



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek
Poslijediplomski sveučilišni studij
Smjer: Analitička kemija

Petra Petrović

**APTASENZOR ZA DETEKCIJU
SARS-COV-2 TEMELJEN NA SERS
SPEKTROSKOPIJI**

Kemijski seminar I

Prema radu: E. Zavyalova et al., *Nanomaterials* **11** (2021) 1394-1407.

Zagreb, 2022 godina.

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
§ 2. ANALITIČKE METODE ZA DETEKCIJU SARS-COV-2 VIRUSA.....	2
2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	2
2.2. Imunoenzimske metode (ELISA).....	3
2.3. Imunokromatografija.....	4
§ 3. APTASENZOR ZA BRZU KVANTITATIVNU DETEKCIJU SARS-COV-2.....	5
3.1. Kemijski senzori.....	5
3.1.1. Biosenzori.....	6
3.1.2. Aptasenzori.....	6
3.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS).....	7
3.2.1. Mehanizmi pojačanja.....	8
3.2.2. SERS supstrati.....	9
3.3. Razvoj aptasenzora za detekciju SARS-CoV-2 temeljenog na SERS spektroskopiji.....	10
3.3.1. Nanočestice srebra (AgNP).....	10
3.3.2. Strukturna karakterizacija aptamera RBD-1C.....	12
3.3.3. Određivanje afiniteta RBD-1C i RBD-1C-sh.....	13
3.3.4. Specifičnost SERS aptasenzora.....	15
§ 4. ZAKLJUČAK.....	17
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	XVIII

§ 1. UVOD

Novi soj koronavirusa, SARS-CoV-2, prvi puta je otkriven u Wuhanu, Kina 2019. godine. Novi virus uzrokovao je globalnu pandemiju akutne respiratorne bolesti prozване COVID-19. Pandemija je osim mnogobrojnih ljudskih žrtava zadala i velik udarac globalnoj ekonomiji, zdravstvenoj zaštiti te promijenila društveni život ljudi. Mnogi zaraženi pacijenti imaju vrlo blage simptome ili su potpuno asimptomatski, ali i dalje virus mogu prenijeti drugima. Simptomi COVID-19 slični su simptomima drugih respiratornih bolesti. Iz tog razloga vrlo je bitna dobra diferencijacija bolesti COVID-19 od bakterijskih respiratornih bolesti te virusnih respiratornih bolesti drugih uzročnika, kao što su virus gripe, adenovirus i drugi.¹

Analitičke metode neizostavan su dio dijagnostike. U praksi se koriste dobro poznate metode poput lančane reakcije polimeraze (PCR), imunoenzimskih metoda (ELISA) te imunokromatografskih metoda. Navedene metode imaju svoje prednosti i mane. Mane se uglavnom odnose na dugotrajno vrijeme analize i kompliciranu pripremu uzoraka (PCR), mogućnost križne reakcije (ELISA) te česte lažno negativne i lažno pozitivne rezultate (imunokromatografija).¹

Zbog izrazito brzog širenja bolesti COVID-19 diljem svijeta postoji velik interes za razvitkom nove, brze, jednostavne i selektivne metode za dijagnostiku respiratornih bolesti pomoću biosenzora. Biosenzori su uređaji koji pretvaraju određenu kemijsku informaciju o uzorku u analitički mjerljiv signal. Osnovni elementi biosenzora su pretvornik signala i biološki element za prepoznavanje (bioreceptor). Postoji više vrsta biosenzora, ovisno o pretvorniku i elementu za prepoznavanje. U ovom radu biti će predstavljen biosenzor temeljen na spektroskopiji površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) i aptamerom kao elementom za prepoznavanje.

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) metoda je vibracijske spektroskopije koja se temelji na pojačanju Ramanovog raspršenja zbog adsorpcije ili kemijskog vezanja analita na nanostrukturiranu površinu metala.²

Aptameri su građeni od nekoliko slijedova nukleinskih kiselina ili peptida koji imaju visok afinitet vezanja za specifične ciljane molekule, kao što su proteini, male molekule i nukleinske kiseline. Koriste se u farmaceutskoj industriji te kao elementi za prepoznavanje u različitim biosenzorima kao zamjena za antitijela.³

§ 2. ANALITIČKE METODE ZA DETEKCIJU SARS-COV-2 VIRUSA

2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

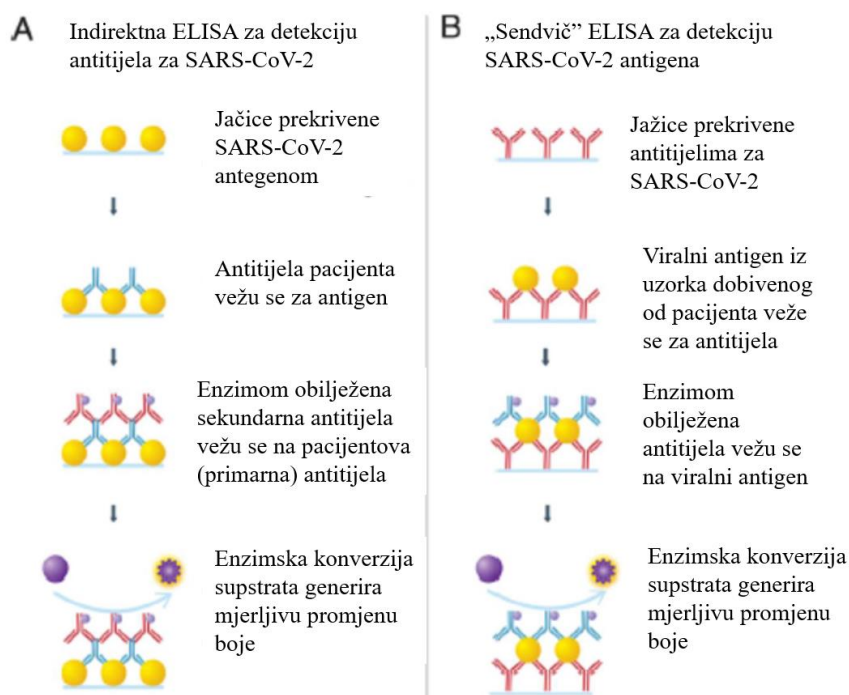
Lančana reakcija polimeraze (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) je metoda kojom se relativno kratki DNA fragmenti umnožavaju u velik broj identičnih kopija.⁴ Metoda PCR u principu je vrlo jednostavna. Dio molekule DNA koji se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama – primerima, koji su komplementarni krajevima DNA od interesa. Opisani primeri su pokretači serije reakcija enzima polimeraze DNA koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac. Veličina sintetiziranog dijela molekule DNA odgovara dužini koju određuju izabrani primeri. Metoda PCR reverzibilne transkripcije (RT-PCR) objedinjuje dvije fleksibilne i robusne metodologije, reverzibilnu transkripciju i lančanu reakciju polimeraze u svrhu stvaranja i umnožavanja cDNA iz RNA ili predložaka mRNA. Molekula RNA se prvo mora prevesti u cDNA kako bi se dobio termostabilan predložak DNA za polimerazu. Upravo ova verzija PCR metode koristi se za detekciju novog koronavirusa. Metoda RT-PCR umnožava i akumulira specifičnu ciljnu sekvencu za detekciju RNA. Umnožavanje se može pratiti u realnom vremenu i to kroz intenzitet fluorescencije reporterske molekule kojom se obilježava ciljna sekvenca. Oligonukleotid se nalazi između dva PCR primera obilježena fluoroforom koji je kovalentno vezan za molekulu koja gasi fluorescenciju. Fluorescencija je inhibirana sve dok su reporterska molekula i molekula koja gasi fluorescenciju dovoljno blizu.⁵

Metoda RT-PCR ovisi o sposobnosti prijenosa ograničene količine genetskog materijala virusa u uzorku. Ova metoda je poznata kao „zlatni standard“ za prepoznavanje SARS-CoV-2.⁵ Uzorci su najčešće slina ili krvni serum. Metoda PCR je pouzdana, osjetljiva i točna. Međutim, priprema uzoraka je dugotrajna i komplicirana, za samo izvođenje analiza potrebno je stručno osoblje, laboratorij opremljen PCR uređajem kao i odvojena prostorija za rukovanje uzorcima. Dodatno, nedostatak je i ukupno vrijeme obrade uzoraka i provedba PCR metode koje bi trebalo biti kraće, a sve u cilju usporavanja širenja koronavirusa u populaciji.¹

2.2. Imunoenzimske metode (ELISA)

Metoda ELISA (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) temelji se na imunoenzimskom testu kojim se određuje prisutnost i količina nekog antigena. Temelji se na specifičnom vezanju antitijela i antigena iz uzorka i visokoučinkovitim biokatalitičkim svojstvima enzima.⁶ Postoji više vrsta metoda ELISA, a to su: indirektna, „sendvič“, konkurentna te višestruka i prijenosna metoda koja koristi mikrotitarske ploče. Testovi mogu biti kvalitativni i kvantitativni, a vrijeme dobivanja rezultata varira od jednog do pet sati.⁵

U slučaju detekcije SARS-CoV-2 virusa, obično se u jažice nanese antigen koji potječe od virusa.¹ Ukoliko su uzorku prikupljenom od pacijenta prisutna antitijela, ona se direktno i specifično vežu za antigen u jažici. Nastali kompleks može se identificirati pomoću sekundarnih antitijela koja su konjugirana s enzimom i vežu se na primarna antitijela iz uzorka. Dolazi do enzima katalizirane konverzije supstrata i mjerljive promjene boje. Testovi ELISA daju očitavanja za sva SARS-CoV-2 antitijela: IgG, IgM i IgA koja nastaju u različitim vremenima napretka infekcije u organizmu.⁷ Metoda ELISA je brza i osjetljiva, može primijeniti i u razvoju brzih seroloških testova za SARS-CoV-2, a shema metode prikazana je na slici 1.⁵ Međutim, korištenje skupih reagensa kao što su antigeni, antitijela i enzimi ograničava upotrebu ove metode u rutinskoj analizi novog koronavirusa. Također, istraživanja su pokazala da često daje lažno pozitivne i lažno negativne rezultate.¹

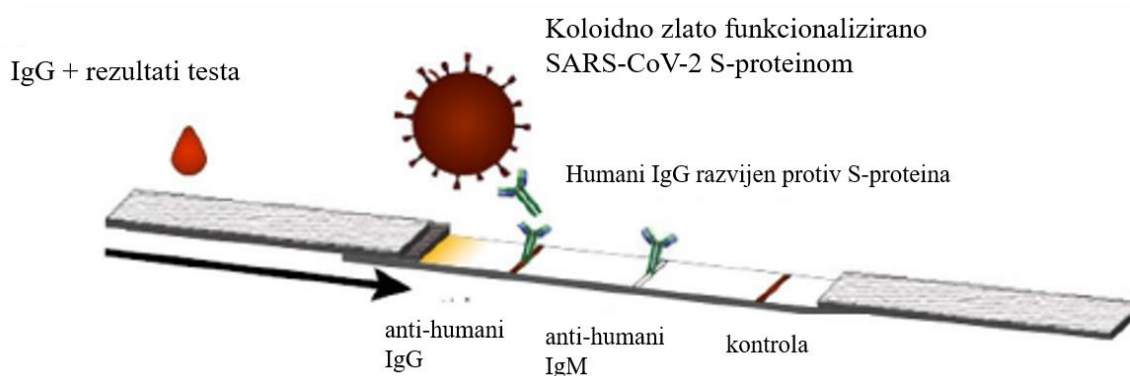


Slika 1. Shema ELISA metode za detekciju SARS-CoV-2

2.3. Imunokromatografija

Imunokromatografija rutinski je u upotrebi već dugi niz godina. 1988. godine na tržište je stavljen prvi imunokromatografski test, a to je bio kućni test na trudnoću.⁷ Izvedba ovakvih testova vrlo je jednostavna. Antigen ili antitijelo specifično za analit imobilizirani su na nitroceluloznu membranu i taj dio predstavlja testnu liniju. Potrebna je i kontrolna linija gdje se nalaze molekule ili čestice koje indiciraju da je uspostavljen kapilarni protok. Ostala mjesta na membrani su blokirana nespecifičnim proteinima s niskom koncentracijom surfaktanta. Sastavni dio je i jastučić od staklenih vlakana obložena nanočesticama zlata dimenzija 20-60 nm ili česticama obojenog lateksa koji su konjugirani s drugim antitijelom ili antigenom specifičnim za analit od interesa. Celulozna membrana uklanja interferencije kao što su eritrociti i ostale molekule koje mogu obojiti membranu. Sve komponente imunokromatografskog testa nalaze se u kućištu koje pruža mehaničku zaštitu osjetljivih komponenti, osigurava ujednačen protok te sprječava isparavanje iz površine membrane tijekom testiranja.⁷

Većina SARS-CoV-2 seroloških testova temelji se na zahvaćanju anti-COVID IgG i/ili IgM antitijela pomoću imobiliziranih anti-humanim IgG i/ili IgM nakon prepoznavanja antitijela za SARS-CoV-2 korištenjem SARS-CoV-2 S-proteina kojim je funkcionalizirano koloidno zlato kako bi se dobio vizualno prepoznatljiv signal. Shema ovakvog imunokromatografskog testa prikazana je na slici 2.⁷ Ovom metodom moguća je detekcija jako niskih koncentracija analita i dobar je alat za brzu detekciju infekcije. Međutim, istraživanja su pokazala relativno visok postotak lažno pozitivnih testova. Pogreške proizlaze iz needuciranosti osoblja o provedbi testova te neprovođenja preporučene procedure.¹

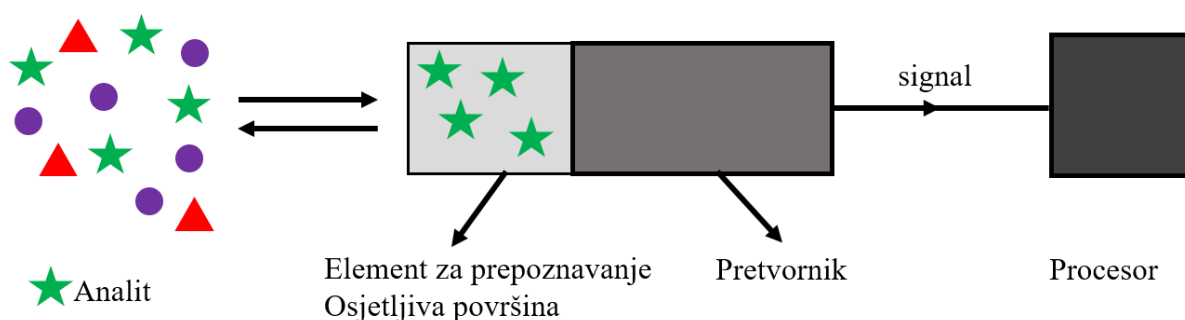


Slika 2. Shema imunokromatografskog testa za detekciju antitijela IgG nastalog kao odgovor na antigen koji potječe od SARS-CoV-2

§ 3. APTASENZOR ZA BRZU KVANTITATIVNU DETEKCIJU SARS-COV-2

3.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji stvaraju odziv na temelju selektivne kemijske reakcije s odgovarajućim analitom.⁸ Koriste se za kvalitativno i kvantitativno određivanje analita, a primjena im je vrlo široka. Koriste se ponajviše u medicini, različitim industrijama te u praćenju onečišćenja okoliša. Senzori su često jednostavne konstrukcije, daju rezultate u kratkom vremenu te za njihovo rukovanje nije potrebno jako stručno i obrazovano osoblje. Shema kemijskog senzora prikazana je na slici 3.



Slika 3. Shema kemijskog senzora.

Najvažnija komponenta kemijskog senzora je osjetljiva površina koju čini element za prepoznavanje. To je dio senzora u kojem se odvija selektivna reakcija s analitom. Pretvornik je komponenta koja fizikalnu ili kemijsku promjenu do koje dolazi uslijed selektivne reakcije pretvara u mjerljivi signal. Pretvornici se dijele na elektrokemijske i optičke pretvornike, piezo-električne uređaje i toplinske senzore. Potreban je i procesor koji obrađuje signal dobiven iz pretvornika. Glavna svojstva svakog kemijskog senzora su selektivnost, područje odziva (linearno područje, granica detekcije), točnost, uvjeti medija koji moraju biti zadovoljeni (pH, temperatura, ionska jakost), vrijeme odziva, vrijeme oporavka i vrijeme uporabe.⁸

3.1.1. Biosenzori

Biosenzori su uređaji koji stvaraju odziv na temelju selektivne reakcije biološkog elementa za prepoznavanje s analitom. Analiti biosenzora mogu biti kemijske ili biološke tvari. Vrijeme odziva biosenzora u pravilu je nešto veće u odnosu na kemijske senzore.⁹

Kao elementi za prepoznavanje koriste se biološki reagensi poput enzima, antitijela, receptora ili aptamera. Enzimi se koriste pročišćeni, u mikroorganizmima ili komadićima tkiva, a djeluju kao biološki katalizatori ili se specifično vežu supstrat. U biosenzorima enzimi imaju katalitičko djelovanje. Antitijela se specifično vežu za odgovarajući antigen i u tu svrhu se koriste kao elementi za prepoznavanje u biosenzorima. Receptori su proteini koji imaju svojstva molekuskog prepoznavanja, a nalaze se unutar lipidnog dvosloja membrane koja okružuje stanicu.

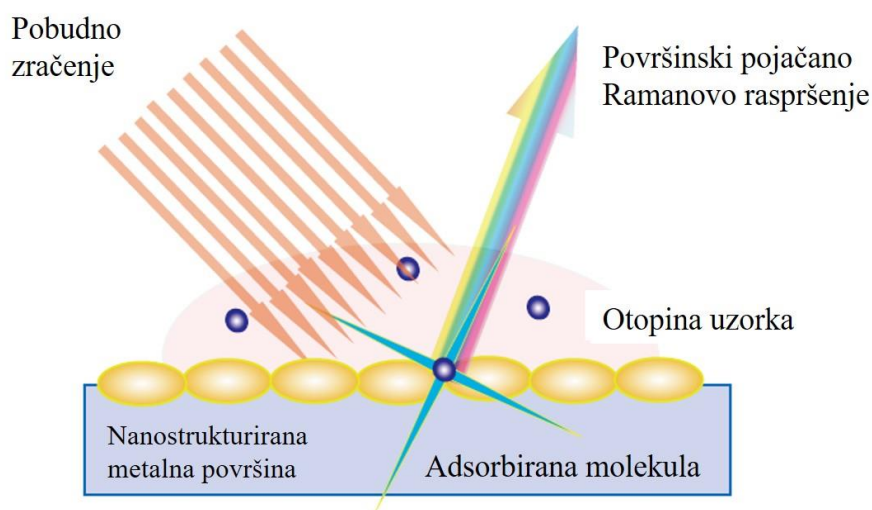
3.1.2. Aptasenzori

Aptasenzori su podvrsta biosenzora koji funkcioniraju na temelju biološkog prepoznavanja. Sadrže jedinstveni element za prepoznavanje, aptamer, spojen na pretvornik za pretvaranje biološke interakcije u mjerljive signale koji se mogu lako obrađivati. Specifičnost aptasenzora je usporediva, a ponekad i bolja od senzora koji koriste antitijela kao elemente za prepoznavanje.¹⁰ Aptasenzori se sve češće koriste za detekciju virusa kao što su virus gripe, adenovirus pa čak i novi koronavirus, SARS-CoV-2.¹

Aptameri su kratki jednolančani oligonukleotidi koji se mogu selektivno vezati za ciljane molekule poput proteina, malih molekula i nukleinskih kiselina.¹¹ To su kemijski sintetizirane nekanonske nukleinske kiseline koje se koriste u farmaceutskoj industriji te kao elementi za prepoznavanje u različitim biosenzorima. Kada se uspoređuju s antitijelima imaju mnoge prednosti, a to su prvenstveno kraće vrijeme i niža cijena proizvodnje, lako se modificiraju u svrhu konstruiranja biosenzora i mogu se koristiti kao reporteri signala, linkeri i receptori.¹¹ Metode detekcije temeljene na aptamerima razvijaju se svakodnevno kako bi se prevladali problemi kao što su visoka cijena proizvodnje antitijela i etički problemi.

3.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS)

Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) je metoda kojom se opaža povećanje intenziteta Ramanovog raspršenja za molekule koje se nalaze u neposrednoj blizini ili su adsorbirane na nanostrukturiranu površinu metala kao što je prikazano na slici 4.^{2, 12}



Slika 4. Shema SERS efekta za molekulu adsorbiranu na nanostrukturiranu metalnu površinu

Zbog velikog pojačanja signala koji omogućuje direktnu identifikaciju jedne molekule, ova metoda se smatra jako osjetljivom. U odnosu na klasičnu Ramanovu spektroskopiju intenzitet raspršenja zračenja povećava se 10^4 do 10^6 puta, a u nekim slučajevima čak i 10^7 do 10^{10} puta.¹³ Do pojačanja dolazi zbog plazmonske rezonancije metalnog supstrata. Kao SERS supstrati najčešće se koriste zlato i srebro zbog svoje stabilnosti, dok su željezo i bakar manje zastupljeni zbog stvaranja slojeva oksida na površini što mijenja njenu prirodu, a i predstavlja fizičku barijeru između analita i površine metala pa se oni ne mogu dovoljno približiti. Uspješnost SERS eksperimenta ovisi o vrsti metala, prirodi hrapave površine, strukturi i svojstvima analita, načinu adsorpcije analita na površinu metala te frekvenciji i snazi pobudnog zračenja.

3.2.1. Mehanizmi pojačanja

Mehanizam površinski pojačanog Ramanovog raspršenja još uvijek nije sasvim razjašnjen. Postoje dvije jednakovaljane teorije koje objašnjavaju fenomen pojačanja raspršenja, a to su elektromagnetski i kemijski mehanizam. Elektromagnetski mehanizam temelji se na plazmomskoj rezonanciji dok se kemijski mehanizam temelji na prijenosu naboja s metala na molekulu i/ili molekule na metal.²

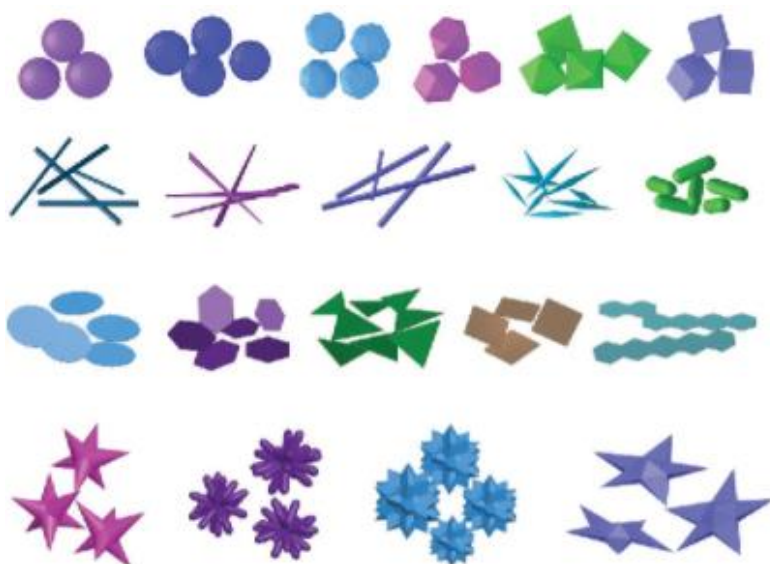
Površina metala prekrivena je vodljivim elektronima koju se mogu slobodno kretati uzduž površine prilikom čega nastaje elektronski oblak koji se proteže na određenoj udaljenosti od same površine.¹⁴ Kada elektromagnetsko zračenje stupi u interakciju s površinom metala dolazi do osciliranja elektrona i polarizacije nanočestica metala. Ove oscilacije elektrona nazivaju se površinski plazmoni. Rezonancijom oscilacija valentnih elektrona metala s frekvencijom upadnog zračenja nastaju lokalizirani površinski plazmoni koji uzrokuju pojačanje elektromagnetskog polja u blizini metalne površine. Elektromagnetsko polje koje je nastalo je vrlo jako te ono inducira dipol u molekulama koje se nalaze u blizini, uslijed čega se povećava Ramanovo raspršenje adsorbiranih molekula. Na mjestima gdje jedan plazmon postaje zajednički plazmon dviju ili više nanočestica dolazi do stvaranja takozvanih „vrućih mjesta“ (engl. *hot spots*) na kojima dolazi do dodatnog pojačanja Ramanovog raspršenja. To se događa na vrhovima, rubovima i dodirnim točkama nanočestica. Elektromagnetski mehanizam ne zahtijeva direktnu vezu između analita i metalne površine kako bi se opazio SERS signal, već je bitno smještanje molekula u blizini površine metala.²

Iako je elektromagnetski mehanizam dominantan u ukupnom pojačanju Ramanovog raspršenja, njemu pridonosi i kemijsko pojačanje koje se još naziva i mehanizmom prijenosa naboja. Ono zahtijeva kemijsku kovalentnu vezu između molekule analita i metalnog supstrata. Pretpostavlja se da nastankom ove veze nastaju nove površinske vrste koje čine analit i neki atomi metalne površine. Upravo zbog toga moguć je prijenos naboja s metalne površine na molekule analita i obrnuto.² Doprinos kemijskog pojačanja Ramanovog raspršenja nije dominantan u ukupnom pojačanju zato što najveće moguće kemijsko pojačanje može iznositi 10^2 puta u odnosu na klasično Ramanovo raspršenje. Također, kemijsko pojačanje ograničeno je samo na prvi sloj molekula analita vezanih na metal.

3.2.2. SERS supstrati

Za uspješno dobivanje SERS signala najvažniji je odabir dobrog SERS supstrata koji mora imati hrapavu površinu. SERS supstrati dijele se u tri glavne kategorije: suspenzije metalnih nanočestica, metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim nosačima i nanostrukture sintetizirane direktno na čvrstim nosačima postupkom nanolitografije.¹⁵

Najčešće se koriste upravo suspenzije metalnih nanočestica. Sinteza se uglavnom provodi redukcijom iona zlata ili srebra u otopini uz korištenje reducensa kao što su natrijev citrat, hidrazin ili hidrosilamin hidroklorid. Veličina nanočestica može se kontrolirati koncentracijom i jačinom reducirajućeg reagensa. U procesu nukleacije atomi metala se grupiraju i nastaju klasteri iz kojih nastaje kristala jezgra koju nazivamo sjemenom. Sjeme nanočestica dalje raste do konačne veličine nanočestica. Moguće je sintetizirati nanočestice različitih oblika koji su prikazani na slici 5.^{15, 16} Oblik nanočestica kontrolira se dodatkom različitih surfaktanata tijekom sinteze koji uzrokuju promjenu površinske energije i kontroliraju agregaciju nanočestica. Surfaktanti stabiliziraju specifične plohe kristala u rastućoj nanostrukтури i tako omogućavaju kontrolirani rast u toj ravnini. Moguće je sintetizirati sferne nanočestice, nanočestice u obliku štapića, kockica, trokutića, pločica i zvjezdica. Oblik i veličina nanočestica utječu na pojačanje Ramanovog raspršenja i upravo zato je za određeni analit vrlo bitno odabrati nanočestice koje najbolje raspršuju zračenje.

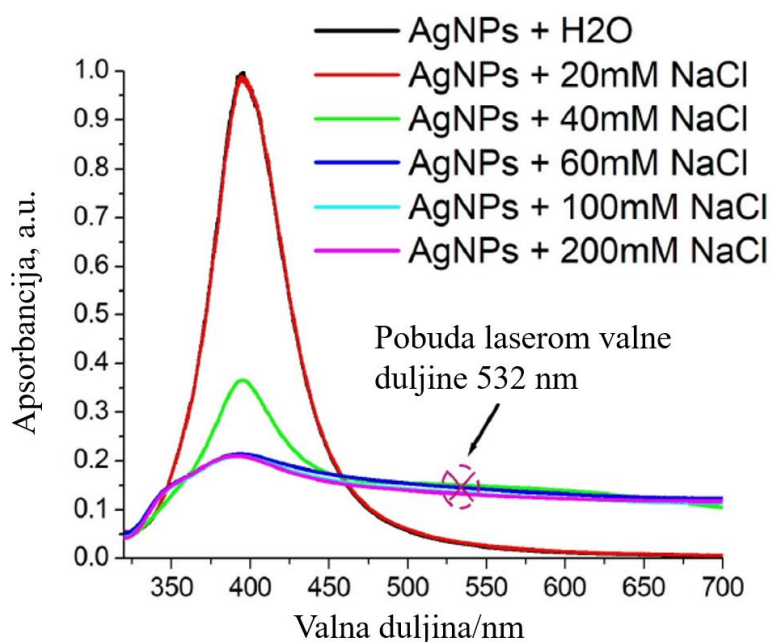


Slika 5. Različiti oblici metalnih nanočestica

3.3. Razvoj aptasenzora za detekciju SARS-CoV-2 temeljenog na SERS spektroskopiji

3.3.1. Nanočestice srebra (AgNP)

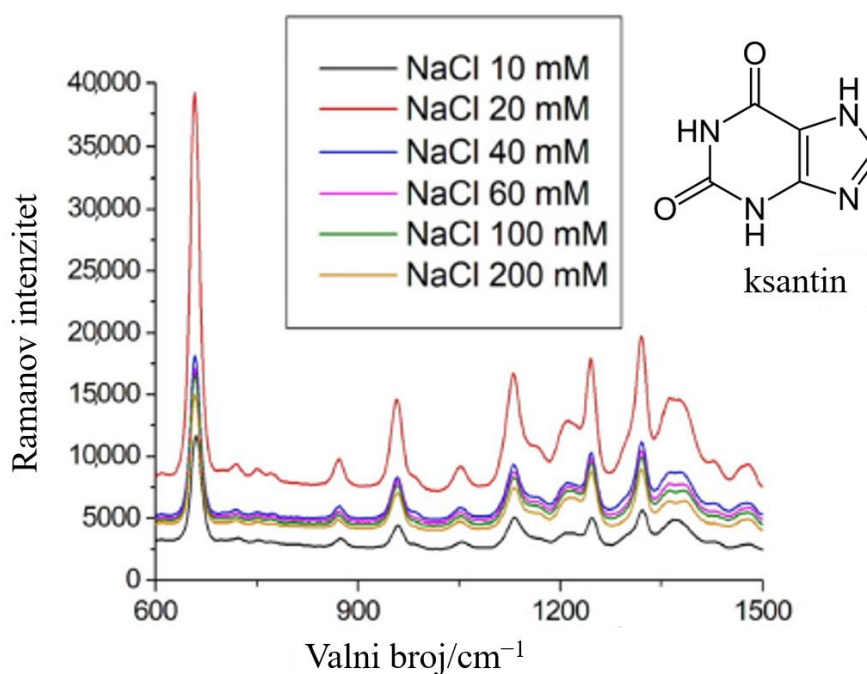
U razvoju aptasenzora za detekciju SARS-CoV-2 temeljenog na SERS spektroskopiji korišten je koloid srebrnih nanočestica (AgNP) u svrhu SERS supstrata.¹ Sinteza koloida provedena je redukcijom srebrovog nitrata s hidroksilamin hidrokloridom prema poznatoj proceduri.¹⁷ Dobiveni koloid bio je žuto-smeđe boje, a dobivene nanočestice bile su sfernog oblika. Na površini nanočestica nalazili su se kloridni ioni čije međusobno elektrostatsko odbijanje održava nanočestice fizički razdvojenima, a na taj način stabilizira se koloidna suspenzija. Svaki SERS supstrat potrebno je okarakterizirati. U tu svrhu snimljen je apsorpcijski spektar iz kojeg je određena valna duljina plazmonske rezonancije koja je iznosila 394 nm. Snimljeni su i apsorpcijski spektri pri različitim ionskim jakostima otopine koji su prikazani na slici 6.¹



Slika 6. Apsorpcijski spektri koloida AgNP različitih ionskih jakosti

Skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) određena je veličina nanočestica. Ustanovljeno je da su nanočestice veličine između 44 i 55 nm. Izmjeren je i ζ -potencijal AgNP koji je iznosio -54 ± 18 mV. Jako negativan ζ -potencijal ukazuje kako SERS supstrat neće ostvarivati interakcije s aptamerom koji je također jako negativno nabijen. Negativan naboj aptamera proizlazi iz fosfatne okosnice oligonukleotida koji je korišten.

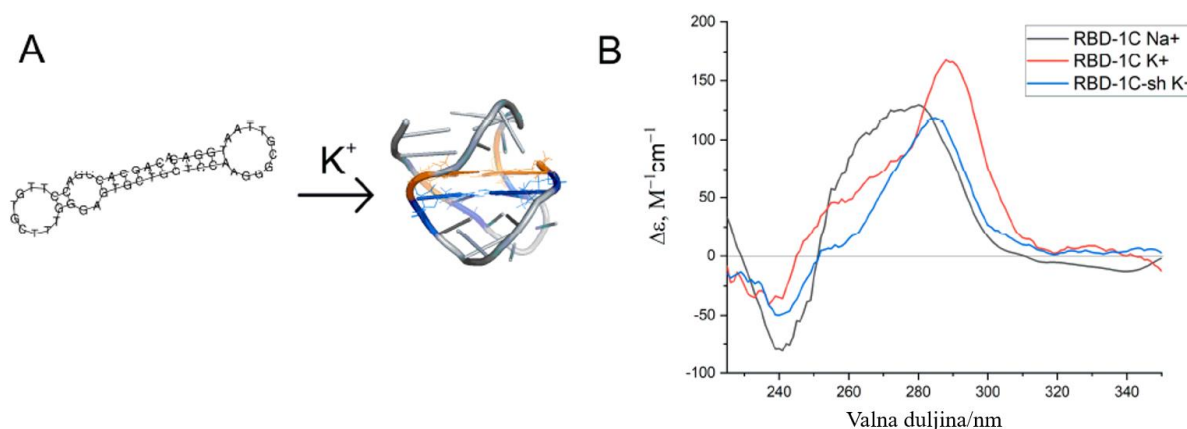
Purinska baza, ksantin, odabrana je kao modelna molekula u svrhu ispitivanja pojačanja Ramanovog raspršenja priređenog koloida AgNP, a rezultati su prikazani na slici 7.¹ Vidljivo je da su vrpce koje potječu od vibracija molekule ksantina najintenzivnije u otopini NaCl koncentracije 20 mmol/L.



Slika 7. SERS spektri ksantina ($c = 2 \mu\text{mol/L}$) u otopinama različite ionske jakosti

3.3.2. Strukturna karakterizacija aptamera RBD-1C

Otkriven je aptamer koji se selektivno veže za S-protein SARS-CoV-2, konkretno za domenu glikoproteina koja veže receptore (engl. *receptor-binding domain*, RBD).¹⁸ Predložena je struktura aptamera: građen je od dva motiva ukosnice koji su međusobno povezani krajevima (slika 8).¹ Kako bi se dodatno istražila struktura snimljeni su spektri cirkularnog dikroizma. Bilo je potrebno identificirati moguće topologije smotane strukture aptamera. Iz spektara CD (slika 8)¹ vidljivi su različiti motivi: pozitivan pik pri 290 nm, rame pri 254 nm i blago negativan pik pri 230 nm. Ovakav spektar CD ne ukazuje samo na dupleks – slični spektri uočeni su za antiparalelne G-kvadruplekse s dijagonalnom petljom.¹ Spektar CD aptamera RBD-1C u natrijevog puferu odgovara strukturi dupleksa DNA. Iz opisanih rezultata zaključeno je kako je prisutna ravnoteža između dvije navedene konformacije.



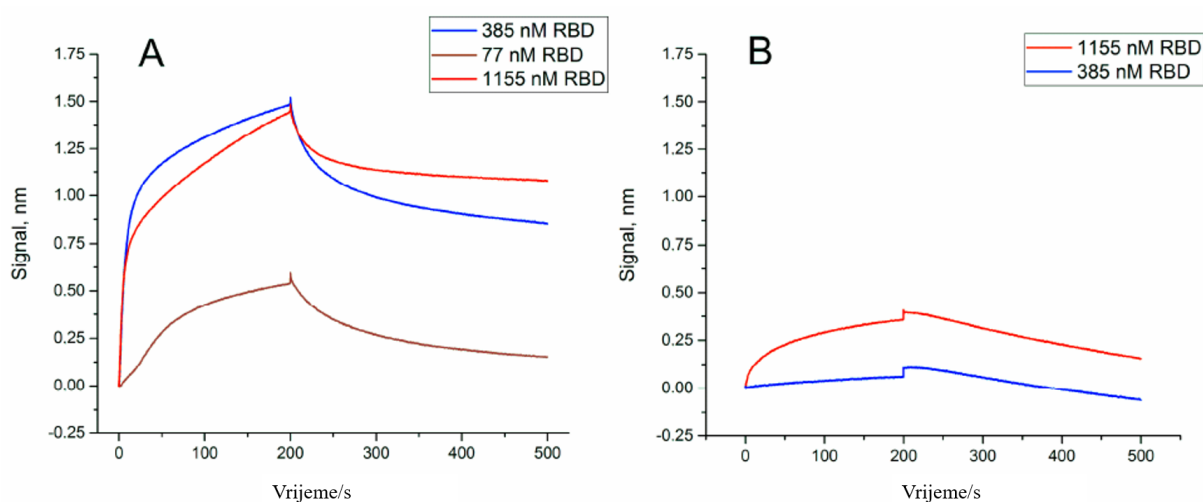
Slika 8. A) Predložena struktura aptamera RBD-1C; B) Spektri cirkularnog dikroizma RBD-1C i RBD-1C-sh u otopinama NaCl i KCl ($c = 140 \text{ mmol/L}$)

Provedeni su i eksperimenti na skraćenom analogu RBD-1C kako bi se utvrdilo je li G-kvadrupleks odgovoran za prepoznavanje S-proteina u ovom aptameru.¹ Korišten je oligonukleotih istog slijeda kao RBD-1C, ali bez 17 nukleotida koji su uklonjeni s 5' kraja – RBD-1C-sh. Iz slike 8¹ vidljivo je da spektar CD skraćenog oligonukleotida RBD-1C-sh slični spektru CD aptamera RBD-1C.

3.3.3. Određivanje afiniteta RBD-1C i RBD-1C-sh

Afinitet RBD-1C prema rekombinantnom proteinu određen je ranije¹⁸, ali eksperiment je bilo potrebno ponoviti i u ovom istraživanju. Prvenstveno zato što je trebalo odrediti koji dio aptamera je odgovoran za selektivno prepoznavanje. Također, osim afiniteta prema S-proteinu SARS-CoV-2 određen je i afinitet prema cijelom virusu.¹

U svrhu određivanja afiniteta, određene su kinetičke konstante asocijacije i disocijacije kompleksa RBD-S-protein uz korištenje interferometra. Kinetičke konstante izračunate su iz eksponencijalnih aproksimacija dobivenih krivulja. Dobiveni senzogrami prikazani su na slici 9¹, a izračunati parametri u tablici 10¹. Kao što je vidljivo iz rezultata, skraćena verzija aptamera (RBD-1C-sh) ima dosta višu konstantu disocijacije (330 ± 60 nmol/L) što ukazuje na nisko specifično vezanje. Dobiveni rezultat ukazuje da je upravo jedinstvena prostorna struktura RBD-1C aptamera presudna za visok afinitet prema S-proteinu SARS-CoV-2.

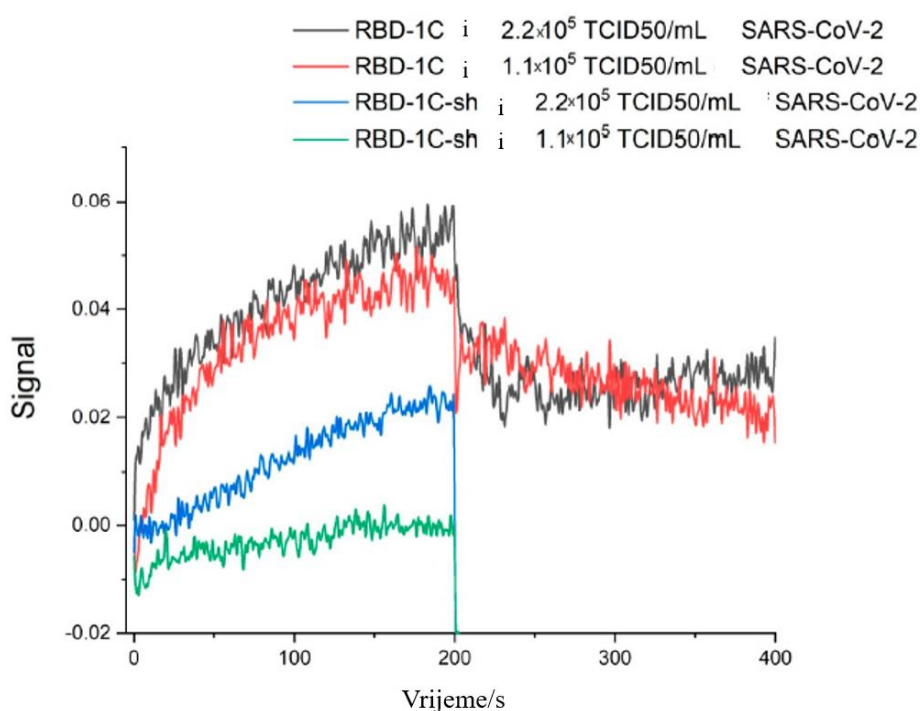


Slika 9. Senzogrami interakcija između RBD S-poteina i oligonukleotida: A) RBD-1C; B) RBD-1C-sh

Tablica 1. Parametri kompleksa S-proteina s RBD-1C i RBD-1C-sh – kinetičke konstante asocijacije (k_a) i disocijacije (k_d) te ravnotežne konstante disocijacije (K_d)¹

Aptamer	k_a ($\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (mol/L)
RBD-1C	$(1,7 \pm 0,8) \times 10^5$	$(2,17 \pm 0,02) \times 10^{-3}$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
RBD-1C-sh	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$	$(5,6 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$(3,3 \pm 0,6) \times 10^{-7}$

Osim afiniteta prema RBD S-proteina, određen je i afinitet aptamera i njegove skraćene verzije prema cijelom virusu. Kao što je vidljivo iz rezultata na slici 10¹, aptamer RBD-1C pokazao je odlične krivulje za obje korištene koncentracije virusa SARS-CoV-2 (udio proteina proporcionalan je broju virulentnih čestica i izražen kao TCID50). Skraćena verzija aptamera, RBD-1C-sh pokazuje nisko specifično vezanje kao i u slučaju izoliranog S-proteina. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da je aktivna komponenta aptamera motiv DNA ukosnice, dok su G-kvadrupleksi samo nisko aktivni dodatci strukturi.¹

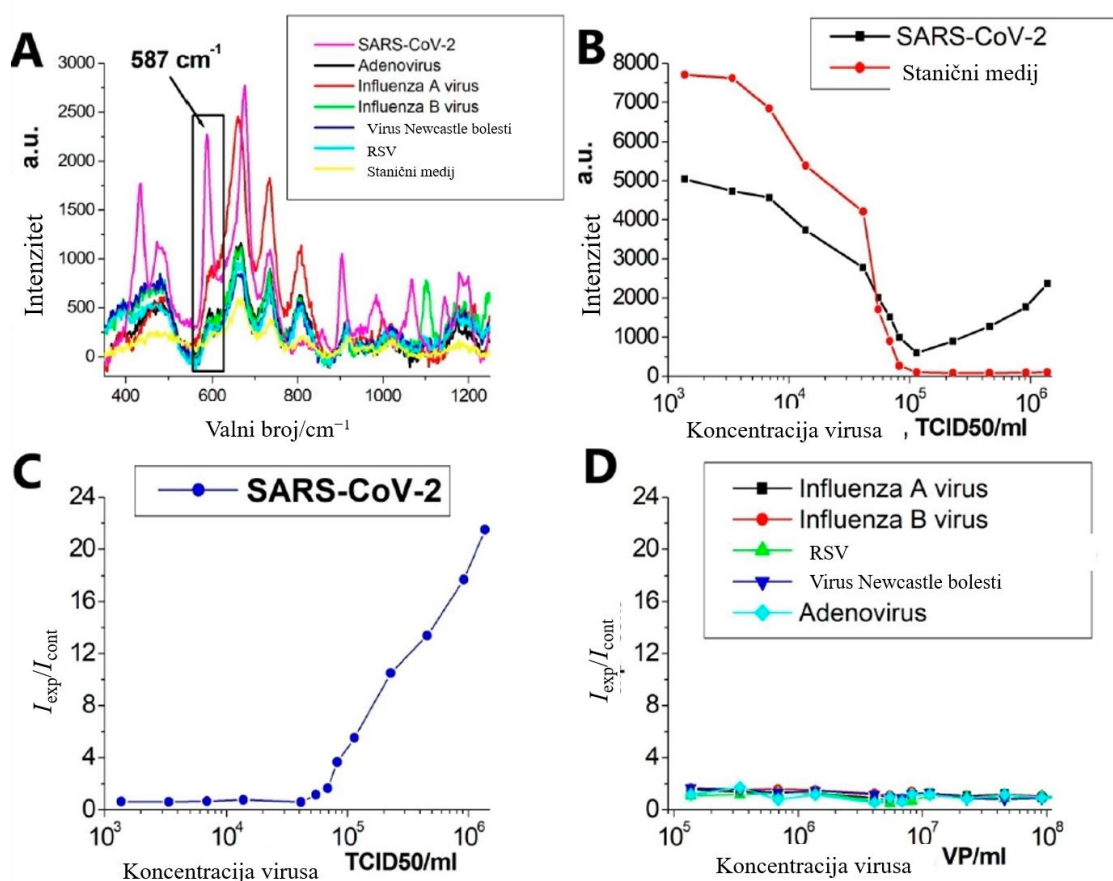


Slika 10. Senzogrami interakcija između SARS-CoV-2 virusa i imobiliziranih oligonukleotida RBD-1C i RBD-1C-sh

3.3.4. Specifičnost SERS aptasenzora

U svrhu određivanja specifičnosti razvijenog SERS aptasenzora provedeni su eksperimenti s različitim virusima. Osim SARS-CoV-2 korišteni su virusi influenza A i influenza B, adenovirus, virus koji uzrokuje Newcastle bolest (ND) kod peradi te virus koji uzrokuje uobičajene prehlade (RSV). Za svaki virus istražena je koncentracijska ovisnost SERS signala. Kao slijepi uzorak korišten je medij u kojem su čuvane stanice.¹

Aptamer je fluorescentno obilježen molekulom BODIPY koju zovemo „Raman aktivnom bojom“. Takvi spojevi široko se koriste kao reporterske molekule. U SERS spektrima prati se obično jedna vrpca koja potječe od vibracija reporterske molekule koje su odabrane upravo zbog svojstva da vrlo jako raspršuju zračenje.¹⁹ Praćen je intenzitet vrpce pri 587 cm^{-1} koja potječe od vibracija molekule BODIPY. Iz dobivenih SERS spektara određena je koncentracijska ovisnost intenziteta signala vrpce pri 587 cm^{-1} (slika 11).¹

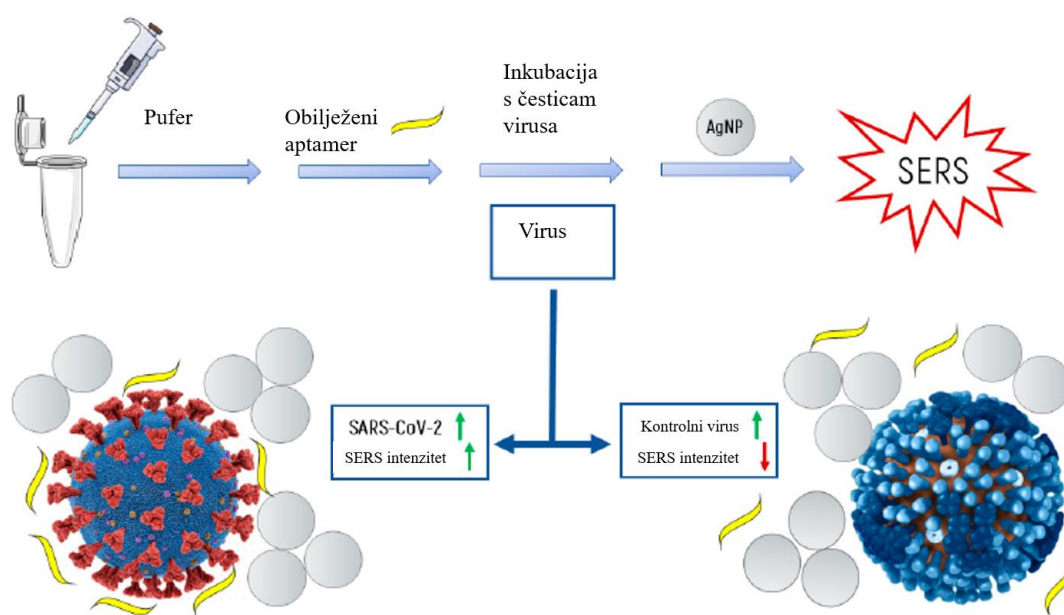


Slika 11. A) SERS spektri SARS-CoV-2, staničnog medija i kontrolnih virusa; B) Ovisnost intenziteta vrpce pri 587 cm^{-1} o koncentraciji SARS-CoV-2 i staničnog medija; C) Koncentracijska krivulja SARS-CoV-2; D) Koncentracijske krivulje kontrolnih virusa

Iz SERS spektara (slika 11A)¹ vidljivo je da je vrpca pri 587 cm^{-1} jasno izražena i vrlo intenzivna u spektru SARS-CoV-2 dok je to područje spektra potpuno drugačije u slučaju kontrolnih virusa i slijepog uzorka. Općenito, SERS spektar SARS-CoV-2 dobiven kao odziv razvijenog aptasenzora ima značajne razlike u području 400-500, 587 i 950-1100 valnih brojeva. Osim pojave novih vrpca spektri se razlikuju i u intenzitetima uočenih vrpca.

Iz literature je poznato da srebrne nanočestice stvaraju vrlo jake interakcije s površinskim proteinima virusa pri visokim ionskim jakostima.²⁰ Pri tome nastaje agregati virusnih čestica. S povećanjem koncentracije proteina dolazi do agregacije nanočestica pri čemu nastaju „vruća mjesta“, nehomogenosti u elektromagnetskom polju s vrlo visokom lokalnom gustoćom na površini. Uočeno je opadanje SERS signala pri 587 cm^{-1} s povećanjem koncentracije nespecifičnih virusa, dok u slučaju SARS-CoV-2 intenzitet vrpce raste. Razlog tomu su značajne razlike u broju reporterskih molekula u blizini nespecifičnih čestica virusa i SARS-CoV-2.¹

Slika 12¹ prikazuje shemu eksperimenta i objašnjava princip na kojem funkcionira razvijen SERS aptasenzor. Ciljani virus (SARS-CoV-2 virion, lijevo na slici) akumulira više obilježenih aptamera zbog ranije opisanih specifičnih interakcija koje ostavaruju S-protein virusa i aptamer. S druge strane, kontrolni virusi (npr. virion influenza A virusa, desno na slici) vežu manje aptamera. Opisano rezultira povećanjem SERS intenziteta s povećanjem koncentracije SARS-CoV-2 i smanjenjem SERS intenziteta u slučaju kontrolnih virusa.¹



Slika 12. Shema eksperimenta i generiranja SERS signala

§ 4. ZAKLJUČAK

Infekcija SARS-CoV-2 virusom ima mnogo vrlo sličnih simptoma kao infekcije uobičajenih respiratornih virusa i upravo je to razlog otežanog dijagnosticiranja bolesti dovoljno rano. Kako bi se infekcija što prije dijagnosticirala, a time usporilo napredovanje globalne pandemije, potrebno je razviti jednostavnu i jeftinu metodu za brzu detekciju SARS-CoV-2 virusa.

Mnoge analitičke metode koriste se u tu svrhu: PCR, ELISA i imunokromatografija. Ove metode imaju nedostatke koji uključuju predugo vrijeme analize, upotrebu skupe instrumentacije i reagensa te nedopustive lažno pozitivne i lažno negativne rezultate. Kako bi se navedeni nedostaci smanjili, svakodnevno se razvijaju nove metode. Jedna od njih je biosenzor koji kao metodu detekcije signala koristi SERS spektroskopiju, visokoosjetljivu metodu kojom je moguće detektirati vrlo niske koncentracije analita. SERS se temelji na pojačanju raspršenja zračenja za molekule koje se nalaze u neposrednoj blizini ili su adsorbirane na nanostrukturiranu površinu metala. U tu svrhu najčešće se koriste koloidne suspenzije nanočestica srebra i zlata. Srebrne nanočestice korištene su kao SERS supstrat u provedenom istraživanju koje je obrađeno u okviru ovog seminara.

U opisanom istraživanju razvijen je aptasenzor, biosenzor koji koristi aptamer kao element za prepoznavanje. Aptameri su odličan alat u konstruiranju ovakvih biosenzora budući da je njihova proizvodnja brža i jeftinija od proizvodnje antitijela, a osjetljivost im je usporedna ili čak bolja u usporedbi s antitijelima. Razvijena metoda je vrlo jednostavna budući da se sastoji od samo jednog koraka i zahtjeva minimalnu pripremu uzorka te vrlo brza, rezultati su dobiveni nakon samo 7 minuta.¹ Specifičnost često predstavlja problem u dijagnostici i daljnjoj terapiji pacijenata. U svim postojećim metodama detekcije prisutan je kompromis između osjetljivosti i specifičnosti. U idealnoj situaciji i dijagnostička osjetljivost i specifičnost iznosile bi 100%. Međutim, namjera da se poveća dijagnostička osjetljivost gotovo uvijek uzrokuje smanjenje dijagnostičke specifičnosti. Za testove kod kojih su lažno pozitivni rezultati nedopustivi, potrebna je visoka dijagnostička specifičnost. Potrebno je naglasiti da što više koraka, materijala i opreme nova metoda zahtjeva veći je stupanj križne reaktivnosti u takvom pristupu. Razvijeni aptasenzor temeljen na SERS spektroskopiji pokazuje odličnu selektivnost u brznoj detekciji SARS-CoV-2 u prisutnosti kontrolnih virusa. Provode se daljnja istraživanja u svrhu poboljšanja metode i usavršavanja dizajna samog aptasenzora.¹

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. E. Zavyalova et al., *Nanomaterials* **11** (2021) 1394–1407.
2. S. Schückler, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
3. S. M. Kim, J. Kim, S. Noh, H. Sohn, T. Lee, *BioChip J.* **14** (2020) 327–339.
4. K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Biotechnology* **24** (1986) 17–27.
5. I. H. Alsohaimi, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **35** (2021) 196–207.
6. Q. Zhao, D. Lu, G. Zhang, D. Zhang, X. Shi, *Talanta* **223** (2021) 121722–121738.
7. E. Ernst, P. Wolfe, C. Stahura, K. A. Edwards, *Talanta* **224** (2021) 121883–121897.
8. A. Ivaska, J. Bobacka, *Process Analysis Electroanalytical Techniques, Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2019, str. 384–388.
9. H. Bi, X. Han, *Chemical, Gas, and Biosensors for Internet of Things and Related Applications*, Elsevier, 2019, 147–160.
10. Y. Zhao, K. Yavari, J. Liu, *Trends Anal. Chem.* **146** (2022) 116480–116490.
11. S. M. Kim, J. Kim, S. Noh, H. Sohn, T. Lee, *BioChip J.* **14(4)** (2020) 327–339.
12. <https://www.stjapan.de/accessories-1/raman-sers-substrates/> (datum pristupa 15. ožujka 2022.)
13. B. P. Kafle, *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*, Elsevier, 2019, str. 245–260.
14. E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, Elsevier, 2009.
15. P. A. Mosier-Boss, *Nanomaterials* **7** (217) 142–171.
16. Z. Wu, S. Yang, W. Wu, *Nanoscale* **8(3)** (2016) 1237–1259.
17. A. N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 5723–5727.
18. Y. Song et al., *Anal. Chem.* **92** (2020) 9895–9900.
19. K. Nishi, S. Isobe, Y. Zhu, R. Kiyama, *Sensors* **15** (2015) 25831–25867.
20. L. Sepunaru, B. J. Plowman, S. V. Sokolova, I. V. Kukshkin, *JETP Lett.* **105** (2017) 677–681.