

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA BIOFIZICĂ ȘI FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE DISERTAȚIE

Coordonatori științifici

CS I dr. Monica Potara

Prof. dr. Simion Aștilean

Absolvent

Raluca-Ioana Apetri

Cluj-Napoca

2025

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA BIOFIZICĂ ȘI FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE DISERTAȚIE

Detecția Vizuală a Proteinei C-Reactive Bazată pe Efectul
Tyndall pe Nanoparticule de Aur Funcționalizate cu Aptameri

Coordonatori științifici

CS I dr. Monica Potara

Prof. dr. Simion Aștilean

Absolvent

Raluca-Ioana Apetri

Cluj-Napoca

2025

Abstract

Noble-metal nanoparticles are frequently employed in nanomedicine for diagnostic and sensing purposes due to their tunable optical characteristics and high surface reactivity. This MSc dissertation focuses on the development of a visual approach for detecting C-reactive protein (CRP), an inflammation biomarker, by exploiting the Tyndall effect which involves light scattering by gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with a CRP-specific aptamer.

The detecting approach relies on measuring the amount of laterally scattered light from as-funfunctionalized colloidal AuNPs when exposed to a coherent light source (640 nm) in the presence of CRP. Upon aptamer-target engagement, AuNPs aggregate, changing the optical transparency and producing a distinct Tyndall beam. The phenomenon was observed by irradiating the colloidal suspension with a red laser pointer, and the optical effect was photographed with a smartphone camera for qualitative investigation.

The method was refined by controlling the aptamer and salt concentrations, and to confirm the determination of CRP, traditional colorimetric detection based on the color variation of the colloidal suspension was used, along with UV-Vis absorption spectroscopy. Reduced absorbance, along with visible variations in beam intensity, enabled quantitative detection of CRP. The suggested approach demonstrates a simple, low-cost, and label-free method for quick CRP sensing, which has potential uses in point-of-care diagnostics.

Cuprins

Introducere	5
Capitolul I: Proteina C-reactivă	6
I.1. Metodele utilizate pentru determinarea CRP	7
I.2. Nanoparticulele de metal nobil și proprietățile acestora	8
I.3. Utilizarea nanoparticulelor de metal nobil în detecție	10
I.3.1. Detecția colorimetrică.....	11
I.3.2. Detecția bazată pe deplasarea LSPR	12
I.3.3. Detecția bazată pe spectroscopia Raman amplificată de suprafață	12
I.3.4. Detecția bazată pe fluorescență	12
I.3.5. Detecția bazată pe efectul Tyndall.....	13
Capitolul II: Materiale și metode	15
II.1. Materiale	15
II.2. Metode	15
II.2.1 Sinteza nanoparticulelor de aur (AuNPs).....	15
II.2.2. Caracterizarea optică și morfologică a AuNPs	15
II.2.3. Funcționalizarea AuNPs cu aptamer	16
II.2.4. Testarea stabilității AuNPs în soluție salină înainte și după funcționalizarea cu aptamer.....	16
II.2.5. Detecția CRP bazată pe metoda colorimetrică	16
II.2.6. Detecția CRP bazată pe efectul Tyndall.....	17
II.2.7. Evaluarea specificității față de CRP a AuNPs funcționalizate cu aptamer	18
Capitolul III. Rezultate și măsurători experimentale	19
III.1. Caracterizarea optică și morfologică a AuNPs.....	19
III.2. Stabilitatea AuNPs în soluție salină și funcționalizarea cu aptamer	20
III.3. Detecția colorimetrică a CRP utilizând AuNPs funcționalizate cu aptamer	21
III.4. Detecția CRP prin intermediul efectului Tyndall utilizând AuNPs funcționalizate cu aptamer	26
III.5. Teste de specificitate	30
Concluzii	34
ANEXE	35
Bibliografie	37

Introducere

Proteina C-Reactivă (CRP) reprezintă un biomarker pentru descoperirea timpurie a bolilor cardio-vasculare, valorile sale crescute indicând, totodată, diferite inflamații sau infecții din organism. Pentru pacienți, nivelul scăzut de CRP din sânge, și anume, între 3-5 $\mu\text{g/mL}$ reprezintă un risc ridicat pentru apariția bolilor cardio-vasculare, între 1-3 $\mu\text{g/mL}$, un risc mediu, iar sub 1 $\mu\text{g/mL}$, un risc scăzut. Metodele standard de testare sunt costisitoare și presupun personal calificat, iar o soluție pentru identificarea CRP se bazează pe utilizarea nanoparticulelor de metal nobil, datorită rezonanțelor plasmonice de suprafață localizate care apar la interacțiunea cu lumina.

Lucrarea de față își propune dezvoltarea și evaluarea unei metode de detecție a proteinei C-Reactive (CRP), bazată pe efectul Tyndall. Acest efect reprezintă un fenomen de împrăștiere a luminii în soluțiile coloidale. S-au utilizat nanoparticule de aur (AuNPs) ce au fost funcționalizate cu un aptamer ce prezintă o specificitate ridicată față de CRP. Metoda de detecție este rapidă, are un cost redus și permite detecția vizuală a CRP, având nevoie doar de un pointer laser de culoare roșie de 640 nm, ca sursă de lumină pentru a pune în evidență efectul Tyndall. Rezultatele experimentale din această lucrare au fost obținute la Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe din cadrul Universității Babeș-Bolyai.

Studiul este împărțit pe trei capitole. Primul capitol cuprinde scurte informații despre ce este CRP, metodele prin care aceasta se poate determina, o scurtă prezentare a nanoparticulelor de metal nobil și a proprietăților pe care acestea le au și, în final, diferite metode de detecție. Aceste metode au la bază nanoparticulele de aur și a fost pus accentul pe detecția colorimetrică și importanța ei.

În cel de-al doilea capitol, sunt prezentate detaliile experimentelor ce au avut loc în laborator, începând cu sinteza AuNPs și apoi funcționalizarea cu aptamer a acestora. Tot în acest capitol, s-au detaliat modul în care s-a realizat detecția atât colorimetrică, cât și cea prin efectul Tyndall, urmând discuția despre testele de selectivitate realizate. Aici mai sunt ilustrate tehnicile de caracterizare optică și morfologică a nanoparticulelor prin cele două tipuri de metode, cea prin spectroscopia UV-VisNIR și cea prin microscopia electronică de transmisie (TEM).

În ultimul capitol, au fost interpretate rezultatele experimentale obținute. S-a început cu caracterizarea optică și morfologică a AuNPs, ca mai apoi să se studieze stabilitatea acestora în soluție salină, cu și fără aptamerul cu o specificitate ridicată față de CRP. După aceste experimente a avut loc realizarea detecției colorimetrice a CRP și detecția prin efectul Tyndall. Ultimul pas a fost cel al testelor de selectivitate pentru a concluziona că aptamerul folosit în experiment este specific doar pentru CRP. În final, sunt prezentate concluziile la care s-a ajuns.

Capitolul I: Proteina C-reactivă

În anul 1930, cercetătorii William Tillet și Thomas Francis de la Univeritatea Rockefeller au descoperit un bio-marker numit proteina C-reactivă (CRP), a cărei structură se poate observa în figura I.1. Aceasta reprezintă cea de a treia fracțiune serologică identificată de cei doi cercetători, dându-i numele de “fracțiunea C”, care putea fi extrasă de la pacienții infectați cu pneumococ. Componenta aceasta se diferenția de fracțiunile descoperite până atunci – nucleoproteică și polizaharidică capsulară- prin caracteristicile sale de a fi identificată cu ajutorul anticorpilor, indicând implicarea sa într-un anumit răspuns imun. În anii care au urmat, cercetătorii Oswald Avery și Maclyn McCarty au descris CRP ca fiind un “reactant de fază acută”, lucru care indica valori mult mai ridicate în serul pacienților care au fost expuși la stimuli inflamatorii, dar și în cazul miocarditei și al inflamației specific febrei reumatice. Un alt cercetător din Stockholm și-a dat seama de faptul că există o legătură între CRP și aterotromboză, nivelul de CRP crescând după un infarct miocardic acut. [1] Atunci când este vorba de concentrații medii de CRP, nu există o diferență clară între bărbați și femei, însă la femeile însărcinate s-a găsit o concentrație mai mare atunci când sarcina este înaintată. [2]

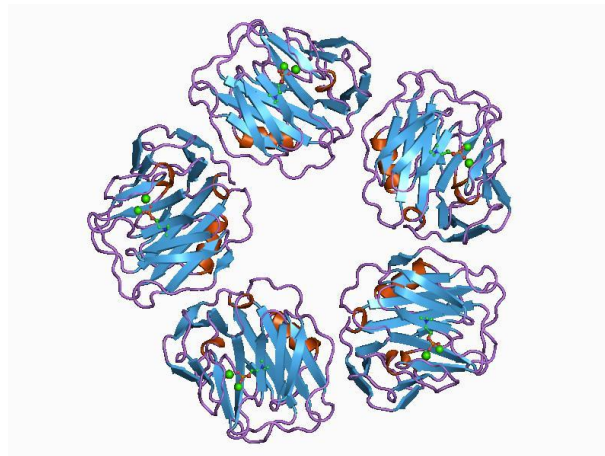


Figura I.1. Imagine cu proteina C-reactivă. [3]

În cazul adulților donatori de sânge, concentrația mediană a CRP ce se găsește în plasmă este de aproximativ 0,8 mg/L. Valoarea identificată a percentilei 90 este de 3 mg/L, iar la percentila 99 este de 10 mg/L. Atunci când apare un stimul inflamator intens, concentrațiile de CRP pot crește semnificativ, de la mai puțin de 50 μg/L, până la peste 500 mg/L, ceea ce reprezintă o creștere de până la 10.000 de ori față de valorile de bază. Hepatocitele sunt singurele care produc CRP, expresia sa fiind controlată exclusiv de nivelurile transcripționale de interleukina-6 (IL-6). S-a speculat că ar exista și alte surse de sinteză și secreție a CRP, însă nu s-au găsit dovezi clare în

acest sens. Ficatul își începe producția de CRP *de novo*, ca urmare a apariției unui stimul inflamator, în decursul a câteva ore. Prin urmare, nivelurile serice depășesc 5 mg/L în aproximativ 6 ore, iar în 48 de ore ajung la concentrația lor maximă. Indiferent dacă este vorba despre o stare de sănătate sau de boală, timpul de înjumătățire plasmatică a CRP este de aproximativ 19 ore. Ca rezultat, rata de sinteză hepatică este principalul factor care afectează concentrația de CRP, reflectând intensitatea procesului patologic care o stimulează. [4]

Pe de altă parte, s-a constatat că dezvoltarea bolii coronariene, a accidentului vascular și a infarctului miocardic acut sunt în strânsă legătură cu nivelul cronic redus al CRP sub 5 mg/L, făcând ca CRP să fie un marker pentru identificarea acestor boli. Recent, în timpul apariției COVID-19, s-a descoperit că CRP poate să fie utilizată în triajul pacienților diagnosticați cu COVID-19, putând prezice, totodată, și riscul de agravare a bolii. Astfel, pentru pacienții care au fost identificați cu un nivel crescut de CRP în sânge ($\geq 26,9$ mg/L) s-au observat riscuri semnificative de a evolua în cazuri grave, în timp ce pacienții cu un nivel redus de CRP nu sunt susceptibili la progresia bolii. [5]

I.1. Metodele utilizate pentru determinarea CRP

Determinarea concentrației serice a CRP este fundamentală pentru practica medicală modernă, fiind utilizată, după cum a fost menționat mai sus, pentru a evalua inflamațiile acute și procesele inflamatorii cronice. Testarea CRP poate fi realizată prin două proceduri, în funcție de contextul clinic și de sensibilitatea necesară. Aceste două metode sunt: o metodă standard și o metodă high-sensitivity CRP (hs-CRP).

Metoda standard pentru determinarea CRP a fost concepută pentru a identifica valori ridicate ale CRP, în intervalul 10-500 mg/L, cele mai frecvent utilizate fiind testele de aglutinare latex. Totuși, aceste metode au un grad scăzut de specificitate, rezultatul obținut fiind pozitiv, indiferent de severitatea inflamației. Au apărut ulterior metode mult mai moderne prezum nefelometria cu laser, imunonefelometria, turbidimetria, testele bazate pe chimioluminescență și testele imunoenzimatic (ELISA), care permit cuantificarea CRP cu precizie și rapiditate. [2] Aceste metode sunt mai eficiente, însă nu sunt adaptate pentru a se realiza testarea imediată a CRP direct în cabinetul medicului sau la patul pacientului, numită și testare de tip *Point of Care* (POC). Există niște dezavantaje precum faptul că sunt mai complexe, costisitoare, au nevoie de o durată mai lungă de timp pentru realizare, necesitând și un personal calificat. [5]

Nivelurile cronice scazute de CRP indica un risc ridicat de a dezvolta boli cardiovasculare, infarct miocardic acut sau accident vascular cerebral ischemic. Concret, un nivel cronic al CRP de 1 mg/L indica un risc scazut, de la 1 mg/L până la 3 mg/L – risc moderat, în timp ce nivelul CRP între 3 mg/L și 5 mg/L indica un risc ridicat pentru dezvoltarea acestor boli. Nivelurile scazute de CRP (între 0.3 și 10 $\mu\text{g/mL}$) sunt determinate cu testele high-sensitivity. [6]. Aceste teste sunt adaptate pentru cuantificarea

I.2. Nanoparticulele de metal nobil și proprietățile acestora

Metodele menționate anterior, cele standard și high-sensitivity, ce sunt utilizate pentru determinarea CRP au nevoie, de cele mai multe ori, de echipamente costisitoare, personal specializat, fapt ce poate împiedica utilizarea acestora în situații unde este necesar un răspuns rapid. Din această cauză, pentru diagnosticul contemporan, a apărut dorința de a crea metode alternative, ușor de utilizat. Aici își face simțită prezența nanotehnologia, în mod special utilizarea de nanoparticule de metal nobil, ce au oferit noi perspective asupra creării de biosenzori eficienți, capabili să răspundă conceptului POC.

Utilizarea nanoparticulelor de metal nobil (aur, argint) în (bio)senzorială se bazează pe exploatarea proprietăților fizico-chimice unice ale acestora, proprietăți care nu se întâlnesc la scară macroscopică. Spre exemplu, nanoparticulele coloidale de metal nobil, numite și nanoparticule plasmonice (PNPs), prezintă stabilitate chimică ridicată și o chimie a suprafeței care permite modificarea acestora cu elemente de recunoaștere moleculară pentru țintirea specifică a (bio)moleculelor de interes. Mai mult, proprietățile optice ale PNPs sunt dominate de așa-numita rezonanță plasmonică de suprafață (engl. surface plasmon resonance -SPR).

Rezonanța plasmonică de suprafață surprinde oscilația colectivă a electronilor liberi la suprafața unei nanoparticule de metal sub excitația unui câmp electromagnetic. Mai precis, atunci când o nanoparticulă metalică este excitată cu un câmp electromagnetic se produce o acumulare (confinare) a electronilor liberi la suprafața nanoparticulei, rezultând o separare de sarcină în interiorul nanoparticulei așa cum se poate observa în figura I.1. Această separare de sarcină dintre electronii liberi deplasați la suprafața nanoparticulei și nucleele ionice pozitive fixe are ca rezultat apariția unui forțe de restaurare în interiorul nanoparticulei care tinde să aducă electronii la poziția de echilibru, producând o oscilație dipolară a electronilor cu aceeași fază, aceștia oscilând cu așa-numita frecvență plasmonică. Rezonanțele plasmonice de suprafață apar când frecvența câmpului incident este în rezonanță cu oscilația coerentă a electronilor liberi din metal. Electronii aflându-se sub influența unui câmp electromagnetic incident, au ca rezultat determinarea și dispersarea

intensă a luminii în regiuni spectrale foarte bine definite în suspensiile coloidale ale metalelor prețioase. [7], [8]

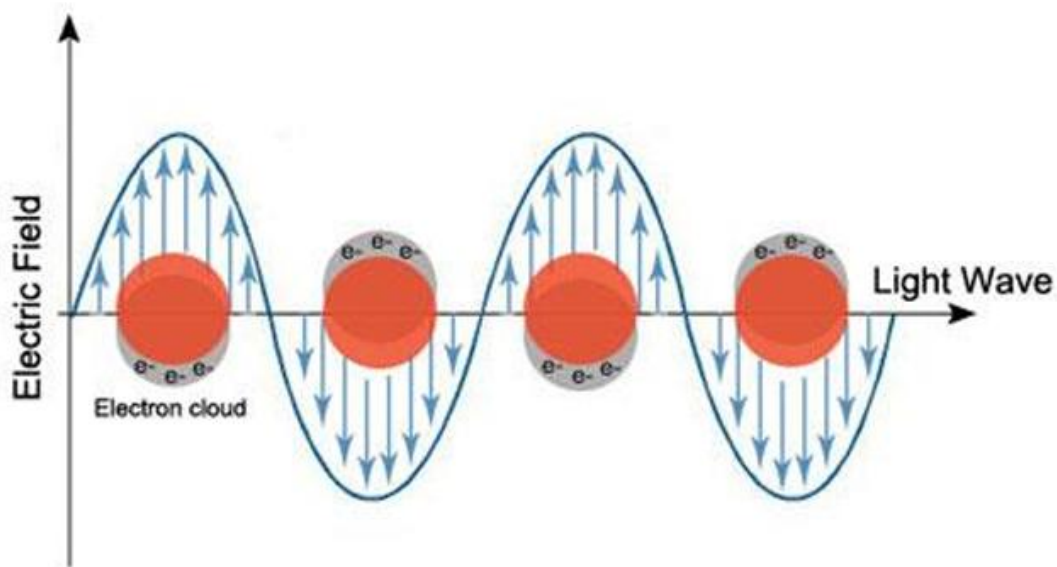


Figura I.1. Reprezentarea schematică a interacțiunii unei nanoparticule metalice de formă sferică cu un câmp electromagnetic [9]

La nanoparticulele de metal această rezonanță plasmonică de suprafață se află la suprafața particulei, de aici și numele de rezonanță plasmonică de suprafață localizată (LSPR). Pentru suspensiile de AuNPs, acestea capătă culori vii și caracteristice, un exemplu fiind culoarea roșu pentru nanoparticulele de formă sferică ce au fost dispersate în apă. [7] Această caracteristică a nanoparticulelor de metal, și anume, culorile acestora, reprezintă o consecință a LSPR. Forma și poziția LSPR în cazul nanoparticulelor de metal nobile suspendate în soluție sunt influențate de: dimensiunea NPs, forma NPs, distribuția de dimensiuni, distanța interparticule, constanta dielectrică a mediului ce înconjoară nanoparticulele și constanta dielectrică a metalului din care sunt confecționate. [10]

După cum a fost menționat anterior, dimensiunea nanoparticulelor este foarte relevantă pentru forma și poziția LSPR, întrucât dacă diametrul lor crește, va avea loc o deplasare spre roșu, adică un anume “red-shift” a benzii plasmonice și lărgirea acesteia. În ceea ce privește forma nanoparticulelor, aceasta este în strânsă legătură cu sarcina de la suprafața particulei, iar un exemplu foarte relevant pentru această informație este faptul că nanoparticulele ce au formă de bastonaș prezintă două benzi plasmonice. Aici are loc oscilația electronilor pe două direcții:

longitudinală și transversală. Deși modurile plasmonice transversale au acumulare de sarcină maximă, cele longitudinale au acumulare minimă, fapt ce explică deplasarea spre roșu a LSPR transversală. Deplasarea poate fi extinsă din regiunea vizibilă până în infraroșu (NIR) prin ajustarea raportului de aspect (lungime/grosime), fapt care determină și modificarea culorii soluției coloidale. [7]

În cazul distribuției de dimensiuni, au fost obținute rezultate foarte bune în ceea ce privește sinteza de nanoparticule monodisperse. În cazul lor, LSPR are o formă îngustă, iar la cele polidisperse se poate observa lărgirea benzii LSPR. O altă caracteristică ce influențează poziția și forma LSPR o constituie indicele de refracție al mediului dielectric ce înconjoară nanoparticula. Această sensibilitate se poate exploata în fabricarea senzorilor optici bazați pe detecția LSPR. [7]

Dezvoltarea metodelor de sinteză permite obținerea cu un înalt grad de reproductibilitate a suspensiilor coloidale de nanoparticule de aur, argint sau combinații Au-Ag cu dimensiuni și forme bine controlate, astfel încât să răspundă unei aplicații vizate.

I.3. Utilizarea nanoparticulelor de metal nobil în detecție

Nanoparticulele de argint (AgNPs) și nanoparticulele de aur (AuNPs) sunt utilizate frecvent pentru a putea detecta ioni metalici, biomolecule și substanțe toxice în probele din mediu, biologice și alimentare. Nanoparticulele funcționale cu elemente de (bio)recunoaștere interacționează cu compușii țintă, iar răspunsul lor de (bio)recunoaștere este transformat în semnale detectabile, incluzând atât semnalul electrochimic, cât și cel optic. După cum s-a menționat anterior în lucrare, datorită proprietăților optice, nanoparticulele de aur (AuNPs) s-au utilizat în diferite metode de detecție. Ca și metode se numără colorimetria, detecția pe baza sensibilității LSPR la modificarea indicelui de refracție al mediului din jurul nanoparticulei, fluorescența, spectroscopia Raman amplificată de suprafață (engl. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)) și electrochimia, fiind niște metode rapide, neinvazive și sensibile. Metodele enumerate mai sus exploatează proprietățile nanoparticulelor plasmonice pentru a detecta concentrații cât mai scăzute de analit cu înaltă specificitate și a extinde intervalele de detecție, oferind atât informații calitative, cât și cantitative despre compusul țintă. [11] În figura I.3.1. este exemplificată integrarea nanoparticulelor de metal nobil în trei categorii de senzori: cel fluorescent, colorimetric și electrochimic. Aceste sisteme sunt mai apoi utilizate în diferite domenii precum protecția mediului, industria alimentară și biomedicină, arătând ca nanoparticulele au o aplicabilitate și o versatilitate largă în detecție. [8]

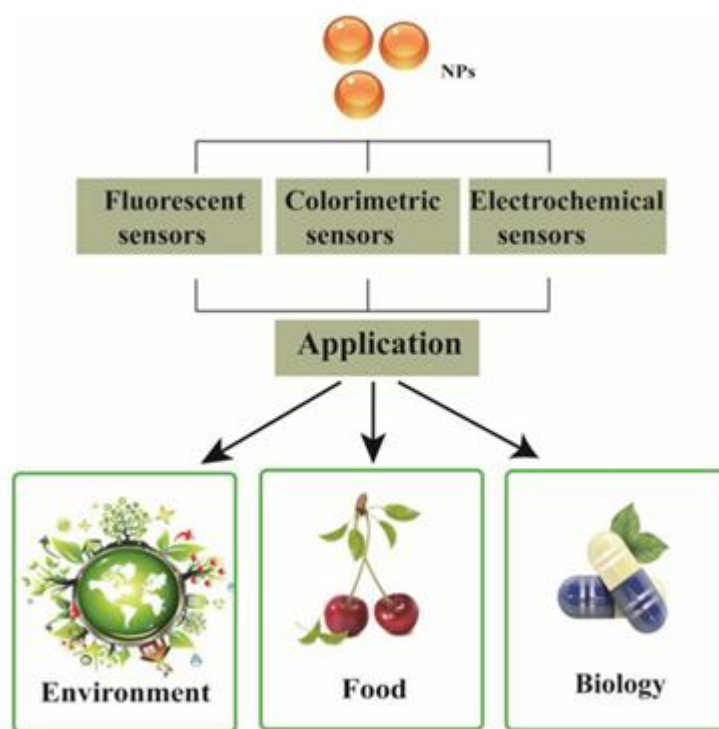


Fig I.3.1. Aplicațiile senzorilor de bază ai nanoparticulelor. [8]

Încorporarea metodelor optice cu tehnicile electrochimice a dus la crearea unor senzori ce sunt atât versatili, cât și bi-reactivi, ce au reușit să îmbunătățească semnificativ capacitățile de detecție. În continuare sunt descrise pe scurt câteva metode de detecție în care sunt exploatate proprietățile optice ale nanoparticulelor de metal nobil.

1.3.1. Detecția colorimetrică

Detecția colorimetrică este adaptată pentru determinarea în timp real și on-site a diferiților biomarkeri. Această tehnică se bazează pe agregarea nanoparticulelor, modificate cu elemente de (bio)recunoaștere în urma captării specifice a moleculelor țintă. Se știe că suspensiile coloidale de nanoparticule de metal nobil au culori vibrante, morfologia și cuplajul electromagnetic determinând culorile. Deci, se poate spune că atunci când nanoparticulele agregă, culoarea se modifică, putând fi observată cu ochiul liber, acest fenomen stând la baza mecanismului de detecție colorimetrică. Totuși, acesta nu este singura modificare determinată de agregarea nanoparticulelor. Schimbarea culorii soluțiilor coloidale este însoțită de modificări spectrale, mai precis de apariția unei benzi plasmonice noi, datorată nanoparticulelor agregate, ce se poate pune în evidență prin spectroscopia UV-Vis-NIR. [5] În timp ce detecția cu ochiul liber este o metodă calitativă, spectroscopia UV-Vis-NIR permite determinarea cantitativă a moleculei țintă. Pentru

aceasta este necesară realizarea unei curbe de calibrare care să coreleze gradul de agregare a nanoparticulelor cu concentrația moleculei de interes.

1.3.2. Detecția bazată pe deplasarea LSPR

Sensibilitatea LSPR la modificarea locală a indicelui de refracție al mediului din jurul nanoparticulei stă la baza detecției LSPR. Principiul de detecție se bazează pe cuantificarea deplasării poziției maximului LSPR în urma captării moleculei de interes de către nanoparticula metalică funcționalizată în prealabil cu un receptor specific. Metoda de detecție bazată pe deplasarea LSPR permite detecția calitativă și cantitativă a compușilor țintă prin înregistrarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR și realizarea unei curbe de calibrare prin reprezentarea grafică a deplasării LSPR în funcție de concentrația analitului.

1.3.3. Detecția bazată pe spectroscopia Raman amplificată de suprafață

Detecția SERS se bazează pe proprietatea nanostructurilor plasmonice de a amplifica semnalul Raman al moleculelor aflate în vecinătatea sau adsorbite pe suprafața metalică. Câmpul electromagnetic amplificat din jurul nanoparticulelor metalice, generat ca o consecință a LSPR, poate determina o creștere până la 6-7 ordine de mărime a semnalului Raman al moleculelor adsorbite pe suprafața metalică, ceea ce face posibilă detecția chiar și a unei singure molecule. Pe lângă sensibilitatea foarte ridicată, detecția bazată pe SERS prezintă avantajul de a identifica speciile moleculare prin așa-numita amprentă spectrală Raman, oferind informații structurale despre acestea. Prin acest fapt, tehnica SERS se poate utiliza în aplicații biomedicale și de biosenzori, având ca beneficii următoarele: nu are nevoie de etichetare sau de proceduri speciale, măsurătorile se pot efectua pe câțiva mililitri de probă, fiind nedistructivă, permițând realizarea mai multor măsurători pe aceeași probă. [12]. Mai mult, această tehnică este foarte adaptată pentru determinarea simultană (multiplexing) a mai multor biomarkeri de interes.

1.3.4. Detecția bazată pe fluorescență

O metodă de detecție utilizată pentru proiectarea senzorilor cu dublă reacție este fluorescența, ce s-a studiat la scară largă. Având o intensitate ridicată, timpi scurți de răspuns și afișajul vibrant al semnalelor fluorescente, senzorii electrochimici fluorescenți oferă o cuantificare foarte sensibilă și multiplexă. În combinație cu precizia electrochimică, se poate spune că fluorescența este un candidat foarte puternic pentru platformele de dublă citire. În cazul detecției fluorescență cu AuNPs există un principiu cheie de funcționare și anume transferul de energie prin fluorescență. Dacă

fluoroforii sunt așezați la suprafața nanoparticulelor, atunci va avea loc stingerea semnalului fluorescent. Acest lucru are loc atunci când are loc schimbul de energie dintre donor, care în acest caz este fluoroforul, și acceptorul care este nanoparticula. Prin realizarea acestui schimb, se permite crearea de senzori ce sunt activi sau inactivi, depinzând de prezența analitului. [8] Totuși, deși poate fi folosită ca metodă de detecție pentru identificarea celulelor canceroase împreună cu colorimetria, literatura și lucrările publicate se axează pe abilitățile cantitative ale fluorescenței. [11]

Metodele prezentate mai sus exploatează atât proprietățile optice ale nanoparticulelor de metal nobil, cât și capacitatea acestora de a putea fi modificate cu ușurință cu (bio)receptori pentru determinarea specifică a unui concentrații cât mai mici de analit. Aceste tehnici conferă o sensibilitate ridicată și capacități de detecție multiplexată, dar un mare dezavantaj îl reprezintă faptul că este nevoie de personal calificat, echipamente complexe, făcându-le astfel limitate din punct de vedere financiar și neadaptate pentru detecția de tip POC. Astfel, s-a dorit realizarea unei metode noi de detecție, ce pot fi mai accesibile și mai ușor de utilizat pentru a putea detecta selectiv și cuantifica diferiți biomarkeri. [13]

1.3.5. Detecția bazată pe efectul Tyndall

O alternativă o presupune detecția bazată pe efectul Tyndall. Efectul Tyndall este denumit după fizicianul John Tyndall din secolul al XIX-lea și este un tip de împrăștiere a luminii ce se desfășoară într-un coloid care conține particule cu mărimi mai mici decât lungimea de undă a luminii vizibile (400-700 nm). Diferiți cercetători au utilizat efectul Tyndall pentru a testa calitativ agregarea nanoparticulelor sau formarea de catalizatori coloidali. [14] Nanoparticulele coloidale din metale nobile au o eficiență ridicată pentru a dispersa lumina vizibilă la 90 de grade față de direcția luminii de excitație. Se știe deja faptul că intensitatea împrăștierii este direct proporțională cu dimensiunea grupului de nanoparticule agregate. Se poate spune, deci, că agregarea nanoparticulelor în soluție poate să genereze un semnal Tyndall mult mai bun, comparativ cu semnalul nanoparticulelor neagregate. S-au făcut diferite studii în trecut care au dezvoltat metode de detecție, dar nu prin schimbarea culorii, ca la detecția colorimetrică, ci prin metode bazate pe intensificarea semnalului Tyndall, ce surprinde agregarea nanoparticulelor după ce au interacționat cu analitul țintă. Totodată, s-a mai demonstrat și faptul că sensibilitatea testelor Tyndall este cuprinsă între 2 și 1000 de ori mai mare decât detecția colorimetrică bazată pe LSPR. [13]

În această lucrare se va exploata Tyndall pentru a determina proteina C-reactivă (CRP). Această strategie se diferențiază de metodele clasice întrucât folosește un simplu pointer laser ca sursă de

lumină, care are o lungime de undă de 640 nm și camera foto de la un telefon mobil, observându-se acest fapt în figura I.3.2. Avantajul acestei metode este că nu necesită un echipament special pentru a se realiza și nici personal calificat, aceste lucruri făcând ca detectia bazată pe efectul Tyndall să fie o alternativă mult mai ieftină și simplă față de detectia colorimetrică. [14]

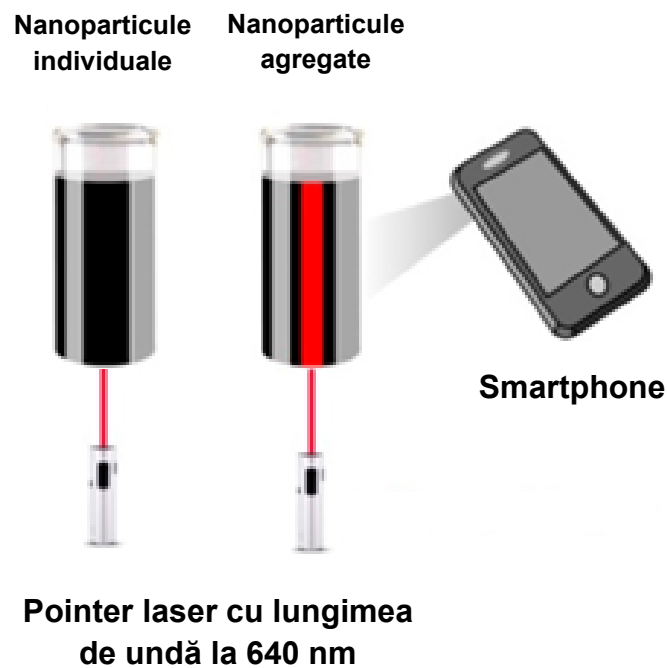


Figura I.3.2. Principiul de funcționare al efectului Tyndall în urma iluminării în întuneric a suspensiilor coloidale de nanoparticule de aur.[14]

Capitolul II: Materiale și metode

II.1. Materiale

Pentru realizarea lucrării de față s-au utilizat următoarele substanțe chimice: clorură aurică ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), citrat de sodiu tribazic dihidrat, clorură de sodiu, proteina C-reactivă (CRP), aptamer monocatenar cu specificitate față de CRP (5'-CGA AGG GGA TTC GAG GGG TGA TTG CGT GCT CCA TTT GGT G-3'), soluție tampon de tip buffer (TRIS-HCl cu supliment de EDTA) necesară pentru dizolvarea și diluția aptamerului, soluție salină tampon de tipul fosfat buffer salin (PBS) utilizată pentru diluarea CRP, acid ascorbic, L-glutamină, albumină serică umană (HSA). Toate substanțele chimice au fost utilizate în forma lor pură, fără a fi nevoie de alte procese de purificare. A fost utilizată apă ultrapură, ce avea o rezistivitate de 18 M Ω , pentru realizarea sintezei, purificării, diluării și re-suspendarea nanoparticulelor de aur. Proveniența apei a avut loc de la sistemul purificator Milli-Q (Millipore, Merck, Massachusetts, USA).

II.2. Metode

II.2.1 Sinteza nanoparticulelor de aur (AuNPs)

Suspensiile coloidale de nanoparticule de aur au fost obținute urmărind protocolul descris de Turkevich-Frens și adaptat ulterior în literatură. Metoda de sinteză constă în reducerea sării de aur cu citratul de sodiu la temperatură ridicată. În mod concret, într-un pahar Erlemeyer s-au pus la fiert, sub agitare magnetică, 100 ml de soluție apoasă de clorură aurică de concentrație 1 mM. În momentul în care soluția a început să fiarbă s-au adăugat 10 ml de soluție apoasă de citrat de sodiu de concentrație 38.8 mM, menținându-se agitarea magnetică. Reacția se finalizează într-un interval de 10-15 minute de la adăugarea citratului de sodiu. Suspensia coloidală obținută a fost purificată prin centrifugare (12000 rpm, 10 min) și resuspendare în apă ultrapură.

II.2.2. Caracterizarea optică și morfologică a AuNPs

Spectrele de absorbție UV-Vis-NIR au fost înregistrate cu ajutorul unui spectro-fotometru Jasco V- 730 UV Vis (anexa 1), care a fost asigurat de compania Jasco International Co., Ltd (Tokyo, Japonia). Acest spectro-fotometru are o rezoluție spectrală de 1 nm. Toate măsurătorile au fost realizate la temperatura camerei, în cuve de cuarț, care au un drum optic de 2 mm, procurate de la Hellma (Germania). Totodată, spectrele de absorbție s-au procesat cu software-ul Spectra

Manager. Caracterizarea morfologică a nanoparticulelor a fost realizată prin microscopia electronică de transmisie (TEM) (Anexa 2). Pentru colectarea imaginilor TEM s-a utilizat microscopul JEOL JEM-100CX II.

II.2.3. Funcționalizarea AuNPs cu aptamer

Aptamerii sunt secvențe scurte de acizi nucleici (ADN, ARN sau derivați sintetici) care pot recunoaște diverse ținte biologice, cu o specificitate și afinitate ridicată. În cazul lucrării, s-a utilizat un aptamer sintetic monocatenar, proiectat special pentru legarea proteinei C reactive (CRP). Acesta a fost atașat pe suprafața nanoparticulelor de aur (AuNPs) pentru a le menține dispersate în soluții saline și pentru a împiedica agregarea nespecifică. Diluarea și dizolvarea aptamerului au fost efectuate folosind o soluție tampon care a fost furnizată de producător. Funcționalizarea a fost realizată prin incubarea de 380 μ L de suspensie centrifugată de AuNPs cu 20 μ L de aptamer 40 μ M timp de 10 minute la 25 °C.

II.2.4. Testarea stabilității AuNPs în soluție salină înainte și după funcționalizarea cu aptamer

Pentru a verifica dacă nanoparticulele de aur sunt stabile în prezența sării a fost preparat un amestec format din 380 μ L de AuNPs + 20 μ L apă, combinat cu un volum de 20 μ L PBS + 45 μ L de NaCl 0,3M. Spectrele UV-Vis-NIR au fost înregistrate după ce proba a fost incubată timp de 10 minute la 25°C. Volumul de apă a fost adăugat pentru a înlocui aptamerul, iar soluția de CRP a fost înlocuită de PBS, acesta fiind solventul CRP. Folosind aceeași metodă, s-a efectuat și o evaluare a stabilității AuNPs funcționalizate cu aptamer.

II.2.5. Detecția CRP bazată pe metoda colorimetrică

Detecția colorimetrică a CRP s-a realizat prin evaluarea gradului de agregare a AuNPs funcționalizate cu aptamer, în urma expunerii dispersiilor coloidale la diferite concentrații de CRP (0-40 μ g/ml) în prezența unei soluții saline. Pentru aceasta, s-au realizat mai multe amestecuri, fiecare conținând 400 μ L suspensie coloidală de AuNPs funcționalizate cu aptamer, 20 μ L CRP de diferite concentrații și 45 μ L soluție apoasă de NaCl de concentrație 0.3 M. Aceste amestecuri au fost menținute timp de 10 min la o temperatură de 25 °C, utilizând pentru aceasta un vortex orbital cu temperatură controlată. Agregarea AuNPs funcționalizate cu aptamer rezultată în urma incubării acestora cu diferite concentrații de CRP a fost monitorizată atât vizual, prin observarea

Tyndall pe Nanoparticule de Aur Funcționalizate cu Aptameri

modificării culorii suspensiilor coloidale, cât și spectroscopic, prin înregistrarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR. Pentru a corela concentrația de CRP cu gradul de agregare a AuNPs s-a realizat o curbă de calibrare prin reprezentarea grafică a raportului dintre extincția (densitatea optică) la 590 nm, datorată nanoparticulelor agregate, și cea de la cea la 521 nm, caracteristică nanoparticulelor individuale (A_{590}/A_{521}), în funcție de concentrația de CRP. Această curbă de calibrare a fost utilizată pentru determinarea domeniului liniar de detecție, cuantificarea CRP și determinarea limitei de detecție.

II.2.6. Detecția CRP bazată pe efectul Tyndall

Pentru detecția CRP bazată pe efectul Tyndall, suspensiile coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer au fost incubate cu diferite concentrații de CRP în prezența sării, conform protocolului descris mai sus. După expirarea timpului de incubare (10 min) s-au colectat câte 125 μ l din fiecare probă și s-au diluat cu 4875 μ l apă ultrapură, aceste probe diluate fiind apoi analizate pentru detecția CRP pe baza efectului Tyndall. În primul pas, s-au colectat spectrele de împrăștiere ale suspensiilor coloidale expuse la diferite concentrații de CRP utilizând spectrofluorimetrul JASCO FP6500 (Japonia)-(Anexa 3), echipat cu o lampă cu xenon de 150 W ca sursă de excitație. Măsurătorile s-au realizat cu o rezoluție spectrală de 1 nm. Spectrele de împrăștiere au fost înregistrate în urma excitării la 640 nm. Lățimea benzii de excitație a fost fixată la 1 nm, în timp ce lățimea benzii de emisie a fost setată la 3 nm. Măsurătorile au fost realizate în cuve de 10 \times 10 mm. Prin reprezentarea grafică a raportului dintre împrăștierea Tyndall a nanoparticulelor agregate și cea a nanoparticulelor individuale (proba control fără CRP) în funcție de concentrația de CRP s-a realizat o curbă de calibrare cu un domeniu de liniaritate, necesară pentru calculul limitei de detecție și determinarea cantitativă a CRP.

În pasul următor, s-a testat capacitatea dispersiilor coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer de a activa ca senzori portabili pentru detecția vizuală a CRP pe baza efectului Tyndall. Pentru aceasta, dispersiile coloidale expuse la diferite concentrații de CRP au fost iluminate cu un pointer laser cu lungimea de undă la 640 nm, iar imaginile fotografice ale luminii împrăștiată au fost înregistrate cu un smartphone. Pentru cuantificarea CRP s-a realizat o curbă de calibrare prin reprezentarea grafică a raportului dintre intensitatea medie de roșu a luminii împrăștiată de suspensiile coloidale incubate cu diferite concentrații de CRP și cea a probei control (fără CRP) în funcție de concentrația de CRP. S-a obținut un domeniu de liniaritate și s-a calculat limita de detecție.

II.2.7. Evaluarea specificitatii fata de CRP a AuNPs functiionalizate cu aptamer

Pentru a testa specificitatea față de CRP a AuNPs funcționalizate cu aptamer, s-au realizat mai multe amestecuri conform procedurii descrise în subcapitolul II.2.5, cu mențiunea că cei 20 μl de CRP au fost înlocuiți cu 20 μl de diferite molecule (10 μg/mL) care se află în mod normal în probele biologice (acid ascorbic, L-glutamină, albumină serică umană (HSA)). Pentru referință am considerat o probă expusă la sare și incubată cu 10 μg/mL CRP. Pentru control am considerat o probă expusă la aceeași concentrație de sare, amestecată cu 20 μl PBS (fără a fi incubată cu CRP sau alte molecule). Am testat specificitatea AuNPs funcționalizate în detecția colorimetrică a CRP prin monitorizarea vizuală a culorii suspensiilor coloidale și prin colectarea spectrelor de extincție UV-Vis-NIR și compararea cu proba control și, respectiv, proba referință. Pentru testarea specificității AuNPs în detecția CRP pe baza efectului Tyndall, probele incubate cu acid ascorbic, L-glutamină, și HSA, respectiv proba control și cea de referință au fost mai întâi diluate conform procedurii descrise în subcapitolul II.2.6. S-au colectat spectrele de împrăștiere cu un spectrofluorimetru în urma excitării cu o lampă la 640 nm și s-au colectat imaginile fotografice ale dispersiilor coloidale în urma excitării cu un pointer laser la 640 nm și s-au comparat cu proba control și cea de referință.

Capitolul III. Rezultate și măsurători experimentale

Modalitatea de detecție din lucrare are la bază capacitatea suspensiilor coloidale de nanoparticule de aur (AuNPs) de a împrăști lumina vizibilă care trece prin acestea, prin așa-numitul efect Tyndall. Acest efect este dependent de dimensiunea, concentrația și distanța interparticule. Această detecție Tyndall se bazează pe observarea cu ochiul liber a unei raze de la un pointer laser de culoare roșie prin suspensia coloidală și pe cuantificarea luminii împrăștiată cu ajutorul unei camere de la un smartphone. În prezența CRP, în condiții de salinitate și în prezența unui aptamer ce are o specificitate ridicată față de CRP, are loc agregarea NPs, având ca și consecință schimbările semnificative care apar la intensitatea luminii împrăștiată. Pentru ca CRP să fie determinat s-au efectuat și măsurători spectroscopice, și anume: (1) s-au colectat spectrele de extincție UV-Vis-NIR ale suspensiilor coloidale expuse la diferite concentrații de CRP și (2) s-au înregistrat spectrele de împrăștiere ale suspensiilor coloidale expuse la diferite concentrații de CRP în urma excitării cu o lampă la 640 nm, utilizându-se un spectrofluorimetru. Identificarea CRP a avut loc prin funcționalizarea AuNPs cu un aptamer ce a prezentat o specificitate ridicată față de CRP. Această funcționalizare cu aptamer a oferit stabilitate AuNPs în soluție salină, în absența CRP. În continuare, este ilustrată realizarea experimentală a lucrării și rezultatele obținute, însoțite de concluzii.

III.1. Caracterizarea optică și morfologică a AuNPs

Prin schimbarea culorii amestecului de reacție de la galben la albastru închis, mai apoi în vișiniu (roșu-burgund), s-a observat obținerea de AuNPs. Această schimbare a fost vizibilă atât cu ochiul liber, fiind o consecință a interacțiunii rezonante a luminii cu NPs prin excitarea plasmonilor de suprafață, cât și prin spectrul de absorbție UV-Vis al nanoparticulelor. Un prim pas din această lucrare, a fost colectarea spectrului de absorbție a coloidului obținut prin sinteză și a coloidului obținut prin centrifugare. În momentul măsurării acestui spectru, s-a constatat faptul că AuNPs dețin o singură bandă plasmonică, care este localizată la 519 nm, deoarece generează un răspuns optic unic, al AuNPs, ce au formă sferică. Această bandă plasmonică se poate observa în figura III.1.1. de mai jos.

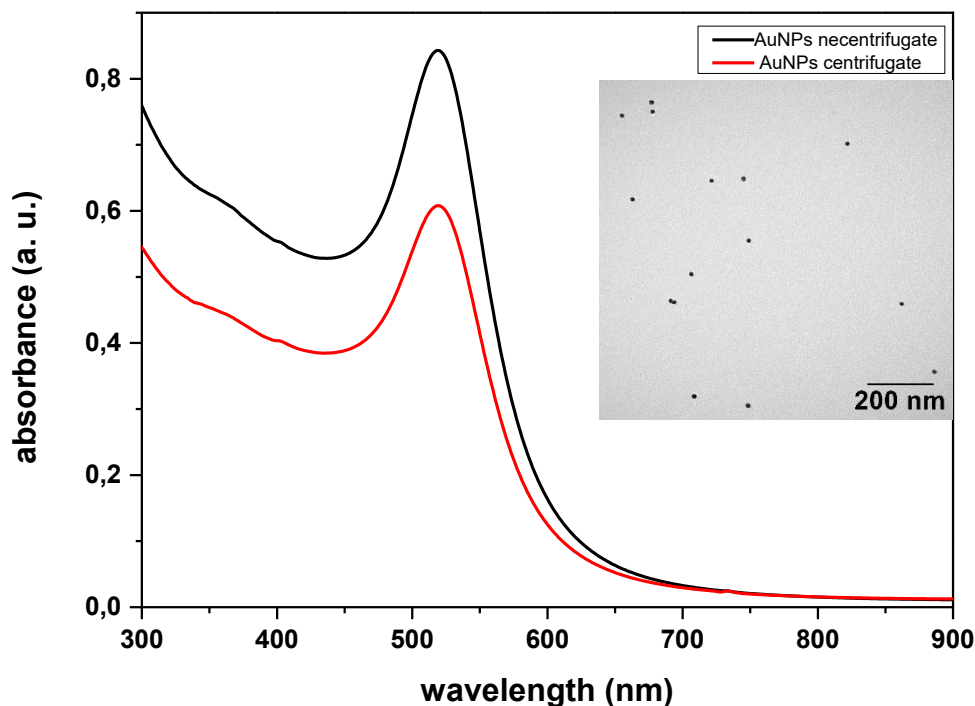


Figura III.1.1. Spectrul de absorbție UV-Vis al AuNPs în formă de sferă, înainte de a fi centrifugate, respectiv după centrifugare, ce au maximul de absorbție la 519 nm. În interiorul figurii este prezentată o imagine TEM a AuNPs.

Formarea nanoparticulelor de aur de formă sferică a fost confirmată și prin măsurători TEM, o imagine reprezentativă fiind prezentată în interiorul figurii III.1.1.

III.2. Stabilitatea AuNPs în soluție salină și funcționalizarea cu aptamer

Pentru a testa stabilitatea coloidală a AuNPs în soluția salină, s-au realizat teste comparative, între nanoparticulele nefuncționalizate și, respectiv, cele funcționalizate cu aptamer. S-a utilizat un volum de 380 μL de AuNPs incubat cu 20 μL de apă ultrapură, pentru a simula volumul aptamerului, combinat cu 20 μL PBS, acesta ținând locul CRP și 45 μL de NaCl, cu o masă molară de 0,3 M. Acest amestec a fost ținut timp de 15 minute, la o temperatură de 25 $^{\circ}\text{C}$, ulterior înregistrându-se spectrul de absorbție UV-Vis. S-a observat că în prezența sării, nanoparticulele agregă foarte rapid, banda plasmonică fiind vizibil mai largă, având loc și o scădere a absorbției nanoparticulelor individuale la 521 nm însoțită de o creștere a extincției în domeniul spectral 600-900 nm datorată nanoparticulelor agregate (figura III.2.1.)

Tyndall pe Nanoparticule de Aur Funcționalizate cu Aptameri

În paralel, a fost realizată și funcționalizarea nanoparticulelor cu aptamer. Practic, s-a înlocuit volumul de apă cu aptamer, concentrația utilizată de aptamer fiind de 40 μM . Primul lucru observat a fost faptul că nanoparticulele, în prezența aptamerului, prezintă o stabilitate ridicată. În plus, pe lângă benzile plasmonice caracteristice nanoparticulelor, în cazul spectrului funcționalizat cu aptamer, se observă apariția unei noi benzi la 251 nm, datorată aptamerului (251 nm), lucru ce se poate vedea în figura III.2.1.

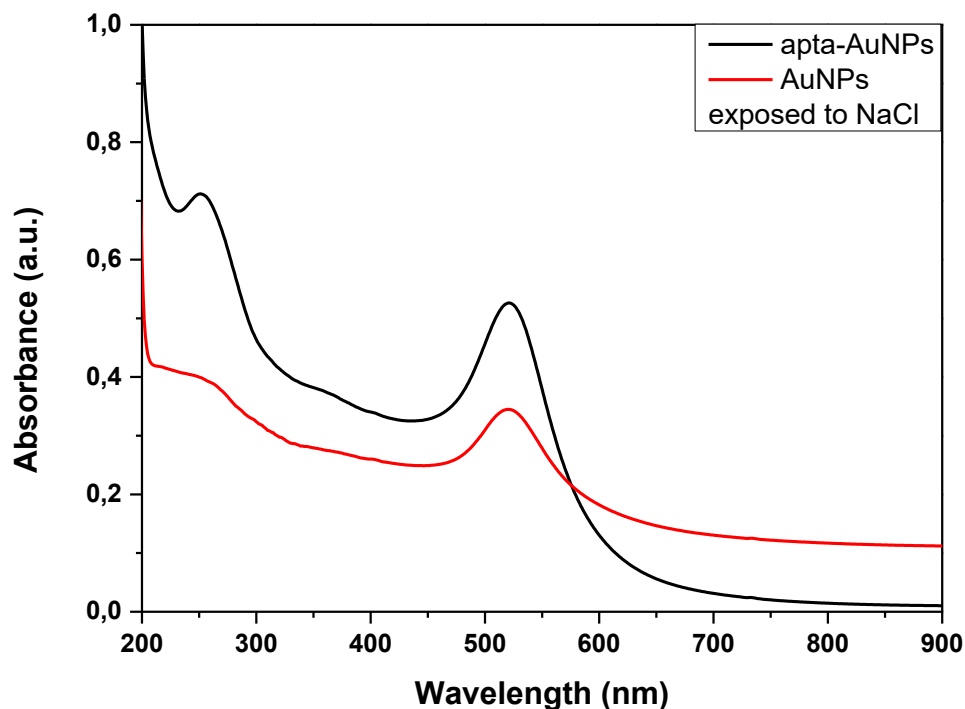


Figura III.2.1. Spectrele de extincție ale AuNPs și AuNPs funcționalizate cu aptamer, expuse la soluție salină.

III.3. Detecția colorimetrică a CRP utilizând AuNPs funcționalizate cu aptamer

Principiul de detecție folosit în această lucrare (Figura III.3.1.) are la bază capacitatea aptamerului de a se ancora peste suprafața nanoparticulelor de aur, creând, astfel, un strat protector ce le conferă stabilitate în soluția salină. Relevant este că, atunci când nu există CRP în soluție, nanoparticulele rămân dispersate și nu apare agregarea. Totuși, atunci când CRP este introdusă în amestecul ce conține și soluția salină, aptamerul captează CRP, având loc o rearanjare structurală a aptamerului. Acesta se va desface de pe suprafața nanoparticulelor, iar acestea vor fi expuse la soluția salină, fapt ce va determina agregarea lor.

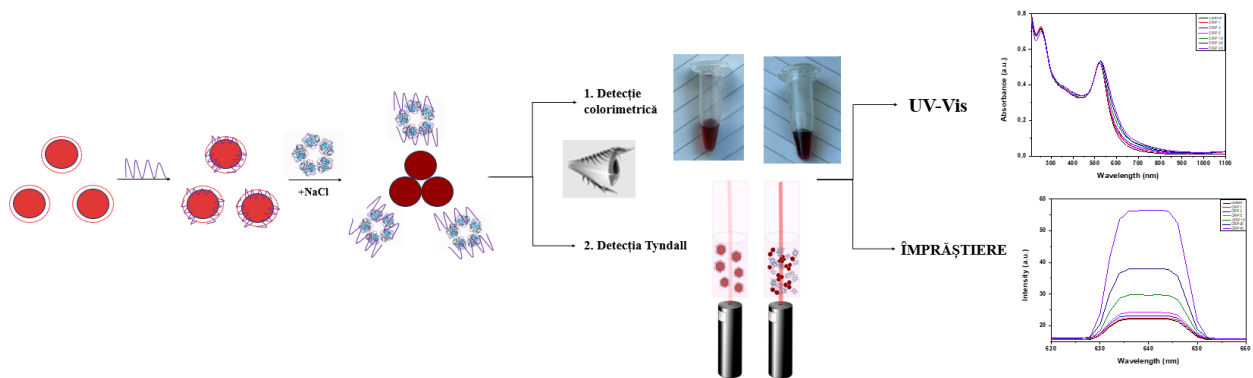


Figura III.3.1. Principiul de detecție utilizat.

Procesul de detecție surprinde modificarea culorii suspensiilor coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer în urma expunerii acestora la diferite concentrații de CRP în prezența sării. Incubarea a avut loc timp de 10 minute la 25 °C, folosind diferite concentrații de CRP (0-40 μg/ml), practic urmărindu-se capacitatea AuNPs funcționalizate cu aptamer de a detecta concentrații diferite de CRP, în prezența sării. Prin această expunere la diferite concentrații, a avut loc o schimbarea a culorii amestecului coloidal, de la vișiniu, care reprezenta proba de control cu 0 μg/ml, concentrație de CRP, la un vișiniu mai închis, aceasta fiind proba cu cea mai mare concentrație, și anume 40 μg/ml, CRP.

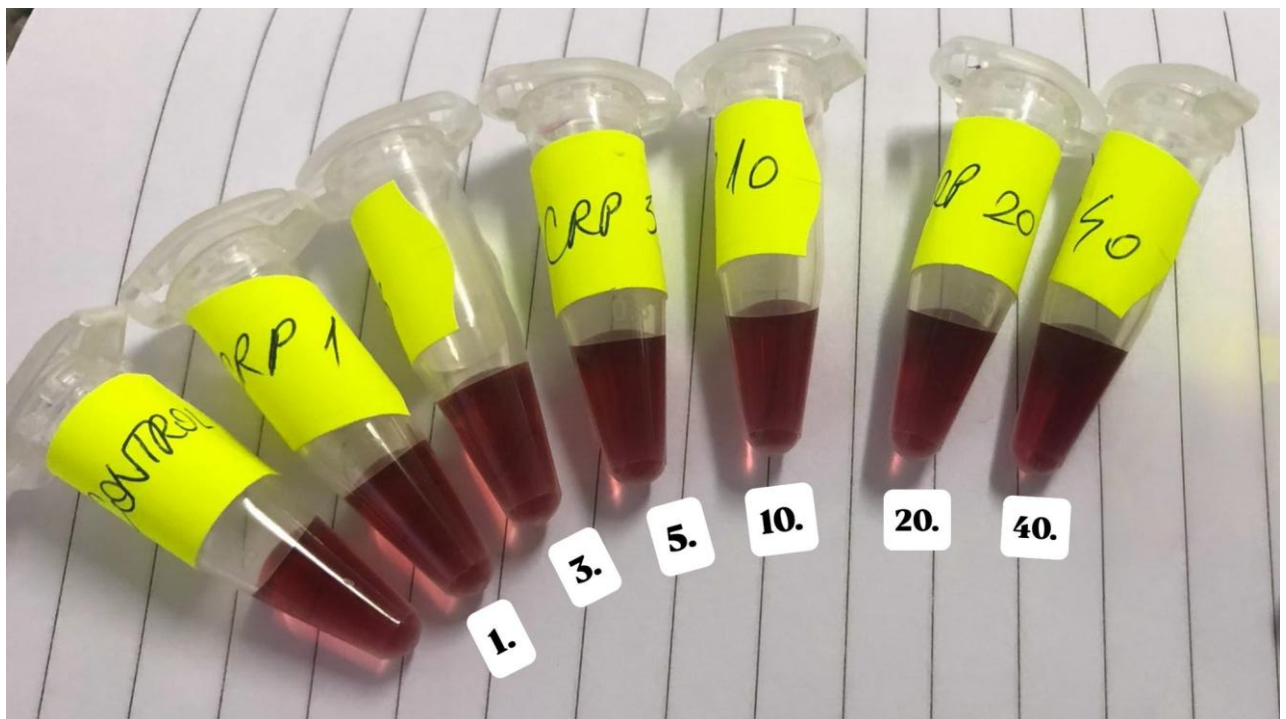


Figura III.3.2. Fotografie digitală realizată în laborator ce surprinde suspensiile coloidale AuNPs funcționalizate cu aptamer în urma expunerii la diferite concentrații de CRP în prezența sării.

În figura III.3.2. se poate observa că pe măsură ce concentrația de CRP a crescut, a avut loc și o modificare a culorii, vizibilă cu ochiul liber. Prima probă este cea de tip control, care conține, 400 μ l AuNPs funcționalizate cu aptamer, 20 μ L de PBS și 45 μ L de NaCl de 0,3M. Următoarele probe conțin concentrații de 1, 3, 5, 10, 20, 40 μ g/ml de CRP. Au fost alese aceste concentrații pentru a sublinia clar detectia cu ochiul liber, pentru că dacă erau folosite doar concentrații sub 10 μ g/ml de CRP, schimbarea culorii nu ar fi fost atât de vizibilă.

Totodată, aceste modificări ale culorii soluției coloidale nu au fost doar vizual, ci și prin modificările spectrale obținute prin colectarea de spectre de extincție. Acestea au fost colectate prin intermediul spectro-fotometrului UV-Vis JASCO V-730 și se pot observa în figura III.3.3. Prin aceste spectre, este ilustrat că pe măsură ce crește concentrația de CRP, are loc o scădere a absorbantei nanoparticulelor individuale la 521 nm și o creștere a acesteia în domeniul 550-750 nm ce este datorată nanoparticulelor agregate.

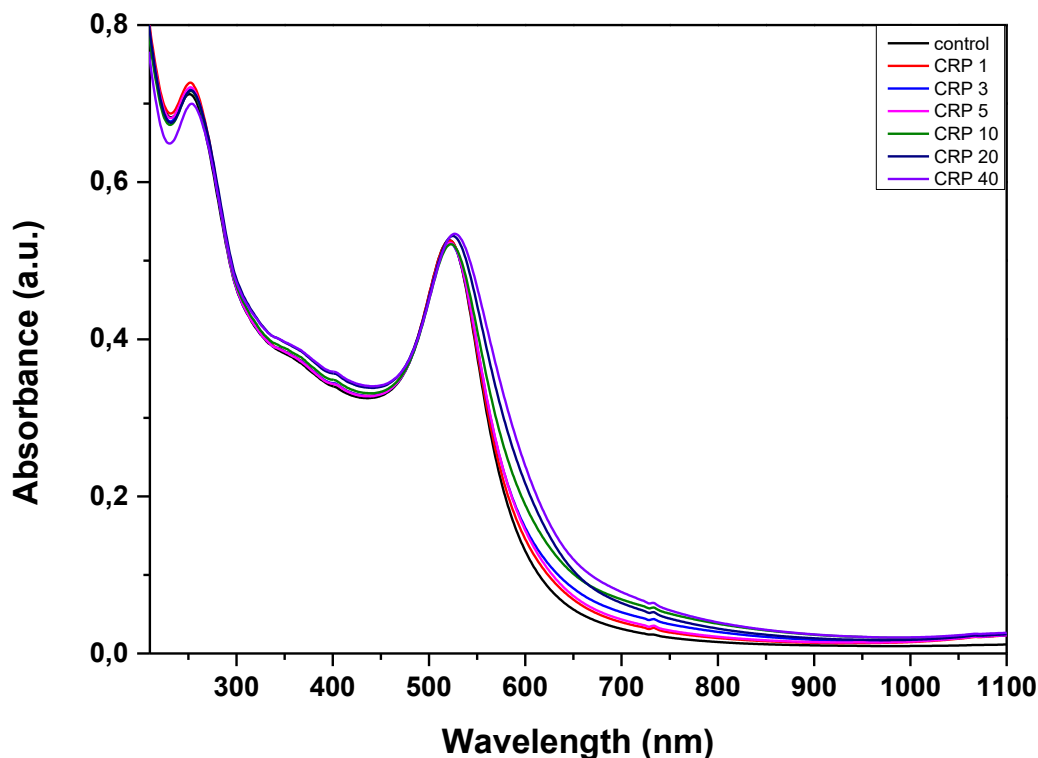


Figura III.3.3. Spectrele de absorbție ale AuNPs funcționalizate cu aptamer în urma expunerii la diferite concentrații de CRP în prezența sării.

Pentru a face o analiză cantitativă, a fost calculat raportul dintre absorbantele nanoparticulelor agregate ce se află la 590 nm și absorbantele nanoparticulelor individuale de la 521 nm, totul în funcție de concentrația de CRP, reprezentându-se printr-o curbă de calibrare (figura III.3.6.). Au fost folosite trei seturi de măsurători (Tabelul III.3.4.), fiind calculată valoarea medie a raportului A590/A521 a fiecărei concentrații de CRP și deviația standard (Tabelul III.3.5.).

Tabelul III.3.4. Absorbantele nanoparticulelor agregate (590 nm) și ale nanoparticulelor individuale (521 nm).

	măsurătoarea 1		măsurătoarea 2		măsurătoarea 3	
	A521	A590	A521	A590	A521	A590
c	0,525	0,164	0,526	0,165	0,526	0,159
1	0,528	0,180	0,525	0,173	0,528	0,168
3	0,527	0,186	0,522	0,187	0,532	0,182
5	0,525	0,190	0,522	0,183	0,538	0,183
10	0,528	0,207	0,520	0,218	0,534	0,213
20	0,533	0,237	0,529	0,249	0,543	0,252
40	0,536	0,283	0,529	0,257	0,546	0,294

Tabelul III.3.5. Valorile rapoartelor absorbanțelor, valoarea medie și deviația standard.

A590/521- măsurătoarea 1	A590/521- măsurătoarea 2	A590/521- măsurătoarea 3	Media	Deviația standard
0,312	0,313	0,302	0,309	0,006
0,340	0,329	0,318	0,329	0,011
0,352	0,358	0,342	0,350	0,008
0,361	0,350	0,340	0,350	0,010
0,392	0,419	0,398	0,403	0,014
0,444	0,470	0,464	0,459	0,013
0,527	0,485	0,538	0,516	0,027

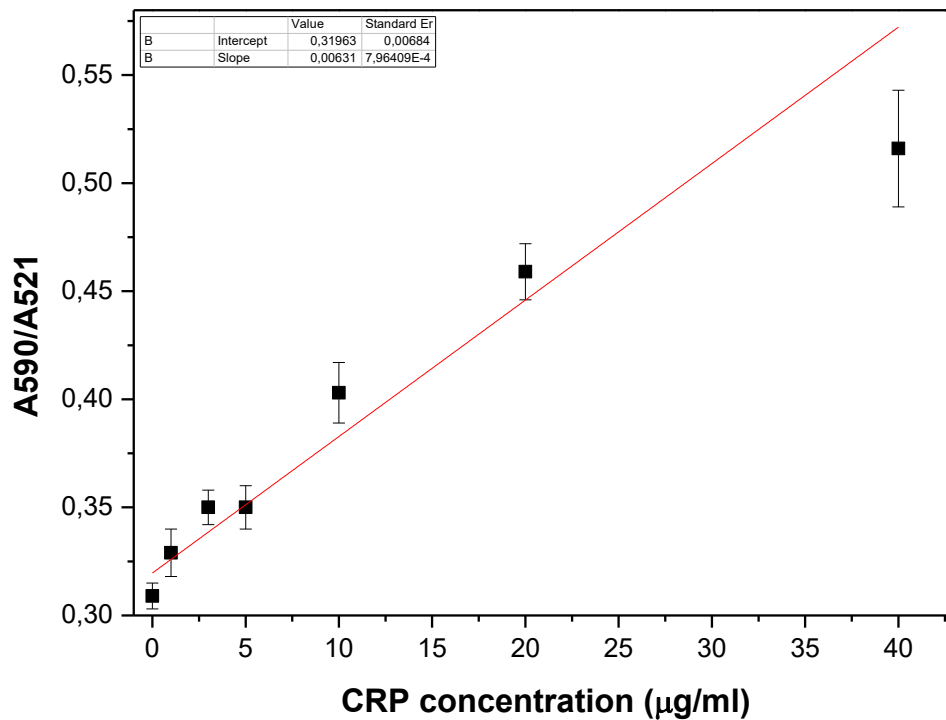


Figura III.3.6. Curba de calibrare reprezentată prin raportul dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (590 nm) și cea a nanoparticulelor individuale (521 nm), în funcție de concentrația de CRP.

Folosind această curbă de calibrare am calculat limita de detecție (limit of detection -LOD) prin metoda colorimetrică, utilizând ecuația de mai jos:

$$LOD = \frac{3.3 S_y}{S}$$

S_y și S s-au obținut din curba de calibrare, S_y reprezentând deviația standard, iar S panta curbei. Am obținut o limită de detecție de 2,26 $\mu\text{g/ml}$ și un domeniu de liniaritate între concentrațiile de CRP 1-20 $\mu\text{g/ml}$.

Deși curba de calibrare rezultată din raportul A_{590}/A_{521} nu este perfect liniară pe intervalul de concentrații de CRP testat, acest lucru nu afectează semnificativ validitatea metodei. Întrucât obiectivul principal al metodei este de a optimiza o detecție utilizând efectul Tyndall, lipsa unei

curbe de calibrare liniare în analiza UV-Vis este acceptabilă, detecția finală bazându-se pe efectul Tyndall, nu pe detecția colorimetrică clasică.

Pentru a înțelege mai bine efectul diferitelor concentrații de CRP asupra morfologiei nanoparticulelor, s-au efectuat și analize TEM. În figura III.3.7. sunt prezentate imaginile TEM ale AuNPs funcționalizate cu aptamer după incubarea timp de 10 min cu CRP de concentrație 0, 3, 10 și 40 $\mu\text{g/ml}$ în prezența sării. Remarcăm că proba control (0 $\mu\text{g/ml}$ CRP) conține nanoparticule sferice individuale. În proba incubată cu 3 $\mu\text{g/ml}$ CRP remarcăm apariția unor mici agregate de nanoparticule, în același timp fiind prezent și un procent de nanoparticule individuale. Proba incubată cu 10 $\mu\text{g/ml}$ CRP conține agregate mai mari comparativ cu proba incubată cu 3 $\mu\text{g/ml}$ CRP, observându-se totuși și nanoparticule individuale. În proba expusă la 40 $\mu\text{g/ml}$ CRP procentul de nanoparticule individuale este extrem de redus, aproape toate nanoparticulele fiind agregate în clusteri de dimensiuni mai mari decât în cazul probelor expuse la concentrații mai mici de CRP (3, 10 $\mu\text{g/ml}$ CRP). Practic, creșterea concentrației de CRP determină o creștere a gradului de agregare a nanoparticulelor, ceea ce corelează atât cu imaginile fotografice (modificarea culorii suspensiilor coloidale), cât și cu măsurătorile UV-Vis (creșterea densității optice în domeniul spectral 550-750 nm).

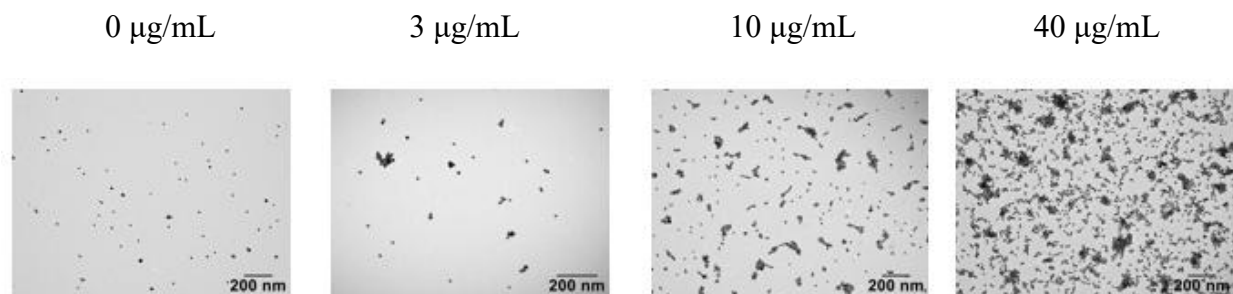


Figura III.3.7. Imagini TEM reprezentative ale AuNPs funcționalizate cu aptamer expuse la concentrațiile 0, 3, 10, 40 $\mu\text{g/mL}$ de CRP în prezența sării.

III.4. Detectia CRP prin intermediul efectului Tyndall utilizând AuNPs fuctionalizate cu aptamer

S-au înregistrat spectrele corespunzătoare împrăștierii luminii (Figura III.4.1.) de către suspensiile coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer, în prezența concentrațiilor crescânde de CRP, pentru a evalua potențialul metodei bazate pe efectul Tyndall. Metoda se bazează pe faptul că agregarea nanoparticulelor duce la o intensificare semnificativă a împrăștierii luminii. Măsurătorile s-au realizat utilizând un spectrofluorimetru, probele fiind excitate cu o lampă la 640

Tyndall pe Nanoparticule de Aur Funcționalizate cu Aptameri

nm. Pentru evaluarea efectului Tyndall, pentru fiecare spectru s-a luat în considerare intensitatea la 640 nm. Agregarea este dependentă de concentrația proteinei, deoarece spectrele obținute arată un semnal de împrăștiere mai intens pe măsură ce concentrația CRP crește. Trei măsurători au fost efectuate pentru fiecare concentrație testată, iar media și deviația standard au fost determinate folosind intensitățile maxime înregistrate la 640 nm. Pentru o interpretare cantitativă, raportul dintre intensitatea semnalului pentru fiecare concentrație și intensitatea medie pentru proba control (0 $\mu\text{g/mL}$ CRP) a fost calculat. Raportul a fost reprezentat grafic în funcție de concentrația de CRP și a arătat variația relativă a semnalului de împrăștiere față de control. O corelație liniară în intervalul 0-40 $\mu\text{g/mL}$ este evidențiată de curba de calibrare rezultată. (Figura III.4.2.). În mod similar cu cel descris la metoda colorimetrică s-a calculat LOD, obținându-se o valoare de 0,148 $\mu\text{g/mL}$.

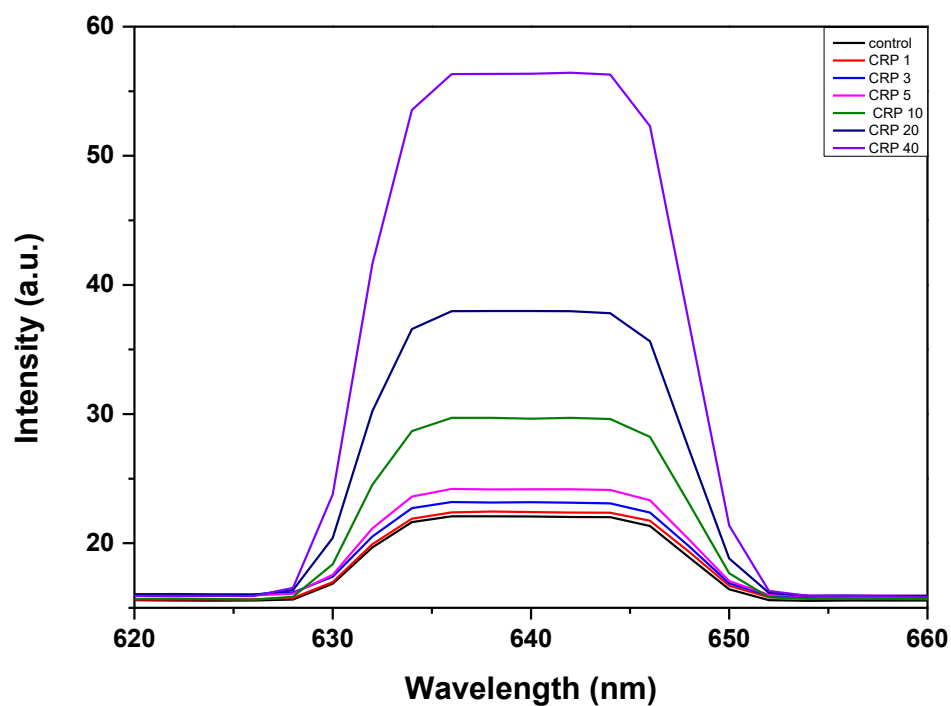


Figura III.4.1. Spectrele de împrăștiere a AuNPs funcționalizate cu aptamer incubate cu diferite concentrații de CRP în prezența sării, excitate cu o lungime de undă de 640 nm.

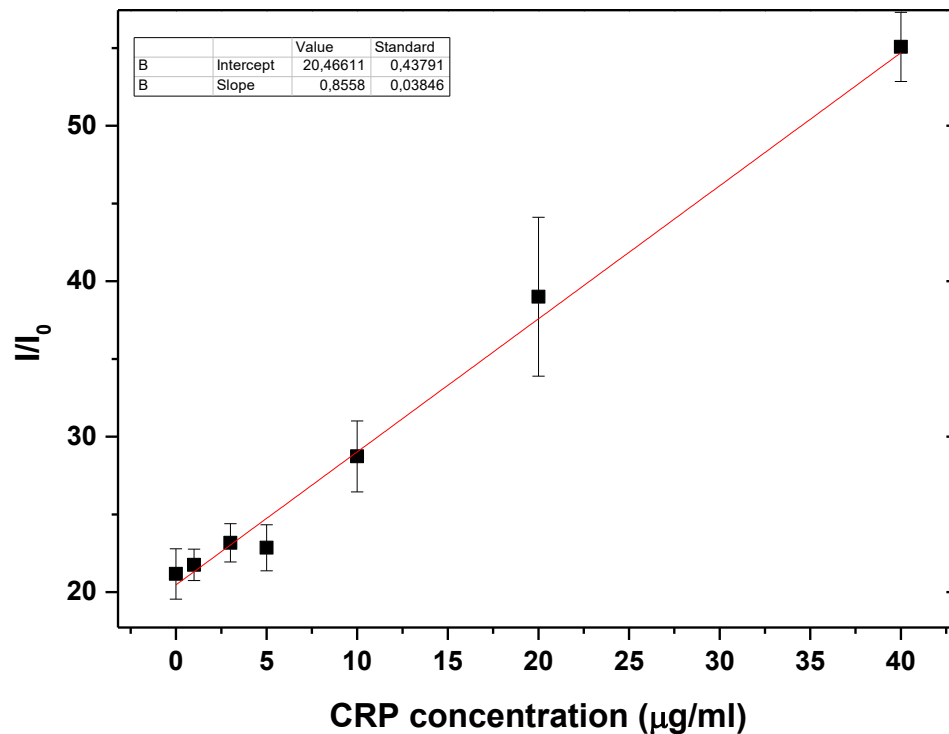


Figura III.4.2. Raportul dintre împrăștierea Tyndall a nanoparticulelor agregate și cea a nanoparticulelor individuale (proba control fără CRP) în funcție de concentrația de CRP.

Această lucrare a examinat două metode de detecție complementare, fiecare având propriile beneficii. Tehnologia bazată pe efectul Tyndall s-a dovedit a fi eficientă în evidențierea prezenței CRP la concentrații reduse; a existat un răspuns evident începând cu 1 $\mu\text{g/mL}$, ceea ce o face adecvată pentru aplicațiile care au nevoie de sensibilitate ridicată. În schimb, detecția a fost completată prin analiza spectroscopică UV-Vis, care a oferit o imagine clară a procesului de agregare la concentrații mai mari. În comparație cu analizele clasice din laboratoare, ambele metode se disting prin rapiditatea testului – care durează aproximativ 10 minute – și simplitatea procedurală. Totuși, pentru cuantificarea CRP a fost necesară utilizarea echipamentelor de laborator (spectrofotometru, respectiv spectrofluorimetru) ceea ce presupune creșterea costului analizei. Pentru a depăși acest neajuns, în continuare am demonstrat detecția CRP pe baza efectului Tyndall utilizând un pointer laser cu lungimea de undă de 640 nm ca sursă de excitație și camera unui smartphone pentru citire.

Suspensiile coloidale au fost plasate în întuneric (într-o incintă), fiind iradiate cu un pointer laser, și fotografiate cu un smartphone, ȳ păstrând aceeași distanță între camera de la telefon și soluție. Aceste caracteristici au fost utile în a împiedica prezența unor interferențe luminoase, respectiv a

unor erori experimentale. În figura III.4.3. sunt ilustrate rezultatele obținute prin fotografierea suspensiilor coloidale expuse la diferite concentrații de CRP.

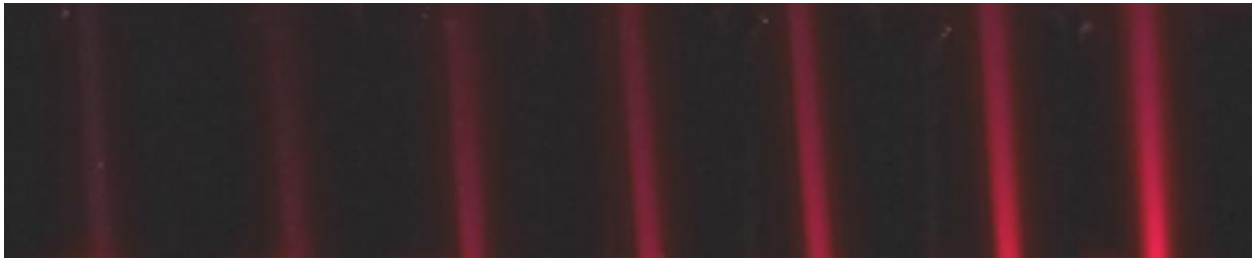


Figura III.4.3. Imaginile digitale ale soluțiilor coloidale incubate cu diferite concentrații de CRP (0-40 $\mu\text{g/mL}$) excitate cu un pointer laser de 640 nm.

Pentru realizarea cuantificării semnalului, imaginile au fost analizate în software-ul ImageJ, de unde a fost extrasă valoarea medie a semnalului roșu (ARV) și valoarea soluției control (proba fără CRP)- ARV_0 . S-a făcut raportul între cele două valori ARV/ARV_0 și a fost reprezentat grafic în funcție de concentrația de CRP (Figura III.4.4.) S-a obținut o limită de detecție de 0,35 $\mu\text{g/mL}$, și un domeniu linear de detecție între concentrațiile de CRP 1-40 $\mu\text{g/mL}$.

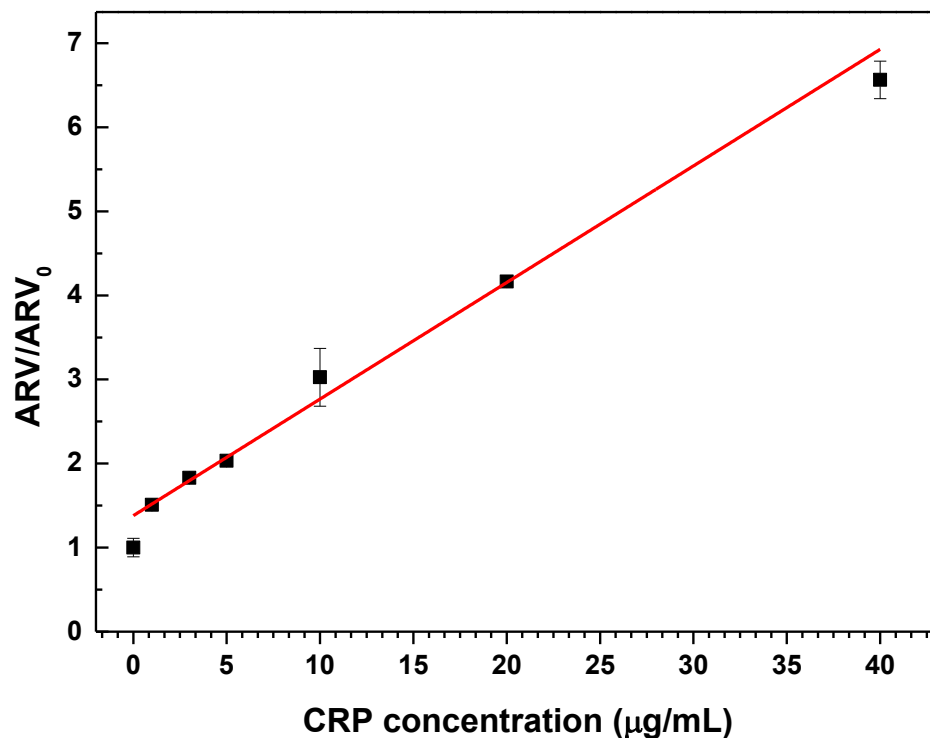


Figura III.4.4. Valorile raportului ARV/ARV_0 reprezentate în funcție de concentrația de CRP.

III.5. Teste de specificitate

Un lucru important pentru această lucrare a fost capacitatea AuNPs de a identifica specific CRP. Astfel, s-au făcut teste de specificitate pentru AuNPs funcționalizate cu aptamer, utilizând molecule care ar putea intra în contact cu CRP în cazul unei detecții reale. Aptamerul utilizat în experiment a fost unul cu o specificitate ridicată față de CRP, deci atunci când CRP va fi înlocuit cu celelalte molecule, trebuie urmărit stadiul de agregare al AuNPs în prezența soluției saline. Moleculele utilizate pentru această specificitate sunt molecule care se găsesc în plasmă și anume acid ascorbic (AA), L-glutamină și albumină serică umană (HSA).

În figura III.5.1. sunt ilustrate spectrele de extincție ale soluțiilor coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer, expuse la soluție salină, în urma incubării cu CRP, AA, L-glutamină și HSA de concentrație 10 $\mu\text{g/ml}$, la 25°C, timp de 10 minute. În imaginea de mai jos, se observă cum spectrul de extincție al substanțelor incubate cu AA, L-gluta și HSA prezintă o creștere a absorbantei. Suspensia coloidală incubată cu CRP (spectrul roșu) prezintă un stadiu ridicat de agregare, fiind vizibil prin lărgirea benzii plasmonice și creșterea extincției în domeniul spectral 550-700 nm. În figura III.5.2. se observă că soluția coloidală incubată cu CRP prezintă un grad mai mare de agregare, comparativ cu soluțiile coloidale incubate cu moleculele menționate anterior, demonstrând specificitatea față de CRP a AuNPs funcționalizate cu aptamer.

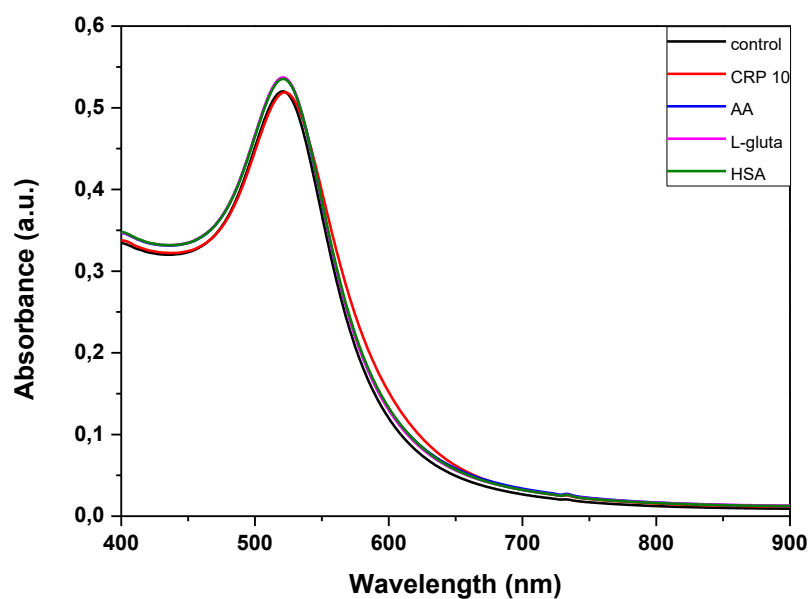


Figura III.5.1. Spectrele suspensiilor coloidale de AuNPs funcționalizate cu aptamer, expuse la NaCl, incubate cu CRP, AA, L-glutamină, HSA.

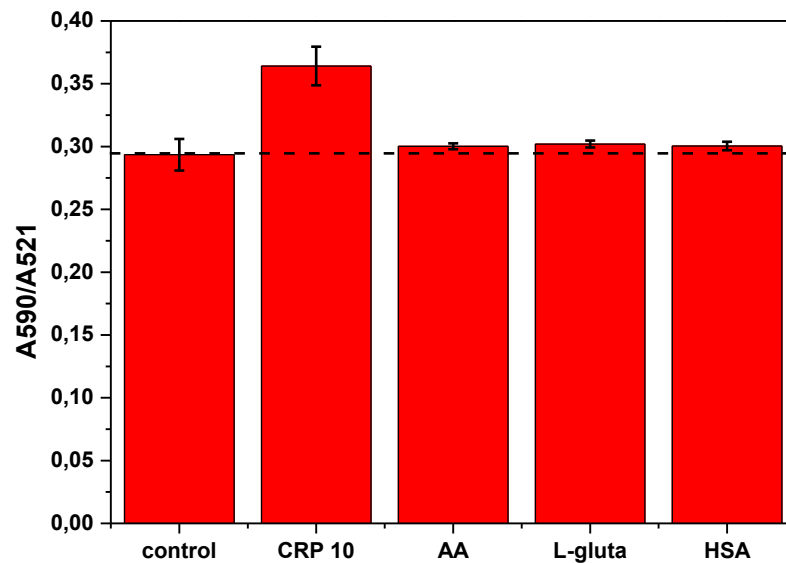


Figura III.5.2. Rapoartele dintre absorbanta nanoparticulelor agregate (590 nm) și a nanoparticulelor individuale (521 nm).

La fel ca în cazul detecției CRP bazate pe spectroscopia UV-Vis, s-au realizat spectrele de împrăștiere a luminii (Figura III.5.3.) unde se observă capacitatea aptamerului de a fi specific față de CRP.

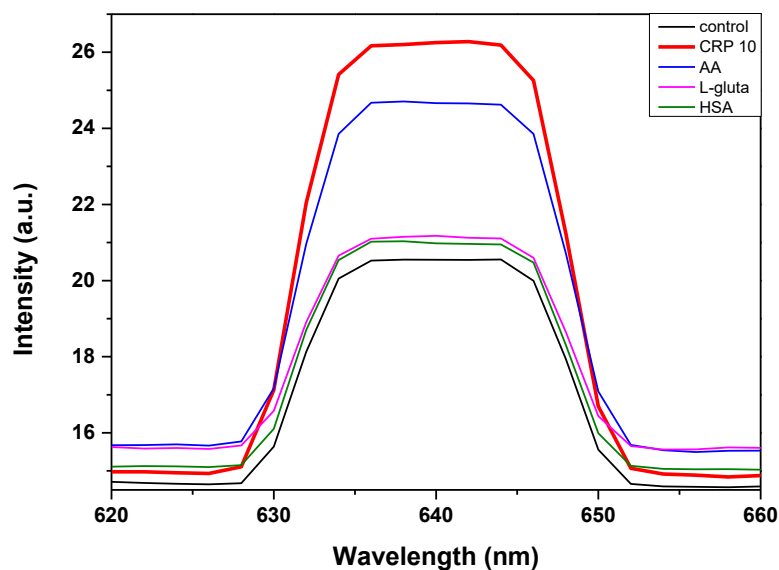


Figura III.5.3. Spectrele de împrăștiere ale AuNPs funcționalezate cu aptamer, incubate cu diferite molecule.

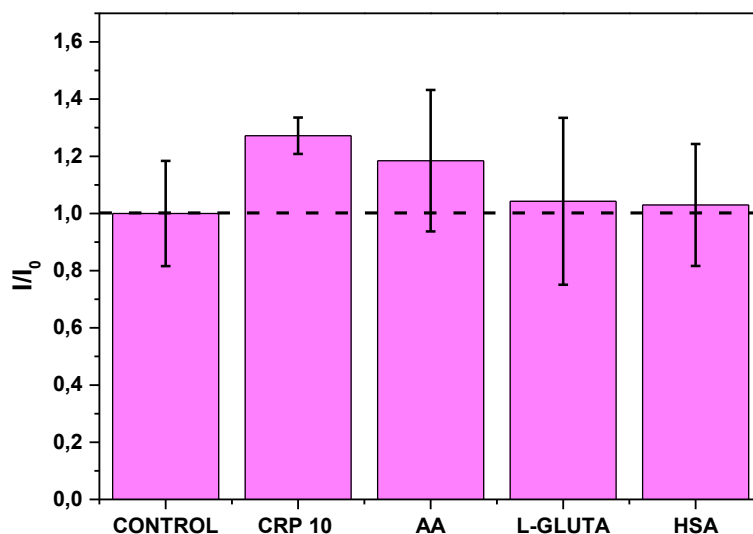


Figura III.5.4. Raportul dintre împrăștierea Tyndall a nanoparticulelor agregate și cea a nanoparticulelor individuale (proba control fără CRP) în în prezența CRP, AA, L-glutamină și HSA.

În figura III.5.3. se observă că proba care conține CRP are un semnal mai intens, cu proba control și, respectiv suspensiile coloidale incubate cu celelalte molecule, ceea ce confirmă specificitatea sistemului de detecție Tyndall față de CRP. Acest aspect este este evidențiat și în figura III.5.4. în care este reprezentat grafic raportul dintre intensitatea spectrului de împrăștiere Tyndall a nanoparticulelor incubate cu CRP, AA, L-glutamină sau HSA, de concentrație 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ și cea a probei control (fără CRP).

Pozele s-au realizat cu ajutorul unui smartphone la soluțiile coloidale incubate cu moleculele alese, AA, L-glutamină și HSA de concentrație 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pozele realizându-se la fel, în urma iluminării suspensiilor coloidale cu un pointer laser de culoare roșie, la întuneric. Pentru comparație, s-a iradiat și suspensia coloidală incubată cu 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CRP, respectiv proba control (fără CRP). În imaginea digitală realizată (Figura III.5.4 5.) este mult mai intensă culoarea roșie a laserului prin coloidul incubat cu CRP 10, față de restul suspensiilor coloidale.

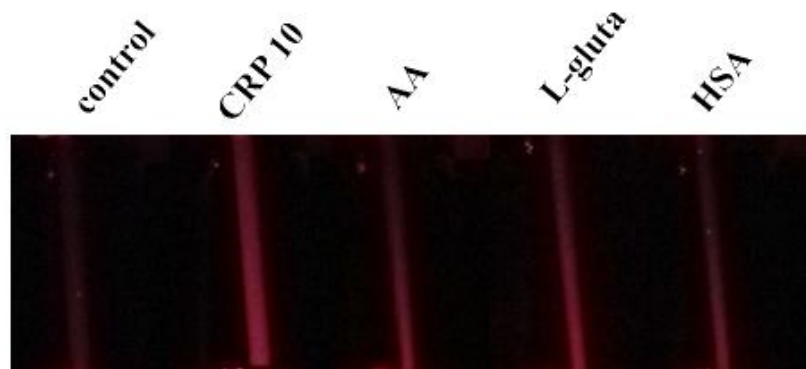


Figura III.5.5. Imagine digitală a soluțiilor coloidale incubate cu CRP, AA, L-glutamină și HSA de concentrație 10 $\mu\text{g/ml}$ și a probei control (fără CRP).

Totodată s-a reprezentat grafic raportul dintre intensitatea medie de roșu a luminii împrăștiată de suspensiile coloidale incubate cu CRP, AA, L-glutamină sau HSA de concentrație 10 $\mu\text{g/mL}$ și cea a probei control (fără CRP) (Figura III.5.6.), observându-se un raport semnificativ mai mare în cazul suspensiei coloidale expuse la CRP comparativ cu proba control, respectiv suspensiile coloidale incubate cu celelalte molecule.

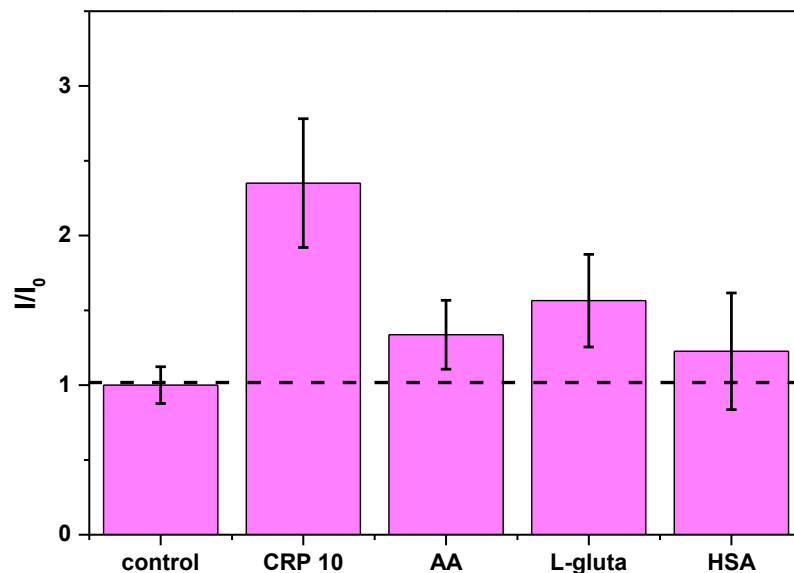


Figura III.5.6. Reprezentarea grafică a raportului dintre intensitatea medie de roșu a luminii împrăștiată de suspensiile coloidale incubate cu CRP, AA, L-glutamină sau HSA concentrație 10 $\mu\text{g/mL}$ și cea a probei control (fără CRP).

Concluzii

Această lucrare de dizertație a fost realizată în Centrul de Nanobiofonică și Microspectroscopie Laser din cadrul ICIBNS. În cadrul acestei lucrări, am sintetizat și caracterizat optic și morfologic AuNPs prezentate în soluții apoase. După acest pas, am efectuat teste în soluție salină pentru a stabili dacă sunt stabile sau nu, ca mai apoi să fie funcționalizate cu un aptamer cu o specificitate ridicată față de CRP, dovedindu-se stabilitatea lor în soluție salină, în prezența acestuia. Am colectat spectrele de absorbție UV-Vis-NIR ale AuNPs, iar apoi incubarea cu CRP. Detectia CRP a fost demonstrată atât colorimetric (vizual) cât și spectral. În plus, pe lângă detectia colorimetrică a CRP, s-a demonstrat detectia prin efectul Tyndall al AuNPs. Pentru cele două tipuri de detecții s-au colectat spectrele de extincție și respectiv spectrele de împrăștiere a luminii la care s-au adăugat și imagini digitale (fotografii) ce surprind aspecte observate cu ochiul liber. Prin analiza imaginilor realizate, s-au trasat curbele de calibrare prin reprezentare grafică, atât pe baza spectrelor de extincție la UV-Vis-NIR, cât și în cazul împrăștierii luminii, și au fost calculate limitele de detecție. S-a demonstrat liniaritatea raportului dintre extincția nanoparticulelor agregate și cea a nanoparticulelor individuale (proba control fără CRP) în funcție de concentrația de CRP. Prin testele de selectivitate a fost urmărită demonstrarea faptului că aptamerul utilizat este cel ce prezintă o specificitate ridicată față de CRP, lucru care a fost realizat cu succes. În concluzie, scopul lucrării a fost îndeplinit cu succes.

Mulțumiri:

Această lucrare a fost susținută de un grant al Ministerului Cercetării, Inovării și Digitalizării, CNCS/CCCDI – UEFISCDI, numărul de proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-1592, în cadrul PNCDI III.

ANEXE

Anexa 1

Spectrofotometru Jasco V- 730 UV-Vis- NIR



Figura A1.1. Spectro-fotometrul folosit pentru colectarea spectrelor de absorbție din cadrul lucrării experimentale. [15]

Absorbția luminii în domeniile infraroșu apropiat, ultraviolet și vizibil poate oferi informații utile despre comportamentul electronic al moleculelor. În acest scop, se utilizează metoda spectroscopică UV-Vis-NIR, care se bazează pe capacitatea substanțelor de a absorbi radiații la anumite lungimi de undă. În funcție de structura chimică a substanțelor, aceasta produce semnale specifice. În lucrare, spectro-fotometrul a fost un factor foarte important în realizarea spectrelor de absorbție UV-Vis-NIR.

Anexa 2

Microscopia electronică în transmisie (TEM)

Microscopia electronică în transmisie (TEM) este o tehnică de analiză structurală de înaltă performanță care produce imagini extrem de detaliate prin intermediul unui fascicul de electroni care traversează proba investigată. În comparație cu microscopul optic convențional, TEM oferă o rezoluție mult mai mare, permițând observarea materialelor analizate la nivel nanometric.

Anexa 3

Spectrofluorimetrul JASCO FP6500



Figura A3.1. Spectrofluorimetrul utilizat pentru realizarea spectrelor de împrăștiere a luminii. [16]

S-a folosit un spectrofluorimetru Jasco FP-6500 pentru a evidenția împrăștierea luminii din probele coloidale. Pentru a simula condițiile efectului Tyndall în suspensii coloidale, iradierea s-a realizat la o lungime de undă de 640 nm, echivalentă radiației roșii.

Bibliografie

- [1] P. M. Ridker, „C-Reactive Protein: Eighty Years from Discovery to Emergence as a Major Risk Marker for Cardiovascular Disease”, *Clinical Chemistry*, vol. 55, nr. 2, pp. 209–215, feb. 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.119214.
- [2] B. Clyne și J. S. Olshaker, „The C-reactive protein”, *The Journal of Emergency Medicine*, vol. 17, nr. 6, pp. 1019–1025, nov. 1999, doi: 10.1016/S0736-4679(99)00135-3.
- [3] „c reactive protein - Căutare Google”. Data accesării: 8 mai 2025. [Online]. Disponibil la: https://www.google.com/search?sca_esv=04452a2cde695022&sxsrf=AHTn8zrB5OSVfvc4bBuh2B99OfHsbix-w:1746702089798&q=c+reactive+protein&udm=2&fbs=ABzOT_BYhiZpMrUAF0c9tORwPGLs0vqphpL9nGKy0PrLJqseLh0EQ6IW_YF9DHIKeRA2FImp3Dx7GlevZQOss0rMv5Tw3qvJev e1MmdHGmodySi5X9GAMZzvnhGIQLToZD4Rmo08ZvpK4A47ZUf2v3SmkLkUzVoZeU_rK5MaBiAEIFTosjVL2eUMwAznjSXBj3_KrjzxBuKTxT_X2lGmFgtiaKnkku3g&sa=X&sqi=2&ved=2ahUKEwiU7dys3JONAxVpGhAIHTzzIpEQtKgLegQIFBAB&biw=1536&bih=730&dp r=1.25#vhid=upu0VyAHCpglUM&vssid=mosaic
- [4] M. B. Pepys și G. M. Hirschfield, „C-reactive protein: a critical update”, *J. Clin. Invest.*, vol. 111, nr. 12, pp. 1805–1812, iun. 2003, doi: 10.1172/JCI200318921.
- [5] T. Nagy-Simon, A.-M. Hada, S. Suarasan, și M. Potara, „Recent advances on the development of plasmon-assisted biosensors for detection of C-reactive protein”, *Journal of Molecular Structure*, vol. 1246, p. 131178, dec. 2021, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131178.
- [6] P. M. Ridker, „Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention”, *Circulation*, vol. 107, nr. 3, pp. 363–369, ian. 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000053730.47739.3C.
- [7] M. A. Garcia, „Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications”, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 45, nr. 38, p. 389501, sep. 2012, doi: 10.1088/0022-3727/45/38/389501.
- [8] X. Zhao, H. Zhao, L. Yan, N. Li, J. Shi, și C. Jiang, „Recent Developments in Detection Using Noble Metal Nanoparticles”, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 50, nr. 2, pp. 97–110, mar. 2020, doi: 10.1080/10408347.2019.1576496.
- [9] „localized plasmon resonance - Căutare Google”. Data accesării: 3 mai 2025. [Online]. Disponibil la: https://www.google.com/search?sca_esv=497749797b431add&sxsrf=AHTn8zqCQY4E2gOA328ezmw1Qhsfk3VOpw:1746289742558&q=localized+plasmon+resonance&udm=2&fbs=ABzOT_BYhiZpMrUAF0c9tORwPGLs0vqphpL9nGKy0PrLJqseLh0EQ6IW_YF9DHIKeRA2FImp3Dx7GlevZQOss0rMv5Tw3qvJev e1MmdHGmodySi5TM8pW6qnUccLfvnJ2vQ3v0SNKzzRS8prj qj44U6MeXfSnKqc55B3wT4ZezkkFqJv4U735uJK1UF-ZqqnTojGQmUjSwghU8C1tn6U0K09Ksg01dIA&sa=X&sqi=2&ved=2ahUKEwis1J6e3IeNAX

WYHRAIHcJfDO8QtKgLegQIERAB&biw=767&bih=730&dpr=1.25#vhid=rMkUEoaNDlxsDM&vssid=mosaic

- [10] „Lucrare de laborator-curs nanofotonica-Reporteri Raman.pdf”.
- [11] W. Aidli, D. Fumagalli, V. Pifferi, și L. Falciola, „From dual-mode to multi-modal electrochemical based sensors: A path toward accurate sensing”, *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 50, p. 101655, apr. 2025, doi: 10.1016/j.coelec.2025.101655.
- [12] A. Verde *et al.*, „SERS Sensing of Bacterial Endotoxin on Gold Nanoparticles”, *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 758410, oct. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.758410.
- [13] A.-M. Hada, S. Suarasan, M. Muntean, M. Potara, și S. Astilean, „Aptamer-conjugated gold nanoparticles for portable, ultrasensitive naked-eye detection of C-reactive protein based on the Tyndall effect”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 1307, p. 342626, iun. 2024, doi: 10.1016/j.aca.2024.342626.
- [14] W. Xiao *et al.*, „Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect”, *Anal. Chem.*, vol. 91, nr. 23, pp. 15114–15122, dec. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b03824.
- [15] „JASCO V-730BIO - ABL&E-JASCO”, ABL&E-JASCO ROMÂNIA. Data accesării: 16 iunie 2025. [Online]. Disponibil la: <https://www.jasco.ro/produse/instrumente-lifescience/jasco-v-730-bio/>
- [16] „FP6500_072.pdf”. Data accesării: 16 iunie 2025. [Online]. Disponibil la: https://jascoinc.com/docs/product-spec-sheets/FP6500_072.pdf

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, Apetri Raluca-Ioana, declar că Lucrarea de disertație pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de Fizică, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea iulie 2025, sub îndrumarea prof. dr. Aștilean Simion și CS I dr. Potara Monica, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,

17.06.2026

Nume,

Apetri Raluca-Ioana

Semnătură

