

**SIMULASI DINAMIKA MOLEKUL PADA NANOBODI-
KORTISOL DENGAN PENAMBAHAN PENANDA HISTIDIN
DAN SISTEIN SEBAGAI RANCANGAN PEMBUATAN KIT
DETEKSI**

SKRIPSI

MENORAH ABISAG INDRAWATI WIJAYA

A182019



SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA

YAYASAN HAZANAH

BANDUNG

2022

**SIMULASI DINAMIKA MOLEKUL PADA NANOBODI-
KORTISOL DENGAN PENAMBAHAN PENANDA HISTIDIN
DAN SISTEIN SEBAGAI RANCANGAN PEMBUATAN KIT
DETEKSI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

MENORAH ABISAG INDRAWATI WIJAYA

A182019



SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA

YAYASAN HAZANAH

BANDUNG

2022

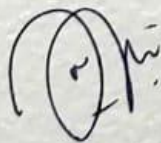
**SIMULASI DINAMIKA MOLEKUL PADA NANOBODI-
KORTISOL DENGAN PENAMBAHAN PENANDA HISTIDIN
DAN SISTEIN SEBAGAI RANCANGAN PEMBUATAN KIT
DETEKSI**

**MENORAH ABISAG INDRAWATI WIJAYA
A182019**

Agustus 2022

Disetujui Oleh:

Pembimbing



(Nur Asni Setiani, M. Si.)

Pembimbing



(Umi Baroroh, S.Si., M.Biotek.)

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

“Kupersembahkan skripsi ini untuk Mamah dan Papah tercinta yang senantiasa memberikan semangat, dukungan, serta doa terbaik sejak aku dilahirkan ke dunia. Terimakasih sudah mencurahkan tenaga dan pikiran untuk merawat dan membesarkanku hingga saat ini.”

ABSTRAK

Simulasi dinamika molekul adalah teknik komputasi yang dapat mensimulasikan interaksi protein dan ligan dalam pelarut dengan proses pemanasan sebagai satu kesatuan sistem untuk mengamati interaksi kimia yang terjadi selama waktu yang ditentukan. Nanobodi VHH adalah antibodi kelas baru yang memiliki spesifisitas, afinitas, dan kemudahan produksi. Penelitian ini melanjutkan modifikasi struktur natif nanobodi VHH-kortisol (Nb-Cor) dan mutan T53I dengan penambahan histidin untuk pemurnian nanobodi dan sistein untuk deteksi kortisol pada alat deteksi. Penelitian ini bertujuan untuk memodelkan kompleks Nb-Cor dan memperoleh informasi afinitas Nb-Cor terhadap penambahan histidin dan sistein. Preparasi Nb-Cor natif dan mutan dilakukan dengan program MODELLER. Evaluasi hasil model dilakukan dengan metode skor DOPE, plot Ramachandran, dan *Z-score*. Simulasi dinamika molekul dilakukan dengan program pmemd pada Amber20 dengan suhu pemanasan maksimal 299 K selama 120 ns untuk menghasilkan trajektori simulasi RMSD dan RMSF serta analisis pengikatan energi bebas MMPBSA dan ikatan hidrogen. Hasilnya RMSD kedua sistem stabil dan nilainya berada di bawah rentang 2,5 Å. Fluktuasi RMSF Nb-Cor natif mempengaruhi pengikatan ligan pada CDR1 dan CDR2. Pengikatan energi bebas natif -36,89 kkal/mol dan mutan -38,47 kkal/mol. Durasi ikatan hidrogen mutan lebih lama daripada natif. Kesimpulannya Nb-Cor-Cys-His mutan lebih baik daripada Nb-Cor-Cys-His natif karena tidak terpengaruhnya CDR1 dan CDR2.

Kata kunci: Nanobodi, Kortisol, Histidin, Sistein, Simulasi Dinamika Molekul

ABSTRACT

Molecular dynamics simulation is a computational technique that can simulate the interaction of proteins and ligands in dissolution by heating process as a unit system for chemical interactions that occur over a specified time. VHH nanobody is a new class of antibodies that has specificity, affinity, and ease of production. This study continued modifying the native structure of the VHH nanobody-cortisol (Nb-Cor) and the T53I mutant with the addition of histidine for the purification of nanobodies and cysteine to detect cortisol in the detection device. This study aims to model the Nb-Cor complex and obtain information on the affinity of Nb-Cor to the addition of histidine and cysteine. The native and mutant Nb-Cor preparations were carried out with the MODELLER program. The model evaluations were carried out using the DOPE score method, the Ramachandran plot, and the Z-score. Molecular dynamics simulations were carried out using the pmemd program on Amber20 with a maximum heating temperature of 299 K for 120 ns to produce RMSD and RMSF trajectory simulations along with analysis of binding energy of MMPBSA and hydrogen bond. As a result, RMSD of both systems was stable and their range value was below 2,5 Å. Fluctuations of Nb-Cor native RMSF affected ligand binding to CDR1 and CDR2. Native binding free energy was -36,89 kcal/mol and the mutant -38,47 kcal/mol. Hydrogen bond duration on mutant was longer than native. In conclusion, the Nb-Cor-Cys-His mutant structure was better than the Nb-Cor-Cys-His native structure because it didn't affect CDR1 and CDR2.

Keywords: *Nb-Cor, Histidine, Cysteine , Protein Folding, Energy Binding*

KATA PENGANTAR

Dalam Nama Tuhan Yesus Kristus,

Puji dan Syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yesus Kristus atas segala Berkat dan Rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Simulasi Dinamika Molekul pada Nanobodi Kortisol dengan Penambahan Hisitidin dan Sistein sebagai Rancangan Pembuatan Kit Deteksi”**.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat mendapatkan gelar sarjana pada jurusan Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Nur Asni Setiani, M.Si. dan Umi Baroroh, S.Si., M.Biotek. atas bimbingan, nasihat, dukungan, serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Diki Prayugo Wibowo, S.Si., M.Si., selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik,
3. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M.Si., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
4. Dr. Syarif Hamdani, M.Si., selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis,
5. Seluruh staf dosen, staf administrasi serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
6. Seluruh staf Pusat Riset Bioteknologi Molekuler dan Bioinformatika Universitas Padjadjaran yang telah memberikan waktu dan tenaga untuk mendukung terlaksananya penelitian,
7. Ci Angel yang telah bersedia memberikan banyak informasi dan motivasi dalam proses penelitian simulasi dinamika molekul,
8. Sahabat serta rekan-rekan ROOTEN 2018 yang telah memberikan inspirasi

dan menemani dalam suka duka selama penulis berkuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, Agustus 2022

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
LEMBAR PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Identifikasi Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Kegunaan Penelitian	4
1.5. Waktu dan Tempat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Antibodi VHH	5
2.2. Hormon Kortisol	6
2.2.1. Fisiologi Hormon Kortisol	6
2.2.2. Kegunaan Kortisol	8
2.2.3. Deteksi Kortisol	8
2.3. Nanopartikel Emas (AuNPs)	9
2.4. Penanda Histidin	10
2.5. Struktur Protein	11
2.5.1. Pelipatan Protein	13
2.5.2. Plot Ramachandran	13
2.5.3. Domain dan Fungsi Domain	14
2.5.4. Homologi Protein	14

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Daftar Istilah

- Antibodi : Protein yang terbentuk oleh sistem kekebalan tubuh
- Antigen : Zat yang dapat merangsang sistem kekebalan tubuh untuk menghasilkan antibodi
- AuNPs : *Aurum nanoparticles*, nanopartikel emas yang akan mengikat antibodi dan menghasilkan pewarnaan pada alat deteksi
- Circadian* : Jam biologis tubuh yang mengatur siklus tidur dan bangun dalam 24 jam
- Coil* acak : Daerah protein yang tidak membentuk protein sekunder pada umumnya dan tidak bisa dikarakterisasi oleh pola pengikatan hidrogen apapun
- CDR : *Complementarity Determining Region*, suatu *loop* dalam daerah variabel antibodi
- DOPE : *Discrete Optimized Protein Energy*, besaran energi model struktur protein tiga dimensi untuk menilai kualitas model
- Gap* : Satu atau lebih residu asam amino yang dihapus dari urutan asam amino pertama dalam penyelarasan sekuens karena adanya penyisipan pada urutan asam amino kedua
- IMAC : *Immobilize Metal Affinity Chromatography*, teknik purifikasi protein dengan cara imobilisasi oleh interaksi antara sisi rantai protein dengan ion logam (seperti Cu^{2+} , Ni^{2+} , dan Zn^{3+})
- In-silico* : Eksperimen yang dilakukan melalui komputer atau simulasi dengan komputer
- Ligan : Senyawa yang akan menempel dalam *binding pocket* (kantong pengikatan) suatu reseptor
- Loop* : Struktur sekunder protein yang menghubungkan rantai polipeptida melipat untuk membentuk struktur tiga dimensi
- Mutan : Keadaan protein setelah dilakukan perubahan residu asam amino atau perubahan struktur

Natif	: Keadaan awal protein tanpa penambahan residu asam amino atau perubahan struktur
<i>Probe</i>	: Suatu segmen alat deteksi yang dapat memberikan hasil pemeriksaan kualitatif atau kuantitatif
Templat	: Cetakan untuk memodelkan protein
VHH	: Domain variabel pengikatan antigen rantai H dari antibodi rantai berat
<i>Z-score</i>	: Nilai analisis model protein dengan protein hasil eksperimen

Daftar Singkatan

ACTH	: <i>Adenocorticotropic Hormone</i>
AVP	: <i>Arginine Vasopressin</i>
CBG	: <i>Cortisol-Binding Globulin</i>
CPU	: <i>Central Processing Unit</i>
CRH	: <i>Corticotrophin-Releasing Hormone</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GPU	: <i>Graphical Processing Unit</i>
HPA	: <i>Hypothalamus-Pituitary-Adrenal</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
MST	: <i>Microscale Chromatography</i>
Nb-Cor	: <i>Nanobody-Cortisol</i>
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology</i>
NMR	: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PAP	: <i>Panorama Studio Project</i>
PC	: <i>Personal Computer</i>
PDB	: <i>Protein Data Bank</i>
PIR	: <i>Parrot Intermediate Representation</i>
ProSA	: <i>Protein Structure Analysis</i>
RAM	: <i>Random Access Memory</i>
RIA	: <i>Radioimmunoassay</i>
RMSD	: <i>Root Mean Square Deviation</i>

RMSF : *Root Mean Square Fluctuation*
 VMD : *Visual Molecular Dynamic*

Daftar Lambang

Ψ : *psi*
 ϕ : *phi*
 GB : *Gigabyte*
 TB : *Terabyte*
 GHz : *Gigahertz*
 Å : *Angstrom*
 ns : *Nanosecond*
 ps : *Picosecond*

Daftar Asam Amino

Alanin	Ala	A
Sistein	Cys	C
Asam Aspartat	Asp	D
Asam Glutamat	Glu	E
Fenilalanin	Phe	F
Glisin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleusin	Ile	I
Lisin	Lys	K
Leusin	Leu	L
Metionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S

Treonin	Thr	T
Valin	Val	V
Triptofan	Trp	W
Tirosin	Tyr	Y

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Resume hasil pemodelan struktur Nb-Cor natif	21
4.2. Resume hasil pemodelan struktur Nb-Cor mutan	21
4.3. Hasil perhitungan pengikatan energi berdasarkan perbedaan (kompleks- reseptor-ligan) menggunakan MMPBSA	33
4.4. Ikatan hidrogen struktur Nb-Cor natif dan mutan selama simulasi 120 ns	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur <i>camelid heavy chain antibody</i> dan antibodi konvensional manusia	5
2.2. Interaksi dalam aksis HPA	7
2.3. Representasi diagram dari nanopartikel emas (AuNPs)	9
2.4. Pengikatan selektif antara Nikel (Ni^{2+}) dengan khelat resin terhadap protein rekombinan penanda histidin	11
2.5. Empat tingkat struktur protein	12
2.6. Representasi skematik dari siklus dinamika molekul	15
4.1. Penjajaran sekuens Nb-Cor natif dan mutan dengan 6ITP	19
4.2. Grafik plot profil DOPE templat, Nb-Cor natif, dan Nb-Cor mutan	22
4.3. Plot ramachandran struktur Nb-Cor natif dan mutan	23
4.4. Plot <i>Z-score</i> Nb-Cor natif dan mutan	24
4.5. Struktur 6ITP dalam format PDB	25
4.6. Hasil <i>superimpose</i> Nb-Cor natif terhadap templat 6ITP dan mutan terhadap struktur T53I	26
4.7. Grafik kumulatif hasil rata-rata EKTOT, EPTOT, dan ETOT Nb-Cor natif dan mutan	28
4.8. Grafik RMSD Nb-Cor natif dan mutan setelah tahap produksi selama 120 ns	29
4.9. Grafik RMSF Nb-Cor natif dan mutan setelah tahap produksi selama 120 ns	30
4.10. Nb-Cor natif dan mutan sebelum dan sesudah simulasi	35
4.11. Interaksi ligan kortisol Nb-Cor natif dan mutan	36

DAFTAR PUSTAKA

- Agüi-Gonzalez, P., Dankovich, T. M., Opazo, F., Rizzoli, S. O., and Phan, N. T. N. 2021. "Gold-Conjugated Nanobodies for Targeted Imaging Using High-Resolution Secondary Ion Mass Spectrometry." *Journal Nanomaterials* 11 (7): 1-12.
- Bannas, P., Hambach, J., and Koch-Nolte, F. 2017. "Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies as Antitumor Therapeutics." *Frontiers in Immunology* 8(11): 1-13.
- Baroroh, U., Setiani, N. A., Mardiah, I., Astriany, D., dan Yusuf, M. 2022. "Computational Design of Nanobody Binding to Cortisol to Improve Their Binding Affinity Using Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations." *Indones. J. Chem*: 1–14.
- Bates, R., Salsberry, P., and Ford, J. 2017. "Measuring Stress in Young Children Using Hair Cortisol: The State of the Science." *Biological Research for Nursing* 19(5): 499–510.
- Bever, C. S., Dong, J. X., Vasylieva, N., Barnych, B., Cui, Y., Xu, Z. L., Hammock, B. D., and Gee, S. J. 2016. "VHH Antibodies: Emerging Reagents for the Analysis of Environmental Chemicals." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(22): 5985–6002.
- Bowman, G. R. 2016. "Accurately modeling nanosecond protein dynamics requires at least microseconds of simulation." *Journal of Computational Chemistry* 37(6): 558-566.
- Carugo, O., and Djinovic Carugo, K. 2013. "Half a century of Ramachandran plots." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69(8): 1333–1341.
- Cheng, X., and Ivanov, I. 2012. "Molecular Dynamics" *Method in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press. P. 243–285.
- de Meyer, T., Muyltermans, S., and Depicker, A. 2014. "Nanobody-Based Products as Research and Diagnostic Tools." *Trends in Biotechnology* 30(10): 1–8.
- Dhull, N., Kaur, G., Gupta, V., and Tomar, M. 2019. "Highly Sensitive and Non-Invasive Electrochemical Immunosensor for Salivary Cortisol Detection." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 293: 281–288.
- Ding, L., Wang, Z., Zhong, P., Jiang, H., Zhao, Z., Zhang, Y., Ren, Z., and Ding, Y. (2019). "Structural Insights into the Mechanism of Single Domain VHH Antibody Binding to Cortisol." *FEBS Letters* 593(11): 1248–1256.
- Eisele, N. B., Andersson, F. I., Frey, S., and Richter, R. P. 2012. "Viscoelasticity of Thin Biomolecular Films: A Case Study on Nucleoporin Phenylalanine-Glycine Repeats Grafted to a Histidine-Tag Capturing QCM-D Sensor." *Biomacromolecules* 13(8): 2322–2332.
- El-Farhan, N., Rees, D. A., & Evans, C. 2017. "Measuring cortisol in serum, urine and saliva – are our assays good enough?" *Annals of Clinical Biochemistry* 54(3): 308–322.
- Ertuğrul Uygun, H. D., Uygun, Z. O., Canbay, E., Girgin Sağın, F., and Sezer, E. 2020. "Non-invasive cortisol detection in saliva by using molecularly cortisol

- imprinted fullerene-acrylamide modified screen printed electrodes.” *Talanta* 206: 1-5.
- Gao, Y., Mei, Y., and Zhang, J. Z. H. 2015. “Treatment of Hydrogen Bonds in Protein Simulations.” *InTech*: 121-136.
- Goossens, J., Sein, H., Lu, S., Radwanska, M., Muyldermans, S., Sterckx, Y. G. J., and Magez, S. 2017. “Functionalization of gold nanoparticles with nanobodies through physical adsorption.” *Analytical Methods* 9(23): 3430–3440.
- He, F., Yang, J., Zou, T., Xu, Z., Tian, Y., Sun, W., Wang, H., Sun, Y., Lei, H., Chen, Z., Liu, J., Tan, X., and Shen, Y. 2021. “A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for simultaneous detection of multiplex sildenafil adulterants in health food by only one antibody.” *Analytica Chimica Acta* 1141: 1–12.
- Hofström, C., Altai, M., Honarvar, H., Strand, J., Malmberg, J., Hosseinimehr, S. J., Orlova, A., Gräslund, T., and Tolmachev, V. 2013. “HAHAHA, HEHEHE, HIIHHI, or HKHKHK: Influence of position and composition of histidine containing tags on biodistribution of [99mTc(CO) 3]⁺-labeled affibody molecules.” *Journal of Medicinal Chemistry* 56(12): 4966–4974.
- Horowitz, S., & Trievel, R. C. 2012. “Carbon-oxygen hydrogen bonding in biological structure and function.” *Journal of Biological Chemistry* 287(50): 41576–41582.
- Inder, W. J., Dimeski, G., and Russell, A. 2012. “Measurement of salivary cortisol in 2012 - Laboratory techniques and clinical indications.” *Clinical Endocrinology* 77(5): 645–651.
- Jember, T. F. 2021. “Molecular Cloning, Expression and Purification of Recombinant VHH Proteins Expressed in *E. coli*.” *American Journal of Molecular Biology* 11(04): 129–141.
- Jiang, L., and Lai, L. 2002. “CH···O hydrogen bonds at protein-protein interfaces.” *Journal of Biological Chemistry* 277(40): 37732–37740.
- Jin, W. J., Yang, G. J., Shao, H. X., and Qin, A. J. 2013. “A novel label-free impedimetric immunosensor for detection of semicarbazide residue based on gold nanoparticles-functional chitosan composite membrane.” *Sensors and Actuators, B: Chemical* 188: 271–279.
- Kijanka, M., van Donselaar, E. G., Müller, W. H., Dorresteyn, B., Popov-Čeleketić, D., el Khattabi, M., Verrips, C. T., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., and Post, J. A. 2017. “A novel immuno-gold labeling protocol for nanobody-based detection of HER2 in breast cancer cells using immuno-electron microscopy.” *Journal of Structural Biology* 199(1): 1–11.
- Kinsland, C. 2010. “Bacterial Protein Overexpression Systems and Strategies.” *Comprehensive Natural Products*, Vol II. New York: Wiley. P. 695–721.
- Lou, S., Ye, J. Y., Li, K. Q., and Wu, A. 2012. “A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: The influence of nanoparticulate size.” *Analyst* 137(5): 1174–1181.
- Miller, R., Plessow, F., Kirschbaum, C., and Stalder, T. 2013. “Classification criteria for distinguishing cortisol responders from nonresponders to psychosocial stress: Evaluation of salivary cortisol pulse detection in panel designs.” *Psychosomatic Medicine* 75(9): 832–840.

- Muyldermans, S. 2013. "Nanobodies: Natural single-domain antibodies." *Annual Review of Biochemistry* 82: 775–797.
- Naidu, V., Whalley, J., and Narayanan, A. 2017. "Exploring the Effects of Gap-Penalties in Sequence-Alignment Approach to Polymorphic Virus Detection." *Journal of Information Security* 08(04): 296–327.
- Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2013. *Lehninger : Principles of Biochemistry*, 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company. P. 96.
- Ngili, Y. 2017. *Biokimia : Konsep-Konsep dan Latihan Soal*. Bandung: Rekayasa Sains. Hal. 151-182; 227-307.
- Pan, D., Khan, M. S., Misra, S. K., Wang, Z., Daza, E., Schwartz-Duval, A. S., Kus, J. M., and Pan, D. 2017. "Paper-Based Analytical Biosensor Chip Designed from Graphene-Nanoplatelet-Amphiphilic-diblock-co-Polymer Composite for Cortisol Detection in Human Saliva." *Analytical Chemistry* 89(3): 2107–2115.
- Perry, L., and Medbak, S. 2013. "The Adrenal Cortex." *The Immunoassay Handbook*, Ed. 4. New York: Wiley Publishing. P. 695–703.
- Riguero, V., Clifford, R., Dawley, M., Dickson, M., Gastfriend, B., Thompson, C., Wang, S. C., and O'Connor, E. 2020. "Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins." *Journal of Chromatography A* 1629: 1-19.
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., and M Van Uum, S. H. 2014. "The Detection of Cortisol in Human Sweat: Implications for Measurement of Cortisol in Hair." *Ther Drug Monit* 36(1): 30-34.
- Salmaso, V., and Moro, S. 2018. "Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview." *Frontiers in Pharmacology* 9: 1-16.
- Strazewski, P. 2010. "The relationship between difference and ratio and a proposal: Equivalence of temperature and time, and the first spontaneous symmetry breaking." *Journal of Systems Chemistry* 1: 1-7.
- Tallo-Parra, O., Manteca, X., Sabes-Alsina, M., Carbajal, A., and Lopez-Bejar, M. 2014. "Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: Protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites." *Animal* 9(6): 1059–1064.
- Urusov, A. E., Zherdev, A. v., and Dzantiev, B. B. 2014. "Use of gold nanoparticle-labeled secondary antibodies to improve the sensitivity of an immunochromatographic assay for aflatoxin B1." *Microchimica Acta* 181(15–16): 1939–1946.
- Vasudev, A., Kaushik, A., Tomizawa, Y., Norena, N., and Bhansali, S. 2013. "An LTCC-based microfluidic system for label-free, electrochemical detection of cortisol." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 182: 139–146.
- Wiederstein, M., and Sippl, M. J. 2007. "ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." *Nucleic Acids Research* 35.
- Zangheri, M., Cevenini, L., Anfossi, L., Baggiani, C., Simoni, P., di Nardo, F., and Roda, A. 2015. "A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection." *Biosensors and Bioelectronics* 64: 63–68.
- Zhang, X. 2015. "Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications." *Cell Biochemistry and Biophysics* 72(3): 771–775.