



Nanotecnología en proteómica: *arrays* de proteínas y nuevos sistemas de detección

María González-González, Ricardo Jara-Acevedo, Sergio Matarraz,
María Jara-Acevedo, Sara Paradinas, Alberto Orfao y Manuel Fuentes

El campo de la proteómica ha experimentado rápidos avances en la última década, siendo los microarrays de proteínas una de las tecnologías más prometedoras para los estudios a gran escala de proteomas complejos. Las aplicaciones de la nanotecnología en la proteómica surgieron de la necesidad de detectar, en tiempo real y formato multiplex, proteínas poco abundantes en mezclas complejas. El objetivo de este artículo es describir el estado actual y los principales avances nanotecnológicos en los arrays de proteínas.

La secuenciación del genoma humano ha dado lugar a nuevos campos de investigación para la exploración de todas las posibles aplicaciones de la información obtenida a escala genómica. Con este fin, las herramientas proteómicas han tenido un rápido crecimiento, con un creciente énfasis en el desarrollo de tecnologías robustas en formato de alto rendimiento (HT) para el estudio a nivel proteico de un estado celular, así como su función celular.¹

El estudio del proteoma humano puede ser una tarea muy desalentadora debido al elevado número de proteínas producidas por alrededor de 25 000 genes.² En un intento por desarrollar una plataforma metodológica para el estudio del proteoma, manejando la gran cantidad de datos generados, por ejemplo, por modificaciones postraduccionales, etc., los *arrays* de proteínas son una plataforma que permite el análisis masivo, en paralelo y simultáneo de interacciones proteína-proteína.³ En general, las proteínas se depositan e inmovilizan sobre superficies planas de sílica, permitiendo su estudio simultáneo, masivo y el gran potencial

para la caracterización biológica de una célula de interés. Hasta la fecha se han desarrollado y puesto en práctica diferentes formatos de *arrays* de proteínas en aplicaciones tales como la identificación de biomarcadores y el desarrollo de vacunas, entre otras.^{1,3,4}

Junto con los avances desarrollados en los *arrays* de proteínas, a su vez se han realizado importantes avances en nuevos métodos de detección. Últimamente, ha habido una transición de los sistemas de detección basados en etiquetas a los sistemas libres de etiquetas (*label-free*) con una alta utilidad en estudio funcional o del interactoma. Habitualmente, los sistemas basados en etiquetas se centran en el empleo de biomoléculas como sondas fluorescentes, radioisótopos, etc. Aunque más recientemente, se proponen otros elementos como *quantum dots* y nanopartículas de oro.⁵⁻⁷

Por otro lado, las técnicas sin marcaje (*label-free*) incluyen metodologías como la resonancia de plasmón de superficie o SPR (de *Surface Plasmon Resonance*), nanotubos de carbono, *cantilevers*, etc. Estas técnicas proporcionan una medida basada en las pro-

piedades específicas de las moléculas de interés, como propiedades dieléctricas, ópticas... Varias de estas plataformas pueden utilizarse en *arrays* de proteínas, debido a que permiten una detección específica, rápida, masiva y de alta sensibilidad.^{7,8}

El área de nanotecnología se ha ampliado para incluir aplicaciones pioneras en biomedicina y ofrece un amplio espectro de métodos innovadores que pueden satisfacer muchas de las demandas actuales en la proteómica. Por tanto, el acoplamiento con éxito de la nanotecnología con la proteómica puede proporcionar una novedosa plataforma conocida como *nanoproteómica*, que permita el estudio dinámico de proteínas en muestras biológicas complejas. Así pues, la nanoproteómica permite múltiples ventajas sobre las técnicas convencionales, tales como la miniaturización de plataformas, análisis multiplex en tiempo real, análisis de trazas, rapidez o mínimo consumo de reactivos, traduciéndose en una mayor sensibilidad y menor complejidad.

En el presente artículo nos centramos en las ventajas, retos y aplicaciones actuales de la nanotecnología en proteómica.

► Arrays de proteínas. Visión general

Los *arrays* de proteínas permiten el estudio en forma simultánea y masiva de miles de proteínas. Sin embargo, en comparación con los *arrays* de DNA, los de proteínas aún tienen muchos retos pendientes. La mayoría tienen su origen en la necesidad de mantener la integridad estructural y propiedades fisicoquímicas de las proteínas, fruto de su complejidad y variabilidad. Sin embargo, a pesar de estos retos y teniendo en cuenta el papel fundamental de las proteínas, se ha desarrollado y mejorado tanto la generación de *arrays* de proteínas como sus múltiples aplicaciones.^{1,9,10}

Brevemente, los *arrays* de proteínas se pueden clasificar en *target* (diana), *microarrays*, *arrays* en fase reversa e *in situ microarrays*¹¹⁻¹³ (fig. 1).

En los *arrays* de proteínas diana, los agentes de captura pueden ser de distinta naturaleza (por ejemplo, anticuerpos o proteínas recombinantes) y se inmovilizan para posteriormente incubarse con la muestra de interés. Estos *arrays* se emplean comúnmente para el estudio de

patrones diferenciales de expresión proteica, de acuerdo a su afinidad, especificidad u otras características. Sin embargo, estos pueden presentar algunos inconvenientes, tales como reactividad cruzada y/o pérdida de actividad de las proteínas por su inmovilización. En general, se ha encontrado una amplia aplicabilidad en estudios clínicos e inmunológicos para esta tecnología.⁸

Por otro lado, los *arrays* en fase reversa (RPP) se generan mediante la inmovilización de lisados celulares o de tejidos o muestras de suero, para la posterior detección mediante un anticuerpo específico contra la proteína diana. Esta interacción antígeno-anticuerpo se revela mediante un anticuerpo secundario conjugado con alguna etiqueta para amplificar la señal.¹⁴ Por tanto, la intensidad de la señal será directamente proporcional a la especificidad, la afinidad y la accesibilidad espacial entre el analito y el anticuerpo. Por otra parte, las probabilidades de no detectar una proteína de interés son muy altas si se encuentra en muy baja concentración o es muy poco abundante. Los *arrays* RPP se han empleado con éxito para el análisis de modificaciones postraduccionales o estudio de las ru-

tas de señalización. Por todo ello, los *arrays* RPP tienen un interés creciente para generar mapas funcionales de vías de señalización celular con un gran potencial en el desarrollo de terapias personalizadas.¹⁵

Los *arrays* de proteínas *in situ* se basan en sistemas de expresión libres de células, como por ejemplo *E. coli* 30 o extractos de germen de trigo. Para dotar de contenido a estos *arrays*, es necesaria una colección de clones que contengan los ORF (*Open Reading Frame*). Durante los últimos años se han desarrollado numerosos tipos de *arrays* de proteína *in situ*: PISA (*protein in situ arrays*), DAPA (*DNA arrays to proteína array*), NAPPA (*nucleic acids programmable protein arrays*) (fig. 1).^{16,17}

► Métodos de detección para arrays de proteínas

En general, el método de detección ideal para *arrays* de proteínas debe incluir parámetros de sensibilidad y límite de detección, rango dinámico, capacidad de multiplicación multiplex y nivel de resolución.

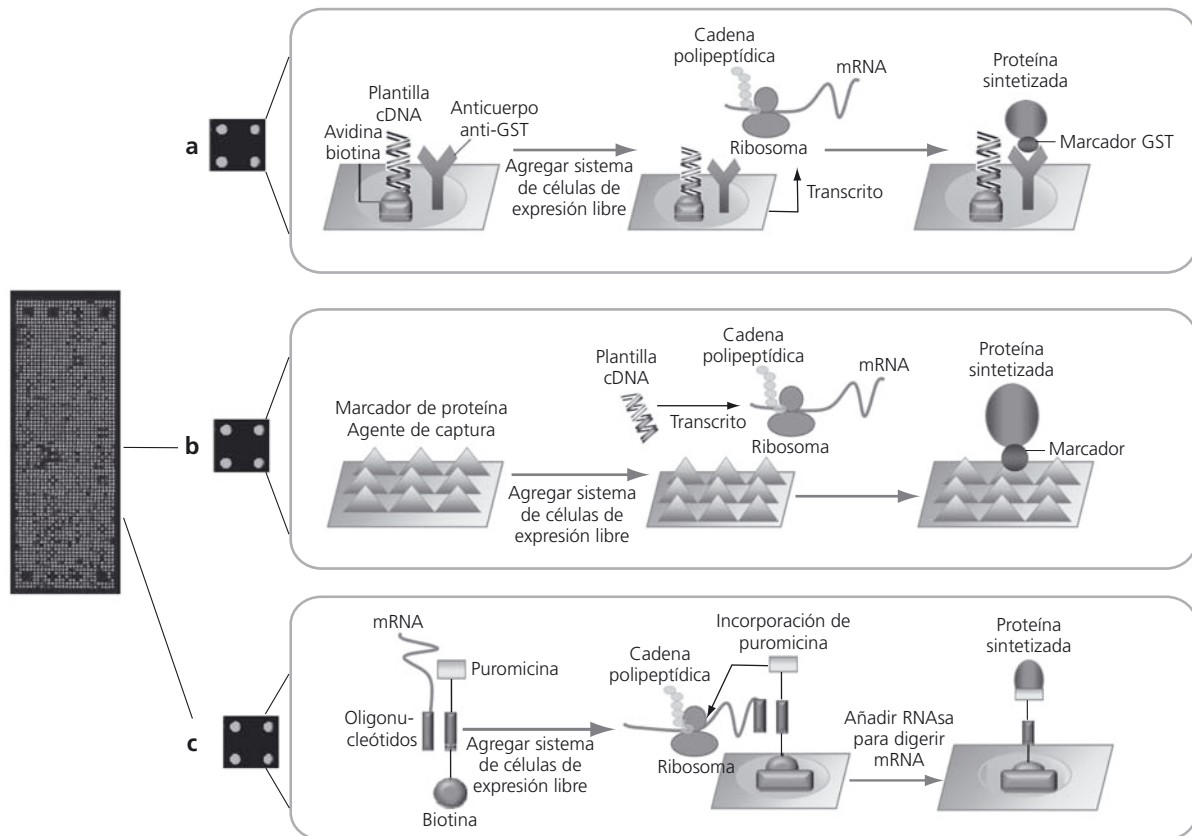


Figura 1. Arrays de proteínas. Esquema de distintos arrays de proteínas in situ: a) NAPPA; b) PISA; c) puromicina.

Métodos basados en marcaje con etiquetas

Hasta la fecha, la mayoría de las aplicaciones de *microarrays* han empleado técnicas de detección basada en etiquetas, debido a la amplia disponibilidad de reactivos e instrumentación. Además, se están introduciendo nuevas estrategias nanotecnológicas ya mencionadas como los *quantum dots* y los nanotubos de carbono. Incluso se han obtenido resultados prometedores combinando microesferas magnéticas con fluorocromos y citometría de flujo.¹

MARCAJE FLUORESCENTE CONVENCIONAL

Entre los primeros procedimientos de detección desarrollados está la utilización de radioisótopos, por ejemplo ³²P, empleándose con éxito en el estudio de interacciones de proteínas. Posteriormente, comenzó la amplia utilización de fluorocromos convencionales (fluoresceína, BODIPY, cianinas...) en *arrays* de proteínas. La elección de los fluorocromos es muy importante y depende de la naturaleza de la muestra y del soporte, los espectros de emisión y excitación, la concentración de proteína o la autofluorescencia presente en la muestra.¹⁸

En este sentido, fluorocromos como las cianinas (Cy3 y Cy5) se encuentran entre los más empleados para la detección

en *microarrays* de proteínas, debido principalmente a su mínima interacción con otras biomoléculas, la intensidad y la alta variedad para su conjugación química.

Teniendo en cuenta esto, se han obtenido interesantes resultados con doble fluorescencia para la identificación de biomarcadores tanto en cáncer de próstata¹⁹ como en suero de pacientes con fibrosis quística.²⁰

El empleo de ensayos tipo sándwich para la detección masiva de proteínas se limita a no más de 30-50 antígenos.²¹ Además, los *arrays* de anticuerpos se han utilizado con éxito para el estudio de rutas de señalización como ErbB.²² Una nueva estrategia con dos colores para la detección de distintas proteínas en un suero con un *array* de anticuerpos permitió analizar un total de 75 citoquinas en concentración femtomolar.²³

Métodos de detección para arrays basados en esferas

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CF) se usa comúnmente para evaluar los patrones fenotípicos de investigación básica y clínica, o para la detección de proteínas solubles intracelulares. El empleo de microesferas en CF se ha limitado en gran medida a la calibración y cuantificación de células.²⁴

Esta metodología se basa en microesferas marcadas con distintos fluorocromos y anticuerpos que se incuban con la muestra. Después, con anticuerpos secundarios (conjugados con sondas fluorescentes) se detecta por CF, con al menos dos láseres, para análisis cualitativo y cuantitativo. El número de láseres y detectores, la configuración de los filtros y el procesamiento de datos está directamente relacionado con el número de anticuerpos y fluorocromos que pueden ser evaluados al mismo tiempo.²⁴

Las ventajas asociadas a la CF sobre la fluorescencia convencional se basan en la evaluación rápida y precisa de varias muestras a la vez, con mínima señal de fondo, un bajo coste y alta sensibilidad.^{25,26}

Recientemente, se ha desarrollado un gran número de ensayos basados en microesferas con anticuerpos de captura para la detección simultánea de múltiples analitos de distintas fuentes (fig. 2). Últimamente se ha descrito una plataforma para la detección de proteínas aisladas de los diferentes compartimentos celulares mediante técnicas de cromatografía por exclusión.²⁵ El análisis mediante esta plataforma bidimensional proporciona información sobre los perfiles de elución, lo que permite la identificación a gran escala de complejos proteicos.

En la actualidad, se han empezado a desarrollar aplicaciones en formato *array* de esferas en suspensión para su detección por CF, como una plataforma versátil para la evaluación o análisis cinético de interacciones moleculares.²⁷

DETECCIÓN BASADA EN ESFERAS MAGNÉTICAS

Esta tecnología incluye la utilización de esferas magnéticas acopladas con anticuerpos para la detección de las proteínas diana (fig. 2). Así, parece ser un método ideal para *arrays* en suspensión por su alta sensibilidad y reproducibilidad, junto con una rápida detección, bajo ruido de fondo, amplio rango dinámico y bajo coste.²⁸ Recientemente, se ha descrito la comparación entre anticuerpos acoplados a esferas magnéticas y el método de fluorescencia convencional para la detección de 12 autoantígenos en 21 muestras de suero de pacientes con enfermedades de carácter autoinmune. También se han descrito aproximaciones basadas en esferas magnéticas fluorescentes para la detección y aislamiento de

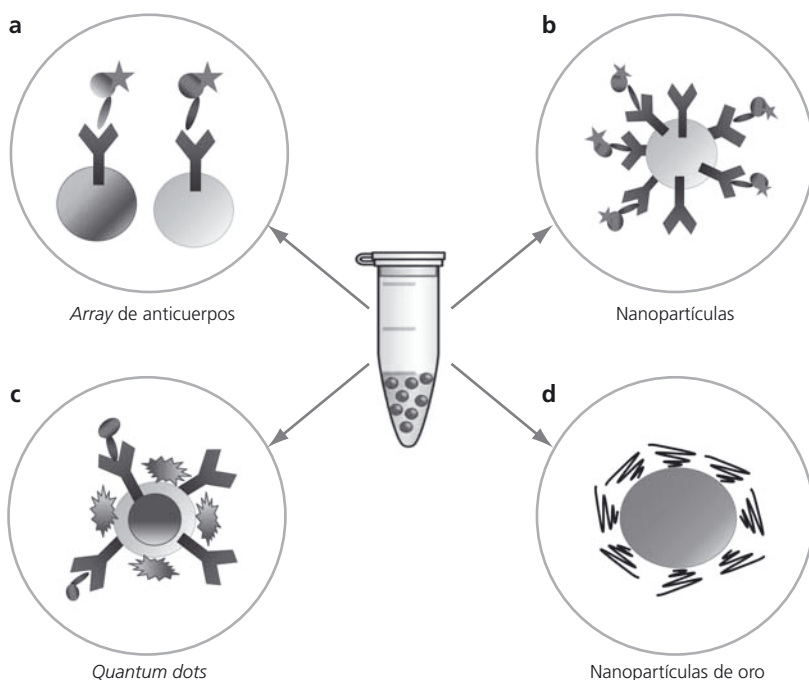


Figura 2. Arrays de proteínas basados en esferas: a) arrays de anticuerpos para detección por citometría de flujo; b) arrays de anticuerpos en microesferas magnéticas; c) quantum dots; d) nanopartículas magnéticas.

las células diana en cultivos celulares. Así, mediante microscopia de fluorescencia sobre células tumorales se han detectado células neoplásicas a concentraciones de cultivo del 0,01%.²⁹ Estos resultados sugieren un alto potencial en el diagnóstico precoz de células cancerígenas.

QUANTUM DOTS

Los *quantum dots* son nanocristales, formados por un núcleo de material semiconductor y fluorescente (por ejemplo, seleniuro de cadmio) recubierto de otro semiconductor (como sulfuro de cadmio o de cinc) que presentan propiedades ópticas muy estables y un gran salto entre las longitudes de onda de emisión y excitación (fig. 2). Estos compuestos muestran un amplio rango de aplicaciones en diagnóstico por imagen, detección de biomarcadores o análisis de sueros, etc.^{30,31}

Estas partículas nanométricas se pueden conjugar con moléculas de biorreconocimiento, tales como péptidos o anticuerpos para su utilización con etiquetas biológicas o marcadores fluorescentes. Los *quantum dots* proporcionan ventajas como una alta fluorescencia, excelente fotoestabilidad, excitación multicolor, espectro de emisión ajustable y estrecho, y mayor rendimiento cuántico, comparados con los fluorocromos orgánicos.^{30,31} De esta manera, se ha descrito la utilización de *quantum dots* unidos a estrepta-

vidina para la detección de citoquinas con un *array* de anticuerpos.³²

En el mismo sentido, un interesante estudio comparativo entre *quantum dots* y fluorocromos orgánicos reveló que estos resultan ser treinta veces más sensibles para la identificación de biomarcadores de cáncer (CEA, CA 125 y Her-27Neu) en suero.³³ No obstante, los *quantum dots* presentan una baja estabilidad y un corto período de vida media, debido a su susceptibilidad a la oxidación y la fotólisis. Además, existen riesgos para la salud humana y el medio ambiente asociados al uso de este tipo de compuestos.

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las nanopartículas de oro proporcionan múltiples aplicaciones para la detección de proteínas, debido a sus propiedades ópticas, eficiencia cuántica y compatibilidad con una amplia gama de longitudes de onda.^{7,34}

Se han desarrollado inmunoensayos con nanopartículas para la detección multiplexada del antígeno prostático específico (PSA) en *microarrays* de proteínas, con buena sensibilidad y un límite de detección en el suero de 300 aM.³⁵

También mediante esta tecnología se han detectado moléculas antibacterianas; discriminando selectivamente entre diversas

cepas bacterianas con una alta sensibilidad.^{36,37}

Métodos de detección sin marcaje (label-free)

En la actualidad existe un creciente interés en el empleo de metodologías de detección que superen las limitaciones asociadas a la detección basada en etiquetas, tales como la conjugación, la alteración de la biomolécula, etc. Las técnicas sin etiqueta han probado ser útiles para el estudio de la cinética de interacción en tiempo real de interacciones proteína-proteína, sin impedimentos estéricos causados por la presencia de etiquetas (fig. 3).

En el área de los *arrays* de proteínas, uno de los principales requisitos para los métodos de detección es su compatibilidad o adaptación a formatos masivos, la detección de pequeñas moléculas y un amplio rango dinámico. En este sentido, se están probando una gran variedad de tecnologías como posibles métodos (sin marcaje) idóneos para *arrays* de proteínas.

RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE (SPR)

La tecnología SPR se basa en la generación de plasmones en una superficie. Estos son oscilaciones de electrones libres propagadas paralelamente a la interfase

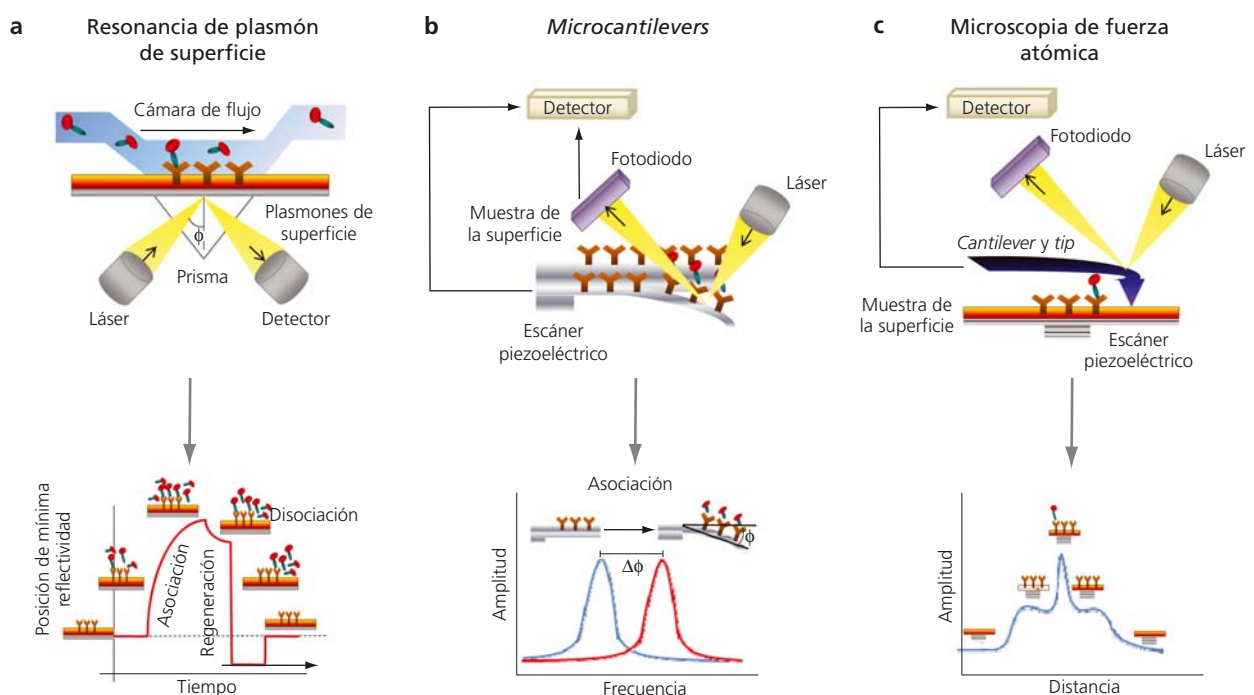


Figura 3. Métodos de detección sin marcaje (label-free) para arrays de proteínas: a) resonancia de plasmón de superficie; b) microcantilevers; c) microscopia de fuerza atómica.

metal/medio, lo que permite medir los cambios en el índice de refracción de la superficie del sensor.⁹ La aparición de asociaciones o disociaciones moleculares se traduce en plasmones de superficie que dependen de la variación de intensidad de la luz reflejada y/o del ángulo de incidencia (fig. 3). De esta forma, los SPR permiten determinar la relación entre la asociación y disociación de biomoléculas entre sí, así como evaluar la afinidad y especificidad de dichas interacciones, permitiendo medir interacciones biomoleculares en tiempo real con alta sensibilidad.⁹ Por sus características, esta tecnología está siendo relevante en investigación biomédica.

En 2009, Ladd *et al.* utilizaron SPRi para la detección de posibles biomarcadores para el diagnóstico de tumores mediante *arrays* de anticuerpos.

MICROCANTILEVERS

Los *microcantilevers* son láminas delgadas de silicio recubiertas de superficies de oro asociadas a nanomecánica de reconocimiento biomolecular. Por este motivo, anticuerpos o proteínas se inmovilizan sobre las finas láminas, de forma que cuando existe una interacción se puede medir la variación en la posición de la lámina con sistemas ópticos o electrónicos (fig. 3). Sobre esta base de detección, se han descrito interacciones de varios fármacos en distintos estudios clínicos.

Del mismo modo, *microcantilevers* dieléctricos se han aplicado para la detección de glutatión-S-transferasa (GST) con anticuerpos anti-GST, detectando una concentración similar a un sistema óptico estándar.³⁸ Por tanto, los *microcantilevers* son una herramienta prometedoras para *arrays* de proteínas, dada su simplicidad, rapidez y fácil preparación.

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Brevemente, la microscopía de fuerza atómica (conocida por sus siglas en inglés AFM) es el análisis a escala microscópica de muestras, observando únicamente las variaciones topológicas de la superficie (fig. 3). Últimamente, se ha empleado para la caracterización de la superficie de *arrays* de proteínas, la inmovilización de biomoléculas diferentes con una resolución de micrómetros y para la detección de interacciones proteína-proteína.³⁹ Con esta tecnología, Souttani-Vigneron *et al.*⁴⁰ desarrollaron una técnica para la inmovilización de oligopéptidos en *microarrays* de proteínas utilizando AFM, espectros-

copia infrarroja y microscopía de fluorescencia.

Conclusiones

En los últimos años, la nanotecnología ha realizado un avance muy significativo y se ha convertido en un área con gran aplicabilidad para el estudio del proteoma. Por este motivo, estas metodologías se están utilizando en el descubrimiento de biomarcadores, el estudio de interacciones proteína-proteína o la construcción de *microarrays*, entre otras.

Sus ventajas han permitido tener un éxito creciente en proteómica. No obstante, a pesar del avance de estas tecnologías todavía resulta necesario resolver algunas limitaciones, tales como: biocompatibilidad de superficies, insuficiente conocimiento de los mecanismos implicados, reactividad cruzada, falta de métodos sencillos y de aplicación general.

En la actualidad, la proteómica junto con la nanotecnología está siendo incorporada paulatinamente en la investigación clínica debido a la disponibilidad de novedosas técnicas que permiten profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de ciertas enfermedades. Pero aún son necesarios muchos esfuerzos para la aplicación de estas técnicas de forma rutinaria en clínica.

El último reto en proteómica es poder desentrañar, en alta densidad y masivamente, procesos biológicos relevantes como los tumorales. Hoy día, ya es posible prever un próximo desarrollo significativo que hará de la nanoproteómica un campo más fuerte, sensible y de gran fiabilidad. #

María González-González,^a

Ricardo Jara-Acevedo,^b

Sergio Matarraz,^a

María Jara-Acevedo,^a Sara Paradinas,^c

Alberto Orfao^a y Manuel Fuentes^a

^a CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER/ IBMCC (USAL/CSIC), DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y SERVICIO GENERAL DE CITOMETRÍA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

^b IMMUNOSTEP, SL. EDIFICIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

^c DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, FIS PI081884) y la Junta de Castilla-León (JCYL-SAN10). María González tiene una beca predoctoral del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII FI08/00721).

Bibliografía

- 1 Matarraz S., González-González M., Jara-Acevedo M., Orfao A., Fuentes M. «New technologies in cancer. Protein microarrays for biomarker discovery». *Clin Transl Oncol* 2011 Mar; 13 (3): 156-61.
- 2 Marko-Varga G., Fehninger T.E. «Proteomics and disease – the challenges for technology and discovery». *J Proteome Research* 2004; 3 (2): 167-78.
- 3 LaBaer J., Ramachandran N. «Protein microarrays as tools for functional proteomics». *Curr Opin Chem Biol* 2005 Feb; 9 (1): 14-9.
- 4 Hall D.A., Ptacek J., Snyder M. «Protein microarray technology». *Mech Ageing Dev* 2007; 128 (1): 161-7.
- 5 Chan S.M., Ermann J., Su L., Fathman C.G., Utz P.J. «Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways». *Nat Med* 2004; 10 (2): 1390-6.
- 6 Espina V., Woodhouse E.C., Wulfkühle J., Asmussen H.D., Petricoin E.F., Liotta L.A. «Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies». *J Immunol Methods* 2004; 290 (1-2): 121-33.
- 7 Ray S., Mehta G., Srivastava S. «Label-free detection techniques for protein microarrays: prospects, merits and challenges». *Proteomics* 2010; 10 (4): 731-48.
- 8 Ramachandran N., Srivastava S., Labaer J. «Applications of protein microarrays for biomarker discovery». *Proteomics Clin Appl* 2008 Oct; 2 (10/11): 1444-59.
- 9 Ramachandran N., Larson D.N., Stark P.R., Hainsworth E., LaBaer J. «Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays». *FEBS J* 2005 Nov; 272 (21): 5412-25.
- 10 Rifai N., Gillette M.A., Carr S.A. «Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility». *Nat Biotechnol* 2006; 24: 971-83.
- 11 Speer R., Wulfkühle J.D., Liotta L.A., Petricoin. «Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis». *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7: 240-5.
- 12 Borrebaeck C.A., Ohlin M. «Antibody evolution beyond Nature». *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1189-90.
- 13 Chandra H., Srivastava S. «Cell-free synthesis-based protein microarrays and their applications». *Proteomics* 2010; 10 (4): 717-30.

- ¹⁴ Ehrlich J.R., Qing S., Liu B.C. «The 'reverse capture' autoantibody microarray: a native antigen-based platform for autoantibody profiling». *Nat Protoc* 2002; 1 (1): 452-60.
- ¹⁵ Sheehan K.M., Calvert V.S., Kay E.W. *et al.* «The 'reverse capture' autoantibody microarray: a native antigen-based platform for autoantibody profiling». *Mol Cell Proteomics* 2005; 4 (4): 346-55.
- ¹⁶ He M., Taussig M.J. «Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method)». *Nucleic Acids Res* 2001; 29: E73-75.
- ¹⁷ Ramachandran N., Raphael J.V., Hainsworth E., Demirkan G., Fuentes M.G., Rolfs A., Hu Y., Labaer J. «Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays». *Nat Methods* 2008; May 11.
- ¹⁸ Angenendt P. «Progress in protein and antibody microarray technology». *Drug Discovery Today* 2005; 10 (7): 503-11.
- ¹⁹ Miller J.C., Zhou H., Kwekel J. *et al.* «Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers». *Proteomics* 2003; 3 (1): 56-63.
- ²⁰ Srivastava M., Eidelman O., Jozwik C. *et al.* «Serum proteomic signature for cystic fibrosis using an antibody microarray platform». *Mol Genet Metab* 2006; 87 (4): 303-14.
- ²¹ Haab B.B. «Methods and applications of antibody microarrays in cancer research». *Proteomics* 2003; 3 (11): 2116-22.
- ²² Nielsen U.B., Cardone M.H., Sinskey A.J., McBeath G., Sorger P.L. «Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays». *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 5: 299-307.
- ²³ Zhou H., Bouwman K., Schotanus M. *et al.* «Two-color, rolling-circle amplification on antibody microarrays for sensitive, multiplexed serum-protein measurements». *Genome Biol* 2004; 5 (4): R28.
- ²⁴ Edwards B.S., Oprea T., Prossnitz E.R., Sklar L.A. «Flow cytometry for high-throughput, high-content screening». *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8 (4): 392-98.
- ²⁵ Wu W., Slastad H., de la Rosa Carrillo D., Frey T., Tjonnfjord G., Boretti E., Aasheim H.C., Horejsi, Lund-Johansen F. «Antibody array analysis with label-based detection and resolution of protein size». *Mol Cell Proteomics* 2009; 8 (2): 245-57.
- ²⁶ Morgan E., Varro R., Sepúlveda H. *et al.* «Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology». *Clin Immunol* 2004; 110: 252-66.
- ²⁷ Blazer L.L., Roman D.L., Muxlow M.R., Neubig R.R. «Use of flow cytometric methods to quantify protein-protein interactions». *Curr Protoc Cytom* 2010; 13.11.1-15.
- ²⁸ Gantelius J., Hartman M., Schwenk J.M., Roeraade J., Anderson-Svahn H., Joos T.O. «Magnetic bead-based detection of autoimmune responses using protein microarrays». *Nat Biotechnol* 2009; 26 (6): 269-76.
- ²⁹ Song E.Q., Hu J., Wen C.Y., Tian Z.Q., Yu X., Zhang Z.L., Shi Y.B., Pang D.W. «Fluorescent-magnetic-biotargeting multifunctional nanobioprobes for detecting and isolating multiple types of tumor cells». *ACS Nano* 2011; 5 (2): 761-70.
- ³⁰ Sun Y.P., Zhou B., Lin Y. *et al.* «Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence». *J Am Chem Soc* 2006; 128 (44): 7756-57.
- ³¹ Hu M., Yan J., He Y., Lu H., Weng L., Song S., Fan C., Wang L. «Ultrasensitive, multiplexed detection of cancer biomarkers directly in serum by using a quantum dot-based microfluidic protein chip». *ACS Nano* 2010; 4 (1): 488-94.
- ³² Zajac A., Song A.D., Qian W., Zhukov T. «Protein microarrays and quantum dot probes for early cancer detection». *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 58 (2): 309-14.
- ³³ Ghazani A.A., Lee J.A., Klostranec J. *et al.* «High throughput quantification of protein expression of cancer antigens in tissue microarray using quantum dot nanocrystals». *Nano Lett* 2006; 6 (12): 2881-86.
- ³⁴ Yan J., Estévez M.C., Smith HE *et al.* «Dye-doped nanoparticles for bioanalysis». *Nano Today* 2007; 2 (3): 44-50.
- ³⁵ Liang R.Q., Tan C.Y., Ruan K.C. «Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement». *J Immunol Methods* 2004; 285 (6): 157-63.
- ³⁶ Gao J., Liu C., Liu D., Wang Z., Dong S. «Antibody microarray-based strategies for detection of bacteria by lectin-conjugated gold nanoparticle probes». *Talanta* 2010; 81 (4-5): 1816-20.
- ³⁷ Gao J., Liu D., Wang Z. «Microarray-based study of carbohydrate-protein binding by gold nanoparticle probes». *Anal Chem* 2008; 80 (22): 8822-7.
- ³⁸ Dauksaite V., Lorentzen M., Besenbacher F., Kjems J. «Antibody-based protein detection using piezoresistive cantilever arrays». *Nanotechnology* 2007; 18 (18): 125503.
- ³⁹ Breinstein M., Holzel R., Bier F.F. «Immobilization of different biomolecules by atomic force microscopy». *J Nanobiotechnology* 2010; 8: 10.
- ⁴⁰ Sultani-Vigeneron S., Dugas V., Rouillat M.H. *et al.* «Immobilisation of oligopeptidic probes for microarray implementation: characterisation by FTIR, atomic force microscopy and 2D fluorescent». *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2005; 822: 304-10.

