ДЕТЕКЦИЯ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ОСНОВАННАЯ НА РЕГИСТРАЦИИ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

©2015 г.

Д. В. СОТНИКОВ, А. В. ЖЕРДЕВ, Б. Б. ДЗАНТИЕВ

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

I. Введение. II. Принцип работы ППР-сенсоров. III. Методы возбуждения ППР. IV. Сравнительная характеристика детекторов ППР. V. Схемы проведения анализа. VI. Повышение чувствительности ППР-сенсоров. VII. Повышение производительности ППР-сенсоров. VIII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) используется в биохимии более трех десятилетий. Образование межмолекулярных комплексов на границе раздела двух сред сопровождается изменением показателя преломления одной из них, что приводит к модуляции параметров ППР, регистрируемой детектором [1]. Фактически ППР-детекторы являются рефрактометрами. На основании ППР разработано множество сенсорных систем, ставших эффективными инструментами как для изучения межмолекулярных взаимодействий, так и для решения практических аналитических задач.

Методы, основанные на ППР, привлекают исследователей, прежде всего, возможностью регистрации взаимодействий без использования меток, высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью результатов. Процессы массопереноса между

Принятые сокращения: ППР – поверхностный плазмонный резонанс; ЛППР – локальный поверхностный плазмонный резонанс; ППРи – ППР-имиджинг; RIU – refractive index unit; RU – resonance unit.

Адрес для корреспонденции: dzantiev@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект No 14-14-01131).

средой и сенсорной поверхностью в ходе образования и диссоциации межмолекулярных комплексов регистрируются в виде зависимости сигнала сенсора от времени (сенсограммы). На основании этих зависимостей можно рассчитать кинетические и равновесные константы реакции комплексообразования. Данные об изменениях сенсограмм при различных температурах позволяют вычислить термодинамические характеристики реакции: изменения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии [2].

Технология ППР-детекции носит универсальный характер и позволяет регистрировать взаимодействия как низкомолекулярных объектов, так и макромолекул, их агломератов, вирусов и даже целых клеток. Это обусловило интенсивное применение метода в фундаментальных исследованиях, медицине, экологическом мониторинге, контроле безопасности пищевых продуктов и других областях [2, 3]. В последнее время значительные усилия направлены на совершенствование ППР-техники — увеличение чувствительности детекции [4] и создание систем для одновременной регистрации многих взаимодействий [5]. Практическая реализация этих разработок обеспечит еще более широкое применение ППР-методов.

В данном обзоре кратко описывается принцип ППР-анализа, рассмотрены наиболее распространенные способы возбуждения ППР, различные типы детекторов. Особое внимание уделено новым решениям для высокочувствительного и производительного ППР-анализа.

ІІ. ПРИНЦИП РАБОТЫ ППР-СЕНСОРОВ

Плазмоны — это псевдочастицы, представляющие собой кванты колебаний электронного газа в проводящем материале. Резонансное возбуждение таких колебаний электромагнитной волной в тонком слое проводящего материала, помещенного между двух сред с разными показателями преломления, получило название «поверхностный плазмонный резонанс» [1].

В подавляющем большинстве случаев для возбуждения ППР используется система, состоящая из прозрачного материала с высоким показателем преломления (например, кварца [6]) и нанесенной на его поверхность тонкой золотой пленки. Противоположная сторона пленки контактирует с анализируемой средой. Преимущественное использование золота в таких системах обусловлено высокой химической устойчивостью этого металла [7].

Возникновение ППР возможно при соблюдении условий полного внутреннего отражения [1]. Явление полного отражения основано на

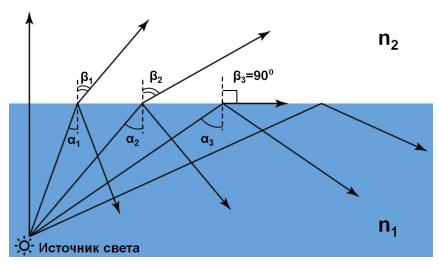


Рис. 1. Эффект полного внутреннего отражения.

 n_1 и n_2 – показатели преломления двух сред ($n_1 > n_2$). α_i – углы падения, β_i – углы преломления. Углы со значением $> \alpha_3$ называются углами полного внутреннего отражения (в данном диапазоне углов преломленных лучей не существует).

том, что при прохождении света из более оптически плотной среды в менее оптически плотную преломленный луч отклоняется от нормали к поверхности раздела сред (угол преломления больше угла падения). Если увеличить угол падения настолько, что угол преломления станет больше 90 градусов, то свет не сможет проникнуть вглубь среды с меньшим показателем преломления, и большая часть световой энергии (при низкой экстинкции) отразится от поверхности раздела сред (рис. 1).

Электрическое поле фотонов все же проникает в менее оптически плотную среду, но лишь на расстояние порядка длины волны света. Если при этом на границе раздела находится слой проводящего материала с толщиной меньше длины волны возбуждающего света, то проникающее в него электромагнитное поле вызывает колебания свободных электронов (рис. 2). Для эффективного возбуждения таких колебаний частота света должна быть ниже собственной частоты колебаний электронов (плазменной частоты) [8, 9]. Поэтому при возбуждении ППР в металлических пленках используется свет с частотой видимого и ближнего инфракрасного диапазона спектра, так как плазменная частота большинства металлов находится в ультрафиолетовой области.

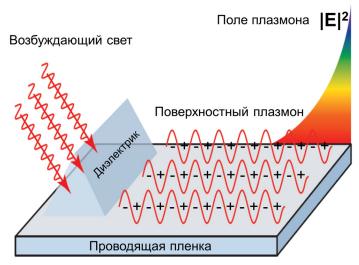


Рис. 2. Возбуждение поверхностного плазмона на проводящей пленке.

Резонансное поглощение энергии света электронными колебаниями возникает при условии равенства вектора импульса поверхностного плазмона и проекции вектора импульса фотона на границу раздела сред [10]. Параметры первого из этих векторов зависят от свойств проводника и показателей преломления граничащих с ним сред, а второго – от частоты и угла падения света. Если выполняются условия резонанса, то интенсивность отраженного света резко уменьшается вследствие перехода части энергии световой волны в энергию плазмона.

Минимальные изменения показателя преломления в приграничной области, вызванные изменением состава среды, приводят к изменениям условий ППР. Это позволяет, регистрируя параметры отраженной волны, в режиме реального времени детектировать образование комплексов на границе сред. Регистрируемыми параметрами могут быть резонансная частота возбуждающего света при фиксированном угле падения луча или резонансный угол падения луча при фиксированной частоте, а также амплитуда или фаза света. Первые два типа ППР-детекции называют также спектроскопией поверхностных плазмонов с частотными и угловыми спектрами, соответственно [11].

Еще одно условие эффективного возбуждения плазмона связано с поляризацией возбуждающего света. Колебания электронов в основном возбуждаются под действием электрической составляющей

электромагнитной волны. Поэтому сильнее всего с электронами в проводящей пленке взаимодействует плоскополяризованная волна, у которой вектор электрического поля параллелен плоскости падения. Вектор магнитного поля в этом случае колеблется параллельно границе раздела. Такую волну называют р-поляризованной, π -поляризованной, волной H-типа, TM-волной (Transverse Magnetic). В противоположность этому s-поляризованная волна имеет вектор электрического поля E, перпендикулярный плоскости падения. s-Поляризованную волну также называют σ -поляризованной, сагиттально поляризованной, волной E-типа, TE-волной (Transverse Electric)*.

Поскольку s-поляризованная волна слабо взаимодействует с плазмоном, в ППР-системах в основном используют свет с p-поляризацией [12]. Исключение составляют ППР-детекторы с фазовой модуляцией, в которых регистрируются различия фазы p- и s-поляризованных волн после взаимодействия с плазмоном [13].

Чувствительность ППР к изменению показателя преломления зависит от амплитуды поля плазмонной волны, которое экспоненциально уменьшается при удалении от поверхности. По этой причине ППР наиболее чувствителен к изменениям непосредственно на границе раздела сред. Для описания толщины чувствительного слоя используется понятие глубины проникновения поля — расстояния от поверхности, на котором амплитуда поля уменьшается в е (основание натурального логарифма) раз. Этот параметр возрастает при увеличении длины волны. Например, для системы золото—диэлектрик с показателем преломления 1,32 мы можем, варьируя длину волны возбуждающего света от 600 до 1000 нм, увеличить глубину проникновения поля от 100 до 600 нм [14].

ІІІ. МЕТОДЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ ППР

Как отмечалось выше, резонансное возбуждение плазмона происходит при условии равенства вектора импульса поверхностного плазмона и проекции вектора импульса фотона на границу раздела сред (иногда это требование формулируют как равенство волновых векторов). Однако обычно импульс плазмонов больше, чем фотонов [9]. Поэтому для возникновения ППР используют специальные приспособления (согласующие устройства), увеличивающие импульс фотонов. Исключением является возбуждение ППР в металлических

^{*} Обозначения p- и s- были введены на основании немецких слов parallel и senkrecht (параллельный и перпендикулярный).

частицах нанометрового размера — оно не требует дополнительных приспособлений. В качестве согласующих устройств используются призмы, волноводы и дифракционные решетки, реже другие приспособления, например, фотонные кристаллы [14, 15]. Рассмотрим наиболее распространенные методы возбуждения ППР:

ППР С ПРИЗМЕННЫМИ СОГЛАСУЮЩИМИ УСТРОЙСТВАМИ

В пионерских работах Отто [16] и Кречмана [17] ППР возбуждался светом, проходящим через призмы из диэлектрика с высоким показателем преломления. В схеме Кречмана вышедший из призмы свет попадает на пленку металла, нанесенную на нижнюю границу призмы, и, отражаясь от нее, направляется в детектор. Обратная сторона металлической пленки контактирует с анализируемой средой (рис. 3, A). В схеме Отто свет отражается от границы раздела призмы и анализируемой среды, а слой металла помещается вблизи этой границы (рис. 3, Б). В ППР-анализе преимущественно используются призменные согласующие устройства с геометрией Кречмана, что обусловлено простотой их реализации и высокой эффективностью возбуждения плазмонов [18]. Призменные согласующие устройства могут сочетаться с любыми типами ППР-детекторов: измеряющими резонансный угол, резонансную частоту, интенсивность или фазу отраженного света.

ППР С ВОЛНОВОДНЫМИ СОГЛАСУЮЩИМИ УСТРОЙСТВАМИ

Благодаря эффекту полного внутреннего отражения свет может распространяться внутри оптического волновода — прозрачного канала, изготовленного из материала с высоким показателем преломления. Если на поверхность такого канала нанести металлическую пленку, то поле световой волны может возбудить на внешней границе пленки поверхностный плазмон (рис. 3, В). Чаще всего такие ППР-системы реализуются в виде оптоволоконных каналов с металлическим покрытием на сенсорном участке [19]. ППР-детекторы в системах с волноводными согласующими устройствами могут работать в режиме модуляции фазы, частоты или амплитуды, но не угловой модуляции [20].

ППР С ДИФРАКЦИОННЫМИ РЕШЕТКАМИ

Вместо сплошных металлических покрытий для возбуждения плазмонов можно использовать металлическую дифракционную решетку с периодом меньше длины волны света. Регистрация межмолекулярных взаимодействий в таких устройствах осуществляется посредством измерения параметров дифрагированного света и

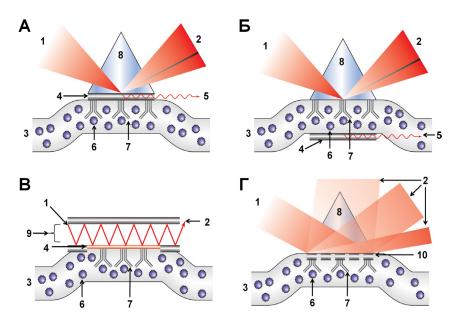


Рис. 3. Схемы ППР-сенсоров с разными типами согласующих устройств: (A) – с призмой из диэлектрика в конфигурации Кречмана; (Б) – с призмой из диэлектрика в конфигурации Отто; (В) – с волноводом; (Г) – с дифракционной решеткой. 1 – возбуждающий свет; 2 – отраженный свет; 3 – анализируемая среда; 4 – металлическая пленка; 5 – поверхностный плазмон; 6 – аналит; 7 – рецептор; 8 – призма из диэлектрика с высоким показателем преломления; 9 – волновод; 10 – дифракционная решетка.

сравнения характеристик лучей разного порядка дифракции. ППР-сенсоры с дифракционными решетками очень разнообразны: они могут работать как в режиме пропускания, так и в режиме отражения, а возбуждающий свет может падать непосредственно на сенсорную поверхность или с противоположной стороны от нее. Как и ППР-сенсоры с призменными согласующими устройствами, ППР-сенсоры с дифракционными решетками могут сочетаться с любыми типами детекторов [21–23]. На рис. 3, Г в качестве примера приведена схема ППР-сенсора с дифракционной решеткой в режиме отражения.

ЛОКАЛЬНЫЙ ППР

Особого рассмотрения требует возбуждение поверхностных плазмонов внутри металлических частиц, размер которых меньше длины волны возбуждающего света. Такие плазмоны представляют собой кванты коллективных колебаний электронов, сходных с колебаниями гармонического осциллятора, относительно положительно заряжен-

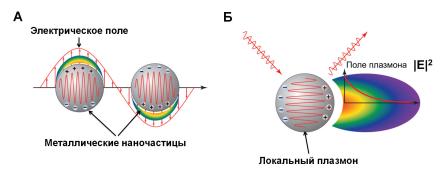


Рис. 4. Возбуждение ЛППР электрическим полем (А) и распределение интенсивности поля вокруг наночастицы с возбужденным плазмоном (Б).

ных ядер (рис. 4). В отличие от плазмонов, в протяженных структурах колебания не распространяются, поэтому их резонансное возбуждение получило название локальный поверхностный плазмонный резонанс (ЛППР).

Моделирование ЛППР с использованием теории светорассеяния Ми показывает [24], что для его возникновения не требуется никаких согласующих устройств. Изменение состава среды вокруг наночастиц смещает резонансную частоту электронных осцилляций и пик экстинкции в спектре света, проходящего через раствор наночастиц. Это смещение используется для мониторинга процессов комплексообразования на поверхности наночастиц.

IV. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕКТОРОВ ППР

Классификация ППР-детекторов основана на параметрах световой волны, которые они измеряют. Соответственно различают четыре типа регистрирующих устройств, основанных на измерении угла отражения, частоты, интенсивности и фазового сдвига света.

Основными характеристиками ППР-детекторов являются чувствительность, разрешение, предел детекции и динамический диапазон [14].

Чувствительность ППР-детектора — отношение изменения сигнала сенсора к изменению показателя преломления [25]. Показатель преломления измеряется в RIU (refractive index unit), а сигналом детектора могут быть резонансный угол, резонансная длина волны, интенсивность или фазовое смещение отраженного света. Поэтому для разных типов ППР-детекторов единицы измерения чувствительности различаются [4].

Разрешение ППР-детектора — отношение стандартного отклонения шума к чувствительности. Разрешающая способность, в отличие от чувствительности, для всех типов ППР-детекторов измеряется в одних и тех же единицах — RIU. [13, 25]. При этом, поскольку при одинаковом значении шума повышение чувствительности сенсора влечет за собой снижение его разрешения, сенсоры с меньшим разрешением считают более чувствительными.

Нижний предел детекции – концентрация аналита, которая вызывает изменение сигнала сенсора, равное трем стандартным отклонениям фонового сигнала [25]. Часто его называют просто пределом детекции.

Динамический диапазон – диапазон значений, в котором определяемый параметр может быть достоверно измерен [26, 27]. Следует отличать динамический диапазон от рабочего диапазона – диапазона значений, в котором определяемый параметр может быть измерен с заранее заданной точностью [27].

В таблице разные типы ППР-детекторов сопоставлены по аналитическим характеристикам. Как видим, по убыванию разрешающей способности ППР-детекторы располагаются следующим образом:

- 1. Измерение интенсивности,
- 2. Измерение резонансной длины волны,
- 3. Измерение резонансного угла отражения,
- 4. Измерение фазового сдвига.

По убыванию динамического диапазона сенсоры располагаются в следующем порядке:

- 1. Измерение резонансной длины волны,
- 2. Измерение резонансного угла отражения,
- 3. Измерение интенсивности,
- 4. Измерение фазового сдвига.

Детекторы с измерением резонансного угла благодаря простоте реализации, высокой чувствительности и широкому рабочему диапазону на сегодняшний день получили наибольшее распространение [13, 14]. Детекторы, основанные на измерении фазового сдвига, обладают наибольшей разрешающей способностью, но их главный недостаток — узкий диапазон измеряемых величин [13].

Существуют методики, позволяющие расширить динамический диапазон детекторов фазового сдвига до $0.06\,\mathrm{RIU}$ при разрешении $2.2\times10^{-7}\,\mathrm{RIU}$ [4, 28, 29]. В результате их динамический диапазон становится сопоставимым с динамическим диапазоном детекторов с измерением интенсивности, а разрешающая способность по-прежнему превосходит разрешающую способность большинства детекторов.

Таблица. **Аналитические параметры разных типов** ППР-детекторов

Titil Actoriopos				
Тип детектора	Измерение интенсив- ности	Угловая ППР- спектро- скопия	Частотная ППР- спектро- скопия	Измерение фазового сдвига
Типичное раз- решение (/RIU)	10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	4×10 ⁻⁸
Типичная ширина дина- мического диапазона (/RIU)	0.05	0.1	>0.1	5×10 ⁻⁴
Типичная чувстви- тельность	15000 %/RIU	200 Deg/RIU	10000 nm/RIU	100000 deg./RIU
Возможность повышения производи- тельности	Высокая	Средняя	Средняя	Высокая

Одно из наиболее важных направлений совершенствования ППР-сенсоров — повышение их производительности. Наиболее производительными являются системы ППР-имиджинга (см. раздел VII), в которых в основном применяются детекторы, регистрирующие модуляцию интенсивности или фазовые сдвиги отраженного света. Возможен и ППР-имиджинг с угловой и частотной модуляцией, но такие приборы значительно сложнее и уступают конкурентам по производительности [13, 14].

Как видим, выбор конкретного типа детектора определяется спецификой решаемой задачи: для определения аналитов в низких концентрациях предпочтительны детекторы фазового сдвига или угловая ППР-спектроскопия; для детекции широкого диапазона концентраций — частотная или угловая ППР-спектроскопия; для высокопроизводительного анализа — измерение интенсивности или фазового сдвига отраженного света.

V. СХЕМЫ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Первой стадией ППР-анализа является модификация сенсорной поверхности для придания ей способности специфически связывать аналит. Для этого на ней иммобилизуют рецепторные молекулы: антитела, пептиды, нуклеиновые кислоты и др. [30–33]. Связывание рецепторных молекул с сенсорной поверхностью может проводиться с помощью различных ковалентных [34–39] и нековалентных [40–45] методов иммобилизации.

После модификации поверхности на ней проводят реакции специфического взаимодействия лиганд-рецептор. В зависимости от состава образующихся на сенсорной поверхности комплексов и порядка связывания компонентов различают четыре основные схемы проведения ППР-анализа [5].

Изменение показателя преломления вблизи сенсорной поверхности увеличивается с увеличением массы молекул, связанных с поверхностью. Поэтому, если анализируемые объекты имеют большую массу (> 5 кДа), их связывание с модифицированной поверхностью сенсора приводит к значительному изменению показателя преломления в приграничной области. Этот формат анализа называют прямым.

Если аналит имеет несколько потенциальных сайтов связывания с рецепторными молекулами, то после комплексообразования на твердой фазе у него остаются свободные валентности. Обычно это также относится к крупным объектам. Свободные валентности могут образовывать комплексы с рецептором в растворе, что приводит к дополнительному росту сигнала за счет увеличения массы, связанной с поверхностью. В результате аналит в комплексе оказывается заключен между двумя и более рецепторными молекулами. Такой формат называется «сэндвич» и применяется для более чувствительной детекции.

Низкомолекулярные соединения при связывании слабо изменяют показатель преломления, поэтому их сложно детектировать методом ППР напрямую. В таких случаях прибегают к конкурентному или ингибирующему анализу [14]. В первом случае аналит конъюгируется с более крупным носителем, а на поверхности сенсора иммобилизуется рецептор. Конъюгированный и свободный аналит смешиваются и конкурируют за связывание с рецептором. Во втором случае в анализируемый раствор добавляется фиксированная концентрация рецептора, а на поверхности иммобилизуется аналит или его конъюгат. Если в анализируемом растворе присутствует свободный аналит, он связывается с рецептором, препятствуя взаимодействию рецептора с модифицированной поверхностью. Ингибирующий анализ является

разновидностью конкурентного анализа, но часто выделяется в отдельный формат.

Отметим, что в прямом и «сэндвич»-анализе наблюдается прямая зависимость детектируемого сигнала от концентрации аналита, а в конкурентном и ингибирующем — обратная.

VI. ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ППР-БИОСЕНСОРОВ

Существенным ограничением ППР-сенсоров является низкая чувствительность при определении низкомолекулярных соединений. Предел детекции большинства коммерческих ППР-сенсоров соответствует поверхностной плотности связанного с чипом белкового аналита порядка $1~\text{пг/mm}^2$. Именно такая степень заполнения поверхности обычно соответствует одной единице изменения сигнала, измеряемого в резонансных единицах (resonance unit – RU) [1].

Однако значительное количество задач требует детектирования низкомолекулярных соединений в чрезвычайно низких концентрациях. В этих случаях необходимо прибегать к дополнительным способам повышения чувствительности, которые могут потребовать значительного изменения конструкции сенсора или введения дополнительных меток.

В данном разделе мы будем в основном сравнивать ППР-сенсоры по параметру разрешения, так как, в отличие от чувствительности, разрешение различных типов ППР-сенсоров измеряется в одних и тех же единицах – RIU (см. раздел IV). Однако, поскольку понижение разрешения сенсора, как правило, приводит к росту его чувствительности и снижению предела детекции [4], для простоты будем использовать словосочетание «методы повышения чувствительности».

МЕТОЛЫ ИЗМЕРЕНИЯ ФАЗОВОГО СДВИГА

Как уже отмечалось, наиболее чувствительными из ППР-сенсоров являются системы с измерением фазового сдвига, возникающего вследствие взаимодействия луча с поверхностными плазмонами. Поэтому само по себе использование такой техники может рассматриваться как способ увеличения чувствительности. Основная трудность применения данного подхода заключается в том, что, в отличие от других параметров, регистрируемых в ППР-сенсорах, фаза света не может быть измерена напрямую вследствие его высокой частоты (порядка 10¹⁴ Гц для видимого света). В связи с этим фазовый сдвиг вследствие взаимодействия с поверхностным плазмоном изме-

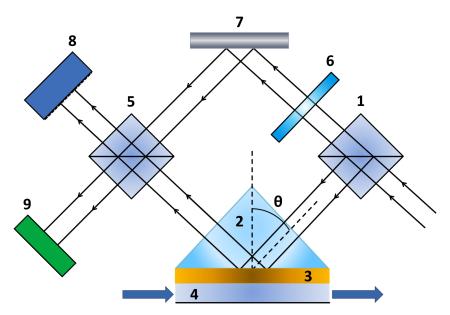


Рис. 5. Принципиальная схема ППР-интерферометра: 1, 5 — светоделительные кубики; 2 — призмы; 3 — золотая пленка; 4 — газовая камера; 6 — поглощающий фильтр; 7 — зеркало; 8 — ССD-матрица; 9 — широкоапертурный диод.

Рисунок подготовлен с учетом [46].

ряется опосредованно с помощью явления интерференции. Ниже мы рассмотрим основные приемы таких измерений.

Анализ интерференционного узора

В 1997 г. Кабашин и Никитин предложили устройство, основанное на использовании интерферометра Маха-Цендера для анализа интерференционного узора с целью определения фазового сдвига при ППР [46,47]. Принцип метода заключался в том, что исходный лазерный луч разделялся на две составляющие: сигнальную и опорную (рис. 5). Сигнальный луч направлялся в ячейку для ППР, где р-поляризованный компонент луча претерпевал фазовый сдвиг, тогда как опорный луч отражался от зеркала без изменений. Оба луча затем направлялись на детектор, где интерферировали с образованием характерного узора, на основании анализа которого рассчитывали фазовый сдвиг. Эксперимент показал, что обмен Ar и N_2 газов в ППР-ячейке приводит к смещению фазы отраженного света $0,6-0,7\,\pi$, что соответствует пределу обнаружения 4×10^{-8} RIU.

В последующих работах описан ряд ППР-сенсоров с использованием альтернативных интерферометров (интерферометры Михельсона [48], Фабри-Перо [49] и др.), кристаллов двойного лучепреломления [50, 51], фазовых пластин [52], призм Волластона [53] и других приспособлений.

Эллипсометрия

Поскольку s- и p-компоненты световой волны по-разному взаимодействуют с поверхностными плазмонами, то после такого взаимодействия изменяются параметры эллипса поляризации. Методы, регистрирующие эти изменения, носят название эллипсометрии [13].

При условиях ППР р-компонента световой волны претерпевает значительные изменения амплитуды и фазы, тогда как s-компонента практически не меняется. Таким образом, изменение поляризации и, соответственно, сигнал эллипсометра формируют два процесса: поляризационный контраст, связанный с изменением разности амплитуд s- и p-компонент, и фазовый контраст, связанный с их фазовым сдвигом [54].

Интерференционная картина на поверхности детектора сама по себе может дать информацию о параметрах поляризации. Однако, используя различные фазовые замедлители и поляризационные модуляторы, можно отфильтровывать шумы и тем самым повышать точность измерений [13]. В некоторых случаях применение эллипсометрии в ППР-сенсорах позволяет добиться разрешения по показателю преломления до 3.7×10^{-8} RIU [55, 56].

Гетеродины

Еще одним способом измерения фазового сдвига является применение гетеродинов — устройств, работа которых основана на «биении». Рассмотрим природу этого явления.

Если частота одной волны немного отличается от частоты другой волны, их интерференция приводит к тому, что амплитуда суммарной волны по ходу луча периодически увеличивается и уменьшается. Тогда у огибающей суммарной волны частота становится в несколько раз меньше частоты исходных волн (рис. 6). Величина частоты огибающей волны зависит от разности частот исходных волн. Данная схема наложения волн может применяться несколько раз последовательно в одном устройстве. В результате можно получить огибающую волну с частотой на несколько порядков ниже исходной и регистрировать её фазу с помощью фазового измерителя [57].

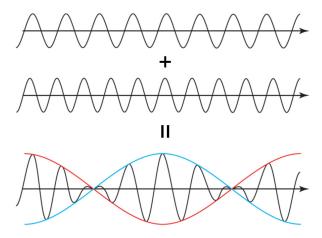


Рис. 6. Сложение волн с близкими частотами (эффект «биения»).

Именно такую схему регистрации фазового сдвига использовали Ли и соавт. [58] в анализаторе, продемонстрировавшем рекордное на сегодняшний день разрешение по показателю преломления, равное 2.8×10^{-9} RIU. При измерении взаимодействия на поверхности чипа модельной пары мышиные IgG – антимышиные IgG это соответствовало пределу детекции 10 фг/мл (67 аМ).

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ МОДУЛЯЦИИ ИНТЕНСИВНОСТИ

Строго говоря, методы эллипсометрии в ППР-сенсорах, описанные выше, можно отнести в равной степени и к методам модуляции фазы, и к методам модуляции интенсивности, поскольку изменение амплитуды сигнала влияет на параметры эллипса поляризации так же, как и фазовый сдвиг. Среди ППР-сенсоров с модуляцией интенсивности такие сенсоры наиболее чувствительны. Если же интенсивности измеряется напрямую, регистрация модуляции интенсивности (амплитуды) характеризуется средним разрешением в 10⁻⁵ RIU и оказывается наименее чувствительной. Однако чувствительность ППР-сенсоров с модуляцией интенсивности может быть повышена, например, при использовании двух источников излучения с разными длинами волн. В такой системе сенсорный сигнал определяется на основании разности интенсивности отраженных лучей с различными длинами волн. Разрешение сенсора по показателю преломления при этом повышается до 2×10⁻⁶ RIU [59].

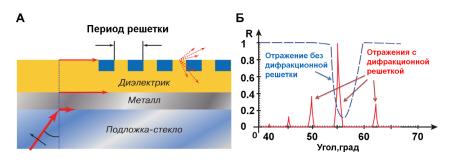


Рис. 7. ППР-сенсор с угловой модуляцией с дополнительной дифракционной решеткой. Схемы подготовлены с учетом [60].

А – Принципиальная конструкция сенсора.

 $\mathsf{F}-\mathsf{C}\mathsf{p}$ авнение угловых спектров сенсоров с дифракционной решеткой и без нее.

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ РЕЗОНАНСНОГО УГЛА

Чувствительность измерения резонансного угла – одна из наиболее высоких в ППР-технике, но и она может быть повышена. Чувствительность ППР-анализа с угловыми спектрами зависит прежде всего от точности определения положения резонансного максимума. А точность положения резонансного максимума зависит от его ширины и формы кривой углового спектра поглощения. Поэтому сужение резонансного спектра существенно повышает чувствительность анализа. Так, поместив дополнительную дифракционную решетку вблизи сенсорной поверхности ППР-анализатора с угловым сканированием, мы получим вместо одного широкого резонансного максимума набор узких пиков, соответствующих дифрагированным лучам разного порядка (рис. 7). Таким способом линии поглощения на угловой диаграмме излучения значительно - до тысячи раз - сужаются по сравнению с исходными. Дальнейшее повышение чувствительности ограничивается шириной спектра источника излучения, шумами и тепловым дрейфом аппаратуры [60].

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ РЕЗОНАНСНОЙ ЧАСТОТЫ

Чувствительность ППР-сенсоров, работающих в режиме модуляции длины волны, может быть повышена, если в качестве детекторов использовать спектрофотометры с Фурье-преобразованием. Такие ППР-сенсоры благодаря высокой точности измерения длины волны

более чувствительны, чем стандартные ППР-сенсоры с измерением резонансного угла или резонансной частоты [61]. Данный подход используется, например, в сенсоре SPR100 производства компании GWC Technologies.

Хомола и соавт. [62] разработали ППР-сенсор с частотной модуляцией, основанный на использовании полихроматического света и архитектуры с множеством параллельных каналов считывания. В этом приборе полихроматический световой пучок коллимировался и направлялся на согласующую призму. Отразившись от множества сенсорных каналов, световые пучки направлялись в различные измерительные входы спектрографа. Такая реализация ППР-сенсора позволила достичь разрешения до 2×10^{-7} RIU.

Для ППР-сенсоров с частотной модуляцией серебряные пленки обеспечивают большую чувствительность по сравнению с золотыми [63]. Однако химически серебро менее устойчиво. Поэтому весьма успешно применяются биметаллические (серебряные с золотым покрытием) пленки, позволяющие сохранить стабильность чипа и обеспечить пятикратный рост чувствительности измерений [64].

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Использование длинноволновых поверхностных плазмонов

Еще в 1981 г. Сарид теоретически показал [65], что в тонкой металлической пленке, заключенной между двумя слоями диэлектрика с близкими показателями преломления, могут возникать две моды поверхностных плазмонов с симметричным и антисимметричным профилями поля (рис. 8). Появление этих мод — следствие взаимодействия двух поверхностных плазмонов на противоположных сторонах металлической пленки, у которой толщина сопоставима с глубиной проникновения поля поверхностных плазмонов. Для симметричного поверхностного плазмона константа распространения и затухание при утолщении металлической пленки увеличиваются, а для антисимметричного — уменьшаются. Поскольку антисимметричный плазмон затухает быстрее, чем симметричный, первый принято называть коротковолновым поверхностным плазмоном, а второй — длинноволновым.

Поле симметричного поверхностного плазмона проникает в диэлектрическую среду значительно глубже, чем поле антисимметричного поверхностного плазмона или поле обычного поверхностного плазмона, возникающего на одной границе металл—диэлектрик. Поэтому возникновение длинноволнового плазмона приводит к зна-

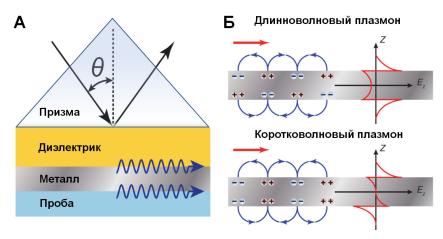


Рис. 8. Возбуждение поверхностных плазмонов.

А – Схема возбуждения.

Б – Распределение зарядов и профили напряженности поля в коротковолновых и длинноволновых плазмонах.

чительному усилению интенсивности электромагнитного поля, что может повысить чувствительность ППР. Например, Хомола и соавт. [66] предложили усовершенствованную конфигурацию ППР-сенсора с возбуждением длинноволновых плазмонов, в которой достигалось разрешение 3×10^{-8} RIU.

Повышение чувствительности с помощью нанопокрытий

ППР с нанодиэлектрическим слоем. Лахав и соавт. [67] предложили использование в ППР-сенсоре дополнительного диэлектрического слоя толщиной 10–15 нм, помещаемого между металлом и анализируемой средой. Одним из необходимых условий повышения чувствительности таким способом является высокий показатель преломления диэлектрика. При наличии тонкого слоя диэлектрика с высоким показателем преломления возбуждение поверхностных плазмонов на поверхности металла сопровождается возникновением частично канализированных волн, что приводит к усилению электромагнитного поля и повышению чувствительности сенсора. При увеличении толщины диэлектрического слоя на порядок он превращается в полноценный волновод, но чувствительность значительно падает из-за большого расстояния от плазмона до сенсорной поверхности. Поэтому высокочувствительные измерения требуют малой толщины дополни-

тельного диэлектрического слоя. Так, использование серебряной пленки и 10-нанометрового силиконового нанопокрытия повышает чувствительность анализа в 4 раза [67].

Графеновое покрытие сенсорной поверхности. Использование графена в качестве дополнительного покрытия сенсорной поверхности также увеличивает чувствительность ППР-сенсоров. Как показано Ву и соавт. [68], усиление сигнала в этом случае обеспечивает перенос заряда с графена на поверхность золота. При этом интенсивность поля на сенсорной поверхности возрастает, что делает сенсор более чувствительным к изменению ближайшего окружения. Жанг и соавт. [69] продемонстрировали 4-кратное снижение предела детекции человеческих IgG в ППР-сенсоре с использованием в качестве чувствительной поверхности золотой пленки, покрытой оксидом графена.

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ

Поскольку сигнал ППР-сенсора напрямую зависит от количества и массы объекта, связанного с поверхностью, а поле поверхностной волны проникает в среду на расстояние до нескольких сотен нанометров, чувствительность ППР-анализа возрастает при мечении взаимодействующих молекул наночастицами. В качестве меток могут использоваться наночастицы металлов (например, золота или серебра), оксидов металлов (например, оксиды железа), углеродные нанотрубки, латексные частицы и липосомы, а также комбинированные препараты из разных наночастиц [70]. Такое мечение повышает чувствительность измерений в сотни раз. Рассмотрим подробнее особенности применения разных видов наночастиц.

Металлические наночастицы. Наночастицы благородных металлов часто используются в качестве усилителей в ППР-сенсорах. Важным преимуществом металлических наночастиц является двойной механизм усиления ППР — за счет увеличения массы на сенсорной поверхности и за счет взаимодействия полей поверхностных плазмонов на металлической пленке сенсора и собственных электронов наночастицы (совмещение ППР—ЛППР). Эффективность сопряжения полей зависит от расстояния между наночастицей и поверхностью, размера и формы наночастицы [70—72].

Наибольшее распространение получили золотые наночастицы благодаря высокой стабильности, хорошо отработанным методикам функционализации, а также возможности получения частиц с контролируемым размером и формой. Лион и соавт. продемонстрировали [73] 25-кратное усиление ППР золотыми наночастицами, детектируя в прямом формате анализа до 6.7 пМ человеческого иммуноглобулина G.

Данный метод успешно применяется и при конкурентном определении низкомолекулярных соединений. В качестве усилителей можно использовать конъюгаты золотых наночастиц со специфическими антителами, однако, как показано Урусовым и соавт. на примере определения охратоксина А [74], наилучшие результаты достигаются при непрямом усилении с помощью сочетания немодифицированных специфических антител и конъюгата золотых наночастиц с антивидовыми антителами (рис. 9). Использование такого конъюгата позволило значительно уменьшить концентрацию специфических антител и благодаря этому понизить предел детекции охратоксина А более чем в 10 раз — до 60 пг/мл.

Оригинальное усиление сигнала ППР-сенсора предложили Као и соавт. [75] при определении антител против декарбоксилазы глутаминовой кислоты (glutamic acid decarboxylase – GAD) – маркера для диагностики инсулин-зависимого диабета. Они использовали конъюгат золотых наночастиц с ковалентно пришитыми антивидовыми антителами и пероксидазой хрена. Первая стадия усиления заключалась во взаимодействии этого конъюгата и комплекса (GAD – антитела против GAD). Затем добавляли раствор, содержащий 3,3'-диаминобензидин (DAB) и ${\rm H_2O_2}$. Пероксидаза катализировала окисление DAB пероксидом с образованием преципитата и дополнительным усилением сигнала. Такой подход позволил снизить предел детекции на четыре порядка и детектировать антитела в концентрации до 200 фМ.

Магнитные наночастицы. Функционализированные магнитные наночастицы, такие как $\mathrm{Fe_3O_4}$, также активно используются для усиления сигнала в ППР-сенсорах. Их главными преимуществами являются меньшая стоимость по сравнению с частицами благородных металлов и возможность проведения манипуляций с помощью магнитного поля. Такие частицы могут образовывать на сенсорной поверхности агрегаты, значительно изменяя показатель преломления и, как следствие, значительно усиливая сигнал.

Химическая функционализация магнитных наночастиц хорошо отработана и позволяет получать коньюгаты с различными рецепторными молекулами. Например, Терамкура и соавт. [76] разработали систему детекции натрийуретического пептида (маркера сердечной недостаточности) с амплификацией коньюгатом магнитных наночастиц со стрептавидином. Предел детекции составил 25 пг/мл, тогда как без усиления он равнялся 10 нг/мл. Поллет и соавт. [77] описали анализ с усилением коньюгатом магнитных наночастиц со специфическими антителами, повышающим чувствительность

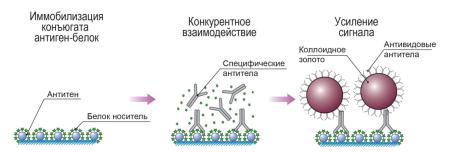


Рис. 9. Схема усиления сигнала ППР-анализа золотыми наночастицами.

определения аллергена арахиса Ara h1 в 100 раз (до 90 пг/мл). Ванг и соавт. [78] в «сэндвич»-анализе тромбина использовали наночастицы оксида железа, модифицированные аптамерами. Предел детекции тромбина составил 17 пМ (без усиления -27 нМ).

Углеродные нанотрубки. Ли и соавт. [79] использовали коньюгаты специфических антител с углеродными нанотрубками для ППР-детекции человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и человеческого эритропоэтина. Они продемонстрировали более чем 30-кратное усиление ППР-сигнала по сравнению с методикой, в которой использовались немеченые специфические антитела. Предел детекции обоих аналитов в анализе с усилением равнялся 100 пг/мл.

Латексные наночастицы были самыми первыми наноматериалами, использованными в качестве усилителей в ППР-анализе. Они привлекли внимание благодаря большому размеру и массе, которые значительно изменяют показатель преломления среды вблизи сенсорной поверхности. Еще в 1993 г. Северс и Шасфурт предложили усиление ППР функционализированными латексными частицами при определении хорионического гонадотропина человека, показав 30-кратное усиление сигнала и предел детекции 5 нМ [80].

Липосомы – сферические полые образования из одного или нескольких бислоев фосфолипидов – также используются в качестве усилителей ППР. Их большой размер (более 100 нм) приводит к тому, что связывание липосом значительно изменяет показатель преломления среды вблизи поверхности [70]. Винк и соавт. [81] при ППР-анализе интерферона-γ продемонстрировали, что использование липосомных меток обеспечивает снижение предела детекции на четыре порядка – до 100 пг/мл. Это один из самых высоких показателей увеличения чувствительности, сравнимый с двойным усилением золотыми наночастицами + преципитацией [75].

VII. ПОВЫШЕНИЕ ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТИ ППР-СЕНСОРОВ

МНОГОКАНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

Одно из основных направлений совершенствования ППР-сенсоров — повышение их производительности. С этой целью ведущие разработчики ППР-сенсоров направили усилия на создание многоканальных систем. Еще, в конце 90-х годов компания Віасоге, лидер индустрии ППР-сенсоров, представила прототип системы, способной проводить в параллельных каналах до 8 измерений. Один цикл измерений длится около 4 мин, что в сочетании с автоматической подачей проб позволяет тестировать 600 проб в день [82].

Следует отметить существование двух смежных задач в мультиплексном анализе: одновременный анализ многих аналитов в одной пробе и одновременный анализ многих проб на содержание одного аналита. В первом случае проба может последовательно протекать через сенсорные элементы, модифицированные рецепторами к разным аналитам. Во втором случае необходимо наличие нескольких параллельных каналов. Возможно, тем не менее, решение обеих задач в одном устройстве. Так, появившаяся в 2005 г. система Віасоге А100 состоит из четырех проточных ячеек, каждая из которых имеет пять аналитических зон. Эта система позволяет проводить до 20 измерений за цикл, а ее суточная производительность – 3800 измерений. Сходная четырехканальная система используется в моделях Biacore T100 и Віасоге 3000 [5]. Другие производители также используют этот подход для увеличения производительности, например, трехканальный SensiQ Pioneer (SensiQ Technologies), четырехканальный Reichert4SPR (Reichert Technologies), пятиканальный BI4500 Series (Biosensing Instrument) или восьмиканальный NanoSPR8 481 (NanoSPR Devices).

Обычно в одном или нескольких каналах мультиканальных систем генерируется референсный сигнал, не связанный со специфическим взаимодействием. Поэтому многоканальные системы повышают не только производительность, но и надежность тестирования. Кроме того, при клинических анализах содержание того или иного биомаркера может сильно варьировать, и параллельное тестирование нескольких маркеров одного и того же патологического состояния значительно повышает надежность постановки диагноза [5, 83].

Высокопроизводительное мультиплексное тестирование востребовано для решения ряда задач — скрининга библиотек антител и аптамеров, генотипирования, определения сенсибилизации организма к аллергенам и др. Одна из задач, требующих мультиплексного

тестирования, — определение патогенов, так как заражение организма различными бактериями и вирусами часто имеет сходную симптоматику и экспрессная идентификация возбудителя крайне важна для эффективной терапии. Так, Ванг и соавт. использовали многоканальный ППР-сенсор, основанный на ДНК-гибридизации, для одновременного определения четырех патогенных бактерий: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Clostridium tetani и Clostridium perfringens [84]. Предел детекции ДНК составил 10 пМ.

ППР-ИМИДЖИНГ

Настоящий прорыв в системах мультиплексного анализа совершили системы ППР-имиджинга (ППРи), сделав возможным одновременный анализ до нескольких сотен взаимодействий [85]. Такие устройства появились благодаря развитию микрофлюидной техники и технологии изготовления матриц чувствительных элементов с нанесенными рецепторными молекулами различной специфичности.

Брокман и Фернандес разработали ППР-сенсор с модуляцией по интенсивности на основе решетки из полимера, покрытой золотой пленкой. Чувствительный элемент сенсора — двумерная матрица из 400 элементов размером 250 мкм. Поверхность сенсора облучается монохроматическим светом, а отраженное излучение, несущее информацию о пространственном распределении интенсивностей ППР, регистрируется ССD-камерой. Разрешение сенсора по показателю преломления достигает 10⁻⁶ RIU [86]. Минимальная детектируемая концентрация биомолекул для сенсора данного типа, достигнутая Баггио и соавт., — 0,1 нМ [87]. Данный подход был применен для создания успешно коммерциализованной системы FLEXChip [5,14].

Многие ППРи системы коммерчески доступны и успешно применяются для мультиплексного определения онкомаркеров, антител, нуклеиновых кислот, бактерий, вирусов и др. [3]. Наиболее перспективным представляется применение ППРи для генотипирования, так как данная технология делает возможным одновременное определение множества нуклеотидных фрагментов за короткое время. Из-за меньшего размера чувствительного элемента ППРи обычно несколько менее чувствителен, чем стандартный ППР, однако применение средств усиления (таких как наночастицы) делает возможным детектирование нуклеотидных фрагментов до фемтомолярных концентраций. Так, Д'Агата и соавт. [36] использовали сочетание золотых наночастиц, модифицированных стрептавидином, и биотинилированных олигонуклеотидов для усиления ППРи. Такой анализ на основе ППРи-сенсора SPR imager (GWC

Technologies) позволяет выявлять однонуклеотидные полиморфизмы с фемтомолярной чувствительностью измерений без предварительной ПЦР-амплификации.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ППР-анализ нашел широкое применение для определения параметров реакций комплексообразования (антиген-антитело, лиганд-мишень, гибридизация ДНК и др.) Активно данный метод применяется и для решения различных аналитических задач, прежде всего — в медицинской диагностике.

Несмотря на высокую чувствительность ППР-анализа, она часто оказывается недостаточной. На сегодняшний день предложено большое число методов, позволяющих на порядки снизить предел детекции. Некоторые из них требуют модификации конструкции прибора (например, методы измерения фазового сдвига, спектроскопии с Фурье-преобразованием и др.), другие могут быть использованы без конструктивных изменений (например, усиление с помощью наночастиц).

Важным направлением совершенствования ППР-систем является повышение производительности. В настоящее время имеются много-канальные ППР-системы и системы ППР-имиджинга, одновременно тестирующие до нескольких сотен проб и аналитов. Такие системы позволяют также быстро набирать значительную статистику измерений, повышая достоверность анализа.

Появление новых методических решений для высокочувствительного и высокопроизводительного анализа, представленных в настоящем обзоре, обуславливает существенные конкурентные преимущества ППР-детекции как аналитического средства для решения фундаментальных и прикладных задач.

Благодарности

Авторы благодарят А.Е. Урусова (Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН) за подготовку иллюстраций к обзору.

ЛИТЕРАТУРА

- Schasfoort R.B.M., Tudos A.J. (eds.). (2008) Handbook of Surface Plasmon Resonance. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 403 p.
- 2. Иванов А.С., Медведев А.Е. (2015) Оптический плазмонно-резонансный биосенсор в молекулярном фишинге, *Биомедицинская химия*, **61**, 231–238.
- Mariani, S., Minunni, M. (2014) Surface plasmon resonance applications in clinical analysis, *Analytical and Bio-analytical Chemistry*, 406, 2303–2323.
- Shalabney, A., Abdulhalim, I. (2011) Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors, *Lasers and Photonics Reviews*, 5, 571–606.
- 5. Situ, C., Buijs, J., Mooney, M.H., Elliott, C.T. (2010) Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 1305–1315.
- 6. Yuk, J., Hong, D.-G., Jung, J.-W., Jung, S.-H., Kim, H.-S., Han, J.-A., Kim, Y.-M., Ha, K.-S. (2006) Sensitivity enhancement of spectral surface plasmon resonance biosensors for the analysis of protein arrays, *European Biophysics Journal*, **35**, 469–476.
- Biacore Sensor Surface Handbook. (2005) Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 100 p.
- 8. Oates, T.W.H., Wormeester, H., Arwin, H. (2011) Characterization of plasmonic effects in thin films and metamaterials using spectroscopic ellipsometry, *Progress in Surface Science*, **86**, 328-376.
- 9. Lakowicz, J.R. (2006) Plasmonics in biology and plasmon-controlled fluorescence, *Plasmonics*, 1, 5–33.
- 10. Li, M., Cushing, S.K., Wu, N. (2015) Plasmon-enhanced optical sensors: a review, *Analyst*, **140**, 386–406.

- De Mol N.J., Fischer M.J.E. (eds.). (2010) Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols. New York: Springer Science, 286 p.
- Brongersma, M.L., Kik, P.G. (eds.). (2007) Surface Plasmon Nanophotonics. Springer Series in Optical Sciences. vol. 131. Berlin: Springer Science, 268 p.
- 13. Huang, Y.H., Ho, H.P., Wu, S.Y., Kong, S.K. (2012) Detecting phase shifts in surface plasmon resonance: A review, *Advances in Optical Technologies*, **2012**, Article ID 471957, 12 pages, doi:10.1155/2012/471957.
- Homola, J. (2008) Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical Reviews*, 108, 462–493.
- Tokel, O., Inci, F, Demirci, U. (2014) Advances in plasmonic technologies for point of care applications, *Chemi*cal Reviews, 114, 5728–5752.
- Otto, A. (1968) Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik*, 216, 398–410
- Kretschmann, E., Raether, H. (1968) Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, Zeitschrift für Naturforschung, 23A, 2135–2136.
- Nagata K., Handa H. (eds.). (2000) Real-time analysis of biomolecular interactions: applications of BIACORE, Tokyo: Springer Science, 256 p.
- Jorgenson, R.C., Yee, S.S. (1993)
 A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance, Sensors and Actuators B: Chemical, 12, 213–220.
- Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G. (1999) Surface plasmon resonance sensors: review, Sensors and Actuators B: Chemical, 54, 3–15.

- 21. Cullen, D.C., Brown, R.G., Lowe, C.R. (1987) Detection of immunocomplex formation via surface plasmon resonance on gold coated diffraction gratings, *Biosensors*, 3, 211–225.
- 22. Cullen, D.C., Lowe, C.R. (1990) A direct surface plasmon-polariton immunosensor: preliminary investigation of the non-specific adsorption of serum components to the sensor interface, Sensors and Actuators B: Chemical, 1, 576–579.
- Jory, M.J., Vukusic, P.S., Sambles, J.R. (1994) Development of a prototype gas sensor using surface plasmon resonance on gratings, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 17, 203–209.
- Mayer, K.M., Hafner, J.H. (2011) Localized surface plasmon resonance sensors, *Chemical Reviews*, 111, 3828–3857.
- 25. Homola J. (ed.). (2006) Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. Series 4. Berlin: Springer Science, 252 p.
- 26. McNaught A.D., Wilkinson A. (eds). IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book"). 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. 1622 p.
- Inczedy, J., Lengyel, T., Ure, A.M. (eds.). (1998) IUPAC. Compendium of Analytical Nomenclature (the «Orange Book»). 3rd edn. Oxford: Blackwell Science Publications, 964 p.
- 28. Huang, Y.H., Ho, H.P., Wu, S.Y., Kong, S.K., Wong, W.W., Shum, P. (2011) Phase sensitive SPR sensor for wide dynamic range detection, *Optics Letters*, **36**, 4092–4094.
- Huang, Y.H., Ho, H.P, Kong, S.K., Kabashin, A.V. (2012) Phase-sensitive surface plasmon resonance biosensors: methodology, instrumentation and applications, *Annalen der Physik*, **524**, 637–662.

- 30. Hermanson, G.T. (2008) Bioconjugate Techniques. 2nd edn. San Diego: Academic Press, 1202 p.
- 31. D'Agata, R., Spoto, G. (2012) Artificial DNA and surface plasmon resonance, *Artificial DNA: PNA & XNA*, 3, 45–52.
- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M. (2003) New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding, *Trends in Analytical Che*mistry, 22, 810–818.
- 33. Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. (2006) Молекулярно импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе, Успехи биологической химии, 46, 149–192.
- Knoll, W., Liley, M., Piscevic, D., Spinke, J., Tarlov, M.J. (1997) Supramolecular architectures for the functionalization of solid surfaces, *Advances in Biophysics*, 34, 231–251.
- 35. Brockman, J.M., Frutos, A.G., Corn, R.M. (1999) A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA interactions with surface plasmon resonance imaging, *Journal of the American* Chemical Society, 121, 8044–8051.
- 36. D'Agata, R., Corradini, R., Grasso, G., Marchelli, R., Spoto, G. (2008) Ultrasensitive detection of dna by pna and nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging, Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology, 9, 2067–2070.
- 37. Fang, S., Lee, H.J., Wark, A.W., Corn, R.M. (2006) Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 14044–14046.
- Egawa, Y., Miki, R., Seki, T. (2014) Colorimetric sugar sensing using boronic acid-substituted azobenzenes, *Materials*, 7, 1201–1220.

- 39. Makaraviciute, A., Ramanaviciene, A. (2013) Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, **50**, 460–471.
- Chivers, C.E., Crozat, E., Chu, C., Moy, V.T. Sherratt, D.J., Howarth, M. (2010) A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability, *Nature Methods*, 7, 391–393.
- 41. Šípová, H., Homola, J. (2013) Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: a review, *Analytica Chimica Acta*, **773**, 9–23.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. (2001) Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 314, 1–26.
- Mullett, W.M., Lai, E.P., Yeung, J.M. (2000) Surface plasmon resonancebased immunoassays, *Methods*, 22, 77–91.
- 44. D'Agata R., Spoto G. (2013) Surface plasmon resonance imaging for nucleic acid detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**, 573–584.
- 45. Zhen, G., Falconnet, D., Kuennemann, E., Vörös, J., Spencer, N.D., Textor, M., Zürcher, S. (2006) Nitrilotriacetic acid functionalized graft copolymers: A polymeric interface for selective and reversible binding of histidinetagged proteins, Advanced Functional Materials, 16, 243–251.
- 46. Kabashin A.V., Nikitin, P.I. (1997) Interferometer based on a surface plasmon resonance for sensor applications, *Quantum Electronics*, **27**, 653–654.
- 47. Kabashin, A.V., Nikitin, P.I. (1998) Surface plasmon resonance interferometer for bio- and chemicalsensors, *Optics Communications*, **150**, 5–8.
- 48. Yuan, W., Ho, H.P., Wong, C.L., Kong, S.K., Lin, C. (2007) Surface plasmon resonance biosensor incorporated

- in a Michelson interferometer with enhanced sensitivity, *IEEE Sensors Journal*, 7, 70–73.
- 49. Ho, H.P., Yuan, W., Wong, C.L., Wu, S.Y., Suen, Y.K., Kong, S.K., Lin, C. (2007) Sensitivity enhancement based on application of multi-pass interferometry in phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor, *Optics Communications*, **275**, 491–496.
- Kochergin, V.E., Valeiko, M.V., Beloglazov, A.A., Ksenevich, T.I., Nikitin, P.I. (1998) Visualisation of the angular dependence of the reflected-radiation phase under conditions of a surface-plasmon resonance and its sensor applications, *Quantum Electronics*, 28, 835–839.
- Nikitin, P.I., Beloglazov, A.A., Kochergin, V.E., Valeiko, M.V., Ksenevich, T.I. (1999) Surface plasmon resonance interferometry for biological and chemical sensing, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **54**, 43–50.
- 52. Chen, S.J., Su, Y.D., Hsiu, F.M., Tsou, C.Y., Chen, Y.K. (2005) Surface plasmon resonance phase-shift interferometry: real-time DNA microarray hybridization analysis, *Journal of Biomedical Optics*, **10**, Article ID 034005, 6 pages, doi: 10.1117/1.1924713.
- 53. Wu, S.Y., Ho, H.P., Law, W.C., Lin, C., Kong, S.K. (2004) Highly sensitive differential phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on the Mach–Zehnder configuration, *Optics Letters*, 29, 2378–2380.
- Kabashin, A.V., Kochergin, V.E., Nikitin, P.I. (1999) Surface plasmon resonance bio-and chemical sensors with phase-polarisation contrast, *Sen*sors and Actuators B: Chemical, 54, 51–56.
- Chiang, H.P., Lin, J.L., Chen, Z.W. (2006) High sensitivity surface plasmon resonance sensor based on phase interrogation at optimal incident wavelengths, *Applied Physics Let-*

- ters, 88, Article ID 141105, 3 pages, doi:10.1063/1.2192622.
- 56. Chiang, H.P., Lin, J.L., Chang, R., Su, S.Y., Leung, P.T. (2005) High-resolution angular measurement using surface-plasmon-resonance via phase interrogation at optimal incident wavelengths, *Optics Letters*, **30**, 2727–2729.
- Nelson, S.G., Johnston, K.S., Yee, S.S. (1996) High sensitivity surface plasmon resonance sensor based on phase detection. *Sensors and Actua*tors B: Chemical, 35, 187–191.
- Li, Y.C., Chang, Y.F., Su, L.C., Chou, C. (2008) Differential-phase surface plasmon resonance biosensor. *Analytical Chemistry*, 80, 5590–5595.
- Zybin, A., Grunwald, C., Mirsky, V.M., Kuhlmann, J., Wolfbeis, O.S., Niemax, K. (2005) Double-wavelength technique for surface plasmon resonance measurements: Basic concept and applications for single sensors and two-dimensional sensor arrays, Analytical Chemistry, 77, 2393–2399.
- Palagushkin, A.N., Prokopenko, S.A., Sergeev, A.P. (2009). Plasmonic holographic nanostructures, *Optical Memory and Neural Networks*, 18, 156–163.
- Frutos, A.G., Weibel, S.C., Corn, R.M. (1999) Near-infrared surface plasmon resonance measurements of ultrathin films. 2. Fourier transform SPR spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 71, 3935–3940.
- 62. Homola, J., Dostalek, J., Chen, S., Rasooly, A., Jiang, S., Yee, S.S. (2002) Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 61–69.
- 63. Homola, J., Koudela, I., Yee, S.S. (1999) Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity com-

- parison, Sensors and Actuators B: Chemical, **54**, 16–24.
- 64. Lecaruyer, P., Canva, M., Rolland, J. (2007) Metallic film optimization in a surface plasmon resonance biosensor by the extended Rouard method, *Applied Optics*, 46, 2361–2369.
- Sarid, D. (1981) Long-range surfaceplasma wave on very thin metal films, *Physical Review Letters*, 47, 1927–1930.
- 66. Slavík, R., Homola, J. (2007) Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **123**, 10–12.
- Lahav, A., Auslender, M., Abdulhalim, I. (2008) Sensitivity enhancement of guided-wave surface-plasmon resonance sensors, *Optics Letters*, 33, 2539–2541.
- Wu, L., Chu, H.S., Koh, W.S., Li, E.P. (2010) Highly sensitive graphene biosensors based on surface plasmon resonance, *Optics Express*, 18, 14395–14400.
- Zhang, H., Sun, Y., Gao, S., Zhang, J., Zhang, H., Song, D. (2013) A novel graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensor for immunoassay, Small, 9, 2537–2540.
- Zeng, S., Baillargeat, D., Ho, H.P., Yong, K.T. (2014) Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications, *Chemical Society Reviews*, 43, 3426–3452.
- Springer, T., Ermini, M.L., Spacková, B., Jablonku, J., Homola, J. (2014) Enhancing sensitivity of surface plasmon resonance biosensors by functionalized gold nanoparticles: size matters, *Analytical Chemistry*, 86, 10350–10356.
- 72. Kwon, M.J., Lee, J., Wark, A.W., Lee, H.J. (2012) Nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance detection of proteins at attomolar concentrations: comparing different nano-

- particle shapes and sizes, *Analytical Chemistry*, **84**, 1702–1707.
- Lyon, L.A., Musick, M.D., Natan, M.J. (1998) Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing, *Analytical Chemistry*, 70, 5177–5183.
- 74. Urusov, A.E., Kostenko, S.N., Sveshnikov, P.G., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B. (2011) Ochratoxin A immunoassay with surface plasmon resonance registration: Lowering limit of detection by the use of colloidal gold immunoconjugates, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156, 343–349.
- 75. Cao, C., Sim, S.J. (2007) Signal enhancement of surface plasmon resonance immunoassay using enzyme precipitation-functionalized gold nanoparticles: A femto molar level measurement of anti-glutamic acid decarboxylase antibody, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1874–1880.
- Teramura, Y., Arima, Y., Iwata, H. (2006) Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification, *Analytical Biochemistry*, 357, 208–215.
- 77. Pollet, J., Delport, F., Janssen, K.P.F., Tran, D.T., Wouters, J., Verbiest, T., Lammertyn, J. (2011) Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor, *Talanta*, 83, 1436–1441.
- Wang, J., Munir, A., Zhu, Z., Zhou, H.S. (2010) Magnetic nanoparticle enhanced surface plasmon resonance sensing and its application for the ultrasensitive detection of magnetic nanoparticle-enriched small molecules, *Analytical Chemistry*, 82, 6782–6789.
- Lee, E.G., Park, K.M., Jeong, J.Y., Lee, S.H., Baek, J.E., Lee, H.W., Chung, B.H. (2011) Carbon nano-

- tube-assisted enhancement of surface plasmon resonance signal, *Analytical Biochemistry*, **408**, 206–211.
- 80. Severs, A.H., Schasfoort, R.B.M. (1993) Enhanced surface plasmon resonance inhibition test (ESPRIT) using latex particles, *Biosensors and Bioelectronics*, **8**, 365–370.
- 81. Wink, T., van Zuilen, S.J., Bult, A., Van Bennekom, W.P. (1998). Liposome-mediated enhancement of the sensitivity in immunoassays of proteins and peptides in surface plasmon resonance spectrometry, *Analytical Chemistry*, **70**, 827–832.
- 82. Situ, C., Crooks, S.R., Baxter, A.G., Ferguson, J., Elliott, C.T. (2002) Online detection of sulfamethazine and sulfadiazine in porcine bile using a multi-channel high-throughput SPR biosensor, *Analytica Chimica Acta*, **473**, 143–149.
- 83. Cacciatore, G., Eisenberg, S.W., Situ, C., Mooney, M.H., Delahaut, P., Klarenbeek, S., Elliott, C.T. (2009) Effect of growth-promoting 17β-estradiol, 19-nortestosterone and dexamethasone on circulating levels of nine potential biomarker candidates in veal calves, *Analytica Chimica Acta*, **637**, 351–359.
- 84. Wang, J., Luo, Y., Zhang, B., Chen, M., Huang, J., Zhang, K., Liao, P. (2011) Rapid label-free identification of mixed bacterial infections by surface plasmon resonance, *Journal of Translational Medicine*, **9**, 85, 9 pages, doi:10.1186/1479-5876-9-85.
- 85. Homola, J., Vaisocherová, H., Dostálek, J., Piliarik, M. (2005) Multianalyte surface plasmon resonance biosensing, *Methods*, **37**, 26–36.
- Brockman, J.M., Fernández, S.M. (2001). Grating-coupled surface plasmon resonance for rapid, label-free, array-based sensing, *American Laboratory*, 33, 37–40.
- 87. Baggio, R., Carven, G.J., Chiulli, A., Palmer, M., Stern, L.J., Arenas, J.E.

(2005) Induced fit of an epitope peptide to a monoclonal antibody probed with a novel parallel surface plasmon

resonance assay, Journal of Biological Chemistry, **280**, 4188–4194.