

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Specifické nosiče a biokonjugáty v moderních analytických metodách

Disertační práce

2020

Mgr. Pavla Murasová

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 11. 8. 2020

.....
Mgr. Pavla Murasová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové Ph.D. za cenné rady, předané zkušenosti a pomoc během studia. Velký dík patří mým kolegům z imunochemické skupiny, kteří po celou dobu mého studia vytvářeli velmi přátelskou a inspirativní atmosféru. Stejně tak děkuji i kolegyním z mikrobiologické skupiny, které mi vždy byly ochotny poradit a pomoci s jakýmkoli problémem. Poděkování patří také všem projektovým partnerům, kteří mě vždy přátelsky přivítali ve svých laboratořích a mnohému mě naučili. Velké a srdečné poděkování za neuvěřitelnou míru trpělivost, motivace a podpory patří mému manželovi a mým rodičům.

Anotace:

Předložená disertační práce se zabývá biofunkcionalizací/biokonjugací mikro- a nanočástic na bázi kovů a jejich následným využitím v moderních bioanalytických metodách. Biofunkcionalizací magnetických mikročástic byly připraveny dva druhy magnetických nosičů. Tyto nosiče byly použity pro izolaci a průkaz bakteriálních buněk v mléčných výrobcích nebo pro průkaz specifických protilátek v séru pacientů s Alzheimerovou chorobou. Pro elektrochemický průkaz bakteriálních buněk byly připraveny biokonjugáty na bázi zlatých nanočástic. Bylo experimentálně ověřeno, že konjugované bioaktivní složky reagovali specificky s povrchem bakteriálních buněk a umožnili jejich kvantifikaci v analyzovaném vzorku.

Klíčová slova:

Biofunkcionalizace, biokonjugáty, imunosorbenty, imunomagnetická separace, rychlý průkaz bakterií v potravinách

Anotation:

This thesis deals with the biofunctionalization/bioconjugation of metallic-based micro- and nanoparticles and their subsequent use in modern bioanalytical methods. Two types of magnetic carriers were prepared by biofunctionalization of magnetic microparticles. Carriers were used to isolate and detect bacterial cells in dairy products or to detect specific antibodies in the serum of Alzheimer's patients. Gold nanoparticles based bioconjugates were prepared for electrochemical detection of bacterial cells. It was experimentally verified that the conjugated bioactive components reacted specifically with the bacterial cell surface and allowed their quantification in the analyzed sample.

Key words:

Biofunctionalization, bioconjugates, immunosorbents, immunomagnetic separation, rapid detection of food-borne bacteria

Souhrn

Disertační práce popisuje řešení 3 vědecko-výzkumných úkolů, jejichž společným jmenovatelem byla povrchová modifikace magneticky aktivních materiálů nebo konjugace bioaktivních molekul se značkou poskytující signál vhodný pro detekci, kvantifikaci. Vždy se také jednalo o nástroje efektivně využitelné při analýze biologických materiálů.

Byly připraveny a experimentálně ověřeny protokoly pro výrobu magnetického nosiče (imunosorbentu) vhodného pro vysoce specifickou izolaci bakteriálních buněk z mléčných výrobků. Konkrétně se jednalo o bakterie *Salmonella spp.* Imunosorbent byl charakterizován z hlediska koloidní, skladovací a operační stability, cytotoxicity, vazebné účinnosti, selektivity a specifity a následně byl využit pro imunomagnetickou separaci *Salmonella spp.* ze vzorků mléka, a to jak ve vsádkovém, tak i v mikrofluidním uspořádání.

Druhým typem nosiče byly superparamagnetické mikročástice, na jejichž povrchu byly kovalentně navázány molekuly amyloid beta peptidu ($A\beta$) o délce 42 aminokyselin. Cílem bylo použít tento nosič pro průkaz a kvantifikaci specifických anti- $A\beta$ protilátek. Tyto protilátky se vyskytují v mozkomíšním moku a/nebo v séru některých pacientů s Alzheimerovou chorobou. Tradiční metoda ELISA doplněná o biofunkcionalizované magneticky aktivní částice byla vyvinuta s cílem ověřit, zda výskyt těchto specifických protilátek koreluje s vyšší hladinou patologických forem $A\beta$ peptidů v mozkové tkáni, mozkomíšním moku pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Specifické protilátky nebo oligonukleotidy byly konjugovány se zlatými nanočásticemi. Cílem bylo experimentálně ověřit různé metody biokonjugace a získat tak biokonjugát poskytující elektrochemický signál. Vybrané biokonjugáty byly poté testovány jako signál generující složka u nově vyvíjeného elektrochemického biosenzoru.

Summary

The thesis describes the solution of 3 scientific research tasks, in which the surface modification of magnetically active materials or the conjugation of bioactive molecules with a label providing a signal suitable for detection and quantification was the common denominator. They have been used as tools for effective analysis of biological materials.

Protocols for the production of a conjugate suitable for highly specific isolation of bacteria cells from dairy products have been prepared and experimentally verified. Specifically, they were *Salmonella spp.* Immunosorbent was characterized in terms of colloidal, storage, operational stability, cytotoxicity, binding efficiency, selectivity and specificity. The magnetically active carrier was subsequently used for the immunomagnetic separation of *Salmonella spp.* from milk samples in both batch and microfluidic arrangements.

The second type of carrier was superparamagnetic microparticles, on the surface of which 42 amino acid amyloid beta peptide (A β) molecules were covalently bound. The aim was to use this carrier for the detection and quantification of specific anti-A β antibodies. These antibodies occur in the cerebrospinal fluid and / or serum of some patients with Alzheimer's disease. The traditional ELISA method supplemented with biofunctionalized magnetically active particles was developed to verify whether the presence of these specific antibodies correlates with higher levels of pathological forms of A β peptides in brain tissue, cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease.

Specific antibodies or oligonucleotides were conjugated with gold nanoparticles. The aim was to experimentally verify various methods of bioconjugation to obtain a bioconjugate providing sufficient electrochemical signal for sensitive detection. Selected bioconjugates were then used as a signal generating component of the newly developed electrochemical sensor.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1 Biokonjugace a biofunkcionalizace moderních materiálů	16
1.2 Biofunkcionalizace magnetických částic.....	20
1.2.1 Magnetické částice – vlastnosti a chování v magnetickém poli	20
1.2.2 Syntéza magnetických částic	20
1.2.3 Povrchová modifikace magnetických částic.....	21
1.2.4 Vazba ligandů na povrch magnetických částic.....	23
1.2.5 Metody charakterizace magnetických částic	26
1.2.6 Magnetická separace jako nástroj purifikace a izolace specifické látky ze vzorku	28
1.2.6.1 Faktory ovlivňující účinnost imunomagnetické separace.....	31
1.3 Využití magnetických nosičů v moderních analytických metodách	34
1.3.1 Magnetické nosiče pro izolaci bakteriálních buněk.....	36
1.4 Biokonjugáty na bázi zlatých nanočástic.....	43
1.4.1 Zlaté nanočástice.....	43
1.4.2 Syntéza zlatých nanočástic	43
1.4.3 Funkcionalizace zlatých nanočástic.....	44
1.4.4 Biokonjugace zlatých nanočástic.....	45
1.5 Využití biokonjugátů na bázi zlatých nanočástic.....	49
1.6 Magnetické nosiče a biokonjugáty jako součást „Lab-on-a-chip“ platformem	53
1.6.1 Úloha magnetických částic uvnitř Lab-on-a-chip platformem	54
1.6.2 Využití magnetických nosičů a biokonjugátů při detekci bakteriálních buněk uvnitř Lab-on-a-chip platformem	56

2	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	58
3	DOSAŽENÉ VÝSLEDKY A DISKUZE	61
3.1	Komentovaný úvod k článkům č. I a II	62
3.2	Komentovaný úvod k článku č. III.....	65
3.3	Komentovaný úvod k článkům č. IV a V.....	67
3.4	Komentovaný úvod k článku č. VI.....	68
4	PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY	70
4.1	Článek I.....	70
4.2	Článek II.....	79
4.3	Článek III.....	87
4.4	Článek IV	93
4.5	Článek V	106
4.6	Článek VI.....	113
5	ZÁVĚR	124
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	126
7	PUBLIKAČNÍ ČINNOST.....	154

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Různé podoby konjugátů vzniklých spojením biomolekuly (A) s různými částicemi případně jinými molekulami (B).....	17
Obrázek 2: Komplex kombinující magnetický nosič a signál generující biokonjugát.	18
Obrázek 3: Vazba biologických molekul na mikro- a nanočástice.	19
Obrázek 4: Morfologické typy magnetických polymerních mikročástic. (a) částice s mnohočetnými magnetickými jádry přítomnými na povrchu částice, (b) částice typu jádro-plášť, (c) částice s mnohočetným magnetickými jádry obklopenými polymerem.	21
Obrázek 5: Schéma magnetického nosiče s různými ligandy: protilátky, proteiny, nukleové kyseliny, enzymy, fluorescenční značky, radionuklidy a léčiva.....	23
Obrázek 6: Schematické znázornění nejběžnějších strategií využívajících se pro kovalentní vazby biomolekul na povrch částic s různou funkční skupinou.....	25
Obrázek 7: Schematické znázornění metod používaných pro charakterizaci magnetických částic s odpovídajícími záznamy.	26
Obrázek 8: Základní rozdělení magnetické separace na pozitivní a negativní selekci.....	29
Obrázek 9: Různé typy komerčně dostupných magnetických separátorů konstruované pro 1) mikrozkušavky (Cell Signaling Technology, Inc.), 2) PCR destičky (SP Scienceware - Bel-Art Products), 3) centrifugační zkumavky (Chemicell), 4) mikrotitrační destičky (Chemicell).	30
Obrázek 10: Schematické znázornění poměrů různě velikých magnetických částic k povrchu eukaryotické buňky.....	32
Obrázek 11: Aplikace biofunkcionalizovaných magnetických částic v biotechnologii a biomedicíně.....	34
Obrázek 12: Schematické znázornění časové náročnosti detekce bakterií pomocí konvenčních mikrobiologických metod v porovnání s detekcí využívající IMS.....	37

Obrázek 13: Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu. A) (měřítko 1 μm) a B) (měřítko 100 nm) magnetické submikronové částice (0.88 μm) s navázanou salmonelovou buňkou C) (měřítko 200 nm) magnetické nanočástice (300 nm) a D) (měřítko 5 μm) mikročástice (2.8 μm) a navázanou salmonelovou buňkou	39
Obrázek 14: Využití různě konjugovaných sekundárních protilátek pro následnou detekci izolované bakterie pomocí imunosorbentu. MČ - magnetická částice.	41
Obrázek 15: Souhrn nejčastěji používaných biomolekul pro biokonjugaci zlatých nanočástic a jejich aplikace.	46
Obrázek 16: Schéma strategií používaných pro přípravu F(ab') a F(ab) fragmentů z celé molekuly Imunoglobulinu G.....	48
Obrázek 17: Využití zlatých nanočástic v bioaplikacích. A) Biodetekce B) Zobrazovací techniky-zobrazení nádorové buňky pomocí zlaté nanočástice konjugované s fluorescenční značkou. C) Umlčení genu-zablokování syntézy určitého proteinu pomocí zlaté nanočástice nesoucí komplementární siRNA za vzniku komplexu nesoucího umlčující komplex.	49
Obrázek 18: Obecné schéma Lab-on-a-chip systému.....	53
Obrázek 19: Schematické znázornění mikrofluidních čipů s magnetickými částicemi: A) imunomagnetická separace uvnitř kanálku (částice tvoří zátku) B) mikrofluidní magneticky stabilizované fluidní lože C) řetízky magnetických částic na magnetických kotvách.....	55
Obrázek 20: Schematické znázornění dílčích cílů disertační práce.....	60
Obrázek 21: Schematické znázornění imunomagnetické separace salmonelových buněk uvnitř magneticky stabilizovaného fluidního lože.	63
Obrázek 22: Schematické znázornění propojení imunomagnetické separace z velkého objemu s Lab-on-a.Chip platformou vedoucí k detekci 1 bakteriální buňky ve 25 ml mléka s pomnožovací fází v délce 3 hodiny.....	64
Obrázek 23: Schematické znázornění imunosenzoru spojujícího proces imunomagnetické separace s elektrochemickou detekcí.	66

SEZNAM ZKRATEK

2-MEA	2-merkaptoethylamin
A β	Amyloid beta peptid
A β 1-42	Amyloid beta peptid o délce 42 aminokyselin
AFM	Mikroskopie atomárních sil (z angl. Atomic Force Microscopy)
AuNPs	Zlaté nanočástice (z angl. Au Nanoparticles)
BSA	Hovězí sérový albumin
CFU	Jednotka tvořící kolonie (z angl. Colony Forming Unit)
CT	Výpočetní tomografie (z angl. Comupted Tomography)
DLS	Dynamický rozptyl světla (z angl. Dynamic Light Scattering)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
ELISA	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
HGMS	Vysokogradientová magnetická separace (z angl. High Gradient Magnetic Separation)
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. Human Immunodeficiency Virus)
HRP	Křenová peroxidáza (z angl. Horseradish Peroxidase)
IgG	Imunoglobulin G
IMS	Imunomagnetická separace
LAMP	Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (z angl. Loop-mediated Isothermal Amplification)
LGMS	Nízkogradientová magnetická separace (z angl. Low Gradient Magnetic Separation)
LOC	Laboratoř na čipu (z angl. Lab-on-a-Chip)
LOD	Limit detekce (z angl. Limit of Detection)
MELISA	Enzymová imunoanalýza na magnetických částicích (z angl. Magnetic Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
MRI	Magnetická rezonance (z angl. Magnetic Resonance Imaging)

PAA	Polyakrylamid
PC	Polykarbonát (u angl. Polycarbonate)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
PCS	Fotonová korelační spektroskopie (z angl. Photon Correlation Spectroscopy)
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
PEG	Polyethylenglykol
PET	Pozitronová emisní tomografie
PMMA	Poly(methylmetakrylát)
PVA	Polyvinylalkohol
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. Real Time Polymerase Chain Reaction)
SEM	Rastrovací (Skenovací) elektronová mikroskopie (z angl. Scanning Electron Microscopy)
SPCE	Tištěná uhlíková elektroda (z angl. Screen-Printed Carbon Electrode)
SPM	Mikroskopie skenující sondou (z angl. Scanning Probe Microscope)
STM	Skenovací tunelová mikroskopie (z angl. Scanning Tunneling Microscopy)
SWASV	Anodická rozpouštěcí square wave voltametrie (z angl. Square Wave Anodic Stripping Voltammetry)
SWCSV	Katodická rozpouštěcí square wave voltametrie (z angl. Square Wave Cathodic Stripping Voltammetry)
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
UV-VIS	Ultrafialováviditelná oblast spektra (z angl. Ultraviolet–Visible Spectroscopy)
XAS	Rentgenová absorpční spektroskopie (z angl. X-Ray Absorption Spectroscopy)
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (z angl. X-Ray Photoelectron Spectroscopy)
XRD	Rentgenová difrakční analýza (z angl. X-Ray Diffraction)

ÚVOD

Rychlé, účinné, dostatečně citlivé a robustní detekční techniky hrají klíčovou roli ve včasné diagnostice nejrůznějších onemocnění. S ohledem na ochranu lidského zdraví má podobný význam i rychlý průkaz bakteriálních kontaminací v potravinách. V současné době je již v praxi k dispozici celá škála běžně dostupných diagnostických technik a detekčních metod. Patří sem např. zobrazovací techniky, biochemické testy, imunochemické metody, molekulárně-biologické techniky nebo mikrobiologické konfirmace. Avšak i nadále je snaha vyvinout a následně v praxi uplatnit kvalitativně nové metodické přístupy a detekční systémy. Parametry jako časová nebo finanční náročnost bioanalýzy, pracnost provedení nebo toxicita a celková spotřeba drahých reagensů, to vše jsou i v dnešní době faktory ovlivňující konečné uplatnění a rutinní provozování analytických metod v praxi.

V klinické diagnostice stejně jako v analýze potravin je dnes velkým trendem vyvíjet metody, které jsou schopny poskytnout konečný výsledek v co nejkratším čase, jsou nízkonákladové, přístrojově nenáročné, snadné na provedení a mají minimální nároky na objem vzorku. Tyto metody obecně pracují na principu takzvaného point of care testování (*in vitro* testování v místě péče o pacienta, testování u lůžka). Typickým zástupcem tohoto typu testování jsou mikrofluidní analyzátory typu Lab-on-a-chip (laboratoř na čipu). Hlavním rysem těchto analyzátorů je integrace veškerých dílčích úkonů, které jsou prováděné při běžném testování v laboratoři do miniaturní přenosné platformy. Aby však bylo možné tyto platformy vytvořit a používat, je nutné zachovat citlivost, specifitu a robustnost dané metody. Proto se přistupuje k využití nových technologií a materiálů, které mají v této oblasti ohromný potenciál.

Velké pokroky v materiálovém inženýrství již několik desetiletí otevírají dveře novým technologiím ať už v chemickém nebo v elektrotechnickém průmyslu, v zemědělství, v biotechnologiích nebo v medicíně. V dnešní době již existuje nepřeborné množství (nano)technologií, díky kterým je možné připravit širokou škálu materiálů různého složení, tvaru a velikostí a díky tomu i různého uplatnění.

V oborech jako jsou biotechnologie nebo biomedicína se dnes největší měrou uplatňují materiály v rozměrech nano až maximálně několik jednotek mikrometrů. Ať už se jedná o organické částice, jako jsou liposomy, dendrimery, polymerní micely případně anorganické částice kovů, vždy se s výhodou využívá jejich vlastností často souvisejících s jejich velikostí,

tvarem a typem materiálu.

Velmi rozšířenou skupinou jsou pak částice na bázi kovů, které si upevnily své postavení jak na poli detekce, tak i v oblasti terapie. Jedná se především o magnetické částice, zlaté a stříbrné nanočástice nebo kvantové tečky. Výše zmíněné materiály určené pro aplikace v diagnostice, katalýzu biotechnologických procesů nebo v biomedicíně výzkumu mají různou strukturu, která úzce souvisí s očekávanou funkcí a účelem, ke kterému jsou tyto materiály určeny. I když mají materiály na bázi kovů v bioanalýze různá uplatnění, i tak mají některé společné vlastnosti. Jsou jimi kovové jádro nesoucí určité fyzikálně-chemické vlastnosti a biopolymerní obálka. Tato obálka poskytuje v mnoha případech částicím koloidální stabilitu ve vodných roztocích, biokompatibilitu a především možnost kovalentní vazby s nejrůznějšími ligandy. Pokud jsou na částice navázány bioaktivní látky, jako jsou např. peptidy, proteiny (nejčastěji protilátky nebo enzymy) nebo nukleové kyseliny, můžeme tyto komplexy označit jako tzv. biokonjugáty, případně biofunkcionalizované nosiče, které se dnes nachází ve středu vývoje moderních diagnostických metod, ale i terapeutických postupů.

V moderní laboratoři se pro analýzu biologických materiálů dnes běžně používají biofunkcionalizované částice jako pevná fáze pomocí níž lze hledanou látku snadno a rychle izolovat, purifikovat nebo zakoncentrovat. K těmto procesům se používá nejen tradiční centrifugace nebo filtrace, ale nově i magnetické pole. Superparamagnetické vlastnosti částic jsou dány přítomností kovového jádra na bázi oxidů železa. Pokud jsou na povrch magnetické částice navázány specifické protilátky, pak hovoříme o tzv. imunosorbentech. Protilátka zajistí specifickou vazbu hledané látky na povrch imunosorbentu a analyt je poté ze vzorku pomocí vnějšího magnetického pole oddělen. Imunomagnetická separace je snadná, rychlá a citlivá separační metoda, která se v posledních letech stala velmi oblíbenou a často využívanou.

Nanomateriály na bázi kovů jsou často součástí i tzv. biokonjugátů. Nanomateriál zde zastává funkci značky generující signál a bioaktivní molekula zajišťuje specifickou interakci s látkou, kterou chceme prokázat, případně kvantifikovat. Volba kovu, materiálu, který byl pro výrobu biokonjugátů zvolen, závisí na typu detektoru. Např. pro fluorescenční detekci je součástí konjugátu kvantová tečka definované velikosti, pro elektrochemickou detekci jsou to zase nanočástice obsahující atomy některých kovů, např. Zn, Pb, Cu, Au. Díky moderním technologiím dnes existuje velké množství protokolů na jejich výrobu. V literatuře bylo popsáno mnoho možností jak tyto částice povrchově modifikovat a jak na jejich povrch zavádět reaktivní

funkční skupiny pro kovalentní vazbu s bioaktivní molekulou. Tyto biofunkcionalizované materiály se pak stávají nedílnou a často klíčovou součástí moderních analytických metod.

1 TEORETICKÁ ČÁST

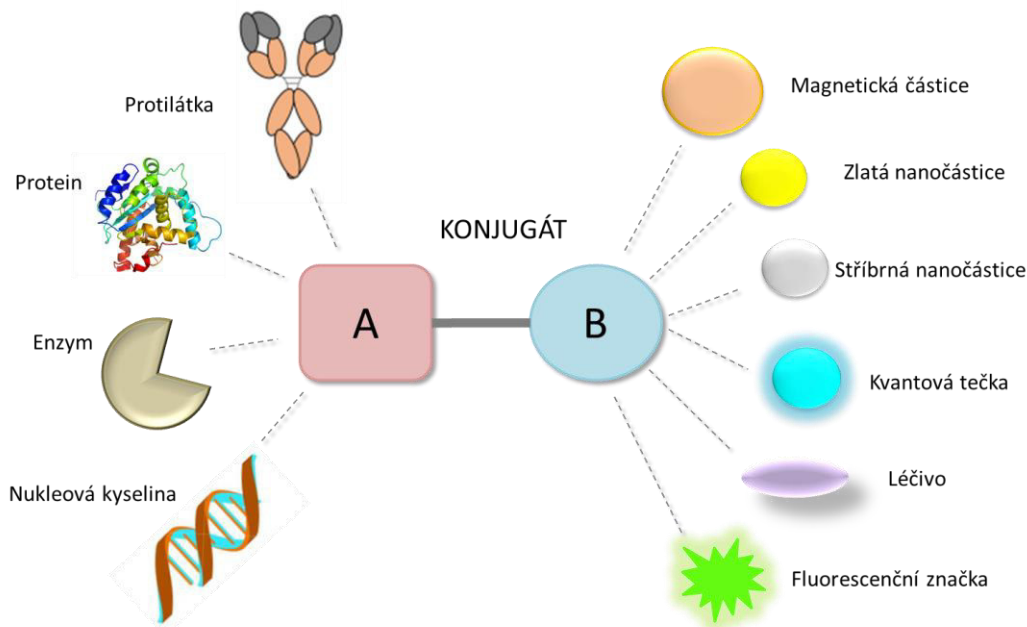
1.1 Biokonjugace a biofunkcionalizace moderních materiálů

Termíny biokonjugace a biofunkcionalizace obecně popisují procesy, při kterých dochází ke spojení dvou, případně i více molekul, přičemž alespoň jedna z vázaných molekul nese určité biologické vlastnosti [1]. Mezi nejčastěji používané biologicky aktivní molekuly patří peptidy [2,3], proteiny [4,5] (enzymy [6]), nukleové kyseliny [7], atd. Ty mohou být konjugovány se širokou škálou jiných molekul nebo materiálů. Nejčastěji to bývají nano- a mikro- částice [8-10], syntetické polymery [11], fluorescenční značky [12] nebo léčiva [13]. Dalo by se říci, že tyto procesy jsou určitým propojením mezi biologií, chemií a fyzikou, jelikož se zde využívá (bio)chemické, případně fyzikální vlastnosti jedné molekuly a zároveň biologických vlastností molekuly druhé.

Vyvinuto a experimentálně ověřeno bylo již nepřeberné množství konjugačních strategií, pomocí nichž jsou výše uvedené molekuly vzájemně vázány, a to jak nekovalentně, tak kovalentně. Mezi nekovalentní interakce patří elektrostatické interakce, π - π interakce, zachycení v polymerech a van der Waalsovy interakce. Ačkoli pro vytvoření vazby vyžadují nízkou aktivační energii, jejich hlavní nevýhodou je nízká stabilita, a tedy i spolehlivost. Naproti tomu kovalentní vazby poskytují konjugáty vysoce stabilní, jež jsou schopny odolávat extrémním vlivům reakčního prostředí, jako jsou například extrémní hodnoty pH, vysoké koncentrace detergentů, chaotropních činidel a solí ve vodných roztocích. Další alternativou jsou interakce, kde sice není vytvořena kovalentní vazba, avšak svojí intenzitou se kovalentní vazbě blíží. Těmi jsou například bioafinitní interakce zprostředkované systémem biotin/avidin (streptavidin) [14]. Škála možností, jak vytvořit tyto konjugované komplexy je velice široká (Obrázek 1).

Takto vzniklé komplexy lze následně využít zejména pro tyto účely:

- Zachycení, odstranění, čištění široké škály analytů [15,16]
- Stanovení a kvantifikaci široké škály analytů [17-19]
- Sledování a zobrazení (např. tkání *in vivo* a *in vitro*) [20-22]
- Terapie, *in vivo* diagnostika [23-25]



Obrázek 1: Různé podoby konjugátů vzniklých spojením biomolekuly (A) s různými částicemi případně jinými molekulami (B).

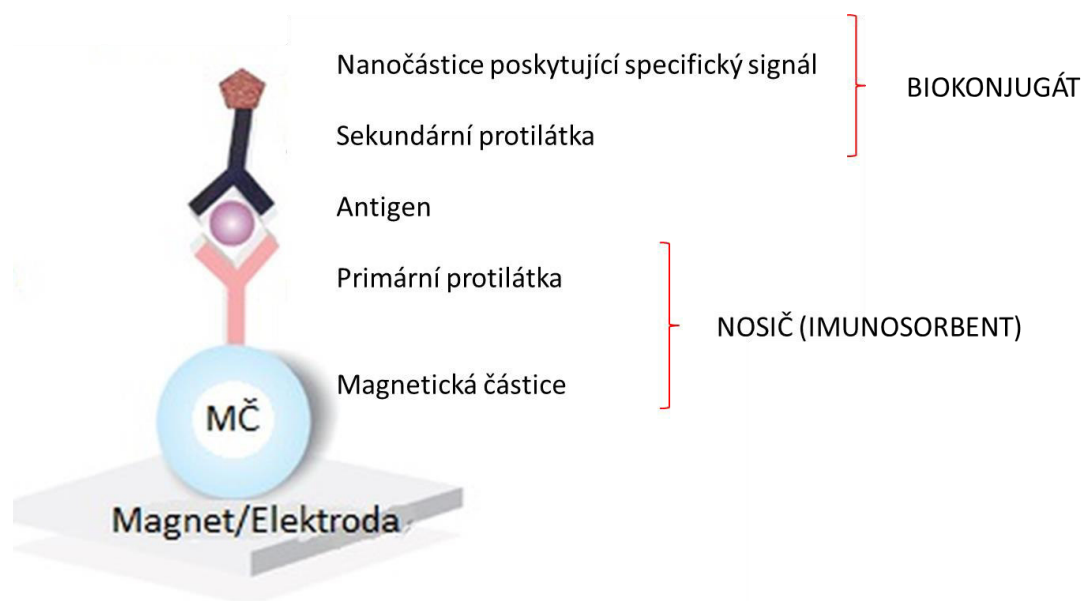
Díky velké popularitě oborů materiálového inženýrství a nanotechnologie se do středu zájmu dostala příprava a využití částic na bázi kovů, které se začaly uplatňovat v mnoha aplikacích od diagnostiky až po terapii [26-29]. Hlavními výhodami při práci s materiály na bázi kovů je rozmanitost jejich fyzikálně-chemických vlastností, jako je např. bod tání, elektrostatická a tepelná vodivost, absorpce a rozptyl světla, magnetismus [30]. V případě, že uvažujeme použití tyto systémy v diagnostice nebo při terapii, je možné volit takový materiál, který není toxický a je tzv. biokompatibilní. Nespornou výhodou u mikro- a nanočástic je i velký specifický povrch, na něž lze navázat velké množství různých molekul, přesněji biomolekul, což jim přináší velmi pestré využití. V biomedicině se z těchto důvodů nejvíce uplatňují např. zlaté [31] a stříbrné nanočástice [32], kvantové tečky [29] a magnetické mikro- nebo nanočástice [33].

Zavádění funkčních skupin na povrch magnetických částic se nazývá povrchová modifikace a následná vazba ligandu biologické povahy se označuje termínem biofunkcionalizace. Z magnetické částice se tak stává magnetický nosič. V procesu magnetické separace pak magnetická částice slouží jako pevná fáze pro ukotvení bioaktivní látky, která s izolovanou látkou vytváří biospecifický pár a vnější magnetické pole je potom použito k oddělení této pevné fáze z roztoku (ze vzorku biologického materiálu) díky

superparamagnetickým vlastnostem částic.

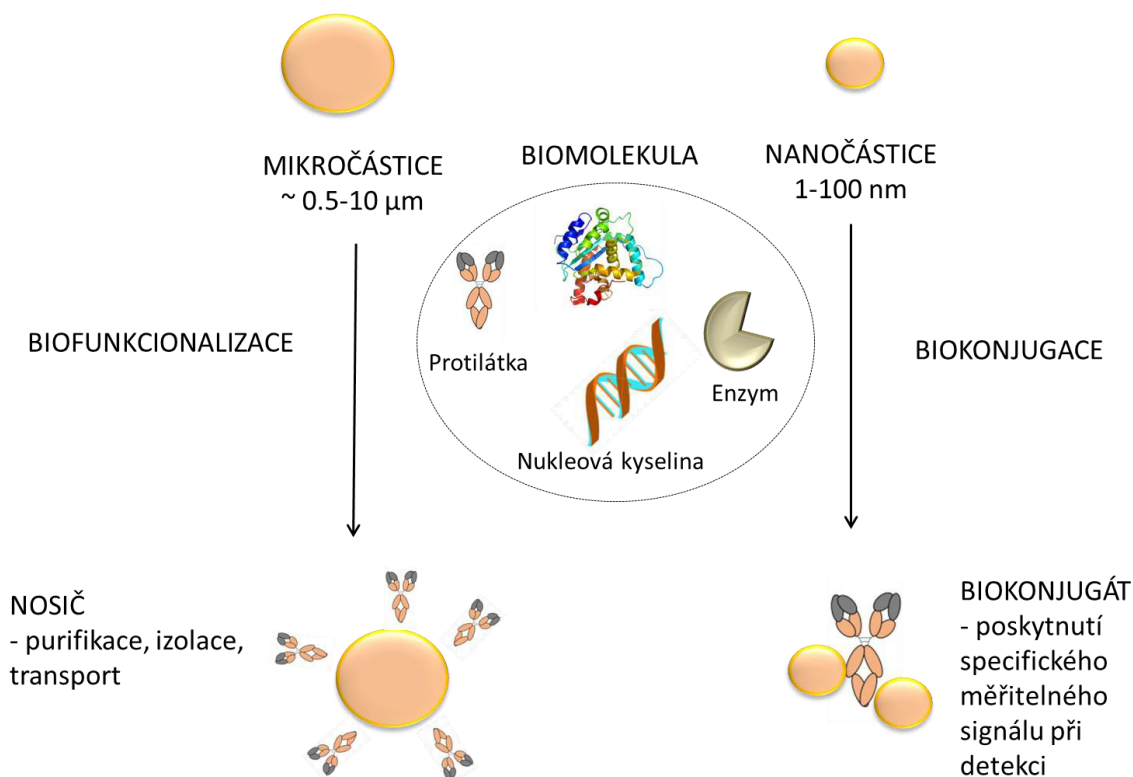
Za nanočástice se obecně považují ty, s minimálně 1 rozměrem v rozsahu 1-100 nm. [34]. Díky velkým pokrokům v syntéze, modifikaci a následné biokonjugaci kovových nanočástic se nabízí velmi široká šála jejich využití od separace [16], cílené dopravy léčiv [35], genové terapie [36], radioterapie [21], zobrazovací *in vivo* techniky až po detekci [22]. Pokud tedy hovoříme o biokonjugátu, máme na mysli biomolekulou (nejčastěji protilátkou, peptidem, enzymem, nukleovou kyselinou) označenou nanočásticí. Biologická molekula zajistí kontakt s okolním prostředím a nanočástice je díky svým specifickým fyzikálním a chemickým vlastnostem schopna poskytnout měřitelný signál, který je detekován.

Díky velké variabilitě v přípravě jak magnetických nosičů, tak i biokonjugátů nanočástic lze získat nepřeberné množství jejich různých variant. Navíc je lze mezi sebou kombinovat (Obrázek 2) a vytvořit tak vysoce selektivní a specifický biosenzor pro detekci různých analytů. Nespornou výhodou je i možnost jejich integrace do miniaturizovaných mikrofluidních systémů.



Obrázek 2: Komplex kombinující magnetický nosič a signál generující biokonjugát.

Obrázek 3 znázorňuje procesy biofunkcionalizace a biokonjugace tak, jak jsou předkládány v této disertační práci.



Obrázek 3: Vazba biologických molekul na mikro- a nanočástice.

Tato práce se zabývá biofunkcionalizací magnetických mikročástic za účelem přípravy specifických a účinných magnetických nosičů, které jsou následně využity pro specifickou izolaci bakterií případně proteinů. Vedle toho jsou optimalizovány postupy pro přípravu biokonjugátů zlatých nanočástic, které jsou využity k detekci bakteriálních buněk.

1.2 Biofunkcionalizace magnetických částic

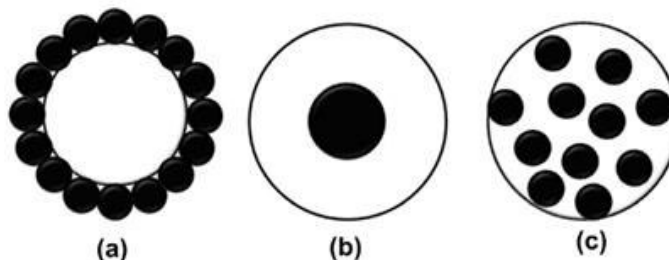
1.2.1 Magnetické částice – vlastnosti a chování v magnetickém poli

Magnetické částice díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem disponují ohromnými benefity. Ačkoli i v odborné literatuře jsou běžně označovány jako částice magnetické, v převážné většině se jedná o částice superparamagnetické, které vykazují magnetický moment pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Při absenci magnetického pole by tedy částice mezi sebou neměly interagovat a vytvářet tak nežádoucí agregáty. Důležitou výhodou je, že díky superparamagnetickým vlastnostem je možné částice znovu resuspendovat, pokud na ně přestane magnetické pole působit. K přípravě superparamagnetických částic se nejčastěji používají oxidy železa, magnetit Fe_2O_3 nebo maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Oproti ostatním oxidům kovů, které se k výrobě kovových částic využívají, mají navíc oxidy železa nespornou výhodu díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě [37]. Nedílnou složkou částic je i nemagnetická část, kterou mohou být rozličné organické nebo anorganické molekuly, obalující magnetické jádro a zajišťující koloidní stabilitu a rozpustnost [38]. V bioaplikacích se většinou používají magnetické částice o velikostech 50 nm až 10 μm [39]. Podle velikosti lze tyto částice rozdělit na mikro- a nano-. Toto rozdělení pak souvisí právě s jejich využitím v různých oblastech. Magnetické nanočástice uplatňují svůj velký potenciál především v medicíně *in vivo* aplikacích, a to v oblastech diagnostiky [40] a terapie [41]. Naproti tomu magnetické mikročástice ve velikostech pohybujících se od stovek nanometrů do jednotek mikrometrů, se uplatňují zejména *in vitro*, například při imunomagnetické separaci (IMS) nebo diagnostice buněk [42], proteinů [43] a patogenních mikroorganismů [44].

1.2.2 Syntéza magnetických částic

Pro přípravu magnetické složky částic se nejčastěji používají následující metody: (I) spolusrážecí (koprecipitační) reakce solí železa (II) termický rozklad organických prekurzorů obsahujících železo [45-47]. Kromě výše zmíněných metod, mohou být tyto magnetické částice připraveny zcela odlišnou biogenní metodou, kdy jsou produkovány magnetotaktickými nebo kov redukujícími bakteriemi [48]. Všechny výše zmíněné metody vedou k syntéze vysoce kvalitních magnetických částic složených z oxidů kovů. Druhou složkou částice jako takové je

její nemagnetická složka, kterou jsou rozličné organické ale i anorganické látky [49]. Samotné částice obsahující pouze oxidy železa jsou vysoce chemicky aktivní a snadno oxidovatelné na vzduchu, což má za následek ztrátu magnetismu. Proto je nutné povrch těchto částic pokrýt vrstvou, která zajistí stabilitu částic během skladování a následných aplikací a zabrání jejich oxidaci a vzájemné agregaci. Podle vzájemného uspořádání těchto dvou složek vznikají částice s různou morfologií (Obrázek 4).



Obrázek 4: Morfologické typy magnetických polymerních mikročástic. (a) částice s mnohočetnými magnetickými jádry přítomnými na povrchu částice, (b) částice typu jádro-plášť, (c) částice s mnohočetným magnetickými jádry obklopenými polymerem [46].

1.2.3 Povrchová modifikace magnetických částic

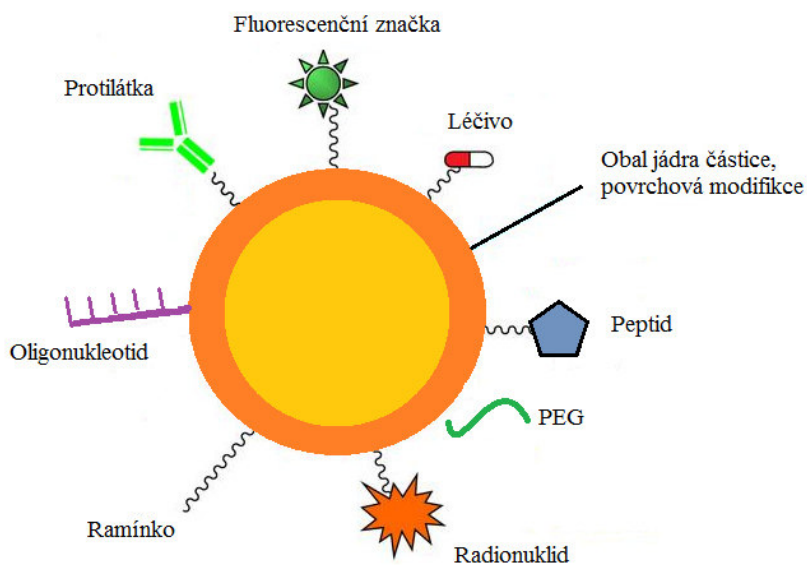
Povrchová modifikace částic se provádí z několika důvodů. Jsou jimi zábrana samovolné agregace částic ve vodném prostředí a zvýšení jejich koloidní a chemické stability [50], zavedení vhodné funkční skupiny nebo raménka pro následnou vazbu ligandu (biomolekuly) [51], zabránění vysoké nespecifické sorpce proteinů popřípadě buněk z komplexních biologických vzorků, případně zamezení sorpce samotných částic na vnitřní stěny reakčních nádob [52,53]. Částice lze modifikovat různými typy organických molekul nebo surfaktantů, polymerů nebo anorganických látek, jako jsou oxidy křemíku (silika), oxidy nebo sulfidy kovů [49]. Molekuly jsou na povrch částic zaváděné buď přímo při syntéze nebo ligandovou výměnou. Pokud je povrch magnetických částic modifikován organickými molekulami popřípadě surfaktanty, lze podle jejich povahy funkcionalizované částice rozdělit do tří základních skupin: rozpustné v oleji (lipofilní), rozpustné ve vodě (hydrofilní) a částice kombinující obě vlastnosti (amfifilní) [49]. Klasickým příkladem využívané lipofilní molekuly je kyselina olejová, která dokáže vytvořit silnou ochrannou vrstvu, čímž dává vzniknout jednotným a monodisperzním magnetickým

částicím. Kyselina olejová se skládá z C18 řetězce a obsahuje dvojnou cis vazbu mezi 9. a 10. uhlíkem. Právě přítomnost této dvojně vazby je důležitá pro stabilitu částice, jelikož kyselina stearová se stejnou délkou řetězce avšak absencí této dvojně vazby po navázání na částice není schopna jejich stabilizace [54,55].

Větší pozornost je však směřována k přípravě hydrofilních částic, které jsou biokompatibilní, biodegradabilní a s minimální toxicitou. Nejvíce používanou anorganickou sloučeninou pro modifikaci magnetických částic je silika [56]. Takto modifikované částice mají několik výhod. Jsou stabilní, je u nich potlačena vzájemná agregace, jsou biokompatibilní, hydrofilní a lze u nich velmi snadno kontrolovat tloušťku vzniklé obalové vrstvy [57]. Velmi častá je funkcionalizace částic pomocí polymerů. Tato modifikace zvyšuje odpuzivé síly mezi částicemi, což zapříčiňuje jejich větší stabilitu a rovněž zábranu jejich agregace. Polymery můžeme rozdělit na syntetické a přírodní. Mezi přírodní patří například dextran, chitosan nebo želatina, mezi ty syntetické pak řadíme polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA), polyakrylamid (PAA) nebo alginát. Ze zde uvedených polymerů se pro bioaplikace nejvíce využívá modifikace polyethylenglykolem tzv. pegylace [58]. PEG je neutrální, málo reaktivní, vysoce hydrofilní molekula, která zvyšuje biokompatibilitu povrchů a zabraňuje nespecifické sorpci [52,59]. Díky tomu, že není schopen vyvolat imunologickou reakci a není toxický, je často používán v *in vivo* aplikacích. K dispozici je široká škála komerčně dostupných polyethylenglykolů a to jak lineárních, tak i různě větvených, modifikovaných, homo- nebo heterobifunkčních. Pomocí nich lze na povrch částice zavést téměř jakoukoliv terminální funkční skupinu a vytvořit tak unikátní částici, která co nejlépe splňuje požadavky pro danou aplikaci. Zavedené funkční skupiny na povrchu částic následně slouží k biofunkcionalizaci, tedy navázání různých biomolekul.

1.2.4 Vazba ligandů na povrch magnetických částic

Povrchově navázané ligandy dávají magnetické částici unikátní vlastnosti, kterých se pak využívá v následných aplikacích. Na povrch částic lze vázat jak nekovalentně, tak i kovalentně. Po vazbě ligandu se magnetická částice stává účinným nosičem jeho specifických vlastností. Na obrázku 5 je schematicky znázorněn magnetický nosič s různými ligandy navázanými na svém povrchu.



Obrázek 5: Schéma magnetického nosiče s různými ligandy: protilátky, proteiny, nukleové kyseliny, enzymy, fluorescenční značky, radionuklidy a léčiva.

Nejstarší, nejjednodušší a také finančně nejméně náročnou metodou je přímá fyzikální sorpce proteinů na základě elektrostatických interakcí, která nevyžaduje předem žádnou předchozí chemickou modifikaci ligandu. Je však méně spolehlivá a málo stabilní ve srovnání s imobilizací pomocí kovalentní vazby [60].

Naproti tomu při imobilizaci ligandu kovalentní vazbou lze získat nevratné ukotvení, které je velmi pevné, stabilní a schopné odolávat i extrémním podmínkám jako je teplota, pH, vysoký tlak a další. Kovalentní vazba je tedy v současné době nejvyužívanější imobilizační technikou. Základem pro vznik této vazby je přítomnost funkčních skupin (např. aminových, karboxylových, hydroxylových nebo thiolových) na povrchu nosiče. Působením různých

aktivačních a konjugačních činidel dojde k aktivaci těchto skupin a ty jsou poté schopny vázat ligandy přes jejich vhodné funkční skupiny. Pro tyto reakce bylo vyvinuto velké množství různých aktivačních a konjugačních činidel lišících se tím, v jakých podmínkách (pH, teplota, vodné/organické prostředí) pracují s největší účinností. Tyto podmínky jsou nastavovány především s ohledem na bioligand, který je v reakci využit. Ten totiž nesmí být degradován a musí si zachovat svou aktivitu a funkčnost i po navázání, aby neztratil schopnost biospecifické interakce [14]. Na obrázku 6 jsou přehledně shrnuty příklady nejčastějších metod využívaných pro kovalentní navázání biomolekul na povrch magnetických částic s různými funkčními skupinami. Pokud je na povrchu částice karboxylová nebo hydroxylová skupina, je pro vazbu využita tradiční karbodiimidová metoda vazby [14], která probíhá tím způsobem, že 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC) aktivuje hydroxylové skupiny nosiče a mění je na reaktivní imidokarbonáty. Ty pak reagují s aminoskupinami ligandu. Přídavkem sodné soli N-hydroxysulfosukcinimidu do reakce se zvýší rozpustnost aktivního imidokarbonátu a zároveň se prodlouží i jeho stabilita, čímž se zvýší pravděpodobnost reakce s aminoskupinou. Podobně lze využít i epichlorhydrin, který aktivuje hydroxylovou skupinu tak, že vytvoří reaktivní epoxidovou skupinu, která se váže s nukleofilními sloučeninami obsahujícími amino, hydroxylové nebo thiolové skupiny [14,61]. Pro vazbu na částice s aminovou skupinou se využívá nejčastěji bifunkčních činidel jako je glutaraldehyd, tetrachlor-*p*-benzochinon nebo dianhydrid kyseliny benzentetrakarboxylové. V případě glutaraldehydu dochází mezi aldehydovou a aminovou skupinou k tvorbě Schiffovy báze a druhá volná aldehydová skupina glutaraldehydu zůstává volná pro navázání biomolekuly přes její aminovou skupinu stejnou reakcí. Někdy se provádí redukce Schiffovy báze borohydridem sodným, kdy díky odstranění dvojných vazeb vzniká stabilnější vazba.

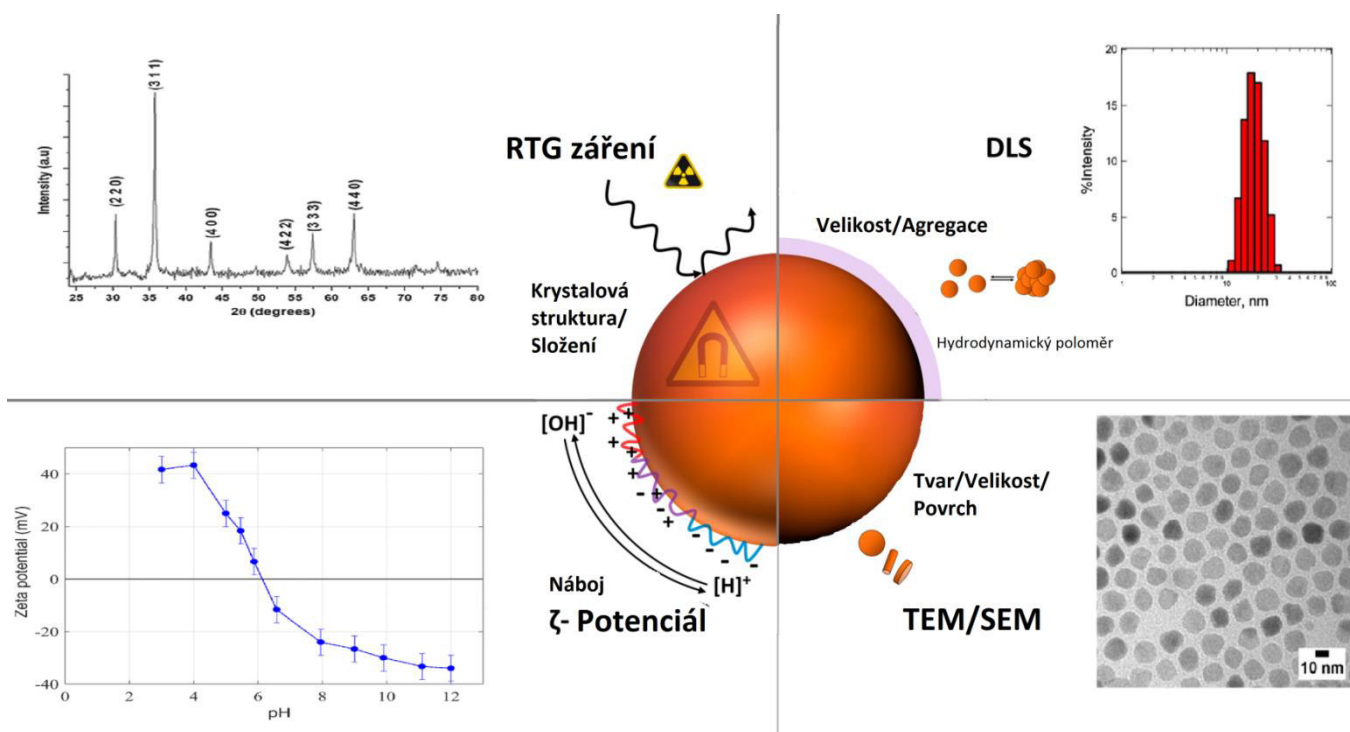
Reakční skupina na částici	Reaktivní molekula	Produkt konjugace
Karboxylová skupina		
Karbodiimidová reakce		
Amino skupina		
Homobifunkční zesíťování		
		<p>přes glutaraldehyd</p> <p>přes sukcinimid</p>
Maleimidová reakce		
Epoxidová skupina		
Thiolová skupina		
Maleimidová reakce		
Aldehydová skupina		
Schiffova báze		

Obrázek 6: Schematické znázornění nejběžnějších strategií využívajících se pro kovalentní vazby biomolekul na povrch částic s různou funkční skupinou.

1.2.5 Metody charakterizace magnetických částic

Souhrnně by se dalo říci, že ideální magnetická částice by měla mít potřebné magnetické vlastnosti, uniformní velikost s rovnoměrnou distribucí, dobře definovanou morfologii a vysokou míru povrchové funkcionalizace. Mezi základní vlastnosti popisující magnetické částice patří jejich struktura, velikost, tvar, povrchový náboj a složení. Tyto vlastnosti jsou pak klíčové při budoucím využití částic pro různé aplikace, a je tedy důležité mít tyto informace k dispozici.

Pro charakterizaci fyzikálních a chemických vlastností magnetických částic se používá řada experimentálních technik (Obrázek 7).



Obrázek 7: Schematické znázornění metod používaných pro charakterizaci magnetických částic s odpovídajícími záznamy. Převzato a upraveno podle [62-65].

Velikost částic a její distribuce, má zásadní vliv na vlastnosti jakéhokoliv nano-/mikromateriálu. Rutinně využívanou metodou je fotonová korelační spektroskopie (PCS) označovaná jako dynamický rozptyl světla (DLS). Metoda DLS je založen na interakci světla s částicemi o rozměrech od 1 nm až po několik mikrometrů, které v koloidních suspenzích podléhají

Měří se světlo rozptýlené molekulami vzorku v čase [66]. Další často využívanou metodou je metoda laserové difrakce. Při této metodě jsou částice měřeny v průtočné cele, kterou prochází laserový paprsek. Vlivem částic dochází k difrakci paprsku na jejich povrchu pod úhlem, který je nepřímě úměrný jejich velikosti [67].

Mezi hojně využívané způsoby charakterizace částic a obecně mikro- a nanomateriálů patří mikroskopické metody. Pomocí těchto metod se částice zobrazují přímo, a proto lze díky nim určit jejich tvar a velikost. V současné době existuje řada mikroskopických metod od čistě optických až po elektronické techniky. Pomocí světelného mikroskopu, který stojí na úplném začátku vývoje mikroskopických technik, však nebylo možné zobrazovat částice v rozměrech jednotek nanometrů z hlediska omezení vlnových délek světelných zdrojů. Muselo se tedy přistoupit k elektronové mikroskopii, kde se na rozdíl od světelné mikroskopie jako zdroj využívá tok elektronů [68]. Elektronovou mikroskopii lze rozdělit na dva typy: transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a rastrovací (skenovací) elektronová mikroskopie (SEM). Při metodě TEM je prozařován celý vzorek najednou, proto je nutné, aby byl vzorek dostatečně tenký. Uváděná rozlišovací schopnost TEM se pohybuje přibližně od 1 nm do 10 μm [69]. Naproti tomu u SEM se charakteristika povrchu vzorku získává ze sekundárních elektronů emitovaných z povrchu vzorku. Rozlišovací schopnost SEM je řádově od 2 nm do 50 μm [69,70]. Další skupinou mikroskopických metod je mikroskopie skenující sondou (SPM). Při těchto metodách se pracuje v oblasti tzv. blízkého pole, kdy dochází k těsnému přiblížení měřící sondy k sledovanému vzorku. Díky této malé vzdálenosti mezi hrotem sondy a měřeným vzorkem lze dosáhnout rozlišení pod takzvanou difrakční mezí. Lze však získat pouze lokální informaci o vzorku. Mezi nejvýznamnější varianty SPM patří skenovací tunelová mikroskopie (STM) a mikroskopie atomárních sil (AFM) [70,71].

Zeta potenciál je označení pro elektrokinetický potenciál v koloidních systémech, který působí na hranici mezi povrchovou vrstvou částice a okolní kapalinou. Jeho hodnota naznačuje potencionální stabilitu koloidního systému a poukazuje tak na případnou agregaci částic nebo jakoukoli interakci s jinými materiály [72]. Obecně vysoké hodnoty, ať už kladné, nebo záporné, vedou ke stabilizaci částic, zatímco hodnoty blízké se nule obvykle vedou k agregaci částic [73]. Hranice mezi stabilní a nestabilní suspenzí se zpravidla uvádí při hodnotě zeta potenciálu +30 mV, respektive -30 mV [72,74].

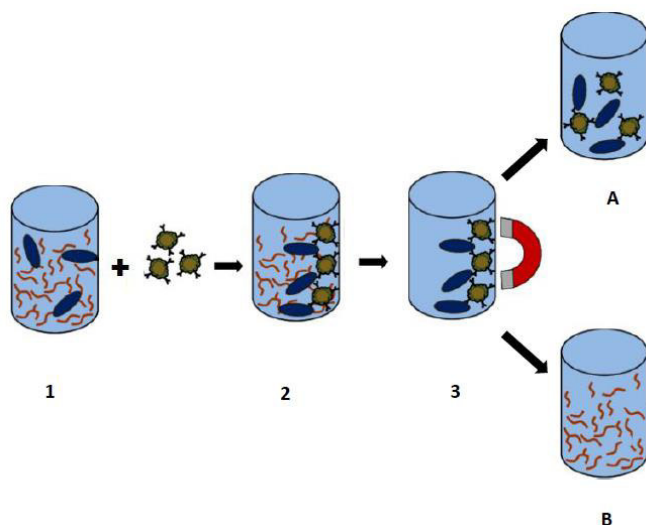
Metody založené na rentgenovém záření poskytují informaci o vlastnostech povrchu

a jeho modifikací, krystalové struktury nebo elementárním složení částic. Mezi metody založené na rentgenovém záření patří rentgenová absorpční spektroskopie (XAS), rentgenová fluorescence (XRF), rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS) a rentgenová difrakční analýza (XRD). Výše uvedené metody jsou často kombinovány s metodami elektronové mikroskopie [70,68].

1.2.6 Magnetická separace jako nástroj purifikace a izolace specifické látky ze vzorku

Proces purifikace a izolace specifických molekul je využíván téměř ve všech biotechnologických odvětvích. Nejčastěji se využívá chromatografických [75,76] a elektroforetických metod [76], ultrafiltrace [77], centrifugace [78], precipitace a dalších. Tyto metody se volí především podle povahy surového vzorku, nároků na čistotu vyzolovaného produktu a samozřejmě s ohledem na budoucí aplikaci. Výše zmíněné techniky se běžně využívají v komerčních laboratořích k purifikaci syntetizovaných peptidů, protilátek, enzymů, oligonukleotidů, ale také léčiv.

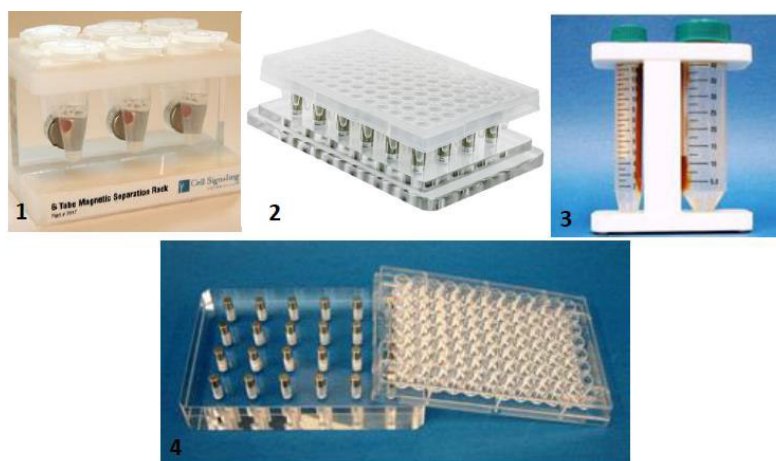
Naproti tomu v moderních bioanalytických metodách si v posledních letech vedle těchto metod vybudovala své postavení magnetická separace. Ta kombinuje výhody afinitní chromatografie s vlastnostmi magnetických částic, a díky tomu je specifická, selektivní, rychlá, lze ji integrovat do čipů, průtočných cel a automatizovat ji [79,80]. Biofunkcionalizací povrchu magnetické částice získáme magnetický nosič (sorbent) umožňující specifickou a selektivní izolaci cílových molekul [81]. Tato izolace může být pozitivní, za účelem získat dané cílové molekuly, případně negativní, kdy dochází k odstranění nežádoucích molekul ze vzorku (Obrázek 8).



Obrázek 8: Základní rozdělení magnetické separace na pozitivní a negativní selekci. 1) Vzorek obsahující cílový analyt 2) Přidání magnetického nosiče do vzorku a jeho specifická vazba na cílový antigen 3) Magnetická separace komplexu sorbent-analyt. A) Pozitivní selekce (na nosiči byl zachycen stanovovaný antigen, v supernatantu zůstávají nežádoucí složky vzorku) B) Negativní selekce (v supernatantu zůstává analyt, který má být stanoven, na nosiči byl odseparován nežádoucí analyt). Převzato a upraveno podle [82].

Jelikož se většinou magnetická separace využívá k zakoncentrování a separaci analytu při zpracování vzorku, rozšířenější je pozitivní izolace. Magnetické částice, které jsou funkcionalizované ligandy se specifitou k cílovému antigenu, jsou snadno resuspendovatelné v celém objemu vzorku, a tím i dobře přístupné pro reakci. Po zachycení antigenu ze vzorku lze částice pomocí vnějšího magnetického pole zakoncentrovat a odseparovat tak zbytek vzorku obsahující nenavázané (nežádoucí) části. Superparamagnetické částice vykazují magnetický moment pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Proto po odstranění magnetického pole a přidání roztoku lze částice opět snadno resuspendovat. Díky této snadné a rychlé manipulaci se výrazně zkracuje čas přípravy vzorku k analýze [16]. Ohromnou výhodou magnetické separace je, že není potřeba dalšího procesu, jako je centrifugace, precipitace případně filtrace vzorku. Po navázání cílové molekuly na magnetický nosič lze buď tuto částici podrobit eluci za účelem získání čisté molekuly, se kterou se může dále pracovat, případně lze celý komplex (magnetická částice-analyt) zavést do různých biosenzorů [83] a mikrofluidních čipů [84,85], kde je zachycený analyt stanoven.

Nejjednodušším provedením je magnetická separace ve vsádkovém uspořádání. V závislosti na povaze a objemu analyzovaného vzorku může separace probíhat v různých typech laboratorních nádob. Nejčastěji to jsou mikrozkušavky o objemu 0,5–2 ml, mikrotitrační destičky nebo centrifugační zkumavky (15 a 50 ml) [16]. Typu nádoby je pak přizpůsoben i magnetický separátor (Obrázek 9). Díky vlastnostem magnetických částic lze analyt z velkého objemu vzorku převést do objemu menšího, například z 25 ml do 100 μ l [83] a s částicemi dále pracovat ve zkumavkách případně je integrovat do miniaturizovaných platforem. S příchodem a rozvojem mikrofluidních technik byla magnetická separace ze vsádkového uspořádání integrována do průtočných cel a mikročipů. Uvnitř mikročipů se pracuje řádově s mikrolitrovými, nanolitrovými, ale i menšími objemy, což značně snižuje nároky na množství vzorku a dalších reagensů. Navíc lze separace v průtoku automatizovat a propojit s dalšími miniaturizovanými technikami a vytvořit tak tzv. laboratoře na čipu (LOC). Princip magnetické separace probíhající v mikrofluidním zařízení bude podrobněji popsána v kapitole 1.6.2.



Obrázek 9: Různé typy komerčně dostupných magnetických separátorů konstruované pro 1) mikrozkušavky (Cell Signaling Technology, Inc.), 2) PCR destičky (SP Scienceware - Bel-Art Products), 3) centrifugační zkumavky (Chemicell), 4) mikrotitrační destičky (Chemicell).

Podle velikosti gradientu magnetického pole potřebného pro separaci magnetických částic dělíme magnetickou separaci na nízkogradientovou magnetickou separaci [86] (LGMS) a vysokogradientovou magnetickou separaci [87] (HGMS). V bioanalýzách se pro separaci a purifikaci využívá jak LGMS, tak HGMS.

Vysokogradientová magnetická separace vzniká uvnitř kolony, která je naplněná náhodně zapletenými magneticky citlivými vlákny a obklopená elektromagnetem. Po aplikaci magnetického pole se okolo vláken vytvoří velký gradient magnetického pole, což vede k zachycení magnetických částic z roztoku právě na povrch těchto vláken [88]. Ačkoli HGMS je často využívána, její velikou nevýhodou jsou vysoké náklady spojené s instalací a provozem. Další a velmi významnou nevýhodou z hlediska diagnostických metod je fakt, že zachycené magnetické částice na magnetických vláknech lze poměrně těžce odstranit [89,90]. Proto se HGMS využívá především pro selektivní odstranění buněk [16], proteinů [91] nebo kontaminantů z životního prostředí jako jsou radionuklidy [92], ionty těžkých kovů [93] případně nepolární organické kontaminanty [94]. Pro diagnostické metody, kde slouží magnetické částice k separaci a purifikaci vzorku lze s výhodou využít LGMS, která je z hlediska uspořádání mnohem jednodušší než HGMS. U LGMS je nehomogenní magnetické pole vytvořeno za pomoci permanentního magnetu přiloženého ke zkumavce, případně ke kanálku mikrofluidního čipu. Magnetické částice jsou pomocí magnetických sil přitahovány do místa, kde je magnetický gradient nejvyšší, tudíž do těsné blízkosti magnetu. Po oddálení magnetu magnetické pole zmizí a částice mohou být opět snadno resuspendovány v roztoku [95]. Účinnost LGMS pak závisí na tvaru, síle a postavení magnetů. Mezi velké výhody jejího využití patří především nenáročné přístrojové vybavení a s tím spojená i finanční dostupnost, snadné provedení a při správném výběru permanentních magnetů i vysoká účinnost zachycení částic. Díky tomu se LGMS stala velmi využívanou jak ve vsádkovém, tak i v mikrofluidním uspořádání.

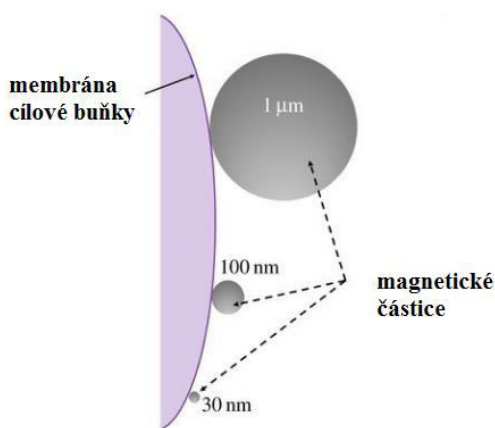
1.2.6.1 Faktory ovlivňující účinnost imunomagnetické separace

Velmi důležitou roli v rychlosti a účinnosti LGMS hrají také parametry magnetických částic. Při optimalizaci procesu magnetické separace a výběru vhodných magnetických částic musí být tato skutečnost brána v potaz.

Jedním z důležitých parametrů je jejich velikost. Jak již bylo výše uvedeno, pro izolaci cílových analytů z komplexních biologických vzorků se využívají částice o velikosti od jednotek nanometrů do několika jednotek mikrometrů [39]. Magnetická rychlost určující dobu separace lineárně roste s velikostí částic. Znamená to, že při působení magnetického pole o stejné intenzitě jsou rychleji separovány magnetické částice s větší velikostí [95,96]. Například Lin a kol. ve své práci použili pro separaci *E. coli* O157:H7 nanočástice o velikostech 180 nm a 30 nm. Bakterie označené většími částicemi byly z roztoku vychytány za 2 minuty na rozdíl od těch označených

30 nm částicemi, pro jejichž separaci bylo potřeba 60 minut [97]. Obecně by se dalo říci, že pokud se zavádí rychlá screeningová metoda, tak se preferenčně volí částice s větší velikostí kvůli kratšímu času potřebnému pro jejich separaci. Ačkoli jsou větší částice vhodné z hlediska rychlosti separace, mají v porovnání s menšími částicemi několik nedostatků. Zaprvé je to poměr plochy povrchu k objemu částic, který je u mikročástic naopak nižší než u nanočástic[98]. Znamená to, že u větších částic dochází k redukci vazebné kapacity, což se projeví snížením účinnosti vazby. Dalším problémem je sedimentace, která je přímo úměrná velikosti částic [99,16]. Z tohoto důvodu je během specifického vychytávání cílových molekul nutné neustálé míchání suspenze magnetických částic, aby bylo docíleno co největšího rozptýlení v celém roztoku. Oproti velkým částicím jsou ty malé v roztoku lépe rozptýleny, což jim zajišťuje rychlejší reakční kinetiku [100].

Dalším faktorem, který by se měl brát v úvahu, je prostorová zábrana částic, která ovlivňuje především separaci buněk [101]. Na povrch membrány cílové buňky může být navázáno větší množství nanočástic oproti mikročásticím z důvodu nižší prostorové zábrany (Obrázek 10). Z toho vyplývá, že menší částice lze použít pro detekci struktur, které se na povrchu buněk vyskytují s vyšší četností a naopak větší částice použít pro struktury které se na povrchu vyskytují s nižší hustotou.

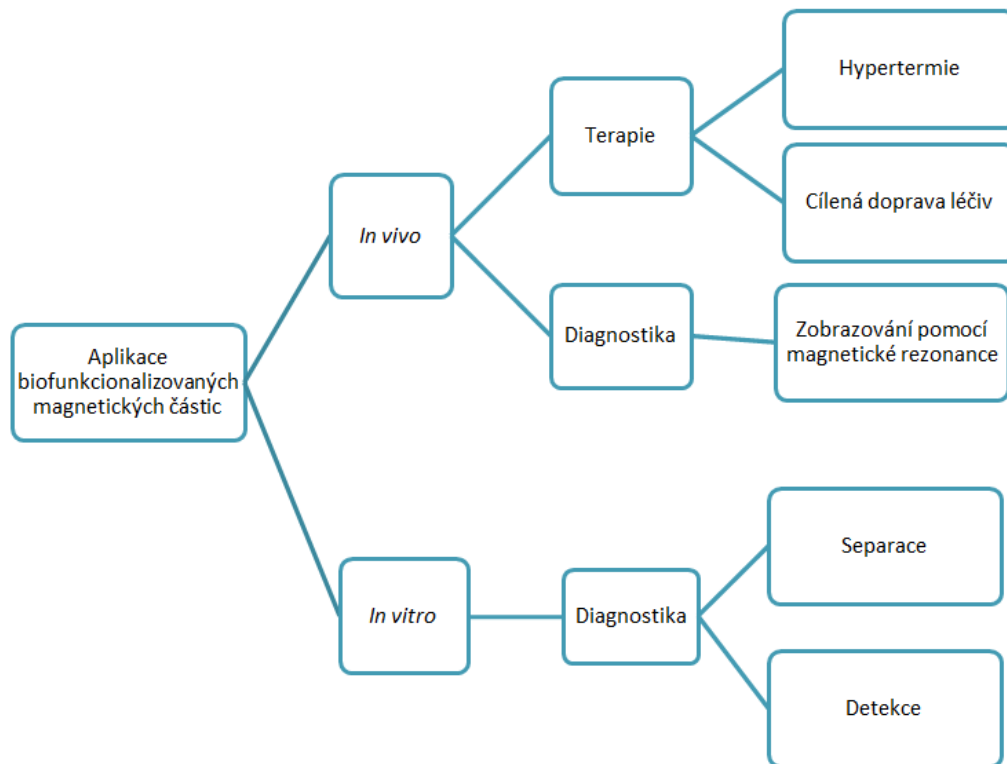


Obrázek 10: Schematické znázornění poměrů různě velikých magnetických částic k povrchu eukaryotické buňky. Převzato a upraveno podle [95].

Některé srovnávací studie uvádí o trochu vyšší účinnost separace pomocí nanočástic [102,103]. Avšak nevýhodou by mohla být jejich větší nestabilita při dlouhodobém skladování [102]. Proto při optimalizaci nové metody magnetické separace je z hlediska efektivity a účinnosti separace nutné brát v úvahu všechny výše zmíněné faktory a omezení a vybrat vhodný kompromis.

1.3 Využití magnetických nosičů v moderních analytických metodách

Díky široké škále velikostí a snadné biofunkcionalizaci a biokonjugaci lze magnetické částice využít pro aplikace *in vitro*, tak i *in vivo* [104] (Obrázek 11).



Obrázek 11: Aplikace biofunkcionalizovaných magnetických částic v biotechnologii a biomedicině.

In vivo aplikace magnetických nanočástic

V případě *in vivo* aplikací se funkcionalizované magnetické nanočástice staly velmi atraktivním nástrojem diagnostiky a cílené terapie [24,40,105] a v těchto odvětvích zažívají velký rozvoj. Pozornost vědců je upíraná k nádorovým onemocněním, kde by využití magnetických nanočástic mohlo být vhodnou alternativou k již rutinně zavedeným diagnostickým a terapeutickým postupům.

Účinné a co nejpřesnější zobrazení nádorové tkáně má zásadní význam jak v diagnostice, tak i následném sledování účinnosti léčby. Pro tyto účely se využívá mnoho zobrazovacích technik, mezi které patří rentgen, ultrazvuk, magnetická rezonance (MRI), počítačová tomografie (CT) nebo pozitronová počítačová tomografie (PET) [106]. Magnetické nanočástice se v oblasti

diagnostiky jeví jako vhodné díky jejich schopnosti zvýšit kontrast při MRI [107,108]. Díky svým magnetickým vlastnostem se mohou za pomoci externího magnetického pole selektivně hromadit v místě nádoru a pomáhají tak poskytovat informace o jeho rozsahu.

V případě cílené terapie, a to nejen při léčbě nádorů, jsou magnetické nanočástice využívány hned z několika důvodů. Zaprvé je to jejich velký povrch umožňující navázání vysokého množství terapeutické látky. Dále pak jejich schopnost rozptýlení a rychlý transport v tekutinách související s jejich nanorozměry [104] a v neposlední řadě jejich aktivita v magnetickém poli. Pomocí magnetu tak lze docílit přímé dopravy léčiva do místa určení uvnitř organismu [24]. U většiny chemoterapeutických léčebných postupů je hlavní nevýhodou jejich systémové podání, kdy jsou chemoterapeutika zátěží pro celý organismus. Takto nespecifické podání vede ke vzniku mnoha nežádoucích vedlejších účinků [40]. Pokud je však chemoterapeutikum navázáno na povrch magnetické nanočástice, může být cíleně transportováno do určité tkáně. Pro posílení schopnosti cílit na určitou buňku jsou magnetické nanočástice nesoucí chemoterapeutika navíc konjugovány se specifickými protilátkami, které reagují s předem určenou tkání [109-111].

Stejně jako s chemoterapeutiky mohou být magnetické nanočástice konjugovány například s radioaktivními izotopy nebo radionuklidy [21,112]. Ionizující záření z radionuklidů poškozuje molekuly deoxyribonukleových kyselin (DNA) uvnitř buněk nádorové tkáně v jejich bezprostřední blízkosti, inhibuje jejich proliferaci nebo dokonce indukuje buněčnou smrt, tzv. apoptózu. Navázáním na magnetické nanočástice je zajištěno specifické zakoncentrování do cílového místa, čímž se zabrání nechtěnému poškození zdravých tkání [22]. Dalším terapeutickým přístupem využívajícím magnetické nanočástice je hypertermie. Při aplikaci střídavého magnetického pole částice absorbují a přeměňují energii na teplo, které způsobí selektivní ohřev v okolí nádorové tkáně, která je infiltrovaná magnetickými nanočásticemi [113]. Tento ohřev způsobí nekrózu v cílové tkáni [114]. Tuto metodu lze s výhodou využít při léčbě nádorů vyskytujících se hluboko uvnitř tkáně.

Ačkoli v posledních letech došlo ve výzkumných laboratořích k velkým pokrokům, z převážné části jsou veškeré aplikace využívající magnetické nanočástice ve fázi preklinických studií. Pro úspěšné zavedení magnetických nanočástic do klinické praxe je zapotřebí splnění určitých klíčových kritérií. Magnetické nanočástice by měly být složeny výhradně z netoxických materiálů, případně z materiálů schopných biodegradace na složky, které mohou být z organismu

posléze zcela odstraněny játry a ledvinami. Měly by být biokompatibilní a hydrofilní. Navíc by měly mít dostatečně velký specifický povrch pro navázání vysokého množství terapeutické látky a schopnost jejího uvolňování kontrolovatelným způsobem. Neschopnost splnění výše uvedených kritérií je pak velkou komplikací a brzdou při zavádění aplikací využívajících magnetické nanočástice do klinické praxe. Studie prohlubující znalosti v oblasti magnetických nanočástic a zaměřující se především na jejich chování v biologických systémech jsou tak velkým příslibem pro zavedení metod využívajících magnetických částic do klinické praxe.

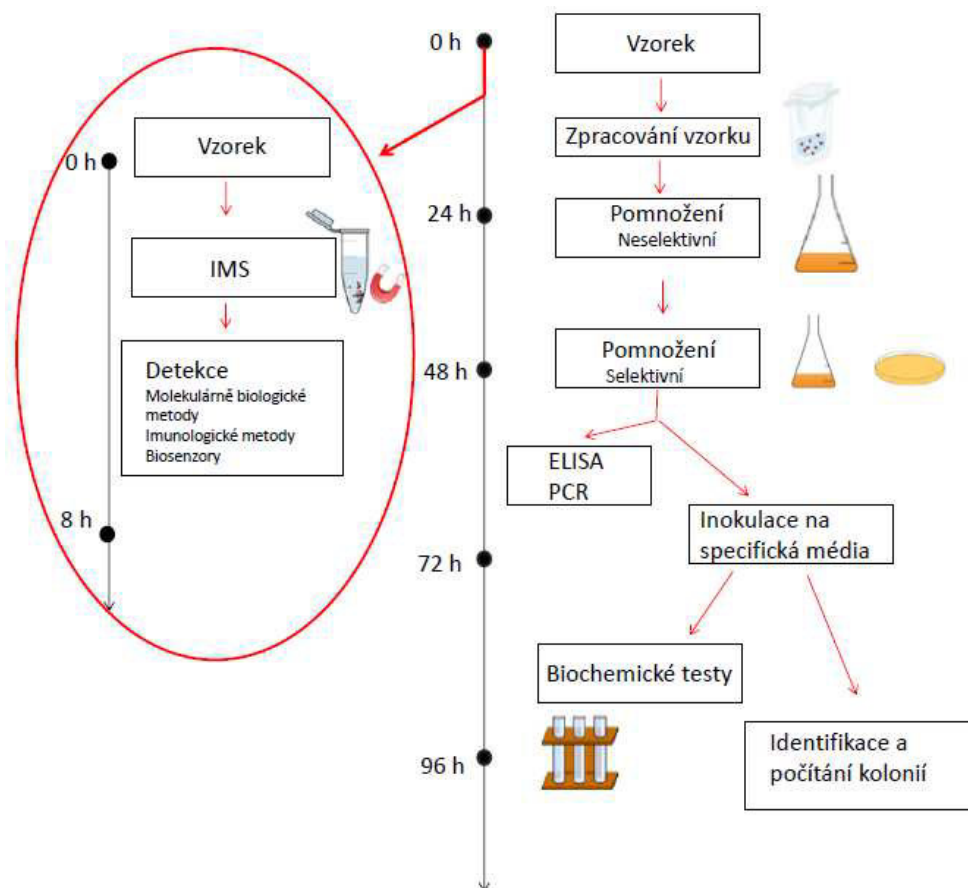
In vitro aplikace magnetických částic

Co se týče *in vitro* aplikací, lze magnetické částice využít jako sorbenty k purifikaci, separaci a transportu analytu [115-117] během analýzy, což je hlavním a nejvýznamnějším využitím magnetických nosičů. Díky nim lze splnit přísné požadavky na čistotu analyzovaných vzorků a zároveň rozšířit škálu testovaných materiálů z důvodu zvýšení citlivosti a zlepšení bioanalytických charakteristik testovaných vzorků.

1.3.1 Magnetické nosiče pro izolaci bakteriálních buněk

Metody sloužící k detekci bakteriálních buněk ze vzorku zahrnují několik kroků, kterými jsou: pomnožení, separace a samotná detekce [118,119]. Mezi nejčastěji používané metody pro separaci bakteriálních buněk patří filtrace [120], centrifugace [121] a IMS [122]. Jak u filtrace (odděluje buňky na základě velikosti), tak i u centrifugace (odděluje buňky na základě hmotnosti), je častou slabinou neschopnost oddělení buněk s podobnými fyzikálními vlastnostmi. Z tohoto důvodu se v praktických aplikacích stala velmi populární separační metodou IMS, která umožňuje separaci bakteriálních buněk prostřednictvím specifické reakce antigenu s protilátkou. [44,123-131]. Navíc jde díky svému rychlému provedení ruku v ruce s trendem poslední doby, kdy je kladen stále větší důraz na rychlost analýzy z důvodu včasné diagnostiky, případně co nejrychlejšího zamezení šíření nežádoucích bakteriálních kontaminací. V mnohých studiích je snaha o vyvinutí tak citlivé kombinace IMS a detekční techniky, aby mohlo být pomnožení vzorku zkráceno na minimální dobu, či dokonce úplně vynecháno [82,83,132-136]. Ačkoli IMS je velmi efektivním a elegantním řešením, opět je tu určité omezení v souvislosti s povahou vzorku. Jedná se především o tuhé vzorky potravin, kdy se musí vzorky dostatečně homogenizovat, aby byl možný pohyb magnetických částic v prostředí vzorku a nedocházelo k nežádoucí sorpci

magnetických částic na částičky špatně homogenizovaného vzorku. Na obrázku 12 je na časové ose znázorněna klasická mikrobiologická konfirmace zahrnující identifikaci bakterie ve vzorku s pomnožením v porovnání s detekcí využívající IMS.

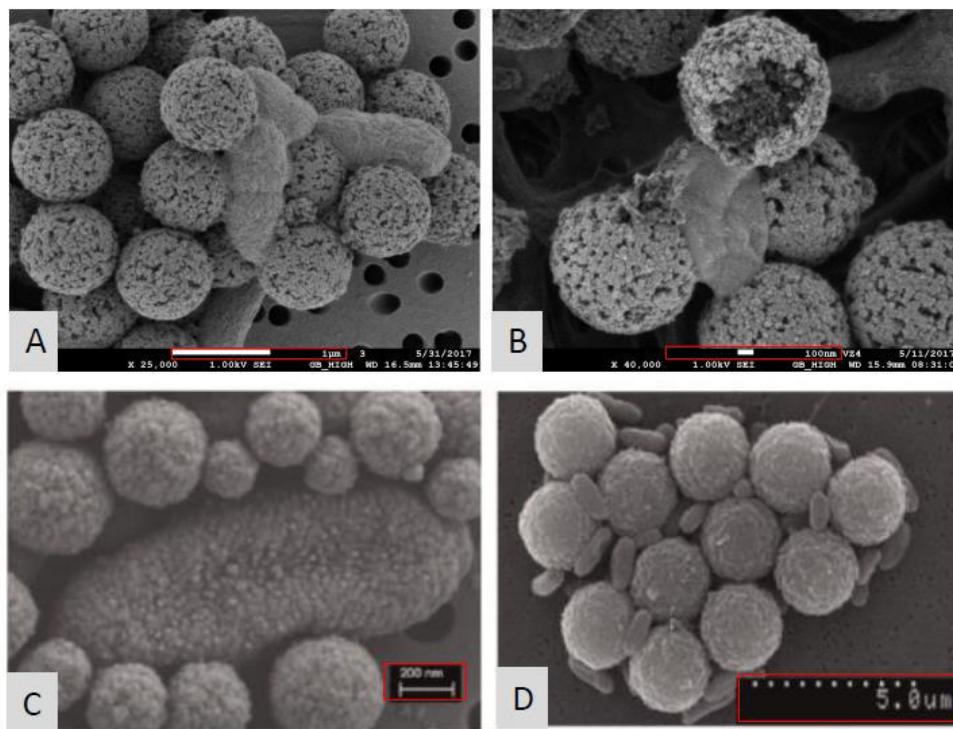


Obrázek 12: Schematické znázornění časové náročnosti detekce bakterií pomocí konvenčních mikrobiologických metod v porovnání s detekcí využívající IMS.

Je zřejmé, že využití IMS k izolaci buněk výrazně zkracuje dobu analýzy oproti klasickému přístupu. Rychlá, účinná a citlivá magnetická izolace buněk je pak spojena s následujícími detekčními technikami.

Mikroskopické techniky

Pro vizualizaci bakterií zachycených pomocí magnetických částic lze využít také mikroskopické techniky. Magnetické částice s navázanou protilátkou mohou shlukovat bakterie a vytvořit tak organizované struktury typu rozet nebo komplexnější aglutináty viditelné pomocí světelného mikroskopu [137]. Tato metoda je však celkem zastaralá a lze jí považovat spíše za orientační, jelikož moderní metody nabízí mnohem větší rozlišení a vyšší citlivost. Pokud je komplex magnetická částice-bakterie označen sekundární protilátkou, která je konjugovaná s fluorescenční značkou, může se k zobrazení použít fluorescenční mikroskopie [138]. Bakterie navázané na magnetické částice mohou být také zobrazeny pomocí SEM [103,138,139]. Na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu (Obrázek 13) můžeme vidět například rozdíl v použití různě velkých magnetických částic [103]. Kdy v případě mikročástic o velikosti 2,8 μm dochází spíše k navázání většího množství salmonelových buněk o velikosti ($\sim 0,7\text{--}1,5 \mu\text{m}$) na povrch částice [103]. Naproti tomu v případě nanočástic o velikostech 300 nm a 880 nm dochází spíše k navázání několika magnetických částic na membránu jedné buňky [103,140]. Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu poskytují informace o reálné situaci, tedy jakým způsobem dochází k zachycení bakterií zvoleným magnetickým imunosorbentem. To musí být bráno v úvahu při sestavování biosenzorů využívajících IMS k izolaci bakterií ze vzorku. Musí se zohlednit velikost použitých částic, velikost cílových buněk, ale také četnost specifické struktury na povrchu buňky, proti které bude imunosorbent namířen (více viz. kapitola 1.2.6.1). Mohlo by se stát, že bakterie bude zcela obsazená magnetickými částicemi a už nebude mít volné místo pro vazbu další detekční protilátky (konjugátu), která je zodpovědná za tvorbu signálu pro daný detektor. Došlo by tak ke snížení citlivosti detekce.



Obrázek 13: Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu. A) (měřítko 1 μm) a B) (měřítko 100 nm) magnetické submikronové částice (0.88 μm) s navázanou salmonelovou buňkou [140]. C) (měřítko 200 nm) magnetické nanočástice (300 nm) a D) (měřítko 5 μm) mikročástice (2.8 μm) a navázanou salmonelovou buňkou [103].

Kultivační metody

Zachycením bakterie na magnetickou částici není ovlivněna její životaschopnost a bakterie je tedy schopna za odpovídajících podmínek růst a dále se množit. To znamená, že bakterie nemusí být po IMS z částic uvolněny, ale mohou být společně s částicemi kultivovány jak v tekutých médiích, tak i na živných půdách [103,140-142]. Při počítání narostlých jednotek tvořící kolonie (CFU) na miskách se však musí zohlednit fakt, že bakterie a magnetické částice tvoří agregáty. Znamená to tedy, že kolonie narostlá na misce nutně nemusí pocházet z jedné buňky, ale právě ze shluku několika bakterií na magnetických částicích. Proto se doporučuje vedle frakce magnetických částic vyočkovat i frakci odebranou po inkubaci s imunosorbentem, promývací frakci a původní vzorek [103,142], aby se dal výpočet těmito hodnotami korigovat. Z tohoto důvodu se tedy většinou po IMS doporučuje využít metody molekulárně biologické [143,144], imunochemické [145] případně elektrochemické, u kterých je navíc možnost automatizace, miniaturizace a integrace do čipů [83,140,142].

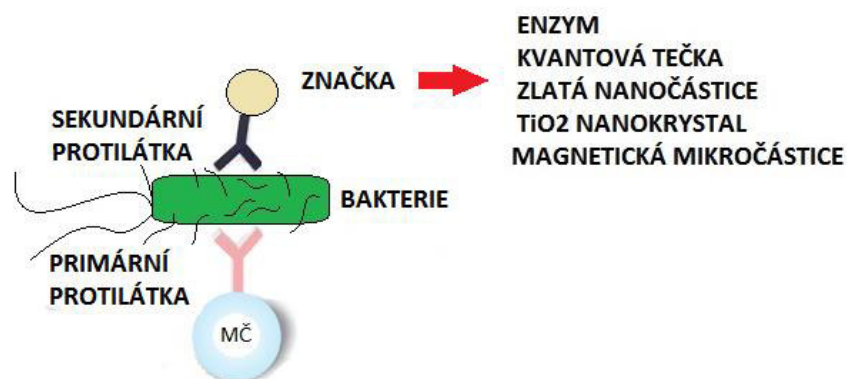
Molekulárně biologické metody

Jednou z nejcitlivějších a nejdostupnějších molekulárně biologických technik pro detekci bakteriálních buněk je řetězová polymerázová reakce (PCR). Dochází při ní k rychlé amplifikaci nukleových kyselin detekovaných bakterií z relativně malého množství materiálu. Ideálním cílem k identifikaci bakterií je amplifikace a sekvenování genu 16S rRNA, který je vysoce specifický pro každý bakteriální druh [146]. Citlivější metodou s možností kvantifikace je polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) [144,147,148] Ačkoli obě tyto metody jsou citlivé, poskytují spolehlivé výsledky a staly se hojně využívanými, v případě reálných vzorků se objevuje několik překážek, které mohou ovlivňovat výsledky. Ať už se jedná o vzorky potravin, či klinické vzorky, ve většině případů obsahují jen malá množství stanovených bakterií, vedle toho je v nich obsaženo mnoho kontaminantů, které PCR reakci inhibují. Ve většině případů je tedy nutné před samotnou PCR provést určité kroky vedoucí k zakoncentrování malého množství bakterií a zároveň k odstranění nežádoucích inhibitorů. Řešením těchto překážek je IMS, kdy lze tyto komplikace vyřešit v jednom kroku. Bakterie jsou pak z magnetických částic buď uvolněny, například za pomoci 10mM roztoku maltózy [44] a následně denaturovány vysokou teplotou (95°C), nebo může být tento denaturační krok proveden přímo s komplexem magnetická částice-bakterie [148]. V obou případech jsou magnetické částice od zbylého roztoku odseparovány pomocí magnetu, aby neinhibovali další reakce. Uvolněná DNA je po denaturaci vkládána do PCR reakce a vzniklé produkty amplifikace jsou následně detekovány.

Poměrně modernější metodou než je RT-PCR je metoda izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP) [149]. Jedná se o metodu, která na rozdíl od RT-PCR probíhá za izotermálních podmínek. Oproti konvenční metodě PCR, je rychlejší a zároveň citlivější [149]. Uplatnění našla především v klinické praxi, kde už jsou optimalizovány funkční sady pro komerční využití [150].

Metody založené na reakci se značenou sekundární protilátkou

Další možností je označení vyizolovaných bakterií pomocí sekundární protilátky, která je konjugovaná s různými značkami (tzv. konjugát), (Obrázek 14). Detekční metoda se pak odvíjí od značky, která byla použita. Komplex magnetická částice-bakterie reaguje tedy s konjugátem specificky namířeným proti dané bakterii. Výstavba takovýchto imunokomplexů je základem biosenzorů, které v detekci bakterií zažívají veliký rozvoj.



Obrázek 14: Využití různě konjugovaných sekundárních protilátek pro následnou detekci izolované bakterie pomocí imunosorbentu. MČ - magnetická částice.

Je-li protilátka značena enzymem, může být pro konečnou fázi detekce použita spektrofotometrie [145], barevná změna měřeného roztoku je přímo úměrná množství bakteriálních buněk zachycených na povrchu částic. Je-li značkou elektrochemicky aktivní látka, lze bakteriální buňky prokazovat elektrochemicky [103,151], kdy se měří pokles proudové odezvy. Brandao a kol. [103] popsal ve své práci elektrochemický imunosenzor pro detekci *S. Typhimurium* v mléce. Izolace bakterií ze vzorku byla provedena za pomoci mikro- i nanočástic a jako elektrochemicky aktivní značka byl použit enzym křenová peroxidáza (HRP). Bez předchozího pomnožení dosáhl v případě magnetických mikročástic limitu detekce (LOD) 538 CFU/ml a 291 CFU/ml v případě nanočástic. Celková doba analýzy byla pouze 1 hodinu. Avšak pro dosažení LOD, který by splňoval legislativu, kdy 25 ml mléka nesmí obsahovat ani jednu bakterii, musela být před IMS zařazena osmihodinová pomnožovací fáze vzorku.

Dalším typem značky mohou být fluoreskující polovodičové nanokrystaly běžně známé jako kvantové tečky. Ty mají schopnost emitovat záření po předchozí excitaci. Pro detekci je tedy zapotřebí přístrojů schopných měřit fluorescenci. Využívají se tak spektrofluorimetry poskytující fluorescenční spektra, případně fluorescenční mikroskopy poskytující snímky se zvýrazněnými strukturami [152]. Podoba emisních spekter je dána jak složením, tak i velikostí kvantových teček. Proto při použití různých kvantových teček navázaných na různé protilátky může být vedle sebe detekováno i více typů bakterií v jednom vzorku [138]. Kvantové tečky se však dají detekovat také elektrochemicky. Nejčastěji používanou metodou je anodická rozpouštěcí square wave voltametrie (SWASV). Po rozpuštění kvantových teček v kyselém prostředí se detekují

kovové ionty uvolněné z jejich struktury. Po vložení vhodného potenciálu na pracovní elektrodu dojde na jejím povrchu k redukci těchto kovů a proudové odezvy se zaznamenají při jejich následné oxidaci [153].

Jednou z méně častých značek mohou být nanokrystaly TiO_2 [154]. Detekce probíhá nepřímo, kdy je měřena absorpce nenavázaných protilátek značených TiO_2 nanokrystaly v UV-VIS oblasti spektra.

Velmi používanou značkou díky svým optickým a elektrochemickým vlastnostem, biokompatibilitě a nízké toxicitě jsou zlaté nanočástice. Pokud jsou součástí elektrochemických biosenzorů, probíhá měření na uhlíkové elektrodě metodou diferenční pulzní voltametrie. Například Alfonso a kol. [139] použili takový typ imunosenzoru pro detekci *S. Typhimurium* (LOD 143 CFU/ml).

Další zajímavou imunochemickou metodou detekce je metoda označovaná termínem immunoblot kolonií [155]. Komplex magnetická částice-bakterie je vyočkován na selektivní půdu, po inkubaci nutné k nárůstu kolonií jsou tyto kolonie z misky přeneseny na nitrocelulózovou membránu a následně inkubovány se sekundární protilátkou značenou enzymaticky.

1.4 Biokonjugáty na bázi zlatých nanočástic

1.4.1 Zlaté nanočástice

Zlaté nanočástice (AuNPs) jsou definované jako stabilní koloidní roztok shluků jednotlivých atomů zlata v rozsahu velikostí od 1 do 100 nm [156]. Díky těmto velmi malým rozměrům vykazují v porovnání se zlatem ve své elementární podobě odlišné fyzikální a chemické vlastnosti [31]. AuNPs se staly hojně užívanými v oblasti biomedicíny a biotechnologie především díky svým jedinečným fyzikálně-chemickým vlastnostem jako je jejich velikost, tvar, optické a elektronické vlastnosti, velký specifický povrch, vynikající biologická kompatibilita, chemická stabilita a minimální toxicita. [157,158]. Na poli biomedicíny se jejich rozmanité aplikace dají rozdělit do několika hlavních oblastí. Rutinně se používají v mikroskopických zobrazovacích metodách [159], další oblastí je jejich využití v terapii [160-162], kde zastávají své místo jako cílené nosiče léčiv, jež po ozáření uvolní transportovanou látku do cílového místa v organismu. Uplatňují se také v hypertermické terapii, jelikož jsou schopny usmrtit cílové (zhoubné) buňky díky své schopnosti silně se zahřát po interakci se silnými světelnými pulsy [163,164]. Uplatňují se také v diagnostice, kde se využívají jako elektrochemicky případně opticky aktivní značky k detekci nukleových kyselin [165,166], proteinů [167,168], nádorových buněk [169], ale například i bakteriálních buněk [139].

1.4.2 Syntéza zlatých nanočástic

Existuje několik postupů pro syntézu AuNPs jak v nepolárním, tak i v polárním prostředí [170,171]. Díky různým metodám přípravy vznikají AuNPs rozdílných tvarů, velikostí a disperzity. Obecně jsou AuNPs syntetizovány redukcí prekurzorů obsahujících zlatité ionty za přítomnosti redukčních a stabilizačních činidel. Mezi nejčastěji využívané metody patří redukce citrátem a Brust-Schiffrinova metoda.

Redukce pomocí citrátu

Jedná se o tzv. Turkevichovu metodu, která byla popsána již v roce 1951 [172]. Je to velmi jednoduchá metoda probíhající ve vodném prostředí, při které jsou syntetizovány sférické částice. Děje se tak redukcí kyseliny chlorozlatité za přítomnosti redukčního činidla. Tím bývá nejčastěji citrát, který je zodpovědný za vznik monodisperzních AuNPs [172,173]. Citrát při této

metodě zastává tedy dvě role. Nejprve se chová jako redukční činidlo, které přemění zlatité ionty na částice zlata a následně po absorpci na takto vzniklé částice je stabilizuje a zabraňuje tím jejich dalšímu nárůstu. Pokud je při reakci přítomna vyšší koncentrace citrátu, dochází ke stabilizaci již malých částic zlata, které jím jsou zcela pokryty. Naproti tomu při nízké koncentraci citrátu nedochází ke kompletnímu pokrytí a stabilizaci částic, tím pádem částice dále narůstají a dochází tak ke vzniku nanočástic s větším průměrem [172]. Velikost částic je při syntéze ovlivňována nejen koncentrací samotného citrátu, ale poměrem citrátu a zlata [174,175]. Navíc je velikost ovlivňována i silou redukčního činidla. Citrát je relativně slabým redukovadlem oproti například borohydridu sodnému využívanému v Brust-Schiffrinově metodě. Proto jsou při citrátové metodě syntetizovány větší částice (>10 nm) v porovnání s částicemi o velikostech do 5 nm vznikajícími Brust-Schiffrinovou metodou [176].

Brust–Schiffrinova metoda

Touto metodou jsou syntetizovány monodisperzní AuNPs v rozmezí velikostí od 1,5 do 5 nm. Částice vznikají rovněž redukcí prekurzorů zlata, ovšem v tomto případě probíhá redukce v organické fázi a jako redukční činidlo je použit borohydrid sodný. Vzniklé částice jsou stabilizovány organickou monovrstvou alkanthiolátu, např. dodekanthiolu, a jsou tedy rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Monovrstva alkanthiolátů může být pomocí substituce nahrazena jinými ligandy. Podle jejich povahy mohou být AuNPs opatřeny specifickými vlastnostmi, jako je povrchový náboj, rozpustnost ve vodě popřípadě mohou být na jejich povrch zavedeny specifické funkční skupiny nebo biomolekuly pro následné bioaplikace. [177].

1.4.3 Funkcionalizace zlatých nanočástic

Velmi rozšířenou a univerzální metodou je funkcionizace AuNPs molekulou polyethylenglykolu (PEG). Tento hydrofilní polymer s nízkou imunogenicitou lze s výhodou využít pro různé biomedicínské aplikace. Využívá se heterobifunkční PEG, který na jednom konci molekuly nese thiolovou skupinu, přes kterou je snadno vázán na záporně nabitý povrch zlaté nanočástice. Molekulou na druhém konci polymeru může být například biotin, lektin, fluorescenční značka. Případně to mohou být i různé funkční skupiny jako je například aminová nebo karboxylová skupina, které jsou následně využity pro vazbu bioaktivní molekuly [178-180].

1.4.4 Biokonjugace zlatých nanočástic

Podle Pearsonovy teorie slabých a silných kyselin a bází je zlato jako takové klasifikované jako slabá kyselina, která je schopna tvořit silnou vazbu se slabou Lewisovskou bází [181]. Zlaté nanočástice připravené nejčastěji používanou Turkevichovou metodou jsou tvořeny jádrem z atomů zlata obklopených vrstvou slabě absorbovaných iontů citrátu. Tento negativní náboj na povrchu slouží ke stabilizaci částic a brání jejich vzájemné agregaci [182]. Nicméně tyto částice jsou velmi citlivé k vlivům okolního prostředí jako je pH, teplota, případně složení rozpouštědla. Z toho vyplývá, že biokonjugace částic, která je nutná k následným bioaplikacím je výhodná i z hlediska stabilizace těchto částic v roztoku. Metody používané k biokonjugaci AuNPs biomolekulami jsou založeny na elektrostatických adsorpčních, afinitních interakcích nebo kovalentních vazbách [183]. V případě elektrostatických interakcí dochází k prosté sorpci pozitivně nabitých proteinů na povrch AuNPs stabilizovaných anionickými ligandy jako je již zmiňovaný citrát [184]. Afinitní interakce jsou zprostředkované systémem biotin/avidin (streptavidin), kdy jsou biotinylované biomolekuly vázány na AuNPs s navázaným streptavidinem [185]. Kovalentní interakce na povrch AuNPs jsou zprostředkované thiolovými skupinami, které jsou v biomolekulách buď přirozeně přítomné, popřípadě jimi jsou tyto biomolekuly uměle funkcionalizovány. Při biokonjugaci AuNPs se využívá především bifunkčních ligandů, přičemž jeden konec slouží k přímému ukotvení na povrch zlaté nanočástice a druhý je pak volně přístupný pro specifickou interakci. Nejčastěji využívanými biomolekulami při biokonjugaci AuNPs jsou oligonukleotidy a protilátky, ale rovněž se využívají i peptidy (Obrázek 15).

Biomolekula	Aplikace	Reference
Polyethylenglykol (PEG)	Cílení na buňky, cílený transport léčiv	[178,179]
Peptid	Cílení na buňky, stimulace makrofágů a produkce prozánětlivých cytokinů, zobrazování buněk	[186,187]
DNA	Cílená genová terapie, regulace exprese transgenů, detekce specifických genů např. v mikrobiologii, zobrazování,	[188-190]
Protilátka	Imunoanalýzy, diagnostika a cílená léčba,	[191,19]

Obrázek 15: Souhrn nejčastěji používaných biomolekul pro biokonjugaci zlatých nanočástic a jejich aplikace.

Biokonjugace zlatých nanočástic s oligonukleotidy

V roce 1996 byly publikovány první práce zabývající se vazbou DNA na povrch AuNPs [192,193]. Byly použity thiolované oligonukleotidy, které byly na povrch AuNPs vázány přes síru za vzniku stabilní Au-S vazby. DNA molekuly jsou na povrchu částic navázány s vysokou četností, což zaručuje částicím stabilitu dokonce i v roztocích o velmi vysoké iontové síle [194].

Klíčový fakt při biokonjugaci AuNPs oligonukleotidy přes Au-S vazbu je ten, že povrch nanočástic je záporně nabitý stejně tak jako celá molekula DNA. Tato skutečnost tedy vede ke vzniku odpuzivých sil mezi částicemi a molekulami DNA. Pokud je použit roztok o vysoké koncentraci chloridu sodného, jehož přítomnost by měla záporný náboj na povrchu částice odstínit a zpřístupnit ho tak pro vazbu DNA, dochází však vlivem iontových vazeb k nežádoucímu shlukování těchto částic. Tento problém byl vyřešen procesem postupného zasolování roztoku AuNPs s oligonukleotidy, kdy na začátku je v roztoku přítomna určitá molární koncentrace AuNPs a oligonukleotidů a až postupným přidáváním soli dochází k vazbě oligonukleotidů na povrch AuNPs. Díky tomu, že jsou oligonukleotidy oproti soli stále v nadbytku, nedochází k shlukování částic. Bylo dokázáno, že množství navázaných oligonukleotidů na povrch částic je úměrné výsledné koncentraci chloridu sodného [20,195,196]. Tento proces vazby s postupným zasolováním vede ke vzniku stabilních biokonjugátů, avšak celková doba biokonjugace je 1-2 dny [18].

Dalším úskalím při vazbě DNA s AuNPs je, že u částic větších než 50 nm dochází ke snížení účinnosti konjugace [197,198]. Proto byly vyvinuty postupy pro větší částice až do 250 nm, které jsou během procesu biokonjugace stabilní díky přítomnosti surfaktantu v reakci. V tomto případě jsou nejprve na AuNPs sorbovány molekuly surfaktantu (např. dodecylsulfát sodný) zajišťující jejich stabilitu vůči vysokým koncentracím přidávané soli [195]. Později byla publikována práce s využitím neionogenního fluorovaného surfaktantu (ZonylTM FSN-100), kdy byl vazebný čas zkrácen na 2 hodiny a roztok 1M chloridu sodného byl použit dokonce v jednorázovém přídávku [199]. Použití surfaktantů při biokonjugaci sice vede ke zvýšení účinnosti vazby, avšak jejich použití je díky jejich cytotoxicitě pro následné aplikace v biomedicině nevhodné.

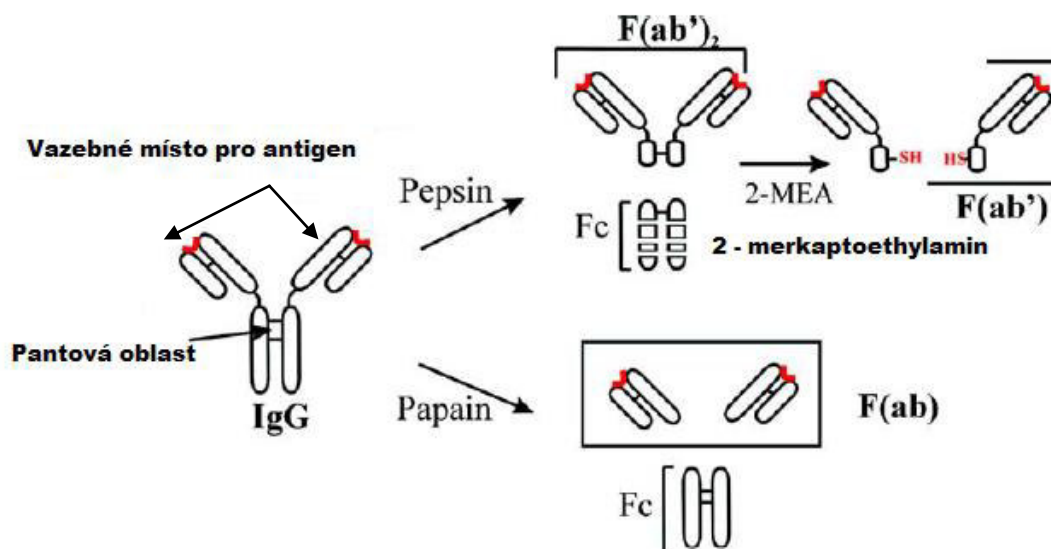
Zhang se svými kolegy se ve své práci kromě vlivu přidané soli na úspěšnou biokonjugaci začal zabývat i vlivem pH reakčního pufru. Výsledkem byl protokol pro vazbu oligonukleotidů na povrch AuNPs v prostředí 10 mM citrátového pufru pH 3 s 0,3M roztokem chloridu sodného. Takto konjugované částice jsou stabilní dokonce i v prostředí o pH 7,6 s přídávkem 1M roztoku chloridu sodného, ve kterém by AuNPs před navázáním DNA molekul agregovaly [182].

Z dosud publikovaných prací tedy vyplývá, že pro úspěšnou vazbu thiolovaných oligonukleotidů na povrch AuNPs je nutné s ohledem na následující aplikaci věnovat pozornost: I) pH vazebného roztoku, které má při nízkých hodnotách vliv na redukci denzity povrchového náboje, II) koncentraci přidávané soli (nejčastěji chlorid sodný), III) přídávku surfaktantu, kde však musí být zvažena následná aplikace kvůli případné cytotoxicitě.

Biokonjugace zlatých nanočástic s proteiny

Na kovalentní vazbě mezi proteiny a AuNPs se podílí volné thiolové skupiny cysteinových zbytků uvnitř molekul proteinů. Této jednoduché interakce lze využít například při vazbě redukováných protilátek. Velmi populární strategií pro přípravu imunologicky aktivních povrchů je enzymatická fragmentace imunoglobulinu G (IgG) za vzniku monovalentních fragmentů protilátky [200-203]. Tyto F (ab') fragmenty vznikají po štěpení molekuly IgG pepsinem a následnou redukcí 2-merkptoethylaminem (2-MEA) (Obrázek 16). Malá velikost fragmentu je výhodná z hlediska potlačení prostorové zábrany, navíc je zde vyloučeno riziko nespécifické sorpce, která je běžně zapříčiněna Fc fragmentem, který je v tomto případě odštěpen. Vzniká tak částice s orientovaně navázaným fragmentem protilátky. Navíc bylo

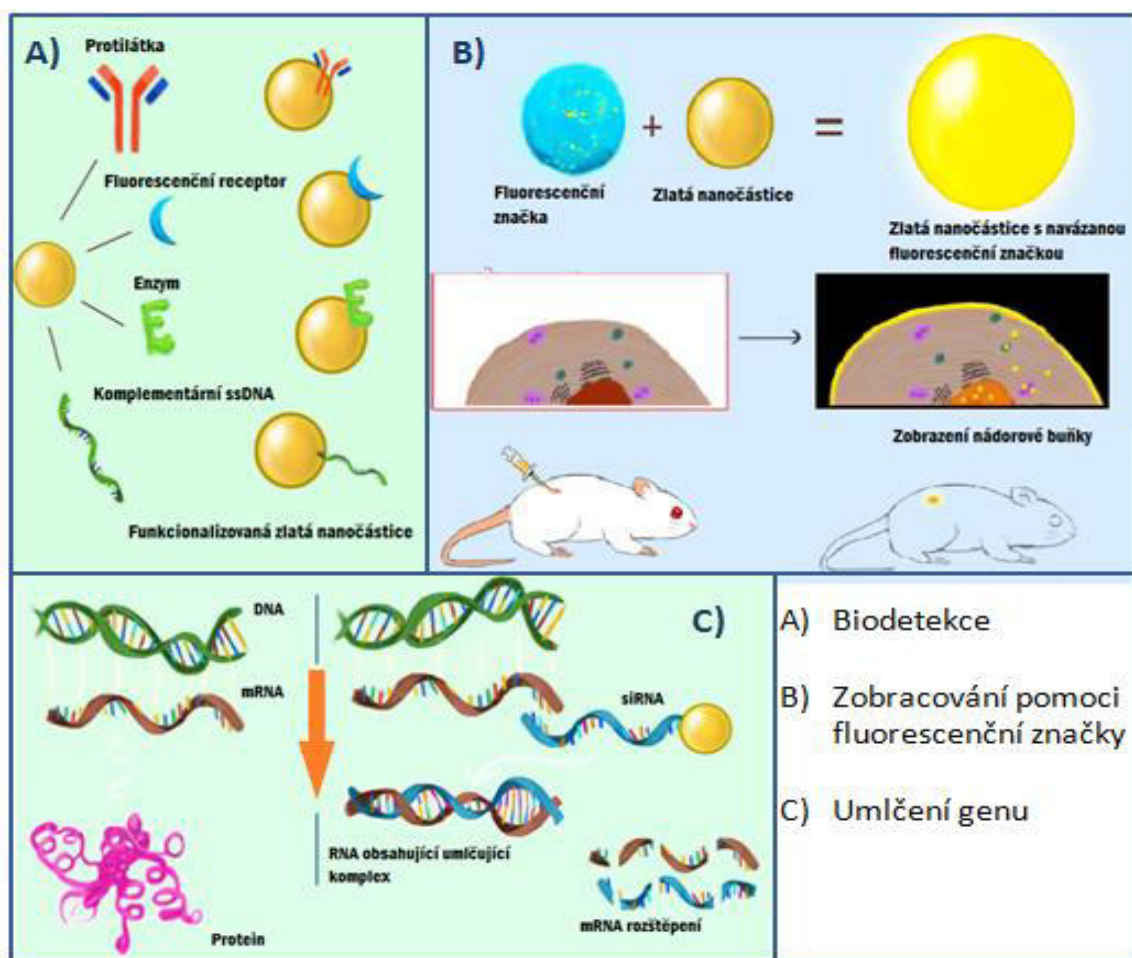
dokázáno, že tento imunologicky aktivní povrch vykazuje vyšší vazebnou aktivitu k antigenu, než povrch s nespecifickou sorpcí [204]. Dalším, rozšířenějším příkladem kovalentní vazby, je vazba protilátek na AuNPs modifikovaných PEG s karboxylovými funkčními skupinami [205]. Na takto modifikované částice jsou pak protilátky vázány za pomoci karbodiimidové konjugační metody (viz. kapitola 1.2.4) [206,207].



Obrázek 16: Schéma strategií používaných pro přípravu $F(ab')$ a $F(ab)$ fragmentů z celé molekuly Imunoglobulinu G [208].

1.5 Využití biokonjugátů na bázi zlatých nanočástic

Využití biokonjugátů AuNPs se dá stejně jako u magnetických částic rozdělit na *in vivo* a *in vitro* aplikace. Existuje celá řada vědeckých prací popisujících využití AuNPs jako součást kolorimetrických a elektrochemických senzorů. Konkrétní aplikace je pak závislá na ligandu, který je na částici navázán (Obrázek 17).



Obrázek 17: Využití zlatých nanočástic v bioaplikacích. A) Biodetekce B) Zobrazovací techniky-zobrazení nádorové buňky pomocí zlaté nanočástice konjugované s fluorescenční značkou. C) Umlčení genu-zablokování syntézy určitého proteinu pomocí zlaté nanočástice nesoucí komplementární siRNA za vzniku komplexu nesoucího umlčující komplex. Převzato a upraveno podle [187].

In vivo aplikace biokonjugátů na bázi zlatých nanočástic

Zlaté nanočástice mohou být využity během terapie různých onemocnění. Nejvýznamnější je asi jejich využití pro cílenou dopravu léčiv [35,209]. Je to především z důvodu jejich biokompatibility a snadné konjugace s různými ligandy [210]. Nicméně vedle těchto výhod musí být brána v úvahu jejich náchylnost k agregaci a problémy spojené s jejich manipulací ve vnitřním fyziologickém prostředí [171,211]. Slibným řešením je právě konjugace AuNPs s biomolekulami, které obecně zlepšují jejich stabilitu, biokompatibilitu a rozpustnost. Klíčovou roli při cílené dopravě léčiv pak hrají zejména aminokyselinové zbytky proteinů navázaných na AuNPs, které jsou zodpovědné za lokalizaci částice uvnitř buňky, a také jejich signální peptidy, které jsou pak zodpovědné za úspěšnou interakci s importiny a transportem přes jaderné membrány [212,213]. V této souvislosti jsou nejvíce studované peptidové sekvence Tat proteinů pocházejících z viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) [214] a integrin vázající domény [215], jelikož nabízí zajímavý a slibný potenciál pro cílenou dopravu léčiv do jádra buňky. Patel a kol. ve své práci popisují přípravu biokonjugátu složeného z AuNPs, HIV Tat proteinu a protismyslné oligonukleotidové sondy. Za pomoci tohoto biokonjugátu bylo dosaženo 75% úspěšnosti v regulaci genové exprese [216]. Dalším příkladem je využití AuNPs konjugovaných s hovězím sérovým albuminem (BSA) [217]. Bylo prokázáno, že takto konjugované částice vykazují výraznou stabilitu v roztocích s měnící se hodnotou pH a koncentrací elektrolytu [218,219]. Po následném navázání aminoglykosidických antibiotik na tyto částice byl pozorován silnější antibakteriální účinek ve srovnání s použitím jen samotných antibiotik. Pravděpodobně byl díky BSA usnadněn vstup částice přes buněčnou stěnu, díky čemuž byl baktericidní účinek lokalizován přímo do buňky [219]. AuNPs mohou být vedle BSA a terapeutika konjugovány se specifickými protilátkami, které mohou být namířeny například proti rakovinovým buňkám, čímž se nabízí slibná varianta v cílené léčbě nádorových onemocnění [220].

Zlaté nanočástice lze také využít při fototerapii nádorových, ale i infekčních onemocnění. Díky fenoménu zvanému povrchová plazmonová rezonance mají AuNPs až o několik řádů zvýšenou schopnost absorpce viditelného a infračerveného světla oproti konvenčním laserovým fototerapeutickým činidlům. Absorbovanou energii jsou pak schopny přeměnit na teplo, a tím ničit okolní nádorovou tkáň. Pokud jsou použity AuNPs konjugované se specifickou protilátkou, vzniká velmi specifické a účinné činidlo pro fototermální terapii [221].

In vitro aplikace biokonjugátů na bázi zlatých nanočástic

In vitro se biokonjugáty AuNPs využívají v moderních analytických metodách, kam patří především imunoeseje, biosenzory a různé rychlé chromatografické testy. Zde slouží jako samotné kolorimetrické a elektrochemické značky, případně se podílí na zesílení signálu při detekci. U obou typů detekcí se využívá unikátních vlastností AuNPs, díky nimž je při stanovování různých analytů dosahováno vysokých citlivostí. Ligandy biologické povahy konjugované s částicemi zajistí specifické označení cílové molekuly a AuNPs slouží jako signál generující molekula.

Hlavní mechanismus kolorimetrických detekcí spočívá v ději zvaném povrchová plazmonová rezonance a závisí na vzdálenostech mezi částicemi. V případě, že vzdálenosti mezi částicemi jsou menší než samotný průměr částice, dochází k jejich agregaci a vazbě mezi povrchovými plazmony sousedních částic [222]. Vznik agregace závisí na okolním prostředí, ve kterém se částice nachází a projevuje se barevnou změnou roztoku částic z červené na modrou, pozorovatelnou i pouhým okem. Pomocí UV-VIS spektrofotometrie se poté měří absorpce záření o odpovídající vlnové délce, která je způsobená právě povrchovou plazmonovou rezonancí [192,223,224]. Agregaci AuNPs s následnou kolorimetrickou detekcí lze využít při detekci molekul DNA, například při odhalování genetických mutací [225], ale i při identifikaci patogenů [189,226]. Už v roce 1996 Mirkin popsal detekci jednovláknového oligonukleotidu za pomoci dvou různých sond označených AuNPs. Každá z těchto dvou sond byla komplementární právě k polovině stanovovaného oligonukleotidu. Pokud došlo k vzájemné hybridizaci mezi stanovovaným oligonukleotidem a sondami, vznikla polymerní síť, uvnitř které se AuNPs vázané na sondách přiblížily natolik, že došlo k již výše zmíněné agregaci vedoucí k barevné změně roztoku [192]. Tato barevná změna tedy indikovala přítomnost stanovovaného oligonukleotidu ve vzorku. AuNPs se také využívají ke kolorimetrické detekci proteinů. Lze připravit AuNPs konjugované s celou škálou sacharidů a využít je k detekci proteinů, které mají schopnost tyto sacharidy vázat. Stupeň agregace AuNPs pak odpovídá koncentraci stanovovaného proteinu. Tuto metodu lze využít k vysoce citlivé kvantitativní detekci lektinů [227]. Zajímavým využitím barevné změny agregovaných AuNPs je studium protein-proteinových interakcí [228].

Další využití nachází AuNPs při vývoji vysoce citlivých elektrochemických detekčních metod, a to díky své katalytické aktivitě a vysoké vodivosti. Při přímé detekci jsou AuNPs adsorbovány na povrch elektrického převodníku, kde dochází nejdříve k takzvané "předoxidaci"

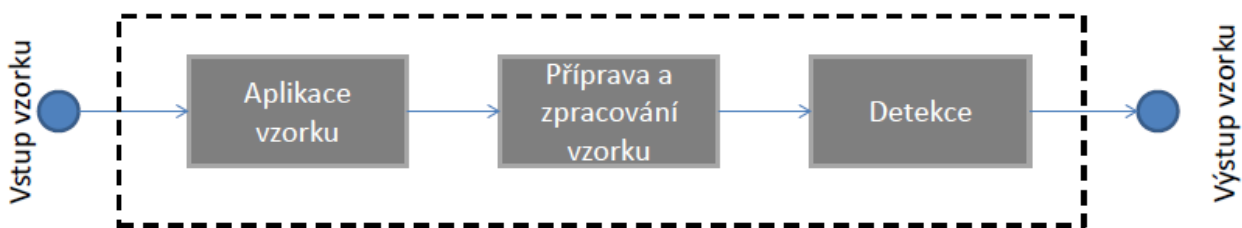
AuNPs, za vzniku elektroaktivnějšího zlatitého iontu. Děje se tak za vysokých oxidačních potenciálů v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové. Vzniká komplex AuCl_4^- , který je následně reverzně redukován na Au (0). Analytickým signálem, který vyjadřuje počáteční koncentraci AuNPs, je dobře definovaný katodický pík, který se generuje právě díky výše uvedeným jevům na elektrodě [229,230]. Tato metoda byla úspěšně využita v mnoha systémech ve spojení s tištěnými elektrodami a vykazovala velmi dobré výsledky [139,229,230,231].

Je však důležité poznamenat, že elektrochemická detekce je silně ovlivněna velikostí AuNPs. Malé částice jsou díky Brownovu pohybu a pomalejší sedimentaci více ve vznosu, tím pádem dále od elektrody a dochází tak k výraznému snížení signálu v porovnání s většími částicemi. Aby se předešlo tomuto falešnému snížení signálu, je potřeba zajistit těsný kontakt AuNPs s elektrodou. Pokud je tato podmínka splněna, nedochází k žádným omezením a bylo dokonce vyzkoušeno, že vyšší signály poskytují pak částice s menším rozměrem. Je to zřejmě způsobeno poměrem povrchu oproti velikosti částic, který je u nanočástic vysoký [232]. Jako vhodným řešením, díky kterému by se předešlo potížím spojených s nedostatečnou sedimentací malých nanočástic na povrch elektrody, se ukázalo využití IMS. Díky magnetickým částicím může být analyt ze vzorku specificky izolován, a pokud je při následné elektrochemické detekci pod elektrodu vložen permanentní magnet, magnetické částice jsou přitahovány do jeho blízkosti a je tak zajištěn těsný kontakt detekovaného vzorku s povrchem elektrody.

Takto sestaveného biosenzoru bylo využito jak pro detekci bakterií, tak i například virů. Afonso a kol. ve své práci popisují biosenzor pro detekci salmonelových buněk v mléce. Díky kombinaci IMS a elektrochemické detekce byli schopni detekovat 143 CFU/ml, kdy celá analýza trvala pouhých 90 minut [139]. Wang a kol. použili biosenzor na stejném principu pro stanovení *E. coli* O157:H7. Ve srovnání s konvenčními metodami, které trvají 2 - 4 dny, bylo za pomoci tohoto biosenzoru detekováno 10 CFU/ml za méně než jednu hodinu [233]. Saihy a kol. sestavili stejný biosenzor pro detekci viru Influenza A subtyp H9N2. Díky kombinaci magnetické separace a elektrochemické detekce získal rychlou, citlivou metodu s malou spotřebou vzorku a nízkým detekčním limitem [234].

1.6 Magnetické nosiče a biokonjugáty jako součást „Lab-on-a-chip“ platformem

Díky rychlému rozvoji v oblasti mikrofluidiky a nanotechnologií se velkým trendem v posledních desetiletích stala obecně miniaturizace a automatizace analytických metod. Znalosti v oblasti mikrofluidiky se tak staly základem pro vytvoření miniaturních systémů, kde je průtok malého množství kapaliny (od mikro- až po pikolitry) uvnitř mikrokanálek přesně řízen a kontrolován pomocí elektrokinetických nebo tlakových sil [235]. Výsledkem jsou systémy zahrnující všechny kroky analýzy od zavedení vzorku po jeho detekci na jedné platformě o velikosti několika milimetrů nebo centimetrů. (Obrázek 18). Tyto vysoce integrované miniaturní platformy obsahují mikroventily, pumpy, mixéry a elektrody, což společně tvoří systém, ve kterém dochází k procesům, jako je obohacení, separace, mixování a konečná detekce vzorku [236].



Obrázek 18: Obecné schéma Lab-on-a-chip systému.

Tyto systémy označované jako laboratoře na čipu se těší velkému zájmu ve vědeckých laboratořích. V současné době je vidět intenzivní snaha o zavedení těchto systémů i do běžné praxe a využít tak beze zbytku jejich ohromný potenciál. Hlavními výhodami jsou rychlost analýzy vzorku, snadná obsluha a provedení analýzy, nízká spotřeba vzorku a reakčních činidel související s velikostí platformy a malými objemy kanálek vedoucí samozřejmě ke snížení nákladů na analýzu. V neposlední řadě je to pak možnost paralelních analýz a automatizace. Automatizace, miniaturizace a integrace na jedné platformě navíc zajistí vyšší citlivost a reprodukovatelnost stanovení [237,238]. Aby mohla být miniaturizovaná mikrofluidní zařízení

použitelná a komerčně dostupná pro širokou skupinu koncových uživatelů, je nezbytná jejich masová výroba za poměrně nízkou cenu. Při volbě materiálu musí být bráno v úvahu několik aspektů, jako je snadná výroba, nízké výrobní náklady a robustnost finálního zařízení. Z tohoto důvodu se většina čipů vyrábí z plastových materiálů [239] jako například poly(dimethylsiloxan) (PDMS) [240], poly(methylmetakrylát) (PMMA) [241], polykarbonát (PC) [242], polyimid (PI) [243].

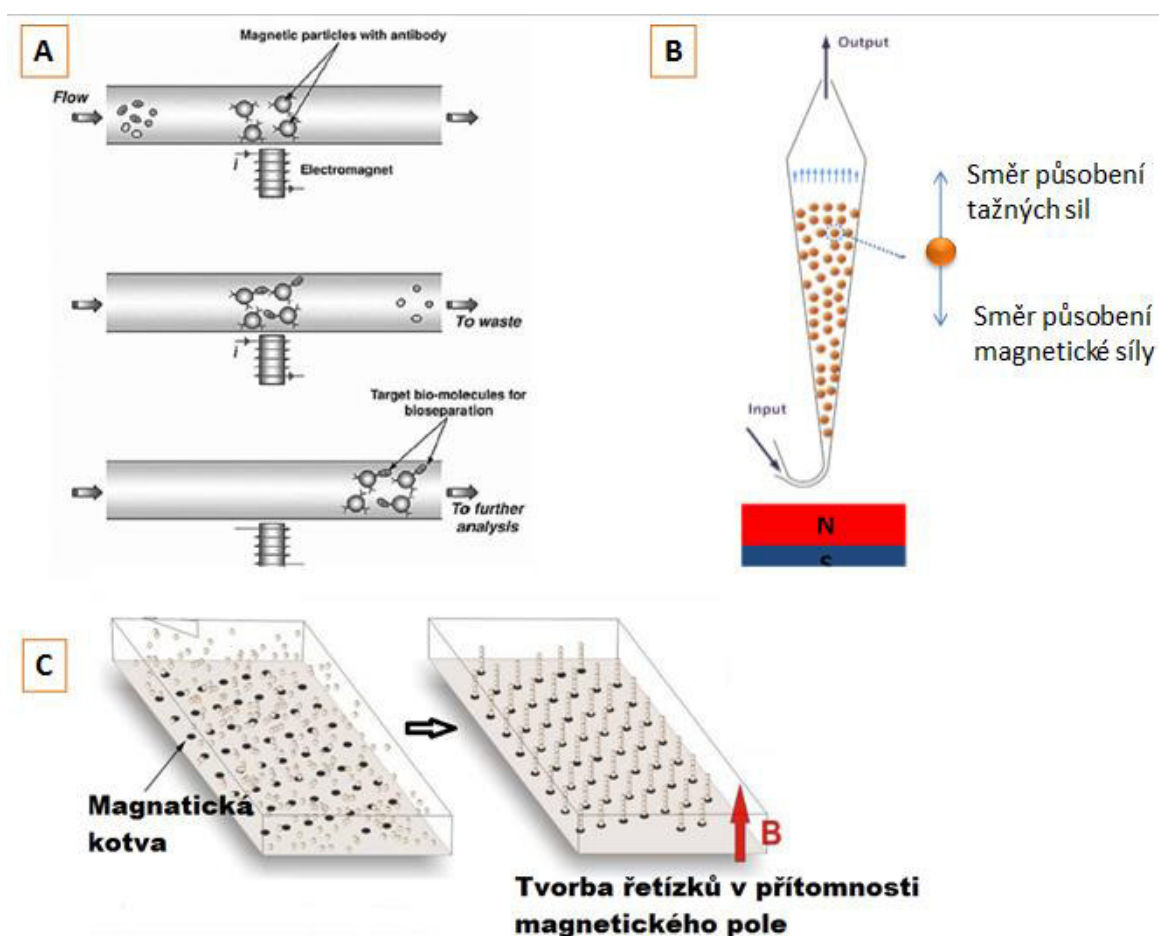
1.6.1 Úloha magnetických částic uvnitř Lab-on-a-chip platformem

Magnetické částice jsou uvnitř mikrofluidních čipů obecně využívány hned k několika procesům. Jsou jimi: míchání tekutiny [244], selektivní zachycení specifických analytů procesem IMS a s tím spojený transport analytů uvnitř čipu. Jelikož míchání tekutin uvnitř kanálků čipů se běžně provádí pasivně, a to za pomoci různé geometrie kanálků [245], nejvýznamnější je využití magnetických částic právě k separaci analytu ze vzorku. Integrace biofunkcionalizovaných magnetických částic do mikrofluidního zařízení výrazně zvyšuje specifický povrch pro zachycení analytu uvnitř čipu. Díky tomu je zajištěna vysoká účinnost záchyty, která je dokonce vyšší v porovnání s případem, kdy je k zachycení analytu využit samotný povrch čipu s navázaným specifickým ligandem [246]. Navíc díky tomu odpadají složité kroky, které jsou pro funkcionalizaci povrchu čipu potřebné.

Pro udržení magnetických částic uvnitř čipu se využívá buď permanentních neodymových magnetů, případně elektromagnetů. Jak již bylo výše uvedeno, s použitím elektromagnetu souvisí několik výhod, ale i nevýhod. Mezi výhody patří přesné nastavení gradientu elektrického pole a možnost jeho okamžitého zapnutí a vypnutí. Mezi nevýhody patří nutnost určitého přístrojového vybavení, což souvisí s vyššími náklady a navíc při generaci magnetického pole dochází k zahřívání systému. Jelikož magnety jsou uloženy externě a obklopují mikrofluidní čip, může docházet k nechtěnému zahřívání vzorku uvnitř systému a nepříznivému ovlivnění analýzy. Naproti tomu permanentní magnety generují pouze nízký magnetický gradient, jeho sílu nelze nijak regulovat a v případě generování magnetického pole se musí přikládat, případně oddalovat od čipu. Avšak při jejich použití nedochází k zahřívání systému a navíc je jejich použití levné a poměrně snadné. Co mají oba typy magnetů společné je, že svou silou a uspořádáním okolo čipu ovlivňují chování a uspořádání magnetických částic uvnitř zařízení [247].

Existuje několik typů uspořádání magnetických částic uvnitř čipu (Obrázek 19). Jedním

z nejjednodušších je zachycení magnetických částic uvnitř kanálku čipu ještě před aplikací vzorku a reagentů. Dojde k tvorbě takzvaného plaku částic. Při průchodu vzorku je na magnetických částicích zachycen analyt a po odstranění magnetického pole může být magnetický nosič s navázaným analytem dále unášen do další části čipu, kde dochází buď k dalšímu zpracování vzorku, případně k detekci [248]. Dalším příkladem je systém, kdy jsou po aplikaci vertikálního magnetického pole částice samy organizovány do řetízků na předem vytvořených magnetických kotvách [249]. Novou a zajímavou variantou je mikrofluidní čip uvnitř něž jsou magnetické částice neustále ve vznosu. Jedná se o magnetem stabilizované fluidní lože, kdy na částice působí tažná síla protékajícího vzorku a v opačném směru magnetická síla, což způsobuje neustálou cirkulaci částic v čipu [80,142].



Obrázek 19: Schematické znázornění mikrofluidních čipů s magnetickými částicemi: A) imunomagnetická separace uvnitř kanálku (částice tvoří zátku) [248] B) mikrofluidní magneticky stabilizované fluidní lože [142] C) řetízky magnetických částic na magnetických kotvách [249].

1.6.2 Využití magnetických nosičů a biokonjugátů při detekci bakteriálních buněk uvnitř Lab-on-a-chip platformem

K detekci a identifikaci mikroorganismů uvnitř mikrofluidních čipů mohou být použity různé analytické metody. Podle nutnosti použití specifických značek je můžeme obecně rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou metody, které po separaci mikroorganismu nevyžadují žádné specifické značení nutné k následné detekci. Jsou jimi techniky molekulární biologie [246,250] nebo například hmotnostní spektrometrie [251]. Zatímco do druhé skupiny řadíme metody, které vyžadují ještě specifické označení izolovaných mikroorganismů za pomoci konjugátu. Sem můžeme zařadit metody fluorescenční spektrometrie [252] a elektrochemické techniky.

Pokud je jako detekční technika uvnitř čipu použita PCR metoda, musí být zajištěna pečlivá kontrola všech reakčních podmínek, jako je přesná teplota, zavádění primerů, ale i ostatních reagensů. Tyto mikrofluidní čipy jsou využívány především jako point-of-care techniky (POCT), což jsou rychlé a snadné *in vitro* testy prováděné v místě péče o pacienta. Například Ganesh a kol. ve své studii vyvinuli integrovaný systém pro detekci *E.coli*. Po krátkém pomnožení za současně probíhající IMS (25 minut) byl vzorek zaveden do čipu, kde proběhla magnetická separace částic se zachycenou bakterií, která byla následně detekována pomocí PCR. Pomocí tohoto poměrně jednoduchého uspořádání byli schopni detekovat 10^3 CFU/ml za méně než 2 hodiny [246]. Tyto slibné výsledky ukazují, že kombinací a miniaturizací IMS a PCR lze získat integrovaný systém, který by mohl sloužit k snadné a rychlé detekci bakteriálních buněk. Aby však bylo dosaženo přísných požadavků pro detekci bakteriálních buněk v reálných vzorcích, je zapotřebí citlivost této metody ještě zvýšit.

Stejně jako PCR metoda může být využita i LAMP metoda. Jak již bylo výše uvedeno, oproti PCR se jedná o modernější, rychlejší, ale i citlivější metodu [149]. Sun a kol. vyvinuli čip s osmi komorami pro současnou detekci *Salmonella spp.* v osmi vzorcích potravin. Opět zde byla využita kombinace s IMS pro zakoncentrování vzorku. Pomocí tohoto systému bylo detekováno 10 CFU/ μ l za méně než 40 minut [250].

Pokud jsou do mikrofluidního čipu integrované elektrody, vzniká systém s velmi citlivou elektrochemickou detekcí. Chen a kol. ve své práci popisují vývoj platformy pro rychlou kombinovaného mikrofluidního zařízení dosáhli limitu detekce 10^2 CFU/ml za 1 hodinu [253].

Velmi zajímavá je práce, která popisuje konstrukci mikrofluidního zařízení pro detekci *Salmonella typhimurium* na principu megnetoimunoanalýzy. Bakterie jsou ze vzorku separovány pomocí magnetických nosičů procesem IMS, následně jsou označeny protilátkami konjugovanými s AuNPs a celé tyto komplexy jsou zavedeny do mikrofluidního zařízení, kde jsou zachyceny na tištěné uhlíkové elektrodě (SPCE). V tomto zařízení byla možná paralelní detekce osmi vzorků. Celá analýza trvala 72 minut a bylo dosaženo LOD 7,7 buněk/ml [85].

Ve výše popsané platformě je propojeno užití magnetických nosičů a biokonjugátů AuNPs a jejich následné zavedení do čipu. Na příkladu této platformy lze v praxi shrnout výhody imunosorbentů a biokonjugátů popisovaných v teoretické části této disertační práce. Magnetický imunosorbent zde slouží k zakoncentrování a separaci bakteriálních buněk ze vzorku. Protilátky navázané na magnetické částici zajišťují selektivitu a specifitu a díky superparamagnetickým vlastnostem částic může být zachycená bakterie velmi snadno oddělena od ostatních kontaminujících složek roztoku. Biokonjugát AuNPs zde slouží jako elektrochemicky aktivní značka, kdy protilátky navázané na AuNPs zajistí selektivní označení bakteriálních buněk a samotná zlatá nanočástice je zodpovědná za citlivý signál vzniklý po její oxidaci a následné redukci na SPCE v prostředí kyseliny chlorovodíkové.

V souvislosti s ochranou lidského zdraví je vývoj takovýchto LOC platform, které jsou snadné, rychlé, přenosné a dostatečně citlivé velmi důležitý pro plošné a rychlé testování rozsáhlé škály vzorků s různými analyty. Pro sestavení takového funkčního, vysoce integrovaného systému je nutná optimalizace všech dílčích částí platformy a stejně tak i jednotlivých metodických postupů. Klíčový je vývoj nosičů, biokonjugátů a výroba mikrofluidního zařízení. Završením je pak jejich účelné propojení.

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

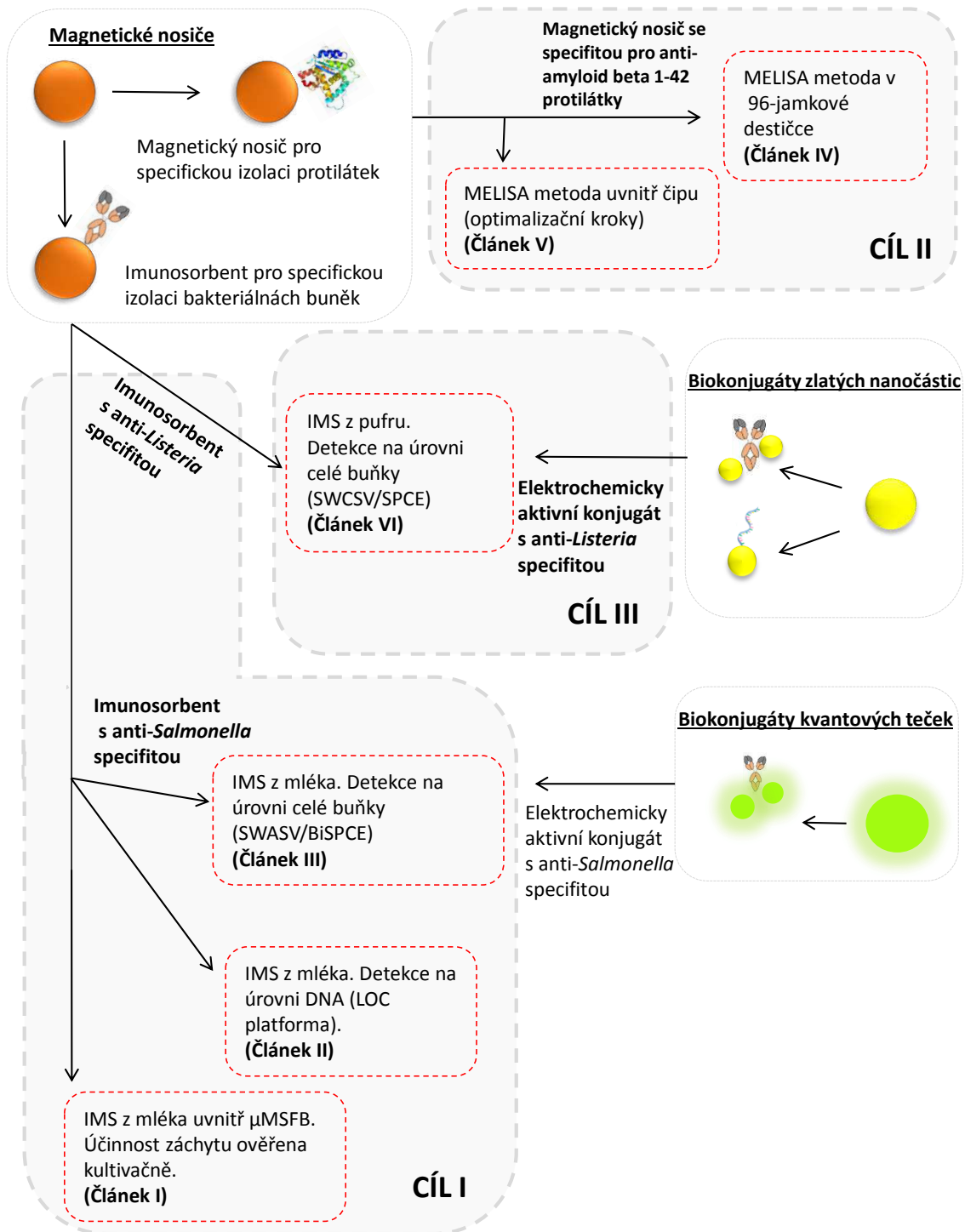
Výzkumné úkoly realizované v rámci doktorského studia byly zaměřeny na biofunkcionalizaci/biokonjugaci kovových mikro- a nanočástic pro následnou aplikaci v moderních bioanalytických metodách. Konkrétně se jednalo o biofunkcionalizaci magnetických mikročástic a biokonjugaci AuNPs za použití specifických protilátek, syntetických peptidů a oligonukleotidů jako biologicky aktivních ligandů. Celá práce je rozdělena do třech dílčích cílů (Obrázku 20).

Hlavním cílem práce byla příprava a využití magnetických imunosorbentů, které byly vyvíjeny za účelem separace bakteriálních buněk z mléčných výrobků. Tyto experimenty byly prováděny v rámci dvou na sebe navazujících evropských projektů LOVE-FOOD, č. projektu 317742, a LOVE-FOOD2MARKET č. projektu 687681. Byly testovány následně vybrány vhodné komerčně dostupné magnetické částice a protilátky a optimalizované podmínky jejich vzájemné konjugace za účelem přípravy co nejvhodnějších imunosorbentů. Následně byla testována jejich vazebná účinnost, koloidní, operační a skladovací stabilita a potenciální cytotoxicita. Připravené magnetické nosiče byly použity pro IMS bakterií z mléka. S připravenými imunosorbenty byly optimalizovány postupy pro záchyt bakterií jak ve vsádkovém, tak i v mikrofluidním uspořádání z různých objemů vzorku od 50 μ l až po 25 ml. Vrcholem všech těchto dílčích kroků byl výsledný průkaz bakterií vyizolovaných ze vzorku za pomoci výše zmíněných imunosorbentů na dvou detekčních zařízeních: I) na LOC platformě se senzorem pracujícím na principu povrchové akustické vlny, II) na tištěné elektrodě pracující na principu anodické rozpouštěcí voltametrie. Současně proběhla i úspěšná integrace vyvinutého magnetického imunosorbentu do mikrofluidního magnetického lože.

Vedle přípravy magnetických nosičů s protilátkami bylo dílčím úkolem optimalizovat postupy pro přípravu magnetických částic s imobilizovanými syntetickými peptidy. Tyto nosiče byly připraveny za účelem izolace specifických protilátek ze séra pacientů s neuredegenerativními chorobami, konkrétně s Alzhemierovou chorobou.

Posledním úkolem byla příprava biokonjugátů AuNPs. Byly optimalizované postupy pro vazbu jak na funkcionalizované nanočástice, tak i na částice bez funkčních skupin. Jako biologicky aktivní ligandy byly použity specifické protilátky a syntetické oligonukleotidy. Biokonjugáty AuNPs a specifických protilátek byly následně využity jako značky při

elektrochemické detekci *Listeria monocytogenes* izolované za pomoci magnetického nosiče, jehož příprava byla součástí výše uvedeného dílčího cíle.



Obrázek 20: Schematické znázornění dílčích cílů disertační práce.

3 DOSAŽENÉ VÝSLEDKY A DISKUZE

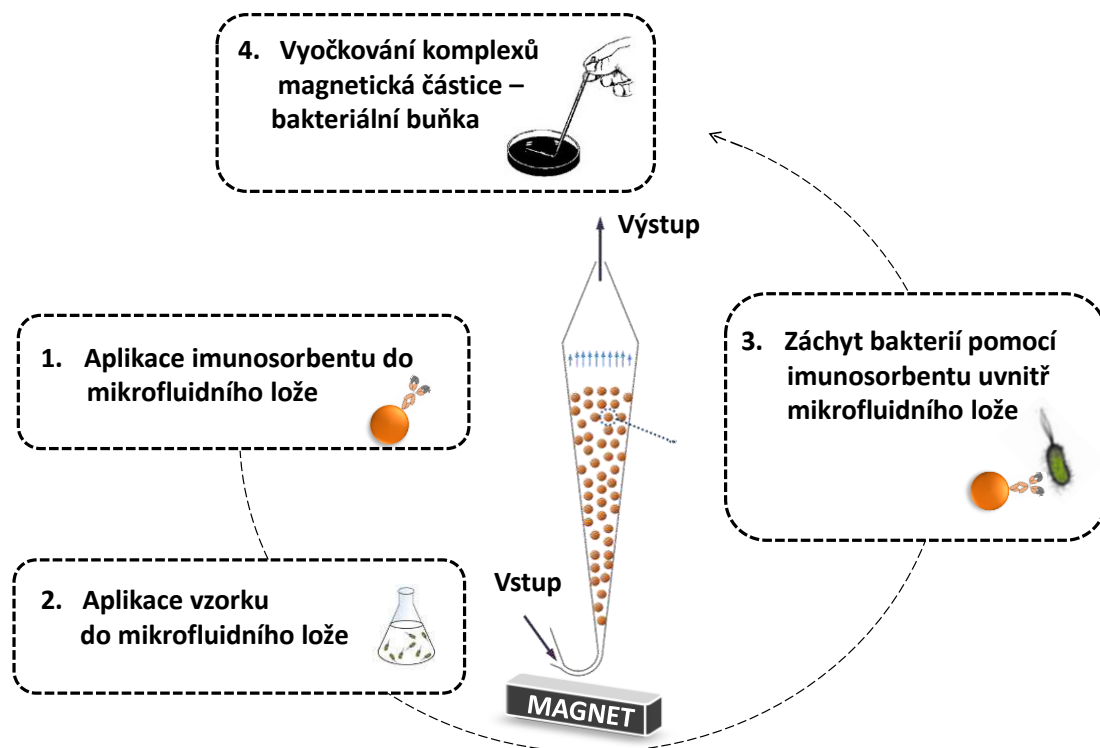
V této části disertační práce jsou shrnuty a komentovány výsledky z přípravy biofunkcionalizovaných/biokonjugovaných kovových mikro- a nanočástic s jejich následnou aplikací v moderních bioanalytických metodách. Výsledky práce a všech realizovaných experimentů jsou detailně popsány a diskutovány v recenzovaných odborných článcích publikovaných v hodnotných odborných periodikách. Dílčí výsledky byly během studia prezentovány také formou plakátových sdělení a přednášek na národních a mezinárodních konferencích.

3.1 Komentovaný úvod k článkům č. I a II

Velká část disertační práce zahrnuje experimenty, které byly prováděny v rámci dvou na sebe navazujících evropských projektů LOVE-FOOD (2012-2016) a LOVE-FOOD2MARKET (2016-2019). Výstupem těchto projektů bylo vyvinout vysoce integrovanou, přenosnou a uživatelsky přívětivou platformu pro průkaz bakterií v mléčných výrobcích, kdy na konci bude funkční prototyp, pomocí kterého bude možné detekovat pouhou jednu bakteriální buňku ve 25 ml vzorku za méně než 4 hodiny. Všechny optimalizační kroky byly prováděny se *Salmonella spp.* a optimalizované postupy následně aplikovány na další bakterie (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a *Bacillus cereus*). Naším dílčím úkolem v rámci projektů byla příprava magnetických imunisorbentů, které budou sloužit ke specifické izolaci bakterií ze vzorku a budou kompatibilní s celou platformou, což je také hlavní náplní a prvním cílem předkládané disertační práce. V rámci optimalizací bylo testováno několik komerčně dostupných magnetických nosičů a komerčně syntetizovaných protilátek, s cílem vyvinout co nejstabilnější a nejefektivnější nosič. Jelikož naše pracoviště má bohaté a dlouholeté zkušenosti s magnetickými nosiči, při výběru vhodných částic byly brány v úvahu zejména zkušenosti z minulých let. Při výběru specifických protilátek byla brána v úvahu jejich afinita k daným bakteriím, ale také jejich cena a dostupnost na trhu. U imunisorbentů byla testována jejich koloidní, operační a skladovací stabilita, cytotoxicita, vazebná účinnost, specifita, selektivita a další potřebné parametry. Nosiče byly řádně ocharakterizovány a výsledkem byly 4 specifické a účinné imunisorbenty pro záchyt 4 různých bakterií. Publikovány byly pak jen nejzajímavější a inovativní výsledky, které tato obsáhlá práce v rámci realizace vědecko-výzkumných projektů přinesla.

V úvodu prvního projektu byl na partnerském pracovišti, Curie Institute v Paříži vyvinut a posléze patentován nový typ mikrofluidního čipu pracující na principu magneticky stabilizovaného fluidního lože. Tento čip byl vyvinut za účelem záchytu bakteriálních buněk v mikrofluidním uspořádání. V rámci stáže na partnerském institutu byla optimalizovaná metoda IMS salmonelových buněk uvnitř čipu za pomoci námi připraveného imunisorbentu (Obrázek 21). Bylo dosaženo velmi dobrých výsledků vazebné účinnosti imunisorbentu, vždy dosahovala minimálně 90%. Imunisorbent vykazoval i výbornou selektivitu, kdy i v případě stonásobného

přebytku kompetující bakterie *E. coli* byla účinnost záchytu salmonelových buněk $99,3 \pm 0,5 \%$ a nespecifická vazba *E. coli* pouze $2,1 \pm 0,8 \%$ (Článek I).

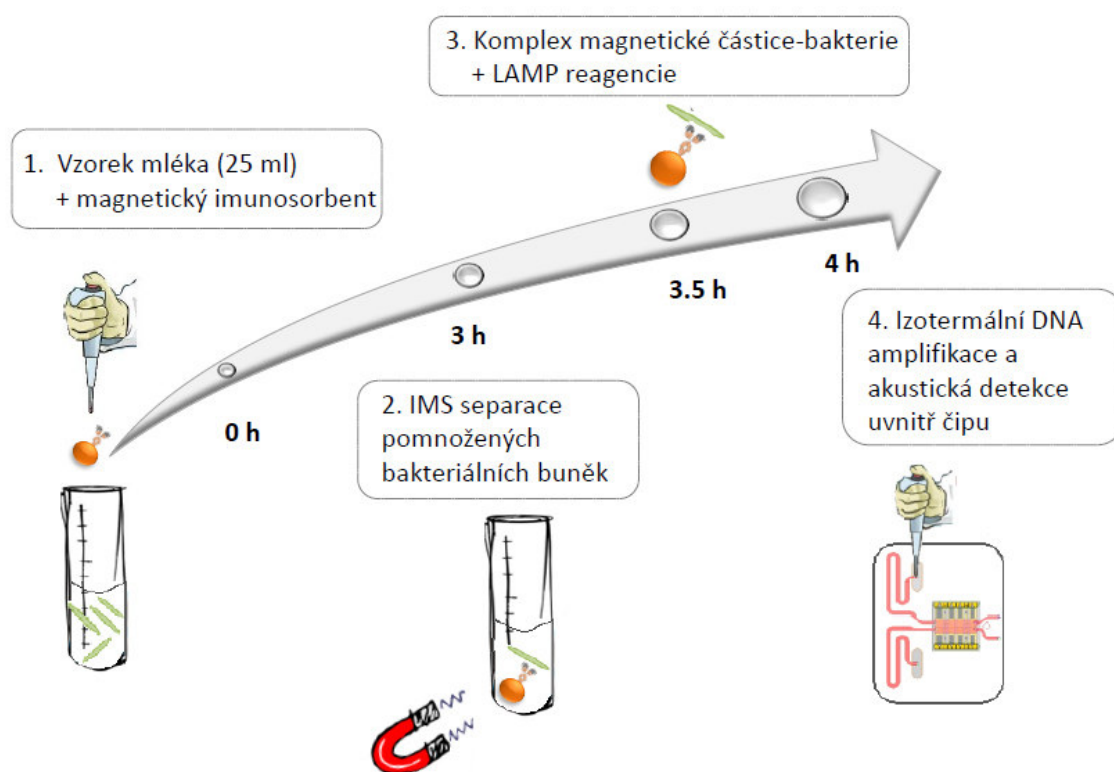


Obrázek 21: Schematické znázornění imunomagnetické separace salmonelových buněk uvnitř magneticky stabilizovaného fluidního lože.

Vzhledem k tomu, že v průběhu projektu bylo paralelně pracováno s několika variantami čipů, od výše uvedeného postupu se z několika opodstatněných důvodů upustilo a hledala se jiná alternativa.

V průběhu druhého projektu v partnerské laboratoři Institute of Molecular Biology and Biotechnology–FORTH, Heraklion, Kréta vyvinuli integrovanou LOC platformu pro detekci bakteriálních buněk na úrovni nukleových kyselin spojující amplifikace DNA metodou LAMP s akustickou detekcí. Jelikož normovaný vzorek podle ISO standardů je 25 ml mléka, nebylo jednoduché propojit fázi zakoncentrování vzorku s další částí platformy. Naším dílem práce bylo optimalizovat postup pro izolaci bakteriálních buněk ze vzorku o objemu 25 ml a následně vše propojit s vyvinutou LOC platformou tak, aby byl postup co nejúčinnější a nejjednodušší.

V rámci stáže v mikrobiologické laboratoři dalšího projektového partnera Institute Pasteur v Paříži, byly optimalizovány podmínky pro pomnožení salmonelových buněk a postupy pro IMS buněk ve vzorku mléka o objemu 25 ml. Jako nejúčinnější se ukázal postup, kdy během pomnožovací fáze probíhala současně i IMS. Vycházelo se z poznatku, že bakterie zachycené na magnetické částici jsou schopné se dále množit, proto nedocházelo k inhibici jejich růstu. Tento experimentálně ověřený postup IMS byl spojen s LOC platformou a vznikl tak mikro-nano-bio akustický systém pro detekci patogenů z reálných vzorků potravin (Obrázek 22). Pomocí tohoto systému bylo možné prokázat kontaminaci mléka s citlivostí na 1 bakteriální buňku ve 25 ml vzorku mléka. Ohromným benefitem byla především časová nenáročnost, kdy pomnožovací fáze trvala 3 hodiny a konečný výsledek byl tedy obdržen za méně než 4 hodiny. (Článek II).



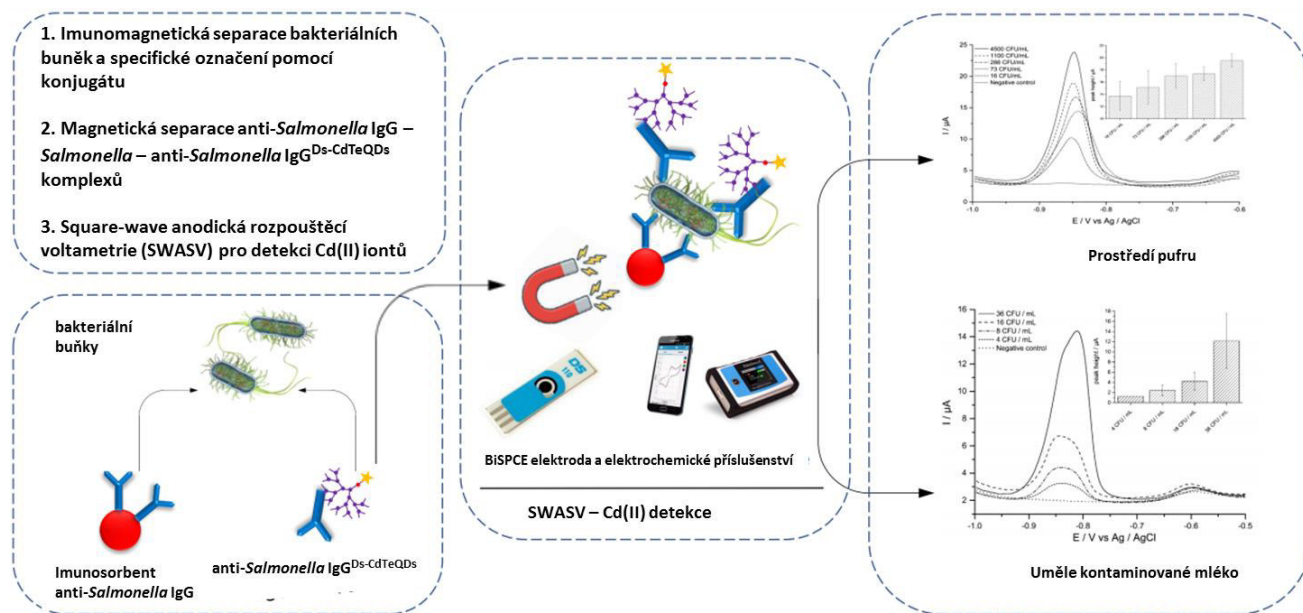
Obrázek 22: Schematické znázornění propojení imunomagnetické separace z velkého objemu s Lab-on-a.Chip platformou vedoucí k detekci 1 bakteriální buňky ve 25 ml mléka s pomnožovací fází v délce 3 hodiny.

3.2 Komentovaný úvod k článku č. III

Rychlá, včasná a dostatečně citlivá metoda hraje klíčovou roli v průkazu kontaminace bakteriálními buňkami. Klasické kultivační metody, tak jak jsou uvedeny v kapitole 1.3.1, patří v běžné praxi stále mezi nejvíce používané a lze je považovat za zlatý standard. Jsou však poměrně časově náročné zvláště vzhledem k době potřebné pro pomnožení v živných médiích a nárůst kolonií na miskách. Z tohoto důvodu byla v rámci naší laboratoře optimalizovaná nová metoda, která by potencionálně mohla klasické metody nahradit. Cílem bylo vyvinout rychlý a účinný biosenzor pro průkaz bakterií *Salomonella spp.* na úrovni celé buňky. Pro sestavení účinného nástroje pro detekci bylo v našem případě využito kombinace IMS s elektrochemickou detekcí. Jak již bylo v našich předešlých studiích ověřeno, IMS za pomoci námi vyvinutého imunosorbentu je rychlou a zároveň velmi selektivní metodou pro izolaci a zakoncentrování buněk ze vzorku s účinností vyšší než 90 %. IMS se při sestavování imunosenzorů pro detekci bakterií již běžně využívá [103,254-256]. Velkou výhodou je fakt, že na trhu je dnes již mnoho komerčně dostupných imunosorbentů s různou specifitou. Avšak ne vždy je za pomoci komerčního imunosorbentu dosaženo požadující účinnosti záchytu, což se významně projeví na citlivosti metody. K detekci se běžně využívají techniky molekulární biologie (především PCR) [257,258], optické metody [154], ale i elektrochemické senzory [259]. V případě PCR se jedná sice o velmi citlivou metodu, avšak přístrojově a technicky poměrně náročnou. Optické metody jsou sice velmi rozšířené, avšak také potřebují specifické a náročné přístrojové vybavení. Elektrochemické senzory, které se dnes v kombinaci s IMS hojně využívají, se tedy jeví jako vhodné jak z hlediska citlivosti, tak i z hlediska snadného a rychlého provedení. Avšak vždy je prostor pro inovace, ať už za účelem zjednodušení metody, zvýšení citlivosti detekce, případně potlačení nežádoucích vlivů jako je například vysoké pozadí.

Naším cílem bylo vytvořit unikátní kombinaci velmi specifického a selektivního magnetického nosiče s elektrochemicky aktivním konjugátem poskytujícím velice citlivou detekci. Zvolili jsme přístup, kdy byly bakteriální buňky separovány ze vzorku pomocí magnetických částic s protilátkou procesem IMS, a současně označeny pomocí elektrochemicky aktivního konjugátu. Konjugátem byla v tomto případě protilátka stejné specifity jako na magnetických částicích značená CdTe kvantovými tečkami, ale pro zvýšení intenzity signálu byl do konstrukce konjugátu zakomponován multifunkční dendron. Tato kombinace doposud nebyla

využita pro žádnou aplikaci a my jsme ji zvolili hned z několika důvodů. CdTe kvantové tečky byly navázány na N-konci dendronu, zatímco protější C-konec s 8 karboxylovými skupinami zůstal volný a zajistil stabilní a pravděpodobně i vícenásobnou vazbu na protilátky. Navíc došlo k eliminaci nežádoucí nescifické sorpce konjugátu, která běžně vede k vysokým odezvám při testování tzv. negativních kontrol (ověření nescifické reakce testované bez přítomnosti stanovené bakterie). Za pomoci tohoto imunosenzoru (Obrázek 23) byly detekovány 4 salmonelové buňky v 1 ml mléka.



Obrázek 23: Schematické znázornění imunosenzoru spojujícího proces imunomagnetické separace s elektrochemickou detekcí.

3.3 Komentovaný úvod k článkům č. IV a V

Rychlá a včasná diagnostika je klíčovým krokem k zahájení léčby a potlačení patologických procesů téměř u všech chorob. Detekce protilátek proti A β 1-42 (anti- A β 1-42 IgG/IgM) jako potencionálních biomarkerů Alzheimerovi choroby je dnes prováděna pomocí metody enzymové imunoanalýzy na pevné fázi (ELISA) [260,261]. V současné době se hledají nové modifikace tradiční imunoanalytické metody s cílem zvýšit citlivost a specifitu detekce. Jedním z řešení může být zvýšení specifického povrchu, kde dochází k reakci mezi antigenem a stanovovanými protilátkami. Za účelem zvýšit citlivost detekce anti A β 1-42 protilátek byly místo povrchu jamek mikrotitrační destičky k fixaci antigenu (A β 1-42) použity magnetické mikročástice. Tento typ uspořádání přinesl několik výhod. Magnetické mikročástice s vysokým specifickým povrchem mohou být na rozdíl od stěny jamek mikrotitrační destičky homogenně rozptýleny v celém reakčním objemu, kdy větší plocha tzv. mezifázového rozhraní umožní rychlejší tvorbu biospecifických párů. Inkubační doby tak mohou být výrazně zkráceny. Protokoly pro provedení magnetické ELISA metody označované zkratkou MELISA byly optimalizovány pro vsádkové provedení v jamkách mikrotitrační destičky (článek IV) a vedle toho byly na modelovém systému provedeny i pilotní experimenty pro integraci MELISA metody do čipu (článek V).

Zásadním úkolem byla příprava magnetických částic funkcionalizovaných antigenem, syntetickým A β 1-42 peptidem. Vzhledem k tomu, že sérum je velmi komplexní biologický materiál, byl při přípravě nosičů kladen velký důraz na kontrolu nespecifické sorpce nežádoucích složek séra na povrch nosiče. Vzhledem k malé velikosti ligandu bylo nutné zajistit prostorovou dostupnost vazebného místa pro prokazované protilátky. Vhodným řešením se ukázalo vázat ligand přes tzv. ramínko tvořené bifunkční molekulou PEG. Experimentálně bylo potvrzeno, že raménko zvýšilo vazebnou kapacitu magnetického nosiče. Optimalizovaný protokol byl poté použit pro analýzu celé série vzorků pacientů s již prokázanou Alzheimerovou chorobou.

3.4 Komentovaný úvod k článku č. VI

Součástí této disertační práce byl i vývoj biokonjugátů na bázi AuNPs vhodných pro elektrochemické senzory. Pro přípravu biokonjugátů byly použity jak nemodifikované, tak i AuNPs povrchově modifikované karboxylovou skupinou. Povrchově nemodifikované AuNPs byly použity pro vazbu synteticky připravených DNA oligonukleotidů s reaktivní thiolovou skupinou. Kombinací vysoké specifity DNA oligonukleotidů a unikátních optických a fyzikálních vlastností AuNPs vzniká DNA sonda, kterou lze využít jako signál generující složku biosenzoru.

Pro vzájemnou konjugaci AuNPs s oligonukleotidy byla využita Au-S vazba vznikající mezi thiolovou skupinou oligonukleotidu a atomy zlata. Díky vysoké afinitě thiolové skupiny se zlatem vzniká velmi stabilní konjugát. Při funkcionalizaci AuNPs pomocí oligonukleotidů přes Au-S vazbu je klíčový fakt, že povrch nanočástic je záporně nabitý stejně tak, jako celá molekula DNA, což vede ke vzniku odpuzivých sil. Tomu lze zabránit procesem postupného zasolování roztoku během reakce pomocí chloridu sodného, který negativní náboj na povrchu AuNPs zastíní. Rozhodující je však nejen zvolený vazebný pufr, ale i jeho hodnota pH, čemuž je nutno během optimalizace věnovat pozor. Zabývali jsme se tedy optimalizací co možná nejvhodnějšího protokolu vedoucího k úspěšné přípravě AuNP-oligo DNA konjugátu. Výsledkem byly 4 různé protokoly, které byly následně porovnány z hlediska jejich účinnosti.

K přípravě biokonjugátů se také používají AuNPs, které mají již na svém povrchu zavedenou specifickou funkční skupinu. Funkční skupiny jsou na povrch AuNPs zaváděny např. pomocí PEG. Tento typ povrchové modifikace přináší navíc tu výhodu, že AuNPs získávají povrchový náboj, ve vodných roztocích nemají tendenci agregovat a vykazují koloidní stabilitu. Podle zavedené funkční skupiny se poté volí způsob vazby ligandu. Úkolem bylo navázat na povrch AuNPs specifické anti-*Listeria* protilátky, konkrétně molekuly IgG. Tyto specifické konjugáty protilátek s AuNPs byly následně testovány jako potenciální elektrochemicky aktivní značky pro průkaz bakterií *Listeria monocytogenes*. Experimentálně byla ověřena funkčnost tohoto konjugátu, kdy bylo stanoveno 10^4 CFU/ml. Elektrochemické experimenty potvrdily, že AuNPs v porovnání např. s kvantovými tečkami poskytují v tomto uspořádání nižší elektrochemické odezvy (řádově desítky jednotek μA) [232]. Výzvou v rámci dalšího výzkumu

bude zvýšit množství AuNPs navázaných na 1 molekulu IgG. Jedině tak bude možné dosáhnout požadované citlivosti měření.

4 PUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY

4.1 Článek I

Advanced immunocapture of milk-borne *Salmonella* by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed

Jana Srbova¹, **Pavla Krulišová¹**, Lucie Holubova¹, Iago Pereiro^{2,3,4}, Amel Bendali^{2,3,4}, Audrey Hamiot⁵, Veronika Podzemna⁶, Jan Macák⁶, Bruno Dupuy^{5,7}, Stephanie Descroix^{2,3,4}, Jean-Louis Viovy^{2,3,4}, Zuzana Bílková¹

- 1 Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 573, 53210 Pardubice, Czech Republic; Email:
- 2 Macromolecules and Microsystems in Biology and Medicine, Institute Curie, UMR 168, 26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France
- 3 Sorbonne Universités, UPMC Univ Pris 06, 75005, Paris, France
- 4 Institut Pierre-Gilles de Gennes, 75005, Paris, France
- 5 Laboratory of Pathogenesis of Bacterial Anaerobes, Dept. Microbiol., Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France
- 6 Center of Materials and Nanotechnologies, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Nam. Cs. Legii 565, 530 02 Pardubice, Czech Republic
- 7 University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Electrophoresis (2018) 39, 526-533.

IF (2020): 2, 754

Podíl autorky na uvedené práci: V rámci této publikace se autorka podílela na všech experimentech souvisejících s optimalizací IMS v čipu, které byly náplní její stáže na Institute Curie v Paříži. Modifikovala metodu pro přípravu vzorku pro analýzu pomocí elektronového mikroskopu a částečně se podílela i na sepsání manuskriptu. Procentuálně lze podíl na publikaci vyjádřit jako 50%.

Jana Srbova¹ 
 Pavla Krulisova¹
 Lucie Holubova¹
 Iago Pereiro^{2,3,4}
 Amel Bendali^{2,3,4}
 Audrey Hamiot⁵
 Veronika Podzemna⁶
 Jan Macak⁶
 Bruno Dupuy^{5,7}
 Stephanie Descroix^{2,3,4}
 Jean-Louis Viovy^{2,3,4}
 Zuzana Bilkova¹

¹Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic

²Macromolecules and Microsystems in Biology and Medicine, Institute Curie, Paris, France

³Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France

⁴Institut Pierre-Gilles de Gennes, Paris, France

⁵Laboratory of Pathogenesis of Bacterial Anaerobes, Department of Microbiology, Institut Pasteur, Paris, France

⁶Center of Materials and Nanotechnologies, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic

⁷University Paris Diderot, Paris, France

Received June 20, 2017

Revised August 25, 2017

Accepted August 25, 2017

1 Introduction

Immunomagnetic separation (IMS) is an effective tool for the selective isolation, purification, and preconcentration of the target analyte—peptides, proteins, or whole cells like bacteria [1–3]. This approach substantially increase the detection probability and thereby the sensitivity of detection or

Correspondence: Professor Zuzana Bilková, Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 573, 53210 Pardubice, Czech Republic

Fax: +420-466-037-068

E-mail: zuzana.bilkova@upce.cz

Abbreviations: **Ab**, antibodies; **CE**, capture efficiency; **hulgG**, human immunoglobulin G; **IMS**, immunomagnetic separation; **Promag-KPL**, Promag microspheres biofunctionalized with the polyclonal anti-Salmonella Ab from KPL; **μMSFB**, microfluidic magnetically stabilized fluidized bed

Research Article

Advanced immunocapture of milk-borne *Salmonella* by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed

The success of microfluidic immunocapture based on magnetic beads depends primarily on a sophisticated microscale separation system and on the quality of the magnetic immunosorbent. A microfluidic chip containing a magnetically stabilized fluidized bed (μMSFB), developed for the capture and on-chip amplification of bacteria, was recently described by Pereiro et al.. The present work shows the thorough development of anti-Salmonella magnetic immunosorbents with the optimal capture efficiency and selectivity. Based on the corresponding ISO standards, these parameters have to be high enough to capture even a few cells of bacteria in a proper aliquot of sample, e.g. milk. The selection of specific anti-Salmonella IgG molecules and the conditions for covalent bonding were the key steps in preparing an immunosorbent of the desired quality. The protocol for immunocapturing was first thoroughly optimized and studied in a batchwise arrangement, and then the carrier was integrated into the μMSFB chip. The combination of the unique design of the chip (guaranteeing the collision of cells with magnetic beads) with the advanced immunosorbent led to a *Salmonella* cell capture efficiency of up to 99%. These high values were achieved repeatedly even in samples of milk differing in fat content. The rate of nonspecific capture of *Escherichia coli* (i.e. the negative control) was only 2%.

Keywords:

Capture efficiency / Immunomagnetic separation / Microfluidic immunocapture / Microfluidic magnetically stabilized fluidized bed / Milk-borne bacteria

DOI 10.1002/elps.201700257

diagnostic assays [4]. This technique is especially useful for the isolation of cells due to its gentleness ensuring a high viability of captured cells [5]. IMS has also become a widely applied approach in the field of food microbiology, where the IMS of pathogens from various complex food matrices such as meat [6–8], eggs [9, 10], fruits [11, 12], or dairy products [10, 13, 14] has been reported.

IMS is not a detection method in itself. It is usually connected with end-detection methods such as plating, PCR/real-time PCR [8, 15], ELISA [16], lateral flow tests [13], and so on [11, 17, 18]. IMS is typically performed batchwise—tubes or flasks—but due to the magnetic properties of the immunosorbents it can also be automated and carried out in a microfluidic format. The detection methods compatible with microfluidics (such as PCR) enables the development of miniaturized, automated, and portable platforms integrating the preconcentration step (IMS) and the final detection of food pathogens. There is still a need for the development of such portable devices for the routine and rapid monitoring of food quality in

order to prevent massive foodborne pathogen outbreaks [19]. This effort is supported by the recent increase in published papers dealing with the rapid biosensor-based immunocapture and detection of foodborne pathogens [20–22].

Specific immunosorbents, i.e. superparamagnetic microspheres grafted with antibodies of the desired specificity, applied for the IMS of bacteria must meet at least the following requirements: excellent immunoreactivity with the target bacteria and minimal nonspecific adsorption of the abundant food matrices and accompanying nontarget bacteria. The advantage of using antibodies (Ab) immobilized on magnetic beads inside the microfluidic chips over Ab immobilized directly on the inner surface of the chips is the potentially higher specific surface area of beads and the possibility to wash them away for further analysis. When inserting the immunosorbent into the microfluidic chips, the following additional demands are placed: (i) high colloidal stability under various conditions; (ii) satisfactory magnetic response of the immunosorbent enabling rapid operation times; and (iii) minimal adhesion of the immunosorbent onto the inner walls of microfluidic devices. However, such immunosorbents that meet all the aforementioned criteria, especially those for the immunocapturing of foodborne bacteria, are not always commercially available. While there are numerous papers dealing with the development of different assays for the immunodetection of bacteria in food, there are not enough works describing the step-by-step development of an immunosorbent compatible with microfluidic systems.

The goal of this study was to develop an efficient magnetic immunosorbent with specificity for *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*), a representative of common foodborne pathogens. Attention was paid to the choice of superparamagnetic microspheres and the anti-Salmonella Ab. The capture efficiency (CE) of *S. typhimurium* achieved with our Promag-KPL immunosorbent was thoroughly evaluated in a batchwise arrangement in a model buffer. IMS for artificially spiked milk differing in fat content was then performed. Finally, the advanced immunosorbent was applied for microfluidic IMS of *S. typhimurium* from the whole milk in a novel microsystem—a microfluidic magnetic fluidized bed [23], further denoted as a μ MSFB chip. This work thus can be considered as a guideline for the preparation of the immunosorbent for the microfluidic isolation and preconcentration of any foodborne pathogen from complex liquid matrices, particularly milk.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and antibodies

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), the sodium salt of *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), and 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) was from Gibco, Life Technologies (Waltham, MA, USA). Other chemicals were of

analytical grade and obtained from Penta (Chrudim, Czech Republic). All buffers were prepared from ultrapure water filtered through a TKA Smart2Pure system (Thermo Scientific TKA, Niederelbert, Germany). Skimmed UHT (fat content 0.5%), semi-skimmed UHT (fat content 1.5%), whole ultra-heat treatment (UHT) milk (fat content 3.5%) as well as high-temperature pasteurized milk (fat content 1.5%) were bought from a common grocery store.

Primary Ab for immobilization: (i) Mouse monoclonal Ab: anti-LPS IgG2a monoclonal Ab Clone No M9011222 was acquired from MyBiosource (San Diego, CA, USA) and (ii) Polyclonal Ab: goat anti-Salmonella *sp.* was provided by KPL (Gaithersburg, MD, USA). Nonspecific IgG from human serum (huIgG) was purchased from Sigma–Aldrich.

2.2 Magnetic microspheres

Micromer[®]-M - PEG-COOH particles (2 μ m) were purchased from Micromod Partikeltechnologie GmbH (Rostock, Germany), ProMag[™] 1 Series COOH Surfactant Free (further denoted as Promag, 0.88 μ m) were from Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, IN, USA), SiMAG-Carboxyl particles (1 μ m) were from Chemicell (Berlin, Germany), and Dynabeads M-270 Carboxylic Acid (2.8 μ m), Dynabeads MyOne Carboxylic Acid (1 μ m), and Dynabeads[®] anti-Salmonella were from Dynabeads, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.3 Bacterial cultures

Salmonella enterica serovar *typhimurium* ATCC 43971 from the Institut Pasteur Collection (CIP), Paris, France and *Escherichia coli* ATCC 25922 from the Czech Collection of Microorganisms, Brno, the Czech Republic, were cultured at 37°C in LB broth (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) or LB agar, nutrient agar No. 2 (HiMedia, Mumbai, India), or Chromocult Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) accordingly. For IMS, an overnight culture (18–24 h) of *S. typhimurium* or *Escherichia coli* was resuspended in a physiological solution to an optical density of 0.5 of McFarland ($\sim 1\text{--}2 \times 10^8$ CFU/mL) and diluted in PBS containing 0.05% v/v Tween 20 (PBS-T) or in milk, respectively, up to the required concentration (10^1 CFU/mL).

2.4 Preparation of magnetic immunosorbent

One milligram of Promag microspheres was washed five times with 0.1 M MES (1 mL; pH 5) and activated with EDC (7.5 mg in 0.25 mL of 0.1 M MES pH 5) and sulfo-NHS (1.25 mg in 0.25 mL of the same buffer), and filled up to 1 mL with the same buffer, and then incubated (room temperature, rotation, 10 min). The microspheres were washed with 1 mL of 0.1 M MES pH 5, unless stated otherwise 25 μ g of the anti-Salmonella Ab (KPL or MyBiosource; see 2.1) was

added to the microspheres, the volume was filled up to 1 mL and immobilization continued overnight at 4°C with rotation. The immunosorbents were washed twice with 0.1 M MES pH 5, once with the same buffer containing 1M NaCl, and five times with 0.1 M MES pH 5.

To estimate the maximum binding efficiency of Ab on different microspheres (see 2.2), 100 µg of huIgG Ab was immobilized onto their surface (1 mg of each microspheres) using the same protocol as with the immobilization of the anti-Salmonella Ab. The binding efficiencies were determined indirectly using SDS-PAGE with densitometry. Immobilized IgG was determined from the difference in the densities of IgG in the initial solution and the total IgG in the supernatant after immobilization and washing. Binding efficiencies were expressed as the percentage of huIgG molecules immobilized onto surface of the beads versus the initial amount of huIgG used for immobilization (i.e., 100 µg).

2.5 Immunomagnetic separation and viable cell count

2.5.1 Batch immunomagnetic separation

Prior to using 0.5 mg (unless stated otherwise) of prepared anti-Salmonella microspheres (with KPL or MyBiosource Ab) or 20/100 µL of commercial Dynabeads® anti-Salmonella, beads were washed thrice with 1 mL of sterile PBS-T. The washed beads were gently mixed with 1 mL of PBS-T or milk spiked with *S. typhimurium* or the mixture of *S. typhimurium* + *E. coli*, and incubated (10 min, rotation). Then, the beads–bacteria complexes were magnetically separated (3 min) and washed twice with 1 mL of PBS-T, resuspended in 100 µL of the same buffer, and spread-plated on either nutrient agar No. 2 or on Chromocult Coliform Agar (Merck). All plates were incubated at 37°C for 18–24 h before bacteria enumeration.

2.5.2 Microfluidic immunomagnetic separation

The microfluidic IMS was performed in a µMSFB chip following the literature [23, 24], with the exception of the surface-capture support replaced with our Promag-KPL immunosorbent. Briefly, 50 µg of prepared Promag-KPL immunosorbent was washed with PBS containing 1% w/v BSA and twice with PBS-T, and introduced to the triangular-shaped chamber of the chip. Fifty microliters of whole UHT milk artificially spiked with *S. typhimurium* of the desired concentration were loaded into the inlet and passed through the fluidized Promag-KPL at a constant flow rate of 1 µL/min. The immunosorbent was then washed with 40 µL of PBS-T at a flow rate of 1.5 µL/min. Experimental observation was performed using a Nikon TI-E inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan). All unbound bacteria were collected in the tubing which was connected directly to the chip outlet and were spread

plated. This empty tubing was finally rinsed with 100 µL of PBS-T, and this washing fraction was also plated for bacteria enumeration. Beads–bacteria complexes were also flushed from the chip and spread plated. Unbound bacteria, washing fractions, and beads–bacteria complexes were plated either on LB agar or Chromocult Coliform Agar (after IMS from mixed cultures of *E. coli* and *S. typhimurium*) accordingly and incubated for 18–24 h at 37°C before enumeration.

2.5.3 Capture efficiency

CE was calculated as the average of the total number of cells captured with the immunosorbent relative to the total cell count used for immunomagnetic separation. All average numbers of CFUs and SDs were calculated in at least triplicate.

2.5.4 SEM

Beads–bacteria complexes were captured on polycarbonate isopore membrane filters with a pore size of 0.2 µm (Merck) and imaged by the SEM instrument JEOL JSM 7500F (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). For the best imaging performance, the SEM specimens were fixed with glutaraldehyde and dehydrated through a graded ethanol series. The usual protocol for the preparation of bacteria has already been described in [25]. To produce an electrically conductive surface for SEM, specimens were sputter-coated with gold thin film (~10 nm) using Leica EM ACE 200 sputter (Leica, Wetzlar, Germany).

3 Results and discussion

3.1 Selection of magnetic microspheres and specific antibodies

It was initially necessary to specify criteria for the selection of suitable magnetic particles for microfluidic systems. Attention was focused on microspheres in the size range between 1 and 3 µm, which is a suitable size for in vitro laboratory diagnostics [26] and at the same time suitable for microfluidics [27]. We preferred microspheres with terminal carboxyl functional groups which are suitable for covalent biofunctionalization using carbodiimide chemistry. Five different commercial microspheres from different suppliers (see 2.2) were chosen and compared. Since the Ab are usually the most expensive component of the prepared immunosorbent, binding capacity of the microspheres was first evaluated using the model huIgG. The highest binding efficiencies (82%) were repeatedly achieved with Promag microspheres. The binding efficiencies of huIgG on the surface of other beads (Dynabeads MyOne, Dynabeads M270, SiMAG-Carboxyl, and micromer-M-PEG-COOH) were significantly lower: 43, 55, 34, and 17%,

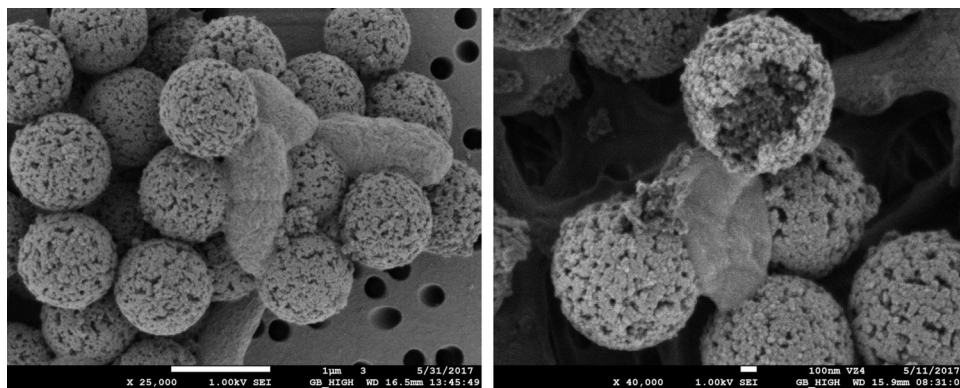


Figure 1. SEM images of Promag-KPL immunosorbent with captured *S. typhimurium*.

respectively. Then the behaviour of Promag particles in a microfluidic PDMS chip, i.e. their stability and very low aggregation or adsorption on the walls of channels, was examined and found to be excellent (data not shown). Therefore, these particles were chosen for biofunctionalization with the specific anti-Salmonella Ab.

The most important parameters which considered during the selection of the anti-Salmonella Ab were high immunoreactivity, purity, and integrity of the Ab. The monoclonal Ab used for IMS carries the risk that specificity of the Ab will be restricted to bacteria with the common antigenic epitopes, which might not be present, e.g. in old or stressed cultures [3]. Therefore, polyclonal Ab seems to be a better choice for the immunocapturing of bacteria. However, to the best of our knowledge, they are only commercially available as a pool of purified IgG fraction, and not as immunogen affinity-purified Ab. When such Ab are used for particle biofunctionalization, specific as well as nonspecific Ab will naturally appear on the surface of the bead, which can negatively affect their CE. All these aspects were considered, studied in detail, and earlier published by Kucerova et al. [28]. Based on these previous findings, monoclonal Ab from MyBiosource and polyclonal goat Ab from KPL were selected for immobilization on Promag microspheres.

3.2 Development of anti-Salmonella immunosorbent

Both monoclonal MyBiosource and polyclonal KPL Ab were immobilized on Promag microspheres by the strategy based on carbodiimide coupling, which enables direct but random Ab immobilization. The immobilization of Ab was followed by the batch IMS of *S. typhimurium*, using the procedure adapted from recommendations from Dynal Thermo Fisher Scientific (see 2.5). The method applied for the enumeration of captured cells, i.e. the evaluation of the quality of the immunosorbent, was the standard spread-plate and count method. Although this method was time consuming and the quantity of captured cells could be in theory underestimated since more than one bacterium could bind to one

bead, it was selected as a convenient and cheap method that provided reproducible results in our study. Moreover, as we confirmed by the SEM imaging of beads–bacteria complexes, the IMS usually leads to the situation where one bacterium is embedded with several beads, and thus immunosorbents (Fig. 1).

Monoclonal Ab from MyBiosource immobilized on Promag particles proved to be inappropriate for *S. typhimurium* immunocapturing at all; the capture rate never exceeded more than 3%. In contrast, the CE achieved after the aforementioned carbodiimide conjugation of KPL Ab (25–50–75–100 μg of Ab) on Promag microspheres (1 mg) was very high and did not fall below $89.5 \pm 3.3\%$ after IMS from 10^2 CFU/mL. It was also found that the lowest tested concentration of Ab (25 μg) used for the biofunctionalization of particles was sufficient and kept for all remaining experiments. This immunosorbent is denoted below as “Promag-KPL”.

3.3 Evaluation of Promag-KPL immunosorbent in batchwise arrangement

Microfluidic immunocapturing using Promag-KPL was preceded by thorough evaluation in a batchwise arrangement. Generally, when a dense suspension of bacteria ($>10^5$ CFU/mL) is mixed with the immunosorbent, high capture rate is expectable due to the high probability of collision between cells and Ab present on the particles. Nevertheless in our work, the high sensitivity (i.e. the ability of capture even units of cells) of the immunosorbent was one of the required properties, since the immunosorbent is going to be used for capturing of foodborne pathogens. Therefore, the effect of an increasing concentration of *S. typhimurium* applied for IMS using Promag-KPL on the CE was investigated (Figure 2). The following CE were achieved for specific concentrations of *S. typhimurium* (from 10^1 to 10^5 CFU per reaction volume, i.e. 1 mL): 69.2 ± 23.5 , 86.2 ± 12.6 , 63.2 ± 3.8 , 64.9 ± 4.5 , and $69.3 \pm 3.5\%$ (Figure 2). These results were in agreement with the literature [11], where it was also demonstrated that higher concentrations of bacteria are not a limiting factor significantly affecting CE. In parallel, Promag microspheres bearing huIgG (Promag-huIgG) were applied as a control

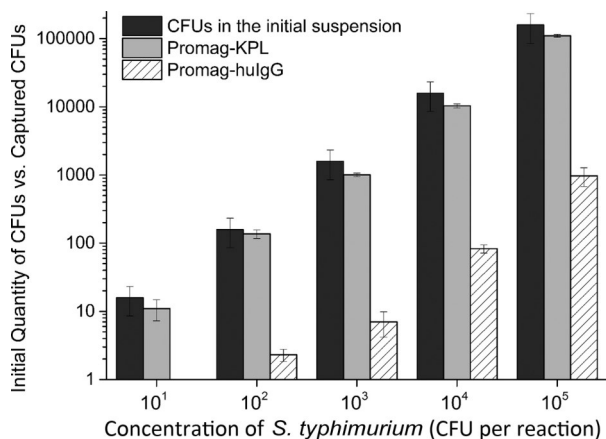


Figure 2. Effect of increasing concentration of *S. typhimurium* (CFU/mL) on number of specifically (using Promag-KPL) or non-specifically (using Promag-hulgG) captured cells (batchwise arrangement, buffer, reaction volume: 1 mL).

carrier for monitoring the specificity of the immunocapture. After the IMS from 10⁵ CFU/mL using such an immunosorbent, only 1.0 ± 0.3% CE was attained (see Fig. 2), which indicates high specificity during immunocapture.

To compare the CE achieved with our developed Promag-KPL immunosorbent in a batchwise arrangement with the commercial one, Dynabeads® anti-Salmonella, IMS in PBS-T buffer from 10³ CFU/mL was then performed. When 100 μL of Dynabeads suspension was used for IMS and the standard protocol suggested by Dynal was followed, a CE of 30.0 ± 9.5% was achieved, while when 20 μL of the same suspension of beads was applied, only 15.3 ± 3.8% captures were observed. These results were below our expectations, since the authors typically demonstrated much higher CE. Indeed, Zheng et al. [8] achieved 39.5 ± 1.88% CE after IMS from a pure culture with 20 μL of Dynabeads suspension and after 10 min of bead–bacteria incubation time. In addition, Brandao et al. [29] reported CEs from 92 to 100%, depending on the initial concentration of *S. typhimurium* used for IMS.

The selectivity of the developed Promag-KPL was also investigated by performing the same experiment in the presence of an excess of *E. coli* strain used as the competing bacteria (see Fig. 3). Since *E. coli* is taxonomically close to *S. typhimurium*, a certain immunoreactivity was expected with the polyclonal Ab used which, therefore, could slightly cross-react. With a 1:1 ratio, the nonspecific capture of *E. coli* using Promag-KPL was 5.1%, and with an increasing surplus of *E. coli* the CE decreased to 0.9% (see Fig. 3). The CE of *S. typhimurium* was affected when the ratios of the competing bacteria applied to the IMS was increased to 1:1000 and 1:10 000 (*Salmonella/E.coli*). These results confirmed the high sensitivity and selectivity of Promag-KPL.

Finally, after all these experiments, the CE of *S. typhimurium* was evaluated in real food samples such as milk differing in fat content (0.5–3.5%) and type of thermal treatment (UHT vs. pasteurized). Here, we demonstrated that complex milk, i.e. an emulsion of a colloid of butter fat

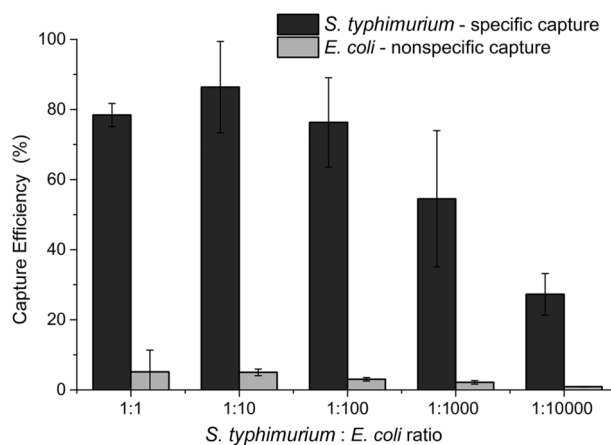


Figure 3. Effect of increasing concentration of competing bacteria (*E. coli*) on capture efficiency of *S. typhimurium* using Promag-KPL (batchwise arrangement, buffer, reaction volume: 1 mL).

globules and water with dissolved carbohydrates and proteins, does not affect the CE of *S. typhimurium*. Apparently, the abundant milk protein micelles and lipids did not cover the binding sites of Ab on Promag-KPL. No correlation was found between fat content of milk and the CE of *S. typhimurium*. Indeed, the following CEs were obtained (IMS from 10³ CFU/mL): 83.5 ± 4.1, 70.1 ± 2.8, 72.5 ± 1.0, and 91.3 ± 11.2% for skimmed UHT, semi-skimmed UHT, whole UHT, and high-temperature pasteurized milk, respectively. The fat present in milk can interfere with some detection techniques based on DNA analysis, such as real-time PCR [30,31], so IMS does not only serve as a tool for the preconcentration of target bacteria, but also avoid sample preparation such as delipidation.

3.4 Immunocapture of *S. typhimurium* in the μMSFB chip

The IMS of *S. typhimurium* from spiked milk was then performed in a microfluidic chip without any prior sample treatment. For this purpose a newly developed and recently published μMSFB chip was employed [23, 24] (Figure 4A). This chip was inspired by large fluidized-bed reactors and is based on the dynamic recirculation of magnetic microspheres which are in equilibrium due to opposing magnetic and drag forces, resulting in a high bed porosity and recirculation coupled to resistance to clogging. The μMSFB chip is made from PDMS and consists of one inlet, one outlet, and an internal 1-cm-long triangle-shaped chamber specifically dimensioned for bacteria capture and possible subsequent on-chip cultivation; the height of all the chip channels and the chamber is 50 μm. The permanent magnet is positioned externally. For details, see [23].

During the capture step, the Promag-KPL immunosorbent was homogeneously spread across the chamber (see Fig. 4B) and recirculated. Even if high concentrations of *S. typhimurium* (e.g. 10⁶ CFU/mL) were passed through the

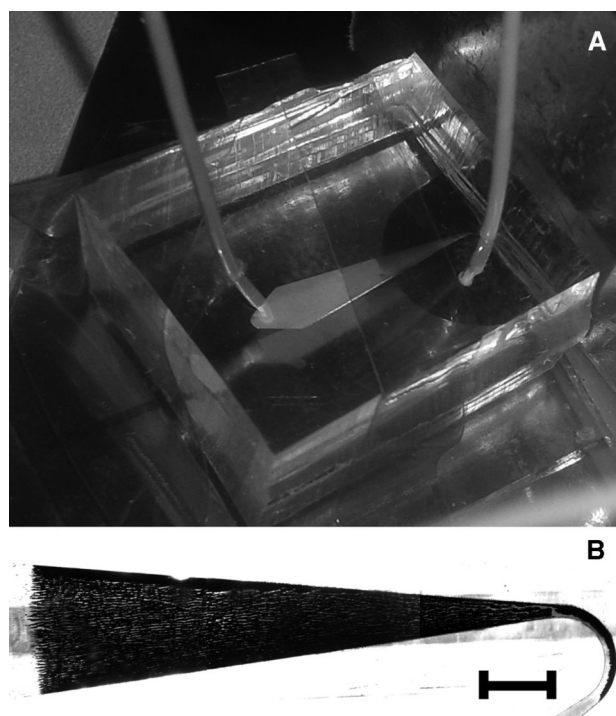


Figure 4. Images of μ MSFB chip (A) Macrophotography of chip with Promag-KPL (50 μ g). (B) Microphotography of the main chamber of the chip during *S. typhimurium* immunocapturing from whole milk using Promag-KPL (50 μ g). Scale bar 1 mm.

fluidized bed, the immunosorbent did not aggregate as a result of captured bacteria, as can happen in batch processes [3]. The presence of milk did not significantly affect behaviour of the particles; the globules of fat present in milk were visible under the microscope but did not cause any problems during bacteria capturing.

For this study, the spread-plate and count method, as with IMS in Eppendorf tubes, was applied to evaluate the CE in the μ MSFB chip. Nevertheless, in-line IMS with on-chip cultivation and quantification by bed expansion, which can be easily followed with a low-end camera, was recently demonstrated in this chip [23]. Other detection techniques integrated with the microfluidic immunocapture of bacteria were reported over the past few years, such as fluorescent dyes [32, 33] or quantum dots-based immunoassays [20, 21], light scattering [34], surface-plasmon resonance [35], or PCR-based techniques.

The CE of *S. typhimurium* using Promag-KPL immunosorbent in the μ MSFB chip was evaluated directly in whole UHT milk. As with batch IMS, the milk was spiked with an increasing concentration of *S. typhimurium* (from 10^1 to 10^5 CFU per reaction volume, i.e. 50 μ L, which corresponds to 2×10^2 – 2×10^6 CFU/mL), followed by IMS (see Fig. 5A). Excellent capture rates were achieved even in low-concentrated suspensions ($92.5 \pm 5.4\%$), and they did not fall under 90% (with the exception of the highest tested bacterial concentration). To evaluate the effect of the miniaturized reaction volume and distinguish it from the effect

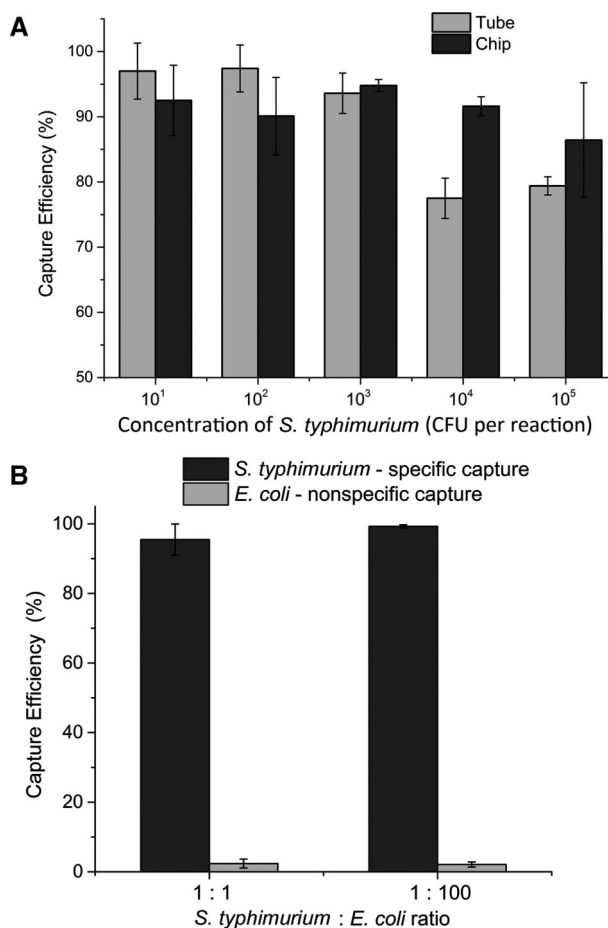


Figure 5. Capture efficiencies of *S. typhimurium* in milk using Promag-KPL in μ MSFB chip (reaction volume: 50 μ L). (A) The effect of increasing concentration of *S. typhimurium* on its CE in chip and tube. (B) The effect of presence of competing bacteria (*E. coli*) on capture efficiency of *S. typhimurium* in chip.

of microfluidics, a parallel batch experiment under exactly the same conditions (50 μ g of immunosorbent in 50 μ L of milk, capture time 50 min) was performed in Eppendorf tubes (Fig. 5A, column tube). It is evident from the results that the miniaturized format of the IMS (both in tubes and μ MSFB) significantly improved the achieved CE compared to our standard protocol in the batchwise arrangement (0.5 mg of immunosorbent in 1 mL of milk, capture time 10 min; Fig. 2). Microfluidic immunocapturing seems to work with higher efficiency for denser bacterial suspensions (10^4 and 10^5 CFU per reaction volume, corresponding to 2×10^5 and 2×10^6 CFU/mL), compared to IMS in tubes. Other advantages of microfluidic IMS making it preferable to batch are the possibility of automating the protocol, to accurately dose the required sample volumes, control the flow rate, and run the experiments under strictly reproducible conditions.

After that, an aliquot of milk was artificially spiked with a mixed culture of *S. typhimurium* and *E. coli* in two different ratios (1:1 and 1:100) to confirm the selectivity of the Promag-KPL immunosorbent in the μ MSFB chip (Figure 5B). Both

achieved CE exceeded our expectations; the surplus (100:1) of competing bacteria increased the CE of *S. typhimurium* to as high as $99.3 \pm 0.5\%$. The nonspecific capture of *E. coli* was negligible and only reached $2.1 \pm 0.8\%$.

These excellent capture rates achieved with Promag-KPL in the μ MSFB chip are even more notable after comparing them with Dynabeads® anti-Salmonella under exactly the same conditions, a CE of around $71 \pm 8\%$ was achieved in whole UHT milk with the commercial immunosorbents (for details see Fig. 2 in [23]).

4 Concluding remarks

This study deals with the development of an efficient magnetic immunosorbent for the microfluidic immunocapturing of milk-borne pathogen, *S. typhimurium*. The characteristics of the Promag-KPL immunosorbent were thoroughly investigated in a batchwise arrangement. After that, the immunocapture of *S. typhimurium* was performed in a μ MSFB chip. The Promag-KPL proved to be stable and highly specific towards *S. typhimurium* cells, while nonspecific capture proved to be insignificant. It was demonstrated that the miniaturized format of the assay increases the capture rate of *S. typhimurium*, and the immunosorbent showed an excellent compatibility with microfluidic device. It was confirmed that the quality immunosorbent is a fundamental condition for an efficient microfluidic immunocapturing. The higher CE is achieved with IMS and the lower LOD can be reached by the subsequent end-detection technique. With the presented microfluidic system, the naked-eye quantification of captured bacteria can be performed directly in the μ MSFB chip [23], but this same immunosorbent is compatible with other end-detection techniques that can be selected for optimal short assay time, low LOD, and compatibility with IMS module.

This work was supported by the European Union's projects LOVE-FOOD under contract no. 317742 and L-F2 MARKET under contract no. 687681. We thank Ministry of Youth, Education and Sports of the Czech Republic for financial support of this work through project LM2015082. We also thank the Collection de l'Institut Pasteur (CIP) to provide the Salmonella enterica serovar typhimurium.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, S. K., Hornes, E., Ugelstad, J., Uhlen, M., *Clin. Microbiol. Rev.* 1994, 7, 43–54.
- [2] Safarik, I., Safarikova, M., *Biomagn. Res. Technol.* 2004, 2, 7, 1–17.
- [3] Cudjoe, S. K., *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd edn. Elsevier, Oxford 2014.
- [4] Duodu, S., Mehmeti, I., Holst-Jensen, A., Loncarevic, S., *Food Anal. Methods.* 2009, 2, 23–29.
- [5] Safarik, I., Safarikova, M., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999, 722, 33–53.
- [6] Favrin, S. J., Jassim, S. A., Griffiths, M. W., *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 85, 63–71.
- [7] Hagren, V., Von Lode, P., Syrjälä, A., Korpimäki, T., Tuomola M., *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 125, 158–161.
- [8] Zheng, Q., Mik, M., Yang, Y., Xu, W., Yuk, H., *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 186, 6–13.
- [9] Mine, Y., *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3723–3727.
- [10] Rijpens, N., Herman, L., Vereecken, F., Jannes, G., De Smedt, J., *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 46, 37–44.
- [11] Najafi, R., Mukherjee, S., Hudson, J., Sharma, A., Banerjee, P., *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 189, 89–97.
- [12] Wang, Z., Cai, R., Yuan, Y., Niu, C., Hu, Z., Yue, T., *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 175, 30–35.
- [13] Fisher, M., Simon, I., Gordin, M., Mechaly, A., Yitzhaki, S., *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 48, 413–418.
- [14] Liébana, S., Lermo, A., Campoy, S., Pilar, M., Alegret, S., Isabel, M., *Biosens. Bioelectron.* 2009, 25, 510–513.
- [15] Metzger-Boddien, C., Khaschabi, D., Schönbauer, M., Boddien, S., Schleuderer, T., Kehle, J., *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 110, 201–208.
- [16] Wang, Z., Yue, T., Yuan, Y., Cai, R., Niu, C., Guo, C., *Int. J. Food Microbiol.* 2013, 166, 28–33.
- [17] Wang, Y., Alocilja, E. C., *J. Biol. Eng.* 2015, 9, 1–7.
- [18] Romero, M. R., D'Agostino, M., Arias, A. P., Robles, S., Casado, C. F., Iturbe, L. O., Lerma, O. G., Andreou, M., Cook, N., *J. Appl. Microbiol.* 2016, 120, 469–477.
- [19] Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., Van Der Giessen, J., Kruse, H., *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 139, 3–15.
- [20] Kim, G., Moon, J., Moh, C., Lim, J., *Biosens. Bioelectron.* 2015, 67, 243–247.
- [21] Wang, R., Ni, Y., Xu, Y., Jiang, Y., Dong, C., Chuan, N., *Anal. Chim. Acta* 2015, 853, 710–717.
- [22] Zhang, C., Wang, H., Xing, D., *Biomed. Microdevices* 2011, 13, 885–897.
- [23] Pereira, I., Bendali, A., Tabnaoui, S., Alexandre, L., Srbova, J., Bilkova, Z., Deegan, S., Joshi, L., Viovy J., *Chem. Sci.* 2017, 8, 1329–1336.
- [24] Pereira, I., Tabnaoui, S., Fermigier, M., du Roure, O., Descroix, S., Viovy J., Malaquin, L., *Lab Chip* 2017, 17, 1603–1615.
- [25] Kuo J., *Electron Microscopy: Methods and Protocols*, 2nd edn., Humana Press, New Jersey 2008.
- [26] Basinska, T., *Macromol. Biosci.* 2005, 5, 1145–1168.
- [27] Fan, Z. H., Mangru, S., Granzow, R., Heaney, P., Ho, W., Dong, Q., Kumar, R., *Anal. Chem.* 1999, 71, 4851–4859.

- [28] Kucerova, J., Holubova, L., Jankovicova, B., Dvorakova, V., Motkova, P., Bilkova, Z., *Sci. Pap. Univ. Pardubice* 2013, 19, 57–66.
- [29] Brandão, D., Liébana, S., Campoy, S., Cortés, P., Alegret, S., Pividori, M. I., *J. Phys. Conf. Ser.* 2013, 421, 1–7.
- [30] Le Dréan, G., Mounier, J., Vasseur, V., Arzur, D., Habrylo, O., Barbier, G., *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 138, 100–107.
- [31] Riyaz-UI-Hassan, S., Verma, V., Qazi, G. N., *Lett. Appl. Microbiol.* 2013, 56, 275–282.
- [32] Mai, J., Abhyankar, V. V., Piccini, M. E., Olano, J. P., Willson, R., Hatch A. V., *Biosens. Bioelectron.* 2014, 54, 435–441.
- [33] Verbarq, J., Plath, W. D., Shriver-Lake, L. C., Howell, P. B., Jr., Erickson, J. S., Golden, J. P., Ligler, F. S., *Anal. Chem.* 2016, 85, 4944–4950.
- [34] Fronczek, C. F., You, D. J., Yoon, J., *Biosens. Bioelectron.* 2013, 40, 342–349.
- [35] Tokel, O., Yildiz, U. H., Inci, F., Durmus, N. G., Ekiz, O. O., Turker, B., Cetin, C., Rao, S., Sridhar, K., Natarajan N., Shafiee, H., Dana, A., Demirci, U., *Sci. Rep.* 2015, 5, 1–9.

4.2 Článek II

Micro-nano-bio acoustic system for the detection of foodborne pathogens in real samples

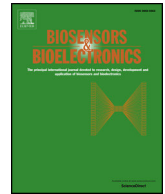
George Papadakis^{1,*}, **Pavla Murasová**³, Audrey Hamiot⁴, Katerina Tsougeni⁵, Gogo Kaprou^{2,5}, Michael Eck⁶, David Rabus⁷, Zuzana Bílková³, Bruno Dupuy⁴, Gerhard Jobst⁶, Angeliki Tserepi⁵, Evangelos Gogolides⁵, Electra Gizeli^{1,2,**}

- 1 Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH, 100 N. Plastira Str, Heraklion, 70013, Greece
- 2 Department of Biology, Univ. of Crete, Voutes, Heraklion, 70013, Greece
- 3 University of Pardubice, 573 Studentska, Pardubice 532 10, Czech Republic
- 4 Institut Pasteur, 25-28 Rue du Docteur Roux, Paris Cedex 15, 75724 France
- 5 Institute of Nanoscience and Nanotechnology, NCSR-Demokritos, Patriarhou Gregoriou Str., Aghia Paraskevi 15310, Greece
- 6 Jobst Technologies GmbH, Engesserstraße 4b, 79108, Freiburg, Germany
- 7 SENSEOR SAS, 18Temis Innovation, rue Alain Savary 25000 Besançon, France

Biosensors and Bioelectronics (2018) 111, 52-58.

IF (2020): 9, 518

Podíl autorky na uvedené práci: V rámci této publikace autorka optimalizovala postupy pro přípravu nosiče a IMS. V rámci stáže na Institute Pasteur v Paříži se podílela na experimentech pro optimalizaci pomnožení a imunomagnetickou separaci bakteriálních buněk ze vzorku mléka o objemu 25 ml. A v rámci stáže v laboratoři Institute of Molecular Biology and Biotechnology – FORTH, Heraklion, Kréta, se podílela na spojení optimalizovaných postupů pro pomnožení a IMS bakterií ze vzorku s LOC platformou. Také se podílela na psaní odpovídajících kapitol publikace. Procentuálně lze podíl na publikaci vyjádřit jako 30%.



Micro-nano-bio acoustic system for the detection of foodborne pathogens in real samples

George Papadakis^{a,*}, Pavla Murasova^c, Audrey Hamiot^d, Katerina Tsougeni^e, Georgia Kaprou^{b,e}, Michael Eck^f, David Rabus^g, Zuzana Bilkova^c, Bruno Dupuy^d, Gerhard Jobst^f, Angeliki Tserepi^e, Evangelos Gogolides^e, Electra Gizeli^{a,b,**}

^a Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH, 100 N. Plastira Str., Heraklion 70013, Greece

^b Department of Biology, Univ. of Crete, Voutes, Heraklion 70013, Greece

^c University of Pardubice, 573 Studentska, Pardubice 532 10, Czech Republic

^d Institut Pasteur, 25-28 Rue du Docteur Roux, Paris Cedex 15 75724, France

^e Institute of Nanoscience and Nanotechnology, NCSR-Demokritos, Patriarhou Gregoriou & 27 Neapoleos Str., Aghia Paraskevi, Attiki 15341, Greece

^f Jobst Technologies GmbH, Engesserstraße 4b, 79108 Freiburg, Germany

^g SENSeOR SAS, Temis Innovation, 18 rue Alain Savary, 25000 Besançon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Lab-on-a-chip
Molecular diagnostics
Acoustic biosensor
Salmonella detection

ABSTRACT

The fast and efficient detection of foodborne pathogens is a societal priority, given the large number of food-poisoning outbreaks, and a scientific and technological challenge, given the need to detect as little as 1 viable cell in 25 gr of food. Here, we present the first approach that achieves the above goal, thanks to the use of a micro/nano-technology and the detection capability of acoustic wave sensors. Starting from 1 *Salmonella* cell in 25 ml of milk, we employ immuno-magnetic beads to capture cells after only 3 h of pre-enrichment and subsequently demonstrate efficient DNA amplification using the Loop Mediated Isothermal Amplification method (LAMP) and acoustic detection in an integrated platform, within an additional ½ h. The demonstrated 4 h sample-to-analysis time comes as a huge improvement to the current need of few days to obtain the same result. In addition, the work presents the first reported Lab-on-Chip platform that comprises an acoustic device as the sensing element, exhibiting impressive analytical features, namely, an acoustic limit of detection of 2 cells/μl or 3 aM of the DNA target and ability to detect in a label-free manner dsDNA amplicons in impure samples. The use of food samples together with the incorporation of the necessary pre-enrichment step and ability for multiple analysis with an internal control, make the proposed methodology highly relevant to real-world applications. Moreover, the work suggests that acoustic wave devices can be used as an attractive alternative to electrochemical sensors in integrated platforms for applications in food safety and the point-of-care diagnostics.

1. Introduction

The application of micro-nano/technologies in the life sciences has brought a paradigmatic change in the area of molecular diagnostics and the analysis of genetic biomarkers, especially when combined with a Lab-on-Chip (LOC) platform for target analyte detection. (Jain, 2003; Rosi and Mirkin, 2005) Ultra-sensitive, label-free, fast and integrated systems employing a biosensor as the detection platform have been developed for the analysis of a variety of nucleic acid analytes, including cancer biomarkers such as circulating tumor DNA (Das et al., 2016), pathogens, such as *Salmonella* (Cinti et al., 2017), *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Ahmed et al., 2013; Safavieh et al., 2014),

and infectious diseases, such as influenza virus (Ferguson et al., 2011), *Mycobacterium tuberculosis* and *Klebsiella pneumonia* (Luo et al., 2014). One of the critical challenges in the development of point-of-care (POC) integrated systems is the sample preparation which is normally required prior to amplification and detection. With the exception of few works (Das et al., 2015; Ferguson et al., 2011; Patterson et al., 2013a), the majority of the reported LOC systems employ synthetic or bench-top purified genetic material spiked in the working solution, thus, avoiding steps such as cell lysis and nucleic acid extraction. In addition, the vast majority of the LOC reported applications employ electrochemical sensors for analyte detection, normally combined with the hybridization of the amplified target to a surface-bound probe (Hsieh et al., 2015;

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH, 100 N. Plastira Str., Heraklion 70013, Greece.

E-mail addresses: gpapadak@imbb.forth.gr (G. Papadakis), gizeli@imbb.forth.gr (E. Gizeli).

Labib et al., 2016; Patterson et al., 2013b; Sage et al., 2014).

Food safety is one of the current societal priorities given the very large number of food-poisoning outbreaks and incidences that occur annually worldwide. Today, culture colony counting is the standard method used for food-pathogen detection. While the big asset of the microbiological method is its high sensitivity and low cost, the main disadvantage is that it suffers from laborious and time consuming protocols, requiring several days (2–5) per pathogen. Alternative molecular diagnostics methods such as PCR and immune-tests have also been developed. These methods take 13–16 h for analysis, are also laborious and require trained personnel for operation. The development of new methodologies advancing the state of the art in foodborne pathogen detection is a challenge for scientists and technologists for two reasons. The first is related to the high complexity of food samples (Mortari and Lorenzelli, 2014), i.e., a matrix containing high concentrations of nutrients and cells (for example, milk contains 3.5% fat, 3.5% proteins, 5% carbohydrates and 10^4 – 10^5 cells/ml), as opposed to urine or serum. The second concerns the legislation worldwide which requires the “absence of bacteria” in food quantities as large as 25 gr (Cinti et al., 2017). The latter requirement imposes the necessity for a pre-enrichment step for the microbial growth of viable cells. Moreover, for the development of integrated platforms, the 25 gr (or ml) of sample is a huge amount for miniaturized microfluidic channels, having typical volumes of 10–200 μ l. For these reasons, although integrated platforms have been used extensively for applications related to human diseases, they have not been applied to food analysis yet, at least for real life applications starting from 25 gr (ml) of the food sample. Indeed, the pre-enrichment step included in some works, combined with PCR and micro-sensor based DNA detection, was performed in a modular rather than integrated way (Khemthongcharoen et al., 2015).

In this work, we present for the first time a micro-nano-bio acoustic system that overcomes the existing barriers for the application of microsystems and integrated platforms to food quality control and provides the means for ultra-fast, sensitive and cost-effective analysis, always within the existing legislation framework. The system takes advantage of magnetic immunobeads for capturing bacteria from milk and a LOC platform for the isothermal amplification of target-DNA in a microfluidic chamber followed by detection with a surface acoustic wave (SAW) sensor. Acoustic sensors are an attractive alternative to electrochemical devices, since they also offer label-free detection, have a planar geometry which can be easily integrated with microfluidics, and can be produced in extremely competitive prices since they are used as components in mobile phones (Bo et al., 2015). In addition, it has been shown that acoustic wave devices are sensitive to the conformation (Mateos-Gil et al., 2016; Papadakis et al., 2010, 2012; Tsortos et al., 2008, 2016) and way of attachment (Miloni et al., 2017; Wiseman and Frank, 2012) of surface-bound molecules; this novel concept allows the design of highly specific genetic assays for DNA-amplicons of a pre-defined geometry (Papadakis et al., 2013) and/or a distinct way of binding (flat versus floating) (Miloni et al., 2017). Here, acoustic detection is combined with the Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method in a LOC and shown to be able to successfully detect as little as 1 *Salmonella* cell in 25 ml of milk within only 4 h of total analysis time. An overview of the complete procedure is depicted in Fig. 1.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The sodium salt of N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), Tween 20, were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Polyclonal antibodies: goat anti-

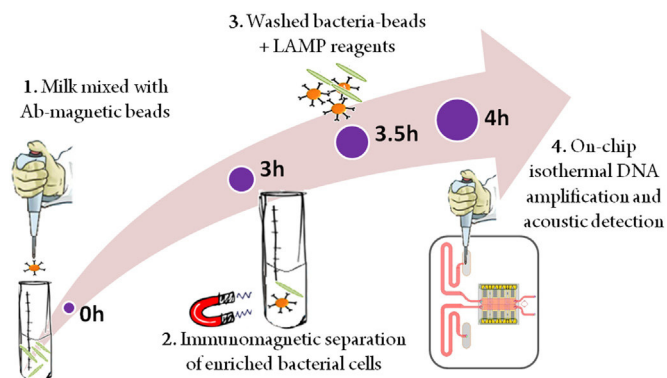


Fig. 1. The complete procedure for the detection of food pathogens comprises the following steps: (1) 25 ml of milk are mixed with 1 mg of magnetic particles functionalized with antibodies and incubated at 37 °C for 3 h; (2) and (3) Enriched bacterial cells are captured by an external magnet, washed with buffer and resuspended in 25 μ l of a solution containing Triton-X 100 for lysis and the LAMP ingredients; and, (4) The 25 μ l is injected in the LOC where isothermal DNA amplification is performed at \sim 65 °C for 30 min followed by rapid acoustic detection (\sim 60 s) using a SAW sensor. Results can be presented as a “Yes” or “No”, or as a real-time graph.

Salmonella sp. Ab were from KPL (Gaithersburg, MD, USA). ProMag™ 1 Series COOH surfactant free magnetic beads (0.8, 1.0 and 3.0 μ m) were from Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, IN, USA). All others chemicals were reagent grade and obtained from Penta (Chrudim, the Czech Republic). Water used for preparation of buffers was filtered through a TKA Smart2Pure system (Thermo Scientific TKA, Niederelbert, Germany). Whole UHT milk (fat content 3.5%) were bought in a common grocery. PLL(25)-g-PEG(2) was purchased from Nanocs Inc (New York, USA).

2.2. Growth cell protocol and numeration

All experiments have been performed with an attenuated strain of *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium. *Salmonella* was grown overnight in Luria-Bertani (LB) medium; cultures were subsequently measured spectrophotometrically (OD_{600}) and adjusted at OD_{600} :1 corresponding to a cell concentration of 1 – 1.5×10^9 CFU/ml. Serial dilution of the above cells suspension by LB was carried out to reach a concentration of 100 CFU/ml; the latter was used to spike 25 ml of milk with 1–25 CFUs. The spiked milk was incubated under agitation at 37 °C and the growth was followed every hour by plating $2 \times 100 \mu$ l of the culture on LB agar plate from 3 to 10 h. Plates were incubated overnight before numeration. Three independent cultures were numerated for each time growth.

2.3. Preparation of magnetic immunosorbent

Magnetic immunosorbent was prepared as described previously (Srbova et al., 2018). Briefly, goat anti-*Salmonella* sp. antibodies KPL were immobilized on the magnetic particles following a 2 step carbodiimide reaction; 1 mg of particles was washed with 0.1 M MES pH 5 and then pre-activated with EDC (7.5 mg in 0.25 ml of 0.1 M MES pH 5) in combination with sulfo-NHS (1.25 mg in 0.25 ml 0.1 M MES pH 5) in a total volume of 1 ml. After 10 min of incubation the magnetic carriers were washed with 1 ml of 0.1 M MES pH 5 and then incubated with 25 μ g of the anti-*Salmonella* Ab overnight and at 4 °C. Functionalized particles were washed with 0.1 M MES pH 5 (x2), 0.1 M MES pH 5 with 1 M NaCl (x2) and 0.1 M MES pH 5 (x5). The capturing efficiency of *S. Typhimurium* was characterized and found to be satisfactory even in the presence of an excess of *E. coli* bacteria (Srbova et al., 2018).

2.4. Immunomagnetic separation of salmonella in milk

1 mg of immunosorbent was mixed with 25 ml of whole UHT milk spiked with 1–25 CFU of *Salmonella*. After incubation for 2.5, 3.0 and 3.5 h at 37 °C under shaking, the particle-bacteria complexes were placed on a magnetic separator for 20 min, followed by washing with 1 ml of PBS buffer containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) (x2). For verifying the capture efficiency, magnetically separated particles were resuspended in 100 μ l of the same buffer and plated on nutrient agar. After cultivation for 18–24 h at 37 °C, bacteria enumeration took place.

2.5. Fabrication of SAW array

A SAW array (16 \times 16 mm) comprising a 4-acoustic channel design was fabricated on a ST quartz (YXI/36°) and subsequently fully characterized as described before (Papadakis et al., 2017a); briefly, each sensor included patterned 150 nm thick aluminium electrodes followed by a split-finger geometry resulting in a 8 μ m electrode period and a 32 μ m acoustic wave length, i.e., an operating frequency of 155 MHz. A waveguiding layer was formed by spin coating a S1813 photoresist (Shipley, U.S.) guiding layer over the entire array. A follow up photolithographic step was included for opening the electrical pad access after exposure to UV light. Typical insertion losses of the fabricated devices in air were in the 25 dB range.

2.6. Fabrication of the microfluidic card and docking station

The microfluidic cards were created from 75 μ m thick polyolefin foils structured by a CNC cutter and heat-laminated to a 6-layer stack in the micro-fluidics rapid-layer-manufacture service of Jobst Technologies GmbH, Germany. Delta-shaped ultra-narrow low loss seals to the SAW chip of < 100 μ m seal width were created from MED-6215 silicone of NuSil Technology LLC, USA and directly attached to the cards using a precision milled PMMA mold. The docking station was created by precision CNC machining of polycarbonate parts and PCBs, reactive molding of seals from MED-6215, components soldering for contact to SAW chip and heaters, and final assembly. The docking station also houses a 5 \times 5.5 cm² printed circuit board (0.8 mm thick) where two resistive microheaters were fabricated to provide (through Joule heating) the temperature necessary for DNA amplification (Moschou et al., 2014). The microheaters were patterned in the inner (18 μ m thick) copper layer of the PCB (Kaprou et al., 2016). The copper tracks, 200 μ m wide, were designed meandering-like to provide an electrical resistance of approximately 40 Ω . In order to maximize the temperature uniformity across the heating zone, an external copper layer (18 μ m thick) of the PCB was used, and during LOC operation was brought into thermal contact with the microfluidic card containing the microchambers for LAMP-based DNA amplification. The designed microheaters were industrially realized at PCB manufacturers, and to provide the desired temperature during operation, they are connected to a temperature controller unit.

2.7. LAMP amplification protocol

Bacterial cells resuspended in PBS buffer were lysed for 10 min with 0.01% Triton-X 100. The *Salmonella* invasion gene *invA* was targeted by a set of six primers (Chen et al., 2011), two outer (F3 and B3), two inner (FIP and BIP) and two loop (Loop-F and Loop-B). F3: CGGCCGATTT TCTCTGG, B3: CGGCAATAGCGTCA-CCTT, FIP: GCGCGGCATCCGCAT CAATATGCCCGGTTAAACAGATG-AGT, BIP: GCGAACGGCGAAGCGTAC TGTCGCACCGTCAA-AGGAAC, Loop-F: GGCCTTCAAATC-GGCATC AAT, Loop-B: GAAAGGGAAAGCCAGCTTACG. The LAMP reagent mix in a total volume of 25 μ l contained 12.5 μ l WarmStart 2 \times Master Mix (New England BioLabs), 1.8 μ M FIP and BIP, 0.1 μ M F3 and B3, 0.4 μ M Loop-F and Loop-B, and 1ul lysed cells in PBS. The minimum required time for successful DNA amplification from \sim 50 cells was 20 min at

63 °C. LAMP products were analyzed using electrophoresis on a 2% agarose gel containing GelRed™ (Biotium) and visualized under UV light.

2.8. Acoustic detection protocol

Surface functionalization was performed by injecting 90 μ l of PLL-g-PEG (0.1 mg/ml) in 10 mM Tris pH 7.5 followed by buffer rinsing. The LAMP reactions were subsequently injected and rinsed with buffer. All steps were performed at a flow rate of 20 μ l/min. The surface of the sensor could be cleaned several times by rubbing gently with a cotton stick. Real time amplitude and phase changes were monitored using an Agilent Network Analyzer or the electronic measuring system (SAW reader) developed by SENSEOR (Rabus et al., 2013).

3. Results and discussion

3.1. Optimizing pre-enrichment and cell capture with magnetic-beads

Our initial aim was to assess the minimum time needed for pre-enrichment in order to comply with the need to grow and detect even one viable cell if present in the sample but, also, have in the end enough bacteria for subsequent LOC amplification and detection. We challenged the traditional foodborne pathogen bacteria pre-enrichment method which includes, first, growth in a non-selective medium followed by a selective enrichment step in order to enhance the number of target cells versus competitor microorganisms. Starting from 1 to 25 cells in 25 ml of milk, we performed different pre-enrichment times varying from 3 to 10 h at 37 °C without adding any growth medium (selective or non-selective). Around three hours is the minimum time required for cell growth given that cells normally go through an initial lag phase of 2 h before they start growing. From the growth kinetics, (Fig. 2/a) it was observed that around 500 CFUs were reached after 3 h of culturing and approximately twice as many within 4.5 h. In a

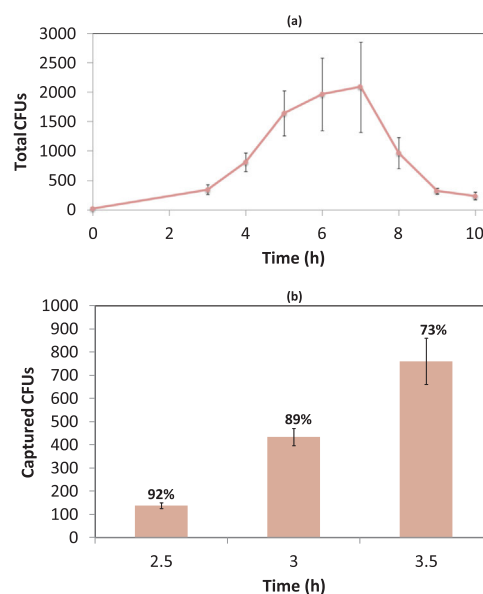


Fig. 2. (a) *Salmonella* growth curves obtained directly in 25 ml of milk after incubation at 37 °C for up to 10 h; note that after 6 h of incubation *Salmonella* cells stop growing and are lysed. (b) Plating results showing the absolute number of *Salmonella* bacteria extracted with the magnetic immunobeads as a function of the culture time starting from \sim 1 cell in 25 ml of milk; the capturing efficiency corresponds to $N_c / N_0 \times 100$, where N_c is an average total number of cells captured with the immunosorbent (CFU/ml) and N_0 is an average total number of cells counted after plating of the original cell suspension (growing without beads) (CFU/ml). In all cases, immunobeads were added at the beginning of the enrichment step.

following step, magnetic beads functionalized with polyclonal anti-*Salmonella* Typhimurium antibodies were added in milk cultures spiked with *Salmonella* cells. In search of the optimum conditions for bacteria cells capturing, the following parameters were taken into account: size of nano-particles (0.8, 1.0 and 3.0 μm), amount of particles (1.0, 0.5 and 0.2 mg) added in 25 ml of milk, time at which beads were added in the sample (at the beginning or end of the culture period) and cross-reactivity with other cells. Immuno-ProMAG beads (0.88 μm ; 1 mg) were selected due to their uniform size, good colloidal stability in food matrices and excellent specificity, even in the presence of an excess of *E. coli* cells (Srbova et al., 2017). Moreover, it was repeatedly confirmed that bacteria cells were able to grow and divide even when they were captured on the surface of the beads. For this reason, samples containing immunobeads from the start of incubation were cultured for 2.5, 3.0 and 3.5 h and then put into contact with a magnet for 20 min. Re-suspended beads were plated and colonies enumeration showed an average of 85% capturing efficiency for all growth times tested (Fig. 2/b).

3.2. LAMP amplification inside cell lysates and acoustic detection

Based on the previous observations, it was estimated that for a minimum pre-enrichment step of 3 h, approximately 400 bacterial cells would be captured for further injection in the LOC system. The ability of the LAMP method to specifically and rapidly amplify the *Salmonella* invasion gene target (*invA*) from whole cell lysates was investigated. Given the fact that thermal lysis was not possible due to the instability of Bst polymerase at elevated temperatures, Triton X-100, a nonionic detergent commonly used during DNA extraction, was employed for chemical lysis. After performing several tests, it was concluded that a final concentration of 0.004% Triton X-100 within the LAMP cocktail was sufficient to lyse up to 10^5 cells within 10 min (SI, Fig. S1). Moreover, acoustic experiments verified that this concentration of the detergent did not affect the surface or signal of the biosensor during the measurement. Cells could also be lysed separately outside the LAMP cocktail with 0.1% – 1% Triton X-100 within 5 min but, in this case, acoustic measurements could not be performed due to the high concentration of the detergent. Following cell lysis within the LAMP cocktail, amplification was performed and found to be efficient and capable of amplifying DNA within 15 min directly from 10 CFUs and without prior DNA extraction (SI, Fig. S2).

The capability of the LAMP for rapid amplification in crude samples was subsequently combined with the detection capability of a 155 MHz acoustic wave device based on a Love wave configuration (Rasmusson and Gizeli, 2001); the latter is a waveguide geometry which, in this case, comprised a thin (1.2 μm) photoresist (S1813) layer deposited on the surface of a shear horizontal SAW device. The sensor surface was pre-functionalized with a PLL-g-PEG copolymer which can be physically adsorbed onto bare gold as well as other polymeric materials (such as photoresist) at physiological pH (Papadakis et al., 2017b). This copolymer has also been shown to allow the selective immobilization and simultaneous acoustic detection of DNA molecules in the presence of other proteins or cell debris as is the case with bacteria-cell lysates. We performed acoustic measurements with LAMP amplicons produced off-chip and after chemical lysis of 10^5 *Salmonella* cells in 25 μl of the LAMP cocktail. Acoustic changes monitored through a network analyzer showed that amplified DNA could be successfully detected directly from the complex mixture, without pre- or post-amplification purification steps. It was also observed that changes in the acoustic wave energy, here recorded as amplitude (Fig. 3/a), were more sensitive than phase measurements (Fig. 3/b) and could be used to differentiate positive from negative samples. This difference results from the fact that dsDNA amplicons, found to adsorb loosely and with a flat configuration on the PLL-g-PEG surface (Fig. 3/c), are more dissipative than the non-specific components present in the solution (Papadakis et al., 2017b). Indeed, while the latter also bind to the surface as indicated by the high mass-

sensitive phase signal, these molecules adsorb directly on the polymer surface and in a quite tight manner (Fig. 3/d), resulting in a distinguishable lower energy dissipation signal.

In order to verify that the acoustic detection is possible even after a short (3 h) pre-culturing step, we performed the whole process of bacterial growth and capturing, DNA amplification and acoustic detection and managed to detect 5 starting CFUs in 25 ml of milk within 4 h in total. When we tested various numbers of cells in the range of 150–1000 CFUs (according to plate enumeration), we found that the change in the amplitude for the positive samples was 0.361 ± 0.029 dB while for the negative samples 0.207 ± 0.039 dB. It is apparent, that implementing a very short pre-enrichment step is feasible due to the high capturing efficiency of magnetic beads in combination with the efficiency of the LAMP method with whole cell lysates and the impressive performance of the acoustic DNA detection platform in complex samples.

3.3. Efficiency of amplification and acoustic detection in the docking station

For the development of a rapid detection assay of foodborne pathogens, the DNA amplification and detection steps were integrated into a LOC system for automatic operation. The ability of a SAW device to operate when the surface is in contact with a 4-channel microfluidic chip has been demonstrated in the past (Mitsakakis et al., 2008; Mitsakakis and Gizeli, 2011). In this work, a disposable plastic microfluidic card (Fig. 4/a) was fabricated where two DNA amplification processes could take place inside two micro-chambers; the same card could also lead the liquid from each amplification chamber over the surface of the 4 SAW sensors array (S1-S4). The good quality of the acoustic signal, a prerequisite for the development of a reliable and reproducible LOC system, was ensured after extensive optimization of the geometry of the plastic card/SAW contact area and type of material used for the gasket (Papadakis et al., 2017a). A docking station for the micro-fluidic cards with integrated resistive microheaters (Fig. 4/b) was created by precision CNC machining. In order to avoid the possibility of contamination of the LOC, the fluidic inlets were introduced on the disposable card so that liquid was loaded directly using a pipette tip. Finally, a portable unit comprising the SAW sensor reader and control units for driving the fluidics (micro-pump) and temperature controller (micro-heaters) was developed (Rabus et al., 2013) together with a Graphical User Interface (GUI).

The efficiency of LAMP amplification inside the microfluidic chambers was first tested by using cards made of three different materials, i.e., polycarbonate (PC), poly(methyl) methacrylate (PMMA) and polypropylene (PP), and compared to the LAMP efficiency obtained inside a standard microcentrifuge tube in the thermocycler. In all three materials, the amplification was successful and the efficiency was approximately $87 \pm 7\%$ of the respective one inside the tube. The difference of $13 \pm 7\%$ is probably due to the bigger surface-to-volume ratio of the meander-like microchambers, the lack of uniform heating since the resistive microheaters were located only below the chip and a small degree of evaporation that was evident.

Furthermore, the acoustic response of the biosensor when in contact with the microfluidic card inside the docking station was evaluated with respect to the acoustic detection of LAMP amplicons produced without pre- or post-purification on the PLL-g-PEG functionalized surface. Through the GUI of the system, it was possible to monitor in real-time the injection of the completed amplification reaction over the 4 sensors in a sequential manner. The injection was performed with 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ flow rate that corresponds to a 60 s end-point detection step (Fig. 4c). In this way, four measurements could be recorded for each sample which significantly minimized the risk of false results or failed measurements. For all the experiments, amplitude change was preferentially monitored as the most sensitive signal for DNA detection. In addition, for comparison, the amplitude signal changes of positive samples under examination were normalized based on the respective

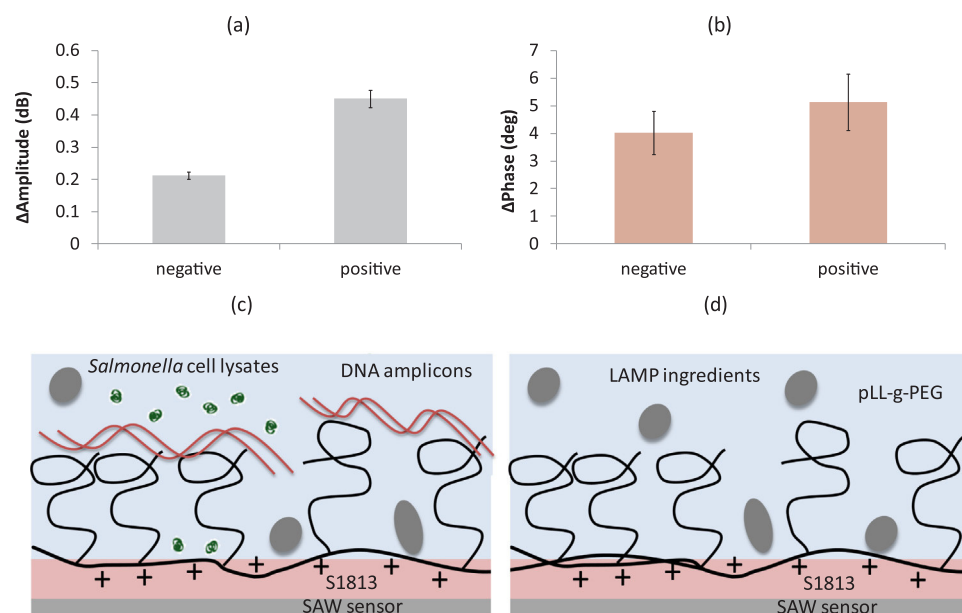


Fig. 3. (a) and (b): Amplitude and phase acoustic signals obtained during the detection of dsDNA amplicons produced during LAMP of 10^5 *Salmonella* cells (positive) and samples containing no cells (negative) using an acoustic waveguide device functionalized with PLL(25)-g-PEG(2); (c) schematic representation of the device surface upon addition of a positive sample that contains ds DNA amplicons, cell lysates and LAMP ingredients; and, (d) as before but for a negative sample, i.e., only the LAMP ingredients.

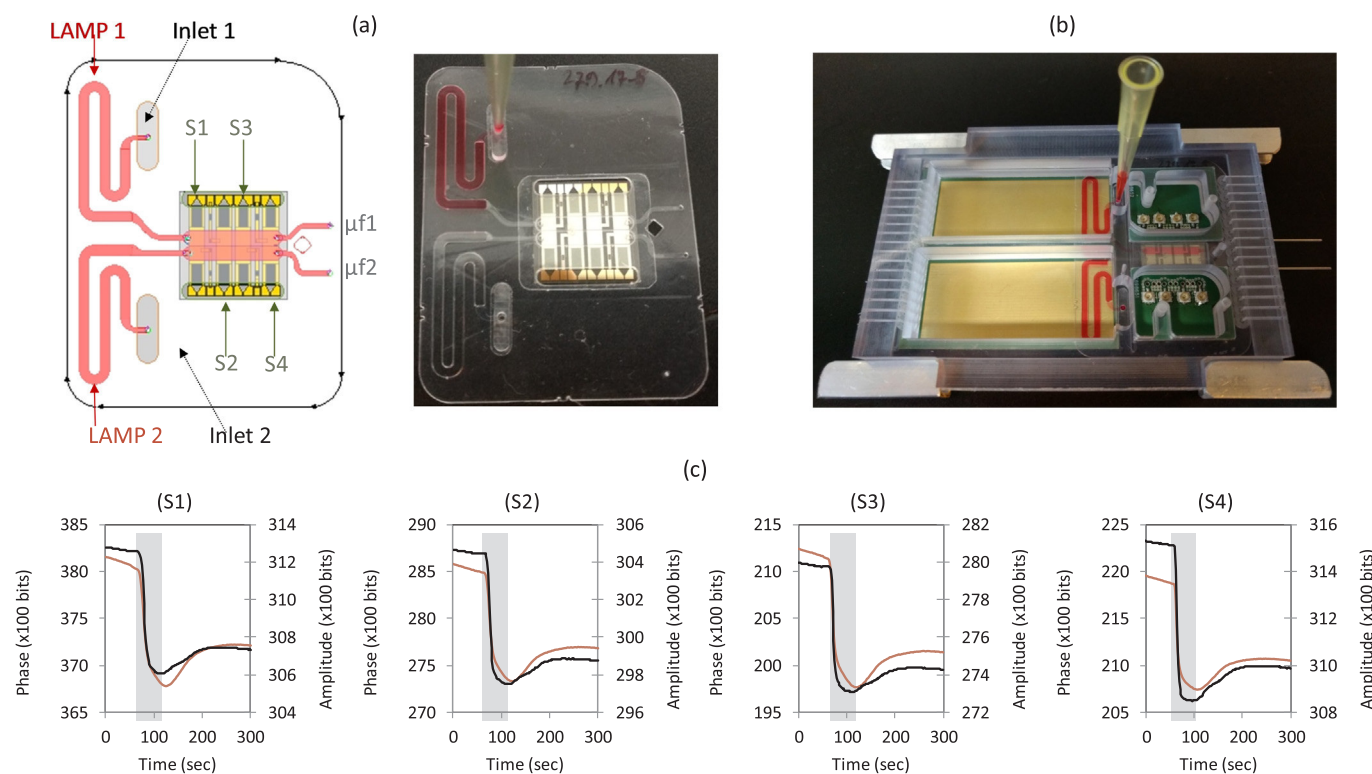


Fig. 4. (a) Left: Schematic drawing of the disposable plastic card with two isothermal DNA amplification micro-chambers; each LAMP comprises a 55.5 mm long x 1.5 mm wide and 0.3 mm high microfluidic chamber of 25 μ l with one inlet for sample injection and an extended path at the other end that flows over the 4-sensors of the acoustic biochip (μ f1 for LAMP 1 and μ f2 for LAMP 2). The second LAMP compartment can be used for testing either a second sample or as a control (LAMP reagents). Right: Photograph of the plastic card on top of the SAW biochip; (b) Photograph of the docking station comprising one acoustic biochip and the plastic card with the 2 amplification chambers. The plastic card lies above a PCB, where a microheater is fabricated for on-chip heating. The empty (yellow) space on the left can be used to house another biochip with 2 extra LAMP chambers for the eventual detection of 4 samples per docking station, or three samples and one control. (c) Real-time binding curves of LAMP reactions flowing sequentially over the 4 sensors (S1 to S4) of the acoustic device through μ f1 (see Fig. 4/a). The red and black lines correspond to changes in phase and amplitude, respectively. Both phase and amplitude are measured in bits (arbitrary units). The shadowed part corresponds to the time interval during sample flow over the surface, in between buffer flow.

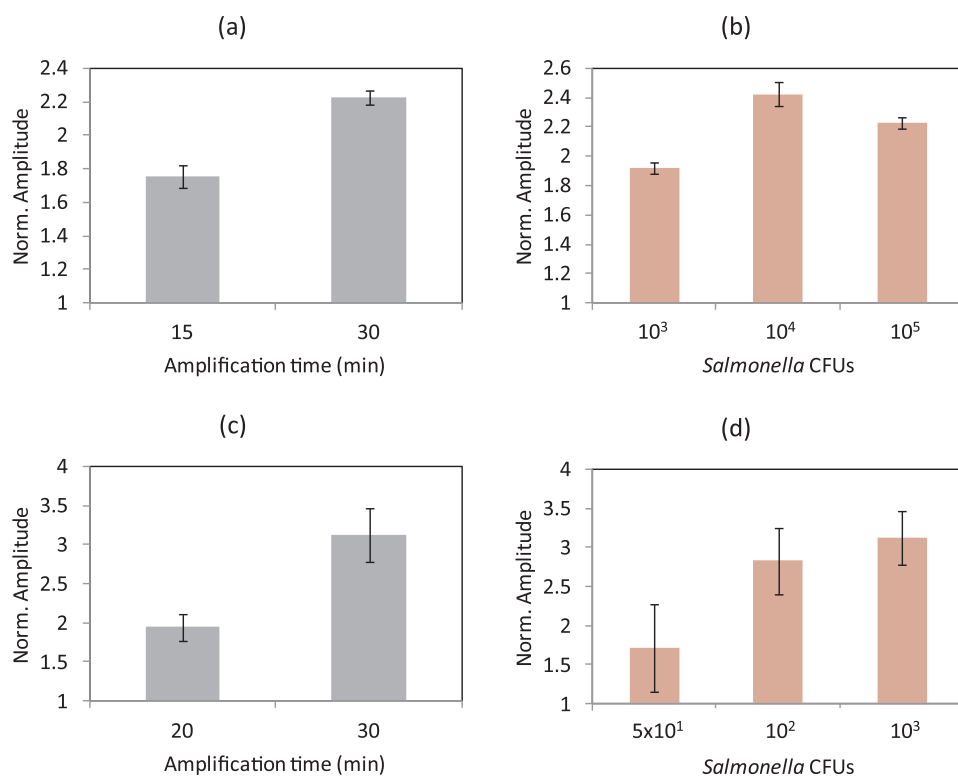


Fig. 5. Charts of acoustic response with LAMP reactions performed in 25 μ l and for: (a) 15 and 30 min containing 10^5 cells, (b) 30 min with 10^3 , 10^4 and 10^5 cells. (c) 20 and 30 min with 10^3 cells, (d) 30 min with 50 , 10^2 and 10^3 cells. Measurements in the top charts were performed with Bst2.0(ws) polymerase while in the bottom charts with a Bst2.0(ws) LAMP kit.

changes of negative samples; i.e., without bacteria in the amplification mixture. The normalized signals shown in Fig. 5, thus, indicate the ratio of positive amplitude value (dB)/average negative reference value (dB).

For the evaluation of the acoustic response, LAMP reactions performed in a thermocycler for 15 or 30 min with Bst2.0 warm start (ws) polymerase were compared. A high number of *Salmonella* cells (10^5) was initially spiked in the 25 μ l of the reaction. The normalized amplitude change showed that in 30 min the response was higher than in 15 min (Fig. 5/a). By keeping a constant 30 min amplification time we also measured decreasing starting numbers of bacteria in the reaction down to 10^3 CFUs (Fig. 5/b). For 10^4 and 10^5 CFUs the signal was very close, indicating a saturation of the surface by the produced amplicons. For 10^3 CFUs there was a decrease but still significantly higher (at least double) from the baseline (Fig. 5/b). To investigate further the limit of detection of the acoustic sensor in the LOC by using the new portable SAW reader, we performed a time comparison assay with 10^3 CFUs, this time using the Bst2.0(ws) kit. Since 10 additional minutes of amplification (20 vs 30 min) resulted in significantly higher acoustic signal (Fig. 5/c), we subsequently incubated reactions for 30 min containing 50, 10^2 and 10^3 CFUs (Fig. 5/d). Acoustic data showed a decrease in the signal with decreasing number of cells and 50 cells were considered as the limit of detection. Between 10^2 and 10^3 CFUs there was no

significant difference indicating, again, that LAMP amplicons reached saturation after 30 min of incubation.

3.4. Integrated amplification and acoustic detection in the LOC

After completing the evaluation of the acoustic response inside the LOC but with off-chip amplification reactions, the integrated LAMP amplification and acoustic detection was performed to estimate the total detection efficiency of the system. For this purpose, 10^3 *Salmonella* whole cells were mixed with the lysis/LAMP cocktail, as described previously.

The mixture was loaded in the system and the procedure was completed within 30 min, including amplification and acoustic detection. The normalized acoustic signal of 19 measurements is depicted in Fig. 6. Based on the presented data, positive reactions in the LOC gave a signal that on average was 2.1 ± 0.6 times above the control baseline. The previously measured signal when LAMP was performed outside the LOC was 3.1 ± 0.3 times higher. This difference, as well as the greater variation (± 0.6) in the measurements observed within the LOC can be attributed to the reduced amplification efficiency in the microfluidic chips described previously.

However, even with this lower amplification efficiency, the signal is still twice the one observed with the negative samples and can be used to detect reliably the presence of even 50–100 cells in 30 min according to the results presented in Fig. 5/d.

4. Conclusions

The current work demonstrates the first reported LOC platform that employs an acoustic wave device as the detection module. While the combined procedures of amplification and acoustic detection have been demonstrated in applications using PCR or other isothermal DNA amplification methods along with the SAW (Kordas et al., 2016) or QCM (Grammostianou et al., 2017; Ittarat et al., 2013; Jearanaikoon et al., 2016; Karamollaoglu et al., 2009; Prakrankamanant et al., 2013) devices, never before has the integration of the two been achieved in a

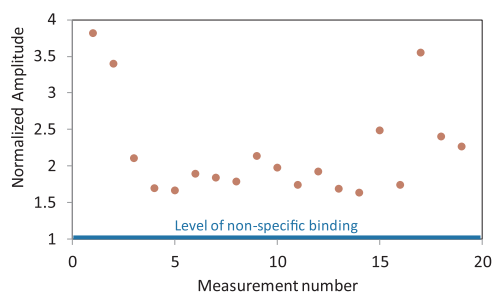


Fig. 6. Normalized amplitude changes for the detection of 10^3 whole *Salmonella* cells with the LOC system. Each red point represents one of the 19 acoustic measurements.

microfluidic channel and inside a LOC system. Obstacles, regarding the efficient operation of the acoustic chip when clamped inside a LOC as well as the ability/sensitivity of the acoustic signal when in contact with a complex medium, have been the reason for the lack of incorporation of acoustic devices in such platforms. While the solution to the first obstacle requires optimization of the design and material of the fluidics card (Papadakis et al., 2017a), the latter is more complex and cannot be addressed through the traditional use of acoustic devices as a mass-sensor. The novel biophysical approach applied here that exploits the hydrodynamic nature of acoustic detection (Milioni et al., 2017; Tsortos et al., 2015) is apparently a more powerful detection mode for molecular diagnostic. Moreover, the ability to discriminate the sample signature from “noise”, allows the direct detection of dsDNA amplicons avoiding the cumbersome steps of denaturation and subsequent hybridization. Through acoustic energy measurement we have achieved an impressive limit of detection of DNA derived from 50 cells in 25 μ l of the reaction sample, i.e. a LOD of 2 cells/ μ l or \sim 3 aM of DNA target; this was achieved in a crude sample and without the use of any purification step.

Moreover, we demonstrated a micro-nano-bio-acoustic methodology which enables the detection of *Salmonella* cells in milk. The successful combination of a 3 h pre-enrichment step in the presence of immunobeads of high capturing efficiency together with the integrated DNA-amplification and acoustic detection results in a sample-to-answer time of only 4 h. This performance breaks not only the barrier of same-day results but also achieves analysis time within the same working shift. Using our methodology and integrated platform, we have achieved the detection of 1 cell in 25 ml of milk. While electrochemical systems have been used in the past for *Salmonella* analysis (Campuzano et al., 2017; Cinti et al., 2017; Ferguson et al., 2009; Hsieh et al., 2012; Li et al., 2012; Lubin et al., 2006; Patterson et al., 2013b; Yan et al., 2016) to the best of our knowledge this is the first time that a methodology employing a LOC platform is demonstrated with real food samples and by also including the necessary pre-enrichment step. The combination of the advantages of on-chip DNA amplification with the detection power of surface acoustic wave sensors paves the way to the creation of a new generation of products for rapid and label-free DNA analysis, not only for food safety but also for point-of-care diagnostics.

Acknowledgments

This work was supported by the European Union's Horizon 2020-ICT 20–2015 research and innovation program under grant agreements No. 687681 (LoveFood2Market).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.056>.

References

Ahmed, M.U., Nahar, S., Safavieh, M., Zourob, M., 2013. *Analyst* 138, 907–915.
 Bo, L., Xiao, C., Hualin, C., Mohammad, M.A., Xiangguang, T., Luqi, T., Yi, Y., Tianling, R., 2015. *J. Semicond.* 37 (2) (021001-021001 – 021001-021009).
 Campuzano, S., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J.M., 2017. *Chemosensors* 5, 8.
 Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J.C., Stein, R.E., Ge, B., 2011. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4008–4016.

Cinti, S., Volpe, G., Piermarini, S., Delibato, E., Palleschi, G., 2017. *Sensors* 17, 1910.
 Das, J., Ivanov, I., Montermini, L., Rak, J., Sargent, E.H., Kelley, S.O., 2015. *Nat. Chem.* 7, 569–575.
 Das, J., Ivanov, I., Sargent, E.H., Kelley, S.O., 2016. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 11009–11016.
 Ferguson, B.S., Buchsbaum, S.F., Wu, T.-T., Hsieh, K., Sun, R., Soh, H.T., 2011. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 9129–9135.
 Ferguson, B.S., Swensen, J.S., Hsieh, K., Lu, X., Soh, H.T., 2009. *Anal. Chem.* 81, 6503–6508.
 Grammostianou, A., Papadakis, G., Gizeli, E., 2017. *IEEE Sens. Lett.* 1 (5).
 Hsieh, K., Ferguson, B.S., Eisenstein, M., Plaxco, K.W., Soh, H.T., 2015. *Acc. Chem. Res.* 48, 911–920.
 Hsieh, K.P., A.S., Ferguson, B.S., Plaxco, K.W., Soh, H.T., 2012. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 4896–4900.
 Ittarat, W., Chomean, S., Sanchomphu, C., Wangmaung, N., Promptmas, C., Ngrenngarmert, W., 2013. *Clin. Chim. Acta* 419, 47–51.
 Jain, K.K., 2003. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3 (2), 153–161.
 Jearanaikoon, P., Prankrankamanant, P., Leelayuwat, C., Wanram, S., Limpaboon, T., Promptmas, C., 2016. *J. Virol. Methods* 229, 8–11.
 Kaprou, G.D., Papadakis, G., Papageorgiou, D., Kokkoris, G., Papadopoulos, V., Kefala, I., Gizeli, E., Tserepi, A., 2016. *Microsyst. Technol.* 22, 1529–1534.
 Karamollaoglu, I., Oktem, H.A., Mutlu, M., 2009. *Biochem. Eng. J.* 44, 142–150.
 Khemthongcharoen, N., Wonglumsom, W., Suppat, A., Jaruwongrungrongsee, K., Tuantranont, A., Promptmas, C., 2015. *Biosens. Bioelectron.* 63, 347–353.
 Kordas, A., Papadakis, G., Milioni, D., Champ, J., Descroix, S., Gizeli, E., 2016. *Sens. Biosensing Res.* 11, 121–127.
 Labib, M., Sargent, E.H., Kelley, S.O., 2016. *Chem. Rev.* 116, 9001–9090.
 Li, Q., Cheng, W., Zhang, D., Yu, T., Yin, Y., Ju, H., Ding, S., 2012. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 844–856.
 Lubin, A.A., Lai, R.Y., Baker, B.R., Heeger, A.J., Plaxco, K.W., 2006. *Anal. Chem.* 78, 60, 84–91.
 Mateos-Gil, P., Tsortos, A., Velez, M., Gizeli, E., 2016. *Chem. Commun.* 52, 6541–6544.
 Milioni, D., Tsortos, A., Velez, M., Gizeli, E., 2017. *Anal. Chem.* 89 (7), 4198–4203.
 Mitsakakis, K., Gizeli, E., 2011. *Biosens. Bioelectron.* 26 (11), 4579–4584.
 Mitsakakis, K., Tserepi, A., Gizeli, E., 2008. *J. Micro. Syst.* 17, 1010–1019.
 Mortari, A., Lorenzelli, L., 2014. *Biosens. Bioelectron.* 60, 8–21.
 Moschou, D., Vourdas, N., Kokkoris, G., Papadakis, G., Parthenios, J., Chantzandroulis, S., Tserepi, A., 2014. *Sens. Actuator B-Chem.* 199, 470–478.
 Papadakis, G., Friedt, J.M., Eck, M., Rabus, D., Jobst, G., Gizeli, E., 2017a. *Biomed. Micro.* 19, 16.
 Papadakis, G., Palladino, P., Chronaki, D., Tsortos, A., Gizeli, E., 2017b. *Chem. Commun.* 53, 8058–8061.
 Papadakis, G., Tsortos, A., Bender, F., Ferapontova, E.E., Gizeli, E., 2012. *Anal. Chem.* 84, 1854–1861.
 Papadakis, G., Tsortos, A., Gizeli, E., 2010. *Nano Lett.* 10, 5093–5097.
 Papadakis, G., Tsortos, A., Kordas, A., Timiakou, I., Morou, E., Vontas, J., Kardassis, D., Gizeli, E., 2013. *Sci. Rep.* 3, 2033.
 Patterson, A.S., Heithoff, D.M., Ferguson, B.S., Soh, H.T., Mahan, M.J., Plaxco, K.W., 2013a. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2302–2311.
 Patterson, A.S.H., K., Soh, H.T., Plaxco, K.W., 2013b. *Trends Biotechnol.* 31, 704–712.
 Prankrankamanant, P., Leelayuwat, C., Promptmas, C., Limpaboon, T., Wanram, S., Prasongdee, P., Pientong, C., Daduang, J., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 40, 252–257.
 Rabus, D., Friedt, J.M., Ballandras, S., Martin, G., Carry, E., Blondeau-Patissier, V., 2013. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 60 (6), 1219–1226.
 Rasmuson, A., Gizeli, E., 2001. *J. Appl. Phys.* 90, 5911–5914.
 Rosi, N.L., Mirkin, C.A., 2005. *Chem. Rev.* 105, 1547–1562.
 Safavieh, M., Ahmed, M.U., Ng, A., Zourob, M., 2014. *Biosens. Bioelectron.* 58, 101–106.
 Sage, A.W., Besant, J.D., Lam, B., Sargent, E.H., Kelley, S.O., 2014. *Acc. Chem. Res.* 47, 2417–2425.
 Srbova, J., Krulisova, P., Holubova, L., Pereiro, I., Bendali, A., Hamiot, A., Podzemna, V., Macak, J., Dupuy, B., Descroix, S., Viovy, J.-L., Bilkova, Z., 2017. *Electrophoresis* 38, 1–8.
 Srbova, J., Krulisova, P., Holubova, L., Pereiro, I., Bendali, A., Hamiot, A., Podzemna, V., Macak, J., Dupuy, B., Descroix, S., Viovy, J.L., Bilkova, Z., 2018. *Electrophoresis* 39, 526–533.
 Tsortos, A., Grammostianou, A., Lymbouridou, R., Papadakis, G., Gizeli, E., 2015. *Chem. Commun.* 51, 11504–11507.
 Tsortos, A., Papadakis, G., Gizeli, E., 2016. *Anal. Chem.* 88, 6472–6478.
 Tsortos, A., Papadakis, G., Mitsakakis, K., Melzak, K., Gizeli, E., 2008. *Biophys. J.* 94 (7), 2706–2715.
 Wiseman, M.E., Frank, C.W., 2012. *Langmuir* 28, 1765–1774.
 Yan, Y., Ding, S., Zhao, D., Yuan, R., Zhang, Y., Cheng, W., 2016. *Sci. Rep.* 6, 18810.

4.3 Článek III

Direct culture-free electrochemical detection of *Salmonella* cells in milk based on quantum dots-modified nanostructured dendrons

Pavla Murasová¹, Aneta Kovářová¹, Jitka Kašparová¹, Iveta Brožková¹, Audrey Hamiot⁴, Jana Pekarkova^{2,3}, Bruno Dupuy^{4,5}, Jana Drbohlavova², Zuzana Bílková¹, Lucie Korecká¹

- 1 Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 573, 53210 Pardubice, Czech Republic
- 2 Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Purkynova 123, 61200 Brno, Czech Republic
- 3 Department of Microelectronics, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technicka 10, 61600 Brno, Czech Republic
- 4 dUniv. Lille, CNRS, INRA, ENSCL, UMR 8207 - UMET - Unité Matériaux et Transformations, F-59000 Lille, France
- 5 Laboratory Pathogenesis of Bacterial Anaerobes, Institut Pasteur, Université de Paris, France

Journal of Electroanalytical Chemistry (2020) 863

IF: 3, 807

Podíl autorky na uvedené práci: Podíl autorky jak na experimentech, tak i na sepsání publikace je většinový. Autorka připravovala magnetický nosič, podílela se na přípravě konjugátu, prováděla veškeré separace, přihlížela pak elektrochemickému měření a sepsala manuskript. Procentuálně lze podíl na publikaci vyjádřit jako 90%.



Direct culture-free electrochemical detection of *Salmonella* cells in milk based on quantum dots-modified nanostructured dendrons

Pavla Murasova^a, Aneta Kovarova^a, Jitka Kasparova^a, Iveta Brozkova^a, Audrey Hamiot^d, Jana Pekarkova^{b,c}, Bruno Dupuy^e, Jana Drbohlavova^b, Zuzana Bilkova^a, Lucie Korecka^{a,*}

^a Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 573, 53210 Pardubice, Czech Republic

^b Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Purkynova 123, 61200 Brno, Czech Republic

^c Department of Microelectronics, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technicka 10, 61600 Brno, Czech Republic

^d Univ. Lille, CNRS, INRA, ENSCL, UMR 8207 - UMET - Unite Matériaux et Transformations, F-59000 Lille, France

^e Laboratory Pathogenesis of Bacterial Anaerobes, Institut Pasteur, Université de Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2019

Received in revised form 2 March 2020

Accepted 7 March 2020

Available online 09 March 2020

Keywords:

Salmonella spp.

Electrochemical immunosensor

Nanostructured dendrons

Quantum dots

Stripping voltammetry

Foodborne pathogen

ABSTRACT

With regard to global food safety and preventing the spread of diseases caused by foodborne pathogens or their toxins, there is an increasing need for simple and rapid methods for the screening of such pathogens. We aimed to develop a fast and efficient biosensor for the screening of milk samples contaminated by *Salmonella* spp. and provide a quick and cost-effective method as an alternative to the time-consuming conventional cultivation- or PCR-based approaches. We exploited a simple but highly specific technique whereby bacterial cells were separated immunomagnetically, with subsequent reaction with conjugate; i.e. specific IgG molecule labelled with an electrochemically potent indicator. The unique structure of this indicator exploits the benefits of hyperbranched dendron molecules and heavy metal-derived quantum dots (QDs). Square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV) using of screen-printed carbon electrodes with in situ formed Bi(III) film (BiSPCE) was used for the detection and quantification of metal ions released from the QDs (CdTe) after their acidic dissolution. The metal ion signals proportionally correlate with the amount of captured bacteria cells. By this method, the presence of *Salmonella* spp. was proven in 2.5 h even in minimal number of bacterial cells (4 CFU) in 1 mL of the sample.

1. Introduction

Foodborne illnesses caused by pathogens and their toxins pose a serious threat to human health. Many pathogens have been identified to cause of these diseases, but in most cases, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* are responsible for foodborne diseases [1]. There is no doubt about the importance of conventional methods used in pathogens detection. However, nowadays, in a world full of modern and automatic analyzers, novel time-saving, easy, cost-effective, and eventually, multiplex methods for pathogen detection are urgently required [2,3]. The methods established for the detection of pathogenic bacteria are traditional culture and colony counting. These are often combined with both polymerase chain reaction (PCR) and immunology assay to obtain more robust results [4–6]. Although these methods are considered as the golden standard for pathogen detection, they are associated with the limitations such as the complexity of the analysis and the requirement of long time periods, i.e., up to several days, from the sample collection to final confirmation [7]. Thus, development of a rapid method allowing the

detection and identification of pathogens, while maintaining a high specificity and sensitivity is now of great importance in the health.

Electrochemical biosensors, which are portable and low-cost, offer the possibility of simple and rapid detection of bacteria without the time-consuming pre-cultivation and isolation phase [8,9]. Table 1 summarizes some selected examples of the use of electrochemical biosensors for rapid detection of bacterial cells.

Moreover, modern electroanalytical techniques using screen-printed electrodes can allow analysis using only one drop of the sample, while maintaining high sensitivity and multiplicity [18]. Although biosensors offer many benefits for pathogens detection, there is still scope for improving their sensitivity, compared to that in traditional methods. With regard to food safety, the development of advanced biosensor is complicated due to complexity of food samples. Milk matrix (which this work focuses on) contains high concentration of nutrients and cells, which can negatively influence the detection of pathogens. Moreover, it is necessary to ensure compliance with the legislation mandated by the international organization for standardization (ISO). In fact, ISO standard for *Salmonella* spp. in milk and milk products (ISO 6785:2001) correspond to a total absence of bacteria in standard sample volume i.e. 25 mL.

In this work we developed an electrochemical immunosensor for the detection of pathogens in milk, particularly *Salmonella typhimurium*

* Corresponding author.

E-mail address: lucie.korecka@upce.cz. (L. Korecka).

Table 1

Different detection modes of electrochemical biosensors for foodborne pathogen detection.

Detected bacteria	Detection method	Limit of detection (CFU/mL)	Reference
<i>E. coli</i> O157:H7	Impedimetry	2×10^3	[10]
<i>Salmonella</i> spp.		1×10^3	
<i>E. coli</i>	Potentiometry	10	[11]
<i>Salmonella</i> spp.	Amperometry	10	[12]
<i>E. coli</i> O157:H7	Conductometry	7.9×10^1	[13]
<i>Salmonella</i> spp.			
<i>Salmonella</i> spp.	Amperometry	21	[14]
<i>E. coli</i> O157:H7	Amperometry	81	[15]
<i>E. coli</i>	Amperometry	50	[3]
<i>L. monocytogenes</i>		10	
<i>S. typhimurium</i>	Impedimetry	4.8×10^5	[16]
<i>E. coli</i>	Impedimetry	$10^1 - 10^7$	[17]

(*Salmonella*). Knowing that we need to detect even a few bacterial cells in a large volume of sample, we exploited the combination of electrochemical sensing with specific and selective magneto-immunocapturing technique [19,20]. Undoubtedly, the choice of a suitable electrochemically active signal-generating label has been crucial for our success. Quantum dots (QDs), which are semiconductor nanocrystals, are currently being used in various applications for their luminescent features; they are also used in the field of biosensors, owing to their excellent electrical properties and ability to provide high current responses [21]. They have already been used as part of biosensors for bacteria detection but are preferred for use as fluorescence signal-generating labels [22–24]. Polymeric dendrons were selected for QDs attachment as a representative of nanomaterials contributing to signal amplification through multilabelling of antibodies. Application of dendrons for labelling of biomolecules has already been reported [25,26]. Our experiments confirmed that the unique combination of a conjugate components, precisely specific IgG antibodies labelled with electrochemically active CdTe/COOH quantum dots (QDs) attached to bifunctional dendron molecule (Ds), served as an excellent tool for the specific and enough sensitive detection of bacterial cells.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

Sodium borohydride, trisodium citrate, cadmium chloride, sodium tellurite, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), the sodium salt of N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), bovine serum albumin (BSA), Tween 20, bismuth(III) nitrate pentahydrate, Polyester 2,2-Bis(hydroxyl-methyl)propionic acid (bis-MPA) dendron with 8 carboxyl and 1 amine (generation 3) (MPA dendron 8C/1A) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Specific antibodies: polyclonal goat anti-*Salmonella* spp. IgG were from KPL (stock solution 1 mg/mL) (Gaithersburg, MD, USA). ProMag™ 1 Series COOH Surfactant-free superparamagnetic particles (0.745 μm) were procured from Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, IN, USA). All other chemicals were of reagent grade and obtained from Penta (Chrudim, the Czech Republic). Whole UHT milk (fat content 3.5%) was purchased from a common grocery.

2.2. Bacterial strains and their cultivation

Salmonella enterica subsp. *enterica* Serovar Typhimurium ATCC 43971 from the Institut Pasteur Collection (CIP) (Paris, France) was cultured on nutrient agar No. 2 (HiMedia, Mumbai, India) at 37 °C. For immunomagnetic separation, the 18–24-h culture of *Salmonella* was resuspended in a physiological solution until an optical density of 0.6 McFarland was attained and diluted with PBS-Tween (0.1 M pH 7.4, 0.05%) buffer or UHT whole milk to the required concentration. The exact concentration of the bacterial suspension was quantified by the standard plating method.

2.3. Preparation of magnetic immunosorbent

Anti-*Salmonella* spp. antibodies were immobilized onto magnetic particles using a common two-step carbodiimide method with zero-length cross-linker EDC and sulfo-NHS according to protocol published previously [21]. Briefly, magnetic particles (1 mg) were washed five times with MES buffer (0.1 M, pH 5, 1 mL) and carboxyl groups were activated by EDC (12 μg in 0.25 mL of MES buffer) and sulfo-NHS (1 μg in 0.25 mL of MES buffer) addition, followed by the use of MES buffer to attain a final volume of 1 mL reaction volume with and incubation (30 min, room temperature, with rotation). After subsequent washing with MES buffer (twice, 1 mL), anti-*Salmonella* spp. IgG molecules (25 μg) were added; a reaction volume of 1 mL was attained using MES buffer, followed by incubation overnight at 4 °C with rotation. Unbound IgG molecules were washed away stepwise with MES buffer (twice, 1 mL), Tris-HCl (once, 0.1 M, pH 8, 1 mL), MES buffer containing 1 M NaCl (twice, 1 mL), and MES buffer (five times, 1 mL). Immobilization efficiency was estimated from densitometric evaluation of fractions before and after immobilization analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with silver staining.

2.4. Preparation of electrochemically active probe and anti-*Salmonella* IgG^{Ds-CdTeQDs}

In first step, polymeric dendrons (250 μg) resuspended in pure methanol (stock solution 1 mg/mL) were mixed with CdTe/COOH QDs (28 μL of stock solution) which were preactivated by addition of EDC (0.5 mg in 100 μL of ultrapure water). Next, the solution was heated to 80 °C until visible aggregation (5 min). After centrifugation (8000 rpm, 3 min) and supernatant removal, the pellet was dissolved in 30 μL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.3). Subsequently, EDC (0.2 mg in 10 μL of ultrapure water) and anti-*Salmonella* spp. antibodies (50 μg) were added followed by incubation (5 mins) with gentle agitation at room temperature. The solution was then adjusted to a final volume of 1 mL with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.3).

2.5. Electrochemical detection of *Salmonella* cells after magneto-immunocapturing

Magnetic immunosorbent (0.1 mg in 100 μL) was mixed with 100 μL of suspension containing 4500, 1110, 286, 73, and 16 *Salmonella* CFUs/mL in PBS-Tween (0.05%) buffer or 36, 16, 8, and 4 *Salmonella* CFUs/mL in the case of UHT whole milk. Thereafter, 20 μL of the electrochemically active probe was added, followed by incubation for 1 h at room temperature under rotation conditions. The resulting anti-*Salmonella* IgG – *Salmonella* – anti-*Salmonella* IgG^{Ds-CdTeQDs} complexes were magnetically separated and washed five times with PBS-T buffer (1 mL). To be sure, there is no non-specific sorption of QDs on the surface of magnetic particles that would lead to false positivity, negative controls were prepared and analyzed at the same way as positive samples except addition of the bacteria. All electrochemical measurements were performed using a portable electrochemical interface PalmSens (PalmSens, The Netherlands) controlled by the PStTrace 4.8 software and connected with screen-printed three-electrode sensors with a carbon working, a carbon auxiliary, and a silver pseudoreference electrode (C-C-Ag/AgCl, SPCE, DropSens, Spain) modified by an in-situ formed bismuth film (BiSPCE, 500 ppb Bi(III)). The Cd(II) ions released from the core of QDs were monitored by square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV) after the acidic dissolution of immunocomplexes in 90 μL of 0.1 M hydrochloric acid for 3 min. The current response provided by Cd(II) ions is directly proportional to amount of *Salmonella* spp. cells present in the sample. Parameters of the voltammetric measurement were optimized as follows: deposition potential: –1.0 V for 120 s, potential range: from –1.0 V to –0.15 V, step potential: 0.003 V, amplitude: 0.02805 V, and frequency: 25 Hz.

2.6. Plate count method for quantification of the captured bacteria cells

Evaluation of magneto-immunocapture efficiency was performed by standard bacteria growing in Petri dishes with subsequent plate count method. Nutrient agar No. 2 (HiMedia, Mumbai, India) was used for plating the control sample (i.e.; bacteria suspension), fraction after incubation with immunosorbent, washing fractions and particles with captured cells. After 18–24 h of growth at 37 °C, all the grown colonies were counted and related to the total number of CFU deduced from control samples (capture efficiency %).

3. Results and discussion

The aim of this study was to develop a simple, rapid and sufficiently specific and sensitive method for screening potential bacterial contamination as an alternative to the conventional methods. The principle of our developed system is shown in Fig. 1; our system involved the magneto-immunocapturing of target bacterial cells together with specific labelling using an electrochemically active probe (I). The subsequently created anti-*Salmonella* IgG – *Salmonella* – anti-*Salmonella* IgG^{Ds-CdTeQDs} immunocomplexes are magnetically separated (II) and finally analyzed by square-wave anodic stripping voltammetry (III).

The great benefit of magnetic immunosorbent for specific and selective capturing *Salmonella* Typhimurium as a representative of common food-borne pathogens has already been verified within our previous work [28]. We confirmed that the selectivity of this immunosorbent was excellent; no or minimal cross-reactivity in the presence of *E. coli* as competing bacteria. It was selected due to taxonomic similarity with *Salmonella* Typhimurium. The cross-reactivity was less than 2% in 100-fold surplus of competing bacteria. Moreover, the immunosorbent can be used for analyzing a wide range of sample volumes (50 µL, 0.5 mL, 25 mL) without affecting the capturing efficiency, which is an important parameter in food samples analysis [28–31]. For preparation of the immunosorbent, specific polyclonal rabbit anti-*Salmonella* IgG antibodies were immobilized by standard two-step carbodiimide-mediated covalent amide bond using N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) in reaction ratio 12:1. Covalent immobilization provides highly stable final immunosorbent. The evaluation of anti-*Salmonella* IgG immobilization efficiency based on densitometric evaluation of SDS-PAGE analysis of the fractions before and after

immobilization (Fig. 2) confirmed the optimal amount of immobilized antibodies (25 µg/1 mg; immobilization efficiency more than 95%).

For the preparation of sensitive electrochemically active probes, polymeric dendrons modified with quantum dots were exploited. Commercially available bifunctional dendrons synthesized of polyester bis-MPA with defined number of functional groups (1 amino/8 carboxyl) were combined with CdTe/COOH QDs (cadmium content 0.6 mg/mL, verified by ICP-OES) prepared according to already published protocol [32,33]. Bifunctionality of dendrons allowed their functionalization with QDs on its N-side, whereas the opposite C-side with eight carboxylic groups ensured their stable, and presumably, multi-site attachment onto antibodies. This unique combination has not yet been used for any application. Moreover, the insertion of dendrons improved the elimination of non-specific sorption of the labelled antibodies (anti-*Salmonella* IgG^{Ds-CdTeQDs}) leading to high current responses of negative controls (data not shown).

As mentioned previously, current ISO standards for the detection of *Salmonella* in milk and milk products (ISO 6785:2001) indicates the absence of bacteria in a standard sample volume, i.e., 25 mL. For this purpose, samples with different amounts of artificially added bacteria cells were thus tested. The results were compared with those for the negative control (milk with no contamination).

First experiments were performed only in PBS-Tween (0.05%) buffer. To appropriate amount of immunosorbent (100 µg, corresponding to amount of anti-*Salmonella* IgG 2,45 µg), artificially contaminated samples were added (see Section 2.5). The presence/absence of captured *Salmonella* cells was subsequently revealed via labelled specific anti-*Salmonella*^{Ds-CdTeQDs} conjugates. Selection of the used amount of conjugate (50 times diluted; 20 µl of the suspension) was based on previous experiments [27] and the benefit of used nanomaterial was taken into account. For electrochemical analysis of cadmium ions (Cd(II)) released from QDs after their acidic dissolution, the disposable screen-printed carbon electrodes modified with bismuth film (BiSPCE, in situ formed, 500 ppb) were used. Square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV), as per conditions specified in Section 2.5 and as optimized in our previous work [27], was used as the detection method. Current responses at potential –0.84 V were evaluated. Slight shift in the peak maximum occurred depending on the disposable electrode. Fig. 3 shows the SWASV voltammogram for the detection of different amounts of *Salmonella* cells (expressed as CFU/mL) in the buffer. Results showed that the current values for positive samples (n = 3) were clearly higher than the analytical noise (0 µA) achieved by

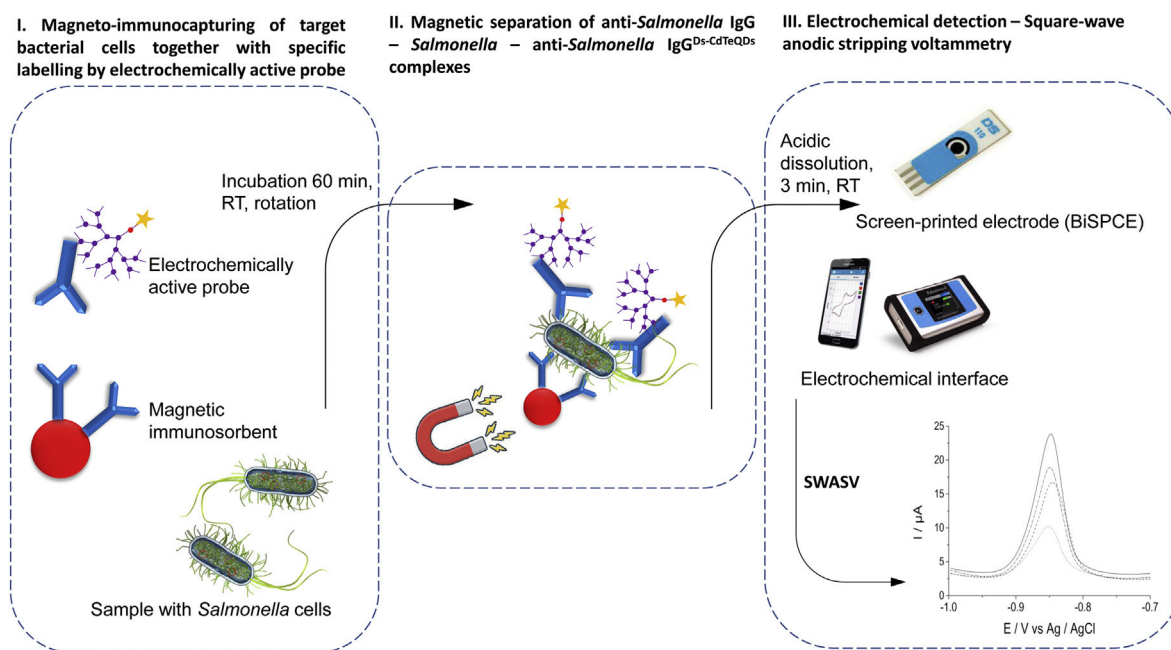


Fig. 1. Scheme of the arrangement of the developed electrochemical immunosensor for detection of whole *Salmonella* spp. cells.

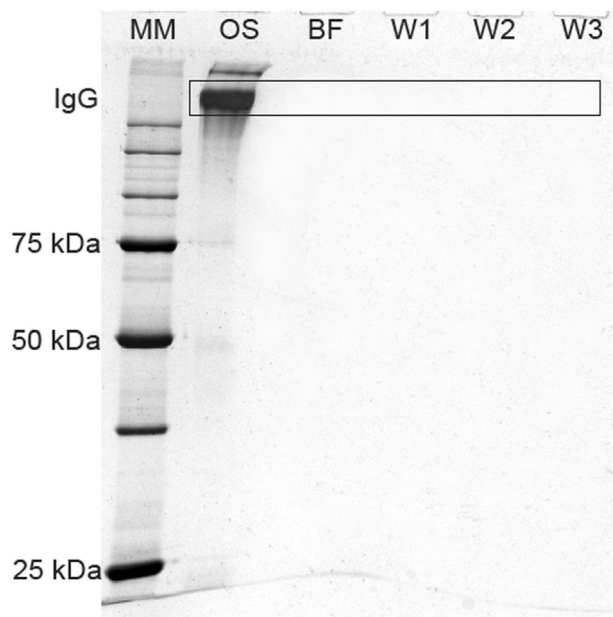


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of fractions for estimation of anti-*Salmonella* IgG immobilization efficiency. MM – molecular mass standard; OS – fraction before immobilization; BF – fraction after immobilization; W1-W3 – washing fractions. 10% polyacrylamide separation gel, 5% polyacrylamide focusing gel, silver staining, samples mixed with Laemmli sample buffer (1:1, v/v); separation conditions 180 V, 30 mA per gel.

repeating the measurements of the negative control ($n = 4$). Analysis of negative controls prepared as identically as samples, with omitting the addition of the bacterial cells, and with a thorough washing to eliminate unreacted reagents, showed minimal non-specific sorption of conjugates to naked immunosorbent. Any non-specific sorption would generate undesirable false positive results. The results obtained in this experiment confirmed the ability of the biosensor to detect contamination with 16 CFU/mL *Salmonella* cells in the buffer sample.

Subsequently, the functionality of the whole system was verified using real food samples. UHT whole milk samples were artificially spiked with different amounts of *Salmonella* cells 36, 16, 8 and 4 CFU/mL. Samples were prepared and analyzed in the same way as that in case of the model

PBS-based samples. The results (Fig. 4) confirmed the suitability of this novel methodology to detect low amount of *Salmonella* cells in actual milk samples. In the voltammograms in Fig. 4 is shown, that difference was obtained between the positive samples and analytical noise (0 μA , $n = 4$) repeatedly, confirming the ability of the biosensor to detect bacterial contamination. Compared to the other works listed in Table 1, we achieved a much higher sensitivity, exactly bacterial counts as low as 4 CFU/mL.

4. Conclusion

With regards to the requirements of food safety, we intended to develop rapid electrochemical immunosensor combining the specificity of magneto-immunocapturing with the sensitivity of electrochemical detection. Unique nanostructures-based indicator consisted of bifunctional polymeric dendron molecule modified with electrochemically active QDs was developed for labelling of captured *Salmonella* cells. As advantages can clearly be considered that arrangement of our proposed methodology enabled analysis in a limited sample volume, and we were able to detect the contamination of milk samples by *Salmonella* spp. cells in count as low as 4 CFU/mL. Achieved results confirmed that our biosensor enables to detect the contamination with bacteria cells of only a few CFU/mL. Owing to its simplicity and timelessness, this biosensor may serve as a reliable tool for the rapid screening of bacterial contaminants in milk. An indisputable advantage of this methodology is the possibility of simple change of used antibodies, and thus specificity of biosensor pointed for detecting common pathogens. Although the versatility and robustness of this methodology is obvious, as well as the potential for the use outside the laboratory, next experiments will be focused on multi-pathogen detection.

CRedit authorship contribution statement

Pavla Murasova: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Aneta Kovarova:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Jitka Kasparova:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Iveta Brozkova:** Investigation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Audrey Hamiot:** Investigation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Jana Pekarkova:** Investigation; Methodology; Writing - review & editing. **Bruno Dupuy:** Investigation, Formal analysis, Writing - review & editing. **Jana Drbohlavova:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Zuzana Bilkova:** Writing - review & editing. **Lucie Korecka:** Supervision, Writing - review & editing.

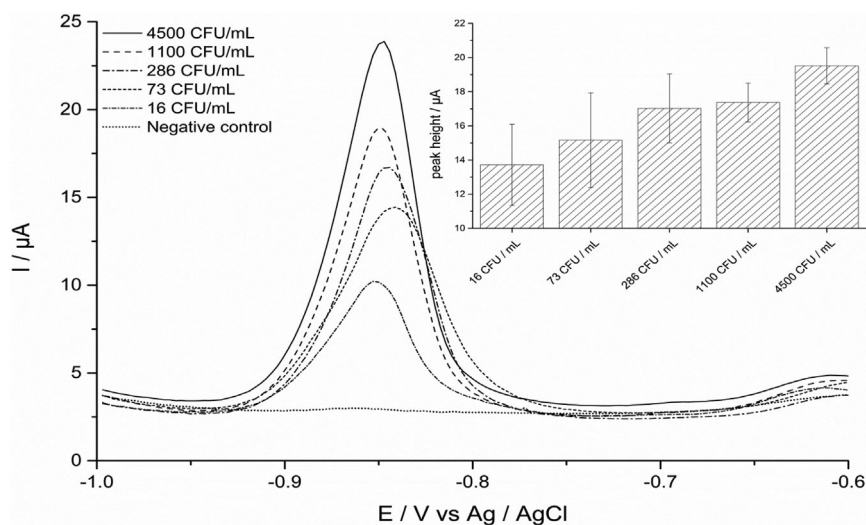


Fig. 3. Square-wave voltammograms and evaluated current responses (inset graph) of *Salmonella* spp. isolated from model solution (PBS-T buffer). Concentrations of *Salmonella* artificially added to samples: 4500, 1100, 286, 73 and 16 CFU/mL. Measurements were performed with BiSPCE using the electrochemical detection conditions specified in the experimental part ($n = 3$).

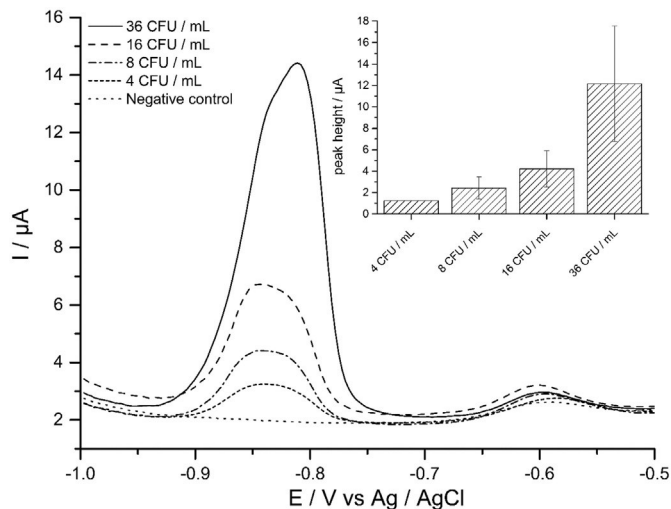


Fig. 4. Square-wave voltammograms and current responses (inset graph) of the detection of *Salmonella* cells from milk using our electrochemical immunosensor. Concentrations of *Salmonella* artificially added to the samples: 36, 16, 8, and 4 CFU/mL. Measurements were performed with BiSPCE using electrochemical detection conditions specified in the experimental section ($n = 3$).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the OP RDE project, “Strengthening interdisciplinary cooperation in research of nanomaterials and their effects on living organisms” project no. CZ.02.1.01/0.0/17 048/0007421.

References

- E.C. Alocilja, S.M. Radke, Market analysis of biosensors for food safety, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 841–846, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00009-5).
- J. McLauchlin, The relationship between *Listeria* and listeriosis, *Food Control* 7 (1996) 187–193, [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(96\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(96)00038-2).
- S. Chemburu, E. Wilkins, I. Abdel-Hamid, Detection of pathogenic bacteria in food samples using highly-dispersed carbon particles, *Biosens. Bioelectron.* 21 (3) (2005) 491–499, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.025>.
- S. Iqbal, W. Mayo, J. Bruno, B. Bronk, C. Batt, J. Chambers, A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 549–578, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00108-1).
- R. Kumar, P. Surendran, N. Thampuran, Evaluation of culture, ELISA and PCR assay for the detection of *Salmonella typhi* in seafood, *Lett. Appl. Microbiol.* 46 (2008) 221–226, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02286.x>.
- A. Schneid, K. Rodrigues, D. Chemello, E. Tondo, M. Aybu, J. Alexio, Evaluation of an indirect ELISA for the detection of *Salmonella* in chicken meat, *Braz. J. Microbiol.* 37 (2006) 350–355, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300027>.
- M.P. K. A. Biswas, K. Choi, U. Pal, Methods for rapid detection of foodborne pathogens, *Am. J. Food Technol.* 6 (2) (2011) 87–102, <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.87.102>.
- D. Ivnitiski, I. Abdel-hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, Biosensors for detection of pathogenic bacteria, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 599–624, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00039-1).
- D. Lin, K.D. Harris, N.W.C. Chan, A.B. Jemere, Nanostructured indium tin oxide electrodes immobilized with toll-like receptor proteins for label-free electrochemical detection of pathogen markers, *Sensors Actuators B Chem.* 257 (2018) 324–330, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.140>.
- M. Xu, R. Wang, Y. Li, Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation, *Talanta* 148 (2016) 200–208, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.082>.
- C. Ercole, M. Del Gallo, L. Mosiello, S. Barcella, A. Lepidid, *Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor, *Sensors Actuators B Chem.* 91 (2003) 163–168, [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00083-2).
- D.L. Alexandre, A.M.A. Melo, R.F. Furtado, M.F. Borges, E.A.T. Figueiredo, A. Biswas, H.N. Cheng, C.R. Alves, A rapid and specific biosensor for *Salmonella Typhimurium* detection in milk, *Food Bioprocess Technol.* 11 (4) (2018) 748–756, <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2051-8>.
- Z. Muhammad-Tari, E.C. Alocilja, A conductometric biosensor for biosecurity, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 813–819, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00020-4).
- F. Salam, I. Tothill, Detection of *Salmonella typhimurium* using an electrochemical immunosensor, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2630–2636, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.01.025>.
- Z. Muhammad-Tari, E.C. Alocilja, A disposable biosensor for pathogen detection in fresh produce samples, *Biosyst. Eng.* 88 (2) (2004) 145–151, <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2004.03.005>.
- L. Yang, Y. Li, C.L. Griffis, M.G. Johnson, Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1139–1147, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.10.009>.
- X. Munoz-Berbel, N. Vignes, A. Jenkins, J. Mas, F. Munoz, Impedimetric approach for quantifying low bacteria concentrations based on the changes produced in the electrode-solution interface during the pre-attachment stage, *Biosens. Bioelectron.* 23 (10) (2008) 1540–1546, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.01.007>.
- H.M. Mohamed, Screen-printed disposable electrodes: pharmaceutical applications and recent developments, *Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.010>.
- O. Olsvik, T. Popovic, E. Skjerve, S.K. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad, M. Uhlen, Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology, *Clin. Microbiol. Rev.* 7 (1) (1994) 43–54, <https://doi.org/10.1128/cmr.7.1.43>.
- I. Safarik, M. Safarikova, Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *Biomagn. Res. Technol.* 2 (2004) 7–23, <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>.
- C. Kokkinos, A. Economou, Emerging trends in biosensing using stripping voltammetric detection of metal-containing nanolabels - a review, *Anal. Chim. Acta* 961 (2017) 12–32, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.016>.
- X.L. Su, Y. Li, Quantum dot biolabeling coupled with immunomagnetic separation for detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Anal. Chem.* 76 (16) (2004) 4806–4810, <https://doi.org/10.1021/ac049442+>.
- M.A. Hahn, J.S. Tabb, T.D. Krauss, Detection of single bacterial pathogens with semiconductor quantum dots, *Anal. Chem.* 77 (15) (2005) 4861–4869, <https://doi.org/10.1021/ac050641i>.
- H. Wang, Y. Li, E. Wang, M. Slavik, Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based multiplex immunoassay, *J. Food Prot.* 74 (2011) 2039–2047, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-144>.
- A.M.-S. Ortiz, P. Stenström, P.M. Antunez, O.C.J. Andrés, M.J. Torres, M.I. Montañez, M. Malkoch, Design of multivalent fluorescent dendritic probes for site-specific labeling of biomolecules, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 56 (2018) 1609–1616, <https://doi.org/10.1002/pola.29055>.
- C. Wängler, G. Moldenhauer, R. Saffrich, E.-M. Knapp, B. Beijer, M. Schnölzer, B. Wängler, M. Eisenhut, U. Haberkorn, W. Mier, PAMAM structure-based multifunctional fluorescent conjugates for improved fluorescent labelling of biomacromolecules, *Chem. Eur. J.* 14 (2008) 8116–8130, <https://doi.org/10.1002/chem.200800328>.
- M. Cadkova, A. Kovarova, V. Dvorakova, R. Metelka, Z. Bilkova, L. Korecka, Electrochemical quantum dots-based magneto-immunoassay for detection of HE4 protein on metal film-modified screen-printed carbon electrodes, *Talanta* 182 (2018) 111–115, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.054>.
- J. Srbova, P. Krulisova, L. Holubova, I. Pereiro, A. Bendali, A. Hamiot, V. Podzemna, J. Macak, B. Dupuy, S. Descroix, J. Viovy, Z. Bilkova, Advanced immunocapture of milk-borne *Salmonella* by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed, *Electrophoresis* 39 (2018) 526–533, <https://doi.org/10.1002/elps.201700257>.
- M. Varshney, L. Yang, X. Su, Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, *J. Food Prot.* 68 (9) (2005) 1804–1811, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.9.1804>.
- R. Najafi, S. Mukherjee, J. Hudson, A. Sharma, P. Banerjee, Development of a rapid capture-cum-detection method for *Escherichia coli* O157 from apple juice comprising nano-immunomagnetic separation in tandem with surface enhanced Raman scattering, *Int. J. Food Microbiol.* 189 (2014) 89–97, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.036>.
- G. Papadakis, P. Murasova, A. Hamiot, K. Tsougeni, G. Kaprou, M. Eck, D. Rabus, Z. Bilkova, B. Dupuy, G. Jobst, A. Tserepi, Micro-nano-bio acoustic system for the detection of foodborne pathogens in real samples, *Biosens. Bioelectron.* 111 (2018) 52–58, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.056>.
- P. Modlitbova, P. Porizka, K. Novotny, J. Drbohlavova, I. Chamradova, Z. Farka, H. Zlamalova-Gargosova, T. Romih, J. Kaiser, Short-term assessment of cadmium toxicity and uptake from different types of Cd-based Quantum Dots in the model plant *Allium cepa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 153 (2018) 23–31, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.044>.
- J.P. Simunovic, J. Pekarkova, J. Zak, I. Chamradova, J. Hubalek, Studying of quantum dot luminescence quenching effect caused by covalent conjugation with protein, *Monatsh. Chem.* 148 (2017) 1901–1909, <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2064-z>.

4.4 Článek IV

Development of the magnetic bioaffinity carrier for the anti-amyloid beta1-42 antibodies detection

Marcela Slovákova^{1,*}, **Pavla Murasová¹**, Věra Vozandychová¹, Jiří Palarčík², Veronika Podzemná³, and Zuzana Bílková¹

- 1 Department of Biological and Biochemical Sciences, University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice, Czech Republic
- 2 Institute of Environmental and Chemical Engineering, University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice, Czech Republic
- 3 Centre of Materials and Nanotechnologies – CEMNAT, University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice, Czech Republic

Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A; Faculty of Chemical Technology (2019), 25, 41-52

Odborný recenzovaný článek bez IF

Podíl autorky na uvedené práci: V této práci se autorka podílela na přípravě magnetického nosiče a optimalizaci magnetické ELISA metody na magnetických částicích, při psaní publikace se podílela na metodické části a diskuzi výsledků. Procentuálně lze podíl na publikaci vyjádřit jako 40%.

Development of the magnetic bioaffinity carrier for the anti-amyloid β 1–42 antibodies detection

Marcela Slováková^{1*}, Pavla Murasová¹, Věra Vozandychová¹,
Jiří Palarčík², Veronika Podzemná³, and Zuzana Bílková¹

¹ Department of Biological and Biochemical Sciences,
The University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice, Czech Republic

² Institute of Environmental and Chemical Engineering,
The University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice, Czech Republic

³ Center of Materials and Nanotechnologies – CEMNAT,
The University of Pardubice, CZ–530 02 Pardubice, Czech Republic

Received: May 31, 2019; Accepted: July 25, 2019

In this paper, the development of a new affinity carrier was the key point for the anti-amyloid β 1–42 antibodies detection in human serum, as the potential marker of the Alzheimer's disease. Magnetic solid-phase preparation comprised the amyloid β 1–42 peptide immobilization on the superparamagnetic carboxyl beads that had been modified by bisamino-polyethylene glycol spacer to gain terminal amine groups and subsequently analyzed by the zeta potential measurement. The following immobilization of the amyloid β 1–42 peptide onto the modified superparamagnetic beads was performed by the carbodiimide chemistry. Nonspecific sorption of serum contaminants was prevented by using of bovine serum albumin. The developed magnetic carrier was analyzed by scanning electron microscopy. The amyloid β 1–42 peptide bioaffinity carrier was applied for detection of natural anti-amyloid β 1–42 antibodies in human serum. A comparison with spacer-free bioaffinity carrier has confirmed a divergent optical density values for control serum sample. The new bioaffinity carrier was applied to the detection of anti-amyloid β 1–42 antibodies in control serum and in sera of patients with neurodegenerative disorders.

Keywords: Anti-amyloid β 1–42; Magnetic bioaffinity carrier; Immobilization

* Corresponding author, ✉ marcela.slovakova@upce.cz

Introduction

Development of efficient methods for fast, simple, and selective isolation of specific antibodies of clinical or diagnostic significance still represents a great challenge for researchers. The determination of anti-amyloid β antibodies (anti-A β Abs) in biological material is typically carried out by the universal and highly specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), where ligand – a specific antigen, is bound onto a surface of microtiter plates [1,2], or by the newly developed thiophilic chromatography [3]. In the recent years, the use of magnetic spherical carrier as the solid phase has also gained popularity in the ELISA systems. The magnetic ELISA brings a high comfort of fast and simple magnetic separation during the individual steps of the respective methods. An increase in the sensitivity of the magnetic ELISA method is directly related to the magnification of specific surface of the spherical particles [4–6]. The selection of suitable magnetic particles for the individual applications depends on their magnetic properties. Thus, the materials from which they are made as well as their size are essential [7]. Magnetic ELISA has been evaluated as accurate, less time-consuming and more sensitive than conventional ELISA [8,9]. Magnetic ELISA combines advantages of using the immunomagnetic beads with classic method ELISA having potential to increase the accuracy and specificity in comparison with usual immunotests [9].

Recently, more and more studies deals with the role of autoimmunity in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). It has been found that human IgG repertoire contains naturally occurring antibodies to amyloid beta (A β), which may play a role in the pathogenesis, as well as in the treatment of AD [10–12]. A β peptide is about 4 kDa large molecule and being generated by proteolytic cleavage of amyloid precursor protein in the plasma membrane by β and γ -secretase [13]. This cleavage gives rise to several isoforms of A β of which 40/42 hydrophobic amino acid peptide tends to polymerize and form the plaque [14]. Specifically, the N-terminal anti-A β Abs were effective in removing plaques because only N-terminal parts could be easily accessible to antibodies [15–18]. Therefore, immunochemical detection of natural anti-A β antibodies (nA β -Abs) in human serum is connected to the therapeutic potential strategy of the A β -Abs found in intravenous immunoglobulin (IVIg) for the treatment of patients with AD [11,19–21].

Based on these facts, we had prepared a magnetic bioaffinity carrier composed of amine containing superparamagnetic beads with immobilized A β 1–42 peptide and applied the resultant bioaffinity carrier in the pilot experiment for the detection of the N-terminal A β -Abs antibodies in human sera.

Materials and Methods

Reagents, chemicals and magnetic microspheres

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), the sodium salt of N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), bovine serum albumin (BSA) and poly(ethylene glycol) bis(3-aminopropyl) terminated (NH₂-PEG-NH₂) spacer (MW 1,5 kDa) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals were of reagent grade and obtained from Penta (Chrudim, Czech Republic). Water used for preparation of buffers was filtered through a TKA Smart2Pure system (Thermo Scientific TKA, Niederelbert, Germany). Peptide A β 1–42 (MW 4,514 kDa) was purchased from Apronex (Vestec, Czech Republic). Human patient sera were provided from the National Institute of Mental Health (Klecany, Czech Republic). All patients, whose samples had been analyzed, signed the informed consent. Control sera were provided by healthy donors – volunteers from the University of Pardubice.

ProMag™ 1 Series COOH Surfactant Free (further denoted as Promag, 0.88 μ m) were purchased from Bangs Laboratories (Fishers, IN, USA). Magnetic suspension agitations and separations were performed using a Grant Bio PTR-30 rotator (Wolf-Laboratories, Pocklington, York, UK) and a Dynal MPC-S magnetic separator (Biotech, Prague, Czech Republic).

Preparation of the magnetic immunosorbents

To prepare the immunosorbent, A β 1–42 peptide was immobilized to the carboxyl superparamagnetic microparticles by I) two-step carbodiimide method or II) one-step carbodiimide method [22] with the aid of polyethyleneglycol (NH₂-PEG-NH₂) as the homobifunctional linker. In both cases, magnetic particles (1 mg) were washed 4 times with a 0.1M MES (pH 4.5) and activated with EDC in 0.25 mL (0.0391 mol L⁻¹ in 0.01M MES; pH 4.5) and sulfo-NHS in 0.5 mL (5.76·10⁻³ mol L⁻¹ in 0.01M MES; pH 4.5) and incubated 10 min. at room temperature under rotation. Subsequently, magnetic carrier was washed with 1 mL of 0.1M MES (pH 4.5), in case (I) A β 1–42 was added (50 μ g), filled up to 1 mL with 0.01M MES (pH 4.5), and incubated overnight at 4 °C on a rotator. After overnight incubation, the functionalized particles were blocked with 1 mL 1% BSA. In case (II) NH₂-PEG-NH₂ (0.003 mg) was added, filled up to 1 mL with 0.01M MES (pH 4.5), and incubated overnight at 4 °C on a rotator. After overnight incubation particles modified with PEG were washed with 1 mL of 0.1M MES (pH 4.5) and activated again with EDC and sulfo-NHS as described above. Subsequently, magnetic carrier was washed with 1 mL of 0.1M MES (pH 4.5), A β 1–42 was added (50 μ g) and filled up to 1 mL with 0.01M MES (pH 4.5). After

overnight incubation at 4 °C on a rotator, the functionalized particles were blocked with 1% BSA (1 h, RT, rotation) and washed 10 times with 0.1M PBS buffer (pH 7.4). Storage conditions were as follows: 4 °C, with addition of 0.01% NaN₃.

SEM analysis of magnetic particles

Superparamagnetic microparticles were dried at a temperature of 37 °C and imaged by the SEM instrument JEOL JSM 7500F (JEOL, Tokyo, Japan). To produce an electrically conductive surface for SEM, specimens were sputter-coated with thin gold film (~10 nm) using Leica EM ACE 200 sputter (Leica, Wetzlar, Germany).

Zeta potential measurement

A zeta potential analyzer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) was used in the zeta measurement protocols. The zeta potential of the beads was measured in a phosphate buffer made 10 and 100 mM in concentration and pH adjusted from 3 to 11 using either HCl or NaOH. The total volume for all the measurements was 1 mL, and the concentration of the beads chosen as $3 \cdot 10^{-3}$ %. Each measurement included 2×12 cycles of uniform measurements and one mixing step to prevent magnetic particles from settling and sedimentation.

Detection of anti-A β Abs in serum using the magnetic bioaffinity carrier

100 μ L of diluted sera (1:100) was added to 0.05 mg of magnetic particles functionalized with the A β 1–42 peptide and the resultant mixture incubated for 1 hour in 37 °C under shaking. Afterwards, the particles were washed 3 times with 1 ml 5% BSA in PBS-T buffer. 100 μ L of goat anti-human IgG labeled with HRP and diluted 1:16 000 was added and incubated with particles another one hour at 37°C under shaking. Subsequently, the particles were washed three times with 5% BSA in PBS-T buffer and twice with PBS buffer. 100 μ L of substrate solution – 0.1M acetate buffer (pH 5.5), 0.03% H₂O₂ with 0.3 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; 6 mg mL⁻¹ in DMSO) acting as a chromogen was added and incubated for 15 min at 37 °C in dark. The reaction was stopped by adding 50 μ L 1M H₂SO₄ and the absorbance measured using a Multiscan RC ELISA reader (Labsystems, Helsinki; Finsko) at a wavelength of 492 nm. The results were obtained in three replicates. All the samples and all three measurements of each sample were used to evaluate the data.

The averages were calculated from the values measured as the replicates. Data showed a violation of data normality, and Kruskal–Wallis test was used for statistical evaluation; P-values ≤ 0.05 being considered statistically significant.

Results and discussion

Immobilization of the amyloid β 1–42 peptide to magnetic beads

Naturally occurring A β -antibodies recognize the A β epitope at its N-terminus, amino acids 1–15 [18]. To detect free natural N-terminal A β Abs, we immobilized the peptide A β 1–42 by the C-terminus to the magnetic carrier. First, the ProMag carboxyl beads were modified by the bisamino-polyethylene glycol (NH₂-PEG-NH₂) spacer, which was followed by the A β 1–42 peptide immobilization. The scheme of the A β 1–42 peptide immobilized to superparamagnetic beads is in the Fig. 1. C-terminus Amyloid β 1–42 peptide bioaffinity carrier will allow one to detect specifically N-terminal A β Abs from human serum. Another great advantage of using a spacer before the peptide immobilization was formation of an affinity ligand binding space near the beads.

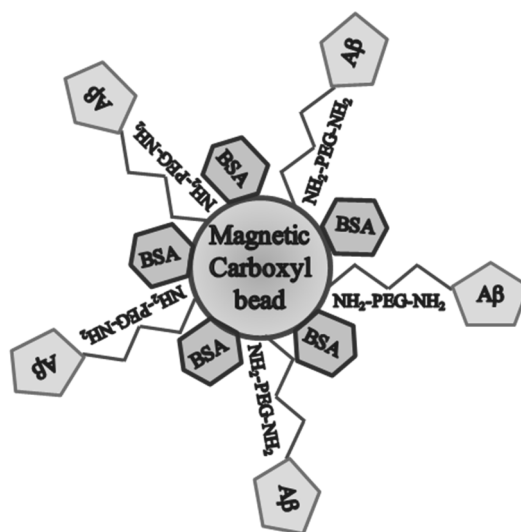


Fig. 1 Schema of the A β 1–42 peptide immobilization using of the bisamino-polyethylene glycol spacer to the magnetic carboxyl beads

NH₂-PEG-NH₂, bisamino-polyethylene glycol

To prevent nonspecific interaction of the magnetic beads after amine modification, the concentration of the bisamino-polyethylene glycol spacer was optimized. Zeta potential, as a measure of the magnitude of the repulsion or attraction between beads, was measured for each concentration chosen. Its measurement provided insight into the dispersion mechanism.

The results in Fig. 2 showed that the spacer did not significantly reduce the stability of the Promag magnetic particles. Beads modified with the lowest amount of spacer (3 μg) are still well stable and least susceptible to an aggregation from all other bindings of bisamino-polyethylene glycol spacer.

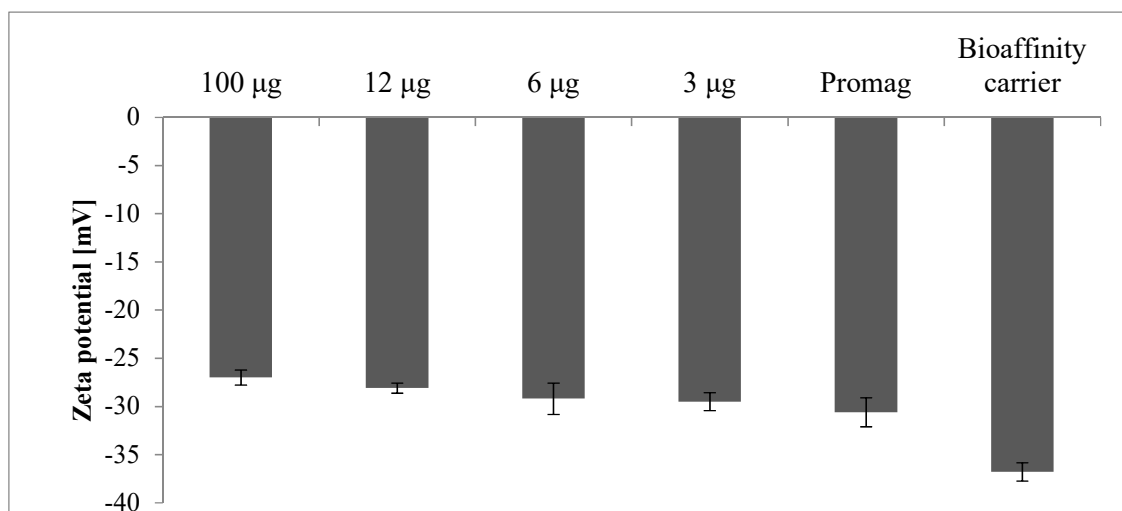


Fig. 2 Zeta potential analysis of Promag beads with different amounts of the bisamino-polyethylene glycol spacer and the A β 1–42 peptide bioaffinity carrier in 0.01M PBS buffer pH 7.4

Average of at least 12 repetitions

The magnetic beads functionalization with bisamino-polyethylene glycol spacer was followed by the immobilization of A β 1–42 peptide via C terminus by two-step carbodiimide chemistry. Tricine SDS-PAGE analysis confirmed binding efficiency of the A β 1–42 peptide to the amine modified magnetic beads (not shown). Further, the bead surface and bead size of the prepared magnetic affinity carrier were analyzed by the scanning electron microscopy to ensure unchanged particle size for use in magnetic ELISA method. Beads featured in Fig. 3A confirmed a spherical shape without hints of surface changes. No change in ligand-bound particles was observed for the magnetic bioaffinity carrier.

The size of the beads before and after preparation of the bioaffinity carrier was then calculated from the SEM images (Figure 3B). Size of the individual beads before its modifications was 0.906 μm (± 0.057); acquired bead sizes being close to the bead size stated by the manufacturer (0.88 μm). There was no significant change in size after the modification by the spacer and peptide.

Detection of anti-A β antibodies in human serum

The newly developed A β 1–42 peptide magnetic bioaffinity carrier was applied to detect natural N-terminal A β -Abs in the sample of control human serum (diluted in ratio of 1:100).

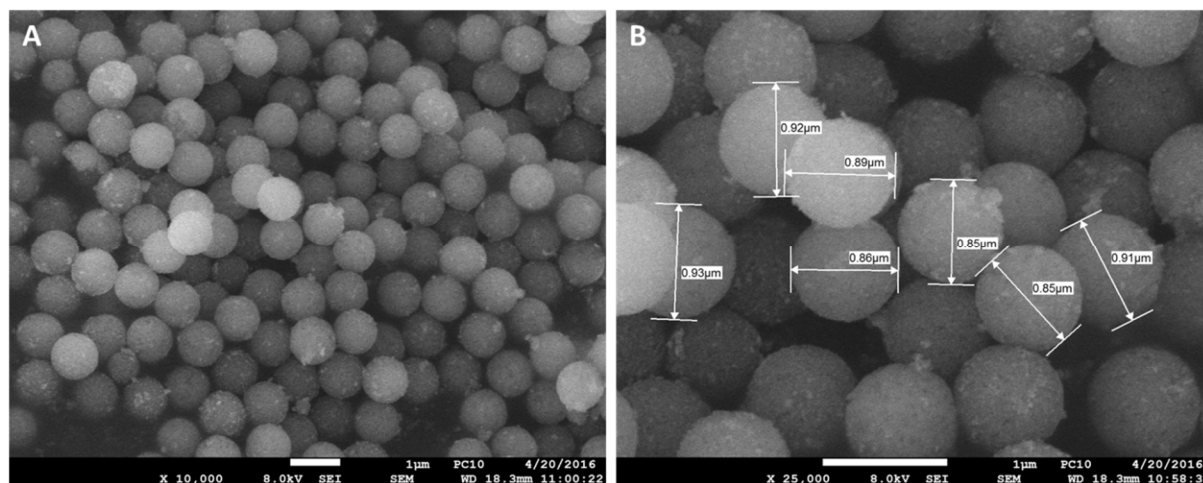


Fig. 3 Scanning electron microscopy of the bioaffinity carrier (A), bead size measurement (B)

To compare this developed system, we prepared the A β 1–42 peptide bioaffinity carrier without a bisamino-polyethylene glycol spacer. The spacer free A β 1–42 peptide bioaffinity carrier was prepared using the two-step carbodiimide method. Both bioaffinity carriers were blocked with 1% BSA to prevent adsorption of serum proteins to the carrier and simultaneously used for specific antibodies detection. Data, expressed as the mean optical density (OD) values \pm SEM, responded to the solution after colorimetric anti-human IgG HRP conjugate development. The detection method and the evaluation have been taken from the previous report [1]. The interpretation of results on the Fig. 4 shows that the greater the OD value of the peptide carrier, the higher level of the anti-A β 1–42 Abs can be detected in the human serum.

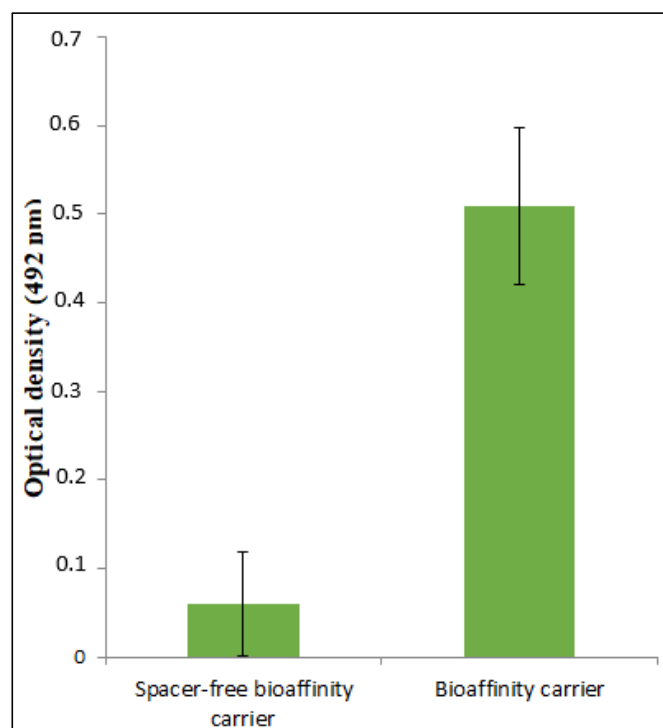


Fig. 4 Influence of the A β 1–42 peptide magnetic bioaffinity carrier preparation method to acquired values anti-A β Abs detected in control serum
OD values are acquired from three repetitions

Acquired values optical densities have shown that the spacer-free bioaffinity carrier had a significantly lower absorbance than the response of the spacer modified bioaffinity carrier. The peptide binding sites for spacer-free carriers compared to the spacer modified bioaffinity carrier were probably less accessible to anti-A β 1–42 Abs. Data suggest a significant positive effect of the bisamino-polyethylene glycol spacer use on the immobilized peptide availability to the specific antibody binding sites. Yet another possible explanation can also be the appropriate N terminal orientation of the immobilized A β 1–42 peptide related to the presence of natural anti-A β 1–42 Abs in the control serum.

In the next experiment, the A β 1–42 peptide magnetic bioaffinity carrier was used for analysis of different human serum samples. Bioaffinity carriers were blocked with 1% BSA. The aim of this pilot experiment was to observe different levels of specific antibodies known from the literature [16,18]. Serum samples included six randomly selected controls and fourteen patient sera from which six had belonged to patients with mixed cognitive impairment (MKP) and eight to the patients suffering from Alzheimer's disease (AD). Patient sera were provided by the National Institute of Mental Health in Klecany (see *Materials and methods*) and the designations of AD and MKP were based on confirmed clinical diagnoses. The sera tested were diluted at a ratio of 1:100.

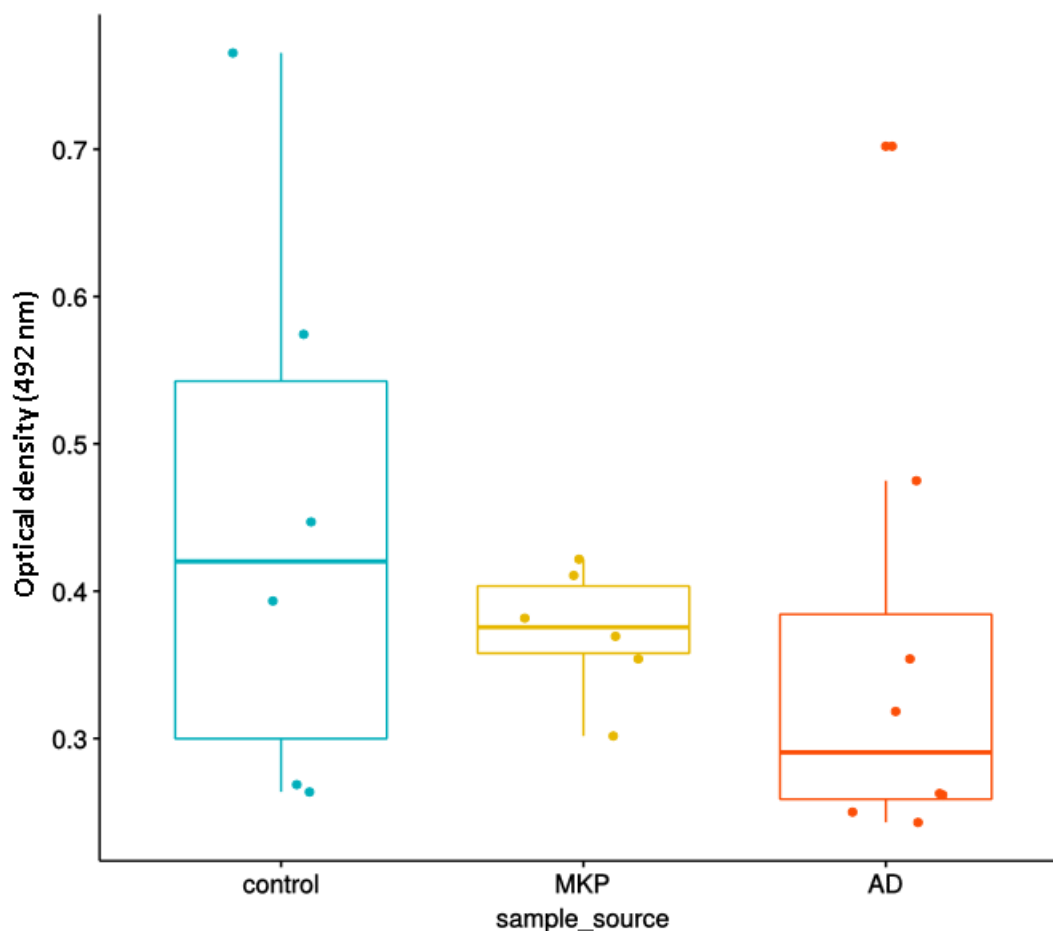


Fig. 5 Box plot of acquired values anti-A β Abs detected in control and patients sera using the A β 1–42 peptide magnetic bioaffinity carrier

MKP, mixed cognitive impairment, AD, Alzheimer disease, Values are acquired from three repetitions

Values of optical densities have been acquired from three analysis repetitions of each sample and are plotted in Fig. 5. The antibody levels measured in the control sera group showed a large dispersion. Similarly, large dispersion of data was evident from sera from patients with AD. A single group of MKP patient data gave homogeneous results. The developed magnetic bioaffinity carrier used for the anti-A β Abs detection was able of detecting anti-A β Abs with some differences between the groups of sera. The differences in the acquired data have been found not statistically significant (Kruskal–Wallis, p-value 0.2697). The low number of data and the sera examined did not allow us to evaluate the importance of the anti-A β Abs in serum.

Conclusions

A magnetic bioaffinity carrier with the amyloid β 1–42 peptide has been developed and tricine-SDS-PAGE used for verification of the immobilization efficiency. Also, SEM was used for verification of the particle size before and after ligand modification. The concentration of bisamino-polyethylene glycol spacer being necessary during peptide immobilization has been optimized and verified by beads zeta-potential measurements. Properties of the amyloid β 1–42 peptide bioaffinity carrier with spacer have proven to be useful as a solid phase for the detection of anti-amyloid antibodies in human serum. Detection of anti-amyloid beta antibodies in serum controls and patients with AD and MKP in the pilot experiment did not revealed statistically significant differences between the control samples and those obtained from patients with AD.

Shortcuts

A β	amyloid beta
A β -Abs	anti-A beta antibodies
AD	Alzheimer's disease
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	horse radish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
MKP	mixed cognitive impairment
OD	optical density

Acknowledgements

The authors kindly thank for supplying the serum samples by MUDr. Aleš Bartoš from National Institute of Mental Health in Prague, Czech Republic, and are also thankful to Dr. Anna Pačínková for statistical data processing.

The work was supported from European Regional Development Fund, Project "Modernization and upgrade of the CEMNAT infrastructure (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001829)", a student project at the University of Pardubice (SGS_2019_007), and from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LM2015082).

References

- [1] Klaver A.C., Patrias L.M., Coffey M.P., Finke J.M., Loeffler D.A.: Measurement of anti-Abeta 1–42 antibodies in intravenous immunoglobulin with indirect ELISA: the problem of nonspecific binding. *Journal of Neurosciences Methods* **187**(2) (2010) 263–269.
- [2] Klaver A.C., Coffey M.P., Smith L.M., Bennett D.A., Finke J.M., Dang L., Loeffler D.A.: ELISA measurement of specific non-antigen-bound antibodies to Abeta 1–42 monomer and soluble oligomers in sera from Alzheimer’s disease, mild cognitively impaired, and noncognitively impaired subjects. *Journal of Neuroinflammation* **8** (2011) 93(1–11).
- [3] Szabo P., Mujalli D.M., Rotondi M.L., Sharma R., Weber A., Schwarz H.-P., Weksler M.E., Relkin N.: Measurement of anti-beta amyloid antibodies in human blood. *Journal of Neuroimmunology* **227** (2010) 167–174.
- [4] Kourilov V., Steinitz M.: Magnetic-bead enzyme-linked immunosorbent assay verifies adsorption of ligand and epitope accessibility. *Analytical Biochemistry* **311**(2) (2002) 166–170.
- [5] Liu R.P., Liu J.T., Xie L., Wang M.X., Cai X.X.: Magnetic nanoparticles-based ELISA for low-cost and sensitive detection of brain natriuretic peptide. *Journal of Harbin Institute of Technology* **43**(SUPPL.1) (2011) 388–392.
- [6] Zhang H., Meyerhoff M.E.: Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: Enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance. *Analytical Chemistry* **78**(2) (2006) 609–616.
- [7] Pamme, N.: Magnetism and microfluidics. *Lab on chip* **6** (2006) 24–38.
- [8] Wang L.S., Leung Y.Y., Chang S.K., Leight S., Knapik-Czajka M., Baek Y., Shaw L.M., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Clark C.M.: Comparison of xMAP and ELISA assays for detecting cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer’s disease. *Journal Alzheimers Disease* **31**(2) (2012) 439–445.
- [9] Song F., Zhou Y., Li Y.S., Meng X.M., Meng X.Y., Liu J.Q., Lu S.Y., Ren H.L., Hu P., Liu Z.S., Zhang Y.Y., Zhang J.H.: A rapid immunomagnetic beads-based immunoassay for the detection of β -casein in bovine milk. *Food Chemistry* **158** (2014) 445–448.
- [10] Weksler M.E., Relkin N., Turkenich R., LaRusse S., Zhou L., Szabo P.: Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Experimental Gerontology* **37**(7) (2002) 943–948.
- [11] Szabo P., Relkin N., Weksler M.E.: Natural human antibodies to amyloid beta peptide. *Autoimmunity Reviews* **7**(6) (2008) 415–420.
- [12] Kellner A., Matschke J., Bernreuther C., Moch H., Ferrer I., Glatzel M.: Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer’s disease and help control plaque burden. *Annals of Neurology* **65**(1) (2009) 24–31.
- [13] Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., Seabrook G., Borchelt D., Iwatsubo T., Sisodia S., Malinow R.: APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**(6) (2003) 925–937.

- [14] Selkoe D.J.: Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* **924** (2000) 17–25.
- [15] Brendza R.P., Holtzman D.M.: Amyloid-beta immunotherapies in mice and men. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* **20**(2) (2006) 118–123.
- [16] Dodel R, Balakrishnan K, Keyvani K, Deuster O., Neff F., Andrei-Selmer L.C., Röskam S., Stür C., Al-Abed Y., Noelker C., Balzer-Geldsetzer M., Oertel W., Du Y., Bacher M.: Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* **31**(15) (2011) 5847–5854.
- [17] Bachmeier C.J., Beaulieu-Abdelahad D., Mullan M.J., Paris D.: Epitope-dependent effects of Beta-amyloid antibodies on Beta-amyloid clearance in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Microcirculation* **18**(5) (2011) 373–379.
- [18] Qu B.X., Gong Y., Moore C., Fu M., German D.C., Chang L.Y., Rosenberg R., Diaz-Arrastia R.: Beta-amyloid auto-antibodies are reduced in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology* **274**(1–2) (2014) 168–173.
- [19] Relkin N., Szabo P., Adamiak B., Monthe C., Burgut F.T., Du Y., Wei X., Schiff R., Weksler M.E.: Intravenous immunoglobulin (IVIg) treatment causes dose-dependent alterations in beta-amyloid (A-beta) levels and anti-beta antibody titers in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of Alzheimer's disease (AD) patients. *Neurology* **64**(6, Suppl. 1) (2005) A144–A145.
- [20] Relkin N.R., Thomas R.G., Rissman R.A., Brewer J.B., Rafii M.S., van Dyck C.H., Jack C.R., Sano M., Knopman D.S., Raman R., Szabo P., Gelmont D.M., Fritsch S., Aisen P.S.: A phase 3 trial of IV immunoglobulin for Alzheimer disease. *Neurology* **88**(18) (2017) 1768–1775.
- [21] Gold M., Mengel D., Roeskam S., Dodel R., Bach J.P.: Mechanisms of action of naturally occurring antibodies against beta-amyloid on microglia. *Journal of Neuroinflammation* **10** (2013) 1–10.
- [22] Carbodiimide Crosslinker Chemistry.
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html#/legacy=www.piercenet.com>.
(accessed July 22, 2019).

4.5 Článek V

On-chip ELISA on magnetic particles: isolation and detection of specific antibodies from serum

Svobodová Zuzana¹, **Krulišová Pavla¹**, Černá Michaela¹, Jankovičová Barbora¹, Bílková Zuzana¹

1 University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Biological and Biochemical Sciences, Pardubice, Czech Republic

Nanocon 2015: Conference Proceedings, ISBN 978-80-87294-59-8

Odborný příspěvek ve sborníku s ISBN

Podíl autorky na uvedené práci: V této práci autorka prováděla experimenty týkajících se magnetické ELISA metody v mikrotitrační destičce. Při psaní se podílela na kapitolách týkajících se výše zmíněných experimentů. Procentuálně lze podíl na publikaci vyjádřit jako 30%.

ON-CHIP ELISA ON MAGNETIC PARTICLES: ISOLATION AND DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES FROM SERUM

SVOBODOVA Zuzana, KRULISOVA Pavla, CERNA Michaela, JANKOVICOVA Barbora,
BILKOVA Zuzana

1 University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Biological and Biochemical Sciences, Pardubice, Czech Republic, EU

Abstract

In recent years, microfluidics has shown considerable promise for improving diagnostics and biology research. Certain properties of microfluidic technologies, such as rapid sample processing and the precise control of fluids in an assay, have made them attractive candidates to replace traditional experimental approaches [1]. Here, an example of such application is presented: ELISA that uses magnetic particles as the solid phase (MELISA) implemented into a microfluidic device. The microfluidic Rhombic chamber chip (120 μ l chamber volume, hydrophilized) in ChipGenie[®] edition-P holder (microfluidic ChipShop, Jena, D) with strong integrated magnets enabling to fix the magnetic particles in reaction chamber and arrange them as a fluidized bed was employed. The behaviour and colloidal stability of 11 various types of superparamagnetic particles varying in composition and diameter (0.5–100 μ m) were compared. Parameters as optimal amount of magnetic particles inside the chamber, rate of aggregation, clogging the chip channels and stability of magnetic cloud inside the chip were evaluated. The microparticles with the best parameters were then coated with specific antigen (chymotrypsin) and traditional MELISA with such bioactive carrier and variously diluted porcine serum was performed in microplate arrangement and simultaneously in microfluidic chip. Only the final step, measurement of sample absorbance was performed off-line in microplate spectrophotometer. Our results repeatedly confirmed that MELISA can be easily adopted for microfluidic version drawing all benefits associated with the miniaturization.

Keywords: ELISA, Microfluidics, Magnetic Particles, Lab-on-Chip

1. INTRODUCTION

The magnetic particles (MPs) have numerous properties that make them suitable for wide-spread use in various applications from imaging to drug delivery: ease of manufacturing, manipulation in fluid and a wide range of commercially available MPs diameters, ranging from nanoparticles (50 nm) to microparticles (up to tens of μ m) [2]. One of the possible applications of MPs is a magnetic solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA). The principle of the method is the same as for commonly used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) except: the binding ligand is bound on the surface of MPs instead of walls of microtitration plate [3], the 96-well plate magnetic separator is applied for separation of the MPs during washing steps and the microplate-shaker for homogenous dispersion of MPs. The MELISA arrangement brings advantages such as robustness of ligand amount per well compare to inaccuracy of adsorbed ligand in microtitration plate. Moreover, the dispersed MPs have higher interaction with the target ligand in the sample ensuring better and faster kinetics of the reaction [4] and thus higher sensitivity. Therefore this technique is used for example for detection of antibodies that are not detectable with conventional ELISA [5]. Both conventional methods ELISA and MELISA are quite laborious and time-consuming since require numerous washing steps, accurate pipetting, placing on shaker etc. The use of microfluidics to perform sandwich immunoassays permits one to specifically address these drawbacks. The low scale of these devices reduces the volumes and diffusion distances inside the micro-channels, therefore decreasing the duration of the successive incubation periods especially in combination with ligand-coated MPs and easy fluid manipulation [6-8]. The aim of this work was to optimize the MELISA protocol for

detection of antibodies for on-chip application. Simple commercial microfluidic set from microfluidic ChipShop was employed. This device provides easy liquid application, automatic mixing of the MPs and high ratio of used MPs vs. chamber volume. Therefore, this setup enables one to capture specific antibodies on the surface of the magnetic biofunctionalized microparticles that can be (i) eluted and subsequently detected and/or (ii) directly detected by MELISA protocol upon the application requirements. Both MELISA arrangements (in microtitration plate and/or in microfluidic chip) were performed simultaneously under the same conditions and the results were subsequently compared. The preliminary results of on-chip MELISA for detection/isolation of anti-chymotrypsin antibodies are presented in here.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Magnetic particles

Magnetic bead cellulose MT200 with hydroxyl functional group, size 80-100 μm (Iontosorb, Ústí n. Labem, CZ, EU); magnetic hypercrosslinked poly(styrene-co-divinylbenzene) microspheres (HMP-S-MG4) with sulfite functional group, size 5.7 μm [9] and magnetic poly(glycidyl methacrylate) albumin-coated microspheres with carboxyl and/or amino functional group, size 4.5 μm (PGMA-ALB) [10] were obtained from Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, CZ, EU; Micromer microparticles with carboxyl or amino functional group, size 3 μm and 4 μm (Micromod, Rochester, NY); Dynabeads with carboxyl functional group, size 1 μm or 2.8 μm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); SiMAG particles with amino functional group, size 0.5 μm or 1 μm (Chemicell, Berlin, D) and Sera-Mag® Speed Beads with carboxyl functional group, size 0.771 μm or 0.816 μm (Seradyne, Indianapolis, IN).

2.2. Microfluidic device

The microfluidic Rhombic chamber chip (120 μl chamber volume, hydrophilized) contains two microfluidic chambers with two inlets and two outlets, the dimensions are mentioned in Fig. 1a. The chip fits into ChipGenie® edition-P holder (microfluidic ChipShop, Jena, D, see Fig. 1b) with two strong integrated magnets enabling fix the magnetic particles in reaction chamber and arrange them as a fluidized bed. The magnets inside the chip holder move forward and backward below the microfluidic chamber and keep the fluidized bed moving left and right thus efficient mixing inside the chip is ensured.

2.3. MELISA in microtitration plate

Suspension of magnetic biofunctionalized carrier was added into microtitration plate (25 $\mu\text{g}/\text{well}$) in sample buffer (PBS pH 7.4 with 0.05% Tween and 0.1% BSA). 100 μl of porcine hyperimmune serum prediluted by the sample buffer in range 1:30,000–1:120,000 was added and 1h incubation at RT under agitation followed. Subsequently, the particles were three times washed by PBS pH 7.4 with 0.05% Tween and 5% BSA using the magnetic separator for 96 well plates (MagnetopURE96, Chemicell, Berlin, D). Then, 100 μl of goat anti-porcine IgG marked with HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted in ratio 1: 16,000 in bicarbonate buffer pH 9.5 with 0.05% Tween and 0.1% BSA was added and incubation for 1h at RT under agitation followed. The particles were washed by PBS pH 7.4 with 0.05% Tween and 5% BSA three times and then two times with PBS pH 7.4. After that, 100 μl of substrate solution (0.003% H_2O_2 in 0.1M acetate buffer pH 5.5 with 0.1 mg/ml of substrate TMB from Immunotech Beckman Coulter, Marseille, F) was added per well. The incubation took 15 min at RT in dark. The reaction was stopped by adding 50 μl 1M H_2SO_4 and the absorbance was measured at 450 nm in microplate spectrophotometer (LabSystems Multiskan RC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

2.4. On-chip MELISA

The suspension of magnetic biofunctionalized carrier (1 mg in sample buffer) was added into microfluidic chamber via orthogonally placed syringe underneath the inlet of the chip. The magnet was switched on.

Other steps were similar to 2.3. except the washing step (continuous injection of 300 μ l) and final off-line step (adding 50 μ l 1M H₂SO₄ and microplate spectrophotometer measurement).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. On-chip behaviour and properties of various magnetic particles

Magnetic particles are made of different materials, undergo various surface modifications (pegylation, polymerization, insertion of functional groups and/or bridges enabling efficient binding of target ligands) and therefore have diverse behaviour and colloidal stability inside the microfluidic chip (Fig. 1). In this work, eleven superparamagnetic particles varying in material, structure and diameter (0.5–100 μ m) were compared. Initially, aliquot of 10 mg particles was taken from the stock solution and applied one by one (milligram) into the chip. Parameters as optimal amount of magnetic particles inside the chamber (in other words how much of the beads can be applied inside the chamber) and the maximal capacity without losing the magnetic particles were evaluated. In addition, rate of particles aggregation, clogging the chip channels by the aggregates, stability of the fluidized bed (leaking the particles out of the chip) and speed of the cloud shift (how fast the fluidized bed moves from the inlet to the outlet when the magnet is moving left and right) were observed.

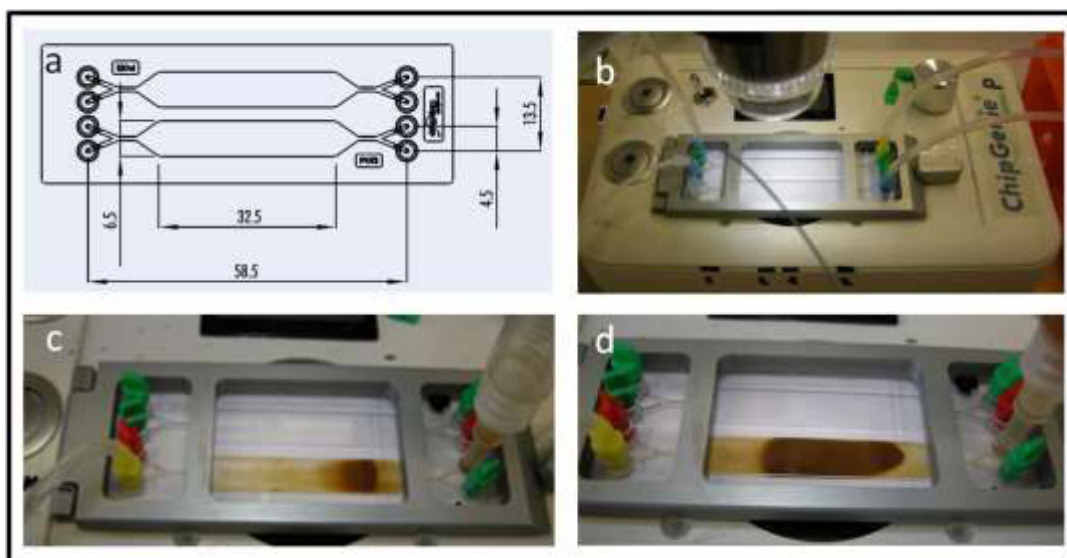


Fig. 1 (a) The microfluidic Rhombic chamber chip (120 μ l chamber volume, hydrophilized); (b) ChipGenie® edition-P chip holder (microfluidic ChipShop, Jena, D). (c) Microfluidic chamber filled with 1 mg and/or (d) 5 mg of superparamagnetic microparticles (PGMA-ALB, 4.5 μ m in PBS pH 7.4) forming a fluidized bed.

Table 1 summarizes these observations. The MPs that have the optimal parameters, such as wide working range of amount of the applied particles, low/no leaking of the particles from the chip, no aggregation of the particles, no clogging in the microfluidic channels, and that moreover had slow shift of the fluidized bed are highlighted in the table (grey) and are overall evaluated as (+). Other magnetic beads suffered especially from leaking from the chip in spite of small amount of particles inserted, also from aggregation inside the chamber and fast shift of fluidized bed caused by moving the magnets underneath the chip forward and backward. Generally, small particles (size 0.5-1.0 μ m) leaked out of the chip from the beginning as well as the biggest one (size 80-100 μ m). Probably, this is due to the low iron oxide content inside each of the small particle. In case of the big particles, we suppose that the weight vs. size ratio decrease the stability inside the chamber and the particle kinetics export them out of the chip. The particles of size 2.8 to 4.5 μ m performed the highest stability and were evaluated as the most suitable for this microfluidic device.

Table 1 Properties of various superparamagnetic particles observed in microfluidic ChipGenie® edition-P Rhombic chip

Name	Size (µm)	Opt. (mg)	Max. (mg)	Particle leaking	Agg.*	Clogg.*	Shift speed	Overall eval.*
SiMAG-NH2	0.5	2-4	6	From the beginning	yes	no	fast	-
Seradyn	0.771	1-2	4	From the beginning	no	no	very fast	-
Seradyn	0.816	1-2	5	From the beginning	yes	no	very fast	-
SiMAG-NH2	1	1-4	10	From the beginning strongly	yes	no	middle	-
Dynabeads	1	1-2	4	From the beginning strongly	no	no	fast	-
Dynabeads	2.8	2-8	10	From 8 mg weakly	no	no	slow	+
Micromer	3	2-5	10	From 5 mg weakly	no	no	middle	+
Micromer	4	2-8	10	From 9 mg weakly	no	no	middle	+
PGMA-ALB	4.5	1-6	10	From 8 mg weakly	no	no	slow	+
HMP-S-MG4	5.7	1-5	9	From the beginning weakly	no	at 9 mg	slow	-
Iontosorb M-OH	80-100	1-2	6	From 3 mg strongly	yes	at 6 mg	fast	-

* Agg. – aggregation; Clogg. – clogging; Eval. – evaluation

3.2. On-chip MELISA

Micromer particles (4 µm in diameter and amino functional group) were selected as the most suitable according to previous experiments for the MELISA application inside the microfluidic chip. The microparticles were coated with specific antigen (chymotrypsin) and such bioactive carrier (1 mg) was applied simultaneously into the reaction chamber of microfluidic chip and into the microtitration plate (see Fig. 2). So far, the incubation time was for both arrangements the same although we plan to shorten the incubation time for on-chip application.

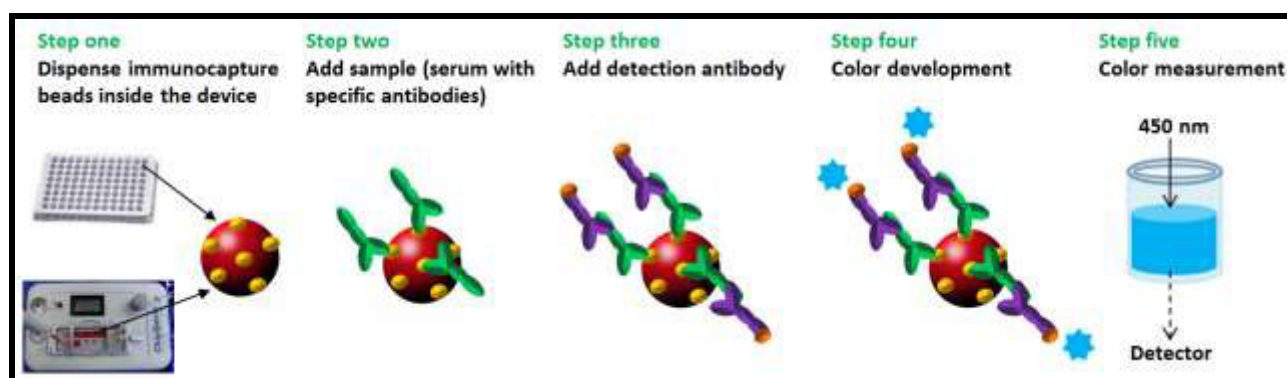


Fig. 2 Principle of MELISA (Magnetic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) inside the microtitration plate and/or the microfluidic chip (ChipGenie® edition-P, ChipShop, Jena, D).

The preliminary results from MELISA performed in microtitration plate and in the microfluidic chip are presented in Fig. 3. The same protocol for determination of anti-chymotrypsin antibodies in hyperimmune porcine serum was repeated in three subsequent days on always fresh aliquot of the bioactive carrier with immobilized chymotrypsin. The data from the three measurements in microtitration plate and their trend lines

are shown in Fig. 3 (black symbols). The coefficient of determination (R^2) were for day 1 (0.986), for day 2 (0.906) and for day 3 (0.845). The standard deviation between the three measurements in microtitration plate for each serum dilutions were: 1:30,000 (0.057); 1:40,000 (0.120); 1:60,000 (0.081); 1:80,000 (0.065); 1:120,000 (0.029). The results from the on-chip application, for serum dilution 1:30,000, are also presented in Fig. 3 (colored symbols) and their values went along the trend of the results from the microtitration plate. The highest values were achieved in the day 2 as well as the lowest values in day 3. The standard deviation among the three subsequent measurements in microfluidic setup was 0.183. Such variability between the measurements were probably due to the technique of the final sample volume uptake from the outlet of the device. We are now about to develop a robust technique which would enable us to reach the more reproducible results.

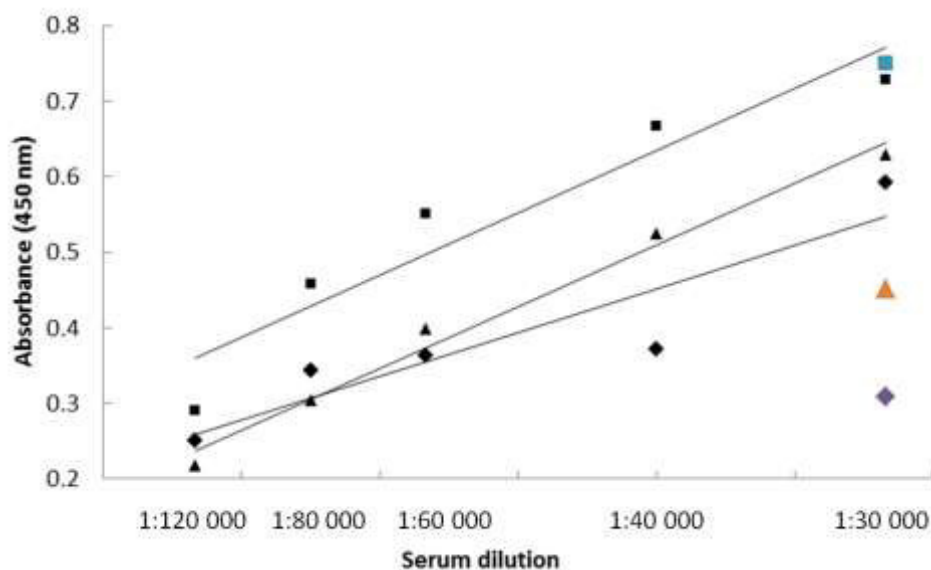


Fig. 3 The results from MELISA determination of anti-chymotrypsin specific antibodies in hyperimmune porcine serum (high titer of specific antibodies to chymotrypsin). The measurement of 5 different serum dilutions was repeated in 3 subsequent days. The black symbols correspond to results from MELISA on microtitration plate and the colour symbols correspond to on-chip MELISA (only for dilution 1:30,000).

The day one (triangle), the day two (square), the day three (rhombus).

In these preliminary results 1 mg of magnetic biofunctionalized carrier was employed for fluidized bed formation inside the microfluidic chamber. In the future experiments we would like to use higher amount of particles up to maximal limit for the microfluidic chamber to test the maximal capacity of the device for specific antibody capture and detection via on-chip MELISA. Moreover, we would like to test the stop-flow repetitive sample addition and incubation with the biofunctionalized carrier in on-chip arrangement, preconcentrate the specific antibodies inside the chamber and perform a subsequent elution and collection of the isolated specific antibodies for further analysis or experiments. In the future, we would like to apply the improved and optimized microfluidic setup for anti-amyloid β antibodies isolation/detection from the Ivlg samples since such natural antibodies have potentially neuro-protective effect and therapeutic potential for the treatment of patients with Alzheimer disease [11].

CONCLUSION

The on-chip MELISA is an efficient and easy method applied for specific antibody isolation and detection. The preliminary data presented here were obtained with the model system represented by chymotrypsin and the specific anti-chymotrypsin antibodies isolated from hyperimmune porcine serum. The promising results encouraged us in future work that we would like to focus on improving the sample uptake from the chip with

the aim to enhance the data reliability and robustness. In addition, modification of the procedure for maximization of the amounts of isolated specific antibodies in minimal volume ensuring low diffusion and dilution of the target antibodies will be tested. This technique has high potential for automation and parallelization that enables to perform more efficient and thus significantly less time-consuming assay.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support of the European Union's projects LOVE-FOOD (No. 317742) and NADINE (No. 246513) are gratefully acknowledged as well as the financial support of the student grant of Faculty of Chemical Technology at University of Pardubice No. SGFCHT07/2015.

REFERENCES

- [1] SACKMANN, E.K., FULTON, A.L. and BEEBE, D.J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, vol. 507, no. 7491, 2014, pp. 181-189.
- [2] GIJS, M.A.M. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 1, no. 1, 2004, pp. 22-40.
- [3] DE CAMARGO, Z.P., GUESDON, J.L., DROUHET, E. and IMPROVISI, L. Magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*, vol. 22, no. 4, 1984, pp. 291-299.
- [4] NAGASAKI, Y., KOBAYASHI, H., KATSUYAMA, Y., JOMURA, T. and SAKURA, T. Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 5/15, vol. 309, no. 2, 2007, pp. 524-530.
- [5] KALA, M., BAJAJ, K. and SINHA, S. Magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detects antigen-specific binding by phage-displayed scFv antibodies that are not detected with conventional ELISA. *Analytical Biochemistry*, vol. 254, no. 2, 1997, pp. 263-266.
- [6] HERRMANN, M., VERES, T. and TABRIZIAN, M. Enzymatically-generated fluorescent detection in micro-channels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic ELISA. *Lab Chip*, vol. 6, no. 4, 2006, pp. 555-560.
- [7] VERGAUWE, N., VERMEIR, S., WACKER, J.B., CEYSSSENS, F., CORNAGLIA, M., PUERS, R., GIJS, M.A.M., LAMMERTYN, J. and WITTERS, D. A highly efficient extraction protocol for magnetic particles on a digital microfluidic chip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 196, no. 0, 2014, pp. 282-291.
- [8] AYTUR, T., FOLEY, J., ANWAR, M., BOSER, B., HARRIS, E. and BEATTY, P.R. A novel magnetic bead bioassay platform using a microchip-based sensor for infectious disease diagnosis. *Journal of Immunological Methods*, vol. 314, no. 1-2, 2006, pp. 21-29.
- [9] ŠÁLEK, P., HORÁK, D. and BABIŠ, M. PEG-modified magnetic hypercrosslinked poly (styrene-co-divinylbenzene) microspheres to minimize sorption of serum proteins. *Reactive and Functional Polymers*, vol. 73, no. 8, 2013, pp. 1122-1129.
- [10] HORAK, D., SVOBODOVA, Z., AUTEBERT, J., COUDERT, B., PLICHTA, Z., KRALOVEC, K., BILKOVA, Z. and VIOVY, J. Albumin-coated monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with immobilized antibodies: Application to the capture of epithelial cancer cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 101A, no. 1, 2013, pp. 23-32.
- [11] SZABO, P., RELKIN, N. and WEKSLER, M.E. Natural human antibodies to amyloid beta peptide. *Autoimmunity Reviews*, vol. 7, no. 6, 2008, pp. 415-420.

4.6 Článek VI

Different approaches for preparation of AuNPs-based conjugates as a signal-generating unit for electrochemical biosensors

Pavla Murasová*, Aneta Kovářová, Jana Srbová, and Zuzana Bílková

Department of Biological and Biochemical Sciences, University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice, Czech Republic

Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A; Faculty of Chemical Technology (2018), 24, 109-118

Odborný recenzovaný článek bez IF

Podíl autorky na uvedené práci: Podíl autorky na této práci a stejně tak na psaní publikace je většinový. S výjimkou elektrochemického měření prováděla autorka veškeré experimenty. Procentuálně lze podíl na publikaci vyjádřit jako 90%



Different approaches for preparation of AuNPs-based conjugates as a signal-generating unit for electrochemical biosensors

Pavla Murasová*, Aneta Kovářová, Jana Srbová, and Zuzana Bílková

*Department of Biological and Biochemical Sciences,
The University of Pardubice, CZ–532 10 Pardubice, Czech Republic*

Received: June 4, 2018; Accepted: August 15, 2018

With the advent of micro- and nanotechnology, major advances and breakthroughs have taken place in many areas, such as biotechnology, medicine, pharmacy or material industry. Gold nanoparticles (AuNPs) with their unique optical and physical properties as well as biocompatibility have already proved themselves to be powerful tool in biological applications. In this work, AuNPs were selected as a potential electrochemically active label. With the aim to use them as an electrochemical active tag, two types of AuNPs were tested and suitable protocols for their functionalization were optimized. Non-functionalized AuNPs were modified with thiolated DNA oligonucleotides using Au-S bond. Such conjugates could be potentially used as a DNA probe. Functionalized AuNPs containing carboxyl groups were also modified, but with specific antibodies. In this case, the goal was to optimize suitable protocol for effective modification performed with carbodiimide crosslinker enabling direct and covalent immobilization. Finally, quality of AuNPs-IgG was defined by experiments via detection of bacterial cells in model samples.

Keywords: Gold nanoparticles; Bioconjugation; Label; Immunosensor

Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) are defined as a stable colloidal solution of clusters of individual atoms of gold in the size range from 1 to 100 nm [1]. Because of their very small dimensions, they differ in physical and chemical properties

* Corresponding author, ✉ Pavla.Murasova@upce.cz

compared to other small species or gold in common elementary form; in fact, AuNPs behave like a giant molecule [2]. In addition, this form of gold is characterized by a high absorption coefficient which ensures sufficiently high sensitivity for optical detection [3]. Thanks to yet another unique feature, which is surface oscillation (used for signaling, imaging and sensor technology), AuNPs are advantageously used in the field of biomedicine and biotechnology. They are routinely used in microscopic imaging methods or in therapy as drug delivery systems. Their use is also important in diagnostics to detect not only biomolecules as nucleic acids or proteins but also whole bacteria cells [4].

For modification of AuNPs by oligonucleotides, different types of chemical bonds can be used. One of the most common linkages between thiolated oligonucleotides and gold molecule is the Au-S binding. Due to the high affinity of the thiol group toward gold atoms, a very stable conjugate is then formed [5]. AuNPs are negatively charged, as well as the entire DNA molecule, resulting in the repulsive forces. This can be avoided by the process of gradually salting the solution with sodium chloride during the reaction [6–7]. The binding buffer and pH are also decisive, needing to be optimized.

Another type of binding between AuNPs and biomolecules could be via additional functional groups. These can be immobilized onto the surface of AuNPs by functionalizing heterobifunctional polyethyleneglycol (PEG) with a thiol group at one end of the chain. On the second end of the chain, one can attach e.g. biotin, lectin, fluorescent label or different functional groups, such as amino group (-NH₂) or carboxyl group (-COOH) subsequently applicable, for example, to bind the protein [8].

The main goal of this work was to optimize the binding strategy for modification of AuNPs with thiolated oligonucleotides or specific antibodies. Two different types of AuNPs, two different bonds and two different types of biomolecules were selected for preparation of conjugates potentially usable as a signal generating molecule for electrochemical biosensors.

In one case, we used particles of colloidal gold without any functional group on their surface to prepare the DNA-oligonucleotides conjugates as a potential probe for detection of food borne pathogens by using a piezoelectric biosensor. Four different protocols for binding between thiolated DNA oligonucleotides and AuNPs basically rising from previously published papers had been applied [9–11]. In the second part of this work, AuNPs functionalized with PEG introducing carboxyl groups on their surface were modified by specific anti-*Listeria* antibodies. This second type of conjugate was finally tested as a part of electrochemical immunosensor for detection of whole bacterial cells in some model samples.

Materials and methods

Reagents and Chemicals

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), the sodium salt of N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), acrylamide, *N,N'*-methylene-*bis*-acrylamide, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate, glutaraldehyde, silver nitrate were purchased from Sigma-Aldrich. Other chemicals were of analytical grade and obtained from Penta (Chrudim, Czech Republic). All buffers were prepared from ultrapure water using a TKA purification system (model "Smart2Pure"; Thermo Scientific TKA, Niederelbert, Germany).

Gold nanoparticles, magnetic particles, antibodies, and oligonucleotides

A suspension of gold nanoparticles (with 10 nm in diameter) stabilized in citrate buffer was purchased from Sigma-Aldrich. PEG-AMINO 3500 functionalized gold nanoparticles (20 nm) were from Orion High Technologies (Madrid, Spain). A pure proteome Protein "A" magnetic beads were from Merck. Polyclonal antibodies (polyAb): rabbit anti-*Listeria* ssp. antibodies (concentration: 4–5 mg mL⁻¹) were provided by Virostat (Portland, ME, USA). 5'-Thiol (C6)-CAA ATC TTA TTT TCT TTT CAC CTT CTC TCT-Cy3-3' DNA oligonucleotides were from Friz Biochem (Neurid, Germany).

Probe oligonucleotide-gold nanoparticles conjugation

For conjugation of AuNPs with oligonucleotides four different protocols were used; for details, see Table 1. Thiolated DNA oligonucleotides were treated with TCEP for 45 min. to cleave the disulfide bounds. Thereafter DNA oligo-nucleotides were desalted using an NAP-5 column and mixed with the AuNPs in ratio 46:1 (AuNPs:oligo). After incubation, the samples were spin for 30 min. under 13 000 rpm, the supernatant with unbound DNA oligonucleotides was removed, conjugates washed one time and resuspended in the appropriate buffer. For quantification of the bound DNA oligonucleotides, a fluorescence spectrophotometric method was used. Due to this, fluorescently labeled oligonucleotides were used for these optimizing steps. All the measurements were performed using an Infinite M200 well-plated reader (Tecan, Salzburg, Austria). The concentration of bound oligonucleotides was calculated from the respective calibration curve.

Table 1 Overview of binding protocols / procedures

Gold nanoparticles		Oligonucleotides	Binding	
Size [nm]	Concentration of AuNP in reaction [nmol]	Concentration of oligonucleotides in reaction [nmol]	Protocol	
1			Incubation for 4 h under 37 °C; in water ; salt stabilization 0.1M NaCl, overnight 38 °C	
2	10	230	5	
3				10 mM citrate-HCl buffer pH 3 ; lab. temp. incubation 10 min.; salt stabilization 0.3 M NaCl; lab. temp. incubation 20 min
4				5 mM HEPES buffer pH 9 ; 16 h incubation at lab. temp.; than salt stabilization 0.1 M NaCl.
			10mM PBS buffer pH 7.4 , 16 h incubation at lab. temp.; add 0.01% SDS , salt stabilization 1M NaCl, 30 min incubation at lab. temp.	

Conjugation of gold nanoparticles with antibodies

Anti-*Listeria* antibodies were immobilized on the surface of AuNPs by one- or two-step carbodiimide method in different ratio of AuNPs and antibodies. In the case of one-step method, all the reagents were mixed at the same time (300 µg of EDC, 50 µg of sulfo-NHS, 30 µg of AuNPs and 15 resp. 30 µg of antibodies depending on the ratio chosen). In the case of two-steps method, particles were firstly preactivated with EDC and sulfo-NHS for 10 minutes, washed, and antibodies were added to pre-activated particles at the aforementioned ratios. Particles with antibodies were incubated overnight moderately rotated at 4 °C. After incubation, the particles were washed and the complex antibody-AuNPs purified on Pure proteome protein "A" magnetic particles to remove the unbound (naked) AuNPs. The binding efficiencies were determined indirectly using a standard of tris/glycin SDS-PAGE, followed with silver staining and densitometric detection. The amount of immobilized antibodies was calculated from the difference in the densities of antibodies in the initial solution and the total antibodies in the supernatant after completing the immobilization and washing steps. Prepared conjugates were checked by electrochemical detection via conditions specified in the next paragraph.

Electrochemical detection of *Listeria* ssp. bacteria cells

Magnetic immunosorbent with specific anti-*Listeria* antibodies (0.1 mg, prepared according to previously published [12]) was mixed with 50 µL of PBS buffer containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) spiked with 500 *Listeria* CFU and with 75 µL of the electrochemically active probe (75 µL containing 7.5 µg of AuNPs and 7.5 resp. 3.75 µg of Ab).

In the case of negative control, 50 μL of PBS-T buffer was used instead of bacteria suspension. Incubation for 1 hour at room temperature took place under rotation regime. After that, the resulting magnetic particle-bacteria-conjugate complexes were magnetically separated and washed five times with 1 mL of PBS-T buffer. All electrochemical measurements were performed with a portable PalmSens interface (PalmSens, GA Houten, The Netherlands) controlled by software PStTrace 4.8 (the same manufacturer) and connected with a screen-printed three-electrode system with carbon as the working and auxiliary electrodes and a silver pseudo-reference (DropSens, Spain) completing the cell.

The *Listeria* cells were detected after 5 min. incubation in the presence of 100 μL 0.1 M HCl. The Au(III) ions were monitored by square-wave cathodic stripping voltammetry (SWCSV) coupled with the SPC-3-EL-cell. Parameters of the SWV ramp were as follows: deposition potential, 1.2 V for 180 s; condition potential, 0.15 V for 120 s; potential range, 1.2 V – 0.0 V vs. ref.; step potential, –0.003 V; pulse amplitude, 0.02805 V; and SWV-frequency, 25 Hz.

Results and discussion

In this work, we have tested potential of AuNPs as an electrochemically active label especially for their unique optical and physical properties. Our goal was to prepare conjugates using different types of particles and different types of analyte bound onto their surface.

AuNPs are usually prepared by citrate reduction method and stabilized via the negative charges by citrate ions [13–14]. Under standard conditions, the DNA molecules are highly negatively charged and being repelled by AuNPs. To screen the negative charge of AuNPs, a solution with high concentration of NaCl should be added although this addition of highly concentrated salt may lead to the irreversible aggregation of particles. This problem can be solved by the process called "salt aging", when such a salt is gradually added together with the molecules of DNA. While DNA is still at an excess against the salt, the aggregation of particles is then prevented. In this work, four various protocols working with different buffers and different processes using the salt aging method were performed and compared; see Table 1. The proposed procedures were taken from the literature and modified. For optimizing steps, the DNA molecules labelled with fluorescent tag Cy3 were used for easier determination of capture efficiency, when the intensity of fluorescence correlated with the concentration of bound DNA oligonucleotides. The capture efficiency expressed by numbers of DNA chains bound on the surface of AuNPs was calculated from calibration curve. Because there exists a mathematical relationship for predicting suitable saturation of the nanoparticles surface with oligonucleotides, we could compare our results with theoretical assumption. Namely, one should bound around 68 ± 10 chains per one unit of AuNP with diameter 10 nm.

We were not far from this prediction, so there was no need to change the protocol to increase the capture efficiency. Except the binding in water (63 chains of DNA per one AuNP), there were no significant differences among the individual protocols; see Fig. 1. The most effective was the procedure with 10mM PBS containing 0.01% SDS used as the detergent avoiding undesirable aggregation of AuNPs. We could estimate that, by this protocol, 154 of DNA oligonucleotide chains were bound on the surface of one nanoparticle. For future application, protocol with citrate buffer was chosen. As we have estimated, around 134 of DNA oligonucleotide chains were bound on the surface of one nanoparticle. Moreover, from the sufficient binding efficiency, this protocol was not time-consuming and the conjugates could be prepared in 1.5 hours.

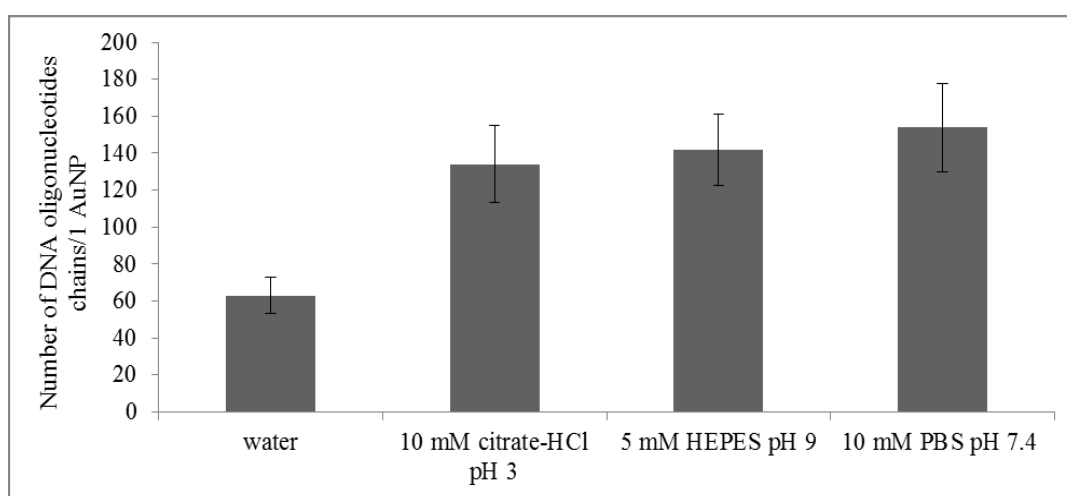


Fig. 1 Immobilization of reduced oligonucleotides on AuNPs in four different buffers

Second part deals with the modification of AuNPs by antibodies via crosslinker. On the surface of AuNPs containing functional groups, the specific anti-*Listeria* antibodies were bound. One- or two-step carbodiimide methods were tested. In addition, the different ratios of AuNPs and antibodies (1:1 or 2:1, resp.) were optimized. The advantage of one-step method is the absence of washing which extends analysis time. On the other hand, this washing step removes redundant reagents that could affect the subsequent procedures so we had to evaluate the quality and quantity of final product. The binding efficiencies were estimated by the SDS-PAGE via densitometry evaluation. Binding efficiencies were expressed as the percentage of molecules of antibodies immobilized onto the surface of AuNPs versus the initial amount of antibodies used for immobilization. As shown in Fig. 2, concerning the one-step method, the capture efficiency of antibodies was around 68 % (initial ratio of AuNPs:Ab was 1:1) and in the case of two time surplus of AuNPs (initial ratio 2:1) the capture efficiency was around 60 %. In the case of two-step method, the binding efficiency was substantially lower, being around 36 % resp. 31 %.

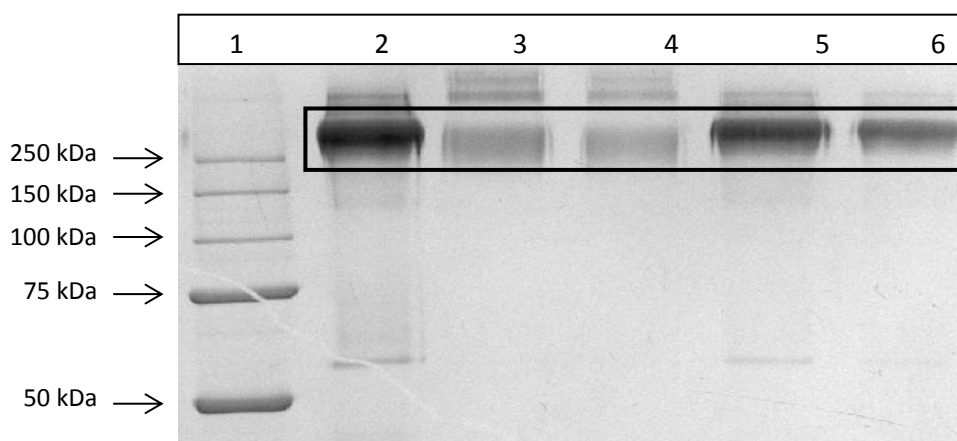


Fig. 2 SDS-PAGE analysis followed by silver staining Lanes

- 1 – molecular weight marker (10–250 kDa); 2 – initial experiment (sample);
 3 – binding fraction of one step carbodiimide method – AuNPs:Ab ratio 1:1;
 4 – binding fraction of one step carbodiimide method – AuNPs:Ab ratio 2:1;
 5 – binding fraction of two steps carbodiimide method – AuNPs:Ab ratio 1:1;
 6 – binding fraction of two steps carbodiimide method – AuNPs:Ab ratio 2:1.

Prepared conjugates (contaminated by naked AuNPs) were purified by magnetic particles containing protein "A". This substance specifically bound antibodies via their Fc fragments so that the conjugates had consisted of antibodies and AuNPs could be captured. Naked AuNPs that might affect subsequent experiments were thus separated off. To control the nonspecific sorption of AuNPs on carrier with protein "A", the aliquot of naked particles was used. In Fig. 3, one can see a voltammogram with the efficient quantitative elution of conjugated molecules from carrier with protein "A". In the case of all four conjugates, the current signals were monitored being typical for gold with appropriate peak height (-1.049 , -0.695 , -1.2 , and -1.759 μA). These results have suggested us successful preparation and purification of anti-*Listeria* conjugates.

The functionality and usability of these conjugates were then verified by model samples with *Listeria* cells. For preliminary experiments, two conjugates were used (prepared by one- or two steps method with initial ratio of AuNPs:Ab 2:1). Conjugates were mixed together with anti-*Listeria* magnetic immunosorbent and sample spiked with *Listeria* cells. During 60 min. incubation, *Listeria* cells should be captured by magnetic immunosorbent and so caught cells were labelled with the conjugates at the same time. After incubation, these complexes were captured from the samples (due to magnetic immunosorbent), washed, and the signal generated from electrochemically active conjugate measured on SPCE. In Fig. 4, a voltammogram with positive and negative control is drawn clearly showing the differences. The signals of both negative controls were nearly 0 μA and for positive samples provided signals -0.157 μA and 0.165 μA , resp. These results indicate that the prepared conjugates give rise to an electrochemically measurable signal enabling to distinguish the samples with *Listeria* cells from negative samples.

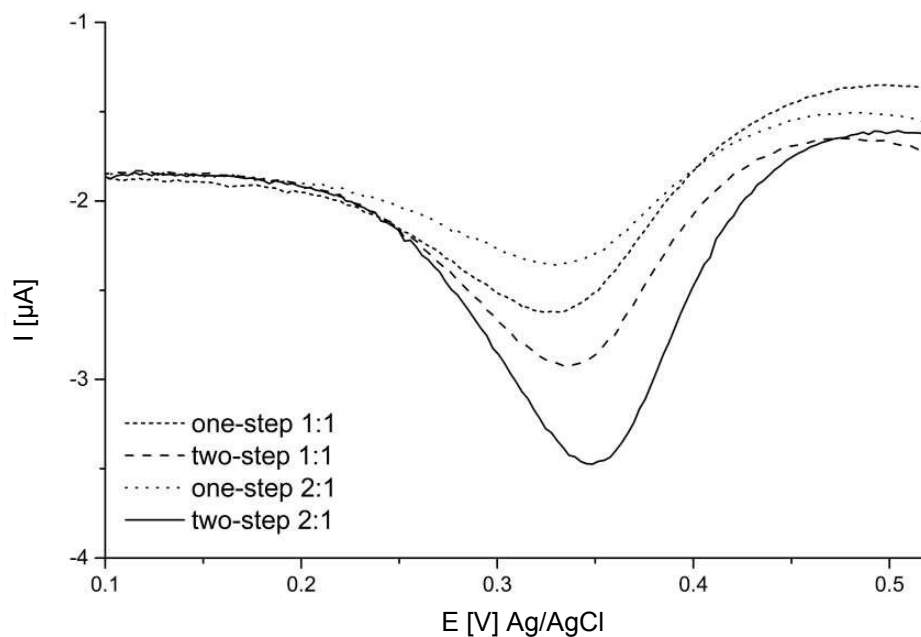


Fig. 3 Square-wave voltammograms of conjugates prepared one- or two-step method and with different ratio of AuNPs and anti-Listeria antibodies

Measurements were performed with SPCE under conditions for electrochemical detection specified in the experimental part ("Materials and methods").

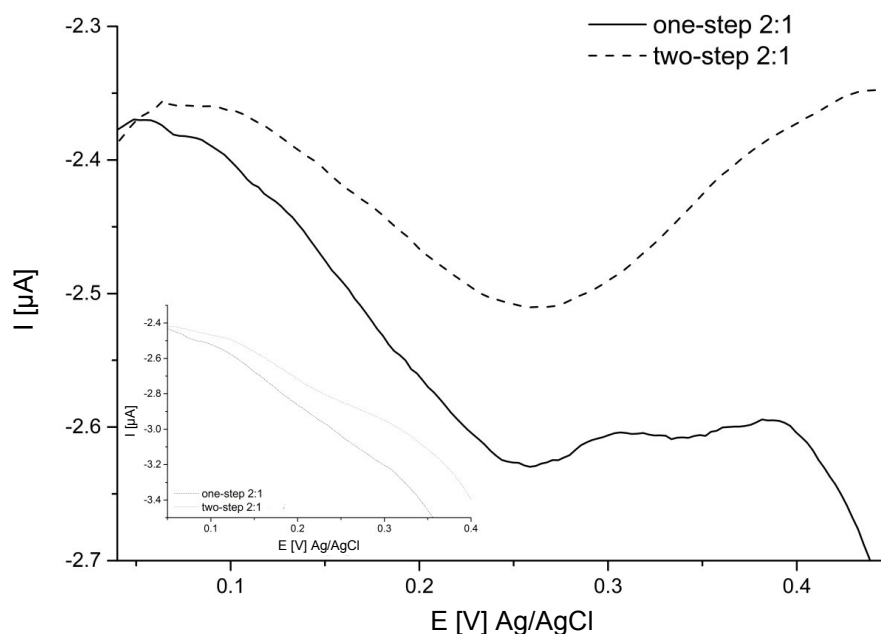


Fig. 4 Square-wave voltammograms of *Listeria*-cells detection with the aid of conjugates prepared and serving as a part of biosensor

Initial ratio of AuNPs:Ab is 2:1, both one- and two- steps method are compared. Measurements were performed with SPCE under conditions for electrochemical detection specified in Experimental. Voltammogram with negative control is inserted.

Conclusions

This work deals with the modification of AuNPs for their future use as a signal generating unit in biosensor configurations. Two types of AuNPs were chosen. Non-functionalized nanoparticles were used for conjugation with thiolated DNA oligonucleotides to create the DNA probe. This bond utilizes the affinity of surface of the colloidal AuNPs and thiol-conjugated DNA oligonucleotides. The main problem was to be repulsion between the negatively charged nanoparticles and DNA strains, which could however be eliminated using salt-aging protocol. In this work, we successfully modified AuNPs by thiolated oligonucleotides with four various protocols. Such prepared DNA probe could then be used in other applications; e.g., for detection with piezoelectric biosensor.

The second type of AuNPs had had functional carboxyl groups. On such type of particles, various proteins should be bound with the help of carbodiimide crosslinker via the respective amino groups. We have tried to optimize the most effective procedure that would provide the most useful conjugate. Such conjugates are meant to be applied as the electrochemically active part of biosensor for detection of bacteria. Regarding this, we were able to prepare the conjugates of AuNPs and anti-*Listeria* antibodies. These conjugates were found electrochemically active and, during preliminary experiments, it was confirmed that they could be used as a part of electrochemical biosensors for detection of bacteria cells.

Acknowledgement

This work was supported by the European Union's LOVE-FOOD 2 MARKET project under the contract No. 687681.

References

- [1] Parida U.K., Biswal S.K., Nayak P.L., Bindhani B.K.: Gold nano particles for biomedical applications. *World Journal of Nano Science and Technology* **2** (2013) 47–57.
- [2] Zhang X.: Gold Nanoparticles: Recent advances in the biomedical applications. *Cell Biochemistry and Biophysics* **72** (2015) 771–775.
- [3] Parida U.K., Nayak P.L.: Biomedical applications of gold nanoparticles: opportunity and challenges. *World Journal of Nano Science and Technology* **1** (2012) 10–25.
- [4] Das M., Shim K.H., An S.S.A., Yi D.K.: Review on gold nanoparticles and their applications. *Toxicology and Environmental Health Sciences* **3** (2011) 193–205.
- [5] Su S., Zuo X.L., Pan D., Pei H., Wang L.H., Fan C., Huang W.: Design and applications of gold nanoparticle conjugates by exploiting biomolecule-gold nanoparticle interactions. *Nanoscale* **5** (2013) 2589–2599.

- [6] Hurst S.J., Lytton-Jean A.K.R., Mirkin C.A.: Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Analytical Chemistry* **78** (2006) 8313–8318.
- [7] Herne T.M., Tarlov M.J.: Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **119** (1997) 8916–8920.
- [8] Tiwari P., Vig K., Dennis V., Singh S.: Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomaterials* **1** (2011) 31–63.
- [9] Hill H.D., Millstone J.E., Banholzer M.J., Mirkin C.A.: The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles. *ACS Nano* **3** (2009) 418–424.
- [10] Zhang X., Servos M.R., Liu J.: Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route. *Journal of the American Chemical Society* **134** (2012) 7266–7269.
- [11] Chen S., Wu V.C.H., Chuang Y., Lin C.: Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor. *Journal of Microbiological Methods* **73** (2008) 7–17.
- [12] Srbova J., Krulisova P., Holubova L., Pereiro I., Bendali A., Hamiot A., Podzemna V., Macak J., Dupuy B., Descroix S., Viovy J.-L., Bilkova Z.: Advanced immunocapture of milk-borne Salmonella by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed. *Electrophoresis* **39** (2018) 526–533.
- [13] Turkevich J.: Colloidal gold. Part II. *Gold Bulletin* **18** (1985) 125–131.
- [14] Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A.: Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry* **110** (2006) 15700–15707.

5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývala biofunkcionalizací magnetických mikročásteček a konjugací zlatých nanočásteček s bioaktivní složkou. Vzniklé nosiče a biokonjugáty byly vyvíjeny jako součást analytických metod, kde se kombinovaly fyzikální a chemické vlastnosti kovových částic s biologickými vlastnostmi ligandů vázanými na jejich povrchu. Navázáním specifických protilátek nebo peptidů na povrch magnetických částic vznikly tzv. nosiče, které byly použity např. ke specifické izolaci a purifikaci bakteriálních buněk ze vzorků mléka nebo vybraných mléčných výrobků nebo k izolaci klinicky významných protilátek ze vzorků lidského séra. Zlaté nanočástečky a jejich elektrochemické vlastnosti byly využity pro přípravu biokonjugátů jako jednu z částí elektrochemického senzoru pro přímý průkaz patogenních bakterií v mléce.

Největší část práce byla věnována přípravě imunosorbentů na bázi magnetických mikročásteček a jejich použití pro izolaci bakteriálních buněk ze vzorků mléka. Zde se jednalo o kombinaci krátkodobé pomnožovací fáze a imunomagnetické separace. Cílem bylo eliminovat časově náročnou pomnožovací fázi (řádově desítky hodin) doposud v praxi běžně používanou. Pomocí námi vyvinutého imunosorbentu bylo dosaženo velmi dobrých výsledků vazebné účinnosti. Byly optimalizovány podmínky účinné izolace z normovaných 25 ml výchozího vzorku, v našem případě kravského mléka nebo homogenizovaného sýru Ricotta. Imunosorbent dále vykazoval výbornou selektivitu i v přítomnosti kompetitivní bakteriální kultury, která byla v mnohonásobném přebytku. Dále bylo experimentálně potvrzeno, že tento nosič lze použít i jako integrální součást mikrofluidního zařízení. Průkaz patogenních bakteriálních buněk probíhal na LOC platformě spolu s integrovanými korky lyze bakteriálních buněk s DNA amplifikací a akustickou detekcí. Tato metoda poskytla v souladu s legislativou dostatečnou citlivost pro průkaz bakteriálních buněk, kdy celkový čas analýzy nepřekročil 4 hodiny. Mohlo by se tedy jednat o vhodnou variantu pro terénní testování potravinových, ale i klinických vzorků, kdy nelze využít klasických konfirmačních metod. Navíc s ohromným benefitem úspory času a bez nutnosti složitějšího přístrojového vybavení.

Vedle moderních biosenzorů a LOC platform se magnetické nosiče mohou s výhodou používat i u tradičních metod, jakými je např. metoda ELISA. Magnetické nosiče zde mohou být využity jako pevná fáze za účelem zvýšení citlivosti metody a zkrácení inkubačních dob

v jednotlivých krocích imunoeseje. V našem případě jsme tuto metodu využili k detekce anti-A β 1-42 protilátek ze sér pacientů s Alzheimerovou chorobou. Stěžejním krokem byla příprava magnetického nosiče. Námi sestavená magnetická ELISA se ukázala jako vhodná alternativa, avšak ještě je nutné více zpracovat na povrchové modifikaci magnetického nosiče, především z hlediska nespecifické sorpce nežádoucích proteinů a balastních složek ze séra, které působí při stanovení velmi rušivě.

V další fázi výzkumu jsme se rozhodli experimentálně ověřit, zda je možné sestavit biosenzor pro průkaz bakteriálních buněk vyskytujících se v malých koncentracích v komplexním a vysoce heterogenním materiálu. Naše strategie se opírala o kombinaci velmi specifického a selektivního magnetického nosiče (popsaného výše) s elektrochemicky aktivním konjugátem. Konjugátem byla v tomto případě anti-salmonelová protilátka značená CdTe kvantovými tečkami, ale pro zvýšení intenzity signálu byl do konstrukce konjugátu zakomponován i multifunkční dendron. Ukázalo se, že kombinací kvantových teček a dendronů vznikla citlivá elektrochemická značka, jejíž využití nebylo doposud nikde publikováno. V kombinaci s účinnou izolací pomocí magnetického nosiče vznikl tedy velmi citlivý imunosenzor s možností využití pro rychlou a levnou detekci bakteriálních kontaminací. Vedle toho byly jako potenciální elektrochemické značky testovány i konjugáty na bázi AuNPs pro průkaz kontaminace bakterií *Listeria monocytogenes*. Avšak naše dosavadní výsledky neposkytují potřebnou citlivost.

Závěrem lze konstatovat, že jednou z nejdůležitějších součástí biosenzorů, která jasně rozhoduje o jeho analytických parametrech, je konjugát nesoucí signál generující značku. Další výhodou přináší i spojení elektrochemického senzoru s imunomagnetickou separací, kdy získáme analyt v dostatečné koncentraci a kvalitě. Možnost integrovat celý systém do LOC platformy je dalším benefitem, který tato technika přináší. Mohou tak vzniknout integrované detekční platformy na principu LOC pro rychlé a přesné testování vzorků, což dnes hraje s ohledem na ochranu lidského zdraví klíčovou roli.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] W.R. Algar, A Brief introduction to traditional bioconjugate chemistry ,Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions: Concepts and Applications. (2017), 3–36, <https://doi.org/10.1002/9783527683451>.
- [2] K. Splith, W. Hu, U. Schatzschneider, R. Gust, I. Ott, L.A. Onambele, A. Prokop, I. Neundorf, Protease-activatable organometal–peptide bioconjugates with enhanced cytotoxicity on cancer cells, *Bioconjug. Chem.* 21(7) (2010), 1288–1296, <https://doi.org/10.1021/bc100089z>.
- [3] J.B. Delehanty, I.L. Medintz, T. Pons, F.M. Brunel, P.E. Dawson, H. Mattoussi, Self-assembled quantum dot–peptide bioconjugates for selective intracellular delivery, *Bioconjug. Chem.* 17(4) (2006), 920–927, <https://doi.org/10.1021/bc060044i>.
- [4] V. Mani, D.P. Wasalathanthri, A.A. Joshi, C.V Kumar, J.F. Rusling, Highly efficient binding of paramagnetic beads bioconjugated with 100 000 or more antibodies to protein-coated surfaces, *Anal. Chem.* (2012), 84(23), 10485–10491, <https://doi.org/10.1021/ac3028257>.
- [5] H. Liao J.H. Hafner, Gold nanorod bioconjugates, *Chem. Mater.* (2005), 17(18), 4636–4641, <https://doi.org/10.1021/cm050935k>.
- [6] Y-Y. Liang L-M. Zhang, Bioconjugation of papain on superparamagnetic nanoparticles decorated with carboxymethylated chitosan, *Biomacromolecules.* (2007), 8(5), 1480–1486, <https://doi.org/10.1021/bm061091g>.
- [7] A. Banerjee, T. Pons, N. Lequeux, B. Dubertret, P. Marie, B. Dubertret, Quantum dots – DNA bioconjugates: synthesis to applications *Interface Focus.* (2016), 6(6), <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0064>
- [8] J.E. Smith, L. Wang, W. Tan, Bioconjugated silica-coated nanoparticles for bioseparation and bioanalysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* (2006), 25(9), 848–855, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.03.008>.
- [9] R.A. Sperling, P. W.J. Parak, Surface modification , functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* (2010), 368, 1333–1383,

- <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>.
- [10] R. He, X. You, J. Shao, F. Gao, B. Pan, D. Cui, Core/shell fluorescent magnetic silica-coated composite nanoparticles for bioconjugation, *Nanotechnology*. (2007), 18(31), 1-7, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/31/315601>.
- [11] J-F. Lutz H. G. Börner, Modern trends in polymer bioconjugates design, *Prog. Polym. Sci.*, (2008), 33(1), 1–39, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.07.005>.
- [12] Y-D. Zhu, J. Peng, L-P. Jiang, J-J. Zhu, Fluorescent immunosensor based on CuS nanoparticles for sensitive detection of cancer biomarker, *Analyst*. (2014), 139(3), 649–655, <https://doi.org/10.1039/C3AN01987J>.
- [13] S. Salmaso, S. Bersani, A. Semenzato, P. Caliceti, New cyclodextrin bioconjugates for active tumour targeting, *J. Drug Target*. (2007), 15(6), 379–390, <https://doi.org/10.1080/10611860701349752>.
- [14] G.T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*. třetí vydání, (2013), Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00002-9>
- [15] M. Varshney, L. Yang, X. Su, Magnetic Nanoparticle-Antibody Conjugates for the Separation of Escherichia coli O157 : H7 in Ground Beef, *J. Food. Prot.* (2005), 68(9), 1804–1811, <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.9.1804>.
- [16] I. Safarik, M. Safarikova, Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J. Chromatogr. B.* (1999), 722, 33–53, [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00338-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00338-7).
- [17] M.G. Manera, G. Pellegrini, P. Lupo, V. Bello, C.J. Fernández, F. Casoli, S. Rella, C. Malitesta, F. Albertini, G. Mattei, Functional magneto-plasmonic biosensors transducers: Modelling and nanoscale analysis, *Sensors Actuators B Chem.* (2007), 239, 100–112, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.128>.
- [18] J. Liu, Y. Lu, Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes, *Nat. Protoc.* (2006), 1, 246–252, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.38>.
- [19] A. Sharma, Z. Matharu, G. Sumana, P.R. Solanki, C.G. Kim, B.D. Malhotra, Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection, *Thin Solid Films*. (2010), 519(3), 1213–1218, <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.08.071>.
- [20] L.M. Demers, Ch.A. Mirkin, R.C. Mucic, R.A. Reynolds, R.L. Letsinger, R.Elghanian, G.Viswanadham, A Fluorescence-Based Method for Determining the Surface Coverage

- and Hybridization Efficiency of Thiol-Capped Oligonucleotides Bound to Gold Thin Films and Nanoparticles, *Anal. Chem.* 72(22), 5535–5541, <https://doi.org/10.1021/ac0006627>.
- [21] M. Hamoudeh, M.A. Kamleh, R. Diab, H. Fessi, Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2008), 60(12), 1329–1346, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.04.013>.
- [22] Z.R. Stephen, F.M. Kievit, M. Zhang, Magnetite Nanoparticles for Medical MR Imaging, *Mater Today (Kidlington)*. (2011), 14 330–338, [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70163-8](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70163-8).
- [23] R. Tietze, J. Zaloga, H. Unterweger, S. Lyer, R.P. Friedrich, C. Janko, M. Pöttlera, S. Dürr, C. Alexiou, Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015), 468(3), 463–470, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.022>.
- [24] V.V. Mody, A. Cox, S. Shah, Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor, *Appl. Nanosci.* (2014), 4, 385–392, <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0216-y>.
- [25] K. Ulbrich, K. Hola, S. Vladimir, A. Bakandritsos, J. Tucek, R. Zboril, targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles : covalent and noncovalent approaches , release control , and clinical studies, *Chem. Rev.* (2016), 116(9), 5338-5431, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00589>.
- [26] R.V. Mehta, Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology, *Mater. Sci. Eng. C.* (2017), 79, 901–916, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.135>.
- [27] D. Lombardo, M.A. Kiselev, M.T. Caccamo, Smart nanoparticles for drug delivery application : development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine, *J. Nanomater.* (2019), 1–26, <https://doi.org/10.1155/2019/3702518>.
- [28] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy, M.A. El-Sayed, The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chem. Soc. Rev.* (2012), 41(7), 2740–2779, <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>.
- [29] G.P.C. Drummen, Quantum Dots — From synthesis to applications in biomedicine and life sciences, *Int J Mol Sci.* (2010), 11, 154–163, <https://doi.org/10.3390/ijms11010154>.
- [30] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y.S. Chan, A. Dufresne, M.K. Danquah, Review on nanoparticles and nanostructured materials : history , sources , toxicity and regulations,

- Beilstein J. Nanotechnol. (2018), 9 1050–1074, <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.
- [31] X. Zhang, Gold nanoparticles: recent advances in the biomedical applications, *Cell Biochem. Biophys.* (2015), 72, 771–775, <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0529-4>.
- [32] Q.H. Tran, V.Q. Nguyen, A-T. Le, Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* (2013), 4(3), 1-23, <https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001>.
- [33] C. Chircov A.M. Grumezescu, Magnetic particles for advanced molecular diagnosis, *Materials.* (2019), 2158-2170, <https://doi.org/10.3390/ma12132158>.
- [34] Z. Liu, F. Kiessling, G. Jessica, advanced nanomaterials in multimodal imaging : design , functionalization and biomedical applications, *Journal of Nanomaterials.* (2010), 6, 1-15, <https://doi.org/10.1155/2010/894303>
- [35] J. Safari, Z. Zarnegar, Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design a review, *J. Saudi Chem. Soc.* (2014), 18(2), 85–99, <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.009>.
- [36] N. Sun, Z. Liu, W. Huang, A. Tian, S. Hu, The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2014), 89(3), 352–357, <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.009>.
- [37] N. Singh, G.J. Jenkins, R. Asadi, Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), *Nano Rev.*(2010), 1, 1–15, <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>.
- [38] T. Hyeon, Chemical synthesis of magnetic nanoparticles, *Chem. Commun.* (2003), 8, 927–934, <https://doi.org/10.1039/B207789B>.
- [39] W. Andrä, U. Häfeli, R. Hergt, R. Misri, Application of magnetic particles in medicine and biology, handbook of magnetism and advanced magnetic materials, American Cancer Society. (2007), <https://doi.org/10.1002/9780470022184.hmm431>.
- [40] Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *Journal of Physics D: Applied Physics.* (2003), 36(13), <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/50/501002>.
- [41] L. Hajba A. Guttman, The use of magnetic nanoparticles in cancer theranostics: toward handheld diagnostic devices, *Biotechnol. Adv.* (2016), 34(4), 354–361, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.001>.
- [42] T. Kekarainen, S. Mannelin, J. Laine, T. Jaatinen, Optimization of immunomagnetic

- separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells, *BMC Cell Biol.* (2006), 10, 1–10, <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-30>.
- [43] B. Jankovičová, Z. Svobodová, L. Hromádková, R. Kupčák, D. Řípková, Z. Bílková, Benefits of immunomagnetic separation for epitope identification in clinically important protein antigens: a case study using ovalbumin, carbonic anhydrase I and tau protein, *Univers. J. Biomed. Eng.* (2015), 3(1), s. 1–8, <https://doi.org/10.13189/ujbe.2015.030101>.
- [44] M. Lim, G. Lee, D. Thi, N. Huynh, C. Hong, S. Park, S. KO, Y. Kim, Biological preparation of highly effective immunomagnetic beads for the separation, concentration, and detection of pathogenic bacteria in milk, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2016) 145, 854–861, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.077>.
- [45] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L.V. Elst, R.N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chem. Rev.* (2008), 108, 2064–2110, <https://doi.org/10.1021/cr068445e>.
- [46] D. Horák, M. Babič, H. Macková, M.J. Beneš, Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations, *J. Sep. Sci.* (2007), 30(11), 1751–1772, <https://doi.org/10.1002/jssc.200700088>.
- [47] A.G. Roca, R. Costo, A.F. Rebolledo, S. Veintemillas-Verdaguer, P. Tartaj, T. González-Carreño, M.P. Morales C.J. Serna, Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *J. Phys. D. Appl. Phys.* (2009), 42(22), <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/22/224002>.
- [48] A.A. Bharde, R.Y. Parikh, M. Baidakova, S. Jouen, B. Hannoyer, T. Enoki, B.L.V. Prasad, Y.S. Shouche, S. Ogale, M. Sastry, Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles, *Langmuir.* (2008), 24, 5787–5794, <https://doi.org/10.1021/la704019p>.
- [49] W. Wu, Q. He, C. Jiang, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Res Lett.* (2008), 3(11), 397–415, <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>.
- [50] A. Jedlovszky-Hajdú, E. Tombácz, E. Illés, D. Bica, L. Vekas, Magnetite nanoparticles stabilized under physiological conditions for biomedical application, *Colloid and Polymer Science.* (2008), 135, 29–37, https://doi.org/10.1007/2882_2008_111.

- [51] D. Horák, J. Kučerová, L. Korecká, B. Janokovičová, P. Mikulášek, Z. Bílková, New monodisperse magnetic polymer microspheres biofunctionalized for enzyme catalysis and bioaffinity separations, *Macromol. Biosci.* (2012), 12(5), 647–655, <https://doi.org/10.1002/mabi.201100393>.
- [52] J. Goddard, J.H.M. Hotchkiss, Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds, *Prog. Polym. Sci.* (2007), 32, 698–725, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002>.
- [53] U. Wattendorf, H.P. Merkle, PEGylation as a tool for the biomedical engineering of surface modified microparticles, *J. Pharm. Sci.* (2008), 97(11), 4655–4669, <https://doi.org/10.1002/jps.21350>.
- [54] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, W.S. Kim, Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications, *Sci. Technol. Adv. Mater.* (2015), 16(2), 1-43, <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>.
- [55] A. Kumar, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials.* (2005), 26, 3995–4021, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- [56] S. Grama, D. Horák, Preparation of monodisperse porous silica particles using poly (glycidyl methacrylate) microspheres as a template, *Physiol. Res.* (2015), 64, 11-17, <https://doi.org/10.33549/physiolres.933135>.
- [57] P. Ashtari, X. He, K. Wang, P. Gong, An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles, *Talanta.* (2005), 67, 548–554, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.043>.
- [58] P. Gong, D.W. Grainger, *Nonfouling Surfaces, Microarrays. Volume 1: Synthesis Methods*, Humana Press, (2007), 59–92, https://doi.org/10.1007/978-1-59745-303-5_3.
- [59] U. Wattendorf, H.P. Markle, PEGylation as a tool for the biomedical engineering of surface modified microparticles, *J. Pharm. Sci.* (2008), 97, 4655–4669, <https://doi.org/10.1002/jps.21350>.
- [60] G. Bayramoglu, M. Yılmaz, A. Şenel, Y. Arica, Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption, *Biochem. Eng. J.* (2008), 40, 262–274, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.013>.

- [61] I. Matsumoto, Y. Mizuno, A.N. Seno, Activation of sepharose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent, *J. Biochem.* (1997), (85)4, 1091–1098, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132417>.
- [62] P. Biehl, M. der Lühe, S. Dutz, F.H. Schacher, Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings, *Polymers (Basel)*.(2018),10(1), <https://doi.org/10.3390/polym10010091>.
- [63] Y.T. Prabhu, K.V. Rao, B.S. Kumari, V. Sessa, S. Kumar, T. Pavani, Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and its antibacterial application, *Int. Nano Lett.* (2015), 5, 85–92, <https://doi.org/10.1007/s40089-015-0141-z>.
- [64] W. Badri, M. Tarhini, Z. Lgourna, N. Lebaz, H. Saadaoui, N. Zine, Preparation and characterization of glued corn flakes – like protein – based magnetic particles, *Chem. Africa.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s42250-020-00147-2>.
- [65] J. Lim, S.P. Yeap, H.X. Che, S.C. Low, Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering, *Nanoscale Res. Lett.* (2013), 8(1), 1–14, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>.
- [66] J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews.* (2016), 8(4), 409–427, <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- [67] Z. Ma, H. Merkus, J. Smet, C. Heffels, B. Scarlett, New developments in particle characterization by laser diffraction: size and shape, *Powder Technol.* (2000), 111, 66–78, [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(00\)00242-4](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(00)00242-4).
- [68] B. Akbari, M.P. Tavandashti, M. Zandrahimi, Particle size characterization of nanoparticles – a practical approach, *IJMSE.* (2011), 8(2), 48–56, 2011.
- [69] S.L. Guo, B.L. Chen, S.A. Durrani, Kapitola 4 - Solid-state nuclear track detectors, v handbook of radioactivity analysis (třetí vydání), Amsterdam: Academic Press. (2012), 233–298, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384873-4.00004-9>.
- [70] M. Joshi, A. Bhattacharyya, S.W. Ali, Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles, (2008), 33, 304–317, <https://hdl.handle.net/123456789/2019>.
- [71] E. Gnecco, T. Glatzel, E. Meyer, Characterization of nanoparticles using atomic force microscopy characterization of nanoparticles using atomic force microscopy, *Journal of Physics Conference Series.* (2007), 61, 971–976, <https://doi.org/10.1088/1742->

6596/61/1/192.

- [72] J.D. Clogston, A.K. Patri, Zeta potential measurement, characterization of nanoparticles intended for drug delivery, NJ: Humana Press. (2011), 63–70, https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.
- [73] K.A. Monopoli, M.P. Aberg, C. Salvati, A. Dawson, Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials, *Nat. Nanotech.* (2012), 7, 779–786, <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>.
- [74] R. Vogel, A.K. Pal, S. Jambhrunkar, P. Patel, S.S. Thakur, High-resolution single particle zeta potential characterisation of biological nanoparticles using tunable resistive pulse sensing, *Sci. Rep.* (2017), 7(1), 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14981-x>.
- [75] L. Nováková, . Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta.* (2009), 656(1), 8–35, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>.
- [76] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, Y. Wen, Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques, *TrAC Trends Anal. Chem.*(2018), 102, 123–146, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>.
- [77] R. Kornilov, M. Puhka, B. Mannerström, H. Hiidenmaa, H. Peltoniemi, P. Siljander, R. Seppänen-Kaijansinkko, S. Kaur, Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum, *J. Extracell. Vesicles.* (2018), 7(1), 1-14 <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1422674>.
- [78] H. Shin, H. Woo, B. Kang, Optimisation of a double-centrifugation method for preparation of canine platelet-rich plasma, *BMC Vet Res.* (2017), 13, 198-206, <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1123-3>.
- [79] I. Safarik, M. Safarikova, Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *Biomagn Res Technol.* (2004), 2(7), 1-17, <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>.
- [80] I. Pereiro, S. Tabnaoui, M. Fermigier, O. du Roure, S. Descroix, J.L Viovy, L Malaquin, Magnetic fluidized bed for solid phase extraction in microfluidic systems, *Lab on a Chip.* (2017), 17, 1603–1615, <https://doi.org/10.1039/c7lc00063d>.
- [81] F. Cui, M. Rhee, A. Singh, A. Tripathi, Microfluidic sample preparation for medical

- diagnostics, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (2015), 17(1), 267–286, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040538>.
- [82] E. Settingington, E. Alocilja, Electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of magnetically extracted bacterial pathogens, *Biosensors*. (2012), 2, 15-31, <https://doi.org/10.3390/bios2010015>. 2012.
- [83] G. Papadakis, Murasová, P, Hamiot, A, Tsougeni, K, Kaprou, G, Eck, M, Rabus, D, Bílková, Z, Dupuy, B, Jobst, G, Tserepi, A, Gogolides, E, Gizeli, E, Micro-nano-bio acoustic system for the detection of foodborne pathogens in real samples, *Biosens. Bioelectron.* (2018), 111, 52–58, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.056>.
- [84] G. Cai, S. Wang, L. Zheng, J. Lin, A fluidic device for immunomagnetic separation of foodborne bacteria using self-assembled magnetic nanoparticle chains, *Biosens. Bioelectron.* (2018), 9, 624-635, <https://doi.org/10.3390/mi9120624>.
- [85] T.R. De Oliveira, D.H. Martucci, R.C. Faria, Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay, *Sensors Actuators B. Chem.* (2018), 255, 684–691, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.075>.
- [86] J. Lim, S. Pin, S. Chun, Challenges associated to magnetic separation of nanomaterials at low field gradient, *Separation and Purification Technology*. (2014). 123, 171-174, <https://10.1016/j.seppur.2013.12.038>.
- [87] G. Moeser, K. Roach, W. Green, T. Hatton, P. Laibinis, High-gradient magnetic separation of coated magnetic nanoparticles, *AIChE J.* (2004), 50, 2835–2848, <https://doi.org/10.1002/aic.10270>.
- [88] J.R. Stephens, J.S. Beveridge, M.E. Williams, Analytical methods for separating and isolating magnetic nanoparticles, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2012), 14(10), 3280–3289, <https://doi.org/10.1039/C2CP22982J>.
- [89] P.Y. Toh, S.P. Yeap, L.P. Kong, B.W. Ng, D.J.CH. Chank, A.L. Ahmad, J.K. Lim, Magnetophoretic removal of microalgae from fishpond water: Feasibility of high gradient and low gradient magnetic separation, *Chem. Eng. J.* (2012), 211–212, 22–30, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.051>.
- [90] J. Gómez-Pastora, E. Bringas, I. Ortiz, Recent progress and future challenges on the use of high performance magnetic nano-adsorbents in environmental applications, *Chem. Eng. J.* (2014), 256, 187–204, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.119>.

- [91] J.J. Hubbuch, O.R.T. Thomas, High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin, *Biotechnol. Bioeng.* (2002), 79(3), 301–313, <https://doi.org/10.1002/bit.10285>.
- [92] B. Buchholz, L. Nunez, G. Vandegrift, Radiolysis and hydrolysis of magnetically assisted chemical separation particles, *Sep. Sci. Technol.* (1996), 31, 1933–1952, <https://doi.org/10.1080/01496399608001021>.
- [93] D. Leun, A.K. SenGupta, Preparation and characterization of magnetically active polymeric particles (mapps) for complex environmental separations, *Environ. Sci. Technol.* (2000), 34(15), 3276–3282, <https://doi.org/10.1021/es0010148>.
- [94] G.D. Moeser, K.A. Roach, W.H. Green, P.E. Laibinis, T.A. Hatton, Water-based magnetic fluids as extractants for synthetic organic compounds, *Ind. Eng. Chem. Res.* (2002), 41(19), 4739–4749, <https://doi.org/10.1021/ie0202118>.
- [95] S.S. Leong, S.P. Yeap, J. Lim, Working principle and application of magnetic separation for biomedical diagnostic at high- and low-field gradients, *Interface Focus.* (2016), 6, 1-16 <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0048>
- [96] S.P. Yeap, S. Leong, A.L. Ahmad, O. Seng, J. Lim, On size fractionation of iron oxide nanoclusters by low magnetic field gradient, *J. Phys. Chem. C.* (2014), 118, 24042–24054, <https://doi.org/10.1021/jp504808v>.
- [97] J. Lin, M. Li, Y. Li, Q. Chen, A high gradient and strength bioseparator with nano-sized immunomagnetic particles for specific separation and efficient concentration of *E. coli* O157:H7, *J. Magn. Magn. Mater.* (2015), 378, (206–213), <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.11.039>.
- [98] C.T. Yavuz J.T. Mayo, W.W Yu, A. Prakash, J.C. Falkner, S. Yean, L. Cong, H.J. Shipley, A. Kan, M. Tomson, D. Natelson, V.L. Colvin et al., Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals, *Science.* (2006), 314(5801), 964–967, <https://doi.org/10.1126/science.1131475>.
- [99] G.D. Chen, C.J. Alberts, W. Rodriguez, M. Toner, Concentration and purification of human immunodeficiency virus type 1 virions by microfluidic separation of superparamagnetic nanoparticles, *Anal. Chem.* (2010), 82(2), 723–728, <https://doi.org/10.1021/ac9024522>.
- [100] U. Tamer, I. Boyacı, E. Temür, A. Zengin, I. Dincer, Y. Elerman, Fabrication of magnetic

- gold nanorod particles for immunomagnetic separation and SERS application, *J. Nanoparticle Res.* (2011) 13, 3167–3176, <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0213-y>.
- [101] H. Wei A. Wang, Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood, *Biomaterials.* (2012), 32(36), 9758–9765, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.076>.
- [102] J. Chen, B. Park, Effect of immunomagnetic bead size on recovery of foodborne pathogenic bacteri, *Int. J. Food Microbiol.* (2018), 267, 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.022>.
- [103] D. Brandao, S. Liébana, S. Campoy, S. Alegret, M. Isabel, Immunomagnetic separation of Salmonella with tailored magnetic micro and nanocarriers . A comparative study, *Talanta.* (2015), 143, 198–204, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.035>.
- [104] S. Doswald, W.J. Stark, B.B. Schimmer, Biochemical functionality of magnetic particles as nanosensors : how far away are we to implement them into clinical practice?, *J. Nanobiotechnology,* (2019), 17, 1–11, <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0506-y>.
- [105] A. Akbarzadeh, M. Samiei, S. Davaran, Magnetic nanoparticles : preparation , physical properties , and applications in biomedicine, *Nanoscale Res Lett.* (2012), 7(1), 1–13, <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-144>.
- [106] S.H.Malik, T. Lone, S. Quardi imaging techniques for cancer diagnosis and scope for enhancement, *IJIGSP.* (2016), 8(5), 83–91, <https://doi.org/10.5815/ijigsp.2016.05.08>.
- [107] T.H. Shin, Y. Choi, S. Kim, J. Cheon, Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging, *Chem. Soc. Rev.* (2015), 44(14), 4501–4516, <https://doi.org/10.1039/C4CS00345D>.
- [108] H.B. Na, I. C. Song, T. Hyeon, Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents, *Adv. Mater.* (2009), 21(21), 2133–2148, <https://doi.org/10.1002/adma.200802366>.
- [109] J. Yang, Ch.H. Lee, J. Park, S. Seo, E.K. Lim, Y. Song, J. Suh, H.G. Yoon, Y.M. Huh, S. Haam, Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer, *J. Mater. Chem.* (2007), 17(26), 2695–2699, <https://doi.org/10.1039/B702538F>.
- [110] R.J. robabeh rezaeipoor, S.G Adie, E.J. Chaney, M. Marjanovic, A.L. Oldenburg, S.A. Rinne, Fc-directed antibody conjugation of magnetic nanoparticles for enhanced molecular targeting robabeh, *J. Innov. Opt. Health Sci.* (2009), 2, 387–396,

<https://doi.org/10.1142/S1793545809000693.Fc-DIRECTED>.

- [111] X. Peng, H. Mao, A.Y. Wang, Z.G. Chen, S. Nie, Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy, *Int J Nanomedicine*. (2008), 3(3), 311–321, <https://doi.org/10.2147/ijn.s2824>.
- [112] Z. Chunfu, C. Jinquan, Y. Duanzhi, W. Yongxian, F. Yanlin, T. Jiajü, Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy, *Appl. Radiat. Isot.* (2004), 61(6), 1255–1259, <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2004.03.114>.
- [113] B. Thiesen, A. Jordan, Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia, *Int J Hyperthermia*. (2008), 24(6), 467–474, <https://doi.org/10.1080/02656730802104757>.
- [114] R.A. Revia M. Zhang, Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances, *Mater Today*. (2016), 19, 157–168, <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.08.022>.
- [115] V. Mani, B.V. Chikkaveeraiah, J.F. Rusling, Magnetic particles in ultrasensitive biomarker protein measurements for cancer detection and monitoring, *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. (2011), 5, 381–391, <https://doi.org/10.1517/17530059.2011.607161.Magnetic>.
- [116] J.W. Choi, K. Oh, J. Thomas, W. Heineman, H. Halsall, J. Nevin, A. Helmicki, H. Henderson, C. Ahn, An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic bead-based sampling capabilities, *Lab Chip*. (2002), 2(1), 27–30, <https://doi.org/10.1039/B107540N>.
- [117] Y. Nagasaki, H. Kobayashi, Y. Katsuyama, T. Jomura, T. Sakura, Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system, *J. Colloid Interface Sci.* (2007), 309(2), 524–530, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.079>.
- [118] S. Taskila, M. Tuomola, H. Ojamo, Enrichment cultivation in detection of food-borne Salmonella, *Food Control*. (2012), 26(2), 369–377, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.043>.
- [119] P.K. Mandal, K.C.A.K. Biswas, U.K. Pal, Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview, *Am. J. Food Technol.* (2011), 6, 87–102, <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.87.102>.

- [120] J. Liu, H.S. Shang, X. Wang, Ch. Liu, A portable membrane-based analysis system for rapid and sensitive detection of bacteria, *Proceedings of the World Congress on Intelligent Control and Automation*. (2010), 2951–2954, <https://doi.org/10.1109/WCICA.2010.5554946>.
- [121] J.H. Seo, B.H. Park, S.H. Oh, G. Choi, D. Kim, E. Lee, T. Seo, Development of a high-throughput centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for multiplex foodborne pathogenic bacteria detection, *Sensors Actuators B Chem.* (2017), 246, 146–153, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.051>.
- [122] Q. Zheng, M. Mikš-Krajnik, Y. Yang, W.Xu, a H.G. Yuk, Real-time PCR method combined with immunomagnetic separation for detecting healthy and heat-injured *Salmonella Typhimurium* on raw duck wings, *Int. J. Food Microbiol.* (2014), 186, 6–13, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.005>.
- [123] M.R. Blake, B.C. Weimer, Immunomagnetic detection of *Bacillus stearothermophilus* spores in food and environmental Samples, *Appl. environmental Microbiol.* (1997), 63(5), 1643–1646, <https://doi.org/10.1128/AEM.63.5.1643-1646>.
- [124] J.A. Hudson, R.J. Lake, M.G. Savill, P. Scholes, R.E. McCormick, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction, *J. Appl. Microbiol.* (2001), 90, 614–621, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01287.x>.
- [125] G. Jeníková, J. Pazlarová, K. Demnerová, Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay, *Internatl microbiol.* (2000), 3(4), 225–229.
- [126] F.G. Pérez, M. Mascini, I.E. Tohill, A.P.F. Turner, Immunomagnetic Separation with Mediated Flow Injection Analysis Amperometric Detection of Viable *Escherichia coli* O157, *Anal. Chem.* (1998), 70(11), 2380–2386, <https://doi.org/10.1021/ac970715t>.
- [127] B.H. Pyle, S.C. Broadaway, G.A. McFeters, Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in Food and Water by Immunomagnetic Separation and Solid-Phase Laser Cytometry, *Appl Environ Microbiol.* (1999), 65(5), 1966–1972, <https://doi.org/10.1128/aem.65.5.1966-1972.1999>.
- [128] J. Qiu, Y. Zhou, H. Chen, J.M. Lin, Immunomagnetic separation and rapid detection of bacteria using bioluminescence and microfluidics, *Talanta*, (2009), 79(3), 787–795,

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.05.003>.

- [129] M. Srisa-Art, K.E. Boehle, B.J. Geiss, C.S. Henry, Highly Sensitive Detection of *Salmonella typhimurium* Using a Colorimetric Paper-Based Analytical Device Coupled with Immunomagnetic Separation, *Anal. Chem.* (2018), 90(1), 1035–1043, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04628>.
- [130] X.L. Su, Y. Li, Quantum Dot Biolabeling Coupled with Immunomagnetic Separation for Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Anal. Chem.* (2004), 76(16), 4806–4810, <https://doi.org/10.1021/ac049442+>.
- [131] Y. Zhao, M. Ye, Q. Chao, N. Jia, Y. Ge, H. Shen, Simultaneous Detection of Multifood-Borne Pathogenic Bacteria Based on Functionalized Quantum Dots Coupled with Immunomagnetic Separation in Food Samples, *J. Agric. Food Chem.* (2009), 57(2), 517–524, <https://doi.org/10.1021/jf802817y>.
- [132] J.Y. Hyeon X. Deng, Rapid detection of *Salmonella* in raw chicken breast using real-time PCR combined with immunomagnetic separation and whole genome amplification, *Food Microbiol.* (2017), 63, 111–116, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.007>.
- [133] V.A. Chidambara, A.T. Ngo, K. Kant, P. Engelsmann, V.P. Dave, M.A. Shahbazi, A. Wolff, D.D. Bang, Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR, *Biosens. Bioelectron.* (2018), 129, 224–230, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.078>.
- [134] J. Li, Q. Liu, Y. Wan, X. Wu, Y. Yang, R. Zhao, E. Chen, X. Cheng, Xiaoyan, M. Du, Rapid detection of trace *Salmonella* in milk and chicken by immunomagnetic separation in combination with a chemiluminescence microparticle immunoassay, *Anal. Bioanal. Chem.* (2019), 411, 6067–6080, <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01991-z>.
- [135] J. Wang, Y. Li, J. Chen, D. Hua, H. Deng, Y. Li, Z. Liang, J. Huang, Rapid detection of food-borne *Salmonella* contamination using IMBs-qPCR method based on *pagC* gene, *Brazilian Journal of Microbiology.* (2017), 49(2), 320–328, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.001>.
- [136] Q. Chen, J. Lin, C. Gan, Y. Wang, D. Wang, Y. Xiong, A sensitive impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis for rapid detection of *Listeria monocytogenes* using an immobilization-free interdigitated array microelectrode, *Biosens. Bioelectron.* (2019), 74, 504–511, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.007>.

- [137] B. Johne, J. Jarp, A rapid assay for protein-A in *Staph. aureus* strains, using immunomagnetic monosized polymer particles, *APMIS*. (1988), 96(1), 43–49, <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb05266.x>.
- [138] H. Wang, Y. Li, A. Wang, M. Slavik, Rapid , Sensitive , and Simultaneous Detection of Three Foodborne Pathogens Using Magnetic Nanobead – Based Immunoseparation and Quantum Dot – Based Multiplex Immunoassay, *J Food Prot.* (2011), 74(12), 2039–2047, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-144>.
- [139] S. Afonso, B. Pe, M.M. Costa, A. Merkoç, A.X. Roig-sague, Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* (2013), 40, 121–126, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.054>.
- [140] J. Srbová, P. Krulišová, L. Holubová, I. Pereiro, A. Bendali, A. Hamiot, V. Podzemná, J. Macák, B. Dupuy, S. Descroix, J.L. Viovy, Z. Bílková, Advanced immunocapture of milk-borne *Salmonella* by microfluidic magnetically stabilized fluidized bed, *Electrophoresis*. (2017), 39(3), 526–533, <https://doi.org/10.1002/elps.201700257>.
- [141] P.M. Fratamico, F.J. Schultz, R.L. Buchanan, Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an immunomagnetic separation method, *Food Microbiol.* (1992), 9(2), 105–113, [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(92\)80018-Y](https://doi.org/10.1016/0740-0020(92)80018-Y).
- [142] I. Pereiro, A. Bendali, S. Tabnaoui, A. Lucile, J. Srbová, Z. Bílková, Zuzana, S. Deegan, J. Lokesh, J.L. Viovy, L. Malaquin, B. Dupuy, S. Descroix, A new microfluidic approach for the one-step capture, amplification and label-free quantification of bacteria from raw samples, *Chem. Sci.* (2017), 8, 1329–1336, <https://doi.org/10.1039/C6SC03880H>.
- [143] B. Malorny, C. Lo, M. Wagner, N. Kra, J. Hoorfar, Enumeration of *Salmonella* Bacteria in Food and Feed Samples by Real-Time PCR for Quantitative Microbial Risk Assessment, *Appl. Environment. Microbiol.* (2008) 74, 1299–1304, <https://doi.org/10.1128/AEM.02489-07>.
- [144] D. Houhoula, J. Papaparaskevas, K. Zatsou, N. Nikolaras, H. Malkawi, M.P. Mingenot-Leclercq, S. Konteles, S. Koussisis, A. Tsakris, E. Charvalos, Ekatherina, Magnetic nanoparticle-enhanced PCR for the detection and identification of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*, *New Microbiol.* (2017), 40, 165–169.
- [145] L.P. Mansfield, S.J. Forsythe, The detection of *Salmonella* using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure, *Lett. Appl. Microbiol.*

- (2000), 31, 279–283, <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00811.x>.
- [146] A.F. Fouad, J. Barry, M. Caimano, M. Clawson, Q. Zhu, R. Carver, K. Hazlett, J.D. Radolf, PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol.* (2002), 40(9), 3223-3231, <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3223-3231.2002>.
- [147] H. Yang, L. Qu, A. Wimbrow, X. Jiang, Y. Sun, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR, *Int. J. Food Microbiol.* (2007), 118, 132–138, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.019>.
- [148] Y. Mao, X. Huang, S. Xiong, H. Xu, Z. Aguilar, Y. Xiong, Large-volume immunomagnetic separation combined with multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in lettuce, *Food Control*, (2016), 59, 601–608, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.048>.
- [149] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, T. Hase, Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* (2000), 28(12), 1-7, <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- [150] J. Mahony, S. Chong, D. Bulir, A. Ruyter, K. Mwawasi, D. Waltho, Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40min with single genome copy sensitivity, *J. Clin. Virol.* (2013), 58(1), 127–131, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.006>.
- [151] D. Brandão, S. Liébana Girona, S. Campoy, M. Cortés, S. Alegret, I. Pividori, Electrochemical magneto-immunosensing of *Salmonella* based on nano and micro-sized magnetic particles, *Journal of Physics Conference Series.* (2012), 421, <https://doi.org/10.1088/1742-6596/421/1/012020>.
- [152] A. Hlaváček, P. Skládal, Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii, *Chem. List.* (2011), 105, 611–615, ISSN 0009-2770.
- [153] M. Amelia, C. Lincheneau, S. Silvi, A. Credi, Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots, *Chem. Soc. Rev.* (2012), 41(17), 5728–5743, <https://doi.org/10.1039/C2CS35117J>.
- [154] J. Joo, C. Yim, H. H. Shin, H.J. Cha, A facile and sensitive detection of pathogenic bacteria using magnetic nanoparticles and optical nanocrystal probes, *Analyst.* (2012),

- 137(16), 3609-3612, <https://doi.org/10.1039/c2an35369e>.
- [155] Z. Q. Yang, Y.F. Wei, S.Q. Rao, L. Gao, Y.Q. Yin, F. Xue, W.M. Fang, R.X. Gu, X.A. Jiao, Immunomagnetic separation combined with colony immunoblotting for selective enrichment and detection of piliated *Lactobacillus rhamnosus* strains, *J. Appl. Microbiol.* (2016), 121, 1406–1415, <https://doi.org/10.1111/jam.13275>.
- [156] U.K. Parida, S.K. Biswal, P.L. Nayak, B. K. Bindhani, Gold Nano Particles for Biomedical Applications, *World Journal of Nano Science and Technology.* (2013) 2(1), 47–57, <https://doi.org/10.5829/idosi.wjnst.2013.2.1.21139>.
- [157] U.K. Parida, P.L. Nayak, Biomedical Applications of Gold Nanoparticles : Opportunity and Challenges, *World Journal of Nano Science and Technology*, (2012), 1(2), 10–25, <https://doi.org/10.5829/idosi.wjnst.2012.1.2.202>.
- [158] M. Das, K.H. Shim, S. An, a D.K. Yi, Review on gold nanoparticles and their applications, *Toxicol. Environ. Health Sci.* (2011), 3, 193–205, <https://doi.org/10.1007/s13530-011-0109-y>.
- [159] S. Klein, S. Petersen, U. Taylor, D. Rath, S. Barcikowski, Quantitative visualization of colloidal and intracellular gold nanoparticles by confocal microscopy, *J. of Biomedical Optics.* (2010), 15(3), 036015, <https://doi.org/10.1117/1.3461170>.
- [160] G.F. Paciotti, D.G.I. Kingston, L. Tamarkin, Colloidal Gold Nanoparticles: A Novel Nanoparticle Platform for Developing Multifunctional Tumor-Targeted Drug Delivery Vectors, *Drug Develop. Res.* (2006), 67, 47–54, <https://doi.org/10.1002/ddr>.
- [161] R. Meir, K. Shamalov, O. Betzer, M. Motiei, M. Horovitz-Fried, R. Yehuda, A. Popovtzer, R. Popovtzer, C. Cohen, Nanomedicine for Cancer Immunotherapy: Tracking Cancer-Specific T-Cells in Vivo with Gold Nanoparticles and CT Imaging, *ACS Nano.* (2015), 9(6), 6363-6372, <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01939>.
- [162] F. Wang, Y.C. Wang, S. Dou, M.H. Xiong, T.M. Sun, J. Wang, Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells, *ACS Nano.* (2011) 5, 3679–3692, <https://doi.org/10.1021/nn200007z>.
- [163] L.L. Félix, B. Sanz, V. Sebastián, T.E. Torres, M.H. Sousa, J.A. H. Coaquira, Gold-decorated magnetic nanoparticles design for hyperthermia applications and as a potential platform for their surface- functionalization, *Sci. Rep.* (2019), 9(1), 1–11, <https://doi.org/>

10.1038/s41598-019-40769-2.

- [164] J. Lee, D.K. Chatterjee, M.H. Lee, S. Krishnan, Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls, *Cancer Letters*. (2014), 347(1), 46-53, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.006>.
- [165] F. Xia, X. Zuo, R. Yang, Y. Xiao, D. Kang, A. Vallée-Bélisle, X. Gong, J.D. Yuen, B.B.Y. Hsu, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, Colorimetric detection of DNA , small molecules , proteins , and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes, *PNAS*. (2010), 107(24), 10837-10841, <https://doi.org/10.1073/pnas.1005632107>.
- [166] M. Pumera, M.T. Castañeda, M.I. Pividori, R. Eritja, A. Merkoçi, S. Alegret, Magnetically triggered direct electrochemical detection of dna hybridization using Au7 quantum dot as electrical tracer, *Langmuir*. (2005), 21(21), 9625–9629, <https://doi.org/10.1021/la051917k>.
- [167] N.R. Jana, J.Y. Ying, Synthesis of functionalized au nanoparticles for protein detection, *Adv. Mater.* (2008) 20, 430–434, <https://doi.org/10.1002/adma.200701348>.
- [168] A. Ambrosi, M.T. Castañeda, A.J. Killard, M.R. Smyth, S. Alegret, A. Merkoçi, Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis, *Anal. Chem.* (2007), 79(14), 5232–5240, <https://doi.org/10.1021/ac070357m>.
- [169] A. de la Escosura-Muñiz, C. Sánchez-Espinel, B. Díaz-Freitas, Á. González-Fernández, M. Maltez-da Costa, A. Merkoçi, Rapid identification and quantification of tumor cells using an electrocatalytic method based on gold nanoparticles, *Anal. Chem.* (2009), 81(24), 10268–10274, <https://doi.org/10.1021/ac902087k>.
- [170] T. Pellegrino, S. Kudera, T. Liedl, A. Muñoz Javier, L. Manna, a W.J. Parak, On the development of colloidal nanoparticles towards multifunctional structures and their possible use for biological applications, *Small*. (2005), 1(1), 48–63, <https://doi.org/10.1002/sml.200400071>.
- [171] D.A. Giljohann, D.S. Seferos, W.L. Daniel, M.D. Massich, P.C. Patel, C.A. Mirkin, Gold nanoparticles for biology and medicine, *Angew. Chemie Int. Ed.* (2010), 49(19), 3280–3294, <https://doi.org/10.1002/anie.200904359>.
- [172] J. Turkevich, Colloidal gold part II: colour, coagulation, adhesion, alloy-ing and catalytic properties, *Gold Bulletin*. (1985), 18(4), 125–131, <https://doi.org/10.1007/BF03214694>.
- [173] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *The Journal of Physical Chemistry B*. (2006),

- 110(32), 15700–15707, <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- [174] J. Polte, R. Kraehnert, M. Radtke, U. Reinholz, H. Riesemeier, A. Thünemann, F. Emmerling, New insights of the nucleation and growth process of gold nanoparticles via in situ coupling of SAXS and XANES, *J. Phys. Conf. Ser.* (2010), 247(1), 12051, <https://doi.org/10.1088/1742-6596/247/1/012051>.
- [175] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, X. Peng, Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate, *J. Am. Chem. Soc.* (2007), 8, 1957–1962, <https://doi.org/10.1021/ja074447k>.
- [176] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, S. Carolina, Seeding growth for size control of 5 - 40 nm diameter gold nanoparticles, *Langmuir.* (2001), 37, 6782–6786, <https://doi.org/10.1021/la0104323>.
- [177] M. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles : assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.* (2004), 104(1), 293–346, <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.
- [178] J. Lipka, M. Semmler-Behnke, R. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Schleh, T. Kissel, W. Parak, W. Kreyling, Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection, *Biomaterials.* (2010), 31(25), 6574–6581, , <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.009>.
- [179] H. Khalil, D. Mahajan, M. Rafailovich, M. Gelfer, Synthesis of zerovalent nanophase metal particles stabilized with poly (ethylene glycol), *Langmuir.* (2004), 20(16), 6896–6903, <https://doi.org/10.1021/la0497402>.
- [180] T. Kawano, M. Yamagata, H. Takahashi, Y. Niidome, S. Yamada, Y. Katayama, T. Niidome, Stabilizing of plasmid DNA in vivo by PEG-modified cationic gold nanoparticles and the gene expression assisted with electrical pulses, *J. Control. Release.* (2006), 111(3), 382–389, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.12.022>.
- [181] R.G. Pearson, Hard and soft acids and bases, *J. Am. Chem. Soc.* (1963), 85(22), 3533–3539, <https://doi.org/10.1021/ja00905a001>.
- [182] X. Zhang, M.R. Servos, J. Liu, Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route, *J. Am. Chem. Soc.* (2012), 134(17), 7266–7269, <https://doi.org/10.1021/ja3014055>.
- [183] E. Katz, I. Willner, Integrated nanoparticle – biomolecule hybrid systems : synthesis ,

- properties , and applications angewandte, *Angew Chem Int Ed Engl.* (2004), 43(45), 6042-6108, <https://doi.org/10.1002/anie.200400651>.
- [184] W. Shenton, S. A. Davis, S. Mann, Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody - antigen recognition, *Advanced material.* (1999), 11(6), 449-452, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199904\)11:6<449::AID-ADMA449>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199904)11:6<449::AID-ADMA449>3.0.CO;2-A).
- [185] M. Wilchek, E.A. Bayer, The avidin-biotin complex in bioanalytical applications, *Anal. Biochem.* (1988),171(1), 1–32, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90120-0).
- [186] L. Sun, D. Liu, Z. Wang, functional gold nanoparticle–peptide complexes as cell-targeting agents, *Langmuir.* (2008), 24(18), 10293–10297, <https://doi.org/10.1021/la8015063>.
- [187] P.M. Tiwari, K. Vig, V.A. Dennis, S. R. Singh, Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications, *Nanomaterials.* (2011), 1, 31–63, <https://doi.org/10.3390/nano1010031>.
- [188] J.H. Kim H.H. Jang, S.M. Ryou, S. Kim, J. Bae, K. Lee, M.S. Han, A functionalized gold nanoparticles-assisted universal carrier for antisense DNA, *Chem. Commun.* (2010), 46(23), 4151–4153, <https://doi.org/10.1039/C0CC00103A>.
- [189] D.J. Javier, A. Castellanos-Gonzalez, S.E. Weigum, A.C. White, R. Richards-Kortum, Oligonucleotide-gold nanoparticle networks for detection of cryptosporidium parvum heat shock protein 70 mRNA, *J Clin Microbiol.* (2009), 47(12), 4060–4066, <https://doi.org/10.1128/JCM.00807-09>.
- [190] J.S. Rink, K.M. McMahon, X. Chen, C.A. Mirkin, C.S. Thaxton, D.B. Kaufman, Transfection of pancreatic islets using polyvalent DNA-functionalized gold nanoparticles, *Surgery.* (2010),148(2), 335–345, <https://doi.org/10.1016/j.surg.2010.05.013>.
- [191] Y. Liu, Y. Liu, R.L. Mernaugh, X. Zeng, Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay, *Biosens. Bioelectron.* (2009), 24(9), 2853–2857, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.02.016>.
- [192] Ch.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, J.J. Storhoff, A DNA based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature*, (1996), 382(6592), 607–609, <https://doi.org/10.1038/382607a0>.
- [193] A.P. Alivisatos, K.P. Johnsson, X. Peng, T.E. Wilson, C.J. Loweth, M.P. Bruchez, P.G

- Schultz, Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA, *Nature*. (1996), 382(6592), 609–611, <https://doi.org/10.1038/382609a0>.
- [194] S. Su X. Zuo, D. Pan, H. Pei, L. Wang, Ch. Fan, W. Huang, Design and applications of gold nanoparticle conjugates by exploiting biomolecule–gold nanoparticle interactions, *Nanoscale*. (2013), 5(7), 2589–2599, <https://doi.org/10.1039/C3NR33870C>.
- [195] S.J. Hurst, A.K.R. Lytton-Jean, C.A. Mirkin, Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes, *Anal. Chem.*(2006), 78(24), 8313–8318, <https://doi.org/10.1021/ac0613582>.Maximizing.
- [196] T.M. Herne, M.J. Tarlov, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* (1997), 119(38), 8916–8920, <https://doi.org/10.1021/ja9719586>.
- [197] R. Jin, G. Wu, Z. Li, C.A. Mirkin, G.C. Schatz, What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?, (2003), 125(6), 1643–1654, <https://doi.org/10.1021/ja021096v>.
- [198] J. Liu, Y. Lu, Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNazymes for simple and fast colorimetric Pb²⁺ detection, *Journal of the American Chemical Society*. (2004), 126(39):12298-12305, <https://doi.org/10.1021/ja046628h>.
- [199] Y. Zu, Z. Gao, Facile and controllable loading of single-stranded DNA on gold nanoparticles, *Anal. Chem.* (2009), 81(20), 8523–8528, <https://doi.org/10.1021/ac901459v>.
- [200] R.L. Wimalasena, G.S. Wilson, Factors affecting the specific activity of immobilized antibodies and their biologically active fragments, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* (1991), 572(1-2), 85–102, [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80475-R](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80475-R).
- [201] T.M. Spitznagel, J. W. Jacobs, D.S. Clark, Random and site-specific immobilization of catalytic antibodies, *Enzyme Microb. Technol.* (1993), 15(11), 916–921, [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90166-Y](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90166-Y).
- [202] B. Lu, J. Xie, C. Lu, W.U. Changru, Oriented immobilization of Fab' fragments on silica surfaces, *Anal. Chem.* (1995), 67(1), 83–87, <https://doi.org/10.1021/ac00097a014>.
- [203] J. Alarie, M. Sepaniak, T. Vo-Dinh, Evaluation of antibody immobilization techniques for fiber optic-based fluoroimmunosensing, *Analytica Chimica Acta.* (1990), 229(2), 169–176, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)85125-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)85125-9).
- [204] K.L. Brogan, M.H. Schoenfisch, C. Hill, N. Carolina, Influence of antibody

- immobilization strategy on molecular recognition force microscopy measurements, *Langmuir*. (2005), 21(7), 3054–3060, <https://doi.org/10.1021/la047922q>.
- [205] C. Parolo, A. de la Escosura-Muñiz, E. Polo, V. Grazú, J. M. de la Fuente, a A. Merkoçi, Design, Preparation, and Evaluation of a Fixed-Orientation Antibody/Gold-Nanoparticle Conjugate as an Immunosensing Label, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. (2013), 5(21), 10753–10759, <https://doi.org/10.1021/am4029153>.
- [206] D. Bartczak, A.G. Kanaras, Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling, *Langmuir*. (2011), 27(16), 10119–10123, <https://doi.org/10.1021/la2022177>.
- [207] Q. Zhang, R. Li, X. Chen, X.X. He, A.L. Han, G.Z. Fang, J.F. Lui, S. Wang, Study of efficiency of coupling peptides with gold nanoparticles, *Chinese J. Anal. Chem.* (2017), 45(5), 662–667, [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(17\)61013-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(17)61013-2).
- [208] K.L. Brogan, K.N. Wolfe, P.A. Jones, M.H. Schoenfisch, Direct oriented immobilization of F(ab') antibody fragments on gold, *Anal. Chim. Acta*. (2003), 496(1), 73–80, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00991-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00991-7)
- [209] J.D. Gibson, B.P. Khanal, E.R. Zubarev, Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* (2007), 129(37), 11653–11661, <https://doi.org/10.1021/ja075181k>.
- [210] C. Park H. Youn, H. Kim, T. Noh, Y.H. Kook, E.T. Oh, H.J. Park, Ch. Kim, Cyclodextrin-covered gold nanoparticles for targeted delivery of an anti-cancer drug, *J. Mater. Chem.* (2009), 19(16), 2310–2315, <https://doi.org/10.1039/B816209C>.
- [211] R. Arvizo, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine, *Expert Opin. Drug Deliv.* (2010), 7(6), 753–763, <https://doi.org/10.1517/17425241003777010>.
- [212] P.R. Selvakannan, S. Mandal, S. Phadtare, R. Pasricha, M. Sastry, Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible, *Langmuir*. (2003), 19(8), 3545–3549, <https://doi.org/10.1021/la026906v>.
- [213] C. Yang, J. Uertz, D. Yohan, B.D. Chithrani, Peptide modified gold nanoparticles for improved cellular uptake, nuclear transport, and intracellular retention, *Nanoscale*. (2014), 6(20), 12026–12033, <https://doi.org/10.1039/C4NR02535K>.
- [214] C. Berry, J. Fuente, M. Mullin, S. Chu, A. Curtis, Notice of violation of IEEE publication principles nuclear localization of HIV-1 Tat functionalized gold nanoparticles, *IEEE*

- Transactions on NanoBioscience. (2007), 6, 262–269, <https://doi.org/10.1109/TNB.2007.908973>.
- [215] P.H. Wu, Y. Onodera, Y. Ichikawa, E. Rankin, A. Giaccia, Y. Watanabe, W. Qian, T. Hashimoto, H. Shirato, J.M. Nam, Targeting integrins with RGD-conjugated gold nanoparticles in radiotherapy decreases the invasive activity of breast cancer cells, *Int. J. Nanomedicine*. (2017), 12, 5069–5085, <https://doi.org/10.2147/IJN.S137833>.
- [216] P.C. Patel, D.A. Giljohann, D.S. Seferos, C.A. Mirkin, Peptide antisense nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2008), 105(45), 17222–17226, <https://doi.org/10.1073/pnas.0801609105>.
- [217] P. Khullar, V. Singh, A. Mahal, P.N. Dave, S. Thakur, G. Kaur, J. Singh, S. S. Kamboj, M.S. Bakshi, Bovine serum albumin bioconjugated gold nanoparticles: synthesis, hemolysis, and cytotoxicity toward cancer cell lines, *J. Phys. Chem. C*. (2012), 116(15), 8834–8843, <https://doi.org/10.1021/jp300585d>.
- [218] L. Leopold, I.S. Todor, Z. Diaconeasa, D. Rugină, A. Ștefancu, N. Leopold, C. Coman, Assessment of PEG and BSA-PEG gold nanoparticles cellular interaction, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* (2017), 532, 70–76, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.061>.
- [219] L. Rastogi, A.J. Kora, A. J., Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics, *Mater. Sci. Eng. C*. (2012), 32(6), 1571–1577, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.044>.
- [220] N. Halien, H. La, V.H. Xuan, V.H. Chu, T. Nguyen, Q. Le, E. Fort, H.D. Quang, T.H. Nhung, Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* (2010), 1(2), 25009, <https://doi.org/10.1088/2043-6254/1/2/025009>.
- [221] X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-sayed, M.A. El-sayed, Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles, *Lasers in Medical Science*. (2008), 23(3), 217–228, <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>.
- [222] S. Srivastava, B.L. Frankamp, V.M. Rotello, Controlled plasmon resonance of gold nanoparticles self-assembled with PAMAM dendrimers, *Chem. Mater.* (2005), 17(3), 487–490, <https://doi.org/10.1021/cm048579d>.
- [223] K.S. Lee, M.A. El-Sayed, Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity

- of plasmon response to size, shape, and metal composition, *J. Phys. Chem. B.* (2006), 110(39), 19220–19225, <https://doi.org/10.1021/jp062536y>.
- [224] A.R. Bizzarri, S. Cannistraro, SERS detection of thrombin by protein recognition using functionalized gold nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2007), 3(4), 306–310, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.09.005>.
- [225] J. Ludwig, J. Weinstein, Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection, *Nat Rev Cancer.* (2005), 5(11), 845–856, <https://doi.org/10.1038/nrc1739>.
- [226] R.F. Pedro, V Baptista, M. Koziol-Montewka, J. Paluch-Oles, G. Doria, Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples, *Clin. Chem.* (2006), 52(7) 1433–1434, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.065391>.
- [227] H. Otsuka, Y. Akiyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Quantitative and reversible lectin-induced association of gold nanoparticles modified with α -lactosyl- ω -mercapto-poly(ethylene glycol), *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 123(34), 8226–8230, <https://doi.org/10.1021/ja010437m>.
- [228] C.S. Tsai, T.B. Yu, C.T. Chen, Gold nanoparticle-based competitive colorimetric assay for detection of protein–protein interactions, *Chem. Commun.*(2005), 34, 4273–4275, <https://doi.org/10.1039/B507237A>.
- [229] S.A. Lim, H. Yoshikawa, E. Tamiya, H.M. Yasin, M.U. Ahmed, A highly sensitive gold nanoparticle bioprobe based electrochemical immunosensor using screen printed graphene biochip, *RSC Adv.* (2014), 4(102), 58460–58466, <https://doi.org/10.1039/C4RA11066H>.
- [230] Q. Xu, F. Yan, J. Lei, C. Leng, H. Ju, Disposable electrochemical immunosensor by using carbon sphere/gold nanoparticle composites as labels for signal amplification, *Chem. – A Eur. J.* (2012), 18(16), 4994–4998, <https://doi.org/10.1002/chem.201200171>.
- [231] N. Verdoodt, C.R. Basso, B.F. Rossi, V.A. Pedrosa, Development of a rapid and sensitive immunosensor for the detection of bacteria, *Food Chem.* (2017), 221, 1792–1796, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.102>.
- [232] A. de la Escosura-Muñiz, C. Parolo, F. Maran, A. Mekoçi, Size-dependent direct electrochemical detection of gold nanoparticles: application in magnetoimmunoassays, *Nanoscale.* (2011), 3, 3350–3356, <https://doi.org/10.1039/c1nr10377f>.
- [233] Y. Wang, E.C. Alcolija, Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive

- detection of bacterial pathogens, *J. Biol. Eng.* (2015), 9(16), 1–7, <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0014-z>.
- [234] M. Sayhi, O. Ouerghi, K. Belgacem, M. Arbi, Y. Tepeli, A. Ghram, Ü. Anik, L. Österlund, D. Laouini, M.F. Diouani Electrochemical detection of influenza virus H9N2 based on both immunomagnetic extraction and gold catalysis using an immobilization-free screen printed carbon microelectrode, *Biosens. Bioelectron.* (2018), 107, 170–177, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.018>.
- [235] F. Gorjikhah, S. Davaran, R. Salehi, M. Bakhtiari, A. Hasanzadeh, Y. Panahi, M. Emamverdy, A. Akbarzadeh, Improving “ lab-on-a-chip ” techniques using biomedical nanotechnology: a review, *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016, 44(7), 1609-1614, <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1129619>.
- [236] N. Wen, Z. Zhao, B. Fan, D. Chen, D. Men, J. Wang, J. Chen, Development of droplet microfluidics enabling high-throughput single-cell analysis, *Molecules.* (2016) 21(7), 881-894, <https://doi.org/10.3390/molecules2107088>.
- [237] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M.R. Tam, B.H. Weigl, Microfluidic diagnostic technologies for global public health, *Nature.* (2006), 442(7101), 412–418, <https://doi.org/10.1038/nature05064>.
- [238] G. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature.* (2006), 442(7101), 368–373, <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- [239] G.M Whitesides, The ‘right’ size in nanobiotechnology, *Nat. Biotechnol.* (2003), 21(10), 1161–1165, <https://doi.org/10.1038/nbt872>.
- [240] C. Ionescu-Zanetti, R.M. Shaw, J. Seo, Y. Jan, L.Y. Jan, L.P. Lee, Mammalian electrophysiology on a microfluidic platform, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102(26), 9112-9111, <https://doi.org/10.1073/pnas.0503418102>.
- [241] S.K. Sahoo, S. Parveen, J.J. Panda, The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2007), 3(1), 20–31, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.11.008>.
- [242] J. Chen, M. Wabuyele, H. Chen, D. Patterson, M. Hupert, H. Shadpour, D. Nikitopoulos, S.A. Soper, Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate, *Anal. Chem.* (2005), 77(2), 658–666, <https://doi.org/10.1021/ac048758e>.

- [243] H. Becker, C. Gärtner, Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems, *Anal. Bioanal. Chem.* (2008), 390(1), 89–111, <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1692-2>.
- [244] S.H. Lee, D. Noort, J.Y. Lee, B.T. Zhang, T. Park, Effective mixing in a microfluidic chip using magnetic particles, *Lab Chip.* (2009), 9, 479–482, <https://doi.org/10.1039/b814371d>.
- [245] W. Jeon, C.B. Shin, Design and simulation of passive mixing in microfluidic systems with geometric variations, *Chem. Eng. J.* (2009), 152(2), 575–582, 2009 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.05.035>.
- [246] I. Ganesh, B. Tran, Y. Kim, J. Kim, H. Cheng, N.Y. Lee, S. Park, An integrated microfluidic PCR system with immunomagnetic nanoparticles for the detection of bacterial pathogens, *Biomed Microdevices.* (2016), 18(116), <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0139-y>.
- [247] E. Engineering, N. Nanotechnology, Microfluidic bio-particle manipulation for biotechnology, *Biochemical Engineering Journal.* (2014), 92, 63–82, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.07.013>.
- [248] T. Jamshaid, E. Taveira, T. Neto, M.M. Eissa, N. Zine, Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications *Trends in Analytical Chemistry.* (2016), 79, 344–362, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.022>.
- [249] A.E. Saliba, L. Saias, E. Psychari, N. Minc, D. Simon, F.C. Bidard, C. Mathiot, J.Y. Pierga, V. Fraissier, J. Salamero, V. Saada, F. Farace, P. Vielh, L. Malaquin, J.L. Viovy, Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010), 107(33), 14524–14529, <https://doi.org/10.1073/pnas.1001515107>
- [250] T. Linh, T. Quang, W. Hoe, D. Duong, D. Version, T. Linh, A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of *Salmonella* spp. in food samples, *Lab on a Chip.* (2015), 15(8), 1898–1904, <https://doi.org/10.1039/C4LC01459F>.
- [251] X. Feng, B.F. Liu, J. Li, X. Liu, Advances in coupling microfluidic chips to mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* (2015), 34(5), 535–557, <https://doi.org/10.1002/mas.21417>.
- [252] R.Q. Zhang, S.L. Liu, W. Zhao, W.P. Zhang, X. Yu, Y. Li, A.J. Li, D.W. Pang, Z.L.

- Zhang, A simple point-of-care microfluidic immunomagnetic fluorescence assay for pathogens, *Anal. Chem.* (2013), 85(5), 2645–2651, <https://doi.org/10.1021/ac302903p>.
- [253] Q. Chen, D. Wang, G. Cai, Y. Xiong, Y. Li, M. Wang, H. Huo, J. Lin, Fast and sensitive detection of foodborne pathogen using electrochemical impedance analysis, urease catalysis and microfluidics, *Biosens. Bioelectron.* (2016), 86, 770–776, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.071>.
- [254] W.J. Guo, X.Y. Yang, Z. Wu, Z.L. Zhang, A colorimetric and electrochemical dual-mode biosensor for thrombin using a magnetic separation technique, *J. Mater. Chem. B.* (2020), 8(16), <https://doi.org/10.1039/C9TB02170A>.
- [255] M. Extracted, B. Pathogens, Electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of magnetically extracted bacterial pathogens, *Biosensors.* (2012), 2(4), 15–31, <https://doi.org/10.3390/bios2010015>.
- [256] L. Fabiani, E. Pucci, E. Delibato, G. Volpe, S. Piermarini, D. De Medici, F. Capuano, G. Palleschi, ELIME assay vs Real-Time PCR and conventional culture method for an effective detection of Salmonella in fresh leafy green vegetables, *Talanta.* (2017), 166, 321–327, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.071>.
- [257] D. Luo, X. Huang, Y. Mao, Ch. Chen, F. Li, H. Xu, Y. Xiong, Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk, *J. Dairy Sci.* (2017), 100(10), 7883–7890, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13140>.
- [258] S. Wei, B.J. Park, S. Kim, K.H. Seo, Y.G. Jin, D.H. Oh, Detection of *Listeria monocytogenes* using Dynabeads® anti-*Listeria* combined with real-time PCR in soybean sprouts, *LWT.* (2018), 99, 533–539, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.023>.
- [259] M. Xu, R. Wang, Y. Li, Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation, *Talanta.* (2016), 148, 200–208, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.082>.
- [260] A.C. Klaver, L.M. Patrias, M.P. Coffey, J.M. Finke, D.A. Loeffler, Measurement of anti-A β 1–42 antibodies in intravenous immunoglobulin with indirect ELISA: The problem of nonspecific binding, *J. Neurosci. Methods.* (2010), 187(2), 263–269, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.01.018>.

[261] A. C. Klaver, M. Coffey, L. Smith, D. Bennett, J. Finke, L. Dang, D. Loeffler, ELISA measurement of specific non-antigen- bound antibodies to A b 1-42 monomer and soluble oligomers in sera from Alzheimer ' s disease , mild cognitively impaired , and noncognitively impaired subjects, *J. Neuroinflammation*. (2011), 8(1), 93, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-93>.

7 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Výstupy související s tématem disertační práce

Publikace v odborných recenzovaných časopisech s IF

Srbová, J; **Krulišová, P**; Holubova, L; Pereiro, I; Bendali, A; Hamiot, A; Podzemná, V; Macák, J; Dupuy, B; Descroix, S; Viovy, J-L; Bílková, Z, Advanced Immunocapture of Milk-borne Salmonella by Microfluidic Magnetically Stabilized Fluidized Bed, Electrophoresis. (2018), 39, 526-533.

Papadakis, G; **Murasová, P**; Hamiot, A; Tsougeni, K; Kaprou, G; Eck, M; Rabus, D; Bílková, Z; Dupuy, B; Jobst, G; Tserepi, A; Gogolides, E; Gizeli, E, Micro-nano-bio acoustic system for the detection of foodborne pathogens in real samples, Biosensors and Bioelectronics.(2018), 111, 52-58.

Murasová, P; Kovářová, A; Kašparová, J; Brožková, I; Hamiot, A; Pekárková, J; Dupuy, B; Drbohlavová, J; Bílková, Z; Korecká, L, Direct culture-free electrochemical detection of Salmonella cells in milk based on quantum dots-modified nanostructured dendrons, Journals of electroanalytical Chemistry. (2020), 863, 1-5.

Publikace v recenzovaných periodikách bez IF

Murasová, P; Kovářová, A; Srbova, J; Bílková, Z; Different approaches for preparation of AuNPs-based conjugates as a signal-generating unit for electrochemical biosensors, Scientific Papers of the university of Pardubice, Series A; Faculty of Chemical Technology. (2018), 24, 109-118.

Slováková, M; **Murasová, P**; Vozandychová, V; Palarčík, J; Podzemná, V; Bílková, Z; Development of the magnetic bioaffinity carrier for the anti-amyloid beta1-42 antibodies detection, Scientific Papers of the university of Pardubice, Series A; Faculty of Chemical Technology. (2019) 25, 41-52.

Práce v recenzovaných sbornících, dle WoS zařazeno do kategorie „Proceedings Paper”

Svobodová, Z; **Krulišová, P**; Černá, M; Jankovičová, B; Bílková, Z; On-chip ELISA on magnetic particles: isolation and detection of specific antibodies from serum. *Nanocon 2015: Conference Proceedings. Ostrava: TANGER, spol. s r.o., (2015).* s. 1-6. ISBN 978-80-87294-59-8.

Krulišová, P; Jankovičová, B; Bílková, Z; Zavedení MELISA metody pro průkaz specifických protilátek proti biomarkerům Alzheimerovy choroby., Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVII, sborník příspěvků ze semináře, (2015), s. 45-53. ISBN 978-80-7395-926-5.

Srbová, J; Holubová, L; **Krulišová, P**; Bílková, Z; Vývoj magnetického imunisorbentu pro průkaz Salmonella Typhimurium pro mikrofluidní aplikace. XXIV. Tomáškovy dny mladých mikrobiologů, (2015), Brno, Česká republika. *Sborník* ISBN 978-80-210-7851-2, str. 19.

Příspěvky prezentované vědeckých konferencích (přednášky):

Krulišová, P; Srbová, J; Bílková, Z; The use of functionalized micro/nano particles as a tool for fast detection of foodborne pathogens, YISAC 2016, Novi Sad, 28.6 – 1.7. 2016, str.28, ISBN 978-86-80092-24-9

Krulišová, P; Kovářová, A; Korecká, L; Bílková, Z; Electrochemical immunosensor based on antibody-nanoparticle conjugates as a potential tool for rapid detection of foodborne pathogens, 24th YISAC 2016, Benátky, Itálie, 28 – 30.6. 2017, str.1, sborník ISBN nemá

Ostatní přednášky

Krulišová, P; Srbová, J; Bílková, Z; Functionalization of gold nanoparticles with thiolated oligonucleotides, 7. Meeting evropského projektu LOVE-FOOD, Besancon 27. – 28. 8. 2015.

Krulišová, P; Srbová, J; Bílková, Z; Advances in preparation of anti-Salmonella and anti-Bacillus immunosorbents for sample processing and purification, 7. Meeting evropského projektu LOVE-FOOD, Besancon 27. – 28. 8. 2015.

Krulišová, P; Bílková, Z; Immunomagnetic separation of Salmonella cells from 25 ml of UHT

whole milk connected with LAMP amplification and acoustic detection, Meeting evropského projektu LOVE-FOOD2MARKET, Heraklion, Kréta 14. 2. 2017.

Murasová, P; Srbová, J; Bílková, Z; Report on the shelf life of functionalized magnetic particles and enviromental risk assessment associated with using this particles for bioassays, Meeting evropského projektu LOVE-FOOD2MARKET, Thessaloniky, Řecko 8. 3. 2018.

Příspěvky prezentované na vědeckých konferencích (plakátová sdělení):

Krulišová, P; Jankovičová, B; Kučerová, J; Bílková, Z; Optimization of magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay for detection of specific antibodies against Amyloid beta representing biomarkers of Alzheimer's disease, 13th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (ICAPP), October 5-7, 2013, Galveston, Texas, USA (abstract: Amino Acids (2013) 45 (3) p. 585)

Krulišová, P; Jankovičová, B; Bílková, Z; Development of magnetic enzyme-linked immunosorbent assay for detection of specific antibodies against amyloid beta protein as biomarker of Alzheimer disease. 13th International interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (CECE 2016), 17. - 19. 10. 2016, Brno, str. 151-155 , ISBN: 978-80-904959-4-4)

Korecká, L; Kovářová, A; **Krulišová, P;** Kašparová, J; Sýs, M; Metelka, R; Bílková, Z; Electrochemical magneto-immunosensors for analysis of single or multiple disease biomarkers, poster, 5th International Conference on Bio-Sensing Technology 7. – 10. května 2017, Riva del Garda, Itálie

Murasová, P; Kovářová, A; Korecká, L; Bílková, Z, Electrochemical immunosensor for rapid and specific detection of foodborne pathogens, RAFA 2017, 7. -10. 10. 2017., Praha 277, ISBN 978-80-7080-999-0.

Murasová, P; Kovářová, A; Srbová, J; Korecká, L; Bílková, Z, Optimalizace přípravy DNA sondy na bázi zlatých nanočástic využitelné pro elektrochemické sensory, RANK 2018, Pardubice 7. -8. 2. 2018., 49, ISBN 978-80-87436-12-7

Korecká, L; **Murasová, P;** Kovářová, A; Kašparová, J; Bílková, Z; Electrochemical

immunosensor for rapid detection of whole bacterial cells using metal nanoparticles as antibody label, 17th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2018), 3rd-7th June 2018, Rodos, Greece (Book of abstracts, pp 175)

Kašparová, J; Kovářová, A; **Murasová, P**; Palarčík, J; Česlová, L; Bílková, Z; Korecká, L; Electrochemically active probes based on coupling of quantum dots with bifunctional dendrons, 17th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2018), 3rd-7th June 2018, Rodos, Greece (Book of abstracts, pp 176)

Ostatní výstupy nesouvisející s tématem disertační práce

Publikace v odborných recenzovaných časopisech s IF

Kupčík, R; Macák, J; Řehulková, H; Sopha, H; Fabrik, I; Anitha, VC; Klimentová, J; **Murasová, P**; Bílková, Z; Řehulka, P; Amorphous TiO₂ Nanotubes as a Platform for Highly Selective Phosphopeptide Enrichment. ACS OMEGA 4(7), 12156 - 12166, 2019

Príspevky prezentované na vědeckých konferencích (plakátová sdělení):

Kupčík, R; Macák, J; **Krulišová, P**; Řehulka P, Bílková, Z; A Novel Carrier Based on TiO₂ Suitable for Isolation of His-tagged Recombinant Proteins and Peptides.; 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics; St. Louis, Missouri, USA, 31. 5. – 4. 6.2015, p. 116.

Kupčík, R; Macák, J; Řehulka, P; **Krulišová, P**; Bílková, Z; Enrichment of multiphosphorylated peptides using novel magnetic TiO₂ based nanomaterial. 14th Human Proteome Organization World Congress; Vancouver, Canada, 27. – 30. 9. 2015, p. 173.

Kupčík, R; Řehulka, P; Fabrik, I; Klimentová, J; Řehulková, H; Stulík, J.; **Krulišová, P**; Bílková, Z; Two-step elution of phosphopeptides from TiO₂ microparticles – an improved detection of multiphosphorylated peptides, 64rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics; San Antonio, Texas, USA, 5. 6. – 9. 6. 2016, p. 83.

Kupčík, R; Řehulka, P; Macák, J; Fabrik, I; Klimentová, J; Řehulková, H; **Krulišová, P**; Stulík, J; Bílková, Z; An improved detection of multiphosphorylated peptides using novel magnetic TiO₂ based nanomaterial; HPLC 2017, 18. – 22. 6. 2017, Prague, Czech Republic, p. 101.

Kupčák, R; Macák, J; Řehulka, P; **Krulišová, P**; Bílková, Z; Sopha, H; Highly selective isolation of tryptic phosphopeptides from the Jurkat T-cell lysate by novel nanomaterial, e.g. TiO₂ nanotubes decorated by Fe₃O₄ nanoparticles, ITP 2017, 10. – 13. 9. Gdaňsk, Poland, 2017, p. 114.

Kovářová, A; **Murasová, P**; Kašparová, J; Drbohlavová, J; Bílková, Z; Korecká, L; Application of electrochemical immunosensor for detection of biologically active molecules through utilization of nanoparticle-based tags, 1st Cross-Border Seminar on Electroanalytical Chemistry (ELACH), 4th - 6th April 2018, Furth im Wald (Book of abstracts, pp 37)

Kovářová, A; Kašparová, J; **Murasová, P**; Drbohlavová, J; Bílková, Z; Korecká, L; Nanoparticles as the key detection component of sandwich-type electrochemical immunosensor for simultaneous quantification of ovarian cancer biomarkers, ESEAC, 3.6.-7.6.2018, Rhodos, Řecko, s. 165.

Kovářová, A; Kašparová, J; **Murasová, P**; Drbohlavová, J; Bílková, Z; Korecká, L; Simultaneous electrochemical stripping analysis of 3 ovarian cancer biomarkers using magneto-immunosensor with metal nanoparticles as antibody labels, Bioelectrochemistry and bioelectronics of macromolecules (JW 70), 12th-15th June 2018, Brno (Book of Abstracts, pp 93-94)