

Aptasenzor za detekciju SARS-CoV-2 temeljen na SERS spektroskopiji

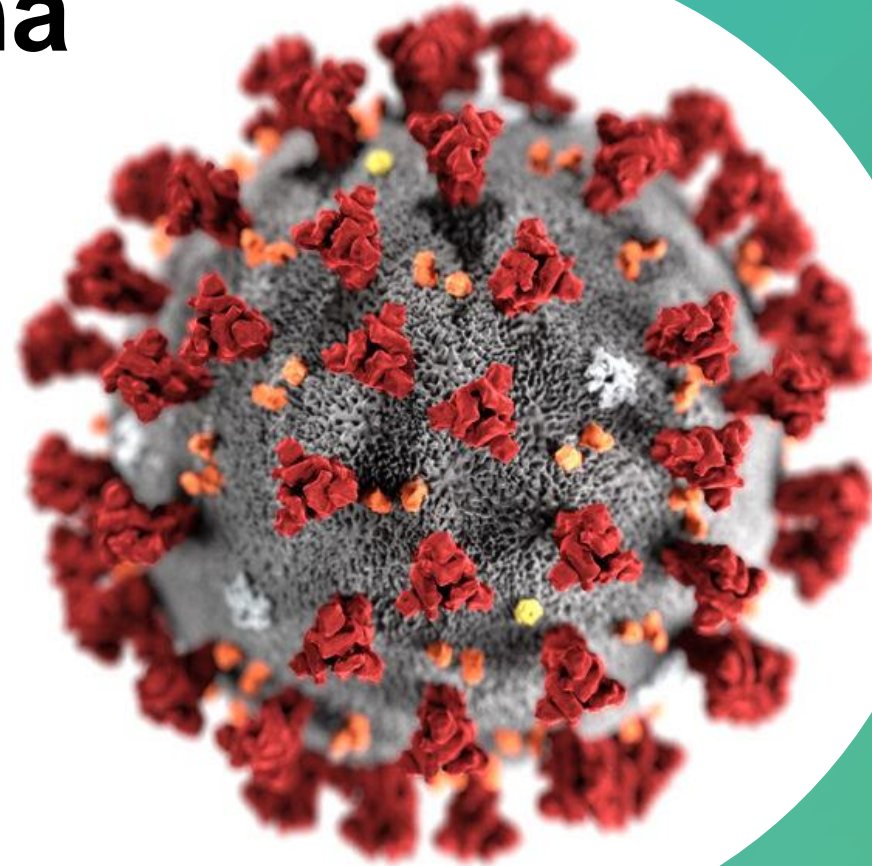
Prema radu:

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

Petra Petrović, mag. chem.

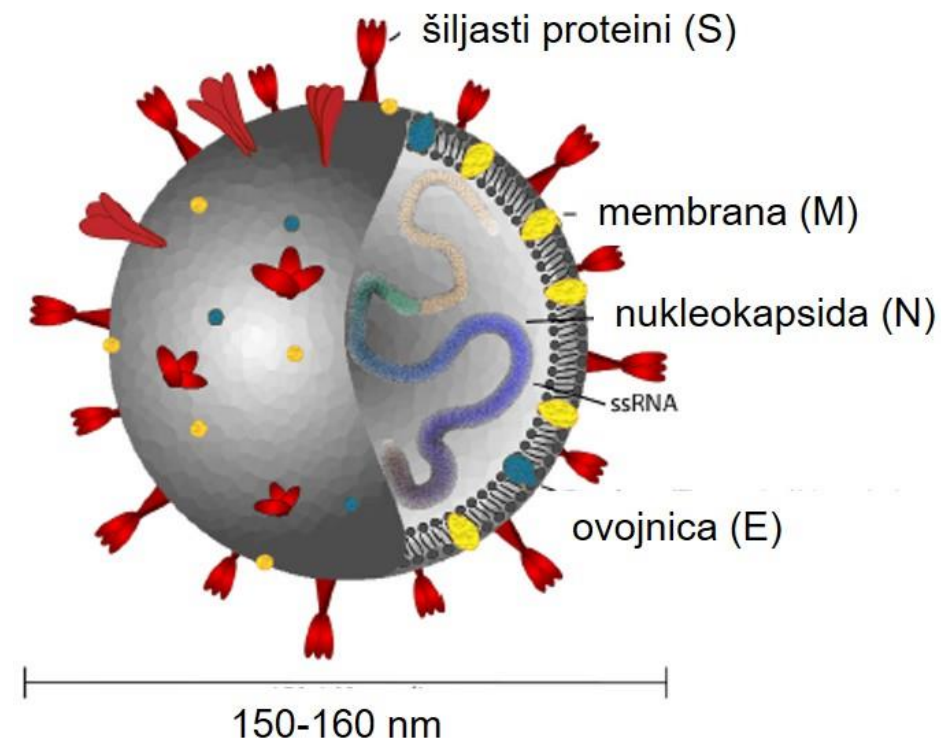
Kemijski seminar 1

Zagreb, 27.04.2022.



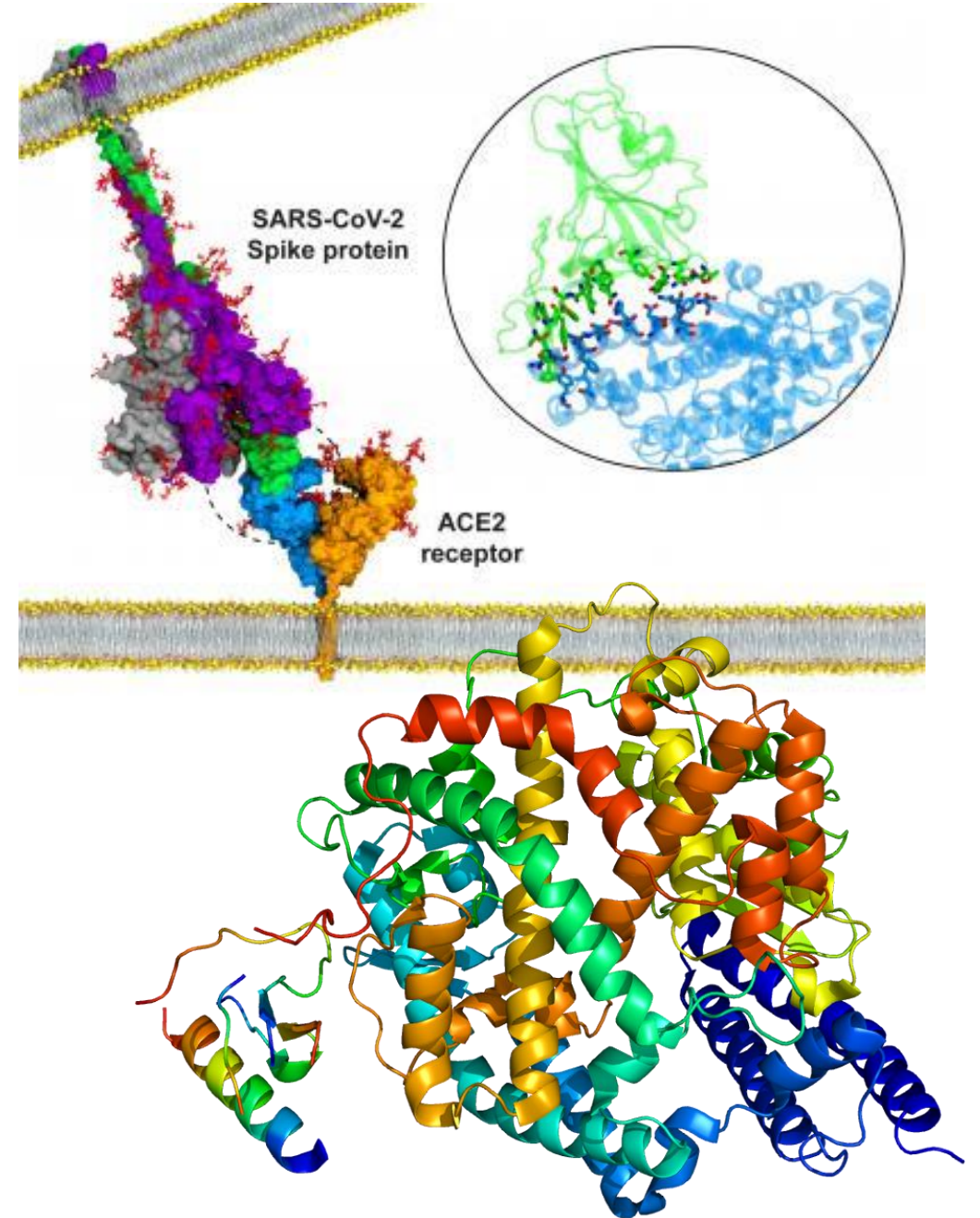
SARS-CoV-2

- novi soj koronavirusa otkriven u Kini 2019. godine
- najčešći simptomi zaraze: povišena temperatura, umor, kašalj, otežano disanje, bolovi u mišićima, gubitak osjeta okusa i/ili mirisa
- neizostavni dio dijagnostike – analitičke metode
- interes za razvitkom novih, bržih, jednostavnijih i pouzdanijih metoda detekcije – kemijski senzori
- građa: nukleokapsida (N), membrana (M), ovojnica (E) i šiljasti proteini (S) → S i N proteini kao najčešće korišteni antigeni u dijagnostici



S-PROTEIN SARS-CoV-2

- S-proteini su građeni od S1 i S2 podjedinica
- S1 – distalni dijelovi čine domenu za vezanje na receptore stanice domaćina
- S2 – provodi fuziju s membranom stanice domaćina
- SARS-CoV-2 veže se na receptor za angiotenzin konvertirajući enzim 2 (ACE-2) – transmembranski enzim ljudskih stanica – metaloenzim (sadrži cink)
- vezanje S1 podjedinice S-proteina za ACE-2 receptor na površini stanica rezultira endocitozom i translokacijom virusa i enzima u endosome stanice



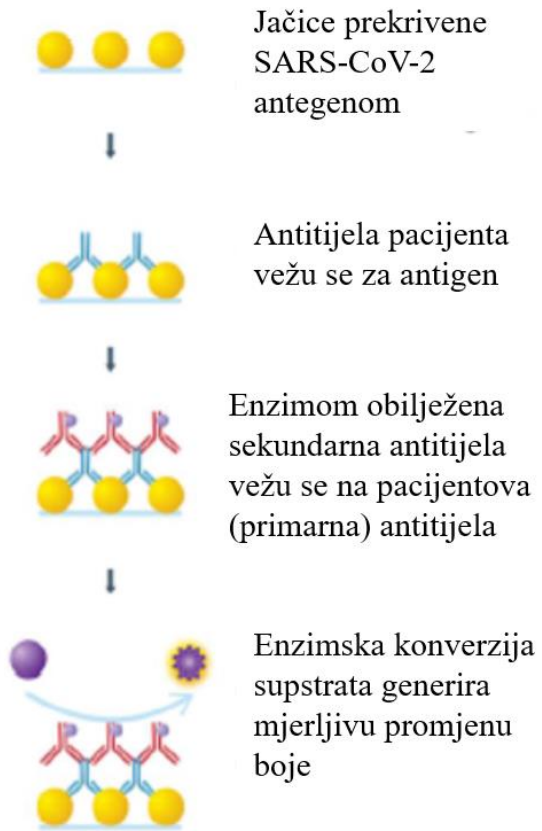
LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

- relativno kratke DNA fragmente umnožava u velik broj identičnih kopija
- RT-PCR – metoda PCR reverzibilne transkripcije – molekula RNA prvo se prevodi u DNA koja služi kao termostabilan predložak za polimerazu
- umnožavanje moguće pratiti u realnom vremenu – praćenje intenziteta fluorescencije reporterske molekule kojom se obilježava ciljna sekvenca
- „zlatni standard” za prepoznavanje SARS-CoV-2
- dugotrajna priprema uzoraka, potrebno stručno osoblje i instrumentacija, dugo ukupno vrijeme obrade uzoraka i provedba PCR metode

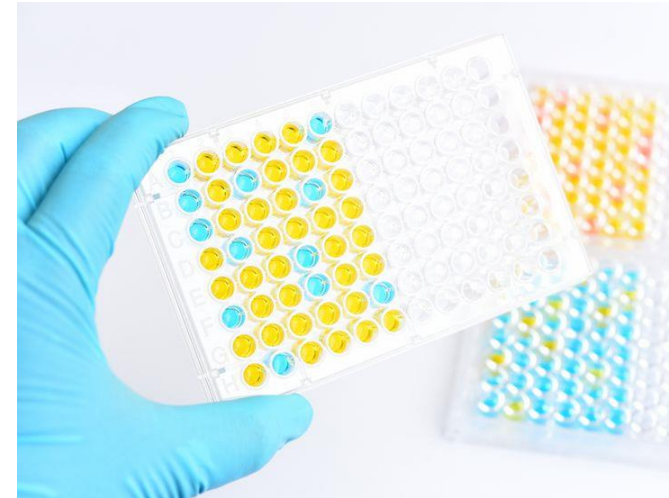
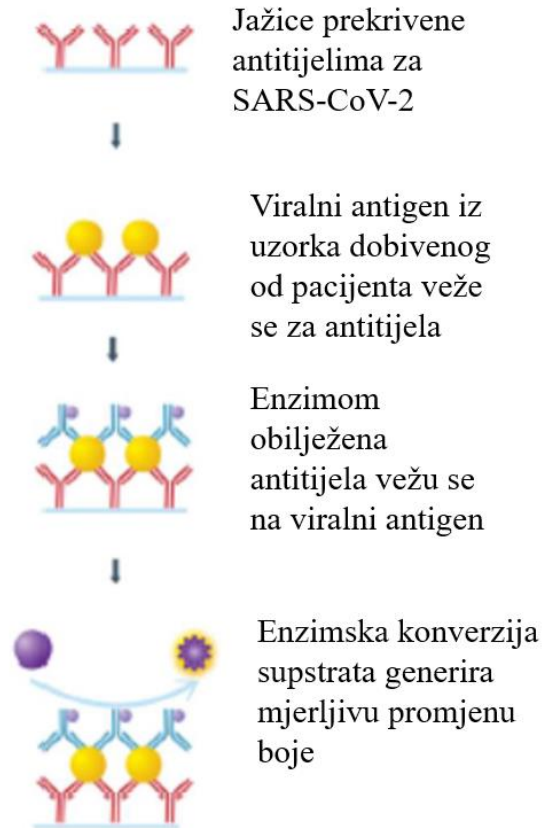


ELISA TESTOVI

A Indirektna ELISA za detekciju antitijela za SARS-CoV-2

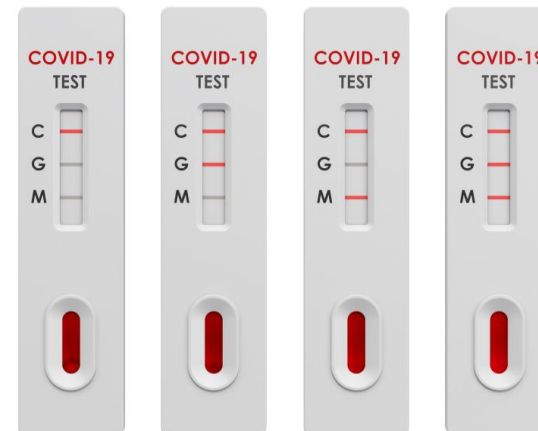
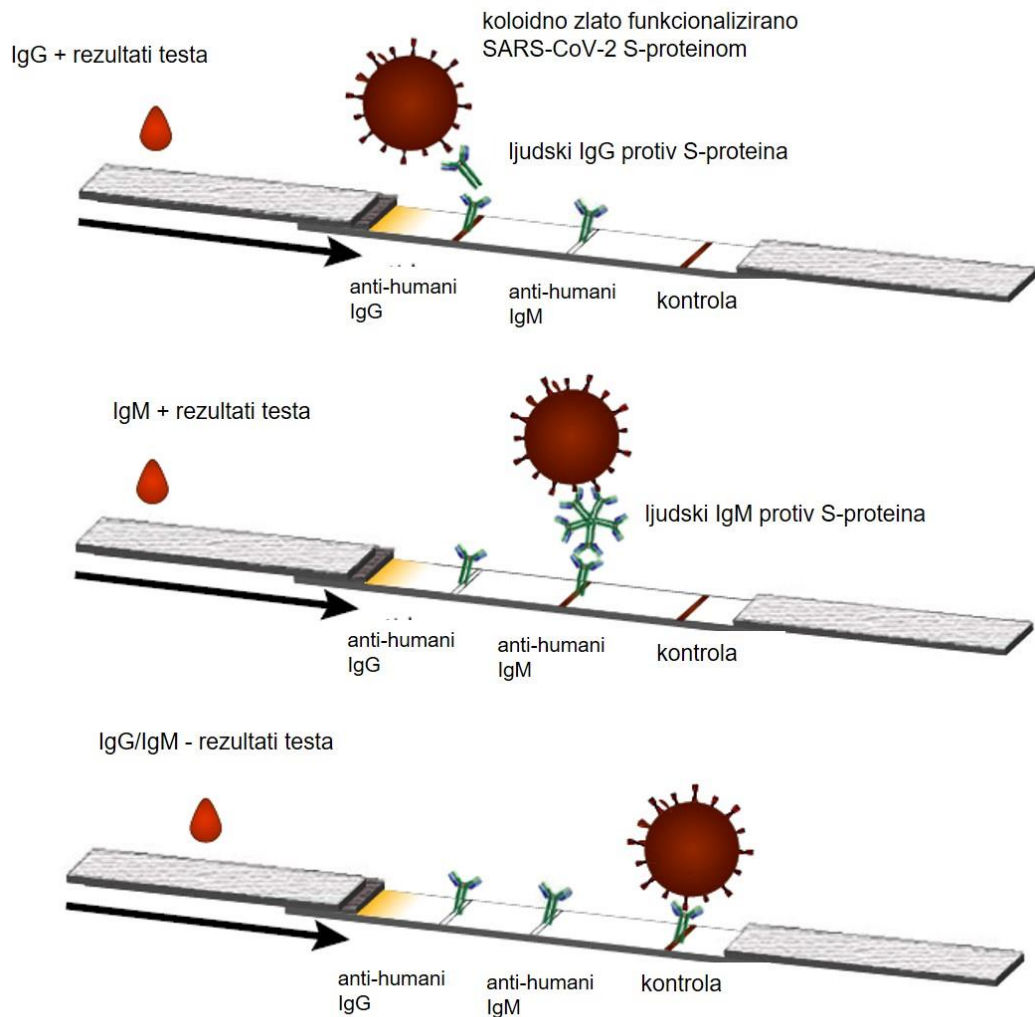


B „Sendvič” ELISA za detekciju SARS-CoV-2 antigena



- ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- daju očitavanja za sva SARS-CoV-2 antitijela (IgG, IgM i IgA)
- brza i osjetljiva metoda
- ograničavajući faktor: korištenje skupih reagensa (antigeni, antitijela, enzimi)
- često daje lažno pozitivne i lažno negativne rezultate

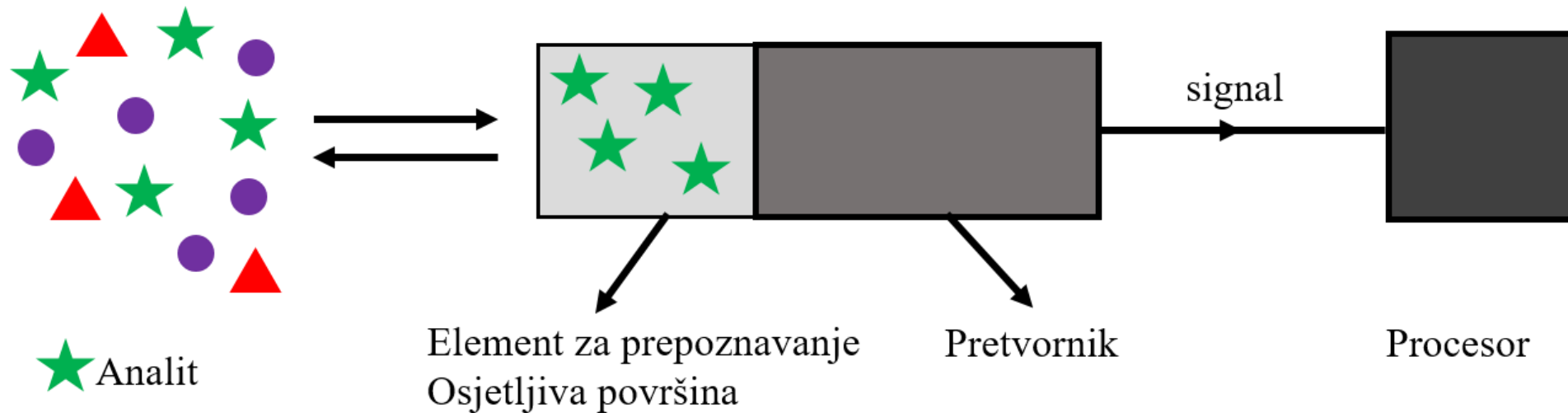
IMUNOKROMATOGRAFSKI TESTOVI



- antigen ili antitijelo specifični za analit imobilizirani na nitroceluloznu membranu – testna linija
- molekule ili čestice koje indiciraju da je uspostavljen kapilarni protok – kontrolna linija
- ostala mjesta – blokirana nespecifičnim proteinima
- relativno visok postotak lažno pozitivnih rezultata – needuciranost osoblja o provedbi testova, neprovođenje preporučene procedure

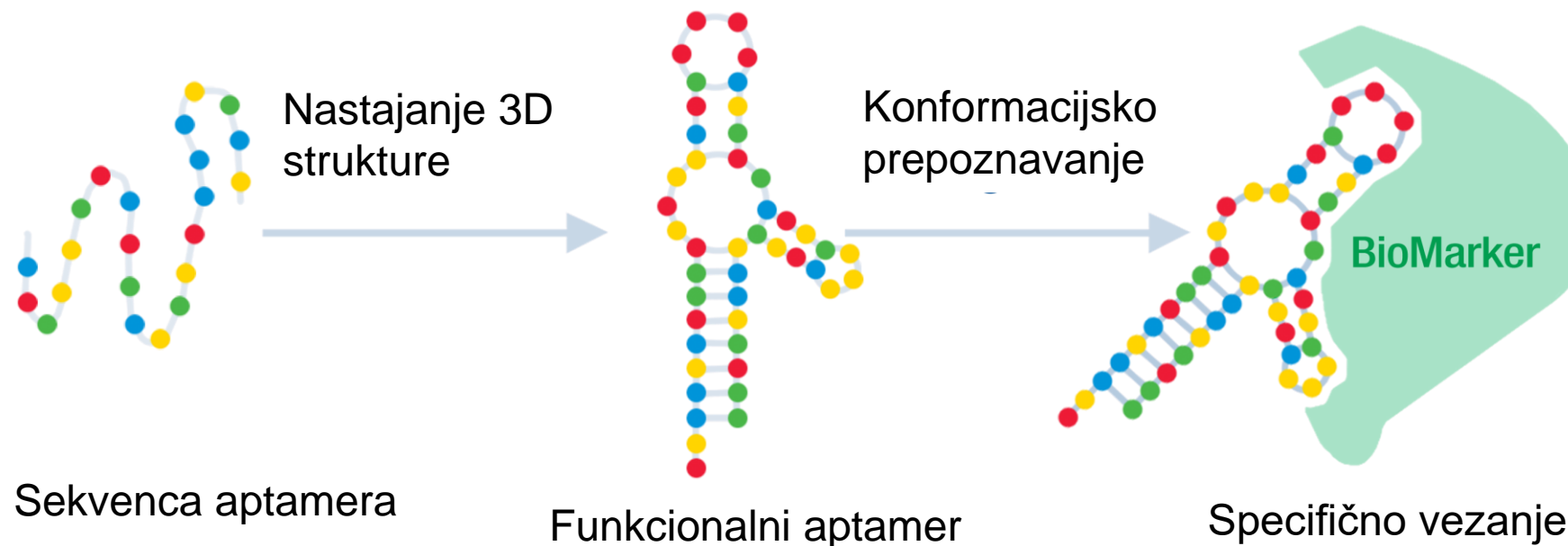
APTASENZOR TEMELJEN NA SERS SPEKTROSKOPIJI

- kemijski senzori – uređaji koji stvaraju odziv na temelju selektivne kemijske reakcije s odgovarajućim analitom
- biosenzori – biološki element za prepoznavanje (enzimi, antitijela,...)
- aptasenzori – podvrsta biosenora; element za prepoznavanje: aptamer

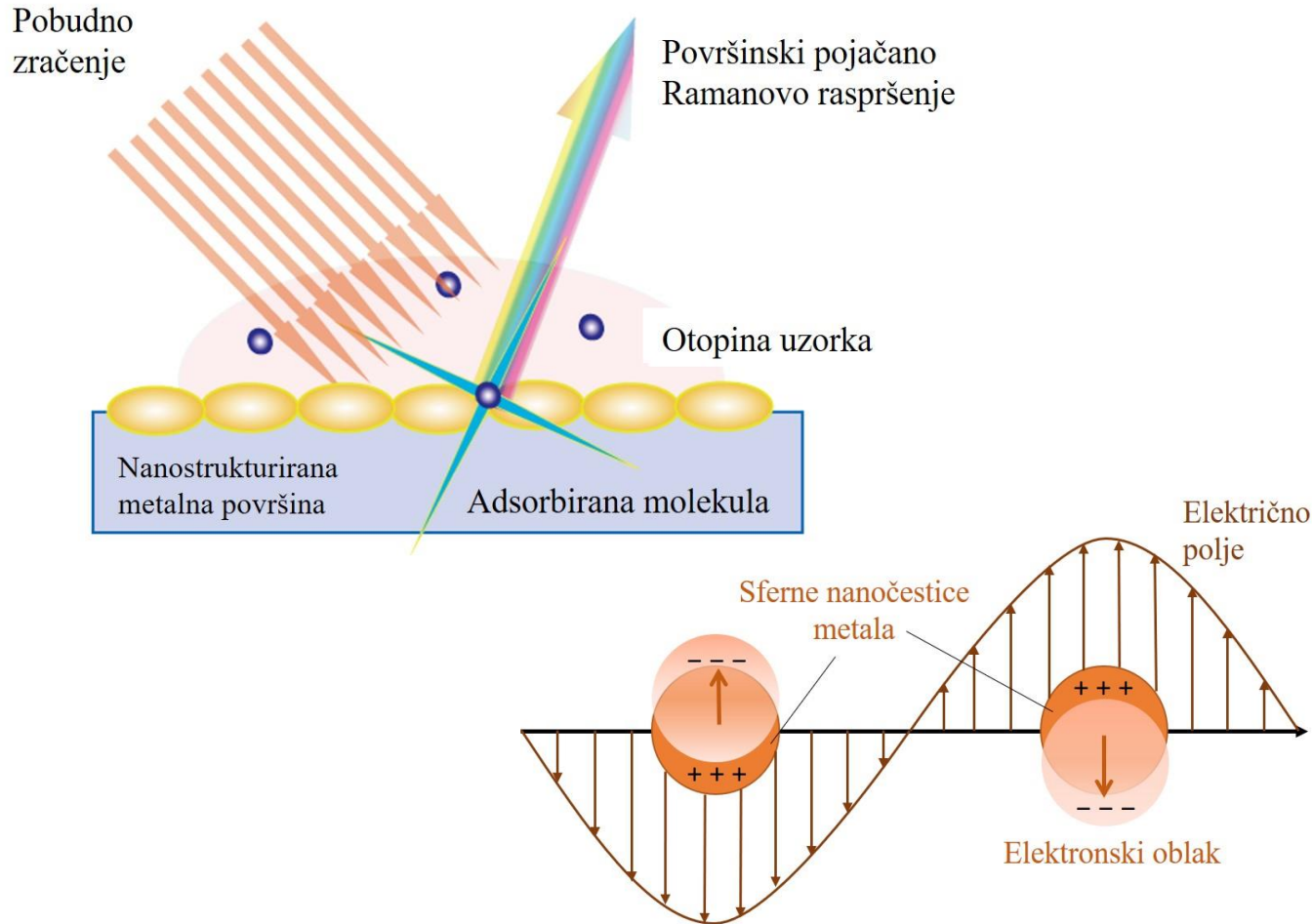


APTAMERI

- kratki jednolančani oligonukleotidi koji se mogu selektivno vezati za ciljne molekule poput proteina, malih molekula i nukleinskih kiselina
- kemijski sintetizirane nekanonske nukleinske kiseline
- usporedba s antitijelima: kraće vrijeme i niža cijena proizvodnje, lako se modificiraju u svrhu konstruiranja biosenzora i mogu se koristiti kao reporteri signala, linkeri i receptori

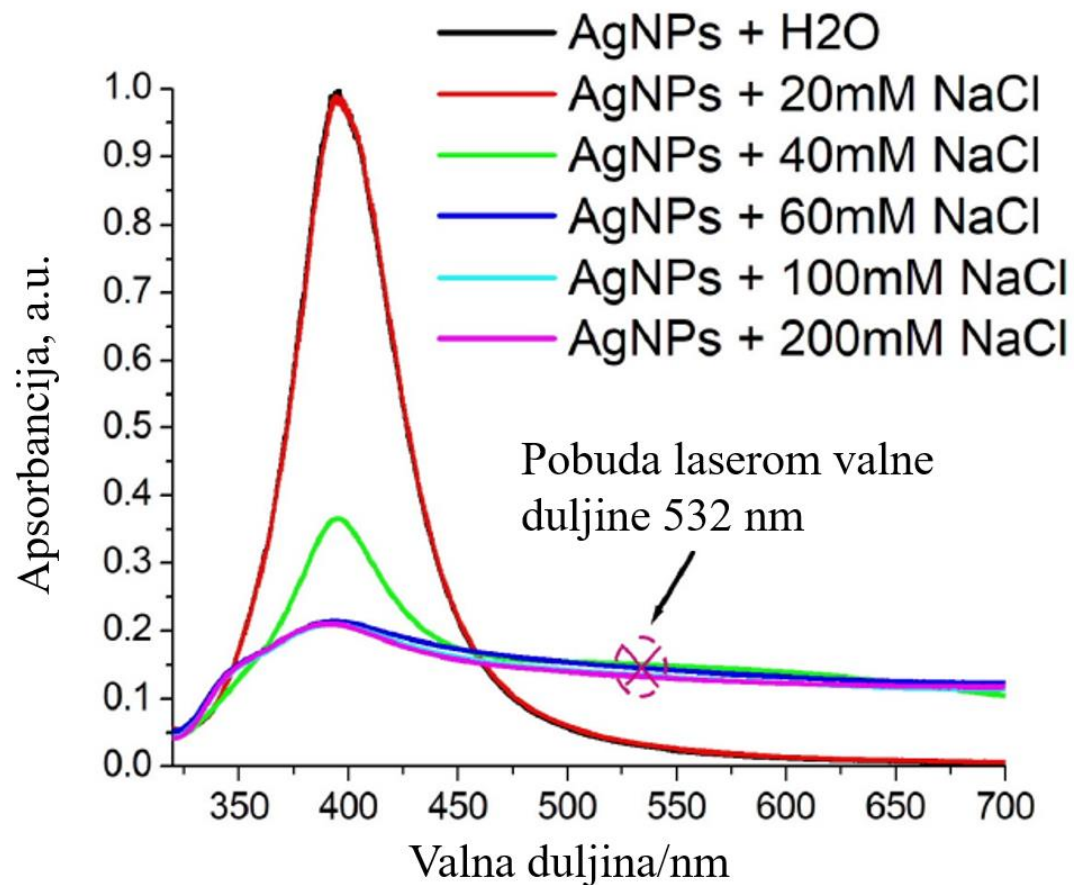


SPEKTROSKOPIJA POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA - SERS



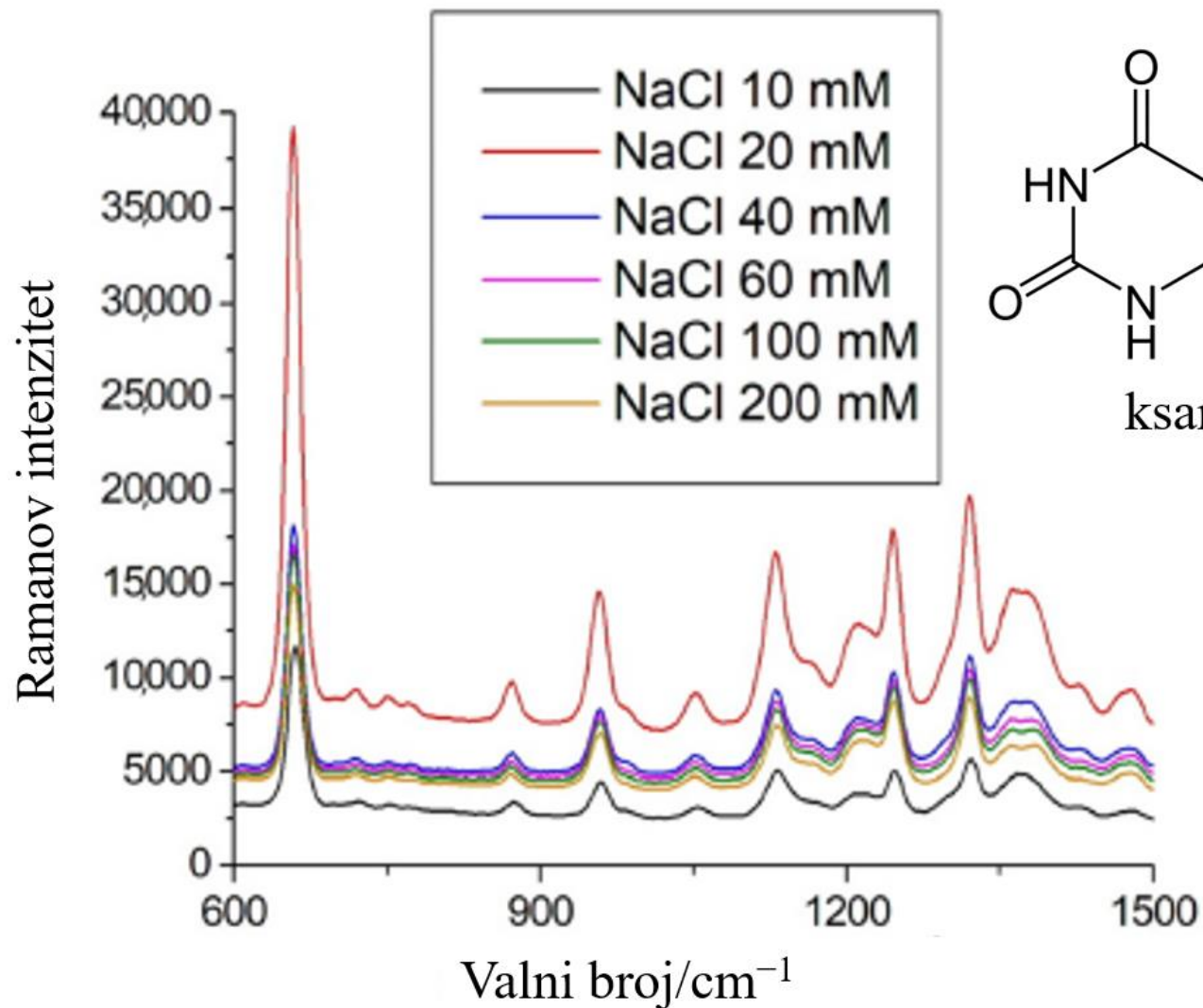
- **elektromagnetski mehanizam** – temelji se na plazmonskej rezonanciji
- **kemijski mehanizmi pojačanja** – temelji se na prijenosu naboja s molekule na metal i/ili s metala na molekulu
- “vruća mjesta” – dodatno pojačanje Ramanovog raspršenja
- SERS supstrati – moraju imati hrapavu površinu – nanočestice u suspenziji ili imobilizirane na čvrstim nosačima, metalni filmovi, elektrode hrapave površine

RAZVOJ APTASENZORA – SERS SUPSTRAT



- SERS supstrat – koloid nanočestica srebra s površinskim slojem kloridnih iona
- Kemijska redukcija AgNO₃ s hidroksilamin hidrokloridom
- Karakterizacija koloida: valna duljina plazmonske rezonancije → 394 nm; dimenzije nanočestica → 44-55 nm; zeta potencijal → -54 ± 18 mV
- Snimljeni apsorpcijski spektri pri različitim ionskim jakostima otopine

RAZVOJ APTASENZORA – SERS SUPSTRAT

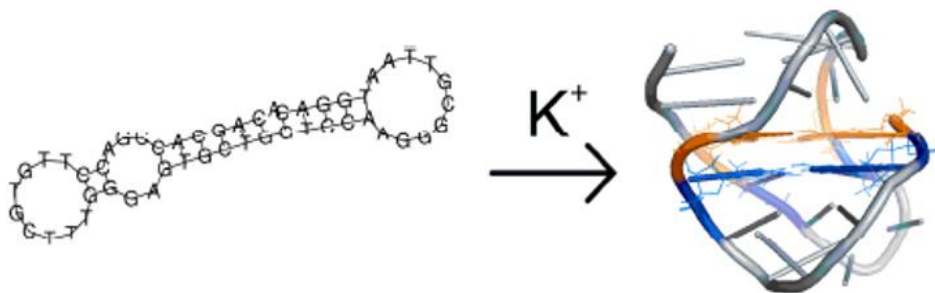


- Ispitivanje pojačanja Ramanovog raspršenja – modelna molekula → purinska baza ksantin
- Najintenzivniji spektar u otopini NaCl (20 mM)

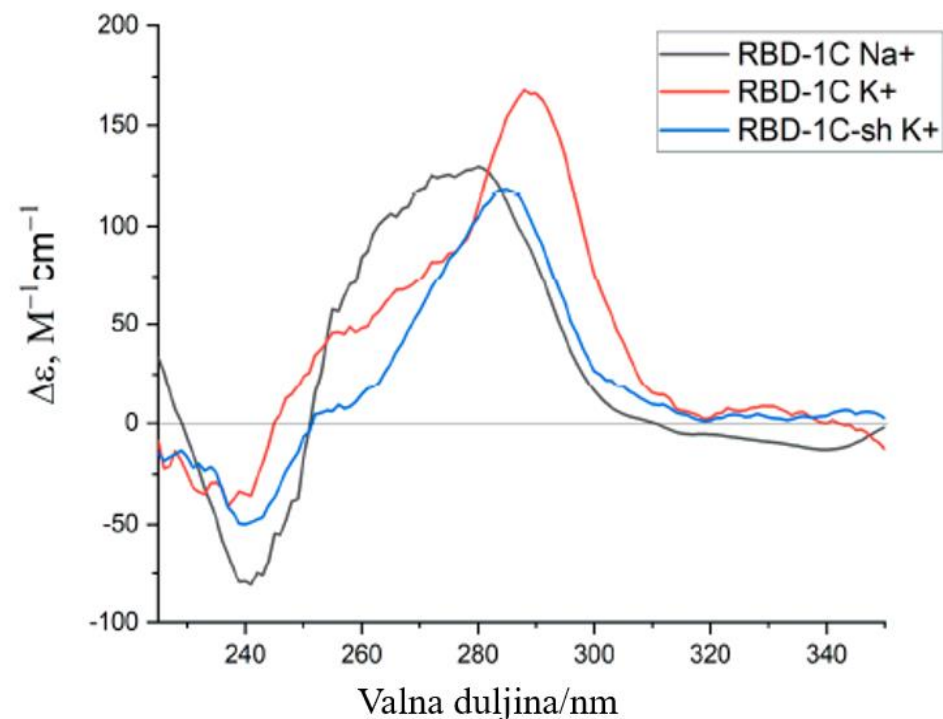
RAZVOJ APTASENZORA – STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA APTAMERA

- Aptamer RBD-1C → selektivno se veže za S-protein SARS-CoV-2, konkretno za domenu glikoproteina koja veže receptore (engl. *receptor binding domain*, RBD)
- Spektri CD → kombinacija dupleksa i antiparalelnog G-kvadrupleksa s dijagonalnom petljom → istražiti i skraćenu verziju aptamera (RBD-1C-sh)!

A



B

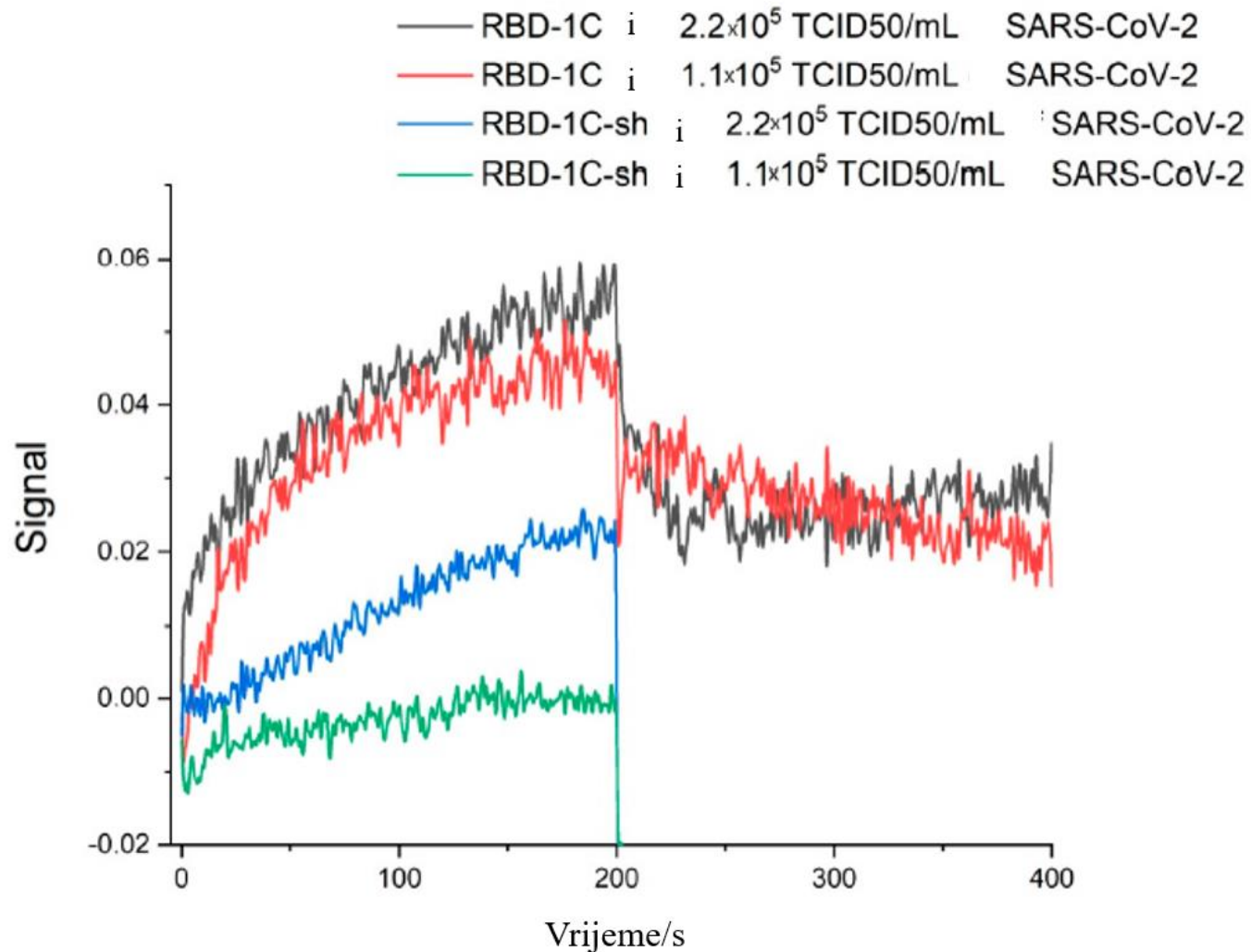


RAZVOJ APTASENZORA – ODREĐIVANJE AFINITETA APTAMERA PREMA S-PROTEINU

- određene su kinetičke konstante asocijacije i disocijacije kompleksa RBD-S-protein uz korištenje interferometra
- skraćena verzija aptamera (RBD-1C-sh) ima višu konstantu disocijacije (330 ± 60 nmol/L) što ukazuje na nisko specifično vezanje – jedinstvena prostorna struktura RBD-1C aptamera presudna za visok afinitet prema S-proteinu SARS-CoV-2

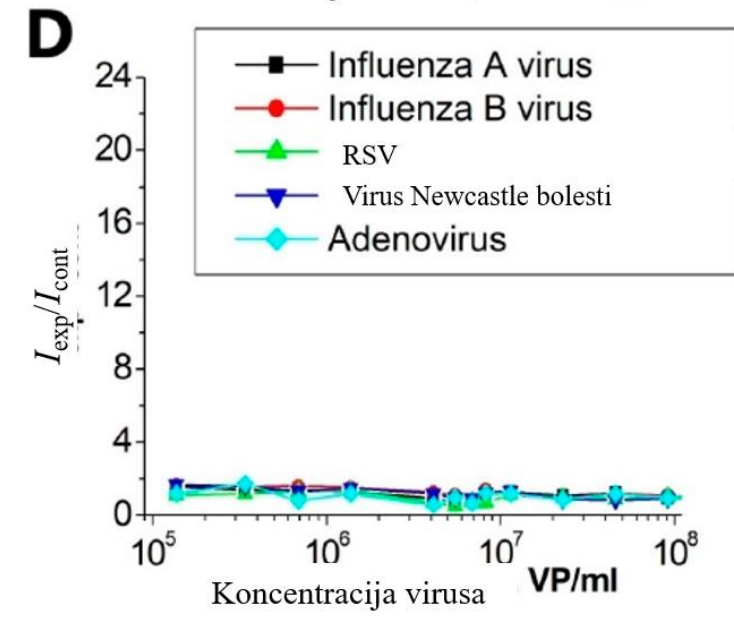
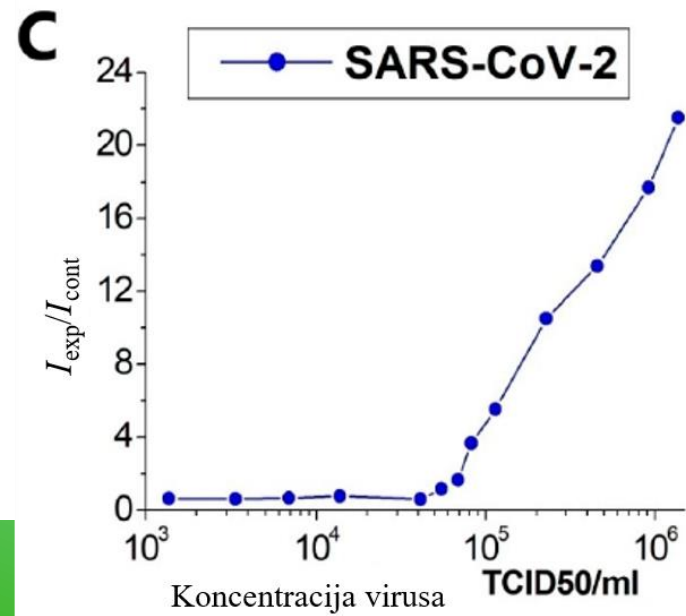
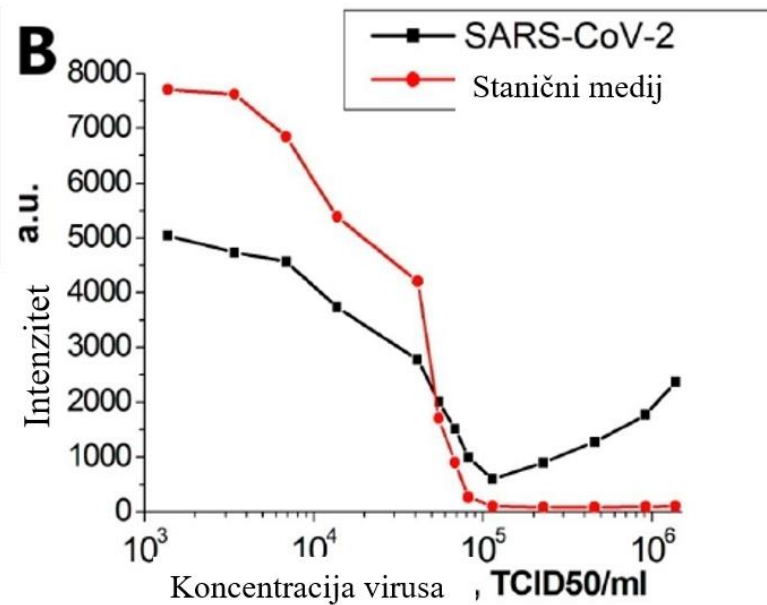
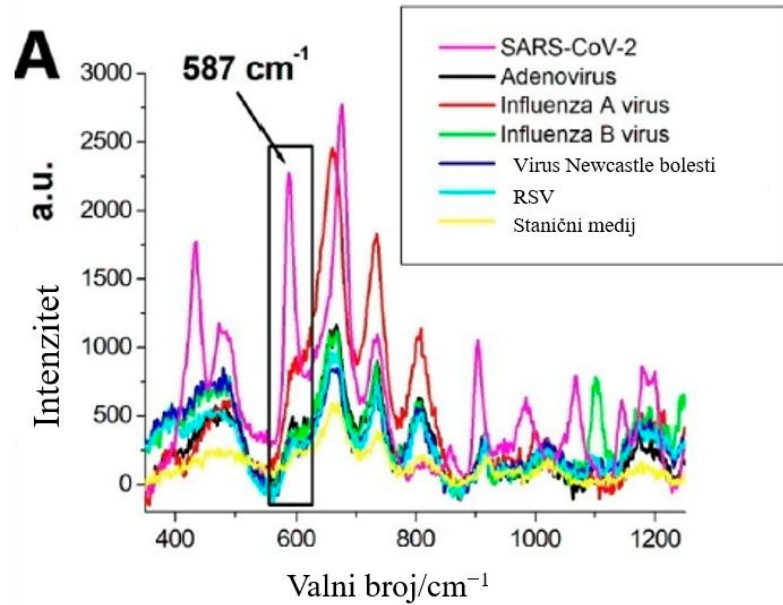
Aptamer	k_a (mol ⁻¹ L s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_d (mol/L)
RBD-1C	$(1,7 \pm 0,8) \times 10^5$	$(2,17 \pm 0,02) \times 10^{-3}$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
RBD-1C-sh	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^4$	$(5,6 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$(3,3 \pm 0,6) \times 10^{-7}$

RAZVOJ APTASENZORA – ODREĐIVANJE AFINITETA APTAMERA PREMA CIJELOM VIRUSU

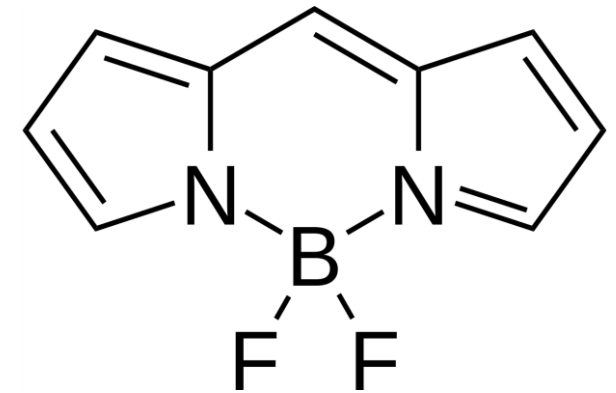


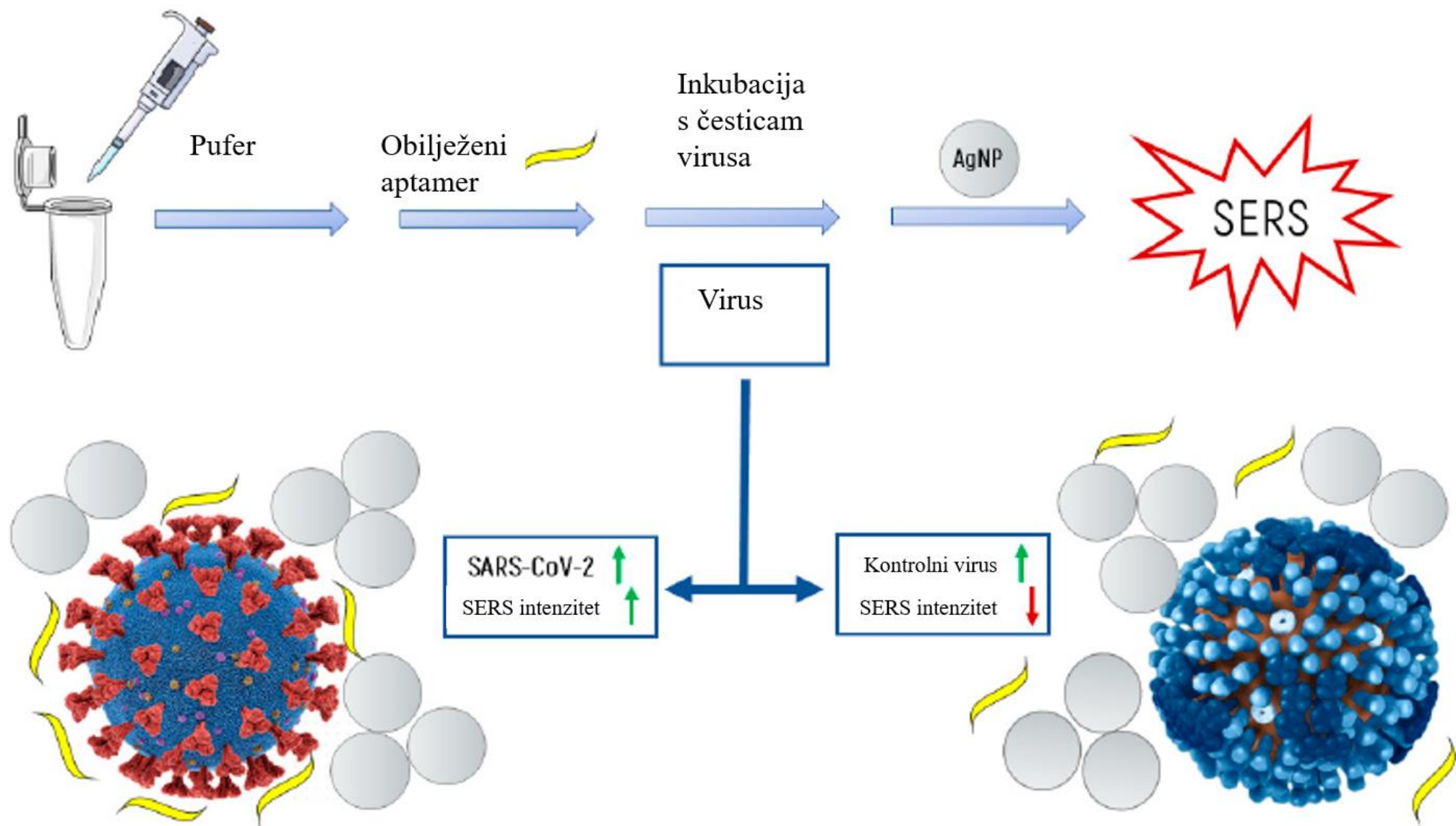
- RBD-1C pokazuje visokospecifično vezanje
- RBD-1C-sh pokazuje niskospecifično vezanje
- → aktivna komponenta aptamera – motiv DNA ukosnice, dok su G-kvadrupleksi samo nisko aktivni dodatci strukturi

SPECIFIČNOST SERS APTASENZORA



- Provedeni eksperimenti s različitim virusima
- Aptamer fluorescentno obilježen BODIPY molekulom – praćen intenzitet vrpce pri 587 cm^{-1} – iz SERS spektara određena koncentracijska ovisnost inenziteta signala





ZAKLJUČAK

većina poznatih testova temelji se na dobro poznatim tehnikama imunokromatografije i ELISA-e kao i „zlatni standard” – RT-PCR

razvijen SERS aptasenzor, biosenzor koji koristi aptamer kao element za prepoznavanje

aptameri – osjetljivost usporedna ili veća u usporedbi s antitijelima, a proizvodnja brža i jeftinija

vrlo jednostavna metoda (1 korak), minimalna priprema uzorka, brza metoda (7 minuta)

odlična selektivnost prema SARS-CoV-2 u prisutnosti drugih virusa

provode se daljnja istraživanja – poboljšanje metode, usavršavanje dizajna aptasenzora