

К.В. Костюкевич, Р.В. Христосенко

МОДИФІКАЦІЯ ПОВЕРХНЕВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПЛАЗМОННОГО МЕТАЛУ БІОХІМІЧНИХ ТОНКОПЛІВКОВИХ СЕНСОРІВ З ВИКОРИСТАННЯМ СІРКОВМІСНИХ МОЛЕКУЛ

Твердотільна методологія хімічного та біологічного сенсорингу у різних середовищах на основі ефекту поверхневого плазмон-поляритонного резонансу широко вивчається й використовується з прискореним зростанням у таких галузях, як відкриття нових ліків, клінічна діагностика і полімерна інженерія, моніторинг довкілля та промислових відходів, оцінка якості продукції та питної води, що охоплює широку область охорони здоров'я та біологічних наук. Роботу присвячено огляду способів модифікації поверхневих властивостей плівок золота з використанням сірковмісних молекул неорганічного та органічного походження для захисту поверхні, стабілізації характеристик металевої плівки та її адаптації до адсорбції біологічних молекул.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, сірковмісні молекули, металева поверхня чутливого елемента, захист, стабілізація, біосумісність, функціоналізація.

1. ВСТУП

З появи у ранні 1990-ті оптичних тонкоплівкових сенсорів показника заломлення, що базуються на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР), і дозволяють вивчати кінетику процесів поверхневої взаємодії молекул з високою чутливістю у реальному часі без застосування флуоресцентної або радіоактивної мітки та витратою малої кількості проби (мікролітри) на проведення аналізу, їхнє застосування для біохімічних досліджень і впровадження в широку практику значно поширилося [1,2]. Поверхневі плазмони (ПП) являють собою зв'язану моду поверхневих коливань поляризованого газу вільних електронів і збуджуючого електромагнітного (ЕМ) поля оптичного діапазону, локалізовану на границі тонкої напівпрозорої плівки металу з діелектриком [3]. Збудження ПП, що може здійснюватися за допомогою призми повного внутрішнього відбиття чи дифракційної ґратки, має резонансний характер (напруженість ЕМ поля до 100 разів підсилюється на границі поділу метал-діелектрик та загасає при віддаленні від неї в обидва боки за експоненціальним законом на відстані порядку довжини хвилі) [4], та проявляється як різкий спад у спектрі внутрішнього відбиття (резонансна крива або спектр ППР) при зміні кута падіння, довжини хвилі, фази чи інтенсивності падаючого світла, що лінійно поляризоване у площині падіння. Кількість енергії, що поглинається в результаті цього процесу, залежить від оптичних властивостей плазмонного металу або речовини, яка містить велику кількість вільних електронів (легованих напівпровідників, карбиду кремнію, графену та ін.) та контактуючого з ним діелектричного (досліджуваного) середовища у полі ближньої зони дифракції. Для даного монохроматичного джерела світла існує специфічний кут збудження ПП (або кут ППР). При узгоджених умовах оптики і параметрах матеріалу (призми і металу) кут ППР залежить тільки від діелектричної сталої або (комплексного) коефіцієнта заломлення середовища біля поверхні плівки металу [5]. Коефіцієнт заломлення є найбільш чутливою змінною, що пов'язана з такими явищами, як адсорбція, хімічні реакції або зв'язування молекул рецептор-ліганд [6,7]. Якщо поверхня чутливого елемента ППР контактує з прозорою біологічною рідиною (плазма та сироватка крові, слина, сеча), то появу тонкого адсорбованого шару молекул (з молекулярною масою більше 10000 дальтон (Да)) безпосередньо на поверхні металу можливо легко зафіксувати по зсуву мінімуму резонансної кривої. У випадку дослідження прозорого середовища, процес адсорбції молекул або

молекулярних комплексів на поверхню металевої плівки (або чутливого елемента (ЧЕ)) сенсора ППР є формою створення молекулярного шару з певним коефіцієнтом заломлення та товщиною, що лінійно пов'язані з масою адсорбованих молекул [8]. Таким чином, біохімічний сенсор ППР є резонансно чутливим тонкоплівковим рефрактометром, що проявляє різку зміну у кутовій залежності коефіцієнта відбиття при появі дуже малого поглинання у досліджуваному середовищі або формуванні тонких органічних плівок на поверхні плазмонного металу. Форма резонансної кривої та положення мінімуму змінюються при протіканні різних біохімічних процесів у досліджуваному середовищі, що і фіксується сенсорним приладом у якості вихідного сигналу. З метою спостереження та вивчення біохімічної взаємодії молекул, методику ППР необхідно сполучити з тонкими хімічними та біохімічними методами спрямованої підготовки поверхні металу до вибіркової взаємодії з цікавим для дослідника аналітом. Важливо оптимізувати всю оптичну систему спостереження, оптимізувати технологію виготовлення плазмонного металу та розробити оптимальну наноархітектуру чутливого шару. Для детектування певних молекул з досліджуваної біологічної рідини, металеву поверхню ЧЕ перетворювача ППР необхідно модифікувати чутливим шаром молекулярно-розпізнаючих елементів, які можуть бути біологічними (пептиди, ДНК, РНК, вуглеводневі структури і органічні молекули різних видів, включаючи ліпіди, а також більш складні натуральні продукти), біохімічними (антитіла, антигени), хімічними, комбінацією цих елементів чи їхніми синтетичними аналогами [9-13]. Хоча минуло більше 30 років з часу розробки сенсорної технології ППР, але вона досі не здатна скоротити трудомісткі етапи аналізу та чи навряд підходить для мініатюрних портативних платформ, що необхідні для тестування на місці надання медичної допомоги. Разом з тим, розвиток сенсорної технології сприяв розробці численних фізичних та конструкторських стратегій з метою підвищення чутливості і продуктивності, мініатюризації, інтеграції та зменшення ціни для приладів ППР [14-24]. Багато уваги приділяється стратегіям розвитку приладів ППР у якості недеструктивної оптичної системи, що підтримує біологічну активність і аналітичну ефективність імуноаналізу (підвищення афінності, підтримка природного стану, орієнтації та стабільності антитіл) при застосуваннях у клінічній діагностиці і відкритті нових ліків, моніторингу довкілля, промислових відходів та питної води [25-29]. Але при усіх застосуваннях поверхнево-орієнтованої методики ППР найважливішою проблемою є фізичний та біохімічний стан робочої поверхні ЧЕ, тому що для отримання точних та достовірних кількісних результатів дослідження проби, вимога стабільності та відтворюваності фізичних характеристик плівки металу є визначальною. Роботу присвячено огляду способів модифікації поверхневих властивостей плівок золота з використанням сірковмісних молекул неорганічного й органічного походження для стабілізації характеристик плазмонного металу, захисту робочої поверхні ЧЕ та її адаптації до адсорбції біологічних молекул.

2. НЕОРГАНІЧНЕ ІНЕРТНЕ ПОКРИТТЯ ДЛЯ ФІЗИЧНОЇ АДСОРБЦІЇ БІОМОЛЕКУЛ

Біохімічний сенсор ППР є резонансно чутливим тонкоплівковим рефрактометром, що вимірює дуже малі зміни коефіцієнта заломлення, пов'язані з адсорбцією та взаємодією молекул на металевій поверхні ЧЕ [30]. Тобто біохімічні процеси, що фіксуються приладами ППР, відбуваються у рідкому середовищі, зазвичай, безпосередньо на поверхні полікристалової плівки золота. У цьому випадку, вимога стабільності та відтворюваності фізичних характеристик плівки металу, носія плазмонних коливань, є визначальною для отримання точних та достовірних кількісних результатів дослідження. Цього не можна досягнути тільки за рахунок оптимізації технологічних умов виготовлення золотого покриття [31], тому що адсорбція біомолекул може призводити до появи небажаних оптичних та

структурних ефектів у плівці металу. З іншого боку – можливість, швидкість та якість проведення біохімічної реакції, а також величина відгуку сенсора суттєво залежать від орієнтованої іммобілізації біологічних молекул у своєму природному, недеструктованому стані [32-34]. При адсорбції біологічної молекули на робочу поверхню ЧЕ відбувається сильна взаємодія золота з атомами сірки біомолекули [35], що супроводжується помітною зміною фізико-хімічних властивостей адсорбованої молекули і навіть повною втратою її біологічної активності. Зазначені вище проблеми обумовлюють необхідність застосування перехідних шарів для робочої поверхні оптоелектронного біохімічного перетворювача ППР, які б стабілізували його характеристики, мали властивості біологічних мембран та становили товщину, набагато меншу за глибину проникнення хвилі ПП у зовнішнє середовище ($100 \div 200$ нм для випромінювання у видимій області спектра).

Стабілізувати характеристики полікристалічної плівки золота, отриманої методом термічного випаровування у вакуумі, можливо не тільки використовуючи термічний спосіб модифікації її властивостей [36], а також й застосовуючи метод довготривалої (порядку 24 годин) витримки у слабкореактивному розчині [37]. Відомо, що сульфіді благородних металів є кінетично і термодинамічно стабільними хімічними сполуками, реакційна здатність яких по відношенню до біологічних молекул зневажливо мала [38]. З іншого боку, адсорбція сірки значно підвищує рухливість поверхневих атомів металу, що призводить до упорядкування поверхневої структури та зниження поверхневої шорсткості плівок золота [39,40]. Тому було запропоновано дослідити процес реактивного відпалу золотої поверхні ЧЕ перетворювача ППР у парах сірководню (H_2S) з метою формування інертного мономолекулярного шару неорганічного походження – сульфідів золота (Au_xS_y), що забезпечує оптимальні умови для фізичної адсорбції активних біологічних молекул при збереженні високої чутливості та стабільності роботи сенсора [41].

Виходячи з умов технологічної простоти виготовлення чутливого елемента біосенсора ППР, модифікацію золотої поверхні проводили в насичених парах H_2S (отримували додаванням розведеної сірчаної кислоти (HCl) до сульфідів заліза (FeS)) при кімнатній температурі і атмосферному тиску протягом заданого часу (5, 10, 15, 20 та 25 годин). Особливості формування двовимірного мономолекулярного шару Au_xS_y в залежності від часу обробки в атмосфері H_2S аналізували за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ – дослідили зміни у топографії поверхні) [42] та кутової спектроскопії поверхневих плазмонів у повітрі (беручи до уваги, що поверхнева шорсткість й неоднорідність діелектричних параметрів поверхневого шару золота суттєво впливають на ефективні значення оптичних констант на межі поділу). АСМ-зображення показали, що середньоквадратична шорсткість необробленої поверхні плівки золота становить ~ 0.84 нм, а для модифікованої поверхні протягом понад 15 годин вона зменшується до $\sim 0.6 \div 0.5$ нм та супроводжується збільшенням розміру областей реконструкції поверхні до макроскопічних.

Резонансні криві ППР у повітрі (рис.1) наявно підтверджують два етапи формування двовимірного поверхневого сульфідів золота в залежності від часу витримки зразків в атмосфері H_2S . Видно, що реактивний відпал протягом 10 годин призводить до зміщення кривої ППР в область більших кутів, її розширення та збільшення інтенсивності відбиття у мінімумі. Такі зміни свідчать про формування на поверхні плівки золота неоднорідного шару діелектрика. Збільшення часу модифікації до 15 годин призводить до переміщення кривої ППР у бік менших кутів, зменшення напівширини та інтенсивності відбиття у мінімумі. Крім того, на цих зразках значно зменшується дрейф мінімуму кривої ППР у водних розчинах і складає одиниці кутових секунд. Ці факти свідчать про формування суцільного нерозчинного мономолекулярного шару сульфідів золота – інертного по відношенню до біологічних молекул покриття, яке супроводжується реконструкцією поверхні полікристалічної плівки золота і забезпечує його хімічну пасивацію.

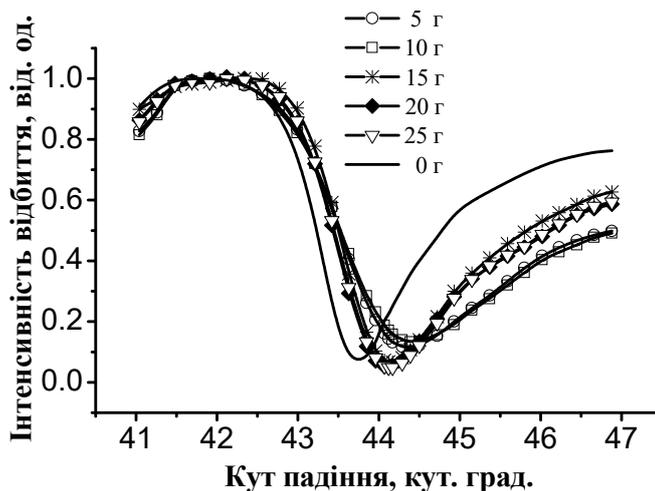


Рис. 1. Резонансні криві ППР (повітря) для плівок золота без обробки і модифікованих реактивним відпаром у насичених парах сірководню (H_2S) протягом заданого часу – 5, 10, 15, 20 та 25 годин.

Взаємодія білків-інгібіторів з ферментами заснована на високому ступені компліментарності поверхонь реагуючих молекул, яку забезпечує велика кількість водневих зв'язків та гідрофобних контактів [43,44]. Тому можна вважати, що ефективність утворення комплексу фермент-інгібітор у значній мірі визначається стабільністю вторинної структури білків та свідчить про збереження природного стану біомолекул. Тому у якості критерію збереження біологічної активності білків, при фізичній адсорбції на досліджувані поверхні, використовували відношення молекулярних мас (~1:1), що характерне для їхнього комплементарного моновалентного зв'язування. Необхідно також підкреслити, що простий та стійкий до руйнівного впливу білок СІТ денатурує на поверхні металів, зокрема, золота [45].

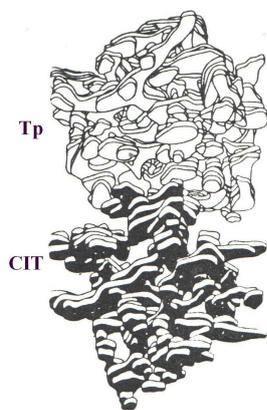


Рис. 2. Просторова модель специфічного зв'язування молекул соєвого інгібітору трипсину (СІТ – глобулярний білок з молекулярною масою 21500 Да) з ферментом трипсином (Тр – глобулярний білок з молекулярною масою 23800 Да).

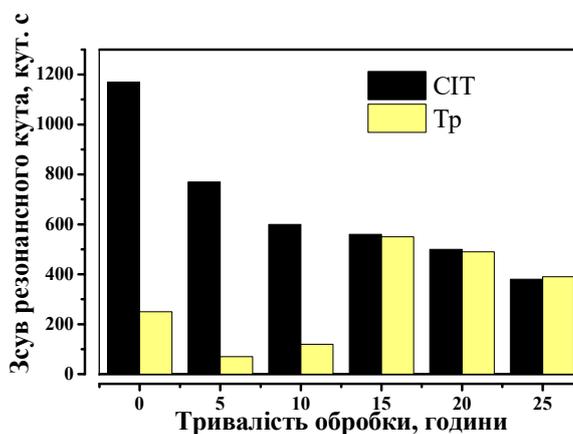


Рис. 3. Значення зсуву резонансного кута у насиченні (з даних кінетичних вимірів ППР) для фізичної адсорбції молекул соєвого інгібітору трипсину (СІТ) та подальшої специфічної взаємодії з ним трипсину (Тр) на поверхні плівок золота без обробки (0 годин) і модифікованих реактивним відпаром у насичених парах сірководню (H_2S) протягом заданого часу – 5, 10, 15, 20 та 25 годин.

Ступінь інертності модифікованих в атмосфері H_2S досліджуваних зразків по відношенню до біологічних молекул перевірено на основі ППР-вимірювань взаємодії модельної специфічної пари соєвий інгібітор трипсину (СІТ – глобулярний білок з молекулярною масою 21500 Да) – фермент трипсин (Тр – глобулярний білок з молекулярною масою 23800 Да) у водному розчині (фосфатний буфер рН 7.2, що містить 0.15М NaCl) при однакових концентраціях досліджуваних молекул – 200 мкг/мл (рис.2, рис.3). Добре видно, що на чистому золоті (час обробки 0 годин) не проявляється специфічний зв'язок, далі йде перехідна стадія, а якщо час дорівнює 15 годинам – закінчується формування щільного моношару сульфиду золота та спостерігається повне збереження функціональних властивостей адсорбованих біологічних молекул (відношення сигналів близьке до 1).

Отже, технологія реактивного відпалу поверхні плівки золота у насичених парах сірководню є простою, сумісною з методами виготовлення ЧЕ сенсорів ППР та може бути використана для широкомасштабного застосування. Недоліком даного реактивно інертного покриття є можливість здійснення тільки фізичної адсорбції біомолекули, тому що поверхня сульфиду золота не містить функціональних угруповань для іммобілізації і не створює умов для орієнтованого закріплення макромолекули на поверхні. Перетворювачі ППР на основі фізичної адсорбції біомолекул виявляють найнижчу чутливість і, як підтвердження цьому, у нашому експерименті максимальна кількість адсорбованого СІТ на поверхню золота, модифіковану протягом 15 годин, досягла лише 0.5 нг/мм², тоді як теоретично розрахована гранично допустима величина поверхневої концентрації для СІТ становила 5 нг/мм².

3. МОДИФІКАЦІЯ ОРГАНІЧНИМИ МОЛЕКУЛАМИ МЕРКАПТАНІВ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ МОЛЕКУЛ

Унікальна система захисту хребетних заснована на виробленні антитіл до чужорідних речовин (антигенів), що потрапляють до організму. Тому антитіла або антигени широко використовують як чутливі шари імуносенсорів; вони з високою специфічністю зв'язуються з молекулами аналітами, відповідно антигенами або антитілами. Досягнуто великого прогресу у методах модифікації для функціоналізації поверхні ЧЕ сенсора ППР та підходах до іммобілізації партнерів взаємодії антитіло-антиген [46,47]. Розроблено великий спектр методів іммобілізації, але враховуючи широкі відмінності молекулярних властивостей, загальнозастосовних способів так і не з'явилося.

Як було зазначено вище, спонтанна адсорбція білків та інших молекул або пасивне зв'язування з поверхнею плівок золота чи срібла призводить до низького рівня адсорбованих молекул та навіть втрати їхньої біологічної активності. Процедура іммобілізації чутливого матеріалу є істотним моментом для одержання достовірних результатів досліджень і ефективної роботи перетворювача ППР. З одного боку, закріплення рецепторів не повинно впливати на структурні та оптичні характеристики плівки металу, що призводять до нестабільної роботи сенсора ППР у часі (під стабільністю ми розуміємо незмінність у часі основного параметра – кутового положення мінімуму резонансної кривої $\theta_{ППР}$). З іншого боку – забезпечувати упорядковане орієнтоване розташування молекул-рецепторів у своєму природному, недеформованому взаємодію з металом стані, оскільки саме від цього залежить можливість і швидкість молекулярного зв'язування, а також амплітуда відгуку перетворювача.

3.1. Тіоли як молекулярні шари для захисту поверхні ЧЕ та стабілізації характеристик біосенсорів. Прийняті великі зусилля для розробки підходів з метою покриття поверхні металу перед початком іммобілізації біологічної молекули, мінімізації неспецифічної адсорбції та введення реактивноздатних груп для специфічної взаємодії. Найбільш успішні методи засновані на концепції спонтанної молекулярної самоорганізації органічних молекул

тіолу чи дисульфиду з розчину за рахунок виняткової спорідненості атомів сірки до поверхні плівки золота [48]. Формування самоорганізованих моношарів (СОМ) обумовлено міцною координацією сірки (групою голови) з металом, що супроводжується силами взаємодії Ван-дер-Ваальса між алкановими ланцюгами. За умови достатньої довжини ланцюга ($n > 6$), отриманий моношар утворює щільно упаковану та високоупорядковану (про це свідчать дифракційні та рентгенівські методики) і дуже стабільну структуру, яка орієнтована більш-менш вздовж нормалі до металевої поверхні (рис.4). Упорядкованість моношару, яка залежить від його однорідності та хімічно доступного розміщення кінцевих груп, контролює макроскопічні властивості СОМ, такі як змочування. При цьому СОМ на поверхні золота, як правило, є стійкими до впливу сильних кислот та лугів, не руйнуються розчинниками та витримують фізіологічне довкілля [49].

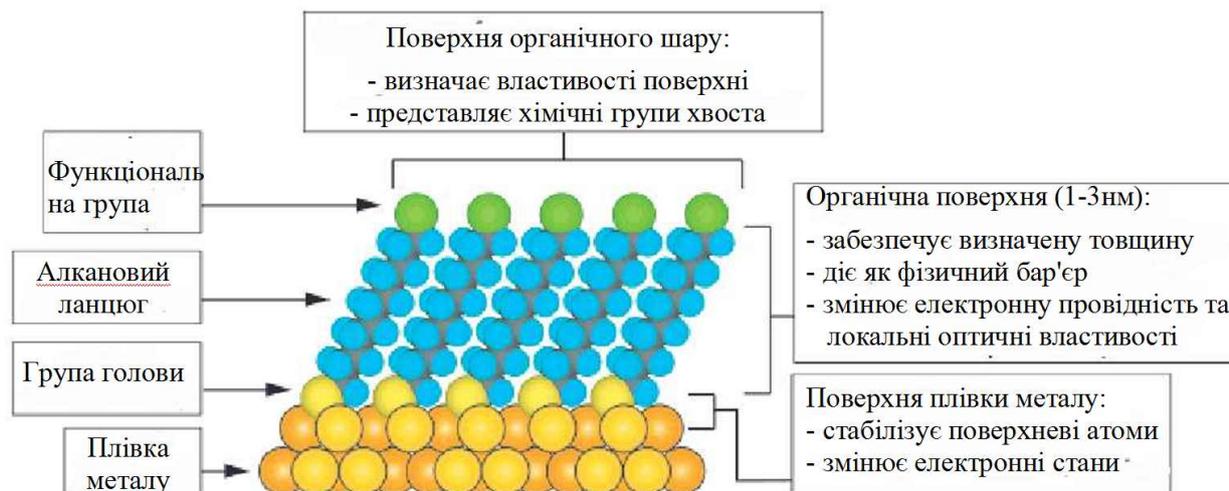


Рис. 4. Схематична ілюстрація самоорганізованої моношарової органічної сірковмісної речовини (тіолату) на підкладці з плівкою золота.

Ці шари, товщиною у нанометр, можуть бути легко виготовлені з комерційно доступних речовин або синтезовані з відносною легкістю. Перші застосування СОМ для біосенсорики були описані наприкінці 1980-х років. Сьогодні відбувається поступова заміна методу самоорганізації молекулярних ансамблів тіолів з розчину на метод підвищеної ефективності формування СОМ з газової фази – підсилене плазмою нанесення пароподібних хімічних сполук (plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD)) [50]. Основна перевага довголанцюгових алкантіолів полягає у широких можливостях кінцевих (хвостових) груп створювати поверхні з широким спектром властивостей. Поверхні можуть бути гідрофільними, гідрофобними, або їх можна активувати для подальшого прямого зв'язування з різними молекулами.

Для формування СОМ з контрольованим складом, структурою і товщиною використовують функціоналізовані меркаптани, зокрема, аліфатичні тіоли ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$), завдяки простій технології одержання, стабільності та функціональній розмаїтості [51]. Організація модифікуючого шару на поверхні благородного металу відбувається методом тривалої спонтанної хемосорбції з розчину, переважно в етанолі, з концентрацією $(0,1-1,0) \times 10^{-3} \text{ M}$ і складається з двох етапів. Спочатку відбувається взаємодія HS групи голови та поверхневих атомів золота з утворенням тіолату золота. Потім йде наноструктурна перебудова зв'язаного моношару, керована взаємодією аліфатичних ланцюгів, що супроводжується реконструкцією поверхні металу. Таким чином, формується щільно упаковане молекулярне покриття, яке забезпечує значний бар'єр для переносу електронів та іонів, а також має високу кінетичну і термодинамічну стабільність. При цьому функціональні

групи хвоста визначають фізико-хімічні властивості модифікованої поверхні благородного металу, вуглеводневі ланцюги забезпечують її просторове екранування на десятки ангстрем (довжина С-Н зв'язку $\sim 1,1 \text{ \AA}$), що істотно не впливає на чутливість сенсора [52-55].

На перешкоді формуванню щільного моношару СОМ можуть стати неоднорідності поверхні полікристалічних плівок золота, що наносять методом термічного випаровування у вакуумі на підкладки без підігріву. Крім того, поверхнева шорсткість металу суттєво впливає на розсіювання ПП та призводить до передчасного загасання плазмонів, зменшення їхньої фазової швидкості та зміни форми дисперсійної кривої [56]. Температурний відпал напилених плівок сприяє зменшенню концентрації дефектів кристалічних ґрат, переходу структури у більш стійкий термодинамічний стан, якому відповідають більш стабільні оптичні властивості. Тому було досліджено вплив низькотемпературного відпалу плівок золота у діапазоні $80\div 200^\circ\text{C}$ протягом 30 хвилин (повітря) на реконструкцію їхньої поверхні (застосовували малокутову дифракцію рентгенівського випромінювання та атомно-силову мікроскопію (АСМ)), а також оптичні та експлуатаційні характеристики перетворювача ППР (досліджували форму резонансної кривої ППР, довготривалу стабільність значення резонансного кута, величини оптичних констант, розсіювання з кутовим розділенням та інтегральне розсіювання світла) [36]. Було показано, що при низькотемпературному відпалі з оптимумом при 120°C характерне згладжування дрібномасштабного рельєфу поверхні плівки золота, що дозволяє знизити інтенсивність розсіювання світла в умовах ППР, зменшити коефіцієнт екстинкції, стабілізувати оптичні характеристики та сформувати на поверхні бездефектні високовпорядковані нанорозмірні захисні та стабілізуючі молекулярні шари [57,58]. Запропонована методика низькотемпературного відпалу була застосована для стабілізації характеристик сенсора ППР за допомогою модифікації поверхні ЧЕ додекантіолом ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$) [59-61]. Оптимізацію стабілізуючих властивостей було проведено на основі вимірювань контактного кута змочування водою [62], дослідження резонансних кривих, зміни положення резонансного кута з часом на повітрі (старіння протягом 100 днів) та кінетики зміни положення резонансного кута з часом у воді (рис.5).

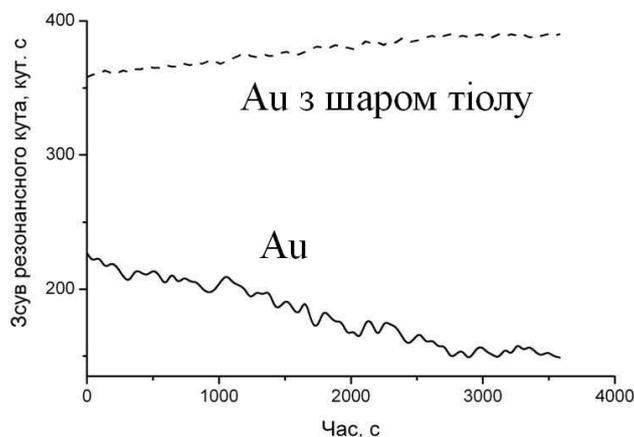


Рис. 5. Дрейф базової лінії приладу ППР у воді з часом для ЧЕ з вільною золотою поверхнею та поверхнею, модифікованою додекантіолом ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$).

Результати вимірювань дрейфу резонансного кута з часом у воді показують, що після температурного відпалу плівок золота при температурі 120°C протягом 30 хвилин, формування на них бездефектних самоорганізованих моношарів додекантіолу ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$) призводить до істотної стабілізації параметрів перетворювача ППР.

3.2. Тіоли як проміжні шари для закріплення іммобілізуючої матриці молекул-рецепторів.

З метою підвищення швидкості молекулярного зв'язування, а також амплітуди відгуку сенсора за рахунок збільшення площі чутливої поверхні було розроблено матричні структури органічного та неорганічного походження для орієнтованої іммобілізації молекул-рецепторів у своєму природному, недеформованому взаємодію з металом стані, які закріплювали на СОМ-похідної поверхні золота. Яскравим прикладом такого підходу до процедури модифікації поверхні сенсорних чипів була розробка компанії Viacore AB з використанням гідрогелеподібної тривимірної структури декстрану (органічна сполука полісахаридів, що синтезується мікроорганізмами)[63]. Декстрановий полімер складається, переважно, з нерозгалужених глюкозних одиниць, що забезпечує високу гнучкість та розчинність у воді. Його іммобілізація здійснюється за рахунок модифікації термінального гідроксилу СОМ. Поверхню можливо додатково активувати для подальшої іммобілізації потрібними лінкерами, так введення карбоксиметильних груп виявилось універсальним застосуванням. Змінюючи розміри декстрану (від 10 000 до більш мільйона Да), можна створювати поверхні для різних застосувань [64,29,65,66].

З метою орієнтованої іммобілізації антитіл на золотій поверхні ППР-чипу та формування буферного шару заданої товщини ми запропонували використати процес самоорганізації в моношарах заміщених ціанофератів ($[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]^{3-}$), що зшиваються у тривимірну структуру іонами міді [67]. Такі структури несуть на своїй поверхні рівномірно розташовані активовані аміногрупи (NH_2^+), з якими утворюють ковалентні зв'язки карбоксильні (COOH) групи Fc фрагмента імуноглобуліну (IgG). Відбувається орієнтоване (місця специфічного зв'язування молекул направлені у розчин) закріплення антитіл без втрати їхніх функціональних можливостей. Ідею реалізовано з використанням неорганічної п'ятишарової плівки амінопентаціаноферату (II) міді ($\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$), яку методом пошарового осадження з водних розчинів ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л сульфату міді (CuSO_4) на 10 хвилин, амінопентаціаноферату натрію ($\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$) на 1 хвилину), наносили на золоту поверхню ППР-чипу, яку попередньо модифікували тіолом (рис.6) [68].

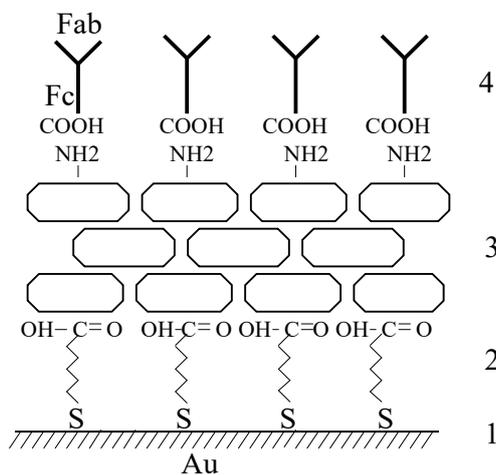


Рис. 6. Схема формування багатошарового покриття для сайт-орієнтованої іммобілізації антитіл: 1 – плівка золота, 2 – самоорганізований моношар алкантіолу $\text{HS}(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$, 3 – багатошарова плівка амінопентаціаноферату (II) міді ($\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]_2$), 4 – антитіла.

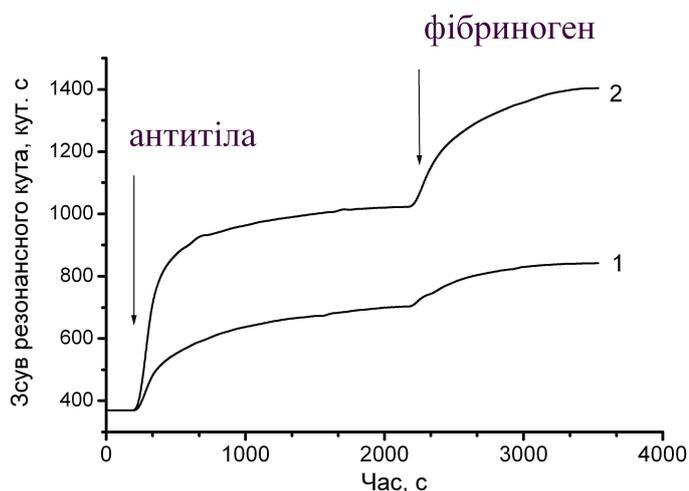


Рис. 7. Сенсограми реакції специфічного зв'язування антифібриноген-фібриноген людини на золотій поверхні перед (1) та після (2) застосування багатошарового орієнтуючого покриття.

На рис.7 продемонстровано, що використання цієї модифікації призводить до орієнтованого закріплення антитіл на поверхні ППР-сенсора та збільшує відгук на присутність білка фібриногену у пробі майже у два рази [69,12]. Крім того, отримані структури легко розчиняються у лужному середовищі молярної концентрації, що дозволяє відновити фізичний перетворювач ППР до початкового стану (тобто повернутися до чистої поверхні плівки золота) для багаторазового застосування без втрати ефективності його роботи.

3.3. Суміші меркаптанів та молекулярний імпринтинг. Підхід SOM створив інструмент для зручного введення різних поверхневих функцій, які можуть бути використані для іммобілізації молекул-рецепторів та здійснення різних механізмів детектування молекул-аналітів. Альтернативні застосування методики SOM включають комбінації меркаптанів (сірковмісні молекули) різної довжини й структури, із різними кінцевими групами та у різних співвідношеннях. Одним з таких прикладів є метод молекулярного імпринтингу, який полягає у створенні полімерної плівки з пустотами у формі потрібної для детектування молекули (спосіб взаємодії за формою молекули) і широко застосовується при використанні полімерних шарів у різноманітних сенсорах [70-72].

Підкреслимо, що молекулярний імпринтинг – це метод створення синтетичних спеціалізованих рецепторів, які можуть селективно розпізнавати та пов'язувати цільові молекули з високою спорідненістю. Функціональні можливості SOM для сенсорних застосувань можливо розширити, змінюючи мікроструктуру молекулярної границі поділу (формування двовимірного рисунка) з використанням прийомів мікрозапису, хімічного фрезерування, штампування та ультрафіолетової мікролітографії [73-75]. Але найбільш простим є спосіб використання суміші тіолів, які містять компоненти з різною довжиною ланцюга та функціональними групами хвоста [76,77]. Такі моношари отримують довільною соадсорбцією декількох тіолів з розчину, при цьому вони мають щільну внутрішню область, що примикає до поверхні золота, і зовнішню область з бажаним рельєфом. Склади розчину та отриманого моношару не співпадають. Відносна пропорція компонент у плівці буде залежати від таких параметрів, як співвідношення компонент у розчині, довжина ланцюгів, розчинність тіолів, а також властивостей термінальних груп.

На основі відомих уявлень про застосування методу молекулярного імпринтингу для модифікації поверхні ЧЕ біохімічного сенсора ППР [78] розроблено селективну самоорганізовану матричну структуру для прямого якісного та кількісного виявлення невеликої молекули барбітурової кислоти ($C_4H_4O_3N_2$) у рідині [79,80]. Спосіб полягає в застосуванні не однієї, а двох молекул меркаптанів різної довжини, одна з яких (тіобарбітурова кислота - $C_4H_4O_2N_2S$) є структурним аналогом ідентифікованої речовини і забезпечує формування ямок у матричному шарі, форма і розмір яких відповідають молекулі-аналіту (рис.8). У цьому випадку, за допомогою методу спонтанної хемосорбції суміші (другий компонент – додекантіол $HS(CH_2)_{11}CH_3$) з розчину, формується моношарова матриця з високим ступенем селективності зв'язування саме молекули барбітурової кислоти. Цей ефект демонструє рис.9, де впевнено реєструється відгук на наявність барбітурової кислоти, тоді як адсорбція близького структурного аналога цієї речовини – вероналу ($C_8H_{12}O_3N_2$) не реєструється.

Технологію молекулярного імпринтингу здійснювали методом довільної соадсорбції суміші додекантіолу та тіобарбітурової кислоти з розчину при температурі 297°K протягом 72 годин, промивкою у чистому розчиннику для видалення фізично адсорбованих речовин та сушінням у потоці чистого повітря. Оскільки компоненти сильно відрізняються за довжиною алканового ланцюга та розчинністю, склад розчину підбирали експериментальним шляхом і отримували наступним чином: готували 1×10^{-3} Моль/л розчин $HS(CH_2)_{11}CH_3$ в етиловому спирті (а); готували 1×10^{-3} Моль/л розчин $C_4H_4O_2N_2S$ в 50% суміші води та етилового спирту (б); створювали суміш розчинів (а) і (б) у співвідношенні 1:20.

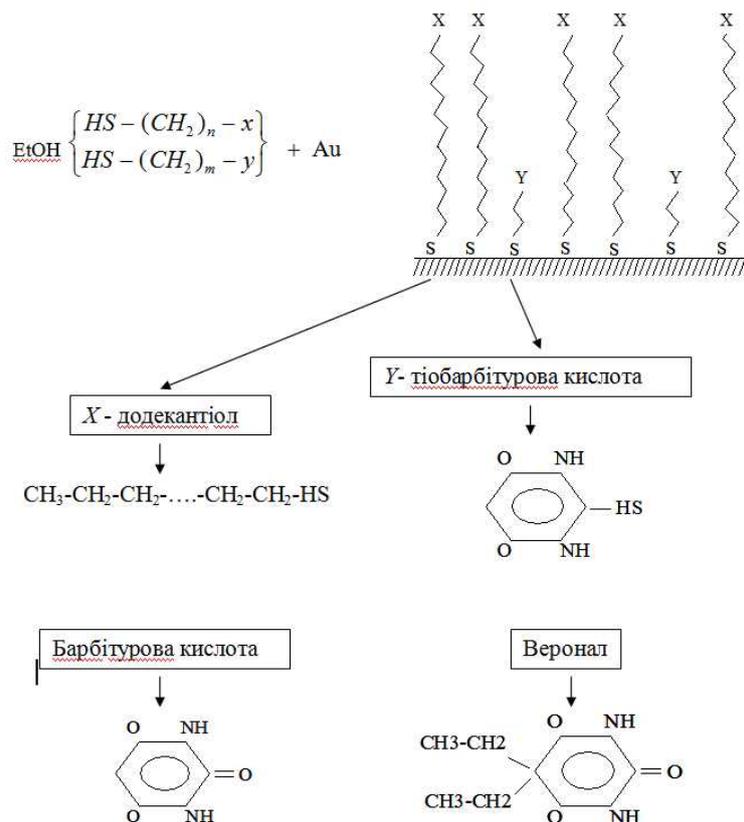


Рис. 8. Схема формування органічної самоорганізованої матриці меркаптанів (сірковмісні молекули) із різною довжиною та структурою на поверхні ЧЕ (золото) сенсора ППР (молекулярний імпринтинг) та структурні формули компонентів, що беруть участь у формуванні матриці, а також в експерименті із детектування барбітурової кислоти.

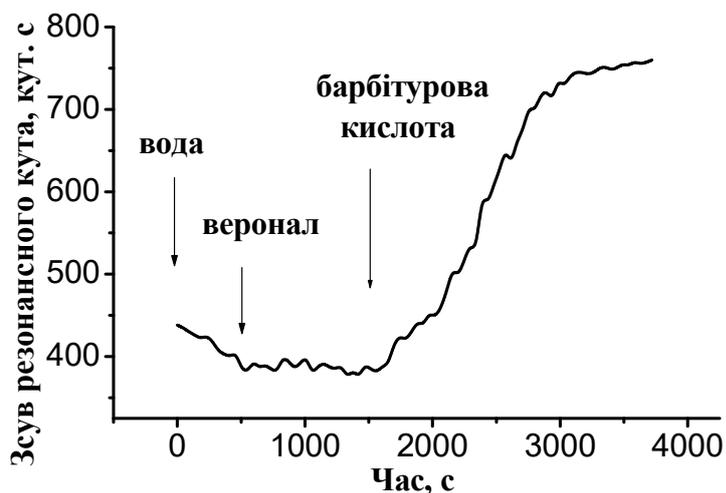


Рис. 9. Сенсограма взаємодії вероналу (1 мкг/мл) та барбітурової кислоти (1 мкг/мл) з поверхнею ЧЕ (золото) сенсора ППР, що модифікована матрицею меркаптанів із різною довжиною та структурою (молекулярний імпринтинг).

Барбітурати обрано у якості об'єктів детектування, тому що задача контролю їхнього рівня у біологічних рідинах і воді вкрай актуальна для медицини та екології. Ці

низькомолекулярні сполуки, депресанти центральної нервової системи, використовують у медицині як знеболюючі, снодійні та протисудомні ліки. При хронічному застосуванні барбітуратів розвивається звикання до них і смерть може настати як від передозування, так і після різкого припинення прийому.

Необхідно особливо наголосити, що при формуванні наномолекулярної архітектури самоорганізованого покриття, особлива роль відводиться до досконалості структури підкладки, тому що будь-які спотворення матриці меркаптанів призводять до порушення або повної відсутності селективної взаємодії з досліджуваною речовиною. Тому у якості підкладок рекомендовано використання плівок золота, що отримані методом термічного випаровування у вакуумі з наступним температурним відпалом при 120°C, оскільки в них буде відсутня дрібномасштабна шорсткість поверхні [36].

4. ВИСНОВКИ

Сенсор поверхневого плазмонного резонансу (ППР) є резонансно чутливим тонкоплівковим рефрактометром, що вимірює дуже малі зміни коефіцієнта заломлення на металевій поверхні чутливого елемента (ЧЕ). З метою спостереження та вивчення біохімічної взаємодії молекул, методику ППР необхідно сполучити з тонкими хімічними та біохімічними методами спрямованої підготовки поверхні металу до вибіркової взаємодії з цікавим для дослідника аналітом. В роботі досліджено особливості формування і властивості моношарових плівок сірковмісних молекул неорганічного та органічного походження на золотій поверхні ЧЕ сенсора ППР для захисту поверхні, стабілізації властивостей металевієї плівки та її адаптації до адсорбції біологічних молекул.

Вивчено процес формування реактивно інертного покриття (сульфід золота – Au_xS_y) для неструктурної фізичної адсорбції біомолекул на поверхню плівки золота. Показано (на основі резонансних ППР-кривих та специфічної реакції соєвий інгібітор трипсину (СІТ) – фермент трипсин (Тр)), що під дією реакційного відпалу полікристалічної плівки золота в атмосфері сірководню (H_2S) протягом 15 годин формується щільний моношар Au_xS_y . Процес формування супроводжується реконструкцією золотої поверхні, що стабілізує характеристики перетворювача ППР і створює межу поділу з меншою шорсткістю поверхні і неструктурними властивостями для фізичної адсорбції біологічно активних молекул.

Показана доцільність використання органічних плівок додекантіолу $HS(CH_2)_{11}CH_3$, що отримані методом самоорганізації молекулярних (СОМ) ансамблів з розчину, для захисту робочої поверхні сенсора, стабілізації властивостей плівки металу та її адаптації до адсорбції біологічних молекул. З метою підвищення швидкості молекулярного зв'язування, а також амплітуди відгуку сенсора за рахунок збільшення площі чутливої поверхні розглянуто метод орієнтованого закріплення молекул-рецепторів у своєму природному, недеформованому взаємодією з металом стані всередині тривимірної структури полісахаридного гідрогелю-декстрану, що закріплювали на поверхні золота за допомогою шару тіолу. Застосовано метод пошарового осадження з водних розчинів для формування неорганічної п'ятишарової плівки амінопентаціаноферату (II) міді ($Cu_3[Fe(CN)_5NH_3]_2$) на СОМ-похідної поверхні золота з метою орієнтованої іммобілізації антитіл проти фібриногену людини. Продемонстровано, що використання цієї модифікації збільшує відгук на присутність фібриногену у пробі майже у два рази.

Інша ідея використання органічних молекул меркаптанів, сірковмісних молекул різної довжини і структури, полягала у створенні умов селективного зв'язування стосовно обраних молекул з використанням методу молекулярного імпринтингу. Запропоновано і реалізовано спосіб формування органічної моношарової матриці на поверхні плівки золота для молекулярного розпізнавання не дуже великих молекул барбітурової кислоти $C_4H_4O_3N_2$. Матрицю отримували методом довільної соадсорбції суміші додекантіолу $HS(CH_2)_{11}CH_3$ та

тіобарбітурової кислоти $C_4H_4O_2N_2S$ з розчину. Показано, що механізмом, який визначає селективність взаємодії, є формування відбитків молекул-аналітів у поверхневому органічному шарі, що і дозволяє виявляти барбітурову кислоту на фоні її хімічного аналогу – вероналу $C_8H_{12}O_3N_2$.

Для формування бездефектної наномолекулярної архітектури самоорганізованого покриття на поверхні ЧЕ сенсорів ППР запропоновано технологію низькотемпературного відпалу ($120^\circ C$ протягом 30 хвилин), що призводить до згладжування дрібномасштабного рельєфу золотої поверхні та одержання оптимальних параметрів резонансної кривої.

K.V. Kostyukevych, R.V. Khrystosenko

MODIFICATION OF PLASMON METAL SURFACE PROPERTIES FOR THIN FILM BIOCHEMICAL SENSORS USING SULPHUR-CONTAINING MOLECULES

The work investigated the features of the formation and properties of monolayer films of sulfur-containing molecules of inorganic and organic origin on the gold surface of the SE SPR sensor for surface protection, stabilization of the properties of the metal film, and its adaptation to the adsorption of biological molecules. The process of forming a reactively inert coating (gold sulfide – Au_xS_y) for non-destructive physical adsorption of biomolecules onto the surface of a gold film was studied. It was shown (based on resonant SPR curves and the specific reaction of soybean trypsin inhibitor (SIT) – enzyme trypsin (Tp)) that under the action of reactive annealing of a polycrystalline gold film in a hydrogen sulfide (H_2S) atmosphere for 15 hours, a dense monolayer of Au_xS_y is formed. The formation process is accompanied by the reconstruction of the gold surface, which stabilizes the characteristics of the SPR transducer and creates a boundary with less surface roughness and non-destructive properties for the physical adsorption of biologically active molecules. The feasibility of using organic films of dodecanethiol $HS(CH_2)_{11}CH_3$, obtained by the method of self-organization of molecular (SOM) ensembles from solution, for protecting the working surface of the sensor, stabilizing the properties of the metal film, and adapting it to the adsorption of biological molecules is shown. In order to increase the speed of molecular binding, as well as the amplitude of the sensor response by increasing the area of the sensitive surface, a method of oriented fixation of receptor molecules in their natural, in a state undeformed by interaction with the metal inside the three-dimensional structure of the polysaccharide hydrogel – dextran, which was fixed on the gold surface using a thiol layer. The method of layer-by-layer deposition from aqueous solutions was used to form an inorganic five-layer film of copper (II) aminopentacyanoferrate ($Cu_3[Fe(CN)_5NH_3]_2$) on a COM-derived gold surface for the purpose of oriented immobilization of antibodies against human fibrinogen. It has been demonstrated that the use of this modification increases the response to the presence of fibrinogen in the sample by almost twofold. Another idea for using organic molecules called mercaptans, sulfur-containing molecules of various lengths and structures, was to create selective binding conditions for selected molecules using the molecular imprinting method. A method for forming an organic monolayer matrix on the surface of a gold film for molecular recognition of not very large molecules of barbituric acid $C_4H_4O_3N_2$ has been proposed and implemented. The matrix was obtained by the method of random co-adsorption of a mixture of dodecanethiol $HS(CH_2)_{11}CH_3$ and thiobarbituric acid $C_4H_4O_2N_2S$ from solution. It is shown that the mechanism that determines the selectivity of the interaction is the formation of fingerprints of analyte molecules in the surface organic layer, which allows the detection of barbituric acid against the background of its chemical analogue - veronal $C_8H_{12}O_3N_2$. To form a defect-free nanomolecular architecture of a self-organized coating on the surface of the CE sensors of the SPR, a low-temperature annealing technology ($120^\circ C$ for 30 minutes) is

proposed, which leads to smoothing of the small-scale relief of the gold surface and obtaining optimal parameters of the resonance curve.

Keywords: surface plasmon resonance, sulfur-containing molecules, metal surface of the sensing element, protection, stabilization, biocompatibility, functionalization.

1. Puiu M., Bala C. SPR and SPR imaging: recent trends in developing nanodevices for detection and real-time monitoring of biomolecular events. *Sensors*. 2016. **16**. P. 870-884; doi: 10.3390/s16060870.
2. Vigneshvar S., Sudhakumari C.C., Senthilkumaran B., Prakash H. Recent advances in biosensor technology for potential applications an overview. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2016. 4:11. doi: 10.3389/fbioe.2016.00011.
3. Handbook of Surface Plasmon Resonance. Edited by R.B.M. Schasfoort and A. J. Tudos. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry. 2008. 426 p.
4. Zayats A.V., Smolyaninov I.I., Maradudin A.A. Nano-Optics of surface plasmon polaritons. *Phys. Rep.* 2005. **408**. P. 131-314.
5. Dastmalchi B., Tassin P., Koschny T., Soukoulis C.M. A new perspective on plasmonics: Confinement and propagation length of surface plasmons for different materials and geometries. *Adv. Opt. Mater.* 2016. **4**. P. 177-184.
6. Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* 2008. **108**. P. 462-493.
7. Nguyen H., Park J., Kang S., Kim M. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. *Sensors*. 2015. **15**. P.10481-10510.
8. Vörös J. The density and refractive index of adsorbing protein layers. *Biophysical Journal*. 2004. **87**. P. 553-561.
9. Spadavecchia J., Manera M.G., Quaranta F., Siciliano P., Rella R. Surface plasmon resonance imaging of DNA based biosensors for potential applications in food analysis. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005. **21**. P. 894-900.
10. Byrne B., Stack E., Gilmartin N., O'Kennedy R. Antibody-based sensors: Principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors*. 2009. **9**. P. 4407-4445.
11. Holler S., Arnold S., Dantham V. A nanoplasmonic sensor detects cancer proteins at the single-molecule level. *Newsroom*. 2013. doi:10.1117/2.1201309.005131.
12. Kostyukevych S.O., Kostyukevych K.V., Khristosenko R.V., Lysiuk V.O., Koptyukh A.A., Moscalenko N.L. Multielement surface plasmon resonance immunosensor for monitoring of blood circulation system. *Optical Engineering*. 2017. **56**, №12. P. 121907.
13. Костюкевич К.В., Христосенко Р.В., Загородня С.Д., Костюкевич С.О., Коптюх А.А., Крючин А.А., Олексенко П.Ф. Молекулярна діагностика на основі кутової спектроскопії поверхневих плазмонів. *Ресстрація, зберігання і обробка даних*. 2020. **22**, №3. С.14-30.
14. Erickson D., Mandal S., Yang A.H.J., Cordovez B. Nanobiosensors: Optofluidic, electrical and mechanical approaches to biomolecular detection at the nanoscale. *Microfluid. Nanofluid.* 2008. **4**. P. 33-52.
15. Abbas A., Linman M.J., Cheng Q. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. **26**. P.1815-1824.
16. Wang X., Zhan S., Huang Z., Hong X. Review: Advances and applications of surface plasmon resonance biosensing instrumentation. *Instrum. Sci. Technol.* 2013. **41**. P. 574-607.
17. Tabasi O., Falamaki C. Recent advancements in the methodologies applied for the sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensors. *Analytical Methods*. 2018. **32**. P. 3899 - 4008.
18. Xu Y., Bai P., Zhou X., Akimov Yu., Png C.E., Ang L.-K., Knoll W., Wu L. Optical refractive index sensors with plasmonic and photonic structures: promising and inconvenient truth (review). *Adv. Optical Mater.* 2019. 1801433. 47 p.
19. Khrystosenko R.V. Optimization of the surface plasmon resonance minimum detection algorithm for improvement of method sensitivity. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2015. **18**, №3. P. 279-285.
20. Христосенко Р.В., Костюкевич Е.В., Ушенин Ю.В., Самойлов А.В. Улучшение эксплуатационных характеристик преобразователей на основе поверхностного плазмонного резонанса за счет оптической части сенсорных приборов типа "ПЛАЗМОН". *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2015. **50**. С. 53-60.
21. Костюкевич С.О., Коптюх А.А., Костюкевич К.В., Лисиук В.О., Погода В.І., Христосенко Р.В., Самойлов А.В., Ушенин Ю.В., Суворцева О.Р., Крючин А.А. Удосконалення сенсорів з призмивим типом збудження поверхневого плазмонного резонансу на полімерній основі. *Ресстрація, зберігання і обробка даних*. 2019. **21**, №3. С. 3-19.
22. Костюкевич К.В., Крючина Є.А., Крючин А.А., Костюкевич С.О. Оптичні біосенсори на основі гібридних наноструктур та мета матеріалів. *Медична інформатика та інженерія*. 2021. №2. С.14-33.
23. Костюкевич С.О., Костюкевич К.В., Христосенко Р.В., Коптюх А.А., Погода В.І. Чутливий елемент сенсора поверхневих плазмонів з термічною модифікацією структурних властивостей полімерної підкладки. *Оптоелектроніка та напівпровідникова техніка*. 2022. **57**. С. 82-92.

24. Костюкевич К.В., Христосенко Р.В., Крючин А.А., Рубіш В.М., Горбов І.В., Погода В.І., Костюкевич С.О. Спектрометри з призмовим типом збудження поверхневого плазмонного резонансу: шляхи підвищення ефективності (огляд). *Оптоелектроніка та напівпровідникова техніка*. 2024. **59**. С.76-98.
25. Hodnic V., Anderluh G. Toxin detection by surface plasmon resonance (Review). *Sensors*. 2009. **9**. P. 1339-1354. doi: 10.3390/s9031339.
26. Shankaran D.R., Gobi K.V., Miura N. Recent advancement in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B*. 2007. **121**, №1. P. 158-177.
27. D’Orazio P. Biosensors in clinical chemistry – 2011 update. *Clin. Chim. Acta*. 2011. **412**. P. 1749-1761.
28. Helmerhorst E., Chandler D.J., Nussio M., Mamotte C.D. Real-Time and label-free bio-sensing of molecular interactions by surface plasmon resonance: A laboratory medicine perspective. *Clin. Biochem. Rev.* 2012. **33**. P. 161-173.
29. Krystosenko R.V. Optimization of surface plasmon resonance based biosensor for clinical diagnosis of the Epstein-Barr herpes virus disease. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2016. **19**, №1. P. 84-89.
30. Ramsden J.J. Optical Biosensors (review). *Journal of molecular recognition*. 1997. **10**. P. 109-120.
31. Snopok B.A., Kostyukevich K.V., Lysenko S.I., Lytvyn P.M., Shepeliavii P.E., Lytvyn O.S., Mamykin S.V., Zynio S.A., Kostyukevich S.A., Venger E.F., Shirshov Yu.M. Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2001. **4**, №1. P. 56-69.
32. Snopok B.A., Kostyukevych K.V., Rengevych O.V., Shirshov Yu.M., Venger E.F., Kolesnikova I.N., Lugovskoi E.V. A biosensor approach to probe the structure and function of the adsorbed proteins: fibrinogen at the gold surface. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 1998. **1**, №1. P.121-134.
33. Kostyukevich E.V., Shirshov Yu.M. Development of biosensor systems based on surface plasmon resonance phenomenon: physical, chemical and biological aspects. *Proc. SPIE*. 2004. **5327**. P.374-385.
34. Костюкевич С.О., Христосенко Р. В., Костюкевич К.В., Коптюх А.А., Суровцева О.Р., Крючин А.А. Молекулярний аналіз тонких плівок різної природи на основі спектроскопії поверхневих плазмонів. *Реєстрація, зберігання і обробка даних*. 2018. **20**. №4. С. 5-20.
35. Jung Ch., Dannenberger O., Xu Y., Buck M., Grunze M. Self-assembled monolayers from organosulfur compounds: a comparison between sulfides, disulfides and thiols. *Langmuir*. 1998. **14**. P. 1103-1107.
36. Kostyukevych K.V. Transducer based on surface plasmon resonance with thermal modification of metal layer properties. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2016. **19**, №3. P. 255-266.
37. Zubimendi J.L., Vela M.E., Salvarezza R.C., Vazques L., Vara J.M., Arvia A.J. Decrease in the roughness of vapor-deposited gold surfaces induced by surface mobility. *Langmuir*. 1996. **12**. P. 12-18.
38. Фримантл М. Химия в действии. Ч-2. Москва: Мир, 1991. 620 с.
39. Kotelitz M., Oudar J. Etude thermodynamique et structurale de l’adsorption dans le systeme or-soufre. *Surf. Sci*. 1971. **27**. P. 176-190.
40. Kotelitz M., Domange J.L., Oudar J. Etude par la diffraction des electrons lents et la spectroscopie Auger de l’adsorption du soufre sur l’or. *Surf. Sci*. 1973. **34**. P. 431-449.
41. Костюкевич Е.В., Костюкевич С.А. Реакционный отжиг как способ пассивации и стабилизации поверхностей биосенсоров. *Оптоелектроніка та напівпровідникова техніка*. 2011. **46**. С. 122-129.
42. Snopok B.A., Kostyukevych K.V., Beketov G.V., Zynio S.A., Shirshov Yu.M., Venger E.F., Verevka S.V. Biochemical passivation of metal surfaces for sensor application: reactive annealing of polycrystalline gold films in hydrogen sulfide atmosphere. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 2000. **3**, №1. P.59-68.
43. Frattali V., Steiner R.F. Separation and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry*. 1968. **7**, №2. P. 521-529.
44. Веремеенко К.Н. Протеолитические ферменты поджелудочной железы и их применение в клинике. Киев: Здоровье, 1967. С. 5-46.
45. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol*. 1947. **30**. P. 291-310.
46. Salamon Z., Macleod H.A., Tollin G. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. II: Applications to biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997. **1331**. P. 131-152.
47. Vashist S.R., Dixit C.K., MacCraith B.D., O’Kennedy R. Effect of antibody immobilization strategies on the analytical performance of a surface plasmon resonance-based immunoassay. *Analyst*. 2011. **136**. P.4431-4436.
48. Love J.C., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* 2005. **105**. P. 1103-1169.
49. Delamarche E., Michel B., Biebuyck H.A., Gerber C. Golden interfaces: The surface of self-assembled monolayers. *Advanced Materials*. 1996. **8**. P. 719-729.
50. Gandhiraman R.P., Gubala V., O’Mahony C.C., Cummius T., Raj J., Eltayeb A., Doyle C., James B., Daniels S., Williams D.E. PECVD coatings for functionalization of point-of-care biosensor surfaces. *Vacuum*. 2012. **86**. P. 547-555.

51. Ulman A. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly. San Diego, CA.: Academic Press. 1991. 352 p.
52. Fenter P., Eberhardt A. Eisenberger P. Self-assembly of n-alkyl thiols as disulfides on Au(111). *Science*. 1994. **266**. P. 1216-1218.
53. Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* 1996. **96**. P. 1533-1554.
54. McCarly R.L., Kim Y-T., Bard A.J. Scanning tunneling microscopy and quartz crystal microbalance studies of Au exposed to sulfide, thiocyanate, and n- octadecanethiol. *J. Phys. Chem.* 1993. **97**. P. 211-215.
55. Bain C.D., Evall J., Whitesides G.M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.* 1989. **111**. P. 7155-7164.
56. Braundmeier A.J., Arakawa E.T. Effect of surface roughness on surface plasmon resonance adsorption. *J. Phys. Chem. Solids*. 1974. **35**. P. 517-520.
57. Костюкевич С.О., Костюкевич К.В., Христосенко Р.В. Спосіб виготовлення робочого елемента перетворювача з призмовим типом збудження поверхневого плазмонного резонансу: пат. 112568 Україна: МПК (2014.01) G01N 21/55. №u201605636; заявл. 25.05.2016; опубл. 26.12.2016, Бюл. № 24.
58. Костюкевич С.О., Христосенко Р.В., Костюкевич К.В., Коптюх А.А., Погода В.І. Ефективний робочий елемент сенсора з призмовим типом збудження поверхневого плазмонного резонансу: патент 128844 Україна: МПК (2014.01) G01N 21/25; B82Y 20/00. № a202102589; заявл. 17.05.2021; опубл. 06.11.2024, Бюл. №45.
59. Lysenko S.I., Snopok B.A., Kostyukevich E.V., Zinio S.A., Sterligov V.A., Shirshov Yu.M., Venger E.F. Light scattering of thin dielectric films: self-assembled monolayers on the surface of polycrystalline gold. *Proc. SPIE*. 1999. **3904**. P. 476-487.
60. Snopok B.A., Strizhak P.E., Kostyukevich E.V., Serebriy V., Lysenko S.I., Shepeliavii P.E, Priatkin S.L., Kostyukevich S.A., Venger E.F., Shirshov Yu.M. Interfacial architecture on the fractal support: polycrystalline gold films as support for self-assembling monolayers. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. 1999. **2**, № 3. P. 86-97.
61. Lysenko S.I., Snopok B.A., Sterligov V.A., Kostyukevich E.V., Shirshov Yu.M. Light scattering by molecular-organized films on the surface of polycrystalline gold. *Optics and Spectroscopy*. 2001. **90**, No.4. P. 606-616.
62. Keller H., Schrepp W., Fuchs H. Self-assembled organic films on gold and silver. *Thin solid films*. 1992. 210/211. P. 799-802.
63. Liedberg B., Lundstrom I. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B*. 1993. **11**. P. 63-72.
64. Tabasi O., Falamaki C., Mahmoudi M. A detailed study on the fabrication of surface plasmon sensor chips: Optimization of dextran molecular weight. *Plasmonics*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11468-018-00903-8>.
65. Нестерова Н.В., Загородня С.Д., Баранова Г.В., Головань А.В., Ушенін Ю.В., Христосенко Р.В. Імуносенсорна тест-система на основі поверхневого плазмонного резонансу для виявлення антитіл проти вірусу Епштейна-Барр: пат. 51125 Україна: МПК (2009) А61К 31/505. № u2009 05251; заявл. 26.05.2009; опубл. 12.07.2010, Бюл. №13.
66. Нестерова Н.В., Носач Л.М., Повниця О.Ю., Загородня С.Д., Баранова Г.В., Головань А.В., Ушенін Ю.В., Христосенко Р.В. Імуносенсорна тест-система для виявлення в сироватках крові антитіл проти аденовірусів людини: пат.46973 Україна: МПК (2009) А61К 47/48, А61К 39/44. №u200907930; заявл. 27.07.2009; опубл. 11.01.2010, Бюл. №1.
67. Гольцов Ю.Г., Матковська Л.О., Снопко Б.А., Костюкевич К.В., Ширшов Ю.М., Венгер Є.Ф. Біологічний оптоелектронний перетворювач, що контролює стереохімічне закріплення активних молекул: пат. 37078 Україна: МПК⁶ G01N 21/55, 33/553. № 2000031543; заявл. 20.03.2000; опубл. 16.04.2001, Бюл. № 3.
68. Snopok B.A., Goltsov Yu.G., Kostyukevich E.V., Matkovskaja L.A., Shirshov Yu.M., Venger E.F. Self-assembled multilayer super-structures as immobilization support for bioreceptors. *Sensors and Actuators B*. 2003. **95**. P. 336-343.
69. Костюкевич Е.В., Христосенко Р.В., Ушенін Ю.В., Самойлов А.В., Костюкевич С.А. Иммуносенсор поверхностного плазмонного резонанса с повышенной чувствительностью и стабильностью для детектирования фибриногена, растворимого фибрина и D-димера в плазме крови человека. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2012. **47**. С.70-76.
70. Harsanyi G. Polymer films in sensor applications: a review of present uses and future possibilities. *Sensor Review*. 2000. **20**, №2. P. 98-105.
71. Zhao B., Feng S., Hua Y., Wang S., Lua X. Rapid determination of atrazine in apple juice using molecularly imprinted polymers coupled with gold nanoparticles-colorimetric/SERS dual chemosensor. *Food Chemistry*. 2019. **276**. P. 366-375.
72. Hu Y., Feng S., Gao F., Li-Chan E.C.Y., Grant E., Lu X. Detection of melamine in milk using molecularly imprinted polymers – surface enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry*. 2015. **176**. P. 123-129.
73. Kumar A., Abbot N.L., Kim E., Biebuyck H.A., Whitesides G.M. Patterned self-assembled monolayers and meso-scale phenomena. *Acc. Chem. Res.* 1995. **28**. P. 219-226.

74. Lopez G.P., Biebuyck H.A., Harter R., Kumar A., Whitesides G.M. Fabrication and imaging of two-dimensional patterns of proteins adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 1993. **115**. P.10774-10781.
75. Dulcey C.S., Georger J.H., Krauthamer Jr.V., Stenger D.A., Fare T.L., Calvert J.M. Deep UV photochemistry of chemisorbed monolayers: patterned coplanar molecular assemblies. *Science*. 1991. **252**. P. 551-554.
76. Cotton C., Glidle A., Beamson G., Cooper J. M. Dynamics of the formation of mixed alkanethiol monolayers: application in structuring biointerfacial arrangements. *Langmuir*. 1998. **14**. P. 5139-5146.
77. Bain C.D., Whitesides G.M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain. *J. Am. Chem. Soc.* 1989. **111**. P. 7164-7175.
78. Yola M.L., Atar N., Eren T. Determination of amikacin in human plasma by molecular imprinted SPR nanosensor. *Sensors and Actuators B*. 2014. **198**. P. 70-76.
79. Пілецький С.А., Костюкевич К.В., Ширшов Ю.М., Снопок Б.А. Оптичний перетворювач для безпосереднього якісного та кількісного визначення речовини у рідкій пробі: пат. 34994 Україна: МПК⁶ G01N 21/55, 30/93. № 99074335; заявл. 27.07.1999; опубл. 15.03.2001, Бюл. № 2.
80. Костюкевич Е.В., Костюкевич С.А. Сенсор поверхностного плазмонного резонанса для определения уровня барбитуратов в жидкой пробе. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2010. **45**. С. 130-136.

Інститут фізики напівпровідників
ім. В.Є. Лашкарьова НАН України,
41, просп. Науки,
03028 Київ, Україна

Отримано: 07.07.2025