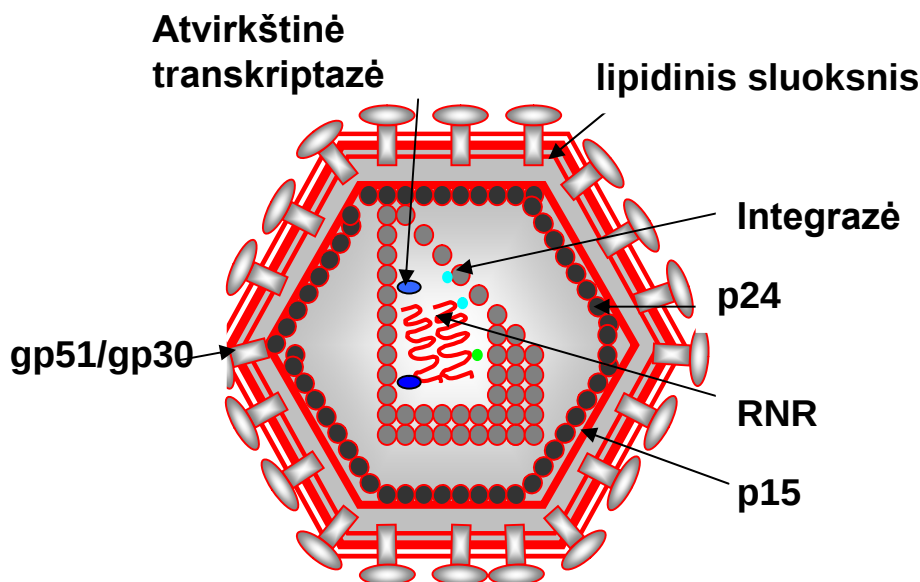
Pirmą kartą galvijų leukemijos virusą (GLV) atrado apie 1970-uosius metus (Miller J et al. 1969), kai sėkmingai buvo išskirtos vėžinių ląstelių kultūros. Buvo nustatyta, kad leukemijos pagrindas yra retrovirusiniai agentai, kuriuos sunku aptikti užkrėstuose gyvūnuose (Gallo RC, Wong-Staal F. 1989).

GLV infekuotame organizme viremija nustatoma tik pirmąsias 2 savaites po GLV patekimo į B limfocitus (Portetelle et al. 1978). Vėliau GLV antigenų ekspresija nėra stebima, tačiau hibridizacijos *in situ* metodu nustatoma retroviruso nukleokapsidės šerdinio baltymo p24 bei viriono išorinio apvalkalo glikoproteinų gp51 ir gp30 sintezė, vykstanti galvijų limfiniuose mazguose (Heeney et al. 1992).

1.2. Galvijų leukemijos viruso (GLV) sandara

Galvijų leukemijos virusas (GLV) (žr. 1.2 pav.) yra egzogeninis retrovirusas (Gillet et al. 2007; ADDL [interaktyvus]), sukeliantis enzootinę limfosarkomą – vėžinę ligą ir pastovią

limfocitozė – gerybinio (nepiktybinio) pobūdžio neoplastinę galvijų limfocitų transformaciją. Apie 70% GLV infekuotų galvijų išsivysto persistentinė limfocitozė, o 1-5% galvijų – limfosarkoma (Ferrer 1980; Gallo, Wong-Staal 1989; Hamblin, Oscier 1997; Schwartz, Levy 1996).



1.2 pav. Galvijų leukemijos viruso struktūra (Nermut, Hockley 1996)

GLV, panašiai kaip ir kiti retrovirusai, turi atvirkštinės transkriptazės (pol), šerđinių (kapsidės struktūrinių) baltymų (gag) ir apvalkalo baltymų (env) genus (Collins et al. 2005). Morfologiškai, virusinė dalelė (60-125 nm diametras) yra sudaryta iš centrinio nukleoido ir išorinio apvalkalo. 2 genomines viengrandės RNR kopijos yra supakuotos į viruso nukleoidą. p24 baltymai formuoja kapsidę, kurioje virusinė RNR sąveikauja su p12. Kapsidėje taip pat yra 2 fermentiniai baltymai: atvirkštinė transkriptazė ir integrazė. Kapsidės matrikso baltymas p15 jungia kapsidę su išoriniu apvalkalu, sudarytu iš lipidinio bisluoksnio, kuriame yra įsiterpę gp51 ir gp30 baltymai (Gillet et al. 2007; Johnston, Radke 2000).

GLV genomo analizė parodė, kad yra tam tikra amino rūgščių sekų homologija (apie 50%) tarp GLV ir ŽTLV (žmogaus T ląstelių leukemijos virusas) (Trainin, Brenner 2005). GLV yra giminingas ŽTLV-1 ir ŽTLV-2 struktūriniu ir funkcinu atžvilgiu. (Gallo RC, Wong-Staal F. 1989). Be to, ŽTLV-1 infekuoja apie 20 mln. žmonių pasaulyje, iš kurių 2–3 % sukelia T ląstelių leukemiją. GLV ir ŽTLV apvalkalai pasižymi 36 % amino rūgščių identišku (Gillet et al. 2007). Be to, yra labai panaši GLV ir ŽTLV sukeliamos ligos patogenezė. Šie retrovirusai infekuoja pagrindines organizmo imuninės sistemos ląsteles – B limfocitus. Specifiniai antikūnai prieš GLV baltymus buvo nustatyti ir žmonių organizme (Trainin, Brenner 2005).

1.2.1. Geno env, koduojančio GLV *gp51* ir *gp30* baltymus, sekos savybės

Genas env (sutrumpinimas nuo envelope) koduoja du produktus: retroviruso apvalkalo glikoproteinus *gp51* ir *gp30*. Tačiau *gp51* baltymas yra GLV viruso paviršinės struktūros dalis, kurią koduoja genominės RNR dalis. Koduojančio šį baltymą geno seka buvo rasta Europos bioinformatikos instituto (toliau – EBI) duomenų bazėje, pasinaudojus SRS įrankiu, t.y. išplėstine ieškojimo tvarka. Genas yra sudarytas iš 1548 bazių porų (toliau – BP). Env geno sekoje raidės a, t, g, c reiškia atitinkamai adeniną, timiną, guaniną ir citoziną. Geno env sekos dalis, kuri koduoja *gp51* antigeno susiformavimą yra žemiau nurodyta mėlyna spalva (EBI [interaktyvus]).

Geno env seka: 1548 BP; 338 A; 499 C; 309 G; 402 T; 0 kiti;

atgcctaaag	aacgacggtc	ccgaagacgc	ccacaaccga	tcatcagatg	ggtaagtctc	60
actctcactc	tcctcgctct	ctgtcggccc	atccagactt	ggagatgctc	cctgtcccta	120
ggaaaccaac	aatggatgac	agcatataac	caagaggcaa	aattttccat	ctccattgac	180
caaatactag	aggctcataa	tcagtcacct	ttctgtgcca	agtctcccag	atacaccttg	240
gactctgtaa	atggctatcc	taagatctac	tggccccccc	cacaagggcg	gcgccggttt	300
ggagccaggg	ccatggtcac	atatgattgc	gagccccgat	gcccttatgt	gggggaggat	360
cgcttcgact	gccccactg	ggacaatgcc	tcccaggccg	atcaaggatc	cttttatgtc	420
aatcatcaga	ttttattcct	gcatctcaaa	caatgtcatg	gaattttcac	tctaacctgg	480
gagatatggg	gatatgatcc	cctgatcacc	ttttctttac	ataagatccc	tgatccccct	540
caacccgact	ttccccagtt	gaacagtgc	tgggttcctt	ctgtcagatc	atggggccctg	600
cttttaaatc	aaacagcacg	ggccttccca	gattgtgcta	tatgttgga	accttcccct	660
ccctgggctc	ccgaaatatt	agtatgtaac	aaaaccatct	ccagctctgg	acccggcctc	720
gccctcccgg	acgccc aaat	cttctgggtc	aacacgtcct	cgtttaacac	cacccaagga	780
tggcaccacc	cttcccagag	gttgtgttgc	aatgtttctc	aaggcaacgc	cttgttatta	840
cctcctatct	ccctgggtta	tctctctacg	gcttcctccg	cccctcctac	ccgggtcaga	900
cgtagtcccg	tcgcagccct	gaccttaggc	ctagccctgt	cagtggggct	cactggaatt	960
aatgtggccg	tgtctgccct	tagccatcag	agactcacct	ccctgatcca	cgttctggag	1020
caagatcagc	aacgcttgat	cacagcaatt	aaccagaccc	actataattt	gcttaatgtg	1080
gcctctgtgg	ttgccagaaa	ccgacggggg	cttgattggg	tgtacatccg	gctgggtttt	1140
caaagcctat	gtcccacaat	taatgagcct	tgctgtttcc	tgcgcattca	aaatgactcc	1200
attatccgcc	tcgggtgatct	ccagcctctc	tcgcaaagag	tctctacaga	ctggcagtgg	1260
ccctggaatt	gggatctggg	gctcactgcc	tgggtgcgag	aaaccattca	ttctgttcta	1320
agcctgttcc	tattagccct	ttttttgctc	ttcctggccc	cctgcctgat	aaaatgcttg	1380
acctctcgcc	ttttaaagct	cctccggcag	gctccccact	tccctgaaat	ctcccctaacc	1440
cctaaacccg	attctgatta	tcaggccttg	ctaccatctg	caccagagat	ctactctcac	1500
ctctcccccg	tcaaacccga	ttacatcaac	ctccgaccct	gcccttga		1548

1.2.2. Transmembraninio GLV baltymo *gp51* aminorūgščių seka

UniProt duomenų bazė - tai universali baltymų duomenų bazė, apjungianti kelias gerai žinomas duomenų bases į vieną, t.y. Swiss-Prot, TrEMBL, and PIR, ir sėkmingai suteikianti informacijos apie baltymų sekas ir funkcijas bei nurodanti raktinius žodžius, kuriuos galima panaudoti tolimesniems ieškojimams. env geno produkto - baltymo seka sudaryta iš 515 aminorūgščių, matosi C-galo (P-prolinas) ir N-galo (M-metioninas) aminorūgštys. Mėlyna spalva yra pažymėtos tos aminorūgštys, kurios sudaro *gp51* subvieneto grandinę. Raidės žymi 20 gamtoje egzistuojančių aminorūgščių. Kiekviena raidė reiškia vieną aminorūgštį (Uniprot [interaktyvus]).

1	MPKERRSRRR PQPIIRWVSL TLTLALCQP IQTWRCSLSL GNQQWMTTYN	50
51	QEAKFSISID QILEAHNQSP FCPRSPRYTL DFNNGYPKIY WPPQGRRRF	100
101	GARAMVTYDC EPRCPYVGAD HFDCPHWDNA SQADQGSFYV NHQILFLHLK	150
151	QCHGIFTLTW EIWGYDPLIT FSLHKIPDPP QPDFPQLNSD WVPSVRSWAL	200
201	LLNQATARAF DCAICWEPSP PWAPEILVYN KTISGSGPGL ALPDAQIFWV	250
251	NTSLFNTTQG WHHPSQRLLF NVSQGNALLL PPISLVNLST VSSAPPTRVR	300
301	RSPVAALTLG LALSVGLTGI NVAVSALSHQ RLTSLIHVLE QDQQLITAI	350
351	NQTHYNLLNV ASVVAQNRRG LDWLYIRLGF QSLCPTINEP CCFLRIQNDS	400
401	IIRLGDQLPL SQRVSTDWQW PWNWDLGLTA WVRETIHSLV SLFLLALFLL	450
451	FLAPCLIKCL TSRLKLLRQ APHFPEISFP PKPDSYQAL LPSAPEIYSH	500
501	LSPTKPDYIN LRPCP	515

1.2.3. env geno, koduojančio baltymą gp51 ir gp 30, erdvinė struktūra

MODBASE yra visų galimų kiekvieno baltymo sekų erdvinių struktūrų palyginimo duomenų bazė. Modeliai yra kuriami ir apskaičiuojami MODPIPE, PSI-BLAST, IMPALA, MODELLER programų pagalba. Šioje duomenų bazėje buvo rasta env geno, koduojančio baltymus gp51 ir gp 30, erdvinė struktūra (žr. 1.3 pav.) (ModBase [interaktyvus]).



1.3 pav. Geno env produkto (baltymo) erdvinė struktūra (ModBase [interaktyvus])

1.3. Epidemiologiniai rodikliai ir ekonominė žala

Galvijų enzootinės leukemijos (toliau - GEL), sukeltos GLV viruso, pasekmių mažinimas ir šiomis dienomis yra vis dar labai aktualus. Nors higienos normos ir standartai galvijų laikymui kelia aukštus reikalavimus, tačiau Vokietijos gyvulių augintojai negali išnaikinti šio viruso iki šių dienų. (Teifke, Vahlenkamp 2008).

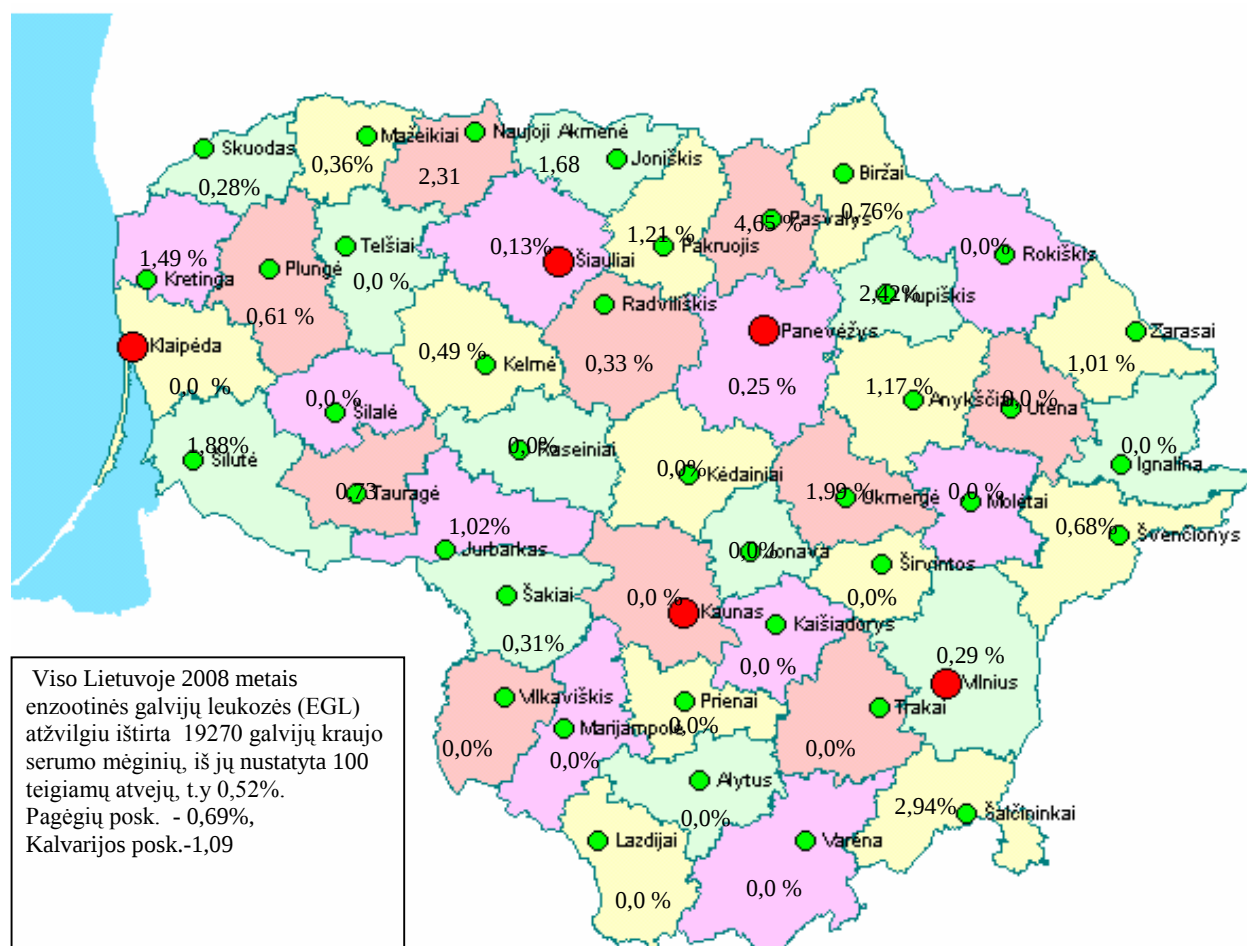
GEL sergama visose pasaulio valstybėse. Vidutinio klimato regionuose virusas plinta per infekuotų limfocitų pernašą. Šiltuose regionuose jis yra dažniau sutinkamas, o pernešėjais labai dažnai tampa vabzdžiai. (Gallo, Wong-Staal 1989). Nauji židiniai dažniausiai atsiranda ten, kur gyvuliai atvežami iš užkrėstų ūkių (Milius et. al. 2005). Neekologiškose, užterštose vietovėse yra aptinkamas didesnis infekuotų GLV galvijų skaičius. Ilgą laiką gyvūnus laikant tokiomis sąlygomis, jų imuninis atsparumas gali žymiai sumažėti (Ponomareva 2008).

GEL ekonominiai nuostoliai yra dideli (Juliarena 2009), nes užsikrėtęs galvijai turi būti skerdžiamas, pvz. kiekvienais metais Kalifornijoje yra paskerdžiama virš 5000 karvių, užsikrėtusių GLV. Virusui išplitus, ne visi galvijai suserga. Tačiau, jei karvė buvo infekuota, tai jau lieka visam jos gyvenimui (Vetmed [interaktyvus]). Taip sumažėja galvijų produktyvumas,

jie brokuojami, utilizuojamos jų skerdenos ir organai, sutrinka veislininkystės darbas, daug lėšų išleidžiama likviduojant ligą (Milius et. al. 2005).

Lietuvos žemės ūkio galvijininkystės plėtrai didelę žalą daro galvijų užkrečiamosios, ypač virusinės, ligos, todėl būtina greitai, tiksliai ir efektyviai diagnozuoti galvijų virusines ligas, užkirsti kelią jų plitimui Lietuvoje (Milius et. al. 2005). Kuo anksčiau nustatant virusines ligas galima išvengti didelių ekonominių nuostolių, kurie susidaro susirgus galvijams, gaišimo atveju, sumažėjus mėsos, pieno ir kitai produkcijai, netekus gyvulių prieauglio ir bandų veislinio branduolio (Collins et al. 2005; Milius et. al. 2005). Nemaži nuostoliai susidaro dėl gyvų galvijų ir jų produktų prekybos apribojimo ar eksporto į kitas valstybes, taip pat dėl išlaidų, susijusių su kompensacijų išmokėjimu už kritusius galvijas, ar mokant galvijų virusinių ligų likvidavimo išlaidas (Milius et. al. 2005).

Šiuo metu serologiniais tyrimais GLV infekuoti galvijai yra nustatomi tik pavieniais atvejais (Milius et. al. 2005) (žr. 1.4 pav.). Nacionalinė veterinarijos laboratorija ištyrė, kad teigiamai reagavusių galvijų leukozės atžvilgiu buvo daugiausia Pasvalio rajone (4,65 %).



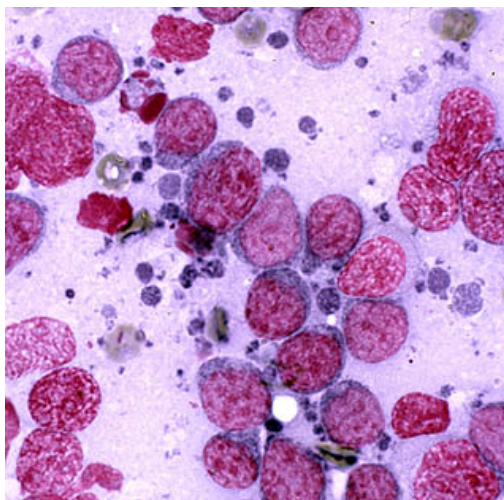
1.4 pav. Teigiamai reagavusių leukozės atžvilgiu galvijų procentas 2008 metais Lietuvoje

GEL yra viena iš ligų, kuri padaro nuostolių ne tik galvijų sveikatai, bet ir galvijų veisliniam darbui, jų produkcijai ir eksportui. Užsikrėtę galvijai negali būti parduodami veislei, draudžiamas jų eksportas, jie likviduojami skerdziant (Vetmed [interaktyvus]). Vieno galvijo tyrimo kaina – 1 Lt. Taigi per 2000–2004 metus GLV tyrimams buvo išleista 2 827 853 litai (Milius et. al. 2005).

1.4. Galvijų leukemijos vystymosi stadijos bei imuninio atsako formavimasis

Daugumai GLV infekuotų gyvūnų būdingas ilgas besimptomis periodas (Harris 1989; Dairymd [interaktyvus]), kurio metu dar nestebimas padidėjęs cirkuliuojančių B ląstelių kiekis ar auglių išsivystymas (Doménech et al. 2000). GLV skatina B limfocitų kaupimąsi periferinėje kraujotakos sistemoje ir limfiniuose audiniuose (žr. 1.5 pav.) (Florins et al. 2008). Ilgą šios infekcijos latentinį laikotarpį kai kurie tyrinėtojai bando paaiškinti tuo, kad šios ligos pradžioje yra infekuojami monocitai/makrofagai, kurie tampa virusų rezervuarais (Doménech et al. 2000; ADDL [interaktyvus]). GLV infekuotame organizme vyksta daugelis molekulinų, ląstelinų ir audinių pokyčių (Bex et al. 1979; Pieskus et al. 1995).

GLV infekuotame organizme viremija nustatoma tik pirmąsias 2 savaites po GLV patekimo į B limfocitus (Portetelle et al. 1978). Vėliau GLV antigenų ekspresija nėra stebima, tačiau hibridizacijos *in situ* metodu nustatoma retroviruso nukleokapsidės šerdinio baltymo *p24* bei viriono išorinio apvalkalo glikoproteinų *gp51* ir *gp30* sintezė, vykstanti galvijų limfiniuose mazguose (Heeney et al. 1992). Dauguma GLV struktūrinių baltymų yra imunogenai, bet natūraliai infekuotame organizme formuojasi antikūnai tiek *env* geno koduojamus glikoproteinus *gp51* ir *gp30*, tiek *gag* koduojamus baltymus *p24* ir *p15*. Tačiau vyrauja antikūnai prieš *p24* ir *gp51* (Juliarena 2009) ir jie priklauso IgM ir IgG1 izotipams (Vaičiūnienė et al. 1995; Levkut et al. 1997). Antikūnai prieš *p24*, *gp51* ir *gp30* yra leukemijos ankstyvosios stadijos būdingiausias rodiklis. Jie gali būti detektuojami pirmųjų 2-3 savaičių laikotarpyje (Harris 1989).



1.5 pav. Padidėjęs nesveikų limfocitų skaičius galvijų, segančių limfosarkoma, limfinio mazgo ląstelėse

GLV infekcijos pasekmė – persistentinė limfocitozė (PL), yra aptinkama apie 30% infekuotų galvijų. (Stone et al. 2000; Vetmed [interaktyvus]; Gillet et al. 2007; ADDL [interaktyvus]; Collins et al. 2005). Viruso *in vitro* ekspresijos supresija tam tikrais GLV antikūnais ar baltymų kinazių C inhibitoriais sumažina spontaniinę limfocitų proliferaciją (Stone et al. 2000).

1.5. Galvijų leukemijos infekcijos nustatymo metodai

GLV infekcijai nustatyti naudojami įvairūs metodai, kurie skiriasi jautrumu, specifiškumu, sudėtingumu, brangumu, analizės trukme (Beier et al. 1998; Simard et al. 2000a). Daugumoje GLV infekcijos nustatymo metodų (pvz., imunofermentinė analizė (toliau – IFA) (Harris 1989), polimerazės grandininės reakcijos (PGR) (Juliarena et al. 2007; Teifke, Vahlenkamp 2008) ir kt.), naudojami papildomi reagentai (žymėti antikūnai, substratai, pradmenys, nukleotidai ir kt.) bei atliekamos papildomos procedūros, kurios ilgina analizę. Todėl žymiai perspektyvesni būtų tokie nustatymo metodai, kuriuose GLV infekciją galėtume nustatyti be papildomų reagentų.

Besimptomis GLV infekcijos periodas, apimantis ir inkubacijos stadiją, gali tęstis mėnesius ar net metus. Šioje stadijoje GLV infekcija gali būti nustatoma imunodifuzijos reakcijos (Meas et al. 2000a; Simard et al. 2000b), imunofermentinės analizės (Have, Hoff-Jürgensen 1991; Gutiérrez et al. 2001, Dairynd [interaktyvus]), imunodoto (Llames et al. 1999), immunobloto (Grover and Guillemain 1992; Johnson et al. 1998; Kittelberger et al. 1999), radioimuninės analizės metodais (Bossman et al., 1989) ar PGR (Klintevall et al., 1994, Dumalakienė et al. 1995; Pieskus et al. 1995; Rola, Kuzmak 2002). Dažniausia naudojami serologiniai testai yra agarų gelio imunodifuzijos reakcija ir imunofermentinė analizė (ADDL [interaktyvus]). Šie metodai skiriasi jautrumu ir specifiškumu. Dvikryptės spindulinės imunodifuzijos reakcijos (IDR) agarų gelyje pagrindas yra imuninė reakcija. Agarų gelio poromis priešprieša difunduoja Ag ir Ak, jų susitikimo vietoje aiškiai matoma precipitacijos juosta, kuri yra sąveikos tarp antigeno ir antikūnų rezultatas. Agarai šiuo atveju dalyvauja kaip nešėjas ir kaip precipitato lokalizacijos vieta (Vaičiunienė 1997).

Šiuo metu GLV antigenams nustatyti naudojami komerciniai imunofluorescenciniai ir imunofermentiniai testai yra labai jautrūs ir pasižymi dideliu specifiškumu nustatamai analizei, bet nėra nuolat naudojami diagnostikoje dėl pakankamai sudėtingo darbo su dideliu mėginių skaičiumi (OIE 2004). Buvo sukurtas ir toliau yra kuriami elektrocheminiai immunosensoriai, nustatantys specifinius anti-*gp51* antikūnus prieš GLV *gp51* antigeną (Kurtinaitienė et al. 2008).

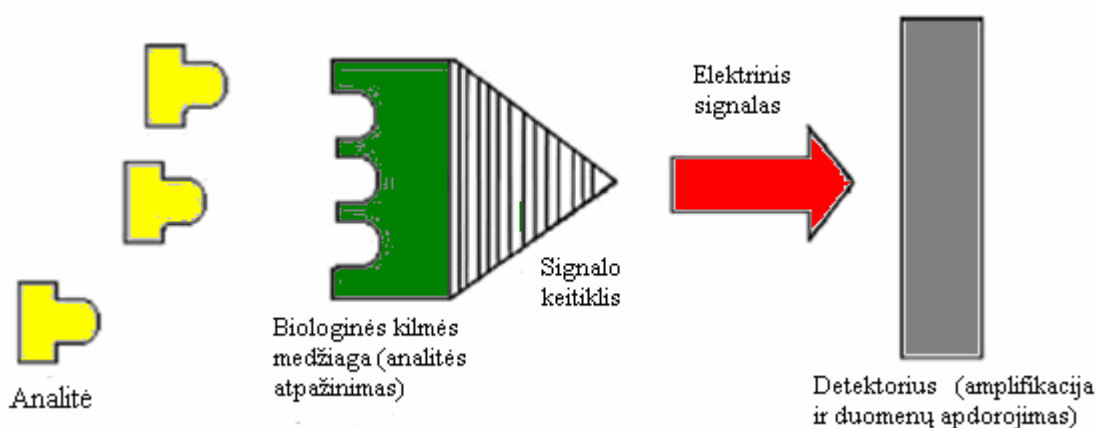
IDR ir IFA yra GLV nustatymo metodai, bet pagrindinis beveik visų šių metodų trūkumas yra gana ilga analizės trukmė, pvz., IDR trunka 1-2 paras, IFA apie 4-24 valandas, PGR apie 2-3

valandas. Ilga analizės trukmė yra neabejotinas šių analitinių metodų trūkumas ir todėl galima manyti, kad ateityje užleis vietą modernesniems ir žymiai greitesniems metodams. Sparčiai plėtojantis mikroelektronikai ir biotechnologijos mokslams bus sukurti imunoanalizei skirti lustai, kuriuose bus daugybė imuninių jutiklių ir PGR testų rinkinių (OIE [interaktyvus]).

1.6. Biologiniai jutikliai

Biologiniai jutikliai – tai analizinės sistemos, sudarytos iš biologinio atpažinimo elemento (BAE), tiesiogiai kontaktuojančio su atitinkamu signalo vertikliu, gebančiu BAE sąveiką su analite arba BAE sukeltus biokatalizinius procesus paversti išmatuojamais elektriniais signalais, proporcingais analizės koncentracijai (žr. 1.6 pav.) (Sharma et al. 2003; Holme 1998; Sonleitner 1999; Shankaran et al. 2007; Bonroy et al. 2006; Subrahmanyam et al. 2002; Nice, Catimel 1999; Kumar 2000). Analitėmis gali būti fermentai (Kurtinaitiene et. al. 2008; Wang, Wang 2008), receptoriai (Subrahmanyam et al. 2002), antikūnai arba antigenai (Gobi et al. 2007), bakterijos, ląstelės, daugialąsčiai gyvi organizmai, jų audiniai arba organai (Shankaran et al. 2007; Ramanavičius 2005).

Kai tiriamoje aplinkoje esama analizės, sąveikaujančios su BAE, šios sąveikos generuojamas signalas yra perduodamas signalo keitikliui (žr. 1.6 pav.). Šiuo metu sprendžiant įvairius analizinius uždavinius labai dažnai taikomi įvairūs optiniai, elektrocheminiai ir pjezoelektriniai signalų registravimo metodai (Shankaran et al. 2007; Nice, Catimel 1999; Kausaite et al. 2006; Wang XH, Wang S 2008). Tam pritaikomos įvairios šviesai jautrios medžiagos, elektrai laidūs paviršiai, kvarco osciliatoriai, paviršiaus akustinių bangų įrenginiai ir įvairios puslaidininkių savybėmis pasižyminčios medžiagos (Ramanavičius, 2005).



1.6 pav. Biologinio jutiklio schema

Pagal imobilizuotojo BAE sąveikos su analite tipą biologiniai jutikliai yra skirstomi į katalizinius ir afiniškumo biologinius jutiklius (Ramanavičius 2005; Kausaite et al. 2007). Katalizinių komponentų grupę sudaro fermentai, mikroorganizmai, audiniai; į afiniškumo

biologinės kilmės medžiagų grupę įeina antikūnai, receptoriai ir nukleino rūgštys. (Sharma et al. 2003). Biologinės kilmės medžiagos yra atsakingos už analizės atpažinimą (Shankaran et al. 2007; Subrahmanyam et al. 2002). Gamtinių biopolimerų tyrimas yra būtinas augalų, gyvūnų ląstelių ir jų audinių funkcionavimo suvokimui (Sharma et al. 2003).

Biologiniai jutikliai gali būti plačiai panaudojami medicininėje diagnostikoje (Kausaite et al. 2007), aplinkos monitoringe (Kurosawa et al. 2006; Gobi et al. 2007), genetikoje, saugumo ir gynybos diagnostikoje. Biologiniai jutikliai, pvz. su nervinėmis ląstelėmis užaugintomis ant mikroprocesoriaus paviršiaus, gali reaguoti į toksinų buvimą aplinkoje, sukeldami elektrinius signalus. Tokios technologijos vienija mokslo sritis, pvz. elektronų inžineriją ir biologinius mokslus (Sharma et al. 2003).

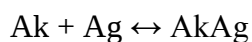
1.7. Afiniškumo jutikliai

Afiniškumo jutikliai - tai tokie biologiniai jutikliai, kuriuose pritaikytos afiniškumu nustatomajai analitei pasižyminčios biologinės kilmės medžiagos (antikūnai, vienagrandės DNR fragmentai, RNR, receptoriniai baltymai ir k.t.) arba medžiagos, kurioms afiniškumas nustatomajai analitei buvo suteiktas suformuojant analizės molekulių išpaudus polimero matricoje (Ramanavičius 2005).

Afiniškumo jutikliai yra naudojami tam tikrų biomolekulių, pvz. antikūnų, receptorių, polinukleotidų ir kt. selektyviai sąveikai su specifiniais taikiniai nustatyti. Biomolekulinis atpažinimo procesas vyksta pagal receptoriaus ir ligando tarpusavio atitikimą. Biocheminių reakcijų aukštas specifiskumas ir afiniškumas leidžia sukurti labai selektyvius ir jautrius jutiklius. Elektrocheminiai signalo keitikliai yra tinkami afiniškumo sąveikoms nustatyti ir tirti. Tokios priemonės matuoja elektrinius signalus, gaunamus atitinkamų biomolekulių sąveikos proceso metu (Wang 2000).

1.8. Imuniniai jutikliai

Nemažos dalies afiniškumo jutiklių veikimo pagrindas yra imunologinės reakcijos (Vaughan, Guilbault 2007), kurių metu antigenas (Ag) yra specifiskai atpažįstamas antikūno (Ak) ir sudaromas antikūno/antigeno (AkAg) kompleksas (Flanagan, Pantell 1984; Shankaran et al. 2007):



Antikūnas – baltymas (imunoglobulinas), gaminamas organizme į jį patekus genetiškai svetimoms medžiagoms. Nepaprastas antikūnų selektyvumas yra pagrįstas antigeną surišančios srities stereospecifiškumu ir yra apibūdinamas didelėmis asociacijos konstantų vertėmis ($10^5 - 10^9 \text{ L mol}^{-1}$) (Wang 2000; Vaughan, Guilbault 2007).

Kuriant imuninius jutiklius kaip BAM dažniausiai yra naudojami antikūnai (Hu et al. 2008; Bonroy et al. 2006). Didelis antikūnų specifiskumas ir afiniškumas tam tikriems antigenams

leidžia labai atrankiai atpažinti analites (antigenus ar antikūnus) (Shankaran et al. 2007), kurių koncentracijos tiriamajame bandinyje gali būti nuo nano- iki pikomolių, esant šimtams kitų substratų, net jei jų koncentracijos keletą eilių viršija analitės koncentraciją (Ramanavičius 2005).

Pastaruoju laiku imunologiniai tyrimai, pvz. vaistų, hormonų nustatymas klinikinėje ir farmacinėje chemijoje ir kt., labai sparčiai tobulėja. Imuniniai jutikliai, kuriuose antikūnai ar jų fragmentai yra imobilizuojami ant elektrodų paviršiaus, optinių pluoštų ar puslaidininkių lustų, atstovauja šioms daug žadančioms sritims (Sharma et al. 2003).

1.9. Imuninių jutiklių klasifikacija

Imuniniai jutikliai gali būti skirstomi į tris pagrindines grupes, priklausomai nuo signalo keitiklio tipo: 1) elektrocheminius (žr. 1.9.1. skyrių), 2) pjezoelektrinius (žr. 1.9.2. skyrių) ir 3) optinius jutiklius (žr. 1.9.3. skyrių) (Gobi et al. 2007; Shankaran et al. 2007; Sharma et al. 2003; Nice, Catimel 1999). Antikūnams imobilizuoti yra pritaikomi skirtingi būdai (žr. 1.11.4. skyrių) (Hu et al. 2008; Bonroy et al. 2006; Shankaran et al. 2007; Gobi et al. 2007; Shen et al. 2008). Kryptingas antikūnų prijungimas prie aukso paviršiaus yra vienas iš svarbiausių veiksmų, lemiančių efektyvių imuninių jutiklių kūrimą (Sharma et al. 2003).

1.9.1. Elektrocheminiai imuniniai jutikliai

Elektrocheminiai imuniniai jutikliai pagal detekcijai taikomą elektrocheminį metodą yra skirstomi į amperometrinius, potenciometrinius ir konduktometrinius (Ramanavičius 2005; Shankaran et al. 2007; Holme 1998; Nice, Catimel 1999; Sonleitner 1999; Gobi et al. 2007).

Amperometriniai jutikliai registruoja srovės pokytį, atsirandantį biologinių sistemų oksidacijos-redukcijos reakcijų metu, esant pastoviam potencialui (Holme 1998; Shankaran et al. 2007; Kurtinaitienė et al. 2008). Potenciometriniai jutikliai yra pagrįsti potencialų skirtumo matavimais imuninių reakcijų elektrodo paviršiuje metu (Shankaran et al. 2007). Lyginant su amperometriniais jutikliais, šiuo atveju registruojamas signalas priklauso nuo pusiausvyros nusistovėjimo, pH pokyčių. Konduktometriniai jutikliai registruoja tirpalo elektrinį laidumą, kuris kinta fermento katalizuojamos reakcijos metu elektrolito tirpale (Sonleitner 1999).

1.9.2. Pjezoelektriniai imuniniai jutikliai

Masės nustatymo jutikliai yra patys populiariausi tarp mikroanalizės jutiklių. Jų veikimo principas grindžiamas pjezoelektriniu reiškiniu ir matuoja rezonuojančio dažnio pokytį osciliatoriaus paviršiuje. Patys populiariausi pjezoelektriniai jutikliai yra kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės (toliau – KKM) (Shankaran et al. 2007; Nice, Catimel 1999).

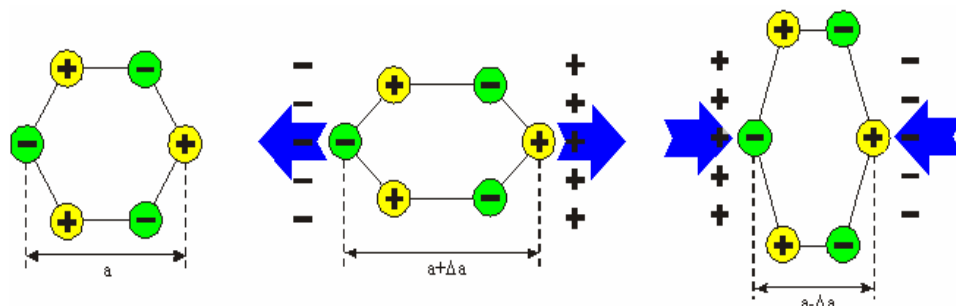
1.9.2.1. Kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės

Monokristalinis kvarcas yra viena iš geriausiai mums žinomų medžiagų, nesvarbu, ar bus kalbama apie gamtinį, ar apie sintetinį kvarcą, naudojamą kompiuteriuose, telekomunikacijų

įrangoje ir laikrodžiuose (Elektronika [interaktyvus]). Daugelio unikalių kvarco savybių priežastis yra jo atominė sandara. Kvarcas yra pjezoelektrinė medžiaga, kurios kristalinė gardelė elektriniame lauke pasikeičia, pasikeitus silicio ir deguonies atomų pozicijai vieni kitų atžvilgiu (Elektronika [interaktyvus]; Piezocryst [interaktyvus]).

Ši kvarco kristalo savybė, kuri yra trūkumas gaminant tikslius ir stabilius rezonatorius telekomunikacinei technikai, yra vis plačiau panaudojama kuriant naujus biologinius jutiklius. Tam tikrų orientacijų ir įvairaus dydžio kvarco kristalai gali būti naudojami matuojant daugybę skirtingų fizikinių parametrų, pavyzdžiui, pagreitį, masę, sukimosi momentą, drėgmę, slėgį ir temperatūrą. Keletą šių parametrų galima nustatyti kvarco kristalo mikrogravimetrinių svarstyklių aparatu (QCM - *Quartz Crystal Microbalance* – kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės (toliau – KKM)), kuri dažnai yra taikoma matuojant padengimo garinimo būdu greitį ir užgarintų sluoksnių storį (Elektronika [interaktyvus]).

KKM yra ypatingai jautrus sveriantis įrenginys, kurio veikimas pagrįstas pjezoelektriniu efektu (Wang 2000; Tang et al. 2006; Kupciunaite et al. 2006). Pjezoelektrinį reiškinį atrado ir ištyrė fizikai broliai Pierre ir Jacques Curie 1880 m. (O’Sullivan, Guilbault 1999; Piezocryst [interaktyvus]; CCRMA [interaktyvus]; Vaughan et al. 2001; Susmel et al. 2000). Tiesioginis pjezoelektrinis reiškinys pasireiškia, kai, veikiant mechaninei jėgai (gr. *piezo* – jėga), kvarco kristalas (pjezoelektrikas), poliarizuoja ir ant jo paviršiaus esančiuose elektroduose atsiranda elektriniai krūviai (CCRMA [interaktyvus]; Piezocryst [interaktyvus]). Pjezoelektrinis reiškinys yra stebimas gyvuosiuose organizmuose, pvz. kaulai veikia kaip jėgos jutikliai (Piezocryst [interaktyvus]). Atvirkštinis pjezoelektrinis reiškinys pasireiškia, kai elektrinis laukas sukelia pjezoelektriko deformacijas (žr. 1.7 pav.). KKM pagrindas yra atvirkštinis pjezoelektrinis efektas (Wang 2000).



1.7 pav. Išorinis elektrinis laukas, sukeliantis kvarco kristalo mechaninį rezonansą

Išorinio elektrinio lauko sugebėjimas sukelti medžiagos mechaninį rezonansą priklauso nuo pjūvio orientavimo kvarco kristalo kristalinės gardelės atžvilgiu. Kvarco kristalas veikiamas išorinio elektrinio lauko keičia formą (vyksta šlyties deformacijos), jo plokštumos pasislenka lygiagrečiai viena kitos atžvilgiu (Wang 2000).

1.9.2.2. KKM imuniniai jutikliai

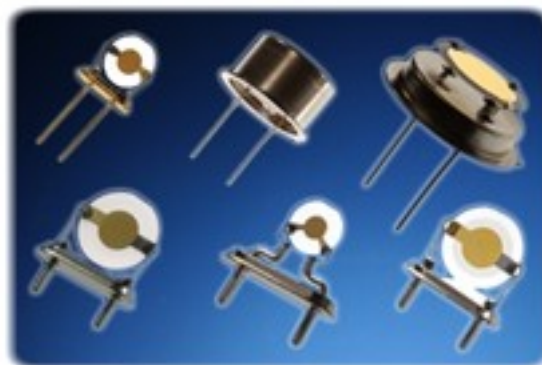
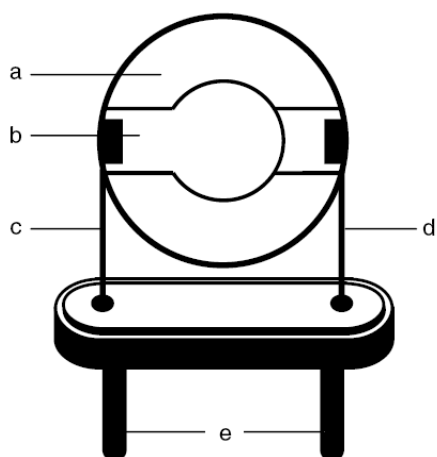
KKM biologiniai jutikliai yra plačiai taikomi biomolekulių sąveikoms, sąveikų greičiams tirti bei kitiems biologiniams, imunoanaliziniams tyrimams (Luo et al. 2007; Kurosawa et al. 2006; Wang 2005; Shen et al. 2008; Kurosawa et al. 2004). Jų veikimas yra pagrįstas elektrodo (žr. 1.8 pav.) paviršiuje vykstančiais masės pokyčiais, taip pat gali būti atliekami ir elektrocheminių parametrų matavimai (Luo et al. 2007; Spangler, Tyler 1999; Kurosawa et al. 2006; Kupciunaite et al. 2006).

Jei masė kristalo paviršiuje yra: (I) palyginti maža su kristalo mase; (II) kietai, nejudamai adsorbuota ir (III) vienodai pasiskirsčiusi kristalo aktyviame paviršiuje (Wang 2000; Ferreira et al. 2007) iš (1) lygties, kurią 1959 m. paskelbė prof. G.Sauerbrey'us, matyti, kad kristalo masės pokytis, Δm , yra tiesiogiai proporcingas dažnio pokyčiui, Δf (Ferreira et al. 2007; Kumar, 2000; Vaughan et al. 2001; Susmel et al. 2000; Deng et al. 2006; Luo et al. 2007; Kurosawa et al. 2006; Tang et al. 2006; O'Sullivan, Guilbault 1999).

Dažnio pokyčiai (Δf) siejasi su masės pokyčiais (Δm) pagal Sauerbrey'o lygtį:

$$\Delta f = -2\Delta m f_0^2 / A\sqrt{\mu\rho}, \quad (1.1)$$

kur f_0 yra kristalo rezonansinis dažnis (8 MHz), A – aktyvus kristalo plotas ($0,205 \text{ cm}^2$), ρ – tankis ($2,648 \text{ g/cm}^3$), μ – šlyties modulis ($2,947 \times 10^{11}$) (Wang 2000; Kurosawa et al. 2006).



1.8 pav. Kvarco kristalo rezonatorius a) kvarco kristalas, b) aukso elektrodas, c) ir d) jungiančios metalinės vielos, e) pagrindas/atrama (Wang 2000).

Kvarco kristalo elektrodai iš abiejų pusių padengti aukso sluoksniu (žr. 1.8 pav.), taip pat yra naudojami ir elektrocheminiuose imuniniuose jutikliuose, nes jie chemiškai inertiški (Wang 2000; Kurosawa et al. 2006; Luo et al. 2007; Spangler, Tyler 1999). Pirmasis pjezoelektrinis

imuninis jutiklis buvo sukurtas Shons mokslinėje grupėje 1972 m. (O'Sullivan, Guilbault 1999). Dauguma žinomų biomolekulių imobilizavimo būdų ant aukso yra pagrįsti merkaptų funkcinų grupių (-SH ar -SS-) kovalentiniu prijungimu (Chu et al. 2006). Antikūnai dažniausia prie aukso yra jungiami bifunkciniais reagentais su viena laisva tioline grupe. Tačiau antikūnų imobilizavimas panaudojant savitvarkius monosluoksnius ar kitais metodais ne visada garantuoja kryptingą biomolekulių orientaciją paviršiuje, todėl mažėja afiniškumo jutiklių jautrumas. Kryptingas antikūnų imobilizavimas aukso paviršiuje yra nepaprastai svarbi problema, kuriant imuninius jutiklius (Sharma 2003).

1.9.3. Optiniai imuniniai jutikliai

Optiniai detekcijos principai: paviršiaus plazmono rezonansas (toliau PPR), rezonansiniai vėidrodžiai, visiškos vidinės refleksijos fluorescencija, elipsometrija ir interferometrija buvo pritaikyti daugiafunkciniams optiniams biologiniams jutikliams sukurti (Nice, Catamel 1999). Optiniai imuniniai jutikliai matuoja imuninių reaguojančių agentų ir šviesos emisijos, sugerties, poliarizacijos ar lūžio rodiklių pokyčius. Perspektyviausi ir labiausiai paplitę optiniai imuniniai jutikliai pagrįsti PPR reiškiniu (Shankaran 2007).

1.10. Paviršiaus plazmono rezonanso jutikliai

Pastaraisiais metais PPR metodas tapo vienu iš pagrindinių metodų tiriant bei nustatant afiniškai sąveikaujančias medžiagas (Ramanavičius 2005). PPR biologiniai jutikliai vis dažniau yra naudojami nustatant naujų vaistų savybes (Lee et al. 2005), diagnozuojant bakterijų ir virusų sukeltas ligas (Tsai, Li 2009), nustatant toksinus (Wang XH, Wang S 2008), alergenų (Huang et al. 2008), hormonus, steroidus, imunoglobulinius (Kausaite et al. 2007b), tiriant maisto (Tsai, Li 2009), aplinkos (Shankaran et al. 2007) užterštumą, charakterizuojant polikloninius antikūnus ir atliekant kiekybinę imunoanalizę (Gobi et al. 2007; Lofas, Johnsson 1990). Šiuo metu daugelio šalių biomedicininėse laboratorijose PPR jutikliais yra nustatomas morfinas, metamfetaminas, teofilinas, kofeinas, ksantinas, streptomocinas (Kausaite et al. 2007b). PPR biologiniais jutikliais galima analizuoti chemiškai labai panašių medžiagų mišinius, kadangi yra detektuojamos tik tos analitės, kurios specifiškai sąveikauja su PPR jutiklio paviršiuje imobilizuota biologinio atpažinimo medžiaga (Tsai, Pai 2009; Ramanavičius 2005). PPR biologiniai jutikliai taikomi betarpiškam analitės sąveikos su imobilizuota biologinio atpažinimo medžiaga nustatymui realia laike (Tsai, Pai 2009), tai leidžia detalai tirti šių medžiagų sąveikos kinetiką. Kita vertus, taikant PPR metodą galima tirti tiek analitės asociaciją su imobilizuota afiniškai sąveikaujančia medžiaga, tiek ir susidariusio komplekso disociaciją. Šie biologiniai jutikliai, imobilizavus biologiškai aktyvią medžiagą, skirtą analitės nustatymui, ir sėkmingai parinkus susidariusio komplekso disociacijos sąlygas, daugeliu atveju gali būti naudojami net kelioms

dešimtims matavimų iš naujo neimobilizuojant biologinio atpažinimo medžiagos (Ramanavičius 2005). Todėl šis metodas šiuo metu yra vienas iš pačių perspektyviausių ligando-receptoriaus, antigeno-antikūno (Flanagan, Pantell 1984; Karlsson 2004) ir kitų afiniškai sąveikaujančių medžiagų sąveikai nustatyti ir yra vis dažniau taikomas susirgimų diagnostikoje ir biomedicininuose tyrimuose (Kausaite et al. 2007b).

1.10.1. Paviršiaus plazmono rezonanso jutiklių privalumai

Paprastai biomolekulių sąveikos yra tiriamos naudojant tokius metodus kaip imunoanalizė (IFA) (Huang et al. 2008), pusiausvyrinė dializė, afininė chromatografija ir spektroskopija, tačiau PPR biologiniai jutikliai turi kelis pagrindinius pranašumus lyginant su šiais metodais (Tsai, Li 2009; Gobi et al. 2007):

1) Matavimai vykdomi realiame laike (Tsai, Pai 2009). Prisijungimas yra stebimas tiesiogiai visą laiką tol, kol vyksta sąveika (Ramanavicius 2005; Kausaite et al. 2007a; Huang et al. 2008; Shankaran et al. 2007).

2) Nėra būtinybės papildomai žymėti sąveikaujančių molekulių (Tsai, Pai 2009; Kausaite et al. 2007a), pvz., radioaktyviomis, fluorescencinėmis arba fermentinėmis žymėmis. Baltymų žymėjimas gali įtakoti reakcingumo ir/arba specifiškumo pokyčius (Shankaran et al. 2007; Huang et al. 2008; Kausaite et al. 2007). Tokiu būdu yra mažinami kokybiniai (specifiškumas, selektyvumas, analitės aptikimo riba ir pan.) ir kiekybiniai analizės rodikliai (afiniškumo, kinetiniai ir termodinaminiai parametrai, koncentracijos analizė) (Karlsson 2004; Tsai, Li 2009; Lofas, Johnsson 1990).

3) Tą patį PPR jutiklį analizei galima panaudoti keletą kartų, sėkmingai regeneravus jutiklį (Tsai, Pai 2009; Shankaran et al. 2007).

4) PPR jutikliai gali būti panaudojami mažiems, nešiojamiems jutikliams gaminti (Wang XH, Wang S 2008; Huang et al. 2008).

5) PPR jutikliai yra labai jautrūs ir specifiški nustatomajai analitei, gali nustatyti mažas analitių koncentracijas (Tsai, Pai 2009; Homola et al. 1999; Gobi et al. 2007; Wang XH, Wang S 2008). Detekcijos riba 20 kDa molekulėms yra apytiksliai 1-10 nM (Huang et al. 2008).

6) Laiko sąnaudos yra mažesnės (Kausaite et al. 2007b; Ramanavičius 2005).

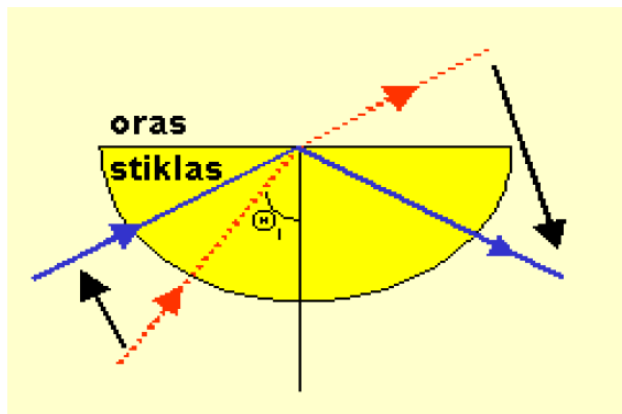
1.10.2. Paviršiaus plazmono rezonanso reiškiny

Paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) reiškiny yra žinomas gana seniai, tačiau biologiniams tyrimams jis pirmą kartą buvo panaudotas tik 1983 m. Liedberg'o ir bendradarbių (Liedberg et al. 1983). Nuo tada PPR metodas išsivystė į labai perspektyvų biomolekulių tyrimo metodą, turintį daugybę pritaikymo galimybių.

Paviršiaus plazmonų rezonansas yra kvantinis optinis-elektrinis reiškiny atsirandantis dėl šviesos bangų sąveikos su metalo paviršiumi (Homola et al. 1999; Ramanavičius 2005). Esant

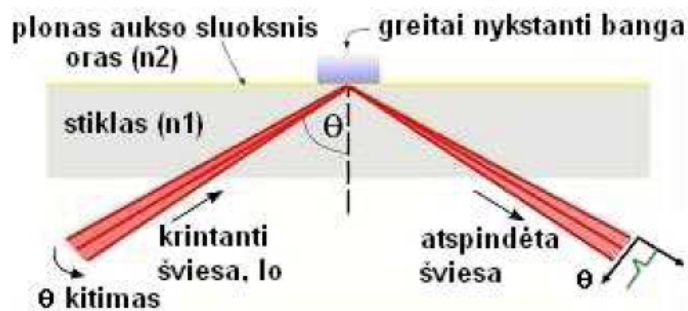
tam tikroms sąlygoms energija, perduodama šviesos fotonais, metalo paviršiuje yra perduodama elektronams, kurie priverčiami osciliuoti tam tikru dažniu. Šie virpesiai ir vadinami plazmonų rezonansu (Kausaite et al. 2007b; Shankaran et al. 2007). Paviršiaus plazmonas, tai banga turinti krūvį bei tankį (Ramanavičius 2005) ir atsirandanti sąlyčio paviršiuje tarp metalo ir dielektriko (Lofas, Johnsson 1990). Energijos perdavimas įvyksta tik esant konkrečiam rezonansiniam šviesos bangos ilgiui. Tai yra bangos ilgis, kuriam esant energijos kvantas perduotas fotonais tiksliai atitinka kvantinių plazmonų energijos lygmenį (Homola 1999; Ramanavičius 2005).

Paviršiaus plazmonų rezonansas remiasi vienu iš pagrindinių optikos reiškiniu – visišku vidiniu atspindžiu (VVA) (Tsai, Pai 2009). Kai šviesos spindulys patenka į pusiau cilindrinę prizmę šviesa yra nukreipiama link sąlyčio paviršiaus plokštumos. Kai šviesos spindulys praeina tankesnę terpę jis atsispindi fazių sąlyčio riboje su retesne terpe, kai $n_1 > n_2$ (žr. 1.9. pav.) (Kausaite et al. 2007b). Esant tam tikram šviesos kritimo kampui, kuris dar vadinamas kriziniu kampu, visa įeinanti šviesa yra atspindima prizmės viduje (Tsai, Pai 2009). Kadangi šiuo atveju šviesa neišeina iš prizmės – šis reiškinys vadinamas visišku vidiniu atspindžiu (VVA) (žr. 1.9 pav.) (Ramanavičius 2005).



1.9 pav. Visiško vidinio atspindžio schema (Ramanavičius 2005)

Esant visiškam vidiniam atspindžiui, atspindėti fotonai sukuria elektrinį lauką priešingoje fazių sąlyčio paviršiui pusėje. Plazmonai sukuria panašų lauką, kuris registruojamas kitoje metalo sluoksnio pusėje. Šis laukas vadinamas greitai nykstančia banga (žr. 1.10 pav.), kadangi bangos amplitudė mažėja eksponentiškai didėjant atstumui nuo sąlyčio paviršiaus (Homola et al. 1999). Tokia greitai nykstanti banga, kuri tęsiasi apie 300 nm už metalo paviršiaus puikiai tinka biologiniams matavimas, kadangi daugelio afiniškai sąveikaujančių biologiškai aktyvių medžiagų molekulių ir jų tarpusavio kompleksų matmenys yra mažesni, nei 300 nm (Ramanavičius 2005; Kausaite et al. 2007b).



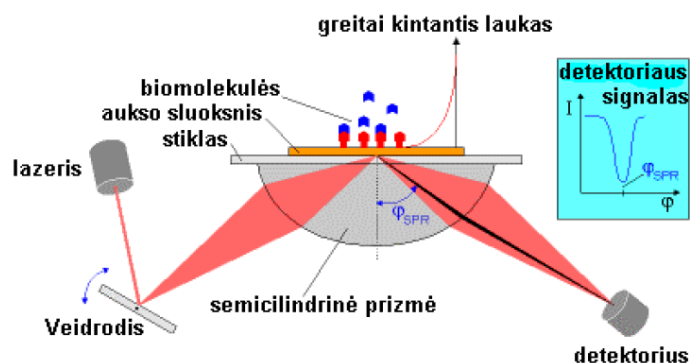
1.10 pav. Greitai nykstančio elektrinio lauko susidarymas (Kaušaitė et al. 2007a)

Paviršiaus plazmono rezonanso kampas priklauso nuo metalo sluoksnio savybių, krintančios šviesos bangos ilgio ir medžiagų, abiejose metalo sluoksnio pusėse, lūžio rodiklių (Tsai, Pai 2009; Kausaite et al. 2007a). Kadangi lūžio rodiklis priklauso nuo temperatūros, todėl matavimus reikia atlikti pastovioje temperatūroje (Kausaite et al. 2007b). Tam, kad stebėtume PPR reiškinių paviršius, kuris naudojamas registruojant PPR, privalo būti laidus, pagamintas iš gryno metalo, rezonuoti atitinkamo bangos ilgio šviesoje ir negali susidaryti oksidų ar sulfidų. Dažniausiai praktiniams tikslams naudojamas PPR generuojantis paviršius yra 50 ± 2 nm storio aukso sluoksnis ant stiklinio ar plastikinio pagrindo (Ramanavičius 2005).

1.10.3. PPR taikymas bioanaliziniams tikslams

PPR yra labai jautrus biocheminis tyrimo metodas. PPR gali būti naudojamas tirti molekulinėms sąveikoms, kadangi, kai molekulės esančios tirpale prisijungia arba disocijuoja nuo jutiklio paviršiaus, rezonanso kampas keičiasi proporcingai lūžio rodikliui (Mice, Catimel 1999). Šis metodas taip pat naudojamas nustatyti kinetines, termodinamines ir pusiausvyros konstantas.

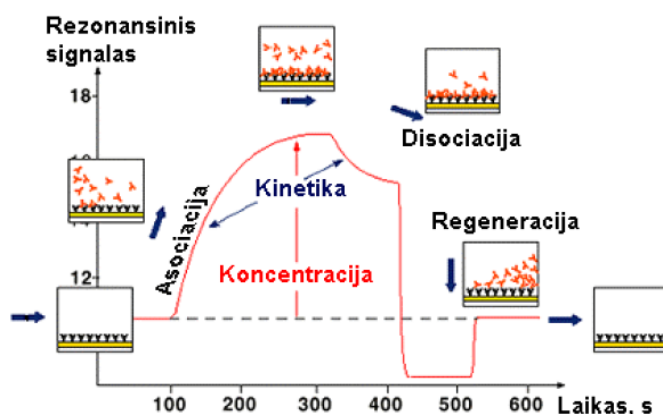
Skenuojančio atspindžio biologiniuose jutikliuose (žr. 1.11 pav.) yra taikomas PPR kampo poslinkio tūkstantųjų dalių tikslumo matavimas tol, kol nusistovi pusiausvyra tarp imobilizuotosios biologiškai aktyvios medžiagos ir analitės kompleksų susidarymo bei šių kompleksų disociacijos greičio. Signalas taip pat priklauso nuo lūžio rodiklio palyginamajame tirpale. 120 tūkstantųjų laipsnio dalių pokytis reiškia, kad paviršius yra padengtas maždaug 1 ng/mm^2 baltymo, o palyginamajame tirpale lūžio rodiklis yra maždaug 10^{-3} (Tsai, Pai 2009; Kausaite et al. 2007a; Lofas, Johnsson 1990).



1.11 pav. Principinė skenuojančio atspindžio PPR biologinio jutiklio schema (Kausaite et al. 2007b)

Detektavimo tikslumą limituoja analitės dydis. Jei junginio molekulinė masė yra mažesnė nei 100 - 200 daltonų, tuomet lūžio rodiklio kitimas analitės jungimosi metu yra per mažas, kad būtų detektuojamas tiesiogiai. Greitai nykstančios bangos (300-400 nm) prasiskverbimo gylis taip pat priklauso nuo nustatomų makromolekulių ar dalelių dydžio. Didesnės nei 400 nm dalelės negali būti nustatomos iš viso. Šiuo atveju signalas tiesiškai nepriklauso nuo prijungtų molekulių kiekio. Esant tokioms sąlygoms kiekybinė ar kinetinė analizė negali būti atliekama, tačiau galima tirti vienų ar kitų molekulių prisijungimą (Ramanavičius 2005; Kausaite et al. 2007b).

Tiriant prisijungimą PPR pokyčiai atsiranda, kai tirpalas yra praleidžiamas pro jutiklio lusto paviršių (Kausaite et al. 2007). Fiksuoto bangos ilgio šviesa yra nukreipiama į jutiklio paviršių (Lofas, Johnsson 1990). Tyrimas, kuriuo metu detektuojamas PPR kampo kitimas sensogramoje (žr. 1.12 pav.), pradedamas pro gardelę leidžiant gryną buferį (0 – 100s) (Mice, Catimel 1999; Ramanavičius 2005; Kausaite et al. 2007b).



1.12 pav. Tipinė PPR biologinio jutiklio sensograma registruojama atliekant pilną tarpmolekulinio komplekso susidarymo ir to komplekso disociacijos tyrimo bei biologinio jutiklio regeneravimo ciklą (Ramanavičius 2005)

Suleidus mėginį analizė prisijungia prie paviršiuje prijungto receptoriaus, kas sąlygoja signalo padidėjimą (100 – 300s). Vėliau, leidžiant buferį (300 – 420s), tirpalas su analite yra pakeičiamas buferiu ir stebimas signalo sumažėjimas. Vėliau aukso paviršius yra regeneruojamas (420 - 520s) praleidžiant pro gardelę regeneruojantį buferį. Dažnai paviršiaus regeneravimui yra naudojamas 100 mmol/L HCl tirpalas. Po to, siekiant atstatyti bazinę liniją, vėl praleidžiamas grynas buferis (520 – 600 s) (Mice, Catimel 1999; Ramanavičius 2005; Kausaite et al. 2007b)

1.11. Biologiškai aktyvių medžiagų, t.y. antikūnų imobilizavimo būdai aukso paviršiuje

Kuriant biologinius imuninius jutiklius BAM imobilizavimas aukso paviršiuje įtakoja jų specifiškumą, stabilumą ir praktinį panaudojimą (Mansuy-Schlick et al. 2006). Imobilizavimas turi būti greitas, pigus ir svarbiausia neįtakojantis imobilizuotos medžiagos biologinio aktyvumo (Kuprianou 2009). Vienas iš svarbiausių etapų imuninio jutiklio kūrime yra tinkamas imobilizavimo pasirinkimas (Lee et al. 2003).

1.11.1. Antikūnai, jų sandara ir sąveika su antigenais

Antikūnai – molekulės, kurias gamina organizmas į jį patekus genetiškai svetimoms medžiagoms. Visi antikūnai yra baltymai vadinami imunoglobulinais. Antikūnai yra plazmos γ globulinų frakcijos pagrindinė dalis. Tačiau ne visi γ globulinai yra antikūnai. Specifiniai antikūnai atpažįsta antigenus ir su jais sudaro imuninius kompleksus dėka vandenilinių, joninių ryšių bei hidrofobinės ir Van der Waals'o sąveikų (Lerner 2003).

Antikūnus gamina B-limfocitai (Lerner 2003), kurie sudaro apie 15% kraujyje cirkuliuojančių limfocitų. Visi limfocitai kilę iš kaulų čiulpų (angl. *bone marrow*) ląstelių, tačiau dalis limfocitų ten ir subręsta, todėl ir vadinami B-limfocitais. Aktyvinti B-limfocitai dažniausiai virsta IgM antikūnus gaminančiais plazmocitais (pirminis atsakas) ir gebančiomis virsti į B atminties ląsteles (Kollman, Roehm 2005). Atminties ląstelės gali dešimtmečius cirkuliuoti kraujyje, tačiau pasikartojus kontaktui su antigenu, jos greičiau ir gausiau pradeda gaminti savituosius antikūnus (antrinis atsakas) (Adomaitienė et al. 2001).

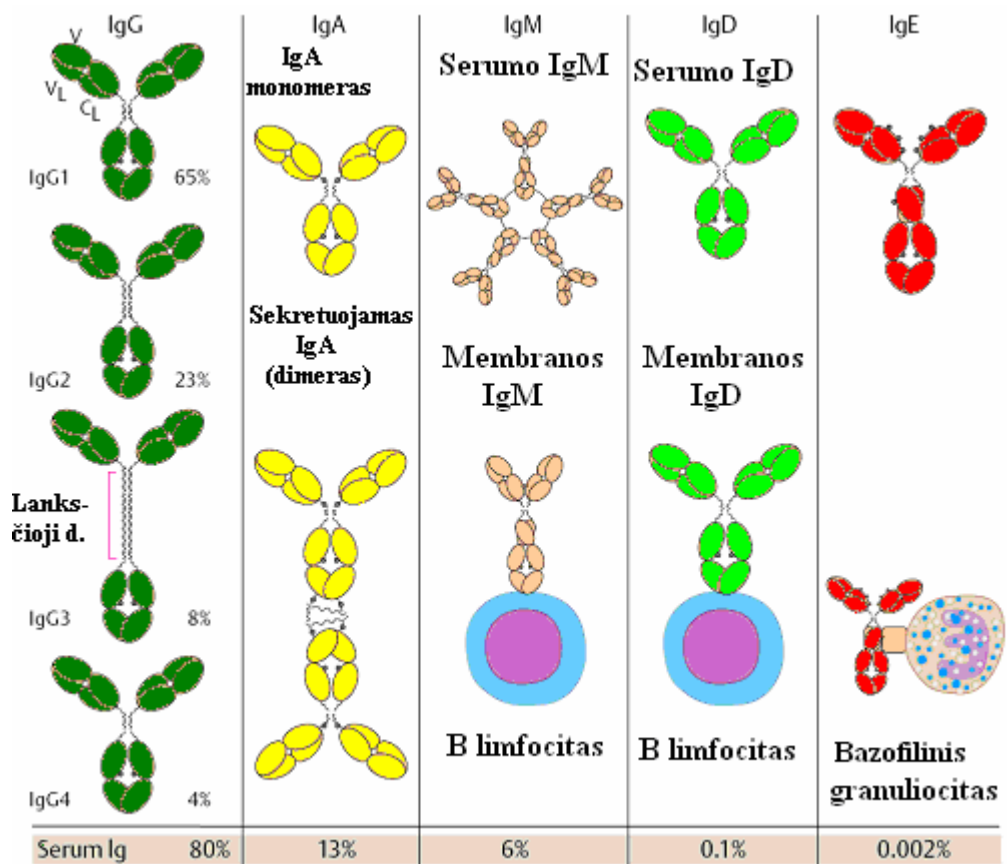
Imunoglobulino molekulės – tai glikoproteinai, sudaryti iš vieno ar daugiau subvienetų, iš kurių kiekvienas turi keturias polipeptidines grandines: dvi sunkiąsias (H) ir dvi lengvasias (L) (žr. 1.13 pav.) (Čiapaite, 2007; Conroy et al. 2009; Abbas, Lichtman 2004; Pinchuk 2002; Burmester, Pezutto 2003). Kiekviena L grandinė (molekulinė masė – 25 kDa) turi vieną kintantį V_L ir vieną pastovųjį C_L domeną. H grandinės (molekulinė masė – 50 kDa) sudarytos iš variabilaus V_H ir trijų pastoviųjų domenų C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} . Sunkiosios ir lengvosios grandinės yra sujungtos tarpusavyje nekovalentiniais ryšiais ir kovalentiniais disulfidiniais tilteliais (Koolman, Roehm 2005; Čiapaite 2007; Conroy et al. 2009; Kubby, 2002; Pinchuk 2002), sudarydamos L_2H_2 simetrišką tetramerą (apie 150 kDa) (Koolman, Roehm 2005). Jo struktūra yra panaši į Y

The diagram illustrates the structure of an antibody, showing the Fab (antigen-binding) and Fc (crystallizable) regions. The Fab regions are shown in blue and red, with labels for 'Antigeną surišanti sritis' (antigen-binding site) and 'Fab'. The Fc region is shown in blue and red, with labels for 'Fc' and 'Karbohidratas' (carbohydrate). The Fc region is also labeled 'Antigeną surišančioji sritis' (antigen-binding site). The Fc region is further divided into 'Lengvosios grandinės' (light chains) and 'Sunkiosios grandinės' (heavy chains). The Fc region is also labeled 'Fab (Fab')₂'.

Antikūnai gali specifiskai sąveikauti su daugeliu skirtingų antigenų, tame tarpe ir su makromolekulėmis bei mažais cheminiais junginiais (Lerner 2003). Antigeno dalis, kurią atpažįsta antikūnai, vadinama epitopu arba antigeniniu determinantu (Eales 2003). Skirtingi determinantai gali būti atpažįstami pagal seką (linijiniai) arba formą (konformaciniai). Dalis iš šitų epitopų yra nematomi bei pažeidžiami fizikocheminių pokyčių pasekoje (Abbas, Lichtman 2004). Sąveikos stiprumas tarp antigeną surišančios srities ir antigeno epitopo vadinamas afiniškumu. Afiniškumas dažnai yra išreiškiamas kaip disociacijos konstanta (K_d) (Pinchuk 2002). Dauguma antikūnų susidariusių pirminio imuninio atsako metu turi K_d , varijuojančią nuo 10^{-6} iki 10^{-9} M, bet po pakartotinės imunizacijos tuo pačiu antigenu, t.y. antrinio imuninio atsako metu, K_d būna nuo 10^{-8} iki 10^{-11} M (Abbas ir Lichtman 2004; Kubby 2002; Pinchuk 2002). Afiniškumo sustiprėjimas yra vadinamas afiniškumo brendimu. Kiekvienas A_k , priklausomai nuo klasės, gali prijungti nuo 2 iki 10 epitopų, jei identiški epitopai yra arti vienas kito, pvz. ląstelės paviršiuje, etc. (Abbas, Lichtman 2004).

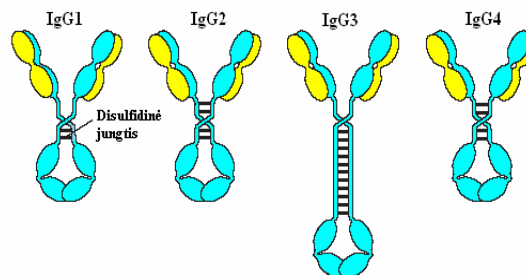
1.11.2. Imunoglobulinų klasės ir poklasiai

Imunoglobulinai skirstomi į penkias klases pagal sunkiosios grandinės tipą – tai IgG, IgM, IgA, IgD ir IgE. IgG molekulės turi dvi sunkiąsias γ grandines, atitinkamai IgM – μ , IgA – α , IgD – δ ir IgE – ϵ sunkiąsias grandines (žr. 1.14 pav.) (Burmester, Pezutto 2003; Conroy et al. 2009; Lerner 2003; Kollman, Roehm 2005). Sunkiųjų grandinių skirtumai leidžia imunoglobulinams dalyvauti skirtingose imuninėse reakcijose (Burmester, Pezutto 2003). Lengvųjų grandinių yra tik du tipai – κ (kappa) ir λ (lambda). Skirtingų klasių antikūnai skiriasi valentingumu. Žmogaus IgM antikūnai sudaro pentamerus (5 Y-formos subvienetai), t.y. turi dešimt lengvųjų, dešimt sunkiųjų grandinių ir dešimt antigeną surišančių sričių. IgG – monomeras, sudarantis serume 80% visų imunoglobulinų, yra vienintelė imunoglobulinų klasė, pereinanti placentą ir apsauganti naujagimius pirmais gyvenimo mėnesiais (Lerner 2003; Eales 2003). IgG, atsižvelgiant į jo unikalias savybes – santykinį gausumą imuniniame serume ir puikų specifiskumą antigenams, yra pagrindinis antikūnas naudojamas imunologiniuose tyrimuose ir klinikinėje diagnostikoje. IgM (pentamero forma žinduoliuose) klasės imunoglobulinai sudaro apie 10% žmogaus serumo imunoglobulinų, pirmieji praddami sintetinti imuninės sistemos filogenezės ir atsako į antigeną metu (Koolman, Roehm 2005; Eales 2003); daugiausia IgM monomero yra B limfocitų membranos paviršiuje. Serume IgM monomerai yra sujungti tarpusavyje disulfidiniais ryšiais ir J (ang. joining) grandine. Kiekvienas iš penkių monomerų sudarytas iš dviejų lengvųjų grandinių (κ arba λ) ir dviejų sunkiųjų. IgA (apie 15% serume) būna dviejų formų – monomerinės ir chimerinės (Eales 2003). Sekretuojamas IgA (dimeras, gausiai aptinkamas gleivinėse) apsaugo organizmą nuo vietinių infekcijų. IgA atlieka svarbią vietinio imuniteto funkciją, apsaugo odą ir gleivinę nuo patogeninės mikrofloros (Lerner 2003; Koolman, Roehm 2005). IgD ir IgE aptinkami serume mažais kiekiais, lyginant su kitais imunoglobulinais. IgD daugiausia yra subrendusių B limfocitų membranoje, biologinė funkcija nežinoma. IgE yra svarbūs alerginių reakcijų metu (Lerner 2003; Kubly 2002; Abbas, Lichtman 2004; Piercenet [interaktyvus]).



1.14 pav. Imunoglobulinų klasės (Burmester, Pezutto 2003)

IgG imunoglobulinų klasė dar yra skirstoma į 4 poklasius: IgG1 (H grandinė γ_1), IgG2 (γ_2), IgG3 (γ_3) ir IgG4 (γ_4). Molekulės skiriasi disulfidinių jungčių skaičiumi ir išsidėstymu, taip pat aminorūgščių skaičiumi lanksčioje dalyje.



1.15 pav. IgG klasės poklasiai: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ (Kubby, 2002)

1.11.3. Polikloniniai ir monokloniniai antikūnai

Antikūnai (nesvarbu kokios klasės ar poklasio) gali būti polikloniniai ir monokloniniai. Polikloniniai antikūnai susidaro imunizuojant laboratorinius gyvūnus (peles, triušius, avinus ir k.t.). Imuninio atsako metu tam tikras skaičius plazminių ląstelių gamina antikūnus prieš tą patį antigeną, prieš jo epitopus. Šio proceso eigoje gauname imuninį serumą, kurį sudaro antigenui specifiški skirtingų klasių ir poklasių antikūnai. Kadangi toks serumas turi skirtingų ląstelių klonų antikūnų mišinį, tai išgryninti antikūnai yra vadinami polikloniniais. Polikloniniai

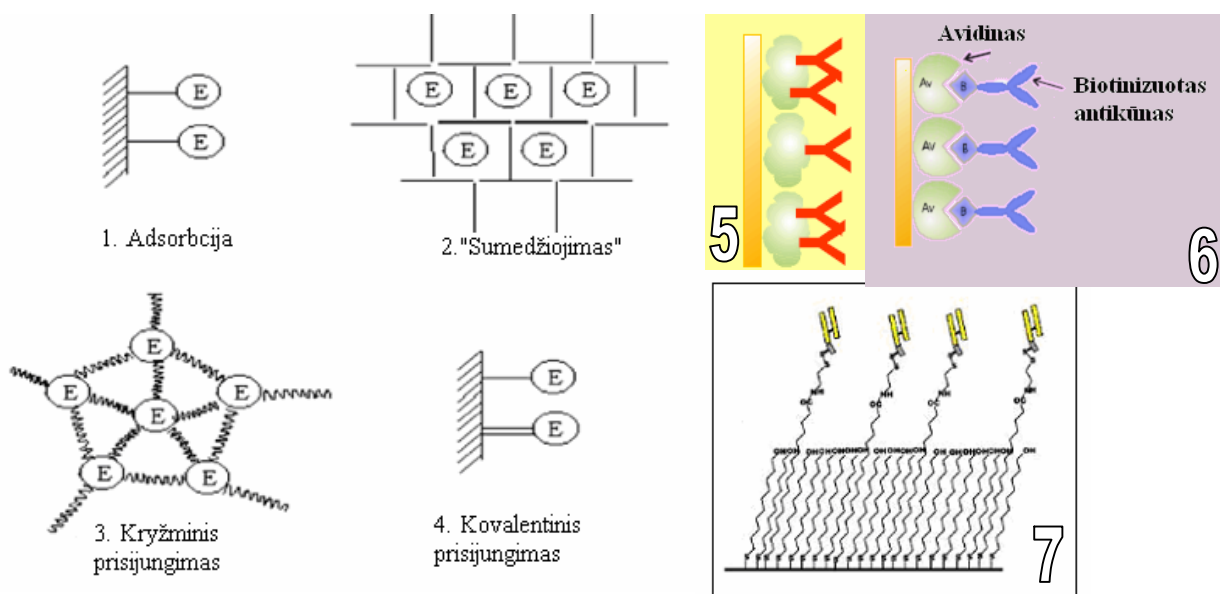
antikūnai yra naudojami imuniniuose tyrimuose (Huang et al. 2008) bei kuriant imunoanalizines sistemas, taip pat yra svarbūs imuninių kompleksų išryškinimui (antriniai žymėti antikūnai).

Monokloniniai antikūnai – gaunami panaudojant ląstelių kultūrų technologijas (hibridomas), iš vieno ląstelių klonu. Šiuo atveju visi sekretuojami antikūnai yra identiški. Monokloniniai antikūnai yra plačiai taikomi klinikinėje medicinoje, diagnostikoje bei kuriant analizines sistemas (Abbas, Lichtman 2004).

1.11.4. Antikūnų imobilizavimo būdai aukso paviršiuje

Skirtingi būdai yra naudojami biomolekulėms imobilizuoti ant signalo keitiklio paviršiaus. Plačiausiai paplitę metodai naudojami kuriant imunosensorius yra adsorbcija, įterpimas, sujungimas bifunkciniais reagentais, kovalentinis prijungimas, imobilizavimas panaudojant bakterinius ar plazmos baltymus (žr. 1.16 pav.) (Sharma et al. 2003):

1. Adsorbcija (Hu et al. 2008): Tokie substratai, kaip celiuliozė, silikatiniai geliai, stiklas, kolagenas yra gerai žinomi kaip biomolekulių adsorbentai. Procesas vyksta vandenilinių ryšių, Van der Waals'o ir kt. ryšių pagalba (Chu et al. 2006; O'Sullivan, Guilbault 1999; Vikholm 2005).
2. Įterpimas (Hu et al. 2008): Jeigu polimerinis gelis ar polimeras yra ruošiamas tirpale, kuriame yra biomolekulės, tai jos yra įterpiamos į šio gelio struktūrą (Kuprianou et al. 2009), pvz. poliakrilamidas, krakmolai, nilonas (Sharma et al. 2003).
3. Sujungimas bifunkciniu reagentu: Biomolekulės yra sujungiamos tarpusavyje, panaudojant tokius bi- ar multi-funkcinius reagentus, kaip glutaraldehidą, di-izocionato heksametileną, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeną ir kt. (Bonroy et al. 2006; Lee et al. 2005; Sharma 2003)
4. Kovalentinis prijungimas (Hu et al. 2008): Prijungiama prie paviršiaus kovalentiniais ryšiais per tokias funkcines grupes – amino, karboksilines, imidazolo, hidroksilo ir kt. (Tsai, Pai 2009; Kuprianou et al. 2009; Chu et al. 2006; Vikholm 2005).
5. Panaudojant bakterinius baltymus pasižyminčius dideliu afiniškumu įvairių imunoglobulinų klasių ir poklasių Fc sričiai (Baltymai A ir G) (Tsai, Pai 2009; Chu et al. 2006; Vikholm 2005; Lee et al. 2003).
6. Panaudojant specifines sąveikas tarp baltymų, pvz. biotinas – avidinas (Cho et al. 2005; Vikholm 2005; Hu et al. 2008).
7. Panaudojant sąvaimę besiformuojančius monosluoksnius (O'Sullivan, Guilbault 1999; Kuprianou et al. 2009; Lee et al. 2005; Vikholm 2005; Lee et al. 2003).



1.16 pav. Imobilizavimo būdų schemas: 1 - adsorbcija, 2 - „Sumedžiojimas“, 3 - Kryžminis prisijungimas, 4 - Kovalentinis prisijungimas, 5 - imobilizavimas, panaudojant bakterinius baltymus, 6 - prisijungimas, panaudojant specifines sąveikas; 7 - panaudojant savaime besiformuojančius monosluoksnius (Sharma et al. 2003; Bonroy et al. 2006)

1.11.5. Antikūnų skaldymas

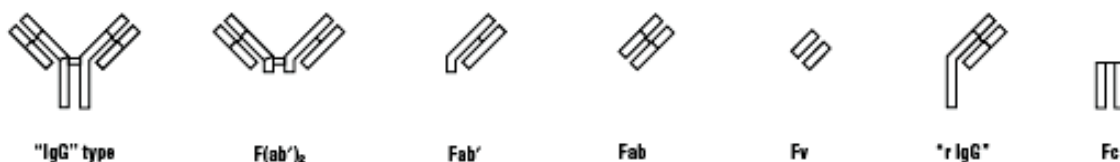
Dažnai yra naudinga tirti imunoglobulino vieno fragmento aktyvumą be kitos dalies įtakos. Pasirinktinai galima skaldyti imunoglobulino molekulę į fragmentus, kurie turėtų konkrečias savybes. Labiausiai domina du antikūnų fragmentų tipai: antigeną surišantys fragmentai – $F(ab')_2$ (angl. fragment of antigen binding) ir nesurیشantys antigeno – Fc (angl. crystalline fragment) (Conroy et al. 2009; Vikholm 2005; Lee et al. 2005). Antigeną surišančių fragmentų galimi keli tipai, bet kiekvienas iš jų turi išsaugoti antigeną surišančią sritį, t.y. sunkiosios ir lengvosios grandinių variabilius regionus (V_H ir V_L atitinkamai), sujungtus disulfidiniais tilteliais. Fc fragmentai turi tik sunkiosios grandinės pastoviąją sritį (Piercenet [interaktyvus]; Conroy et al. 2009; Ciapaite 2007).

1.11.6. Antikūnų fragmentų tipai

$F(ab')_2$, Fab', Fab, ir Fv yra antigeną surišantys fragmentai. Tokie fragmentai skiriasi dydžiu, valentingumu ir Fc dalimi. Fc fragmentai yra gaunami iš imunoglobulino sunkiosios grandinės pastovaus regiono. Antikūnų fragmentų struktūros yra pavaizduotos 1.17 pav. ir aprašomos detaliau (Biopharmaceuticals; Conroy et al. 2009; Ciapaite 2007)

$F(ab')_2$ (110 kDa IgG fragmentas, 150 kDa IgM fragmentas) fragmentai turi 2 antigeną surišančias sritis, sujungtas disulfidiniais tilteliais šarnyrinėje srityje be Fc regiono.

Fab' (55 kDa IgG, 75 kDa IgM) fragmentai gaunami $F(ab')_2$ redukcijos metu. Fab' fragmentas turi vieną laisvą sulfhidrilinę grupę, kuri gali būti alkilinama arba panaudojama konjugatui su fermentu, toksinu, baltymu sudaryti.



1.17 pav. Antikūno fragmentų tipai (Piercenet [interaktyvus])

Fab (50 kDa) yra monovalentinis fragmentas, sudarytas iš IgG ar IgM V_H, C_H ir V_L, C_L regionų, sujungtų vidiniais disulfidiniais tilteliais.

Fv (25 kDa) yra mažiausias IgG, IgM fragmentas su pilna antigeną surišančia sritimi. Fv fragmentai turi tas pačias surišimo charakteristikas kaip Fab. V_H ir V_L grandinės yra sujungtos nekovalentiškai. Skiedžiant, šios grandinės gali disocijuoti.

“r IgG” (80 kDa) – tai IgG redukuotos formos fragmentas, kurį sudaro pilna sunkioji bei lengvoji grandinės. Tai tikroji ½ IgG molekulės dalis su viena antigeną surišančią sritimi. „r IgG“ fragmentai yra gaunami lanksčiosios srities disulfidinių tiltelių redukcijos metus.

Fc (50 kDa) fragmentai turi C_{H2} ir C_{H3} sritis ir dalį lanksčiosios srities, sujungtų disulfidiniais ir nekovalentiniais ryšiais. Terminas Fc atsirado nuo šio fragmento iškristalizavimo galimybės. Fc fragmentai yra imunoglobulinų sunkiųjų grandinių pastovioji sritis, kuri nesuriša antigeno, bet atlieka efektorines funkcijas (Piercenet [interaktyvus]).

1.11.7. Antikūnų fragmentų imobilizavimo pranašumas

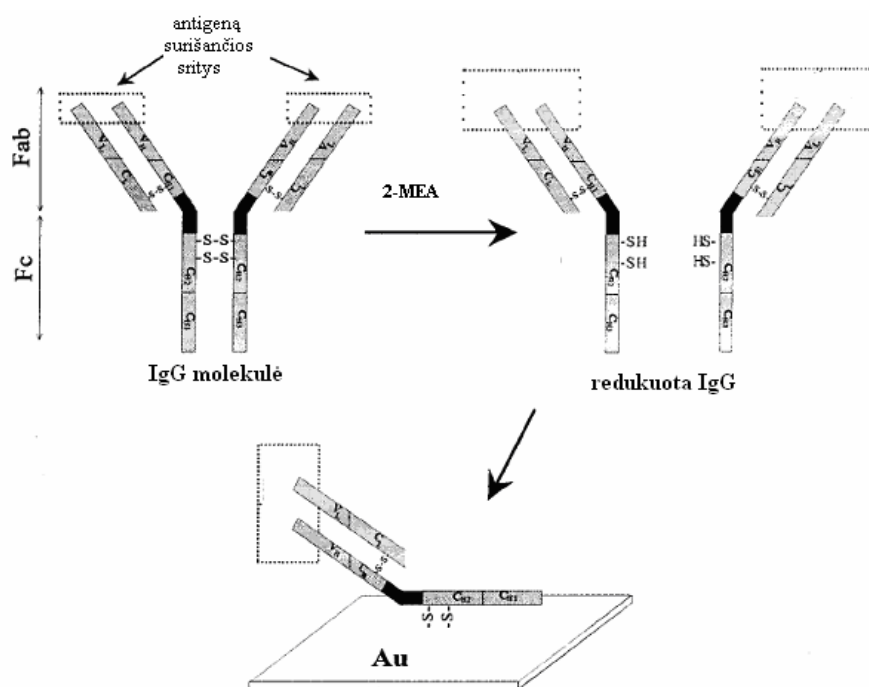
Antikūnų fragmentai kaip reagentai imunocheminiuose methoduose yra naudingesni už neskaldytus imunoglobulinius, nes:

1. Atskirtų nuo Fc regiono antigeną surišančių sričių panaudojimas sumažina nespecifinių sąveikų tikimybę (daug ląstelių turi Fc sritį surišančius receptorių);
2. Didesnį aktyvumą antigeno atpažinime kietų fazių methoduose rodo maži antigeną surišantys fragmentai. Tai sumažėjusių sterinių kliūčių epitopuose pasekmė;
3. Antikūnų fragmentai daug lengviau prasiskverbia į audinius, taip pagerindami dažymo rezultatus imunohistocheminiuose tyrimuose;
4. Antikūnų fragmentai geriausiai tinka antigeno-antikūno sąveikai tirti;
5. Antikūnų fragmentai yra mažiau imunogeniški, negu neskaldyti antikūnai (Piercenet [interaktyvus]).

1.11.8. Kryptingas antikūnų skaldymas aukso paviršiuje

Antikūnų imobilizavimas turi fundamentalią reikšmę kietos fazės imuniniams tyrimams ir afiniškumo chromatografijai (Wang et al. 2005; Cho et al. 2007). Pagrindiniai imobilizavimo būdai, aptarti 1.11.4. skyriuje, pagrįsti bifunkcinių reagentų panaudojimu ir kt., t.y. imobilizuojant per tarpininkus. Deja, tokie būdai sukelia antikūnų atsitiktinę orientaciją (Chu et

al. 2006) ir sukelia asimetrinių molekulių imunoaktyvumo praradimą. Antikūnai gali būti kryptingai imobilizuoti aukso paviršiuje tiesiogiai per -SH grupes, prisijungiant prie baltymo A ar G ir prie savaime besiorganizuojančių monosluoksnių (Tsai, Pai 2009; Lee et al. 2005). Pastaruoju metu intensyviai atliekami kryptingo imobilizavimo būdo tyrimai, kada IgG molekulė yra suskaldoma į du fragmentus ir jie imobilizuojami aukso paviršiuje tiolinių grupių pagalba (-SH) (žr. 1.18 pav.) (Wang et al. 2005; Cho et al. 2007). Suskaldyti antikūnų fragmentai imobilizuojami aukso paviršiuje paprastos adsorbcijos būdu (Karyakin et al. 2000). Aukso paviršiuje imobilizuotų antikūnų fragmentų skaičius (paviršinis tankis) ir antigeno surišimo galimybės (Kurosawa et al. 2004) yra didesnės lyginant su neskaldytais antikūnais modifikuotu paviršiumi (Karyakin et al. 2000). Kryptingas antikūnų imobilizavimas gali padidinti 50% antigenų prisijungimo efektyvumą lyginant su atsitiktinio imobilizavimo atveju (Tsai, Pai 2009). Taip pat kryptingas antikūnų imobilizavimas, apsaugojantis antigeną surišančių sričių vientisumą ir prieinamumą (taisyklinga erdvinė orientacija paviršiuje) sumažina inhibicijos tikimybę, kurią gali kelti fizikinis prisijungimas (Vikholm 2005).



1.18 pav. Kryptingo antikūnų fragmentų imobilizacijos schema (Karyakin et al. 2000)

Antikūnas skaldomas per pusę (2-merkaptioetilaminas, DTT) ir gaunami 2 redukuoti imunoglobulino fragmentai. Disulfidinių tiltelių skaičius tarp dviejų sunkiųjų grandinių priklauso nuo imunoglobulino tipo. Šio skaldymo metu svarbiausia nepažeisti antigeną surišančių sričių. Šis metodas yra palankesnis už jau žinomus, nes imobilizuoti, skaldyti antikūnai pasižymi didelėmis antigeno asociacijos konstantomis ir taip modifikuotas paviršius yra ilgą laiką stabilus (Karyakin et al. 2000).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Prietaisai ir priemonės

Automatinės pipetės (Eppendorf AG, Vokietija), 1000, 200, 10 μ L;
pH-metras-milivoltmetras, pH-673 M (Rusija);
Elektroninės svarstyklės WA 33 (Zakłady Mechaniki Precyzyjnej, Lenkija);
Analitinės svarstyklės SBA 33 (SCALTEC, Vokietija);
Magnetinė maišyklė MM3M (Rusija);
UV/VIS spektrofotometras Lambda 25 (PerkinElmer®, Anglija);
Termostatas TC-80M-2 (Rusija);
Centrifuga 5415D (Eppendorf AG, Vokietija);
Ultragarso vonelė BANDELIN SONOREX (Berlinas, Vokietija);
Elektroforezės aparatas, Consort, EV261 (JAV);
Kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės QCM CHI400A (CH Instruments, Austin, USA);
PPR analizatorius Autolab ESPRIT (ECO-Chemie, Olandija)
PPR jutiklių lustai, servetėles optikai (XanTec bioanalytics GmbH, Vokietija)
Kompiuterinės programos: Lambda 25, Chi400A, SPR Autolab Acquisition, Kinetic evaluation, Excel, SigmaPlot.

2.1.2. Medžiagos ir reagentai

Serologinis leukozės viruso nustatymo rinkinys (Kursko Biofabrikas „Biok“, Rusija);
GLV infekuotų galvijų kontrolinis serumas (Kursko Biofabrikas „Biok“, Rusija);
DTT (ditiotreitolis) (Sigma, JAV);
Kalio chloridas, KCl, natrio chloridas, NaCl (Lachema, Čekija);
Kalio hidroksidas KOH (Reanal, Vengrija);
Druskos rūgštis, HCl, 37% (Lachema, Čekija);
Amonio sulfatas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fluka, Olandija);
Albuminas (toliau – BSA) (Carl Roth GmbH&Co. KG, Vokietija);
PBS buferio tabletės (Medicago, Švedija);
N,N'-metilen-bi-akrilamidas; amonio persulfatas (Carl Roth GmbH&Co. KG, Vokietija);
Vandenilio peroksidas, H_2O_2 , 30% (AppliChem, Vokietija);
Sieros rūgštis, H_2SO_4 (Merck, Vokietija);
Baltymų molekulinės masės markeris (Fermentas, Lietuva),
TRIS – Gly buferis, acto rūgštis (Carl Roth GmbH&Co. KG, Vokietija),
Natrio dodecil sulfatas (toliau – SDS) (Merck, Vokietija);
Imersinė alyva, $n = 1.518$ (Merck, Vokietija).

2.2. Metodai

2.2.1. Imunoglobulinų nusodinimas

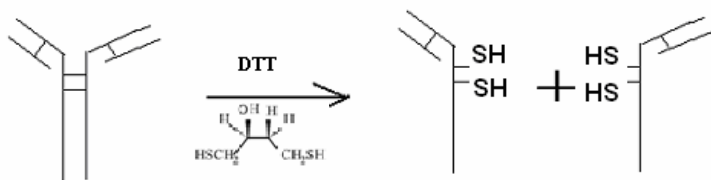
Imunoglobulinų nusodinimas pagrįstas jų tirpumu vandeniniuose tirpaluose. Tirpumą lemia hidrofilinių grupių buvimas ir jų santykis struktūroje. Imunoglobulinuose gausu hidrofilinių aminorūgščių, jie blogai tirpsta mažos joninės jėgos vandeniniuose tirpaluose. Didinant tirpalo joninę jėgą, daugelio biopolimerų tirpumas didėja, tačiau iki tam tikros koncentracijos, nuo kurios pradeda agreguotis ir iškrenta nuosėdomis. Įvyksta vadinamasis baltymų nusodinimas.

Imunoglobulinų nusodinimas buvo atliktas pagal G. Mikalauskienės metodiką (Mikalauskienė, Pieškus 1999). Į cheminę stiklinaitę buvo įpilta 2 mL serumo ir palengva supilami 2 mL sotaus amonio sulfato tirpalo (nuolat maišant su magnetine maišykle). Stiklinėlė paliekama stovėti 2 val. kambario temperatūroje. Vėliau esantis virš nuosėdų tirpalas buvo nupilamas, o susidariusios nuosėdos ištirpinamos 1 mL-e dist. H₂O ir supilamos į ependorfinius mėgintuvėlius. Centrifuguojama 20 min. 4000 apsis./min greičiu Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos ištirpinamos 400 µL distiliuoto vandens ir tūris padidinamas iki 1 mL. Nusodinimas pakartojamas, tik šįkart įpilamas 1 mL sotaus amonio sulfato tirpalo.

Po nusodinimo amonio sulfatu ir ištirpinus pasirinktame buferyje iš tirpalų turi būti pašalinta druska. Vienas iš būdų tai padaryti – dializuoti tirpalą prieš buferį, kurio druskų koncentracija maža. Gautos nuosėdos ištirpinamos 1 mL dist. H₂O ir supilamos į dializės maišelį taip, kad trečdalis maišelio tūrio liktų nepripildytas dializuojamo tirpalo. Dializė atliekama lėtai maišant prieš fiziologinį tirpalą 24 val. 4°C temperatūroje (Mikalauskienė, Pieškus 1999).

2.2.2. Antikūnų skaldymas.

Antikūnų skaldymas disulfidinių tiltelių srityje buvo vykdomas pagal 2.1. paveiksle pavaizduotą bendrą schemą. IgG redukuojamas į du fragmentus, naudojant 6 mg/mL ditionitritolo (DTT) tirpalą 0,1 M fosfatiniame buferyje, pH 7,4. Inkubuojama 60 min. 37°C temperatūroje.



2.1 pav. Antikūno skaldymo schema

2.2.3. Imunodifuzijos reakcija agaro gelyje

Imunodifuzijos reakcija buvo atlikta pagal Ouchterlony (1968) pasiūlytą metodiką. IDR buvo taikoma tiriant skaldytų antikūnų prieš GLV antigeną gp51 aktyvumą. Buvo naudotas serologinis leukozės viruso nustatymo rinkinys (Kursko Biofabrikas, Rusija). Paruošto 1% agaro 3,5 ml užpilama ant objekcinio stikliuko ir paliekama sustingti kambario temperatūroje apie 30

min. Po to gelyje tam tikslui skirta forma įspaudžiamos “gėlytės” formos duobutės, kur aplink centrinę yra išsidėsčiusios kitos šešios duobutės. Duobučių skersmuo 6 mm, atstumas tarp jų 6 mm. Į centrinę duobutę pilama 30 µl antigeno, o į aplinkines – po 30 µl tiriamų antikūnų tirpalo ar kontrolinio serumo. Taip paruošti agarų geliu padengti objektiniai stikliukai yra dedami į eksikatorius ir laikomi kambario temperatūroje. Rezultatai įvertinami vizualiai po 24 val.

2.2.4. Spektrofotometriniai matavimai

Matavimai buvo atliekami dviejų spindulių UV/VIS spektrofotometru Lambda 25. Tyrimams buvo naudojamos plastikinės UV kiuvetės. Optinio kelio ilgis 1 cm. Palyginamuoju tirpalu buvo naudojamas buferis. Absorbacija buvo matuojama 200 - 700 bangos ilgių srityje. Matavimo rezultatų apdorojimui naudota „Lambda 25“ programa.

2.2.5. Baltymo koncentracijos nustatymas spektrofotometrinio būdu.

Baltymo koncentracijos nustatymas buvo atliktas pagal D. Labeikytės metodiką (Bagdonienė et al. 2006). Aromatinių aminorūgščių triptofano ir tirozino liekanos baltymuose sugeria šviesą esant 280 nm bangos ilgiui. Metodas jautrus. Patogu, kad pamatavus optinį tankį, baltymų tirpalus galima toliau naudoti. Baltymų tirpaluose būna ir kitų medžiagų (pvz., nukleorūgščių), kurios sugeria šviesą esant 260 nm bangos ilgiui ir trukdo tiksliai nustatyti baltymų kiekį tirpale. Matuojant baltymų tirpalų optinį tankį esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiui ir naudojant formulę (2.1), galima nustatyti baltymų koncentraciją tiriamajame tirpale:

$$\text{Baltymas (mg/mL)} = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260} \quad (2.1)$$

kur: A – sugerties dydis, esant 260 ir 280 nm bango ilgiui.

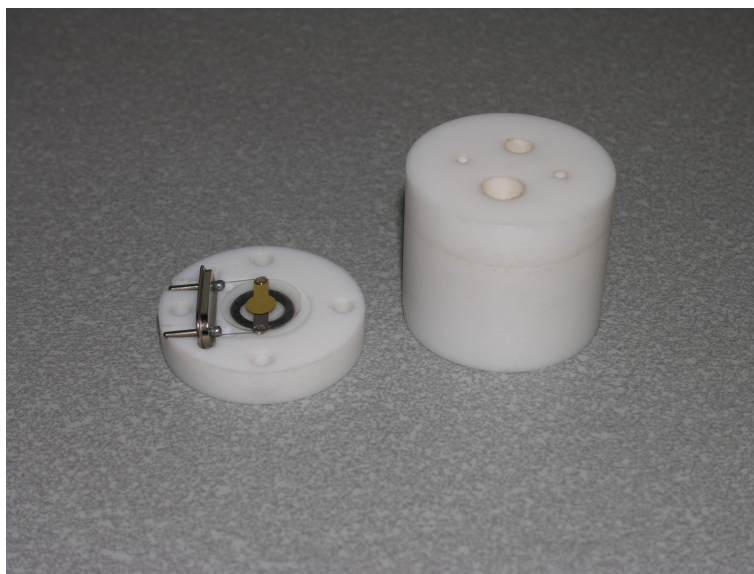
2.2.6. Skaldytų antikūnų elektroforezė

Antikūnų fragmentai buvo charakterizuojami atliekant vienkryptę elektroforezę (Lemli et al. 1970) frakcionuojančiame natrio dodecil sulfato poliakrilamidiniame gelyje (12%) denatūruojančiomis sąlygomis (toliau – SDS-PAGE elektroforezė), kurios metu įkrautos molekulės dėl skirtingo dydžio, formos ir krūvio pasižymėjo skirtingu judrumu elektriniame lauke. SDS-PAGE elektroforezė buvo atliekama vertikaliame elektroforezės aparate. Prieš elektroforezę antikūnai buvo suskaldyti su DTT koncentracija, o vėliau pakaitinti esant joninio detergento (SDS) pertekliui. Šiomis sąlygomis tiolinis reagentas redukuoja -S-S- tiltelius iki -SH grupių. SDS suteikia baltymams neigiamą krūvį. Kadangi baltymai masės vienetui suriša vienodą kiekį SDS, todėl baltymų-SDS kompleksai gelyje išsiskirsto pagal jų molekulinę masę. Baltymų kontroliniai markeriai buvo naudojami, kaip molekulinės masės „liniuotė“. Baltymų fragmentai buvo dažomi Coomassie brilliant blue G250 dažais.

2.2.7. Kvarco kristalo mikrogravimetrinės svarstyklės

Kvarco kristalo (toliau - KK) paruošimas. Kvarco kristalas 10 min. laikomas acetone, o po to valomas elektrochemiškai 50 mM H₂SO₄ tirpale atliekant 40 potencialo skleidimo ciklą 0,3 V/s greičiu, skleidžiant nuo 1,7 iki -0,3 V.

KKM aparatūros paruošimas darbui. Darbinė celė (žr. 2.2 pav.) su paruoštu kvarco kristalu prijungiama prie KKM svarstyklių bei registruojamas bazinės linijos nusistovėjimas.



2.2 pav. Kvarco kristalo celė, naudota eksperimentui

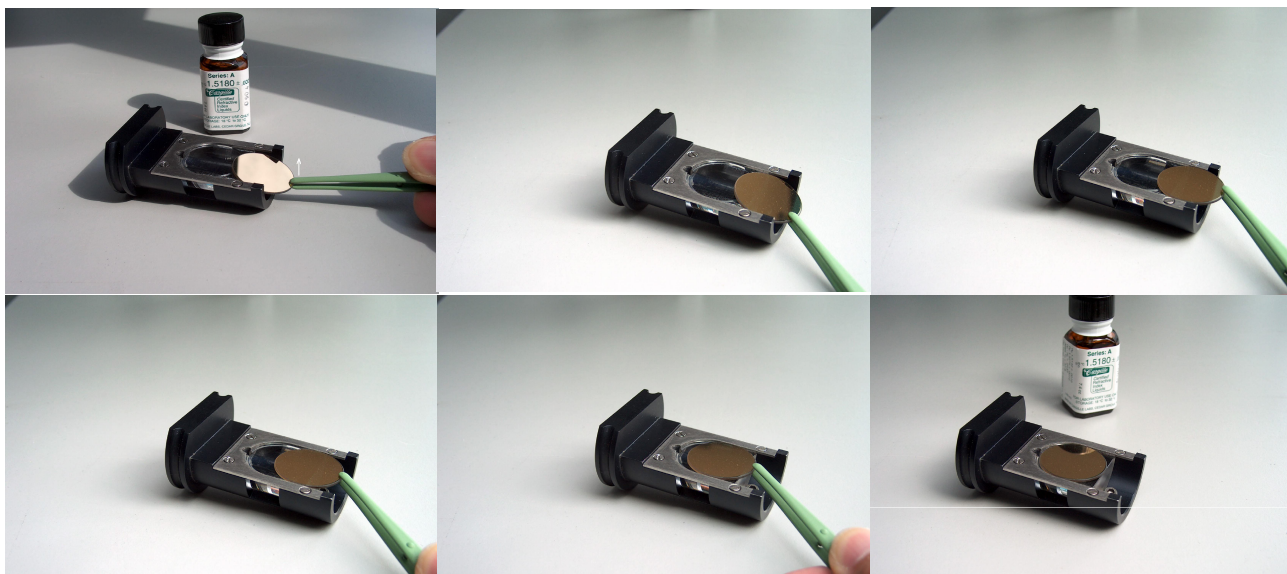
Į kvarco kristalo celę įpilama 300 µL antikūnų tirpalo ir 4000 sekundžių yra registruojamas kvarco kristalo padengto aukso sluoksniu rezonansinio dažnio pokytis. Tada celė išplaunama su PBS, pH 7,4, įpilama 1% albumino tirpalo laisvų vietų blokavimui ir laikoma 1,5 val. Praplautą celę užpildžius 270 µL PBS buferio pH 7,4, KKM aparatūra registruojamas bazinės linijos nusistovėjimas. Į buferį įnešus 30 µL antigeno (3,8 mg/mL), registruojamas dažnio pokytis.

2.2.8. Paviršiaus plazmono rezonanso jutikliai

Specifiniai anti-*gp51* antikūnai arba jų fragmentai yra imobilizuojami PPR jutiklio lusto aukso paviršiuje. Dėl labai specifinės sąveikos tarp GLV antigeno ir specifinių *gp51* antikūnų, jokios kitos molekulės, esančios tirpale šiuo jutikliu negali būti nustatytos. Tyrimo metu yra registruojama PPR imuninio jutiklio sensograma – PPR kampo kitimo priklausomybė nuo laiko. Iš atsako kitimo greičio gaunami sąveikos kinetiniai parametrai – asociacijos ir discociacijos greičio konstantos, k_a (M⁻¹s⁻¹) ir k_d (s⁻¹), taip pat yra apskaičiuojama afiniškumo konstantos, K_a , reikšmė.

PPR jutiklio lusto paruošimas. Naujas jutiklio lustas valomas NaOH ir HCl. Tam jutiklio lustas 20 min. pamerkiamas į 1 mol/L NaOH tirpalą, nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir pamerkiamas 5 min. į 1 mol/L HCl tirpalą. Po 5 min. ištraukiamas ir vėl plaunamas distiliuotu vandeniu. Stiklinis aukso sluoksniu modifikuotas paviršius kruopščiai nuvalomas specialia

servetėle optikai. Ant laikiklyje esančios pusiau cilindrinės prizmės užlašinamas lašas imersinės alyvos ir atsargiai, auksiniu paviršiumi į viršų, uždedamas jutiklio lustas (žr. 2.3 pav.).



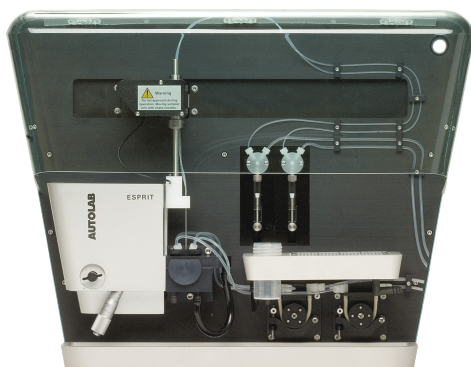
2.3 pav. PPR jutiklio lusto uždėjimas ant pusiau cilindrinės prizmės

Laikiklis įstatomas į PPR analizatorių, uždedama ir pritvirtinama pratekamoji gardelė. Tada atliekamas paviršiaus stabilizavimas (sudrėkinimas). Tam buvo naudojamas buferinis tirpalas, kuriame ruošiami ligando tirpalai ir 0.5% natrio dodecil sulfato (SDS) bei 50 mmol/L NaOH arba 100 mmol/L HCl tirpalas. Stabilizavimas vykdomas 2 min. intervalais apie 30 min.

Skaldytų antikūnų prieš galvijų leukemijos viruso antigenus (toliau – anti-gp51 antikūnai) imobilizavimas. Imobilizavimas atliekamas abiejuose PPR gardelės kanaluose. Naudotas 1 mg/mL anti-GLV tirpalas 10 mmol/L fosfatiniame (PBS) tirpale, pH 7.4. Skaldyti anti-GLV antikūnai prie jutiklio prisijungia per merkaptido - funkcines grupes. Imobilizavimas vykdomas 15 min. Neprisijungę prie aukso paviršiaus skaldyti anti-GLV antikūnai yra pašalinami pratekamą gardelę praplovus 10 mmol/L PBS tirpalu, pH 7.4.

Paviršiaus su imobilizuotais anti-gp51 antikūnais stabilizavimas. Paviršius su imobilizuotais anti-GLV antikūnais yra stabilizuojamas tikslingai, t.y. stabiliai bazinei linijai gauti. Šiam tikslui naudojamas 10 mmol/L PBS buferinis tirpalas, pH 7.4 ir 0.5% SDS bei 50 mmol/L NaOH arba 100 mmol/L HCl tirpalai, kurie iš eilės paimami automatiškai. Stabilizavimas vykdomas 2 min. intervalais apie 30-45 min.

Skaldytų antikūnų ir GLV antigeno sąveikos tyrimai. PPR tyrimai atliekami PPR analizatoriumi Autolab ESPRIT (žr. 2.4 pav.).



2.4 pav. PPR analizatorius Autolab ESPRIT (ECO-Chemie, Olandija)

Tai dvikanalis PPR analizatorius (žr. 2.4 pav.), kuriame vienas kanalas naudojamas signalo registravimui, o kitas yra palyginamasis kanalas, kurio pagalba išvengiama nespecifinės sąveikos įtakos. Prieš pradėdant tyrimą į ant hemicilindrinės prizmės esantį jutiklio lustą – plonu aukso sluoksniu padengtą stiklinę plokštelę, tam tikru reikiamu kampu, nukreipiamas lazerio spinduliuojamos p-poliarizuotos 670 nm bangos ilgio monochromatinės šviesos bangos ilgio spindulys. Šviesos kritimo kampą galima keisti nuo 62° iki 78° . Hemicilindrinė prizmė eliminuoja spindulio „vaikščiojimą“ ir pasklidimą po jutiklio paviršiuje esantį ploną aukso sluoksnį. Krintančios į fotodiodą šviesos intensyvumas priklauso nuo šviesos kritimo į jutiklį kampo. Esant PPR kampui, PPR jutikliu registruojamas ryškus atspindėtos šviesos intensyvumo sumažėjimas. PPR kampas yra matuojamas be pertraukos visą laiką ir užregistruojama jutiklio atsako priklausomybė nuo laiko vadinamoje sensogramoje.

Eksperimentų rezultatai apdorojami PPR Autolab tiekiamą programine įranga Kinetic evaluation. Matematiniai sąveikos modeliai derinami prie eksperimentinių duomenų 2 etapais: 1) generuojamos diferencialinės greičio lygtys pagal pasirinktą sąveikos modelį, 2) randami greičio lygčių parametrų rinkiniai, su kuriais modelis geriausiai atitinka eksperimento duomenis.

Daugumai sąveikos modelių diferencialinės greičio lygtys gali būti integruojamos, ir gaunama atsako priklausomybė nuo laiko derinama prie eksperimentinių duomenų. Kiti sąveikos modeliai aprašomi diferencialinių greičio lygčių sistemomis, kurias analitiškai integruoti labai sunku ar net neįmanoma, todėl teorinės kreivės generuojamos naudojant skaitmeninį integravimą. Ieškant geriausio modelio derėjimo, algoritmas skenuoja parametrų reikšmių kombinacijas ir išrenka tą, su kuria gaunama mažiausia χ^2 reikšmė (žr. 2.2 lygtį) (Path [interaktyvus]).

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (r_f - r_x)^2}{n - p}, \quad (2.2)$$

kur r_f – priderinta reikšmė duotame taške, r_x – eksperimentinė reikšmė tame taške, n – taškų skaičius, p – derinamų parametrų skaičius. Praktikoje priimtos $\chi^2 < 10$ reikšmės.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

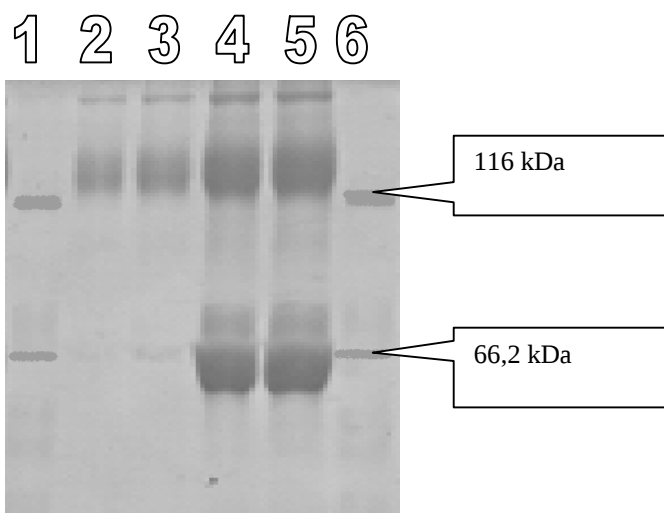
Imuninių jutiklių kūrime labai svarbus etapas yra kryptingas antikūnų imobilizavimas paviršiuje, t.y. antikūnus imobilizuoti taip, kad tam tikrame paviršiuje jie būtų kryptingai orientuoti. Kryptingam imobilizavimui aukso paviršiuje naudojome imunoglobulinų molekules, suskaldytas į du fragmentus, kurie jungiasi prie paviršiaus merkaptido grupių pagalba (-SH) paprastos adsorbcijos proceso metu. Imuniniai jutikliai, kuriuose pavyksta kryptingai imobilizuoti antikūnus, yra jautresni, gali sąveikauti su didesniu analitės kiekiu lyginant su imuniniais jutikliais, kur buvo taikoma atsitiktinė antikūnų orientacija. Taip pat buvo siekta, kad paviršiuje būtų didelis biologiškai aktyvios medžiagos tankis, imuninis jutiklis būtų stabilus ir regeneruojamas.

3.1. Imunoglobulinų išsodinimas bei baltymo koncentracijos nustatymas

Imunoglobulinai buvo išsodinti sočiuoju amonio sulfato tirpalu pagal 2.2.1. skyriuje aprašytą metodiką, dializuojami ir naudojami tolimesniems tyrimams. Naudojant imunoglobulinius tolimesniame eksperimente, yra svarbu žinoti baltymo koncentraciją. Antikūnų koncentracija buvo nustatyta spektrofotometrinio būdu. Baltymo koncentracija specifinių antikūnų prieš galvijų leukozės viruso (GLV) antigeną turinčiame serume yra 26,9 mg/mL, nusodintos ir dializuotos imunoglobulinų frakcijos koncentracija yra 17,3 mg/mL.

3.2. Antikūnų išgryninimo patikrinimas elektroforeziškai

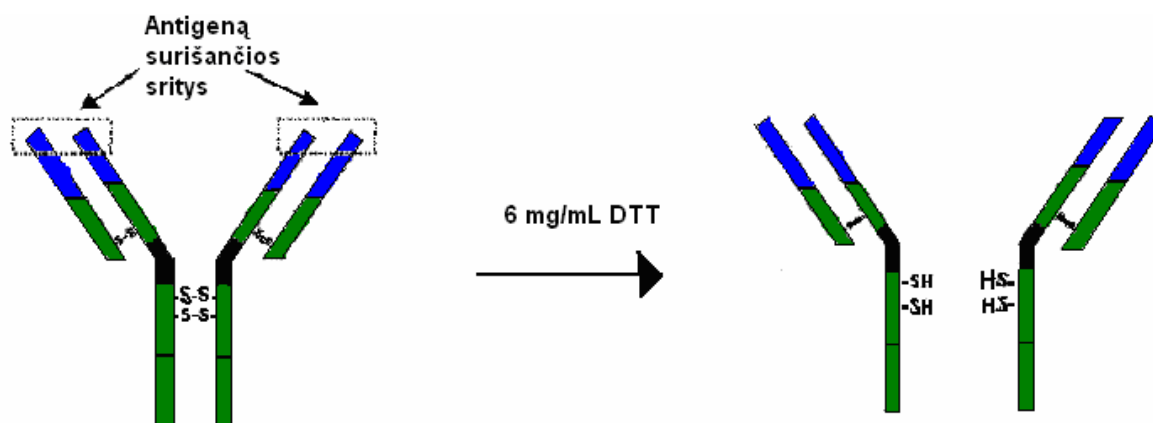
Elektroforezė buvo atliekama vertikaliai natrio dodecilo sulfato poliakrilamidiniame gelyje (12%) denatūruojančiomis sąlygomis. Elektroforegramoje (žr. 3.1 pav.) pateikti išgryninto (2, 3 takeliai) ir nevalyto (4, 5 takeliai) specifinių anti-*gp51* antikūnų turinčio serumo vaizdai rodo, kad naudojant imunoglobulinų nusodinimo amonio sulfatu metodą sėkmingai pavyko pašalinti dalį nereikalingų ir tolimesnius tyrimo rezultatus galinčių įtakoti baltymų.



3.1 pav. Serumo, turinčio specifinių anti-*gp51* antikūnų, elektroforegrama: 2,3 – antikūnai po gryninimo; 4, 5 – serumas; 1,6 – markeris

3.3. Antikūnų skaldymas

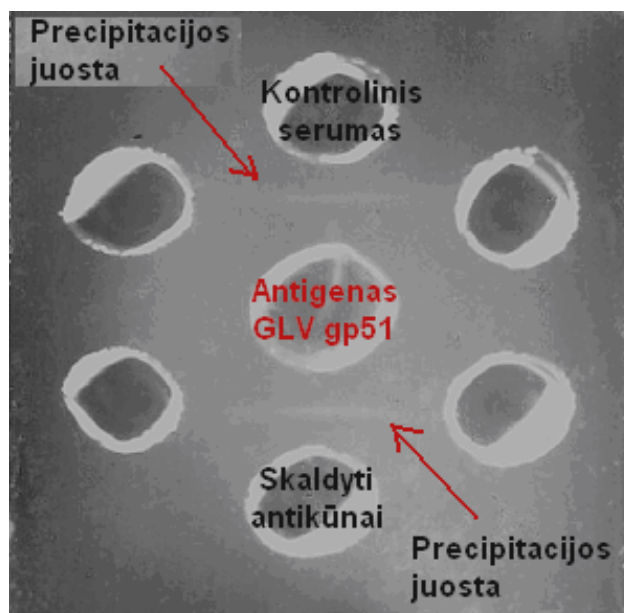
Disulfidinius tiltelius redukuojančiu agentu buvo naudojamas ditionitritolis 6 mg/mL (DTT). Tokią DTT koncentracijos pasirinkimą lėmė keli veiksniai: literatūriniai duomenys ir tinkamiausias skaldytų antikūnų merkaptų grupių skaičius (Baniukevič et al. 2009). Esant šiai DTT koncentracijai suskyla du disulfidiniai tilteliai, kaip parodyta 3.2 pav. Po redukuojančio agento pridėjimo į imunoglobulinų mėginį, jis buvo inkubuojamas 1 val. 37°C temperatūroje.



3.2 pav. Imunoglobulino molekulių skaldymo schema

3.4. Imunodifuzijos reakcija (toliau - IDR)

IDR buvo atlikta pagal 2.2.3. skyriuje aprašytą metodiką. IDR buvo taikoma tiriant skaldytų antikūnų prieš GLV antigeną *gp51* aktyvumą. Gautas rezultatas užfiksuotas, fotografuojant gelį (žr. 3.3 pav.).

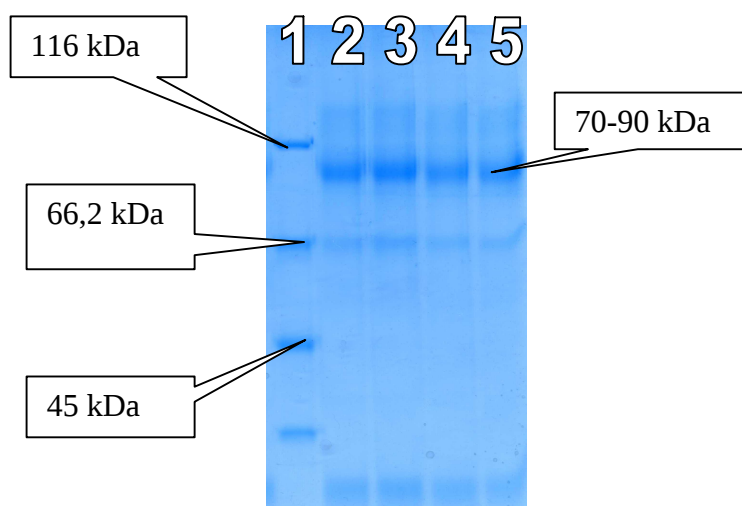


3.3 pav. Imunodifuzijos reakcija agarų gelyje, naudojant antikūnų fragmentus, gautus juos skaldant 6 mg/ml DDT tirpalu

3.3 pav. IDR agaro gelyje stebimos 2 precipitacijos juostos tarp antigeno GLV *gp51* ir antikūnų (kontrolinio serumo) (3.3 pav. viršutinė juosta) bei skaldytų antikūno fragmentų (naudojant 6 mg/ml DTT koncentraciją) (3.3 pav. apatinė juosta). Tai reiškia, kad skaldant antikūnus lieka nepažeistos antigeną surišančios sritys, t.y. jų sugebėjimas atpažinti ir specifiskai surišti antigeną.

3.5. Antikūnų skaldymo efektyvumo patikrinimas elektroforeziškai

DTT buvo pasirinktas, kaip reduktorius skaldantis tarp antikūnų sunkiųjų grandinių esantį disulfidinių tiltelių. Darbo metu buvo naudojamas 6 mg/mL reduktoriaus tirpalas:

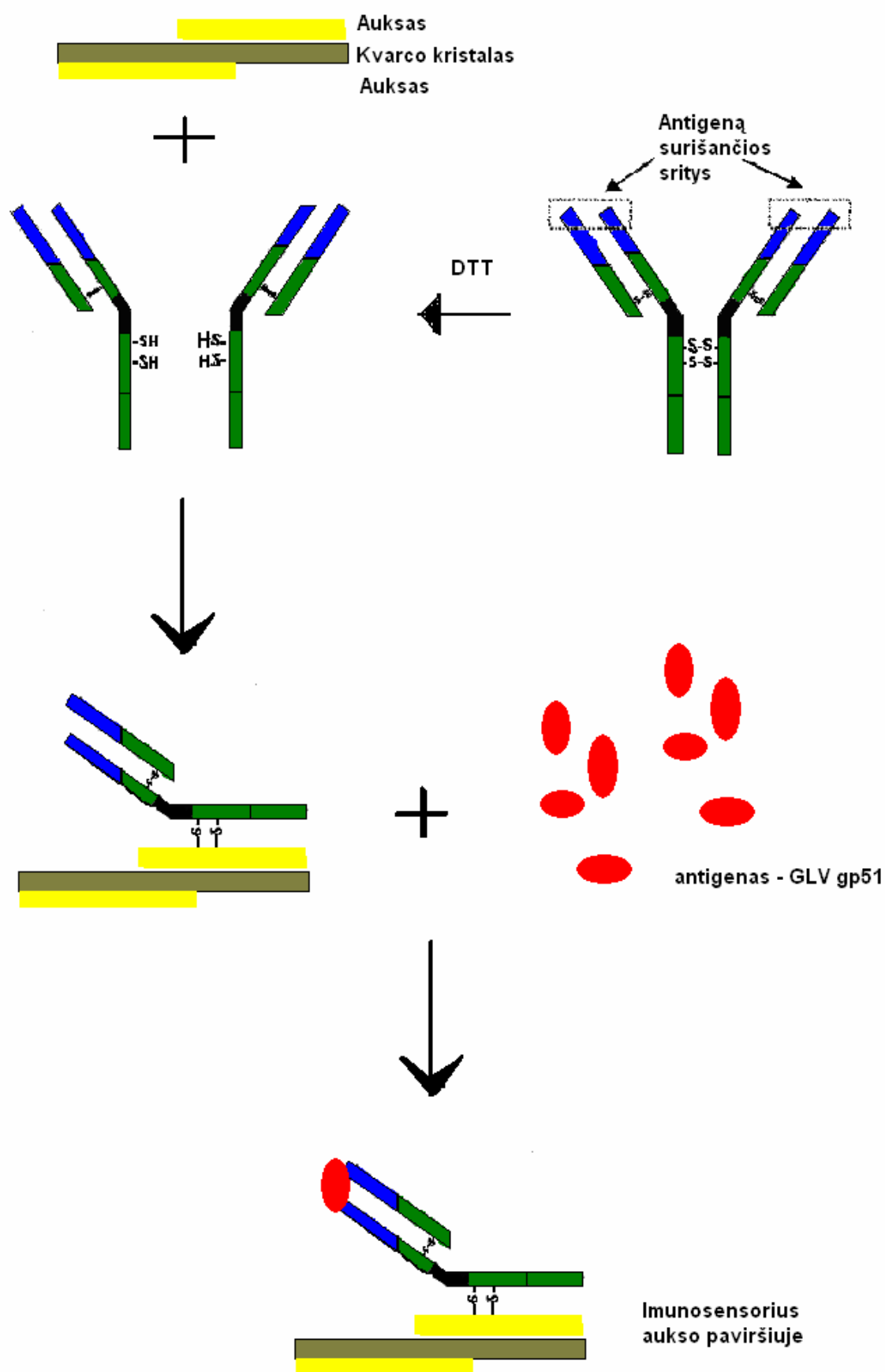


3.4 pav. Skaldytų antikūnų elektroforegrama: 1 – markeris; 2,3,4,5 - skaldyti antikūnai.

Pateiktoje elektroforegramoje (žr. 3.4 pav.), po antikūnų skaldymo mėginyje daugiausia yra 70-90 kDa dydžio fragmentų. Antikūnų (IgG) fragmentų, gautų suardžius disulfidinius tiltelius lanksčioje srityje, masė yra 80 kDa. Iš aukščiau pateikto vaizdo matome, kad skaldydami antikūnus su DTT, gauname redukuotos formos fragmentus, kuriuos sudaro pilna sunkioji bei lengvoji grandinės.

3.6. Imuninių jutiklių kūrimas

Darbo metu buvo kuriami dviejų tipų imuniniai jutikliai. KKM buvo panaudotas pjezoelektriniam jutikliui sukurti, o PPR aparatas – optiniam jutikliui gauti. Norint pagaminti efektyvų jutiklį, antikūnas buvo skaldomas su redukuojančiu agentu pusiau ir imobilizuojamas kryptingai aukso paviršiuje (žr. 3.5 pav.). GLV antigeno sąveikos su imobilizuotais antikūnų fragmentais tyrimas buvo registruojamas atitinkamo prietaiso programine įranga.



3.5 pav. Imuninio jutiklio kūrimo eiga aukso paviršiuje

3.6.1. KKM imuninis jutiklis

Skaldytų antikūnų imobilizavimo sorbcijos būdu aukso paviršiuje tyrimas kvarco kristalo mikrogravimetrinėmis svarstyklėmis

KKM leidžia registruoti masės pokyčius vykstančius elektrodo paviršiuje, nustatyti ir įvertinti vykstančias sąveikas tarp analizuojamų medžiagų, bei tirti kuriamas analizines sistemas. Antikūnų sorbcija ir antikūno-antigeno sąveika buvo tiriama, panaudojant aukso sluoksniu padengtus kvarco kristalus (7.995 MHz) iš CH Instruments, Inc (Austin, USA).

Vienas iš keliamų tyrimo uždavinių buvo kryptingas antikūnų imobilizavimas paviršiuje. Pasiekus šį tikslą bei įvertinus sąveikos su antigenu efektyvumą galėtume sėkmingai šią metodiką taikyti galvijų leukozės viruso baltymų nustatymui. Siekiant įvertinti kryptingo antikūnų imobilizavimo efektyvumą ant darbinio KK elektrodo, buvo registruoti rezonansinio dažnio pokyčiai (Hz) laike, vykstant skaldytų antikūnų fragmentų sorbcijai paviršiuje.

Masės pokytis elektrodo paviršiuje (Δf) yra tiesiogiai proporcingas dažnio pokyčiui ir buvo apskaičiuotas pagal Sauerbrey'o lygtį:

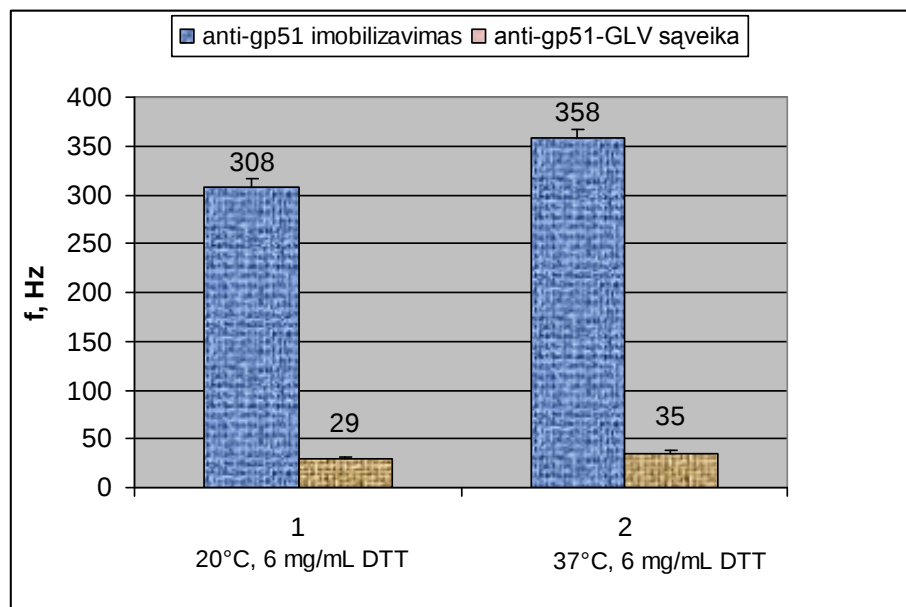
$$\Delta f = -2\Delta m f_0^2 / A\sqrt{\mu\rho} \quad (3.1)$$

kur f_0 yra kristalo rezonansinis dažnis (8 MHz), A – aktyvus kristalo plotas ($0,205 \text{ cm}^2$), ρ – tankis ($2,648 \text{ g/cm}^3$), μ – šlyties modulis ($2,947 \times 10^{11}$).

Antikūnai buvo skaldyti 37°C temperatūroje su 6 mg/mL DTT koncentracijos reduktoriumi. Kontrolė – tai natyvūs antikūnai. Duomenų palyginimui buvo nuspręsta skaldyti antikūnus kambario 20°C temperatūroje, veikiant juos tokia pačia DTT koncentracija. Antikūnai buvo imobilizuojami aukso paviršiuje 4000 sekundžių. Skirtingose temperatūrose skaldytų antikūnų fragmentų sąveika su KK elektrodo paviršiuje esančiu aukso sluoksniu vyksta skirtingu greičiu. Įvertinus rezonansinio dažnio pokytį buvo nustatyti skirtingi masės pokyčiai paviršiuje. Nors aktyvus elektrodo paviršiaus plotas yra $0,205 \text{ cm}^2$, masės pokytis yra apskaičiuojamas 1-am cm^2 . Didžiausias skaldytų antikūnų kiekis išimobilizavo aukso paviršiuje, atlikus skaldymą 37°C temperatūroje ($0,515 \mu\text{g/cm}^2 \pm 0.6$). 20°C temperatūroje skaldytų antikūnų fragmentų mažiau išimobilizavo ($0,435 \mu\text{g/cm}^2 \pm 1.1$) aukso paviršiuje (žr. 3.6 pav.). Naudojant natyvius antikūnus dažnio pokytis nurodytame laiko intervale buvo nežymus.

Kryptingai orientuotų antikūnų panaudojimas imuninio jutiklio skirto galvijų leukozės antigeno nustatymui kūrime

Antikūnai buvo imobilizuojami aukso paviršiuje 4000 sekundžių. Užblokavus laisvą paviršiaus plotą 1% albumino tirpalu, buvo tiriama kryptingai imobilizuotų antikūnų sąveika su antigenu.



3.6 pav. Antikūnų fragmentų imobilizavimo ir jų sąveikos su GLV antigenu efektyvumo įvertinimas pagal dažnio pokyčius Δf , Hz

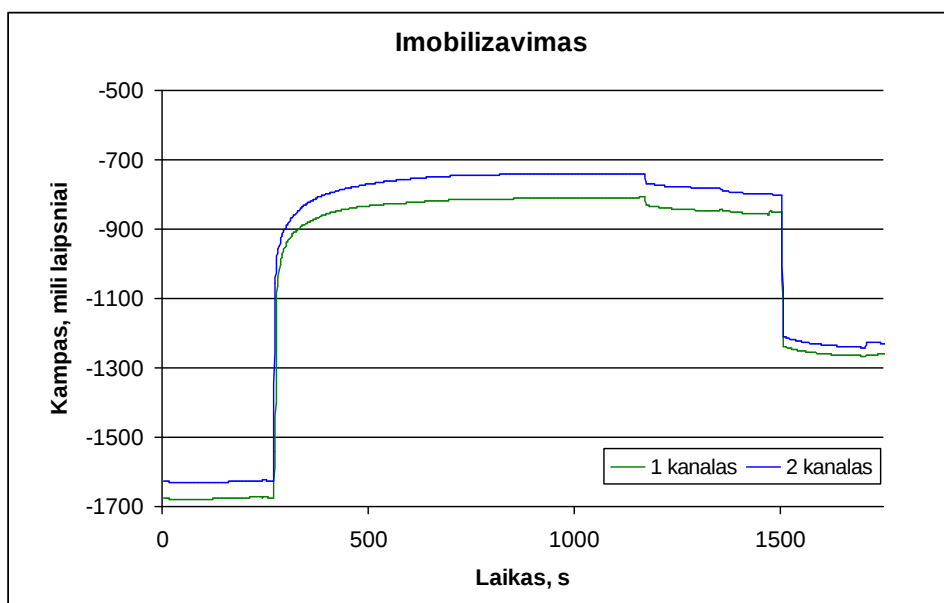
Elektrodai, modifikuoti kryptingai orientuotais antikūnų fragmentais, buvo panaudoti KKM imuninio jutiklio skirtu galvijų leukemijos antigeno nustatymui. Antigeno sąveika pagal gautus eksperimentinius rezultatus, efektyvesnė buvo su antikūnų fragmentais gautais atlikus skaldymą 37°C temperatūroje negu po skaldymo 20°C temperatūroje gautais antikūnų fragmentais (žr. 3.6 pav.). Todėl tolimesniems tyrimams buvo panaudotas efektyvesnis skaldymo būdas, t.y. 37°C temperatūroje.

3.6.2. PPR imuninis jutiklis

Specifinių anti-*gp51* antikūnų ir jų fragmentų imobilizavimo PPR jutiklio lusto paviršiuje sąlygų parinkimas ir ištyrimas

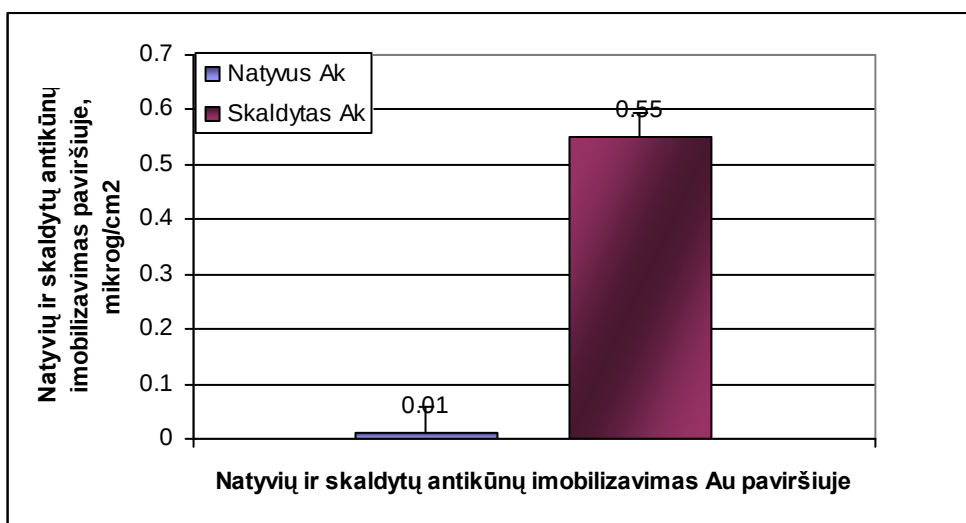
Tyrimai buvo atlikti dvikanaliu PPR analizatoriumi Autolab ESPRIT. Vienas kanalas naudojamas signalo registravimui, o kitas kanalas yra palyginamasis, kuris padeda pašalinti nespecifinės sąveikos įtaką. Eksperimentų rezultatai buvo gauti sensogramų pavidalu – PPR kampo, išreiškiamo mililaipsniais, priklausomybės nuo laiko grafikais (žr. 3.7 pav.). Prieš specifinių anti-*gp51* antikūnų ir jų fragmentų imobilizavimą buvo atliktas aukso paviršiaus stabilizavimas 10 mmol/L natrio fosfatiniu (toliau – PBS) buferiniu tirpalu, pH 7.4 ir 100 mmol/L HCl tirpalu. anti-*gp51* imobilizavimui PPR jutiklio lusto paviršiuje buvo panaudotas 1 mg/mL anti-*gp51* tirpalas 10 mmol/L PBS buferiniame tirpale, pH 7.4. Tyrimas pradedamas per PPR jutiklio lusto paviršių praleidžiant 10 mmol/L PBS buferinį tirpalą, pH 7.4. Kai bazinė linija stabilizuojasi, atliekamas skaldytų anti-*gp51* imobilizavimas pastovioje 37°C temperatūroje (žr. 3.7 pav.). Atliekant imobilizavimą turi būti naudojami tirpalai be oro burbuliukų, kadangi

esant tirpale oro burbuliukų yra gaunamas mažesnis ligando prisijungimo prie lusto paviršiaus efektyvumas.



3.7 pav. Skaldytų antikūnų fragmentų imobilizavimas PPR lusto paviršiuje

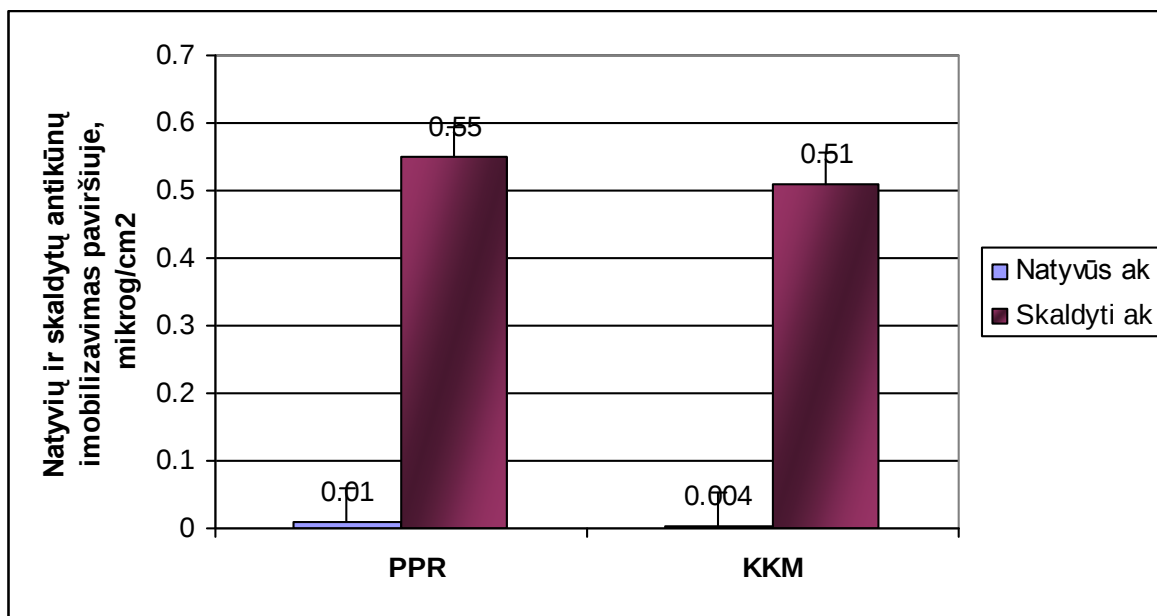
Tarp paviršiuje prisijungusių molekulių kiekio ir PPR kampo pokyčio egzistuoja tiesioginė priklausomybė. PPR kampo poslinkis mililaipsniais naudojamas kaip biologinio jutiklio signalas, siekiant išmatuoti ir įvertinti molekulių prisijungimą prie jutiklio paviršiaus. PPR jutiklio signalas taip pat priklauso ir nuo terpės lūžio rodiklio. 120 m° kampo pokytis atitinka apie 1 ng/mm² baltymo paviršinės koncentracijos pokytį arba apie 10⁻³ terpės lūžio rodiklio pokytį. Atlikus skaldytų antikūnų fragmentų imobilizavimą aukso paviršiuje buvo nustatyta, kad PPR jutiklio paviršiuje buvo imobilizuota 5,5 ± 0,45 ng/mm² (0,55 ± 0,05 μg/cm²) anti-*gp51* (žr. 3.8 pav.). Specifinių anti-*gp51* antikūnų fragmentai jungiasi prie aukso paviršiaus laisvomis merkaptų grupėmis.



3.8 pav. Natyvių ir skaldytų antikūnų imobilizavimo PPR jutiklio aukso paviršiuje palyginimas

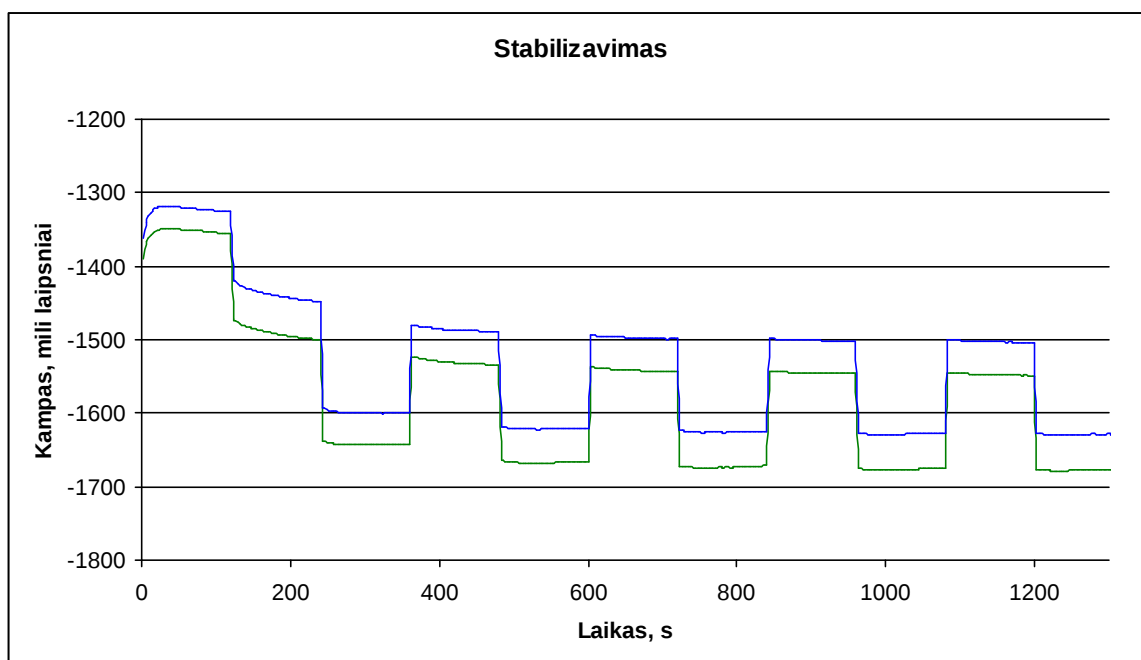
Atlikus natyvių antikūnų imobilizavimą buvo nustatytas labai nežymus įsimobilizavusio antikūno kiekis – $0,12 \pm 0,5 \text{ ng/mm}^2$ ($0,01 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$) (žr. 3.8 pav.). Tokie gauti rezultatai rodo, kad skaldytų antikūnų fragmentai didina tiesioginio, kryptingo imobilizavimo PPR jutiklio aukso paviršiuje efektyvumą. Natyvių antikūnų įsimobilizavimas galėjo įvykti dėl nespecifinės sąveikos su aukso paviršiumi tyrimo metu. Norint sumažinti nespecifiškumą laisvas paviršiaus plotas buvo blokuotas parą 10 mg/mL BSA tirpalu. Užblokavus laisvas jutiklio paviršiaus vietas nespecifinė sąveika sumažėja iki minimumo.

Lyginant specifinių anti-*gp51* antikūnų ir jų fragmentų imobilizavimo rezultatus KKM ir PPR jutiklio aukso paviršiuose (žr. 3.9 pav.) buvo nustatyta, kad anti-*gp51* antikūnų fragmentų, skaldytų 37°C temperatūroje, įsimobilizavo 8% daugiau PPR jutiklio paviršiuje. Natyvių antikūnų imobilizavimo rezultatai buvo labai nežymūs abiejuose jutikliuose. Todėl tolimesniuose tyrimuose buvo naudojami specifinių anti-*gp51* antikūnų fragmentų imobilizavimas PPR jutiklio aukso paviršiuje.



3.9 pav. Natyvių ir skaldytų antikūnų imobilizavimo PPR ir KKM jutiklių aukso paviršiuje palyginimas

Atlikus specifinių antikūnų imobilizavimą aukso paviršiuje ir norint toliau tirti antikūno-antigeno komplekso susidarymo sąveiką, būtina jutiklio paviršių stabilizuoti (žr. 3.10 pav.). PPR lusto paviršiaus stabilizavimas, t.y. bazinės linijos nusistovėjimas trukdavo nuo 20 min. iki 1 val. PPR kampo pokytis buvo registruojamas sensogramos pavidalu.

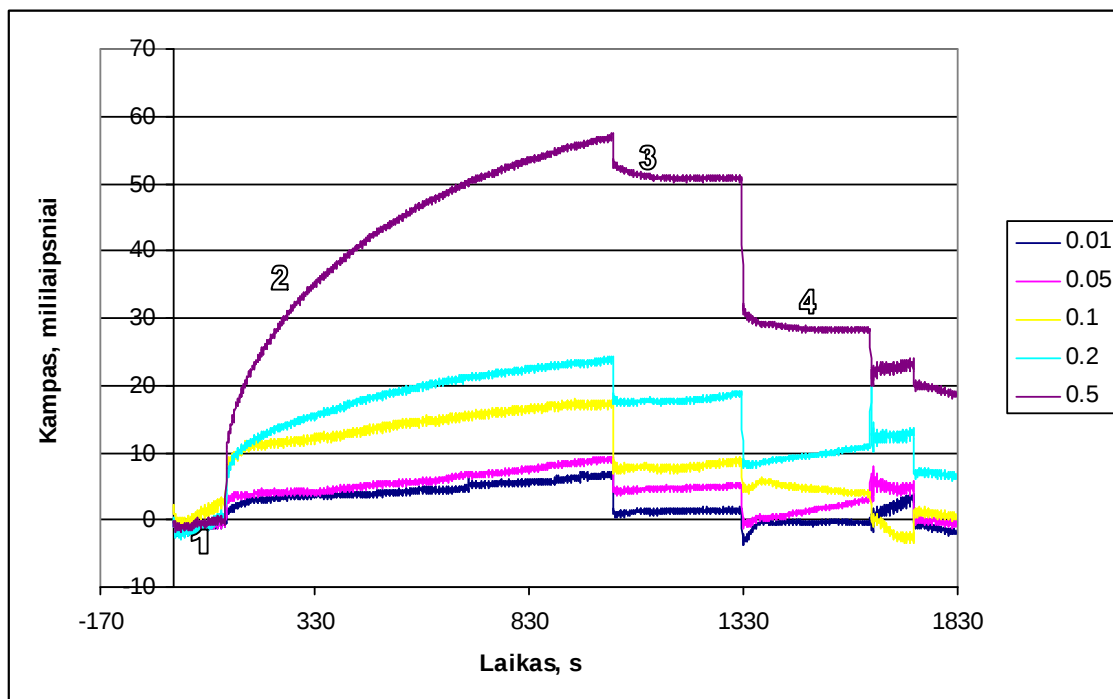


3.10 pav. Bazinės linijos nusistovėjimas

Aukščiau nurodytame 3.10 paveiksle matome, kad bazinė linija nusistovi (480 -1200 s) dviejuose PPR analizatoriaus kanaluose. Bazinei linijai nusistovėjus galima imobilizuoti antikūnus ir/arba tirti jų sąveiką su antigenu.

Sąveikos tarp imobilizuotų specifinių anti-*gp51* fragmentų ir GLV antigeno esančio tirpale tyrimas

Imobilizavus anti-*gp51* PPR jutiklio paviršiuje buvo atliktas stabilizavimas/drėkinimas 10 mmol/L PBS buferiniu tirpalu, pH 7.4. Imobilizuoto anti-*gp51* ir GLV antigeno *gp51* esančio tirpale sąveikos tyrimams naudotas įvairių koncentracijų: 0.01; 0.05; 0.1; 0,2; 0,5 mg/mL GLV antigeno tirpalas PBS buferiniame tirpale, pH 7.4. anti-*gp51* ir GLV antigeno sąveikos tyrimas pradedamas jutiklio paviršių su imobilizuotu anti-*gp51* kruopščiai praplaunant PBS buferiniu tirpalu, pH 7.4 ir stabilizuojant paviršių. Nusistovėjus stabiliai bazinei linijai į 1 kanalą įleidžiamas mėginys turintis GLV antigeno, o į 2 kanalą PBS buferinis tirpalas, pH 7.4. PPR kampo padėtis priklauso nuo aplinkos, esančios arti jutiklio paviršiaus, lūžio rodiklio. Lūžio rodiklis PPR biologinio jutiklio paviršiuje keičiasi dėl makromolekulių prisijungimo prie paviršiaus. Kai jutiklis yra patalpinamas į mėginį turintį GLV antigeno molekulių, jos prisijungia prie jutiklio paviršiaus dėl specifinės sąveikos su imobilizuotais anti-*gp51* fragmentais. GLV antigeno prisijungimas prie anti-*gp51* fragmento padidina PPR jutiklio signalą, kuris fiksuojamas sensogramoje (žr. 3.11 pav.).

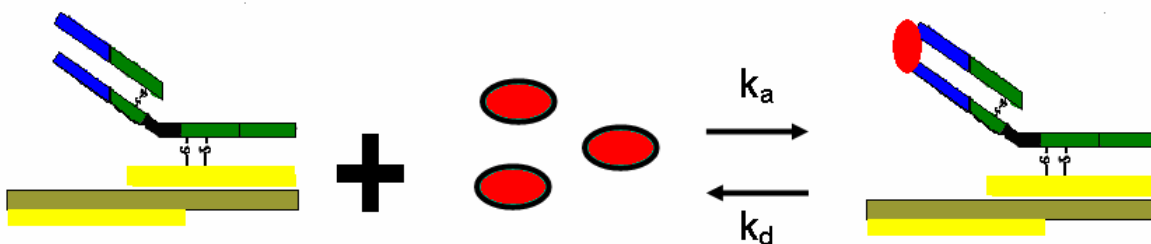


3.11 pav. PPR signalo kitimas, esant skirtingoms GLV antigeno koncentracijoms: 1 – bazinė linija (10 mmol/L PBS buferinis tirpalas, pH 7.4); 2 – asociacijos stadija; 3 – disociacijos stadija; 4 – regeneracijos stadija

Susidariusių anti-*gp51/gp51* kompleksų paviršinė koncentracija yra proporcinga koncentracijai GLV antigenų, esančių tirpale. Per jutiklio lusto paviršių vėl praleidus buferinį tirpalą, analitės (GLV antigeno *gp51*) tirpalas pakeičiamas buferiniu tirpalu, anti-*gp51/gp51* kompleksas disocijuoja ir signalas sumažėja. Atlikus paviršiaus regeneravimą tirpalu, sudarytu iš 0.5% SDS ir 50 mmol/L NaOH, ir praplovus PBS buferiniu tirpalu (pH 7.4), PPR jutiklio signalas atsistato iki bazinės linijos. Šiuo atveju galima atlikti pakartotinius tyrimus su tuo pačiu lustu, esant kitai GLV antigeno koncentracijai. Vienas iš PPR jutiklių privalumų yra tas, kad šis metodas leidžia tirti biomolekulių sąveikas realiaame laike. Be to, nėra būtinybės žymėti sąveikaujančias molekules papildomomis žymėmis (pvz., radioaktyviomis, fluorescencinėmis). Tai taupo laiką ir padeda išsaugoti biomolekulėms būdingas savybes.

Sąveikos tarp imobilizuoto specifinio anti-*gp51* antikūno fragmento ir GLV antigeno esančio tirpale kinetinių parametrų

Eksperimentų rezultatai buvo apdoroti PPR Autolab tiekiamą programine įranga Kinetic evaluation. Specifinių anti-*gp51* antikūnų fragmentai su GLV antigenu sąveikauja 1:1 stochiometrinio santykiu. Tokiems skaldytiems antikūnų fragmentams būdinga tik viena antigeną surišanti sritis, todėl kinetiniams parametrams gauti pasirinktas pseudo pirmos eilės sąveikos modelis, atitinkantis 1:1 sąveikos schemą (žr. 3.12 pav.):



3.12 pav. Specifinių anti-gp51 antikūnų fragmentų ir GLV antigeno sąveikos schema

Supaprastinus šios sąveikos išraišką buvo pažymėta, kad:



kur A – imobilizuotas antikūno fragmentas, B – tirpale esantis GLV antigenas, k_a – asociacijos greičio konstanta, $M^{-1}s^{-1}$ k_d – disociacijos greičio konstanta, s^{-1}

Pagal schemą (žr. 3.12 pav.) buvo sudaryta diferencialinių lygčių sistema:

$$\begin{aligned} \frac{d[A]}{dt} &= k_d \cdot [AB] - k_a \cdot [A] \cdot [B] \\ \frac{d[AB]}{dt} &= k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB] \\ [A](0) &= R_{\max}, [AB](0) = 0 \end{aligned} \quad (3.3)$$

kur $[AB]$ – susidariusio komplekso koncentracija, $[A]$ ir $[B]$ – atitinkamai imobilizuoto Ak ir laisvo GLV antigeno koncentracijos; $R_{\max} = \frac{R_{Ak} \cdot M_{Ag}}{M_{Ak}}$ - valentingumas - maksimalus signalo dydis, apibūdinantis bendrą Ak kiekį aukso paviršiuje, m° ; M – molekulinė antigeno arba antikūno masė.

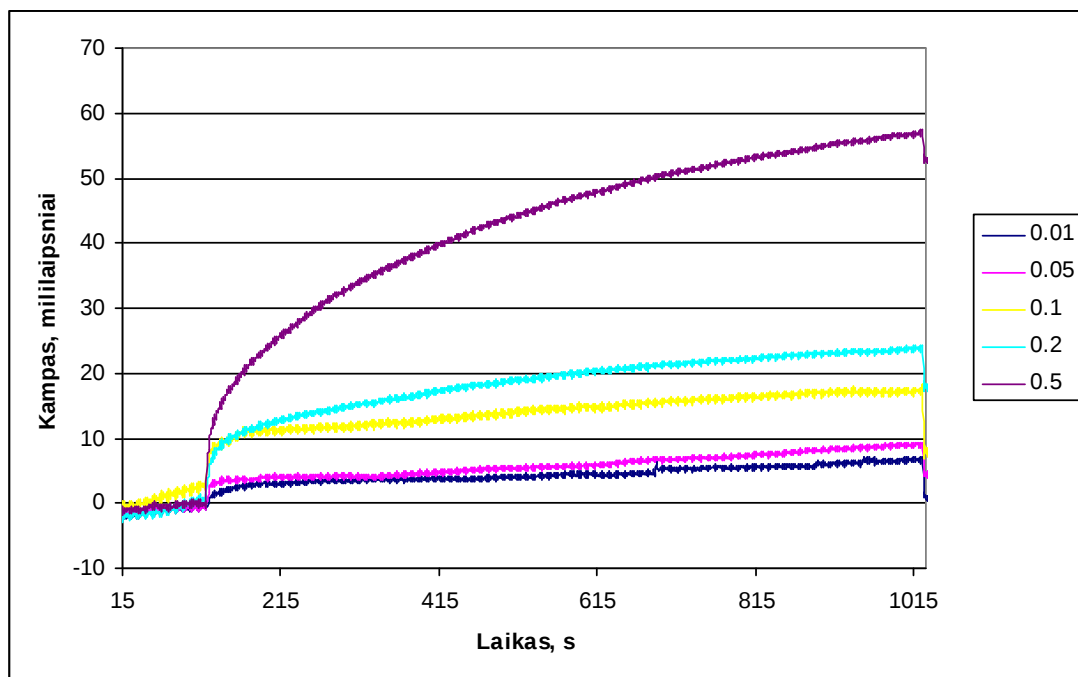
Susidarant antikūno-antigeno kompleksui GLV antigeno koncentracija tirpale yra labai maža, todėl į jos pokyčius galima neatsižvelgti. Žinant, kad laisvo antigeno koncentracija yra pastovi ir lygi pradinei koncentracijai, C, (3.3) lygčių sistema buvo perrašyta PPR signalo R, kuris atitinka komplekso AB koncentracijos kitimo greitį, atžvilgiu:

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot (R_{\max} - R) - k_d \cdot R \quad (3.4)$$

Kinetiniai parametrai buvo apskaičiuoti apdorojus duomenis nelineinės regresijos (Bath [interaktyvus]) būdu, t.y. (3.4) lygtis buvo integruojama pagal t, R_t parametrus:

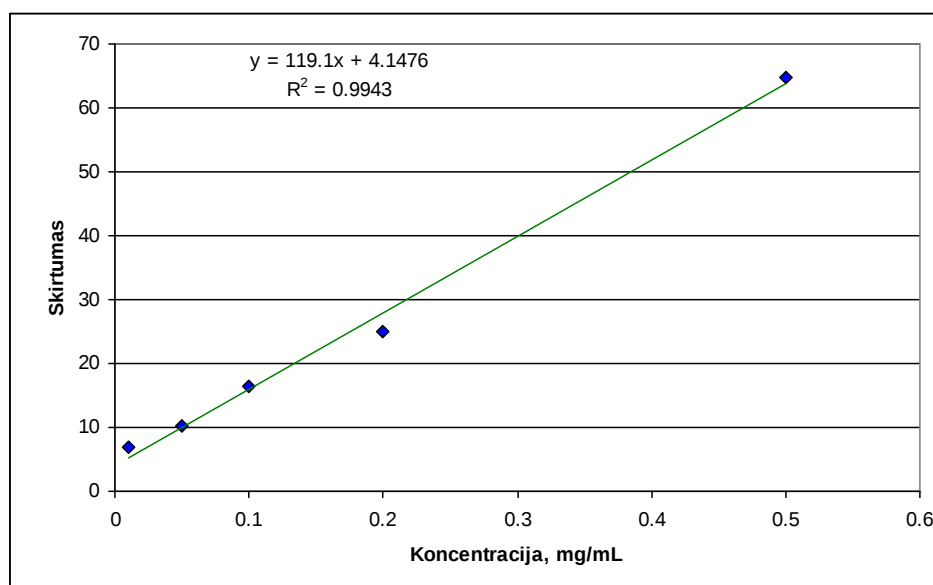
$$R_t = \frac{k_a \cdot C \cdot R_{\max} \cdot [1 - e^{-(k_a \cdot C + k_d) \cdot t}]}{k_a \cdot C + k_d} + R_0 \quad (3.5)$$

3.11 paveiksle pasirinkus tik asociacijos stadijos kinetinių kreivių dalis gaunamas asociacijos stadijos kinetinės kreivės, esant skirtingoms GLV antigeno koncentracijoms (žr. 3.13 pav.).



3.13 pav. Asociacijos stadijos kinetinės kreivės, esant skirtingoms GLV antigeno koncentracijoms

Iš 3.13 pav. kinetinių kreivių buvo skaičiuojamas PPR signalo pokytis tarp asociacijos stadijos pradžios ir pabaigos taškų. Gauti rezultatai pavaizduoti kalibracinėje kreivėje (žr. 3.14 pav.), kurioje taškų išsibarstymas yra 0,99.



3.14 pav. PPR signalo skirtumo priklausomybės nuo laiko kalibracinė kreivė esant skirtingoms GLV antigeno koncentracijoms

Asociacijos stadijos metu (3.5) lygtis turi 3 parametrus, priklausančius nuo laiko, t :

$$R_t = E \cdot [1 - e^{-k_s}] + R_0, \quad (3.6)$$

kur E – maksimalus PPR kampo pokytis, esant konkrečiai antigeno koncentracijai; $k_s = (k_a C + k_d)$; R_0 – signalo dydis, kai $t=0$.

Tinkamas atitikimas buvo gautas esant mažiausiai antigeno koncentracijai (0,01 mg/mL) – $\chi^2=9,3 \pm 1,5$. Kitų kreivių atveju χ^2 dydis svyravo nuo 13 iki 65. Toks teorinių ir praktinių rezultatų neatitikimas gali būti paaiškinamas keliais būdais. Pirma, buvo pasirinktas netinkantis modelis, kadangi prisijungus antigenui, antikūno konfirmacija pasikeitė, o į tai tyrimo metu nebuvo atsižvelgta. Teisingiau būtų pasirinkti 1:1 sąveikos su konformaciniais pakitimais modelį. Tačiau tokio modelio Autolab kinetinė programa neturėjo. Antra, esant didesnei antigeno koncentracijai gali atsirasti didesnė nespecifinės sąveikos tikimybė. Kadangi esant 0,01 mg/mL GLV antigeno koncentracijai gauti rezultatai rodė patenkinamą modelio atitikimą eksperimento duomenims, todėl 1-oje lentelė yra pateikiami kinetinių parametrų - greičio konstantų ir atitikimo dydžiai.

1 lentelė. Kinetiniai specifiniai anti-gp51 antikūnų ir GLV gp51 antigeno sąveikos parametrai pagal pseudo pirmos eilės sąveikos modelį

[GLV gp51], mg/mL	[GLV gp51], M	k_s, s^{-1}	$k_a, M^{-1} s^{-1}$	k_d, s^{-1}	χ^2
0,01	$1,96 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^4 \pm 7,7 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-4} \pm 1,5 \cdot 10^{-3}$	$9,3 \pm 1,5$

Nors pseudo pirmos eilės 1:1 sąveikos modelis geriausiai atitiko eksperimentinius duomenis, esant 0,01 mg/mL GLV antigeno koncentracijai, tačiau įsitikinti, kad toks sąveikos mechanizmas atitinka realią situaciją, reikalinga atlikti papildomus komplekso struktūros tyrimus.

Sąveikos tarp imobilizuoto specifinio anti-gp51 antikūno fragmento ir GLV antigeno esančio tirpale afiniškumo konstantos nustatymas

Specifinių anti-gp51 antikūnų ir GLV antigeno komplekso susidarymo greitis (dR/dt) buvo apskaičiuotas pagal 3.4 lygtį pusiausvyros sąlygomis yra lygus nuliui:

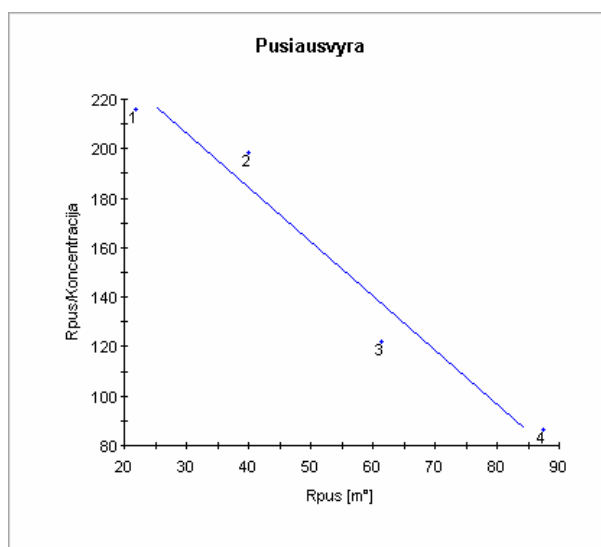
$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot (R_{\max} - R_{pus}) - k_d \cdot R_{pus} = 0 \quad (3.7)$$

Ši lygtis buvo pertvarkyta ir naudojama duomenims apdoroti pusiausvyros sąlygomis:

$$\frac{R_{pus}}{C} = K_A \cdot R_{\max} - K_A \cdot R_{pus} \quad (3.8)$$

Tyrimo metu gauti rezultatai buvo pavaizduoti grafike (3.15 pav.), kuriame y-ašyje buvo atidėti R_{pus}/C , o x-ašyje – R_{pus} , m^o dydžiai. Kreivė pavaizduojama tiesine priklausomybe, o iš jos nuokrypio buvo apskaičiuotas K_A .

Rezultatų pasiskirstymo 3.15 pav. išsibarstymas yra 96,7%. Iš tiesinės priklausomybės nuokrypio buvo apskaičiuota afiniškumo konstanta, K_A , kuri yra lygi $3,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Kuo afiniškumo konstanta yra didesnė, tuo sąveika tarp antigeno ir antikūno yra stipresnė.



3.15 pav. Tiesinė Ak-Ag komplekso susidarymo priklausomybė. Taškais 1,2,3,4 pažymėtos atitinkamai antigeno koncentracijos: 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 mg/mL

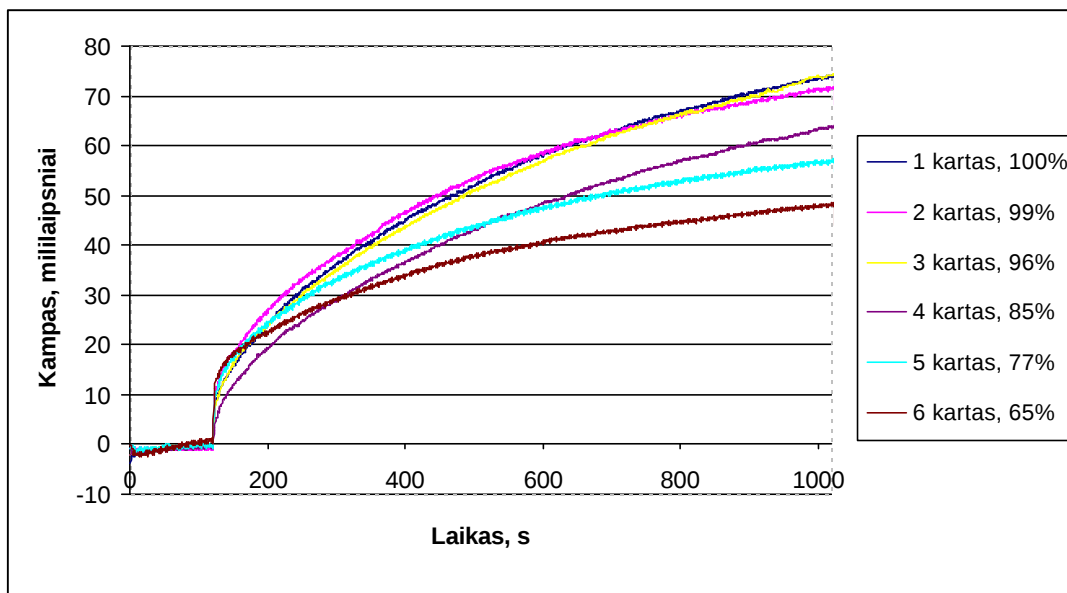
GLV antigeno ir specifinių anti-gp51 antikūnų komplekso surišimo efektyvumui apskaičiuoti buvo panaudota lygtis (Tsai, Pai 2009):

$$\omega = \frac{M_{Ag}}{M_{Ak}} \times \frac{\Delta\Theta_{Ak}}{\Delta\Theta_{Ag}} \times 100\%$$

kur: M_{Ak} – antikūnų fragmentų molekulinė masė, $\Delta\Theta_{Ag}$ – PPR kampo pokytis, prisijungus GLV antigenui; M_{Ag} – GLV gp51 antigeno molekulinė masė; $\Delta\Theta_{Ak}$ – PPR kampo pokytis po Ak imobilizavimo aukso paviršiuje

Žinant, kad GLV gp51 antigeno molekulinė masė yra 51 kDa (Johnston, Radke 2000; Basu et al. 2003), o skaldytų antikūnų fragmentų – 80 kDa, buvo pasiektas komplekso susidarymo 84,4% efektyvumas. Literatūroje nurodoma (Tsai, Pai 2009), kad esant atsitiktinei antikūnų orientacijai surišimo efektyvumas yra 60%, kryptingas antikūnų imobilizavimas pasižymi 90% surišimo efektyvumu.

Kiekvienas jutiklis turi pasižymėti dar viena svarbia savybe, t.y. būti regeneruojamas. Jutiklis yra tuo geresnis, kuo atsikartojamumo paklaida yra mažesnė. Darbo metu jutiklis buvo regeneruojamas 6-8 kartus, esant GLV antigeno 0,01 mg/mL koncentracijai. Gauti rezultatai, pavaizduoti 3.16 pav., rodo, kad jutiklio 3 ciklų metu PPR signalo pokytis skiriasi 4%. Kinų darbo grupėje gauto PPR signalo pokytis skyrėsi 30% (Tsai, Pai 2009).



3.16 pav. PPR jutiklio regeneravimas

Pakartotinai 6 kartus atlikus antikūno-antigeno sąveikos bei jutiklio regeneravimo (imuninio komplekso suardymas) ciklus, išlieka 65% pradinio analizinio signalo. Taigi PPR jutikliu, panaudojant skaldytus antikūnų fragmentais modifikuotą lustą, galima sėkmingai atlikti pakartotinius antigeno nustatymus.

Atlikta panašių darbų, aprašytų mokslinėje literatūroje, analizė ir palyginimas su mūsų gautais rezultatais nuteikia optimistiškai. Ir visų svarbiausia, kad tai skatina tolimesnę metodinę paiešką, kuriant sąlygas gauti efektyvesnį atsikartojamumą ir kuo mažesnes paklaidas.

IŠVADOS

1. Antigeną surišančios sritys išlieka aktyvios ir gali sąveikauti su antigenu, skaldant specifinius anti-*gp51* antikūnus 6 mg/ml DTT koncentracijos tirpalu.
2. Skaldytus antikūnų fragmentus įvertinus elektroforeziškai nustatyta, kad jų molekulinė masė yra 70-90 kDa intervale.
3. Skaldytų antikūnų įsimobilizavimo efektyvumas yra 97 - 98% lyginant su natyvių antikūnų imobilizavimu aukso paviršiuje.
4. Paviršiaus plazmono rezonanso jutiklis pasižymi didesniu jautrumu nei kvarco kristalo mikrogravimetrinis imuninis jutiklis ir galima nustatyti mažesnes antigeno koncentracijas.
5. Tiriant anti-*gp51/gp51* komplekso sąveiką, eksperimentinius duomenis geriausiai atitiko pseudo pirmos eilės 1:1 sąveikos modelis, esant 0,01 mg/mL GLV antigeno koncentracijai tirpale.
6. Galvijų leukemijos viruso anti-*gp51* antikūnų fragmentai specifiškai sąveikauja su *gp51* antigenu, anti-*gp51/gp51* komplekso afiniškumo konstanta K_A yra lygi $3,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Esant kryptingam antikūnų imobilizavimui komplekso surišimo efektyvumas buvo didesnis lyginant su atsitiktiniu natyvių antikūnų imobilizavimu aukso paviršiuje.
7. PPR imuninį jutiklį galima regeneruoti ir pritaikyti pakartotiniam antigeno nustatymui. Atlikus 3 sąveikos su antigenu – regeneracijos ciklus, prarandama tik 5% pradinio analizinio signalo.

LITERATŪRA

1. Abbas AK, Lichtman AH. Basic of immunology. 2nd ed. Elsevier, 2004.
2. ADDL [interaktyvus]. JAV: Animal disease diagnostic laboratory. [Žiūrėta 2009-04-20]. Internetinė prieiga: <<http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1996/winter/blv.shtml>>
3. Adomaitienė D, Janulevičiūtė N, Kazakevičius R, Vaičiūvenas V. Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas: KMU Spaudos ir leidybos centras, 2001. 408 p.
4. Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators* 1983; 4: p. 299-304.
5. Bagdonienė L, Bendikienė V, Kadziauskas J, Labeikytė D, Markuckas A, Sabaliauskienė V, Sasnauskienė S, Šeputienė V. Biochemijos laboratoriniai darbai. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2006. 153 p.
6. Baniukevič J, Kirlytė J, Ramanavičienė A, Ramanavičius A. Kvarco kristalo mikrogravimetrijos metodas antikūnų imobilizavimo bei sąveikos su antigenu tyrimuose. Respublikinės studentų mokslinės konferencijos “Chemija ir Cheminė Technologija” pranešimų medžiaga, Klaipėda 2009, 14-18 p.
7. Basu I, Ferens WA, Stone DM, Hovde CJ. Antiviral activity of shiga toxin requires enzymatic activity and is associated with increased permeability of target cells. *Infection and Immunity* 2003; 71: p. 327-334.
8. Bath [interaktyvus]. University of Bath (personal home pages). [Žiūrėta 2009-05-20]. Internetinė prieiga: <<http://people.bath.ac.uk/chsataj/Manual%20KE-software.pdf>>
9. Beier D, Blankenstein P, Fechner H. Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1998; 105: p. 408-412.
10. Bex F, Bruck C, Mammerick M, Portetelle D, Glysdal J, Cleuter Y, Leclerc M, Dekegel D, Burny A. Humoral antibody response to bovine leukaemia virus infection in cattle and sheep. *Cancer Res* 1979; 39: p. 1118-1123.
11. Bonroy K, Frederix F, Reekmans G, Dewolf E, Palma RD, Borghs G, Declerck P, Goddeeris B. Comparison of random and oriented immobilization of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers. *JIM* 2006; 312: p. 167 - 181.
12. Bossmann H, Siakkou H, Ulrich R, Uckert W, Kraft R, Rosenthal S, Rosenthal HA. A radioimmunoassay detecting the bovine leukaemia virus transmembrane protein *gp30* and anti- *gp30* antibodies in the serum of cattle. *Acta Virol* 1989; 33: p. 113-120.
13. Burmester GR, Pezutto A. Color Atlas of Immunology. New York: Thieme, 2003. 336 p.

14. CCRMA [interaktyvus]. JAV: Center of computer research in music and acoustics. [Žiūrėta 2009-05-20]. Internetinė prieiga:
< <http://ccrma.stanford.edu/CCRMA/Courses/252/sensors/node7.html> >
15. Cho IH, Paek EH, Lee H, Kang JY, Kim TS, Paek SH. Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces. *Anal Biochemistry* 2007; 365: p. 14-23.
16. Chu X, Zhao ZL, Shen GL, Yu RQ. Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex. *Sens. Actuators, B* 2006; 114: p. 696-704.
17. Collins DF, Tarpley HL, Latimer KS. [interaktyvus] A Review of Enzootic Bovine Lymphosarcoma. [Žiūrėta 2009-04-30]. Internetinė prieiga:
< <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/collins/index.php> >
18. Conroy PJ, Hearty S, Leonard P, O’Kennedy RJ. Antibody production, design and used for biosensor-based applications. *Semin Cell Dev Biol* 2009 (corrected proof).
19. Čiapaitė J, Saulis G. (2007) Naujasių mokslinių pasiekimų ir tyrimo metodų biotechnologijos srityje taikymo medicinoje mokslinė studija „Biotechnologija medicinoje.“, 2007. Kaunas, VDU.
20. Dairymd [interaktyvus]. Colorado: The dairy authority Lab. [Žiūrėta 2009-05-15]. Internetinė prieiga: <http://www.dairymd.com/bovine_leukemia.php>
21. Deng T, Li JS, Huan SY, Yang HF, Wang H, Shen GL, Yu RQ. Quartz crystal microbalance bioaffinity sensor for biotin based on mixed self-assembled monolayers and metastable molecular complex receptor. *Biosens. Bioelectron.* 2006; 21: p. 1545-1552.
22. Domenech A, Goyache J, Llamas L, Paya MJ, Suarez G, Gomez-Lucia E. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* 2000; 81: p. 109-118.
23. Dumalakienė L, Popendikytė V, Vaičiūnienė V, Mikalauskienė G, Mauricas M, Pieškus J. Detection BLV infection by PCR and serological tests. In: The Problems of Immunology Today (Pieškus J, editor). Vilnius: Baltijos kopija, 1995: p. 267-275.
24. Eales LJ. Immunology for life scientists. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 360 p.
25. EBI [interaktyvus]. European Bioinformatics institute. [Žiūrėta 2009-05-20] Internetinė prieiga: <<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/sva/sva.pl?session=%2Febi%2Fextserv%2Fold-work%2FSESSION4599-1224122793-1&index=0&view=631870891>>
26. Elektronika [interaktyvus]. Ryšių technikos naujienos 2002 (Thornellis G. Daugybė kvarco

- profesiju). [Žiūrėta 2009-04-30]. Internetinė prieiga:
<<http://rtn.elektronika.lt/rtn/0201/kvarc.html>>
27. Ferreira GNM, Encarnacao JM, Rosa L, Rodrigues R, Breyner R, Barrento S, Pedro L, Aires da Silva F, Goncalves J. Recombinant single-chain variable fragment and single domain antibody piezoimmunosensors for detection of HIV1 virion infectivity factor. *Biosens. Bioelectron.* 2007; 23: p. 384-392.
 28. Ferrer JF. Bovine lymphosarcoma. *Adv Vet Sci Comp Med* 1980; p. 24: 1-68.
 29. Flanagan MT, Pantell RH. Surface Plasmon Resonance and Immunosensors. *Electron. Lett* 1984; 23: p. 968-970.
 30. Florins A, Boxus M, Vandermeers F, Verlaeten O, Bouzar AB, Defoiche J, Hubaux R, Burny A, Kettmann R, Willems L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. *Vet Immunol Immunopathol.*, 2008, 125: p. 1-7.
 31. Gallo RC, Wong-Staal F [interaktyvus]. Retrovirus biology and human disease, 1989. 409 p. [Žiūrėta 2009-04-30]. Internetinė prieiga:
<<http://books.google.com/books?id=jtBNxz2iEYAC&printsec=frontcover>>
 32. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. Review : Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirol.* 2007; 4: p. 18.
 33. Gobi KV, Kim SJ, Tanaka H, Shoyama Y, Miura N. Novel surface plasmon resonance (SPR) immunosensor based on monomolecular layer of physically-adsorbed ovalbumin conjugate for detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and atomic force microscopy study. *Sens. Actuators, B* 2007; 123: p. 583-593.
 34. Grover Y, Guillemain B. An immunoblotting procedure for detection of antibodies against bovine leukaemia virus in cattle. *J Vet Med B*, 1992; 39: p. 48-52.
 35. Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukemic cell. *Blood Rev* 1997; 11: p. 119-128.
 36. Harris JR [interaktyvus]. Virally infected cells. Springer, 1989. 450 p. [Žiūrėta 2009-04-14]. Internetinė prieiga:
< <http://books.google.com/books?id=8ZwGQTSMf3cC&printsec=frontcover#PPT1,M1>>
 37. Heeney JL, Valli DJS, Jacobs RM. Evidence of BLV infection of peripheral blood monocytes. *Lab Invest* 1992; 66: p. 608-617.
 38. Holme JD, Peck H. Analytical Biochemistry. 3rd ed. England: Pearson Education. 1998. 501 p.

39. Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuators, B* 1999; 54: p. 3-15.
40. Hu W, Li CM, Dong H. Poly(pyrrole-co-pyrrole propylic acid) film and its application in label-free surface Plasmon resonance immunosensors. *Anal. Chim. Acta* 2008; 630: p.67-74.
41. Huang H, Ran P, Liu Z. Signal enhancement of surface Plasmon resonance - based immunoassays for the allergen detection. *Sens. Actuators, B* 2008; 131: 417-423.
42. Johnston ER, Radke K. The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemija virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions. *J.Virol.* 2000; 74: p. 2930-2935.
43. Johnson M, Rommel FM, Mone J. Development of a syncytia inhibition assay for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in naturally infected cattle; comparison with Western blot and agar gel immunodiffusion. *J Virol Methods* 1998; 70: p. 177-182.
44. Juliarena MA, Gutierrez SE, Ceriani C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res* 2007; 68: p. 1220-5.
45. Juliarena MA, Poli M, Ceriani C, Sala L, Rodríguez E, Gutierrez S, Dolcini G, Odeon A, Esteban EN. Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. *J Dairy Sci.* 2009; 92: p. 375-81.
46. Karyakin AA, Presnova GV, Rubtsova MY, Egorov AM. Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol groups. *Anal Chem* 2000; 72: p. 3805-3811.
47. Karlsson R. SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J. Mol. Recognit.* 2004; 17: p.151-161.
48. Kausaite A, Dijk M, Castrop J, Ramanaviciene A, Baltrus JP, Acaite J, Ramanavicius A. Surface Plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2007a; 35: p. 57-63.
49. Kausaite A, Ramanaviciene A, Mostovojus V, Ramanavicius A. Paviršiaus plazmonų rezonansas ir jo pritaikymas tyrinėjimams (apžvalginis straipsnis). *Medicina (Kaunas)* 2007b; 43: 355 p.
50. Kittelberger R, Reichel MP, Meynell RM, Tham KM, Molloy JB. Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing. *J Virol Methods* 1999; 77: p. 109-114.
51. Kyprianou D, Guerreiro, Chainella I, Piletska EV, Fowler SA, Karim K, Whitcombe MJ, Turner APF, Piletsky SA. New reactive polymer for protein immobilization on sensor

- surfaces. *Biosens. Bioelectron.* 2009; 24: p. 1365-1371.
52. Klintevall K, Ballagi-Pordany A, Naslung K, Blak S. BLV: early detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 1994; 42: p. 191-204.
 53. Koolman J, Roehm KH. Color Atlas of Biochemistry, 2nd ed., New York: Thieme, 2005. 477 p.
 54. Kubly J. Immunology. New York: W.H. Freeman and Company. 5th ed., 2002: p. 87-162.
 55. Kumar A [interktyvus]. Biosensors based on piezoelectric crystal detectors: theory and application. JOM-e 2000; 52. [Žiūrėta 2009-04-10]. Internetinė prieiga: <<http://www.tms.org/pubs/journals/JOM/0010/Kumar/Kumar-0010.html>>
 56. Kupčiūnaitė J, Kaušaitė A, Ramanavičius A, Ramanavičienė A. Study of ssDNA immobilization and hybridization on the gold substrate with quartz crystal microbalance. *Biologija* 2006; 3: p. 1-3.
 57. Kurosawa S, Nakamura M, Park JW, Aizawa H, Yamada K, Hirata M. Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer. *Biosens. Bioelectron.* 2004; 20 : p. 1134-1139.
 58. Kurosawa S, Park JW, Aizawa H, Wakida SI, Tao H, Ishihara K. Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 2006; 22: p. 473-481.
 59. Kurtinaitiene B, Ambrozaite D, Laurinavicius V, Ramanaviciene A, Ramanavicius A. Amperometric immunosensor for diagnosis of BLV infection. *Biosens Bioelectron.* 2008; 23: p. 1547-54.
 60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: p. 680-685.
 61. Lee W, Oh BK, Bae YM, Paek SH, Lee WH, Choi JW. Fabrication of self-assembled protein A monolayer and its application as an immunosensor. *Biosens. Bioelectron.* 2003; 19: p. 185 – 192.
 62. Lee W, Oh BK, Lee WH, Choi JW. Immobilization of antibody fragment for immunosensor application based on surface plasmon resonance. *Colloids surf. B* 2005; 40: p. 143-148.
 63. Lerner KL, Lerner BW (Editors). World of microbiology and immunology. USA: Thomsons Gale, 2003. 701 p.
 64. Levkut M, Ponti W, Levkutova M, Rocchi M, Poli G, Lambertenghi DG, Quirici N, Leng L. Immunoanalysis of IgG and IgM molecules on the surface of BLV infected cattle lymphocytes. *Comp Haematol Int* 1997; 7: p. 152-156.

65. Llames L, Goyache J, Domenech A, de Avila A, Suarez G, Gomez-Lucia E. Rapid detection of specific polyclonal and monoclonal antibodies against bovine leukaemia virus. *J Virol Methods* 1999; 82: p. 129-136.
66. LofAs S, Johnsson B. A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1990; 1526: p. 21-30.
67. Luo J, Zhang Q, Huang Y, Liu G, Zhao R. Quartz crystal microbalance biosensor for recombinant human interferon- β detection based on antisense peptide approach. *Anal. Chim. Acta* 2007; 590: p. 91-97.
68. Mansuy-Schlick V, Delage-Mourroux R, Jouvenot M, Boireau W. Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements. *Biosens. Bioelectron.* 2006; 21: p. 1830-1837
69. Meas S, Ohashi K, Tum S, Chhin M, Te K, Miura K, Sugimoto C, Onuma M. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukaemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci* 2000; 62: p. 779-781.
70. Mikalauskiene G, Pieškus J. Imunologijos praktikos darbai. Vilnius: Academia. 1999.
71. Milius J, Lukauskas K, Tamošiūnas V. Išlaidos galvijų virusinių ligų tyrimams Lietuvoje 2000-2004 metais. *Veterinarija ir zootechnika* 2005; 31: 37 p.
72. Miller J, Miller L, Olson C, Gillette K. Virus-like particles in phytomeagglutin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J.Natl. Cancer Inst.* 1969; 43: p. 1297-1303.
73. ModBase [interaktyvus]. ModBase duomenų bazė. [Žiūrėta 2009-05-10]. Internetinė prieiga: <<http://salilab.org/modbase>>
74. Nermut MV, Hockley DJ. Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; p. 214: 1-22.
75. Nice EC, Catimel B. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *BioEssays* 1999; 21: p. 339-352.
76. O'Sullivan CK, Guilbault GG. Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications (review). *Biosens. Bioelectron.* 1999; 14: p. 663-670.
77. O'Brien JC, Jones VW, Porter MD. Immunosensing platforms using spontaneously adsorbed antibody fragments on gold. *Anal Chem* 2000; 72: p. 703-710.
78. Path [interaktyvus]. Central proteomics facility. [Žiūrėta 2009-05-20]. Internetinė prieiga: <<http://users.path.ox.ac.uk/~vdmerwe/Internal/spr.PDF>>
79. Piercenet.com [internetinė svetainė]. Rockford: Thermo Fisher Scientific Inc. [Žiūrėta 2008-06-20]. Internetinė prieiga:

- <<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=0101>>
80. Pieškus J, Armalis A, Vaičiūnienė V. Detection of bovine leukaemia virus (BLV) and its proteins. In: Immunology of Viral Infections. Proc of 3rd Congress Europ Soc Vet Virol. (Schwyzer M, Ackermann M, Bertini G, Kocherhans R, McCullough K, Engels M, Wittek R, Zanoni R. eds) Amsterdam, 1995: p. 358-360.
 81. Pieškus J. Veterinarinės imunologijos pagrindai. Kaunas: Terra Publica. 2001. 152 p.
 82. Piezocryst [interaktyvus]. Austria: Piezocryst Advanced Biosensorics GmbH. [Žiūrėta 2009-05-20]. Internetinė prieiga:
<http://www.piezocryst.com/downloads/Piezoelectric_Sensors_01.pdf>
 83. Pinchuk G. Theory and problems of immunology. New York: McGraw-Hill, 2002. 329 p.
 84. Ponomareva IS. Biological cycle of radionuclides and dynamics of cattle leukemia in the Orenburg region. *Radiats Biol Radioecol.* 2008; 48: p. 606-10.
 85. Portetelle D, Burny A, Bruck C, Dekegel D, Mammerick M, Urbain J. Detection of complement dependent lytic antibodies in serum from BLV infected animals. *Vet Res* 1978; 9: p. 667-674.
 86. Ramanavičius A. Elektrai laidūs polimerai elektrocheminiuose biologiniuose jutikliuose. Mokomoji knyga. Vilnius, 2005. 77 p.
 87. Ramanavičius A, Kaušaitė A. Paviršiaus plazmonų rezonanso biologiniai jutikliai. Mokomoji knyga. Vilnius: VU leidykla, 2005. 40 p.
 88. Rimšienė D, editorė. Imunologijos metodai. Imunologijos institutas, 1997.
 89. Rola M, Kuzmak J. The detection of bovine leukaemia virus proviral DNR by PCR-ELISA. *J Virol Methods* 2002; 99: p. 33-40.
 90. Schwartz L, Levy D. Pathobiology of bovine leukaemia virus. *Vet Res* 1994; 25: p. 521-536.
 91. Shankaran DR, Gobi KV, Miura N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sens. Actuators, B* 2007; 121: p. 158-177
 92. Sharma SK, Seghal N, Kumar A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics.* 2003; 3: p. 307-316.
 93. Shen G, Liu M, Cai X, Lu J. A novel piezoelectric quartz crystal immunosensor based on hyperbranched polymer films for the detection of α -fetoprotein. *Anal. Chim. Acta* 2008; 630: p. 75-81.
 94. Simard C, Richardson S, Dixon P, Belanger C, Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leucosis: comparison with the agar immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res*

- 2000; 64: p. 101-106.
95. Sonnleitner B. Instrumentation of Biotechnological Processes. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 1999; 66: p. 3-57.
96. Spangler BD, Tyler BJ. Capture agents for a quartz crystal microbalance-continuous flow biosensor: functionalized self-assembled monolayers on gold. *Anal. Chim. Acta* 1999; 399: p. 51-62.
97. Stone DM, Norton LK, Davis WC. Spontaneously proliferating lymphocytes from bovine leukaemia virus-infected, lymphocytotic cattle are not the virus-expressing lymphocytes, as these cells are delayed in G₀/G₁ of the cell cycle and are spared from apoptosis. *J Gen Virol* 2000; 81: p. 971-981.
98. Subrahmanyam S, Piletsky SA, Turner APF. Application of Natural Receptors in Sensors and Assays. *Anal. Chem.* 2002; 74: p. 3942–3951.
99. Susmel S, Sullivan CK, Guilbault GG. Human cytomegalovirus detection by a quartz crystal microbalance immunosensor. *Enzyme Microb. Technol.* 2000; 27: p. 639-645.
100. Tang DQ, Zhang DJ. Amplification of the antigen - antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors via back-filling immobilization of nanogold on biorecognition surface. *J Immunol Methods* 2006; 10: p. 1-9.
101. Teifke JP, Vahlenkamp TW. Detection of bovine leukaemia virus (BLV) in tissue samples of naturally and experimentally infected cattle. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2008; 121: p. 263-9.
102. Trainin Z, Brenner J. The direct and indirect economic impacts of bovine leukaemia virus infection on dairy cattle. *Isr J Vet Med* 2005; 60: p. 94-105.
103. Tsai WC, Li IC. SPR – based immunosensor for determining staphylococcal enterotoxin A. *Sens. Actuators, B* 2009; 136: p. 8-12.
104. Tsai WC, Pai PJR. Surface Plasmon resonance-based immunosensor with oriented immobilized antibody fragments on a mixed self-assembled monolayer for the determination of staphylococcal enterotoxin B. *Microchim Acta* 2009; 1007.
105. Uniprot [interaktyvus]. Baltymų duomenų bazė. [Žiūrėta 2009-05-16]. Internetinė prieiga: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P51519>>
106. Vaičiūnienė V, Pieškus J, Armalis A. Immune complexes of bovine blood serum and milk associated with bovine leukaemia virus infection. *Biologija* 1995; 1: p. 11-15.
107. Vaughan RD, Guilbault GG. Piezoelectric Immunosensors. *Springer Ser Chem Biosens* 2007; 5: p. 237-280.

108. Vaughan RD, O'Sullivan CK, Guilbault GG. Development of quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Enzyme Microb. Technol.* 2001; 29: p. 635-638.
109. Vetmed [interaktyvus]. USA: School of Veterinary Medicine. [Žiūrėta 2008-11-20]. Internetinė prieiga: <http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-DA/INF-DA_BovineLeukemia.html>
110. Vikholm I. Self-assembly of antibody fragments and polymers onto gold for immunosensing. *Sens. Actuators, B* 2005; 106: p. 311-316.
111. Wang H, Wu J, Li J, Ding Y, Shen G, Yu R. Nanogold particle-enhanced oriented adsorption of antibody fragments for immunosensing platforms. *Biosens. Bioelectron.* 2005; 20: p. 2210-2217.
112. Wang J. Analytical electrochemistry. 2nd ed. New York: Wiley-VCH: 2000; 222 p.
113. Wang XH, Wang S. Sensors and biosensors for the determination of small molecule biological toxins. *Sensors* 2008; 8: p. 6045-6054.
114. OIE [interaktyvus]. World Organisation for animal health. Enzootic bovine leucosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [Žiūrėta 2008-11-20]. Internetinė prieiga: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00051.htm>