

Uniwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii



mgr Paweł Falkowski

**BADANIA WPLYWU ARCHITEKTURY I BUDOWY CHIPA
NA WYBRANE PARAMETRY ANALITYCZNE METOD
WYKORZYSTUJĄCYCH BIOSENSORY SPRI**

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana w Pracowni Bioanalizy

Katedry Chemii Fizycznej

Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku

Promotor: dr hab. Ewa Gorodkiewicz, prof. UwB

Białystok, 2022

Podziękowania

*Serdecznie dziękuję **Pani dr hab. Ewie Gorodkiewicz, profesor UwB** za inspirację i motywację, opiekę merytoryczną, cenne wskazówki oraz przyjazną atmosferę pracy podczas pisania rozprawy doktorskiej.*

*Podziękowania składam również **Panu dr hab. Piotrowi Mrozkowi, profesorowi Politechniki Białostockiej** za dostarczenie materiałów do badań, wsparcie merytoryczne oraz owocne i inspirujące dyskusje podczas pisania pracy.*

Spis treści

1. <i>Wstęp</i>	6
2. <i>Spis stosowanych skrótów</i>	8
3. <i>Przegląd literaturowy</i>	10
3.1. Podstawy teoretyczne techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR)	11
3.1.1. Definicja SPR	11
3.1.2. Czynniki warunkujące powstanie efektu powierzchniowego rezonansu plazmonów ..	11
3.1.3. Charakterystyka krzywej SPR i parametry refraktometryczne	17
3.1.3.1. Reflektancja	18
3.1.3.2. Kąt graniczny	20
3.1.3.3. Pełna szerokość krzywej w połowie maksimum (FWHM)	20
3.1.3.4. Czułość	21
3.1.3.5. Rozdzielczość	22
3.1.3.6. Kryterium jakości FOM	22
3.1.4. Stosowane konfiguracje układów optycznych SPR	23
3.1.4.1. Konfiguracje oparte na pryzmacie (konfiguracja Otto i Kretschmanna)	23
3.1.4.2. Konfiguracja oparta na siatce dyfrakcyjnej	25
3.1.4.3. Konfiguracja oparta na światłowodzie	26
3.1.5. Odmiany technik SPR	27
3.1.5.1. Klasyczny SPR	28
3.1.5.2. Zlokalizowany Rezonans Plazmonów Powierzchniowych L-SPR	29
3.1.5.3. Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji obrazowej SPRi	30
3.1.5.4. Pozostałe techniki SPR	32
3.1.6. Wady i zalety techniki SPR	33
3.1.7. Kierunki rozwoju techniki SPR	35
3.2. Charakterystyka sensorów stosowanych w pomiarach techniką SPR	36
3.2.1. Definicja sensora	36
3.2.2. Konstrukcja sensora – struktura i układ poszczególnych warstw	37
3.2.2.1. Budowa podstawy sensora	38
3.2.2.2. Technika próżniowego osadzania metali z fazy gazowej (PVD) jako metoda aplikacji warstw chipa SPR	40
3.2.2.3. Zasady doboru materiałów przy konstruowaniu chipów	42
3.2.2.4. Wpływ konstrukcji chipa na funkcjonowanie sensorów	49
3.2.2.5. Zastosowanie samoorganizujących monowarstw w konstruowaniu sensorów	57

3.2.2.6. Proces immobilizacji biomolekuł w sensorach SPR	61
3.2.2.7. Wykorzystanie nanotechnologii do poprawy charakterystyki sensorów	65
3.3. Przegląd obecnie stosowanych urządzeń SPR	70
3.4. Przykłady zastosowań techniki SPR w diagnostyce oznaczeń substancji biologicznie czynnych	77
4. Badania własne	83
4.1. Cel pracy	84
4.2. Spis odczynników i materiałów zastosowanych w pracy	85
4.3. Charakterystyka zastosowanego układu badawczego	87
4.4. Opis chipów wykorzystanych do pomiarów	87
4.4.1. Chip złoty Au	87
4.4.2. Chip srebrno – złoty Ag/Au	88
4.5. Procedura wykonania chipa	90
4.5.1. Technika próżniowego napylenia metalami srebra i złota (PVD)	90
4.5.2. Technika drukowania masek polimerowych	92
4.5.3. Dobór i aplikacja maski foliowej	95
4.5.4. Opis procedury aplikacji pozostałych warstw linkera i liganda (receptora) w zależności od zastosowanego analitu	97
4.5.5. Krótka charakterystyka oznaczanych biomarkerów	99
4.6. Opis procedury pomiarów wykonywanych przy zastosowaniu aparatu SPRi	101
4.7. Opracowanie parametrów analitycznych biosensorów	104
4.7.1. Krzywa kalibracyjna i zakres prostoliniowy	104
4.7.2. Czułość	111
4.7.3. Precyzja i dokładność	114
4.7.4. Limity detekcji i oznaczalności, zakres odpowiedzi liniowej	118
4.7.5. Walidacja metody przy użyciu próbek biologicznych	120
5. Dyskusja wyników	131
6. Wnioski	136
7. Streszczenie	138
8. Summary in English	139
9. Spis literatury	140
10. Dorobek naukowy	153

1. Wstęp

Technika powierzchniowego rezonansu plazmonów zwana również SPR (z ang. Surface Plasmon Resonance) jest procedurą analityczną mającą zastosowanie w ilościowej i jakościowej analizie cząsteczek związków organicznych jak również nieorganicznych. Metodyka ta stosowana jest w wielu dziedzinach, m.in. w ochronie środowiska, badaniach biologicznych, bezpieczeństwie żywności i diagnostyce klinicznej [1 – 3]. Dużą część analiz spośród wyżej wymienionych stanowią oznaczenia substancji biologicznie czynnych, m.in. biomarkerów, których stężenie pozwala określać rodzaj oraz stadium wielu chorób, np. nowotworów, chorób układu krążenia, zakaźnych, autoimmunologicznych, endokrynologicznych.

Technika SPR jest metodą bezznacznikową, (z ang. label-free), co oznacza, iż w oznaczeniach tego typu nie ma potrzeby stosowania odpowiedniego znakowania badanych substancji, np. użycia radioizotopów, enzymów, chromogenów lub innych markerów specjalnych. Stanowi to jednocześnie ogromną zaletę takiej analizy sprawiając, iż jest ona konkurencyjna względem powszechnie stosowanej chromatografii cieczowej, płytkowej czy też testów immunoenzymatycznych (ELISA) stanowiących również swoistego rodzaju punkt referencyjny w analizach porównawczych.

Podstawą jakościowego jak i ilościowego oznaczenia biomarkerów jest odpowiednio skonstruowany, wysoce selektywny biosensor, specyficzny względem oznaczanego biomarkera. Jego wielowarstwowa konstrukcja zawiera swoiste aptamery, przeciwciała lub inhibitory pozwalające na wychwytywanie oznaczanego związku z płynu ustrojowego, np. surowicy, co skutkuje wytworzeniem sygnału analitycznego wygenerowanego dzięki zjawisku powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR). Obecnie prowadzone badania obejmują szeroką charakterystykę analityczną opracowanych biosensorów, których selektywność i czułość są najważniejszymi parametrami analitycznymi, będącymi podstawą właściwego oznaczenia w technice SPR. Postęp technologiczny jak i wysokie wymagania jakościowe analiz laboratoryjnych wymuszają rozwój metod wykorzystujących zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów, a co za tym idzie udoskonalanie sensorów pod względem parametrów analitycznych, tj. czułość, selektywność, limit detekcji. Pociąga to za sobą ciągle dopracowywanie i ulepszanie konstrukcji czujników poprzez zastosowanie nowych materiałów i wdrażanie innowacyjnych technologii produkcji, np. nanotechnologii.

Niniejsza praca stanowi podsumowanie badań nad opracowaniem nowej konstrukcji biosensora, charakteryzującego się lepszymi parametrami analitycznymi względem

dotychczas używanych bioczujników w metodach oznaczania markerów wybranych chorób.

2. Spis stosowanych skrótów

AFM	mikroskopia sił atomowych (ang. <i>atomic force microscopy</i>)
ATR	całkowite tłumione odbicie (ang. <i>total attenuated reflection</i>)
CCD	sensor optyczny – kamera (ang. <i>charge-coupled device</i>)
CEA	antygen rakowo – płodowy (ang. <i>carcinoembryonic antigen</i>)
CEA 125	antygen nowotworowy 125 (ang. <i>cancer antigen 125</i>)
Da	Dalton, jednostka masy cząsteczkowej
DCC	dicykloheksylokarbodiimid (ang. <i>N, N'-dicyclohexylcarbodiimide</i>)
EW	fala zanikająca (ang. <i>evanescent wave</i>)
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylamino)propylokarbodiimid (ang. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i>)
FDTD	symulacja metodą różnic skończonych (ang. <i>finite-difference time-domain</i>).
FWHM	pełna szerokość przy połowie maksimum (ang. <i>full width at half maximum</i>)
HER 2	receptor kinazy tyrozynowej 2 erb-b2 (ang. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
ITO	tlenek cyny indu (ang. <i>indium tin oxide</i>)
Label-free	określenie metody bez znacznikowej
LED	dioda elektroluminescencyjna (ang. <i>light emitting diode</i>)
LOD	limit wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i>)
LOQ	limit oznaczalności (ang. <i>limit of quantification</i>)
L-SPR	zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonów (ang. <i>localized surface plasmon resonance</i>)
MP-SPR	wieloparametrowy powierzchniowy rezonans plazmonów (ang. <i>multi-parametric surface plasmon resonance</i>)
NP	nanocząstka (ang. <i>nanoparticle</i>)
NHS	1-hydroksypirolidyno-2,5-dion (ang. <i>N-hydroxysuccinimide</i>)
PCB	obwód drukowany (ang. <i>printed circuit board</i>)
PCF	światłowód fotoniczny (ang. <i>photonic crystal fiber</i>)
POF	światłowód polimerowy (ang. <i>polymer optical fiber</i>)
PGMA	poli(metakrylanu glicydydu) (ang. <i>poly(glycidyl methacrylate)</i>)
PMMA	polimetakrylan metylu (ang. <i>poly(methyl methacrylate)</i>)
PPF	folie polimeryzowane plazmowo (ang. <i>plasma polymerized films</i>)
PSA	specyficzny antygen gruczołu krokowego (ang. <i>prostate specific antigen</i>)
PVD	osadzanie z fazy gazowej (ang. <i>physical vapor deposition</i>)

P2VP	2-winylopirydyna (ang. <i>poly-(2-vinyl-pyridine)</i>)
QD	kropka kwantowa (ang. <i>quantum dot</i>)
RIU	jednostka współczynnika załamania światła (ang. <i>refractive index unit</i>)
RSD	względne odchylenie standardowe (ang. <i>relative standard deviation</i>)
SAM	warstwy samoorganizujące się (ang. <i>self-assembled monolayers</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SEM	skaningowy mikroskop elektronowy (ang. <i>scanning electron microscope</i>)
SM	stwardnienie rozsiane (ang. <i>multiple sclerosis</i>)
SP-EIS	powierzchniowy rezonans plazmonów sprzężony ze spektroskopią impedancyjną (ang. <i>surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy</i>)
SPR	powierzchniowy rezonans plazmonów (ang. <i>surface plasmon resonance</i>)
SPRi	powierzchniowy rezonans plazmonów w wersji obrazowej (ang. <i>surface plasmon resonance imaging</i>)
SPR-MS	powierzchniowy rezonans plazmonów sprzężony ze spektrometrią mas (ang. <i>surface plasmon resonance and mass spectrometry</i>)
SPW	powierzchniowa fala plazmonów (ang. <i>surface plasmon wave</i>)
TIR	całkowite wewnętrzne odbicie TIR (ang. <i>total internal reflection</i>)
VOC	lotne związki organiczne (ang. <i>volatile organic compounds</i>)

3. Przegląd literaturowy



3.1. Podstawy teoretyczne techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR)

Technika SPR jest metodą jakościowego i ilościowego oznaczania substancji związków organicznych, takich jak biomarkery raka, cząsteczki DNA czy nawet proste związki nieorganiczne występujące jako zanieczyszczenie wody, wykorzystująca zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów. Aby zrozumieć cały proces zjawiska SPR i wszystkie etapy oznaczenia analitycznego, konieczne jest wyjaśnienie mechanizmu powierzchniowego rezonansu plazmonów oraz podstawowych definicji.

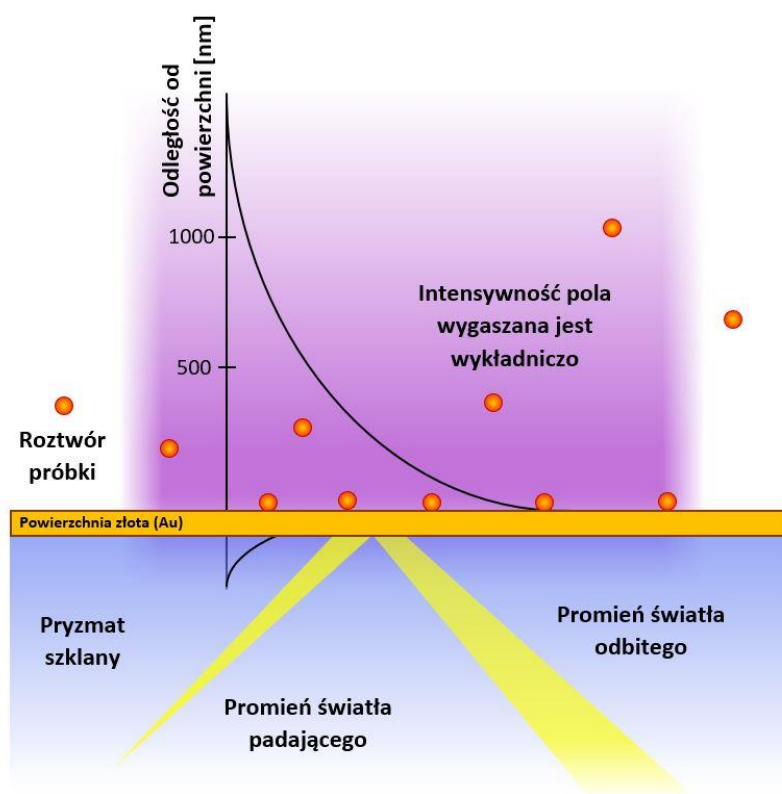
3.1.1. Definicja SPR

Rezonans plazmonów powierzchniowych (SPR) to zjawisko, które występuje na styku dwóch faz różniących się współczynnikiem załamania światła. Polega ono na powstaniu na wspomnianej granicy faz fal elektromagnetycznych przebiegających równoległe do powierzchni, zwanych plazmonami lub polarytonami. Najbardziej charakterystyczną cechą tego zjawiska jest fakt, iż granica faz, na której ono zachodzi jest niezwykle wrażliwa na zmiany właściwości fizykochemicznych powierzchni, zwłaszcza gdy adsorbowane są na niej analizowane substancje, co stanowi podstawę do wykorzystania tego zjawiska w oznaczeniach jakościowych i ilościowych.

3.1.2. Czynniki warunkujące powstanie efektu powierzchniowego rezonansu plazmonów

Zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów występuje na styku ośrodków o skrajnie różnych współczynnikach załamania światła, np. ciecz – powietrze lub ciało stałe – powietrze. Powierzchnia, na której powstaje owe zjawisko, pokryta jest cienką warstwą metalu. Czynnikiem warunkującym wytworzenie rezonansu plazmonów powierzchniowych, jest promieniowanie elektromagnetyczne, padające na powierzchnię metalu. Oddziałuje ono z chmurą elektronów walencyjnych warstwy metalicznej i przy określonych warunkach tworzy pole nadkrytyczne a tym samym efekt rezonansowy. Najistotniejszymi czynnikami, które warunkują powstanie efektu SPR są współczynniki załamania na granicy faz, częstotliwość i kąt padania światła jak i przenikalność magnetyczna oraz elektryczna obu faz. Wszystkie te parametry opisywane są wzorami Fresnella i Maxwella, stanowiące podstawę dalszych obliczeń.

Efekt SPR i technika oparta na tych zjawiskach jest obecnie stosowana w oznaczeniach analitycznych ze względu na fakt, że granica faz, na której powstają plazmony, jest niezwykle wrażliwa na zmiany na powierzchni, zwłaszcza gdy analizowane substancje obecne na granicy są na niej adsorbowane. Przykład pokazano na rysunku 1.



Rys. 1. Graficzne przedstawienie efektu SPR. Opracowanie własne.

Wspomniane pole nadkrytyczne tworzone jest wówczas, gdy światło monochromatyczne p spolaryzowane pada pod określonym kątem na warstwę metalu i ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu (rys. 2). Odbicie światła opisywane jest za pomocą wzoru Fresnella, przy ogólnym założeniu, że kąt światła padającego φ_p i światła odbitego φ_o są sobie równe:

$$\varphi_p = \varphi_o \quad (1)$$

Na skutek tego, współczynnik odbicia według Fresnella opisany jest następującym wyrażeniem:

$$R = R(n_1, n_2, n_3, d, \omega, \varphi) \quad (2)$$

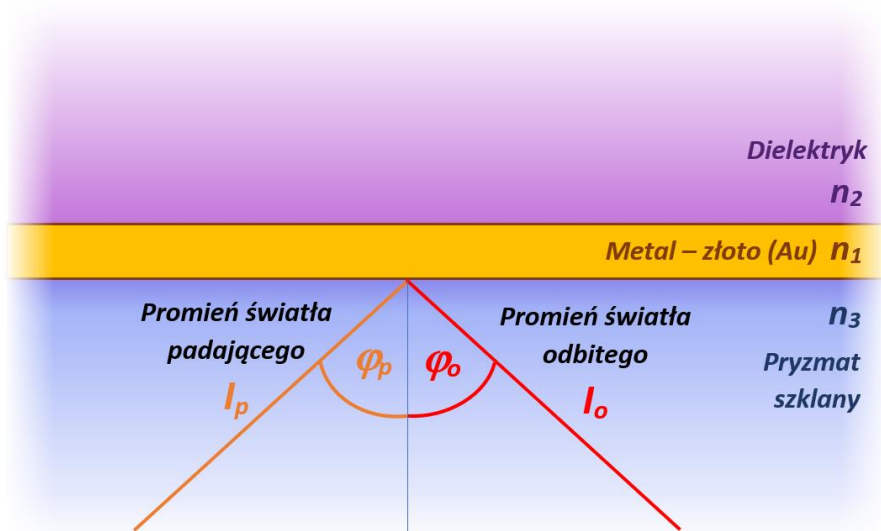
gdzie:

n_1, n_2, n_3 - współczynniki załamania światła w ośrodkach 1,2,3,

d – grubość warstwy metalu,

ω - częstotliwość fali światła padającego,

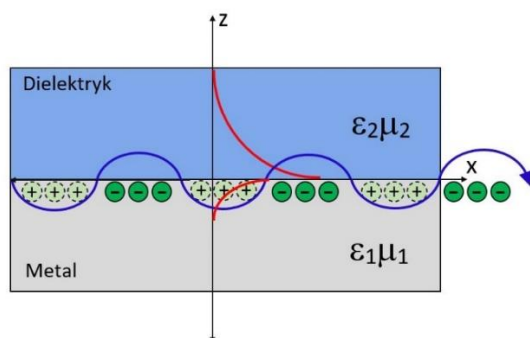
φ - kąt promienia światła padającego.



Rys. 2. Graficzne przedstawienie układu optycznego dielektryk – metal – szkło. Opracowanie własne.

Wzór Fresnella określa zależność zjawiska wewnętrznego odbicia a tym samym efektu SPR od wartości współczynników załamania faz graniczących ze sobą oraz częstotliwości i kąta padającego światła.

Dzięki obecności elektronów w tzw. gazie elektronowym, czyli swobodnych elektronów, które znajdują się pomiędzy złączami sieci krystalicznej [4], oscylują one i generują falę elektromagnetyczną blisko granicy dwóch różnych ośrodków np. metalu i cieczy, która jest równoległa do ich powierzchni. Tworzone w ten sposób pole indukuje tzw. polarytony powierzchniowe zwane również plazmonami powierzchniowymi, które są niczym innym jak swobodnie przemieszczającymi się falami elektromagnetycznymi, poruszającymi się w chmurze elektronów walencyjnych metalu.



Rys. 3. Schemat powierzchniowych fal plazmonowych na granicy między metalem a dielektrykiem. Plazmon propaguje w kierunku x i wygasa wykładniczo w kierunku z , ϵ - przenikalność elektryczna, μ - przenikalność dielektryczna [5].

Plazmony powierzchniowe, czyli fala gęstości ładunku, rozchodzą się wzdłuż granicy faz. Ich wektory pola elektrycznego mają swoje maksima na granicy faz i zanikają wykładniczo prostopadle do tej granicy na oba ośrodki (rys. 3). Warunkiem wytworzenia tych fal, jest transfer energetyczny odbitych fotonów do warstwy metalu tuż przy granicy faz, co skutkuje drastycznym zmniejszeniem intensywności odbitego promieniowania. Aby mogło dojść do sprzężenia a tym samym wytworzenia rezonansu, fotony i plazmony powierzchniowe muszą posiadać ten sam wektor falowy k , zaznaczony punktem przecięcia krzywych dyspersji (rys. 4) opisywanych następującym wzorem Maxwella:

$$k_{sp} = \left(\frac{\omega}{c}\right) \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (3)$$

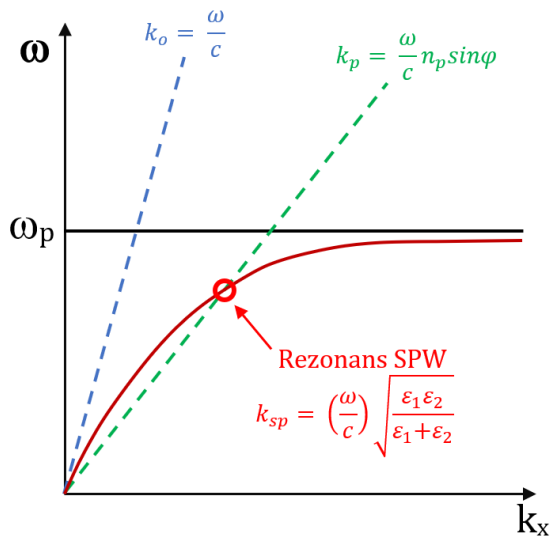
gdzie:

k_{sp} – wektor falowy plazmonów powierzchniowych

ω - częstotliwość fali światła padającego,

c – prędkość światła w próżni,

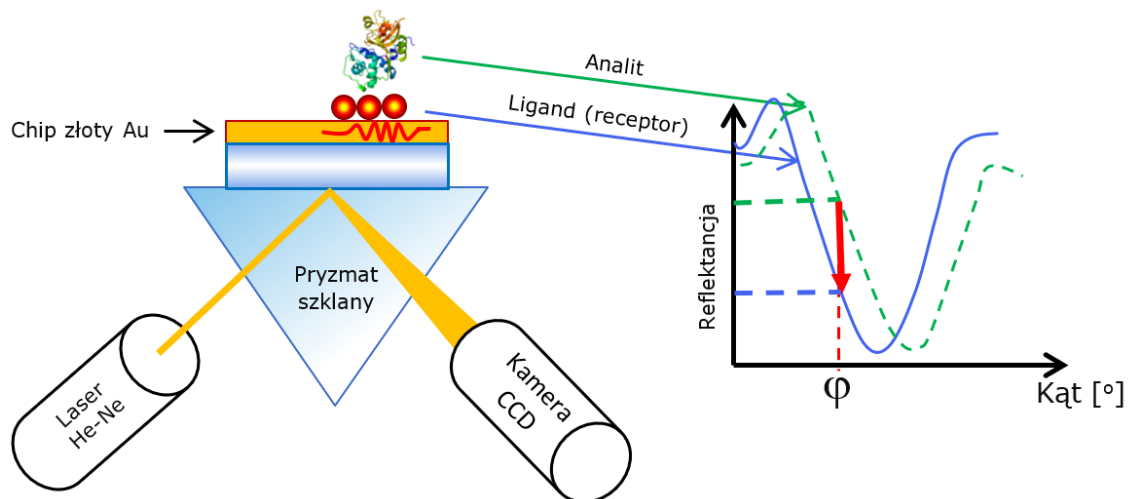
ϵ_1, ϵ_2 – współczynnik przenikalności elektrycznej dla danego ośrodka 1 i 2.



Rys. 4. Krzywa dyspersji dla układu metal – powietrze. Opracowanie własne.

Z rysunku 4 wynika również, że rezonans będzie miał miejsce, jeśli zmniejszy się nachylenie krzywej dyspersji fotonów (krzywa k_o , linia przerywana), która jest równa prędkości światła. Zmniejszenie prędkości światła jest możliwe dzięki przepuszczeniu go przez ośrodek o większym współczynniku załamania n_p np. metalu. Zmniejszając prędkość światła, krzywa k_p ulega znacznemu przesunięciu a co za tym idzie przecięciu z krzywą dyspersji plazmonów powierzchniowych, generując rezonans.

Bardziej ogólne przedstawienie tego zjawiska na rysunku 5 pokazuje, jak istotny jest parametr kąta SPR, przy którym zachodzi to zjawisko, i który odgrywa kluczową rolę w jego tworzeniu.



Rys. 5. Ilustracja zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonów na pryzmacie i jego zastosowanie w analizie. Opracowanie własne.

Warto wspomnieć, iż kąt SPR i jego wartość zależą w głównej mierze od współczynników załamania światła obu ośrodków: przewodnika, np. metalu oraz otaczającego go dielektryka, jednakże w odległości nieprzekraczającej długości wygasania pola nadkrytycznego. Kąt SPR jest wielkością charakterystyczną dla danego układu analitycznego, gdyż jego wartość jest bezpośrednio zależna od zmian fizykochemicznych zachodzących na granicy faz dwóch ośrodków, a co za tym idzie wprost proporcjonalne do stężenia oznaczanego związku. Analit zawiera biocząsteczki, które mają być oznaczane. Są one wychwytywane przez odpowiednie ligandy (receptory) przez co wiążą się z powierzchnią metalu i zmieniają właściwości całego ośrodka (roztworu). Po zaadsorbowaniu analizowanej cząsteczki zmienia się współczynnik załamania światła roztworu, a także kąt graniczny. Z tego powodu krzywa odbicia jest przesunięta, a co za tym idzie wartości wyznaczone dla tego samego kąta granicznego ulegają zmianie. Różnica we współczynniku odbicia odzwierciedla stężenie analitu.

Plazmony powierzchniowe powstające na granicy faz dwóch różnych ośrodków posiadają dwie składowe: falę elektromagnetyczną oraz ładunek powierzchniowy. Kombinacja obu tych parametrów ma istotny wpływ na wzmocnienie jednej ze składowych pola prostopadłych do jego powierzchni, tuż przy jego powierzchni oraz wykładnicze wygaszenie w miarę oddalania się od powierzchni, co obrazuje zanikający charakter pola nadkrytycznego. Z danych literaturowych [6] wynika, iż droga zaniku pola - d wynosi 50% wartości długości fali światła padającego na warstwę metalu. Długość zaniku pola, jest również określana jako odległość, przy której intensywność pola spada do ok. 37% natężenia wyjściowego. Z dostępnych danych [7 – 20] wiadomo, iż większość komercyjnych urządzeń SPR stosuje promieniowanie o długości fali w zakresie 600 – 800 nm, z czego wynika, że długość zaniku pola nadkrytycznego wynosi od 300 – 400nm.

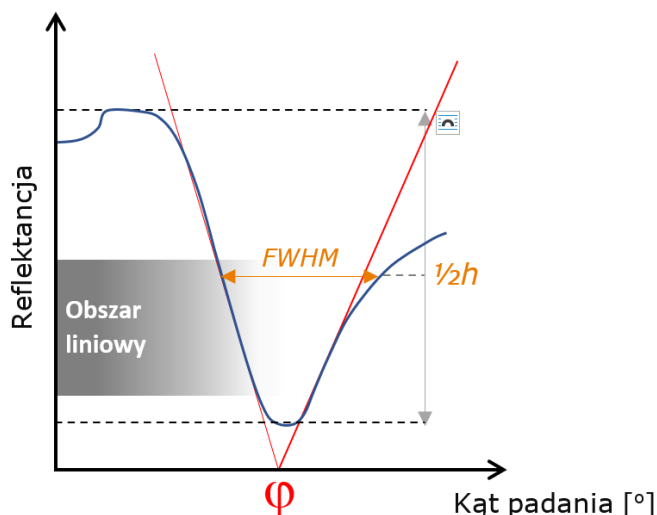
Istotny jest również fakt, iż aby powstał efekt powierzchniowego rezonansu plazmonów, konieczne jest, aby metal posiadał elektrony z pasma przewodnictwa, które w odpowiednich warunkach mogą rezonować z promieniowaniem elektromagnetycznym oświetlającym granicę faz obu ośrodków o różnych współczynnikach załamania światła. Wśród metali, które wykazują zdolność rezonowania wymieniane jest złoto jako najbardziej odpowiednie do badań eksperymentalnych w pomiarach SPR. Inne metale są albo dość drogie (In), gwałtownie reagują (Na), są zbyt podatne na utlenianie (Ag) lub szerokość krzywej SPR w połowie maksimum jest zbyt duża (Cu, Al) aby mogły stanowić podstawę sprawnie działającego sensora.

3.1.3. Charakterystyka krzywej SPR

Zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów obrazowane jest spadkiem intensywności światła odbitego od powierzchni styku dwóch ośrodków o skrajnie różnych współczynnikach załamania tj. metalu i dielektryka. Zmiana intensywności promieniowania, będąca miarą zjawiska SPR może być przedstawiona w postaci funkcji zależnej od długości fali, jak i kąta padania światła. Zmiany te można zobrazować na kilka sposobów. Najbardziej znanym i najczęściej stosowanym podejściem jest metoda przesunięcia kąta (zwana również skanowaniem kątowym) [21], w której długość fali promieniowania utrzymywana jest na stałym poziomie, zaś kąt padania jest zróżnicowany. Pomiaru takie wykonywane są poprzez skanowanie wiązki światła pod różnymi kątami padania lub zastosowanie wiązki rozbieżnej zawierającej określony zakres kątowy. W przypadku takiej konfiguracji, podczas skanowania pojedynczy detektor rejestruje intensywność odbitego światła. W przypadku zastosowania wiązki rozbieżnej zmiana intensywności promieniowania wykrywana jest przez szereg diod dla różnych kątów.

Inną metodą obrazowania zjawiska SPR jest metoda przesunięcia długości fali (lub skanowania długości fali) wykorzystująca określony zakres długości fal światła padającego na powierzchnię metal – dielektryk. W tym przypadku zmiana intensywności odbitego światła obserwowana jest dla konkretnej długości fali, a nie kąta. Taka interpretacja zjawiska SPR preferowana jest w przypadku sond, w których światło białe jest przesyłane przez światłowód. Jednym z argumentów stosowania takiego obrazowania jest fakt, iż technika ta charakteryzowana jest lepszymi wartościami parametrów refraktometrycznych [22].

Podsumowując, zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów najczęściej przedstawiane jest w postaci tzw. krzywej SPR (rys. 6), czyli wykresu obrazującego zmianę refleksyjności w funkcji kąta załamania padającego światła. Graficzne przedstawienie krzywej SPR obrazuje rysunek 4. Krzywa ta charakteryzowana jest parametrami refraktometrycznymi, tj. refleksyjnością, kątem granicznym φ , pełną szerokością krzywej w połowie maksimum (FWHM). Należy zaznaczyć, iż czynniki te opisują krzywą SPR i nie są w żaden sposób tożsame z procedurą analityczną, która wykorzystuje zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów. Sama technika pomiarowa może być charakteryzowana następującymi wielkościami: czułością, rozdzielczością, dokładnością oraz kryterium jakości (FOM).



Rys. 6. Graficzne przedstawienie krzywej SPR. φ - kąt SPR, FWHM – pełna szerokość krzywej w połowie maksimum, h – wysokość maksimum krzywej SPR. Opracowanie własne.

Wart podkreślenia jest fakt, iż aby technika powierzchniowego rezonansu plazmonów przyniosła miarodajne wyniki analizy, krzywa SPR powinna charakteryzować się wysoką czułością oraz szerokim zakresem liniowym. Innymi słowy, konfiguracja SPR powinna generować miarodajną zmianę natężenia światła odbitego, przy zmieniającej się wartości współczynnika załamania w warstwie metalicznej. Aby pomiar mógł zostać wykorzystany w analizie ilościowej zmiana natężenia odbitego światła powinna być liniowa w możliwie najszerszym zakresie, tak, aby przetwarzanie danych było najbardziej wygodne [23].

3.1.3.1. Reflektancja

Reflektancja jest jednym z głównych parametrów obrazujących intensywność zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonów. Wielkość ta nazywana jest również jako współczynnik odbicia światła od powierzchni materiału (metal). Innymi słowy opisuje ona skuteczność w odbijaniu światła i przedstawiana jest za pomocą ogólnego równania 4:

$$R = \frac{I_o}{I_p} \quad (4)$$

gdzie,

R – reflektancja,

I_o – intensywność promieniowania odbitego od powierzchni materiału,

I_p – intensywność promieniowania padającego na określony materiał.

Powyższy wzór opisuje reflektancję jako ułamek intensywności światła, który jest odbijany na granicy faz metal-dielektryk. Jest to wielkość bez jednostkowa, jednakże umownie reflektancji przypisuje jednostkę określaną jako RIU (*ang. refractive index unit*). Współczynnik odbicia jest składnikiem odpowiedzi struktury elektronowej materiału na pole elektromagnetyczne światła i jest ogólnie funkcją częstotliwości lub długości fali światła, jego polaryzacji i kąta padania. Jego wartość zależna jest również od właściwości optycznych, materiałowych i fizycznych obu stykających się ze sobą ośrodków (metal, dielektryk). Zależności te opisywane są następującym wzorem [24]:

$$R = R(n_1, n_2, n_3, d, \omega, \varphi) \quad (5)$$

gdzie,

R – reflektancja,

n_1, n_2, n_3 – współczynniki załamania światła warstw dielektryka (1), metalu (2), szkła (pryzmatu) (3),

d – grubość warstwy metalu,

ω - częstotliwość światła padającego na warstwę metalu,

φ - kąt padającego światła.

Gdy światło monochromatyczne jest oświetlane pod stałym kątem na warstwę metalu przez określony pryzmat, współczynnik odbicia R (reflektancja) określany jest wyłącznie na podstawie współczynnika odbicia ośrodka dielektrycznego n_d . W przypadku padającego światła p-spolaryzowanego, współczynnik odbicia R można obliczyć, stosując dobrze znaną teorię Fresnella w następujący sposób:

$$R = |r_p|^2 \quad (6)$$

$$r_p = \frac{[r_{31} + r_{12} \exp(2ik_{z1}d)]}{[1 + r_{31} + r_{12} \exp(2ik_{z1}d)]} \quad (7)$$

$$r_{31} = \frac{Z_3 - Z_1}{Z_3 + Z_1}, \quad r_{12} = \frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2} \quad (8)$$

$$Z_i = \frac{\varepsilon_i}{k_{zi}}, \quad k_{zi} = [\varepsilon_i(\omega/c)^2 - k_{x3}^2]^{0,5}, \quad i = 1,2,3 \quad (9)$$

$$k_{x3} = \varepsilon_3^{1/2} \frac{\omega}{c} \sin \varphi \quad (10)$$

$$n_i = \sqrt{\varepsilon_i} \quad (11)$$

gdzie,

r_p – współczynnik odbicia światła p-spolaryzowanego,

Z_i – impedancja wolnej przestrzeni (wiążąca przenikalność elektryczną ze stałą falową),

ϵ_i – przenikalność elektryczna ośrodka,

φ - kąt odbicia światła.

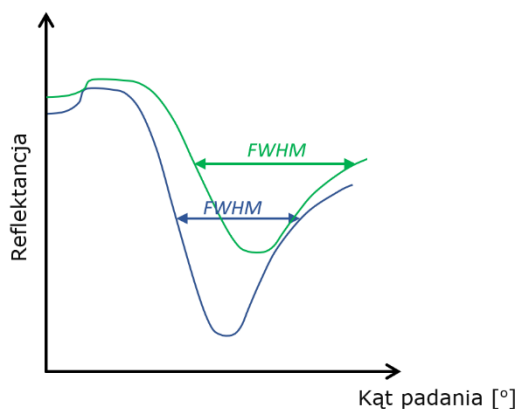
3.1.3.2. Kąt graniczny

Kąt graniczny kąt, przy którym światło padając na pryzmat a następnie sensor, generuje efekt powierzchniowego rezonansu plazmonów. Jak już wcześniej wspomniano kąt SPR i jego wartość zależą w głównej mierze od współczynników załamania światła obu ośrodków: przewodnika – metalu oraz otaczającego go dielektryka [6]. Jest on wielkością charakterystyczną dla danego układu metal – dielektryk i stanowi punkt odniesienia przy opracowywaniu techniki pomiarowej oraz doboru materiałów przy konstrukcji biosensorów.

Do wyznaczenia kąta granicznego stosowane są powszechnie analogowe lub cyfrowe refraktometry. Jednakże wielkość ta może być również odczytana z wykresu SPR (rys. 4). W tym celu należy wykreślić styczne do obu ramion krzywej a następnie odczytać jego wartość z punktu ich przecięcia po ekstrapolacji z osią x.

3.1.3.3. Pełna szerokość krzywej przy połowie maksimum FWHM

Kolejnym równie istotnym parametrem opisującym wykres zależności reflektancji w funkcji kąta padania jest pełna szerokość krzywej przy połowie maksimum (*FWHM* – ang. *full width in half maximum*). Jest to wielkość określająca szerokość zapadu reflektancji w połowie wysokości krzywej SPR. Oznacza różnicę między dwiema wartościami kąta padania, przy których intensywność odbicia jest równa połowie wartości maksymalnej [25]. Charakteryzuje ona konkretny układ przewodnik – dielektryk, zatem jej wartość zależna jest od takich czynników jak współczynnik załamania oraz rodzaj użytych materiałów (np. metalu – Ag, Au, Cu) lub nawet rodzaj zachodzącej reakcji na powierzchni biosensora.



Rys. 7. Graficzne przedstawienie parametru FWHM dla dwóch różnych układów metal – dielektryk. FWHM – pełna szerokość w połowie wysokości maksimum krzywej SPR. Opracowanie własne.

Pełna szerokość krzywej przy połowie maksimum pozwala na pośrednie określenie czułości techniki pomiaru a także na porównywanie układów SPR pomiędzy sobą.

3.1.3.4. Czułość

Kolejną grupę parametrów charakteryzujących technikę SPR stanowi czułość – S (ang. *sensitivity*). Definiowana jest ona jako pochodna monitorowanego parametru SPR względem wartości kąta padania. Określa nachylenie liniowej części krzywej względem osi kąta padania. Można ją opisać jako zmianę wartości reflektancji w jednostce kąta:

$$S = \frac{\Delta R [RIU]}{\Delta \varphi [^\circ]} \quad (12)$$

gdzie:

ΔR – różnica wartości reflektancji [RIU],

$\Delta \varphi$ – różnica wartości kąta padania [°].

Czułość techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów jest uzależniona od wielu innych parametrów, tj. składu struktury warstwy metalicznej czujnika, rodzaju reakcji zachodzących na jego powierzchni [26]. Wielkość ta stosowana jest głównie jako miarodajne narzędzie do porównywania czujników i ich konstrukcji np. dwu lub trzywarstwowych a także wpływu innych materiałów na działanie sensorów [27]. Czułość wykorzystywana jest również do określania innych, równie ważnych parametrów refraktometrycznych np. jakości pomiaru SPR zwanego FOM (ang. *figure of merit*) [28].

3.1.3.5. Rozdzielczość

Rozdzielczość techniki SPR określana jest jako najmniejsza wykrywalna zmiana sygnału wyjściowego, np. refleksyjności. Rozdzielczość zależy w głównej mierze od dokładności, z jaką monitorowany parametr SPR może być wyznaczony przez określone urządzenie pomiarowe (sensor) i jako taki ograniczony jest przez szum czujnika [29]. Rozdzielczość bezpośrednio związana jest również z czułością sensora i monitorowana jest w liniowym odcinku krzywej SPR, przy stałej wartości kąta padania. Wyrażana jest zazwyczaj w postaci odchylenia standardowego szumu względem parametru refleksyjności, odniesionego do czułości pomiaru:

$$r = \frac{\sigma_{so}}{S} \quad (13)$$

gdzie:

σ_{so} – odchylenie standardowe szumu,

S – czułość pomiaru.

Rozdzielczość zależy pośrednio od innych czynników np. generujących szum. Zalicza się do nich jakość zastosowanego układu optycznego i elektroniki odczytowej przyrządu SPR. Dominującymi źródłami szumu są wahania natężenia światła emitowanego przez źródło, statystyczne właściwości światła (szum śrutowy) oraz szum w konwersji natężenia światła na fotoelektrony przez detektor i obwody pomocnicze [30].

3.1.3.6. Jakość pomiaru FOM

Jakość pomiaru to parametr oceny działania sensora SPR. Zdefiniowany jest jako stosunek czułości (S) do pełnej szerokości w połowie maksimum (FWHM) spadku refleksyjności:

$$FOM[RIU^{-1}] = \frac{S [^{\circ}/RIU]}{FWHM [^{\circ}]} \quad (14)$$

FOM – jakość pomiaru SPR [RIU^{-1}],

S – czułość [$^{\circ}/RIU$],

FWHM – pełna szerokość krzywej przy połowie maksimum [$^{\circ}$].

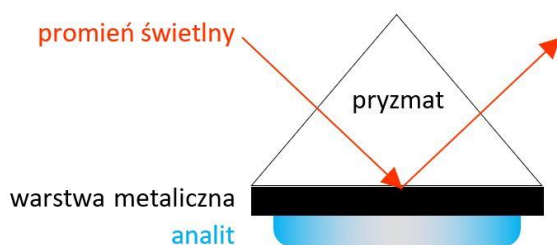
Parametr jakości pomiaru FOM jest uzależniony bezpośrednio od czułości pomiaru i kształtu krzywej SPR (szerokość krzywej). Jak już wspomniano w rozdziale 3.1.3.3. i 3.1.3.3. parametry te z kolei kształtowane są przez dobór materiałów przy konstruowaniu struktury sensora np. metale lub dielektryki wpływające na zmianę współczynnika załamania [31] a także rodzaju zastosowanych substancji biologicznych biorących udział w etapie immobilizacji. FOM pośrednio kształtowany jest również przez rodzaj zastosowanej techniki pomiarowej (rozdział techniki pomiarowe SPR).

3.1.4. Stosowane konfiguracje układów optycznych SPR

W układzie optycznym SPR plazmony powierzchniowe są wzbudzane poprzez padający promień świetlny, który odbijając się od powierzchni tego ośrodka stanowi podstawę generowanego sygnału analitycznego. Układ optyczny można zdefiniować zatem jako pewnego rodzaju konfigurację urządzeń, materiałów, zjawisk o określonych parametrach fizykochemicznych i matematycznych (skład warstw, wartości współczynników odbicia lub załamania, geometria układu). W oparciu o metodę wzbudzania plazmonów powierzchniowych układy optyczne można sklasyfikować jako układy oparte na: pryzmatach (wśród których można wyróżnić konfigurację Kretschmanna i Otto), siatkach dyfrakcyjnych, i światłowodach.

3.1.4.1. Konfiguracje oparte na pryzmacie (konfiguracja Otto i Kretschmanna)

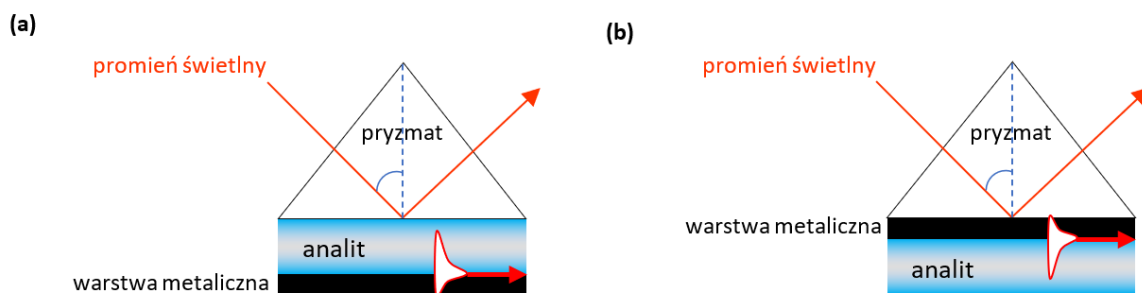
Najczęściej stosowaną konfiguracją w technice SPR jest układ optyczny oparty na pryzmacie szklanym. Przykładowy układ zaprezentowano poniżej (rys. 8):



Rys. 8. Graficzne przedstawienie przykładowej konfiguracji SPR opartej na pryzmacie. Opracowanie własne.

Konfigurację opartą na pryzmacie szklanym można dalej podzielić na dwie różne podkonfiguracje – Otto i Kretschmanna. Pierwsza dotyczy układu, w którym analit (medium dielektryczne) znajduje się pomiędzy warstwą metalu a pryzmatem. Niestety, gdy ciekły analit wypełnia przestrzeń między pryzmatem a warstwą metalu, odległość między warstwami odgrywa kluczową rolę w generowaniu efektu SPR a tym samym jakości sygnału analitycznego. Konfiguracja Otto proponuje układ zawierający dodatkową przestrzeń pomiędzy metalem i pryzmatem, o szerokości rzędu długości fali promieniowania padającego [32]. Powoduje to, że pewna część fali elektromagnetycznej rozchodzi się na granicy pryzmat – powietrze jako fala zanikająca, a tym samym rozpada się na granicy faz metal - powietrze i pogarsza jakość pomiaru SPR, zmniejsza natężenia sygnału analitycznego. Lepszą opcją w tym przypadku wydaje się być konfiguracja Kretschmanna, gdzie grubość warstwy metalu mieści się w zakresie kilkudziesięciu nanometrów (zależnie od rodzaju materiału warstwy metalicznej, np. Au 50 nm) i pozostaje w bezpośrednim kontakcie z jednej strony z pryzmatem z drugiej zaś z roztworem elektrolitu [25, 33]. Dzięki temu fala zanikająca może przejść przez cienką powłokę metaliczną i połączyć się z falą plazmonów powierzchniowych, emitując określony sygnał analityczny. Co więcej, gdy indukowana jest fala plazmonów powierzchniowych SPW, powstaje pole nadkrytyczne i światło jest całkowicie odbijane pod określonym kątem, dzięki stłumionemu całkowitemu odbiciu bez żadnych dodatkowych strat. Podsumowując, konfiguracja Kretschmanna wydaje się być bardziej korzystna z punktu widzenia jakości i siły sygnału SPR, niestety posiada również wadę. Konfiguracja Kretschmanna pomimo lepszej jakości sygnału narzuca umiejscowienie warstwy metalu po zewnętrznej stronie pryzmatu, mającej kontakt z powietrzem, które może prowadzić do utleniania metalu, tworząc warstwę tlenku, który wpływa bezpośrednio na zmianę wartości stałych optycznych a tym samym na siłę sygnału. W konfiguracji Otto metal naporowany jest od strony wewnętrznej co może być znacznym ulepszeniem poprawiającym stabilność powłoki ze względu na brak dostępu powietrza do warstwy metalicznej.

Przykładowy schemat obu konfiguracji przedstawiono na rysunku 9.

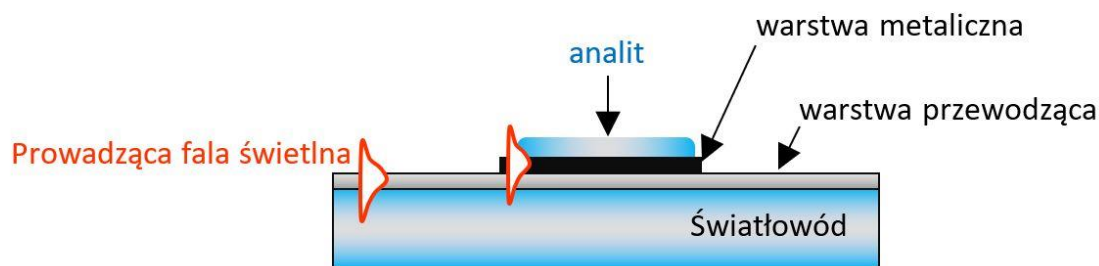


Rys. 9. Ilustracja zjawiska SPR w (a) konfiguracji Otto i (b) konfiguracji Kretschmanna. Opracowanie własne.

3.1.4.2. Konfiguracja oparta na siatce dyfrakcyjnej

Obecnie światłowodowe sondy SPR prezentują najwyższy stopień miniaturyzacji urządzeń SPR, pozwalając na chemiczne i biologiczne detekcje w trudno dostępnych miejscach. Elastyczność mechaniczna i możliwość przesyłania sygnałów optycznych na duże odległości sprawiają, że stosowanie światłowodów jest bardzo popularne i efektywne. Obecnie stosowana technologia pozwala na budowę zminiaturyzowanych światłowodowych sond SPR.

Poniżej (rys. 10) przedstawiono schematyczny szkic układu pomiarowego w konfiguracji opartej na światłowodzie. Główną częścią aparatu pomiarowego jest światłowód (falowód) SPR zbudowany zazwyczaj z włókna o dużej średnicy – zwykle 400 nm, pokrytego dodatkowo powłoką wytwarzaną w procesie nadruku polimerowego lub przy użyciu procesu powlekania wirowego i fotolitografii [34]. Pewna długość włókna jest całkowicie pozbawiona powłoki, a na jego miejscu osadzana jest warstwa metalu, np. srebra. Długość ta zależy od średnicy włókna i determinuje liczbę odbić występujących na granicy powierzchni plazmon-metal. Jeśli długość jest zbyt mała, nastąpi niewystarczające sprzężenie. Jeśli długość jest zbyt duża, sprzężenie będzie bardzo silne, a minimalna intensywność sprzężenia będzie trudna do określenia.

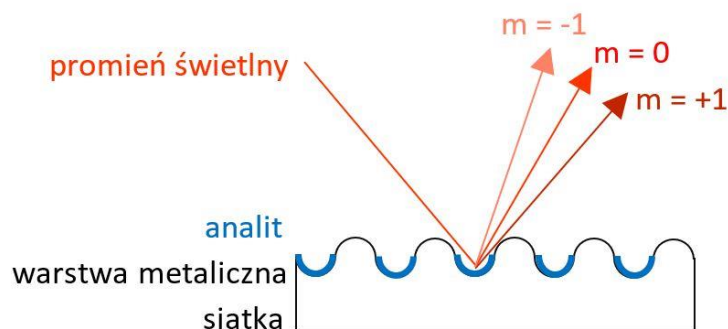


Rys. 10. Graficzne przedstawienie przykładowej konfiguracji SPR opartej na światłowodzie. Opracowanie własne.

Falowodów światłowodowe mają wiele zalet w porównaniu z większymi czujnikami opartymi na pryzmatach. Przede wszystkim są niedrogie i można je łatwo wykorzystać do produkcji jednorazowych czujników do analiz medycznych lub innych aplikacji sterylnych. Włókna są również bardzo małe i nie mają ruchomych części, co daje im znacznie szerszy zakres niż czujniki Kretschmanna. Zastosowanie falowodów optycznych w czujnikach SPR zapewnia wiele ważnych funkcji, takich jak prosty sposób sterowania ścieżką optyczną w układzie czujnika (skuteczna kontrola właściwości światła, tłumienie efektu światła rozproszonego, itp.), mały rozmiar i wytrzymałość. Proces wzbudzania fali plazmonów powierzchniowych w strukturach wykrywających SPR opartych na falowodzie optycznym jest w zasadzie podobny do tego w konfiguracji Kretschmanna. Fala świetlna jest prowadzona przez falowód i wchodzi w obszar z cienką warstwą metalową, zanikając przenika przez warstwę metalu. Jeśli SPW i fala elektromagnetyczna są dopasowane fazowe, fala świetlna wzbudza SPW na zewnętrznej powierzchni styku metalu. Teoretycznie czułość urządzeń SPR opartych na falowodach jest w przybliżeniu taka sama jak w odpowiednich konfiguracjach całkowitego tłumionego odbicia ATR (*ang. total attenuated reflection*), tj. konfiguracji Otto i Kretschmanna. Pomimo zwiększonych ograniczeń projektowych w porównaniu z masowymi pryzmatowymi urządzeniami wykrywającymi SPR, wszystkie główne podejścia do wykrywania SPR zostały zaimplementowane w falowodowych sensorach SPR.

3.1.4.3. Konfiguracja oparta na światłowodzie

Kolejna konfiguracja to układ optyczny oparty na siatce dyfrakcyjnej z napyłoną próżniowo warstwą metalu, np. złotem, stosowana jest jako podobne medium, jak pryzmat w poprzednich konfiguracjach. Przykładowy schemat układu pomiarowego przedstawiono na rysunku 11.



Rys. 11. Graficzne przedstawienie przykładowej konfiguracji SPR opartej na siatce dyfrakcyjnej; m – parametr określający kierunek odbicia promienia świetlnego w odniesieniu do konfiguracji całkowitego pełnego odbicia na powierzchni płaskiej ($m=0$). Opracowanie własne.

Schemat działania układów opartych na siatkach dyfrakcyjnych jest następujący. Powierzchnia siatki na granicy faz metal-dielektryk ulega cyklicznemu zniekształceniu (pofalowaniu). Padająca fala optyczna ulega dyfrakcji, tworząc szereg wiązek skierowanych od powierzchni pod różnymi kątami [35]. Składowa pędu tych ugiętych wiązek wzdłuż granicy faz różni się od składowej fali padającej o wielokrotności wektora falowego siatki. Jeżeli całkowita składowa pędu wzdłuż granicy ugiętego rzędu jest równa pędowi fali plazmonów powierzchniowych, fala optyczna może sprzężać się z SPW. Sprzężenie światła z plazmonem powierzchniowym objawia się spadkiem lub pikiem w widmie kątowym (krzywa SPR).

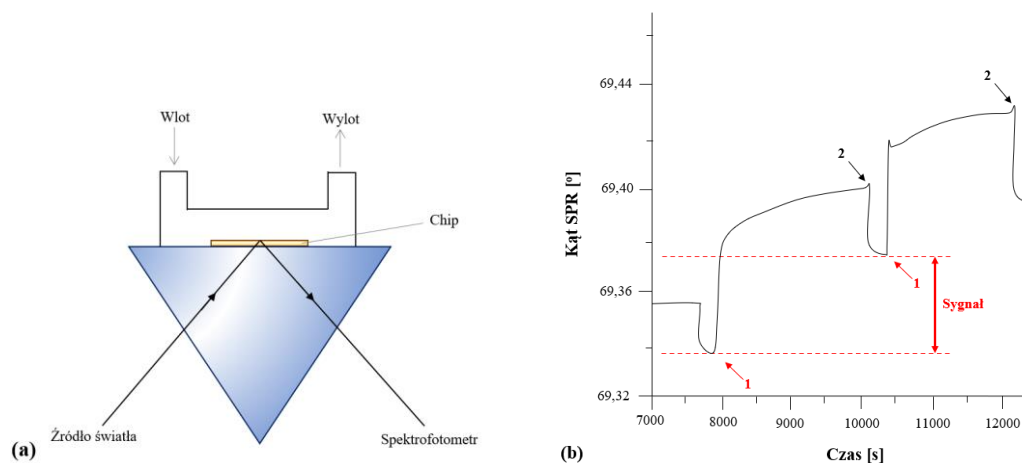
Wadą niektórych zastosowań jest to, że w systemach SPR opartych na siatce, w przeciwieństwie do systemów opartych na pryzmacie, wiązka światła pada przez roztwór próbki, a zatem analit i kuweta przepływowa muszą być optycznie przezroczyste.

3.1.5. Odmiany technik SPR

Technika powierzchniowego rezonansu plazmonów oparta jest na podstawie zjawiska rezonansu fali elektromagnetycznej tuż przy powierzchni granicy faz pomiędzy przewodnikiem, którym jest określony metal a dielektrykiem, który może stanowić powietrze lub inne media zależne od obranej konkretnej techniki pomiarowej SPR. Wśród technik tych możemy wyróżnić następujące odmiany SPR: klasyczny SPR, zlokalizowany SPR (LSPR), SPR w wersji imaging (SPRi), wieloparametrowy SPR (MP-SPR), SPR sprzężony ze Spektroskopią Impedancyjną (SP-EIS), SPR sprzężony ze Spektrometrią Mas (SPR-MS).

3.1.5.1. Klasyczny SPR

Klasyczna technika SPR była do tej pory najbardziej znaną i najczęściej stosowaną procedurą pomiarową wykorzystującą zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonów. W tej wersji pomiar wykonywany przy zastosowaniu biosensora w kontakcie z przepływającym roztworem. Taki układ pomiarowy przedstawiono na rysunku 12.



Rys. 12. Przykład techniki przepływowego SPR: (a) schemat komórki pomiarowej, (b) przykładowy sensogram sensora SPR. Punkt „1” obrazuje wstrzyknięcie próbki. Punkt „2” oznacza wstrzyknięcie bufora myjącego. Opracowanie własne.

Biosensor umiejscowiony na pryzmacie w układzie zamkniętym podczas pomiaru, znajduje się w ciągłym kontakcie z sekwencyjnie wstrzykiwanym roztworem liganda (receptora) oraz roztworem zawierającym określony marker, przesuwany przez przepływający bufor. Następnie badana próbka kierowana jest do biosensora, w którym następuje selektywne wychwytywanie cząsteczek analitu. Reakcje immobilizacji zachodzące na powierzchni sensora wpływają na zmianę wartości współczynnika załamania na granicy faz metal – analit, a co za tym idzie zmianę wartości kąta SPR i wytworzenie sygnału analitycznego, co ilustruje wykres na rysunku 12b. Na koniec czujnik chipa jest czyszczony, aby przygotować go do następnego pomiaru. Kolejne pomiary mogą być wykonywane od razu po oczyszczeniu i regeneracji chipa za pomocą wtrysku kolejnego układu analitycznego.

Charakterystyczną cechą klasycznej techniki przepływowej i za razem pewnym ograniczeniem jest wielkość cząsteczek oraz zakres stężeń, które mogą zostać poddane analizie. Roztwory analitów o skrajnie rozcieńczonym stężeniu generują zbyt małą zmianę współczynnika załamania na powierzchni sensora, aby została ona zauważona

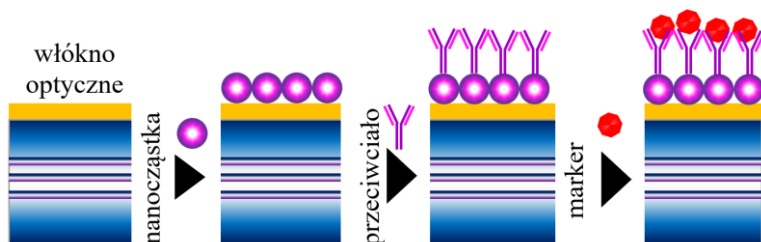
i wygenerowała miarodajny sygnał analityczny. Alternatywą dla takich oznaczeń staje się coraz częściej zlokalizowany SPR, wykorzystujący nanomateriały.

3.1.5.2. Zlokalizowany rezonans plazmonów powierzchniowych L-SPR

Kolejnym przykładem techniki SPR jest wersja zlokalizowanego SPR (LSPR). W tej odmianie techniki rezonansu plazmonów, powierzchnia biosensora stanowiącego podstawę oznaczenia, zmodyfikowana jest dodatkowo nanocząsteczkami. Stanowią one swoistego rodzaju rozwiązanie polegające na wprowadzeniu dodatkowego sprzęgacza i za razem wzmacniacza sygnału analitycznego. Padająca fala świetlna zostaje uwięziona w przewodzących nanocząstkach o wymiarach mniejszych niż długość fali światła [31]. Podczas gdy SP rozprzestrzeniają się wzdłuż ciągłych powierzchni metalu, LSP są zlokalizowane wokół powierzchni nanocząstek. Wprowadzone nanocząstki metali (Ag, Au), zakotwiczone na powierzchni biosensora wzmacniają efekt rezonansu, poprzez generowanie dodatkowego miejscowego efektu SPR na swojej powierzchni. Wytworzenie lokalnego rezonansu przyczynia się do wygenerowania tzw. dodatkowego efektu wzmocnienia co przekłada się na polepszenie sygnału analitycznego. Analit zawierający biocząsteczkę, która jest oznaczana i adsorbowana, przez co wiąże się z powierzchnią metalicznej nanocząstki i zmienia właściwości całego układu powierzchniowego. Po zaadsorbowaniu analizowanej cząsteczki zmienia się współczynnik załamania światła przy powierzchni, a także kąt graniczny. Z tego powodu krzywa odbicia ulega przesunięciu, a co za tym idzie wartości odbicia wyznaczone dla tego samego kąta granicznego ulegają zmianie. Różnica we współczynniku odbicia odzwierciedla stężenie analitu.

L-SPR jest zjawiskiem rezonansu plazmonów zachodzącym na powierzchniach nanostrukturalnych, a jego rezonans można zmodyfikować za pomocą wielkości, kształtu i składu nanocząstek [36]. Chociaż L-SPR ma krótką głębokość penetracji pola elektrycznego (około 20 nm) w porównaniu z modami propagacji, jedną z jego najciekawszych cech jest możliwość dostrajania intensywności SPR poprzez zmianę kształtu, wielkości, składu i otoczenia nanostruktur. Powszechnie stosowanymi nanomateriałami w modyfikacji biosensorów są nanocząsteczki metali (np. NPs Au i Ag), nanocząstki magnetyczne, nanostruktury węglowe (np. grafen), nanocząstki lateksu i krzemionki [37].

Przykładem, który wykorzystuje zjawisko L-SPR jest procedura oznaczenia markera nowotworowego CEA [38], w którym wzmocnienie sygnału analitycznego osiągnięto poprzez wprowadzenie funkcjonalizowanych nanocząstek złota.



Rys. 13. Przykład modyfikacji powierzchni sensora poprzez zastosowanie nanocząstek. Opracowanie własne.

Podsumowując, należy podkreślić, że pomimo licznych zalet techniki wykorzystującej nanomateriały celem poprawienia jakości sygnału analitycznego, L-SPR posiada podstawową wadę polegającą na podatności tej techniki na zakłócenia wynikające z powstawania niepożądanych wiązań niespecyficycznych [39].

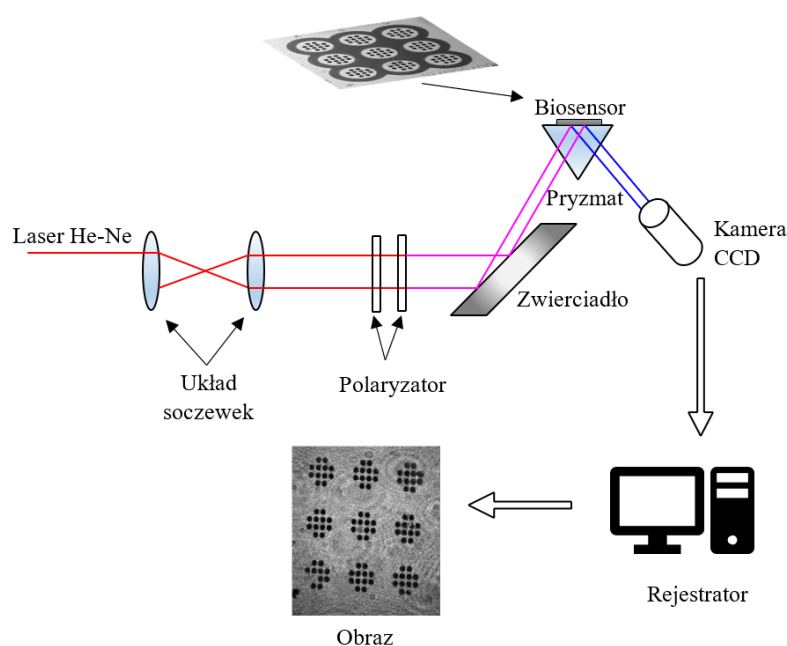
3.1.5.3. Powierzchniowy rezonans Plazmonów w wersji obrazowej SPRi

Kolejną odmianą techniki SPR jest tzw. wersja imaging - obrazowa SPRi (*ang. surface plasmon resonance imaging*). W odniesieniu do klasycznej wersji SPR, ta odmiana stanowi nowatorskie podejście do techniki pomiaru wykorzystującej zjawisko rezonansu. Otóż główną różnicą pomiędzy tą techniką a klasycznym SPR, jest sposób rejestrowania sygnału wyjściowego. W klasycznym SPR tworzone są sensogramy, bazujące na zmieniającej się wartości kąta SPR. W odmianie *imaging* pomiar wykonywany jest poprzez zapisywanie obrazu biosensora za pomocą cyfrowej kamery CCD. Skan powierzchni biosensora stanowi podstawę do dalszej analizy, która polega na wyznaczeniu różnicy w kontraście obrazu sensora przed i po interakcji z oznaczanym analitem.

Technika obrazowania SPRi łączy czułość SPR z przestrzennymi możliwościami obrazowania. SPRi wykorzystuje zarówno stały kąt, jak i stałą długość fali, aby zmierzyć zmiany współczynnika odbicia (ΔR), które występują, gdy krzywa SPR przesuwana się po adsorpcji materiału na powierzchni sensora [40].

Przykładowe urządzenie wykorzystywane w technice SPR imaging przedstawiono na rysunku 14. W celu poprawnego przeprowadzenia pomiaru, dokonuje się seryjnego skanowania całej powierzchni biosensora oświetlanego monochromatycznym

promieniowaniem p-spolaryzowanym emitowanym najczęściej za pomocą lasera. Wyemitowany promień pada na układ równoległych soczewek, ulega rozszerzeniu, a następnie polaryzacji po przejściu przez polaryzator. Światło odbite od powierzchni biosensora kierowane jest do kamery CCD i konwertowane na obraz. Obrazy chipa zarejestrowane przed aplikacją analitu stanowią punkt odniesienia do właściwego oznaczenia ilościowego. Po nałożeniu analitu na powierzchnię chipa i jego delikatnym usunięciu, dokonuje się ponownego skanowania powierzchni chipa, a zapisane obrazy poddaje się dalszej analizie. Zarejestrowane zdjęcia sensora stanowią podstawę do obliczeń refleksyjności (różnicy w odbiciu światła przed i po podaniu analitu). Różnica ta stanowi sygnał analityczny.



Rys. 14. Schemat przedstawiający aparat SPRi. Opracowanie własne.

Technika SPRi wykorzystuje ekstremalną czułość rezonansu plazmonów powierzchniowych w odniesieniu do małych zmian stałej dielektrycznej obszaru międzyfazowego. Jednakże zamiast wyznaczania kąta rezonansu dla pewnych warunków doświadczalnych, intensywność jest jednocześnie mierzona dla danego kąta padania na dużej części sensora, poprzez generowanie poszerzonej równoległej wiązki laserowej, za pomocą której cała powierzchnia sensora jest naświetlana pod pewnym kątem padania, który dla optymalnego kontrastu powinien być zbliżony do najbardziej stromej zmiany krzywej SPR. W ten sposób otrzymywany jest obraz całego sensora, który odzwierciedla przestrzenne zmiany stałej dielektrycznej na granicy faz metal – analit, pod warunkiem,

że granica faz charakteryzuje się jednorodną wartością stałej dielektrycznej i natężenie odbitego światła jest również jednorodne.

3.1.5.4. Pozostałe techniki SPR

Technika pomiarowa powierzchniowego rezonansu plazmonów ulega ciągłym zmianom, dzięki czemu tworzone są jej nowe odmiany. Poniżej scharakteryzowano najczęściej stosowane wersje techniki SPR, poza wcześniej wymienionymi odmianami – klasyczną (SPR), obrazową (SPRi) oraz zlokalizowaną (LSPR):

- **MP-SPR** - wieloparametrowy powierzchniowy rezonans plazmonów (*ang. multi-parametric surface plasmon resonance*). Technika ta opiera się na powierzchniowym rezonansie plazmonów (SPR), jednak wykorzystuje inną konfigurację optyczną, konfigurację goniometryczną SPR. Układ optyczny MP-SPR wykonuje pomiary jednocześnie przy wielu długościach fal, skanując biosensor w szerokim zakresie kątów φ (np. 40 stopni). Tworzone są zatem pełne krzywe SPR przy różnych długościach fali, a co za tym idzie dostarczane są dodatkowe informacje o interakcjach powierzchniowych, jak i właściwościach nanowarstwy [41].

- **SP-EIS** - powierzchniowy rezonans plazmonów sprzężony ze spektroskopią impedancyjną (*ang. surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy*). Technika ta wykorzystuje czujniki składające się z zazębionych ze sobą elektrod metalowych o rozmiarach rzędu mikrometrów, które wzmacniają i podtrzymują zjawisko SPR. Ponadto elektrody naprzemienne wykazują właściwości optycznej siatki dyspersyjnej odbijającej światło. Bezpośrednia analiza spektralna plazmonów powierzchniowych jest możliwa dzięki zastosowaniu dyfrakcji pierwszego rzędu i została wykorzystana jako nowa zasada uproszczonej konfiguracji optycznej. SP-EIS to obiecująca technologia dla różnorodnych zastosowań konduktometrycznych i SPR mono- i wieloczujnikowych na platformach przenośnych lub stacjonarnych [42].

- **SPR-MS** - powierzchniowy rezonans plazmonów sprzężony ze spektrometrią mas (*ang. surface plasmon resonance and mass spectrometry*). Połączenie powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR) i spektrometrii mas (MS) wykazało, iż jest idealna technika, która może być z powodzeniem stosowana do analizy białek. Rezonans plazmonów powierzchniowych służy do ilościowego określania interakcji między białkami i unieruchomionymi na powierzchni akceptorami, zaś spektrometria mas pozwala z łatwością obrazować cechy strukturalne związanych białek [43].

3.1.6. Wady i zalety techniki SPR

Technika powierzchniowego rezonansu plazmonów zaliczana jest do nowatorskich technik oferujących duży wachlarz możliwości, począwszy od miniaturyzacji pomiaru, przez obniżenie limitu detekcji kończąc na bezznacznikowym i szybkim oznaczeniu. Jednakże nie należy zapominać, że tak jak każda technika pomiarowa oferując polepszenie warunków analizy, generuje też negatywne czynniki, które nie są do końca poznane lub też często przy doborze techniki pomijane. Poniżej przedstawiono krótką analizę i porównanie wad i zalet pomiarów SPR.

Portfolio obecnie dostępnych testów laboratoryjnych (np. ELISA) wykorzystujących przeciwciała jako elementy rozpoznawania biomolekularnego stanowią jedną z najszybciej rozwijających się technologii diagnostycznych. Metody te są dość pracochłonne i czasochłonne oraz oferują ograniczoną automatyzację i integrację różnych etapów operacyjnych. Sposoby wykrywania wymagają zazwyczaj odpowiedniego znakowania analitu, co powoduje wydłużenie czasu oznaczenia, zwiększa koszty i może prowadzić do fałszywych wyników negatywnych. Ponadto związki fluorescencyjne stosowane jako znaczniki w testach są niezmiennie hydrofobowe, co stanowi istotny problem, potencjalnie prowadząc do wyników fałszywie dodatnich. Ponadto obecnie nie ma akceptowanych testów immunologicznych dla niektórych poważnych chorób (np. raka), które są wystarczająco specyficzne, czułe, szybkie. Idealnym panelem do badań przesiewowych powinien być szybki, czuły, specyficzny, łatwy w użyciu test i powinien mieć wystarczającą przepustowość, aby można było go zastosować w diagnostyce medycznej. Ponadto oznaczenie analitu najlepiej jest przeprowadzać bezpośrednio w próbkach (np., osoczu, krwi, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, ślinie) bez konieczności długotrwałego i skomplikowanego procesu przygotowania próbki. Pożądane są również inne metody diagnostyczne umożliwiające monitorowanie stężenia analitu, co jest niemożliwe przy zastosowaniu konwencjonalnych testów immunoenzymatycznych. Technika SPR stanowi obiecującą alternatywę dla stosowanych obecnie technologii diagnostycznych i może potencjalnie pełnić wiele z tych wymagań. Biosensory powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR) oferują bezznacznikową platformę do bezpośrednich pomiarów szybkiego badania przesiewowego analitów istotnych z medycznego punktu widzenia. Ostatnie postępy w rozwoju czujników SPR, elementach biorozpoznania i ich immobilizacji sprawiły, że sensory SPR są dobrą alternatywą do opracowania nowych systemów w diagnostyce medycznej [30].

Kolejną, ważną zaletą niektórych sensorów SPR jest wachlarz substancji możliwych do oznaczenia ilościowego. Z uwagi na ograniczenia dotyczące znacznych zmian wartości parametrów refraktometrycznych będących źródłem sygnału analitycznego, większość oznaczeń wykonywana jest dla molekuł, których masa cząsteczkowa przekracza rząd kilku kDa. Istnieje jednak pewien wyjątek, który pokazuje, że przy dobraniu odpowiedniego wysoce selektywnego ligand (receptora), istnieje szansa na ilościowe oznaczenie bardzo małych cząsteczek lub jonów z unieruchomionymi białkami, np. jon wapnia Ca^{2+} za pomocą specyficznej i selektywnej reakcji z białkiem C-reaktywnym. Połączenie tych obu związków daje 10 krotnie silniejszy sygnał podczas oznaczenia za pomocą SPR, aniżeli samodzielnie istniejąca cząsteczka białka CRP [44]. Przykład ten obrazuje jak szerokie spektrum możliwości daje technika powierzchniowego rezonansu plazmonów.

SPR oprócz wykorzystania w typowych analizach medycznych znajduje zastosowanie w technikach monitorowania kinetyki interakcji molekularnych w czasie rzeczywistym. Nie ma konieczności stosowania biocząsteczek-znaczyków, które mogą zaburzać interakcję molekularną. Ponadto promieniowanie optyczne nie uszkadza biomolekuł. Cechy te sprawiają, że obrazowanie SPR jest obiecującą technologią dla chemii bioanalitycznej, takiej jak bezznaczykowe badanie interakcji enzym-substrat, hybrydyzacja DNA, wiązanie przeciwciała-antygen oraz interakcje białko-DNA [45].

Niestety pewnym ograniczeniem dla funkcjonowania biosensorów jest długość wygasania pola nadkrytycznego wynosząca 300 – 400nm. Oznacza to, iż biosensor nie będzie mógł wykryć zmian fizykochemicznych zachodzących w odległości przekraczającej wartość 400nm zaś najwyższe sygnały uzyskiwane będą tuż przy powierzchni biosensora. Pociąga to za sobą fakt, iż aby skonstruować właściwie działający biosensor, potrzebne jest odpowiednie dobranie wszystkich składowych: ligand (receptor) – analit, tak aby zjawiska fizykochemiczne zachodzące pomiędzy tymi składowymi zachodziły możliwie najbliżej powierzchni biosensora. Oznacza to również, iż cząsteczki, których długość przekracza 400 nm, nie spowodują zmiany wielkości współczynnika załamania światła wprost proporcjonalnej do stężenia analitu. Oznaczenie ilościowe w tym przypadku nie będzie możliwe.

Kolejną istotną barierą metody SPR jest ograniczona czułość, gdy zmiany współczynnika załamania światła w wyniku procesów wiązania są często niewielkie, co spowodowane jest najczęściej wiązaniem materiałów o małej masie cząsteczkowej [45]. Ograniczenie to można pokonać przez dobór odpowiedniego liganda (receptora), który spowoduje zwiększenie intensywności sygnału. Możliwym rozwiązaniem w tym przypadku

może być modyfikacja powierzchni za pomocą nanocząstek wzmacniających sygnał analityczny, jednakże i to rozwiązanie niesie za sobą dodatkową przeszkodę w postaci tworzenia niepożądanych wiązań niespecyficznych.

3.1.7. Kierunki rozwoju techniki SPR

Trendy i potrzeby rynkowe pokazują, że technika rezonansu plazmonów jest nowoczesną alternatywą dla obecnie stosowanych metod oznaczeń analitycznych, np. ELISA. SPR podlega ciągłym zmianom poprzez poszukiwanie nowych struktur biosensorów a tym samym poprawę parametrów takich jak czułość, granica wykrywalności czy nawet koszt analizy. Trendy światowych producentów urządzeń SPR pokazują, iż główne kierunki rozwoju tej techniki to miniaturyzacja, szybkość pomiaru, zmniejszenie kosztów analizy, większa elastyczność oraz w ostatnich latach dbałość o środowisko naturalne.

Pierwszym ze wspomnianych nurtów w rozwoju techniki SPR jest miniaturyzacja czujników. Pozwoli ona na konstruowanie urządzeń jeszcze bardziej funkcjonalnych oraz przede wszystkim przenośnych i bardziej opłacalnych [4, 47]. Producenci urządzeń SPR np. firma Biacore skupia się na implementacji kapilar do zastosowań w urządzeniach SPR wysokiej przepustowości. Okazuje się, że możliwe jest wdrożenie kapilar w urządzeniach SPR, jednakże pozostaje kilka wyzwań, w tym osadzanie złota w kapilarach i stosowna optymalizacja czujników.

Wraz z rozwojem technologii, produkującej urządzenia typu „lab-on-a-chip”, te samodzielne, przenośne przyrządy umożliwią pomiary poza laboratorium, np. przy łóżku pacjenta. Technologie biochipowe pozwoliłyby oferować unikalną kombinację możliwości wydajnościowych i cech analitycznych, które nie są dostępne w żadnym innym obecnie wykorzystywanym systemie bioanalitycznym. Wraz z postępem technologii możliwa byłaby produkcja urządzeń mikroprzepływowych, czyli urządzeń typu lab-on-a-chip, które byłyby niedrogimi, niezależnymi, przenośnymi przyrządami, które umożliwiłyby pomiary poza laboratorium, stanowiąc ogromne udogodnienie dla pacjentów [39].

Inne trendy wskazują na tworzenie sensorów oraz urządzeń SPR, w których czułość odgrywa największe znaczenie, dzięki czemu istniałaby możliwość oznaczenia molekuł o małej masie cząsteczkowej bez konieczności znakowania dużymi cząsteczkami białek o masie przekraczającej rzędy kDa. W literaturze widnieje wiele przykładów zastosowanie nanomateriałów w zakresie regulacji natężenia sygnału. To ulepszenie może doprowadzić

technikę SPR do wysokiego, ultraczułego poziomu [48]. Innym dość obiecującym wymaganiem jest uzyskanie ultraczułych nanoczuJNIKÓW plazmONICZNYCH do wykrywania ekstremalnie niskich stężeń biocząsteczek, istotnych dla biomarkerów we wczesnym stadium raka [27, 36].

Niezwykle ważnym parametrem jest również koszt pojedynczej analizy, tak aby była ona osiągalna dla większości pacjentów [49]. Obniżenie kosztów może zostać osiągnięte poprzez zastosowanie tańszych surowców, takich jak miedź i srebro, które okazują się być tańszą alternatywą dla produkcji czujników i implementacji chipów jednorazowego użytku [50]. Jednakże ich stabilność i odporność na utlenianie jest mniejsza stąd konieczność zabezpieczenia ich powierzchni dodatkowymi warstwami ochronnymi np. krzemionką lub złotem.

3.2. Charakterystyka sensorów stosowanych w pomiarach techniką SPR

Sensory, w sensie diagnostycznym, można ogólnie sklasyfikować jako „łatwe w użyciu” urządzenia, które opracowano, w celu ułatwienia wczesnej diagnozy i wspomagania leczenia wielu chorób. Wczesna diagnostyka jest kluczem do skutecznego leczenia wielu chorób. Biosensory wykorzystują szczególne właściwości materiałów biologicznych i fizycznych, aby rozpoznać biocząsteczkę i dokonać przetworzenia sygnału analitycznego, który stanowi podstawę oznaczenia w analizie ilościowej i jakościowej. Głównymi zaletami bioczuJNIKÓW są szybka reakcja oraz ich wysoka czułość. Parametry te podlegają ciągłym zmianom poprzez implementację coraz nowszych rozwiązań z zakresu nanotechnologii, mikro przepływu i automatyzacji. W niniejszym rozdziale scharakteryzowano czujniki poprzez opisanie ich budowy, najczęściej stosowanych materiałów oraz ich wpływu na funkcjonowanie biosensorów.

3.2.1. Definicja sensora

Biosensor można zdefiniować jako urządzenie analityczne przekształcające odpowiedź biologiczną na sygnał np. elektryczny lub inaczej jako urządzenie, które wykorzystuje specyficzne reakcje biochemiczne na poziomie komórkowym za pośrednictwem izolowanych enzymów, systemów immunologicznych, tkanek, organelli lub całych komórek do wykrywania związków chemicznych, zwykle za pomocą sygnałów elektrycznych, termicznych lub optycznych [51]. Sygnały te generowane są przez zmiany

właściwości fizycznych powierzchni, do której zakotwiczona jest cząsteczka np. białko wiążące badany analit.

Każdy sensor z punktu widzenia analizy musi być specyficzny i wysoce selektywny dla oznaczanego analitu, stąd też jego konstrukcja powinna być stworzona tak, aby spełniała wymogi czułości, selektywności oraz specyfiki działania.

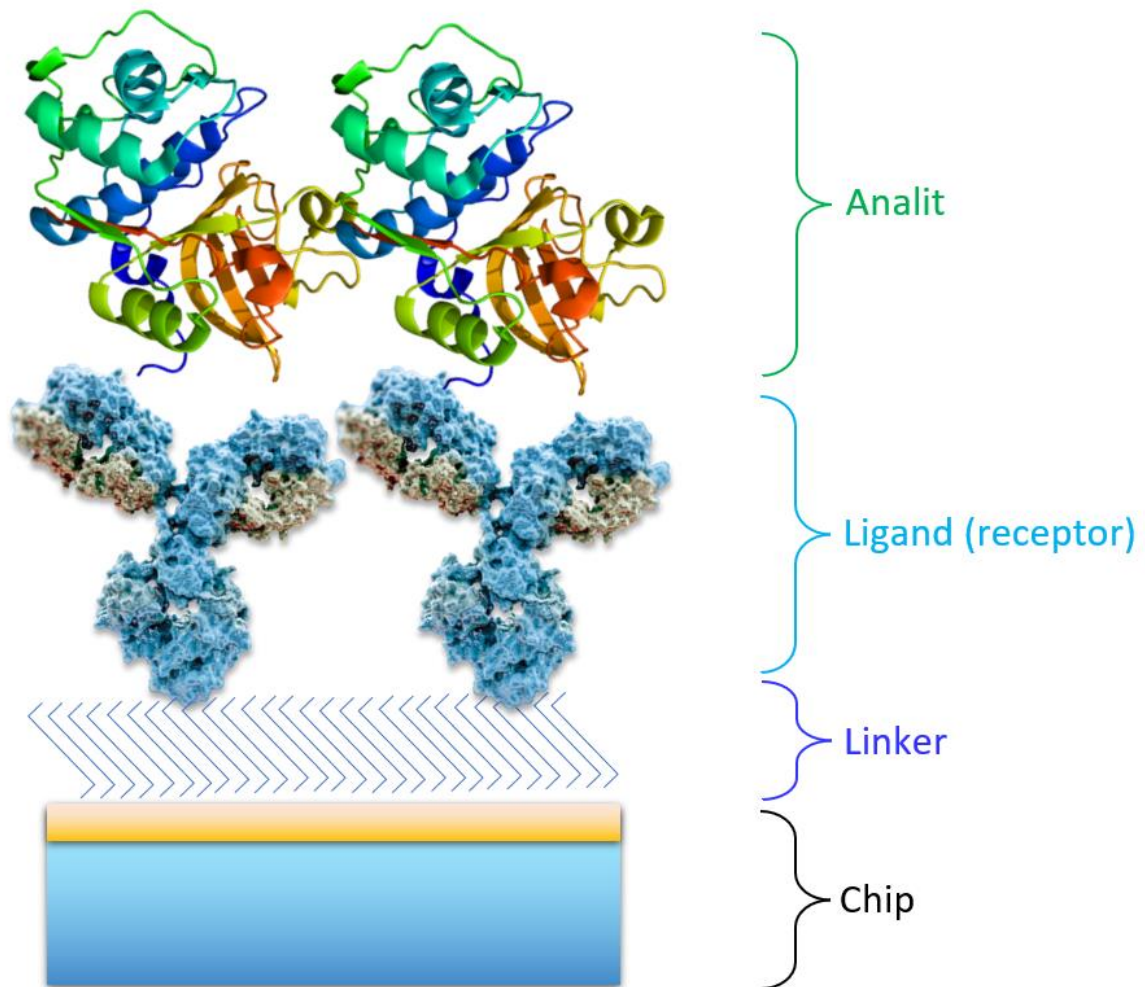
3.2.2. Konstrukcja sensora – struktura i układ poszczególnych warstw

Sensory SPR z uwagi na swoje szerokie zastosowanie w technikach stacjonarnych bądź przepływowych mogą przybierać różne konstrukcje. Ich budowa uzależniona jest nie tylko od rodzaju wykrywanego związku (analitu) ale też w dużej mierze od rodzaju zastosowanej techniki i układu pomiarowego. Chociaż konfiguracja optyczna przyrządu SPR jak i sposób dawkowania próbki są ważne, czujnik jest postrzegany jako kluczowy element całej platformy pomiarowej. Dlatego też ważnym jest postrzeganie sensora jako głównego czynnika przy zastosowaniu detekcji SPR, gdyż to on właśnie determinuje parametry całej analizy: czułość, precyzję oraz limity detekcji i oznaczalności.

Aby zrozumieć, dlaczego sensor jest istotną częścią techniki SPR, należałoby dokonać przeglądu poszczególnych elementów budowy sensora przedstawionych na rysunku 15. Sensor SPR złożony jest z następujących elementów:

- **chip** (przetwornik) – struktura wielowarstwowa zbudowana na podłożu bazowym wykonanym najczęściej ze szkła o wysokim współczynniku załamania światła, oraz powłok metalicznych i ochronnych dobranych odpowiednio do oznaczanego analitu. Matryca ta stanowi podstawę każdego układu niezależnie czy jest to technika stacjonarna czy przepływowa, coraz częściej ulepszona poprzez zastosowanie nanocząstek (LSPR) poprawiających parametry refraktometryczne
- **linker** – kolejna warstwa mająca bezpośredni kontakt z chipem, umożliwiająca zakotwiczenie biomolekuły, specyficznej dla danego analitu. Najczęściej stosowanymi linkerami są tiole, tworzące samoorganizujące się monowarstwy SAM (*ang. self-assembled monolayers*).
- **ligand** (zwany również w terminologii chemicznej receptorem) – cząsteczka specyficzna dla oznaczanego analitu i tworząca z nim trwałe połączenie, dzięki któremu może być wyłapana z roztworu i zakotwiczona na powierzchni biosensora. Dobór tej warstwy uzależniony jest od oznaczanego związku i w przypadku materiału biologicznego (np. biomarkera) może występować w postaci przeciwciała, inhibitora,

enzymu, kwasu nukleinowego. Istotnym parametrem tej warstwy (szczególnie w przypadku techniki przepływowej) jest kinetyka reakcji wiązania, determinująca jakość oznaczenia.

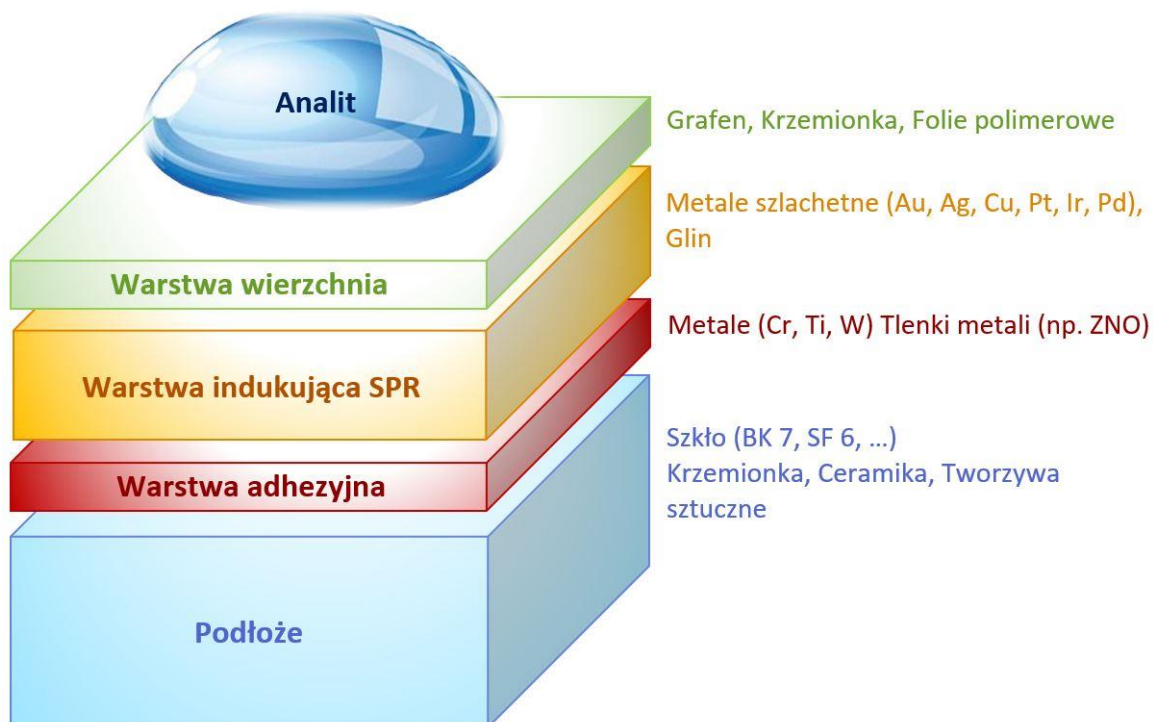


Rys. 15. Ogólny schemat struktury sensora SPR. Opracowanie własne.

3.2.2.1. Budowa podstawy sensora

Podstawę sensora SPR stanowi chip. W zależności od zastosowanej techniki pomiarowej, konstrukcja chipa może się nieco różnić, np. w technice przepływowego SPR chipy przybierają postać zamkniętego naczynia płaskiego (rys. 12) lub występują w formie przewodu, którym przepływa oznaczony analit. W przypadku statycznej techniki klasycznego SPR, chip najczęściej stanowi podłoże szklane o grubości 1mm, pokryte cienką

warstwą metalu szlachetnego, np. złota o grubości 50 nm [27, 52]. Ogólną strukturę klasycznego chipa SPR przedstawiono na rysunku 16.



Rys. 16. Schemat struktury chipa SPR. Opracowanie własne.

Rysunek 16 przedstawia ogólny zarys przekroju poprzecznego (struktury) chipa. Wymienione warstwy stanowią tylko i wyłącznie punkt wyjścia do poprawnego zbudowania chipa, co oznacza, że niektóre z nich można pominąć lub użyć wielokrotnie w postaci dodatkowych warstw ewentualnie ich mieszanki w pojedynczej powłoce. Materiały te podzielono na 4 podstawowe grupy, ze względu na ich właściwości fizykochemiczne oraz możliwość generowania powierzchniowego rezonansu plazmonów:

- **podłoże bazowe** – grupę tą stanowią materiały optyczne charakteryzujące się dużą przezroczystością oraz współczynnikiem załamania światła. Najpowszechniej stosowanymi materiałami są szkła takiej jak BK7 lub SF6, SF10, jednakże coraz częściej do budowy chipów wykorzystywane są materiały syntetyczne np. polimetakrylan metylu (PMMA) [53], głównie ze względu na ich niski koszt jak i dużą elastyczność.
- **warstwa adhezyjna** – jest to dodatkowa powłoka polepszająca przyczepność metali, o grubości rzędu kilku nanometrów. Do grupy tej zalicza się chrom [54, 55], tytan [56, 57] oraz tlenki innych metali (np. ZnO) [58, 59].

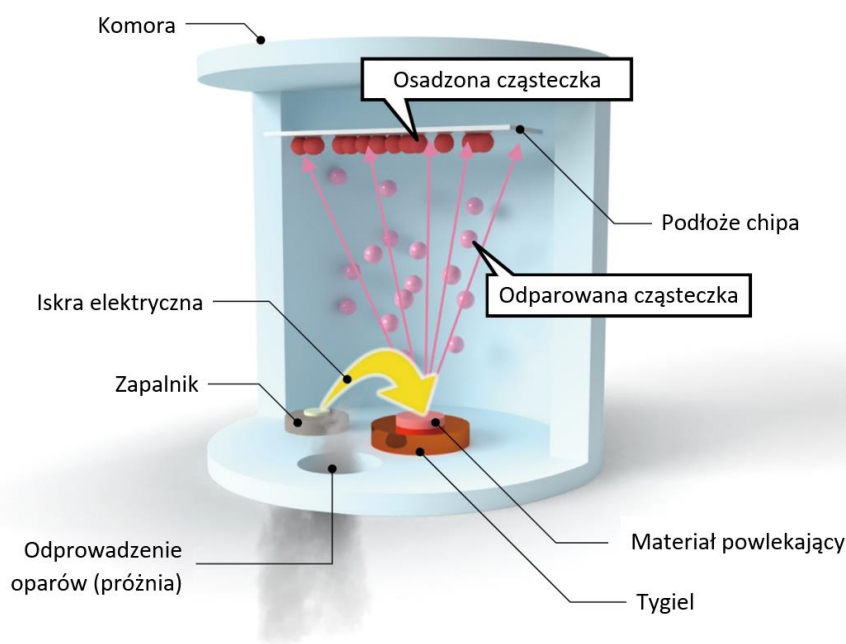
- **warstwa metaliczna SPR** – jest to właściwa powłoka odpowiadająca za generowanie efektu SPR, wykonana z metali szlachetnych, głównie złota [23, 60, 61], lub srebra [23, 27, 62] (czasami również miedzi i aluminium).
- **warstwa wierzchnia** – jest to cienki film uformowany na bazie różnych materiałów organicznych (grafen [40, 62], folie polimerowe np. folie polimeryzowane plazmowo (PPF) [63, 64] czy też karoboksydekstran [65] lub związków nieorganicznych (krzemionka [21] siarczek cynku [66 – 68], azotek tytanu [4], siarczek molibdenu [28] dostosowanych właściwościami do potrzeb sensora SPR. Materiały te powlekane są jako ostatnia powłoka w celu ochrony warstwy metalicznej przed czynnikami zewnętrznymi, zwiększenia jednorodności w dystrybucji próbki analitu na powierzchni sensora czy też zwiększenia jego powierzchni aktywnej.

3.2.2.2. Technika próżniowego osadzania metali z fazy gazowej (PVD) jako metoda aplikacji warstw chipa SPR

Istotnym elementem przy konstruowaniu sensora a w szczególności chipa jest aplikacja wcześniej wspomnianych warstw: adhezyjnej, metalicznej i wierzchniej na bazowe podłoże chipa oraz dobór właściwych parametrów ich aplikacji. Metale jak i inne materiały biorące udział w budowaniu poszczególnych warstw ze względu na swoją jednorodną strukturę atomową (lub cząsteczkową) nakładane są na bazowe podłoże chipa w formie naparowywanych folii o grubości rzędu nanometrów, w odpowiednich warunkach ciśnienia i temperatury. W literaturze [69] widnieje cała gama różnorodnych struktur chipów wykonanych za pomocą techniki osadzania z fazy gazowej zwanej popularnie PVD (ang. *physical vapor deposition*). Proces fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD) wykorzystuje mechanizm rozpylania i odparowywania w celu ułatwienia transportu materiału na powierzchnię podłoża. Rysunek 17 przedstawia schematyczną ilustrację techniki fizycznego osadzania z fazy gazowej. Energia potrzebna do odparowania/napylania jest dostarczana za pomocą działła elektronowego (zapalnika), a cały proces jest przeprowadzany w próżni, aby uniknąć wszelkich zanieczyszczeń [70].

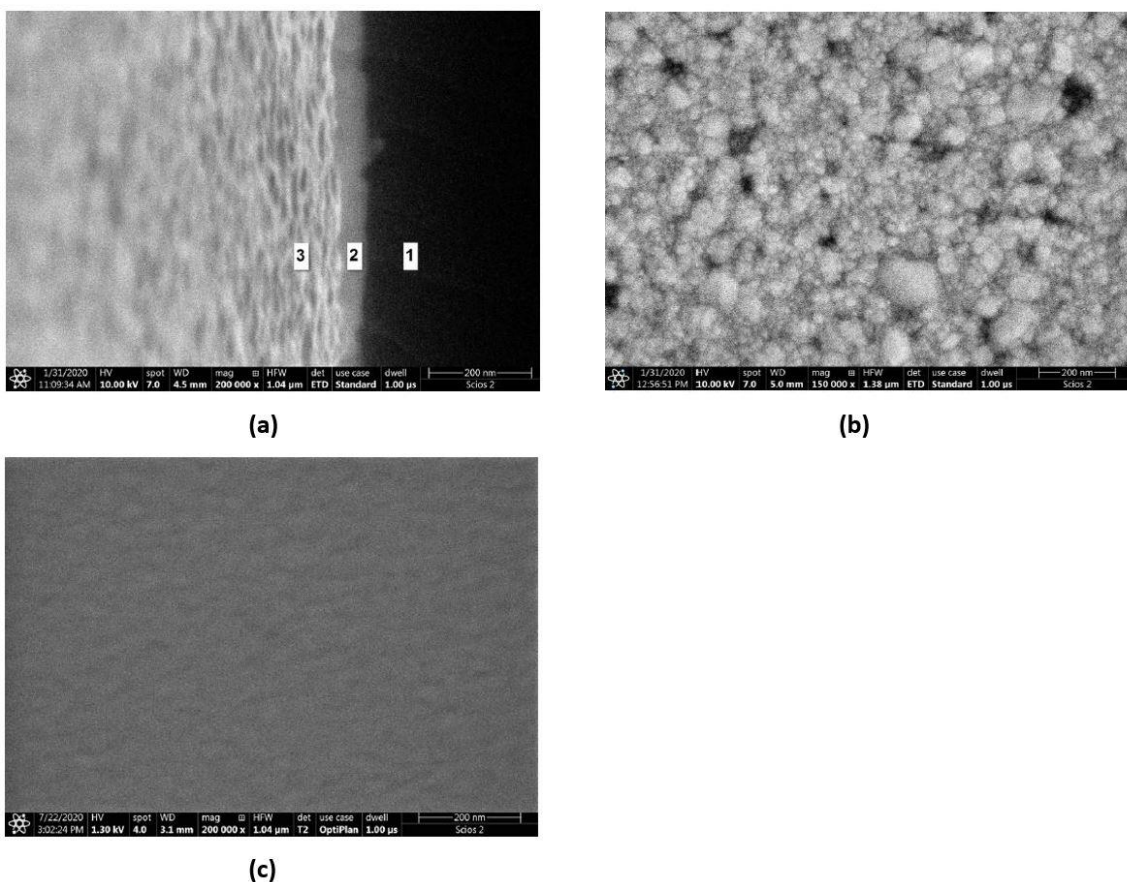
Technika PVD stosowana jest do produkcji chipów SPR ze względu na swoje zalety: odporność mechaniczną napylonych powłok oraz jednorodną strukturę krystaliczną tworzonych w ten sposób cienkich filmów. Proces fizycznego osadzania z fazy gazowej uzależniony jest od warunków temperatury, ciśnienia, wilgotności, czystości otoczenia

i podłoża bazowego oraz czystości chemicznej samych materiałów stosowanych do napyłania. Wielokrotnie wykazano, iż zmiany któregokolwiek z wymienionych parametrów skutkują zmianą jakości naparowanej powłoki. Parametry takie jak temperatura i ciśnienie warunkują w głównej mierze szybkość formowania pojedynczych warstwek złożonych z atomów lub cząsteczek, a nawet determinują porządek zbudowanej sieci krystalicznej.



Rys. 17. Schemat urządzenia stosowanego do próżniowego napyłania metali. Opracowanie własne.

Kolejnym parametrem wpływającym na jakość warstw jest czystość podłoża jak i otoczenia. Sterylność materiału bazowego ma ogromne znaczenie szczególnie ze względu na stworzenie odpowiedniej przyczepności pierwszej folii metalicznej. Przygotowanie podłoża bazowego wykonuje się poprzez jego oczyszczenie w roztworach czyszczących. W przypadku podłoża szklanego istnieje wiele procedur czyszczenia począwszy od etanolu czy izopropanolu, po mieszaniny trawiące np. mieszanina wody utlenionej i kwasu siarkowego (VI) (roztwór pirania). Czynnikiem końcowym poprawnego naparowania cienkich folii jest kontrolowanie jakości warstwy, obrazowanej za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM), skaningowej mikroskopii elektronowej SEM (rys. 18) oraz grubości powłoki mierzonej np. przy pomocy mikrowagi kwarcowej (QCM).



Rys. 18. Obrazy wykonane techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM): (a) warstwa bimetaliczna Ag–Au w przekroju poprzecznym wykonane na próbkę lekko pochyloną: 1: przekrój podłoża szklanego, 2: przekrój warstwy metalicznej Ag–Au, 3: widok nachylona górna powierzchnia Ag–Au; (b) morfologia powierzchni warstwy bimetalicznej Ag–Au; (c) morfologia powierzchni pojedynczej warstwy metalicznej Au [62].

3.2.2.3. Zasady doboru materiałów przy konstruowaniu chipów

Stan techniki opisany w literaturze [27, 52] przedstawia, iż najczęściej stosowanym materiałem przy konstrukcji sensorów SPR jest podłoże szklane o grubości 1mm, pokryte cienką warstwą metalu szlachetnego, który najczęściej stanowi złoto o grubości 50 nm. Dobór tych właśnie materiałów podyktowany jest wieloma czynnikami, wśród których można wyróżnić: właściwości plazmoneczne warstwy metalu (wąska krzywa SPR – mała wartość FWHM, duża czułość), odpowiedni współczynnik załamania podłoża szklanego, a także stabilność materiałów (niezmiennność ich właściwości w czasie) oraz koszt produkcji.

➤ **Materiał bazowy**

Jak już wcześniej wspomniano, dobór materiałów przy konstruowaniu sensorów ukierunkowany jest głównie w celu uzyskania jak najlepszych właściwości optycznych układu SPR. Dodatkowo na wybór odpowiedniego surowca może mieć wpływ rodzaj zastosowanego urządzenia pomiarowego SPR a co za tym idzie innymi właściwościami mechanicznymi, np. jego elastycznością (giętkie kapilary przepływowe) przezroczystością oraz wysokim współczynnikiem załamania. W przypadku wspomnianych układów kapilarnych, najczęściej wybieranymi tworzywami bazowymi są światłowody polimerowe (POF) lub fotoniczne (PCF), charakteryzujące się lekkością, niskim kosztem oraz przede wszystkim dużą elastycznością, dzięki której mogą być zastosowane w urządzeniach przenośnych, gdzie ich wielkość i ciężar odgrywają istotną rolę.

Najczęściej stosowanym podłożem do opracowania sensora jest szkło o symbolu BK7, zwane inaczej szkłem borokrzemianowym [25] charakteryzujące się dobrą odpornością chemiczną, dobrą przejrzystością i przezroczystością. Parametrem decydującym o zastosowaniu szkła w technice SPR jest współczynnik załamania światła przekraczający 1,52. Pozostałe materiały stosowane w technice SPR scharakteryzowano w tabeli 1.

Surowiec, z którego wykonane jest podłoże bazowe (podstawa chipa) dobierany jest na podstawie współczynnika załamania analitu, który oznaczany jest na sensorze. Zastosowanie czujników SPR do monitorowania parametrów optycznych analitów o wysokim współczynniku załamania światła wymaga zastosowania specjalnych i droższych szkieł o wysokim współczynniku załamania. Poza materiałem szklanym istnieją też tańsze syntetyczne substytuty, np. szkło akrylowe, czyli polimetakrylan metylu (PMMA), charakteryzujące się odpowiednią czystością, przezroczystością, które stosowane są do produkcji czujników jednorazowego użytku [53, 70].

Tabela 1. Charakterystyka najczęściej stosowanych materiałów optycznych [70].

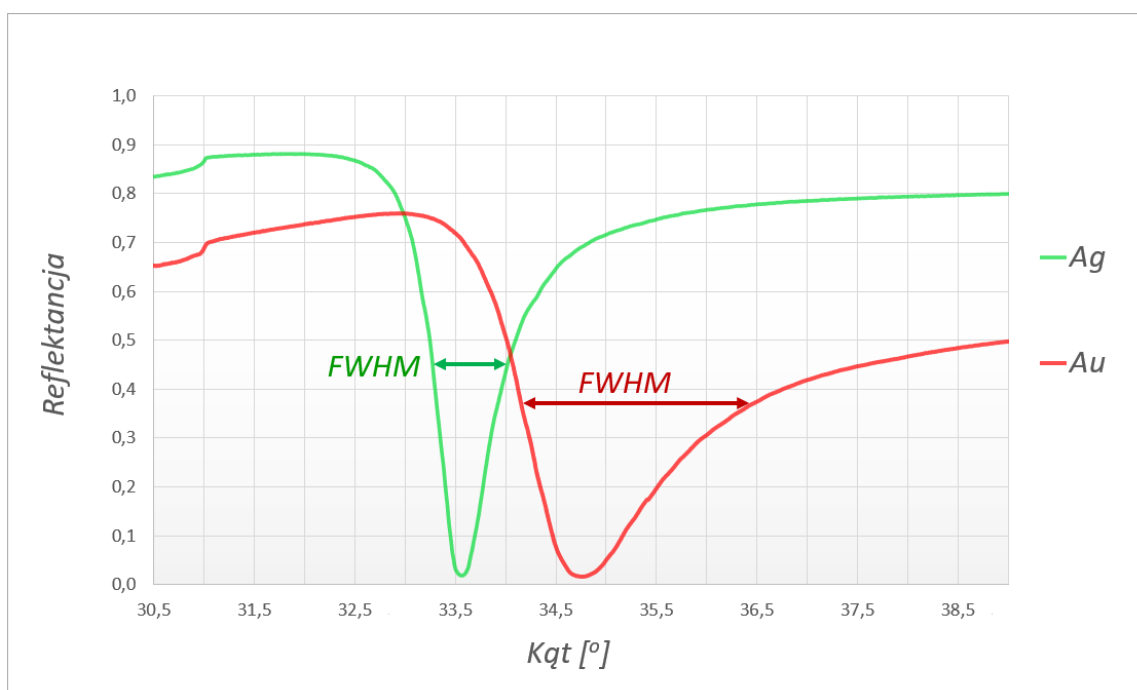
Rodzaj materiału	Zakres transmisji [nm]	Współczynnik załamania n_d ($\lambda = 587,6$ nm)	Charakterystyka
BK7, szkło borokrzemianowe	380–2100	1,51680	Doskonały materiał na soczewki optyczne. Nie zalecane do zastosowań wrażliwych na temperaturę
Szkło kwarcowe	175–2000	1,45846	Syntetyczne. Posiada właściwości UV; przepuszczalność i doskonały niski termiczny współczynnik rozszerzalności cieplnej. Odporny na zarysowania
SF6	390–2500	1,80518	Charakteryzuje się dobrą transmisją w widzialnej i bliskiej podczerwieni. Wysoki współczynnik załamania czyni go wyjątkowym w produkcji soczewek i pryzmatów.
SF10	390 - 2450	1,72828	Charakteryzuje się dobrą transmisją w widzialnej i bliskiej podczerwieni. Wysoki współczynnik załamania czyni go wyjątkowym w produkcji soczewek i pryzmatów.
SF11, flint	380–2350	1,78472	Charakteryzuje się dobrą transmisją w widzialnej i bliskiej podczerwieni zbliżoną do BK7. Jednak wyższy indeks i dyspersja czynią go wyjątkowym w produkcji soczewek.
LaSFN9, flint	420–2300	1,85025	Wysoki współczynnik załamania. Większa moc obiektywu dla mniejszej krzywizny
BaK1, crown	380–2100	1,57250	Doskonały materiał na soczewki optyczne. Nie zalecane do zastosowań wrażliwych na temperaturę
Szkło optyczne, crown	380–2100	1,52288	Jakość mniejsza od BK7
CaF ₂	170–7000	1,43385	Wrażliwe na skoki temperatur
MgF ₂	150–7000	1,37774	Pozytywny kryształ dwójłomny, odporny na szok termiczny i mechaniczny
Szafir krystaliczny Al ₂ O ₃	150–6000	1,7708	Wysoka twardość powierzchni, odporna na zarysowania, chemicznie obojętna

➤ **Warstwa metaliczna**

Projektując chip SPR, należy kierować się odpowiednim doбором warstwy metalicznej o różnym współczynniku załamania (RI) i różnej grubości (najczęściej rzędu nanometrów). Metale użyte do konstrukcji sensorów SPR muszą spełniać podstawowy warunek – muszą posiadać elektron z pasma przewodnictwa, który jest zdolny do rezonansu ze światłem o odpowiedniej częstotliwości, kącie padania i polaryzacji. Najczęściej stosowanymi metalami w sensorach SPR są pierwiastki metali szlachetnych, takich jak złoto (Au), srebro (Ag), aluminium (Al) i miedź (Cu) [6, 23, 52, 66]. Wśród tych metali złoto jest najpowszechniej stosowane jako warstwa SPR, gdyż posiada zalety dużej stabilności, trwałości i wyjątkowej biokompatybilności [55]. Chociaż pojedyncza warstwa Au zapewnia stabilne działanie, chip czujnika oparty na bazie Au ma ograniczoną czułość, szczególnie przy wykrywaniu biocząsteczek o niskiej masie cząsteczkowej lub śladowym stężeniu. Czułość sensorów SPR oparta o metale takie jak złoto czy srebro uzależniona jest w głównej mierze od właściwości wzmacniania pola zanikającego przez warstwę metaliczną (tabela 2) lub inaczej możliwości rozprzestrzeniania fali powierzchniowej SPW na styku faz metal – dielektryk. W porównaniu ze złotem, srebro lepiej wzmacnia pole zanikające. Powierzchniowa fala SPW przechodząca wzdłuż w warstwy srebra jest mniej tłumiona i wykazuje lepszą lokalizację pola elektromagnetycznego niż SPW wykonana dla złota, co skutkuje ostrzejszą krzywą SPR (rys. 19). Zależy ona w dużej mierze od rodzaju zastosowanego metalu, dlatego też porównując wszystkie wymienione metale, srebro wydaje się być lepszym wyborem do konstrukcji sensora niż złoto. Oprócz tego srebro stanowi tańszą alternatywę dla złota. Niestety metal ten podobnie jak inne metale (miedź i glin) łatwiej ulega utlenieniu pod wpływem powietrza lub płynnych reagentów ze względu na jego wysokie powinowactwo do tlenu, co skutkuje koniecznością przykrywania warstwy metalicznej dodatkowymi powleczeniami zabezpieczającymi metal przed czynnikami zewnętrznymi [25, 52].

Tabela 2. Ogólna charakterystyka najczęściej wykorzystywanych pierwiastków wchodzących w skład warstwy metalicznej SPR [35].

Warstwa metaliczna przenosząca SPW	Srebro (Ag)		Złoto (Au)	
	$\lambda=630$ nm	$\lambda=850$ nm	$\lambda=630$ nm	$\lambda=850$ nm
Długość fali światła [nm]				
Długość rozprzestrzeniania SPW [μm]	19	57	3	24
Głębokość wnikania w metal (nm)	24	23	29	25
Głębokość wnikania w dielektryk(nm)	219	443	162	400
Natężenie pola w dielektryku (%)	90	95	85	94



Rys. 19. Porównanie krzywych SPR dla złota i srebra. FWHM – pełna szerokość w połowie wysokości maksimum krzywej SPR. Opracowanie własne.

➤ Warstwa adhezyjna

Kolejnym istotnym parametrem w poprawnym konstruowaniu chipów jest dobór odpowiedniej warstwy adhezyjnej, tak aby zapewnić wystarczającą przyczepność warstwy metalicznej do podłoża bazowego. Słaba przyczepność jest zwykle powodowana obecnością dodatkowych atomów, tj. tlenu i wodoru „uwięzionych” podczas procesu osadzania metalu

z fazy gazowej pomiędzy warstwą metaliczną a szkłem. Jednym z niewielu pierwiastków nadających się do wytworzenia warstwy adhezyjnej jest chrom (Cr) [54]. Pierwiastek ten jest materiałem aktywnym tlenowo, prowadzącym do bardzo stabilnych centrów zarodkowania na szkłe lub utlenionym krzemie. Posiada również wysoką twardość i odporność na korozję. Ta dodatkowa warstwa metalu stanowi nie tylko formę polepszenia przyczepności, ale też zwiększa jednorodność warstwy napyłanego metalu w tym przypadku srebra. Próżniowe napyłanie tego metalu na podłożu szklanym charakteryzuje się często dużą niejednorodnością, aglomeruje się w postaci wysp [55]. Dlatego też, aby wykorzystać srebro do biodetekcji, wymagana jest warstwa adhezyjna zwiększająca przyczepność srebra do podłoża szklanego wraz z dodatkową powłoką jako warstwą ochronną. Innymi alternatywnymi substancjami dla chromu są powszechnie stosowane takie jak tytan Ti oraz azotek tytanu (TiN).

Pozostałymi parametrami branyymi pod uwagę przy wyborze surowców warstwy adhezyjnej jest jak najmniejszy wpływ surowca na zmianę właściwości filmu metalicznego SPR (wysoka wartość przenikalności elektrycznej lub dielektrycznej oraz niska rezystywność).

➤ **Warstwa wierzchnia**

W literaturze opisywane są nie tylko zastosowania warstw adhezyjnych, poprawiających przyczepność oraz jednorodność metalicznej warstwy SPR, ale też przykłady dodatkowych powłok zabezpieczających metale przed wpływem czynników zewnętrznych [40, 62 – 65]. Opisywane powyżej srebro zdaje się być idealnym kandydatem do zastosowania w konstrukcji sensora SPR, jednakże jego predyspozycje do łatwego utleniania sprawiają, iż musi ono być dodatkowo zabezpieczone taką powłoką. Najczęściej wymienianymi substancjami nadającymi się do takich zastosowań należą: tlenek cyny i indu ITO (ang. *indium tin oxide*). Materiał ten nie tylko pomaga chronić warstwę Ag przed utlenianiem, ale też zachowuje jej ostry sygnał optyczny. Cienkie warstwy ITO są szeroko stosowane jako przezroczyste powłoki elektrod w urządzeniach elektronicznych ze względu na ich niską rezystywność, silną absorpcję w zakresie nadfioletu, wysoką transmisję w zakresie widzialnym oraz wysoki współczynnik odbicia w zakresie dalekiej podczerwieni [37, 55]. Dlatego też ITO cieszy się dużym zainteresowaniem przy produkcji czujników do urządzeń SPR.

Innym materiałem powszechnie stosowanym do powlekania chipów jest krzemionka SiO_2 . Materiał ten charakteryzuje się przede wszystkim niską ceną, łatwą dostępnością oraz szeroką gamą dobrze opracowanych procedur kotwiczenia biomolekuł, opartych na chemii wiązania siloksanowego. W szczególności wykazano, że powlekanie podłoża ze złota warstwą krzemianową o grubości kilku nanometrów (3-5nm) utrzymuje czułość techniki SPR [52]. Niestety chemia wiązań siloksanowych nie jest do końca dobrze kontrolowana. Ponadto wiązania Si–O–Si są podatne na hydrolizę w trudnych warunkach, a podwyższone temperatury sprzyjają hydrolizie wiązań siloksanowych. Możliwym rozwiązaniem w tym przypadku może być powlekanie warstwy SPR powłoką węgla amorficznego, która z kolei wykazuje zwiększoną stabilność w porównaniu ze szkłem w warunkach podwyższonej temperatury. Powierzchnie oparte na węglu są kompatybilne z szeroką gamą biomolekuł i umożliwiają ich kowalencyjną immobilizację przy użyciu chemii opartej na przyłączaniu cząsteczek zawierających alken do substratu węglowego. Co ciekawe, podłoża węglowe zapewniają stabilność chemiczną i zachowanie właściwości optycznych cienkiej warstwy SPR (np. złota) i jej zdolności do podtrzymywania plazmonów powierzchniowych. W związku z tym węgiel amorficzny jest szczególnie atrakcyjny, gdyż może być osadzany w temperaturze pokojowej zaś jego cienkie warstwy (0–20 nm) mogą być napyłane na warstwie metalicznej bez zmiany jej właściwości optycznych. Dodatkowe modyfikacje powierzchni węgla amorficznego można wykonać poprzez zakończenie powierzchni wodorem za pomocą obróbki plazmowej i fotofunkcjonalizacji promieniowaniem UV za pomocą 9-decen-1-olu, tak aby uzyskać powierzchnię zakończoną grupą hydroksylową.

➤ **Modelowanie struktury chipa za pomocą FDTD**

Poza powyżej zebrany wskazówkami doboru materiałów przy konstruowaniu chipów jako sensorów SPR, wykorzystywane może być również modelowanie matematyczne, np. metodą różnic skończonych FDTD (*ang. finite-difference time-domain*). Jest to matematyczna symulacja, która w przypadku zjawiska SPR wykorzystuje równania Maxwella i Fresnella. Wykonywana za pomocą oprogramowania komputerowego opartego na serii algorytmów (oprogramowanie Lumerical) [25, 55, 71], pozwala na bardzo dokładne i precyzyjne wyliczenie składu poszczególnych warstw chipa, tj. grubości podłoża bazowego i warstw metalicznych oraz dodatkowych powłok zabezpieczających. Modelowanie FDTD symuluje równanie Maxwella dla danego układu pomiarowego SPR. Przykłady modelowania FDTD wymienione w literaturze [25, 54, 55] wykazują, iż różnica

w wartościach parametrów konstrukcyjnych chipa, tj. grubości warstw, współczynników odbicia lub kąta SPR wynosi od 0 do 5% względem tych samych wielkości otrzymanych eksperymentalnie.

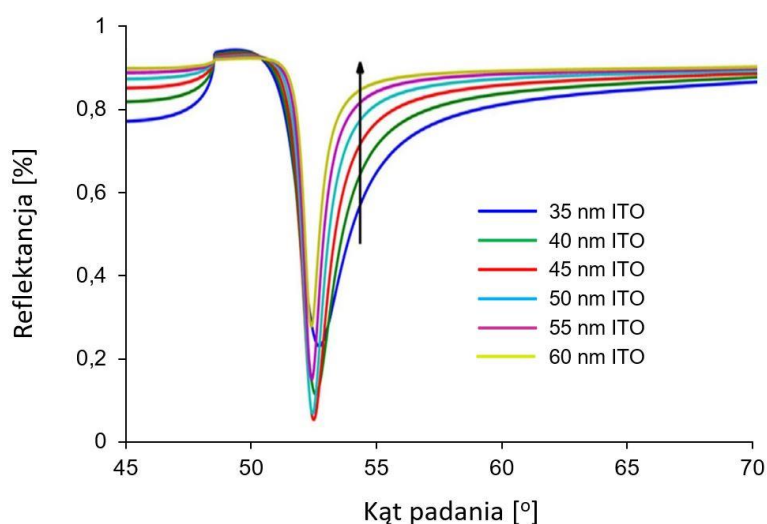
3.2.2.4. Wpływ konstrukcji chipa na funkcjonowanie sensorów

Wszystkie składowe chipa mają istotny wpływ na funkcjonowanie całego sensora. Każda z warstw, począwszy od rodzaju zastosowanego podłoża bazowego, przez warstwy adhezyjną, metaliczną i wierzchnią oraz ewentualne warstwy pośrednie ma istotny wpływ na kształt krzywej SPR sensora a co za tym idzie definiuje jego parametry refraktometryczne takie jak czułość określana poprzez nachylenie spadku krzywej SPR, szerokość w połowie wysokości maksimum (FWHM) czy też rozdzielczość lub parametr jakości pomiaru (FOM). Poniżej przedstawiono krótką analizę wpływu składowych najbardziej powszechnie stosowanych i opisywanych w literaturze konstrukcji sensorów SPR.

Stan techniki opisywany w literaturze przedstawia kilka typowych konstrukcji sensorów SPR. Najbardziej popularną konstrukcją czujników jest chip wykonany ze szkła BK7 o współczynniku załamania światła $n=1,54$ z odpowiednio napyłonymi warstewkami tytanu lub chromu: Ti (1nm) lub Cr (1nm) stanowiącymi warstwę adhezyjną oraz cienkim metalicznym filmem złota Au (50nm). Konstrukcja może stanowić pewnego rodzaju standard i jest punktem wyjścia do opracowania i ulepszania struktur nowo opracowywanych biosensorów, w celu polepszenia ich wspomnianych parametrów refraktometrycznych.

Jedną z warstw, która może mieć istotny wpływ na funkcjonowanie sensora jest powłoka adhezyjna. W literaturze [25, 37, 58, 69, 73] opisywanych jest wiele przykładów ilustrujących badania prowadzone w kierunku ewaluacji wpływu składu tej powłoki na działanie sensorów. Jednym z przykładów może być tlenek cynku stosowany jako podkład dla warstwy generującej efekt SPR. Związek ten ze względu na dobre przewodnictwo elektryczne oraz silną adhezję do złota i srebra stanowi lepszą alternatywę dla powszechnie aplikowanych pierwiastków chromu i tytanu. Te dwa metale posiadają dużą wartość części urojonej współczynnika załamania przez co znacząco wpływają na właściwości rezonansowe całego sensora, poprzez znaczne zwiększenie szerokości w połowie wysokości maksimum (FWHM) i tym samym zmniejszenie amplitudy. Takie zmiany widmowe wykresu SPR zmniejszają czułość sensora oraz zawężają zakres liniowy krzywej.

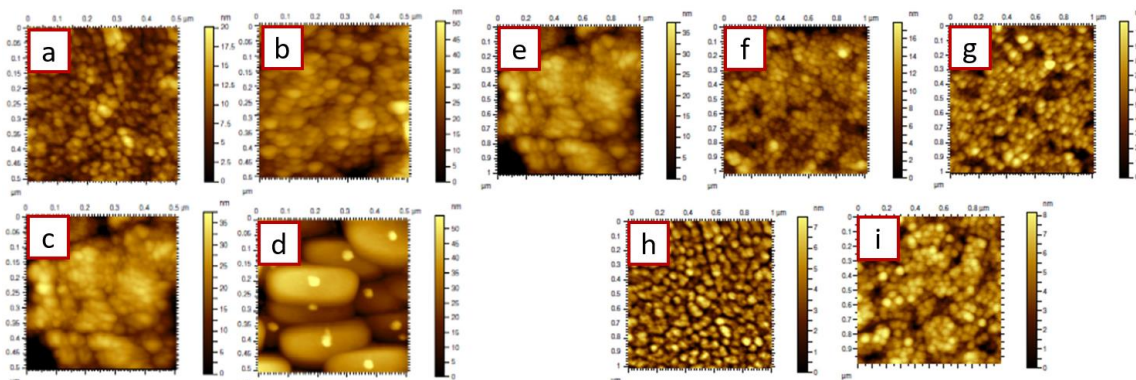
Kolejnym przykładem opisywanym w literaturze [58] jest chip wykonany ze szkła SF11 i pokryty cienką powłoką tlenku indu i cyny (ITO) (warstwa adhezyjna) oraz pokryty dodatkowo srebrem o grubości filmu 45 nm (warstwa metaliczna SPR). W badaniu tej struktury skupiono się na dobraniu odpowiedniej grubości powłoki ITO, tak aby czujnik reprezentował najlepsze parametry czułości (nachylenia) oraz szerokości krzywej (FWHM). W tym celu wykonano chipy różniące się grubością powłoki adhezyjnej od 35 do 60 nm. Pomiar refleksyjności chipów przedstawione na rysunku 20 pokazują, iż grubość warstwy tlenku znacznie wpływa na parametry czujnika. Wraz ze wzrostem grubości filmu ITO, czułość sensora zmienia się nieznacznie, podczas gdy krzywa SPR ulega poszerzeniu (większa wartość) co skutkuje zmniejszeniem jakości pomiaru (FOM).



Rys 20. Wykres przedstawiający krzywą SPR sensora SF11/ITO/Ag 45 dla różnych grubości powłoki adhezyjnej ITO. Wartości grubości powłoki ITO przedstawiono na wykresie [58].

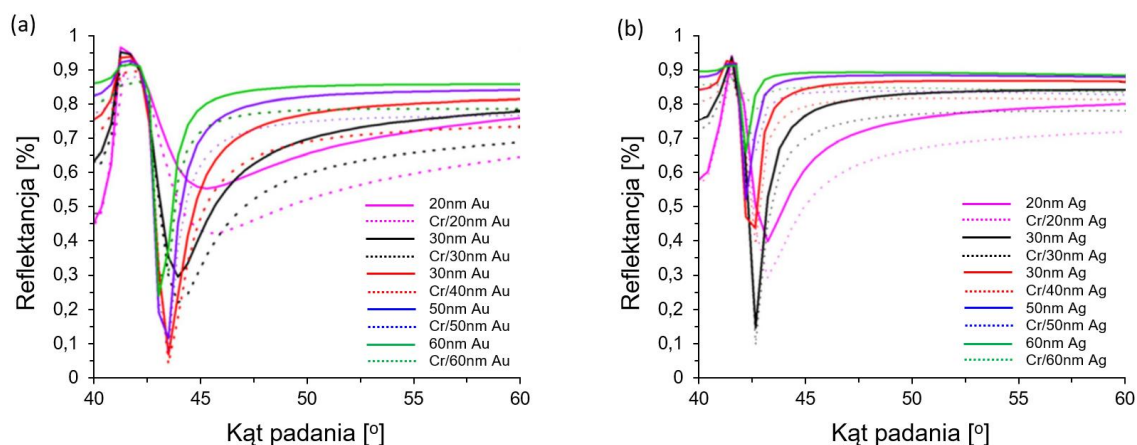
Kolejnym przykładem obrazującym oddziaływanie składu warstwy adhezyjnej na funkcjonalność sensora jest chip, którego konstrukcja oparta jest na szkłe powleczonym cienkim filmem tytanu oraz srebra [72]. Badania prowadzono w kierunku sprawdzenia wpływu chropowatości powierzchni na działanie sensora a także, aby potwierdzić, czy pośrednia warstwa tytanu może wpływać lub nawet polepszać działanie czujnika jako warstwa adhezyjna w bimetalicznym chipie. Wyniki pomiarów refraktometrycznych oraz zdjęcia AFM wykazały, iż warstwa tytanu pomaga generować rezonans powierzchniowy, jednakże powłoki tego pierwiastka o dużej grubości a mianowicie 10–30 nm skutkują tworzeniem ziarnistych struktur, zwiększaniem chropowatości powierzchni chipa. Nierówność powierzchni SPR ma duży wpływ na działanie czujnika, zmieniając różne jego

właściwości, takie jak impedancja, współczynnik odbicia a co za tym idzie zmiana kąta rezonansu (θ_{res}), czułość oraz pełna szerokość przy połowie maksimum (FWHM).



Rys. 21. Obraz AFM chipów powleczonych tytanem (a, b, c, d) i srebrem (e, f, g, h, i). Grubość warstwy tytanu wynosi odpowiednio: (a) 2 nm, (b) 5 nm (c) 10 nm (d) 30 nm, grubość warstwy srebra odpowiednio: (e) 20 nm (f) 30 nm (g) 40 nm (h) 50 nm (i) 60 nm [72].

Ustalono również, iż zoptymalizowana grubość warstwy srebra (wynosząca 60nm) wystarczająco obniża chropowatość powierzchni, tak aby finalnie wpływ nierówności powłoki tytanu mógł być pominięty. Identyczne wnioski wysunięto analizując inną strukturę chipa szklanego powleczonego warstwami chromu (powłoka adhezyjna) i złota [25]. Autorzy badań wysunęli wniosek potwierdzający fakt, iż grubość, chropowatość oraz wartość stałej dielektrycznej (rodzaj materiału) warstwy adhezyjnej determinuje parametry sensorów SPR. Oprócz powszechnie stosowanego tytanu jako podkładu wiążącego metale szlachetne ze szkłem, aplikowany jest także chrom. Również w tym przypadku, obecność tego pierwiastka w powłoce adhezyjnej sensora determinuje zmiany w kształcie krzywej SPR oraz wpływa na wartości parametrów refraktometrycznych. Najmiah i Gan [25] wykazali, iż wzbogacenie struktury chipa dodatkową warstwą Cr polepsza przyczepność, jednakże silnie modyfikuje kształt krzywej SPR. Z wykresu przedstawionego na rysunku 22 wynika, iż chromowy podkład poszerza krzywą SPR (większa wartość FWHM) przy jednoczesnym zwiększeniu grubości warstwy metalicznej, którą stanowi złoto lub srebro. Wnioski te potwierdzono również za pomocą matematycznego wyliczenia parametrów refraktometrycznych przy zastosowaniu symulacji metodą różnic skończonych (FDTD), którego wyniki przedstawiono w tabeli 3 i 4. Zmiany te podyktowane są prawdopodobnie stałą dielektryczną chromu, która wpływa na zmianę wartości współczynnika odbicia, a tym samym osłabia rezonans plazmonów powierzchniowych.



Rys. 22. Wykresy przedstawiające krzywe SPR dla chipów zawierających czyste metale (linia ciągła) oraz podkład chromu (linia przerywana): (a) chip złoty, (b) chip srebrny [25].

Tabela 3. Parametry refraktometryczne chipa srebrnego oraz zawierającego podkład chromu. Grubość warstwy chromu ustalono na 0,5nm. ΔR_{\min} – różnica wartości reflektancji chipów Ag i Cr/Ag, $\Delta\theta_{\text{Res}}$ - różnica wartości kątów SPR chipów Ag i Cr/Ag, FWHM szerokość w połowie maksimum [25].

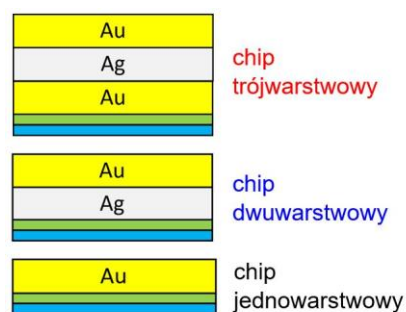
Grubość warstwy Ag [nm]	ΔR_{\min} [a.u.]	$\Delta\theta_{\text{Res}}$ [°]	FWHM [°] Ag	FWHM [°] Cr/Ag
20	0,10721	0,00000	3,61660	4,21910
30	0,05063	0,00000	1,14330	1,04420
40	0,04869	0,01680	1,04080	0,87840
50	-0,14133	0,46130	0,70040	0,69390
60	-0,12231	0,46130	0,57450	0,97020

Tabela 4. Parametry refraktometryczne chipa złotego oraz zawierającego podkład chromu. Grubość warstwy chromu ustalono na 0,5nm. ΔR_{\min} – różnica wartości reflektancji chipów Au i Cr/Au, $\Delta\theta_{\text{Res}}$ - różnica wartości kątów SPR chipów Au i Cr/Au, FWHM szerokość w połowie maksimum [25].

Grubość warstwy Au [nm]	ΔR_{\min} [a.u.]	$\Delta\theta_{\text{Res}}$ [°]	FWHM [°] Au	FWHM [°] Cr/Au
20	0,1307	0,1351	16,8544	20,1057
30	0,0761	0,0000	4,5342	5,7944
40	0,0280	0,0000	1,8679	2,0980
50	0,0424	0,0000	1,3015	1,3446
60	-0,0571	0,0000	0,8967	1,1354

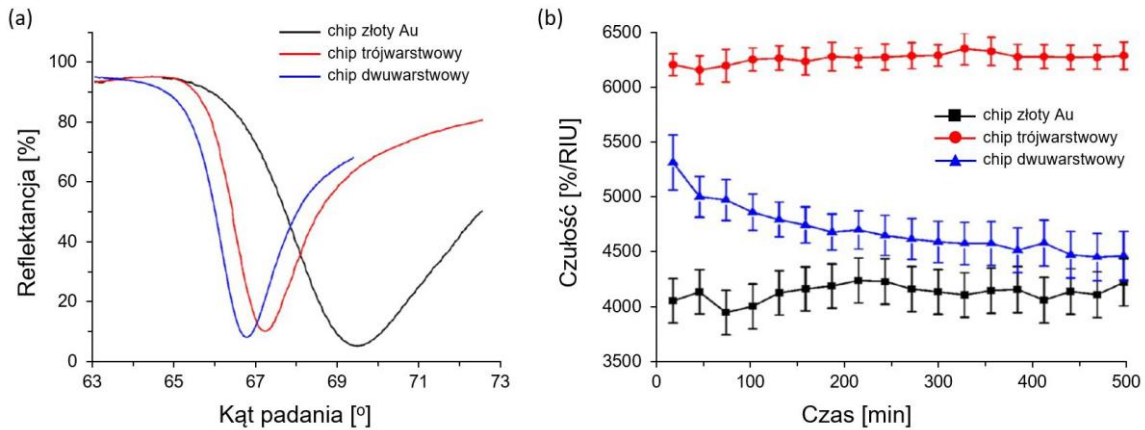
Oprócz opisanych powyżej modyfikacji warstw adhezyjnych, równie istotny jest skład właściwej powłoki metalicznej generującej rezonans plazmonów powierzchniowych. Układ poszczególnych warstw jak i ich grubość oraz skład chemiczny istotnie wpływa na funkcjonalność sensorów. Wang i in. [27] zbadali konstrukcje sensorów, w skład których wchodziły naprzemiennie założone warstwy metaliczne złota i srebra (rys. 23) w celu znalezienia nowej struktury sensora charakteryzującego się lepszą czułością oraz mniejszą szerokością FWHM, względem powszechnie stosowanego złotego chipa szklanego. Do badań zastosowano srebro głównie ze względu na jego lepsze parametry refraktometryczne (niższa wartość FWHM, większa czułość i strome nachylenie krzywej SPR). W jednej z analizowanych konstrukcji wykorzystano dodatkowy film złoty jako podkład pełniący rolę bufora w celu polepszenia adhezji do chromu. Każdą analizowaną strukturę zabezpieczono dodatkowo od zewnątrz złotem przez wzgląd na podatność srebra na utlenianie. Przy analizowaniu tak skonstruowanych chipów skupiono się nie tylko na parametrach refraktometrycznych, ale również na ich stabilności, szczególnie w kwaśnych roztworach wodnych analizując powierzchnię chipów za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM). Z przeprowadzonych pomiarów (rys. 24) jednoznacznie wykazano, iż:

- krzywe SPR wykonane dla nowych struktur zawierających srebro posiadają mniejszą szerokość FWHM oraz bardziej strome nachylenie w odniesieniu do złota (rys 24 a).
- chip o strukturze szkło/Cr(5nm) /Ag(42nm) /Au(13nm) wykazuje pojedyncze uszkodzenia powierzchniowe – uwypuklenia, które łatwo odklejają się od powierzchni. Główną przyczyną powstawania wybrzuszeń w bimetalicznym chipie jest niewystarczająca przyczepność srebra do chromu. Czułość takiego układu (rys. 24b) jest większa niż w przypadku klasycznego złota, jednakże nie utrzymuje ona stałej wartości w czasie, w kwaśnym roztworze wodnym, głównie przez drobne uszkodzenia powierzchni.
- chip o strukturze szkło/Cr(5nm) /Au(2nm) /Ag(42nm) /Au(13nm) nie zawiera uszkodzeń ani uwypukleń powierzchni. Charakteryzuje się również większą czułością



Rys. 23. Schemat przedstawiający analizowane konstrukcje chipów zawierające warstwy złota i srebra. Oznaczenia kolorów: zielony – warstwa chromu, niebieski – szkło. [27].

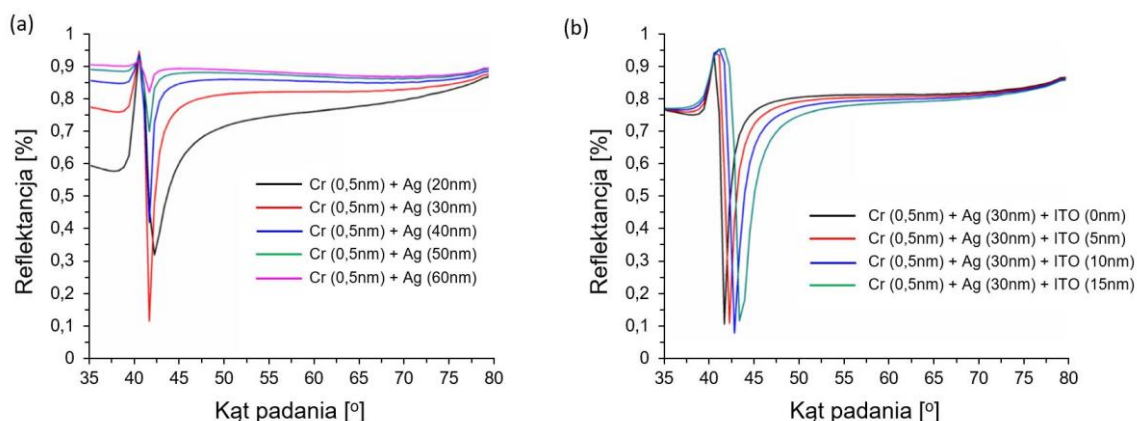
(rys. 24b) względem chipa bimetalicznego – szkło/Cr(5nm) /Ag(42nm) /Au(13nm) a także porównywalną stabilnością do czystego złota.



Rys. 24. Wykresy przedstawiające charakterystykę chipów jedno-, dwu- oraz trójwarstwowych. (a) krzywa SPR wykonana dla wszystkich trzech układów, (b) wykres przedstawiający czułość w funkcji czasu (stabilność) [27].

Do podobnych wniosków doszedł Cheng i in. [49] oraz Xia [23], stwierdzając, iż ekonomiczna przewaga srebra nad złotem w połączeniu ze zwiększoną czułością oraz stabilnością sprawia, że nowa struktura jest dobrą alternatywą dla jednowarstwowych, klasycznych czujników SPR.

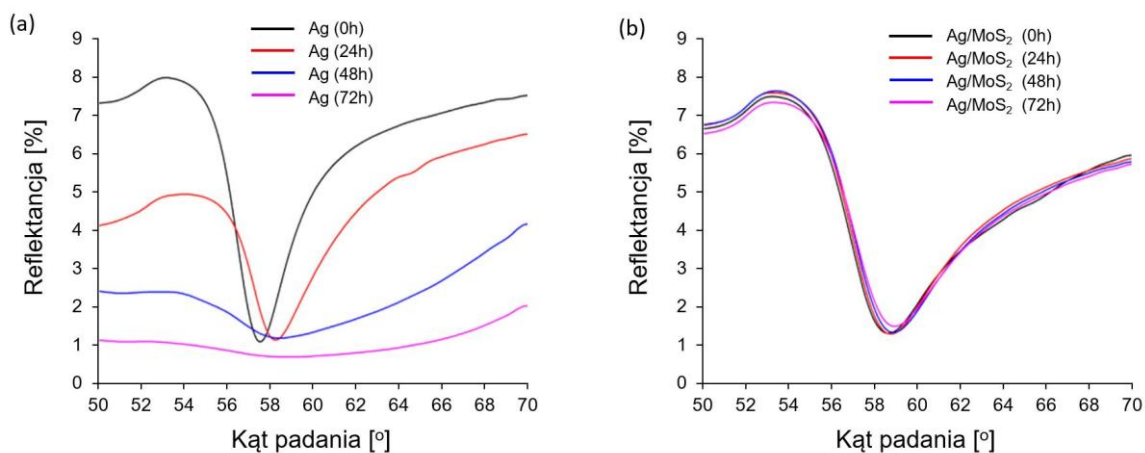
Oprócz Wanga i Changa, badania nad wpływem warstwy metalicznej srebra na funkcjonowanie sensorów prowadzili również Gan i in [55]. Ich celem było przeanalizowanie wpływu struktury chipów o następujących konstrukcjach: Cr(0,5nm) /Ag(30nm) i Cr(0,5nm) /Ag(30nm) /ITO (10nm) w detekcji zmian współczynnika załamania etanolu. Działanie obu sensorów zostało dokładnie przebadane pod kątem wpływu różnych grubości warstwy srebra oraz obecności dodatkowej warstwy zewnętrznej na funkcjonowanie sensora. Z wykresu przedstawionego na rysunku 25 a wynika, iż najbardziej optymalna grubość warstwy srebra, przy której czujnik posiada najmniejszą szerokość FWHM oraz największą czułość, wynosi 30 nm.



Rys 25. Wykresy krzywych SPR dla sensorów: (a) Cr/Ag o zmiennej grubości warstwy srebra w zakresie od 20 – 60 nm, (b) Cr/Ag/ITO o zmiennej grubości warstwy ITO w zakresie od 0 do 15 nm [55].

Kolejnym krokiem było wykreślenie krzywej SPR dla sensora zawierającego optymalną ilość srebra (30 nm) oraz zmienną grubość tlenku cyny i indu (ITO), spełniającego funkcję ochronną, zapobiegającą utlenianiu srebra. Analiza wyników (rys. 25b) wykazała nieznaczne poszerzenie krzywej SPR (większa wartość FWHM) oraz przesunięcie kąta SPR, co ma szczególne znaczenie przy badaniach prowadzonych za pomocą techniki SPRi. Zmiana ta podyktowana jest głównie wysokim współczynnikiem odbicia ITO.

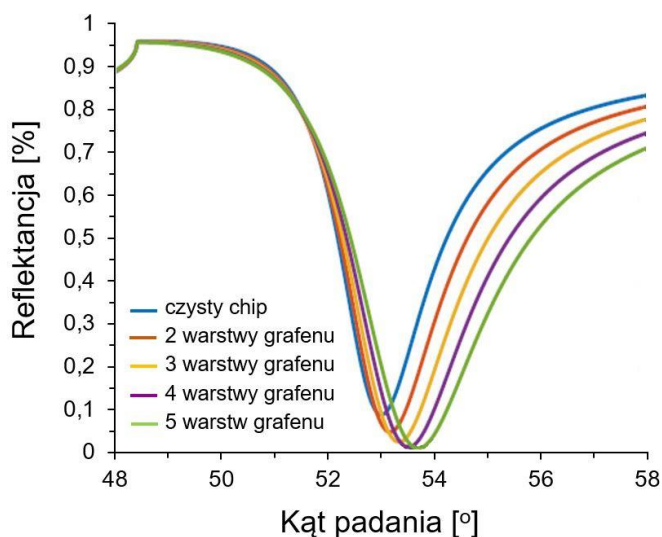
Tlenek cyny i indu jest jednym z wielu związków stosowanych w zewnętrznych powłokach chipów wykorzystywanych w technice pomiarowej SPR, głównie ze względu na dobre przewodnictwo i dużą przezroczystość. W literaturze również często opisywany jest siarczek molibdenu [28] lub grafen [47]. MoS₂ analizowano pod kątem możliwości ochrony warstwy srebra, która łatwo ulega utlenieniu tworząc na powierzchni nieprzezroczysty tlenek Ag₂O, który blokuje generowanie efektu rezonansowego. Dodatkowym atutem siarczku molibdenu miało być polepszenie trwałości powłoki metalicznej, co ma szczególne znaczenie w kontakcie z kwaśnymi roztworami wodnymi.



Rys 26. Wykresy krzywych SPR dla chipów: (a) srebrnego w funkcji czasu, (b) Ag/MoS₂ w funkcji czasu [25].

Analizy krzywych SPR (rys. 26) wykazały, iż siarczek molibdenu mocno stabilizuje warstwę srebra i krzywa SPR takiego układu (rys. 26 b) po upływie 72 godzin nie ulega zmianom (chip jest stabilny). Niestety wprowadzenie warstwy MoS₂ w takim układzie prowadzi do pogorszenia właściwości plazmonicznych sensora. Kształt krzywej SPR obrazujący zależność pomiędzy kątem padania światła a reflektancją jest delikatnie zmieniony, dając szerszy i mniej ostry pik, tym samym zmniejszając czułość techniki pomiarowej.

Srebro pomimo bardzo dobrych właściwości plazmonicznych, pozostaje jednak nadal metalem, który wymaga specjalnego odizolowania od czynników zewnętrznych, powodujących jego utlenianie. Ochronę warstwy Ag zapewnić może również cienka warstwa grafenu, którego łańcuchy zdolne są do blokowania wszelkich możliwych cząsteczek i przede wszystkim tlenu. Grafen wybrany jest przede wszystkim ze względu na właściwości rozpoznawania biomolekularnego ze względu na tworzenie wiązań π z biocząsteczkami opartymi na węglu. Znane są przykłady z literatury [47], które obrazują zastosowanie grafenu w celu zwiększenia tzw. biogodności sensorów, poprzez stosowanie powleczeń np. w postaci cienkich warstw grafenu. Z opracowanych badań (rys. 27) wynika, iż chipy powlekane cienkim filmem grafenu nabywają cech biogodności, przy jednoczesnym pogorszeniu parametrów refraktometrycznych (szersza krzywa SPR, mniejsza czułość).



Rys. 27. Krzywe SPR chipa powleczonego grafenem. Ilość warstw przedstawiono na wykresie [47].

Z przedstawionych krzywych SPR wynika, iż każda dodatkowa warstwa grafenu zmniejsza intensywność z jednoczesnym poszerzeniem krzywej.

Przytoczone powyżej przykłady ilustrują możliwość sterowania parametrami refraktometrycznymi sensorów SPR poprzez zmianę ich konstrukcji, dobór odpowiednich materiałów warstw adhezyjnej, metalicznej lub wierzchniej. Każdy sensor stosowany w technice SPR nie może być konstruowany tylko i wyłącznie w oparciu o właściwości fizyczne danego materiału. Istotną rolę w każdym przypadku odgrywa też cały układ analityczny – sensor wraz z oznaczanym analitem.

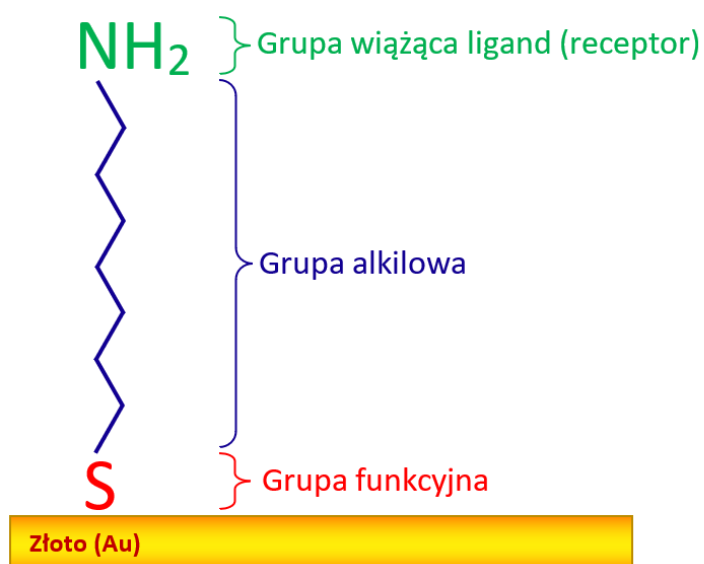
3.2.2.5. Zastosowanie samoorganizujących monowarstw w konstruowaniu sensorów

Technika powierzchniowego rezonansu plazmonów stosowana jest często jako metoda diagnostyczna do badania substancji pochodzenia biologicznego (markery chorób, kwasy nukleinowe, białka). Badanie takich układów biologicznych wymaga unieruchomienia biomolekuł na powierzchni metalowej lub półprzewodnikowej warstwy, na której generowane jest zjawisko SPR. Aby osiągnąć zakotwiczenie analizowanej cząsteczki stosowane są różne formy modyfikacji powierzchni metalu, np. zastosowanie odpowiedniego linkera. To właśnie on stanowi pierwszą warstwę, do której przytwierdzony zostaje ligand (receptor) wyłapujący analit z roztworu. Związanie analizowanej molekuley zapobiega przede wszystkim zmianom strukturalnym cząsteczek zaadsorbowanych

na powierzchni stałej, które mogą skutkować utratą aktywności biologicznej lub modyfikacją właściwości termodynamicznych całego układu pomiarowego [21].

Do najczęściej stosowanych linkerów w technice SPR, wykorzystywanej w diagnostyce substancji pochodzenia biologicznego zalicza się alkanotiole (R–SH) np. 1-merkaptododekan ($\text{SH}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$) [73] lub oktandekantiole $\text{SH}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ [74], aminotiole ($\text{NH}_2\text{--R--SH}$) np. cysteamina $\text{SH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ [62, 75 – 78] oraz inne pochodne zawierające siarkę. Związki te zaadsorbowane na powierzchni metalu (najczęściej złota, srebra lub miedzi) posiadają tendencję do specyficznej adsorpcji w postaci samoporzadkujących się monowarstw, zwanych popularnie SAM (ang. *self-assembled monolayers*). Obliczono, iż w tak upakowanej monowarstwie znajdują się 4×10^{14} cząsteczek alkanotiole/cm². Liczba ta odpowiada wiązaniu alkanotiole z praktycznie każdym atomem złota na powierzchni [40]. SAM posiadają tzw. grupy końcowe, które można wykorzystać do dalszych modyfikacji powierzchni sensora, za pomocą zakotwiczenia liganda (przeciwciała, inhibitora lub enzymu).

Rozważając tworzenie i organizację SAM opartych na tiolach, konieczne jest podzielenie struktury cząsteczki adsorbentu na trzy części (rys. 28). Pierwsza część składa się z ugrupowania tiolowego (–SH) i jest określana mianem grupy funkcyjnej. Chemisorpcja tej grupy do podłoża jest najważniejszym procesem w tworzeniu monowarstwy. Kolejną częścią cząsteczki tworzącej SAM jest łańcuch alkilowy. Oddziaływania Van der Waalsa między łańcuchami, choć energetycznie słabsze niż chemisorpcja, stanowią istotną siłę napędową dla samoorganizacji warstwy. Trzecią część molekuly stanowią grupy wiążące kolejne warstwy (np. ligand) zwane również grupą końcową. W SAM opartych na alkanotiole grupy te są ugrupowaniami metylowymi. Zdarza się jednak, iż grupę końcową mogą stanowić inne podstawniki np. grupa aminowa, która funkcjonuje jako miejsce zakotwiczenia kolejnej warstwy biosensora, np. liganda (receptora) połączonego z tiolem za pomocą wiązania kowalencyjnego.



Rys. 28. Graficzne przedstawienie cząsteczki aminotiolu na powierzchni złota, zawierającą grupę funkcyjną, łańcuch alkilowy i grupę wiążącą ligand (receptor). Opracowanie własne.

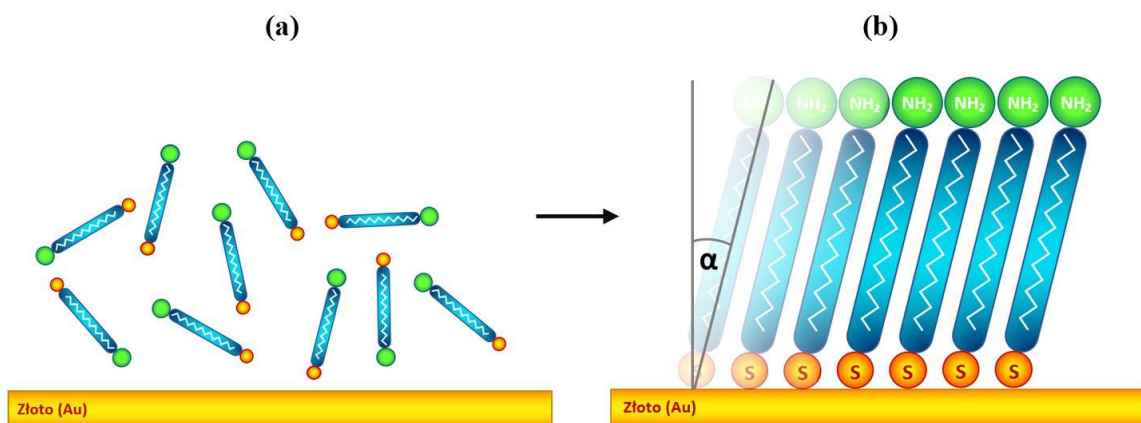
Mocowanie samoorganizującej się monowarstwy w sensorach z warstwą metaliczną SPR (złota, srebra, miedzi) opiera się na silnej adsorpcji związków zawierających siarkę. Początkową siłą napędową budowania monowarstwy jest powinowactwo chemiczne pomiędzy adsorbatami a podłożem. Przykłady par adsorbat–substrat powszechnie stosowanych do generowania SAM obejmują:

- kwasy karboksylowe na aluminium lub srebrze,
- alkohole, aminy i izonitryle na platynie,
- pochodne alkilosilanowe na hydroksylowanej powierzchni,
- sulfidy dialkilowe i disulfidy dialkilowe na złocie,
- alkanotiole na metalach takich jak złoto, srebro i miedź oraz związkach niemetalu tj. fosforek indu (InP), tlenek indu i cyny (ITO).

Alkanotiole posiadające atom siarki tworzą wysoce uporządkowane monowarstwy, w których atomy donora – siarki silnie uporządkowują się na metalicznym podłożu złotym, zaś siły Van der Waalsa występujące pomiędzy grupami metylenowymi orientują i stabilizują monowarstwę. Liczba grup metylenowych reguluje uporządkowanie cząsteczek, dzięki czemu łańcuchy o długości powyżej 10 grup metylenowych łączą się w sposób krystaliczny i ściśle upakowany, zaś łańcuchy krótsze układają się w mniej uporządkowaną strukturę [30, 73, 80]. Średnia grubość utworzonych w ten sposób warstw nie przekracza 2 nm, co odpowiada warunkom powstawania zjawiska SPR [30].

Ogromne znaczenie ma proces budowania monowarstwy. Uzależniony jest on nie tylko od rodzaju molekuł tworzących SAM ale też od rodzaju podłoża (złoto, srebro, miedź). We wspomnianych układach metalicznych budowanie warstwy SAM konkuruje z tworzeniem warstwy tlenkowej lub adsorpcją drobnych zanieczyszczeń. W związku z tym, iż złoto jest względnie obojętne i nie tworzy stabilnego tlenku w warunkach otoczenia w łatwy sposób wiąże się z tiolem prawdopodobnie poprzez utleniające działanie tiolu na złoto, a następnie utratę wodoru w postaci wodoru H_2 lub wody H_2O . W przeciwieństwie do złota inne metale tj. srebro Ag ulegają łatwemu utlenieniu. Oznacza to iż cienkie folie srebrne zawierają cienką warstwę tlenku przed wystawieniem na działanie roztworu alkanotiole i to właśnie ta utleniona powierzchnia reaguje z tiolami. Powstała w ten sposób monowarstwa SAM na srebrze nie zawiera (lub zawiera bardzo małe ilości) tlenku srebra. Tlenek ten usuwany jest podczas właściwego procesu tworzenia SAM na przykład poprzez redukcję albo wypieranie przez tiol. Prawdopodobnie to różne składy chemiczne występujące na powierzchniach metal/tlenek metalu, odpowiedzialne są za końcową strukturę SAM.

Opisując laboratoryjną procedurę tworzenia monowarstw należy wspomnieć, iż najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem przy tworzeniu SAM jest etanol, ze względu na dobrą rozpuszczalność większości tioli. Standardowa procedura budowania samoorganizującej monowarstwy tego związku obejmuje zanurzenie chipa powleczonego cienką warstwą metalu do alkoholowego roztworu tiolu na czas 24 godzin, tak aby umożliwić utworzenie stabilnej monowarstwy. Kolejnym krokiem jest wyjęcie chipa z roztworu, wielokrotne opłukanie rozpuszczalnikiem (w tym przypadku etanolem) celem usunięcia możliwych zanieczyszczeń lub zaadsorbowanych dodatkowych cząsteczek tiolu a następnie osuszenie w strumieniu ultra czystego gazu obojętnego (zwykle azotu lub argonu). Tak przygotowane podłoże może być przechowywane do czasu ponownego użycia, w niektórych przypadkach nawet do 3 miesięcy [49].



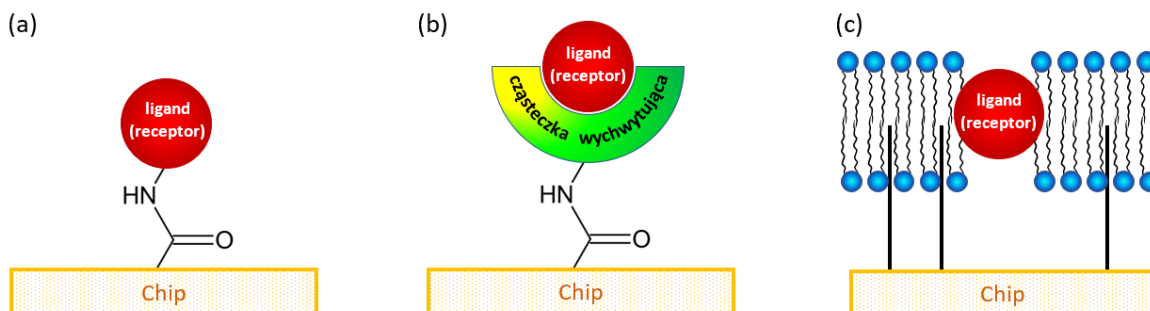
Rys. 29. Wizualizacja rozmieszczenia cząsteczek samoorganizującej się warstwy aminioliu SAM: (a) w roztworze, (b) na powierzchni metalu. α – kąt nachylenia monowarstwy względem osi prostopadłej do powierzchni metalu. Opracowanie własne.

Podsumowując, samoorganizujące monowarstwy SAM wytwarzane są w dość łatwy sposób (najczęściej z roztworu). Monowarstwy charakteryzują się gęstym upakowaniem i są precyzyjnie zorientowane. Ich grubość i właściwości powierzchni można łatwo dostosować przy użyciu standardowych organicznych metod syntetycznych. Chociaż do wytwarzania SAM na bazie alkanotioliu stosowano różne substraty (złoto, srebro, miedź, platynę), to właśnie złoto przykuwa szczególną uwagę ze względu na jego obojętność chemiczną, która pozwala na powtarzalne, dobrze uformowane SAM. W rezultacie SAM alkanotioli na złocie są najdokładniej przebadanym układem monowarstwowym i stały się standardem, według którego porównywane są inne monowarstwy organiczne.

3.2.2.6. Proces immobilizacji biomolekuł w sensorach SPR

Kolejnym równie istotnym etapem konstruowania poprawnie funkcjonującego sensora SPR, poza zastosowaniem linkera w postaci samoorganizujących się monowarstw, jest właściwy dobór sposobu zakotwiczenia – unieruchomienia oznaczanej biocząsteczki. Unieruchomienie zwane również immobilizacją, stanowi kluczowy parametr poprawnie przeprowadzonego oznaczenia związku, gdyż to właśnie on wpływa na kinetykę reakcji wiązania biocząsteczki a co za tym idzie przebiegu całego oznaczenia.

Wśród najbardziej znanych metod immobilizacji (rys. 30) wyróżnia się procedurę wiązania kowalencyjnego (a), unieruchomienia za pomocą pułapkowania na porowatej matrycy, polegającej na enkapsulacji wychwytywanej biocząsteczki (b) oraz uwięzienia biomolekuły w półprzepuszczalnej membranie (c).



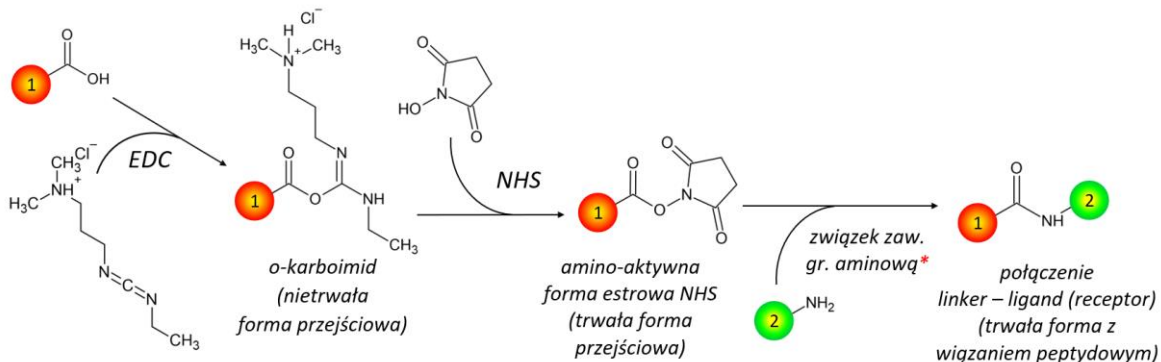
Rys. 30. Schematyczne przedstawienie metod immobilizacji liganda (biomolekuły): (a) wiązanie kowalencyjne, (b) wychwytywania, (c) uwięzienia w półprzepuszczalnej membranie [39].

Aby ustalić jaki sposób immobilizacji będzie najbardziej odpowiedni, należy określić jaki rodzaj liganda (receptora) powinien związać się z powierzchnią sensora (białko, cukier, DNA) oraz co będzie stanowiło analit, który zostanie finalnie oznaczany. Istotne jest również cel badania, czy będzie to oznaczenie ilościowe, jakościowe lub weryfikowana będzie kinetyka reakcji. Powyższe dane są istotne, głównie pod kątem odpowiedniego doboru składników układu: linker – ligand – analit. Wszystkie wymienione składniki powinny być dopasowane do siebie nie tylko pod kątem możliwości połączenia odpowiednich grup funkcyjnych, ale przede wszystkim ze względu na geometrię przestrzenną całego układu, głównie ze względu na wielkość cząstek stosowanych ligandów (receptorów) (od kilku do kilkudziesięciu kDa). Istotne jest również zachowanie aktywności biologicznej liganda (receptora) po jego unieruchomieniu a także branie pod uwagę informacji o jego pH i możliwych grupach uczestniczących w wiązaniu cząsteczek analitu.

Najczęściej spotykaną w literaturze [81-84] procedurą immobilizacji jest metoda wiązania kowalencyjnego. W przypadku zastosowania tej metody powierzchnia sensora pokryta wstępnie linkerem, zawierająca grupę końcową (np. grupa aminowa $-NH_2$ w aminioliu), traktowana jest jako grupa reaktywna, z którą może wiązać się ligand (receptor). Stosowany zazwyczaj ligand (receptor) to duża cząsteczka białka (enzym, przeciwciało, inhibitor), która funkcjonuje jak katalizator w reakcjach chemicznych, jednakże na koniec reakcji pozostaje niezmienną. Ligand (receptor) w reakcji z linkerem tworzy złożony układ cząsteczek, który finalnie wyłapuje molekuly analitu, tworząc tym samym zmiany na powierzchni biosensora i generując sygnał analityczny.

Niezbędnym warunkiem utworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy linkerem a ligandem (receptorem) jest odpowiednie ukierunkowanie reakcji łączenia grup

karboksylowej ($-\text{COOH}$) oraz aminowej ($-\text{NH}_2$) tak aby powstało wiązanie peptydowe. Najczęściej stosowanym sposobem aktywacji wiązań jest procedura EDC/NHS, przedstawiona na rysunku 31.



Rys. 31. Schemat obrazujący reakcję aktywacji grup funkcyjnych uczestniczących w tworzeniu wiązania peptydowego. 1, 2 – reszta peptydowa lub * aminotiol obecny na powierzchni sensora, w postaci linkera zawierający grupę aminową $-\text{NH}_2$. Opracowanie własne.

Reakcja ta może zachodzić na kilka różnych sposobów, wieloetapowo [30]. Punktem wyjścia jest modyfikacja grupy karboksylowej potencjalnego liganda (receptora) za pomocą reagentu karbodiimidowego. Niektóre karbodiimidy, np. DCC (dicykloheksylokarbodiimid), są zazwyczaj stosowane w syntezie organicznej, jednak w przypadku reakcji w roztworach wodnych pierwszeństwo mają takie alternatywy, jak EDC (1-etyl-3-(3-dimetylamino)propylo)karbodiimid) [85]. Główną funkcją odczynnika karbodiimidowego jest stworzenie reaktywnego związku przejściowego z grupą karboksylową, który poddaje się syntezie z odpowiednim nukleofilem. Reakcję tworzenia wiązania kowalencyjnego przeprowadza się zwykle w dwóch etapach: wstępna aktywacja, po której następuje kolejna reakcja, w celu uniknięcia spontanicznego wiązania pomiędzy unieruchomioną cząsteczką i karbodiimidem. W roztworach wodnych aktywność związku przejściowego jest na tyle wysoka, że hydroliza natychmiast może przekształcać go ponownie w kwas karboksylowy, jeżeli nie zostanie wychwycony przez inny rywalizujący nukleofil. Potencjalny efekt uboczny można całkowicie przezwyciężyć stosując mieszaninę EDC i reaktywnego związku zawierającego grupę hydroksylową, tworząc tym samym trwałą, aktywną pochodną estrową. Taka forma przejściowa jest stabilna nawet przez kilka godzin. Najbardziej odpowiednim odczynnikiem w celu stworzenia trwałej formy estrowej jest 1-hydroxypirolidyno-2,5-dion (NHS), który jest zazwyczaj preferowany, głównie ze względu na swoją dobrą

rozpuszczalność w wodzie i stosunkowo niską toksyczność. Jest on mieszany jest z EDC przy odpowiednim pH, tak aby zablokować poboczne grupy funkcyjne, które potencjalnie mogą stwarzać ryzyko tworzenia niepotrzebnych wiązań peptydowych. Opisywana procedura aktywacji wykonywana jest zazwyczaj w warunkach o lekko zasadowym pH, np. w buforze węglanowym o pH około 8,5, w którym tworzone jest stabilne i trwałe wiązanie peptydowe.

Poza metodą tworzenia wiązań kowalencyjnych istnieje jeszcze kilka innych sposobów unieruchomienia biomolekuł na powierzchni sensora, wśród których można wyróżnić umieszczenie cząsteczki w półprzepuszczalnej błonie lipidowej [86]. Procedura ta przeprowadzana jest przy pomocy zawiesiny komórek lub roztworu enzymu ograniczonych membranę przepuszczającą (błoną lipidową). W literaturze opisywane są przykładowo tworzone dwuwarstwy lipidowe [30]. Fosfolipidy zmodyfikowane w grupie czołowej hydrofilowym linkerem na bazie tiolu, zostały zastosowane do zakotwiczenia lipidowych dwuwarstw na powierzchni złota (rys. 30 c). Złota powierzchnia z hydrofilowym polimerem została również zmodyfikowana grupami hydrofobowymi, z którymi wiążą się struktury liposomów. Często spotykaną matrycą immobilizującą biomolekuły jest metoda oparta na bazie karboksydekstranu modyfikowanego łańcuchami alkilowymi, która jest wygodnym wsparciem dla immobilizacji lipidów [26].

W literaturze można znaleźć wiele innych metod immobilizacji takich jak uwięzienie ligandów (receptorów) biologicznych w matrycy polimerowej, np. poliakrylonitrylu, żel agarowy lub alkohol poliwinylowy [87]. Znane są również zastosowania zmodyfikowanej enzymatycznie pasty węglowej lub grafitowej żywicy epoksydowej [88], gdzie ligandy (receptory) są unieruchamiane samodzielnie lub zmieszane z innymi białkami, takimi jak albumina surowicy bydlęcej (BSA), bezpośrednio na powierzchni przetwornika lub na pokrywającej ją membranie polimerowej. Poza tym unieruchomienie biomolekuły może mieć miejsce na foliach polimeryzowanych plazmowo (PPF), które są z powodzeniem stosowane do immobilizacji biomolekuł i funkcjonalizacji wielu rodzajów czujników [63, 64].

3.2.2.7. Wykorzystanie nanotechnologii do poprawy charakterystyki sensorów

Nanotechnologia to nauka, inżynieria i technologia mająca zastosowanie w nanoskali, czyli zakresie rzędu nanometrów. Zwana jest również często nanonauką badającą bardzo małe cząstki i wykorzystywane we wszystkich innych dziedzinach nauki, takich jak chemia, biologia, fizyka, materiałoznawstwo i inżynieria. W przypadku SPR mamy do czynienia z wieloma różnymi typami materiałów lub technologii ich aplikacji, które ze względu na skalę wielkości zaliczane są do grupy nanomateriałów lub ogólniej do nanotechnologii. Są to m.in. nanocząstki, kropki kwantowe czy też sensory drukowane w nanoskali.

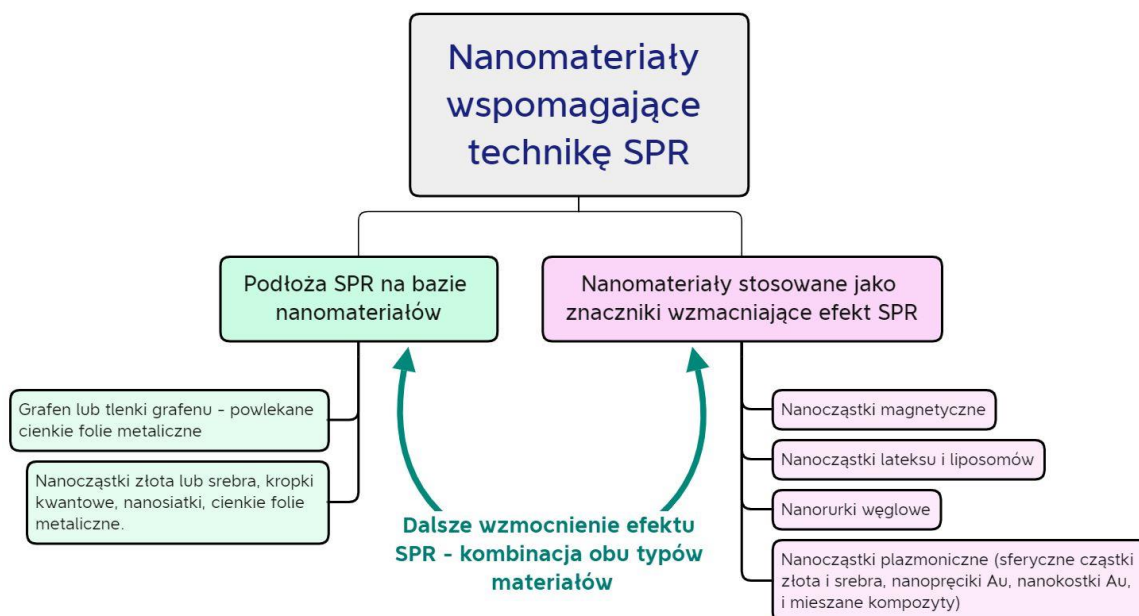
Jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach, technika SPR a w szczególności jej zlokalizowana odmiana LSPR bazuje głównie na zastosowaniu nanocząstek metali szlachetnych takich jak złoto czy srebro w celu poprawienia parametrów refraktometrycznych sensorów jak i zwiększenia siły sygnału SPR a co za tym idzie polepszenia czułości techniki pomiarowej, co stanowi ich główną zaletę. Nanocząstki stosowane w technice LSPR są swoistego rodzaju rozwiązaniem polegającym na wprowadzeniu dodatkowego wzmacniacza sygnału analitycznego. Padająca fala świetlna zostaje uwięziona w przewodzących nanocząstkach o wymiarach mniejszych niż długość fali światła [31, 46]. Podczas gdy SP rozprzestrzeniają się wzdłuż ciągłych powierzchni metalu, LSP są zlokalizowane wokół powierzchni nanocząstek. Wprowadzone nanocząstki metali (Ag, Au), zakotwiczone na powierzchni biosensora wzmacniają efekt rezonansu, poprzez generowanie dodatkowego miejscowego efektu SPR na swojej powierzchni. Wytworzenie lokalnego rezonansu przyczynia się do wygenerowania tzw. dodatkowego efektu wzmocnienia co przekłada się na polepszenie sygnału analitycznego [36].

Znane są również inne nanocząstki plazmonowe Fe_3O_4 o właściwościach magnetycznych, które w trakcie preparacji powlekane są atomami złota i stanowią tańszą alternatywę dla klasycznych nanocząstek złotych [36].

Ogólnie rzecz biorąc nanocząstki stanowią dużą grupę materiałów o różnym składzie chemicznym, zróżnicowanym kształcie i strukturze. Na rysunku 32 zestawiono najbardziej znane i dotychczas stosowane formy nanomateriałów w konstrukcji sensorów wykorzystywanych w technice opartej na powierzchniowym rezonansie plazmonów.

Z przedstawionego schematu (rys. 32) wynika, iż nanomateriały można podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią nanocząstki wbudowane w powierzchnię sensora,

najczęściej zintegrowane z cienkimi foliami metalicznymi. Druga grupa reprezentowana jest przez szerokie grono materiałów, które występują w postaci agregatów, nanoprętów, nanokostek lub sferycznych kulek. Główne zadanie tej grupy materiałów to przede wszystkim wzmocnienie sygnału SPR poprzez ich immobilizację i wbudowanie w część biologiczną wielowarstwowej struktury typu sandwich (rys.33).

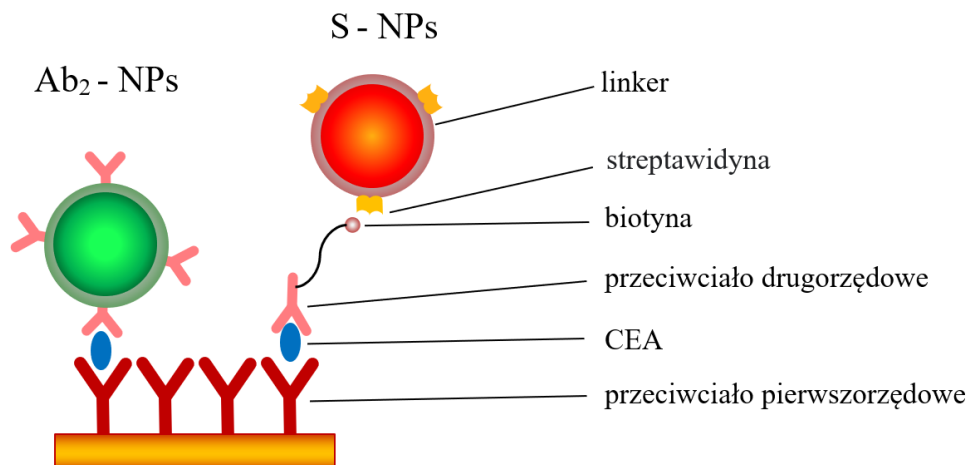


Rys. 32. Schemat przedstawiający grupy nanomateriałów wzmacniających efekt SPR [36].

Warto wspomnieć również o sposobie wytwarzania wymienionych nanomateriałów, który uzależniony jest głównie od ich składu chemicznego. Do najczęściej stosowanych procesów produkcji nanomateriałów można zaliczyć reakcje redukcji prowadzoną w obecności stabilizatorów [87], syntezę elektrochemiczną [89], napromienianie ultradźwiękami [90], rozkład termiczny [91] lub niekiedy litografię nanostemplową [39].

W literaturze opisywanych jest wiele przykładów zastosowania nanocząstek w technice LSPR poprawiających czułość pomiaru, np. oznaczenie antygenu PSA (specyficzny antygen gruczołu krokowego) [85], CEA (antygen rakowo – płodowy) w osoczu krwi [92]. W przypadku oznaczenia antygenu CEA (rys. 33) zastosowano nanocząsteczki złota o wielkości 20 nm, których powierzchnię zmodyfikowano streptawidyną, aby zapewnić wysokie powinowactwo do biotynylowanego drugorzędowego przeciwciała stosowanego w drugim etapie oznaczenia CEA, jak i albuminą surowicy bydlęcej BSA, aby zminimalizować niespecyficzne oddziaływanie z nanocząsteczkami ze względu na złożony skład próbek (osocze krwi). Takie podejście umożliwia biosensorowi

SPR wykrywanie CEA w osoczu krwi w bardzo niskich stężeniach, jak 0,1 ng/ml, znacznie poniżej normalnych poziomów fizjologicznych (około nanogramów na mililitr). Co więcej, granica wykrywalności osiągnięta przy użyciu takich rozwiązań jest ponad 1000 niższa niż granice wykrywalności osiągane do tej pory przy tego typu oznaczeniach dla CEA w osoczu krwi przy użyciu biosensorów SPR [68].

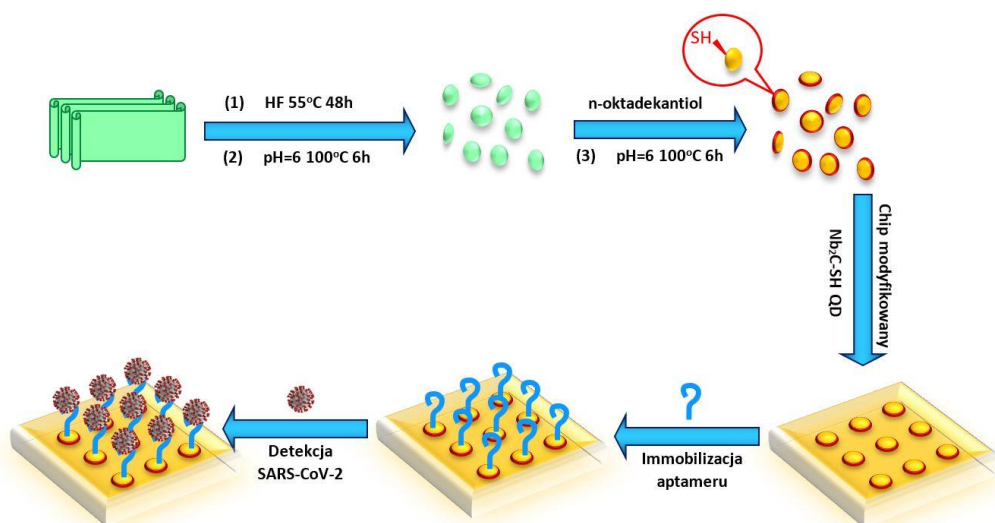


Rys. 33. Graficzne przedstawienie procedury oznaczenia CEA za pomocą funkcjonalizowanych nanocząsteczek złota. S-NPs – nanocząsteczka traktowana streptawidyną, Ab₂-NPs – nanocząsteczka zawierająca przeciwciało drugiego rzędu, specyficzne dla CEA [92].

Sygnal SPR może być wzmocniony nie tylko przy użyciu dobrze znanych nanocząstek metali szlachetnych np. NP–Au czy też NP–Ag [93]. Innym sposobem zwiększenia siły sygnału techniki SPR jak i polepszenia czułości jest zastosowanie kropek kwantowych QD (ang. *quantum dots*). Kropki kwantowe przy zastosowaniu w wielowarstwowej strukturze typu sandwich, działają podobnie jak nanocząstki, z tym, że ich główną zaletą jest szerokie widmo absorpcyjne, umożliwiające jednoczesne wzbudzenie wszystkich kropek kwantowych jednym źródłem światła niezależnie od długości fali.

Wykazano również, iż kropki kwantowe (QD) mogą być zaimplementowane w strukturach typu sandwich (wielowarstwowych) co skutkuje wzrostem czułości pomiaru SPR przy wykrywaniu i oznaczaniu biomolekuł w śladowych ilościach np. DNA (w zakresie femtomoli) lub specyficznego antygenu gruczołu krokowego PSA (ang. *prostate specific antigen*) w stężeniach pikomoli [94]. Zastosowanie kropek kwantowych

w oznaczeniach SPR jest nowatorskim rozwiązaniem. Jednakże najnowsze badania pokazują, iż implementacja QD w analizach SPR przynosi wymierne korzyści zwiększając intensywność odpowiedzi układu pomiarowego oraz czułość analizy. Jednym z najnowszych osiągnięć nanotechnologii jest zastosowanie kropki kwantowej przy oznaczeniu genu N wirusa SARS-CoV-2 [95]. Otóż skonstruowany aptasensor SPR zawierał zmodyfikowane tiolami kropki kwantowe węgliku niobu ($\text{Nb}_2\text{C-SH}$) jako platformy do zakotwiczenia aptameru. W obecności genu N wirusa unieruchomione nici aptameru zmieniły swoje położenie, aby specyficznie wiązać się z genem N. Nowa konfiguracja zwiększyła w ten sposób powierzchnię styku lub zwiększyła odległość między aptamerem a chipem SPR, powodując zwiększenie sygnału SPR. Kropki kwantowe w tym oznaczeniu uzyskano metodą solwotermalną z nanoarkuszy węgliku niobu Nb_2C , a następnie poddano funkcjonalizacji oktadekanotiolem. Chip SPR zastosowany do pomiarów został zmodyfikowany za pomocą kropek kwantowych $\text{Nb}_2\text{C-SH}$ poprzez kowalencyjne wiązanie złota i siarki Au-S, również przez oddziaływanie warstwy samoorganizującej (SAM). Zaaplikowane QD skutkowały nie tylko wysokim biopowinowactwem do aptameru, ale także wzmocniły odpowiedź SPR. Zaproponowane rozwiązanie obniżyło dolną granicę wykrywalności (LOD). Tak skonstruowany sensor wykazał również doskonałą selektywność w obecności innych wirusów układu oddechowego. Co więcej, aptasensor SPR którego konstrukcja oparta była na bazie kropek kwantowych $\text{Nb}_2\text{C-SH}$ wykazał szerokie praktyczne zastosowanie do jakościowej analizy genu N z różnych próbek, w tym wody morskiej, owoców morza i surowicy ludzkiej.

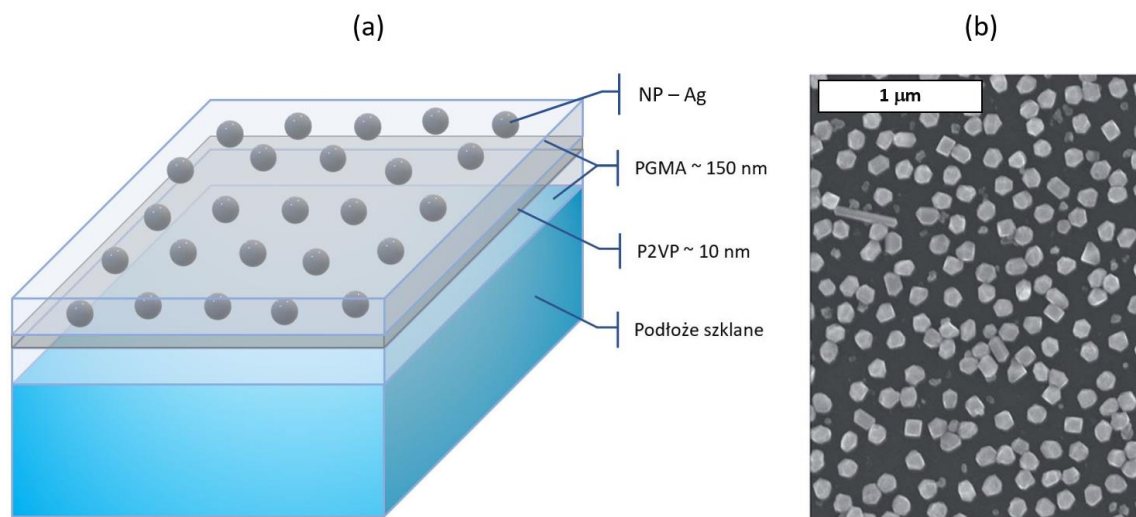


Rys. 34. Schemat obrazujący procedurę oznaczenia wirusa SARS-CoV-2 techniką SPR z zastosowaniem kropek kwantowych Nb_2C [96].

Poza typowymi nanocząsteczkami metali, stosowanymi w celu polepszenia parametrów analiz wykorzystujących technikę SPR (LSPR), coraz częściej opisywane są biosensory modyfikowane grafenem [36]. Wykazano jednoznacznie, iż powlekanie cienkich folii metalicznych srebrnych lub złotych warstwami grafenu może wpływać na zwiększenie siły sygnału SPR w porównaniu z tymi samymi sensorami metalicznymi (Au i Ag) nie posiadającymi warstwy grafenu. Różnica ta wynika głównie z transferu ładunku z grafenu na cienką warstwę metalu i przez to wzmocnienie wzbudzonego pola elektrycznego na powierzchni sensora a tym samym generowanego efektu SPR. Poza tym dodatkową zaletą zastosowania grafenu, mogą być silne niekowalencyjne wiązania π -stackingu powstające pomiędzy analizowanymi związkami zawierającymi pierścienie aromatyczne i warstwą grafenu. Ta specyficzna interakcja z pewnością tworzy nowe możliwości ultraczułego wykrywania peptydów, DNA i cząsteczek RNA.

Ogromną zaletą stosowania nanocząsteczek w budowie biosensorów SPR oprócz wzmocnienia siły sygnału SPR, a tym samym zwiększenia czułości metody jest oznaczanie związków o małej masie cząsteczkowej w porównaniu do dużych molekuł białek (masa rzędu kilku kDa) lub związków występujących w ilościach śladowych (zanieczyszczenia), których klasyczna technika SPR nie była by w stanie wykryć, głównie ze względu na małą intensywność generowanego rezonansu plazmonów [44]. Przykładami takich oznaczeń mogą być analizy zanieczyszczeń wody metalami ciężkimi, np. rtęcią Hg [97], analiza jednoniciowego DNA [98] lub mniejszych cząsteczek białek [99]. Ciekawy i zarazem nietypowy przykład ilustruje procedura oznaczania stężenia lotnych związków organicznych VOC (ang. *volatile organic compounds*), których masa cząsteczkowa daleko odbiega od związków analizowanych przy pomocy klasycznej techniki SPR [100]. Rozwiązanie zastosowane w prezentowanej analizie stanowią nanocząstki srebra osadzone w poliglicydylowym metakrylanie PGMA. Otóż kształty widm SPR zależne są od struktury nanocząstek osadzonych w podłożu PGMA, które jest wrażliwe na lotne związki organiczne. Podłoże pęczniąc, zwiększa odległości między sąsiadującymi cząstkami NP–Ag, co powoduje zmiany wartości współczynnika załamania światła, a także kształt widm SPR. Rozwiązanie to można potraktować jako szansę na opracowanie łatwego, powtarzalnego i taniego czujnika SPR do oznaczania VOC. Oznaczany rozpuszczalnik musi posiadać podobne powinowactwo do matrycy syntetycznej (musi być liofilowy). Rozpuszczalnik i syntetyczna matryca PGMA dobierane są tak, aby stworzyć określoną czułą parę. Materiał syntetyczny jest wrażliwy na rozpuszczalnik i pęcznieje odwracalnie w obecności rozpuszczalnika, zwiększając odstęp między cząstkami i zmieniając swoją strukturę.

Jednocześnie zmienia się współczynnik załamania światła w obrębie miejsca spęcznienia. Powoduje to, że efekt sprzężenia z lokalnymi plazmonami LSPR jest słabszy i zmienia siłę sygnału, a tym samym wpływa na zmiany spektralne. Opracowane w ten sposób nanokompozytowe czujniki czułe na VOC są tanim i powtarzalnym rozwiązaniem względem klasycznych sensorów opracowanych na bazie złota.



Rys. 35. Schemat przedstawiający sensor wykonany z nanokompozytowej folii polimerowej zawierającej nanocząstki srebra (a); Obraz SEM macierzy 2D nanocząstek srebra (b) NP – Ag – nanocząstki srebra, PGMA – poli(metakrylanu glicydyłu), P2VP–2–winylopirydyna [100].

3.3. Przegląd obecnie stosowanych urządzeń SPR

Obecny postęp technologiczny sprawił, iż urządzenia pomiarowe wykorzystujące technikę powierzchniowego rezonansu plazmonów, stosowane powszechnie w laboratoriach badawczych oraz diagnostycznych stanowią swoistego rodzaju wyzwanie dla popularnie stosowanych technik diagnostycznych, np. ELISA. Wspomniany rozwój technologii widoczny jest głównie w zastosowaniu nanomateriałów, odpowiedzialnych m.in. za zwiększenie czułości sensorów lub obniżenie limitu detekcji biocząstek, czasami nawet do poziomu rzędu femtomoli, co sprawia iż technika ta może być z powodzeniem wykorzystywana w kierunku diagnostyki wielu chorób oraz zastosowanie tworzyw sztucznych pozwalających na wdrożenie kanałów przepływowych o znacznie mniejszych średnicach niż standardowo stosowane szkło, a tym samym obniżenie ilości kosztownych odczynników.

Poniżej przedstawiono przegląd najczęściej stosowanych aparatów SPR w laboratoriach badawczych i diagnostycznych (tabela 5). Z zaprezentowanej analizy wynika, iż aparatura ta coraz częściej modyfikowana jest pod kątem automatyzacji procesu próbkowania (autosampler) oraz miniaturyzacji zmniejszającej rozmiary komponentów urządzeń umożliwiającich ich łatwe przenoszenie. Charakterystyka ta obejmuje aparaty takich producentów jak: Horiba, Cytiva, Sartorius, BioNavis, Bruker i FOx Biosystems. Poza ogólnym opisem urządzeń przedstawiono również dodatkowe parametry systemów pomiarowych obrazujące ich specyfikę działania.

Tabela 5. Charakterystyka aparatów SPR najczęściej wykorzystywanych w analizach laboratoryjnych.

Lp.	Producent	Nazwa urządzenia	Charakterystyka urządzenia	Rodzaj chipa	Technika stacjonarna / przepływowa	Literatura
1	Horiba	OpenPlex	<p>OpenPlex to urządzenie, w którym zastosowano technikę SPR w wersji obrazowej. Dzięki otwartej konstrukcji, aparat może być wszechstronnie wykorzystywany do różnego typu doświadczeń biochemicznych, fizykochemicznych oraz badania kinetyki reakcji w czasie rzeczywistym. Stosowany jest głównie w instytutach badawczych, laboratoriach akademickich. Oznaczanie analitów odbywa się przy zastosowaniu zamkniętego systemu przepływowego, w którym chip zamknięto w komórce pomiarowej. Pozostałe parametry OpenPlex:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ ilość punktów pomiarowych w pojedynczym pomiarze: 400 punktów. ▪ termostatowanie próbek: 15 - 40°C, ▪ objętość próbki: 200 µL, ▪ stężenie próbki: 300 ng/mL - 10 µg/mL, ▪ masa cząsteczkowa próbki: > 240 Da, ▪ limit detekcji: 5 pg/mm². 	Złoty chip szklany (warstwa złota 50nm)	Przepływowa	[13, 16]
2	Cytiva	Biacore 3000 Biacore 4000 Biacore X100	<p>Biacore X100 to nowa wersja najczęściej stosowanego aparatu Biacore 3000 lub Biacore 4000. W pełni zautomatyzowany system przepływowy pozwala mierzyć kinetykę reakcji w czasie rzeczywistym (kinetyka wielocyklowa lub jednocyklowa). Urządzenie to oferuje szeroki wachlarz zastosowań, od badań małych molekuł, przez ustalanie procedur oznaczeń po analizę wielkocząsteczkowych związków biologicznych (identyfikacja</p>	Złoty chip szklany. Producent oferuje chipy z odpowiednią warstwą linkera (SAM, karoboksydekstran, etc).	Przepływowa	[7 – 9]

Lp.	Producent	Nazwa urządzenia	Charakterystyka urządzenia	Rodzaj chipa	Technika stacjonarna / przepływowa	Literatura
			<p>biomarkerów). Zaletą tego urządzenia jest łatwa i szybka analiza stężeń bez konieczności stosowania standardu białek. Dodatkowym atutem jest pełna automatyzacja pozwalająca na bezobsługową analizę wielu próbek jednocześnie.</p> <p>Pozostałe parametry Biacore X100:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ zakres stężeń 10 pM do 2 mM, ▪ termostatowanie próbek 4°C do 40°C, ▪ pojemność autosamplera: max. 15 próbek, ▪ szybkość przepływu 1 do 100 µl/min, ▪ objętość wtrysku 5 do 90 µl, ▪ limit masy cząsteczkowej M>100 Da, ▪ liczba komór przepływowych: 2, ▪ objętość próbki min. 32µl, ▪ czas pracy bez nadzoru 24 h. 			
3	Sartorius	Pioneer / Pioneer FE	<p>Urządzenie SPR wykorzystujące technikę przepływową. Umożliwia badanie kinetyki reakcji w czasie rzeczywistym w dwóch modułach: OneStep (wstrzyknięcie jednego stężenia analitu bez konieczności wielokrotnego rozcieńczenia i popelnienia błędów) NextStep (uproszczona procedura scharakteryzowania substancji konkurujących wiążących względem w celu ustalenia mechanizmu działania). Systemy Pioneer FE zapewniają czułość niezbędną do charakteryzowania szerokiego zakresu interakcji biomolekularnych, od fragmentów małych cząsteczek po substancje biologiczne. Trójkanałowy w pełni zautomatyzowany system przepływu pozwala na jednoczesne oznaczanie dwóch analitów względem tego samego</p>	Złoty chip szklany. Producent oferuje pakiet chipów powleczonych wstępnie linkerem.	Przepływowa	[12, 14]

Lp.	Producent	Nazwa urządzenia	Charakterystyka urządzenia	Rodzaj chipa	Technika stacjonarna / przepływowa	Literatura
			<p>kanału odniesienia. Dodatkowym atutem jest maksymalny czas pracy (w trybie bezobsługowym) wynoszący do 72 godzin. Pozostałe parametry:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Zakres współczynników załamania: 1,33–1,40, ▪ Dolna granica masy cząsteczkowej oznaczanych substancji: 70Da, ▪ Najmniejsza objętość próbki: 2µL, ▪ Możliwość termostatowania próbek, ▪ Odgazowywanie buforu w linii. 			
4	BioNavis	MP-SPR Navi 200 (200L, 200A, 210)	<p>MP-SPR Navi 200 to seria modułowych urządzeń półautomatycznych wykorzystywanych głównie w celach dydaktycznych i edukacyjnych. Otwarta konstrukcja aparatu pozwala na dołączenie instrumentów peryferyjnych zwiększając możliwości techniki pomiarowej. Aparat stosowany jest przede wszystkim do pomiaru kinetyki reakcji w czasie rzeczywistym, natomiast sam pomiar wykonywany jest w zamkniętym układzie przepływowym (4 pomiary w dwóch kanałach). Szeroki zakres kątowy wynoszący 40° - 78° umożliwia pomiar cząsteczek organicznych o małej masie cząsteczkowej oraz dużych białek. Dodatkową zaletą aparatu jest zastosowany elastomer, dzięki któremu wymiana sensora jest wyjątkowo łatwa i szybka.</p> <p>Pozostałe parametry MP-SPR Navi 200:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ kontrolowane warunki przepływu cieczy za pomocą pompy perystaltycznej, ▪ dwa kanały przepływu analitu, wstrzykiwanego za pomocą autosamplera (na mikropłytki 96 lub 384 próbki), 	Złoty chip szklany	Przepływowa	[10, 11, 15]

Lp.	Producent	Nazwa urządzenia	Charakterystyka urządzenia	Rodzaj chipa	Technika stacjonarna / przepływowa	Literatura
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ możliwość analizy gazów i rozpuszczalników organicznych, ▪ minimalna ilość próbki 50uL. 			
5	Bruker	Sierra SPR 32 Pro	<p>Sierra SPR 32 Pro to nowej generacji aparat w pełni zautomatyzowany pozwalający na przeanalizowanie ponad 4400 próbek dziennie (analiza label free w czasie rzeczywistym). Stosowany jest do analizowania próbek pochodzenia biologicznego (białka, przeciwciała) oraz fragmentów małych cząsteczek. Kontrolowany przepływ próbek w kanale zmniejsza o połowę liczbę wymaganych cykli testowych i poprawia jakość danych, eliminując potencjalne różnice między preparatami wielu próbek. Hydrodynamiczna izolacja mikroprzepływowa pozwala na szybkie przejścia między roztworami i uzyskanie właściwej kinetyki w różnych matrycach próbek. Połączenie dużej intensywności lasera z możliwością szybkiego skanowania pozwala na uzyskanie dużej czułości analizy.</p> <p>Pozostałe parametry Sierra SPR 32 Pro:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 32 pojedyncze punkty próbkowania złożone z 8 komór przepływowych z 4 punktami do analizy (31 próbek analitu + 1 próbka kontrolna), ▪ 8 próbek przy 1 wstrzyknięciu, ▪ autosampler na mikropłytki (96 lub 384 próbek), ▪ jednoczesna analiza w 8 różnych buforach, przy różnym stężeniu pH, soli, detergentu lub rozpuszczalnika, ▪ szybkość przepływu 5 – 100 µL/min, ▪ objętości wtrysku 2-200 µL, ▪ termostatowanie próbek w temp. 4° – 30°C, 	Złoty chip szklany. Producent oferuje pakiet chipów powleczonych wstępnie linkerem.	Przepływowa	[17, 18]

Lp.	Producent	Nazwa urządzenia	Charakterystyka urządzenia	Rodzaj chipa	Technika stacjonarna / przepływowa	Literatura
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ zakres współczynnika załamania 1,33 – 1,40, ▪ stężenie próbki ≥ 10 pM. 			
6	FOx Biosystems	White Fox1	<p>Urządzenie oparte na światłowodowym SPR, posiada zanurzeniowy sensor przepływowy. W pełni zautomatyzowane, z możliwością przełączania chipów pomiędzy badaniami (4 jednocześnie) co zwiększa elastyczność i czas analizy. Nie ma konieczności stosowania dodatkowych odczynników w celu przygotowania próbek. Nie wymaga czyszczenia.</p> <p>Pozostałe parametry White Fox1:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Zakres stężeń: μM – nM (label-free) i pM – fM (przy użyciu sensora pokrytego nanocząstkami złota), ▪ Termostatowanie próbki w zakresie do 40°C. 	Zanurzeniowy chip złoty w postaci płytki lub probówki	Przepływowa	[19, 20]

3.4. Przykłady zastosowań techniki SPR w diagnostyce do oznaczeń substancji biologicznie czynnych

Omówione w poprzednim rozdziale przykłady aparatów SPR obrazują jak szerokie spektrum możliwości diagnostycznych prezentuje technika powierzchniowego rezonansu plazmonów. Odpowiednio dobrany sprzęt jak i poprawnie skonstruowany biosensor są w stanie wykryć śladowe ilości substancji biologicznych (biomarkerów). Oznacza to, że ta procedura oznaczenia może być z powodzeniem stosowana w identyfikacji oraz analizie ilościowej markerów wielu chorób, m.in. chorób układu krążenia, chorób nowotworowych, chorób neurodegeneracyjnych jak i chorób zakaźnych, głównie ze względu na wysoką czułość techniki, jak i niski limit detekcji, co pozwala na wczesną diagnostykę ww. chorób lub nadzorowanie tempa progresji i odpowiedniego reagowania na leczenie.

Poniżej zaprezentowano przykłady oznaczeń biomarkerów charakterystycznych dla ww. chorób z dokładnym opisem konstrukcji biosensora, obejmującym strukturę warstw chipa, rodzaj zastosowanego linkera, ligand (receptor) specyficzny dla badanego markera oraz sposób jego immobilizacji. Charakterystykę oznaczeń wykonano na podstawie analizy dostępnych pozycji literaturowych następujących chorób:

- **choroby układu krążenia** – grupa chorób, do której zalicza się m.in. zawał oraz zapalenie mięśnia sercowego, miażdżycę, nadciśnienie tętnicze, etc. Z analizy dostępnej literatury (tabela 6) wynika, iż najczęściej oznaczanymi markerami są te charakteryzujące ostry zawał serca. W przedstawionej charakterystyce opisano oznaczenia następujących markerów: troponinę I (TnI), troponinę T (TnT), mioglobinę, kinazę kreatynową (CK-MB) i peptyd natriuretyczny typu B (BNP).
- **choroby nowotworowe** – zbiór chorób szeroko i bardzo często opisywanych w literaturze. Oznaczenie biomarkerów tych chorób za pomocą techniki SPR stanowi istotny krok w kierunku bardzo wczesnej diagnostyki, co w przypadku nowotworów stanowi podstawę do postawienia celnej diagnozy oraz rozpoczęcie leczenia we wczesnych stadiach choroby. Na podstawie zebranej literatury (tabela 7) przedstawiono przykłady najczęściej opisywanych oznaczeń następujących schorzeń: raka okrężnicy, raka prostaty, raka jajnika, raka płuc, niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC), raka pęcherza oraz raka piersi.
- **choroby neurodegeneracyjne** – schorzenia neurodegeneracyjne zaliczane są do coraz częściej diagnozowanych chorób cywilizacyjnych. Światowe statystyki

wykazują, iż na przestrzeni ostatnich 20 lat widoczna jest szybka tendencja wzrostowa umieralności spowodowanej chorobami takimi jak: choroba Alzheimera, Parkinsona czy stwardnienia rozsianego (SM). Obecny problem pacjentów zapadających na ww. jednostki chorobowe, jest brak możliwości całkowitego wyleczenia. Technika diagnostyki SPR pozwala nie tylko na wczesne rozpoznanie schorzenia, ale również wspiera proces leczenia jak i badania potencjalnych leków hamujących objawy tych chorób. Zestawienie opisanych biomarkerów i sensorów przedstawiono w tabeli 8.

- **choroby zakaźne** – ostatnia grupa schorzeń zawiera wiele jednostek chorobowych, z których wybrano pozycje najczęściej opisane w literaturze (tabela 9). Ostatnie lata pandemii wywołanej **koronawirusem ciężkiego ostrego zespołu oddechowego SARS-CoV-2** pokazały, iż pomimo dynamicznego postępu technologicznego jesteśmy wciąż bezbronni wobec świata wirusów i bakterii. Ilość pozycji literaturowych poświęconych diagnostyce tej jednostki chorobowej przy pomocy techniki SPR zaskakuje swoją ilością i zarazem podkreśla jej ważność w diagnostyce innych chorób takich jak: zatrucie pokarmowe, ptasia grypa, salmonelloza, HIV, zapalenie wątroby typu B, malaria i cholera.

Tabela 6. Zestawienie najczęściej oznaczanych biomarkerów w chorobach serca wraz z opisem procedury immobilizacji.

Nazwa markera	Nazwa choroby	Chip	Linker	Ligand (receptor)	Rodzaj immobilizacji	Literatura
troponina T (TnT)	ostry zawał mięśnia sercowego	Szkło/Au (NP)	kwasy 11-merkaptoundekanowy (MUDA)	przeciwciała antytroponina T	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[101]
troponina T (TnT)	ostry zawał mięśnia sercowego	szkło/Au	karboksydekstran	przeciwciała antytroponina T związane parą biotyna-streptawidyna	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[102]
troponina I (TnI)	ostry zawał mięśnia sercowego	Szkło/Au (NP)	polidopamina (PDA)	przeciwciała antytroponina I	fizyczna adsorpcja	[103]
troponina I (TnI)	ostry zawał mięśnia sercowego	przewód/Au	kwasy 11-merkaptoundekanowy (MUDA)	przeciwciała antytroponina I	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[104]
kinaza keratynowa (CK-MB)	ostry zawał mięśnia sercowego	szkło/Au	kwasy 11-merkaptoundekanowy (MUDA)	tetrahydrofosforan sodowy kreatyny na matrycy nanocząstek złota, stabilizowanych cysteaminą	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[76]
mioglobina	ostry zawał mięśnia sercowego	szkło/Au	kwasy 16-merkaptoheksadodekanowy	przeciwciała antymioglobina	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[104]
mioglobina	ostry zawał mięśnia sercowego	przewód/Au	kwasy 11-merkaptoundekanowy (MUDA)	przeciwciała antymioglobina	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[104]
peptyd natriuretyczny typu B (BNP)	ostry zawał mięśnia sercowego	przewód/Au	cysteamina	przeciwciała anti-BNP	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[105]

Tabela 7. Zestawienie najczęściej oznaczanych biomarkerów w chorobach nowotworowych wraz z opisem procedury immobilizacji.

Nazwa markera	Nazwa Choroby	Chip	Linker	Ligand (receptor)	Rodzaj immobilizacji	Literatura
antygen rakowo-płodowy (CEA)	rak okrężnicy	szkło/Au	cysteamina	przeciwciało CEA	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[68]
swoisty antygen sterczowy (PSA)	rak prostaty	szkło/Au	kwas 3-merkaptopropionowy	przeciwciało PSA	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[106]
antygen rakowy 125 (CA125)	rak jajnika	szkło/Au	cysteamina	przeciwciało CA125	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[107]
cytokeratyna 17 (CK 17)	rak płuc	włókno optyczne/Au	ditioloalkanoaromatyczny PEG6-COOH	przeciwciało CK17	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[108]
cytokeratyna 19 (CK 19)	niedrobnokomórkowy rak płuc (NSCLC)	szkło/Au	cysteamina + powłoka funkcjonalizowanego tlenku grafenu	przeciwciało CK19	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[109]
CYFRA 21-1	niedrobnokomórkowy rak płuc (NSCLC)	pryzmat/Au	heksanoditiol	przeciwciało	2,20 -ditiobis [1-(2-bromo-2-metylopropionyloksy)] etan (DTBE)	[110]
laminina-5	rak pęcherza	szkło/Au	cysteamina	przeciwciało lamininy-5	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[58]
kolagen IV	rak piersi	szkło/Au	cysteamina	przeciwciało kolagenu IV	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[111]
receptor kinazy tyrozynowej 2 (HER 2)	rak piersi	szkło/Au/polimer	cysteamina	2 przeciwciała	Biotyna/Streptawidyna	[75]

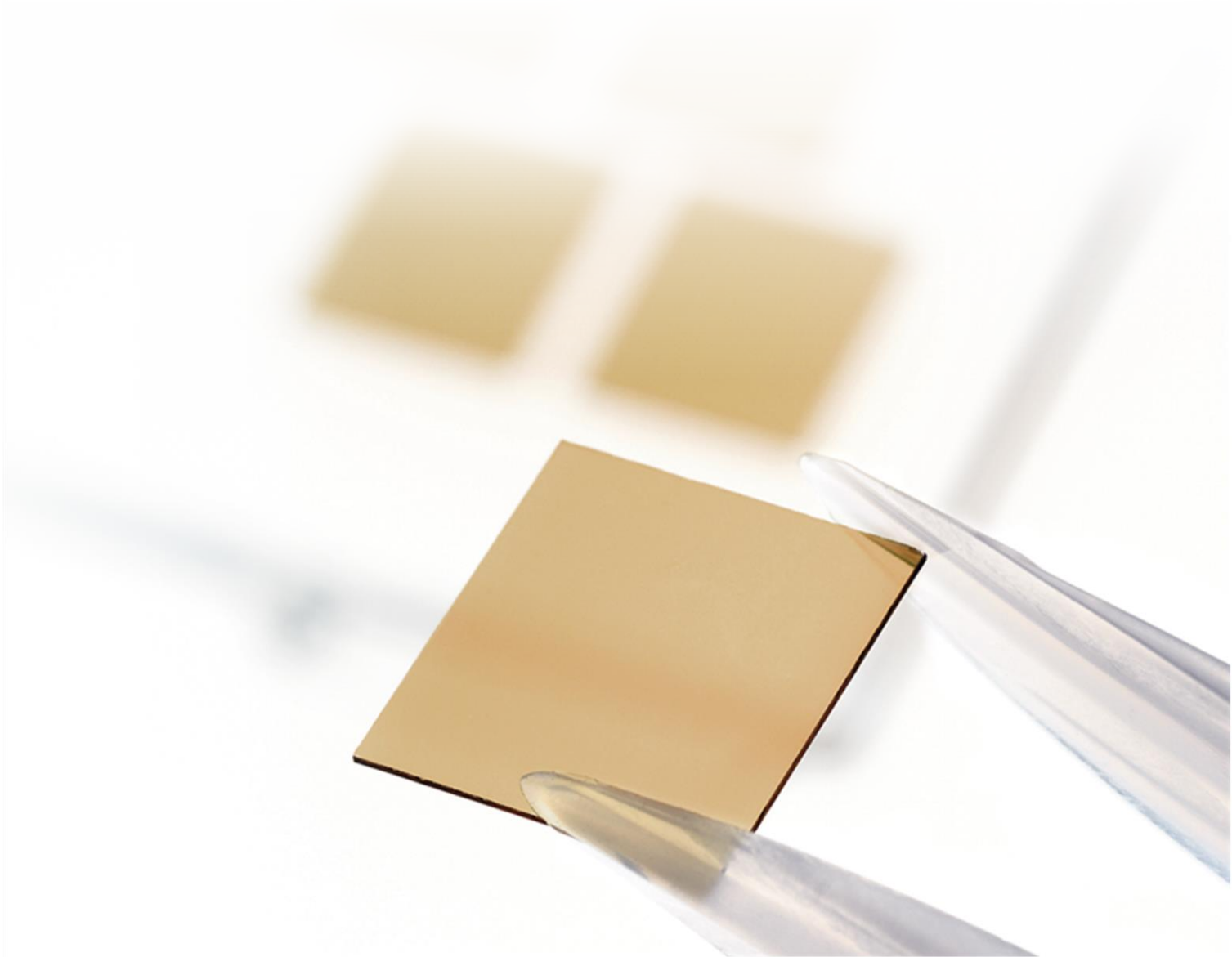
Tabela 8. Zestawienie najczęściej oznaczanych biomarkerów w chorobach neurodegeneracyjnych wraz z opisem procedury immobilizacji.

Nazwa markera	Nazwa Choroby	Chip	Linker	Ligand (receptor)	Rodzaj immobilizacji	Literatura
beta-amyloid	choroba Alzheimerera	szkło/Ag/ZnS-SiO ₂ /Au	SAM	przeciwciało	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[112]
białko tau	choroba Alzheimerera	szkło/Cr/Ag/SiO ₂ (nanocząsteczki)	N, N -dimetyloaminododekan	przeciwciało	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[113]
białko tau	choroba Alzheimerera	szkło/Au	Kwas 11-merkaptoundekanolowy (MUA) 11-merkaptoundekanol (MUD)	aptamer	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[114]
17 beta-hydroksysteryd dehydrogenaza sterydowa 10 17β-HSD10	choroba Alzheimerera	szkło/Au	11-merkapt-1-etylenoglikoloundekanol kwas 16-merkapt-tri (glikol etylenowy)heksadekanowy	Aβ40	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[115]
Nitrotyrozyna (3-NT)	choroba Alzheimerera	szkło/Au	Kwas 11-merkaptoundekanolowy (MUA) 11-merkaptoundekanol (MUD)	przeciwciało	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[116]
α-synukleina	choroba Parkinsona	szkło/Au	karboksydekstran	przeciwciało	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[117]
dopamina	choroba Parkinsona	szkło/Au/(AuNPs)	polidopamina	cDNA	wiązanie kowalencyjne regulowane etyloaminą	[118]
Przeciwciało Ab-CSF114(Glc)	Stwardnienie rozsiane (MS)	szkło/Au	karboksydekstran	Antygen	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[2]

Tabela 9. Zestawienie najczęściej oznaczanych biomarkerów w chorobach zakaźnych wraz z opisem procedury immobilizacji.

Nazwa markera	Nazwa Choroby	Chip	Linker	Ligand (receptor)	Rodzaj immobilizacji	Literatura
SARS-CoV-2	COVID-19	szkło/Au/QD	N-oktadekanomerkaptan	SARS-CoV-2-N58 aptamer	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[96]
Przeciwciało SARS-CoV-2	COVID-19	szkło/Au	3-mercaptopropionic-Leu-His-Asp-Leu-His-Asp-COOH	SARS-CoV-2 rekombinowane białko nukleokapsydu (rN)	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[119]
enterotoksyna gronkowcowa A (SEA)	zatrucie pokarmowe	Au (nanocząstki)	2-iminotiolan (odczynnik Trauta)	przeciwciało	Immobilizacja bezpośrednio na nanocząstkach (wiązanie kowalencyjne)	[120]
Wirus H7N9	ptasia grypa	Szkło/Ag/Au	kwas 11-merkaptoundekanowy (MUA) + 6-merkaptol-heksanol (MCH)	przeciwciało	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[121]
Salmonella	salmonelloza	szkło/Au	kwas 11-merkaptoundekanowy (MUA)	przeciwciało	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[122]
HIV-1 antygen	HIV	szkło/ITO/Au NP	2-merkaptocytyloamina	przeciwciało	Wiązanie kowalencyjne (defragmentacja receptora)	[123]
HbsAb przeciwciało wirusa zapalenia wątroby typu B	Zapalenie wątroby typu B	Szkło/Au	Poli (HPMA-co-CBMAA)	antygen	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[124]
hem	malaria	szkło/Au	β -merkaptocytyloamina	hemoglobina (Hb) + kwas poliakrylowy (PAA)	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[125]
toksyna B	cholera	szkło/Au	kwas 3-merkaptopropanowy (MPA)	Przeciwciało	EDC/NHS wiązanie kowalencyjne	[126]

4. Badania własne



4.1. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie możliwości wprowadzenia do techniki SPRi nowych rozwiązań materiałowych i architektury chipa. W zakresie rozwiązań materiałowych było to skonstruowanie nowego chipa srebrno–złotego jako podstawy biosensora stosowanego do ilościowego oznaczenia wybranych biomarkerów nowotworowych, charakteryzującego się lepszymi właściwościami plazmonicznymi (silniejszy efekt SPR). Równie istotną motywacją prac nad srebrno-złotym chipem był potencjalnie niższy koszt jego produkcji w odniesieniu do obecnie stosowanego, komercyjnego chipa złotego. W zakresie poszukiwań nowych rozwiązań architektury chipa zaproponowano trzy różne rozkłady warstw na powierzchni biosensora: chip z dwuwarstwową maską polimerową obejmującą maskę blokującą oraz maskę rozdzielającą, chip z jednowarstwową maską polimerową zawierającą rozdzielającą hydrofobową maskę rozdzielającą oraz chip z maską foliową rozdzielającą.

Nowe podejście w zakresie rozwiązań materiałowych i architektury chipa sprawdzono na przykładzie trzech biosensorów do oznaczania katepsyn B, D i S. Jako układy odniesienia zastosowano analogiczne biosensory uformowane na klasycznym złotym komercyjnym chipie.

Badano wpływ struktury nowego chipa (układu poszczególnych warstw metalicznych) oraz jego architektury (rozkładu pól pomiarowych) na wybrane parametry analityczne oznaczania biomarkerów, przez porównanie krzywych kalibracyjnych poszczególnych układów analitycznych, a także wyznaczenie pozostałych parametrów analitycznych: zakresu liniowego krzywych, czułości, precyzji, dokładności, zakresu odpowiedzi liniowej, limitów detekcji i oznaczalności. Jako odnośnik referencyjny badań nowo skonstruowanego chipa zastosowano znane i opisywane w literaturze układy analityczne oznaczania katepsyn B, D i S na chipie złotym.

Celem sprawdzenia poprawności oznaczeń analitycznych wykonanych przy pomocy biosensorów, których konstrukcja oparta była o nowo zdefiniowany chip srebrno – złoty Ag/Au, dokonano walidacji technik poprzez oznaczenie katepsyn B, D i S w próbkach biologicznych pobranych od pacjentów chorych na: endometriozę (katepsyna B), glejaka (katepsyna D) i raka jajnika (katepsyna S).

4.2. Spis odczynników i materiałów zastosowanych w pracy

Spis odczynników oraz materiałów wykorzystywanych w badaniach przedstawiono w tabelach: tabela 10 (odczynniki) oraz tabela 11 (pozostałe materiały).

Tabela 10. Spis odczynników zastosowanych w badaniach

Nazwa odczynnika	Masa cząsteczkowa [Da]	Czystość	Producent
aceton	58	99,5%	POCh Gliwice, Polska
alkohol izopropylowy	60	>99%	POCh Gliwice, Polska
argon	40	99,99%	Air Liquide, Puławy, Polska
białko katepsyny B	38 000	> 95%	SIGMA, Steinheim, Niemcy
białko katepsyny D	45 000	> 95%	SIGMA, Steinheim, Niemcy
białko katepsyny S	23 700	>95%	R&D Systems, Minneapolis, USA
bufor octowy pH = 3,50	– (mieszanina)	–	POCh Gliwice, Polska
bufor węglanowy pH = 8,50	– (mieszanina)	–	BIOMED, Lublin, Poland
buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS)	– (mieszanina)	–	POCh Gliwice, Polska
chlorowodorek cysteaminy (2-aminoetanotiol)	77	≥ 98%	SIGMA, Steinheim, Niemcy
chlorowodorek 1-etylo-3- (3-dimetyloaminopropyl) karbodimid (EDC)	155	≥ 98%	SIGMA, Steinheim, Niemcy
cystatyna C z białka kurzego	13 350	> 95%	SIGMA, Steinheim, Niemcy
etanol bezwodny cz.	46	99,8%	POCh Gliwice, Polska
1-hydroksy-2,5- pirydynodion (NHS)	115	≥ 98%	Merck KGaA, Monachium, Niemcy
pepstatyna A	686	> 95%	SIGMA, Steinheim, Niemcy
szczurze przeciwciało monoklonalne specyficzne dla katepsyny S	37 000	> 95%	R&D Systems, Minneapolis, USA

Nazwa odczynnika	Masa cząsteczkowa [Da]	Czystość	Producent
tlenek ceru (IV)	172	99,99%	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Niemcy
węglan sodu	105	100%	POCh Gliwice, Polska

Tabela 11. Spis pozostałych materiałów zastosowanych w badaniach

Nazwa materiału	Producent
farba sitodrukowa ELPEMER SD 2054	Lackwerke Peters GmbH & Co. KG, Kempen, Niemcy
farba sitodrukowa ELPEMER SD 2457	Lackwerke Peters GmbH & Co. KG, Kempen, Niemcy
szkło	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
folia polipropylenowa samoprzylepna PP Clear TC30 RP37 HD70	UPM Raflatac
metaliczne złoto (granulat, 99,99%)	Mennica Polska
metaliczne srebro (granulat, 99,99%)	Mennica Polska
metaliczny chrom (granulat, 99,99%)	POCh Gliwice, Polska
płytki szklane napyłone złotem nr 1-07-04-000	Ssens B.V.

Material biologiczny

Próbki materiałów biologicznych wykorzystanych do oznaczeń wyżej wymienionych biomarkerów (katepsyny B, D, S) zostały pobrane od dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku oraz od pacjentów chorych na endometriozę, rak jajnika oraz glejaka z Białostockiego Centrum Onkologii im. Marii Curie-Skłodowskiej oraz Biobanku Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Próbki do badań przekazano za zgodą Komisji Bioetycznej.

4.3. Charakterystyka zastosowanego układu badawczego

Do badań zastosowano układ badawczy obejmujący następujące składowe:

- Komora próżniowa NA501 stosowana do napyłania warstw metalicznych na podłoże szklane,
- Drukarka sitodrukowa F-C200ZD wykorzystywana do nadruku warstw polimerowych masek rozdzielających na metalizowanym podłożu szklanym,
- Ręczny aplikator służący do naklejania foliowych masek rozdzielających na metalizowane podłoże szklane,
- Aparatura pomiarowa SPRi służąca do wykonywania pomiarów reflektancji.

4.4. Opis chipów wykorzystanych do pomiarów

Badania charakterystyki biosensorów oraz oznaczeń biomarkerów przeprowadzono przy zastosowaniu następujących chipów:

- chip złoty (zwany dalej jako „chip Au”),
- chip srebrno – złoty (zwany dalej jako „chip Ag/Au”).

Powierzchnia chipów została dodatkowo zmodyfikowana, w celu zbudowania stosownych biosensorów, poprzez nałożenie odpowiednich masek rozdzielających:

- dwuwarstwowej maski polimerowej,
- jednowarstwowej maski polimerowej,
- maski foliowej.

W dalszej części pracy scharakteryzowano oba podłoża bazowe, jak i rodzaje masek rozdzielających.

4.4.1. Chip złoty Au

Chip złoty (chip Au) wykonany został z gotowego materiału, tj. metalizowanej płytki szklanej o numerze katalogowym 1-07-04-000, zakupionej w firmie Ssens B.V. Dokładną strukturę materiału zobrazowano na rysunku 36a. Według informacji uzyskanych od producenta, wynika, że podstawę płytki stanowi szkło D263 (BK7) o grubości 1 mm, na które napyłono odpowiednio warstwy metaliczne – 3 nm tytanu (stanowiące warstwę adhezyjną) oraz 47 nm złota (właściwa warstwa metaliczna). Podłoże

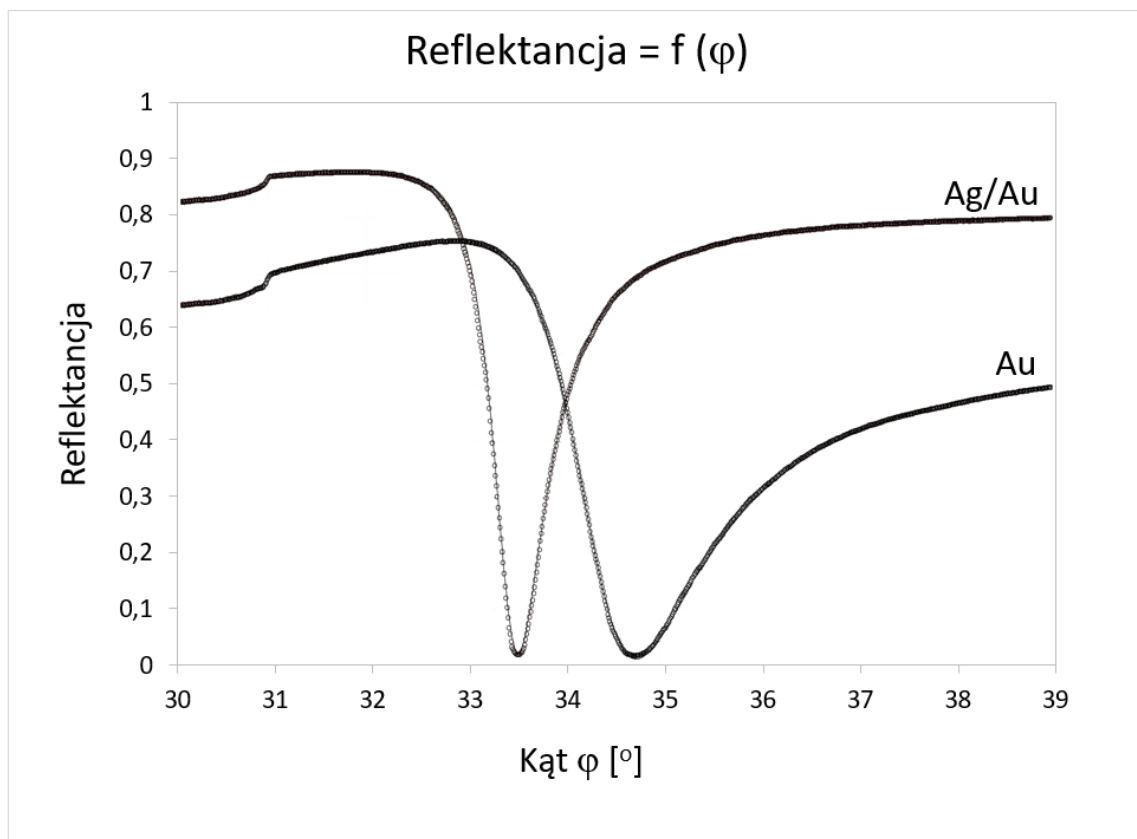
to przycięte jest dokładnie na wymiar 16mm (szerokość) x 16mm (długość). Materiał ten stanowi punkt odniesienia dla nowej konstrukcji chipa srebrno – złotego Ag/Au.



Rys. 36. Schemat struktury chipów: (a) chip Au, (b) chip Ag/Au. Opracowanie własne.

4.4.2. Chip srebrno – złoty Ag/Au

Chip srebrno – złoty (chip Ag/Au) to nowy materiał, który stworzono na podstawie matematycznej symulacji krzywych SPR struktury przedstawionej na rysunku 36 b. W tym celu wyznaczono teoretyczne wartości parametrów opisujących metaliczne warstwy optyczne, na podstawie dopasowania modelowych krzywych rezonansowych (wykonanych przy użyciu oprogramowania Winspall) do wyników wyznaczonych doświadczalnie układem pomiarowym. W tym celu zastosowano układ pomiarowy złożony z obrotowego stolika, na którym znajdował się pryzmat a na nim umieszczona płytką szklaną z napyłonymi warstwami metali: srebra i złota. Układ ten zbudowano w oparciu o konfigurację Kretschmanna, z możliwością obrotu próbki o $0,01^\circ$. Wzbudzenie plazmonów powierzchniowych uzyskano kierując na granicę faz pryzmat/płytkę wiązkę światła p spolaryzowanego, równoległego o mocy 5 mW, którego źródłem była dioda laserowa (długość fali $\lambda = 650$ nm). Pomiary wykonywano poprzez mierzenie zmienności natężenia odbitego światła w funkcji kąta padania φ (rys. 37). Pomiary wykonano zarówno dla nowej konstrukcji płytki jak i chipa złotego Au.



Rys. 37. Wykres przedstawiający porównanie efektu SPR chipów Au oraz Ag/Au [62].

Z wykreślonych powyżej krzywych SPR obu struktur metalicznych (Au i Ag/Au) wynika, iż lepszymi parametrami refraktometrycznymi charakteryzuje się nowa struktura metaliczna Ag/Au. Chip ten posiada przede wszystkim większą czułość (większa zmiana wartości reflektancji przy zmianie kąta padania) oraz mniejszą szerokość krzywej w połowie wysokości maksimum FWHM. Dodatkową zaletą konstrukcji jest jej koszt wykonania. 90% grubości warstwy metalicznej stanowi srebro, które jest metalem tańszym od złota. Jednakże, jak już wcześniej wspomniano (rozdz.3.2.2.3.) warstwa srebra podatna jest na utlenianie w kontakcie z roztworami wodnymi oraz tlenem z powietrza, dlatego też zaproponowano dodatkowo cienką warstwę złota, która będzie stanowiła barierę ochronną zapobiegającą oksydacji srebra. Dodatkowo jako podkład poprawiający przyczepność srebra do szkła zastosowano warstwę chromu o grubości 1nm.

4.5. Procedura wykonania chipa

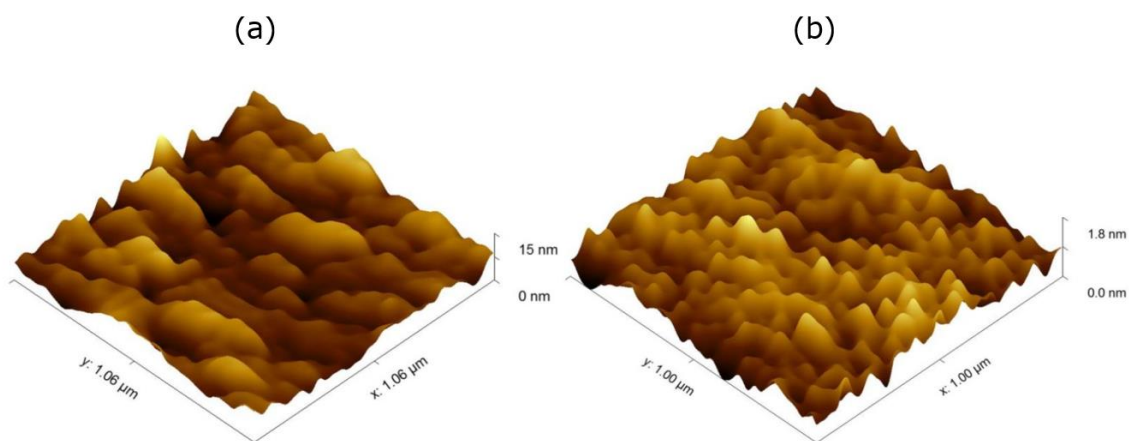
Procedura przygotowania chipów do badań w niniejszej pracy obejmowała następujące etapy:

- próżniowe napylenie chromu, srebra i złota (PVD) na płytki szklane,
- zadrukowanie masek polimerowych na metalizowanych płytkach szklanych lub naklejenie maski foliowej na metalizowane płytki szklane.

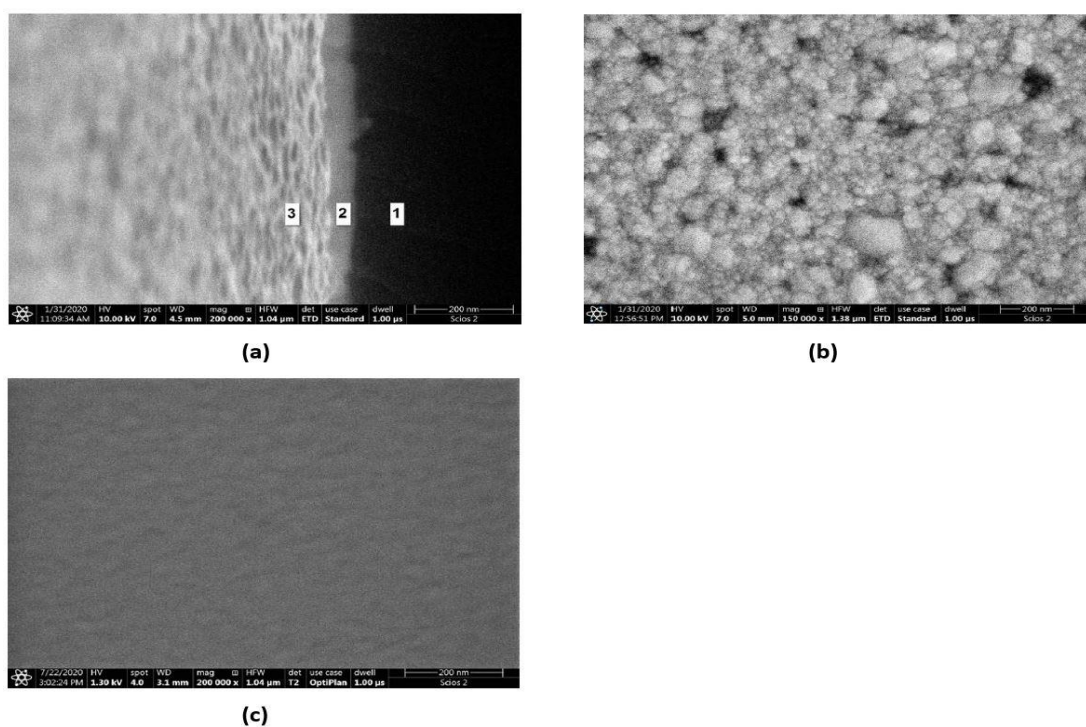
4.5.1. Technika próżniowego napylenia metalami srebra i złota (PVD)

Chipy srebrno–złote wykonano za pomocą próżniowego napylenia metali: chromu, srebra oraz złota. W tym celu wycięto ze szkiełek mikroskopowych podłoża szklane o wymiarach 20 mm × 20 mm × 1 mm. Następnie wypolerowano je przy użyciu wodnej zawiesiny tlenku ceru oraz oczyszczono przy użyciu środków myjących tj. detergentu, acetonu i alkoholu izopropylowego. Po każdym użyciu środka czyszczącego szkiełka były płukane i myte ultradźwiękowo w wodzie dejonizowanej. Cienkie warstwy metaliczne naniesiono na powierzchnię szkła metodą naporowywania próżniowego w układzie próżniowym NA501 w próżni wysokiej (HV) o ciśnieniu $8 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$ hPa. Pierwszą warstwą, która została bezpośrednio naniesiona na szkło była powłoka chromu (grubość 1 nm), którą osadzono z szybkością około 0,1nm/s. Następnymi warstwami były cienki film srebra o grubości 43 nm napyłany z prędkością 0,08 nm/s oraz złoto o grubości 4 nm osadzane z prędkością 0,01 nm/s. Grubość warstwy i szybkość osadzania monitorowano za pomocą mikrowagi kwarcowej.

Topografię powierzchni warstw osadzonych na szklanym podłożu mierzono za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) przy użyciu systemu Nanosurf Nanite B w trybie kontaktowym (rys. 38). Fotografie powierzchni i powierzchni przekroju poprzecznego warstw metalicznych wykonano za pomocą systemu FIB-SEM Scios 2 DualBeam (rys. 39).



Rys. 38. Obrazy topografii powierzchni AFM warstw metalicznych napylnych na podłożu szklanym: (a) warstwa bimetaliczna Ag/Au; (b) pojedyncza warstwa metaliczna Au [62].



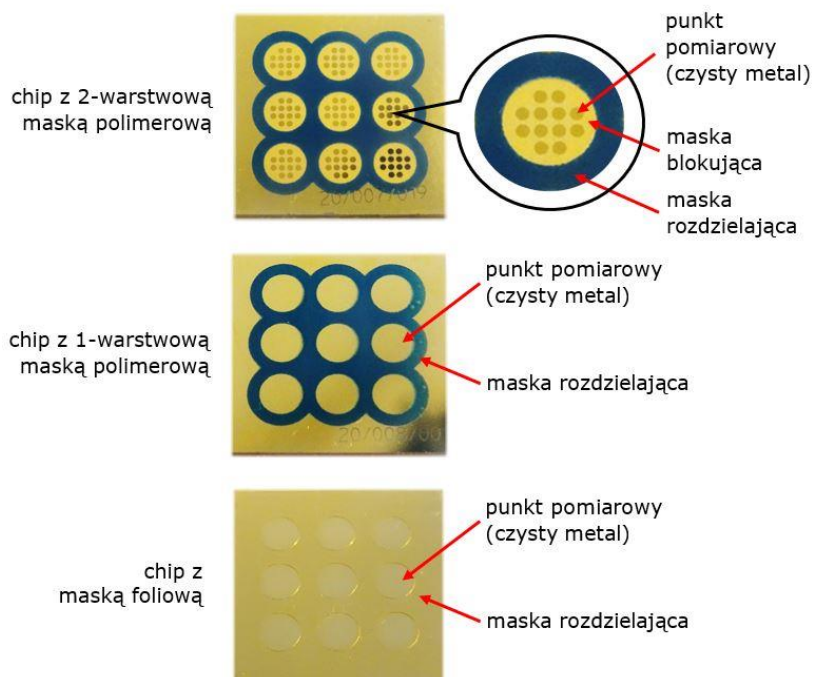
Rys. 39 . Obrazy wykonane techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM): (a) warstwa bimetaliczna Ag/Au w przekroju poprzecznym wykonane na próbkę lekko pochyloną: 1: przekrój podłoża szklanego, 2: przekrój warstwy metalicznej Ag/Au, 3: widok nachylona górna powierzchnia Ag/Au; (b) morfologia powierzchni warstwy bimetalicznej Ag/Au; (c) morfologia powierzchni pojedynczej warstwy metalicznej Au [62].

4.5.2. Technika drukowania masek polimerowych

Kolejnym etapem przygotowania chipa jest dodatkowa modyfikacja warstwy metalicznej w celu wygenerowania powierzchni reakcyjnej, tj. miejsca, w którym zachodzi reakcja wiązania analitu i liganda (receptora) oraz która staje się równocześnie polem pomiarowym. Pole to można utworzyć korzystając z faktu, iż zasięg generowanego zjawiska rezonansu plazmonów od powierzchni metalu wynosi około 400 nm. W związku z tym powierzchnia metaliczna chipa pokryta warstwą dielektryka (np. polimeru) o grubości znacznie przekraczającej zasięg zjawiska SPR, będzie blokowała efekt tego zjawiska, zaś miejsca wolne od powłoki polimeru będą stanowiły pole reakcji wychwytywania cząstek analitu oraz punkt pomiarowy. Opisywany w ten sposób rozkład pól reakcyjnych, ich wielkość i kształt będą nazywane w dalszej części pracy architekturą chipa.

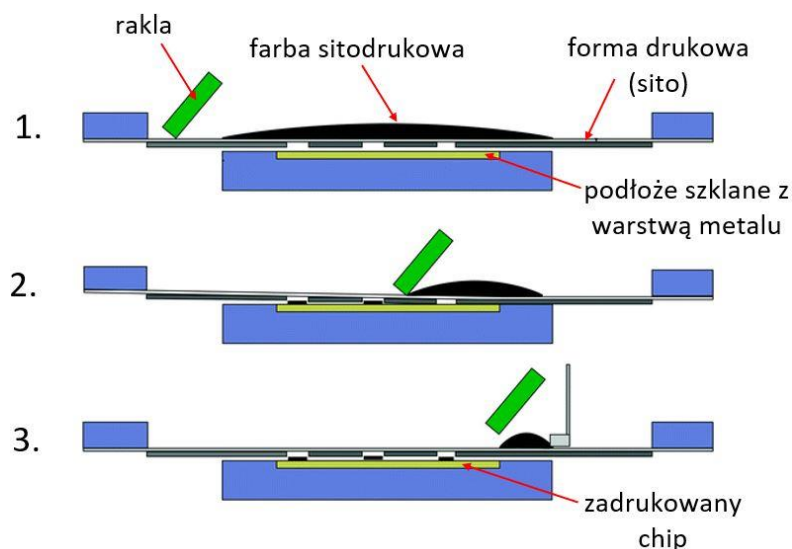
Jednym z głównym celów pracy było stworzenie optymalnej architektury chipów Au i Ag/Au, pozwalającej na oznaczenie biomarkerów katepsyn B, D i S, charakteryzujące się jak najlepszymi parametrami analitycznymi. W tym celu zaproponowano kilka różnych rozkładów architektonicznych powierzchni biosensora (rys. 40):

- **chip z dwuwarstwową maską polimerową** – powierzchnia metaliczna pokryta dwiema powłokami polimerowymi: **1. maską blokującą** efekt SPR i tworzącą 9 skupisk zawierających 12 pojedynczych punktów pomiarowych (powierzchnia pojedynczego punktu 0,159 mm²); **2. maską rozdzielającą**, która tworzy hydrofobową barierę przy aplikowaniu roztworów analitu o różnych stężeniach, zapobiegającą mieszaniu się roztworów na powierzchni chipa.
- **chip z jednowarstwową maską polimerową** – powierzchnia chipa podzielona na 9 równych pól, rozdzielonych hydrofobową **maską rozdzielającą** – barierą zapobiegającą mieszaniu się roztworów na powierzchni chipa. Niezadrukowana powierzchnia metaliczna daje swobodę przy wyborze wielkości i kształtu pól pomiarowych, które wyznaczane są na etapie analizy wyników w oprogramowaniu ImageJ.
- **Chip z maską foliową** – powierzchnia chipa podobnie jak jednowarstwową maską polimerową tworzy 9 równych pól rozdzielonych hydrofobową **maską rozdzielającą** (folią). Niezadrukowana powierzchnia metaliczna daje swobodę przy wyborze wielkości i kształtu pól pomiarowych wyznaczanych za pomocą oprogramowania analizującego wyniki pomiarów.



Rys. 40. Schemat przykładowych rozkładów architektury sensora na przykładzie chipa Au. Opracowanie własne.

Jednym ze sposobów wybiórczego maskowania powierzchni chipów jest technika sitodruku, w której formę drukową stanowi sito poliestrowe przenoszące farbę, której powłoka po zadruku osiąga grubość od 1 do 200 μm (rys. 41).



Rys. 41. Schematyczne przedstawienie procesu druku warstwowych masek polimerowych na płytkach szklanych z naniesioną warstwą metaliczną. Etap 1 – naniesienie farby sitodrukowej, etap 2 – druk (przeniesienie farby z formy drukowej na podłoże szklane), etap 3 – chip zadrukowany maską polimerową. Opracowanie własne.

Przebieg procesu druku masek polimerowych uzależniony jest od ilości powłok farby. Chipy z maską dwuwarstwową drukowane są dwuetapowo (etap I i II), podczas gdy płytki z maską jednowarstwową powlekane są w jednoetapowym procesie zadruku (tylko etap II).

Etap I

W pierwszym etapie czyste, niezadrukowane podłoże (chip Au lub Ag/Au) zostało poddane dokładnemu procesowi czyszczenia poprzez wielokrotne płukanie dichloroetanem i wodą redestylowaną oraz suszenie argonem pomiędzy płukaniem. Na oczyszczonej powierzchni nadrukowano światłoczułą powłokę Elpemer SD 2047, której głównym składnikiem była nowolakowa żywica epoksydowa, tworząc blokującą warstwę polimeru. Do tego celu zastosowano sito płaskie o gęstości oczek 90 linii/cm. Zadrukowaną płytkę szklaną suszono następnie w piecu konwekcyjnym w temperaturze 70°C przez 60 min.

W celu uzyskania odsłoniętych miejsc na metalizowanym szkłe (pól pomiarowych, nie zawierających farby światłoczułej) na zadrukowaną i wysuszoną płytkę nałożono przezroczysty filtr foliowy posiadający czarne, nieprzezroczyste punkty w kształcie koła o średnicy 0,45 mm. Przygotowaną w ten sposób płytkę naświetlano promieniowaniem UV-A o mocy 48 W przez 90 sekund. W kolejnym etapie całą powierzchnię fotopolimeru spryskano intensywnie 1% roztworem węgla sodu a następnie wodą redestylowaną, po czym osuszono w strumieniu argonu. W miejscach, w których fotopolimer był pokryty czarną maską i nie został naświetlony promieniowaniem UV, po spłukaniu, odsłonięta została czysta warstwa metalu. Pola te były wykorzystywane jako punkty pomiarowe.

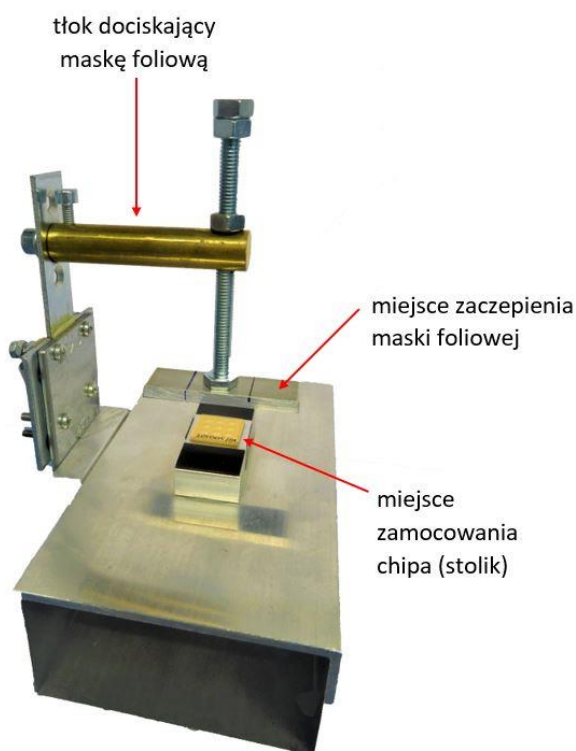
Etap II

Kolejnym krokiem w przygotowaniu chipa było wydrukowanie niebieskiej, hydrofobowej warstwy polimerowej, która stanowiła granicę oddzielającą poszczególne grupy punktów pomiarowych i uniemożliwiająca mieszanie się roztworów analitu. Warstwę hydrofobową nałożono również techniką sitodruku, stosując sito o oczkach 120 linii/cm. Niebieska warstwa farby fotopolimerowej, Elpemer SD 2457, została wydrukowana na wcześniej zadrukowanej płytce, a następnie ponownie wysuszona w piecu konwekcyjnym w temperaturze 65°C przez 60 min. Następnie, całą powierzchnia chipa została naświetlona światłem UV-A przez 5 min. Tak przetworzony chip suszony jest ponownie w piecu konwekcyjnym w temperaturze 150°C, przez 60 min (proces wypalania). Wydrukowany i wysuszony w ten sposób staje się chemicznie odporny na

działanie rozpuszczalnika organicznego, etanolu, stosowanego w kolejnych etapach przygotowania biosensora.

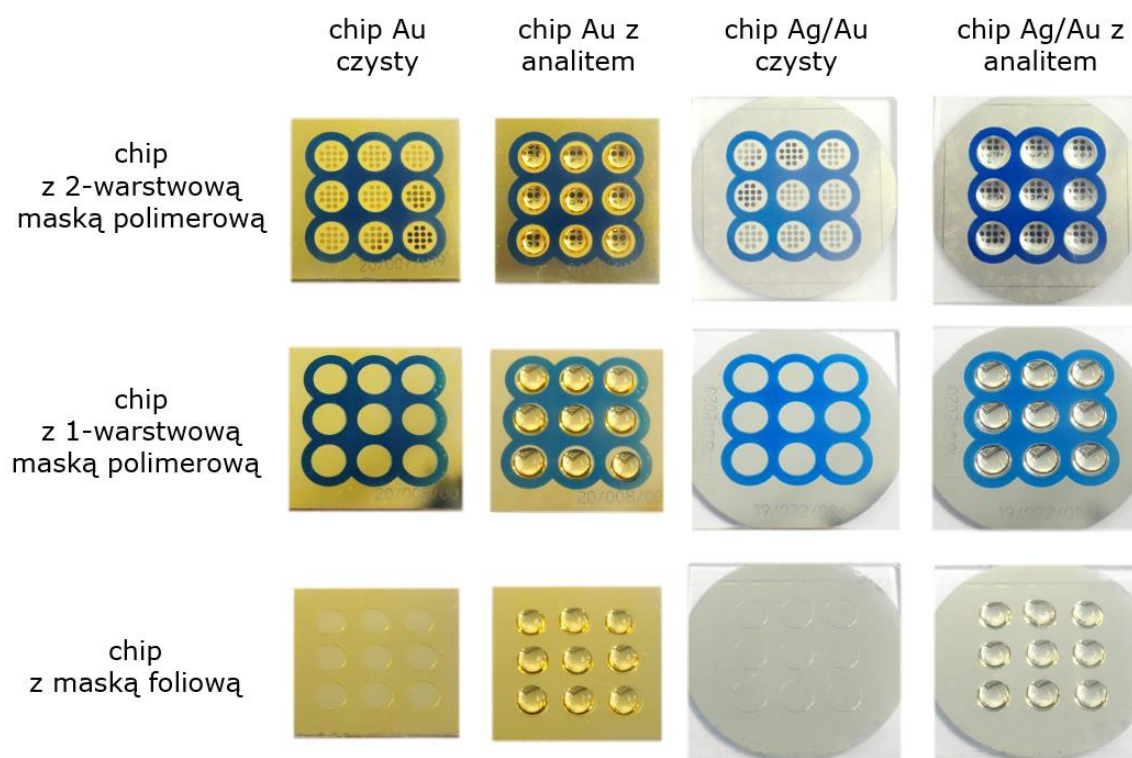
4.5.3. Dobór i aplikacja maski foliowej

Polimerowe maski warstwowe są obecnie najczęściej stosowanym rozwiązaniem, jeżeli chodzi o powłoki nanoszone na podłoże szklane lub metaliczne, głównie w drukowanych materiałach elektronicznych, np. drukowanych obwodach (ang. *printed circuit board*) [127]. Istotą samego procesu nakładania masek polimerowych jest złożoność oraz długi czas procesu druku, dlatego też oprócz wspomnianych masek drukowanych zastosowano w badaniach folie samoprzylepne. Parametrami, które istotnie wpłynęły na wybór tego rodzaju materiału były: łatwość aplikacji (naklejenia na powierzchnię metalizowanej płytki szklanej), elastyczności w wycięciu pól pomiarowych oraz grubości materiału (przekraczającej zakres działania SPR). Poniżej przedstawiono sposób w jaki aplikowane są maski foliowe na powierzchnię chipa (rys. 42).



Rys 42. Urządzenie do naklejania maski foliowej na powierzchnię płytki szklanej. Opracowanie własne.

Maska foliowa nakładana jest w bardzo prosty sposób, zwyczajnego naklejenia przezroczystej folii bezpośrednio na metaliczną płytkę szklaną, za pomocą prostego aplikatora (rys. 42). Miejsca pomiarowe wyznaczone są przez otwory wycięte w folii przy zastosowaniu elektronicznie sterowanego urządzenia wykrawającego. Maskę rozdzielającą stanowi samoprzylepna folia polipropylenowa o grubości 30 μm powleczona od spodu permanentnym, akrylowym klejem światłoutwardzalnym. Dodatkowo materiał ten, jak z resztą i poprzednio opisywane maski drukowane, charakteryzuje się silnie hydrofobową powierzchnią, dzięki czemu stanowi barierę separującą poszczególne krople analitu nanoszone na sąsiednie pola pomiarowe, i zapobiegające ich mieszanemu się. Poniżej przedstawiono zbiór wszystkich rodzajów masek rozdzielających zastosowanych do badań w niniejszej pracy (rys. 43).



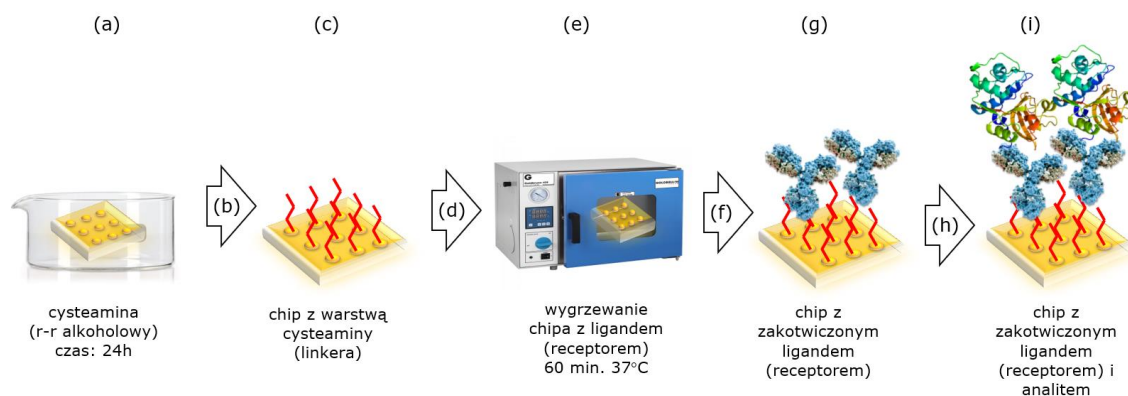
Rys. 43. Zestawienie wszystkich rodzajów chipów Au oraz Ag/Au z trzema rodzajami masek rozdzielających. Chipy przedstawiono w wersji czystej oraz z roztworem analitu naniesionym na miejsca pomiarowe. Opracowanie własne.

4.5.4. Opis procedury aplikacji pozostałych warstw linkera i liganda (receptora) w zależności od zastosowanego analitu

Poprawnie przeprowadzone oznaczenia ilości biomarkerów uzależnione jest od właściwego doboru bioczułych składników biosensora (rys. 15), tj. linkera i liganda (receptora). Oznaczenia katepsyn B, D i S przeprowadzono korzystając ze struktur ustalonych wcześniej osobno dla każdej z katepsyn. Dane dotyczące składu warstw bioczułych zaczerpnięto z podanych poniżej prac (tabela 12):

Tabela 12. Spis proponowanych układów analitycznych zastosowanych do badania charakterystyki chipów Au i Ag/Au

Układ pomiarowy	Analit	Ligand (receptor) (stężenie wyjściowe)	Linker	Sposób immobilizacji	Literatura
1	katepsyna B	cystatyna C (50 ng·mL ⁻¹)	cysteamina	EDC/NHS	[82]
2	katepsyna D	pepstatyna A (400 ng·mL ⁻¹)	cysteamina	EDC/NHS	[81,82, 128]
3	katepsyna S	przeciwciało specyficzne dla katepsyny S (20 ng·mL ⁻¹)	cysteamina	EDC/NHS	[62, 74, 129]



Rys. 44. Schemat przygotowania biosensora i aplikacji analitu podzielony na poszczególne etapy (a) utworzenie samoorganizującej monowarstwy linkera (cysteaminy), (b) mycie i suszenie chipa, (c) przechowywanie chipa, (d) aktywacja liganda (receptora), (e) inkubacja, (f) mycie biosensora, (g) gotowy biosensor, (h) aplikacja analitu, (i) gotowy układ pomiarowy. Opracowanie własne.

Procedura przygotowania sensora obejmuje następujące etapy (rys. 44):

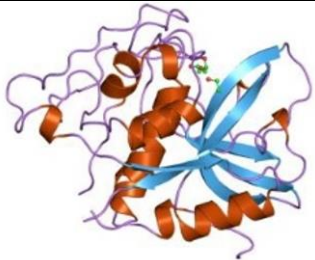

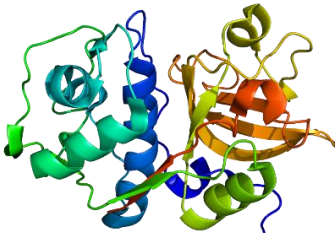
- (a) **utworzenie samoorganizującej monowarstwy linkera (cysteaminy)** – na tym etapie płytka szklana pokryta warstwą metalu przemywana była pięciokrotnie wodą MilliQ i alkoholem etylowym. Następnie chip suszono w strumieniu gazu obojętnego (argonu). Czystą i wysuszoną płytkę szklaną zanurzano do 20 mM alkoholowego roztworu chlorowodoru cysteaminy na czas 12 – 24 godzin w szklanym, zamkniętym naczyniu, w temperaturze pokojowej.
- (b) **mycie i suszenie** – po upływie 24 godzin chip płukano 10 krotnie, naprzemiennie wodą MilliQ i etanolem, a następnie płytki suszono pod strumieniem gazu obojętnego (argonu).
- (c) (*opcjonalnie*) **etap przechowywania chipa** – wysuszony chip posiadający warstwę linkera (cysteaminy) gotowy jest do nałożenia kolejnej warstwy – liganda (receptora). Może być on również przechowywany w zamknięciu do 7 dni.
- (d) **aktywacja liganda (receptora)** – przebieg tego etapu uzależniony jest od rodzaju zastosowanego analitu (tabela 12 powyżej). Aktywacja liganda (receptora) polega na zmieszaniu roztworu wyjściowego z N-hydroksysukcynimidem (NHS) (250 nM) i N-etylo-N'-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidem (EDC) (250 nM) w obecności buforu węglanowego (pH = 8,5). Tak przygotowany roztwór wytrząsano przez 10 min a następnie umieszczono na powierzchni chipa,
- (e) **inkubacja** – chip zawierający roztwór aktywowanego liganda (receptora) zamknięto w szczelnym naczyniu szklanym i umieszczono w cieplarni, inkubowano w 37°C przez 1 godzinę,
- (f) **mycie** – po upływie 1 godziny usunięto nadmiar pozostałego roztworu liganda (receptora) za pomocą pompki próżniowej i płukano 10 krotnie, wodą MilliQ,
- (g) **gotowy biosensor** – tak przygotowany biosensor umieszczony jest w urządzeniu pomiarowym SPR,
- (h) **aplikacja analitu** – nałożenie odpowiedniego przygotowanego roztworu analitu celem przeprowadzenia pomiarów,
- (i) **gotowy układ pomiarowy** – biosensor zawierający cząsteczki analitu związane z ligandem (receptorem).

Etapy (h) oraz (i) omówione zostaną w dalszej części tej pracy.

4.5.5. Krótka charakterystyka oznaczanych biomarkerów

Katepsyny są enzymami zaliczanymi do proteaz lizosomalnych. Oznacza to, że odpowiedzialne są za hydrolizę wiązań peptydowych. Biorą udział w procesach degradacji łańcuchów białkowych, procesach hormonalnych oraz rozpadzie komórek. Katepsyny wykorzystywane są przez niektóre patogeny do niszczenia tkanek, w związku z czym ich podwyższone stężenie może informować o możliwym stanie chorobowym organizmu. Poniżej (tabela 13) przedstawiono charakterystykę oznaczanych w tej pracy biomarkerów – katepsyn B, D i S.

Tabela 13. Charakterystyka katepsyn B, D i S.

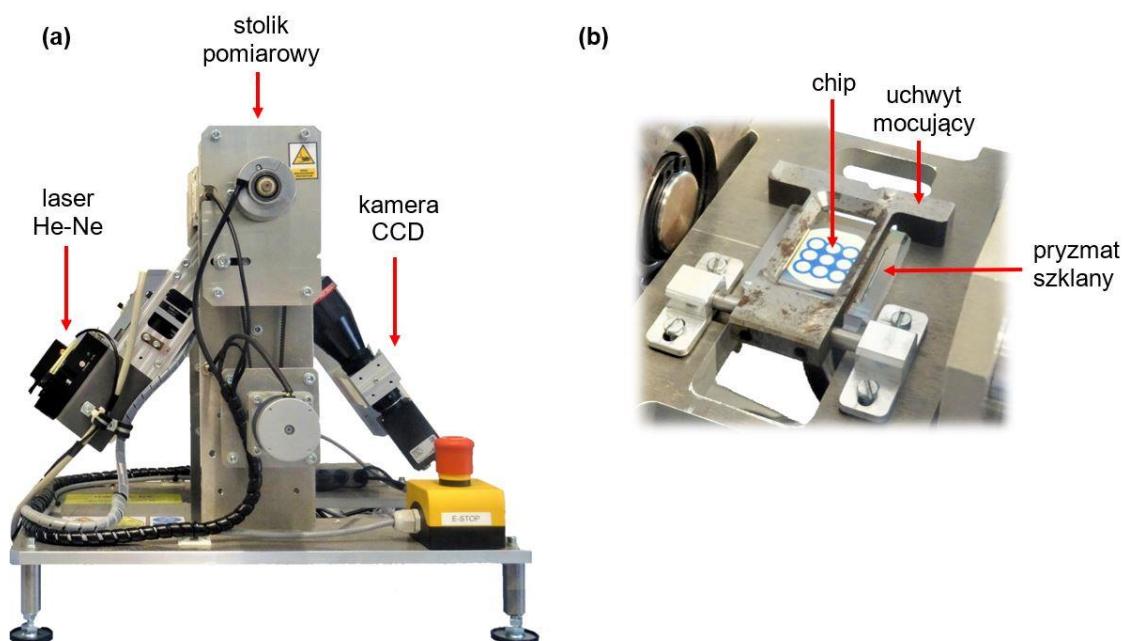
Nazwa	Obraz cząsteczki 3D	Klasa	Masa cząsteczkowa [Da]	Charakterystyka związku	Literatura
katepsyna B		cysteinowa	38 000	<ul style="list-style-type: none"> złożona z 339 aminokwasów, składa się z łańcucha ciężkiego o masie 25-26 kDa i lekkiego o masie 5 kDa, połączonych dimerem dwusiarczku, funkcja hydrolityczna modulowana jest wartością pH roztworu biomarker stanu zapalnego oraz innych chorób, np. nowotworów piersi, jelita grubego, prostaty 	[81,130]
katepsyna D		asparaginowa	45 000	<ul style="list-style-type: none"> główną funkcją katepsyny D jest degradacja białek i aktywacja prekursorów białek bioaktywnych w przedziałach prelizosomalnych miejsca katalityczne katepsyny D obejmują dwie krytyczne reszty asparaginowe (aminokwas 33 i 231) zlokalizowane na łańcuchach 14 kDa i 34 kDa, zwana jest biomarker złego rokowania, np. nowotwór piersi 	[81, 128, 131]
katepsyna S		cysteinowa	23 700	<ul style="list-style-type: none"> złożona z 331 aminokwasów optymalna aktywność przy pH~6,0 – 7,5 silna ekspresja w tkankach nowotworów złośliwych <ul style="list-style-type: none"> biomarker chorób zapalnych lub autoimmunologicznych, np. reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane, 	[131, 132]

4.6. Opis procedury pomiarów wykonywanych przy zastosowaniu aparatu SPRi

Pomiary reflektancji opisanych wcześniej biomarkerów jak i odpowiednich biosensorów przeprowadzono za pomocą prototypowej aparatury dedykowanej do pomiarów macierzowych SPRi opracowanej w Laboratorium Bioanalizy Uniwersytetu w Białymstoku (rys. 45).



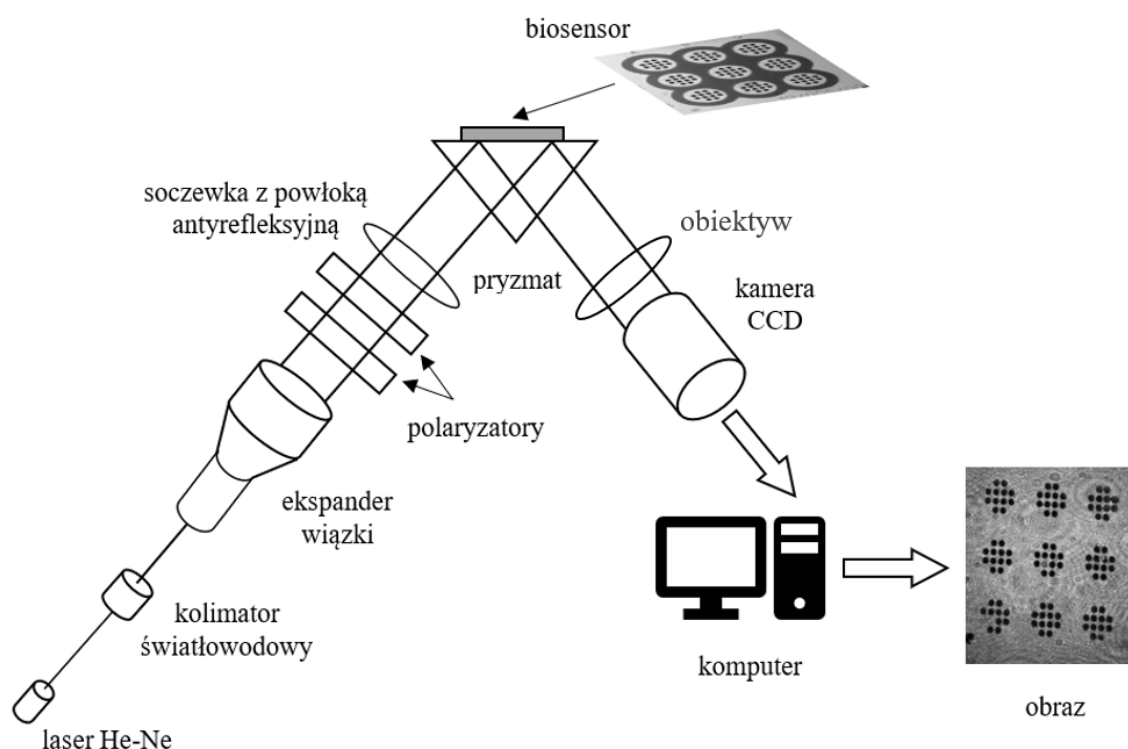
Rys. 45. Aparatura pomiarowa SPRi (stacja pomiarowa wraz z urządzeniami peryferyjnymi). Opracowanie własne.



Rys. 46. Graficzne przedstawienie komponentów stacji pomiarowej SPRi: (a) stacja pomiarowa, (b) stolik pomiarowy. Opracowanie własne.

Układ pomiarowy SPRi złożony jest z połączonych ze sobą kompatybilnych urządzeń (rys. 45):

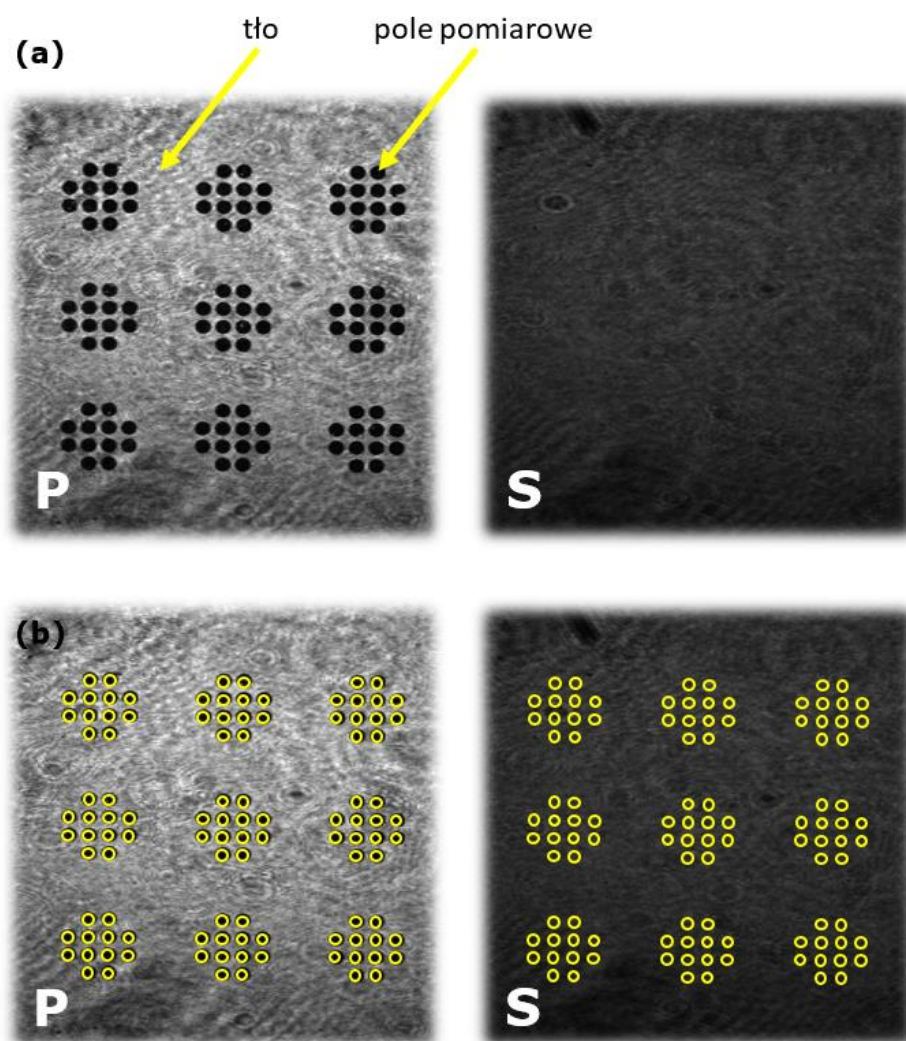
- **dwóch jednostek sterujących** (sterowanie laserem He–Ne, kalibracja i ustawienie kąta soczewek i kamery),
- **komputera z oprogramowaniem** służącym do zbierania i analizowania danych,
- **stacji pomiarowej SPRi** (rys. 46 a), która stanowi główną część zestawu urządzeń. W jej górnej części znajduje się **stolik pomiarowy** (rys. 46 b), w którym umieszczony jest **szklany pryzmat**, zaś bezpośrednio na nim badany **biosensor** dociśnięty za pomocą **uchwyty mocującego**.



Rys. 47. Schemat konfiguracji stacji pomiarowej SPRi. Opracowanie własne.

Powyżej przedstawiono również szkic konfiguracji geometrycznej (rys. 47) obrazujący rozkład poszczególnych elementów stacji pomiarowej SPRi. Pierwszym i zarazem podstawowym elementem aparatury jest źródło światła, które stanowi laser diodowy helowo – neonowy (He–Ne) emitujący wiązkę promieniowania o długości fali równej 635nm. Wiązka jest następnie wyrównywana i zwężana poprzez transmisję przez kolimator światłowodowy. W kolejnym etapie jest ona poszerzana przez ekspander i odbijana na polaryzatorze liniowym, który służy do polaryzacji wiązki światła na dwa typy polaryzacji: p i s. Podstawowe pomiary wykonywane są przy polaryzacji p, natomiast

polaryzacja s służy do pomiarów tła. W górnej części układu pomiarowego znajduje się szklany pryzmat, na którym umieszczono szklany chip zgodnie z konfiguracją Kretschmanna. Światło odbija się od metalicznej warstwy chipa i jest wykrywane przez kamerę cyfrową CCD. Sygnał jest następnie przesyłany do komputera z oprogramowaniem graficznym, które umożliwia ocenę obrazów SPRi w postaci obrazów 2D. Przyrząd zawiera jednostkę sterującą, która umożliwia automatyczne zestawianie pomiarów.



Rys. 48. Obraz zarejestrowany podczas pomiaru: (a) surowy obraz rejestrowany przez kamerę CCD przy polaryzacji p (jasna) i s (ciemna), (b) analiza obrazu przeprowadzana za pomocą oprogramowania ImageJ, odczyt różnicy kontrastu pomiędzy zakreślonymi polami pomiarowymi dla polaryzacji p i s. Opracowanie własne.

Właściwy pomiar SPRi (rys. 48) polega na zarejestrowaniu serii obrazów biosensora oświetlanego promieniowaniem lasera He – Ne w obu polaryzacjach p i s w określonym zakresie kątowym, dla którego różnica kontrastu pomiędzy próbką

(pole pomiarowe) a tłem (maska blokująca lub rozdzielająca) osiąga największą wartość. Następnie identyczna seria pomiarów przeprowadzana jest dla biosensora zawierającego oznaczany biomarker (katepsynę). Wszystkie zapisane obrazy analizowane są za pomocą oprogramowania ImageJ, tak aby uzyskać określone wartości matematyczne. Ostateczny sygnał oznaczanego biomarkera obliczany jest na podstawie różnicy pomiędzy sygnałami przed i po interakcji biologicznie aktywnego związku z biosensorem.

4.7. Opracowanie parametrów analitycznych biosensorów

Charakterystyka opracowanych biosensorów polegała na wyznaczeniu krzywych kalibracyjnych oraz pozostałych parametrów analitycznych oznaczenia katepsyn, tj. czułości, zakresu liniowego krzywych kalibracyjnych, precyzji, dokładności, zakresu odpowiedzi liniowej oraz limitów detekcji i oznaczalności dla wszystkich układów analitycznych przedstawionych w tabeli 12. Pomiary przeprowadzono na nowo skonstruowanych chipach srebrno – złotych Ag/Au jak i obecnie stosowanym chipie złotym Au. Pełne zestawienie wykorzystanych chipów przestawiono na rysunku 43.

4.7.1. Krzywa kalibracyjna i zakres prostoliniowy

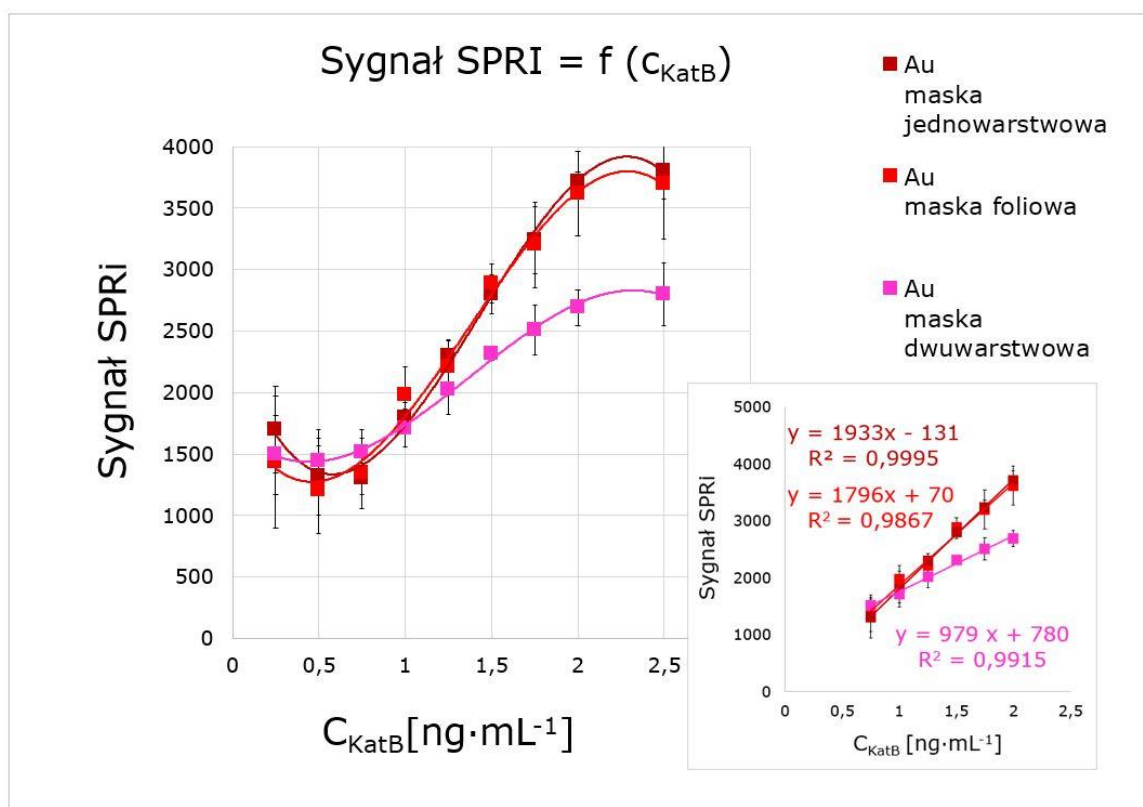
Pierwszym etapem badań było wykreślenie krzywych kalibracyjnych dla wspomnianych układów analitycznych (tabela 12) na nowym chipie Ag/Au jak i obecnym chipie Au z różnymi konfiguracjami masek rozdzielających (rys. 43). Zakresy analitycznie użyteczne wyznaczono poprzez wykreślenie zależności sygnału SPRi od stężenia oznaczanej katepsyny. Do pomiarów zastosowano następujące zakresy stężeń analitów:

- katepsyna B: 0,25 – 2,50 ng·mL⁻¹,
- katepsyna D: 0,05 – 2,50 ng·mL⁻¹,
- katepsyna S: 0,01 – 3,50 ng·mL⁻¹.

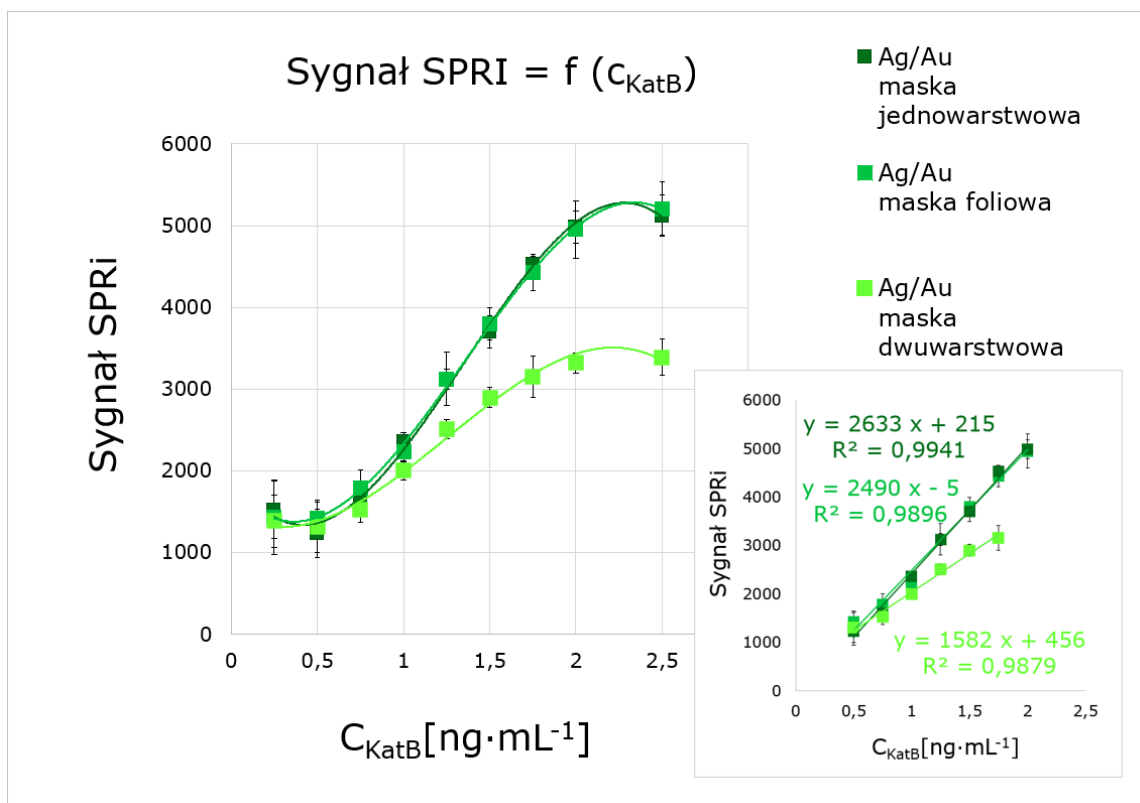
Krzywe kalibracyjne w postaci zależności sygnału SPRi od stężenia oznaczanych biomarkerów dla poszczególnych chipów przedstawiono poniżej:

- katepsyna B: chip Au (rys. 49); chip Ag/Au (rys. 50),
- katepsyna D: chip Au (rys. 51); chip Ag/Au (rys. 52),
- katepsyna S: chip Au (rys. 53); chip Ag/Au (rys. 54).

➤ **Katepsyna B**

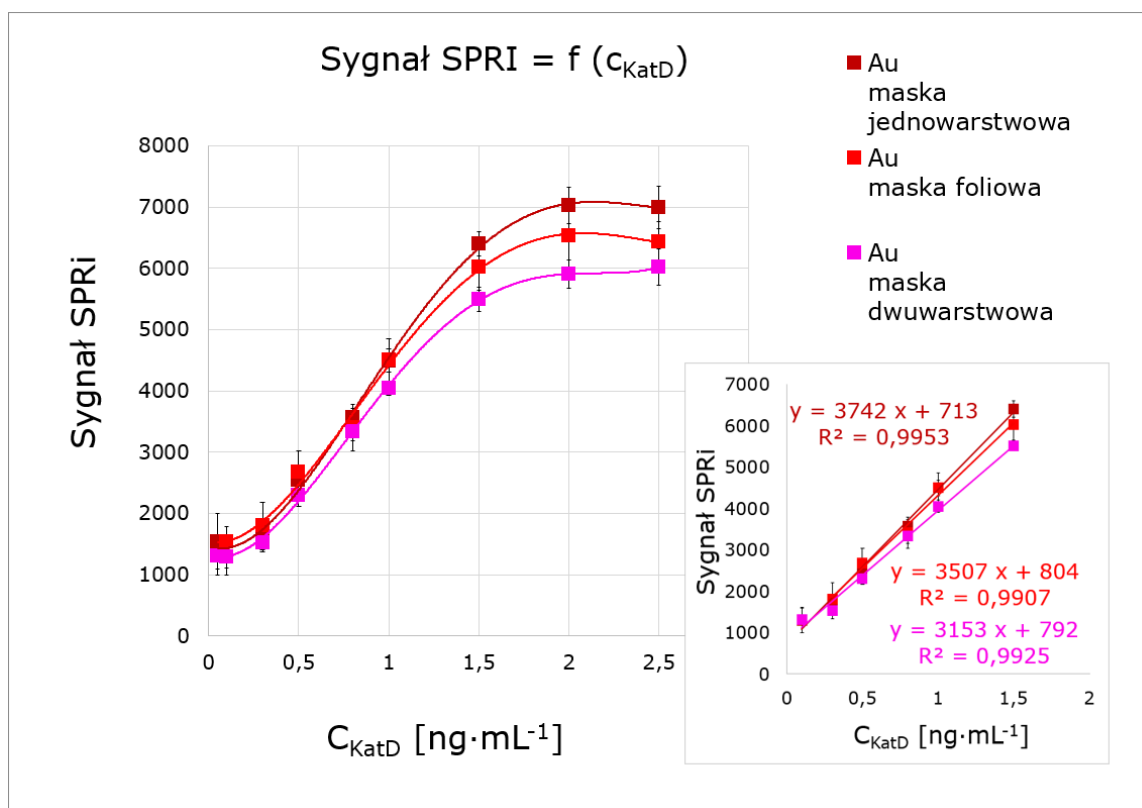


Rys. 49. Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla katepsyny B na chipie Au zawierającym 3 rodzaje masek. Opracowanie własne.

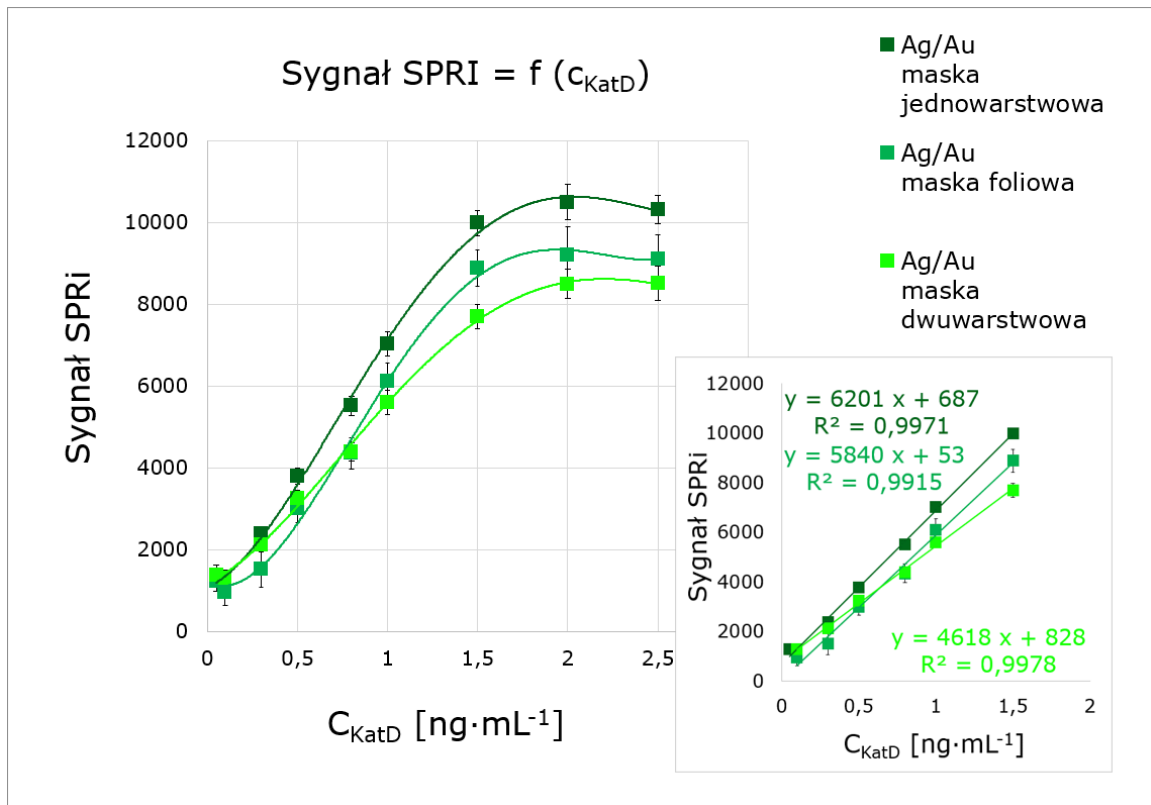


Rys. 50. Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla katepsyny B na chipie Ag/Au zawierającym 3 rodzaje masek. Opracowanie własne.

➤ **Katepsyna D**

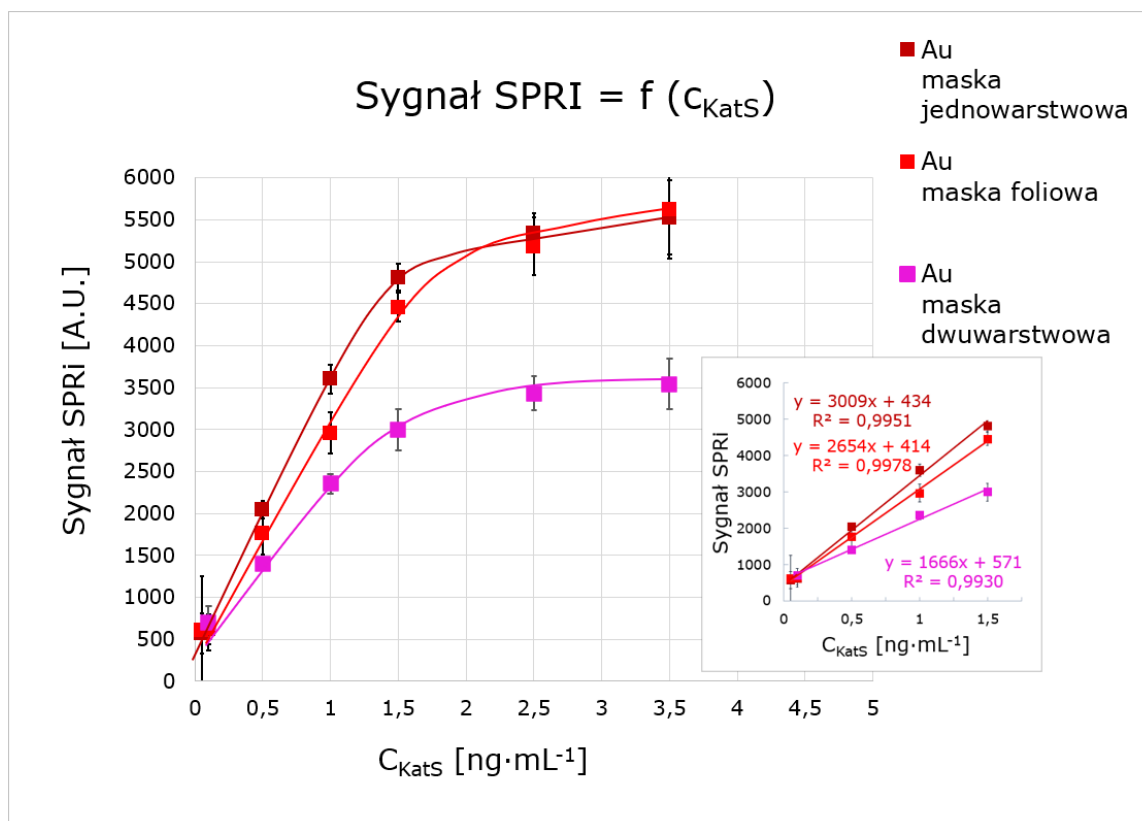


Rys. 51. Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla katepsyny D na chipie Au zawierającym 3 rodzaje masek. Opracowanie własne.

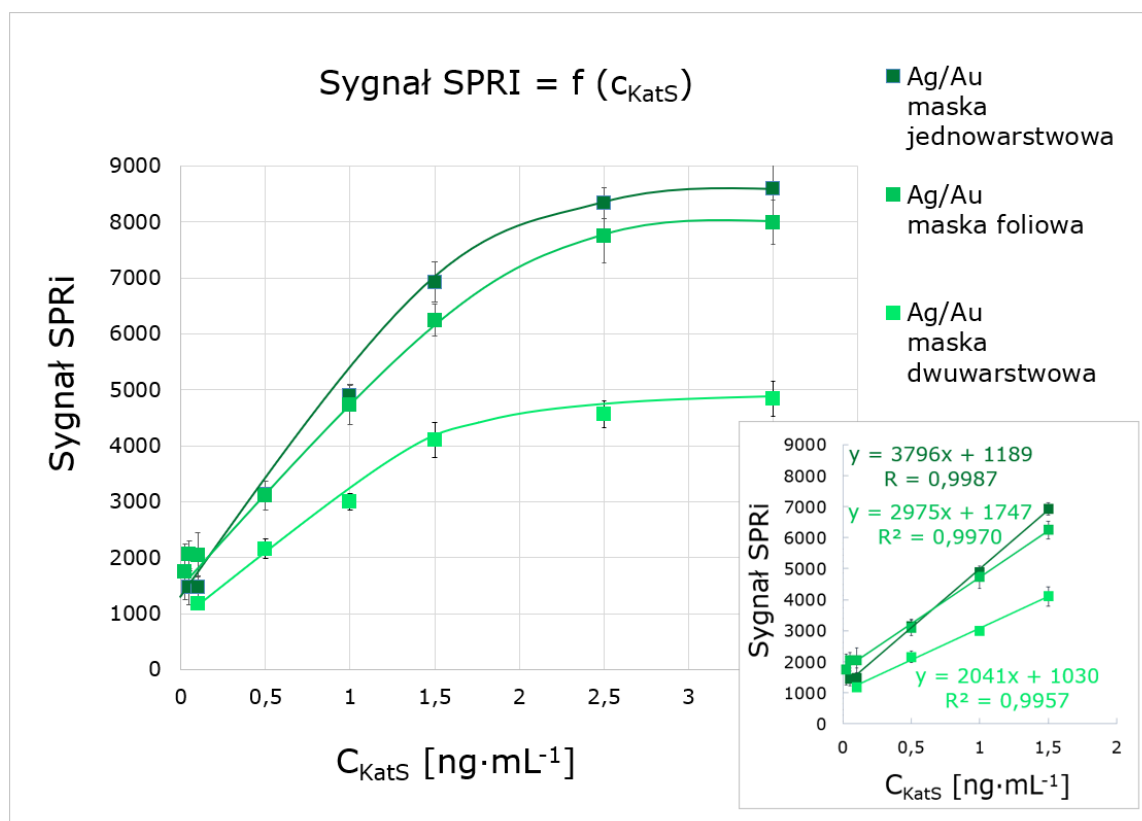


Rys. 52. Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla katepsyny D na chipie Ag/Au zawierającym 3 rodzaje masek. Opracowanie własne.

➤ **Katepsyna S**



Rys. 53. Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla katepsyny S na chipie Au zawierającym 3 rodzaje masek. Opracowanie własne.



Rys. 54. Krzywa kalibracyjna wyznaczona dla katepsyny S na chipie Ag/Au zawierającym 3 rodzaje masek. Opracowanie własne.

Z analizy wykreślonych krzywych kalibracyjnych (rys. 49 – 54) wynika, iż przy wyższych stężeniach oznaczanych biomarkerów tworzy się plateau Langmuira, świadczące o wysyceniu aktywnych miejsc biosensora cząsteczkami biomarkera. W związku z tym użyteczny analitycznie zakres stężeń dla oznaczenia biomarkerów stanowią części liniowe tych krzywych – tabela 14.

Tabela 14. Zakresy prostoliniowe krzywych kalibracyjnych oznaczeń katepsyn B, D i S.

Rodzaj chipa	Rodzaj maski	Zakres stężeń katepsyny B [ng·mL ⁻¹]	Zakres stężeń katepsyny D [ng·mL ⁻¹]	Zakres stężeń katepsyny S [ng·mL ⁻¹]
Chip Au	Maska foliowa	0,750 – 2,000	0,300 – 1,500	0,050 – 1,500
	Jednowarstwowa maska polimerowa	0,750 – 2,000	0,300 – 1,500	0,050 – 1,500
	Dwuwarstwowa maska polimerowa	0,750 – 2,000	0,100 – 1,500	0,100 – 1,500
Chip Ag/Au	Maska foliowa	0,500 – 2,000	0,100 – 1,500	0,025 – 1,500
	Jednowarstwowa maska polimerowa	0,500 – 2,000	0,050 – 1,500	0,050 – 1,500
	Dwuwarstwowa maska polimerowa	0,500 – 1,750	0,100 – 1,500	0,100 – 1,500

4.7.2. Czulość

Czulość jako parametr charakteryzujący układ analityczny, określa w jaki sposób niewielka zmiana stężenia oznaczanego biomarkera wpływa na sygnał SPRi urządzenia pomiarowego. Jej wartość określana jest przez nachylenie krzywej kalibracyjnej (*współczynnik a*). Poniżej zestawiono wszystkie parametry krzywych kalibracyjnych wykreślonych dla katepsyn oznaczonych na poszczególnych chipach:

- katepsyna B (tabela 15),
- katepsyna D (tabela 16),
- katepsyna S (tabela 17).

Tabela 15. Zestawienie parametrów krzywych kalibracyjnych wyznaczonych dla katepsyny B na obu chipach Au oraz Ag/Au zawierających 3 rodzaje masek rozdzielających.

Parametr	Chip Au			Chip Ag/Au		
	Maska foliowa	Jednowarstwowa maska polimerowa	Dwuwarstwowa maska polimerowa	Maska foliowa	Jednowarstwowa maska polimerowa	Dwuwarstwowa maska polimerowa
Nachylenie (czułość) <i>a</i>	1796	1933	979	2490	2633	1582
Wyraz wolny <i>b</i>	70	- 131	780	-5	-215	456
Współczynnik korelacji liniowej <i>R</i> ²	0,9867	0,9995	0,9915	0,9896	0,9941	0,9879

Tabela 16. Zestawienie parametrów krzywych kalibracyjnych wyznaczonych dla katepsyny D na obu chipach Au oraz Ag/Au zawierających 3 rodzaje masek rozdzielających.

Parametr	Chip Au			Chip Ag/Au		
	Maska foliowa	Jednowarstwowa maska polimerowa	Dwuwarstwowa maska polimerowa	Maska foliowa	Jednowarstwowa maska polimerowa	Dwuwarstwowa maska polimerowa
Nachylenie (czułość) <i>a</i>	3507	3742	3153	5840	6201	4618
Wyraz wolny <i>b</i>	804	713	792	53	687	828

Współczynnik korelacji liniowej R^2	0,9907	0,9953	0,9925	0,9915	0,9971	0,9978
---	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Tabela 17. Zestawienie parametrów krzywych kalibracyjnych wyznaczonych dla katepsyny S na obu chipach Au oraz Ag/Au zawierających 3 rodzaje masek rozdzielających.

Parametr	Chip Au			Chip Ag/Au		
	Maska foliowa	Jednowarstwowa maska polimerowa	Dwuwarstwowa maska polimerowa	Maska foliowa	Jednowarstwowa maska polimerowa	Dwuwarstwowa maska polimerowa
Nachylenie (czułość) <i>a</i>	<i>2654</i>	<i>3009</i>	<i>1666</i>	<i>2975</i>	<i>3796</i>	<i>2041</i>
Wyraz wolny <i>b</i>	414	434	571	1747	1189	1030
Współczynnik korelacji liniowej R^2	0,9978	0,9951	0,9930	0,9970	0,9987	0,9957

4.7.3. Precyzja i dokładność

Precyzja to kolejny parametr analityczny charakteryzujący powtarzalność pomiarów lub inaczej rozrzut wyników uzyskanych oznaczeń wokół wartości średniej dla danej techniki pomiarowej, w tym przypadku techniki SPRi. Jest określana na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego, dla próbek na danym poziomie stężeń. W niniejszej pracy wyznaczono ją na podstawie pomiaru sygnału SPRi dla trzech różnych stężeń określonego biomarkera, zawierających się w prostoliniowym zakresie stężeń krzywej kalibracyjnej. Wielkośćmi, którymi określono precyzję techniki SPRi są odchylenie standardowe (SD) oraz względne odchylenie standardowe (RSD).

Poza precyzją techniki SPRi określono również jej dokładność, czyli wyznaczenie jak blisko wartości prawdziwej (oczekiwanej) lub wzorcowej znajduje się uzyskany wynik pomiaru (stężenie oznaczanego biomarkera) lub inaczej stopień zgodności między uzyskanymi wynikami pomiaru (pojedynczego) a wartością rzeczywistą. W przypadku pomiarów SPRi określono ją za pomocą obliczenia odzysku za pomocą wzoru (15):

➤ Odzysk

$$\text{Odzysk} = \frac{c_{\text{sr}}}{c_{\text{nom}}} \cdot 100\% \quad (15)$$

gdzie:

c_{nom} – stężenie nominalne próbki analitu [$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$],

c_{sr} – średnia arytmetyczna obliczona na podstawie wyznaczonych powyżej stężeń pojedynczych pomiarów [$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$],

n – ilość pomiarów.

Wyniki obliczeń parametrów określających precyzję i dokładność oznaczeń katepsyn przedstawiono poniżej:

- katepsyna B (tabela 18),
- katepsyna D (tabela 19),
- katepsyna S (tabela 20).

Tabela 18. Parametry określające precyzję i dokładność w oznaczaniu katepsyny B za pomocą biosensora utworzonego na chipie Au i Ag/Au (n= 24).

Rodzaj chipa	Maska foliowa					Maska jednowarstwowa polimerowa					Maska dwuwarstwowa polimerowa				
	$C_{kat\ B}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]	$C_{kat\ B}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]	$C_{kat\ B}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]
Chip Au	1,000	1,109	0,180	16,234	110,875	1,000	1,047	0,092	8,791	104,654	1,000	0,974	0,070	7,190	97,356
	1,250	1,217	0,210	17,253	97,374	1,250	1,328	0,100	7,530	106,236	1,250	1,226	0,090	7,343	98,057
	1,750	1,729	0,260	15,033	98,828	1,500	1,517	0,123	8,109	101,118	1,500	1,443	0,110	7,625	96,169
Chip Ag/Au	1,000	1,074	0,151	14,064	107,437	1,000	0,976	0,050	5,121	97,646	1,000	1,041	0,080	7,684	104,119
	1,250	1,358	0,175	12,884	108,664	1,250	1,267	0,070	5,526	101,347	1,250	1,303	0,110	8,443	104,231
	1,750	1,746	0,186	10,651	99,786	1,500	1,463	0,100	6,835	97,537	1,500	1,553	0,120	7,729	103,505

Tabela 19. Parametry określające precyzję i dokładność w oznaczaniu katepsyny D za pomocą biosensora utworzonego na chipie Au i Ag/Au (n= 24).

Rodzaj chipa	Maska foliowa					Maska jednowarstwowa polimerowa					Maska dwuwarstwowa polimerowa				
	$C_{Kat D}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]	$C_{Kat D}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]	$C_{Kat D}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]
Chip Au	0,500	0,520	0,090	17,308	104,000	0,300	0,290	0,030	10,331	96,791	0,500	0,475	0,050	10,527	94,995
	0,800	0,770	0,110	14,286	96,250	0,500	0,526	0,045	8,562	105,121	0,800	0,786	0,060	7,636	98,213
	1,000	0,950	0,120	12,632	95,000	0,800	0,787	0,090	11,439	98,346	1,000	0,969	0,120	12,388	96,868
Chip Ag/Au	0,300	0,337	0,150	44,456	112,472	0,300	0,311	0,020	6,440	103,522	0,500	0,523	0,040	7,647	104,614
	0,500	0,545	0,080	14,689	108,929	0,500	0,518	0,020	3,859	103,648	0,800	0,764	0,030	3,928	95,456
	0,800	0,798	0,090	11,281	99,721	0,800	0,813	0,020	2,460	101,634	1,000	1,055	0,050	4,740	105,490

Tabela 20. Parametry określające precyzję i dokładność w oznaczaniu katepsyny S za pomocą biosensora utworzonego na chipie Au i Ag/Au (n=24).

Rodzaj chipa	Maska foliowa					Maska jednowarstwowa polimerowa					Maska dwuwarstwowa polimerowa				
	$C_{Kat S}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]	$C_{Kat S}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]	$C_{Kat S}$ [ng·mL ⁻¹]	$C_{\bar{s}r}$ [ng·mL ⁻¹]	SD	RSD [%]	Odzysk [%]
Chip Au	0,100	0,094	0,033	34,762	94,002	0,100	0,097	0,008	8,215	97,234	0,500	0,511	0,010	1,976	102,233
	0,500	0,479	0,099	20,635	95,897	0,500	0,524	0,042	8,078	104,810	1,000	1,050	0,020	1,934	104,990
	1,000	0,981	0,121	12,286	98,100	1,000	1,005	0,080	7,964	100,456	1,500	1,445	0,120	8,304	96,333
Chip Ag/Au	0,100	0,107	0,028	25,950	107,092	0,500	0,509	0,030	5,894	101,805	0,500	0,519	0,020	3,853	103,824
	0,500	0,527	0,079	15,009	105,496	1,000	1,032	0,023	2,228	103,248	1,000	1,015	0,140	13,797	101,471
	1,000	1,030	0,120	11,650	103,000	1,500	1,505	0,090	5,980	100,333	1,500	1,560	0,112	7,179	104,000

4.7.4. Limity detekcji i oznaczalności, zakres odpowiedzi liniowej

Limity detekcji i oznaczalności to pozostałe parametry pozwalające na porównanie przydatności nowo skonstruowanego chipa Ag/Au w oznaczeniu biomarkerów za pomocą techniki SPRi. W tym celu wykonano pomiar sygnału SPRi dla ślepej próby, którą stanowił buforowy roztwór PBS (ilość punktów pomiarowych n=24).

Limit detekcji oraz oznaczalności wyliczono posługując się następującymi wzorami (16 i 17):

➤ **Limit detekcji (granica wykrywalności, LOD)**

$$LOD = 3,3 \cdot SD \quad (16)$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe ślepej próby [$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$].

➤ **Limit oznaczalności (granica oznaczalności, LOQ)**

$$LOQ = 10 \cdot SD \quad (17)$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe ślepej próby [$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$].

Istotne znaczenie w przypadku oznaczenia biomarkerów za pomocą techniki SPRi stanowi tzw. **zakres odpowiedzi liniowej**, który określa przedział stężeń analitycznie użyteczny, znajdujący się na prostoliniowym odcinku krzywej kalibracyjnej, którego faktyczny (rzeczywisty) zakres zdefiniowany jest wartością limitu oznaczalności, czyli możliwie najmniejszego stężenia oznaczanego składnika. Wielkość zakresu odpowiedzi liniowej jak i limitów detekcji i oznaczalności przedstawiono poniżej:

- katepsyna B (tabela 21),
- katepsyna D (tabela 22),
- katepsyna S (tabela 23).

Tabela 21. Limity detekcji i oznaczalności oraz zakres odpowiedzi liniowej dla oznaczenia katepsyny B

Rodzaj chipa	Parametr	Maska foliowa	Maska polimerowa jednowarstwowa	Maska polimerowa dwuwarstwowa
Chip Au	LOD	0,297	0,228	0,228
	LOQ	0,990	0,760	0,800
	zakres odpowiedzi liniowej	0,990 -2,000	0,760 - 2,000	0,800 - 2,000
Chip Ag/Au	LOD	0,195	0,159	0,168
	LOQ	0,650	0,530	0,560
	zakres odpowiedzi liniowej	0,650 - 2,000	0,530 - 2,000	0,560 - 1,750

Tabela 22. Limity detekcji i oznaczalności oraz zakres odpowiedzi liniowej dla oznaczenia katepsyny D

Rodzaj chipa	Parametr	Maska foliowa	Maska polimerowa jednowarstwowa	Maska polimerowa dwuwarstwowa
Chip Au	LOD	0,059	0,075	0,123
	LOQ	0,198	0,250	0,400
	zakres odpowiedzi liniowej	0,200 - 1,500	0,250-1,500	0,410 -1,500
Chip Ag/Au	LOD	0,051	0,030	0,093
	LOQ	0,170	0,110	0,301
	zakres odpowiedzi liniowej	0,170 - 1,500	0,110-1,500	0,310 - 1,500

Tabela 23. Limity detekcji i oznaczalności oraz zakres odpowiedzi liniowej dla oznaczenia katepsyny B

Rodzaj chipa	Parametr	Maska foliowa	Maska polimerowa jednowarstwowa	Maska polimerowa dwuwarstwowa
Chip Au	LOD	0,034	0,041	0,196
	LOQ	0,113	0,136	0,653
	zakres odpowiedzi liniowej	0,113-1,500	0,136-1,500	0,653-1,500
Chip Ag/Au	LOD	0,031	0,045	0,150
	LOQ	0,093	0,150	0,501
	zakres odpowiedzi liniowej	0,093 - 1,500	0,150 - 1,500	0,501-1,500

4.7.5. Walidacja metody przy użyciu próbek biologicznych

Po wyznaczeniu podstawowych parametrów analitycznych oznaczenia katepsyn na obu chipach Au i Ag/Au wykonano walidację techniki za pomocą oznaczenia tych samych biomarkerów w próbkach naturalnych. Procedura przygotowania próbek biologicznych do analiz różniła się w zależności od oznaczanego biomarkera, i wyglądała następująco:

- **katepsyna B** – oznaczenia wykonano w następujących próbkach: (a) osocze oraz płyn otrzewnowy, pobrane od pacjentek z torbielą endometrialną oraz (b) osocze pobrane od osób zdrowych (grupa kontrolna). Aby móc oznaczyć stężenia na podstawie krzywych kalibracyjnych, wszystkie próbki odpowiednio rozcieńczono roztworem PBS: próbki chorych pacjentów rozcieńczono 10–krotnie, zaś osób zdrowych 2–krotnie. Pomiary przeprowadzono na chipach Au i Ag/Au z jednowarstwową maską polimerową. Ilość punktów pomiarowych dla każdego ze stężeń n=12.
- **katepsyna D** – oznaczenia wykonano w dwóch rodzajach próbek: (a) osocze pobrane od pacjentów chorych na glejaka oraz (b) osocze pobrane od osób zdrowych (grupa kontrolna). Aby móc oznaczyć stężenia na podstawie krzywych kalibracyjnych, wszystkie próbki odpowiednio rozcieńczono buforem octanowym (pH=3,5): próbki chorych pacjentów rozcieńczono 10–krotnie, zaś osób zdrowych 5–krotnie. Pomiary przeprowadzono na chipach Au i Ag/Au z dwuwarstwową

maską polimerową oraz maską foliową. Ilość punktów pomiarowych dla każdego ze stężeń $n=12$.

- **katepsyna S** – oznaczenia wykonano w dwóch rodzajach próbek: (a) osocze pobrane od pacjentek z rakiem jajnika oraz (b) osocze pobrane od osób zdrowych (grupa kontrolna palaczy). Aby móc oznaczyć stężenia na podstawie krzywych kalibracyjnych, wszystkie próbki odpowiednio rozcieńczono roztworem PBS: próbki chorych pacjentów rozcieńczono 10-krotnie, zaś osób zdrowych 2-krotnie. Pomiar przeprowadzono na chipach Au i Ag/Au z dwuwarstwową maską polimerową. Ilość punktów pomiarowych dla każdego ze stężeń $n=12$.

Wyniki walidacji analizy próbek biologicznych zestawiono w tabelach poniżej:

- katepsyna B (tabela 24),
- katepsyna D (tabela 25),
- katepsyna S (tabela 26).

Tabela 24. Wyniki oznaczeń katepsyny B w próbkach biologicznych osób chorych i zdrowych, na chipach Au i Ag/Au, z jednowarstwową maską rozdzielającą.

Rodzaj grupy pacjentów	Nr próbki	Chip Au				Chip Ag/Au			
		Analiza w osoczu		Analiza w płynie otrzewnowym		Analiza w osoczu		Analiza w płynie otrzewnowym	
		C _{Kat B} [ng·mL ⁻¹]	SD	C _{Kat B} [ng·mL ⁻¹]	SD	C _{Kat B} [ng·mL ⁻¹]	SD	C _{Kat B} [ng·mL ⁻¹]	SD
Grupa chorych (endometrioza)	1	14,401	0,923	16,977	0,492	14,977	0,701	17,316	0,692
	2	11,170	0,534	12,616	0,227	10,834	0,320	13,298	0,644
	3	10,911	0,289	13,347	0,454	11,347	0,197	13,868	0,534
	4	12,692	0,818	11,200	0,627	12,946	0,451	11,872	0,183
	5	8,390	0,367	10,725	0,418	8,280	0,282	11,476	0,183
	6	5,406	0,262	8,622	0,138	5,838	0,172	8,391	0,098
	7	13,994	0,291	15,553	0,346	14,553	0,503	16,331	0,454
	8	6,121	0,176	8,366	0,286	5,852	0,183	8,952	0,174
	9	8,186	0,343	10,513	0,589	8,483	0,256	11,144	0,342
Grupa kontrolna	1	2,029	0,111			2,357	0,131		
	2	0,982	0,091			1,091	0,107		
	3	1,982	0,128			2,254	0,151		
	4	1,112	0,218			1,232	0,128		
	5	1,524	0,078			1,570	0,090		
	6	2,616	0,201			2,939	0,105		
	7	2,542	0,102			2,453	0,107		
	8	3,124	0,287			3,329	0,280		
	9	1,487	0,117			1,653	0,135		

Tabela 25. Wyniki oznaczeń katepsyny D w próbkach biologicznych osób chorych i zdrowych, na chipach Au i Ag/Au, z dwuwarstwową maską polimerową.

Rodzaj grupy pacjentów	Nr próbki	Chip Au				Chip Ag/Au			
		Dwuwarstwowa maska polimerowa		Maska foliowa		Dwuwarstwowa maska polimerowa		Maska foliowa	
		C _{Kat D} [ng·mL ⁻¹]	SD	C _{Kat D} [ng·mL ⁻¹]	SD	C _{Kat D} [ng·mL ⁻¹]	SD	C _{Kat D} [ng·mL ⁻¹]	SD
Grupa chorych (glejak)	1	3,951	0,321	4,189	0,289	4,021	0,111	4,231	0,130
	2	4,490	0,277	4,951	0,319	4,223	0,172	4,810	0,286
	3	3,068	0,101	3,343	0,210	3,113	0,193	3,441	0,235
	4	6,333	0,409	6,865	0,450	6,220	0,604	6,786	0,431
	5	7,491	0,144	7,961	0,310	7,363	0,431	7,885	0,612
	6	3,454	0,123	3,973	0,292	3,233	0,192	3,780	0,213
	7	3,563	0,271	3,940	0,172	3,300	0,229	3,511	0,310
	8	6,559	0,335	6,994	0,310	6,301	0,341	6,785	0,412
	9	3,450	0,114	3,822	0,217	3,334	0,170	3,976	0,211
Grupa kontrolna	1	2,932	0,091	2,671	0,187	2,790	0,123	3,031	0,210
	2	3,858	0,119	3,252	0,290	3,594	0,231	4,013	0,237
	3	2,047	0,242	1,801	0,090	2,011	0,285	2,240	0,356
	4	2,241	0,151	2,024	0,189	2,052	0,170	2,442	0,250
	5	2,399	0,310	2,208	0,092	2,110	0,122	2,601	0,171
	6	3,131	0,177	3,009	0,330	3,311	0,191	3,460	0,252
	7	2,938	0,221	3,211	0,321	3,031	0,213	3,157	0,280
	8	2,902	0,193	2,674	0,233	3,182	0,120	3,103	0,171
	9	3,371	0,174	3,691	0,268	3,491	0,251	3,742	0,312

Tabela 26. Wyniki oznaczeń katepsyny S w próbkach biologicznych osób chorych i zdrowych, na chipach Au i Ag/Au, z 2-warstwową maską rozdzielającą.

Grupa pacjentów	Nr próbki	Chip Au Dwuwarstwowa maska polimerowa		Chip Ag/Au Dwuwarstwowa maska polimerowa	
		C _{KatS} [ng·mL ⁻¹]	SD	C _{KatS} [ng·mL ⁻¹]	SD
Grupa chorych (rak jajnika)	1	16,23	0,676	15,84	0,324
	2	18,94	0,797	17,22	0,236
	3	12,63	0,488	11,96	0,654
	4	11,09	0,275	11,94	0,237
	5	16,77	0,673	15,26	0,216
	6	10,29	0,173	9,836	0,410
	7	8,238	0,126	10,09	0,121
	8	12,99	0,541	13,35	0,298
	9	6,986	0,113	7,544	0,127
Grupa kontrolna	1	0,392	0,030	0,477	0,046
	2	0,931	0,010	0,980	0,042
	3	2,579	0,112	2,881	0,075
	4	1,947	0,030	1,923	0,045
	5	0,479	0,011	0,766	0,040
	6	1,163	0,031	1,366	0,140
	7	2,439	0,040	2,828	0,109
	8	2,382	0,020	2,129	0,030
	9	0,399	0,020	0,719	0,088

Opracowane powyżej wyniki oznaczeń biomarkerów nie wskazują bezpośrednio czy nowo opracowany chip srebrno – złoty Ag/Au działa poprawnie – lepiej, względem obecnie stosowanego chipa złotego Au. Dlatego też, aby porównać ze sobą obie konstrukcje chipów i ich działanie przy oznaczaniu biomarkerów w próbkach biologicznych, posłużono się dobrze znaną metodą Bland – Altmana [32, 134]. Metoda ta bazuje na sporządzeniu wykresu punktowego, w którym:

- **oś odciętych (oś x)** – stanowi średnią pomiarów dla porównywanych metod – w tym przypadku średnia różnicy stężeń ($\frac{\Delta C_{Kat(A-B)}}{2}$) wyznaczonych dla tej samej próbki analitu za pomocą pomiaru tej próbki przy użyciu chipa Au (A) i Ag/Au (B),
- **oś rzędnych (oś y)** – jest różnicą pomiędzy pomiarami dla porównywanych metod – w tym przypadku różnica stężeń ($\Delta C_{KatB(A-B)}$) wyznaczonych dla tej samej próbki analitu za pomocą pomiaru tej próbki przy użyciu chipa Au (A) i Ag/Au (B).

Do obliczeń i wykreślenia krzywych Bland – Altman posłużono się danymi z tabel 24, 25, 26. Krzywe Bland – Altman dla analizowanych układów analitycznych próbek biologicznych przedstawiono na poniższych rysunkach:

- próbki biologiczne – oznaczenie Katepsyny B (rys. 55, 56),
- próbki biologiczne – oznaczenie Katepsyny D (rys. 57, 58),
- próbki biologiczne – oznaczenie Katepsyny S (rys. 59).

Poprawność (przydatność) działania danej techniki (w tym przypadku techniki oznaczenia na bazie nowo skonstruowanego chipa) ocenia się na podstawie tzw. **95% przedziału zgodności**, którego szerokość na wykresie określa się na podstawie poniższego wzoru (18):

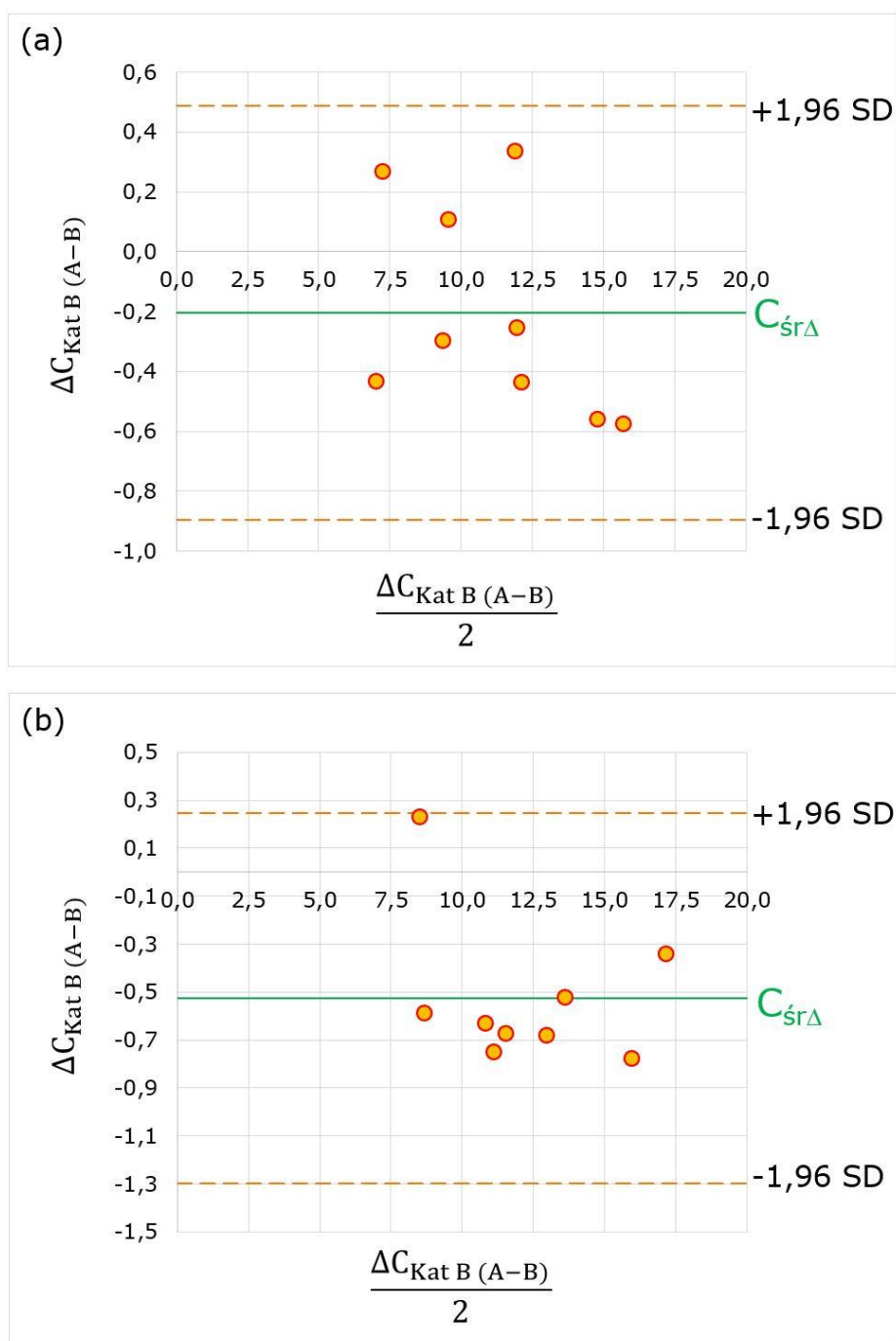
$$PZ = C_{\text{sr}\Delta} \pm 1,96 \cdot SD \quad (18)$$

gdzie:

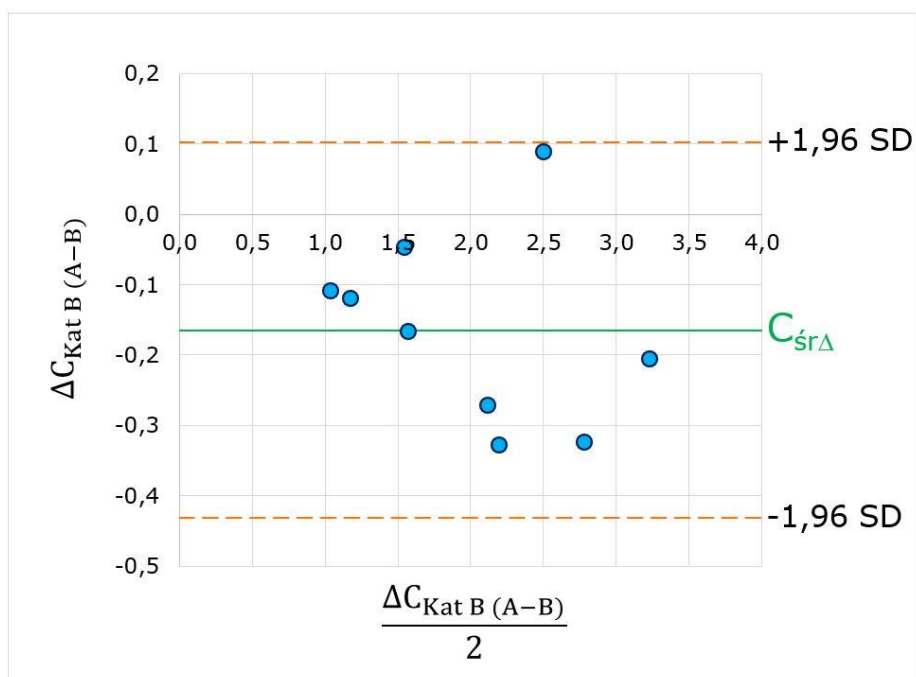
$C_{\text{sr}\Delta}$ – wartość średnia różnic stężeń wyznaczonych dla chipów Au i Ag/Au wszystkich próbek biologicznych [$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$],

SD – odchylenie standardowe dla $C_{\text{sr}\Delta}$ [$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$].

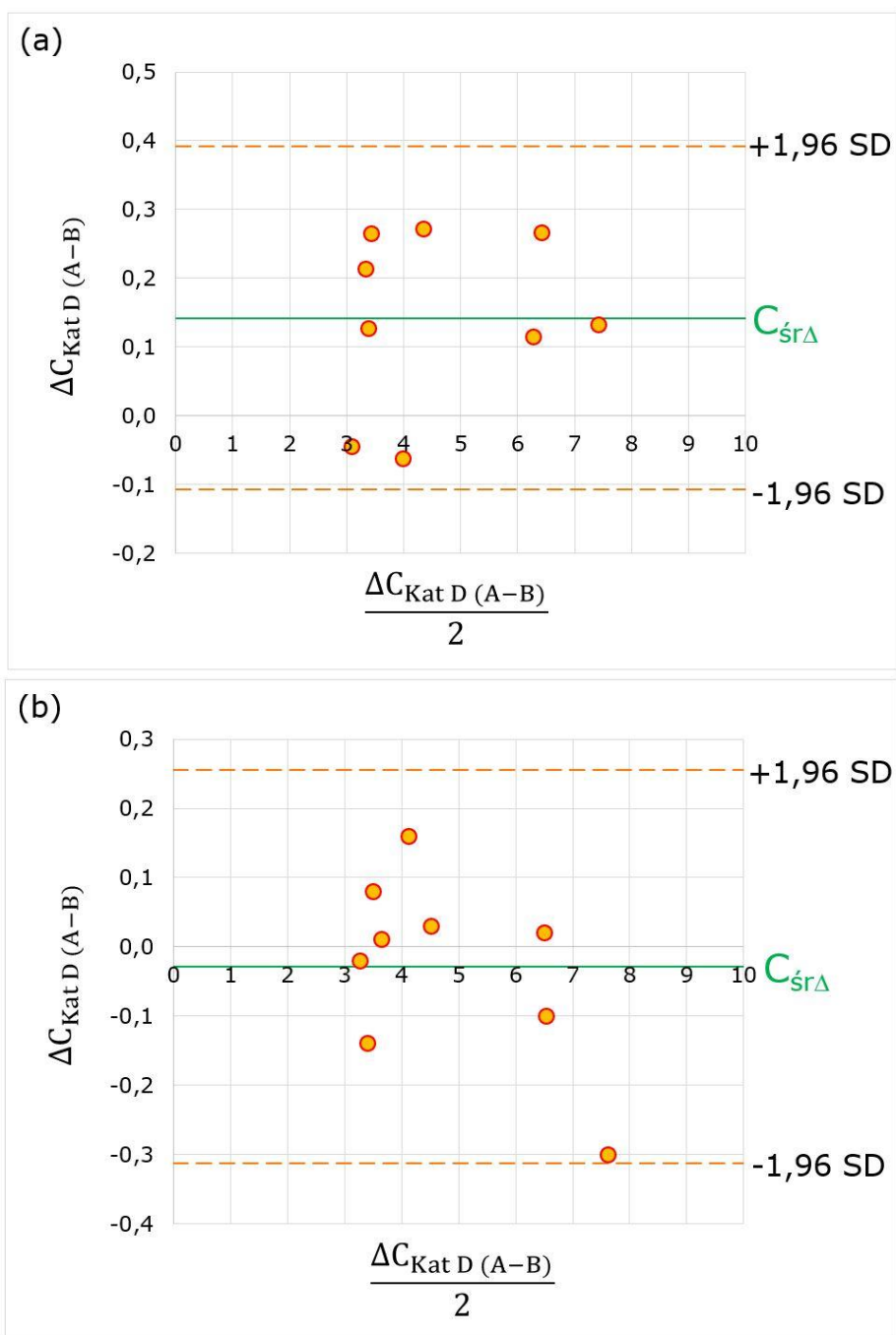
Przedział zgodności zaznaczono na wykresach (rys. 55, 56, 57, 58, 59) przerywaną pomarańczową linią.



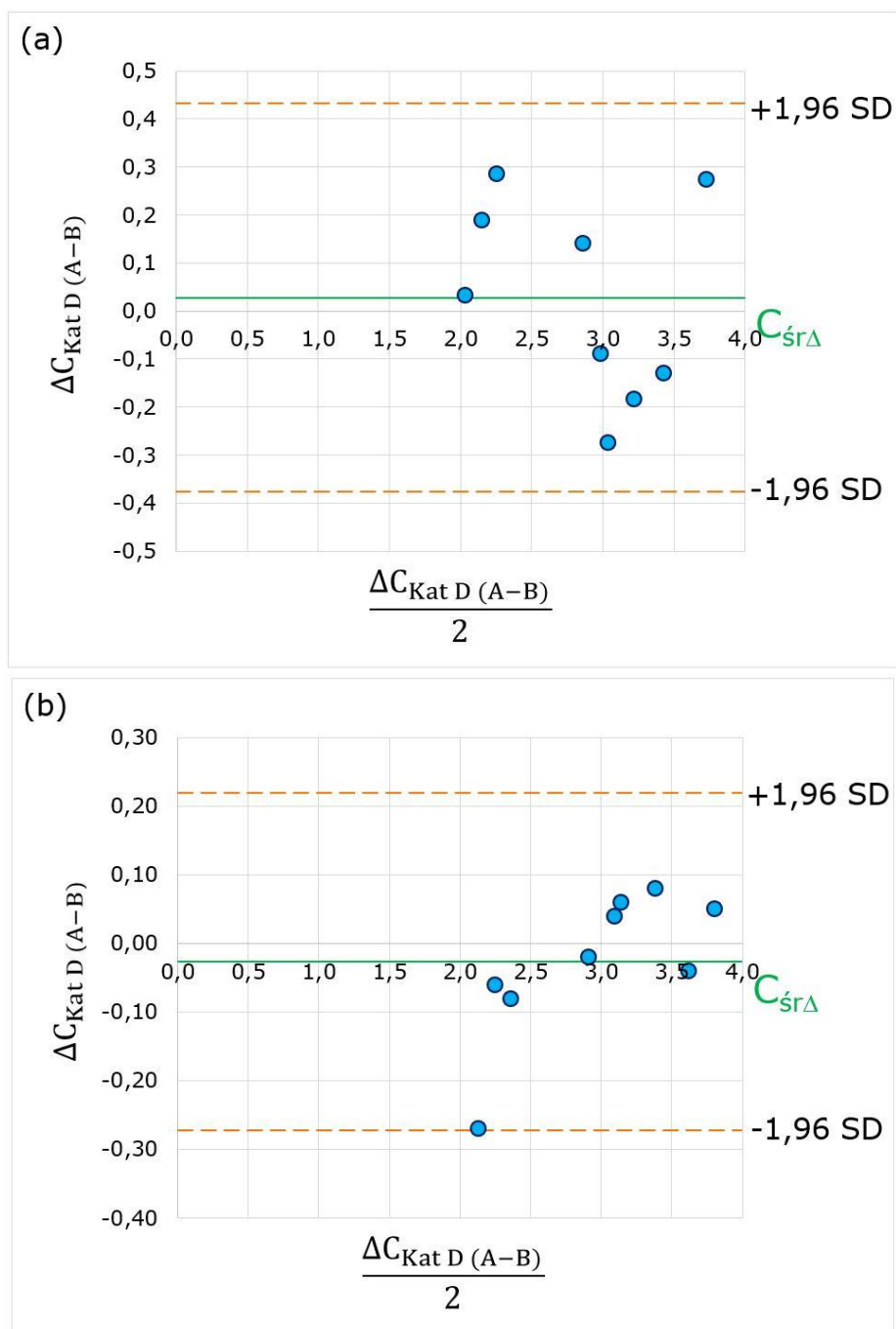
Rys. 55. Wykres Bland–Altman dla **katepsyny B** oznaczenia przeprowadzone na chipach Ag oraz Ag/Au zawierających jednowarstwową maskę polimerową. Oznaczenia przeprowadzono w: (a) grupie pacjentów chorych – oznaczenie katepsyny B w osoczu, (b) grupie pacjentów chorych – oznaczenie katepsyny B w płynie otrzewnowym, $\Delta C_{\text{Kat B (A-B)}}$ – różnica stężeń katepsyny B wyznaczona odpowiednio dla chipów Au (A) i Ag/Au (B), $C_{\text{śrd}\Delta}$ – wartość średnia różnic stężeń wyznaczonych dla chipów Au i Ag/Au wszystkich próbek biologicznych. Opracowanie własne.



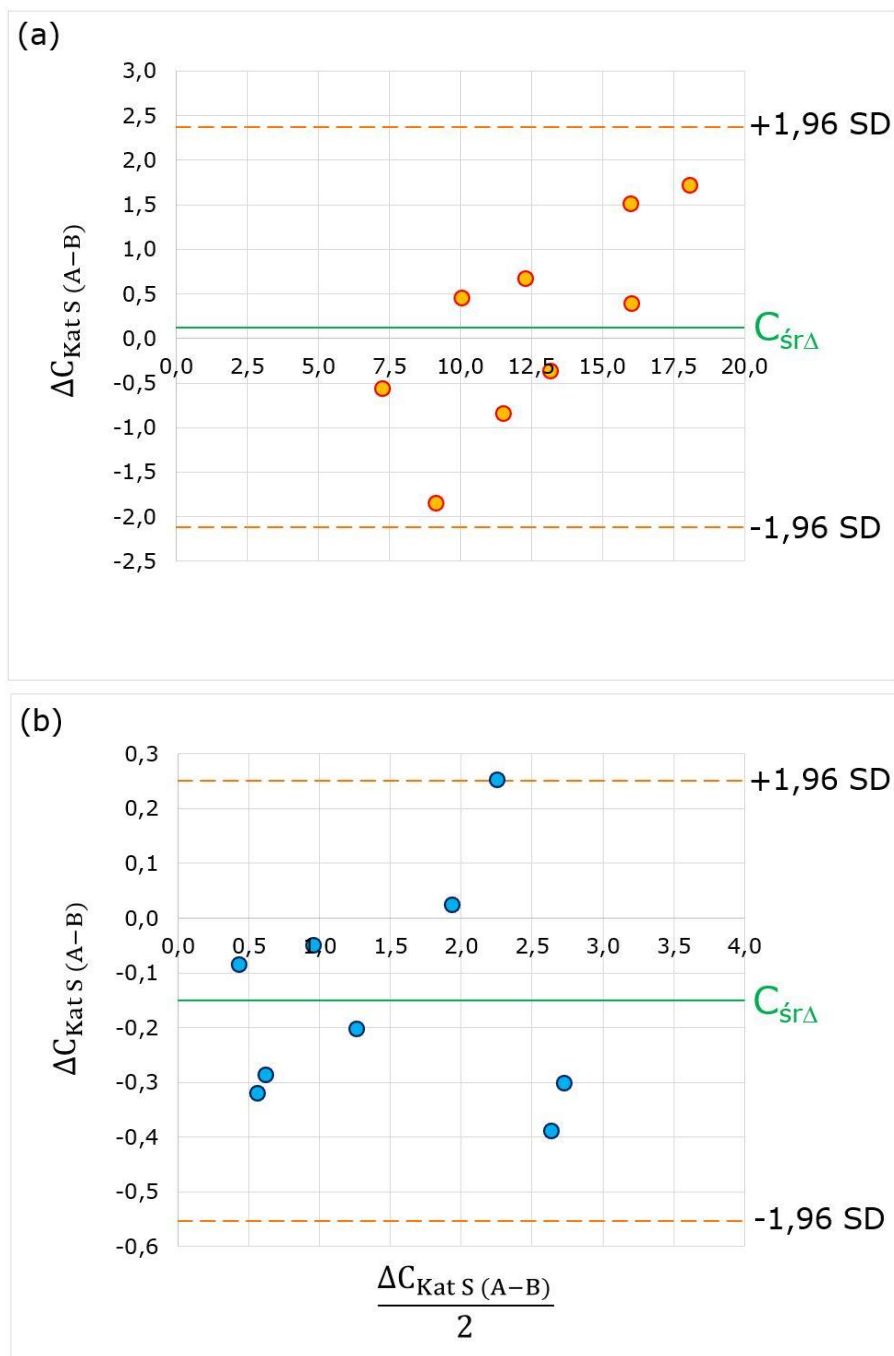
Rys. 56. Wykres Bland–Altman dla **katepsyny B** oznaczenia przeprowadzone na chipach Ag oraz Ag/Au zawierających jednowarstwową maskę polimerową. Oznaczenia przeprowadzono w grupie pacjentów zdrowych (grupa kontrolna) – oznaczenie katepsyny B w osoczu; $\Delta C_{\text{Kat B (A-B)}}$ – różnica stężeń katepsyny B wyznaczona odpowiednio dla chipów Au (A) i Ag/Au (B), $C_{\text{śr}\Delta}$ – wartość średnia różnic stężeń wyznaczonych dla chipów Au i Ag/Au wszystkich próbek biologicznych. Opracowanie własne.



Rys. 57. Wykres Bland–Altman oznaczenia **katepsyny D** przeprowadzonego na chipach Au i Ag/Au, w następujących konfiguracjach: (a) grupa chorych, chip powleczony dwuwarstwową maską polimerową, (b) grupa chorych, chip powleczony maską foliową, $\Delta C_{\text{Kat D (A-B)}}$ – różnica stężeń katepsyny D wyznaczona odpowiednio dla chipów Au (A) i Ag/Au (B), $C_{\text{sr}\Delta}$ – wartość średnia różnic stężeń wyznaczonych dla chipów Au i Ag/Au wszystkich próbek biologicznych. Opracowanie własne.



Rys. 58. Wykres Bland–Altman oznaczenia **katepsyny D** przeprowadzonego na chipach Au i Ag/Au, w następujących konfiguracjach: (a) grupa zdrowych (kontrolna), chip powleczony dwuwarstwową maską polimerową, (b) grupa zdrowych (kontrolna), chip powleczony maską foliową, $\Delta C_{\text{KatD}(A-B)}$ – różnica stężeń katepsyny D wyznaczona odpowiednio dla chipów Au (A) i Ag/Au (B), $C_{\text{sr}\Delta}$ – wartość średnia różnic stężeń wyznaczonych dla chipów Au i Ag/Au wszystkich próbek biologicznych. Opracowanie własne.



Rys. 59. Wykres Bland–Altman oznaczenia katepsyny S przeprowadzonego na chipach Au i Ag/Au, zawierających dwuwarstwową maskę polimerową (a) grupa chorych, (b) grupa zdrowych (kontrolna). $\Delta C_{\text{Kat S (A-B)}}$ – różnica stężeń katepsyny S wyznaczona odpowiednio dla chipów Au (A) i Ag/Au (B), $C_{\text{sr}\Delta}$ – wartość średnia różnic stężeń wyznaczonych dla chipów Au i Ag/Au wszystkich próbek biologicznych. Opracowanie własne.

5. Dyskusja wyników

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie wpływu struktury (układu poszczególnych warstw metalicznych) jak i architektury (rozmieszczenia pól pomiarowych i rodzaju zastosowanych masek rozdzielających) chipa na parametry analityczne metod wykorzystujących biosensory SPRi w oznaczaniu biomarkerów. Punktem wyjścia do analizy charakterystyki nowo skonstruowanego chipa srebrno – złotego Ag/Au był komercyjny standard – chip złoty Au. Dla obu chipów zawierających 3 rodzaje masek rozdzielających wyznaczono szereg parametrów analitycznych na podstawie oznaczeń biomarkerów – katepsyny B, D i S. Charakterystykę porównawczą metod opartych na obu chipach oparto na analizie następujących parametrów:

- przebiegu i zakresie liniowości krzywych kalibracyjnych,
- czułości,
- precyzji i dokładności,
- limitów detekcji i oznaczalności,
- zakresu odpowiedzi liniowej,
- walidacji oznaczeń w próbkach biologicznych.

Poniżej przedstawiono dyskusję ww. parametrów analitycznych na zasadzie porównania metod opartych na chipach Au i Ag/Au w badanych układach analitycznych.

Krzywa kalibracyjna

Dla wybranych układów analitycznych (tabela 12) zbadano zależność sygnału SPRi od stężenia analitów dla obu metod opartych na chipach Au i Ag/Au zawierających trzy rodzaje masek rozdzielających. Wszystkie wykreślone krzywe kalibracyjne posiadały cechę wspólną a mianowicie – wykazały zależność typu Langmuira, która przejawiała się zarysowanym, łagodnym plateau w górnej granicy stężeń analitów. Spowodowana była ona najprawdopodobniej stopniowym wysycaniem aktywnych ligandów (receptorów) na powierzchni chipa cząsteczkami oznaczanego analitu. Kolejną istotną cechą krzywych kalibracyjnych było ich nachylenie, które z reguły było większe dla chipów Ag/Au (niezależnie od rodzaju analitu). Jednakże warto podkreślić, iż wykresy zależności sygnału analitycznego od stężenia biomarkera posiadały pewną powtarzalność. W obrębie jednej metody dla tego samego chipa, nachylenie uzależnione było od rodzaju zastosowanej maski rozdzielającej. Z reguły, największe nachylenie krzywej posiadały metody

z sensorami z jednowarstwową maską polimerową, następnie z chipami z maską foliową i najniższe – z dwuwarstwową maską polimerową.

Zakres liniowy krzywych kalibracyjnych

Z uwagi na występowanie charakterystycznego plateau w zakresie wyższych stężeń analitu, dla obu metod z udziałem różnych chipów wykreślono analitycznie użyteczne zakresy liniowe krzywych kalibracyjnych, dla których z kolei wyznaczono równania dokładnie informujące o ich nachyleniu oraz przecięciu z osiami wykresu. Porównując dane w obrębie jednego typu sensora, zaobserwowano, iż szerokość zakresu liniowego kształtowała się zależnie od rodzaju zastosowanego analitu, i malała w następującym porządku: katepsyna S (największa wartość zakresu: $0,050 - 1,500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), katepsyna D ($0,100 - 1,500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) i katepsyna B ($0,750 - 2,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). W grupie danych dla chipa Au nie zauważono zależności wpływu zastosowanego typu maski rozdzielającej na szerokość zakresu liniowego krzywych kalibracyjnych.

Przebieg zakresów liniowych w przypadku metody z chipem Ag/Au kształtowała się podobnie. Jednakże dla tego chipa nie znaleziono wyraźnej tendencji uzależnienia uśrednionej wartości szerokości zakresu liniowego od rodzaju oznaczanego analitu. Widoczna była natomiast zależność pomiędzy szerokością zakresu a rodzajem zastosowanej maski. Najszerszy zakres liniowy reprezentowały metody wykorzystujące chipy Ag/Au zawierające jednowarstwową maskę polimerową oraz w niektórych przypadkach maskę foliową.

Czułość

Czułość to parametr analityczny procedury oznaczenia, bezpośrednio związany z krzywą kalibracyjną. Jej wielkość określona była wartością współczynnika kierunkowego równania zakresu liniowego krzywej (nachylenie krzywej). Nachylenie krzywych było zróżnicowane przede wszystkim ze względu na rodzaj oznaczanego biomarkera i osiągnęło najwyższe wartości przy oznaczeniu katepsyny D i dwukrotnie niższe przy oznaczeniu katepsyny B i S. Widoczna była ponadto pewna systematyczność w zmianie wartości współczynnika kierunkowego krzywych kalibracyjnych. Jego wartość była zdecydowanie wyższa (zależnie od rodzaju biomarkera) dla metod wykorzystujących chipy Ag/Au niż Au. Ponadto rodzaj zastosowanej maski istotnie wpłynął na kształtowanie nachylenia krzywej, której najbardziej strome nachylenie reprezentowane było przez sensory, których powierzchnia pokryta była jednowarstwową maską polimerową.

Prawdopodobną przyczyną takiego zachowania nowego sensora była odpowiednio dobrana struktura warstw metalicznych a co za tym idzie, zestaw parametrów refraktometrycznych tj. kształt krzywej SPR struktury Ag/Au, głębokość spadku refleksyjności, mała wartość szerokości krzywej w połowie maksimum FWHM oraz przede wszystkim czułość określana przez zmianę wartości refleksyjności przy zmianie kąta padania.

Zauważono ponadto, iż funkcjonowanie nowego chipa, jak również chipa Au, kształtowane było doбором odpowiedniej maski rozdzielającej. Najlepsze wartości parametrów analitycznych uzyskano przy zastosowaniu jednowarstwowej maski polimerowej. Najbardziej prawdopodobną przyczyną takiego zjawiska mógł być sposób aplikacji masek na podłożu metalicznym. Proces druku maski dwuwarstwowej zmuszał do wstępnego pokrycia całej powierzchni metalicznej farbą drukową, która wymywana była w docelowych miejscach pomiarowych (punktach pomiarowych) w kolejnych etapach przygotowania chipa. Można zatem wnioskować, iż wstępny zadruk powłoki farbowej w miejscach pomiarowych mógł pośrednio wpływać na zmiany właściwości fizykochemicznych powierzchni metalu (złota). Etap ten został z kolei całkowicie wyeliminowany w przypadku jednowarstwowej maski polimerowej i foliowej.

Precyzja i dokładność

Przy opisywaniu ww. parametrów posłużono się dwiema wielkościami a mianowicie odchyleniem standardowym lub bardziej miarodajnym względnym odchyleniem standardowym (miara precyzji) oraz odzyskiem (miara dokładności). Z danych zebranych w tabelach 18, 19 i 20 wynikało, iż najlepszą precyzją oraz dokładnością charakteryzowane były metody oparte na chipach srebrno – złotych zawierających jednowarstwową maskę polimerową, dla których wartości względnego odchylenia standardowego osiągały wartość 2 – 6% podczas gdy chipy złote Au powleczone tym samym rodzajem maski osiągały wartości RSD dwukrotnie wyższe.

Dokładność wszystkich metod kształtowała się na tym samym poziomie, jednakże największą dokładność osiągnięto dla metod z chipami srebrno – złotymi z jednowarstwową maską polimerową. Dla tych metod wartość różnicy odzysku względem wartości pożądanej (100%) była najniższa i wyniosła około 0,5 – 1,5%. Dla porównania, wartość różnicy odzysku dla chipów złotych Au w tej samej konfiguracji pomiaru (ten sam analit i architektura chipa) wynosiła od 1,1 – 6,3%.

Maska foliową stanowi równie dobrą alternatywę względem jednowarstwowej maski drukowanej, jednakże w przypadku samoprzylepnego materiału foliowego uzyskiwane są zdecydowanie większe wartości odchyłeń standardowych, a co za tym idzie gorsze parametry dokładności i precyzji. dwuwarstwowa maska polimerowa wpływa negatywnie na wartości parametrów analitycznych oznaczeń biomarkerów, szczególnie na pogorszenie czułości sensorów.

Limity detekcji i oznaczalności

Limit detekcji (LOD – wykrycia analitu w próbce) oraz oznaczalności (LOQ – ilościowego oznaczenia biomarkera) obliczono na podstawie wielkości odchylenia standardowego dla ślepej próby, którą stanowił buforowany roztwór PBS. Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdzono, iż wartość limitów LOD i LOQ kształtowały się w różny sposób uzależniony od rodzaju oznaczanego markera. Najniższą granicę oznaczalności oraz detekcji uzyskano dla metod wykorzystujących chipy srebrno – złote Ag/Au, których wartość wynosiła odpowiednio dla katepsyny D – 0,030 i 0,110 ng·mL⁻¹, katepsyny S – 0,031 i 0,093 ng·mL⁻¹ oraz katepsyny B 0,159 i 0,530 ng·mL⁻¹. Zauważono również, iż w większości przypadków, najlepsze wartości limitów osiągnięto dla metod z chipami pokrytymi jednowarstwową maską polimerową (katepsyna B i D) lub maską foliową (katepsyna S).

Zakres odpowiedzi liniowej

Kolejnym istotnym parametrem był zakres odpowiedzi liniowej metody oznaczenia biomarkerów. Wyznaczono go dla wszystkich metod wykorzystujących chipy pokryte trzema rodzajami masek przy oznaczeniu trzech analitów za pomocą ograniczenia liniowego odcinka krzywej kalibracyjnej wartością limitu oznaczalności (LOQ), wyznaczając tym samym rzeczywisty analitycznie użyteczny zakres krzywej kalibracyjnej. Po głębszej analizie wartości zakresów dla wszystkich układów pomiarowych stwierdzono, iż największy zakres odpowiedzi liniowej posiadała metoda oparta na chipie srebrno – złotym Ag/Au z zadrukowaną jednowarstwową maską polimerową (katepsyna B i D) lub maską foliową (katepsyna S).

Walidacja oznaczeń w próbkach biologicznych

Najistotniejsze porównanie metod opartych na biosensorach utworzonych na chipach Ag/Au i Au dotyczyło walidacji ilościowego oznaczenia katepsyn B, D i S

w próbkach naturalnych pobranych od pacjentów chorych na endometriozę (katepsyna B), glejaka (katepsyna D), raka jajnika (katepsyna S). Dziewięć próbek osocza lub płynu otrzewnowego (zależnie od jednostki chorobowej) od zdrowych dawców i dziewięć próbek od pacjentów z określonym schorzeniem poddano analizie za pomocą metod opartych na chipach Ag/Au i Au z wybranymi architekturami powierzchni (masek rozdzielających). Z przedstawionych danych liczbowych stężeń oraz odpowiadającym im odchyleniom standardowym nie wynikało jednoznacznie czy metoda oparta na chipie srebrno – złotym Ag/Au posiadała podobną (lub lepszą) charakterystykę względem obecnie stosowanego, komercyjnego chipa złotego Au. Aby w miarodajny i przejrzysty sposób sprawdzić i za razem porównać działanie nowego sensora wykreślono krzywe Bland – Altmana, będące powszechnie stosowanym narzędziem do porównywania ze sobą metod oznaczania. Z wykreślonych krzywych wynikało, iż wszystkie wykonane pomiary mieściły się w przedziale zgodności ($C_{\text{sr}\Delta} \pm 1,96 \cdot \text{SD}$), jednakże w przypadku niektórych chipów pokrytych jednowarstwową maską polimerową (rys. 55a, 56, 57a, 58a) lub dwuwarstwową maską polimerową (rys. 59a) rozkład punktów względem średniej różnicy stężeń był dość duży, pojedyncze punkty pomiarowe znajdowały się w pobliżu granicy przedziału zgodności ($\pm 1,96 \cdot \text{SD}$). Jedynie dane dotyczące sensorów zawierających maskę foliową skupione były wokół wartości średniej $C_{\text{sr}\Delta}$.

6. Wnioski

1. Opracowano nowy rodzaj podstawy biosensora stosowanego w metodach z detekcją SPRi zawierający srebro pokryte złotem. Wykazano jego użyteczność analityczną w odniesieniu do trzech biosensorów SPRi oraz pewną przewagę nad klasycznym złotym chipem pod względem parametrów analitycznych.
2. Opracowano dwa nowe rozwiązania architektury chipa polegające na nałożeniu na podstawę chipa polimerowej maski jednowarstwowej lub maski z folii. Porównano efektywność tych nowych rozwiązań z wcześniej stosowaną polimerową maską dwuwarstwową.
3. Dla każdego z trzech biomarkerów: katepsyn B, D i S opracowano 9 nowych wersji biosensorów oraz porównano je z wcześniej stosowanym wariantem maski dwuwarstwowej naniesionej na klasyczną złotą podstawę chipa.
4. Sprawdzono wpływ struktury (układu warstw metalicznych) oraz architektury (rozkładu pól pomiarowych) chipa na parametry analityczne metod oznaczenia potencjalnych biomarkerów – katepsyn B, D i S za pomocą techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging (SPRi).
5. Na podstawie wykonanych pomiarów parametrów analitycznych jak i pełnej walidacji techniki oznaczenia katepsyn B, D i S, stwierdzono, iż nowy chip Ag/Au jest alternatywnym materiałem względem obecnie stosowanego, komercyjnego chipa złotego.
6. Rodzaj zastosowanej maski rozdzielającej miał ogromny wpływ na charakterystykę chipa i jego przetwarzanie (np. regenerację). Najlepsze parametry analityczne dla metod z użyciem badanych chipów oraz łatwiejsze dalsze przetwarzanie chipa uzyskano dla drukowanej jednowarstwowej maski polimerowej. Inne rodzaje masek, np. maska foliowa uniemożliwiają regenerację chipa co sprawia, iż chip staje się materiałem jednorazowego użytku.

7. Najlepsze parametry krzywych kalibracyjnych uzyskano są dla metod z zastosowaniem nowo zdefiniowanego chipa srebrno – złotego Ag/Au powleczonego jednowarstwową maską polimerową. Zakresy liniowe w zależności od rodzaju oznaczanego analitu wyniosły odpowiednio dla katepsyny B: 0,500 – 2,000 ng·mL⁻¹, katepsyny D: 0,050 – 1,500 ng·mL⁻¹, katepsyny S: 0,025 – 1,500 ng·mL⁻¹.
8. Określono charakterystyki analityczne układów pomiarowych dla obu chipów (Ag/Au i Au) poprzez wyznaczenie parametrów czułości, precyzji, dokładności, zakresu odpowiedzi liniowej, jak i limitów detekcji i oznaczalności. Uzyskane wartości pomiarów ponownie potwierdziły, iż najlepsze użyteczne parametry analityczne posiadała metoda oparta na chipie Ag/Au zadrukowanym jednowarstwową maską polimerową.
9. W celu końcowego potwierdzenia i udowodnienia możliwości wykorzystania nowej struktury i architektury chipa Ag/Au jako materiału alternatywnego względem obecnie stosowanego chipa złotego Au, wykonano walidację metod oznaczenia na wybranych architekturach powierzchni obu chipów. Wyniki końcowe przedstawiono w postaci krzywych Bland – Altmana, obrazujących porównanie technik pomiarowych, z których jednoznacznie wynikało, iż nowy materiał chipa Ag/Au może być z powodzeniem zastosowany w metodach oznaczeń potencjalnych biomarkerów.

7. Streszczenie

Celem badań w niniejszej rozprawie doktorskiej było zbadanie wpływu struktury (układu poszczególnych warstw metalicznych) jak i architektury (rozkładu pól pomiarowych) chipa na wybrane parametry analityczne metod oznaczania biomarkerów za pomocą techniki SPRi. W trakcie pracy wprowadzono nowe rozwiązanie materiałowe w postaci chipa Ag/Au, głównie ze względu na zdecydowanie lepsze właściwości plazmoneczne warstwy metalicznej jak i niższy koszt produkcji chipa w odniesieniu do obecnie stosowanego, komercyjnego chipa złotego Au. W zakresie poszukiwań nowych rozwiązań architektury chipa zaproponowano trzy różne rozkłady warstw na powierzchni biosensora: chip z dwuwarstwową maską polimerową obejmującą maskę blokującą oraz maskę rozdzielającą, chip z jednowarstwową maską polimerową zawierającą rozdzielającą hydrofobową maską oraz chip z maską foliową rozdzielającą.

Celem sprawdzenia charakterystyki nowego materiału, jego struktury jak i architektury wykonano szereg oznaczeń biomarkerów na przykładzie trzech metod opartych na biosensorach do oznaczania Katepsyn B, D i S. Jako układy odniesienia zastosowano analogiczne biosensory uformowane na klasycznym komercyjnym chipie złotym Au.

Pełna charakterystyka obu chipów polegała na wyznaczeniu parametrów analitycznych metod oznaczania biomarkerów, przez porównanie krzywych kalibracyjnych poszczególnych układów analitycznych, a także wyznaczenie pozostałych parametrów analitycznych: zakresu liniowego i odpowiedzi liniowej krzywych, czułości, precyzji, dokładności, limitów detekcji i oznaczalności. Jako odnośnik referencyjny badań nowo skonstruowanego chipa zastosowano znane i opisywane w literaturze układy analityczne oznaczania Katepsyn B, D i S na chipie złotym.

Celem sprawdzenia poprawności oznaczeń analitycznych wykonanych przy pomocy biosensorów, których konstrukcja oparta była o nowo zdefiniowany chip srebrno – złoty Ag/Au, dokonano walidacji technik poprzez oznaczenie Katepsyn B, D i S w próbkach biologicznych pobranych od pacjentów chorych na: endometriozę (Katepsyna B), glejaka (Katepsyna D) i raka jajnika (Katepsyna S).

8. Summary in English

The aim of the research in this doctoral dissertation was to investigate the influence of the structure (arrangement of individual metallic layers) and the architecture (distribution of measurement fields) of the chip on selected analytical parameters of the biomarker determination methods using the SPRi technique. In this work, a new material – Ag/Au chip was introduced, mainly due to the significantly better plasmonic properties of the metallic layer and the lower production cost of the chip compared to the currently used, commercial gold Au chip. In the search for new solutions for chip architecture, three different layer layouts on the biosensor surface were proposed: a chip with a two-layer polymer mask including a blocking mask and a separating mask, a chip with a single-layer polymer mask containing a hydrophobic separating mask, and a chip with a separating foil mask.

In order to check the characteristics of new material, its structure and architecture, a number of biomarker determinations were made on the example of three methods based on biosensors for the determination of cathepsins B, D and S. As reference systems, analogous biosensors formed on a classic commercial gold Au chip were used.

The full characterization of both chips consisted in determining the analytical parameters of the biomarker determination methods by comparing the calibration curves of individual analytical systems, as well as determining the remaining analytical parameters: linear and linear response range of the curves, sensitivity, precision, accuracy, detection and determination limits. The analytical systems for determining cathepsins B, D and S on the gold chip, known and described in the literature, were used as a reference for the research on the newly constructed chip.

In order to verify the correctness of analytical determinations made with the use of biosensors, the design of which was based on the newly defined silver-gold Ag/Au chip, the techniques were validated by determining cathepsins B, D and S in biological samples collected from patients suffering from: endometriosis (cathepsin B), glioblastoma (cathepsin D) and ovarian cancer (cathepsin S).

9. Spis literatury

1. Gorodkiewicz, E., Ostrowska, H., Sankiewicz, A., SPR imaging biosensor for the 20S proteasome: sensor development and application to measurement of proteasomes in human blood plasma, *Microchimica Acta*, 175 (2011) 177 – 184
2. Sankiewicz, A., Laudanski, P., Romanowicz, L., Hermanowicz, A., Roszkowska-Jakimiec, W., Debek, W., Gorodkiewicz, E., Development of surface plasmon resonance imaging biosensors for detection of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, *Analytical Biochemistry* 469 (2015) 4 – 11
3. Gorodkiewicz, E., Sankiewicz A., Laudański, P., Surface plasmon resonance imaging biosensors for aromatase based on a potent inhibitor and a specific antibody: Sensor development and application for biological material, *Cent. Eur. J. Chem.* 12 (2014) 557-567.
4. El-Saeed, A. H., Hameed, K. A. E., Azab, M. Y., Obayya, S. S. A., Highly sensitive SPR PCF biosensors based on Ag/TiN and Ag/ZrN configurations, *Optical and Quantum Electronics*, (2019) 51 – 56
5. Liang, G., Luo, Z., Liu, K., Wang, Y., Dai, J., Duan, Y., Fiber optic surface plasmon resonance – based biosensor technique: fabrication, advancement, and application, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 46 (2016) 213 – 223.
6. Brockman, J. M., Nelson, B. P., Corn, R. M., Surface Plasmon Resonance Imaging measurements of ultrathin organic films, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 51 (2000) 41–63
7. Pol, E., The importance of correct protein concentration for kinetics and affinity determination in structure-function analysis, *Journal of Visualized Experiments* 37 (2010) 1 – 17
8. Nakazawa, Y., Takagi, S., Sato, S., Oh-hara, T., Koike, S., Takami, M., Arai, H., Fujita, N., Prevention of hematogenous metastasis by neutralizing mice and its chimeric anti – Aggrus/podoplanin antibodies, *Cancer Sci.* 102 (2011) 2051–2057
9. Audfray, A., Claudinon, J., Abounit, S., Ruvoen-Clouet, N., Larson, G., Smith, D.F., Wimmerova, M., Le Pendu, J., Roemer, W., Varrot, A., Imberty A., Fucose-binding lectin from opportunistic pathogen burkholderia ambifaria binds to both plant and human oligosaccharidic epitopes, *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (2012) 4335 – 4347

10. Granqvist, N., Hanning, A., Eng, L., Tuppurainen, J., Viitala, T., Label-enhanced surface plasmon resonance: a new concept for improved performance in optical biosensor analysis, *Sensors* 13 (2013) 15348-15363
11. Alm, I., García-Linares, S., Gavilanes, J.G., Martínez-del-Pozo, A., Slott, J.P., Cholesterol stimulates and ceramide inhibits Sticholysin II-induced pore formation in complex bilayer membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848 (2015) 925–931
12. Hou, H., Cao, X., PH recycling aqueous two-phase systems applied in extraction of Maitake Glucan and mechanism analysis using low-field nuclearmagnetic resonance, *Journal of Chromatography A*, 1405 (2015) 40–48
13. Chen, J., Park, B., Label-free screening of foodborne Salmonella using surface plasmon resonance imaging, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 5455–5464
14. Hartley-Tassell, E.L., Awad, M.M. Seib, K.L., Scarselli, M., Savino, S., Tiralongo, J., Lyras, D., Day, C.J., Jennings M.P., Lectin activity of the TcdA and TcdB toxins of clostridium, *Infection and Immunity*, 87 (2019) 676-18
15. Lakayana, D., Tuppurainen, J., Albers, M., van Linte, M.J., van Iperen J., Wedag, J.J.A., Kuncova-Kallio, J., Somsen, G.W., Kool, J., Angular scanning and variable wavelength surface plasmon resonance allowing free sensor surface selection for optimum material- and bio-sensing, *Sensors and Actuators B* 259 (2018) 972–979
16. Konopsky, V., Mitko, T., Aldarov, T., Alieva, E., Basmanov, D., Moskalets, A., Matveeva A., Morozova O., Klinov D., Photonic crystal surface mode imaging for multiplexed and high-through put label-free biosensing, *Biosensors and Bioelectronics* 168 (2020) 112575
17. Bullen G., Cross-Reactive SARS-CoV-2 neutralizing antibodies from deep mining of early patient responses, *Frontiers in Immunology*, 12 (2021) 678570
18. Slezak, T., Kossiakoff, A.A., Engineered ultra-high affinity synthetic antibodies for SARS-CoV-2 neutralization and detection, *Journal of Molecular Biology* 433 (2021) 166956
19. Horta, S., -Qu, J.H., Dekimpe, C., Bonneze, Q., Vandebulcke, A., Tellier, E., Kaplanski, G., Delport, F., Geukens, N., Lammertyn, J., Vanhoorelbeke, K., Co(III)-NTA mediated antigen immobilization on a fiber optic-SPR biosensor for detection of autoantibodies in autoimmune diseases: application in immune-

- mediated thrombotic thrombocytopenic purpura, *Anal. Chem.* 92 (2020) 13880–13887
20. Yildizhan, Y., Suresh, V., Geurick, E., Declerck, C., Duskunovic, N., De Sutter D., Noppen, S., Delport, F., ScholsD., Swinnen, J.V., Eyckerman, S., Hendrix, A., Lammertyn, J., Spasic. D., FO-SPR biosensor calibrated with recombinant extra cellular vesicles enables specific and sensitive detection directly in complex matrices, *J Extracell Vesicles.*, 10 (2021) 12059
 21. 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*, 1331 (1997) 131–152
 22. Nelson, B.G., Frutos, A.G., Brockman, J.M., Corn, R.M., Near-infrared surface plasmon resonance measurements of ultrathin films angle shift and SPR imaging experiments, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3928–3934
 23. Xia, L., Yin, S., Gao, H., Deng, Q., Du, C., Sensitivity Enhancement for Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensor by Utilizing Gold–Silver Bimetallic Film Configuration, *Plasmonics* 6, (2011) 245–250
 24. Kihm, K.D., Cheon, S., Park, J.S., Kim, H.J., Lee, J.S., Kim, I.T., Yi, H.J., Surface plasmon resonance (SPR) reflectance imaging: Far-field recognition of near-field phenomena, *Optics and Lasers in Engineering*, 50 (2012) 64–73
 25. Mohamad, N. R., Gan, S. M., Jamil, N. A., Majlis, B. Y., Menon, P. S., Influence of ultrathin chromium adhesion layer on different metal thicknesses of SPR-based sensor using FDTD, *Materials Today: Proceedings*, 7 (2019) 732–737
 26. Chen, S., Liu, L., Zhou, J., Jiang, S., Controlling antibody orientation on charged self-assembled monolayers, *Langmuir* 19 (2003) 2859–2864
 27. Wang, Z., Cheng, Z., Singh, V., Zheng, Z., Wang, Y., Li, S., Song, L., Zhu, J., stable and sensitive silver surface plasmon resonance imaging sensor using trilayered metallic structures, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 1430–1436
 28. Kim, N.H., Choi, M., Kim, T.W., Choi, W., Park, S.Y., Byun, K.M., Sensitivity and Stability Enhancement of Surface Plasmon Resonance Biosensors Based on a Large-Area Ag/MoS₂ Substrate, *Sensors*, 19 (2019) 1894
 29. Nesterenko, D. V., Rehman, S., Sekkat, Z., Surface plasmon sensing with different metals in single- and double-layer configurations. *Appl. Opt.*, 27 (2012) 6673–6682

30. Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006
31. Chen, Y., Ming, H., Review of surface plasmon resonance and localized surface plasmon resonance sensor, *Photonic Sensors* 2 (2012) 37–49
32. Haefnere, P., Luck, E., Mohler, E., Magneto-optical properties of surface plasma waves on copper, silver, gold, and aluminum, *Phys. Stat. Sol.*, 185 (1994) 289
33. Aruna Gandhi, M.S., Chu S., Senthilnathan, K., Babu, R. P., Nakkeeran, K., Li, Q., Recent advances in plasmonic sensor-based fiber, optic probes for biological applications, *Appl. Sci.* 9 (2019) 949
34. Walter J.G., Eilers, A., Malindi Alwis, L.S., Roth B.W., Bremer, K., SPR biosensor based on polymer multi-mode optical waveguide and nanoparticle signal enhancement, *Sensors*, 20 (2020) 2889
35. Homola, J., Yee, S., Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: review, *Sensors and Actuators B*, 54 (1999) 3–15
36. Zeng, S., Baillargeat, D., Hod, H.P., Yong, K.T., Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications, *Chem. Soc. Rev.*, 43 (2014) 3426
37. Abbas, A., Linman, M.J., Cheng, Q., New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 1815–1824
38. Ermini, M.L., Chadtová Song, X., Springer, T., Homola, J., Peptide Functionalization of gold nanoparticles for the detection of carcinoembryonic antigen in blood plasma via SPR-based biosensor, *Frontiers in Chemistry*, 7 (2019) 40
39. Puiu, M., Bala, C., SPR and SPR imaging: recent trends in developing nanodevices for detection and real-time monitoring of biomolecular events, *Sensors*, 16 (2016) 870
40. Kodoyianni V., Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging, *BioTechniques* 50 (2011) 32-40
41. Korhonen, K., Granqvist, N., Ketolainen, J., Laitinen, R., Monitoring of drug release kinetics from thin polymer films by multi-parametric surface plasmon resonance, *International Journal of Pharmaceutics*, 494 (2015) 531-536

42. Patskovsky S., Latendresse, V., Dallaire, A.-M., Doré-Mathieu, L., Meunier, M., Combined surface plasmon resonance and impedance spectroscopy systems for biosensing, *Analyst*, 139 (2014) 596-602
43. Nedelkov, D., Nelson, R.W., Surface plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlooks, *Trends Biotechnol.*, 7 (2003) 301-5
44. Linman, J.L., Abbas, A., Cheng, Q., Interface design and multiplexed analysis with surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy and SPR imaging, *Analyst*, 135 (2010) 2759–2767
45. Gerald Steiner, “Surface plasmon resonance imaging”, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 328–331
46. Choi, J.W., Kang, D.Y., Jang, Y.H., Kim, H.H., Mind, J., Oh, B.K., Ultra-sensitive surface plasmon resonance based immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle–antibody complex, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 313 (2008) 655–659
47. Aksimsek, S., Jussila, H., Sun, Z., Graphene–MoS₂–metal hybrid structures for plasmonic biosensors, *Optics Communications* 428 (2018) 233–239
48. Mariani, S., Ermini, M.L., Scarano, S., Bellissima, F., Bonini, M., Berti, D., Minunni, M., Improving surface plasmon resonance imaging of DNA by creating new gold and silver-based surface nanostructures, *Microchimica Acta* 180 (2013) 1093–1099
49. Cheng, Z., Wang, Z., Gillespie, D. E., Lausted, C., Zheng, Z., Yang, M., Zhu, J., Plain Silver Surface Plasmon Resonance for Microarray application, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1466–1469
50. Oliveiraa, L.C., Moreirac, C.S., Neffa, H., Limaa, A.M.N., Optical properties and instrumental performance of thin noble metal (Cu, Au, Ag) films near the surface plasmon resonance, *Procedia Engineering* 168 (2016) 834 – 837
51. Bhalinge, P., Kumar, S., Jadhav, A., Suman, S., Gujjar, P., Perla, N., Biosensors: nanotools of detection – a review, *International J. of Healthcare and Biomedical Research*, 04 (2016) 26-39
52. D’Agata, R., Spoto G., Surface plasmon resonance imaging for nucleic acid detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 573–584
53. Cennamo, N., Massarotti, D., Conte, L., Zeni, L., Low cost sensors based on SPR in a plastic optical fiber for biosensor implementation, *Sensors*, 11 (2011) 11752-11760

54. Mohamad, N.R., Mei, G.S., Jamil, N.A., Majlis, B.Y., Menon, P.S., Influence of ultrathin chromium adhesion layer on different metal thicknesses of SPR-based sensor using FDTD, *Materials Today: Proceedings* 7 (2019) 732–737
55. Gan, S. M., Menon P. S., Mohamad N. R., Jamil N. A., Majlis B. Y., FDTD simulation of Kretschmann based Cr-Ag-ITO SPR for refractive index sensor, *Materials Today: Proceedings* 7 (2019) 668–674
56. Fernández-González, A., Rychlowska, J., Badía, R., Salzer, R., SPR imaging as a tool for detecting mucin – anti-mucin interaction. Outline of the development of a sensor for near-patient testing for mucin, *Microchimica Acta*, 158 (2007) 219–225
57. Špringer, T., Song, X.Ch., Ermini, M.L., Lamačová, J., Homola, J., Functional gold nanoparticles for optical affinity biosensing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2017) 4087–4097
58. Srivastava, S.K., Verma, R., Gupta, B.D., Theoretical modeling of a self-referenced dual mode SPR sensor utilizing indium tin oxide film, *Optics Communications*, 369 (2016) 131–137
59. Chang, C.C., Chiu, N.F., Lin, D.S., Chu-Su, Y., Liang, Y.H., Lin, C.W., High-sensitivity detection of carbohydrate antigen 15–3 using a gold/zinc oxide thin film surface plasmon resonance-based biosensor, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 1207–1212
60. Peelen, D., Kodoyianni, V., Lee, J., Zheng, T., Shortreed, M.R., Smith, L.M., Specific capture of mammalian cells by cell surface receptor binding to ligand immobilized on gold thin films, *Journal of Proteome Research*, 5 (2006) 1580-1585
61. Baburin, A. S., Merzlikin, A. M., Baryshev, A.V., Ryzhikov, I. A., Panfilov, Y. V., Rodionov, I. A., Silver-based plasmonics: golden material platform and application challenges, *Opt. Mater. Express* 9 (2019) 611-642.
62. Lee, H.J., Nedelkov, D., Robert M., Corn surface plasmon resonance imaging measurements of antibody arrays for the multiplexed detection of low molecular weight protein biomarkers, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 6504-6510
63. Abbas A., Vercaigne-Markoc, D., Supiot, P., Bocquet, B., Vivien, C., Guillochon, D., Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73 (2009) 315–324
64. Abbas, A., Treizebrea, A., Supiot, P., Bourzgui, N.E., Guillochon, D., Vercaigne-Markoc, D., Bocquet, B., Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2009) 154–160

65. Fireman Dutra, R., Kubota, L. T., An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip, *Clinica Chimica Acta*, 376 (2007) 114–120
66. Lee, Y.K., Jan, D.H., Lee, K.S., Kim, W.M., Sohn, Y.S., Enhancing performance of a miniaturized surface plasmon resonance sensor in the reflectance detection mode using a waveguide-coupled bimetallic chip, *Nanoscale Research Letters* 8 (2013) 344
67. Huang, Y., Xu, T., Wang, W., Wen, Y., Li, K., Qian, L., Zhang, X., Liu, G., Lateral flow biosensors based on the use of micro and nanomaterials: a review on recent developments, *Microchimica Acta*, 187 (2020) 70
68. Szymanska, B., Lukaszewski, Z., Hermanowicz-Szamatowicz, K., Gorodkiewicz, E., An immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen by Surface Plasmon Resonance imaging, *Analytical Biochemistry*, 609 (2020) 113964
69. Li, C.T., Lo, K.C., Chang, H.Y., Wu, H.T., Ho, J.H., Yen, T.J., Ag/Au bi-metallic film based color surface plasmon resonance biosensor with enhanced sensitivity, color contrast and great linearity, *Biosens. Bioelectron.*, 36 (2012) 192-198
70. Kasap, S., Capper, P., *Handbook Springer of Electronic and Photonic Materials*, Springer International Publishing AG, 2017
71. Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Marago, M.O., Iati, M.A., Surface plasmon resonance in gold Nanoparticles, *J. Phys. Condens. Matter* 29 (2017)
72. Agarwal, S., Prajapati, Y.K., Singh, V, Influence of metal roughness on SPR sensor performance, *Optics Communications* 383 (2017) 113–118
73. Laibinis, P.E., Fox, M.E., Folkers, J.E., Whitesides, G.M., comparisons of self-assembled monolayers on silver and gold: mixed monolayers derived from HS(CH₂)₂X and HS(CH₂)_nY (X>Y = CH₃, CH₂OH) have similar properties, *Langmuir* 7 (1991) 3167-3173
74. Oldak, L., Sankiewicz, A., Żelazowska-Rutkowska, B., Cylwik, B., Lukaszewski, Z., Skoczylas, M., Gorodkiewicz, E., Two SPRi biosensors for the determination of cathepsin S in blood plasma, *Talanta* 225 (2021) 121900
75. Monteiro, J.P., de OliveirA J.H., Radovanovic, E., Guimarães Brolo, A., Giroto, E.M., Microfluidic plasmonic biosensor for breast cancer antigen detection, *Plasmonics* 11 (2016) 45–51

76. Ferreira, A.L., de Lima, L.F., Moraes, A.S., Rubira, R.J.G., Constantino, C.J.R., Leite, F.J, Delgado-Silva, A.O., Ferreira, M., Development of a novel biosensor for Creatine Kinase (CK-MB) using Surface Plasmon Resonance (SPR), *Applied Surface Science* 554 (2021) 149565
77. Fathil, M.F.M., Md Arshad M.K., Gopinath, S.C.B., Hashim, U., Adzhri, R., Ayub R.M., Ruslinda, A.R., Nuzaihan, M., Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin Biomarkers, *Biosensors and Bioelectronics* 70 (2015) 209–220
78. Gorodkiewicz, E., The surface plasmon resonance imaging sensor for papain based on immobilized cystatin, *Protein Peptide Letters*, 14 (2007) 443–445
79. Guszcz, T., Szymańska, B., Kozłowski, R., Lukaszewski, Z., Laskowski, P., Gorodkiewicz, E., Plasma aromatase as a sensitive and selective potential biomarker of bladder cancer and its role in tumorigenesis, *Oncology Letters* 19 (2020) 562-568
80. Colorado Jr., R., Lee, T. R., Thiol-based self-assembled monolayers: formation and organization, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology* (2001) 9332–9344
81. Gorodkiewicz, E., Surface plasmon resonance imaging sensor for cathepsin determination based on immobilized Cystatin., *Protein Peptide Letters*, 16 (2009) 1379 – 1385
82. Gorodkiewicz, E., Regulska, E., Roszkowska-Jakimiec, W., Determination of the active form concentration of cathepsins D and B by SPRi biosensors, *Journal of Laboratory Diagnostics*, 46 (2010) 107-109
83. Gorodkiewicz, E., Regulska, E., Wojtulewski, K., Development of an SPR imaging biosensor for determination of cathepsin G in saliva and white blood cells, *Microchimica Acta*, 173 (2011) 407-413
84. Mrozek, P., Gorodkiewicz, E., Falkowski, P., Hosiło, B., Sensitivity analysis of single- and bimetallic surface plasmon resonance biosensors, *Sensors*, 21 (2021) 4348
85. Huang, L., Reekmans, G., Saerens, D., Friedt, J.M., Frederix, F., Francis, L., Muyldermans, S., Campitelli, A., van Hoof, C., Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 483–490

86. Thevenot, D., Toth, K., Durst, R., Wilson, G., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001) 121–131
87. Mahmudin, L., Suharyadi, E., Utomo¹, A.B.S., Abraha, K., Optical properties of silver nanoparticles for surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor applications, *Journal of Modern Physics*, 6 (2015) 1071-1076
88. Gorton, L., Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells, *Electroanalysis*, 7 (1995) 23-45
89. Tran, Q.H., Nguyen, V.Q., Le, A.T., Corrigendum: Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 9 (2018) 049501
90. Kholoud, M.M., El-Nour, A., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., Reda, Ammar, A.A., Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry* 3 (2010) 135–140
91. Pyatenko, A., Yamaguchi, M., Suzuki, M., Synthesis of Spherical Silver Nanoparticles with Controllable Sizes in Aqueous Solutions, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 7910-7917
92. Špringer, T., Homola, J., Biofunctionalized gold nanoparticles for SPR-biosensor-based detection of CEA in blood plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2869–2875
93. Shabania, A., Tabrizian, M., Design of a universal biointerface for sensitive, selective and multiplex detection of biomarkers using surface plasmon resonance imaging , *Analyst*, 138 (2013) 6052
94. Springer, T., Ermini, M.L., Spackova, B., Jablonku, J., Homola, J., Enhancing sensitivity of surface plasmon resonance biosensors by functionalized gold nanoparticles: size matters, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10350–10356
95. Gorodkiewicz, E., Breczko, J., Sankiewicz, A., Surface Plasmon Resonance Imaging biosensor for cystatin determination based on the application of bromelain, ficin and chymopapain, *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 50 (2012) 130–136
96. Chen, R., Kan, L., Duan, F., He, L., Wang, M., Cui, J., Zhang, Z., Zhang, Z., Surface plasmon resonance aptasensor based on niobium carbide MXene quantum dots for nucleocapsid of SARS-CoV-2 detection, *Microchimica Acta*, 188 (2021) 316

97. Wang, L., Li, T., Du, Y., Chen, C., Li, B., Zhou, M., Dong*, S., Au NPs-enhanced surface plasmon resonance for sensitive detection of mercury(II) ions, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 2622–2626
98. Wang, J.H., Zhou, H.S., Aptamer-Based Au nanoparticles-enhanced surface plasmon resonance detection of small molecules, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7174–7178
99. Tassa, C.L., Duffner, J.L., Weissleder, R.L., Schreiber, S.L., Koehler, A.N., Shaw, S.Y., Binding affinity and kinetic analysis of targeted small molecule-modified nanoparticles, *Bioconjugate Chem.*, 21 (2010) 14–19
100. Yeshchenko, O. A., Malynych, S. Z., Polomarev, S. O., Galabura, Yu., Chumanov, G., Luzinov, I., Towards sensor applications of a polymer/Ag nanoparticle nanocomposite film, *RSC Adv.*, 9 (2019) 8498
101. Pawula, M., Altintas, Z., Tothill, I.E., SPR detection of cardiac troponin T for acute myocardial infarction, *Talanta*, 146 (2016) 823–830
102. Fireman Dutra, R., Kubota, L.T., An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip, *Clinica Chimica Acta* 376 (2007) 114–120
103. Wu, Q., Li, S., Sun, Y., Wang, J., Hollow gold nanoparticle-enhanced SPR based sandwich immunoassay for human cardiac troponin I, *Microchim. Acta* 184 (2017) 2395–2402
104. Massona, J.F., Obandoa, L., Beaudoin, S., Booksh, K., Sensitive and real-time fiber-optic-based surface plasmon resonance sensors for myoglobin and cardiac troponin I, *Talanta* 62 (2004) 865–870
105. Kurita, R., Yokota, Y., Sato, Y., Mizutani F., Niwa, O., On-Chip enzyme immunoassay of a cardiac marker using a microfluidic device combined with a portable surface plasmon resonance system, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 5525-5531
106. Breault-Turcot, J., Poirier-Richard, H.P., Couture, M., Pelechacz, D., Masson, J.F., Single chip SPR and fluorescent ELISA assay of prostate specific antigen, *Lab. Chip*, 15 (2015) 4433
107. Szymańska, B., Lukaszewski, Z., Hermanowicz-Szamatowicz, K., Gorodkiewicz, E., A biosensor for determination of the circulating biomarker CA125/MUC16 by surface plasmon resonance imaging, *Talanta* 206 (2020) 120187

108. Ribauta, C., Loyeza, M., Larrieuc, J.C., Chevineau, S., Lambert, P., Remmelink, M., Wattieza, M., Caucheteur, C., Cancer biomarker sensing using packaged plasmonic optical fiber gratings: Towards in vivo diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 92 (2017) 449-456
109. Chiu, N.F., Lin, T.L. Kuo, C.T. Highly sensitive carboxyl-graphene oxide-based surface plasmon resonance immunosensor for the detection of lung cancer for cytokeratin 19 biomarker in human plasma, *Sensors and Actuators B*, 265 (2018) 264–272
110. Wang, H., Wang, X., Wang, J., Fu, W., Yao, C., A SPR biosensor based on signal amplification using antibody-QD conjugates for quantitative determination of multiple tumor markers, *Nature Scientific Reports*, 6 (2016) 33140
111. Sankiewicz, A., Lukaszewski, Z., Trojanowska, K., Gorodkiewicz E., Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor, *Analytical Biochemistry*, 515 (2016) 40-46
112. Lee, Y.K., Lee, K.S., Kim, W.K., Sohn, Y.S., Detection of Amyloid-b42 using a waveguide-coupled bimetallic surface plasmon resonance sensor chip in the intensity measurement mode, *Plos One*, 9 (2014) 98992
113. Vestergaard, M., Kerman, K., Kimc, D.K., Hiep, H.M., Tamiya, E., Detection of Alzheimer's Tau protein using localized surface plasmon resonance-based immunochip, *Talanta*, 74 (2008) 1038–1042
114. Kim, S., Wark, A.W., Lee, H.J., Femtomolar detection of tau proteins in undiluted plasma using surface plasmon resonance, *Anal. Chem.* 88 (2016) 7793–7799
115. Hegnerová, K., Bocková. M., Vaisocherová, H., Kristofíková, Z., Homola, J., Surface plasmon resonance biosensors for detection of Alzheimer disease biomarker *Sensors and Actuators B*, 139 (2009) 69–73
116. Hea, Q., Chena, Y., Shena, D., Cuia, X., Zhanga, C., Yanga, H., Zhonga, W., Ereminb, A.S., Fanga, Y., Zhao, S., Development of a surface plasmon resonance immunosensor and ELISA for 3-nitrotyrosine in human urine, *Talanta*, 195 (2019) 655–661
117. Singh, A.S., Bajaj, T., Gupta, D., Sing, S.B., Chakrawarty, A., Goyal, V., Dey, A.B., Dey, S., Serum mortalin correlated with α -synuclein as serum markers in Parkinson's disease: a pilot study, *Neuromolecular Medicine* 20 (2018) 83–89

118. Eddin, F.B.K., Fen, Y.W., The principle of nanomaterials based surface plasmon resonance biosensors and its potential for dopamine detection, *Molecules* 25 (2020) 2769
119. Djaileb, A., Charron, B., Jodaylami, M.H., Thibault, V., Coutu, J., Stevenson, K., Forest, S., Live, L.S., Boudreau, D., Pelletier, J.N., Masson, J.F., A rapid and quantitative serum test for SARS-CoV-2 antibodies with portable surface plasmon resonance sensing, Cambridge University Press, 2020
120. Haddada, M.B., HU, D., Salmain, M., & Zhang, L., Peng, C., Wang, Y., Liedberg, Bo., Boujday, S., Gold nanoparticle-based localized surface plasmon immunosensor for staphylococcal enterotoxin A (SEA) detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 6227–6234
121. Chang, Y.F., Wang, W.H., Hong, W.Y., Yuan, R.Y., Chen, H.K., Huang, Y.W., Lu, L., Chen, H.Y., Chen, A., Su, C.L., Wang, F.S., Simple strategy for rapid and sensitive detection of avian influenza a H7N9 virus based on intensity-modulated spr biosensor and new generated antibody, *Anal. Chem.*, 90 (2018) 1861–1869
122. Chen, J., Park, B., Label-free screening of foodborne Salmonella using surface plasmon resonance imaging, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 5455–5464
123. Lee, J.H., Kim, B.C., Oh, B.H., Choi, J.W., Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1, *Biology, and Medicine* 9 (2013) 1018–1026
124. Riedel, T., Surman, F., Hageneder, S., Pop-Georgievski, O., Noehammer, C., Hofner, M., Brynda, E., Rodriguez-Emmenegger, C., Dostálek, J., Hepatitis B plasmonic biosensor for the analysis of clinical serum samples *Biosensors and Bioelectronics* 85 (2016) 272–279
125. Briand, V.A. Thilakarathne, V., Kasi, R.V., Kumar, C.V., Novel surface plasmon resonance sensor for the detection of heme at biological levels via highly selective recognition by apo-hemoglobin, *Talanta* 99 (2012) 113–118
126. Choi, K.B., Youn, H.J., Ha, Y.C., Kim, K.J., Choi, J.D., Detection of cholera cells using surface plasmon resonance sensor, *Journal of Microbiology*, 36 (1998) 43-48
127. Rinke, T., Koch C., *Photolithography: Basics of Microstructuring*, Micro Chemicals, 4000. Edition, 2017
128. Falkowski, P., Mrozek, P., Miluski, P., Łukaszewski, Z., Gorodkiewicz, E., A comparison of various chips used for the manufacture of biosensors applied in

- non-fluidic array SPRi, based on the example of determination of Cathepsin D, *Biosensors* 12 (2022) 21
129. Falkowski, P., Mrozek, P., Łukaszewski, Z., Ołdak, L., Gorodkiewicz, E., An immunosensor for the determination of cathepsin s in blood plasma by array SPRi – a comparison of analytical properties of silver–gold and pure gold chips, *Biosensors* 11 (2021) 298
 130. Mirkovic, B., Premzl, A., Hodnik, V., Doljak, B., Jevnikar, Z., Anderluh, G., Kos, J., Regulation of cathepsin B activity by 2A2 monoclonal antibody, *FEBS Journal* 276 (2009) 4739–4751
 131. Cimerman, N., Brguljan, P.M., Krasovec, M., Suskovic, S., Kos, J., Circadian and concentration profile of cathepsin S in sera from healthy subjects and asthmatic patients, *Eur. J. Physiol* (2001) 442
 132. Cox, J.M., Troutt, J.S., Knierman, M.D., Siegel, R.W., Qian, Y.W., Ackermann, B.L., Konrad, R.J., Determination of cathepsin S abundance and activity in human plasma and implications for clinical investigation, *Analytical Biochemistry* 430 (2012) 130–137
 133. Bland, J.M., Altman, D.G., Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *The Lancet*, 1986

10. Dorobek naukowy

Wykaz publikacji naukowych:

1. Ewa Gorodkiewicz, Paweł Falkowski, Anna Sankiewicz, Zbigniew Figaszewski, Analytical applications of electrode sensitive to labetalol in pharmaceuticals, CEJC 3 (2003) 242–259
2. Piotr Mrozek, Ewa Gorodkiewicz, Paweł Falkowski, Bogusław Hościło, Sensitivity analysis of single - and bimetallic surface plasmon resonance biosensors, Sensors 2021, 21, 4348
3. Paweł Falkowski, Zenon Łukaszewski, Ewa Gorodkiewicz, Potential of surface plasmon resonance biosensors in cancer detection, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 194 (2021) 113802
4. Paweł Falkowski, Piotr Mrozek, Zenon Łukaszewski, Łukasz Ołdak, Ewa Gorodkiewicz, An immunosensor for the determination of cathepsin s in blood plasma by array SPRi – a comparison of analytical properties of silver–gold and pure gold chips biosensors 2021, 11, 298
5. Paweł Falkowski, Piotr Mrozek, Piotr Miluski, Zenon Łukaszewski, Ewa Gorodkiewicz, A comparison of various chips used for the manufacture of biosensors applied in non-fluidic array SPRi, based on the example of determination of Cathepsin D, Biosensors 2022, 12, 21

Złożone wnioski patentowe:

1. Piotr Mrozek, Ewa Gorodkiewicz, Paweł Falkowski, Bogdan Wyrwas, Zenon Łukaszewski, „Chip immunosensora dla powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging.” Zgłoszenie patentu na wynalazek oznaczone sygnaturą nr P.438864 [WIPO ST 10/C PL438864] z dnia 2021-09-01.

Uczestnictwo w konferencjach naukowych:

1. Paweł Falkowski, Ewa Gorodkiewicz, Influence of sensor structure on selected analytical parameters in technique of surface plasmon resonance – review, XVI Interdyscyplinarna Konferencja Bioanalizy, CECE Gdańsk, 2019
2. Paweł Falkowski, Ewa Gorodkiewicz, Piotr Mrozek, Zróżnicowanie struktury chipa jako parametr modulujący właściwości analityczne biosensora SPRi czułego na

katępsynę S, XI Ogólnopolska Konferencja Postępów w Badaniach Biomedycznych,
Warszawa 2021