

Immunosensory, wykorzystujące przeciwciała jako molekuly detekcyjne, są jednym z najpowszechniej stosowanych typów biosensorów w diagnostyce medycznej, kontroli jakości żywności oraz zanieczyszczeń środowiska. Ten typ biosensorów bazuje na wysoce specyficznym oddziaływaniu pomiędzy przeciwciałami a antygenem. Wykrywanie antygeny w badanej próbce jest możliwe dzięki wyłapywaniu antygenów przez przeciwciała unieruchomione na powierzchni sensora. Proces immobilizacji (czyli unieruchamiania) przeciwciał na powierzchni jest kluczowym krokiem w protokole funkcjonalizacji powierzchni immunosensora. Proces ten wymaga specjalnej uwagi ze względu na różne orientacje, które molekula przeciwciała może przyjmować na powierzchni takie jak: „flat-on”, „side-on”, „head-on” oraz „tail-on”. Orientacja przeciwciał na powierzchni wpływa na dostęp do miejsc wiążących antygen, ulokowanych na domenach F_{ab} , a w rezultacie określa efektywność wiązania antygenów do przeciwciał. Dlatego też zrozumienie i kontrola orientacji przeciwciał unieruchomionych na powierzchni jest przedmiotem wielu badań naukowych. Chętnie stosowanym sposobem immobilizacji przeciwciał jest „immobilizacja losowa”, która może być realizowana poprzez prostą adsorpcję fizyczną lub wiązanie kowalencyjne poprzez grupy aminowe. Jednak w tym przypadku dominująca orientacja przeciwciał jest zależna od wielu czynników takich jak gęstość powierzchniowa przeciwciał, reaktywność grup aminowych oraz oddziaływania białko-białko i białko-powierzchnia np. oddziaływania elektrostatyczne czy specyficzne oddziaływania molekuł. Dlatego dominująca orientacja przeciwciał unieruchomionych na powierzchni w wyniku protokołu funkcjonalizacji powierzchni biosensora powinna być uważnie zbadana. Pomimo znacznego wysiłku badaczy dokładne określenie dominującej orientacji przeciwciał pozostaje wciąż wyzwaniem szczególnie w przypadku złożonych makromolekularnych powierzchni.

W odpowiedzi na te wyzwania celem prezentowanego projektu jest określenie dominującej orientacji przeciwciał na złożonych powierzchniach biosensorycznych funkcjonalizowanych za pomocą warstw różnych molekuł i makromolekuł, a także analiza czynników wpływających na orientację przeciwciał. Planowane badania będą realizowane z wykorzystaniem metody Spektrometrii Masowej Jonów Wtórnych i nowatorskiego podejścia bazującego na analizie orientacji przeciwciał w funkcji ich ilości na powierzchni. Ta strategia analizy orientacji przeciwciał umożliwi bezpośrednie określenie dominującej wertykalnej orientacji przeciwciał na danej powierzchni. Dodatkowo, metoda Spektroskopii Odbiciowej Światła Białego zostanie wykorzystana do badania kinetyki adsorpcji przeciwciał, określenia ilości przeciwciał na powierzchni oraz monitorowania w czasie rzeczywistym wiązania antygenów w celu określenia efektywności ich rozpoznawania. Analiza powierzchni będzie również prowadzona przy wykorzystaniu Mikroskopii Sił Atomowych AFM, Elipsometrii Spektralnej i metody ELISA. Dominująca orientacja przeciwciał zostanie zbadana na złożonych warstwach molekularnych stosowanych do funkcjonalizacji powierzchni biosensorów takich jak warstwy białek, warstwy lipidowe czy szczotki polimerowe. Dodatkowo, zostanie zbadany wpływ czynników takich jak etap adsorpcji, pH roztworu oraz siła jonowa roztworu na dominującą orientację przeciwciał unieruchomionych na powierzchni poprzez adsorpcję fizyczną oraz wiązanie kowalencyjne.

Spodziewanymi rezultatami projektu jest poszerzenie wiedzy o dominującej orientacji przyjmowanej przez przeciwciała na różnych powierzchniach oraz głębsze zrozumienie oddziaływań determinujących orientację przeciwciał. Molekularne i makromolekularne warstwy na powierzchniach stałych podkładów sfunkcjonalizowane za pomocą przeciwciał są ważnymi układami mającymi szerokie zastosowanie w biosensorach i biotechnologii. Dla efektywnego działania takich zastosowań kluczowy jest wysoki udział przeciwciał przyjmujących aktywną orientację umożliwiającą wiązanie antygenów. Dlatego, spodziewane rezultaty projektu pomogą poprawić i zoptymalizować protokoły immobilizacji przeciwciał dla bardziej efektywnego działania biosensorów i innych platform biotechnologicznych bazujących na przeciwciałach.