

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07. – М. 1730 «С». 2021.10.13. 13 ПЗ

НУБІП України

ЧМАРИ ПОЛІНІ ОЛЕКСАНДРІВНИ

НУБІП України ²⁰²²

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:632.3

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та екології

ДОНУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри
Екобіотехнологій та біорізноманіття

Коломієць Ю.В.

(підпис)

Кваско О.Ю.

(підпис)

“ ” 2022 р.

“ ” 2022 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Методи функціоналізації поверхні ППР-біосенсора для оптимізації експрес-діагностики вірусів рослин»

Спеціальність 162 біотехнології та біоінженерія

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

Проф., д. с-г. наук

(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.

(підпис)

(ПІБ)

Керівник бакалаврської роботи

к. б.н., ст. викладач

(науковий ступінь та вчене звання)

Таран О.П.

(підпис)

(ПІБ)

Виконала

(підпис)

Чмара П.О.

(ПІБ студента)

КИЇВ – 2022

Національний університет біоресурсів і природокористування
України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри

“ ” 2022 р.

З А В Д А Н И Я

НА ВИПУСКНУ

МАГІСТЕРСЬКУ КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Чмари Поліни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Методи функціоналізації поверхні ППР-біосенсора для оптимізації експрес-діагностики вірусів рослин

керівник роботи к.б.н., старший викладач Гаран Є.І.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБІП України від «13» жовтня 2021 р. № 1730 «С»

2. Строк подання студентом роботи 11 листопада 2022

3. Вихідні дані до роботи скляні пластинки з напиленням наночасток золота, скляні пластинки з напиленням наночасток цинк оксиду, рослини картоплі, попередньо заражені PVY.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) 1. Дослідити взаємодії антигенів рослинних вірусів з чутливою поверхнею без попередньої модифікації. 2. Підібрати методики для функціоналізації біочіпу. 3. Виконати дослідження на функціоналізованих біочіпах та порівняти різні методи функціоналізації.

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата завдання видав	завдання прийняв
1	к.б.н., ст.викл. Таран О.П.	15.10.21	15.10.21
2	к.б.н., ст.викл. Таран О.П.	01.03.22	01.03.22
3	к.б.н., ст.викл. Таран О.П.	15.08.22	15.08.22
Висновки	к.б.н., ст.викл. Таран О.П.	29.09.22	29.09.22

6. Дата видачі завдання 01 жовтня 2021

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

	Назва етапів випускної магістерської кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Розділ 1. Огляд літературних джерел згідно обраної теми	01.04.2022	
2.	Розділ 2. Матеріали та методи дослідження	10.05.2022	
3.	Розділ 3. Результати дослідження	20.09.2022	
4.	Висновки та оформлення списку літератури	25.10.2022	

Студент

Чмара І.О.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

Таран О.П.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

НУБІП України

Магістерська кваліфікаційна робота на тему «Методи функціоналізації поверхні ППР-біосенсора для оптимізації експрес-діагностики вірусів рослин» виконана на 69-ти сторінках друкованого тексту. Містить у собі 16 рисунків та 2 таблиці. Опрацьовано 101 літературних джерела.

НУБІП України

Робота складається з таких розділів: зміст, вступ, огляд літератури, об'єкт та методи дослідження, результатів дослідження, висновків та списку використаної літератури.

НУБІП України

Метою роботи було дослідження методів функціоналізації поверхні ППР-біосенсора при діагностиці вірусних захворювань для оптимізації експрес-тестування..

Завдання роботи:

- Дослідити взаємодії антигенів рослинних вірусів з чутливою поверхнею без попередньої модифікації.
- Підібрати методики для функціоналізації біочіпу.
- Виконати дослідження на функціоналізованих біочіпах та порівняти різні методи функціоналізації.

НУБІП України

Предметом дослідження було виявлення антигенів вірусів рослин в системі ППР-біосенсора при експрес-діагностиці з поверхнею біочіпу при різних методах його функціоналізації. .

Об'єктом дослідження було виявлення антигенів вірусів рослин.

НУБІП України

Методами дослідження були: імуноферментний аналіз, електронна мікроскопія, метод поверхневого плазмонного резонансу, статистичні методи обробки даних.

НУБІП України

ЗМІСТ НУБІП України

ЗМІСТ 6
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 8

ВСТУП 9 РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД 11

1.1 *Принципи функціонування біосенсорів* 11

1.1.1 Електрохімічні сенсори 14

НУБІП України

1.1.2 Масочутливі сенсори 14

1.1.3 Калориметричні сенсори 15

1.1.4 Акустичні сенсори 15

1.1.5 Оптичні сенсори 16

НУБІП України

1.2 *Загальні принципи ППР* 16

1.2.1 Типова технологія ППР 18

1.3 *Біосенсори, в основі яких лежить явище ППР* 20

НУБІП України

1.4 *Методи функціоналізації біочіпів* 25

1.4.1 Використання ZnO 28

1.4.2 Використання SiO₂ у комплексі з Au 36

1.5 Методи діагностики вірусних захворювань у рослин 37

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ НУБІП України

2.1 *Методи проведення ППР* 40

2.1.1 Попередня підготовка трансдюсера. Модифікація чутливої поверхні 40

НУБІП України

2.1.2 Підготовка біочіпу до ППР 41

2.1.3 Підготовка чутливої поверхні перед аналізом: модифікація пластинки наночастинками ZnO.....	42
2.1.4 Процедура аналізу з використанням ППР-біосенсора «Плазмонтест».....	43
2.3 Методика проведення імуноферментного аналізу.....	44
2.3 Методика проведення електронної мікроскопії. Метод занурення.....	46
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
3.1. Дослідження зв'язування антигенів Y-вірусу з лігандами на ППР-біосенсорі.....	49
3.2. Дослідження зміни фотолумінісценції біосенсора на основі ZnO.....	53
ВИСНОВКИ.....	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	59

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

НУВБІП України
BCA Білочний сироватковий альбумін

EM

Електронна мікроскопія

НУВБІП України
IFA Імуноферментний аналіз
OR Одиниця резонансу
PAHX Поліалілгідрохлорид

PAHX

Поліалілгідрохлорид

НУВБІП України
P33 Прилад з зрядовим зразком
PWB Порушене повне відбиття
PIPR Поверхневий плазмонний резонанс

P33

Прилад з зрядовим зразком

PWB

Порушене повне відбиття

PIPR

Поверхневий плазмонний резонанс

PR

Плазмонний резонанс

НУВБІП України
PK Резонансний кут
SEM Скануючий електронний мікроскоп
СЗМ Самозбірний моношар

PK

Резонансний кут

SEM

Скануючий електронний мікроскоп

СЗМ

Самозбірний моношар

НУВБІП України
TEM Трансмісійний електронний мікроскоп
ФЛ Фотолюмінісценція
ФСБ Фосфатно-сольовий буфер

TEM

Трансмісійний електронний мікроскоп

ФЛ

Фотолюмінісценція

ФСБ

Фосфатно-сольовий буфер

НУВБІП України
APTES 3-амінопропілтриметоксисилан
PVY У-вірус картоплі
RIU Refractive index unit

APTES

3-амінопропілтриметоксисилан

PVY

У-вірус картоплі

RIU

Refractive index unit

TEOS (TEOC)

Тетраетилортосилан

НУВБІП України

НУБІП України

Актуальність. Протягом останніх років біосенсорика – це наука, що швидко розвивається. Основними причинами для її розвитку стало забруднення навколишнього середовища внаслідок людської діяльності: сільське господарство та промисловість. Внаслідок цього, з'явилася необхідність моніторингу небезпечних речовин для тварин та людей [13].

Окрім вищезазначених факторів, не менш важливою стає розробка методів швидкого та безміткового детектування захворювань, що здатні вражати людей та тварин, але при цьому, які не втрачають точності та специфічності при діагностиці тої чи іншої проблеми.

Біосенсори, і, зокрема, прилади, що базуються на ППР, розроблені для лабораторної діагностики та застосовуються у ветеринарії, медицині, при контролі якості харчових продуктів та визначенні забруднення навколишнього середовища [13, 32, 85, 98].

За допомогою ППР можна визначати оптичні параметри зразків, та їхню зміну у режимі реального часу [23]. Призначенням датчиків ППР-біосенсора є точне та швидке визначення показника заломлення середовища та/чи визначення певної речовини завдяки реєстрації зміни оптичних характеристик чутливого шару.

Протягом останніх років, кількість досліджень, пов'язаних з ППР зростає, що свідчить про інтерес науковців у розвитку цього методу дослідження.

Порівняно з класичними методами дослідження (ІФА, ПЛР тощо), цей метод дає змогу спостерігати за кінетикою біохімічних реакцій [75, 98].

Саме дослідження низку економічних переваг, таких як короткий час самого аналізу, мала кількість застосованих реагентів, низьковартісне обладнання.

Тому, дослідження явища плазмонного резонансу, дослідження шляхів функціоналізації біочіпів, покращення технічних характеристик є актуальним на сьогоднішній день.

Мета: Дослідження методів функціоналізації поверхні ППР-біосенсора при діагностиці вірусних захворювань для оптимізації експрес-тестування.

Завдання:

- Дослідити взаємодію антигенів рослинних вірусів з чутливою поверхнею без попередньої модифікації.

- Підібрати методики для функціоналізації біочіпу.

- Виконати дослідження на функціоналізованих біочіпах та порівняти різні методи функціоналізації.

Об'єкт: Виявлення антигенів вірусів в рослин в системі ППР-біосенсора при експрес-діагностиці з поверхнею біочіпу при різних методах його функціоналізації.

Предмет: функціоналізація поверхні біочіпу.

Методи: ІФА, ЕМ, ППР, статистична обробка даних.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

НУБІП України

1.1 Принципи функціонування біосенсорів

НУБІП України

За визначенням, що подається у [2], датчик (також сенсор або чутливий елемент) – це перетворювачі регульованої або контрольованої величини у вихідний сигнал, зручний для дистанційної передачі і подальшої обробки.

Усі сенсори поділяються на такі три великі групи [1,4]:

НУБІП України

- фізичні (використовуються для вимірювання фізичних величин, таких як температура, тиск тощо),
- хімічні (використовуються в аналітичній хімії для кількісного та

якісного аналізу хімічних елементів та речовин);

НУБІП України

- біологічні (використовуються для кількісного або напівкількісного аналізу при використанні розпізнавального елементу біологічного походження).

У вузькому значенні, біосенсор це - молекулярний сенсор, що має аналітично селективну границю поділу фаз, де розташований датчик, що частково чи повністю торкається межі фаз. Функція останнього полягає в передачі взаємодії між аналізованим зразком та поверхнею прямо або за допомогою хімічних медіаторів. У біосенсорі на поверхні зосереджено біорозпізнавальні структури, біомолекули, або аналогічні до них [4].

НУБІП України

Одним з родових принципів функціонування біосенсора є виявлення цільових молекул без використання міток, а шляхом їхнього зв'язування з поверхнею біосенсора.

НУБІП України

На сьогоднішній день, досліджено та розроблено протоколи численних стратегій маркування білків, що дозволяють характеризувати білки щодо їх структури, згортання або взаємодії з іншими білками [77, 91]. Стратегії маркування зазвичай використовуються для досягнення прикріплення мітск-

репортерів за допомогою ковалентних зв'язків, таких як флуорофори, радіоізотопи, ферменти або біотин, до цільових біомолекул (тобто нуклеотидів та білків). Це дає можливість оцінки кількісних показників зв'язування між

біомолекулами [24, 66]. Однак, використання молекулярних міток може змінити структурну конфігурацію або спричинити стеричну перешкоду, впливаючи на спорідненість мічених молекул до цільових біомолекул, що є основною проблемою.

Виявлення без міток усуває необхідність у спеціальних барвниках або молекулах-репортерах. Це дозволяє проводити чутливе вимірювання цільових

аналітів. За останні кілька десятиліть було розроблено різноманітні види оптичних біосенсорів, що, зокрема, включають кварцевий мікробаланс (КМБ) [19] та еліпсометрію [1] поверхневий плазмонний резонанс (ППР) [57]. Серед

різних методів оптичного дослідження, система, в основі якої лежить явище ППР є репрезентативним типом безміткової техніки для моніторингу біомолекулярних взаємодій у режимі реального часу

Головна різниця між сенсорами біологічної та хімічно-природи заключається в тому, що у біологічних сенсорах для кількісного аналізу використовується матеріал біологічної природи [1].

До аналітичних характеристик сенсорів можна віднести наступні показники: чутливість, точність, селективність, час відгуку, відтворюваність, природа розчину, час регенерації, термін експлуатації сенсора.

Дивлячись на вид фізичного перетворювача, сенсори класифікують згідно

з [7]:

- електрохімічні;
- масо-чутливі;
- калориметричні;
- акустичні;
- оптичні [1, 5].

На рисунках 1.1 та 1.2 представлено узагальнену будову біологічних та хімічних сенсорів.

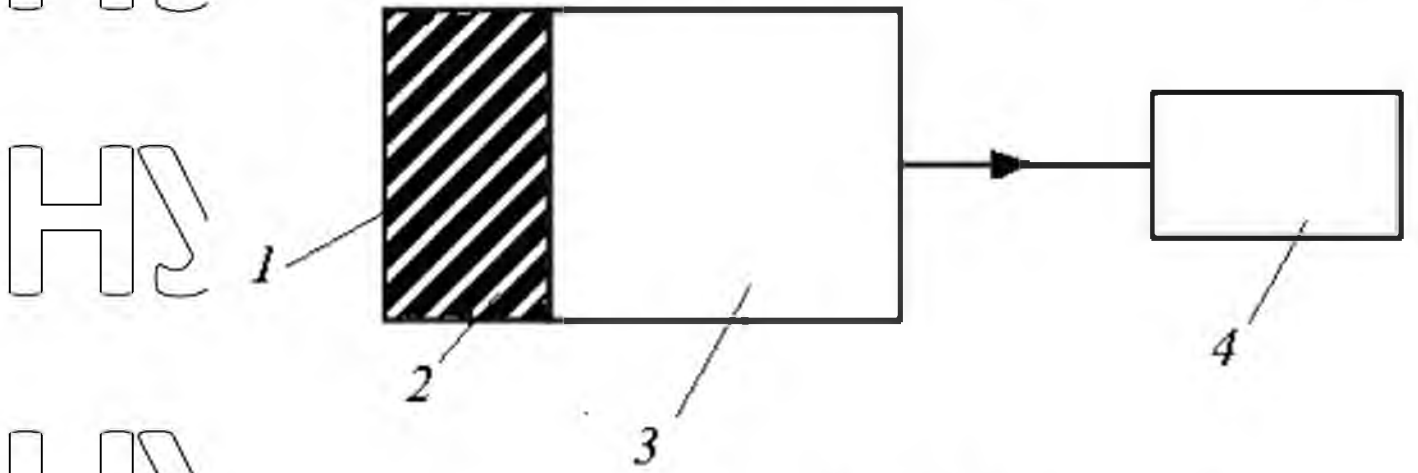


Рис. 1. Загальна схема хімічного або біологічного сенсора:

1 – аналіт (субстрат); 2 – розпізнавальний елемент; 3 – трансдюсер; 4 – пристрій, що отримує та обробляє отриману інформацію [1]



Рис. 1.2 Узагальнена схема біологічного сенсора

НУБІП України

1.1.1 Електрохімічні сенсори

Даний тип сенсорів призначений для кількісного та якісного аналізу різних процесів, що супроводжуються окисно-відновними реакціями [5].

Залежно від методу, що використовується під час виконання вимірювання сигналу в електрохімічних сенсорах, виділяють три типи трансдюсерів:

- амперметричні (до цих методів відносять вольтамперометрію та хроноамперометрію). На клеммах електродів електрохімічної комірки накладений

змінний потенціал. Постійно вимірюється струм, внаслідок чого утворюється

крива. Ця крива відображає залежність струму від прикладеного потенціалу.

Спочатку йде повільне зростання, далі спостерігається різке зростання, вихід на так зване «плато», і знову можна спостерігати поступове спадання показників,

що вимірюються.

- потенціометричні. Основою для даного типу перетворювача є комбінація двох напівелементів, які розміщують в комірку. Для отримання результатів, вимірюється потенціал комірки при умовах нульового струму [1].

- кондуктометричні. На відміну від двох попередніх типів, даний тип ґрунтується на вимірюванні показнику провідності розчинів. До зміни провідності може призводити широкий спектр біохімічних реакцій, зокрема реакцій за участі ферментів [1,5].

1.1.2 Масочутливі сенсори

Цей метод заснований на кантилеверах (це специфічні механічні системи або консолі).

Принцип роботи такого сенсора базований на вимірах прогину консолі завдяки збільшенню маси аналізованої речовини, яка приєднується до рецепторної поверхні чутливого елемента. Мають два перетворювача.

Функціями останніх є виконання перетворень «маса – механічні напруження» та «механічні напруження – електричний сигнал» [5].

Консольні пристрої працюють у двох режимах вимірювання: статичного прогину та динамічному режимі (також цей режим називають резонансним).

Резонансна частота залежить від багатьох факторів: матеріалу, габаритних розмірів, маси [5,37].

1.1.3 Калориметричні сенсори

Даний вид сенсорів базується на перетворенні теплової енергії на електричну напругу з подальшим перетворенням сигналу у вимірювані величини. В основному, цей процес складається з кількох стадій (в основному – дві-три). На початку дослідження взаємодія рецептора з аналізованою речовиною виділяє певну кількість теплоти, яка далі перетворюється на різницю температур, і, далі, вже різниця температур на фізичному перетворювачі переводиться на різницю потенціалів.

Для більшої ефективності, замість контакту типу «метал-метал» використовують «метал-напівпровідник».

Зазвичай використовують сенсори на основі кремнієвих інтегральних схем [5].

1.1.4 Акустичні сенсори

Даний різновид сенсорів базується на різних параметрах (теплових, електричних тощо) середовища, де поширюються акустичні хвилі, можливостями керування цього середовища та характеристиками акустичних хвиль через прикладання зовнішньої дії.

Структура акустоелектронного сенсора на поверхневих акустичних хвилях виглядає наступним чином: підкладка-звукопровід із п'єзоелектричного

матеріалу з нанесеною на робочу поверхню одним (резонаторна структура) або двома (фільтр чи лінія затримки) зустрічно-штирьовими перетворювачами, що розташовуються на визначеній відстані один від одного [8].

1.1.5 Оптичні сенсорні

Даний тип біологічних сенсорів на різних оптичних явищах таких як флюоресценція, поглинання ультрафіолетового чи видимого світла, ППР, схемі-та біоломінесценції тощо [1,5].

Для виконання реакції, реагент повинен бути підготований таким чином, щоб могла відбутися взаємодія між реагентами, що використовуються протягом самої реакції [1].

Головна перевага даного типу сенсорів є точність, діапазон застосування швидкість проведення самого дослідження та висока чутливість [66].

1.2 Загальні принципи ППР

Поверхневий плазмонний резонанс - оптичний метод вивчення шарів біоорганічних чи органічних молекул нанесених на поверхню золота, срібла чи інших благородних металів, взятого у вигляді тонкої плівки [4].

ППР виникає у випадку, коли фотон падаючого світла потрапляє на металеву поверхню (зазвичай, використовують тонкий шар золота). За певного куту падіння, частина світлової енергії проходить через покриття електронами в поверхневому шарі металу, що потім рухається внаслідок збудження.

Рухи електронів називають плазмонами, і вони поширюються паралельно поверхні металу. Коливання плазмонів, в свою чергу генерує електричне поле, діапазон якого становить близько 300 нм від межі між металевою поверхню та розчином аналізованого зразку [36]. За комерційної конфігурації біосенсора базованого на явищі ППР, падаюче світло застосовується з використанням

скляної призми з високим показником відбивання в геометрії Кречмана (рис. 1.3) у методі порушеного повного відбиття (ППВ).

Визначений кут ППВ, при якому відбувається резонанс, при умові постійної довжини хвилі джерела світла і тонкої поверхні напиленого металу, залежить від заломлення показнику матеріалу, що знаходиться близько поверхні металу. Отже, за незначної зміни відбитого кута, індекс чутливого середовища (наприклад, внаслідок прикріплення до біомолекули) плазмон утворитися не може.

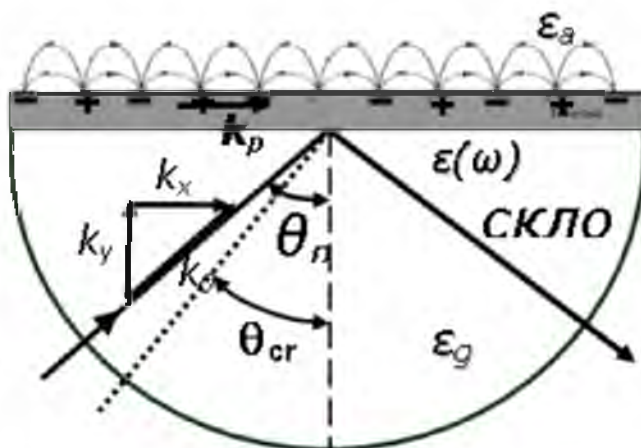


Рис. 1.3 Схема збудження ППВ в геометрії Кречмана

Таким чином, виявлення здійснюється шляхом вимірювання змін відбитого світла, отриманих на детекторі.

Крім того, кількість поверхневої концентрації можна визначити кількісно, контролюючи відбите світло інтенсивності або відстеження зсуву кута резонансу. Зазвичай ППВ-біосенсор має межу виявлення близько 10 пг/мл [31]. У ППВ-біосенсорах молекули досліджуваного зразка спочатку іммобілізуються на чутливій поверхні сенсора. Коли розчин молекул-мішеней потрапляє в контакт з поверхнею, проба-мішень зв'язується через спорідненість відбувається реакція, яка в результаті спричиняє збільшення показника заломлення на поверхні датчику ППВ.

У експериментах, пов'язаних з дослідженням явища ППВ, для опису зміни

сигналу використовуються одиниці резонансу (або відповіді) (OR), де 1 OR еквівалентна критичному зсуву кута на 10^{-4} градуси. Початкове значення OR відповідає стартовому критичному куту на початку експерименту, тобто коли взаємодія «проба-мішень» ще не відбулася, [27].

Зміни показника заломлення відстежують шляхом з'єднання падаючого світла з плазмоном, що розповсюджується на поверхні золота або іншого благородного металу в режимі реального часу.

Відповідно, такі показники як швидкість асоціації (на етапі з'єднання комплексу «проба-мішень»), швидкість дисоціації, (коли цільові молекули видаляються з безперервного потоку шляхом промивання буфером), константи швидкості асоціації та швидкості дисоціації можуть бути визначені за допомогою ППР при обчисленні кінетики зв'язування. Параметр, який пов'язаний з показником заломлення, також можна використати для виявлення та кількісної оцінки молекул-мішеней, прив'язаного до відомого зонда, попередньо іммобілізованого на поверхні датчика.

Межа виявлення у експерименті ППР залежить від ряду факторів, включаючи оптичні властивості, молекулярну масу, спорідненість молекул проб-мішеней, а також від якості покриття поверхні молекули аналізованої речовини [31].

1.2.1 Типова технологія ППР

Спеціальна проточна комірка (також можна зустріти назву «чарунка») встановлюється на чутливу поверхню ППР біосенсора, і використовуючи патрубки, приєднується до системи, що регулює потік досліджуваної речовини. Під час виконання дослідження, чутлива поверхня біосенсора та проточна комірка протягом кількох хвилин промивається буферним розчином.

Цей процес позначений як фаза I на рисунку 1.4.

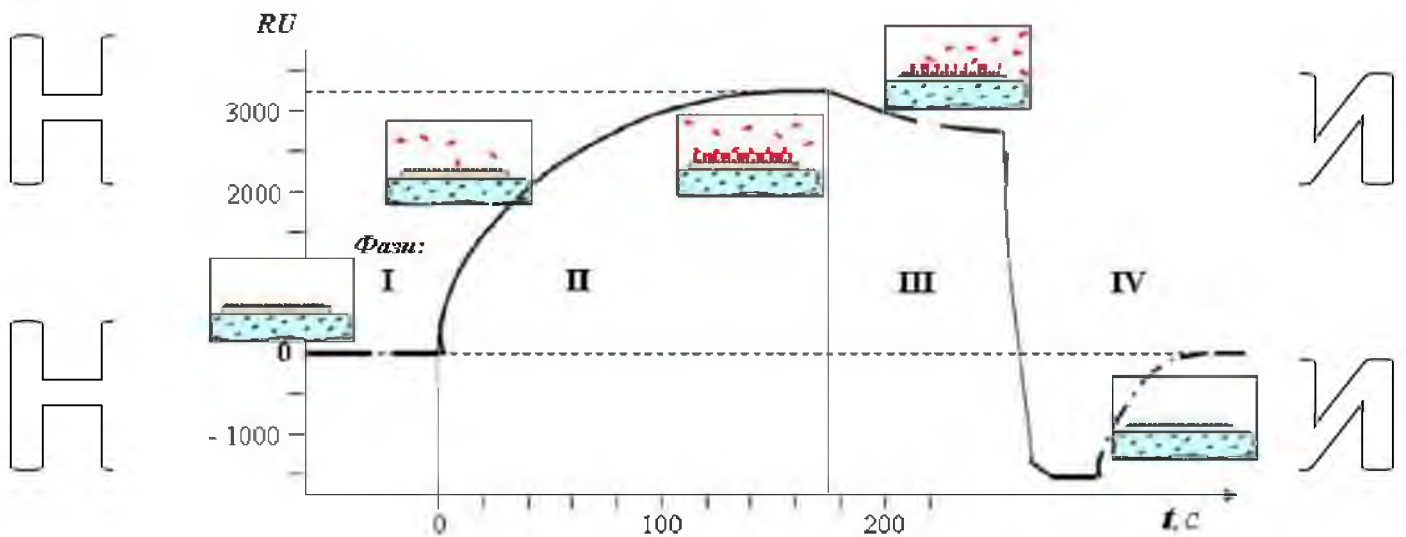


Рис. 1.4 Кінетика зсуву резонансу

При виконанні підготовчого циклу, спочатку, через навірку прокачують розчин білку, що поступово осідає на поверхні, що покрити тонким шаром благородного металу (в основному, золота). Після цього прокачують розчин зразка, що досліджується. Цей процес може тривати від однієї до двох годин. Після цього, через комірку прокачують необхідну кількість досліджуваного зразку. Далі розпочинають процес вимірювання.

Цей процес позначений як фаза II на рисунку 1.4.

Необхідно зазначити, що взаємодія типу «антиген – антитіло» відбувається не миттєво, а поступово. Через це існує необхідність виконувати вимірювання багато разів. Кожного разу після цього, спираючись на результати вимірювання, розраховувати точний мінімум ППР і будувати специфічний графік – так звану «сенсограму».

«Сенсограма» (також зустрічається назва «кінетика») – це специфічний графік, що показує залежність точного мінімуму ППР від часу.

Протягом наступної фази (фаза III на рис. 1.4) досліджуваний зразок вже не вводиться у систему, але чиста рідина продовжує прокачуватись.

Асоціація майже зупиняється, активними залишаються тільки процеси дисоціації. Завдяки результатам, що отримуються під час цієї фази, та спираючись на результати фази II, можна розрахувати відповідні константи.

дисоціації та асоціації.

Остання фаза, фаза IV, через навантаження прокачується розчин елюента (це речовина, що різко послаблює молекулярні взаємодії між лігандом та досліджуванним зразком). Він вимиває досліджуваний зразок, і майже не впливає на сам ліганд.

Після використання, біочутлива поверхня повинна регенерувати, тобто мінімум ППР повинен повернутися у початкове положення. Після процедури регенерації можна розпочинати повний цикл досліджень з тим самим зразком, але за інших умов, чи використовувати вже інший зразок.

Таким чином, один ліганд можна використовувати під час виконання близько 50 досліджень.

Отже, завдяки вищезазначеним особливостям цього явища, завдяки ППР можна:

- визначати наявність чи відсутність хімічних та біохімічних частинок (віруси, антитіла, бактерії, токсини тощо);
- досліджувати «кінетику» та вплив різних чинників середовища на біохімічні взаємодії;
- визначати концентрацію біохімічних та хімічних частинок [5].

1.3 Біосенсори, в основі яких лежить явище ППР

Найперспективнішим напрямком для використання ППР у біосенсоріці можна вважати імуносенсори [16, 54], бо біотестування (взаємодія типу «антиген-антитіло») дуже часто використовується у клінічній діагностиці.

Застосування явища ППР таким чином стало можливим завдяки так званій геометрії Кретчмана, на якій базується конфігурація перетворювача (яка згадується у попередньому підрозділі), у якій плівка металу наноситься безпосередньо на зв'язуючу поверхню [51].

Даний тип біосенсорів ґрунтується на тому, що чутливий матеріал, іммобілізований на поверхню трансдюсера, специфічно взаємодіє з молекулами досліджуваного зразку [6].

Якщо в оточуючому середовищі молекул – зразків відбулася взаємодія цих молекул з чутливим шаром, то прилад фіксує це як вихідний сигнал трансдюсера. Таким чином, у досліджуваному зразку, можна виявити наявність антигену чи їхню відсутність (у випадку, якщо реєстрація сигналу відсутня), і провести контроль на наявність до бактерій, токсинів чи вірусів, і так проводити контроль якості різних видів сировини [28].

Але геометрія Кречмана не єдина схема, що використовується для збудження поверхневих плазмонів. Також відомо ще кілька схем, зокрема хвильоводу, на бічну поліровану поверхню якого нанесено тонкий шар металу чи металічні субхвильові ґратки [64].

У сучасних ППР-біосенсорах за допомогою ПЗЗ-камери відбувається реєстрація розподілення інтенсивності випромінювання, відбитого від робочої площі сенсору, що дозволяє збільшити продуктивність останнього. Зокрема, такий тип сенсорів дає можливість досліджувати гібридизацію коротких олігонуклеотидів з концентрацією менше за 10 нМ, що відповідає розширенню

за показником заломлення 10^{-5} [41]. Використання некогерентного джерела випромінювання та інтерференційного фільтру дозволили досягнути розширення $3 \cdot 10^{-5}$ RIU у дослідженнях бичачого сироваткового альбуміну [26].

Збільшити чутливість сенсору можлива шляхом використання 2 джерел випромінювання з різними довжинами хвиль.

Використання такого підходу дозволило досягнути розширення з показником заломлення $2 \cdot 10^{-6}$ RIU і виконувати визначення олігонуклеотидів та білків з концентрацією порядку одиниць нМ [100]. Використання замість лінійного поляризованого світла еліптично поляризоване призводить до збільшення чутливості та робочого діапазону ППР-сенсору.

Переваги поляризаційного контрасту та певної структури плівки на призмі дозволяють досягати чутливості сенсору за показником заломлення $< 10^{-6}$ [67] та

виконувати детекцію біомолекул, наприклад, коротких олігонуклеотидів з концентрацією < 100 пМ.

На сьогодні методика виконання дослідження за допомогою ППР-чипів використовується у комерційних сенсорах таких як Biacore, GWC Technologies Inc., Lumera, IBIS Technologies, ППРi-Array Biacore (рис. 1.5) [40, 95]. Як метод реєстрації використовують чи вимір довжини хвилі при збудженні плазмону за джерела білого світла [30,34], чи виміряють точну позицію кута ПР



Рис 1.5 Біосенсор Biacore-3000

ППР-сенсори, дія яких засноване на детекції спектральних характеристик ППР також отримали широке поширення. У цих біосенсорах вимірюється спектр коефіцієнту відбиття чи поглинання та вихідний сигнал сенсору пов'язаний з кутовим чи спектральним вимірюванням зміни положення ППР.

Часто, для вказаних сенсорів заснована на модуляції кута падіння збуджуючого випромінювання. Даний тип сенсора дозволяє проводити вимірювання з чутливістю до показника заломлення до 10^{-7} , а також дає можливість побудови багатоканальної системи для проведення біохімічного аналізу. Використання модуляції за довжиною хвилі замість модуляції за кутом, а

також архітектури з паралельними каналами зчитування дає можливість побудувати сенсор з чутливістю за показником заломлення до $2 \cdot 10^{-7}$ RIU [43, 62]. Даний тип ППР-сенсору був використаний для стафілококового ентеротоксину В у молоці і показав межі детекції 0,5 нг/мл [52].

Спектральні ущільнення каналів в ППР-сенсорі шляхом введення додаткового діелектричного покриття чи зміни просторово-кутової схеми збудження плазмонів дозволяє створити багатоканальні сенсори з високою продуктивністю при чутливості $< 10^{-6}$ RIU. Застосування спектроскопії довгохвильових поверхневих плазмонів і спеціальної багатосарової структури плівки забезпечують розширення $< 3 \cdot 10^{-8}$ RIU [73].

Використання у схемах ППР-сенсорів різних типів інтерферометрів (в основному Маха-Цендера та Майкельсона) дозволяє зменшити розмір сенсора без втрати чутливості. Дія таких біологічних сенсорів заснована на вимірюванні зсуву фази між вимірюваним та опорним сигналами. Таким чином, використання інтерферометра Маха-Цендера у 2-канальному ППР-сенсорі дозволило досягти дозволу до $3 \cdot 10^{-6}$ RIU [87]. ППР-сенсор, збудований на базі інтерферометра Майкельсона, дозволяє досягти більш високої чутливості за показником заломлення, а саме $7,7 \cdot 10^{-7}$ RIU. Використання даного сенсора для виявлення

антитіл БСА показало, що межа чутливості для даних біомолекул складає 6 нг/мл. Реалізація у ППР-сенсорі на основі інтерферометра Маха-Цендера незалежної інтерференції TE- і TM-хвиль, від сенсорного елемента та опорного пучка дозволила досягти чутливості $5,5 \cdot 10^{-8}$ RIU, що уможливило виявлення молекул БСА із концентрацією менше 7,4 нг/мл.

Також існує сенсор знаходження і визначення концентрації біологічних молекул і молекулярних комплексів у рідкому аналізі [11]. У даному пристрої відбувається опромінення межі розподілу між скляною призмою й аналітом з боку більш щільного середовища.

Наразі також описано пристрій для знаходження і визначення концентрації біологічних молекул у рідкому досліджуваному зразку [12], що базується на явищі ППР, в якому джерело збуджуючого світла працює в інфрачервоному

діапазоні хвиль.

Принцип дії цих пристроїв базується на вимірюванні інтенсивності відбитого світла при постійному куті падіння чи зміні кута мінімуму ППР.

На рисунку 1.6 схематично зображено криві РК, що реєструються при зміні електричного поля внаслідок приєднання молекул аналізованої речовини до молекул ліганду.

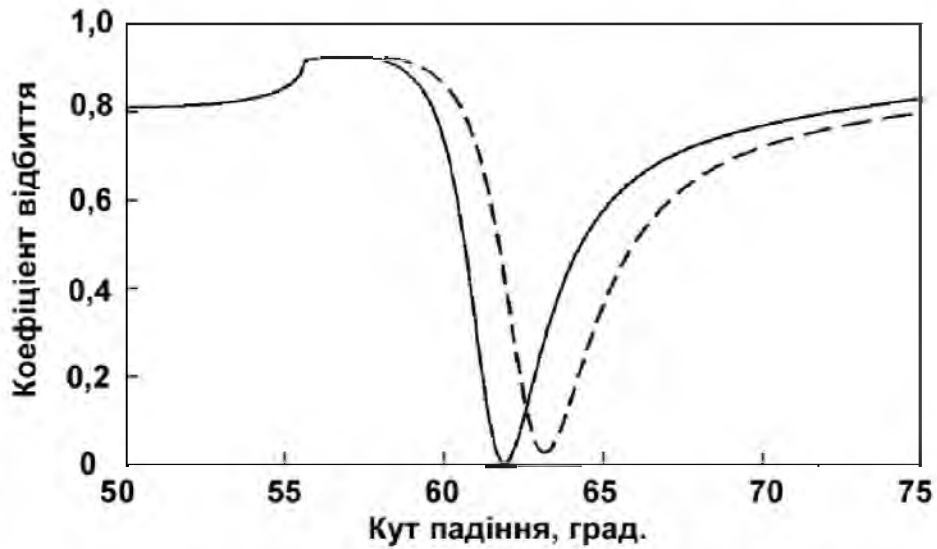


Рис. 1.6 Резонансні криві, що отримуються протягом дослідження [5]

На рисунку 1.7 зображена схема спостереження зсуву кривої ППР при факті присутності досліджуваної речовини.

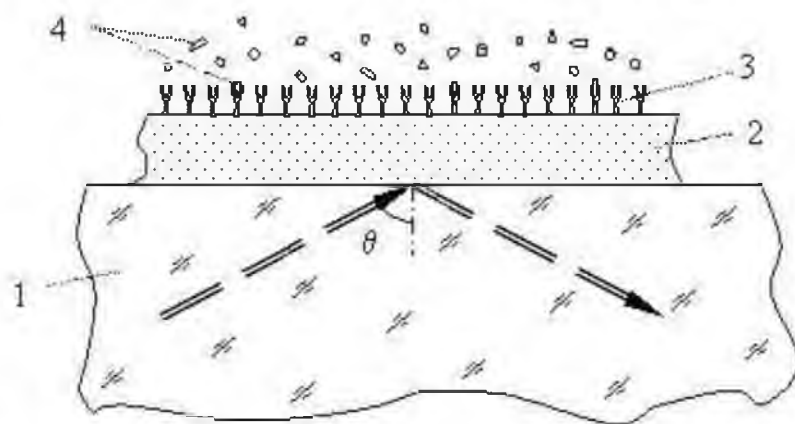


Рис. 1.7. Схема спостереження характеристик ППР
1 - прозоре середовище, 2 - металеві плівка, 3 - чутливий шар ліганду, 4 -

молекули аналізу [5]

Світло проходить через прозоре середовище, що має високий показник заломлення, падає на металеву (часто, золоту) металеву плівку, на яку був попередньо нанесений чутливий шар ліганду. Саме цей шар, в подальшому, взаємодіє з молекулами аналізу [5].

Плазмонтест був розроблений і виготовлений для лабораторних досліджень на базі стаціонарної напівциліндричної призми та напівпровідникового лазера з довжиною хвилі 635 нм з колінеарним пучком.

Зміна кута падіння світла на підкладку та відбитого світла на детекторі, що реєструє випромінювання досягається обертанням лазера та фотодіода, розташованих на протилежних плечах навколо поздовжньої осі призми, за допомогою крокового двигуна. Діапазон кутів становить 40° - 70° , мінімальний крок складає 0,03 градуса.

Програмне забезпечення пристрою дозволяє встановити 10 серій на 10 кривих ППР, визначити положення мінімуму ППР при наближенні поліномом 3-го порядку, побудувати сенсограму кута ППР з часу. Пристрій має зручне діалогове вікно з графічним зображенням кривих ППР та сенсограм [85].

1.4 Методи функціоналізації біочіпів

Один із перших кроків у будь-якому протоколі для біосенсору на основі ППР стосується способу закріплення молекул-рецепторів на чутливій поверхні ППР.

Техніка проведення ППР-дослідження стає цікавою, коли металева плівка, що підтримує поширення плазмонів, є хімічно модифікованою. Біорецептори також фізично сорбовані або хімічно прикріплені до поверхні сенсора. Часто перевагу надають ковалентному кріпленню, оскільки воно забезпечує міцність і стабільність зв'язування рецептора з поверхнею ППР. Таким чином, це дозволяє

легко відновити інтерфейс датчика за допомогою умов, який може видалити аналіт з поверхні, але не сам приєднаний ліганд.

Стратегії ковалентної іммобілізації включають хімічні реакції, такі як сполучення амінів, альдегідів або тіолів на попередньо сформовані, функціональні, самозбірні моношари. Найбільш широко використовуваний підхід для впровадження функціональних груп на тонких золотих плівках ППР базується на тіолованих органічних сполуках, які спонтанно утворюють самозбірні моношари (СЗМ) на золотих поверхнях.

Використання полімерів є альтернативою з пов'язаними перевагами та недоліками. Вибір одного чи іншого залежить від потрібного застосування.

Загалом, полімерні шари, такі як тонкі плівки карбоксильованого декстрану (СМ-декстран) дозволяють молекулам вільно рухатися по поверхні, таким чином зменшуючи деякі проблеми з зв'язуванням аналіту з поверхнею біочіпу. Крім того, вони дають більше точок кріплення, ніж моношар, і діють як буфер для зменшення неспецифічного зв'язування з поверхнею.

Однак це складніше для молекул дифундувати через такий гідрогель, ніж через СЗМ, що потенційно може змінити вимірювану кінетику. Хоча одношарові плівки не виявляють таких проблем з дифузією, ця плівка може бути менш чутлива, у випадку, якщо вона не сформована належним чином. Проте ця проблема було розглянуто в літературі, показуючи, що, насправді, немає різниці в кінетиці зв'язування між моношарами та гідрогелем декстрану [47]. Таким чином, чи є покриття одношаровим або з тонкої плівки, вибір процедури іммобілізації в основному залежить від подальшого застосування.

Як правило, плоскі поверхні з СЗМ є кращими у порівнянні з полімерними шарами, коли аналіти, що досліджуються, є більшими за молекули, наприклад клітини та віруси, а також для визначення кінетичних параметрів, коли необхідний низький рівень неспецифічного зв'язування та бажано низький рівень іммобілізації [46]. Внески неспецифічного зв'язування призводять до помилок у визначенні концентрації та розрахунку кінетичних констант. Зменшення неспецифічного зв'язування можна досягти шляхом включення таких

сполук, як похідні поліетиленгліколю в стадії іммобілізації або введення в ліганд, який необхідно приєднати на поверхню ППР [97].

Окрім вибраної стратегії іммобілізації для зв'язування рецепторів із чіпом SPR, вибір металевої плівки є критичним для чутливості проведення ППР.

Золото є найбільш вживаним для ППР вимірювань в основному з двох причин:

воно відносно стабільне у водних середовищах, необхідних для моніторингу біомолекулярних взаємодій і може бути легко функціоналізовано через утворення алканетіолів СЗМ. Однак золото не найкращий вибір для досягнення

високочутливого дослідження ППР. Теоретичне моделювання ППР у тонких

плівках оксидів металів, що виконували Францен та ін. та який припустив, що ІТО може бути краще підходящим субстратом [25]. Однак це потребує збудження та виявлення в інфрачервоному діапазоні.

У звичайному видимому діапазоні срібні підкладки виявляються найбільш

привабливими, оскільки плазмонний зв'язок виявляє гостріший кутовий резонанс порівняно з резонансом золота, дає підвищену чутливість [50]. Срібні

підкладки можна функціонувати так само, як і золоті, використовуючи молекули тіолу або дисульфиду, які адсорбуються з розчину та самозбираються в щільну

упаковку моношарів або шляхом нанесення полімерів. Однак страждає срібло

від поганої хімічної стабільності, що перешкоджає його широкому використанню для ППР-досліджень. Однією зі стратегій обходу цього обмеження є використання біметалічних шарів срібла/золота [94, 101]. У цьому

випадку можна виконати звичайну хімію тіолу на золоті для приєднання зондів до поверхню датчика.

Як варіант були розроблені пластинчасті конструкції, в яких тонкий шар діелектрика наноситься на поверхню плазмонно-активного металевої тонкої плівки [42, 53, 55-57, 68, 79-83, 88-89]. Ці накладки дозволяють ефективний

захист срібної плівки, що лежить в її основі, і водночас відкриває можливості для

нових схем функціоналізації поверхні, який можна використовувати для прикріплення лігандів до датчика ППР.

На сьогодні, досліджувані шари діелектрика є оксидами [42, 55-57, 68, 79-

83], де прикріплення лігандів до поверхні в основному досягається шляхом силанізації поверхневої гідроксильної групи. Інший підхід полягає в осадженні вуглецю [53] та аморфні кремнієво-вуглецеві сплави [88, 89].

Ці тонкі плівки на основі вуглецю дозволяють ковалентно іммобілізувати досліджувані біомолекули, використовуючи добре розроблені та міцні «реакції» на основі приєднання алкенвмісних молекул до субстрату через зв'язки вуглець-вуглець або Si-C.

1.4.1 Використання ZnO

Досягнення технології вирощування кристалів ZnO дозволяють отримувати наноструктури різних розмірів, форм і властивостей, які відіграють вирішальну роль для ефективно іммобілізації біомолекул. Деякі типи наноструктур ZnO, які використовуються як біосенсорна платформа, показані на рис. 1.8. Переважно 10 типів наноструктур ZnO (нанострижки, нанодропи, наночастинки, квантові точки, тонкі плівки тощо) використовуються в біосенсорах як перетворювачі. Завдяки високому відношенню поверхня/об'єм, здатності до адаптації поверхні, новим властивостям транспорту електронів і багатофункціональності електронної провідності можна успішно іммобілізувати різні типи біомолекул.

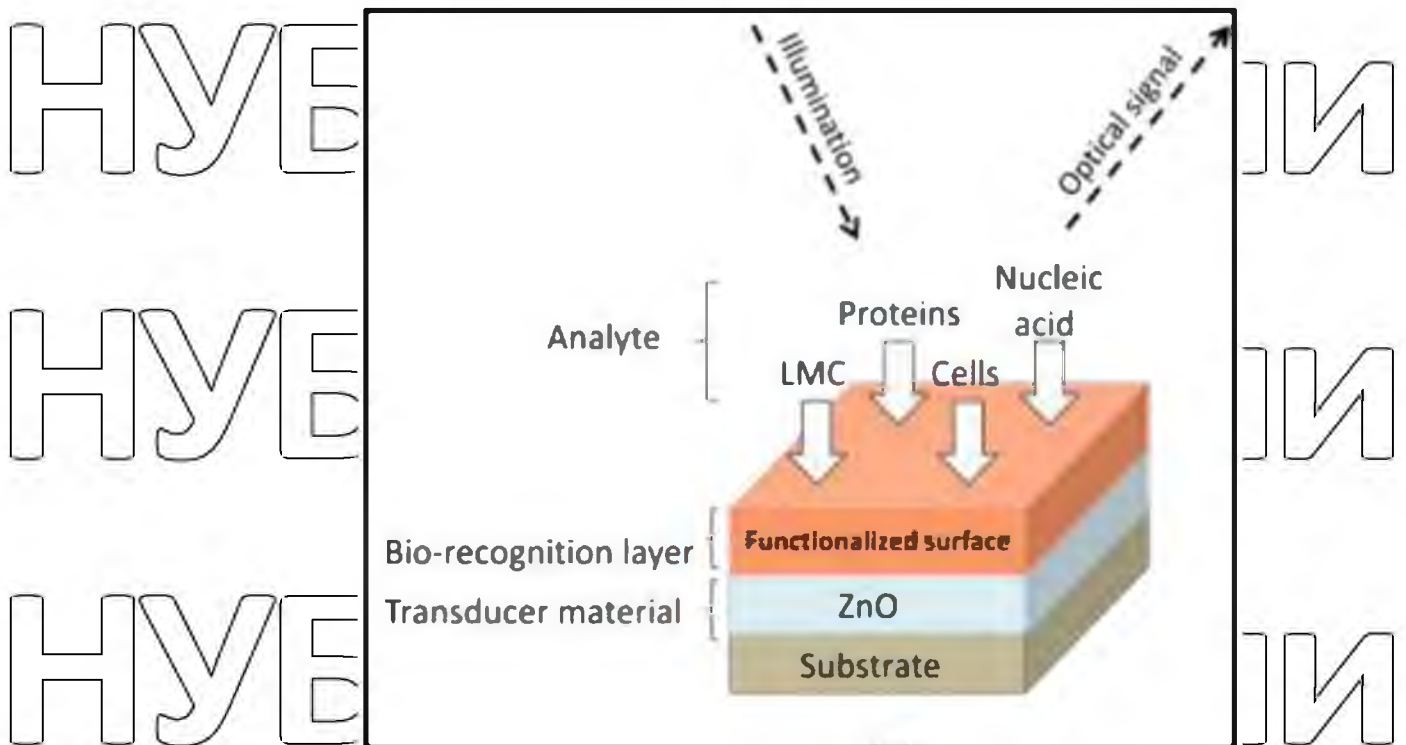


Рис. 1.8 Схеми біосенсора на основі наночасток ZnO [14]

Фотолюмінесценція (ФЛ) з наноматеріалів є придатним і простим методом для характеристики поверхонь зразків, особливо поверхневих дефектів [14]. ФЛ металооксидних наноструктур на сьогоднішній день добре вивчена (хоча і не повністю), а саме встановлено, які саме дефекти відповідають за ті чи інші смуги ФЛ. За зміною смуг люмінесценції в результаті біологічного впливу можна зробити висновок, які саме дефекти діють як адсорбційні центри і працюють на них, покращуючи матеріал зразка. Фотолюмінесценція не є звичайним для використання порівняно з іншими методами, хоча це чудовий спосіб характеристики наноматеріалів і, отже, нанобіоінтерфейсу. Його поєднання з останніми досягненнями в технології вирощування, які дозволяють змінювати оптичні властивості, робить цей метод дуже перспективним для майбутніх малих інтегрованих біосенсорних пристроїв. Відомо два типи оптичних біосенсорів, пов'язаних з вимірюванням ФЛ: використовувані квантові точки флуоресценції як мітки та біосенсори на основі сигналу ФЛ від поверхні зразка. У першому випадку використовуються мітки для біомолекул. Завдяки малим масштабам (1–10 нм) КТ вони зберігають нові властивості, які безпосередньо залежать від їх

розміру, і характеризуються великими спектрами поглинання, вузькими та симетричними смугами випромінювання, а також чудовою фотостабільністю та квантовим виходом (до 90 %). КТ мають великий переріз поглинання та тривалий час життя флуоресценції (410 нс). З усіма цими властивостями КТ швидко стали потенційними новими флуоресцентними зондами для візуалізації біологічних зразків і широко використовуються для цих цілей [14].

Крім того, протягом останніх двох десятиліть пористий кремній (PSi) був запропонований як вискоєфективна біосенсорна платформа завдяки його біосумісності, адаптації поверхні та відтворюваності. Модифіковані частинки

кремнію можна використовувати як біосенсори для детекції білків, антигенів чи молекул нуклеїнових кислот [38]. Оскільки PSi має велику площу поверхні, можлива модифікація частинок великою кількістю сенсорних молекул. Так, були

розроблені та оцінені два різні методи ковалентної біокон'югації антитіл усередині плівок пористого кремнію, та було показано, що проникнення в пори та ефективність зв'язування залежать від змочуваності пористої поверхні.

Отримані плівки використовували для вибіркового захоплення мічених барвником вірусних часток колифагу MS2 з розчину, а концентрація вірусу на рівні 2×10^7 бляшкоутворюючих одиниць на мл (боє/мл) була виявлена

шляхом вимірювання флуоресценції відкритої плівки пористого кремнію [69].

Важливим питанням у використанні біосенсорів на основі PSi є модифікація поверхні для підвищення чутливості пристрою. У роботі [71]

продемонстровано ефективне зв'язування часток вірусу Чикунгунья на основі пептидів білка E2 в пористому кремнієвому мікропорожнистому біосенсорі на

функціоналізованому пептидом біосенсорі при кімнатній температурі та після впливу високої температури. Вимірювання контактного кута, інфрачервоні спектри ослабленого повного відбиття - перетворення Фур'є, і вимірювання

оптичного відбиття підтверджують функціональність пептидів і вибіркоче захоплення білка E2, що дозволяє рекомендувати функціоналізацію поверхні ним для діагностики вірусних часток.

Пористий кремній був випадково відкритий подружжям Улрив, командою чоловіка та дружини, які працювали в Bell Laboratories у середині 1950-х років. Вони намагалися розробити електрохімічний метод обробки кремнієвих пластин для використання в мікроелектронних схемах. За відповідних електрохімічних умов кремнієва пластина не розчинилася рівномірно, як очікувалося, натомість з'явилися дрібні пори, які поширювалися головним у пластині. Оскільки це не забезпечило бажаного гладкого полірування, про цікавий результат було повідомлено в технічній записці Bell labs [38], а потім про матеріал більш-менш забули [71]. У 1970-х і 1980-х роках виник значний інтерес, тому що велика площа поверхні пористого кремнію виявилася корисною як модель поверхні кристалічного кремнію в спектроскопічних дослідженнях, як прекурсор для створення товстих оксидних шарів на кремнії, а також як шар діелектрика в ємнісних хімічних датчиках [18].

PSi привернув значну увагу як новий наноструктурований фотонний матеріал на початку 1990-х років після відкриття Sanham, який повідомив про сильну та яскраву червоно-помаранчеву фотолюмінесценцію PSi при кімнатній температурі [69]. Ефективне багатоколірне випромінювання від PSi пояснюється наявністю квантових дотів нанометрового масштабу, як передбачено моделлю квантового обмеження, яка підтвердила, що оптична фізика наноматеріалу відрізняється від об'ємного кристалічного кремнію [71]. У 1997 році дослідницька група Sailor повідомила про виявлення олігонуклеотидної мішені без міток за допомогою інтерферометра Фабрі-Перо PSi (Lin et al., 1997). Відтоді наноструктури PSi привабили дослідників у різноманітних галузях застосування біосенсору. PSi — це клас фотонних наноструктурованих матеріалів, які містять заповнені повітрям пори діаметром, як правило, <150 нм. PSi демонструє ключові характеристики для зондування та біодатчиків, включаючи швидке, просте та економічно ефективне виготовлення, регульований розмір і товщину пор, високу внутрішню площу поверхні (до $800 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$), універсальну хімію поверхні, виявлення біомолекул за допомогою оптичної відбивної здатності та фотолюмінесценція, біосумісність і здатність до біологічного розкладання для

біологічних застосувань, мініатюризація та інтеграція в мікроелектромеханічні системи (MEMS) і портативні пристрої.

Функціонування наноструктурами оксидів металів не тільки покращує стабільність біосенсорного пристрою, але також підвищує селективність, чутливість і знижує межі виявлення бажаного біосенсора [18]. Нанотехнології мають потенціал для розробки інтегрованих електрохімічних датчиків з високою пропускнуою здатністю шляхом створення надзвичайно чутливих датчиків, таких як нанострижні, які мають потенціал досягнення чутливості до однієї молекули [14].

Для створення успішно працюючого біоаналітичного пристрою на основі оксиду цинку необхідно найбільш ефективно використовувати його поверхню для розташування на ній біоактивних молекул (рецепторів). Першим кроком для досягнення цієї мети є синтез упорядкованої структури ZnO з високорозвиненою поверхнею, як правило, наноструктурованого оксиду цинку. Не менш важливим це є модифікація поверхні оксиду цинку і власне іммобілізація біоматриці, яка здійснюється різними методами.

Для наноструктур оксиду цинку, як і для інших субстратів, існує 2 основні методики іммобілізації, порівняльна характеристика яких наведена у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1
Основні методи іммобілізації

Спосіб іммобілізації	Переваги	Недоліки
Фізична абсорбція	Низька собівартість, швидкість іммобілізації, мінімальна зміна рецептора через відсутності хімічної взаємодії	Легке вимивання при зміні умов
Ковалентне	Стабільне зв'язування	Побічні ефекти, викликані

зв'язування	висока навантаженість, можливість орієнтованого приєднання	лінкером, невисока швидкість іммобілізації, складність відновлення рецептора
-------------	--	---

Фізична адсорбція. Фізична адсорбція забезпечується ван-дер-ваальсовими взаємодіями (на відміну від хімічної адсорбції, при якій утворюються ковалентні зв'язки).

Для оксиду цинку іммобілізація ферменту за допомогою фізичної адсорбції має ключове значення через високе значення ізоелектричної точки (IEP) ZnO - 9.5. Це дозволяє ZnO зв'язувати білки з низькими IEP, наприклад, глюкозооксидазу [48], холестериноксидазу [92], пероксидазу [51], тирозиназу [24] тощо.

Зазвичай прикріплення рецептора методом фізичної адсорбції здійснюється вимочуванням оксиду цинку в розчині відповідного ферменту.

Фізична адсорбція є найбільш простим, зручним і недорогим методом іммобілізації і менше змінює структуру ферменту в порівнянні з методом ковалентного зв'язування, проте відсутність міцного зв'язку між рецептором та оксидом цинку може призводити до вимивання біологічно активної речовини та, отже, до зменшення відгуку біосенсора. У випадку оксиду цинку фізична адсорбція зазвичай використовується для приєднання ферментів, які, на відміну від антитіл, не вимагають додаткової стадії відновлення рецептора.

Ковалентне зв'язування. Серед усіх методів іммобілізації ковалентне зв'язування – найбільш розроблений спосіб. В разі ковалентного зв'язування біомолекула зазвичай прикріплюється за допомогою біфункціональних хімічних сполук – «лінкерів» (як місткові групи) – до оксиду цинку шляхом хімічної взаємодії вхідних до їх складу функціональних груп.

Слід зазначити, що ковалентне пришивання рецепторів, на відміну від методу фізичної адсорбції, сприяє орієнтованому приєднанню біоматриці, що безпосередньо впливає на активність біосенсора. Наприклад, орієнтоване

розташування антигін дає перевагу порівняно з хаотичним розподілом за рахунок доступності Fас-хвостів (fragment anti gen binding, антиген-зв'язуючих фрагментів) [90]. У той же час відновлення біосенсора для здійснення багаторазового використання є окремим завданням і може включати в себе

витримування в органічних розчинниках [53], кислих або лужних буферних розчинів, розчинах солей, детергентів, додавання потенціалу до електродів [39, 72, 89] чи вплив ультразвуком [60].

Приєднання лінкерів до ZnO найчастіше має на увазі реакцію між OH-групами, практично завжди наявними на поверхні ZnO в результаті взаємодії з вологою повітря та відповідними функціональними групами лінкеру.

Так, наприклад, OH-група може реагувати з метокси- або етокси- групами кремній-органічного лінкеру з виділенням відповідного спирту. Для приєднання ферментів або здійснення наступної стадії модифікації часто необхідно отримати

аміномодифікований ZnO, що робить кремній-органічні сполуки, що містять одночасно аміно- та метокси- (етокси-) групи, критично важливими модифікаторами ZnO.

Прикладами таких молекул можуть служити 3-амінопропілтриетоксисілан (APTES), 3-амінопропілтриметоксисілан (APTMS), (3-гліцидил)пропілтриметоксисілан (GPS).

Імобілізація антигін, як і інших білків, на поверхні модифікованого ZnO зазвичай здійснюється через аміногрупу антигінла. Реакції з аміногрупою типові

для альдегідної групи, оксидпропілового кільця та інших функціональних груп. Відповідно, при створенні імуносенсорів кінцевою стадією модифікації, що передуює імобілізації антигінла, є модифікація мутаральдегідом [45], GPS [20] або подібними сполуками, що містять зазначені функціональні групи.

Підбір лінкерів для модифікації пов'язаний з наступною пришиванням біорецепторів, та умови модифікації диктуються тим конкретним типом біоматриці, який передбачається використовувати. У ряді випадків здійснення ковалентного зв'язку між поверхнею оксиду цинку і рецептором за допомогою одноразової модифікації неможливе.

Якщо стадій модифікації декілька, отже, і використовуваних лінкерів декілька, то виникає питання зв'язування між лінкерами. Взаємодія між біфункціональними лінкерами може бути найрізноманітнішим – вже згадана реакція між NH₂- та CHO групами, взаємодія між тіольною та імідною групами та інші.

Так, у роботі [99] для отримання аміномодифікованого ZnO використовували APTES і тетраетоксисилан (TEOS). Для утворення ковалентного зв'язку між цими сполуками і оксидом цинку потрібно лише витримання ZnO в їх водно-спиртовому розчині. Етоксигрупи кремній-органічної сполуки забезпечують зв'язок з OH-групами на поверхні ZnO за рахунок

дегідратації, а аміно група використовується для прикріплення тирозинази – важливого ферменту для визначення фенольних сполук.

У випадку (3-гліцидопропіл) диметилетоксисилану [28] спочатку утворюється олігомер кремній-органічного з'єднання, який і утворює ковалентні зв'язки з OH-групами ZnO. Використовуючи розчин GPS в толуолі або розчині (3-меркап топропіл)триметоксисилану (MTS) та вторинного біфункціонального лінкеру ефіру N-гідроксисукциніміду і γ -малеїмідомасяльної кислоти (GMBS), можна здійснити зв'язок одного атома кремнію з трьома гідроксигрупами ZnO

[20]. Важливою особливістю вибраних кремнійорганічних речовин є присутність оксидпропільного кільця у GPS та тіольної групи у MTS – типових функціональних груп для прикріплення рецепторів.

Варто зауважити, що описані методики іммобілізації мають досить універсальний характер і не відносяться виключно до оксиду цинку.

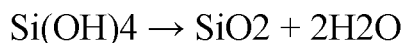
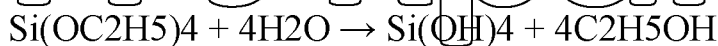
У деяких випадках відбувається приєднання відповідного лінкеру в процесі синтезу частинок ZnO. Для таких цілей використовується мір каптоундеканова кислота (MUA), яка не тільки є темплатою для синтезу частинок ZnO, але і утворює самоорганізовані моношари на їх поверхні, здатні

при з'єднувати глюкозооксидазу та інші ферменти через вторинні лінки: N-гідроксисукцинімід (NHS) і 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодімід (EDC) [99].

1.4.2 Використання SiO₂ у комплексі з Au

Кремнезем (SiO₂) є популярним матеріалом для формування частинок ядра оболонки через його надзвичайну стійкість проти коагуляції. Його некоагуляційна природа пояснюється дуже низьким вмістом значення постійної Хамкера, яка визначає ван-дер-вальсові сили притягання між частинками і середовищем [70]. Він також хімічно інертний, оптично прозорий і не впливає на окисно-відновні реакції на поверхні ядра [84,96].

Для різних цілей бажано, щоб частинки залишалися добре диспергованими в середовищі, що можна досягти шляхом їх відповідного покриття для утворення інкапсулюючої оболонки. Варто зазначити, що за допомогою процедури може відбуватися синтез наночастинок SiO₂ розроблений Stober et al. [93] Цей метод передбачає гідроліз і послідовна конденсація TEOS (Si(OC₂H₅O)₄) в спиртовому середовищі наступним чином:



Адсорбція колоїдів золота на кремнеземних ядрах відбувається виконано шляхом функціоналізації їх поверхні за допомогою APTMS аміногрупи з позитивними дзета-потенціалами. З'єднання в основному досягається за рахунок електростатичного притягання між наночастинками амінованого кремнезему та колоїди золота, що мають негативний заряд. TEM використовується для вивчення утворення золота навколо кремнеземного ядра.

Маленькі колоїди частинок золота приєднані до APTMS—функціоналізоване ядро наночастинок кремнезему, які потім використовуються для шаблону росту золота над шаром.

Загалом, змінюючи відносне співвідношення TEOS до розчинника, можна

синтезувати частинки різного розміру.

Вплив швидкості центрифуги та кількості ТЕОС впливає на діаметр кремнеземного ядра. Діаметр серцевини збільшується зі збільшенням концентрації ТЕОС і зменшенням швидкості центрифуги який ефективно контролює стан агломерації («нагромадження шарів»).

Різноманітність параметрів може впливати на самозбірку наночастинок золота в прикріплені кластери до поверхонь функціоналізованих наночастинок кремнезему.

1.5 Методи діагностики вірусних захворювань у рослин

Відомі хвороби рослин, їхня симптоматика різноманітна, тому не можна спиратися лише на одні зовнішні ознаки, оскільки для багатьох хвороб рослин, спричинених вірусами, симптоматика схожа.

Одним з найпоширеніших зовнішніх симптомів вірусних хвороб є світло та темно-зелені плями, що у купі утворюють різні види мозаїк. Мозаїки бувають [3]:

- крапчаста (хлоротичні плями у вигляді крапок);
- плямиста (хлоротичні плями у вигляді плям);
- зональна (хлоротичні плями у вигляді широких зон).

Часто, мозаїка супроводжується й іншими симптомами як: незвичайний блиск або глянець на листках, крихкість, деформація листкової пластинки тощо.

У діагностиці вірусних захворювань можна використовувати різні види дослідження. Яке саме буде застосовуватись визначається рядом супроводжуючих факторів, таких як вид зразку, можливості проведення певного виду дослідження тощо.

У фітовірусології виділяють такі методи дослідження [3,8].

Макроскопічний метод. Це метод є найпримітивнішою діагностикою.

оскільки при його застосуванні використовуються лише ті ознаки, що видно неозброєним оком, а багато хвороб, спричинених вірусами, має схожу симптоматику, і до цього, можна сплутати природу хвороби (наприклад, переплутати бактеріальну, грибову чи вірусну природу захворювання).

Тому, в основному, цей метод застосовують для попередньої діагностики (наприклад, у полі, під час виконання так званого «скаутингу»), з подальшими детальнішими дослідженнями.

Електронна мікроскопія. Цей метод дорогий, але водночас, є високоефективним методом виявлення вірусних хвороб. ЕМ дає змогу не лише заперечити чи підтвердити наявність збудника, але також він дає змогу зрозуміти вид вірусу, що викликав те чи інше захворювання.

Головна проблема – підготовка зразків, оскільки метод ультратонких зрізів, який в основному використовують, є довготривалим та високовартісним.

Але як альтернатива, існує метод «занурення», з використанням мідних сіток з ґратками, на які попередньо наноситься плівка-«підкладка», що відіграє роль предметного скельця, де і осідають частинки вірусів. Основним матеріалом є нітроцелюлоза. При її нанесенні необхідно зробити так, щоб плівка не була товщою за 200 А. Також, замість нітроцелюлози використовують формварові

плівки.
Метод штучної інокуляції. Цей метод використовується у випадку необхідності визначення дійсного збудника хвороби, вивчення циклу розвитку, визначення шкодочинності тощо.

Для штучного зараження в основному використовують листя, але можна використовувати як і інші органи рослини, так і саму рослину в цілому.

Серодіагностичний метод. Даний метод базується на утворенні антитіл у відповідь на дію патогенів.

Лабораторній тварині (в основному – кролю) вводять ін'єкцію патогенів внутрішньо, після чого, у відповідь на збудник, в сироватці крові накопичуються антитіла.

Це дає змогу виявити вірусні захворювання як і у рослин, з явними

ознаками ураження, так у рослин без видимих ознак захворювання. Це полегшує завдання відбору здорового посадкового матеріалу.

Метод рослин-індикаторів. При штучному зараженні рослин певним штамом вірусу, та за контрольованих умов середовища таких як: світло, температура, вологість у рослин-індикаторів протягом 2-4 днів після зараження проявляються характерні риси для даного вірусу [3,8].

Імуноферментний аналіз. Це один різновид серологічного методу. Це метод кількісного визначення антигенів та антитіл. При дослідженні використовуються антитіла, мічені спеціальним ензимом, і в результаті ферментативної реакції, один з компонентів реакції змінює свій колір. В якості ферменту використовують пероксидазу хрину, β -галактозидазу чи лужну фосфатазу.

Інтенсивність забарвлення залежить від кількості зв'язаних між собою молекул антигену та антитіла. Зміна забарвлення визначається через оптичну щільність розчину на спектрофотометрі.

Полімеразна ланцюгова реакція. Цей метод, завдяки ампліфікації, дозволяє у десятки разів збільшити кількість ділянок досліджуваних ДНК. Головною особливістю цієї реакції є те, що ампліфікуються лише досліджувана ділянка ДНК (чи її фрагмент), і лише за умови наявності цієї ділянки при виконанні дослідження.

Використання біочіпів. Це міні аналітичні системи, поверхню яких попередньо готують для дослідження. І далі, після виконання дослідження, на основі певних специфічних взаємодій, можна робити висновки про наявність чи відсутність шуканого вірусу у зразку.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

НУБІП України

2.1 Методика проведення ППР

Як і у будь-якому дослідженні, етап підготовки є однаково важливим, як і саме дослідження. Підготовчий етап складається з декількох стадій.

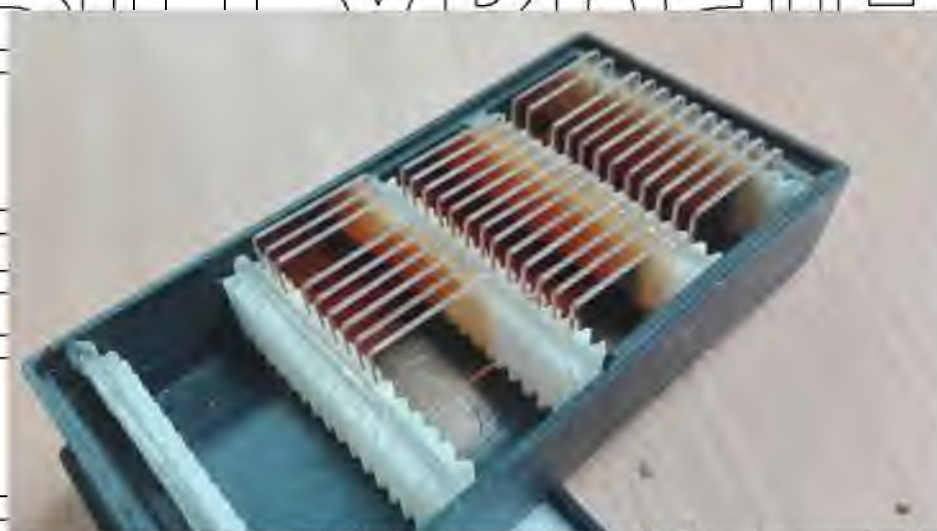
НУБІП України

2.1.1 Попередня підготовка трансдьюсера. Модифікація чутливої поверхні

Як трансдьюсер (біочіп) (рис. 2.1) використовували пластинку зі скла розмірами 20x20 мм та товщиною 1мм. На одну із поверхонь пластинки було напильно шар золота, товщиною близько 50 нм.

Ця пластинка і є, власне, перетворювачем реакції, тобто вона є трансдьюсером – перетворювачем біологічної взаємодії у електричний сигнал для подальшої реєстрації вимірювальним приладом.

НУБІП України



НУБІП України

Рис 2.1 Біочіпи з напильненням з наночасток золота

НУБІП України

Аналітична система створювалася за такою схемою. У дослідну комірку вносили 0,1 М ФСБ (фосфатно-сольовий буфер) у кількості 1 мл. Після нанесення ФСБ, на поверхню біочіпа наносили розчин білку А, який стримують зі штаму бактерій *Staphylococcus aureus* (Sigma) у концентрації 1 мкг/мл.

НУБІП України

Інкубували протягом 20 хвилин. Далі, ретельно промивали ФСБ, і реєстрували величину РК.

Після реєстрації величини РК, у комірку вносили розчин антитіла концентрацією 100 мкг/мл в об'ємі 20 мкл. Далі, на поверхню наносили розчин БСА в об'ємі 20 мл, концентрацією 1 мкг/мл. Інкубували протягом 30 хвилин за кімнатної температури, після цього ретельно промивали ФСБ та реєстрували величину РК.

Використання БСА зумовлено тим, що на поверхні трансдьюсера, могли залишитись пропуски після іммобілізації. БСА їх заповнює

2.1.2 Підготовка біочіпу до ППР

В першу чергу, поверхню попередньо модифікованого біочіпу ППР промивали дистильованою водою та сушили на повітрі. Після висушування, чіп занурювали у так званий розчин «піранії» (це суміш концентрованої, 96% сульфатної кислоти та концентрованого, 30% пероксиду водню у співвідношенні 3:1), що готується безпосередньо перед самим промиванням. Далі, багаторазово промивали дистильованою водою для видалення залишків «піранії».

Підготований таким чином чіп встановлювався на призму, що знаходиться в детектуючій частині приладу. При установці пластинки, використовували іммерсійну олію для зниження показнику заломлення світла на скляній поверхні. Трансдьюсер встановлювали золотою поверхнею вниз, оскільки вона слугує дном для проточної вимірювальної поверхні. У ролі стінок – кільце з силіконової гуми. Кришка виготовлена з оргскла, та містила в собі отвори для з'єднання з вхідною та вихідною трубками. Через них проходять аналізовані зразки та буферний розчин.

Для визначення рослинних антигенів, на поверхні біочіпа для ППР іммобілізували антитіла, що, в подальшому, реагували з клітинними антигенами у дослідних зразках. Угаслідок реакції, реєстрували зсув величини РК. Зміна величини РК залежить від кількості комплексів «антиген-антитіло», що

утворилися на поверхні перетворювача.

За останніми даними, іммобілізація на чисту, непідготовану золоту поверхню перетворювача, може бути недостатньо ефективною, так як антитіла можуть хаотично зв'язуватися з поверхнею перетворювача і, через що, сайти зв'язування блокуються. Тому, зазвичай рекомендовано попередньо модифікувати поверхню біочіпу, для уникнення такої проблеми.

Як правило, після такої підготовки, активність антитіл збільшується до 70%.

2.1.3 Підготовка чутливої поверхні перед аналізом: модифікація пластинки наночастинками ZnO.

Як зазначалося вище, перед безпосереднім початком дослідження необхідно провести модифікацію чутливої поверхні.

На початку, на поверхню пластинки з розчином оксиду цинку наносили 5 мл розчину білку А (цей білок отримують з бактерій *Staphylococcus aureus*) концентрацією 20 мкг/мл. Інкубацію проводили у чашці Петрі. На дно клали фільтруваний папір, попередньо змочений дистильованою водою, після – аномієву підкладку, і вже поверх неї саму пластинку. Після цього, чашку Петрі ставили у холодильник за температурі $+4^{\circ}\text{C}$ та інкубували протягом 40 хвилин.

Після інкубування пластинка промивалася 0,85% розчином NaCl.

Другий етап підготовки – це внесення 10 мкл глутарового альдегіду, та його подальша інкубація протягом 20 хвилин.

Після інкубування пластинка промивалася 0,85% розчином NaCl.

Далі, на пластинку наносили розчин специфічних антитіл. Інкубували протягом 40 хвилин. Далі вона промивалася 0,85% розчином NaCl.

Наступним етапом було нанесення 5 мл розчину БСА концентрацією 10 мкг/мл. Після, інкубували протягом 20 хвилин. Далі пластинка промивалася

0,85% розчином NaCl

2.1.4 Процедура аналізу з використанням ППР біосенсора «Плазмонтест»

Спочатку проводили підготовку робочої поверхні біосенсора. Для цього, золоту поверхню трансдюсера покривали плівкою з поліаліламіногідрохлориду (ПААГ) в концентрації 1 мг/мл.

Далі, на цій поверхні проводили іммобілізацію білку А, і після нього адсорбували специфічні антитіла до шуканих вірусів.

Це називається «прямим методом» діагностики.

Далі за допомогою «Плазмонтесту» вимірювали зміну РК (рис.2.2).

Статистичну обробку отриманих експериментальних даних проводили в програмі Microsoft Excel.



Рис. 2.2 Система реєстрації: прилад «Плазмонтест» і комп'ютерна програма для обробки результатів (розробка Інституту кібернетки ім. В.М. Глушкова НАН України)

2.3 Методика проведення імуноферментного аналізу

Одним із методів для визначення вірусних захворювань рослин є ІФА. При виконанні даного метода, відсутність чи наявність патогену доводять завдяки методиці «сандвічу», використовуючи два поліклональні антитіла.

Дослідження проводилися комерційними тест-системами (LOEWE, Німеччина).

Спочатку готували буферні розчинів, що надалі будемо використовувати у дослідженні. Для виконання необхідно приготувати чотири види буферів та розчин аналізованої речовини. Розчин досліджуваного зразку необхідно готувати безпосередньо перед використанням, так як при довготривалому зберіганні можливі похибки при подальшому проведенні дослідження.

Для приготування адсорбційного буферу брали 1,59 г Na_2CO_3 та 2,93 г NaHCO_3 . Соли, що попередньо зважили на аналітичних терезах на годинниковому скельці, кількісно перенесли у хімічну колбу для подальшого розчинення солей у невеликій кількості дистильованої води. Після розчинення солей, доводили об'єм води до 1 л. Доводили рН до 9,6; контроль кислотності проводили за використання рН-метра.

Для приготування буферу для промивання брали 8 г NaCl , 2,9 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г KH_2PO_4 , 0,2 г KCl та 0,5 мл Твіну 20 (Полісорбат 20). Соли, що попередньо зважили на аналітичних терезах на годинниковому скельці, кількісно перенесли у хімічну колбу для подальшого розчинення солей у невеликій кількості дистильованої води. Після розчинення солей, доводили об'єм води до 1 л. Доводили рН до 7,2-7,4; контроль кислотності проводили за використання рН-метра.

Для приготування кон'югатного буферу (буферу для зразків; використовується для приготування зразків та розчинення кон'югату) брали реактиви для приготування буферу для промивання (8 г NaCl , 2,9 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 г KH_2PO_4 , 0,2 г KCl та 0,5 мл Твіну 20 (Полісорбат 20)) і до

них додали 20 г полівініл пірролідону (K10-K40), 2 г бичачого сироваткового альбуміну (BSA) та 0,1 г NaN_3 . Соли, що попередньо зважили на аналітичних терезах на годинниковому скельці, кількісно перенесли у хімічну колбу для подальшого розчинення солей у невеликій кількості дистильованої води. Після розчинення солей, доводили об'єм води до 1 л. Доводили рН до 7,4; контроль кислотності проводили за використання рН-метра.

Для приготування субстратного буферу брали 97 мл диетаноламіну та 0,2 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Сіль, що попередньо зважили на аналітичних терезах на годинниковому скельці, кількісно перенесли у хімічну колбу для подальшого розчинення солей у невеликій кількості дистильованої води. Після розчинення солей, доводили об'єм води до 1 л. Доводили рН до 9,8; контроль кислотності проводили за використання рН-метра.

Розчин субстрату – це 1 мл/мг 4-нітрофенілфосфатдинатрієва сіль у субстратному буфері.

Окрім досліджуваних зразків, на мікроплашкеті для ІФА наносили також позитивний та негативний контролю.

На першій стадії, нанесення покриття антитіл, проводили іммобілізацію специфічних антитіл імуноглобулінів IgG на внутрішній поверхні лунок мікроплашкети.

Для цього IgG, що попередньо розвели у адсорбційному буфері у пропорції 1:200 відповідно, внесли у мікроплашкет по 0,2 мл на одну лунку. Інкубування проводили протягом 4 годин за температури 37°C у термостаті.

Після інкубації, провели промивання буферним розчином 4 рази.

На другій стадії, стадії утворення комплексу «антиген-антитіло», додали підготовані досліджувані зразки. Досліджувані зразки розчинили у буфері для зразків у пропорції 1:20. Зразки контролю (негативний та позитивний) розчинили у 2,1 мл буферу для зразків.

У мікроплашкет додаємо по 0,2 мл на одну лунку. Залишили для

інкубування на ніч при температурі 4°C у холодильнику.

Після інкубації, провели промивання буферним розчином 4 рази.

На третій стадії, стадії утворення комплексу «антитіло-ЛФ-кон'югат», додали ЛФ-кон'югат, що був попередньо розчинений з оригінального об'єму у кон'югатному буфері у пропорції 1:200. Далі кон'югат внесли у мікропланшет по 0,2 мл на одну лунку. Інкубування проводили протягом 4 годин за температури 37°C у термостаті.

Після інкубації, провели промивання буферним розчином 4 рази.

На четвертій стадії, стадії самої ферментативної реакції, додали розчин субстрату по 0,2 мл на одну лунку. Інкубуємо протягом 1-2 годин за кімнатної температури.

2.3 Методика проведення електронної мікроскопії. Метод занурення

Для проведення електронної мікроскопії використовували метод занурення. Він використовується для швидкого виявлення рослинних вірусів у попередньо неочищених (у досліджуваному зразку можуть зустрічатися фрагменти рослинної клітини; була пропущена стадія центрифугування та відбору верхньої фракції для подальшого використання) та / або інфікованих рослинних зразках.

Цей метод використовується для швидкого виявлення вірусу у заражених рослинах.

За виконанні цієї техніки, крапля соку, що отримується у результаті розчавлення свіжого відрізу листка (чи іншої частини рослини), зараженого вірусом, забарвлюється та досліджується за допомогою електронного мікроскопу.

Для роботи необхідно підготувати необхідний інструмент, рослинні зразки, мідні сітки та реактиви.

Для приготування фосфатного буферу 0,07 М (рН 6,5) необхідно: приготувати 0,07 М динатрію фосфату (Na_2HPO_4) шляхом розчинення 11,41 г

Na_2HPO_4 , і, в подальшому, доводили об'єм до 1 л дистильованою водою.

Для подальшого контрастування в ЕМ можуть використовувати наступні три розчини.

Фосфовольфрамова кислота (ФВК): фосфовольфрамат натрію застосовують у 2% водному розчині. Ця сполука стабільна на світлі за кімнатної температури. (іноді він буферизується 0,1 М амонієвим ацетатом або карбонатним буфером).

Ураніацетат (УА): використовують у 2% розчині. Необхідно зазначити, що ураніацетат необхідно зберігати у темній скляній пляшці, оскільки при взаємодії з прямим сонячним світлом ця речовина випадає в осад. Також необхідно слідкувати за рН (має бути близько 4,2), оскільки це дає кращу роздільну здатність за фосфовольфрамат

Молібдат амонію (МА): використовують 2% розчин. Також необхідно довести рН до діапазону 6,0 – 8,0 амоніаком. Зберігають за кімнатної температури.

Препарат для микроскопії (рис. 2.3) готували наступним чином.



Рис. 2.3 Процес підготовки препарату для ЕМ

Лезом подріснили невеликий шматок зараженого вірусом листя на предметному скельці (попередньо, предметне скельце знежирити за допомогою

етидового спирту та вати) в кількох краплях дистильованої води.

Далі переносили одну краплю суспензії на чистий шматок парафільму. Після цього, за допомогою пінцета з вузьким кінцем, розмістили мідну сітку з покритою стороною догори дном на краплю. Витримали 2 хвилини.

Після цього вийняли сітку та протерли надлишок рідини фільтрувальним папером.

На парафільм нанесли краплю барвника (у нашому випадку – ФВК), вже у ній на 15 секунд розмістили сітку. Вийняли сітку за допомогою пінцету, прибрали зайвий барвник фільтрувальним папером і дали сітці висохнути.

Далі відбувався сам процес електронної мікроскопії. Після виявлення частинок вірусу, фотографували отриманий результат та записували коефіцієнт збільшення.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

3.1. Дослідження зв'язування антигенів Y-вірусу з лігандами на ППР-біосенсори

НУБІП України

Біосенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) найчастіше використовуються як чутливі та кількісні інструменти для моніторингу подій зв'язування та вимірювання динамічних взаємодій між біомолекулами в біохімічній та біомедичній галузях науки. Ці біосенсори виявляють зміни діелектричної проникності в області поверхні золотого нано-сенсора, які викликані утворенням або дисоціацією зв'язування аналітів з приєднаними на поверхнях лігандами, що викликає зміщення резонансного кута

НУБІП України

[33]. Вітчизняними авторами розроблено та випробовано серію пристроїв під загальною назвою "Плазмонтест", які використовуються в рефрактометричних та біохімічних дослідженнях [9]. За допомогою приладу "Плазмонтест" були

НУБІП України

відпрацьовані методи виявлення деяких мікотоксинів [76], прилад був використаний для розробки методів виявлення *Salmonella Typhimurium* [75], для аналізу вмісту в крові сперміну та спермідинових поліамінів як потенційних маркерів раку [68], для біосенсорної діагностики ретровірусного лейкозу великої

НУБІП України

рогатої худоби та оцінки походження молочних продуктів від здорових чи хворих на лейкоз тварин [74]. Таке широке коло вирішення прикладних і фундаментальних задач за допомогою ППР-біосенсора дозволяє розглядати можливість його застосування у виявленні і діагностуванні вірусів рослин, що і було метою нашої роботи.

НУБІП України

Об'єктом дослідження був ізолят Y-вірусу картоплі – *Potato virus Y*, рід *Potyvirus*, (PVY). Дослідження ізоляту проводили методами рослин-індикаторів, електронної мікроскопії, імуноферментного аналізу та подімеразної ланцюгової

реакції із зворотною транскриптазою, що дозволило ідентифікувати вірус із високою точністю. На рослинах тютюну сорту Самсун, які використовували як індикаторні, інокуляція ізольованим вірусом призвела до системної інфекції із проявом симптомів мозаїки та некротизації (рис.3.1.).



Рис.3.1. Симптоми інфікування ізольованим PVY на рослині-індикаторі тютюні,

сорт Самсун (фото власне)

Електронномікроскопічні дослідження виявили в соку інфікованих рослин ниткоподібні частки, довжиною 670-710 нм, що є характерним для PVY (рис.3.2).

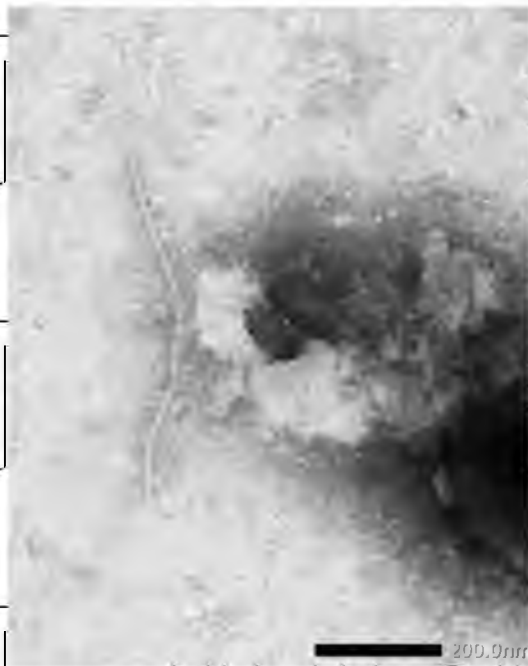


Рис. 3.2. Електронограма ізоляту PVY із рослин тютюну сорту Самсун, нитчасті частинки 670-710 нм (бар = 200 нм) (фото власне)

Біосенсорний підхід визначення вірусів, призначений для вивчення взаємодії між антитілами до вірусу та частками PVY, в ідеалі повинен дозволити захоплення різних ізолятів PVY антитілами, іммобілізованими на поверхні сенсорного чіпа. Для цього в якості захоплюючої молекули – ліганду, ми використовували універсальні поліклональні антитіла – анти-PVY pAb (LOEWE, Німеччина), здатні зв'язувати більшість описаних штамів PVY. Зв'язування антитіл і цільової молекули відбувається за рахунок формування імунного комплексу, який в реакції імуноферментного аналізу виявляють з допомогою ферментної мітки. Зазначимо, що ПІР-біосенсор є безмітковим пристроєм, що дозволяє реєструвати зв'язування ліганду і аналіту безпосередньо і в реальному часі. Цей метод дозволяє провести тестування протягом 20-30 хв, на противагу методу ІФА, який для тестування рослинних вірусів вимагає процедури тривалістю 2 доби.

Зразок тканин із інфікованих рослин суспендували в буфері для зразків за пронином LOEWE, центрифугували для видалення дебрису при 3000 об/хв.

Надосад використовували для проведення імуноферментного аналізу та для біосенсорного тестування. Таким чином, зразок містив інтактні частки PVY, капсидні білки яких були цільовими молекулами в біосенсорному дослідженні.

Антитіла анти-PVY pAb іммобілізували на поверхні трансд'юсера ППР-біосенсора у пристрої «Плазмонтест». Після інкубації, коли антитіла повинні зв'язатися із поверхнею трансд'юсера ППР-біосенсора, надлишок незв'язаних антитіл промивали буфером, а в лунку пристрою «Плазмонтест» ввели підготовлений зразок. Після етапу інкубації, коли між антитілами і капсидами вірусних часток виникає зв'язок, та промиванням для видалення незв'язаних вірусних часток, реєстрували відхилення резонансного кута, яке свідчить про утворення імунних комплексів на поверхні трансд'юсера ППР-біосенсора (рис.3.3.).

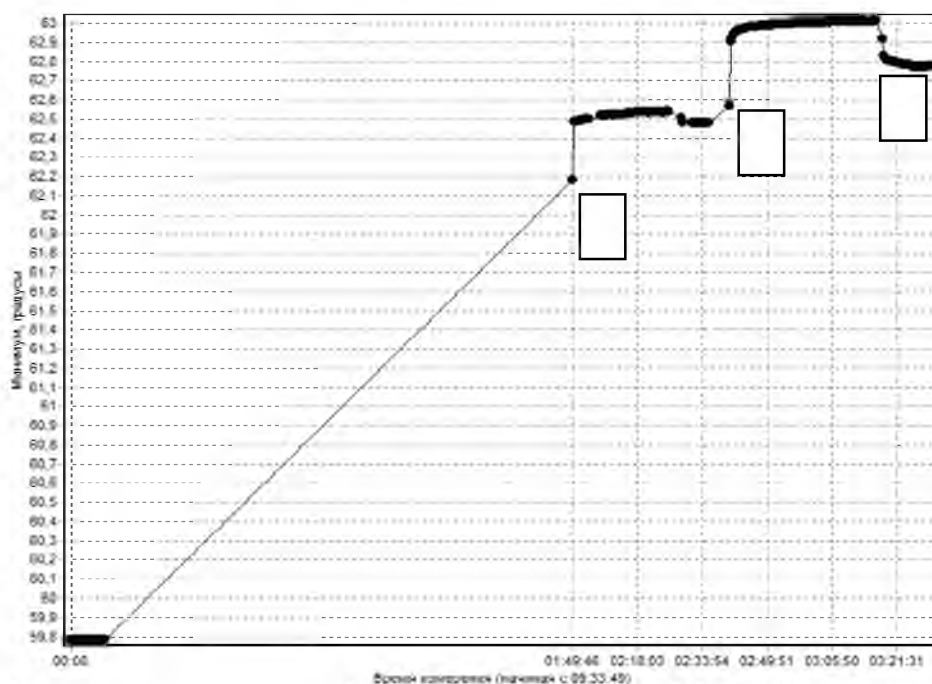


Рис.3.3. Сенсограма зв'язування вірусу PVY з pAb антитілами в якості

ліганду: 1 – іммобілізація антитіл на поверхні трансд'юсера ППР-біосенсора; 2 – введення розчину зразка ізольованого вірусу; 3 – зв'язування часток PVY з лігандом pAb (створено авторами)

При дослідженні іммобілізації антитіл на поверхні біосенсора та зв'язування вірусних часток цим лігандом зміна резонансного кута лежала в межах 0,2-0,3 градуса. Також спостерігали тривале стабільне значення резонансного кута – 62,7-62,8 градуса на етапі утворення імунних комплексів, що свідчить про стабільність зв'язування аналіту – вірусних часток з лігандом – антитілами.

Таким чином, показана можливість іммобілізації на поверхні трансдюсера ППР-біосенсора антитіл в якості лігандів та виявлення часток вірусу за допомогою імунної реакції між антитілами та капсидними білками. Одержані результати можна використовувати для вдосконалення аналізів діагностики на основі антитіл до вірусів рослин. Результати дослідження можуть бути використані для виконання практичних робіт навчальних програм за дисциплінами «Фітовірусологія» та «Біосенсорика».

3.2. Дослідження зміни фотолюмінесценції біосенсора на основі ZnO

Одним із методів візуалізації утворення комплексу «антитіло-антиген», на якій базується виявлення капсидів вірусу у досліджуваному зразку, є детектування зміни сигналу ФЛ деякого наноструктурованого матеріалу для виявлення аналіту та його кількості шляхом характеристики спектрів ФЛ, що відповідає змінам властивостей функціонізованої поверхні. Принцип дії біосенсора ФЛ заснований на зміні сигналу ФЛ до і після іммобілізації біологічних селективних сайтів, у нашому дослідженні - це антитіла до PVX, а також після взаємодії з аналітом – розчином антигену.

Контрольним зразком у дослідженні було вимірювання спектру ФЛ немодифікованих антитілами наночастинок ZnO. Він показав широкий пік з центром в 384 нм. Це свідчить про відсутність специфічності у поверхні біосенсора з чистих наночастинок ZnO, що дає можливість адаптувати його до

ідей дослідників. У той же час діапазон ФЛ зручний для вимірювань, і тому ZnO легко використовувати для створення конкретних комплексів «ліганд-аналіт», які можуть бути використані в біосенсорах.

Антитіла до PVY (Ab-PVY) були додані для створення шару лігандів, яка буде специфічною для капсидних білків PVY, тобто антигена (Ag).

Імобілізація Ab-PVY на поверхні наночастинок ZnO призвела до зміни інтенсивності ФЛ та положення піків ФЛ. Встановлено, що після іммобілізації Ab-PVY спектри ФЛ зсуваються в бік більшої довжини хвилі і стають більш гострими, у порівнянні із контрольним спектром поверхні біосенсора. Це можна

вважати доказом зв'язування ZnO-Ab-PVY.

Основними проблемами використання оптичних властивостей ZnO є функціоналізація поверхні частинками ZnO та способи формування біоселективного шару. Найважливіші моменти процесу іммобілізації, що відповідають за продуктивність біосенсора (адсорбція бімолекул, властивості поверхні, роль дефектів поверхні, нанесення допоміжних шарів тощо), повинні бути ретельно оптимізовані.



A

Оптичні біосенсиори на основі ZnO

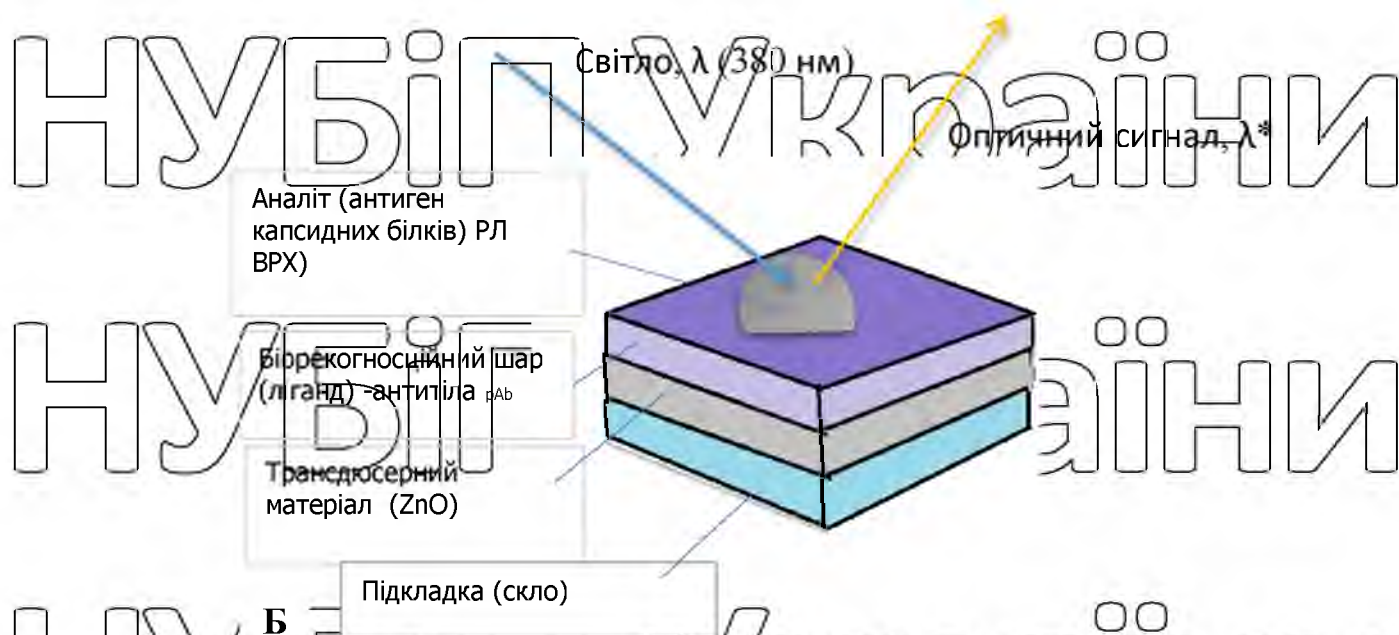


Рис. 3.4. Біосенори на основі оксиду цинку: А - зовнішній вигляд біосенсорів; Б) - принципова схема оптичного біосенсора на основі оксиду цинку, що використовує фотолюмінісценцію

Підготовка поверхні біосенсора. Використовували комерційний порошок наночастинок ZnO (Guangzhou Hongwu Material Technology Co., Ltd.). 20 мкл розчину ZnO наносили на скляні пластини 0,5×0,5 см для утворення комплексу ZnO-скло. Пластини підсушували при кімнатній температурі та відпалювали в муфельній печі при 400 °С протягом 2 год. Поверхня ZnO-скла була додатково модифікована поліалілгідрохлоридом (ПАГХ) (Sigma-Aldrich, США) для збільшення чутливої поверхні. Для цього на скляну пластинку з ZnO наносили розчин ПАГХ та інкубували 20 хвилин при кімнатній температурі. Потім пластину промивали дистильованою водою і сушили при кімнатній температурі.

Після обробки ПАГХ скляні пластини з шаром ZnO покривали розчином протеїну А із *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich, США), фіксували глутаровим альдегідом, промивали після періоду інкубації 0,85% NaCl і покривали в якості захоплюючої молекули – ліганду, універсальними поліклональними антитілами – анти-PVY рAb (LOEWE, Німеччина), які здатні зв'язувати більшість описаних штамів PVY. Поверхню ZnO-біосенсора після інкубування з антитілами анти-

РУУ рAb в подальшому промивали. Після цього планшети поміщали в чашки Петрі, що містили зволожений фільтрувальний папір, і зберігали при 4 °С до експерименту. Вимірювання проводили шляхом перенесення модифікованої скляної пластини (перетворювача) у вимірювальну комірку спектрометра HR2000 (OceanOptics, США). Люмінесценція зразка випромінювалася лазерним променем при 380 нм. Одержані показання були переведені в одиниці фотолюмінесценції, Pl од.

Після вимірювання люмінесценції комплексу ZnO-скло досліджувані зразки поміщали в вимірювальну кювету об'ємом 20 мкл, інкубували протягом 10 хв та вимірювали люмінесценцію в точці, коли показання стабілізувалися. Готували серійне розведення антигену – препарату Y- вірусу картоплі: 1:2, 1:10, 1:100, що дало можливість визначити чутливість ZnO-біосенору до низьких концентрацій антигену. У контрольному варіанті застосовували 0,85% розчин NaCl у розведеннях, що відповідали тим, які використовували в аналізі.

Додавання антигену – розчину вірусмісного матеріалу, виявило зміни у інтенсивності фотолюмінесценції поверхні біосенсора, які свідчили про утворення комплексу «антиген-антитіло» (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1.

Визначення вмісту антигену Y-вірусу картоплі за допомогою імунобіосенсора на основі ZnO, інтенсивність фотолюмінесценції, Pl, од

Варіант	Розведення антигену		
	1:2	1:10	1:100
Контроль	4200 ± 232	3900 ± 240	3700 ± 268
Антиген	6450 ± 191	6300 ± 188	6100 ± 184

Внесення антигену Y-вірусу картоплі підвищувало інтенсивність фотолюмінесценції ZnO-біосенора, в середньому на 2350 Pl, од. У загальному, підвищення інтенсивності фотолюмінесценції спостерігалося в межах від 2250 до

2400 P1, од. Це дає змогу чітко виявити формування комплексу «антиген-антитіло», дозволяє рекомендувати розроблений ZnO-біосенсор для експресного виявлення антигенів Y-вірусу картоплі у рослинному матеріалі.

Розроблений методичний підхід не потребує великої кількості дорогих реагентів, що робить його більш економічним порівняно з відомими аналогами. При цьому підготовка і проведення самого аналізу займає менше часу через відсутність необхідності проведення деяких операцій. Розроблений метод є новим і має багато унікальних особливостей порівняно з методами, що використовуються для діагностування вірусних інфекцій (такими як імуноферментний аналіз, вискоєфективна рідинна хроматографія або інші оптичні біосенсори). Час підготовки зразків займає до 10-15 хвилин, тоді як для біосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу це може зайняти 30-40 хвилин, а традиційні методи аналізу за допомогою імуноферментного аналізу займають кілька годин. Тому розроблений метод виготовлення біосенсора на основі ZnO може бути рекомендований як альтернативний метод в діагностуванні вірусів рослин.

ВИСНОВКИ

НУБІП України

1. Показана можливість іммобілізації на поверхні трансд'юсера ППР-біосенсора антитіл в якості лігандів та виявлення часток вірусу за допомогою імунної реакції між антитілами та капсидними білками. Отримані результати можна використовувати для вдосконалення аналізів діагностики на основі антитіл до вірусів рослин.

НУБІП України

2. Виявлено, що зміни рівнів фотолюмінісценції ZnO-біосенсора відповідають процесам зв'язування лігандів – антитіл до PVY з його поверхнею та цільових молекул – антигенів капсидів PVY – з лігандами, що свідчить про виявлення комплексу «антиген-антитіло».

НУБІП України

3. Показано, що як ППР-біосенсор, так і ZnO-біосенсор ефективно виявляють антигени PVY, що можна використовувати для порівняльних досліджень у розробці діагностикумів для вірусу та експерсних діагностичних процедур виявлення вірусу.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

НУВБІП УКРАЇНИ

1. Белих І.А. та ін. Біологічні та хімічні сенсорні системи : навч. посіб.

/ І. А. Белих, М. Ф. Клещев. – Харків : НТУ «ХП», 2011. – 144 с.

НУВБІП УКРАЇНИ

2. Вакуленко М. О. Фізичний тлумачний словник / М. О. Вакуленко, О. В. Вакуленко. – 2008. – Київ : ВПЦ “Київський університет”. – 772 с.

3. Глинская Е. В. Вирусология. Методические материалы: Учеб.-метод.

пособие для студ. биол. фак. / Е. В. Глинская, Е. С. Тучина, С. В. Петров., 2013.

НУВБІП УКРАЇНИ

4. Глосарій термінів з хімії. Укладачі/І. Опейда, О. Швайка – Донецьк, 2008, 738 с.

5. Дорожинський Г.В., Маслов В.П., Ушенін Ю.В. Сенсорні прилади на основі поверхневого плазмонного резонансу. Монографія /Відповідальний редактор/Порєв В.А. – Київ: НТУУ «ХП», 2016 – 264 с.

НУВБІП УКРАЇНИ

6. Дышлюк А. В. Оптические биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса. Влияние расстояния между парой наночастиц на резонансную частоту и энергию связи системы/ А. В. Дышлюк//Девятнадцатая

НУВБІП УКРАЇНИ

Всероссийская конференция студентов- физиков и молодых ученых. – 2013. – С. 244 – 245

7. Каттралл Роберт В. Химические сенсоры. – М.: Научный мир, 2000.

– с.25

НУВБІП УКРАЇНИ

8. Лабораторний практикум з фітовірусології /М.Д. Мельничук, В.Є. Кожукало, С.О. Смирнова, Г.Г. Мартин.: НАУ, 2004-2006

9. Лебедева Т.С., Мінов Ю.Д., Сутковий П.Г., Фролов Ю.О., Шпильовий П.Б., Стародуб М.Ф. Розробка та використання приладів на основі поверхневого резонансу// Cybernetics and Computer Technologies. – 2020. – № 1. –

НУВБІП УКРАЇНИ

С. 62–73.

10. Лепіх Я.І. Акустоелектронні сенсорні фізичних величин на

поверхневих акустичних хвилях / Лепіх Я.І., Мачулін В.Ф., Олій Я.М., 2015.

11. Пат. PN GE2247749 МКІ.: G01N 021-75, Bio-sensor utilizing surface plasmon resonance, 10.06.2013.

12. Пат. PN WO93-06463 МКІ.: G01N 021-55, Optical Sensor, S.J.Peacock, H.C.Jaggers, J.S.Shaw, 12.01.2015.

13. Г. А. Сергеева, Г. В. Єльська. Біосенсори з'єднання живого з неживим Science and Science of Science, 2016, № 3 с. 60-70

14. Alla Tereshchenko, Mikhael Bechelany, Roman Viter, Volodymyr Khranovsky, Valentyn Smyntyna, Nikolay Starodub and Rositsa Yakimova, Optical biosensors based on ZnO nanostructures: advantages and perspectives. A review, 2016, Sensors and actuators. B, Chemical, (229), 664-677
<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.099>

15. Baranov, Andre & Shiryayev, Mikhail & Eremin, S.. (2014). Biosensors Based on Zinc Oxide. Nanotechnologies in Russia. 9. 99–115.
10.1134/S199507801402015B.

16. Brecht A., Gauglitz G., Goepel W. Sensors in biomolecular interaction analysis and pharmaceutical drug screening // Sensor update 5. - Weinheim: Wiley-VCH, - 2012. - P.147-163.

17. Bu, W.; Wu, Z.; Shun, P.P.; Shao, X.; Pu, J. Sensitivity Enhanced Refractive Index Fiber Sensor Based on Long-Range Surface Plasmon Resonance in SiO₂-Au-TiO₂ Heterostructure. Photonics 2021, 8, 379. <https://doi.org/10.3390/photonics8090379>

18. Canham, L. T. (1990). Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers. Appl. Phys. Lett. 57, 1046–1048
doi: 10.1063/L103561

19. Caruso, F.; Rodda, E.; Furlong, D.N.; Niikura, K.; Okahata, Y. Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic Acid sensor development. Anal. Chem. 1997, 69, 2043–2049.

20. Corso C.D., Dickherber A., Hunt W.D. An investigation of antibody immobilization methods employing organosilanes on planar ZnO surfaces for

biosensor applications // Biosensors & Bioelectronics. 2008. V. 24. № 4. P. 805.

21. De Feijter, J.A.; Benjamins, J.; Veer, F.A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* 1978, 17, 1759–1772.

22. Dostálek J., Vaisocherova H., Homola J. Multichannel surface plasmon resonance biosensor with wavelength division multiplexing // *J. Sens. Actuators B* – 2005; 108: 758.

23. Fano U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves) // *JOSA*. – 1941. – Vol. 31. – P. 213-222.

24. Fong, C.-C.; Lai, W.-P.; Leung, Y.-C.; Lo, S.-L.; Wong, M.-S.; Yang, M. Study of substrate-enzyme interaction between immobilized pyridoxamine and recombinant porcine pyridoxal kinase using surface plasmon resonance biosensor. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1596, 95–107.

25. Franzen S. Surface plasmon polaritons and screened plasma absorption in indium tin oxide compared to silver and gold. *J Phys Chem C* 2008; 112: 6027.

26. Fu E., Foley J., Yager P. Wavelength-tunable surface plasmon resonance microscope // *J. Rev. Sci. Instrum.* – 2003; 74: 3182.

27. Gu B.X., Xu C.X., Zhu G., Liu S., Chen L., Qi X. Tyrosinase Immobilization on ZnO Nanorods for Phenol Detection. *Journal of Physical Chemistry B*. 2009. V. 113. № 1. P. 377.

28. Haake H. Label-free detection of biomolecular interaction by optical sensors / H. Haake, A. Schütz, G. Gauglitz / *Fresenius J Anal Chem* – 2000 - Vol 36. No.6 - P. 576–585

29. Hagen J.A., Kim S.N., Bayraktaroglu B., Leedy K., Chavez J.L., KelleyLoughnane N., Naik R.R., Stone M.O. Biofunctionalized Zinc Oxide Field Effect Transistors for Selective Sensing of Riboflavin with Current Modulation // *Sensors* 2011. V. 11. № 7. P. 6645

30. Ho H.P., Wu S.Y., Yang M., Cheung A.C. Application of white light-emitting diode to surface plasmon resonance sensors // *Sensors and Actuators, B*.

2012. – Vol.80 – P.89-94.

31. Hoang Hiep Nguyen, Jeho Park, Sebyung Kang, and Moonil Kim Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications // *Sensors* 2015, 15, 10481-10510; doi:10.3390/s150510481

32. Homola J. Present and future of surface Plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, c. 528-539. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2101-0>

33. Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species// *Chem. Rev.* 2008. – V.108. – P. 462–493.

34. Homola J. The sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation // *Sensors and Actuators, B* – 2013. – Vol.41 – P.207-211.

35. Homola J., Dostálek J., Chen S. et al. Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk // *Int. J. Food Microbiol.* – 2002; 75: 61.

36. Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: Review // *Sens. Actuators B Chem.* 1999, 54, 3–15.

37. Jacob Fraden. Handbook of modern sensors: physics, designs and applications. Springer. – 2010. – 681 p.

38. Jane, A., Dronov, R., Hodges, A., and Voelcker, N.H. Porous Silicon Biosensors on the Advance, *Trends Biotechnol.*, 2009, vol. 27, no. 4, pp. 230–239. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.12.004>

39. Jiang R.B., Lei U. Biosensor regeneration via substrate electric potential: A physical mechanism // *Applied Physics Letters*. 2010. V. 96. № 26. P. 263701.

40. Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology // *BioTechniques*. – 1991. – Vol.11 – P.620-627.

41. Jordan C., Corn R. Surface plasmon resonance imaging measurements of electrostatic biopolymer adsorption onto chemically modified gold surfaces // *J. Anal. Chem.* – 1997, 69: 1449

42. Kambhampati DKM, Robertson JW, Cai M, Pemberton JE, Knell W.

Novel silicon dioxide sol-gel films for potential sensor applications: a surface plasmon resonance study. *Langmuir* 2001;17:1169-75.

43. Karlsson R., Stahlberg R. Surface Plasmon Resonance Detection and Multi-Spot Sensing for Direct Monitoring of Interactions Involving Low Molecular Weight Analytes and for Determination of Low Affinities // *Anal. Biochem.* – 1995; 228: 274–80.

44. Kretschmann E., Raether H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light // *J. Naturforsch.* – 1968. – 2135 c.

45. Krishnamoorthy S., Bei T., Zoumakis E., Chrousos G.P., Iliadis A.A. Morphological and binding properties of interleukin-6 on thin ZnO films grown on (100) silicon substrates for biosensor applications // *Biosensors & Bioelectronics*. 2006. V. 22. № 5. P. 707

46. Kyprianou D, Guerreiro AR, Nirschl M, Chianella I, Subrahmanyam S, Turner APF, et al. The application of polythiol molecules for protein immobilization on sensor surfaces. *Biosens Bioelectron* 2010;25:1049–55.

47. Lahiri J, Isaacs L, Tien J, Whitesides GM. A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: a surface plasmon resonance study. *Anal Chem* 1999;71:777–90.

48. Lei Y., Yan X., Zhao J., Liu X., Song Y., Luo N., Zhang Y. Improved glucose electrochemical biosensor by appropriate immobilization of nano-ZnO // *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2011. V. 82. № 1. P. 168

49. Liedberg B., Nylander. C., Lundstrom I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing // *Sensor and Actuators B*. - 2013. - Vol.4. - P.299-304.

50. Liu H, Wang B, Leong ESP, Yang P, Zong Y, Si G, et al. Enhanced surface plasmon resonance on a smooth silver film with a seed growth layer. *ACS Nano* 2010;4:3139.

51. Liu J., Guo C., Li C.M., Li Y., Chi Q., Huang X., Liao D., Yu T. Carbon decorated ZnO nanowire array: A novel platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications // *Electrochemistry Communications*. 2009. V.

11. № 1. P. 202.

52. Lockett MR, Weibel SC, Philips MF, Shortreed MR, Sun B, Corn RM, et al. Carbon-on-metal films for surface plasmon resonance detection of DNA arrays. *J Am Chem Soc* 2008;130:8611.

53. Lu X.H., Lu M.G., Yin F. Determination of Formaldehyde in Waste-Water by Luciferin Chemiluminescence // *Analytical Letters*. 1992. V. 25. № 11. P. 2073.

54. Malmqvist M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology // *Nature*. - 2013. – Vol.361. - P.186-187.

55. Manesse M, Sanjines R, Stambouli V, Boukherroub R, Szunerits S. Preparation and characterization of antimony-doped SnO₂ thin films on gold and silver for electrochemical and surface plasmon resonance studies. *Electrochem Commun* 2008;10:1041.

56. Manesse M, Sanjines R, Stambouli V, Boukherroub R, Szunerits S. Preparation and characterization of antimony-doped SnO₂ thin films deposited on silver substrates for surface plasmon resonance studies. *Langmuir* 2009;25:8036.

57. Manesse M, Stambouli V, Boukherroub R, Szunerits S. Electrochemical impedance spectroscopy and surface plasmon resonance studies of DNA hybridization on gold/SiO_x interfaces. *Analyst* 2008;133:1097–103.

58. METHODS OF THE SENSOR SURFACE FUNCTIONALIZATION BY BIOLOGICAL MOLECULES N.E. Maslova, T.S. Krylova, M.Ya. Garaeva, D.A. Mamichev National research centre «Kurchatov institute», Moscow. *Молекулярная медицина Молекулярная медицина* №5, 2013

59. Mohammad E. Khosroshahi, Mohammad Sadegh Nourbakhsh, Lida Ghazanfari Synthesis and Biomedical Application of SiO₂/Au Nanofluid Based on Laser-Induced Surface Plasmon Resonance Thermal Effect. *Journal of Modern Physics*, 2011, 2, 944-953 doi:10.4236/jmp.2011.29112 Published Online September

2011
60. Moreno-Bondi M.C., Mobley J., Alarie J.P., Vo-Dinh T. Antibody-based biosensor for breast cancer with ultrasonic regeneration // *J. of Biomedical Optics*.

2000. V. 5. № 3. P. 350-98.

61. Nelson, B.P.; Grimsrud, T.E.; Liles, M.R.; Goodman, R.M.; Corn, R.M. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1–7.

62. Nice E., Catimel B. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions // *Bioessays*. – 1999; 21: 339–52

63. Nuno Miguel Matos Pires, Tao Dong, Ulrik Hanke, Nils Hoivik. Recent developments in Optical detection technologies in Lab-on-a-Chip devices for biosensing applications // *Sensors* 2014, 14, 15458-15479; doi:10.3390/s140815458.

64. OPTICAL SENSORS BASED ON SURFACE PLASMON RESONANCE FOR HIGH-SENSITIVE BIOCHEMICAL ANALYSIS D.A. Mamichev, I.A. Kuznetsov, N.E. Maslova, M.L. Zanaveskin National research centre «Kurchatov institute», NBICS-Centre, Moscow. *Молекулярная медицина* №6, 2012

65. Pedersen H., Thirstrup C. Design of near-field holographic optical elements by grating matching // *Appl. Opt.* – 2004; 43: 1209–15.

66. Phelan, M.L.; Nock, S. Generation of bioreagents for protein chips. *Proteomics* 2003, 3, 2123–2134. 4. Fong, C.-C.; Lai, W.-P.; Leung, Y.-C.; Lo, S.C.-L.; Wong, M.-S.; Yang, M. Study of substrate-enzyme interaction between immobilized pyridoxamine and recombinant porcine pyridoxal kinase using surface plasmon resonance biosensor. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1596, 95–107.

67. Piliarik M., Vaisocherova H., Homola J. A new surface plasmon resonance sensor for high-throughput screening applications // *J. Biosens. Bioelectron.* – 2005; 20: 2104

68. Prylutskyi M., Starodub N., Lebyedyeva T., Shpylovyy P. Express control of levels of polyamines by immune biosensor based on SPR. *VISNYK Kyivskogo natsionalnogo eniversytetu imeni Tarasa Shevchenka, Problemy regulyatsiyi fiziologichnyh funktsiy.* – 2018. – V. 1(25). – P. 59–62.

69. Rossi, A.M., Wang, L., Reipa, V., and Murphy, T.E., *Biosens. Bioelectron.*, 2007, vol. 23, no. 5, pp. 741–745. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.06.004>

70. S. Kalele, S. W. Gosavi, J. Urban and S. K. Kulkarni, "Nanoshell Particles: Synthesis, Properties and Applications," *Current Science*, Vol. 91, No. 8, 2006, pp.1038–1052.

71. Sailor, M. J. *Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization, and Applications*. John Wiley and Sons. 2012. DOI:10.1002/9783527641901

72. Shriverlake L.C., Breslin K.A., Charles P.T., Conrad D.W., Golden J.P., Liger F.S. Detection of Tnt in Water Using An Evanescent-Wave Fiberoptic Biosensor // *Analytical Chemistry*. 1995. V. 67. № 14. P. 2431.

73. Slavík R., Homola J. Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor // *Sens. Actuators B*. 2007, 123: 10–2.

74. Starodub M.F., Savchuk M.V., Fedelest-Gladynets M.I., Taran O.P. Features of sample preparation for the diagnosis of retroviral leukemia using an immune biosensor//*Biologichni systemy: teoriuya ta innovatsiyi*.– 2018. –287.– P. 135–142.

75. Starodub M.F., Voititskiy V.M., Lebedeva T.S., Shpylovyy P.B. Formation of the Surface Programmed Chemical Sites and Their Selectivity to Some Mycotoxins// *Adv. Biotech. and Micro*. – 2017. – V. 6(4).– P. 555-691.

76. Starodub N., Ogorodniichuk I., Lebedeva T., Shpylovyy P. Immune biosensors based on the SPR and TIRE: efficiency of their application for bacteria determination//*Proc. SPIE 9032*,– *Biophotonics*. – 2013. – P.903201-903204.

77. Stephanopoulos, N.; Francis, M.B. Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 876–884.

78. Szunerits S, Boukherroub R. Electrochemical investigation of a novel interface for electrochemical surface plasmon resonance studies (E-SPR). *Electrochem Commun* 2006;8:439–44.

79. Szunerits S, Boukherroub R. Preparation and characterization of thin films of SiO_x on gold substrates for surface plasmon resonance studies. *Langmuir* 2006;22:1660.

80. Szunerits S, Castel X, Boukherroub R. Preparation of electrochemical and surface plasmon resonance active interfaces: deposition of indium tin oxide on silver

thin films. J Phys Chem C 2008;112:10883

81. Szunerits S, Castel X, Boukherroub R. Surface plasmon resonance investigation of silver and gold films coated with thin indium tin oxide (ITO) layers: on stability and sensitivity. J Phys Chem C 2008;112:15813–7.

82. Szunerits S, Coffinier Y, Janel S, Boukherroub R. Stability of gold/silica thin film interface. Electrochemical and surface plasmon resonance studies. Langmuir 2006;22:10716–22

83. Szunerits S, Nunes-Kirchner C, Wittstock G, Boukherroub R, Chantal G. Electrochemical investigation of the influence of thin SiO_x films deposited on gold on charge transfer characteristics. Electrochim Acta 2008;53: 7805–7914

84. Ung T, Liz-Marzan L M, Mulvaney P. Controlled Method for Silica Coating of Silver Colloids. Influence of Coating on the Rate of Chemical Reactions,” Langmuir, Vol. 14, No. 14, 1998, pp. 3740-3748.

85. T.S. Lebyedyeva, Y.D. Minov, P.G. Sutkovyi, Y.O. Frolov, P.B. Shpylovyy, M.F. Starodub. Development and application of devices based on surface plasmon resonance. Кібернетика та комп'ютерні технології, 2020 № 1 С. 62-73
<https://doi.org/10.34229/2707-451X.20.1.7>

86. Teng Y., Zhang X., Fu Y., Liu H., Wang Z., Jin L., Zhang W. Optimized ferrocene-functionalized ZnO nanorods for signal amplification in electrochemical immunoassay of Escherichia coli // Biosensors & Bioelectronics. 2011. V. 26. № 12. P. 4661

87. Thirstrup C., Zong W., Borre M. et al. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors // Sens. Actuators B. –2004; 100: 298–308.

88. Touahir L, Jenkins ATA, Boukherroub R, Gouget-Laemmel AC, Chazalviel J-N, Peretti J, et al. Surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy on silver based SPR substrates. J Phys Chem C 2010;114:22582.

89. Touahir L, Niedzólka-Jönsson J, Galopin E, Boukherroub R, Gouget-Laemmel AC, Solomon I, et al. Surface plasmon resonance on gold and silver films

coated with thin layers of amorphous silicon-carbon alloys. *Langmuir* 2010;26:6058

90. Trilling A.K., Beekwilder J., Zuillhof H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview // *Analyst*. 2013. V. 138. № 6. P. 1619.

91. Tugarinov, V.; Kanelis, V.; Kay, L.E. Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 749–754.

92. Umar A., Rahman M., Vaseem M., Hahn Y.B. Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles // *Electrochemistry Communications*. 2009. V. 11. № 1. P. 118.

93. W. Stöber, A. Fink and E. Bohn. "Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range." *Journal of Colloid Interface Science*, Vol. 26, No. 1, 1968, pp. 62-69. doi:10.1016/0021-9797(68)90272-5

94. Wang L, Sun Y, Wang J, Zhu X, Jia F, Cao Y, et al. Sensitivity enhancement of SPR biosensor with silver mirror reaction on the Ag/Au film. *Talanta* 2009;78:265.

95. Woodbury R.G., Wendin C., Clendenning J., Mendelez J., Elkind J., Bartholomew D., Brown S., Furlong C. Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniature integrated surface plasmon resonance sensor // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1998. – Vol.13 – P.1117-1126.

96. Y. P. He, S. Q. Wang, C. R. Li, Z. Y. Wu and B. S. Zou, "Synthesis and Characterization of Functionalized Silica coated Fe₃O₄ Superparamagnetic Nanocrystals for Biological Applications," *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol. 38, No. 9, 2005, pp. 1342-1350. doi:10.1088/0022-3727/38/9/003

97. Zareie HM, Boyer C, Bulmus V, Nateghi E, Davis TP. Temperature-responsive self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol): control of biomolecular recognition. *ACS Nano* 2008;2:757–65

98. Zenga Y., Hua R., Wang L. Recent advances in surface plasmon resonance imaging: detection speed, sensitivity, and portability. *Nanophotonics*. 2017. 6(5).c. 1017–1030. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2017-0022>

99. Zhao J., Wu D., Zhi J. A novel tyrosinase biosensor based on

biofunctional ZnO nanorod microarrays on the nanocrystalline diamond electrode for detection of phenolic compounds // *Bioelectrochemistry*. 2009. V. 75. № 1. P. 44.

100. Zybin A., Grunwald C., Mirsky V. et al. Double-wavelength technique for surface plasmon resonance measurements: Basic concept and application for single sensors and two-dimensional sensor arrays // *J. Anal. Chem.* – 2005; 77: 2393

101. Zynio SA, Samoylov AV, Surovtseva ER, Mirsky VM, Shirshov YM, et al. Bimetallic layers increase sensitivity of affinity sensors based on surface plasmon resonance. *Sensors* 2002;2:62.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України