© **Коллектив авторов**, 2012
УДК 577.2

ОПТИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Д.А. Мамичев, кандидат физико-математических наук, **И.А. Кузнецов**, **Н.Е. Маслова**, кандидат физико-математических наук, **М.Л. Занавескин**, кандидат физико-математических наук

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

E-mail: d_mamichev@mail.ru

Сегодня биосенсоры широко используются для проведения биохимических анализов в различных сферах жизни человека, что обусловлено их высокой чувствительностью, быстродействием и малыми (в отличие от традиционных методов анализа) размерами. Наибольшее распространение получили оптические биосенсоры, действие которых основано на явлении поверхностного плазмонного резонанса, так как они обладают рядом преимуществ по сравнению с другими типами сенсоров. В данном обзоре рассмотрены основные виды таких биосенсоров, а также их применение для обнаружения и анализа различных биомолекул.

Ключевые слова: *биосенсор, плазмон, поверхностный плазмонный резонанс, гигантское комбинационное рассеяние света, биохимический анализ, оптические сенсоры*

OPTICAL SENSORS BASED ON SURFACE PLASMON RESONANCE FOR HIGH-SENSITIVE BIOCHEMICAL ANALYSIS

D.A. Mamichev, I.A. Kuznetsov, N.E. Maslova, M.L. Zanaveskin

National research centre «Kurchatov institute», NBICS-Centre, Moscow

There are a many applications of biosensors in biochemical analysis at different regions of human life at present time which caused by their high sensitivity, performance speed and small sizes in contrast to traditional methods of analysis. Optical biosensors based on surface plasmon resonance are most popular because they have some advantages in comparison with other types of sensors. Basic types of those biosensors and their application for a detection and analysis of various biomolecules are viewed in this article.

Key words: *biosensor, plasmon, surface plasmon resonance, surface enhanced Raman scattering, biochemical analysis, optical sensors*

Биосенсорика является бурно развивающимся направлением, что обусловлено прежде всего активным использованием различных видов сенсоров в медицине. Биосенсоры используются для проведения сложных биохимических анализов в клинических условиях, например, для определения содержания метаболитов, лекарств или гормонов в биологических жидкостях человека. Однако в последнее время все большее распространение получают биосенсоры, предназначенные для индивидуального анализа в домашних условиях. Использование биосенсоров позволяет снизить риск ошибки при постановке диагноза, проводить экспресс-диагностику, не прибегая к услугам лабораторий, а также уменьшить затраты на проведение анализов.

Основное отличие сенсорных технологий от традиционных подходов инструментального анализа состоит в том, что биосенсоры позволяют производить качественный и количественный анализ в реальном масштабе времени с минимальной дополнительной подготовкой анализируемого материала, так как в них процессы химического превращения определяемого вещества и измерения сигнала совмещены во времени и пространстве. К характерным особенностям биосенсоров можно отнести следующие: высокая специфичность и чувствительность, быстрый отклик, малая вероятность ошибки, безопасность в использовании и возможность массового производства. Это позволяет использовать биосенсоры в областях, где требуется быстрое получение предварительной информации о химическом составе анализируемого объекта, – в медицине, для оценки качества продуктов питания, в системах безопасности, в производстве, для эколого-аналитического контроля и т.д.

В биосенсорах в качестве рецепторов, обеспечивающих формирование аналитического сигнала, обычно используют биохимические или биологические компоненты. Таким образом, биосенсор – это устройство, которое использует специфические биохимические реакции с участием изолированных ферментов, антител, органелл, клеток и тканей для детектирования химических соединений посредством электрического, термического или оптического сигнала. Важнейшие направления исследований в обла-

сти создания биосенсоров – создание новых материалов для сенсоров и обеспечение более эффективной связи между его компонентами для оптимизации основных характеристик сенсора.

Последние разработки в области биосенсорики и нанотехнологий позволяют существенно уменьшить размер сенсорного элемента без сильной потери в чувствительности, что дает возможность создавать портативные системы для быстрого анализа клинических препаратов, а также *in vivo* мониторинга метаболитов, лекарственных препаратов и белков.

Несмотря на многообразие существующих биосенсоров, наиболее широкое распространение получили оптические биосенсоры [17,18]. Это обусловлено тем, что последние позволяют осуществлять детектирование очень малого количества вещества и могут быть адаптированы к анализу и детектированию большой номенклатуры различных биологических и химических объектов. В настоящее время в этом направлении лидирующие позиции занимают биосенсоры, действие которых основано на спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [14, 23, 27] и гигантском комбинационном рассеянии света (ГКР) [1, 2, 31, 35, 57]. Несмотря на то, что последние находятся пока на уровне лабораторных разработок, они обладают определенными преимуществами по сравнению с ППР-биосенсорами. Так как колебательный спектр каждой молекулы индивидуален и чувствительность ГКР-методов не уступает методам ППР, это позволяет производить детектирование и изучать протекание биохимических реакций практически на уровне единичных биомолекул без дополнительной функционализации поверхности сенсора.

Плазмоны представляют собой коллективные колебания плотности заряда свободного электронного газа. В отличие от объемных плазмонов (колебания электронов проводимости внутри ионной решетки кристалла) поверхностные плазмоны представляют собой поверхностные электромагнитные волны, которые распространяются в направлении, параллельном границе раздела металл – диэлектрик (металл – вакуум), и сильно локализованы у границы раздела сред. В результате такие эванесцентные волны оказываются весьма чувствительными к любым изменениям граничных условий, например, к адсорбции молекул на поверхности металла. Это свойство поверхностных плазмонов позволяет использовать их для детектирования сверхмалых концентраций различных биохимических соединений.

Простейшей системой, в которой можно возбудить поверхностные плазмоны, является граница металл – диэлектрик. Анализ уравнений Максвелла с соответствующими граничными условиями показывает возможность существования только одной распространяющейся моды электромагнитного поля, которая и представляет собой поверхностный плазмон. Диэлектрическая проницаемость металлов является комплексной величиной, характерной особенностью которой является отрицательная величина ее действительной части в ультрафиолетовом (УФ), видимом и в части инфракрасного (ИК) диапазона спектра. Помимо этого, для таких металлов, как золото и серебро, комплексная часть диэлектрической проницаемости имеет относительно невысокие значения в указанном спектральном диапазоне, что говорит о слабом поглощении в материале. Возбуждение поверхностной волны на границе металл – диэлектрик возможно только при определенных соотношениях между диэлектрическими проницаемостями данных материалов, что в видимом и ближнем ИК-диапазоне спектра выполняется для таких металлов, как золото, серебро, алюминий и медь [42].

Поверхностный плазмон является поперечной волной, поэтому его вектор напряженности электрического поля перпендикулярен границе раздела металл – диэлектрик и направлению его распространения. Напряженность электрического поля достигает максимума на границе раздела металл – диэлектрик и затем экспоненциально затухает как в металле, так и в диэлектрике. Величина затухания поля зависит от длины волны излучения и диэлектрической проницаемости материалов. Обычно для границы раздела металл – аналит глубина затухания составляет десятки нанометров, в результате в биосенсорах на ППР осуществляется детектирование молекул, находящихся только в тонком приповерхностном слое. Это позволяет реализовать высокую чувствительность и селективность, а также существенно уменьшить паразитный фоновый сигнал.

Для возбуждения поверхностного плазмона на границе металл – диэлектрик должно выполняться согласование проекции волнового вектора падающего излучения параллельной границе раздела и волнового вектора поверхностного плазмона. Для достижения данного согласования волновых векторов обычно используют согласующие устройства, такие как призма, волновод или субволновая решетка.

Наиболее часто для возбуждения поверхностных плазмонов используют призменную схему Кречмана [33], в которой возбуждающее излучение проходит через призму с высоким показателем преломления и, отражаясь от основания призмы, приводит к возникновению эванесцентной волны (рис. 1). Данная волна проникает в тонкую металлическую пленку, нанесенную на основание призмы, и возбуждает поверхностный плазмон. Согласование волновых векторов в данной схеме возбуждения осуществляется посредством изменения угла падения излучения.

Другой схемой для эффективного возбуждения поверхностных плазмонов является волновод, на полированную боковую поверхность которого нанесена тонкая пленка металла (рис. 2). Электромагнитное поле волноводной моды в основном сконцентрировано в центральном слое волновода, однако небольшая его часть проникает в виде эванесцентной волны

в слой с низким показателем преломления, окружающий волноводный слой. Когда свет достигает области волновода с металлической пленкой, данная эванесцентная волна возбуждает поверхностный плазмон на внешней границе металлического слоя.

Еще один способ возбуждения поверхностных плазмонов основан на использовании металлических субволновых решеток (рис. 3). В этом методе излучение падает из диэлектрической среды на металлическую решетку. Дифрагировавшее излучение может возбудить поверхностный плазмон в том случае, если проекция его волнового вектора, параллельная поверхности решетки, будет равна волновому вектору поверхностного плазмона.

В большинстве используемых сегодня ППР-биосенсоров для возбуждения поверхностных плазмонов используется призменная схема, получившая широкое распространение вследствие простой реализации и возможности использования методов с различным типом модуляции сигнала (см. рис. 1). В наиболее часто используемой схеме пучок монохроматического света проходит через призму и падает на тонкую металлическую пленку, находящуюся на ее основании, под резонансным углом, соответствующим наиболее эффективному возбуждению поверхностных плазмонов. Интенсивность отраженного света зависит от эффективности возбуждения поверхностных плазмонов и поэтому коррелирует с пространственным распределением показателя преломления вблизи поверхности металлической пленки.

В современных ППР-сенсорах с помощью ПЗС-камеры происходит регистрация распределения интенсивности излучения, отраженного от рабочей площадки сенсора, что позволяет увеличить производительность последнего. В частности, такой тип сенсоров дает возможность исследовать гибридизацию коротких олигонуклеотидов с концентрацией менее 10 нМ, что соответствует разрешению по показателю преломления 10^{-5} RIU (refractive index unit) [29]. Использование некогерентного источника излучения и интерференционного фильтра позволили достичь разрешения $3 \cdot 10^{-5}$ RIU в экспериментах по анализу бычьего сывороточного альбумина (БСА) [20]. Увеличить чувствительность сенсора возможно посредством использования 2 источников излучения с различными длинами волн.

Использование такого подхода позволило достичь разрешения по показателю преломления $2 \cdot 10^{-6}$ RIU и производить детектирование олигонуклеотидов и белков с концентрацией порядка единиц нМ [67]. Использование вместо линейно поляризованного света эллиптически поляризованного приводит к увеличению чувствительности и рабочего диапазона ППР-сенсора. Преимущества поляризационного контраста и определенной структуры пленки на призме позволяют добиваться чувствительности сенсора по показателю преломления $<10^{-6}$ RIU [45] и производить детектирование биомолекул, например, коротких олигонуклеотидов с концентрацией <100 пМ [46]. На сегодняшний день методика проведения биоанализа с помощью ППР-чипов с модуляцией интенсивности широко используется в коммерческих сенсорах Biacore, GWC Technologies Inc., Lumera, IBIS Technologies, SPRi-Array.

ППР-сенсоры, действие которых основано на детектировании спектральных характеристик ППР, также получили широкое распространение. В данных сенсорах измеряется спектр коэффициента отражения или пропускания, и выходной сигнал сенсора связан с угловым или спектральным изменением положения ППР. Весьма часто действие указанных сенсоров основано на модуляции угла падения возбуждающего

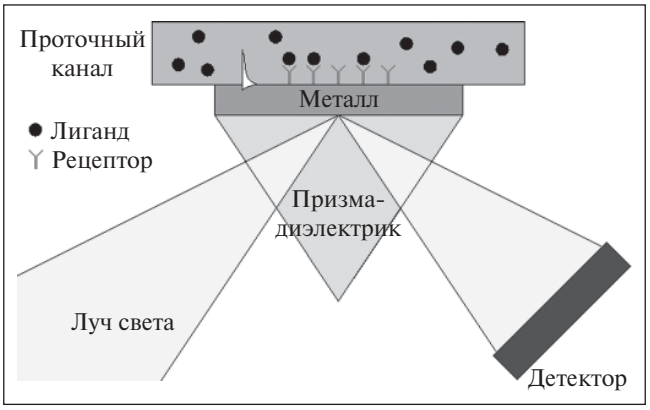

Рис. 1. *Схема ППР-биосенсора на основе диэлектрической призмы (схема Кречмана)*

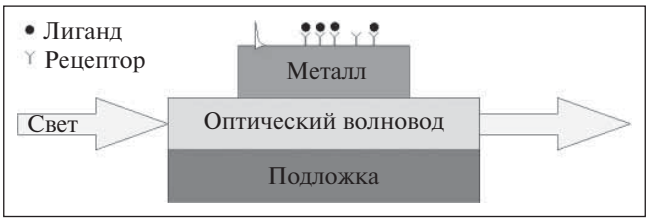

Рис. 2. *Схема на основе оптоволокна ППР-биосенсора*

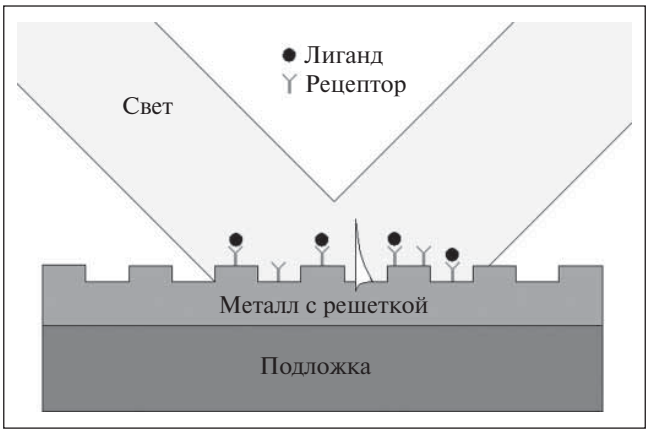

Рис. 3. *Схема ППР-биосенсора на основе субволновой решетки*

излучения. Данный тип сенсора позволяет проводить измерения с чувствительностью к показателю преломления до $1 \cdot 10^{-7}$ RIU, а также дает возможность построения многоканальной системы для проведения биохимического анализа [30, 40]. Использование модуляции по длине волны вместо модуляции по углу, а также архитектуры с параллельными каналами считывания дает возможность построить сенсор с чувствительностью по показателю преломления до $2 \cdot 10^{-7}$ RIU [43]. Данный тип ППР-сенсора был использован для обнаружения стафилококкового энтеротоксина В в молоке и показал предел детектирования 0,5 нг/мл [24]. Спектральное уплотнение каналов в ППР-сенсоре посредством введения дополнительного диэлектрического покрытия или изменения пространственно-угловой схемы возбуждения плазмонов позволяет создать многоканальные сенсоры с высокой производительностью при чувствительности $<10^{-6}$ RIU [15]. Применение спектроскопии длинноволновых поверхностных плазмонов и специальной многослойной структуры пленки обеспечивает разрешение $<3 \cdot 10^{-8}$ RIU [48].

Использование в схемах ППР-сенсоров различных типов интерферометров (в основном Маха–Цендера и Майкельсона) позволяет уменьшить размеры сенсора без потери в чувствительности. Действие таких биосенсоров основано на измерении сдвига фазы между измеряемым и опорным сигналами. Так, использование интерферометра Маха–Цендера в 2-канальном ППР-сенсоре дало возможность достичь разрешения до $3 \cdot 10^{-6}$ RIU [53]. ППР-сенсор, построенный на базе интерферометра Майкельсона, позволяет достичь более высокой чувствительности по показателю преломления, а именно $7{,}7 \cdot 10^{-7}$ RIU [64]. Использование данного сенсора для обнаружения антител БСА показало, что предел чувствительности для данных биомолекул составляет 6 нг/мл. Реализация в ППР-сенсоре на основе интерферометра Маха–Цендера независимой интерференции TE- и TM-волн, от сенсорного элемента и опорного пучка позволила достичь чувствительности $5{,}5 \cdot 10^{-8}$ RIU, что сделало возможным обнаружение молекул БСА с концентрацией менее 7,4 нг/мл [61].

Наиболее компактными являются оптоволоконные ППР-сенсоры (см. рис. 2). Кроме того, сенсоры данного типа позволяют проводить измерения непосредственно в анализируемом растворе без дополнительного оборудования для подачи аналита в область сенсорного элемента. Существует несколько типов оптоволоконных ППР-сенсоров. В первом роль сенсорного элемента выполняет полированная область оптоволокна с удаленной оболочкой, на которую нанесена тонкая пленка металла. Во втором типе сенсоров роль сенсорного элемента играет оптоволокно с сужающимся окончанием, покрытым тонкой пленкой металла. Возбуждение поверхностных плазмонов приводит к изменению интенсивности прошедшего света на определенной длине волны (сенсор с модуляцией интенсивности) или характерному провалу в спектре прошедшего света (сенсор с модуляцией длины волны). Основной проблемой для получения стабильных рабочих характеристик сенсора является чувствительность поляризации излучения, распространяющегося по волокну, к деформациям волокна. Оптоволоконные ППР-сенсоры с модуляцией по интенсивности позволяют достигать чувствительности $<10^{-5}$ RIU. Эксперименты по исследованию гибридизации молекул ДНК с помощью таких сенсоров показали чувствительность на уровне концентраций 0,1 мкМ [34]. Оптоволоконный ППР-сенсор с модуляцией по длине волны позволяет достигать чувствительности по показателю преломления до $5 \cdot 10^{-7}$ RIU [49] при отсутствии деформаций оптоволокна. Однако при умеренных деформациях его чувствительность падает на два порядка. Изучение реакции взаимодействия человеческого иммуноглобулина и моноклональных антител показало, что для сенсоров такого типа детектируемая концентрация биомолекул может составлять менее 0,1 мкг/мл. Для ППР-сенсоров на основе оптоволокна, сохраняющего направление поляризации, разрешение по показателю преломления составляет $<2 \cdot 10^{-6}$ RIU, что позволяет использовать его для обнаружения биомолекул с концентрацией <50 нг/мл [12]. Создание интегрированного ППР-сенсора с модуляцией по интенсивности и 2 каналами (один – для детектирования, другой – в качестве контрольного) позволило увеличить стабильность рабочих характеристик сенсора и его чувствительность. Для такого сенсора было достигнуто разрешение по показателю преломления $<5 \cdot 10^{-5}$ RIU, а проведение измерений для биомолекул симазина показало чувствительность к концентрациям <0,15 мкг/мл [21]. Использование в интегрированном сенсоре модуляции по длине волны позволило увеличить чувствительность по показателю преломления до 10^{-6} RIU и осуществлять регистрацию биомолекул в широком диапазоне концентраций – от 0,1 до 10^{-3} мг/мл [25].

Как было показано выше, ППР-сенсор может быть построен на основе оптоволокна с сужающимся окончанием, которое очищено от оболочки и покрыто пленкой металла. В работе [47] был построен такой сенсор с модуляцией по длине волны, для которого диапазон детектируемых концентраций в исследованиях по гибридизации молекул ДНК и детектированию молекул белков составил 0,5–5 мкМ. Оптоволоконный сенсор такого же типа, но использующий модуляцию по интенсивности, был предложен в работе [10]. Исследования показали, что с его помощью может быть достигнуто разрешение $5 \cdot 10^{-5}$ RIU. Использование однородного оптоволокна с несимметричным коническим окончанием, покрытым пленкой металла, позволяет построить мультирезонансный ППР сенсор с чувствительностью по показателю преломления до $7 \cdot 10^{-7}$ RIU [37].

Помимо призменных и оптоволоконных ППР-сенсоров, достаточно широко распространены ППР-сенсоры, построенные на основе металлических

(металл-диэлектрических) дифракционных решеток (см. рис. 3). Использование данных оптических элементов позволяет уменьшить как размер сенсора, так и его стоимость. Кроме того, в сенсорах данного типа нет необходимости в жидкости с определенным показателем преломления для создания оптического контакта между призмой и ППР-чипом. Как и в случае призменных ППР-сенсоров, сенсоры на решетках можно разделить на два типа – с модуляцией по интенсивности сигнала и спектральной модуляцией. ППР-сенсор с модуляцией по интенсивности на основе решетки из полимера, покрытой золотой пленкой, был создан в работе [7]. Сенсорный элемент освещался монохроматическим излучением, а отраженное излучение, несущее информацию о пространственном распределении интенсивностей ППР в чипе, регистрировалось с помощью ПЗС-матрицы. Такой сенсор позволял производить одновременные измерения в 400 каналах и достигать разрешения по показателю преломления до 10^{-6} RIU. Минимальная детектируемая концентрация биомолекул для сенсора данного типа составила 0,1 нМ [5]. В работе [14] для построения биосенсора была использована угловая спектроскопия поверхностных плазмонов на наборе дифракционных решеток, которые были изготовлены на основе полимера и покрыты золотой пленкой. Измерения показали, что в такой системе удается достичь чувствительности по показателю преломления $5 \cdot 10^{-6}$ RIU и при этом проводить одновременные измерения для 200 каналов. Проведение с помощью данного сенсора исследований по регистрации молекул БСА показали, что минимальная регистрируемая концентрация составляет <100 мкг/мл.

Для получения более детальной информации о распределении показателя преломления на поверхности сенсора можно использовать мультиплазмонную дифракционную решетку [3]. Профиль такой решетки состоит из множества гармоник, что приводит к возбуждению большого количества поверхностных плазмонов на разных длинах волн, с различным распределением поля вблизи поверхности наноструктуры. Проведение исследований для раствора молекул БСА показало, что чувствительность данного сенсора составляет <100 мкг/мл. Помимо этого, данный сенсор позволяет оценить толщину слоя детектируемых биологических молекул. Одновременное использование длинно- и коротковолновых поверхностных плазмонов, возбуждаемых на дифракционной решетке специальной архитектуры, позволило увеличить глубину проникновения длинноволновых поверхностных плазмонов и разделить отклики сенсора, обусловленные изменением объемного и поверхностного показателей преломления [55]. Такой сенсор имеет разрешение по показателю преломления $<3{,}5 \cdot 10^{-6}$ RIU и позволяет детектировать мономолекулярные слои биомолекул, адсорбированных на его поверхности.

В работе [54] угловая спектроскопия поверхностных плазмонов для сенсорного элемента в виде решетки была использована для проведения иммуноанализа. Дифракционная решетка освещалась излучением лазерного диода при различных углах падения излучения. Излучение, отраженное от поверхности чипа, регистрировалось с помощью ПЗС-матрицы, которая детектировала последовательные ППР-изображения в заданном диапазоне углов. Помимо регистрации цитокинов и других белков, данный ППР-сенсор может быть использован для изучения клеток, в частности, регистрации клеточного апоптоза, а также Т- и В-клеток. Исследование взаимодействия антиген – антитело для молекул мышиного иммуноглобулина показало, что для данного сенсора регистрируемая концентрация данных биомолекул составляет менее 50 нг/мл.

В работе [52] предложен новый подход в построении сенсоров, действие которых основано на спектроскопии поверхностных плазмонов, возбуждаемых на дифракционных решетках. В данном случае использовалась специально изготовленная дифракционная решетка, которая освещалась коллимированным пучком немонохроматического света. При этом часть энергии падающего излучения расходовалась на возбуждение поверхностных плазмонов через второй порядок дифракции. Одновременно с этим излучение первого порядка дифракции рассеивалось, и компоненты излучения с различными длинами волн попадали на различные части детектора. Возбуждение поверхностных плазмонов приводит к уменьшению интенсивности дифрагировавшего света, характеризующегося резким и узким провалом в спектре дифрагировавшего излучения. Результаты исследований, выполненных для растворов с различным показателем преломления, показали, что чувствительность данного сенсора по показателю преломления составляет $<3 \cdot 10^{-7}$ RIU.

В последнее время в биосенсорах все активнее начинает применяться спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС), используемая при решении самых разнообразных исследовательских задач. Спектроскопия КРС является важным аналитическим методом специфической идентификации молекул. Суть данного метода состоит в изучении колебательного спектра исследуемого вещества. Из потока света, который падает на образец, большая часть будет рассеиваться назад на той же длине волны лазера, однако малая часть будет неупругого рассеиваться, приводя к образованию ряда линий, которые несут информацию о собственных частотах вещества. Вследствие того, что разные молекулы имеют различные собственные моды, спектр неупругого рассеяния можно рассматривать как аналог «отпечатков пальцев» молекулы, который однозначно определяет анализируемое вещество. Несмотря на высокую специфичность, ранее применение спектроскопии КРС ограничивалось низкой эффективностью неупругих процессов рассеяния и, как следствие, очень слабым сигналом. Эта проблема была решена с появлением ГКР. В данном методе анализируемые молекулы (молекулы-мишени) помеща-

ются в непосредственной близости от металлической (как правило, Ag, Au) поверхности с наноразмерными неоднородностями или в растворе рядом с наночастицами с диаметром значительно меньше длины волны возбуждающего света. Когда свет падает на такую поверхность или раствор наночастиц, наблюдается существенное локальное увеличение электромагнитного поля в окрестности молекулы-мишени, что значительно повышает интенсивность сигнала КРС.

Одним из наиболее перспективных приложений ГКР является изучение структурных и функциональных особенностей различных биологических молекул, так как данный метод является неразрушающим и позволяет быстро получать информацию о химических и структурных свойствах биомолекул. При этом слабый сигнал КРС от молекул воды по сравнению с сигналом от изучаемых молекул позволяет изучать биомолекулы в естественном для них водном окружении. Накоплено большое количество данных, полученных при исследовании различных биологических молекул, таких как аминокислоты, нуклеиновые основания, водорастворимые, мембранные и светочувствительные белки и различные биологические комплексы [6, 22, 26, 56-58]. ГКР позволяет исследовать отдельные молекулы, а также процессы, происходящие внутри живой клетки. Это дает возможность более детально изучить и понять внутриклеточный транспорт, что играет важную роль в разработке новых лекарственных препаратов.

Усиление КРС обусловлено 2 механизмами – электромагнитным (связан с возбуждением поверхностных плазмонов) [32, 51, 63] и химическим (связан с переносом заряда в комплексе металл – молекула, происходящем при сильной электронной связи между молекулой и металлической поверхностью [60, 66]). Как правило, считается, что электромагнитное усиление преобладает над химическим усилением [11, 38].

Электромагнитный механизм усиления сигнала КРС является достаточно дальнодействующим, в отличие от химического механизма усиления. Это обусловлено тем, что электромагнитные поля локальных поверхностных плазмонов затухают на расстоянии нескольких десятков нанометров от поверхности металла. При удалении молекулы от поверхности на достаточно малое расстояние *(R)* фактор усиления *(G)* будет уменьшаться в соответствии с законом: $G \sim (r_0/R)^{12}$, где r_0 — характерный геометрический размер наночастицы. Таким образом, эффект ГКР проявляется только для молекул, находящихся в непосредственной близости от поверхности металла, что позволяет добиться высокой селективности при предварительной функционализации поверхности металла молекулами, высокоспецифичными к детектируемым соединениям.

При применении спектроскопии ГКР для изучения сложных биологических молекул важно знать, в какой мере наблюдаемое усиление сигнала КРС обусловлено электромагнитным механизмом, а в какой – химическим. Изучение ДНК, РНК, белков, нуклеиновых оснований и ряда модельных биологических соединений с известной структурой позволило определить, при каких условиях реализуется электромагнитный и химический механизмы ГКР для адсорбированных молекул. Оптимальной системой для реализации электромагнитного механизма усиления является металлическая поверхность с низкой шероховатостью и регулярными структурными элементами одинаковых размеров, которые приводят к эффективному возбуждению поверхностных плазмонов. Химический механизм усиления КРС в основном преобладает для ГКР подложек, обладающих весьма развитой поверхностью, например, для шероховатых металлических подложек и систем металлических наночастиц. В случае реализации короткодействующего химического механизма появляется возможность проводить анализ топографии макромолекул, а также выяснять природу химических групп, способных образовывать устойчивые и сильные связи с металлами. Важным аспектом при проведении ГКР экспериментов с биологическими молекулами является вопрос сохранения конформации молекул при их адсорбции на поверхности металла. В большинстве случаев адсорбция биомолекул на такие подложки не приводит к изменению конформационных и функциональных свойств молекул, однако этот вопрос требует детального изучения. При электромагнитном механизме усиления КРС различие в электронных структурах молекул не оказывает существенного влияния на увеличение сигнала КРС от адсорбированных молекул [1, 2, 51, 60, 63, 66].

В настоящее время наиболее распространены два метода регистрации биомолекул посредством ГКР: однородный – в этом случае молекула-мишень образует связь с находящимися в растворе металлическими наночастицами, которые играют роль «усилителей» КРС (рис. 4, а), и неоднородный – в данном случае раствор анализируемых молекул помещается на поверхность с ГКР-активными центрами (рис. 4, б). Преимущества первого метода заключаются в высокой скорости реакции и относительной простоте реализации, а также однородности и повторяемости получаемого усиления сигнала ГКР, так как наночастицы могут быть синтезированы с высокой степенью повторяемости их параметров. В таких ГКР-системах часто используют металлические наночастицы с различными типами оболочек [27] и наностержни [41] в качестве ГКР-активных субстратов. Недостаток данного метода состоит в том, что поскольку наночастицы оказываются диспергированы в растворе, чувствительность обнаружения относительно мала, если только не используются усовершенствованные методы микроскопии.

Для реализации неоднородного метода используют различные типы ГКР-активных подложек, например, электрохимические электроды [36], островковые металлические пленки, полученные осаждением из газовой фазы [28], периодические матрицы наночастиц [8, 59], а также наноструктуры, полученные с

помощью литографии [13]. Все это позволяет выбрать архитектуру подложки для ГКР, наиболее соответствующую экспериментальным потребностям [19]. Хотя такие ГКР-системы могут иметь принципиально более высокую чувствительность, чем однородные и возможно повторное использование ГКР-активных поверхностей, время анализа в них может оказаться больше, чем при однородном методе (так как молекулы должны диффундировать к месту анализа), кроме того, часто трудно получить ГКР подложки с повторяющимся уровнем усиления сигнала.

Как было сказано выше, ГКР-методика используется для различных биохимических анализов, в том числе и иммуноанализа, целью которого является обнаружение специфического взаимодействия между антителами и антигенами. В работе [62] проводилось детектирование антигена вируса гепатита В посредством использования золотых наночастиц, снабженных иммунометками, которые адсорбировались на ГКР-активной серебряной подложке. При этом удалось достигнуть чувствительности <0,5 мкг/мл. Авторы другой работы [16] предложили использовать ГКР в области ближнего ИК-диапазона для детектирования мышиного иммуноглобулина (Ig) посредством использования наночастиц золота независимо от образования связей антиген – антитело. В отличие от обычного иммуноанализа с процедурами разделения связанных и свободных антигенов, в данном методе антигены были минимальным образом включены в получаемый ГКР-сигнал вследствие их удаленности от золотой наночастицы. Это позволило провести прямое детектирование антител, используя ГКР-активные молекулы мышиного Ig для концентраций до 10 нМ.

Для создания систем с высокой производительностью необходимы детектирующие методы, позволяющие одновременно обнаруживать различные биомолекулы в пределах одного образца [50]. Малая спектральная ширина линий КРС позволяет минимизировать перекрытие линий от различных меток, что дает возможность исследовать биологические образцы со сложным составом или использовать одновременно различные метки для анализа последовательностей ДНК [4].

Такая методика была использована для обнаружения различных ДНК оснований [57]. Авторы использовали олигонуклеотиды, меченные молекулами КРС-активного красителя. Данные ГКР-активные метки использовались для обнаружения комплементарных им цепочек ДНК посредством гибридизации, что детектировалось с помощью спектров КРС.

В качестве альтернативы традиционному ДНК-анализу в работе [9] предложено использовать ГКР-метод для детектирования ДНК. Для проведения анализа были использованы олигонуклеотиды, меченные молекулами КРС-активного красителя. При этом для достижения более высокой чувствительности золотые наночастицы покрывались серебром. В экспериментах по исследованию гибридизации ДНК были использованы 6 различных ДНК цепочек для детектирования и показано, что предел детектирования составляет 20 фМ.

Как уже отмечалось, химический механизм усиления КРС не требует возбуждения плазмонов и может быть реализован, например, для наночастиц диэлектриков [39]. В данном случае в качестве ГКР-активного субстрата использовались наночастицы TiO_2, функционализированные молекулами энедиола, для селективного обнаружения молекул допамина. Образуемый зарядовый комплекс между наночастицей и адсорбированной молекулой приводил к значительному увеличению сигнала КРС от молекул допамина. Исследования показали, что минимальная детектируемая концентрация молекул допамина составляет 10 мМ.

Наряду с коллоидными растворами наночастиц широкое распространение получили ГКР-подложки, которые по детектируемым концентрациям не уступают растворам наночастиц. В большинстве случаев они представляют собой определенным образом наноструктурированные поверхности металлов. Например, анодирование поверхности алюминиевой фольги приводит к образованию упорядоченной системы гексагональных нанопор [65]. Исследования показали, что такая структура может с успехом использоваться для обнаружения цитохрома из бычьего сердца и обнаружения спор бактерии *Bacillus subtilis* с концентрациями <20 мМ. Еще один метод получения ГКР-подложек

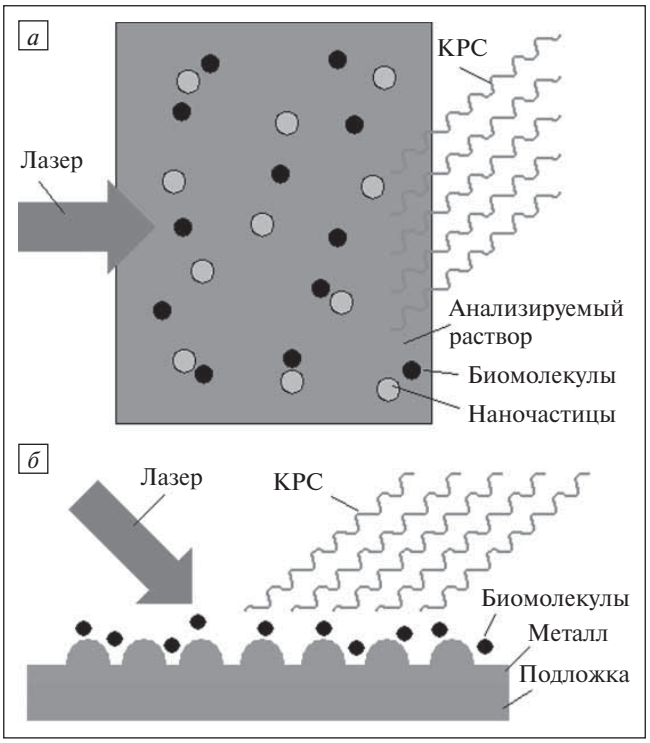

Рис. 4. *Принцип действия ГКР-биосенсора при использовании однородного (а) и неоднородного (б) метода регистрации биомолекул*

состоит в напылении пленки металла на подложку и последующем отжиге, в результате которого формируется система наночастиц металла. Сформированные таким образом наночастицы серебра на поверхности кремния использовались для детектирования молекул родамина 6G и показали предел обнаружения для концентраций менее 40 мкМ. Также ГКР-подложка может быть изготовлена посредством наноструктурирования золотой пленки, нанесенной на кварцевую подложку, в результате ее обработки в кислородной плазме [44]. Исследования по обнаружению молекул аденина с помощью данной структуры показали, что предел детектирования составляет <10 фМ.

В заключение отметим, что рассмотренные оптические биосенсоры, действие которых основано на спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса и эффекте ГКР, могут быть использованы как для обнаружения достаточно большой номенклатуры биологических молекул, так и для изучения протекания различных биохимических реакций. В преобладающем большинстве случаев в биосенсорах, действие которых основано на спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса, в качестве сенсорного элемента используется призма, основание которой покрыто пленкой благородного металла. Данная пленка металла может быть определенным образом структурирована для увеличения чувствительности биосенсора. Сегодня данный тип биосенсоров является коммерчески доступным и реализован такими компаниями, как Biacore, Sensata Technologies, XanTec Bioanalytics, IBIS Technologies, Lumera и SPRi-Array. Однако использование в качестве основы сенсорного элемента оптоволокна или дифракционных решеток позволяет не только уменьшить размер сенсора, но и увеличить его чувствительность. Применение различных схем и структур для возбуждения плазмонов в сенсорах, действие которых основано на спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса, позволяет работать в широком диапазоне концентраций и осуществлять детектирование биомолекул с концентрацией <100 пМ.

Биосенсоры, принцип действия которых основан на явлении ГКР, в основном построены либо на определенным образом наноструктурированных металлических подложках, либо на использовании коллоидных растворов металлических наночастиц. По сравнению с вышеупомянутыми сенсорами, принцип действия которых основан на спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса, данные биосенсоры обладают рядом преимуществ: более высокая чувствительность, высокая специфичность вследствие однозначного детектирования молекулы по ее спектру комбинационного рассеяния света, а также возможность проведения анализа без дополнительной биогибридизации поверхности сенсора. Также данный тип биосенсоров позволяет работать в большом диапазоне концентраций детектируемых веществ и обнаруживать в растворах биомолекулы с концентрацией вплоть до 10 фМ. Однако для проведения биохимического анализа с высокой чувствительностью такие сенсоры требуют сложного аналитического оборудования, что делает затруднительным уменьшение их размеров.

Таким образом, оба типа рассмотренных биосенсоров, обладая высокой чувствительностью к детектируемым молекулам, позволяют работать с большой номенклатурой биологических и химических соединений в широком диапазоне концентраций. Помимо этого, данные биосенсоры позволяют производить измерения в режиме реального времени, анализировать вещества со сложным составом, проводить анализ без использования меток и многократно применять один чип для проведения анализа. Они также обладают высокой стабильностью характеристик и воспроизводимостью результатов. Возможность реализации многоканальных систем для проведения анализа в таких биосенсорах существенно увеличивает не только их производительность, но и чувствительность. Все эти преимущества привели к их широкому использованию в различных областях биотехнологий – для высокочувствительной экспресс-диагностики в медицине, протеомных исследований белковых и белок-лигандных комплексов, биохимического анализа в фармакокинетических исследованиях сывороточного связывания фармпрепаратов, исследования кинетики биохимических реакций для составления карт межбелковых и метаболических взаимодействий, а также для проведения анализа в биотехнологических и иммунологических тест-системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках госконтракта № 11.519.11.3014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Емельянов В.И., Коротеев Н.И. Эффект гигантского комбинационного рассеяния света молекулами, адсорбированными на поверхности металла // УФН. – 1981; 135: 345 с.
2. Набиев И.Р., Ефремов Р.Г., Чуманов Г.Д. Гигантское комбинационное рассеяние и его применение к изучению биологических молекул // УФН. – 1988; 154: 459.
3. Adam P., Dostálek J., Homola J. Multiple surface plasmon spectroscopy for study of biomolecular systems // Sens. Actuators B. – 2006; 113: 774–81.
4. Allain L. et al. Surface-enhanced Raman scattering detection of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 using a silver-coated microarray platform // J. Anal. Chim. Acta. – 2002; 469: 149–54.
5. Baggio R., Carven G., Chiulli A. et al. Induced Fit of an Epitope Peptide to a Monoclonal Antibody Probed with a Novel Parallel Surface Plasmon Resonance Assay // J. Biol. Chem. – 2005; 280: 4188–94.
6. Barhoumi A., Zhang D., Tam F. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA // J. Am. Chem. Soc. – 2008; 130: 5523.
7. Brockman J., Fernandez S. Grating-coupled surface plasmon resonance for rapid, label-free, array-based sensing // Am. Lab. – 2001; 33: 37–40.
8. Brolo A. et al. Nanohole-Enhanced Raman Scattering // J. Nano Lett. – 2004; 4: 2015–8.
9. Cao Y., Jin R., Mirkin C. Select this article nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection // J. Science. – 2002; 297: 1536–40.

10. Chang Y., Chen Y., Kuo H. et al. Nanofiber optic sensor based on the excitation of surface plasmon wave near fiber tip // J. Biomed. Opt. – 2006; 11 (1): 014032.
11. Chen L., Choo J. Recent advances in surface-enhanced Raman scattering detection technology for microfluidic chips // J. Electrophoresis. – 2008; 29: 1815–28.
12. Cho H., Lee B., Liu G. et al. Label-free and highly sensitive biomolecular detection using SERS and electrokinetic preconcentration // Lab Chip. – 2009; 9: 3360–3.
13. Dick L. et al. Metal Film over Nanosphere (MFON) Electrodes for Surface- Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Improvements in Surface Nanostructure Stability and Suppression of Irreversible Loss // J. Phys. Chem. B. – 2002; 106: 853–60.
14. Dostálek J., Homola J., Miler M. Rich information format surface plasmon resonance biosensor based on array of diffraction gratings // Sens. Actuators B. – 2005; 107: 154–161.
15. Dostálek J., Vaisocherova H., Homola J. Multichannel surface plasmon resonance biosensor with wavelength division multiplexing // J. Sens. Actuators B. – 2005; 108: 758.
16. Dou X. et al. Surface-Enhanced Raman-Spectroscopy of Lysozyme // J. Raman Spectrosc. – 1998; 29: 739–42.
17. Erickson D., Mandal S., Yang A. et al. Nanoscale Optofluidic Devices for Biomolecular Detection // J. Microfluid Nanofluid. – 2008; 4: 33–52.
18. Fan X., White I., Shopoua S. et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, Analytica Chimica Acta // J. Anal. Chim. Acta. – 2008; 620: 8–26.
19. Felidj N. et al. Gold particle interaction in regular arrays probed by surface enhanced Raman scattering // J. Chem. Phys. – 2004; 120: 7141–6.
20. Fu E., Foley J., Yager P. Wavelength-tunable surface plasmon resonance microscope // J. Rev. Sci. Instrum. – 2003; 74: 3182.
21. Harris R., Luff B., Wilkinson J. et al. Integrated optical surface plasmon resonance immunoprobe for simazine detection // Biosens. Bioelectron. – 1999; 14: 377–86.
22. Hering K. et al. SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics // J. Anal. Bioanal. Chem. – 2008; 390: 113.
23. Homola J. Surface plasmon resonance based sensors. – Springer: Berlin, Germany, 2006.
24. Homola J., Dostálek J., Chen S. et al. Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk // Int. J. Food Microbiol. – 2002; 75: 61.
25. Huang J., Lee C., Lin H. et al. A miniaturized germanium-doped silicon dioxide-based surface plasmon resonance waveguide sensor for immunoassay detection // Biosens. Bioelectron. – 2006; 22: 519–25.
26. Hudson S., Chumanov G. Bioanalitical applications of SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) // J. Anal. Bioanal. Chem. – 2009; 394: 679.
27. Jackson J. et al. Controlling the surface enhanced Raman effect via the nanoshell geometry // J. Appl. Phys. Lett. – 2003; 82: 257–9.
28. Jacobson M., Rowlen K. Photodynamics on thin silver films // J. Chem. Phys. Lett. – 2005; 401: 52–7.
29. Jordan C., Corn R. Surface plasmon resonance imaging measurements of electrostatic biopolymer adsorption onto chemically modified gold surfaces // J. Anal. Chem. – 1997; 69: 1449.
30. Karlsson R., Stahlberg R. Surface Plasmon Resonance Detection and Multi-Spot Sensing for Direct Monitoring of Interactions Involving Low Molecular Weight Analytes and for Determination of Low Affinities // Anal. Biochem. – 1995; 228: 274–80.
31. Kneipp J. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering in Local Optical Fields of Silver and Gold NanoaggregatessFrom Single-Molecule Raman Spectroscopy to Ultrasensitive Probing in Live Cells // J. Anal. Chem. – 2005; 77: 2381–85.
32. Kneipp K. et al. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy // J. Chem. Rev. – 1999; 99: 2957–76.
33. Kretschmann E., Raether H. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light // J. Naturforsch. – 1968. – 2135 c.
34. Lin H., Tsai W., Tsao Y. et al. Side-polished multimode fiber biosensor based on surface plasmon resonance with halogen light // Appl. Opt. – 2007; 46 (5): 800–6.
35. Liu G. et al. Peptide-nanoparticle hybrid SERS probes for optical detection of protease activity // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2007; 7: 2323–30.
36. Liu Y., Yu C., Sheu S. Improved surface-enhanced Raman scattering on optimum electrochemically roughened silver substrates // J. Anal. Chim. Acta. – 2006; 577: 271–5.
37. Monzon-Hernandez D., Villatoro J. High-resolution refractive index sensing by means of a multiple-peak surface plasmon resonance optical fiber sensor // Sens. Actuator B. Chem. – 2006; 115 (1): 227–31.
38. Moskovits M., Tay L., Yang J. et al. SERS and the single molecule, in: Optical Properties of Nanostructured Random Media. – Springer, Berlin, 2002: 215–27.
39. Musumeci A., Gosztola D., Schiller T. et al. SERS of Semiconducting Nanoparticles (TiO2 Hybrid Composites) // J. AM. CHEM. SOC. – 2009; 131: 6040–1.
40. Nice E., Catimel B. Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions // Bioessays. – 1999; 21: 339–52.
41. Nikoobakht B., El-Sayed M. Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Gold Nanorods // J. Phys. Chem. A. – 2003; 107: 3372–8.
42. Palik E. Handbook of optical constants of solids III. – Academic Press, New York, 1998.
43. Pedersen H., Thirstrup C. Design of near-field holographic optical elements by grating matching // Appl. Opt. – 2004; 43: 1209–15.
44. Piliarik M., Homola J., Manikova Z. et al. Surface plasmon resonance sensor based on a single-mode polarization-maintaining optical fiber // Sens. Actuators B. – 2003; 90: 236.
45. Piliarik M., Vaisocherova H., Homola J. A new surface plasmon resonance sensor for high-throughput screening applications // J. Biosens. Bioelectron. – 2005; 20: 2104.
46. Piliarik M., Vaisocherova H., Homola J. Towards parallelized surface Plasmon resonance sensor platform for sensitive detection of oligonucleotides // J. Sens. Actuators B. – 2007; 121: 187.
47. Pollet J., Delport F., Janssen K. et al. Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA-protein interactions // Biosens. Bioelectron. – 2009; 25 (4): 864–9.
48. Slavík R., Homola J. Ultrahigh resolution long range surface plasmon-based sensor // Sens. Actuators B. – 2007; 123: 10–2.
49. Slavík R., Homola J., Cÿtyrok J. et al. Novel spectral fiber optic sensor based on surface plasmon resonance // Sens. Actuators B. – 2001; 74: 106–11.
50. Sun L., Yu C., Irudayaraj J. Raman Multiplexers for Alternative Gene Splicing // J. Anal. Chem. – 2008; 80: 3342–9.
51. Tao A. R. et al. Polarized Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Coupled Metallic Nanowires // J. Phys. Chem. B. – 2005; 109: 15687–90.
52. Telezhnikova O., Homola J. New approach to spectroscopy of surface plasmons // Opt. Lett. – 2006; 31: 3339–41.
53. Thirstrup C., Zong W., Borre M. et al. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors // Sens. Actuators B. – 2004; 100: 298–308.
54. Unfricht D., Colpitts S., Fernandez S. et al. Grating-coupled surface plasmon resonance: a cell and protein microarray platform // Proteomics. – 2005; 5: 4432–42.
55. Vala M., Dostálek J., Homola J. Diffraction grating-coupled surface plasmon resonance sensor based on spectroscopy of long-range and short-range surface plasmons // Optical. Sensing. Technology. and Applications. – 2007; 6585: 658522.
56. Vo-Dinh T. Nanotechnology in biology and medicine: Methods, devices, and applications. – CRC Press: Boca Raton, FL, 2007.
57. Vo-Dinh T., Allain L., Stokes D. Cancer gene detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS) // J. Raman Spectrosc. – 2002; 33: 511–6.
58. Vo-Dinh T., Yan F., Wabuyele M. Surface-enhanced Raman scattering for medical diagnostics and biological imaging // J. Ram. Spec. – 2005; 36: 640.
59. Wang H., Levin C., Halas N. Nanosphere Arrays with Controlled Sub-10-nm Gaps as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates // J. Am. Chem. Soc. – 2005; 127: 14992–3.
60. Wen R., Fang Y. An investigation of the surface-enhanced Raman scattering (SERS) effect from a new substrate of silver-modified silver electrode // J. Colloid. Interface Sci. – 2005; 292: 469–75.
61. Wu S., Ho H., Law W. et al. Highly sensitive differential phase-sensitive surface plasmon resonance biosensor based on the Mach–Zehnder configuration // Opt. Lett. – 2004; 29: 2378–80.
62. Xu S. et al. Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancemen // J. Analyst. – 2004; 129: 63–8.
63. Xu Y. et al. A new mechanism of Raman enhancement and its application // J. Chemistry. – 2002; 8: 5323–31.
64. Yuan W., Ho H., Wong C. et al. Surface Plasmon Resonance Biosensor Incorporated in a Michelson Interferometer WithEnhanced Sensitivity // IEEE Sensors J. – 2007; 7: 70–3.
65. Zhang C. et al. Surface enhanced Raman scattering of biospecies on anodized aluminum oxide films // Chemical. Physics. Letters. – 2007; 440: 239–43.
66. Zou X., Dong S. Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Silver Nanoplates in Aqueous Solution // J. Phys. Chem. B. – 2006; 110: 21545–50.
67. Zybin A., Grunwald C., Mirsky V. et al. Double–wavelength technique for surface plasmon resonance measurements: Basic concept and application for single sensors and two-dimensional sensor arrays // J. Anal. Chem. – 2005; 77: 2393.