

**RAPORT ȘTIINȚIFIC**  
*privind implementarea proiectului în perioada*  
*mai 2013 - octombrie 2015*

**Titlul proiectului: “DETECȚIE ȘI IDENTIFICARE DE BIOMOLECULE DE INTERES MEDICAL UTILIZÂND PROCESE MAGNETICE ȘI OPTICE”**

**Etapa I. Sinteza de micro si nanoparticule magnetice si nemagnetice ca marcheri si suporturi pentru transportul controlat al receptorilor si biomoleculor tinta implicate in procesul de detectie.**

**Activitatea I.1. Sinteza de nanoparticule magnetice (de ex., magnetita prin utilizarea de metode chimice/fizice).**

Pentru prepararea de nanoparticule magnetice, s-a utilizat o metoda fizico-chimica, utilizandu-se ca precursori ai produsilor de reactie magnetici clorura feroasa ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), clorura ferica ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) si hidroxid de sodiu ( $\text{NaOH}$ ) aflati intr-un raport molar de 1:2:23. Reactivii, achizitionati de la firma Alfa Aesar si utilizati in stare solida, au fost mixati mecanic intr-un mojar de agat timp de cateva minute pentru omogenizare. Apoi, s-a adaugat  $\text{NaOH}$ , utilizat ca agent de precipitare, si s-a mixat continuu. Reactia a fost puternic exoterma, temperatura masurata cu un termocuplu cromel-alumel fiind de peste  $140^\circ\text{C}$ .

Dupa racire la temperatura camerei, proba a fost spalata cu apa bidistilata pana cand pH-ul suspensiei a ajuns 6.5-7. Separarea magnetica a particulelor s-a efectuat cu un magnet permanent NdFeB.

Pentru caracterizare, particulele au fost utilizate fie in forma de pulberi, fie in forma coloidala. Pentru caracterizarea nanoparticulelor magnetice sub forma de pulberi, acestea au fost in prealabil uscate la  $85^\circ\text{C}$  timp de 3 ore, iar pentru caracterizarea in stare dispersata, suspensia a fost sonicata in apa distilata, in pulsuri, cu ajutorul unui omogenizator ultrasonic (Hielscher UP50H, Germania), la o amplitudine de 90%.

Marimea particulelor a fost controlata de pH si solubilitatea precipitatului (Mohapatra et al. 2007; Tartaj et al. 2006). Pe de alta parte, o regula generala privind cristalele precipitate din solutii suprasaturate presupune ca marimea medie a cristalului, masurata la sfarsitul cristalizarii, descreste pe masura ce valoarea suprasaturatiei creste (Von Weimarn 1925; Barlow and Baird 2004). Prin urmare, s-a introdus o cantitate crescuta de  $\text{NaOH}$  peste solutia solida de saruri de fier atat pentru a forta precipitarea rapida a produsilor de reactie si pentru a le pastra o dimesiune redusa, cat si pentru a obtine un pH foarte crescut. De asemenea,

datorita conditiilor specifice de reactie, produsul ionic dintre  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  si  $\text{OH}^-$  devine mult mai mare decat produsul de solubilitate, favorizand astfel sinteza produsului magnetic.

### **Activitatea I.2. Sinteza de nanoparticule nemagnetice, precum nanoparticule de aur, utilizand metode chimice.**

Pentru prepararea de nanoparticule de aur, s-a utilizat o sare de aur (acid cloroauric) si o solutie de citrat trisodic. Sinteza a presupus urmatoarele etape:

1. Vasele de sticla utilizate in prepararea nanoparticulelor au fost tratate cu acid fluorhidric 10 % timp de 1 minut pentru a indeparta orice contaminare a suprafetei interioare a recipientelor de sticla deoarece urmele de metal sau de saruri conduc la agregarea rapida a nanoparticulelor. Apoi, vasele de reactie au fost clatite cu apa ultrapura de cateva ori, fiind uscate la  $70^\circ\text{C}$ .
2. Agitatorul magnetic a fost curatat cu apa regala (trei parti HCl, o parte  $\text{HNO}_3$ ).
3. 300 ml solutie  $\text{HAuCl}_4$  0.5 mM a fost adusa la temperatura de  $100^\circ\text{C}$ .
4. Peste solutia de mai sus, s-au adaugat rapid 30 ml solutie de citrat trisodic 40 mM, sub agitare puternica (1400 rpm).
5. Dupa cateva secunde, solutia a devenit usor albastra, ulterior virand spre rosu inchis si indicand astfel formarea de nanoparticule de aur.
6. Solutia a fost mentinuta sub agitare, la temperatura de fierbere, inca 30 minute si apoi racita lent la temperatura camerei.

Concentratia finala a particulelor in mediul de reactie, de  $10.8 \cdot 10^{11}$  nanoparticule/ml, a fost calculata tinand cont de masa de acid cloroauric utilizata, de dimensiunea medie a nanoparticulelor si de densitatea aurului.

### **Activitatea I.3. sinteza de microparticule nemagnetice (ca alternativa – achizitia de la o firma comerciala).**

Pentru prepararea de particule nemagnetice s-a considerat o metoda de polimerizare in emulsie a stirenului pentru a obtine microparticule de polistiren.

Polimerizarea în emulsie constă în polimerizarea unui radical liber într-o reacție heterogenă. La începutul reacției, monomerul este prezent mai ales sub formă de picături, fiind dispersat în faza apoasă. Reacția trebuie să aibă loc sub agitare pentru a menține dispersia monomerului. Dacă emulsificarea este insuficientă, apare o limitare a transferului de masă a monomerului din faza de monomer în faza în care apare creșterea particulelor de polimer.

În ceea ce privește stabilizatorii, unii alcooli polivinilici și alte tipuri de polimeri solubili în apă pot iniția procesul de polimerizare, deși ei nu formează micle și nu acționează ca surfactanți. Se presupune că acești polimeri se grefează pe particulele polimerice și le stabilizează.

Ca surfactanți, cei mai folosiți sunt: acizi grași, lauril sulfat de sodiu și alfa olefin sulfonat. Ca inițiatori de polimerizare cel mai des folosite sunt sărurile de persulfat; ionul

persulfat se scindează în ioni radical sulfat peste o temperatură de 50 °C, determinând începutul polimerizării.

#### *Metoda de preparare*

O faza apoasa constituita din 200 ml apa distilata, 0.1 g dodecil sulfat de sodiu (surfactant), 0.1 g polivinil pirolidona (stabilizator), 20 g glucoza (stabilizator si agent de reducere, impiedicand o posibila polimerizare rapida si necontrolata) a fost agitata magnetic timp de o ora la 36 °C.

Peste faza apoasa s-au adaugat 10 ml stiren, sub agitare la 1000 rpm, temperatura fiind ridicata la 70 °C. Dupa 3 ore, s-au adaugat 10 ml solutie de persulfat de potasiu (initiator de polimerizare) 5 g %. Apoi, dupa 24 ore s-au adaugat inca 10 ml solutie de persulfat de potasiu 5 g %, iar temperatura a fost crescuta la 85 °C.

Dupa 3 ore, temperatura a fost scăzută treptat până la temperatura camerei, agitarea menținându-se constantă. După oprirea agitării, microparticulele de polistiren au fost centrifugate si spălate de câteva ori cu o soluție de dodecil sulfat de sodiu 0,1 g %.

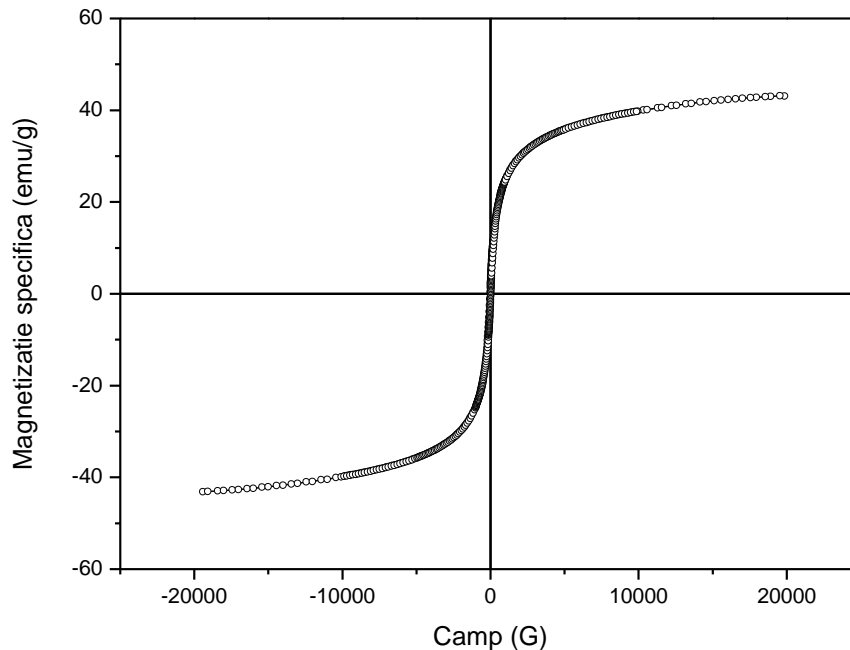
### **Activitatea I.4. Evaluarea structurii, dimensiunii, formei si proprietatilor magnetice ale particulelor obtinute.**

#### **Nanoparticule magnetice**

In cazul nanoparticulelor magnetice, structura a fost determinata prin difractometrie de raze X (XRD); forma a fost evaluata prin microscopie electronica de scanare (SEM); dimensiunea a fost masurata prin utilizarea unei metode bazate pe imprastierea in regim dinamic a luminii (DLS); proprietatile magnetice au fost determinate cu ajutorul magnetometriei cu proba vibranta (VSM).

Magnetizatia nanoparticulelor magnetice (fig. 1) a fost masurata cu un magnetometru cu proba vibranta Lake Shore 7410. Magnetizatia specifica de saturatie, avand o valoare de 46 emu/g, a fost calculata prin extrapolarea tangentei la curba obtinuta din dependenta magnetizatiei,  $M$ , de inversul campului aplicat,  $1/H$ , la campuri mari, in regiunea in care dependenta  $M(1/H)$  este o linie dreapta.

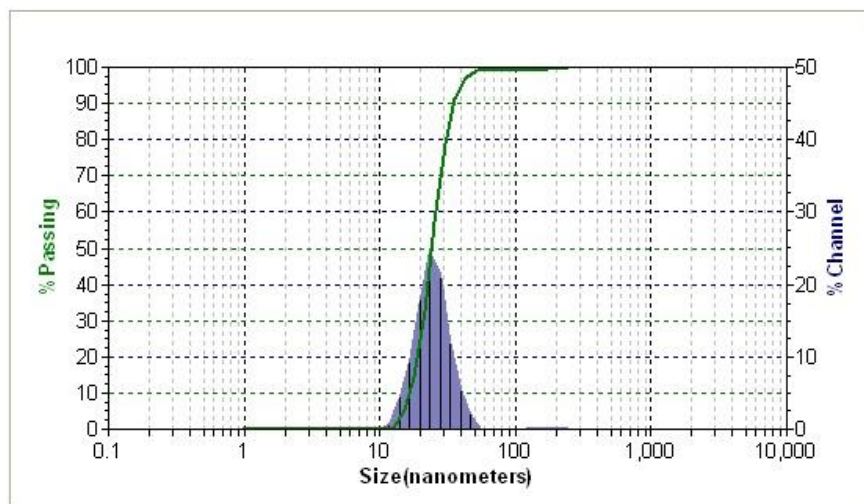
Campul coercitiv al particulelor magnetice a fost de 20 G, iar magnetizatia remanenta a fost de 1,5 emu/g, nanoparticulele apropiindu-se astfel de un comportament superparamagnetic.



**Fig.1.** Curba de histerzis a probei magnetice.

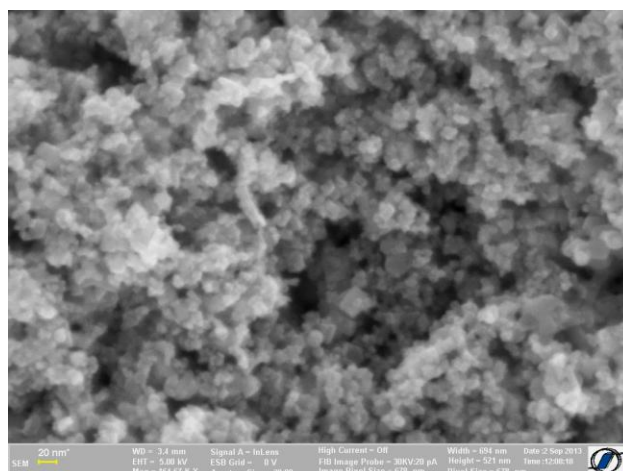
Evaluarea dimensiunii s-a realizat cu ajutorul unui analizor de particule Microtrac/Nanotrac 252.

Dimensiunea nanoparticulelor magnetice a fost cuprinsa intre 10 nm si 55 nm, marimea medie a acestora fiind de 24 nm (fig. 2).



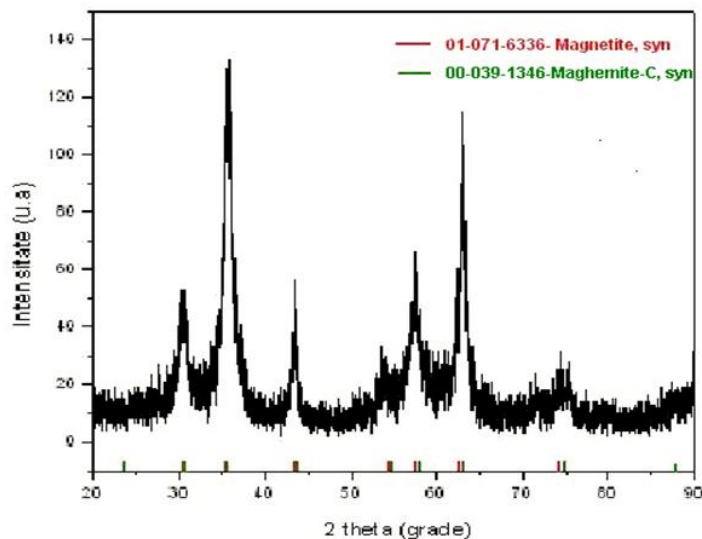
**Fig. 2.** Distributia dimensionala a nanoparticulelor magnetice.

Forma geometrica a nanoparticulelor magnetice a fost evaluata cu ajutorul unui microscop FE-SEM / FIB, CrossBeam System Carl Zeiss NEON40EsB. Imaginile SEM (fig. 3) au aratat ca majoritatea nanoparticulelor prezinta un profil cubic/octaedric.



**Fig. 3.** Imagine de microscopie electronica de scanare a nanoparticulelor magnetice.

Spectrul XRD (fig. 4), obtinut cu un difractometru Brucker AxS D8-Advance, arata ca in proba sunt prezente atat magnetita cat si maghemita. Difractograma probei magnetice prezinta maxime de difractie specifice celor doua componente corespunzand planurilor de difractie (220), (222), (311), (400), (440), (422), (511), (533).



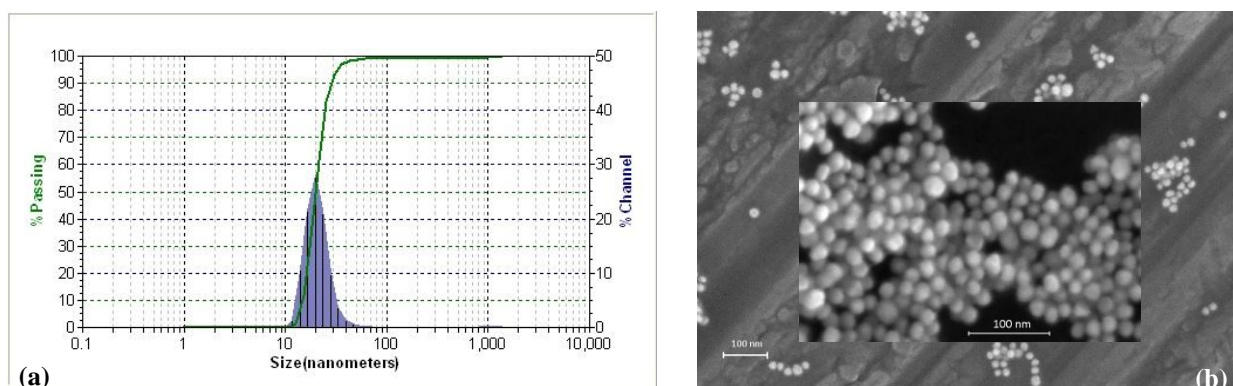
**Fig. 4.** Spectrul XRD al nanoparticulelor magnetice formate dintr-un amestec magnetita-maghemita.

Analiza XRD arata ca proba este formata din nanoparticule cristaline, avand o dimensiune medie de 8.26 nm. Dimensiunea a fost calculata cu ajutorul formulei lui Scherrer.

Dat fiind ca magnetita si maghemita sunt foarte apropiate structural, este dificil de precizat puritatea probei supuse analizei XRD.

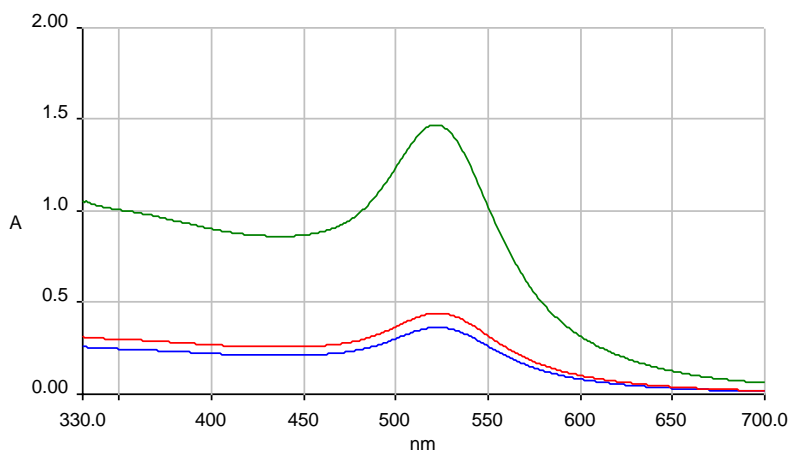
## Nanoparticule de aur

Masuratorile DLS au aratat o distributie gaussiană a dimensiunilor nanoparticulelor, cu un domeniu dimensional cuprins între 10 nm și 60 nm, media situându-se în jurul valorii de 20 nm (fig. 5a), dimensiuni confirmate și de imaginile de microscopie electronica de scanare (fig. 5b).



**Fig. 5.** Distribuția după dimensiuni a nanoparticulelor de aur (a); imagine de microscopie electronica de scanare a nanoparticulelor de aur (b).

Spectrul de absorbție al nanoparticulelor în suspensie s-a determinat prin spectrofotometrie de absorbție UV-VIS. Absorbanta maximă, diferită în funcție de concentrația măsurată, a prezentat un maxim pentru o lungime de undă de 520 nm (fig. 6), specifică nanoparticulelor de aur.



**Fig. 6.** Spectrul de absorbție UV-VIS al nanoparticulelor de aur

## Microparticule de polistiren

Conform analizei dimensionale realizata prin DLS, distributia dupa marimi a microparticulelor a fost cuprinsa intre 2 micrometri si 6 micrometri (fig. 7a), profilul fiind unul gaussian. Dimensiunea medie calculata a fost de 3.35 micrometri.

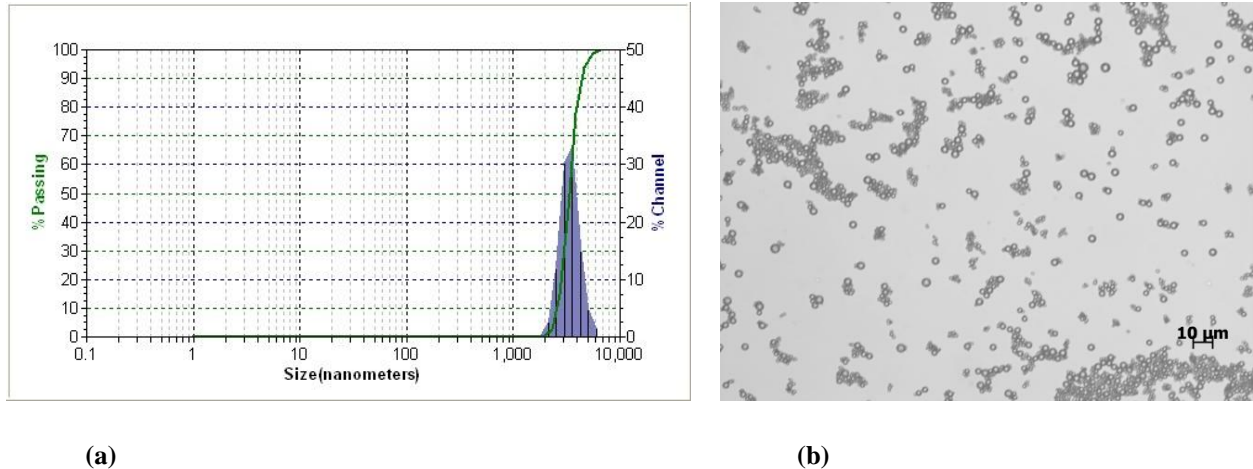


Fig. 7. Distributia dupa dimensiuni a microparticulelor de polistiren (a); imagine de microscopie optica a microparticulelor de polistiren (b).

Imaginile de microscopie optica au aratat ca microparticulele de polistiren prezinta o forma sferica (fig. 7b), confirmand si dimensiunea micrometrica a acestora.

### **Bibliografie**

1. Barlow DA, Baird JK (2004) Theory of the von Weimarn rules governing the average size of crystals precipitated from a supersaturated solution. *J Cryst Growth* 264:417–423.
2. Mohapatra S, Pramanik N, Mukherjee S, Ghosh SK, Pramanik P (2007) A simple synthesis of amine-derivatised superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bioapplications. *J Mater Sci* 42:7566–7574.
3. Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, Gonzalez-Carreno T, Serna CJ (2006) Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles. In: Buschow KHJ (ed) *Handbook of magnetic materials*, vol 16. Elsevier, Amsterdam, p 411.
4. Von Weimarn PP (1925) The precipitation laws. *Chem Rev* 2:217.

**Etapa II. Functionalizarea microparticulelor magnetice si respective nemagnetice cu anticorpi si oligonucleotide in scopul utilizarii acestora in cadrul metodei de detectie de tip bio-barcode; Obtinerea de date experimentale privind capacitatea metodei de tip bio-barcode de a detecta si identifica concentratii foarte mici de biomolecule tinta prin microscopie de fluorescenta.**

***Activitatea II.1. Prepararea de microparticule magnetice functionalizate cu anticorpi receptor***

Anticorprii pot fi utilizați în diferite analize biologice și medicale fie în calitate de bioreceptori pentru un antigen specific, fie ca ținte. Pentru a fi utilizați ca bioreceptori, anticorprii trebuie să fie imobilizați pe diferite suporturi solide. Calitatea analizelor este influențată semnificativ de suporturile solide deoarece acestea dictează nu numai eficiența imobilizării anticorpilor, ci și gradul de legare nespecifică și accesibilitatea anticorpilor la antigen.

Imobilizarea anticorpilor este complicată însă de câteva proprietăți chimice și fizice ale proteinelor. Astfel, nu există o metodă de amplificare a proteinelor ca în cazul acizilor nucleici (metoda „polymerase chain reaction”) și, de asemenea, proteinele sunt (i) mult mai complexe din punct de vedere structural și chimic și (ii) mai heterogene decât acizii nucleici.

Prin urmare, este dificil să se definească strategiile generale de imobilizare și detecție care să nu facă discriminări între proteine. De asemenea, trebuie precizat că, în contrast cu acizii nucleici, proteinele își reduc activitatea biochimică din cauza denaturării, deshidratării sau oxidării.

În general, chimia functionalizării cu anticorpi care se aplica suprafețelor cu arii mari este valabilă și în cazul nano sau microparticulelor polimerice sau metalice acoperite/neacoperite cu liganzi specifici.

**Functionalizarea microparticulelor magnetice cu anticorpi anti-IgG**

În această activitate a proiectului s-au utilizat microparticule magnetice acoperite cu polimer și grupări carboxilice pentru legarea anticorpilor IgG (anti-goat IgG) produși în iepure pentru imobilizarea ulterioară a anticorpilor IgG de capra,

Una dintre cele mai utilizate metode de functionalizare cu anticorpi a microparticulelor magnetice acoperite cu polimer și grupări chimice de tip carboxil (COOH) are la bază utilizarea de 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDAC) care permite legarea microparticulelor de grupările aminice ale anticorpilor.

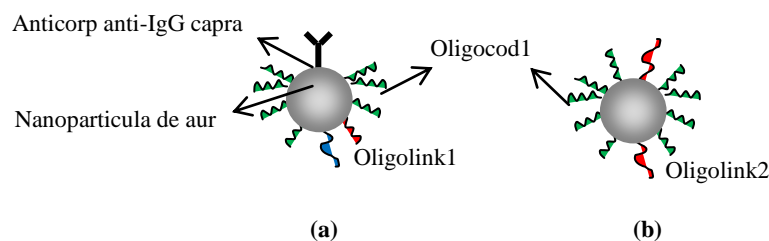
Metoda de cuplare este descrisă punctual mai jos.



1. Microparticulele, solutia tampon de cuplare (PolyLink Coupling Buffer) si respectiv cea de spalare au fost aduse la temperatura camerei.
2. 0,5 ml din suspensia de microparticule (aproximativ 22 mg de microparticule) a fost transferata intr-un tub Eppendorf cu volumul de 2 ml.
3. Microparticulele au fost centrifugate 15 minute la 1000 G si resuspendate in 0,4 ml solutie tampon de cuplare.
4. Dupa o noua centrifugare timp de 15 minute la 1000 G, microparticulele au fost resuspendate in 0,17 ml solutie tampon de cuplare.
5. Imediat inainte de utilizare, s-a preparat o solutie de 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide prin dizolvarea a 10 mg in 50  $\mu$ L solutie tampon de cuplare.
6. 20  $\mu$ L din solutia EDAC preparata mai sus a fost adaugata in suspensia de microparticule sub agitare blanda.
7. Dupa 15 minute de activare, s-au adaugat aproximativ 120  $\mu$ g de anticorpi anti-IgG de capra (60  $\mu$ L dintr-o solutie de anticorpi IgG, 2 mg/ml) in 0,25 ml solutie tampon de cuplare.
8. Solutia a fost agitata usor la temperatura camerei timp de 60 minute, apoi a fost centrifugata 15 minute la 1000 G.
9. In final, microparticulele au fost resuspendate in 0,4 ml solutie tampon de spalare.

***Activitatea II.2. Prepararea de nanoparticule nemagnetice functionalizate cu anticorpi receptor si oligonucleotide.***

In aceasta activitate s-au utilizate nanoparticule de aur preparate in activitatea anterioara a proiectului. S-au preparat doua tipuri de nanoparticule functionalizate: (i) nanoparticule de aur acoperite cu anticorpi receptor anti-IgG de capra si doua tipuri de oligonucleotide, precum si (ii) nanoparticule de aur acoperite numai cu oligonucleotide (Fig. 8).



**Fig. 8.** Nanoparticule de aur acoperite cu (a) anticorpi anti IgG capra si respectiv oligonucleotide Oligo1 si Oligolink1 si (b) Oligo1 si Oligolink2

**A. Prepararea de nanoparticule de aur acoperite cu anticorpi receptor**

Pentru functionalizarea nanoparticulelor acoperite cu citrat, s-au utilizat trei tipuri de oligonucleotide cu grupe terminale tiolice (Tabelul 1) care prezinta o afinitate crescuta pentru

suprafetele de aur si care pot dezlocui moleculele de citrat. Un al patrulea tip de oligonucleotide (Oligocod2) au fost marcate cu un fluorofor (AlexaFluor488) si a fost complementar cu Oligocod1 imobilizate pe nanoparticulele de aur.

**Tabelul 1.** Secventa de baze ale oligonucleotidelor imobilizate pe suprafata nanoparticulelor de aur

Name	Structura
<i>Oligocod1</i>	TAA TTC CGG TTA ATG CGG CCC AAA AAA AAA A [ThiC3];
<i>Oligocod2</i>	GGG CCG CAT TAA CCG GAA TTA[A488];
<i>Oligolink1</i>	CAG CTA GTA TGT TCC GGA ATG TAC TGT TCG GAA AAA AAA AAA AAA AA [ThiC3];
<i>Oligolink2</i>	CCG AAC AGT ACA TTC CGG AAC ATA CTA GCT GAA AAA AAA AAA AAA AA [ThiC3];

Dat fiind ca grupele tiolice (SH) sunt foarte susceptibile la oxidare, formand legaturi disulfidice (S-S), oligonucleotidele cu grupe tiol terminale au fost reconstituite inainte de utilizare. Astfel, oligonucleotidele au fost mai intai centrifugate si dispersate intr-o solutie tampon fosfat pH 7.4 (Sigma-Aldrich). Apoi, s-a adaugat DL-Dithiothreitol (DTT) la o concentratie finala de 100 mM DTT. Dupa 30 minute de incubare la temperatura camerei, s-a utilizat o coloana NAP-10 (GE Healthcare - Sigma) pentru a indeparta excesul de solutie tampon fosfat si DTT. Dupa reducerea cu DTT, oligonucleotidele *Oligocod1* si *Oligolink1* au fost utilizate impreuna cu anticorpii IgG receptor pentru functionalizarea primului tip de nanoparticulelor de aur, iar *Oligocod1* si *Oligolink2* pentru functionalizarea celui de al doilea tip de nanoparticule.

Pentru experimente, s-a utilizat o suspensie coloidala de nanoparticule de aur cu volumul de 5 ml si concentratia molară de 3,5 nM al carui pH a fost ajustat la 9 prin adaugarea de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Peste solutia coloidala s-au adaugat aproximativ 30 µg de anticorpi anti-imunoglobulina de capra impreuna cu 900 µl *Oligocod1* (20 µg/ml) si 100 µl *OligoLink1* (20 µg/ml), iar dupa o agitare blanda timp de 3 ore la temperatura camerei, s-a procedat la incubarea acestora peste noapte la 4 C (in frigider).

Apoi, s-au adaugat 500 µl solutie tampon fosfat (PBS - 0.01 M, pH 7.4) si 5 µl 10 % (w/v) dodecil sulfat de sodiu (SDS - surfactant anionic), agitandu-se timp de 30 minute la temperatura camerei.

Ulterior, s-a adaugat gradual 1 ml de NaCl (1.2 M), iar dupa 3 ore s-au adaugat 0.5 ml 5% (w/v) abumina serica bovina.

Proba a fost pastrata la 4 C la intuneric pentru utilizare ulterioara.

### Activitatea II.3. Teste experimentale pentru evaluarea capacității metodei bio-barcode de a detecta și identifica concentrații scăzute de biomoleculă tinta.

Pentru detectia anticorpilor de interes, s-a utilizat un microscop inversat cu fluorescență (Axio Observer D1 Carl Zeiss) pentru a măsura fluorescența oligonucleotidele marcate cu AlexaFluor488.

Metoda de detectie (Fig. 9) a avut la baza utilizarea microparticulelor magnetice functionalizate cu anticorpi receptor (impotriva imunoglobulinelor IgG de capra) și a 2 tipuri de nanoparticule de aur functionalizate cu aceiași anticorpi receptori și respectiv 2 tipuri de oligonucleotide: un tip functionand ca receptori pentru oligonucleotidele marcate cu fluorofor, în timp ce celălalt tip a avut rolul de a lega cele 2 tipuri de nanoparticule de aur.

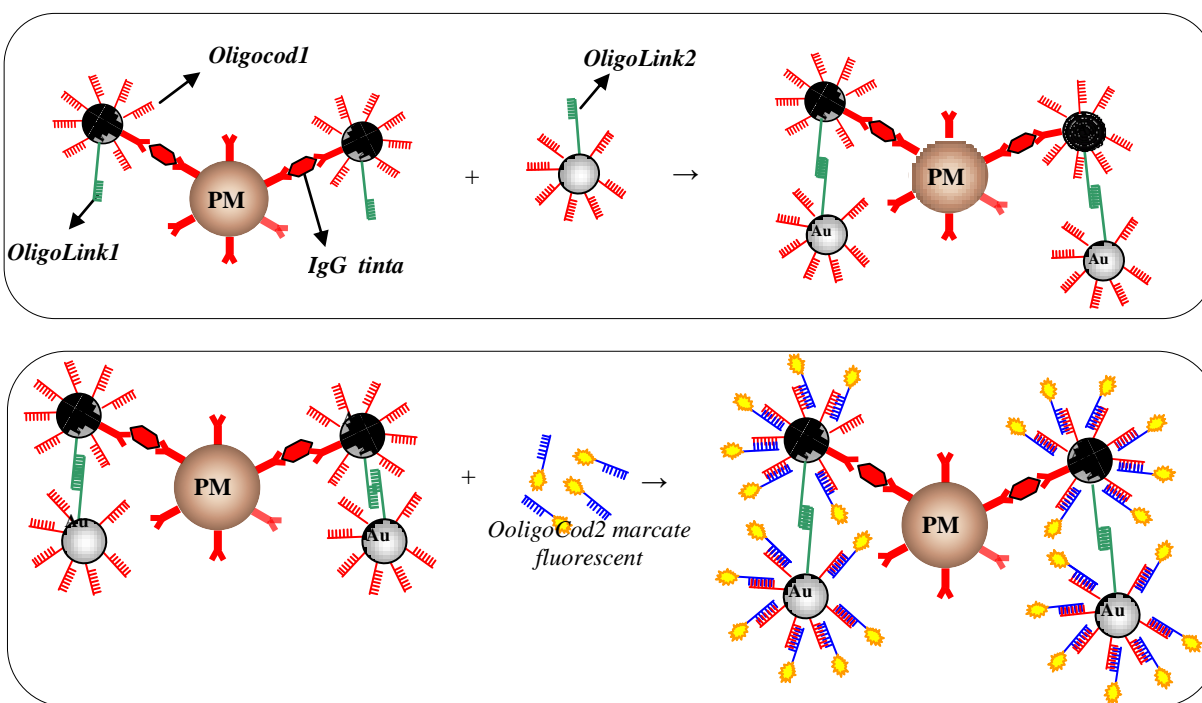


Fig. 9. Principiul metodei de detectie

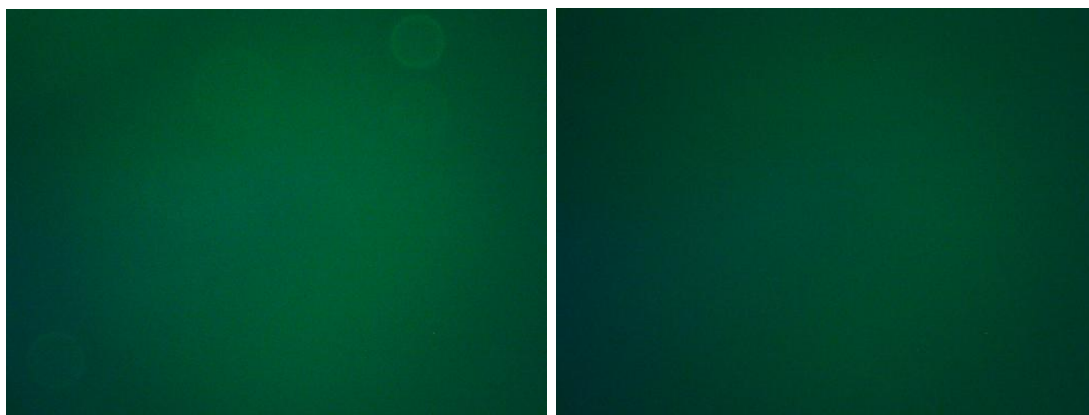
Dupa legarea anticorpilor IgG de capra (tinte) de catre anti-anticorpii receptori imobilizati pe microparticulele magnetice (in solutie tampon fosfat pH 7.4), complexe formate s-au separat cu ajutorul unui magnet permanent NdFeB. Apoi, s-a adaugat primul tip de nanoparticule de aur și s-a incubat la temperatura camerei, procedandu-se ulterior la separarea magnetica a noilor complexe formate.

Dupa spalare cu o solutie de tampon fosfat, s-a adaugat al doilea lot de nanoparticule de aur care s-au legat prin intermediul oligonucleotidelor complementare oligolink1 și oligolink2 și s-a procedat la o noua separare magnetica și spalare cu solutie tampon fosfat.

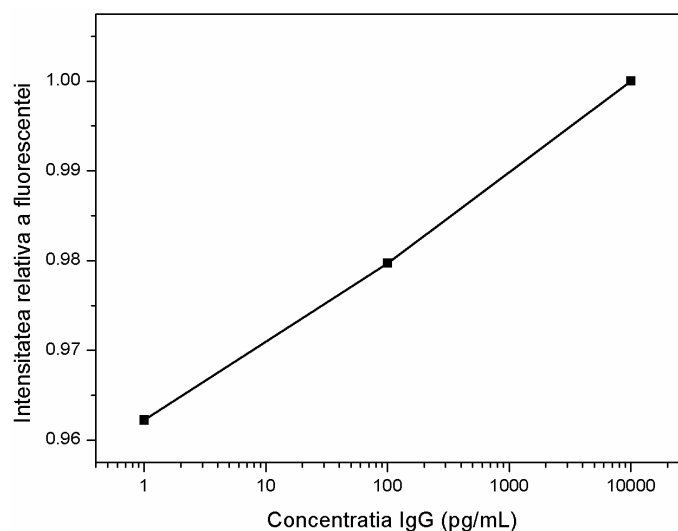
Dupa adaugarea de oligonucleotide fluorescente oligocod2, separare magnetica și spalare

cu tampon fosfat, in suspensia de particule s-a adaugat o solutie de dithiothreitol 100 mM in scopul dezlocuirii oligonucleotidelor de pe suprafata de aur. Dupa separarea magnetica a microparticulelor magnetice, probele provenind din solutia cu oligonucleotide fluorescente (dispersate intre 2 lamele transparente) a fost citita la microscopul cu fluorescanta Zeiss.

Intensitatea fluorescentei din imaginile obtinute la microscop (fig 11) a fost calculata folosind un program de procesare si analiza a imaginii [1], ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).



**Fig. 11.** Imagini de fluorescanta pentru oligonucleotidele oligocod2 fluorescente provenind din doua probe diferite.



**Fig.12.** Dependenta intensitatii relative a fluorescentei in functie de concentratia de IgG de capra (imunoglobulinele tinta)

Dependenta intensitatii relative a fluorescentei in functie de concentratiile de IgG tinta (1 pg/mL,  $10^2$  pg/mL si  $10^4$  pg/mL) a fost liniara (Fig. 12) pe o scara logaritmica, metoda permitand detectii de biomolecule tinta aflate in concentratii scazute, in etapa urmatoare a proiectului, conform Planului de realizare, procedandu-se la stabilirea limitei de detectie a acestei metode.

**Etapa III. a) Obținerea de date experimentale privind capacitatea metodei de tip bio-barcode de a detecta și identifica concentrații foarte mici de biomoleculă tinta prin microscopie de fluorescență (continuarea obiectivului din 2014); (b) Funcționalizarea microparticulelor nemagnetice și respectiv a celor magnetice cu anticorpi receptor în scopul utilizării acestora în cadrul metodei de detecție bazată pe procese optice și magnetice; (c) Date experimentale privind capacitatea metodei respective de a detecta biomoleculă tinta.**

**Activitatea III.1. Experimente pentru stabilirea limitei de detecție și a sensibilității metodei de tip bio-barcode (activitate preluată din anul 2014).**

Pentru detecția anticorpilor tinta, s-a utilizat un microscop inversat cu fluorescență (Evos FL Imaging System) pentru a măsura fluorescența oligonucleotidele marcate cu AlexaFluor488.

Metoda de detecție a utilizat același protocol ca în activitățile precedente, utilizând microparticule magnetice funcționalizate cu anticorpi receptor (împotriva imunoglobulinelor IgG de capra) și 2 tipuri de nanoparticule de aur funcționalizate cu aceiași anticorpi receptori și respectiv 2 tipuri de oligonucleotide: un tip funcționând ca receptori pentru oligonucleotidele marcate cu fluorofor, în timp ce celălalt tip a avut rolul de a lega cele 2 tipuri de nanoparticule de aur.

Intensitatea fluorescenței din imaginile obținute la microscop a fost calculată folosind programul de procesare și analiză a imaginii ImageJ.

Dependența intensității relative a fluorescenței în funcție de concentrațiile de IgG tinta ( $10^{-4}$  -  $10^4$  pg/mL) a crescut liniar, pe o scară logaritmică, pentru concentrații  $1-10^4$  pg/mL, limita de detecție, de 1 pg/mL, obținută în activitățile precedente, neputând fi scăzută.

***Activitatea III.2. Prepararea de microparticule nemagnetice funcționalizate cu anticorpi receptor.***

*Legarea fizică a IgG de capra la suprafața microparticulelor de polistiren (PSb)*

0.35 mg IgG de captură au fost dizolvate în 0.2 mL soluție tampon de cuplare (STC - 50 mM MES, pH 5.2, 0.05 % Proclin-300), iar soluția a fost agitată la temperatura camerei timp de 30 min. O suspensie de PSb (20  $\mu$ L -  $4.4 \times 10^8$  particule) a fost dispersată în 0.2 mL STC, ultrasonată, spălată de 2 ori cu STC și reconstituită în 1.5 mL TC. Suspensia astfel obținută a fost adăugată peste o soluție de anticorpi IgG sub agitare la 250 rpm timp de 40 min. Proba a fost ținută la frigider (4°C), apoi centrifugată la 650 xg, spălată de 4 ori în albumină serică bovină (BSA – 2 mg/mL) și reconstituită în 2 mL soluție tampon de spălare (STS - 10 mM Tris, pH 8, 0.05% Bovine Serum Albumine, 0.05 % Proclin-300).

Anticorpii de captură IgG au fost imobilizați fizic pe suprafața hidrofobică a particulelor

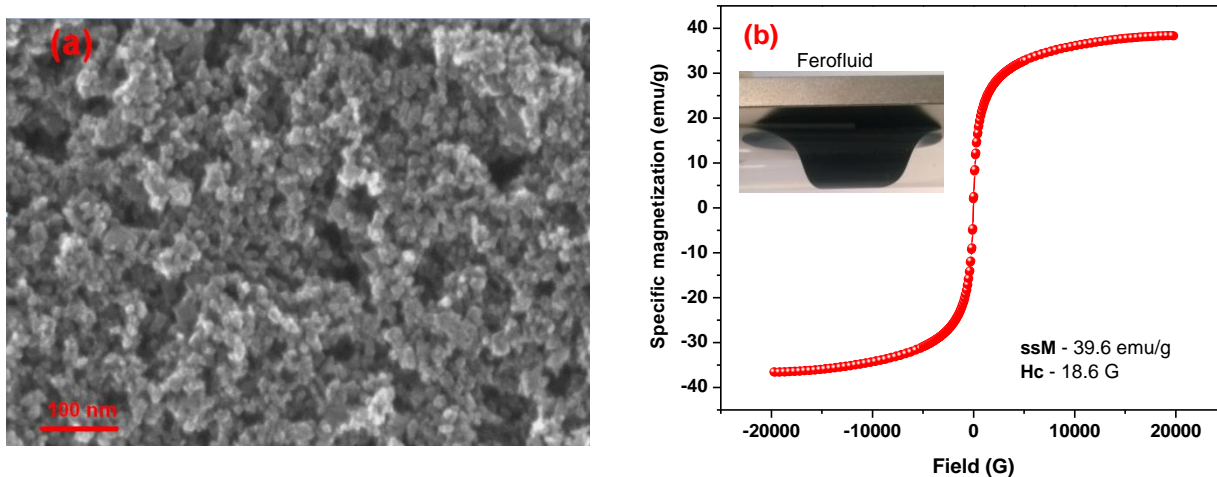
de polistiren urmand partial protocolul recomandat de compania Bangs Laboratories pentru adsorbția fizică, utilizând soluții tampon.

La începutul procesului, legarea anticorpilor IgG la suprafața PSb a condus la o parțială aglomerare a acestora, însă după spălare și resuspendare în soluție de albumină serică bovină (BSA), microparticulele s-au dispersat eficient. Acest comportament poate fi explicat prin acoperirea incompletă a particulelor de polistiren cu IgG și acoperirea ulterioară integrală cu molecule de BSA care a condus la stabilizarea lor sterică.

### **Activitatea III.3. Prepararea de nanoparticule magnetice funcționalizate cu anticorpi receptor.**

*Adsorbția fizică a anticorpilor IgG la suprafața nanoparticulelor magnetice (NPs).*

50  $\mu\text{L}$  ferrofluid (conținând 1.5 mg magnetită cu dimensiuni sub 20 nm și magnetizare de saturare de aproximativ 40 emu/g – Fig 13) a fost mixată 1 h la 1200 rpm cu 1.5 mg anticorpi IgG (în 1.9 mL apă distilată, pH 6.2) și 1 h la 200 rpm. Proba a fost păstrată în frigider peste noapte (4°C), centrifugată la 500 xg, extrăgând de fiecare dată particulele nesedimentate care au fost centrifugate din nou la maximum 2000 xg, spălate de cinci ori în soluție BSA (2 mg/mL), reconstituite în 2 mL în BSA și amestecate din nou 1 ora.



**Fig. 13.** Imagine SEM a nanoparticulelor magnetice (a) și magnetizația specifică a acestora (b).

Acoperirea prin adsorbție fizică a NPs cu anticorpi IgG de captură a fost realizată în apă distilată (pH 6.2). Acoperirea în absența unei soluții tamponate a împiedicat o potențială aglomerare indusă electrostatic prin prezența ionilor din soluția tampon. În consecință, NPs au format o suspensie foarte stabilă atât înainte cât și după conjugarea cu anticorpi. Totuși, dând fiind faptul că stabilitatea pe termen lung a anticorpilor imobilizați fizic nu este foarte bună, această abordare a fost exploatată cu grijă.

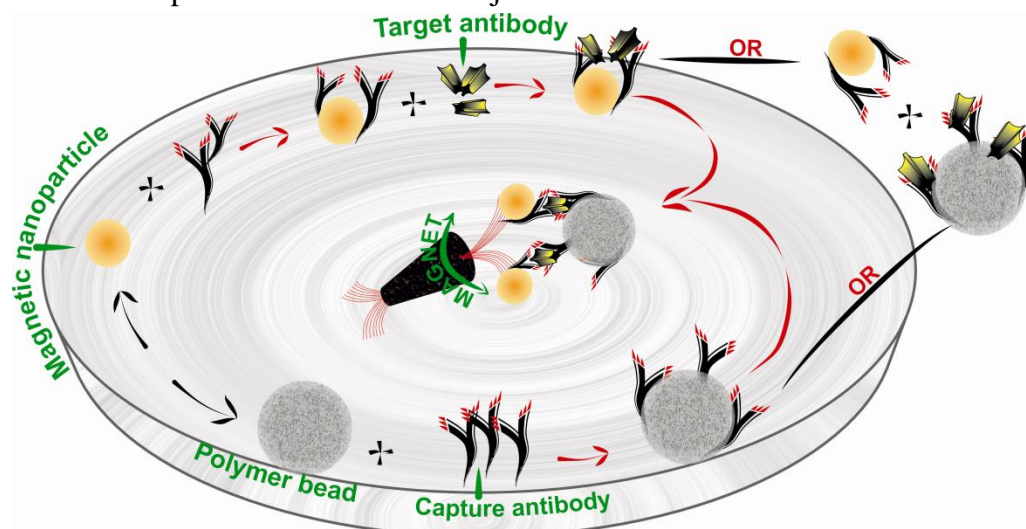
*Imobilizarea covalenta a anticorpilor IgG la suprafata particulelor magnetice pe baza de polimer (MagB - 0,88  $\mu\text{m}$  in diametru).*

Pentru a acoperi cu IgG particulele magnetice (ProMag™ 1 Series), am urmat protocolul recomandat de compania producatoare (Bangs Laboratories, Inc.). Totusi, am redus de 25 de ori concentratiile de reactanti/particule recomandate pentru a evita aglomerarea particulelor. Astfel, MagB (20  $\mu\text{L}$ ) au fost spalate in 0.2 mL solutie tampon de cuplare (STC), ultrasonate scurt, separate magnetic si reconstituite in 1.6 mL STC. Peste suspensia de MagB s-au adaugat de 20  $\mu\text{L}$  solutie EDAC (200 mg/mL) si agitate. Apoi, s-au adaugat 0.3 mg IgG si s-a lasat la incubat 1h in conditii de de agitare blanda. Proba a fost tinuta la frigider peste noapte, spalata de 5 ori in STS si reconstituita in 2 mL in STS. In final, s-a aplicat un scurt tratament de ultrasonare (5 pulsuri, 20 % amplitudine, frecventa de aproximativ 0.2 cycles/s).

#### ***Activitatea III.4. Evaluarea capacitatii metodei de detectie bazata pe procese optice si magnetice de a detecta si identifica biomolecule tinta.***

Principalele componente ale metodei de imunodectie au fost urmatoarele: particule magnetice (NPs sau 0.88  $\mu\text{m}$  MagB) acoperite cu anticorpi de captura (IgG); (b) anticorpi anti-IgG functionand ca *tinte* si (c) particule polistiren (PSb) de 2  $\mu\text{m}$  acoperite fizic cu anticorpi de captura.

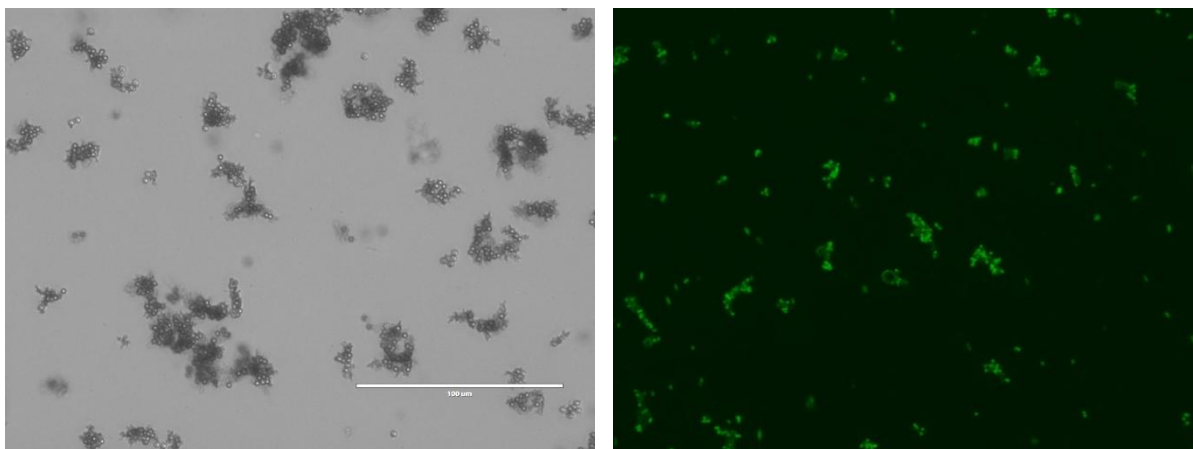
Pentru a demonstra functionalitatea noii metode de detectie, ideea initiala a fost ca mai intai sa se realizeze separarea magnetica a complexelor NPs-anticorpi-PSb de PSb nelegate iar apoi sa se verifice prin microscopie optica incidenta microparticulelor legate de NPs. Intregul lant de detectie este prezenta schematic mai jos.



**Fig. 14.** Reprezentarea schematica a procesului de detectie. Tintele pot fi prinse de catre particule magnetice invizibile sau putin vizibile la microscopul optic (sferele galbene) sau de catre particulele polimerice nemagnetice (sferele gri), proces urmat de legarea celor tipuri de particule si separare magnetica. In final, structurile separate se observa la microscopul optic.



De fiecare data insa, datorita NPs acoperite de IgG tinta care au legat doua sau mai multe PSb acoperite cu IgG de captura s-au format clusterne de microparticule (2-20 microparticule/cluster) usor vizibile la microscopul optic (Fig. 15). Aceasta configuratie a fost foarte convenabila pentru verificarea rotatiei lor ca un intreg in camp magnetic fara a fi necesara o separare magnetica preliminara. Altfel, daca nu sunt formate clusterne, din cauza formei sferice perfecte, rotatia unei singure microparticule de polistiren, chiar daca este acoperita cu NPs invizibile la microscopul optic, ar fi dificil de observant, iar detectia imunocomplexelor ar esua. Daca insa s-ar utiliza microparticule cu alte forme geometrice, atunci si rotatia unei singure microparticule ar putea fi observata.



**Fig. 15.** Imagine de microscopie optica a clusterelor de microparticule PSb si MagB in prezenta anticorpilor tinta (a - bright field, iar b - fluorescenta).

In cazul utilizarii de MagB vizibile, rotatia unei singure PSB legata de o singura MagB poate fi observata cu usurinta.

#### ***Detectia anticorpilor tinta fara separare (magnetica).***

Intr-o prima abordare, markerii optici (PSb) au fost amestecati cu anticorpii tinta, anti-IgG. Dupa incubarea cu NPs, probele au fost analizate la microscopul optic, observandu-se clusterne de microparticule nemagnetice, PSb, de polistiren care, in prezenta campurilor magnetice variabile s-au putut roti sau deplasa, indicand faptul ca NPs, prin intermediul anticorpilor IgG tinta, s-au legat de PSb, confirmand succesul metodei de detectie.

S-a observant si o legare nespecifica redusa in probele de control atunci cand particulele magnetice acoperite cu IgG de captura au fost incubate doar cu PSb, acoperite cu anticorpi IgG de captura, in solutie tampon salina fara BSA deoarece, in acest caz, probabilitatea de desprindere/eliberare in solutia tampon a moleculelor de BSA legate fizic a fost crescuta, reducandu-se stabilizarea sterica a particulelor. Totusi, legarea nespecifica a fost inca observata si in solutia tampon continand BSA, dar intr-un grad mult mai redus.

Pe de alta parte, in functie de intensitatea campului magnetic, NPs au format lanturi fie



stationare, aliniate după liniile câmpului magnetic, fie dinamice, rapid atrase spre magnet, inducând deplasare tuturor particulelor polimerice PSb. Deoarece NPs, organizate în lanțuri, au sedimentat pe suprafața lamei microscopului, atunci când au fost atrase spre magnet, au împins neuniform mediul lichid, forțând formarea a două fluxuri turbulente suprapuse, conținând PSb, care s-au deplasat în mod contrar una față de cealaltă. În acest caz, în lipsa formării clusterelor, deplasarea PSb poate fi considerată ca rezultat pozitiv și, prin urmare, o separare magnetică a tintelor, urmată de separarea magnetică a complexelor NPs-PSb, devine obligatorie.

Atunci când s-au utilizat MagB în locul NPs, deplasarea PSb singulare nu a mai constituit o problemă, dat fiind că PSb au putut fi clar văzute a fi legate sau nu de MagB aflate în mișcare.

#### ***Detectia anticorpilor tinta dupa separarea magnetica a acestora***

Dacă se aplică o separare magnetică a anticorpilor tinta, probabilitatea de blocare a anticorpilor de captură cu tinte libere de pe suprafața PSb este foarte redusă, permițând prin urmare doar legarea tintelor anterior prinse și separate prin intermediul particulelor magnetice.

Pe de altă parte, formarea clusterelor depinde de raportul dintre numărul de tinte și de anticorpii de captură disponibili pe suprafața particulelor magnetice. Dacă se dezvoltă un proces de aglomerare, acesta poate fi ușor observat microscopic, indicând un rezultat pozitiv al imunotestului. Dacă nu se observă nici un cluster, este nevoie de PSb pentru validarea evenimentului imunologic de legare.

În general, în majoritatea testelor, s-a observat o distribuție mai fină a clusterelor atunci când nu s-a aplicat separarea magnetică a tintelor și, în special, atunci când au fost utilizate particule magnetice de 0.88  $\mu\text{m}$ .

În cazul în care există vreo incertitudine privind incidența PSb legate de particulele magnetice în imunocomplexe, se poate verifica fluorescența acestora dat fiind că polistirenul este intrinsec fluorescent (Fig. 15). Totuși, acest lucru este potrivit doar dacă transportorii magnetici invizibil sau puțin vizibili microscopic nu sunt fluorescenti așa cum este cazul nanoparticulelor de magnetită.

***Activitățile III.5 și III.6. Evaluarea gradului de reproductibilitate a metodei bazată pe procese optice și magnetice; teste pentru stabilirea limitei de detecție și a sensibilității metodei bazată pe procese optice și magnetice.***

Pentru evaluarea reproductibilitatii metodei bazata pe procese optice si magnetice, experimentele s-au repetat de trei ori in aceleasi conditii. In cazul acestor teste, s-a luat in considerare numai o singura concentratie de anticorpi anti-IgG, si anume 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Clusterelor de microparticule s-au format de fiecare data cu succes, iar prin rotirea acestora cu ajutorul campului magnetic generat de un magnet permanent NdFeB a fost confirmat faptul ca anticorpii tinta au fost prinsi intre cele doua tipuri de particule.

In ceea ce priveste limita de detectie, chiar daca metoda s-a dovedit a fi una mai mult calitativa, s-au efectuat experimente prin care sa se evalueze si concentratia minima a anticorpilor tinta care inca mai poate fi detectata, utilizand aceleasi conditii experimentale ca in activitatile precedente.

#### *Stabilirea limitei de detectie a anticorpilor anti-IgG prin intermediul NPs*

2.5  $\mu\text{L}$  de PSb au fost dispersati in PBS (6 probe, 100  $\mu\text{L}$  fiecare) continand BSA (2 mg/mL) si anticorpi tinta in concentratii variind intre 0.1 – 10<sup>-7</sup>  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Dupa 30 min de agitare la 200 rpm, s-au adaugat NPs (5  $\mu\text{L}$  suspensie) acoperite cu anticorpi anti-IgG, agitandu-se inca 30 min.

Intr-o abordare inversa, NPs au fost amestecate cu anticorpii tinta, procedandu-se apoi la separarea magnetica a tintelor.

In ambele situatii, limita de detectie a fost de 0.1 ng/ $\mu\text{L}$ .

#### *Stabilirea limitei de detectie a anticorpilor anti-IgG prin intermediul MagB*

PSb (2.5  $\mu\text{L}$ ) au fost dispersate in PBS (6 probe, 100  $\mu\text{L}$  fiecare) continand BSA (2 mg/mL) si anticorpi tinta in concentratii variind intre 0.1 – 10<sup>-7</sup>  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Dupa 30 min de agitare la 200 rpm, s-au adaugat Magb (5  $\mu\text{L}$  suspensie) acoperite cu anticorpi anti-IgG, agitandu-se inca 30 min.

Si in acest caz am testat solutia inversa bazata pe separarea magnetica preliminara a tintelor, identic ca pentru NPs.

In cazul in care s-a aplicat separarea magnetica a anticorpilor tinta, limita de detectie a fost de 0.1 ng/ $\mu\text{L}$ , iar fara separare magnetica, 10 pg/ $\mu\text{L}$ .

In concluzie, toate activitatile si obiectivele propuse pentru toata perioada de executie a proiectului au fost realizate cu succes.

Director proiect,  
Dr. Dumitru-Daniel Herea