

# Теоретическая и Экспериментальная Химия

Научный журнал ♦ Основан в апреле 1965 г. ♦ Выходит 1 раз в 2 месяца

ТОМ 51, № 5, 2015

УДК 544.72+543.9+535.39+53.06

## Сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса: методы поверхностной функционализации и повышения чувствительности

*Е. В. Шинкаренко, С. А. Кравченко*

Институт физики полупроводников им. В. Е. Лашкарёва НАН Украины  
просп. Науки, 41, Киев 03028, Украина. E-mail: o.shynkarenko@isp.kiev.ua

*Проанализированы особенности использования метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с целью создания сенсоров для мониторинга биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени. Рассмотрены и систематизированы методы иммобилизации биомолекул на поверхности ППР-сенсоров и графена. Изложены подходы к функционализации поверхности наночастиц, которые эффективно используются для возбуждения локального ППР. Рассмотрены примеры усиления ППР при одновременном использовании наночастиц металлов и графена, показана возможность совместного применения ППР и электрохимических методов.*

**Ключевые слова:** поверхностный плазмонный резонанс (ППР), локальный поверхностный плазмонный резонанс (ЛППР), биосенсоры, функционализация, иммобилизация, наночастицы золота, графен,

### Введение

Явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР), первоначально предлагавшееся для детектирования газообразных веществ [1], позднее стало широко использоваться в биохимических исследованиях. Этому способствовало создание шведской компанией «Pharmacia Biosensor AB» в начале 90-х гг. прошлого столетия коммерческих биосенсоров на основе этого явления, предназначенных для анализа биомолекулярных взаимодействий [2]. Использование метода ППР открыло новую страницу в изучении функциональных свойств биологических молекул, позволяя получать более полную информацию о механизмах биоаффинного связывания по

сравнению с использовавшимися до этого классическими методами (иммуноферментный анализ, радиорецепторный метод и др.).

ППР позволяет регистрировать процесс биоаффинного взаимодействия между двумя компонентами, один из которых иммобилизован на поверхности чувствительного элемента, а другой является молекулами аналита, находящимися в растворе (жидкофазной пробе).

Принцип работы ППР-биосенсора заключается в высокой чувствительности условий возбуждения поверхностных плазмонов к показателю преломления внешней среды в тонком слое (порядка 200 нм,  $\sim \lambda/4$ , где  $\lambda$  — длина волны света), непосредственно примыкающем к поверхности сенсора. Следова-

тельно, метод основанный на ППР, обладает высокой чувствительностью к формированию нового адсорбированного слоя на поверхности. Основными преимуществами метода являются отсутствие необходимости в дополнительных метках для биомолекул и возможность изучения кинетики взаимодействия в реальном времени. Данный метод находит все более широкое применение для исследования химических и биологических взаимодействий, о чем свидетельствует постоянный рост числа публикаций. Сенсорным приложениям и измерениям на основе ППР посвящено несколько обзоров [3—12].

В настоящей работе рассмотрены и систематизированы разнообразные методы иммобилизации биологического компонента на поверхности ППР-сенсоров, особое внимание уделяется методам ковалентной иммобилизации. Это связано с повышенной значимостью этих методов для увеличения чувствительности и устойчивости получаемых результатов при использовании ППР. Также рассмотрены новые подходы к увеличению чувствительности метода ППР при использовании наночастиц и графена.

#### **Методы ППР и ЛППР: основные представления**

Поверхностные плазмоны (ПП) представляют собой связанную моду поверхностных колебаний электронного газа и электромагнитного поля, локализованную на поверхности металла. Возможность существования и условия возбуждения таких колебаний вытекают из электромагнитной теории Максвелла [13]. Наиболее распространенной схемой оптического возбуждения ПП является использование призмы полного внутреннего отражения в геометрии Кречмана [14]. В этой геометрии тонкая полупрозрачная металлическая пленка (обычно Au или Ag, возможно также использование Al, Cu, Pt) наносится на основание призмы полного внутреннего отражения с высоким показателем преломления. При отражении от поверхности диэлектрик — металл интенсивность световой волны в металле экспоненциально убывает с увеличением расстояния от границы раздела. Для достаточно тонкой пленки металла (~50 нм для Au) отражение света от основания призмы при определенном угле падения приводит к возбуждению связанной моды колебаний электронной плазмы и электромагнитного поля, локализованной на внешней поверхности металлической пленки. Эти колебания называют поверхностными плазмонами (ПП) или поверхностными плазмон-поляритонами, подчеркивая роль поляризации газа свободных электронов в возникновении этого эффекта. Возбуждение ПП носит резонансный характер и наблюдается при равенстве частоты и

тангенциальных (по отношению к границе раздела) составляющих волнового вектора возбуждающей *p*-поляризованной волны и ПП. Угол падения излучения, при котором происходит возбуждение ПП, называют резонансным углом.

Поскольку при поверхностном плазмонном резонансе (ППР) энергия возбуждающего излучения переходит в энергию поверхностных плазмонов, резонансному углу соответствует минимум на угловой зависимости интенсивности света, отраженного от границы раздела. Значение резонансного угла зависит от длины волны и угла падения возбуждающего излучения на границу раздела, а также от (комплексного) показателя преломления внешней среды в непосредственной близости к поверхности пленки металла. Изменение показателя преломления среды приводит к изменению условий резонанса и, следовательно, к изменению угла ППР. Существование такой зависимости служит основой для использования явления ППР в сенсорных системах.

Помимо призмы полного внутреннего отражения, оптическое возбуждение ППР возможно осуществить также при помощи волноводов оптического диапазона и дифракционных решеток.

ППР возбуждается на поверхности, продольный размер которой имеет величину больше, чем длина волны падающего на поверхность светового излучения. Если характерный размер поверхности соизмерим с длиной волны, возможно возбуждение как ППР, так и локального ППР (ЛППР).

Свойства наночастиц значительно отличаются от свойств объемного материала, из которого они состоят. Это связано с изменением соотношения поверхности и объема наночастиц, что приводит к усилению поверхностных явлений. Использование наночастиц для усиления ППР возможно в двух направлениях: усиление сигнала за счет увеличения массы адсорбированных частиц; усиление свойств самой сенсорной подложки. В первом случае для усиления могут применяться практически любые сферические или вытянутые наночастицы и углеродные нанотрубки. Во втором случае эффективно применение Au/Ag наномассивов, нанорешеток и пластин графена. Усиление сигнала ППР при использовании графена обусловлено как переносом заряда от пластины графена к плазмон-несущей пленке металла (увеличивается поле ППР и его отклик), так и значительным увеличением адсорбционной емкости поверхности [15].

В наночастицах, размер которых меньше длины волны, возбуждается ЛППР при совпадении частоты возбуждающих фотонов с частотой колебаний электронов проводимости в наночастицах. Как и ППР, ЛППР обладает высокой чувствительностью к

показателю преломления среды непосредственно вблизи поверхности наночастиц. Толщина чувствительного слоя ЛППР составляет 15—20 нм. Эффект ЛППР зависит также от размера, формы и электромагнитных свойств наночастиц. Для продолговатых наночастиц существует два пика ЛППР, которые связаны с продольными и поперечными размерами наночастиц. Для наночастиц с одинаковыми поперечными размерами увеличение продольного размера приводит к смещению продольной моды в красную область. Изменяя длину наночастиц, можно сдвигать положение продольной моды в нужный диапазон. Длина волны, при которой наблюдается пик продольной моды ЛППР, зависит от соотношения сторон наночастиц (AR) [16]:

$$\lambda_{\max} = 95AR + 420.$$

Так, для сверхтонких нанопроволок золота (диаметром ~1,6 нм и длиной 20—400 нм) продольная мода ЛППР наблюдается в ИК-области при 520 нм [17]. ЛППР можно наблюдать как для наночастиц, осажденных на стеклянную подложку, так и для наночастиц, распределенных по объему образца. Для ЛППР регистрируют интенсивность прошедшего/отраженного света в зависимости от длины волны возбуждающего излучения.

#### **Методы иммобилизации биологического компонента к поверхности ППР-биосенсоров**

##### **Матрицы ППР-биосенсоров**

Ключевым этапом создания биосенсора является иммобилизация биологического компонента на поверхности чувствительного элемента преобразователя сигнала (транздьюсера). Чувствительный элемент можно представить в виде комбинации подложки (support) и матрицы (matrix). В ППР-биосенсорах подложка — это металлическая пленка, в которой распространяется плазмонная волна. Операция иммобилизации предполагает наличие матрицы — промежуточной пленки, в которой присутствуют функциональные группы, участвующие в дальнейшем связывании с биоспецифическим лигандом. В общем смысле биологический компонент может быть иммобилизован как на поверхности матрицы (2D-matrix), так и в ее объеме (3D-matrix) в зависимости от расположения активных функциональных центров матрицы [18]. Некоторые матрицы являются коммерчески доступными и представлены в работе [19].

В случае иммобилизации 2D-матрицы количество доступных активных центров ограничивается поверхностной емкостью матрицы (повышение плот-

ности таких центров приводит к увеличению стерических затруднений на поверхности с соответствующим уменьшением отклика). В качестве 2D-матрицы наибольшее распространение получили самоорганизующиеся монослои (SAM), состоящие из тиоамещенных органических соединений, которые самопроизвольно формируются на золотой поверхности сенсора при выдерживании подложек в соответствующем растворе [20, 21]. Для управления поверхностной плотностью матрицы и повышения степени свободы необходимых функциональных элементов формируют смешанные двухкомпонентные монослои тиосоединений, в которых длинноцепочечный алкантиол с требуемой функциональной группой ( $R-(CH_2)_n-SH$ ) разбавляется тиосоединением с более короткой углеводородной цепью [22].

Иммобилизация 3D-матрицы, формирование которой основано на использовании полимерных соединений, обеспечивает большее количество необходимых активных центров по сравнению с 2D-аналогом, при этом объемный тип матрицы характеризуется улучшенными свойствами в отношении сохранения биологического компонента при длительном хранении сенсора.

3D-матрицы представлены пленками гидрогелей, в объем которых диффундируют необходимый биоконтакт; при этом такие матрицы выявляют в 100 раз большую полезную емкость активных связывающих центров по сравнению с 2D-матрицами [23]. Наиболее известной и широко используемой 3D-матрицей является карбоксиметилированный декстран [24]. Декстраны являются продуктами частичного гидролиза крахмала и представляют собой гидрофильные, незаряженные, нейтральные олигосахариды, растворяющиеся в любых соотношениях в воде с образованием гидрогелей. Благодаря своим гидрофильным свойствам декстраны характеризуются малой способностью к неспецифическому взаимодействию с биологическим компонентом. Высокая концентрация гидроксильных групп в матрице декстрана позволяет провести химическую модификацию без заметного влияния на гидрофильность матрицы. Декстрановый слой, модифицированный метилкарбоксильной группой ( $-CH_2COOH$ ) (карбоксиметилированный декстран, CM-декстран), обладает выраженной способностью к ковалентному связыванию благодаря наличию активной функциональной группы. Полимерные олигосахаридные цепочки в декстране характеризуются неразветвленной структурой с высокой структурной гибкостью матрицы, что обеспечивает повышенную доступность связывающих центров с соответствующим увеличением ее полезной емкости.

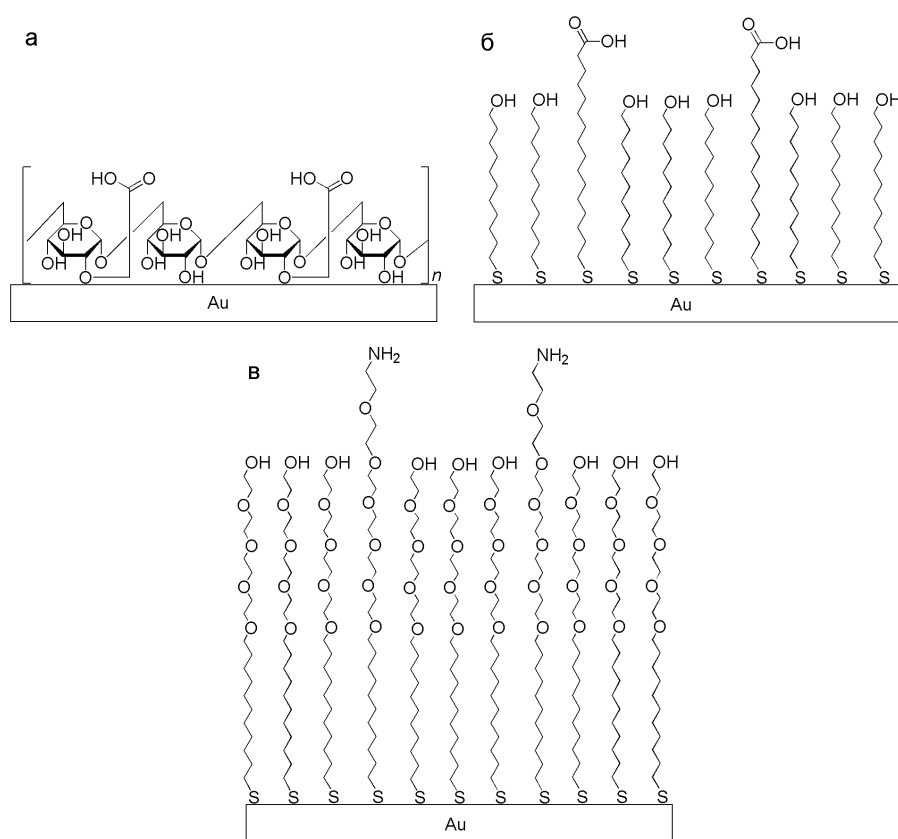


Рис. 1. Матрицы, используемые в ППР-биосенсорах: а — СМ-декстрановая матрица (3D) [24]; б — SAM-матрица (2D) [33]; в — SAM-матрица с ОЭГ-фрагментами (2D) [34].

2D-матрицы являются более предпочтительными по сравнению с 3D-матрицами при использовании в ППР-биосенсорах в следующих случаях: если целевой аналит представляет собой структуру, большую по размерам, чем клетки и вирусы; с целью определения кинетических параметров; для достижения минимальной степени неспецифического связывания; для получения низкой концентрации иммобилизованных лигандов на поверхности сенсора [25].

Следует отметить схожесть кинетики биологического взаимодействия на поверхности сенсора для 2D- и 3D-матриц [26].

Пленка декстрана (3D-матрица) обладает низким уровнем неспецифического связывания на поверхности ППР-сенсора за счет наличия большого количества гидроксильных групп. Для 2D-матриц уход от неспецифического связывания достигается за счет олигоэтиленгликолевых (ОЭГ) фрагментов, которые включают как в молекулу, посредством которой формируется SAM, так и непосредственно в структуру иммобилизуемого лиганда [27]. Примеры декстрановой и SAM-матриц представлены на рис. 1.

Помимо 2D- и 3D-матриц, описанных выше, в ППР-биосенсорах используют слоистые матрицы, представляющие собой слоистые структуры на поверхности металлической подложки. Эти матрицы формируют из слоев оксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ) [28, 29], аморфного углерода [30] или графена [31, 32].

В приведенных примерах матрицы содержат концевые функциональные группы — карбоксильную группу ( $-\text{COOH}$ ) и аминогруппу ( $-\text{NH}_2$ ), которые являются связывающими центрами для иммобилизации лигандов на поверхность сенсора.

В общем случае связывающими центрами в описанных выше матрицах являются следующие функциональные группы: карбоксильная группа ( $-\text{COOH}$ ) для гидрогелевой декстрановой матрицы; карбоксильная группа ( $-\text{COOH}$ ) и аминогруппа ( $-\text{NH}_2$ ) для SAM-матрицы; гидроксильная группа ( $-\text{OH}$ ) для слоистой матрицы.

Представленные функциональные группы могут быть трансформированы при помощи известных химических методов [35] в другие функциональные связывающие группы, позволяя при этом расширять функциональные возможности описываемых матриц.

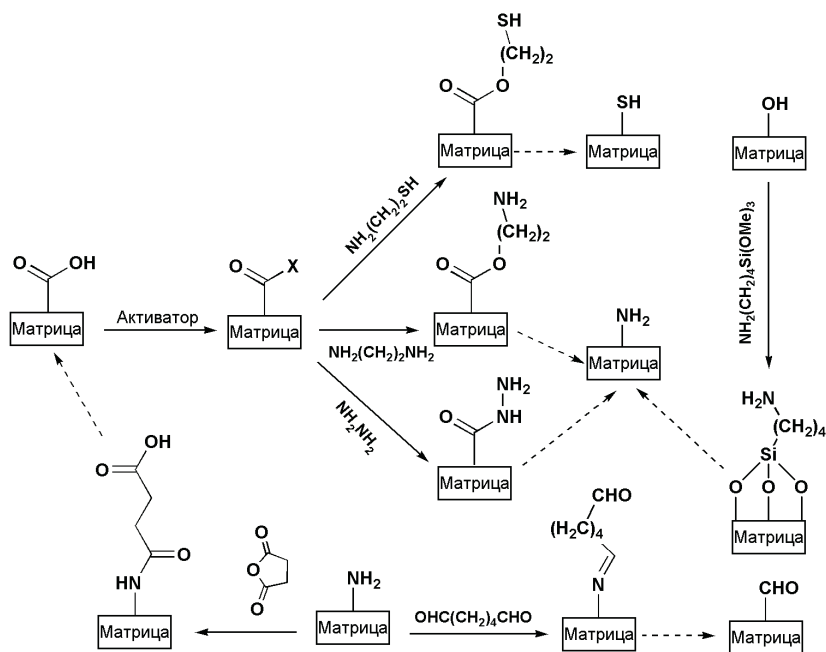


Рис. 2. Трансформация функциональных групп матрицы.

Так, например, COOH-матрица может быть превращена в  $\text{NH}_2$ -, SH- и CHO-матрицы (рис. 2).

Для функционализации поверхности сенсоров используют также полимерные пленки, получаемые методом плазменной полимеризации [36, 37]. Сформированные на поверхности таким способом пленки характеризуются наличием высокореакционных функциональных групп. Преимуществом метода плазменной полимеризации является возможность контроля плотности упаковки за счет варьирования энергетических параметров используемой плазмы [37]. Применение пленок с молекулярными отпечатками является отдельным перспективным направлением развития способов иммобилизации и детально рассмотрено в обзоре [38].

#### Методы иммобилизации лигандов к поверхности матрицы

В ППР-биосенсорах одно из взаимодействующих соединений (биораспознающий элемент или целевая молекула) иммобилизуется на поверхность сенсора, а второй взаимодействующий компонент (аналит) находится в исследуемом растворе. Выбор стратегии для иммобилизации упомянутых выше соединений зависит от используемого биоаналитического формата [39, 40] (табл. 1).

В формате непосредственного определения биораспознающий элемент находится на поверхности сенсора. При контакте с аналитом, находящимся в растворе, на поверхности сенсора формируется комплекс, наличие которого детектируется при помощи

ППР-сенсора. Этот метод используют в случае высоких концентраций аналита в среде с большим молекулярным весом (больше 5 кДа). Для детектирования небольших молекул с относительно малым молекулярным весом используют послойный формат определения, в котором для усиления отклика используют дополнительный биораспознающий элемент.

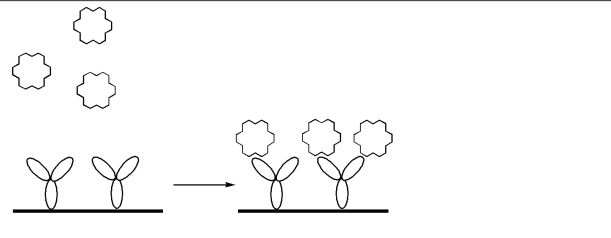
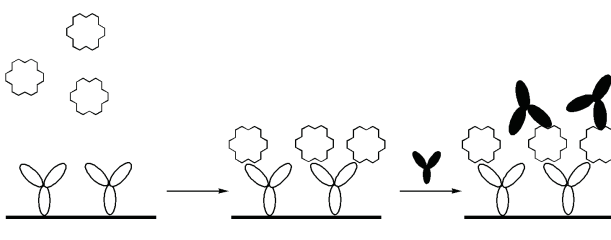
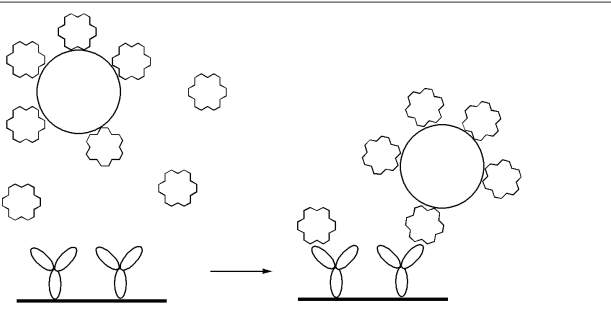
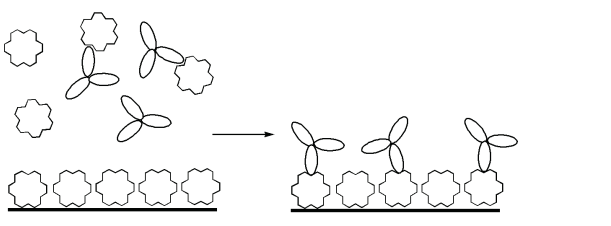



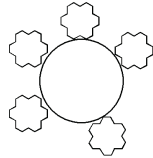
Для аналитов с малым молекулярным весом, не дающим значительного сигнала ППР при прямом связывании, для увеличения чувствительности используют конкурентный и ингибирующий форматы (см. табл. 1).

Наряду с классическими схемами определения аналитов используются также другие форматы. Так, для определения малых молекул тестостерона использованы пленки с молекулярными отпечатками (molecularly imprinted film), полученные полимеризацией [41]. На основе ППР-измерений предложен формат, позволяющий определять белок-белковые взаимодействия и диссоциацию образовавшихся комплексов под воздействием малых молекул-ингибиторов [42].

Иммобилизация представляет собой процесс прикрепления биораспознающего элемента или целевой молекулы к поверхности сенсора для уменьшения подвижности и определяет свойства сенсорного массива. В некоторых случаях иммобилизация может привести к частичной или полной потере биологической активности прививаемого компонента из-за случайной ориентации и структурной деформации. Чтобы сохранить биологическую активность имму-

Таблица 1

**Биоаналитические форматы**

<p>Формат непосредственного определения</p>	
<p>Формат послойного определения</p>	
<p>Формат конкурентного определения</p>	
<p>Формат ингибирующего определения</p>	
<p><i>Примечание.</i></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  Аналит         </div> <div style="text-align: center;">  Биораспознающий элемент I         </div> <div style="text-align: center;">  Биораспознающий элемент II         </div> <div style="text-align: center;">  Аналит, привитый к большой молекуле         </div> </div>	

билизируемого компонента, его следует прививать к поверхности без значимого воздействия на его конформацию и функциональность. Выбор подходящего метода иммобилизации определяется физико-химическими и химическими свойствами как матрицы, так и прививаемого к поверхности биологического компонента.

Физическая иммобилизация происходит при адсорбции компонента на поверхности матрицы под действием межмолекулярных сил, главным образом

за счет ионных, полярных и ван-дер-ваальсовых (гидрофобных) взаимодействий. При таком способе иммобилизации не происходит образование прочной ковалентной связи между биологическим компонентом и поверхностью матрицы. Получаемый в результате физической иммобилизации активный слой случайным образом ориентирован, поскольку каждая биологическая молекула может связываться с поверхностью в различной ориентации, когда происходит минимизирование отталкивающих взаимодей-

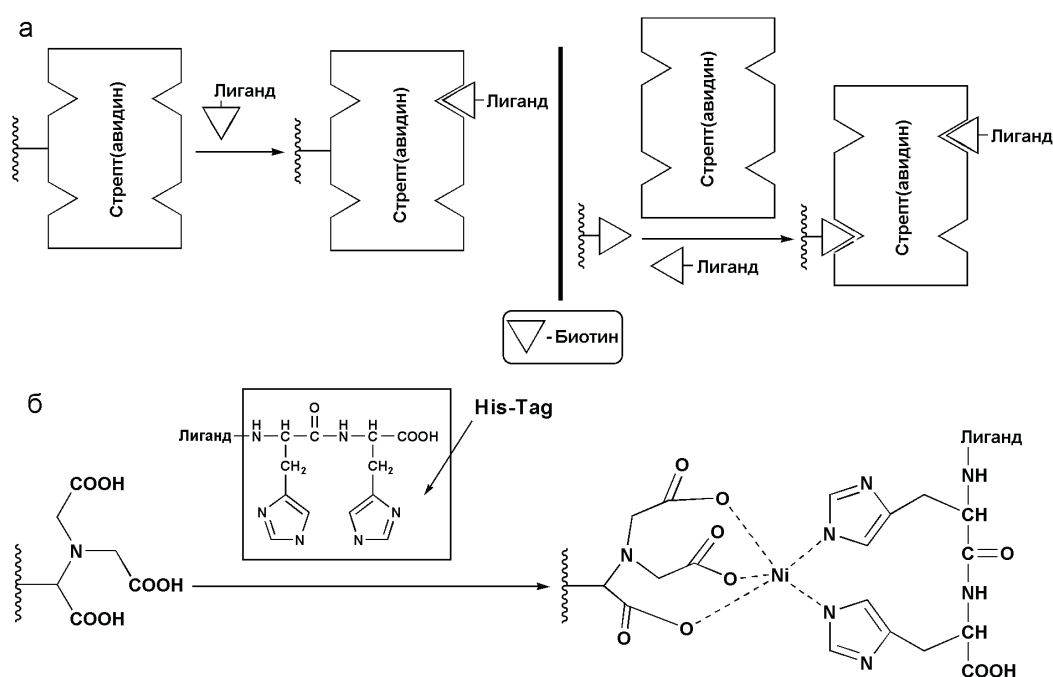


Рис. 3. Методы биоаффинной иммобилизации: *а* — стрепт(авидин)-биотиновая иммобилизация; *б* — никель-гистидин комплексообразующая иммобилизация.

ствий между матрицей и биологическим компонентом. Адсорбционная емкость активной поверхности ограничена геометрическими размерами иммобилизуемого соединения. Высокая плотность адсорбированного компонента может блокировать его активные участки, препятствуя доступности необходимых функциональных групп. Очевидным преимуществом метода физической иммобилизации является простота формирования активного слоя наряду с мягкостью воздействия на прикрепляемый биологический компонент. К недостаткам метода относятся случайная ориентация прививаемых биологических молекул и их слабое закрепление на поверхности.

Физическая адсорбция за счет электростатических сил описана в работе [43], где ионная связь формируется между карбоксильным анионом SAM-матрицы и протонированной аминогруппой поли(L-лизина). Аналогичный механизм физической адсорбции происходит в случае  $\text{NH}_2$ -SAM-матрицы при ее взаимодействии с карбоксильными группами поли(L-глутаминовой кислоты) [44].

Наиболее часто используемым методом иммобилизации в гетерогенных биосенсорах является метод ковалентной иммобилизации, который основан на образовании одной или нескольких ковалентных связей между функциональными группами поверхности и биологического компонента. Связывание между матрицей и биологической молекулой происходит в результате химического взаимодействия между нуклеофильным фрагментом молекулы

( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ) и электрофильной функциональной группой (активированная карбоксильная группа  $\text{C}(\text{O})\text{X}$ , альдегидная группа  $\text{CHO}$ , ненасыщенная двойная связь  $\text{X}-\text{CH}=\text{CH}-\text{Y}$ ) с образованием прочной ковалентной связи. В отличие от физической сорбции, ковалентная иммобилизация необратима, что позволяет достигать наиболее прочного закрепления биологической молекулы на поверхности матрицы и обеспечить условия для сохранения стабильного отклика биосенсорного сигнала и увеличения продолжительности его действия.

Ковалентное связывание с поверхностью сенсора невозможно применить в случае иммобилизации пептидов и белков. В структуре этих соединений содержится множество функциональных групп, способных к неспецифическому ковалентному связыванию. Поэтому для иммобилизации пептидов и белков используют альтернативный подход, который основан на реакции биохимического сродства (bioaffinity) между матрицей и биологическим компонентом и который является основой методов биоаффинной иммобилизации. Наибольшую популярность получили методы, которые основаны на биохимическом взаимодействии молекул стрепт(авидина) с биотином (Biotin-Strept(Avidin) System) [45] (рис. 3, *а*) и реакции комплексообразования гистидиновых фрагментов концевых участков протеина с хелатированными ионами никеля(II) (His-Tag System) [46] (рис. 3, *б*).

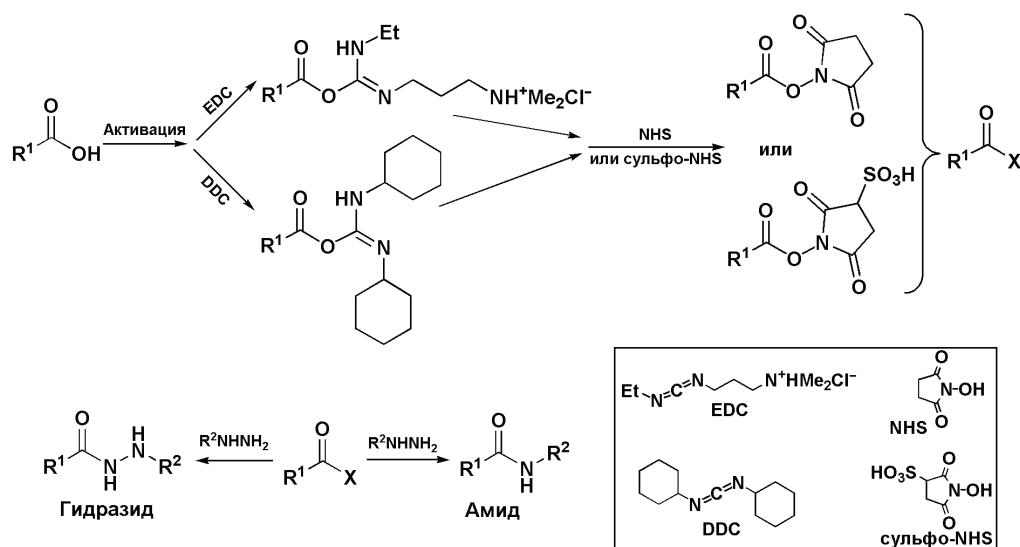


Рис. 4. Активация карбоксильной группы с последующим получением амида или гидрозида.

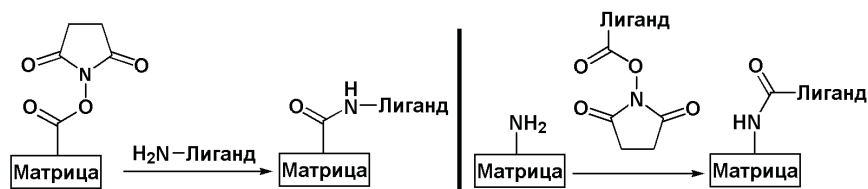


Рис. 5. Иммунизация при помощи NHS-метода.

К биоаффинной иммобилизации также относятся методы, основанные на взаимодействии рекомбинантных протеинов А или G с F<sub>c</sub>-фрагментами определенных классов иммуноглобулинов млекопитающих. Таким способом достигается оптимальная ориентация иммобилизованных молекул иммуноглобулинов на поверхности сенсора [47]. Метод иммобилизации на основе такого взаимодействия (Protein A(G) — Antibody System) является одним из наиболее популярных методов иммобилизации антител на поверхности биосенсора [48].

### Методы ковалентной иммобилизации

Разработанные синтетические методы органической химии являются общим основанием для ковалентных методов иммобилизации в ППР-биосенсорах. Наличие функциональных групп как в матрице сенсора, так и в биологической молекуле позволяет провести надежную иммобилизацию требуемого компонента. В общем случае методы ковалентной иммобилизации можно разделить на следующие группы [35].

**NHS-метод.** При взаимодействии активированной карбоксильной группы с аминогруппой происходит образование прочной и устойчивой амидной или

гидразидной связи. Активация доступной карбоксильной группы осуществляется путем ее этерификации N-гидроксисукцинилимином (NHS) или его замещенным аналогом (Sulfo-NHS). Таким способом повышается электрофильность функциональной группы в отношении нуклеофильного агента (amina или гидрозида) (рис. 4).

NHS-метод (рис. 5) является наиболее используемым среди остальных методов ковалентного связывания (больше 80 % всех используемых случаев) [49]. Он характеризуется относительной простотой, возможностью его проведения *in situ*, мягкостью условий проведения реакции [50, 51].

**Метод восстановительного аминоалкилирования.** Метод основан на взаимодействии альдегидной группы и аминогруппы с образованием неустойчивого основания Шиффа, которое стабилизируется восстановлением иминной связи (CH=N) с образованием вторичного амина (рис. 6).

Частным случаем этого метода является аминоалкилирование по Манниху, где происходит трехкомпонентная конденсация двух аминогрупп с молекулой формальдегида (рис. 7).

Ковалентное связывание биологического компонента можно проводить как с СНО-матрицей, которая



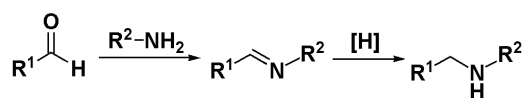


Рис. 6. Реакция восстановительного аминирования.

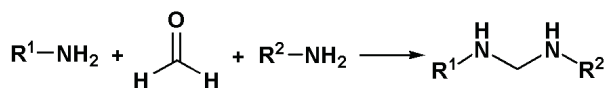


Рис. 7. Аминоалкилирование по Манниху.

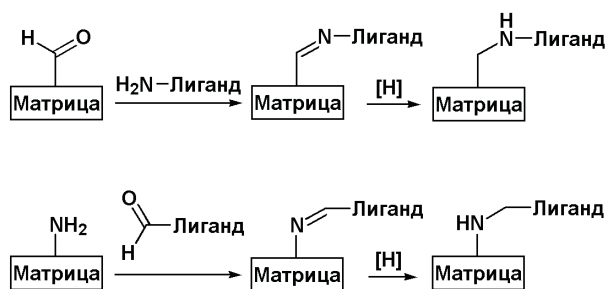


Рис. 8. Иммунизация методом восстановительного аминирования.

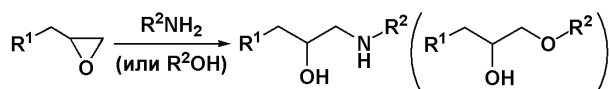


Рис. 9. Реакция оксидного алкилирования.

формируется окислением HO-матрицы [49], так и с  $NH_2$ -матрицей [34] (рис. 8). Иммунизация аминированием по Манниху была использована для прививки к поверхности ППП-сенсора молекулы тетродотоксина в аналитическом методе для определения нейротоксинов [52].

**Метод оксидного алкилирования.** Оксидный трехчленный цикл при воздействии нуклеофилов раскрывается с образованием прочной ковалентной связи. Иммунизация осуществляется в мягких условиях при нейтральных значениях pH среды [53] (рис. 9).

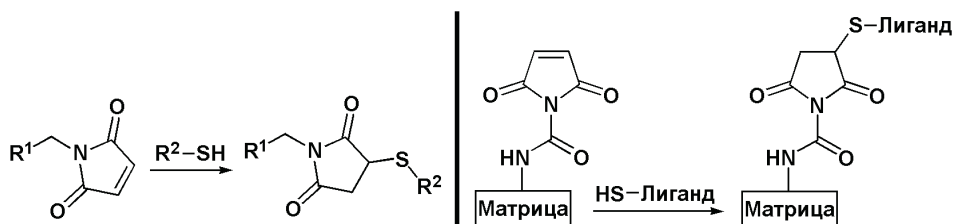


Рис. 10. Малеймидный метод иммунизации.

Следует заметить, что реакция окисления используется в процессе изготовления СМ-декстрановых биочипов, в которых декстрановый компонент иммобилизуется на поверхность сенсора ковалентным связыванием с SAM, который содержит концевой оксидный фрагмент [24].

**Малеймидный метод.** В этом случае ненасыщенная двойная связь малеймида взаимодействует с тиогруппой, претерпевая присоединение по Михаэлю, с образованием устойчивой тиоэфирной связи (рис. 10).

Реакция специфична при значениях pH 6,5—7,5, при более высоких значениях pH происходит взаимодействие с аминной группой, что может привести к нежелательному связыванию при иммобилизации. Малеймид реагирует быстро, однако претерпевает медленный гидролиз в водной среде [54].

**Метод дисульфидного обмена.** Соединения с дисульфидной связью принимают участие в реакции обмена с тиольной группой другого соединения, что приводит к образованию нового замещенного дисульфида. В практике иммобилизации в основном используется дисульфидзамещенный пиридин, который в процессе реакции дисульфидного обмена превращается в легко уходящую группу — тио-пиридин [55] (рис. 11).

**Триазольный метод (метод диполярного циклоприсоединения).** 1,3-Диполярное циклоприсоединение азидов и алкинов, катализируемое Cu(I), с образованием 1,2,3-триазольного пятичленного цикла относится к классу реакций, называемых клик-химией (click chemistry). Введение азидной или алкильной группы в макромолекулу биологического компонента не приводит к выраженному изменению его свойств и структуры, кроме этого, образование триазольного цикла происходит необратимо и количественно [56] (рис. 12).

Иммунизация биологического компонента на поверхность сенсора осуществляется как на матрицу, функционализированную ацетиленовыми группами [56], так и на  $N_3$ -матрицу (матрица активирована азидными группами) [57] (рис. 13).

В табл. 2 приведена совокупность реакций, используемых для ковалентной иммобилизации биологического компонента на поверхности сенсора в

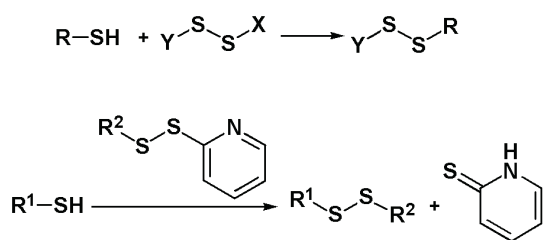


Рис. 11. Иммунизация методом дисульфидного обмена.

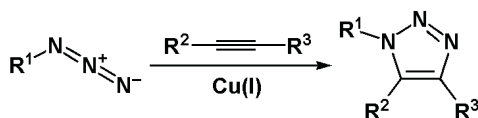


Рис. 12. Реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения.

случае CM-декстрановых ППР-биочипов (BiaCore) [19].

### Подходы к унификации методов ковалентной иммобилизации

Как уже упоминалось, ковалентная иммобилизация биологического компонента происходит за счет активных функциональных групп как находящихся на поверхности сенсора, так и принадлежащих биологическому компоненту. Поэтому требуемая функционализация может быть осуществлена на поверхности сенсора или на биологическом компоненте. Наиболее рациональным подходом, по-видимому, являются операции на поверхности сенсора, поскольку манипуляции с биологическим компонентом зачастую приводят к его структурным и функциональным изменениям. Наиболее употребительными матрицами в процессах ковалентной иммобилизации являются COOH- и NH<sub>2</sub>-матрицы, функциональные группы которых легко трансформируются с образованием других функциональных матриц (см. рис. 2).

Поверхность сенсора функционализируют и производят иммобилизацию при помощи описанных выше методов. Биологический компонент содержит свободные амино(-NH<sub>2</sub>)- или тио(-SH)группы, участвующие в реакции иммобилизации. Если в качестве биологического компонента используются сахара, их

гидроксильные (—OH) группы окисляются до альдегидных (—CHO) групп (табл. 3).

### Методы функционализации поверхности наночастиц

Поверхностная функционализация наночастиц приводит к образованию матрицы, которая участвует в дальнейших процессах иммобилизации на поверхности наночастиц необходимых биологических компонентов. Так как наночастицы обладают малыми размерами, к ним невозможно применить классификацию матриц, которая используется в случае пленок (2D-, 3D- и слоистые матрицы).

В большей части случаев наночастицы, обладающие плазмонным эффектом (наночастицы золота и серебра), получают восстановлением Au(III) и Ag(I) цитратом натрия, который в процессе получения наночастиц выполняет роль восстановителя и стабилизирующего агента. Коллоидная система становится устойчивой за счет действия отталкивающих электростатических сил между коллоидными частицами, которое обусловлено отрицательным зарядом цитрат-анионов. Эти анионы легко замещаются другими молекулами, которые содержат группы, имеющие высокое сродство к поверхности золота или серебра (—SH, —CN, —NH<sub>2</sub>). Посредством этих групп осуществляется адсорбция белков или молекул ДНК на поверхность наночастицы.

Для того чтобы стало возможным применение наночастиц в биоаналитических методах, необходимо следовать определенной стратегии поверхностной функционализации этих наночастиц, которая заключается в том, что функционализация должна приводить к хорошей растворимости наночастиц в водной среде, обеспечивать необходимую поверхностную функциональную активность при связывании с биологическим компонентом и предоставлять условия для сохранения коллоидной устойчивости наночастиц.

Такая стратегия реализуется при помощи реакций так называемого лигандного обмена (ligand exchange reaction), которые представляют собой процесс замещения исходных лигандов (выступающих в роли стабилизирующих агентов при получении наночастиц) гидрофильными лигандами, которые харак-

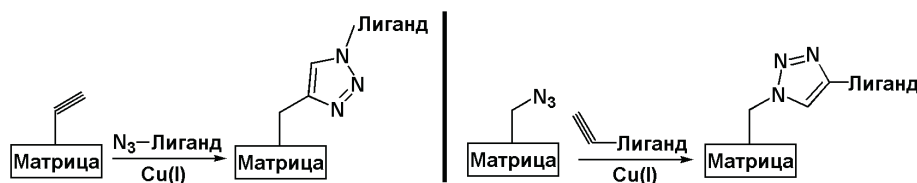
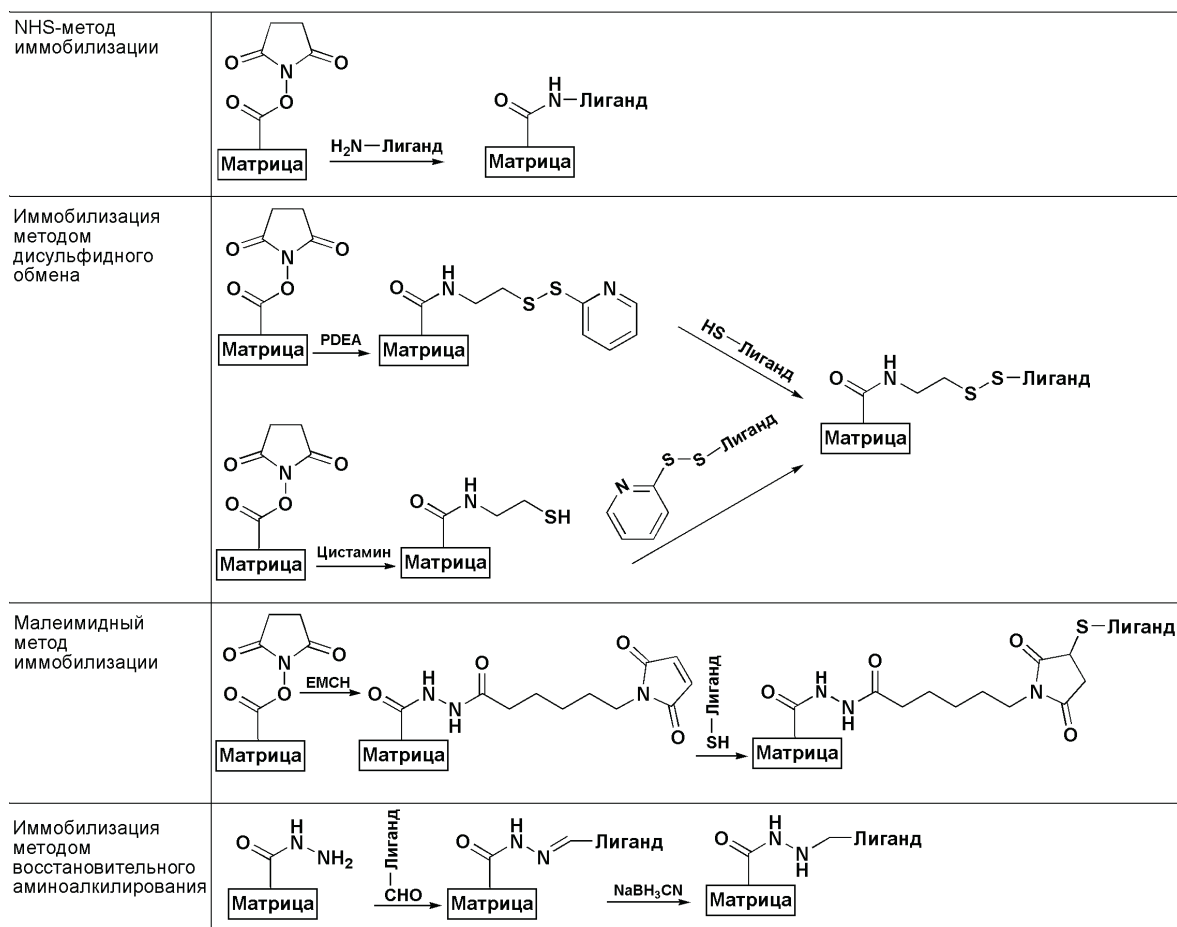


Рис. 13. Триазольный метод иммобилизации.

Таблица 2

## Ковалентная иммобилизация СМ-декстрановых биочипов



Примечание. PDEA — 2-(2-пиридинилдитио)этаноламин; EMCH — гидразид N-[ε-малеимидапроновой кислоты].

теризуются более прочной степенью связываемости с поверхностью наночастицы. Исходный стабилизирующий слой в основном состоит из цитрат-анионной оболочки (при получении наночастиц цитратным методом) или из гидрофобного лигандного слоя (при использовании длинноцепочечных алкантиолов для получения коллоидов) [58, 59]. Молекула, на которую обменивается исходный стабилизирующий лиганд, содержит в себе две функциональные группы: тиольную ( $-\text{SH}$ ) или дисульфидную ( $-\text{S}-\text{S}-$ ) группу, при помощи которой происходит прочное связывание молекулы с поверхностью наночастицы за счет высокого сродства атома серы к золоту или серебру, и концевую активную группу, при помощи которой происходит иммобилизация биологического компонента к поверхности наночастицы (гидроксилы ( $-\text{OH}$ ), карбоксилы ( $-\text{COOH}$ ), амины ( $-\text{NH}_2$ ),

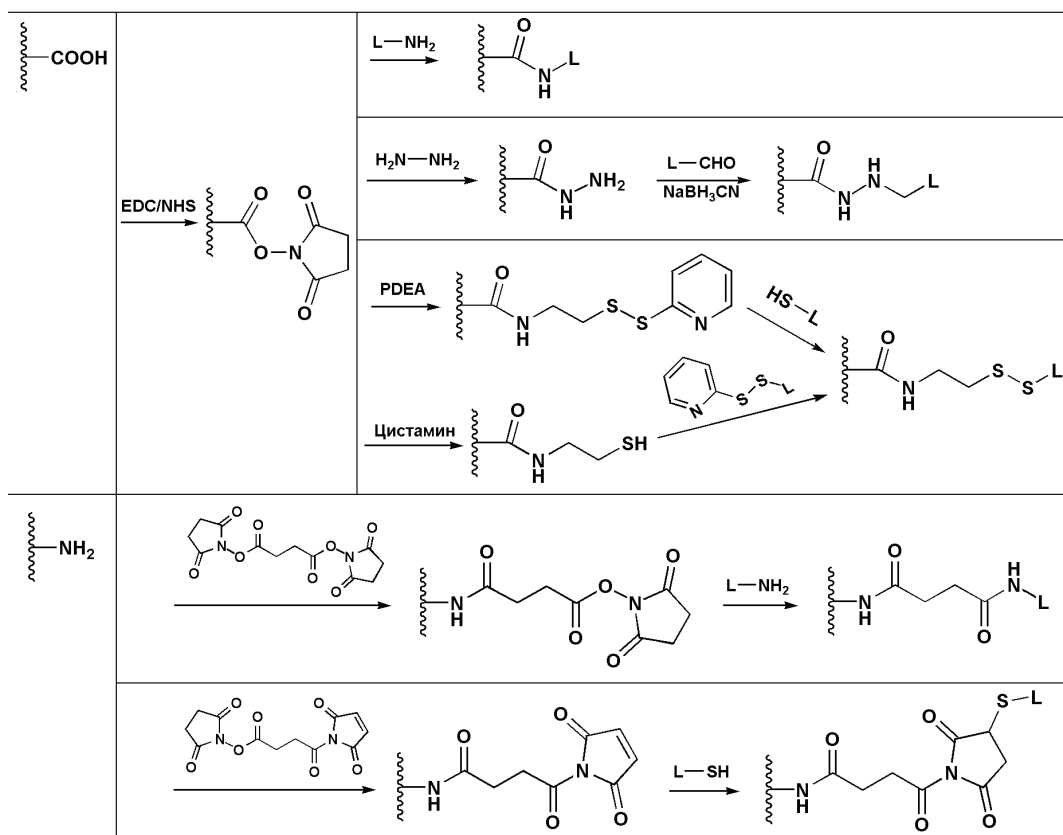
азиды ( $-\text{N}_3$ ), малеимиды, сахара, аминокислоты, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты) (рис. 14) [60–62].

Поверхностная функционализация наночастиц обеспечивает хорошую растворимость наночастиц в водной среде, наличие требуемых функциональных групп на поверхности наночастиц и коллоидную устойчивость в стандартных физиологических условиях.

На следующем этапе производится иммобилизация биологического компонента на поверхность наночастиц. Как и для пленочных матричных структур, методы иммобилизации на поверхности наночастиц делятся по типу связывания на физические, биоаффинные и ковалентные методы иммобилизации [63] (рис. 15).

Таблица 3

Унификации методов ковалентной иммобилизации



Примечание. L — лиганд.

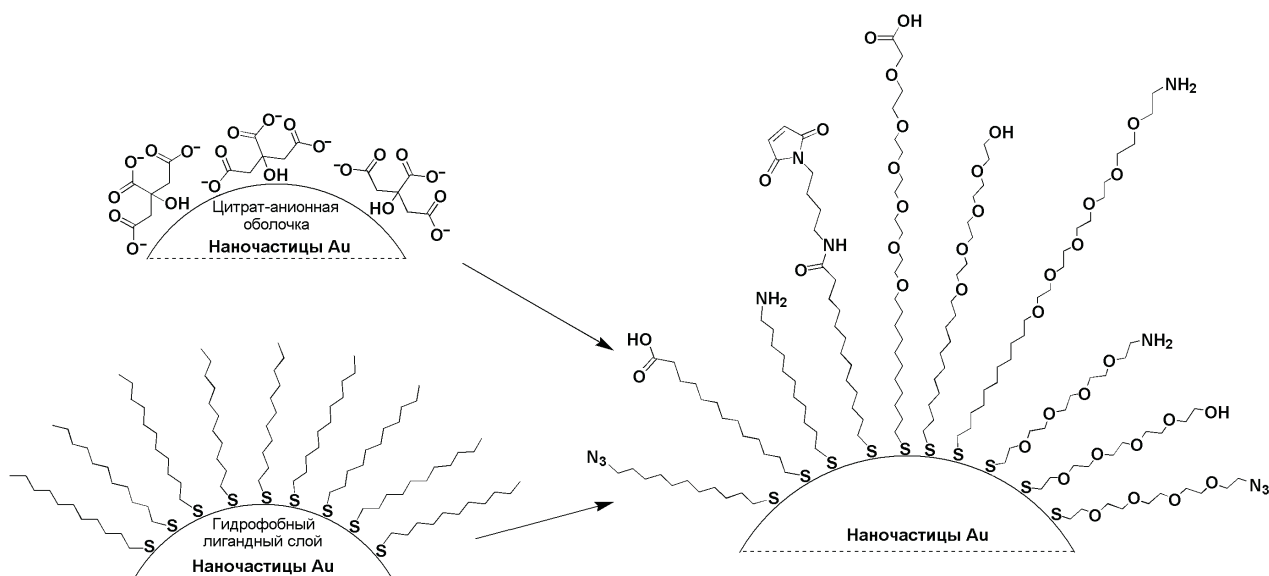


Рис. 14. Реакция лигандного обмена.

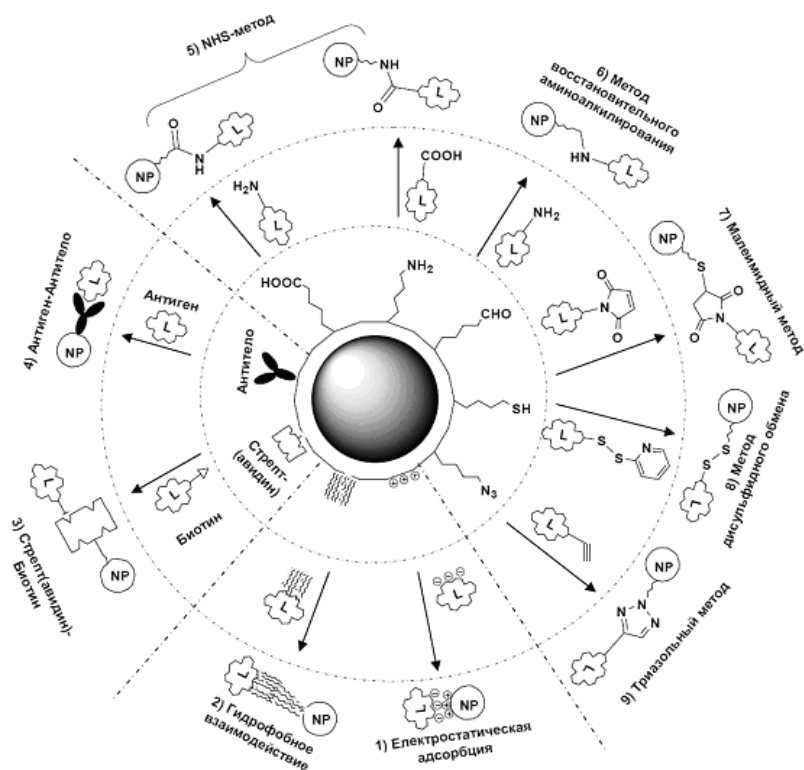


Рис. 15. Методы иммобилизации на поверхности наночастиц: 1, 2 — физическая иммобилизация; 3, 4 — биоаффинная иммобилизация; 5—9 — ковалентная иммобилизация.

### Методы функционализации поверхности графена

Графен, используемый в практических целях, является окисью графена и представляет монослойный материал, получаемый отшелушиванием окисленного графита. Монослойная пластинка обычного графита характеризуется ван-дер-ваальсовой толщиной порядка 0,34 нм, однако монослойная пластинка окиси графена обладает большей величиной толщины благодаря смещению  $sp^3$ -гибридизированных атомов углерода выше и ниже исходной графеновой плоскости и наличию ковалентно связанных атомов кислорода на поверхности. Оптические свойства оксида графена обусловлены наличием кислородсодержащих групп —O, —OH и —COOH [64]. Поверхность пластинки графена имеет сильный отрицательный заряд, который обусловлен ионизацией карбоксильных и гидроксильных групп, входящих в состав графена. Изучение состава кислородсодержащих групп при помощи спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  показало, что базальная плоскость пластинки графена состоит из гидроксильных и эпоксидных групп с малым содержанием карбоксильных групп на краях пластинки. Эти функциональные группы обеспечивают активные центры для различных ре-

акций последующей иммобилизации биологического компонента к поверхности графена. Методы приготовления и функционализации графена рассмотрены в обзоре [65], здесь же освещены потенциальные возможности использования сенсоров на его основе.

Как и в других случаях, методы иммобилизации на поверхность графена можно также разделить на физические и химические. При нековалентной иммобилизации взаимодействие между поверхностью и биологическим компонентом происходит за счет электростатических и ван-дер-ваальсовых сил.  $sp^2$ -Конфигурация пластинки графена обеспечивает  $\pi$ — $\pi$ -взаимодействие с ароматическими и сопряженными соединениями. Оксид графена гидрофильный, в отличие от гидрофобного графена [66], оксид обладает высокой адсорбционной способностью и возможностью связываться с биомолекулами. Гидрофобные взаимодействия с графеном и оксидом графена используют для иммобилизации ДНК [67], полимеров и др.

Ковалентные методы иммобилизации осуществляются за счет краевых карбоксильных групп и базальных эпоксидных (гидроксильных) групп. Их взаимодействие с изоцианатами приводит к образованию устойчивых амидов и карбаматов. Методами

функциональной трансформации были получены матрицы графена, содержащие аминоксипы ( $\text{NH}_2$ ), к которым применимы методы иммобилизации, описанные в предыдущих разделах. Поскольку поверхность графена характеризуется  $sp^2$ -гибридизацией атомов углерода, для ковалентной иммобилизации используются химические реакции, основанные на таком свойстве атомов, — реакции азосочетания, фотохимические реакции присоединения и реакция Дильса — Альдера. Для ковалентной иммобилизации к поверхности графена часто используют триазольный метод иммобилизации [68, 69]. Большинство реакций для ковалентной функционализации углеродных нанотрубок, описанных в работе [70], могут также применяться и для графена.

### Новейшие разработки и применения сенсоров на основе ППР и ЛППР

#### Использование наночастиц для повышения чувствительности

Существенный вклад в чувствительность дает использование наночастиц (НЧ), масса которых значительно больше массы исследуемых молекул. Обзор [71] посвящен использованию золотых наночастиц для усиления сигнала ППР. В нем рассмотрены различные составляющие повышения чувствительности — увеличение массы адсорбированных частиц, увеличение соотношения площади поверхности и взаимодействие поля ЛППР с ППР. Обзор [72] посвящен применению новых наноструктур золота (наночастиц и нанопроволок) в сенсорных приложениях. В обзоре [15] рассматривается использование различных типов наночастиц для биологических и химических сенсоров. Перспективным является совместное применение волноводов с покрытием наночастицами золота [73]. Для отождествления неизвестных молекул в пробе возможно использовать совмещение ЛППР измерений с усиленным поверхностью комбинационным рассеянием.

Высокочувствительная схема определения протромбина с использованием двух типов аптамеров\* предложена в работе [74]. Один биотинилированный аптамер протромбина (ТВА15) иммобилизовали на поверхность сенсора, покрытую декстраном и модифицированную стрептавидином, а другой аптамер протромбина, модифицированный тиолом (ТВА29), иммобилизовали на наночастицах золота (AuНЧ). Через ячейку сенсора сначала пропускали раствор аналита, а потом раствор AuНЧ с ТВА29, которые

связываются с протромбином. Отклик сенсора линейно пропорционален концентрации протромбина в диапазоне 0,5—75 нМ. Чувствительность метода 0,1 нМ. Сенсор можно регенерировать 2 М раствором NaCl. После проведения 100 циклов иммобилизации-регенерации чувствительность снизилась менее чем на 5 %. Подобная схема была использована для определения прогестерона [75].

Обычно в экспериментах по ППР с наночастицами Au поверхность плоской пленки золота покрывают аналитом мишени, а поверхность наночастиц — аналитом захвата. Образуется структура из наночастиц, отделенных от поверхности сенсора молекулами мишени и захвата. В работе [76] показано, что максимальное усиление сигнала ППР при взаимодействии AuНЧ с плоской поверхностью золота происходит при толщине промежуточного слоя, равной 5 нм, и предлагают использовать дитиотретиол (dithiothreitol) для обеспечения нужного зазора. Для сферических AuНЧ размером от 40 до 80 нм максимальное усиление сигнала ППР наблюдается для частиц размером 40 нм (возбуждение лазером с длиной волны 785 нм).

#### Применение графена для усиления ППР

Графен представляет собой двумерную гексагональную решетку углерода толщиной в один атом. Этот материал имеет уникальные механические и химические свойства [77], в частности максимально известную подвижность электронов [78], сильно поглощает свет в видимой и ближней ИК-области света [79]. Графен имеет рекордно большой коэффициент теплопроводности, вследствие чего ППР дает основной вклад в фототермические эффекты в материалах на основе графена [80].

В работе [81] представлен теоретический расчет сечения поглощения и рассеивания для системы AuНЧ в водном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) на подложке из графена. Показано, что адсорбция БСА на AuНЧ приводит к ослаблению сил Ван-дер-Ваальса между НЧ и усиливает стабильность частиц. Обосновано красное смещение пика плазмонного резонанса при наличии БСА.

Предложена новая экспериментальная методика для исследования тропизма\*\* патогенных бактерий на основе использования электрофорезного/электрофоретического осаждения пленок редуцированного оксида графена (РОГ) на поверхность золотой подложки для возбуждения ППР [82]. Для моди-

\* Небольшие молекулы нуклеиновых кислот, которые могут выполнять функции высокоспецифических рецепторов низкомолекулярных органических соединений.

\*\* Тропизм — реакция ориентирования клетки, т. е. направление роста или движения клеток относительно раздражителя.

фикации поверхности РОГ использовали лиганды с различной степенью заряда. Сделан вывод, что электростатические взаимодействия более существенны, чем  $\pi$ — $\pi$ -взаимодействия захвата, и аффинность бактерий определяется локальным зарядом вблизи связывающих сайтов. При исследовании бактерий с помощью бактериофагов важное значение имеет соотношение их размеров [83]. Использование РОГ позволяет исследовать различные штаммы *E. coli* без ограничений в размерах бактериофагов [82].

ППР-сенсор на основе оксида графена позволяет регистрировать связывание протеинов [64]. В работе использовано осаждение пластинок оксида графена на поверхность пленки золота, обработанную цистамином. Показано, что использование оксида графена в ППР-сенсорах позволяет увеличить порог определения с 10 нг/мл до 100 пг/мл и расширить линейный диапазон измерения концентрации протеинов. Авторы [84] использовали аналогичную модель с призмой из халькогенидного стекла. Точность данного сенсора возрастает в 16 раз в ближней ИК-области по сравнению с видимой областью.

Предложен суперчувствительный метод для детектирования ДНК-гибридизации [85]. ППР-чипы с графеновым покрытием нековалентно модифицировали золотыми нанозвездами, несущими однонитевые ДНК. Нанозвезды удерживались за счет взаимодействия ДНК с поверхностью графена. При гибрилизации с комплементарной ДНК происходит десорбция нанозвезд с поверхности сенсора. Предел чувствительности метода  $\sim 0,5 \cdot 10^{-15}$  М, а линейный диапазон измерений — до  $10^{-8}$  М. На основе изложенной концепции возможно исследование комплементарных ДНК с большой точностью.

Другой метод детектирования ДНК-гибридизации на графеновом покрытии основан на непрямом конкурентном ингибировании [67]. Конкурирующим реагентом выступают AuНЧ с иммобилизованными одиночными ДНК. Предел чувствительности метода 10 фМ, линейный диапазон от  $10^{-14}$  до  $10^{-6}$  М. Выигрыш в чувствительности по сравнению с немодифицированной конкурирующей меткой составляет  $10^7$ .

В работе [77] предложена методика выращивания наночастиц серебра (AgНЧ) на квантовых точках (КТ) графена. Последние представляют собой пластины графена с продольными размерами  $< 100$  нм. При этом КТ графена полностью выполняют функции стабилизатора и восстановителя. Окраска раствора полученных структур тускнеет в присутствии  $H_2O_2$  пропорционально концентрации последнего. Это позволяет производить колориметрическое определение  $H_2O_2$ . Чувствительность данного метода как

минимум на порядок выше ранее известных методов определения  $H_2O_2$ .

На основе графена создан чувствительный и регенерируемый электрохимический ППР-сенсор для определения  $\alpha$ -тромбина [86]. Сопротивление переноса заряда линейно связано с логарифмом концентрации  $\alpha$ -тромбина в диапазоне 0,03—200 нМ.

Для визуализации границ раздела между отдельными кристаллическими фрагментами графена используется возбуждение поверхностных плазмонов с помощью наномантенны в инфракрасном диапазоне [87]. Предложенная методика основана на анализе интерференционных картин и позволяет выявлять границы отдельных фрагментов, а также исследовать оптические и электронные свойства конкретных границ раздела между пластинами графена.

### **Влияние параметров ППР-сенсоров на чувствительность**

Несмотря на бурное и довольно длительное использование явления ППР, все еще не определены идеальные параметры сенсоров. Ряд последних работ посвящен влиянию на чувствительность метода таких параметров, как объем ячейки [88] и термостабильность измерений [89]. Для повышения чувствительности метода ППР предложено использовать диэлектрическое покрытие или би- и трехслойные металлические несущие слои [90], а также пористые металлические пленки, осажденные по нетрадиционной технологии [91].

Особенности дизайна сенсоров на основе ППР и ЛППР рассматриваются в работе [92]. В работе [93] описано эффективное приложение, которое позволяет определять концентрацию и константы связывания на основе ППР-измерений.

### **Некоторые примеры практических применений сенсоров на основе ППР и ЛППР**

Сенсоры на основе ППР применяют в таких областях, как медицинская диагностика и мониторинг лечения, биотехнология [94], мониторинг окружающей среды, тестирование безопасности продуктов [95], фармацевтические приложения [10, 96]. Отдельный обзор посвящен применению ППР для клинических анализов [7].

Для исследования клеток требуются специальные условия. Например, клетки активных бактерий могут представлять определенную опасность, культуры живых клеток, как правило, требуют стерильных условий, стабильного состава питательной среды и могут существовать в ограниченном температурном диа-

пазоне. Обзор [11] посвящен исключительно измерениям на основе ППР с использованием живых клеток. В нем также рассмотрены методы иммобилизации клеток на поверхности. Авторы [97] продемонстрировали возможность использования клеток в качестве аналитов.

В работе [98] рассмотрены реакции взаимодействия каротиноидов с такими белками, как альбумин сыворотки человека,  $\beta$ -лактоглобулин и др. связывающие белки; показано, что ППР-сенсоры могут с успехом применяться для исследования механизмов связывания со значительной экономией времени и материала образцов.

Разработан регенерируемый сенсор для определения в сыворотке антигена плоскоклеточной карциномы на основе возбуждения ЛППР [99]. Линейный диапазон измерений составляет 0,1—1000 пМ. Регенерация 50 мМ раствором глицин — HCl (pH 2,0) позволяет сократить время измерений и стоимость анализа. Сенсор имеет высокую чувствительность и селективность, не требует дополнительных разведений и длительного времени проведения анализа.

Для больных с глиомой головного мозга исследования эритроцитарной массы крови с помощью ППР [100] дают возможность определять степень злокачественности опухоли.

### Плазмонные совершенные поглотители

С развитием новых технологий для создания поверхностей для возбуждения локального плазмонного резонанса (ЛППР) возникло новое направление — плазмонные совершенные поглотители (ПСП, *plasmonic perfect absorbers*) [101]. Наиболее типичной геометрией для ПСП является слой периодических металлических наночастиц, отделенный диэлектрической прослойкой от металлической пленки, нанесенной на стеклянную подложку. В такой системе усиление сигнала происходит как за счет ППР на плоской поверхности металлической пленки, так и за счет усиления на двумерной решетке нанобъектов. Варьируя параметры системы, можно варьировать оптимальную длину волны, которая может сдвигаться вплоть до терагерцового диапазона [102]. В работе [101] теоретически исследованы моды ПСП геометрии для волн в диапазоне 600—1500 нм для углов возбуждения  $0^\circ$ — $70^\circ$ , проанализированы спектры рассеивания, отражения и пропускания. Для биосенсорных приложений предложено использовать второй пик поглощения, положение которого зависит от угла возбуждения. Полное поглощение для схемы, рассмотренной в работе [101], наблюдается при  $\lambda = 950,9$  нм и  $\theta = 54,1^\circ$ .

### Сочетание ППР с электрохимическими исследованиями

Сочетание ППР с электрохимическими исследованиями приводит к новым возможностям, которые использованы в ряде работ [103—108].

В работе [103] применена геометрия Кречмана с воздействием внешнего напряжения на Au-электроды. Предложена теоретическая модель, которая учитывает неоднородность поверхности и зависимость параметров системы от напряжения и позволяет рассчитать количество адсорбированных биомолекул при воздействии внешнего поля.

При возбуждении ППР на дифракционных решетках с напыленным островковым слоем меди на поверхности возможно переключение между различными резонансными длинами волн при прикладывании внешнего напряжения [104]. Электрохимические ППР-измерения применяются для определения коэффициента переноса квазиобратимой окислительно-восстановительной реакции [105].

Работа [106] посвящена совмещенным исследованиям ЛППР и электрохимической импеданс-спектроскопии на осажденном на стеклянную подложку оксиде индия и олова (ОИО), модифицированном наночастицами Au. Циклическая вольтамперометрия применялась для осаждения AuНЧ на поверхность ОИО. Показано, что размер кластеров AuНЧ существенно зависит от концентрации KCl в растворе и от приложенного потенциала. Данная схема практически применялась для обнаружения ДНК-гибридизации соответствующей точечной мутации F<sub>i</sub> в гене аполипопротеина E, связанной с прогрессированием болезни Альцгеймера. Минимальные регистрируемые концентрации составляли 512 и 286 нМ соответственно для ЛППР и электрохимической импеданс-спектроскопии. Похожая схема применена в работе [107], но наночастицы золота наносили методом наносферной литографии. Исследованы морфологические изменения  $\alpha$ S олигомеров при взаимодействии с малыми молекулами.

В работе [108] электрохимические ППР-измерения использованы для исследования иммобилизации антител и влияния контроля ориентации связывающих сайтов антигена. Порог определения биотина составляет 0,102 нг/мл.

### Заключение

В течение последних трех десятилетий своего развития метод поверхностного плазмонного резонанса нашел широкое применение в различных областях исследований, связанных с аффинными биомолекулярными взаимодействиями: при изучении иммунологических реакций, свойств поликлональных антител, конформационных характеристик



белковых молекул, для картографирования эпитопов связывания, определения параметров взаимодействий фермент — субстрат, ДНК-гибридизации, диагностики вирусных заболеваний и многих других. Ввиду такого многообразия объектов исследования для формирования биорецепторных слоев на поверхности ППР-сенсоров потребовалась разработка разнообразных методов иммобилизации биологических компонентов, соответствующих условиям конкретных экспериментальных ситуаций.

Особенно важную роль технология иммобилизации биомолекул на твердой поверхности приобретает при создании высокоэффективных иммуносенсоров. Идеальная методика иммобилизации антител должна удовлетворять очень высоким требованиям, которые включают: оптимальную и единообразную ориентацию молекул на поверхности сенсора, минимально возможное воздействие на их конформацию и мягкие условия проведения процесса инкубации.

Большое разнообразие методов иммобилизации, разработанных к настоящему времени, в большинстве случаев позволяет выбрать оптимальные варианты для каждого конкретного исследования. Вместе с тем продолжается интенсивный поиск новых подходов и методов для расширения возможностей метода ППР. При этом в последнее время акцент делается на внедрение нанотехнологий и использование новых материалов, таких как графен, углеродные нанотрубки и наночастицы золота.

Авторы выражают благодарность Бекетову Г. В. за полезное обсуждение работы. Первый автор благодарит Швейцарский национальный научный фонд (SNSF, Берн) за поддержку и частичное финансирование настоящей работы по проекту IZ73Z0\_152661 (SCOPES).

### Литература

- Liedberg B., Nylander C., Lunström I. // *Sensors and Actuators*. — 1983. — **4**. — P. 299.
- <http://www.biacore.com>.
- Guo X. // *J. Biophotonics*. — 2012. — **5**. — P. 483.
- Homola J. // *Chem. Rev.* — 2008. — **108**. — P. 462—493.
- Kodoyianni V. // *BioTechniques*. — 2011. — **50**. — P. 32—40.
- Situ C., Mooney M. H., Elliott C. T. et al. // *Trends Anal. Chem.* — 2010. — **29**. — P. 1305—1315.
- Mariani S., Minunni M. // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2014. — **406**. — P. 2303.
- Šipová H., Homola J. // *Anal. chim. acta*. — 2013. — **773**. — P. 9.
- Nguyen H. H., Park J., Kang S., Kim M. // *Sensors*. — 2015. — **15**. — P. 10481—10510.
- Coutre M., Zhao S. S., Masson J.-F. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2013. — DOI: 10.1039/c3cp50281c.
- Abadian P. N., Kelley C. P., Goluch E. D. // *Anal. Chem.* — 2014. — **86**. — P. 2799.
- Снопко Б. А. // *Теорет. и эксперим. химия*. — 2012. — **48**, № 5. — С. 265—285. — [Theor. Exp. Chem. — 2012. — **48**, N 5. — P. 283—306 (Engl. Transl.)].
- Дмитрук Н. Л., Литовченко В. Г., Стрижевский В. Л. Поверхностные поляритоны в полупроводниках и диэлектриках / Ин-т полупроводников АН УССР. — К. : Наук. думка, 1989.
- Kretschmann E., Raether H. // *Z. Naturforsch. A*. — 1968. — **23**. — P. 2135—2136.
- Zeng S., Baillargeat D., Ho H.-P., Yong K.-T. // *Chem. Soc. Rev.* — 2014. — **43**. — P. 3426.
- Ma X., Wang M.-C., Feng J., Zhao X. // *J. Alloys and Compounds*. — 2015. — **637**. — P. 36—43.
- Ryo Takahata, Seiji Yamazoe, Kiichirou Koyasu, Tatsuya Tsukuda // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2014. — DOI: 10.1021/ja503558c.
- Green R. J., Frazier R. A., Shakeshel K. M. et al. // *Biomaterials*. — 2000. — **21**. — P. 1823—1835.
- Biacore sensor surface handbook BR-1005-71 Edition AB*. — General Electric Co., 2005. — P. 15—19.
- Love J. C., Estroff L. A., Kriebel J. K. et al. // *Chem Rev.* — 2005. — **105**. — P. 1103.
- Ulman A. // *Ibid.* — 1996. — **96**. — P. 1533.
- Peeters S., Stakenborg T., Reekmans G. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2008. — **24**. — P. 72.
- Zhang S. G. // *Nature Mater.* — 2004. — **3**. — P. 7—8.
- Lofas S., Johnson B. J. // *Chem. Soc. Chem. Commun.* — 1990. — **21**. — P. 1526—1528.
- Kyprianou D., Guerreiro A. R., Nirschl M. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2010. — **25**. — P. 1049—1055.
- Lahiri J., Isaacs L., Tien J., Whitesides G. M. // *Anal. Chem.* — 1999. — **71**. — P. 777—790.
- Zareie H. M., Boyer C., Bulmus V. et al. // *ACS Nano*. — 2008. — **2**. — P. 757—765.
- Kambhampati D. K. M., Robertson J. W., Cai M. et al. // *Langmuir*. — 2001. — **17**. — P. 1169—1175.
- Manesse M., Stambouli V., Boukherroub R., Szunerits S. // *Analyst*. — 2008. — **133**. — P. 1097—1103.
- Lockett M. R., Weibel S. C., Philips M. F. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2008. — **130**. — P. 8611—8615.
- Wu L., Chu H. S., Koh W. S., Li E. P. // *Opt. Express*. — 2010. — **18**. — P. 14395—14400.
- Verma R., Gupta B. D., Jha R. // *Sensors and Actuators B*. — 2011. — **160**. — P. 623—631.
- Yuan J., Oliver R., Li J. et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. — 2007. — **23**. — P. 144—148.
- Kopitzki S., Jensen K. J., Thiem J. // *Chem. Eur. J.* — 2010. — **16**. — P. 7017—7029.
- Hermanson G. T. *Bioconjugate techniques*. — San Diego, CA : Acad. press, 2008.
- Liu S., Vareiro M., Fraser S., Jenkins A. T. A. // *Langmuir*. — 2005. — **21**. — P. 8572—8575.
- Manakhov A., Moreno-Couranjou M., Boscher N. D. et al. // *Plasma Processes and Polymers*. — 2012. — **9**. — P. 435—445.

38. *Uzun L., Turner A. P. F.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2015. — <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.013>.
39. *Habauzit D., Chopineau J., Roig B.* // Anal. Bioanal. Chem. — 2007. — **387**. — P. 1215—1223.
40. *Shankaran D. R., Gobi K. V. A., Miura N.* // Sensors and Actuators B. — 2007. — **121**. — P. 158—177.
41. *Zhang Q.* // Anal. Biochem. — 2014. — **463**. — P. 7—14.
42. *Wang H., Ramakrishnan A., Fletcher S., Prochownik E. V.* // J. Biol. Methods. — 2015. — **2**, N 2. — P. e18. — DOI: 10.14440/jbm.2015.54.
43. *Liu Y., Dong Y., Jauw J. et al.* // Anal. Chem. — 2010. — **82**. — P. 3679—3685.
44. *Chen Y., Nguyen A., Niu L., Corn R. M.* // Langmuir. — 2009. — **25**. — P. 5054—5060.
45. *Smith C. L., Milea G. S., Nguyen G. H.* // Top. Curr. Chem. — 2005. — **261**. — P. 63—90.
46. *Wegner G. J., Lee H. J., Marriotti G., Corn R. M.* // Anal. Chem. — 2003. — **75**. — P. 4740—4746.
47. *Islam N., Shen F., Gurgel P. V. et al.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2014. — **58**. — P. 380.
48. *Homola J.* // Chem. Rev. — 2008. — **108**. — P. 462—493.
49. *Surface plasmon resonance: Methods in molecular biology* / Eds. N. J. de Mol, M. J. E. Fischer. — Humana press, 2010. — Vol. 627. — P. 55—73.
50. *Patel N., Davies M. C., Hartshorne M. et al.* // Langmuir. — 1997. — **13**. — P. 6485—6490.
51. *Fernandez-Lafuente R., Rosell C. M., Rodriguez V. et al.* // Enzyme and Microbial Technology. — 1993. — **15**. — P. 546—550.
52. *Taylor A. D., Ladd J., Etheridge S. et al.* // Sensors and Actuators B. — 2008. — **130**. — P. 120—128.
53. *Mateo C., Fernandez-Lorente G., Abian O. et al.* // Biomacromolecules. — 2000. — **1**. — P. 739—745.
54. *Viitala T., Vikholm I., Peltonen J.* // Langmuir. — 2000. — **16**. — P. 4953—4961.
55. *Ishi T., Yamada M., Hirase T., Nagasaki Yu.* // Polymer J. — 2005. — **37**. — P. 221—228.
56. *Zhang Y., Luo S., Tang Y. et al.* // Anal. Chem. — 2006. — **78**. — P. 2001—2008.
57. *Collman J. P., Devaraj N. K., Eberspacher T. P. A., Chidsey C. E. D.* // Langmuir. — 2006. — **22**. — P. 2457—2464.
58. *Gittins D. I., Caruso F.* // ChemPhysChem. — 2002. — **3**. — P. 110—113.
59. *Giersig M., Mulvaney P.* // Langmuir. — 1993. — **9**. — P. 3408—3413.
60. *Zou X., Bao H., Guo H. et al.* // J. Colloid and Interface Sci. — 2006. — **295**. — P. 401—408.
61. *Wang, T., Zhang D., Xu W. et al.* // Langmuir. — 2002. — **18**. — P. 8655—8659.
62. *Sakura T., Takahashi T., Kataoka K., Nagasaki Y.* // Colloid and Polym. Sci. — 2005. — **284**. — P. 97—101.
63. *Bijua V.* // Chem. Soc. Rev. — 2014. — **43**. — P. 744—764.
64. *Chiu N.-F., Huang T.-Y.* // Sensors and Actuators B. — 2014. — **197**. — P. 35.
65. *Gao H., Duan H.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2015. — **65**. — P. 404—419.
66. *Nair R. R., Wu H. A., Jayaram P. N. et al.* // Science. — 2012. — **335**, N 6067. — P. 442—444.
67. *Xue T., Cui X., Guan Q. et al.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2014. — **58**. — P. 374—379.
68. *Dreyer D. R., Park S., Bielawski C. W., Ruoff R. S.* // Chem. Soc. Rev. — 2010. — **39**. — P. 228—240.
69. *Eigler S., Hirsch A.* // Angew. Chem. Int. Ed. — 2014. — **53**. — P. 2—21.
70. *Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M.* // Chem. Rev. — 2010. — **106**. — P. 1105.
71. *Szunerits S., Spadavecchia J., Boukherroub R.* // Rev. Anal. Chem. — 2014. — **33**. — P. 153.
72. *Yuanchao Z., Chu W., Foroushani A. D. et al.* // Materials. — 2014. — **7**, N 7. — P. 5169—5201. DOI: 10.3390/ma7075169.
73. *Cao J., Sun T., Grattan K. T. V.* // Sensors and Actuators B. — 2014. — <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.056>.
74. *Bai Y., Feng F., Zhao L. et al.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2013. — **47**. — P. 265.
75. *Yuan J., Oliver R., Li J. et al.* // Ibid. — 2007. — **23**. — P. 144.
76. *Islam N., Shen F., Gurgel P. V.* // Ibid. — 2014. — **58**. — P. 380—387.
77. *Chen S., Hai X., Chen X.-W., Wang J.-H.* // Anal. Chem. — 2014. — **86**. — P. 6689.
78. <https://en.wikipedia.org/wiki/Graphene>.
79. *Hanson G. W.* // J. Appl. Phys. — 2008. — **103**. — P. 064302.
80. *Parmar J., Jang S., Soler L. et al.* // Lab. Chip. — 2015. — **15**. — P. 2352—2356. — DOI: 10.1039/C5LC90047F.
81. *Phan D., Hoang T. X., Nghiem T. H. L., Woods L. M.* // Surface plasmon resonances of protein-conjugated gold nanoparticles on graphitic substrates. — Aug. 2013. — P. 5.
82. *Subramanian P., Barka-Bouaifel F., Bouckaert J. et al.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. — 2014. — **6**. — P. 5422.
83. *Oh B.-K., Lee W. Y., Chun B. S. et al.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2005. — **20**. — P. 1847.
84. *Maharana P. K., Jha R.* // Sensors and Actuators B. — 2012. — **169**. — P. 161.
85. *Zagorodko O., Spadavecchia J., Serrano A. Y. et al.* // Anal. Chem. — 2014. — **86**. — P. 11211.
86. *Wang L., Zhu C., Han L. et al.* // Chem. Commun. — 2011. — **47**. — P. 7794—7796.
87. *Zhang, P. Chen Y. P., Guo J. S. et al.* // Water Res. — 2014. — **57**. — P. 31—39.
88. *Lynn N. S., Šípová H., Adam P., Homola J.* // Lab Chip. — 2013. — **13**. — P. 1413.
89. *Dorozinsky G., Maslov V., Samojlov A., Ushenin Y.* // Amer. J. Opt. Photonics. — 2013. — **1**. — P. 17.
90. *Wang Z., Cheng Z., Singh V. et al.* // Anal. Chem. — 2014. — **86**, N 3. — P. 1430—1436. — DOI: 10.1021/ac402126k.
91. *Dorozinsky G., Doroshenko T., Maslov V.* // J. Sensor Technology. — 2015. — **5**. — P. 54—61.
92. *Oliveria L. C., Lima A. M. N., Thirstrup C., Neff H. F.* // Surface Plasmon Resonance Sensors. — 2015. — P. 19—25.
93. *Feng F., Kepler T. B.* // PLoS ONE. — 2015. — **10**, N 6. — P. e0130812. DOI: 10.1371/journal.pone.0130812.

94. *Nguyen P.-C. T., Lewis K. B., Ettinger R. A. et al.* // Blood. — 2014. — **123**, N 17. — P. 2732—2739.
95. *Zhu Z., Feng M., Zuo L. et al.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2015. — **65**. — P. 320—326.
96. *Crauste C., Willand N., Villemagne B. et al.* // Analytical Biochemistry. — 2014. — **452**. — P. 54—66.
97. *Mauriz E., Carbajo-Pescador S., Ordonez R. et al.* // Analyst. — 2014. — **139**. — P. 1426—1435.
98. *Vachali P. P., Li B., Bartschi A., Bernstein P. S.* // Archives of Biochem. and Biophys. — 2015. — **572**. — P. 66—72.
99. *Zhao Q., Duan R., Yuan J. et al.* // Int. J. Nanomedicine. — 2014. — **9**. — P. 1097—1104.
100. *Gridina N. Ya.* // Cancer and Oncology Research. — 2013. — **1**, N 1. — P. 1—5. DOI: 10.13189/cor.2013.010101.
101. *Jamali A. A., Witzigmann B.* // Plasmonics. — 2014. — DOI: 10.1007/s11468-014-9740-1.
102. *Wen Q. Y., Zhang H. W., Yang Q. H. et al.* // Perfect metamaterial absorbers in microwave and terahertz bands. — InTech, 2012. — P. 501—512.
103. *Lopatynskyi A. M., Lopatynska O. G., Guiver M. D. et al.* // Quantum Electronics and Optoelectronics. — 2008. — **11**, N 4. — P. 329—336.
104. *Karayalçin N. S.* Electrochemically swithable plasmonic surfaces (thesis for the degree of Master of Sciences), Bilkent University, 2014.
105. *Jin Lu, Jinghong Li* // Anal. Chem. — 2014. — **86**. — P. 3882—3886.
106. *Cheng Xin R., Hau Ben Y. H., Tatsuro E., Kagan K.* // Biosensors and Bioelectronics. — 2014. — **53**. — P. 513—518.
107. *Cheng Xin R., Wallace Gregory Q., Lagugne-Labarthe Francois, Kerman Kagan* // Appl. Mater. and Interfaces. — 2015. — DOI: 10.1021/am507972b.
108. *Wei-Ching Liao, Ja-an Annie Ho* // Biosensors and Bioelectronics. — 2014. — **55**. — P. 32—38.

Поступила в редакцию 23 июля 2015 г.

## Сенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу: методи поверхневої функціоналізації та підвищення чутливості

*О. В. Шинкаренко, С. О. Кравченко*

Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України  
просп. Науки, 41, Київ 03028, Україна. E-mail: o.shynkarenko@isp.kiev.ua

*Проаналізовано особливості використання методу поверхневого плазмонного резонансу (ППР) з метою створення сенсорів для моніторингу біомолекулярних взаємодій у режимі реального часу. Розглянуто та систематизовано методи іммобілізації біомолекул на поверхні ППР-сенсорів і графену. Викладено підходи до функціоналізації поверхні наночастинок, які ефективно використовуються для збудження локального ППР. Розглянуто приклади підсилення ППР при одночасному використанні наночастинок металів і графену, показано можливість одночасного застосування ППР і електрохімічних методів.*

**Ключові слова:** поверхневий плазмонний резонанс (ППР), локальний поверхневий плазмонний резонанс (ЛППР), біосенсори, функціоналізація, іммобілізація, наночастинок золота, графен, електрохімічні методи аналізу.

## Surface Plasmon Resonance Sensors: Methods of Surface Functionalization and Sensitivity Enhancement

*О. В. Shynkarenko, S. A. Kravchenko*

V. E. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics, National Academy of Sciences of Ukraine  
Prosp. Nauky, 41, Kyiv 03028, Ukraine. E-mail: o.shynkarenko@isp.kiev.ua

*Surface plasmon resonance (SPR) biosensing have proved to be exceedingly powerful technique for quantitative label-free real-time monitoring of biomolecular interactions. In this review article, various immobilization techniques developed to date are systematized, with the special emphasis on the covalent binding and the use of nanoobjects: metal nanoparticles and graphene sheets. Approaches to the surface functionalization of nanoparticles that are effectively used for local SPR excitation are described. The latest developments and challenges in applications of SPR sensors are reviewed. In addition, examples of combined SPR and electrochemical methods are given.*

**Key words:** surface plasmon resonance (SPR), local surface plasmon resonance (LSPR), biosensors, functionalization, immobilization, gold nanoparticles, graphene, electrochemical measurements.