

**Е.В. Костюкевич, Р.В. Христосенко,  
Ю.В. Ушенин, А.В. Самойлов, С.А. Костюкевич**

**ИММУНОСЕНСОР ПОВЕРХНОСТНОГО  
ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА  
С ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ  
И СТАБИЛЬНОСТЬЮ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ  
ФИБРИНОГЕНА, РАСТВОРИМОГО ФИБРИНА  
И D-ДИМЕРА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

Исследовано влияние технологии изготовления чипа и шумовых характеристик иммуносенсора поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на чувствительность и стабильность работы прибора в целях достоверного клинического прогнозирования и лечения заболеваний системы кровообращения. Для исключения шума температурных флуктуаций всего прибора разработан термобокс, контролирующий температуру в диапазоне 2—40°C с точностью 0,1°C, что значительно повышает разрешение используемой ППР сенсорной системы.

**Ключевые слова:** поверхностный плазмонный резонанс (ППР), моноклональные антитела (монАТ), сыворотка крови, приборный шум, термостабилизация.

**ВВЕДЕНИЕ**

Для прогнозирования заболеваний системы кровообращения и мониторинга эффективности их лечения необходимо количественное определение в плазме крови больных молекулярных маркеров, характеризующих состояние системы свертывания крови: фибриногена, растворимого фибрина и D-димера фибриногена [1]. Такими заболеваниями являются ишемическая болезнь сердца с ее клиническими формами — инфарктом миокарда и нестабильной стенокардией, инсульт головного мозга, тромбоз глубоких вен (ТГВ), тромбоэмболия легочных артерий (ТЭЛА) и ДВС-синдром (диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови). Фибриноген является центральным белком свертывающей системы крови (концентрация в норме 2—4 мг/мл), его концентрация резко повышается при различных воспалительных процессах, а также угрозе внутрисосудистого тромбообразования, тогда как при некоторых патологических состояниях, например ДВС-синдроме, наблюдается снижение концентрации фибриногена. Концентрация растворимого фибрина резко повышается при активации системы свертывания крови и тромбообразовании. А по концентрации D-димера, превышающего пороговый уровень 500 нг/мл, в мировой клинической практике диагностируют ТГВ и ТЭЛА.

Наибольшее доверие среди исследователей в качестве жизнеспособного инструмента для биомолекулярного анализа и медицинской диагностики вызывает оптический метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Здесь использован автоматизированный малогабаритный прибор типа «Плазмон», разработанный в Институте физики полупроводников им. В.Е. Лашкарева НАН Украины. Принцип работы прибора базируется на эффекте оптического возбуждения волны поверхностного плазмона (ВПП) в тонкой пленке золота и исследовании угловой функции отражения в геометрии ослабленного полного внутреннего

© Е.В. Костюкевич, Р.В. Христосенко, Ю.В. Ушенин, А.В. Самойлов,  
С.А. Костюкевич, 2012

отражения по схеме Кречмана. Изучаемая зависимость является резонансной. Угол, соответствующий минимальному значению интенсивности отраженного света, называется углом ППР. Прибор позволяет с высокой скоростью и чувствительностью, в реальном масштабе времени без необходимости применения меток для молекул исследовать кинетику молекулярных взаимодействий, т.е. характеризовать процесс связывания биомолекулы с партнером, иммобилизованным на золотой чувствительной поверхности, посредством измерения сдвига резонансного угла во времени.

Используя антитела в качестве чувствительных слоев биосенсоров, можно получать уникальные по специфичности отклики и анализировать сложные биологические пробы, такие как кровь, моча, слюна. Особый интерес для создания иммуносенсоров представляют моноклональные антитела (монАТ), являющиеся гомогенными иммуноглобулинами одинаковой специфичности, с высоким сродством связывающиеся с нужным участком на антигене и способствующие повышению чувствительности ППР-иммуносенсора. Моноклональные антитела к фибриногену, растворимому фибрину и *D*-димеру были получены в Институте биохимии НАН Украины.

### **ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА ППР-СЕНСОРА С ОПТИМАЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Чувствительность ППР-сенсоров задается как производная измеряемого ППР-параметра (резонансного угла или длины волны) относительно определяемого параметра (коэффициента преломления, толщины адсорбированного слоя, концентрации и т.п.) [2]. Обычно чувствительность выражают в единицах изменения детектируемого показателя преломления (RIU). Эта величина строго отображает соблюдение оптической конфигурации, подход к измерениям или алгоритм анализа данных, т.е. определяется свойствами конкретного прибора. На сегодняшний день типичная чувствительность коммерческих систем составляет  $1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-6}$  RIU. Однако в общем случае чувствительность сильно зависит от многих иных параметров [3], в том числе от технологии изготовления чувствительного элемента и функционализации чувствительной поверхности сенсора для специфических применений.

Требование стабильности и воспроизводимости физических параметров золотой пленки на стеклянной подложке (носителя плазмонных колебаний) является определяющим для получения достоверных и стабильных количественных результатов ППР-измерений. В работе [4] исследовано влияние низкотемпературного отжига ( $80$ — $250^\circ\text{C}$ ) золотого покрытия на оптические и эксплуатационные характеристики ППР-преобразователя. Показано, что его чувствительность можно увеличить посредством уменьшения коэффициента экстинкции металлической пленки при увеличении температуры отжига с оптимумом при  $120^\circ\text{C}$ . Для этой температуры характерно сглаживание мелкомасштабного рельефа поверхности золотой пленки и уменьшение рассеяния плазмонов и, как следствие, достижение оптимальных параметров резонансной кривой.

Таким образом, термический отжиг пленок золота при температуре  $120^\circ\text{C}$  обеспечивает наилучшие эксплуатационные характеристики ППР-преобразователей на их основе. Однако адсорбция биомолекул на свободную золотую поверхность может приводить к нежелательным оптическим и структурным эффектам металлической поверхности. Кроме

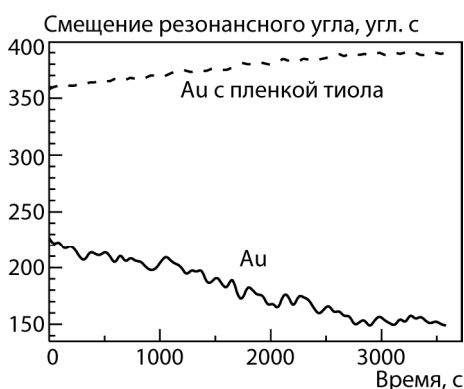


Рис. 1. Дрейф базовой линии ППР-прибора в воде со временем для чувствительного элемента со свободной золотой поверхностью и поверхностью, модифицированной додекантиолом

того, исследования долговременной стабильности резонансных кривых отожженных пленок золота на воздухе и в воде также свидетельствуют о необходимости применения переходных слоев, способных защитить чувствительную поверхность

и стабилизировать параметры ППР-сенсора. Для обеспечения максимальной чувствительности преобразователя толщина переходного слоя должна быть намного меньше глубины проникновения ВПП во внешнюю среду (100—200 нм для излучения в видимой области спектра).

Для формирования защитного слоя чувствительного ППР-элемента можно использовать самособирающиеся молекулярно-организованные органические монослои (СОМ) с контролируемым составом, структурой и толщиной [5]. Наиболее распространенными являются слои на основе функционализированных меркаптанов, в частности, алифатических тиолов ( $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ ) из-за простой технологии их получения, стабильности и функционального разнообразия. Основная идея применения этих линейных молекул состоит в использовании высокого сродства золота к атомам серы. Организация модифицирующего слоя на поверхности благородного металла происходит методом длительной самопроизвольной хемосорбции из раствора, преимущественно в этаноле, с концентрацией  $(0,1-1,0) \cdot 10^{-3} \text{M}$  и состоит из двух этапов. Первоначально происходит взаимодействие HS-группы тиола и поверхностных атомов золота с образованием тиолата золота. Затем следует микроструктурная перестройка связанного монослоя, управляемая гидрофобным взаимодействием алифатических цепей и сопровождающаяся реконструкцией поверхности благородного металла. Таким образом, формируется плотноупакованное молекулярное покрытие, обеспечивающее значительный барьер для переноса электронов и ионов, и обладающее высокой кинетической и термодинамической стабильностью. При этом функциональные терминальные группы определяют физико-химические свойства модифицированной металлической поверхности, а углеводородные цепи обеспечивают ее пространственное экранирование на десятки ангстрем (длина связи  $\text{C}-\text{H} \sim 1,1 \text{ \AA}$ ), что не оказывает существенного влияния на чувствительность сенсора.

На рис. 1 отражен дрейф базовой линии ППР-прибора в воде со временем для чувствительного элемента со свободной золотой поверхностью и поверхностью, модифицированной додекантиолом ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ ). Базовая линия с применением модифицирующего покрытия более стабильна, монотонна и имеет тенденцию к небольшому росту ( $\sim 32$  угл. с в час), что может свидетельствовать о присутствии в воде небольшого количества адсорбирующихся веществ. Для незащищенной пленки золота наблюдается смещение положения минимума ППР в сторону меньших углов ( $\sim 88$  угл. с в час), что скорее всего связано с проникновением воды по порам и границам микрокристаллов золотой пленки.

Огромную роль в повышении чувствительности ППР-прибора при детектировании целевого белка играет функционализация золотой по-

верхности биосенсора. В нашем случае для детектирования фибриногена, растворимого фибрина и *D*-димера в плазме крови человека проблемой является ковалентное закрепление на золотой поверхности сенсора специфических мОНАТ.

Поскольку концентрация фибриногена в плазме крови высока, для его детектирования использовали метод прямой адсорбции мОНАТ к фибриногену на поверхность золотой пленки [6]. Существенное разбавление исследуемой плазмы буфером позволило сохранить высокую концентрацию детектируемого белка и значительно уменьшить влияние большинства других белков плазмы, а добавление в буфер детергента Твин-20 практически исключило неспецифическую сорбцию.

Однако метод прямой адсорбции мОНАТ не является корректным, поскольку при иммобилизации происходит сильное взаимодействие золота с атомами серы биомолекулы. Это сопровождается заметным изменением физико-химических свойств молекулы и даже полной потерей ее биологической активности. Поэтому возможность и скорость протекания реакции, а также величина отклика ППР-иммуносенсора существенно зависят от ориентированной иммобилизации биологических молекул в своем естественном, ненарушенном состоянии за счет использования переходных слоев. Это особенно важно при детектировании биомолекул малого размера и низкой концентрации. При разработке методики модификации золотой поверхности необходимо также учитывать, что наименьшее детектирование и чувствительность тем выше, чем больше рабочая поверхность чувствительного элемента.

Была предложена методика модификации золотой поверхности двухкомпонентной матрицей меркаптанов с разной длиной цепи и различными функциональными группами, что обеспечило получение развитого микрорельефа поверхности сенсорного чипа, а также прочную последующую иммобилизацию мОНАТ на ней [7], которую успешно применили для детектирования фибриногена и растворимого фибрина в плазме крови человека. Иммобилизацию мОНАТ проводили после формирования на золотой ППР-поверхности СОМ путем длительной самопроизвольной соадсорбции из раствора меркаптогексанола и меркаптоундекановой кислоты. Для ковалентного закрепления мОНАТ карбоксильные группы СОМ активировали 0,2 М раствором бициклогексилкарбодиимида в безводной среде и многократно промывали ацетоном. После этой операции чип сушили в потоке аргона, далее с помощью микропипетки наносили 0,5 мл раствора мОНАТ с концентрацией 25–50 мкг/мл в 0,02 НЕРЕС, рН 7,4, 0,3 М NaCl, 0,005 % Tween-20, 0,005 % NaN<sub>3</sub>. В таком состоянии чип с мОНАТ на золотой поверхности выдерживали 12 ч при  $t = +4^{\circ}\text{C}$ . Затем поверхность чипа промывали буфером, наносили на нее 0,5 мл 1М раствора этаноламина в воде и выдерживали в течение 1 ч, промывали буфером. После этого чип был готов для детектирования белков.

Для детектирования *D*-димера, концентрация которого в крови низкая, необходимо достижение максимальной чувствительности прибора, уровень которой ограничивают шумы различной природы [8].

### **УЧЕТ ШУМОВЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИБОРА ДЛЯ ДОСТИЖЕНИЯ МАКСИМАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ**

Полный уровень шума ППР сенсорной системы устанавливает наименьший предел измеряемых изменений коэффициента преломления, иначе, разрешение сенсора. Эта величина не только опре-



Рис. 2. Внешний вид камеры, контролирующей температуру, с работающим прибором типа «Плазмон»

деляется оптическими свойствами сенсорного чипа, но и находится под влиянием электронных шумовых характеристик ППР сенсорной системы, включая алгоритм обработки сигнала [9,10]. По аналогии с рассуждениями относительно шумов других типов оптических сен-

соров [11], полный шум ( $\langle \delta N_{s,tot} \rangle$ ) можно записать как

$$\langle \delta N_{s,tot} \rangle = \sqrt{\sum_i \langle \delta N_i^2 \rangle},$$

где  $\langle \delta N_i \rangle$  — единичный шумовой вклад, выраженный в стандартном или среднеквадратическом отклонении и включающий шум детектирования излучения  $\langle \delta N_{det} \rangle$ ; флуктуации исходящие от источника света  $\langle \delta N_{rad} \rangle$ , в значительной степени определяемые электронным шумом и качеством контролирующей электроники; термический шум, вызываемый температурными флуктуациями  $\langle \delta N_{temp} \rangle$ ; шум механических флуктуаций  $\langle \delta N_{mech} \rangle$ , который является результатом внешнего и внутреннего воздействия налагаемого на сенсорный чип и оптическую систему. Кроме того, есть еще шумы межфазных флуктуаций из-за случайных процессов адсорбции-десорбции на границе раздела, включая эффекты из-за микроскопических воздушных пузырьков на поверхности золотой пленки, флуктуации поток/давление из-за работы насоса, подающего пробу в кювету, а также электромагнитную интерференцию электроники с внешними источниками.

Трудно полностью отделить и количественно оценить каждый единичный шумовой вклад, однако наиболее существенными являются эффекты температурных флуктуаций, у которых разное происхождение [12]. Во-первых, поверхностные плазмоны (ПП) чувствительны к изменению температурно-зависимого эффективного коэффициента преломления пробы. Например, коэффициент преломления воды изменяется на  $10^{-5}$  RIU при изменении температуры на  $0,1$  °C [13], что близко к пределу детектирования ППР-приборов. Во-вторых, температурные изменения в слое золота могут значительно влиять на генерацию ПП. При высокой температуре колебания ПП будут значительно ослабляться из-за увеличения электрон-фононного рассеяния в металле [14]. Это приводит к расширению ППР-кривой и уменьшению чувствительности ППР-прибора. В-третьих, изменение температуры может влиять на работу важных компонент сенсорной системы, таких как выходной сигнал источника света (интенсивность и длину волны), отклик детектора и сенсорную геометрию. И, наконец, изменение температуры окружающей среды может воздействовать на скорость и/или эффективность интересующего молекулярного события связывания.

Таким образом, для достижения стабильной работы прибора и получения достоверных результатов, в первую очередь, необходима минимизация ППР-эффектов, вызываемых изменением температуры. Для этого применяют стабилизацию (активный контроль температуры) и компенсацию (введение опорного канала). В случае, когда прибор работает в

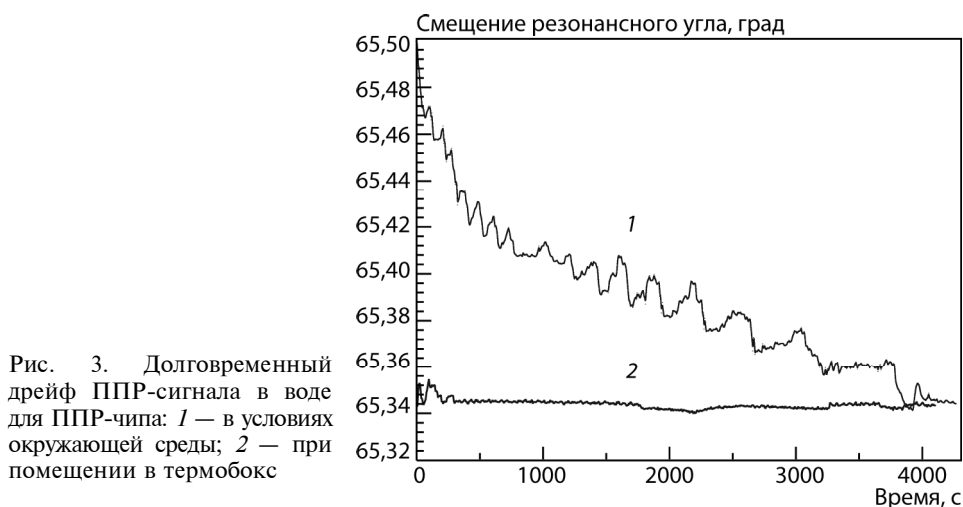


Рис. 3. Долговременный дрейф ППР-сигнала в воде для ППР-чипа: 1 — в условиях окружающей среды; 2 — при помещении в термобокс

широком диапазоне окружающей температуры или при детектировании малой массы, возможно, необходима комбинация методов.

В работе для решения проблемы стабилизации температуры предлагается использовать камеру, контролирующую температуру (термобокс), в которую полностью помещается работающий прибор типа «Плазмон» (рис. 2). В термобокс, контролирующем температуру в диапазоне 2—40 °С с точностью 0,1 °С, применяется разработанный в Институте физики полупроводников температурный контроллер с оптимизированными параметрами пропорционально-интегрально-дифференциального регулятора, модулирующего выходную мощность термоэлектрического модуля на основе эффекта Пельтье.

На рис. 3 показан долговременный дрейф сигнала в воде для описанного выше ППР-чипа, полученный с помощью прибора типа «Плазмон» в условиях окружающей среды и стабилизации температуры при помещении в термобокс. Очевидно, что предложенная нами технология изготовления сенсорного чипа и конструкция ППР-прибора в сочетании с использованием термобокса позволит определить уровень фибриногена, растворимого фибрина и *D*-димера в плазме крови человека.

## ВЫВОДЫ

Работа посвящена разработке ППР-иммуносенсора с повышенной чувствительностью и стабильностью для клинического определения уровня фибриногена, растворимого фибрина и *D*-димера в плазме крови человека. Исследовано влияние приборного шума и долговременного дрейфа сигнала за счет несовершенной технологии изготовления ППР-чипа на получение достоверных результатов при условии малой концентрации и/или малой молекулярной массы аналита. Показано, что температурная стабилизация всего прибора способствует уменьшению уровня шума и значительно увеличивает разрешение используемой ППР сенсорной системы.

**K.V. Kostyukevych, R.V. Khristosenko,  
Yu.V. Ushenin, A.V. Samoylov, S.A. Kostyukevych**

**SURFACE PLASMON RESONANCE IMMUNOSENSOR  
WITH INCREASED SENSITIVITY AND STABILITY TO DETECT  
FIBRINOGEN, SOLVED FIBRIN AND D-DIMER  
IN HUMAN BLOOD PLASMA**

In this work the influence of technology for manufacturing the chip and noise characteristics of the surface plasmon resonance (SPR) immunosensor on sensitivity and stability of this device was investigated aimed at reliable clinic diagnostics and curing the diseases of blood circulation system.

To exclude the temperature fluctuation noise inherent to the whole device, we have designed a special thermal case enabling to control temperature within the range 2 to 40 °C with the accuracy 0.1 °C, which considerably increases the resolution ability of the sensor SPR system in use.

**Keywords:** surface plasmon resonance (SPR), monoclonal antibodies (monAB), blood serum, device noise, thermal stabilization.

1. *Луговской Э.В.* Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. — Киев: Наук. думка, 2003. — 223 с.
2. *Homola J., Yee S.S., Gauglitz G.* Surface plasmon resonance sensors: review // *Sensors and Actuators B.* — 1999. — **54**. — P. 3—15.
3. *Yeatman E.M.* Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing // *Biosensors Bioelectron.* — 1996. — **11**. — P. 635—649.
4. *Snopok B.A., Kostyukevich E.V., Lysenko S.I. et al.* Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters // *Semiconductor Phys., Quant. Electron. and Optoelectron.* — 2001. — **4**, N 1. — P. 56—69.
5. *Ulman A.* Formation and structure of self-assembled monolayers // *Chem. Rev.* — 1996. — **96**. — P. 1533—1554.
6. *Ширишов Ю.М., Костюкевич Е.В., Луговской Э.В. и др.* Иммуносенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для экспресс-анализа уровня фибриногена в плазме крови человека // *Доп. НАН України.* — 2003. — **7**. — С. 168—171.
7. *Storozhylova N.S., Bereznytsky G.K., Makogonenko E.M., Lugovskoi E.V.* Preparation of SPR immunosensor chip for fibrinogen and soluble fibrin determination in human plasma // *Mat. of the Bridges in Life Sciences 6th Annual Scientific Meeting, Bratislava, Slovakia, April 8—10.* — 2011. — P. 146—147.
8. *Ober R.J., Ward E.S.* The influence of signal noise on the accuracy of kinetic constants measured by surface plasmon resonance experiments // *Anal. Biochem.* — 1999. — **273**. — P. 49—61.
9. *Kolomenskii A.A., Gershon P.D., Schuessler H.A.* Sensitivity and detection limit of concentration and adsorption measurements by laser-induced surface-plasmon resonance // *Appl. Opt.* — 1997. — **36**. — P. 6539—6547.
10. *Nenninger G.G., Piliarik M., Homola J.* Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface plasmon // *Measur. Sci. Technol.* — 2002. — **13**. — P. 2038—2046.
11. *Neff H., Khrebtov I.A., Tkachenko A.D. et al.* Noise, Bolometric performance and aging of thin high  $T_c$ -superconducting films on silicon membranes // *J. Thin Solid Films.* — 1998. — **324**. — P. 230—238.
12. *Ozdemir S.K., Turhan-Sayan G.* Temperature effects on surface plasmon resonance: design considerations for an optical temperature sensor // *J. Lightwave Technol.* — 2003. — **21**. — P. 805—814.
13. *Schasfoort R.B.M., Tudos A.J.* Handbook of Surface Plasmon Resonance. — Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry, 2008.— P. 403.
14. *Chiang H., Wang Y., Leung P. et al.* A theoretical model for the temperature-dependent sensitivity of the optical sensor based on surface plasmon resonance // *Optic. Communications.* — 2001. — **188**. — P. 283—289.

Институт физики полупроводников  
им. В.Е. Лашкарева  
НАН Украины  
Проспект Науки, 41  
03028 Киев

Получено 15.05.2012