



ИНСТИТУТ ПО ОПТИЧЕСКИ МАТЕРИАЛИ И ТЕХНОЛОГИИ

“АКАД. Й. МАЛИНОВСКИ”

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на научно-образователна степен „доктор“

направление 4.1 „Физични науки“, специалност „Електрични, магнитни и оптични свойства на кондензираната материя“

Тема: Биосензори, базирани на повърхнинен плазмонен резонанс в дифракционни решетки с директна имобилизация на разпознаващото вещество

Докторант: Евдокия Белина

Научен ръководител: доц. д-р Георги Дянков

София, 2020 г.

Представеният дисертационен труд е обсъден от разширен състав на Колоквиума на Института по оптически материали и технологии „Акад. Й. Малиновски“ БАН на заседание от 14.07.2020г. и е допуснат до публична защита.

Дисертацията се състои от увод и актуалност на тематиката, цел и задачи на дисертационния труд, 3 глави, заключения, основни приноси, списък на публикациите, включени в дисертацията, списък на използвани съкращения и библиография. Изложението съдържа 91 номерирани страници, 51 фигури, 2 таблици, 51 формули и 119 цитирани източника.

Защитата на дисертацията ще се състои на 15.10.2020 г. от 10:00 часа в зала 210 на блок 109 на ИОМТ-БАН на открито заседание на научно жури в състав:

Вътрешни членове:

1. доц. д-р Георги Дянков
2. доц. д-р Димана Назърова

Външни членове:

1. доц. д-р Тихомир Тенев
2. проф. д.ф.н. Лъчезар Аврамов
3. доц. д-р Александър Гизбрехт

Резервни членове:

1. доц. д-р Лиан Неделчев
2. доц. д-р Йордан Маринов
3. доц. д-р Таня Драйшу

Материалите за защитата са на разположение на интересувашите се в деловодството на ИОМТ - БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 109.

Включените в дисертацията резултати са докладвани на 11 научни събития и конференции и публикувани в 5 научни статии.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

1. G. Dyankov, V. Serbezov, E. Borisova, H. Kisov, **E. Belina**, Direct Immobilized Nanostructured Myoglobin for CO Detection by Surface Plasmon Resonance, Laser Optics ICLO 06/2018, Saint Petersburg (2018).
2. **Belina E.**, Kisov Ch., Pavlova E., Borisova E., Dyankov G.. Thin hemoglobin layers deposited by MAPLE technology. AIP (2018) ISSN:0094-243X, **SJR:0.16**.
3. G. Dyankov, T.A. Eftimov, N. Malinowski, **E. Belina**, H. Kisov, P. Mikulic, W.J. Bock, A highly efficient biosensor based on MAPLE deposited hemoglobin on LPGs around phase matching turning point, Optics & Laser Technology, Volume 123, 105907 (2020), **IF: 3.319**.

АКТУАЛНОСТ НА ТЕМАТА И ОБЗОР НА ОСНОВНИТЕ РЕЗУЛТАТИ В ОБЛАСТТА

Регистрацията и наблюдението в реално време на биологичните или биохимичните процеси е от изключително значение за медицината и биологията. Разработването на високочувствителни, специфични и рентабилни биосензори допринася за реализирането на високо прецизна диагноза и индивидуализирана медицина. Необходимостта от достъпни, неинвазивни тестове и контрол на ефективността на лечение дават тласък в развитието на биосензорите. Поради това, изследванията в тази област са с висока интензивност, което се потвърждава от тенденцията за експоненциален ръст на публикациите, запазваща се в продължение на години. Пазарът на биосензори, само в САЩ, се оценява на \$31500M [1] със среден годишен ръст 8.3%, което стимулира финансирането на изследователската дейност и я прави силно конкурентна.

Сензорите, базирани на явлението повърхнинен плазмонен резонанс (ППР) предлагат изключително чувствителен, точен, количествен и без етикетен метод за регистрация на молекулярни реакции в реално време. Това ги превръща в изключително атрактивни за извършване както на ранна диагностика, така и проследяване на ефективността от дадено лечение. От друга страна, обаче, те не са получили приложение като биосензори за приложение на място – като полеви устройства. Причина за това е недостатъчната специфичност.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Основният проблем при биосензорите, базирани на плазмонен резонанс е специфичността. Биосензорът не притежава 100% специфичност, дори ако разпознаващото вещество притежава 100% специфична реакция. Причините за това са в начина на имобилизация на разпознаващото вещество и в принципа на детекция чрез повърхнинен плазмонен резонанс.

В дисертацията са систематизирани изследвания, решаващи тези проблеми. **Целта на дисертацията е: разработване на лабораторен прототип на ППР биосензор за достигане на максимална специфичност.**

Поставените задачи за изпълнение са:

- 1. Да се разработи метод за директна имобилизация на разпознаващото вещество, с който да се имобилизират слоеве от металопротеините хемоглобин и миоглобин.**
- 2. Да се разработи биочип, базиран на ППР чрез отлагане на тези слоеве върху позлатена дифракционна решетка.**
- 3. Да се изследва функционалността на така отложените разпознаващи слоеве за биодетекция.**
- 4. Да се проведе теоретичен анализ на метод за възбуждане на двоен ППР чрез хирален анизотропен слой за разпознаване на сигналите от специфични/неспецифични въздействия.**
- 5. Да се потвърдят експериментално теоретичните изводи чрез моделни експерименти.**

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

В литературния обзор са разгледани основните характеристики, определящи видовете биосензори, разделени по пет критерии. Разгледано е явлението повърхнинен плазмонен резонанс и условията за неговото възникване. Дефинирани са методите за възбуждане на ППР, както и използваните за целта техники. Направено е описание на биосензорите, базирани на ППР, техните предимства и ограничения. Дефинирани са две основни стратегии за подобряване на работата на ППР сензорите и справяне с основният проблем и причините за него при тези устройства – неспецифичността за изследваната молекулярна реакция. Обобщени са използваните до момента методи по първата стратегия, а именно – получаване на силен сигнал от специфичната реакция, чрез оптимизиране на биоразпознаващия елемент. Оценена е ефективността от използваните методи, с което е изложена необходимостта от нов подход за имобилизация на биоразпознаващи елементи. Предложено е решение и технология за осъществяване на първата стратегия, описани във втора глава от дисертационния труд.

Представени са методите за реализация на опорен канал за отчитане на сигнала от неспецифични реакции и са описани техните предимства и недостатъци.

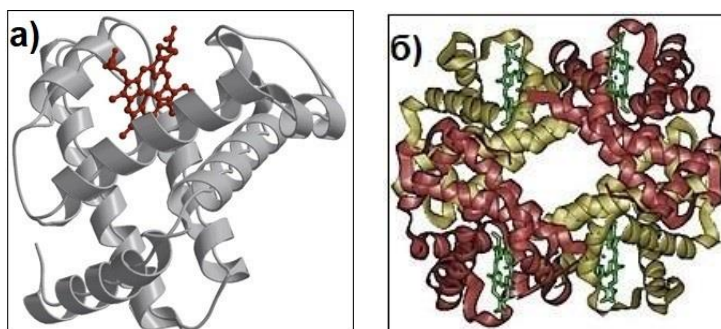
ГЛАВА 2. СТРАТЕГИЯ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА СИЛЕН СИГНАЛ ОТ СПЕЦИФИЧНАТА РЕАКЦИЯ, ЧРЕЗ ОПТИМИЗАЦИЯ НА БИОРАЗПОЗНАВАЩИЯ СЛОЙ

2.1. Металопротеините Hb и Mb като биоразпознаващи елементи

В настоящата глава от дисертацията са представени веществата, използвани за биоразпознаване, а именно – хемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb). Металопротеините се считат за изключително чувствителни молекули, тъй като тяхната биоактивност се определя не само от химическата им структура, но и от конформационните промени, настъпващи при имобилизационните процеси. В тази глава е показан подход за осъществяване на имобилизация чрез MAPLE, с набор от конкретни параметри за отлагане на тези металопротеини, осигуряващи запазването на тяхната химическа и физическа структура, както и тяхната биоактивност. Чрез показания подход се осигурява добра адхезия между отложените молекули и повърхността на чипа, което елиминира необходимостта от използване на вграждаща матрица. Директната имобилизация по този начин елиминира отрицателните въздействия на вграждащата матрица върху чувствителността и специфичността на биосензора. В резултат е постигната рекордна чувствителност при детекция на глюкоза. Доколкото ни е известно, методът не е използван за отлагане на металопротеини, като хемоглобин (Hb) и миоглобин (Mb), въпреки тяхното широко приложение в сензорните устройства.

Hb се използва като разпознаващ елемент в различни биосензори за детекция на CO₂ [2], NO [3] и CO [4], което се определя съответно от неговите аминокиселини, тиол и хем група. Mb е

подходящ като материал за разпознаване на водороден пероксид (H_2O_2) [5], азотен оксид (NO) [6] и сероводород (H_2S) [7] поради желязния йон в сърцевината му.



Фигура 2.1. Структурна формула на: а) миоглобин (Mb); б) хемоглобин (Hb).

2.1. Основни проблеми при имобилизация на Hb/Mb

i) Силната зависимост на биоактивността от състоянието на конформацията, определящо максимален афинитет към лиганда от интерес; ii) Ефектът на дехидратацията върху металопротеиновата активност. Структурата на джоба на хема се запазва от водородната връзка на водните молекули с повърхността на протеина [8].

От изложеното следва, че методът на отлагане на слоеве от металопротеините Hb и Mb трябва не само да запазва химическата структура, но и да запазва конформационното състояние на молекулите. Освен това отделянето на водните молекули от металопротеините, което е неизбежно, тъй като процесът се провежда във вакуум, трябва да бъде сведено до минимум. Решението на гореспоменатите проблеми може да бъде оценено изцяло чрез измерване на биоактивността на наноструктурираният слой, нанесен чрез MAPLE. Това се постига чрез проверка на жизнеността на различни функционални групи, които Hb / Mb притежават.

2.3. Метод и материали за осъществяване на имобилизация на Hb/Mb

В MAPLE, металопротеините се разтварят в селективно поглъщащ лазерното лъчение разтворител. Пригответеният разтвор впоследствие се замразява, образувайки твърда мишена, която се излага на лазерно облъчване. По този начин намалява агресивното взаимодействие на фотоните с биомолекулата, тъй като основната част от лазерната енергия се абсорбира от разтворителя. Лазерната енергия се преобразува в топлинна енергия, която помага да се изпарят молекулите на разтворителя, обграждащ протеиновите молекули. Летливите молекули на разтворителя се отвеждат от камерата чрез вакуумната система, докато протеиновите молекули достигат подложката.

2.3.1. Разтворител

От особено значение е изборът на летлив разтворител, в който се разтварят протеините. В първоначалните експерименти [9, 10] е използвано веществото полиетилен гликол (PEG), поради добре изразената му абсорбция около 355 nm. Като източник на радиация е използвана третата хармонична на Nd: YAG лазер, чиято дължина на вълната

съответства на селективната поглъщателна способност на PEG. Въпреки успешно имобилизираните протеинови слоеве, резултатите бяха незадоволителни, по отношение на повторяемост и биоактивност. Това е така, понеже използваното лъчение в УВ-диапазона е критично за фотоинициативното разлагане на протеини. Поради това, PEG беше заменен с дейонизирана вода. Течната вода, както и ледът имат абсорбционна лента около 1,2 μm [11], което означава, че е разумно да се използва основната дължина на Nd: YAG лазер - 1,06 μm . Използваната дължина на вълната позволява прилагане на радиация с по-висока плътност на енергията, докладвана досега.

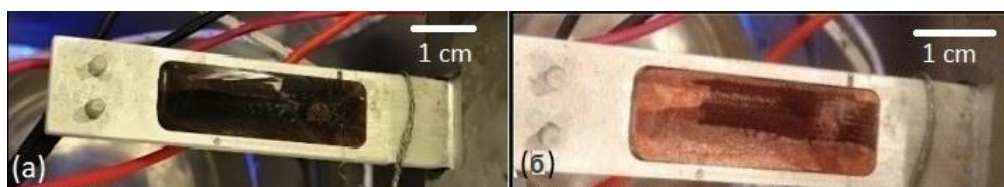
2.3.2. Подготовка на мишената

Параметрите, определящи състоянието на целевото вещество са изследвани и обобщени в таблица 2.1. Направеното проучване относно зависимостта на биоактивността на отложените слоеве от лазерната енергия в използвания температурен диапазон (-15 до -40 °C) потвърди, че ефективността на фототермичния процес е по-висока при по-ниска температури. За мишена с температура -30 °C оптималната импулсна енергия е 44 mJ, оптималната продължителност на импулса е 10 ns, а оптималната честота на повторение е 10 Hz.

Оптимални параметри	Стойност	Обхват на вариация
Крайна температура на мишената	-40 °C	-15 °C - -40 °C
Начин на замразяване	-	шоково/постепенно
Време на престой при налягане по-малко от 10^{-3} Torr	45 min	15-120 min

Таблица 2.1. Обобщение на оптималните параметри за целевото вещество.

На фиг. 2.2а е показана мишената - замразен разтвор на Hb преди имобилизация, докато фиг.2.2б показва същата мишена след частично изпарение. Тъмният цвят от фиг. 2.2а, който се дължи на замразяването във въздух, се използва за илюстриране на процеса. В реалния експеримент замразяването на мишената се извършва в азотна атмосфера.



Фигура 2.2. а) Мишена, замразена във въздух; б) същата мишена след имобилизация: веществото, изложено на лазерно облъчване (по-тъмна част в горния десен ъгъл) и веществото, което не е изложено (останалото).

2.3.4. Експериментални параметри

В таблица 2.2 са обобщени онези параметри, които са оптимизирани според основният критерий - отлагане на слоеве с експериментално доказана биоактивност. Обхватът на вариация на параметрите, показан в таблица 2.2, се определя от техническите

възможности на установката, както и от желаните характеристики на имобилизираните слоеве. Дебелината на имобилизираният слой зависи от броя на лазерните импулси, докато неговата адхезия изисква балансиране на лазерната енергия и разстоянието между мишената и подложката. Едновременно с това, разпределението на лазерната енергия определя биоактивността на отложените слоеве. Следователно, процедурата за оптимизация е сложна, тъй като изисква компромис между множество параметри.

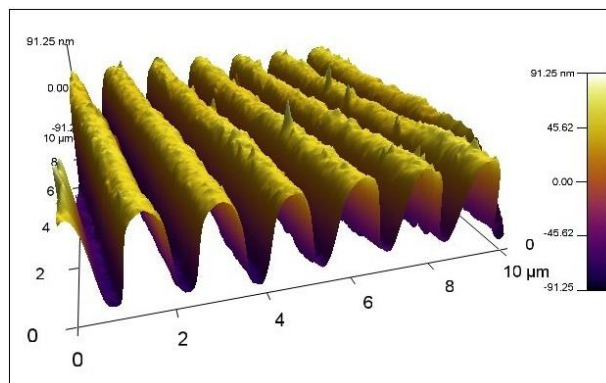
Параметри на взаимодействие между мишената и лазерното лъчение	Стойност	Обхват на вариация на параметрите	Параметри на взаимодействие между мишената и лазерното лъчение	Стойност	Обхват на вариация на параметрите
Дължина на вълната	1.06 μm	355, 512 nm 1.06 μm	Сканирана площ от мишената	4 cm^2	-
Енергия на лазерния импулс	35 mJ	20-100 mJ	Разстояние между мишената и подложката	4 cm	2-7 cm
Плътност на енергията на лазерното петно, фокусирано върху мишената	160 mJ/cm^2	100 – 400 mJ/cm^2	Скорост на сканиране	0.7 mm/s	0.2-2 mm/s
Честота на повторение на импулсите	10 Hz	1-20 Hz	Брой лазерни импулси	45 000	20 000 – 130 000 ¹
Продължителност на импулса	10 ns	10-30 ns	Време на изпаряване	32 min	20 – 120 min
Концентрация на протеина	7% wt	5-10% wt			

Таблица 2.2. Обобщение на ефективните параметри за слоевете от хемоглобин (Hb), успешно имобилизирани чрез MAPLE.

2.3.5. Система за контрол на лазерното лъчение и подложката

Чрез оптична система се осигурява равномерно и фокусирано разпределение на мощността на лазерното петно с диаметър 2 mm. Средната скорост на сканиране е 0,7 mm / s ., а общото време зависи от дебелината на слоя.

Биоактивността на получените с MAPLE наноструктурирани слоеве е изследвана чрез явлението ППР. За тази цел е използвана позлатена дифракционна решетка в ролята на преобразувател. Реализираната за първи път директна имобилизация на Hb / Mb е докладвана в [12, 13]. На фиг. 2.3. е показано изображение, направено с атомно-силов микроскоп (AFM) на гореописаната дифракционна решетка с директно имобилизиран слой от Mb.



Фигура 2.3. AFM изображение на позлатена дифракционна решетка, с отложен върху нея слой от Mb с дебелина 120 nm.

2.3.6. Обсъждане на резултатите

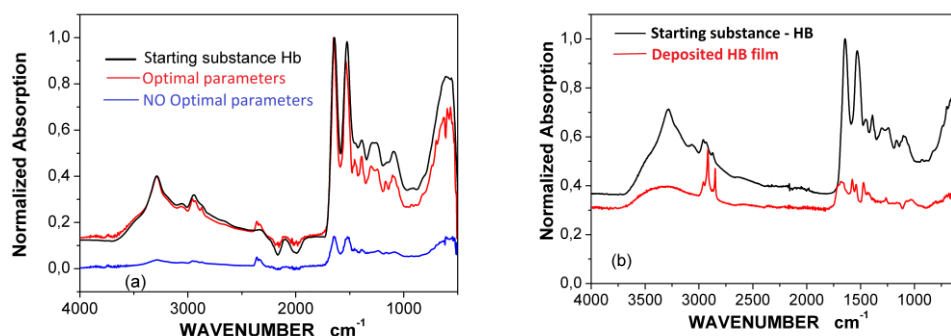
В допълнение относно температурата на мишената, скоростта на замръзване влияе и върху необходимата лазерната енергия. Шоковото замразяване определя по-ниската лазерна енергия. Този ефект е по-изразен за разтвора на Hb, отколкото този на Mb. Hb молекулите, като по-големи и с по-сложна структура, притежават много конформационни състояния. Всяко от тези състояния може да бъде повлияно от разсейване на енергията и от ефективно загряване на молекулите. Когато замразяването протича бавно, разликата в лазерната енергия, необходима за успешното изпаряване, изчезва.

Наблюдаваната зависимост на необходимата лазерна енергия при различни металопротеини показва, че фототермичният процес не се ограничава само до молекулите на летливия разтворител - протеиновите молекули също са засегнати. Това допълнително засилва процеса на отделяне на водни молекули от протеини, което е присъщо за среда на вакуум. Следователно, биоактивността на отложените слоеве значително намалява, в резултат на конформационни промени. Този ефект, специфичен за металопротеините, се изразява в намаляване на активността на свързване на хемовата група, тъй като тя съдържа повече водни молекули. При извършените експерименти е наблюдавана ниска или дори нищожна активност на групата хем, докато активността на другите функционални групи не е нарушена.

Остатъчното след имобилизация вещество от мишената (разтвор на Hb), което не е било изложено на лазерно облъчване, е изследвано чрез Фурие трансформирана инфрачервена спектроскопия (FTIR). Фиг. 2.4а показва FTIR спектри на началното и на остатъчното вещество при два набора от параметри - „оптимални“ и „неоптимални“. Оптималните параметри са обобщени в таблица 2.1. Резултатите, както се вижда от фиг. 2.4а, показват, че отлагането при оптималните параметри на MAPLE протеините в остатъчната мишена са запазени.

От гореизложеното следва, че всички свойства на имобилизираните слоеве се определят от параметрите, свързани с взаимодействието между протеиновите молекули и

лазерното лъчение. Влиянието на тези параметри се оценява чрез изследване на свойствата на получените слоеве. Фиг. 2.4б сравнява FTIR спектрите на чист Hb със спектрите на депозирания (върху Si подложка) слой от Hb. Очевидно, основните характерни ленти са изразени; някои обаче липсват. Таблица 2.2 обобщава параметрите на имобилизираните слоеве от Hb, както и рамките, в които тези параметри варират.

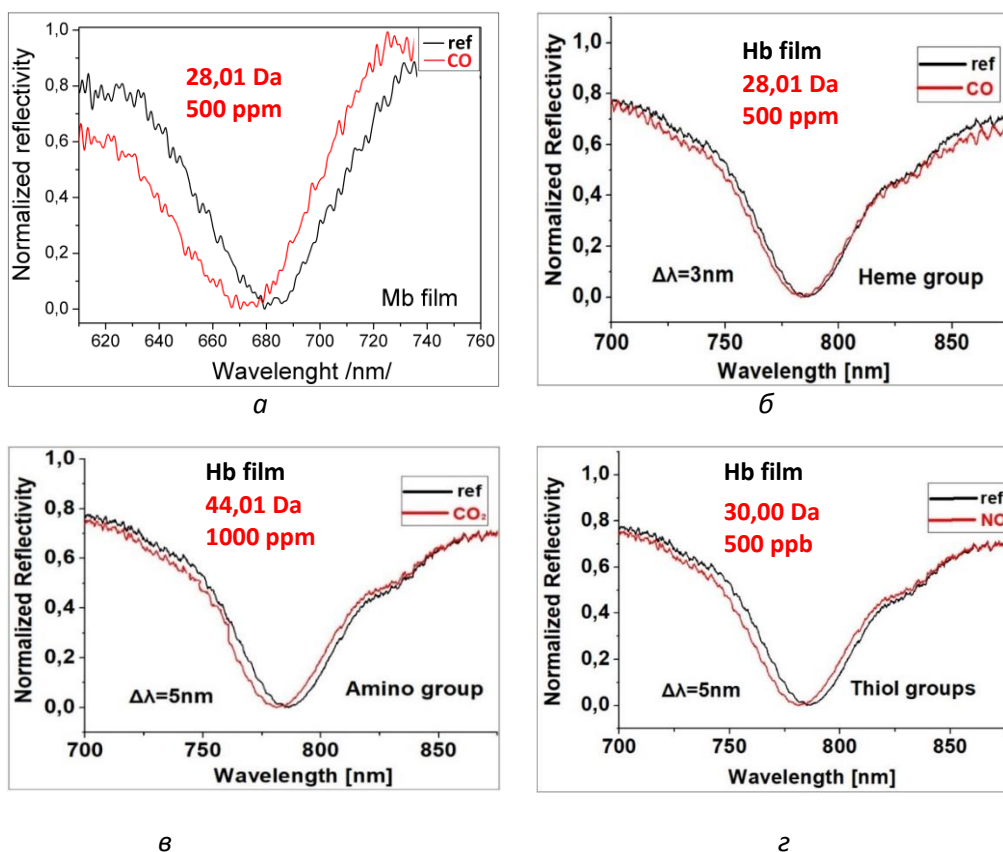


Фигура 2.4. FTIR спектри на а) начало и остатъчно вещество (Hb) в държача на мишената, след имобилизация и без излагане на лазерно облъчване; б) началното вещество (Hb) и остатъчното вещество.

С цел изясняване до каква степен разликите във FTIR спектрите (фиг. 2.4б) са свързани с биоактивността на отложените Hb / Mb слоеве е изследвана способността на съответните им функционални групи за свързване с определени газове. За тази цел е предизвикано взаимодействие на въглероден оксид (CO), въглероден диоксид (CO₂) и азотен оксид (NO) към съответните хем, аминокислотни и тиолни групи, както е описано в [12, 13].

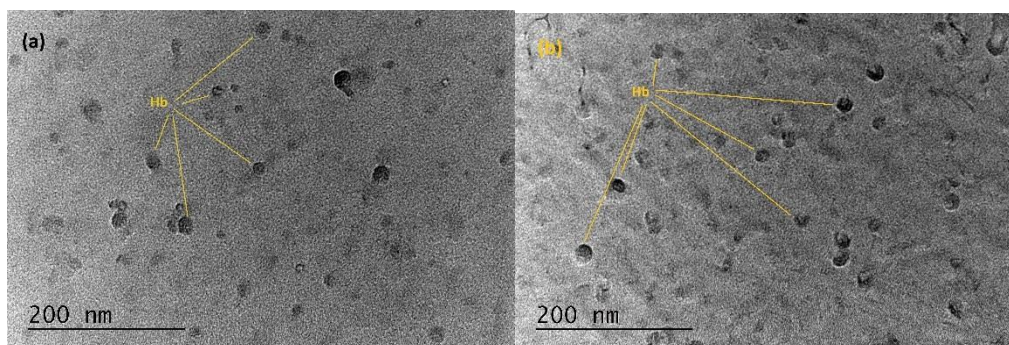
На фиг. 2.5а,б са показани спектралните отмествания на плазмонния резонанс, в резултат на реакцията на свързване между групата хем на миоглобин (фиг. 2.5а) и хемоглобин (фиг. 2.5б) с въглероден оксид (500 ppm). Тези реакции представляват доказателство за биоактивността на отложените слоеве, тъй като групата хем е най-чувствителна към параметрите на отлагане. За металопротеинови слоеве, отложени чрез MAPLE, се наблюдава свързване на аминокислотните и тиоловите групи с CO₂ (1000 ppm) и NO (700 ppb) чрез съответните спектрални отмествания на ППР (фиг. 2.5в,г). Регистрираните спектрални отмествания от около 5–8 nm доказват активността на получените слоеве от Hb.

Регистрираните спектрални отмествания от около 5–8 nm доказват активността на получените слоеве от Hb. Тези резултати удовлетворяват задължителният критерий за ефективността на установените MAPLE параметри за успешна имобилизация.



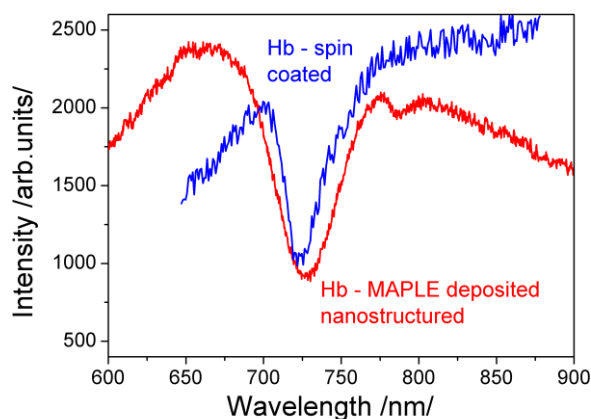
Фигура 2.5. Спектрално отместване на ППР, в резултат на свързване на CO, CO₂, NO към съответните хем, amino и тиол групи на Mb и Hb.

Ефективността на метода за имобилизация е анализирана допълнително чрез изследване на морфологията на получените слоеве. На фиг. 2.6а и 2.6б са показани снимки от трансмисионна електронна микроскопия (TEM) на слоеве от Hb, имобилизирани чрез MAPLE и чрез центробежно поливане (Spin coating). И в двата случая концентрацията на разтворите на Hb е еднаква и слоевете са с еднакви дебелини. Наблюдаваните кръгли частици (маркирани) при двата слоя, със среден размер около 20 nm са идентифицирани като Hb молекули.



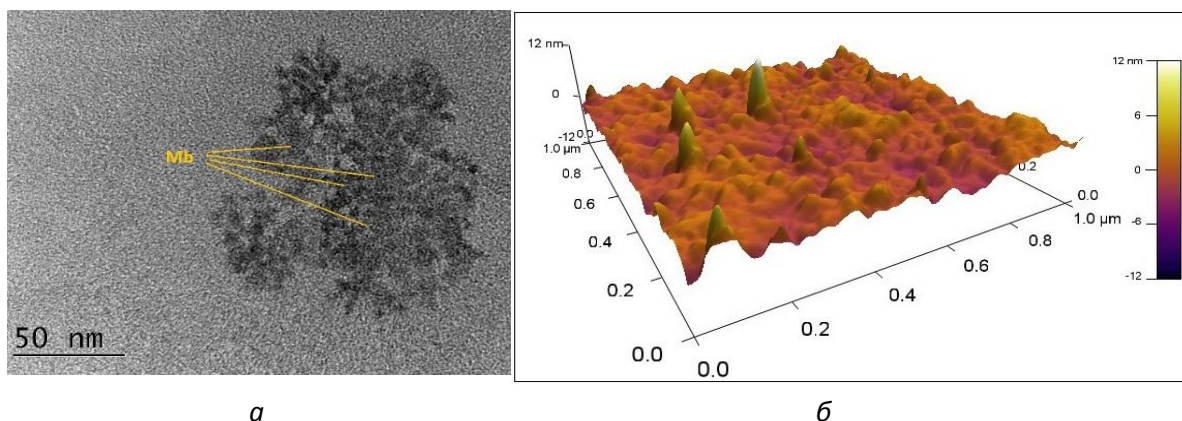
Фигура 2.6. TEM изображения на а) Hb слой, отложен чрез MAPLE; б) Hb слой, получен чрез центробежно поливане.

Фиг. 2.7. илюстрира плазмонните резонанси, възбудени в тези слоеве. ППР в получения чрез MAPLE слой има спектрална ширина, два пъти по-голяма от тази на получения чрез центробежно поливане слой. Тъй като резонансната полу-ширина е мярка за дисипативни загуби, те очевидно са по-големи в MAPLE - слой, вероятно поради унищожени Hb молекули. Освен това измереното спектрално отместване, произтичащо от реакции на свързване в слоя, нанесен с MAPLE, е над два пъти по-малко от наблюдаваното в spin coating -слож. Възможно обяснение е наличието на по-ниско количество биоактивни молекули при MAPLE - имобилизация, водещо до по-слабо изразени реакции на свързване. Това предположение обаче трябва да бъде подкрепено от статистически анализ на TEM изображения, по отношение на плътността на отложени молекули, което е обект на планирани бъдещи проучвания. От представените резултати следва, че параметрите в Таблица 2.1 трябва да бъдат обект на допълнителна оптимизация, включваща подходяща стойност на лазерната енергия, продължителност на импулса, честота на повторение на импулсите и скорост на сканиране на мишената. Тези параметри трябва да съответстват на молекулното тегло на отлаганите металлопротеини.



Фигура 2.7. Сравнение на ефективността на възбуждане на ППР в слой, отложен по технологията MAPLE (червена крива) и в слой, отложен чрез центрофужно поливане (синя крива).

На фиг. 2.8а е показано TEM изображение на слой от Mb, имобилизиран (върху Si - подложка) чрез MAPLE. По-точно, на снимката се вижда един клъстер - представителна извадка на наблюдаваният слой. Кръглите частици (маркирани) със среден размер около 5 nm, се идентифицират като Mb молекули. Полученият чрез MAPLE Hb филм няма такава структура на клъстери (фиг. 2.6а), което може да се обясни с гореспоменатите различия при взаимодействието с лазерно облъчване.



Фигура 2.8. а) TEM снимка на клъстер от Mb слой, получен при еднакви условия, като тези за Hb слой; б) AFM изображение на Mb слой, получен при оптимизирани условия.

Поради това е проложен алтернативен подход - концентрацията на Mb е намалена, при запазване на енергията на лазерния импулс. Резултатите от този подход показват намалена биологична активност на слоевете. При корекция на енергията с коефициент, съвместим със съотношението на молекулните тегла на Hb / Mb, биоактивността на Mb слой беше подобрена. AFM изображението, показано на фиг. 2.8б показва, че наноструктурирания слой притежава структура, идентична с тази на Hb слой.

2.3.7. Заключение

Процесът на имобилизация може да протече без значително разрушаване на металопротеините, чрез прецизна оптимизация на MAPLE параметрите. Въпреки FTIR спектрите, показващи известно изкривяване на протеиновите молекули в отложените слоеве, те притежават биоактивност, подходяща за сензорни приложения. Тази активност до момента е по-ниска от активността на слоевете, отложени чрез центрофужно поливане. Spin coating - слоевете обаче са лесно разтворими и нямат практическо приложение.

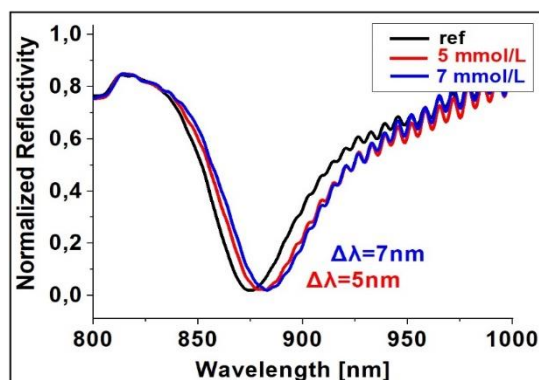
През първите години на разработване на ППР технологията, не се е смятала възможна директната имобилизация. Това вероятно се дължи на използваните химични/биологични методи за имобилизация. Показаните резултати са доказателство, че MAPLE техниката предоставя уникални възможности за директна имобилизация. Това е така, не само благодарение на способността да се запази биоактивността на отложените молекули, но и защото осигурява добра адхезия между тези молекули и повърхността на чипа. Установения подход и параметри на MAPLE без враждаща матрица е демонстрирано чрез детекция на глюкоза. Резултатите са докладвани в [12, 13].

2.4. Регистрация на кръвна захар (глюкоза)

Свързването на Hb с глюкоза е необратим процес, при който се образува съединението, наречено „гликиран хемоглобин“. Този факт е известен повече от 40 години, въпреки

това, доколкото ни е известно, гликиран Hb не е използван досега за детекция на глюкоза.

В настоящата глава е демонстрирана регистрацията на глюкоза чрез отчитане на концентрацията на това съединение. За целта е използвана позлатена дифракционна решетка, с имобилизиран Hb – слой с дебелина 120 nm и проточна клетка. Глюкозата е разтворена в дейонизирана вода, тип I, с концентрации 1 mmol/L – 10 mmol/L. Спектралното отместване на резонансът е показано на фиг. 2.9.



Фигура 2.9. Спектрално отместване на резонансната крива, в резултат на взаимодействието между Hb и воден разтвор на глюкоза. Референтната крива (черно) се наблюдава при взаимодействие само с дейонизирана вода.

Наблюдаваното отместване от 5 – 7 nm при глюкозни концентрации 5 – 7 mmol/L, отговарящи на физическите концентрации в кръвта е доказателство за чувствителността и обхвата на детекция на устройството. Взаимодействието с концентрации под 5 mmol/L не предизвиква съществено спектрално отместване, предвид разделителната способност на спектрометъра. При концентрациите над 7 mmol/L се наблюдава отместване 7 nm, което означава, че 7 mmol/L е границата на насищане.

2.5. Биочип LPG (Long Period Fiber Grating) - конструкция с рекордно висока точност и чувствителност

2.5.1. LPG - конфигурация

При въвеждане на периодични модуляции на формата или на показателя на пречупване по протежение на едномодово оптично влакно, основната мода LP_{01} , движеща се в сърцевината се свързва с мода от по-висок порядък LP_{0p} , разпространяваща се в обвивката и те обменят мощност (фиг. 2.10). Константите на разпространение на двете моди са съответно:

$$\beta_1 = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \quad \text{и} \quad \beta_p = n_p \frac{2\pi}{\lambda}$$

Свързването е възможно, при удовлетворено по отношение на фазите условие:

$$\delta\beta = \beta_1 - \beta_p = \frac{2\pi}{\Lambda} \quad (3.1)$$

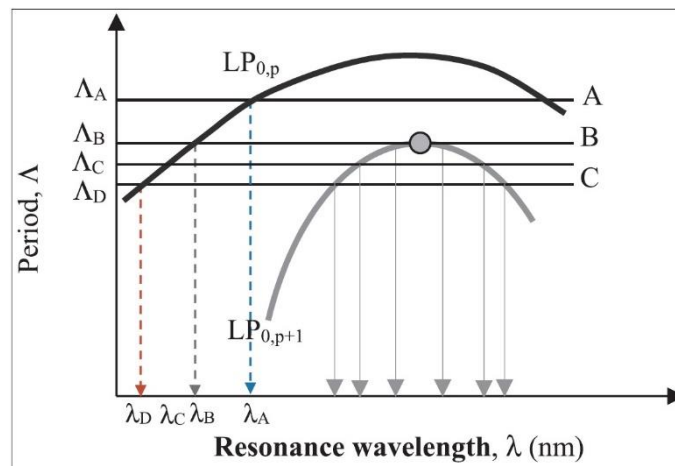
Дължината на вълната λ_c , при която условие (3.1) е изпълнено е равна на:

$$\lambda_c = (n_1 - n_p)\Lambda = \Delta n_{eff}\Lambda \quad (3.2)$$



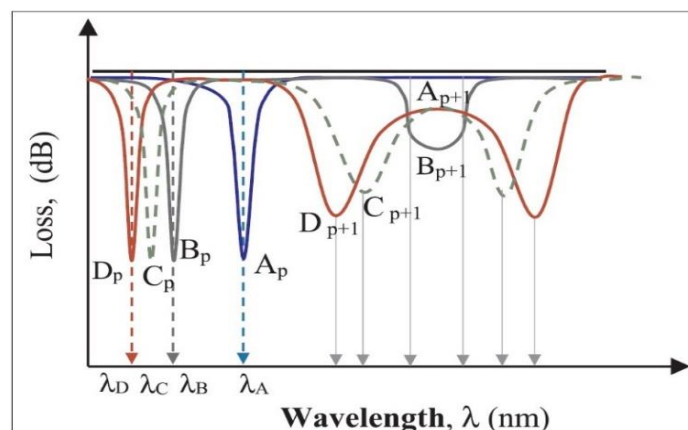
Фигура 2.10. Дългопериодична решетка, в която основната мода в сърцевината LP_{01} и модата от по-висок порядък в обвивката LP_{0p} обменят мощност.

Периодът на решетката Λ и дължината на резонансната вълна за дадена мода от по-висок порядък λ_c са свързани, както е показано на фиг. 2.11. Както се вижда, може да бъде възбудена мода LP_{0p} в обвивката, ако периодът на решетката е по-малък от определена стойност Λ_{TP} , съответстваща на абсолютният максимум на кривата Λ спрямо λ_c от фиг. 2.11.



Фигура 2.11. Зависимост на λ_c при промяна на периода на решетката от Λ_A на Λ_B

Това определя т. нар. повратна точка на фазово съответствие. Фиг. 2.12 илюстрира спектралните промени, настъпващи при преход на периода от Λ_A до Λ_D . Тези промени имат два етапа. При първия се появяват спектрите между A и B до достигане на минимум при B (повратната точка). През втория етап единичният минимум (C, D) се разделя на два минимума, представляващи двата резонанса λ_L и λ_H . Този етап съответства на преход от C към D. Резонансната дължина на вълната за мода в обвивката от по-нисък порядък е винаги по-ниска и се измества към стойности, по-ниски от λ_{TP} . Те са показани на фиг. 2.12 вляво (λ_A до λ_D).

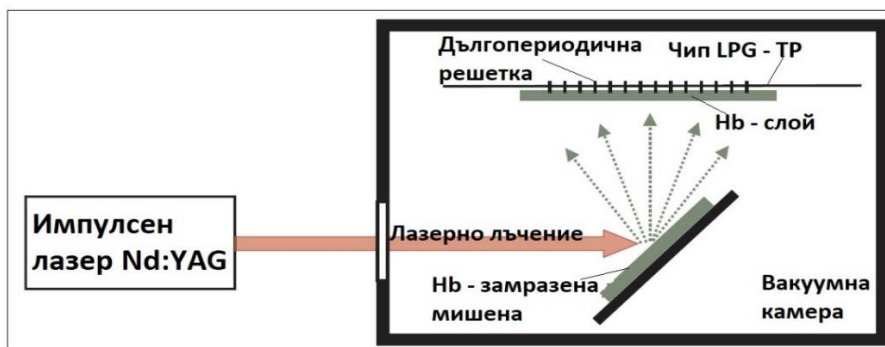


Фигура 2.12. Спектралните промени, настъпващи при преход на периода на решетката от Λ_A на Λ_D

Конфигурацията е силно чувствителна към показателя на пречупване на околната среда около повратната точка на фазово съответствие. Поради това, LPG може да се конструира така, че периодът и да бъде точно под повратната точка във въздух, а във вода да има минимум при λ_{TP} . По този начин, всяка промяна в показателя на пречупване, над този на водата ще бъде регистрирана чрез увеличаване на загубите или разделяне на спектъра чрез разделяне на минимумите. Именно този ефект се използва в настоящата работа, за постигане на максимална чувствителност при детекцията на гликиран хемоглобин.

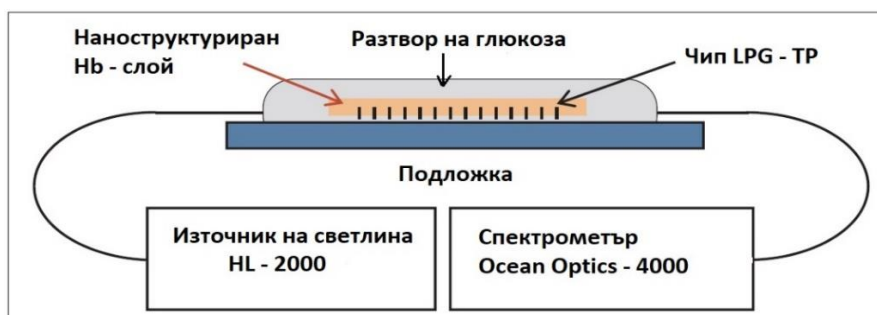
2.5.2. Регистрация на глюкоза. Чувствителност и обхват на детекция

Няколко броя LPG са произведени от влакно SM600, единични моди в диапазона 633 – 780 nm с резонансни дължини на вълната λ_C в диапазона 500 - 600 nm. За изработка на решетките е използван ексимерен лазер Lumonics Pulsemaster KrF, дължина на вълната 238 nm, в комбинация с хромирана амплитудна маска с период $\Lambda=135,6$. Решетките са направени така, че във въздух техните спектри да реагират в точка A на периода Λ (Фиг. 2.11) и спектърът не се вижда - точка $A_p + 1$ на фиг. 2.12. Във вода, минимумът се появява около $\lambda_{\text{TP}} = 775$ nm. Когато влакнестата обвивка на LPG е покрита от нанослой с дебелина 260 nm, решетката се придвижва към точки $B_p + 1$ и след това към $C_p + 1$ при потапяне във вода. За настоящата цел е имобилизиран Hb по технологията MAPLE - фиг. 2.13.



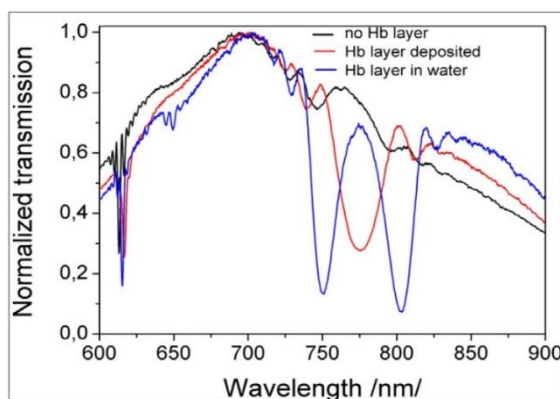
Фигура 2.13. Имобилизация на наноструктуриран слой от Hb на повърхността на чип LPG

Така конструираната конфигурация представлява биочип с основните му компоненти – дългопериодичната решетка в ролята на трансдюсер и нанотруктурираният слой от Hb в ролята на биоразпознаващ слой. Фиг. 2.14 илюстрира експерименталната установка за мониторинг на глюкоза. Покритият с Hb чип LPG е поставен върху подложка, след което е покрит с глюкозен разтвор с определена концентрация.



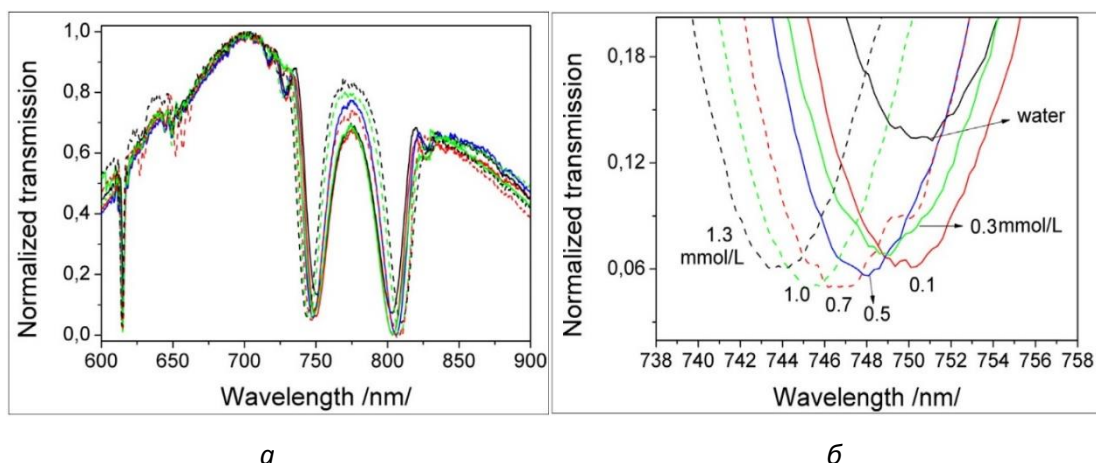
Фигура 2.14. Експериментална установка за мониторинг на глюкоза

Фиг. 2.15 показва нормализираният спектър на трансмисия на чип LPG във въздух, неговата промяна, след имобилизация на Hb - слой и промяната при потапяне във вода. След покриване с Hb, в трансмисионния спектър се появява минимум, чиято дълбочина се увеличава, съответстваща на позицията $B_p + 1$ (фиг. 2.12).



Фигура 2.15. Трансмисионен спектър на чип LPG: във въздух без покритие (черна линия), във въздух с имобилизиран Hb – слой (червена линия - изразен минимум), във вода (синя линия – единичният минимум е разделен на два минимума)

На фиг. 2.16а е показан трансмисионния спектър на чип LPG и неговата промяна, в резултат от взаимодействие между Hb и глюкоза с различни концентрации. Фиг. 2.16б представлява увеличен изглед на левият минимум от фиг. 2.16а. Както се вижда от графиките на фиг. 2.16, спектралното отместване е пропорционално на глюкозната концентрация. Минимумът, който се вижда на фиг. 2.16а показва същата зависимост, но отместването е съответно в противоположна посока, т.е. към по-големи дължини на вълната.

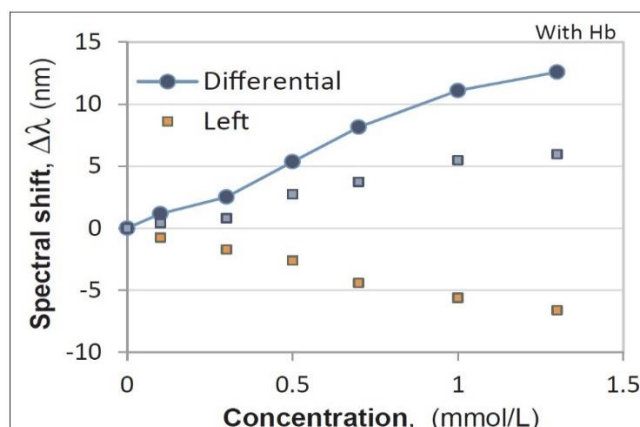


Фигура 2.16. Трансмисионният спектър на чип LPG: а) спектралното отместване при взаимодействие между Hb и глюкоза с различни концентрации; б) увеличен изглед на левият минимум

Очевидно, по-високите концентрации на глюкоза предизвикват по-големи спектрални отмествания в противоположни посоки. Това позволява да се построят диференциални спектрални отмествания спрямо концентрацията на глюкоза. Глюкозата се свързва с хемоглобин през N-края на неговата бета верига [14]. В резултат на това се образува нова форма на хемоглобин, с ковалентно свързана глюкоза (гликиран хемоглобин), означена с HbA1c. Логично, при наличие на по-висока концентрация на глюкоза се наблюдават повече HbA1c молекули. По всяка вероятност, те имат молекулно тегло, структура, оптична плътност и други характеристики, които по своята сложност променят показателя на пречупване на околната за LPG среда и причиняват промяна в спектъра. Фиг. 2.17 показва спектралните отмествания на лявата и дясната страна на резонансите и тяхната разлика, спрямо концентрацията на глюкоза. Тези отмествания са измерени спрямо показанията на фиг. 2.15 спектър на LPG с Hb слой, потопен в дейонизирана вода. Очевидна е способността на чипът да регистрира глюкоза с минимална концентрация 0,1 mmol / L.

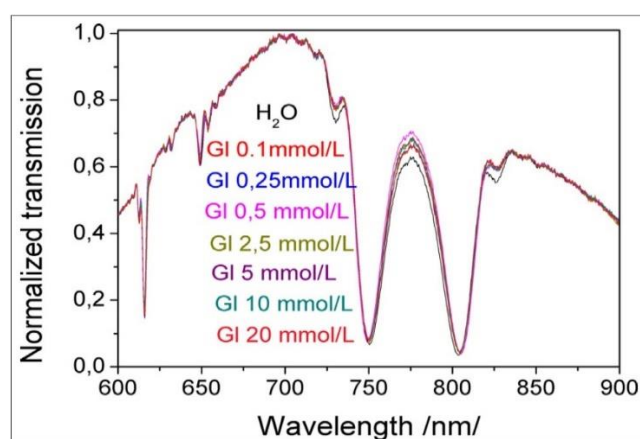
Необходимо е отчитането на факта, че глюкозата се свързва здраво с Hb, благодарение на ковалентна връзка. С увеличаване на концентрацията на глюкоза, все повече и повече Hb молекули се трансформират в HbA1c. Очаква се, че насищането ще настъпи при увеличаване на концентрацията. От експерименталните наблюдения беше потвърдено, че този ефект започва от 0,7 mmol / L - очевидно няма достатъчно свободни молекули Hb след последователни взаимодействия с глюкозни концентрации до 0,7 mmol / L (при споменатата дебелина на Hb -слой).

За избягване на този ефект са използвани отделни LPG - чипове с еднакви характеристики, за измерване на различни концентрации на глюкоза. Установено е насищане при концентрация 1.3 mmol / L.



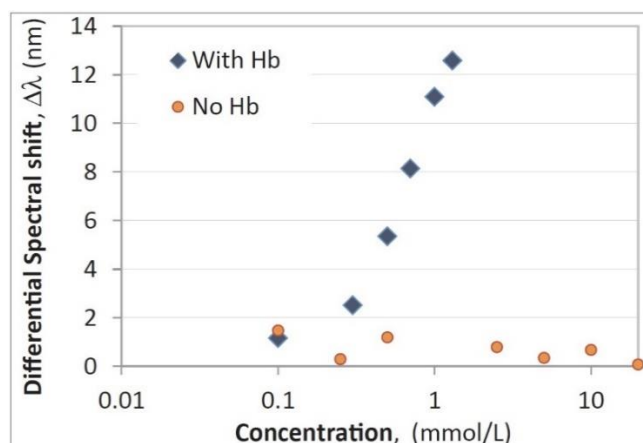
Фигура 2.17. Отместването на лявата и дясната част от резонансната крива и диференциалното отместване като функция от концентрацията на глюкоза.

За недвусмислена демонстрация на ролята на директно имобилизиран Нб при регистрацията на глюкоза, беше изследвано спектралното поведение на LPG - структура, без Нб – слой. Резултатите от фиг. 2.18 показват, че наблюдаваното резонансно отместване има стойности, няколко пъти по-ниски от тези при наличието на разпознаващ слой от Нб и съвпадат с разделителната способност на спектрометъра - 0,25 nm.



Фигура 2.18. Трансмисионен спектър на чип LPG, без имобилизиран Нб при потопяване в разтвори на глюкоза с различни концентрации.

Фиг. 2.19 показва сравнение на диференциалното отместване (разликата между стойностите на дясната и лявата част на резонансната крива), в случая на чип LPG с и без Нб наноструктуриран слой. Спектърът, получен в случая без Нб се приема за шумов, в сравнение със спектъра при наличие на Нб. Сравнението показва, че минималната концентрация, която може да се регистрира е 0,1 mmol / L.



Фигура 2.19. Сравнение на диференциалните спектрални отмествания на чип LPG с и без наноструктуриран слой от Hb, при взаимодействие с различни концентрации на глюкоза

2.6. Изводи

1. На базата на MAPLE технологията е създаден метод за директна имобилизация на металопротеини. Установени са технологични параметри при които отложените слоеве са биоактивни.
2. За първи път е постигната директна имобилизация на металопротеините Hb и Mb, като биоактивността на отложените слоеве е доказана чрез изследване реакциите на свързване на различните им функционални групи.
3. FTIR спектрите и TEM изследванията на имобилизираното вещество показват, че е необходимо допълнително усъвършенстване на технологията.
4. Създаден е прототип на ППР биосензор чрез имобилизация на Hb и Mb върху позлатена дифракционна решетка. Експериментално е доказана високата чувствителност, която се постига като следствие на директната имобилизация при детекция на глюкоза в реално време в лабораторни условия. За първи път е осъществена регистрация на глюкоза чрез хемоглобин.
5. Чрез директна имобилизация на Hb върху дълга периодична решетка в оптично влакно в създаден биосензор за глюкоза. Детектирани са рекордно ниски концентрации на глюкоза в човешката слюнка, което разкрива перспектива за неинвазивни измервания на концентрация на кръвна захар.

ГЛАВА 3. СЪЗДАВАНЕ НА ОПОРЕН КАНАЛ ЗА РАЗПОЗНАВАНЕ/РАЗДЕЛЯНЕ НА СИГНАЛИТЕ ОТ СПЕЦИФИЧНИ/НЕСПЕЦИФИЧНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Тъй като ППР сигналът се генерира от изменение на коефициента на пречупване, възникващо в полето на плазмонната вълна, той съдържа информация както за специфичните молекулярни реакции в разпознаващия слой, така и за ефекти зад този слой. Така, в ППР сензорите винаги съществува фонов сигнал, генериран от неспецифични реакции, в т.ч. и от температурни изменения. За да се сведат до минимум такива ефекти, типичното измерване на ППР се извършва като диференциално и за целта се създава опорен канал, отчитащ фоновия сигнал. Съществуват различни технически решения за организиране на опорния канал, като най-често се прави *пространствено разположение на сигналния и опорен канал или дву-вълнов ППР*.

В настоящата глава са изследвани възможностите за реализация на опорен канал чрез възбуждане на две плазмонни вълни от обикновената и необикновената вълна. Тези вълни възникват в двулъчепречупваща среда, граничеща с повърхнината на разпространение на плазмоните. Като двулъчепречупваща среда се предполага холестеричен течено-кристален слой. Разглежданията са валидни за всяка хирална структура с оптични свойства, в т.ч. от азо-полимер. Изборът на холестеричната среда се определя от добре известните ѝ оптични свойства и от способността ѝ да поддържа различни режими на разпространение на оптичните вълни, които могат да се използват за нашите цели.

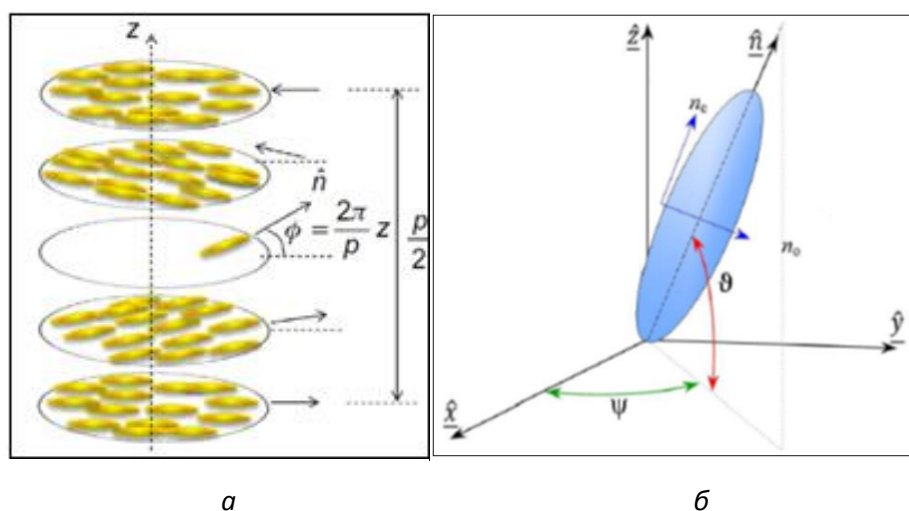
За целта се разглеждат оптичните свойства на идеален Холестеричен Течно-Кристален Слой (ХТКС), изследват се собствените стойности на собствените моди на разпространение на базата на решението на вълновото уравнение за такава среда, дефинират се различни режими на разпространение и теоретично се изследва възможността за възбуждане на ППР в дифракционна решетка. Този анализ е направен за конкретен тип течен кристал - E7. Показано е, че е възможно едновременно възбуждане на две плазмонни вълни, асистирано от ХТКС. Тези изводи частично се подкрепят от моделиран експеримент, който показва и нови възможности за създаване на опорен канал при възбуждането на ППР в дифракционна решетка. Проведеното теоретично изследване предлага обяснение на проведените експерименти с азо-полимерен слой, отложен на повърхността на дифракционната решетка.

Втората част на тази глава се отнася до експериментално изследване на позлатена дифракционна решетка, в която ППР се детектира спектрално. Разгледани са два режима на възбуждане на ППР и са оценени възможностите за приложение в био-сензори.

3.1. Холестеричен течен кристал (ТК) и собствени моди в ХТКС

При холестеричната (хирална) фаза молекулите във всяка равнина, паралелна на ху равнината имат директор, който се върти около оста z с постоянна скорост (3.1a). Молекулите могат да бъдат наклонени по отношение на z на определен ъгъл θ във всяка

равнина, паралелна на $xу$, (3.16) като въртенето по оста z отново е с постоянна скорост. Ние разглеждаме $\theta = 90^\circ$, т.е. холестерик. Всеки половин оборот на спиралата молекулите са ориентирани по същия начин. Директорът няма знак – завъртайки го на 180° или на 360° е един и същ. Пълен оборот на спиралата се нарича стъпка на спиралата, p . Големината на тази стъпка е различна: от няколко микрона до 150 nm. Стъпката на спиралата варира с температурата. Молекули на ТК се изобразяват както на фигура 3.1б. Формата на молекулата определя анизотропията ѝ и най – важното оптично свойство на ТК – двулъчепречупването. ТК представляват едноосна анизотропна двулъчепречупваща среда.



Фигура 3.1. Илюстрация на разположението на молекулите в хирална структура: а) директор и стъпка на въртене на молекулите; б) ъгъл на завъртане.

Тя се характеризира с обикновен n_o и необикновен n_e показател на пречупване. Двулъчепречупването при ТК $\Delta n = n_e - n_o$ е съизмеримо или по – голямо от това на едноосните кристали, като калцита. Очевидно, ТК имат инверсна симетрия – ориентацията при $+\mathbf{n}$ е същата, както при $-\mathbf{n}$. За вълна, разпространяваща се в z направление, ефективният показател на пречупване на ТК, ориентиран в посока $+\theta$ е същият като този, ориентиран в посока $-\theta$. На макроскопично ниво директорът описва средната ориентация на молекулите. При хиралната фаза директорът описва спирала около оста z съгласно:

$$n(r) = \begin{pmatrix} \cos\left(\frac{2\pi}{p}z + \varphi_0\right) \\ \sin\left(\frac{2\pi}{p}z + \varphi_0\right) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.1)$$

където φ_0 е константа, която зависи от граничните условия.

В локалната координатна система тензорът на диелектрична проникваемост има вида [106]:

$$\varepsilon_{\zeta\eta\chi} = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 & 0 & 0 \\ 0 & \varepsilon_2 & 0 \\ 0 & 0 & \varepsilon_3 \end{pmatrix} \quad (3.2)$$

За да се намери тензорът в лабораторна координатна система използваме:

$$\varepsilon_{xyz} = \Lambda \varepsilon_{\zeta\eta\chi} \tilde{\Lambda} \quad (3.3)$$

а матрицата на преобразуване е:

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \cos\phi & -\cos\theta\sin\phi & \sin\theta\sin\phi \\ \sin\phi & \cos\theta\cos\phi & -\sin\theta\cos\phi \\ 0 & \sin\theta & \cos\theta \end{pmatrix} \quad (3.4)$$

В нея участват Ойлеровите ъгли. В случая на холестерик $\theta = \pi/2$ и $\phi \in [0, 2\pi]$ в рамките на една стъпка на спиралата и тензорът на диелектричната проницаемост има вида [18]:

$$\varepsilon(z) = \begin{pmatrix} \bar{\varepsilon} + \delta \cos(2qz) & \delta \sin(2qz) & 0 \\ \delta \sin(2qz) & \bar{\varepsilon} - \delta \cos(2qz) & 0 \\ 0 & 0 & n_0 \end{pmatrix} \quad (3.5)$$

Където: $\delta = \frac{(\varepsilon_{\parallel} - \varepsilon_{\perp})}{2}$; $\bar{\varepsilon} = \frac{(\varepsilon_{\parallel} + \varepsilon_{\perp})}{2}$, а $q = \frac{2\pi}{p}$.

Тъй като разглеждаме разпространение на светлината в посока z , вълновото уравнение има вида:

$$\partial^2 \vec{A}(z) \frac{\partial^2 \vec{A}(z)}{\partial z^2} = k_o^2 \vec{\varepsilon}(z) \cdot \vec{A}(z) \quad (3.6)$$

Където: $\vec{E}(z, t) = \vec{A}(z) e^{i\omega t}$, а $k_o = \frac{2\pi}{\lambda}$.

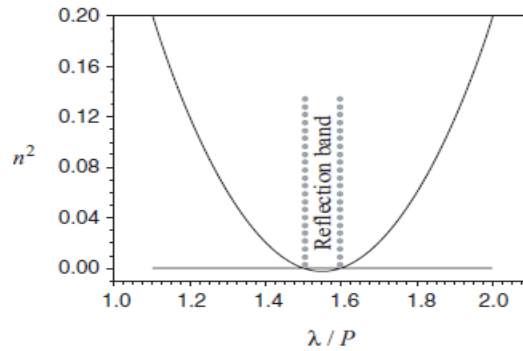
Това позволява да се намери решение на вълновото уравнение в прост вид, както и собствените стойности на четирите собствени моди [15]:

$$n_1^2 = \alpha^2 + \bar{\varepsilon} + (4\alpha^2 \bar{\varepsilon} + \delta^2)^{1/2} \quad (3.7)$$

$$n_2^2 = \alpha^2 + \bar{\varepsilon} - (4\alpha^2 \bar{\varepsilon} + \delta^2)^{1/2} \quad (3.8)$$

където $\alpha = \frac{\lambda}{p}$.

Очевидно, n_1^2 винаги е положително, докато n_2^2 е положително или отрицателно в зависимост от отношението между дължината на вълната λ и стъпката на хеликсната структура P , както е показано на фиг. 3.2 [15]. В отбелязания диапазон собствените стойности са чисто имагинерни, т.е. няма разпространяващи се моди. Това е режимът на Бреговско отражение, при който светлина с определена поляризация се отразява от ТК структура.

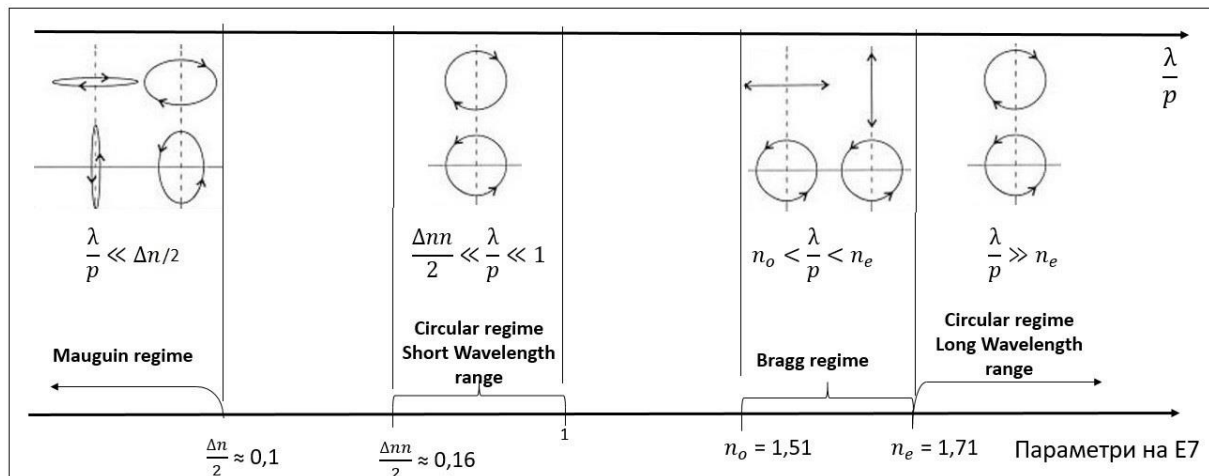


Фигура 3.2. Зависимост на n_2^2 от $\frac{\lambda}{p}$ за ТК с $n_e=1.6$ и $n_o=1.5$.

3.1.1. Поляризационно състояние на собствените моди

Като всяка двулъчепречупваща среда, така и в тази, се разпространяват обикновена и необикновена вълна, като в зависимост от фазовия набег се формират различни поляризационни състояния. Хеликсният характер на структурата създава своята специфика, която се изразява във важността на отношението $\alpha = \frac{\lambda}{p}$. То определя поляризационното състояние на собствените моди, решенията на (3.7) и (3.8) и съответно - собствените вектори на модите. Съгласно [16] съществуват три спектрални режима в зависимост от стойността на α , показани на фиг. 3.3:

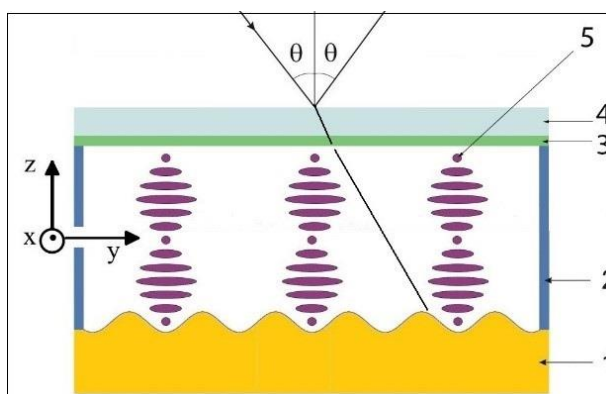
Фигура 3.3. Различни режими на разпространение на светлината в ХТКС, определени от стойността на параметъра α спрямо параметрите на Е7.



Всяко от уравненията (3.7) и (3.8) има две решения, различаващи се по знак, като физическият им смисъл е разпространение в противоположни посоки по z . Физическият им смисъл описва две собствени моди с различни собствени вектори и различно поляризационно състояние, което се определя от α .

3.1.1.1. Режим на Bragg [17] ($n_o < \alpha < n_e$) – не представлява интерес за настоящата цел;

3.1.1.2. Режим на Mauguin ($\alpha < \Delta n/2$) [18] - Собствените моди в този режим са или с много или с по-малко издължена елипса на поляризационното състояние (фиг. 3.3) и са взаимно ортогонални. При разпространението на вълната, главната ос на елипсата следва посоката на локалния директор. Този режим може да осъществи адиабатна трансформация на поляризацията от p - към s - (или обратно) спрямо равнината на падане. Двете собствени моди могат да възбудят два плазмонни резонанса при спазени гранични условия. Фиг. 3.4 показва една примерна конфигурация на течно-кристална клетка, в която е включена позлатена дифракционна решетка и която може да осигури нужните гранични условия.



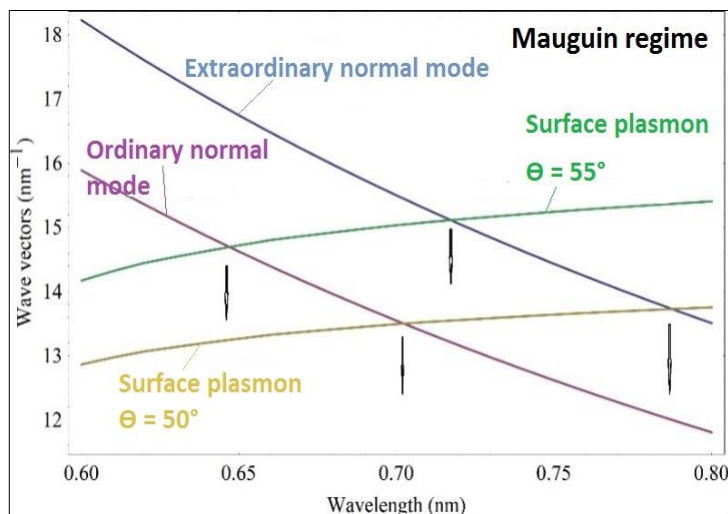
Фигура 3.4. Примерна конфигурация ХТКС/дифракционна решетка, която удовлетворява граничните условия за възбуждане на ППР: 1 – позлатена дифракционна решетка; 2 – спейсър; 3 – PVA слой, осигуряващ закотвяне на ТК молекули; 4 – покривно стъкло.

Повърхнинен плазмон може да се възбуди от падаща вълна с поляризация, колинеарна с вектора на решетката: от p - поляризация (при равнина на падане, перпендикулярна на щрихите на решетката) или от s - поляризация (при равнина на падане, успоредна щрихите). Равнината на падане се определя от положението на поляризационната елипса на собствените моди и тъй като съществуват две собствени моди, те могат да възбудят плазмони. При идеална ситуация, показана на фиг. 3.4, при която директорът лежи по посока на щрихите, p - поляризираната светлина е необикновената мода в ХТКС. *Необходимо условие за възбуждане на повърхнинен плазмон е равенство между вълновите вектори на собствените моди и на повърхнинните плазмони.* За целта се решават съвместно уравненията (3.7) и (3.8) и уравнението за повърхнинен плазмон в дифракционна решетка:

$$(n_d \sin \theta)^2 + \frac{2mn_d \lambda}{d} \sin \theta \sin \varphi + \left(\frac{m\lambda}{d}\right)^2 = \frac{\varepsilon_d \varepsilon'_m}{\varepsilon_d + \varepsilon'_m} \quad (3.9)$$

където n_d/ε_d е показателят на пречупване/диелектричната проницаемост на слоя, поставен на дифракционната решетка, d – периода на дифракционната решетка (приет за $1.5 \mu\text{m}$), θ – ъгълът на падане върху структурата; φ – ъгълът на поляризационната елипса спрямо щрихите на решетката; ε'_m – реалната част на диелектричната

проницаемост на златото. На фиг. 3.5 е показан резултата от съвместното решение на уравненията в термините на вълнови вектори.

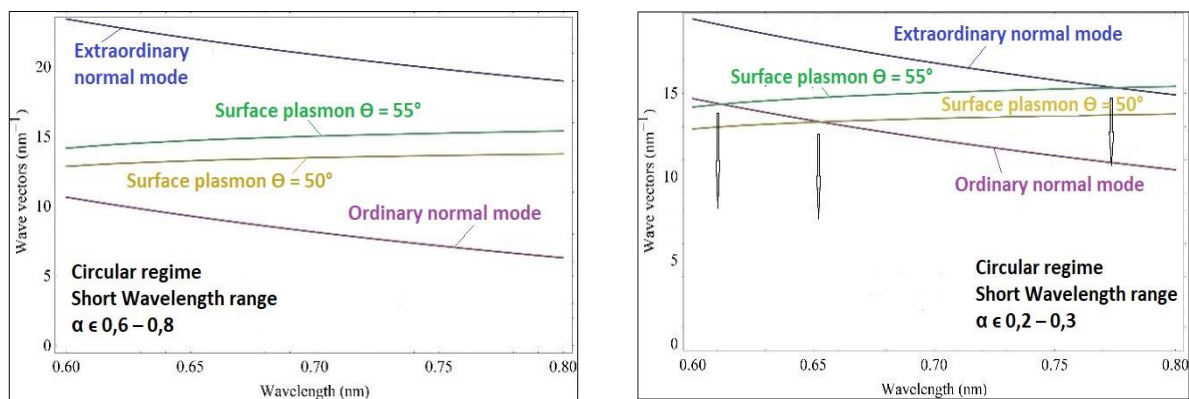


Фигура 3.5. Пресечните точки на кривите указват равенство на вълновите вектори, а техните абциси – дължините на вълните при които възникват ППР.

При ъгъл на падане $\theta=50^\circ$ резонансите възникват при около 700 nm и 780 nm. Първият се възбужда от обикновената мода, (p - поляризация при конфигурацията на фиг. 3.4) вторият – от необикновената (s - поляризация). Промяната на ъгъла на падане дава възможност за пренастройване на резонансите в широк спектрален диапазон.

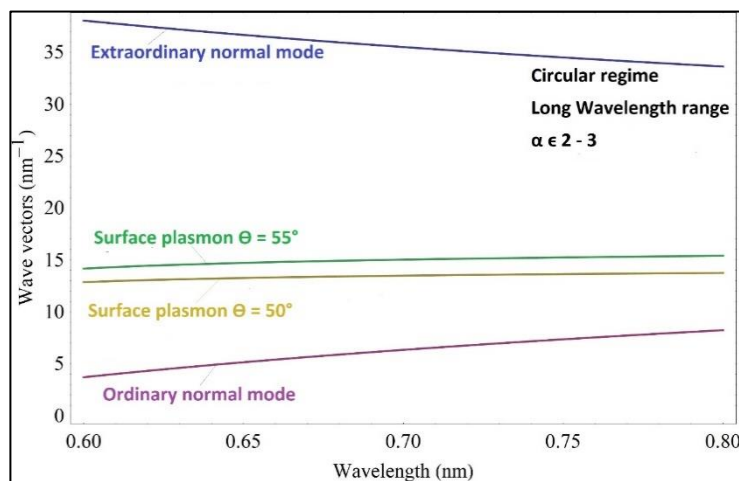
3.1.1.3. Режим на кръгова поляризация в късовълновия диапазон ($\frac{n\Delta n}{2} \ll \alpha \ll 1$) - В този режим собствените моди са кръгово поляризирани – тази, с ефективен коефициент на пречупване, близък до обикновения – дясно поляризирана, другата – ляво поляризирана. Решението на системата уравнения (3.7), (3.8) и (3.9) дава спектралното положение на възможните ППР. Наличието на решение зависи от стойността на α , както е показано фиг. 3.6.

При този режим двата резонанса са отдалечени на повече от 150 nm (при $\alpha \in 0.2-0.3$) което увеличава селективността на детектиране на специфичните и неспецифичните взаимодействия. Изборът на подходящ режим по отношение на α се осъществява с изменение на стъпката на хиралната спирала. На практика това става чрез избор на подходяща хирална добавка и на дебелината на ТК слой.



Фигура 3.6. Наличието на двувълнов ППР в режим на кръгова поляризация зависи от стойността на α .

3.1.1.4. Режим на кръгова поляризация в дълговълновия диапазон ($n_e \ll \alpha$) - При този режим на разпространение собствените моди са кръгово поляризирани, както и при късовълновия диапазон, но с противоположни поляризации. Анализът показва, че в този случай собствените вектори на модите са силно раздалечени и не е възможно да се намерят общи стойности с тези на плазмонните – Фиг. 3.7. Този режим на разпространение не е перспективен, още повече, че трудно се реализира експериментално – стъпката на спиралата трябва да около 300 nm, което изисква специални условия.

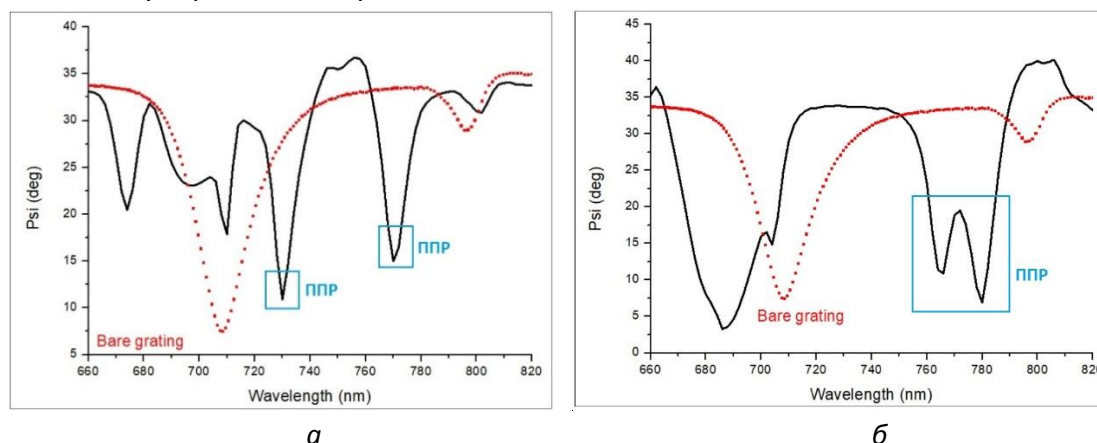


Фигура 3.7. В този режим на разпространение не е възможно да се осъществи двувълнов ППР.

Основният извод от направения анализ е, че най-подходящ режим на разпространение в ХТКС е режима на кръгова поляризация в късовълновия диапазон, тъй като: лесно се осъществява експериментално (стъпката на спирала трябва да е около 3 μm); двете собствени моди имат идентично поляризационно състояние, поради което се очаква да възбудят плазмонни резонанси с еднаква ефективност; Плазмонните резонанси са спектрално раздалечени, което дава възможност за по-точно диференциално измерване на специфичните и неспецифичните реакции.

3.2. Възбуждане на два ППР в режим на отражение

За изясняване възможностите за асистирано възбуждане на ППР чрез анизотропен слой, бе извършен качествен експеримент. Върху позлатена дифракционна решетка чрез spin-coating беше отложен слой азополимер. С цел установяване на подходящите концентрации и дебелини на слоя, бяха проведени многобройни експерименти. Отложените слоеве са с дебелини 140-200 nm. На графиките на фиг. 3.8 са показани елипсометрични измервания на ППР в решетка, покрита със слой азополимер без и с оптически индуцирана анизотропия.



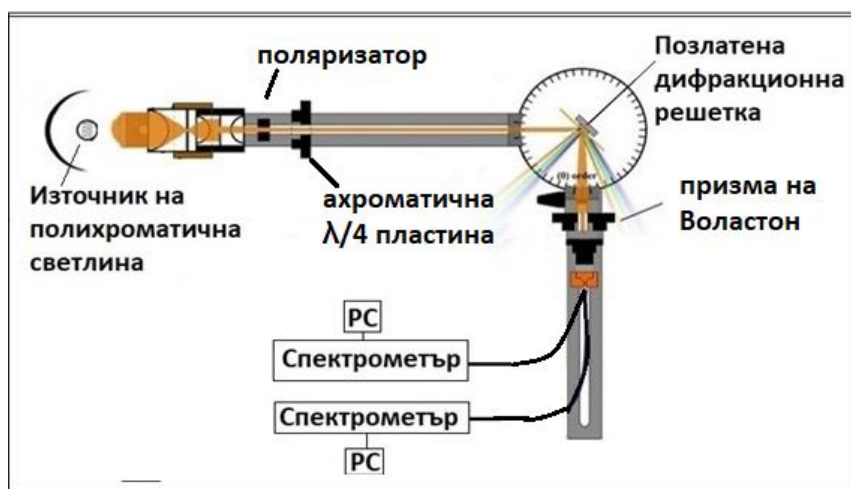
Фигура 3.8. Плазмонни резонанси, възбудени в дифракционна решетка, покрита със слой азополимер; а/анизотропен слой с хаотично ориентирани молекули; б/ слой с оптически индуцирана анизотропия.

Предимството на елипсометричните измервания е в това, че резонансите се идентифицират по два признака – фазовия скок и изменението на амплитудата. С цел яснота, показаните на фиг. 3.8 графики съдържат само изменението на амплитудата. По-точно, на графиките се виждат минимумите на амплитудата, при които възниква ППР. Отбелязаната с червена крива и на двете графики дава информация за типичния за непокрита позлатена дифракционна решетка ППР. Поляризацията на възбуждащата вълна се променя, при преминаване през полимерния слой, чиито молекули са хаотично ориентирани. Поради това се наблюдават два ППР (фиг. 3.8а) – при 730 nm и при 770 nm. Плазмонният резонанс, наблюдаван на 770 nm се разцепва на два, с ясно изразени амплитудни минимума, при индуциране на анизотропия в слоя (Фиг. 3.8б). Тези два резонанса вероятно възникват от възбудените в анизотропния слой обикновена и необикновена вълна, подобно на описаното в т. 3.1. Спектралната разлика между резонансите (около 15 nm) е много по-малка от тази, наблюдавана при Е7 и коментирани в т. 3.1.1. Тази разлика се определя основно от двулъчепречупването на анизотропната среда, (което при азополимера е около 2.5 пъти по-малко от това на Е7). За категорични изводи е нужно да се знаят дисперсионните характеристики на показателите на пречупване на азополимера.

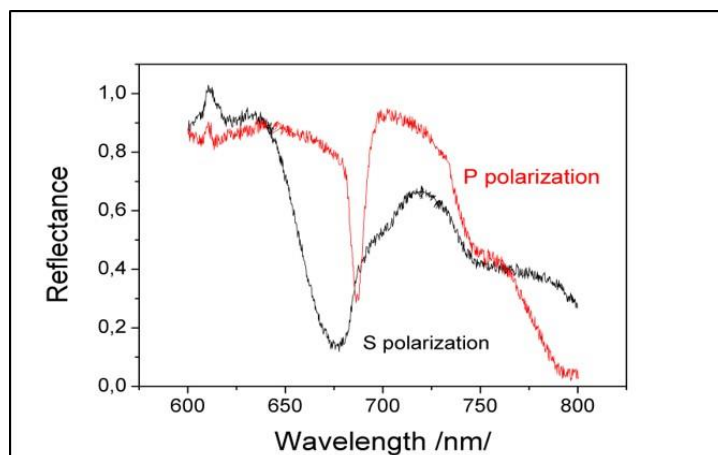
Проведеният анализ в т. 3.1.1.2 се базира на две хипотези:

- че може да се осъществи равенство на вълновите вектори на собствените моди в анизотропна среда и тези на повърхнинните плазмони, възбудени в дифракционна решетка;
- възбуждането на ППР в дифракционна решетка е поляризационно зависимо – може да се осъществи и от s- поляризирана вълна, когато падащата равнина е успоредна на щрихите на решетката.

Правилността на първата хипотеза бе доказана от проведения теоретичния анализ и от експеримента, описан в т. 3.2. Правилността на втората хипотеза може да се докаже, ако дифракционната решетка се освети с кръгово поляризирана светлина. В този случай се създава поляризационна компонента, която в някаква степен е колинеарна на щрихите. При това, в отразената светлина следва да се наблюдава и s- поляризирана компонента. Експерименталната установка е показаната на фиг. 3.9. Поставена е ахроматична $\lambda/4$ пластина след поляризатора, така че възбуждащата полихроматичната светлина е кръгово поляризирана. При това, отразената светлина се наблюдава през призма на Воластон. Това дава възможност всяка поляризация да се наблюдава едновременно и независимо от два спектрометра. Резултатите са представени на графиката на фиг. 3.10 - наблюдават се два ясни ППР.



Фигура 3.9. ППР, възбуден с кръгово поляризирана вълна в режим на отражение – установката позволява едновременно и независимо регистриране на два ППР, съответно в p- и s- поляризация.



Фигура 3.10. Едновременно възбудени ППР в *p*- и *s*- поляризация.

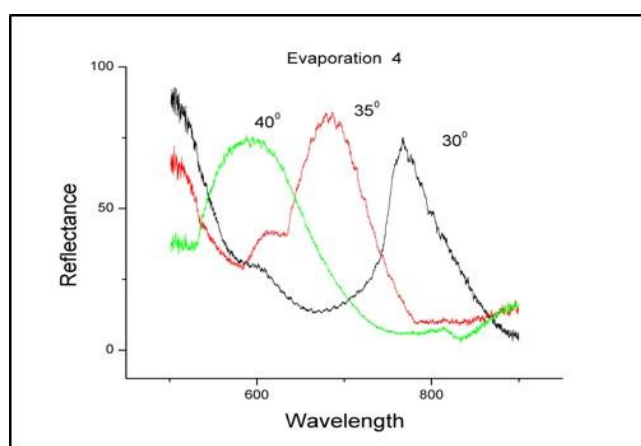
Наблюдаваният в *s*- поляризация е доста по-широк от този при *p*- поляризация, както се предполага теоретично. Наблюдаваните резонанси доказват правилността на хипотезата за възможността за едновременно възбуждане на двоен ППР. Доколкото ни е известно, за първи път е реализирано едновременно възбуждане на две плазмонни вълни в метализирана дифракционна решетка. Предстои експериментално изследване на ефективността на опорния сигнал за подобряване на точността на биодетекция.

Използваните дифракционни решетки са базирани на подложка за CD-R. Детекцията на ППР се основава на измерване на ъгъла при който възниква резонанса и на неговото изменение в процеса на детектиране на анализа. В този случай, възбуждането се извършва чрез монохроматична светлина. В настоящия експеримент е осъществена спектрална детекция, което не бе правено към момента. В случая ППР се възбужда от полихроматична светлина и се измерва спектралното отместване на резонанса при детектиране на свързващите реакции на анализа. Основното предимство е бързината на измерване и простата експериментална реализация – не е нужно прецизно механично устройство за позициониране на ъгъла на падане и ъгъла на отражение.

Разработването на дифракционните решетки започна на основата на поликарбонатни заготовки за CD-R дискове. Първият етап на тази работа е създаване на технологичен цикъл на нанасяне на златно покритие върху поликарбонатна подложка, която се използва като дифракционна решетка. Периодът е около 1.5 μm а височината на прорезите на дифракционната решетка – 50 nm. При няколко експеримента върху поликарбонатната основа беше отложен златен слой чрез вакуумно изпарение. Получени са слоеве с различна дебелина – в диапазона 20 – 200 nm при различни условия на отлагане – време и скорост на изпарение и температура на подложката. Получените слоеве притежават различна адхезия, като е установен режим на изпарение, осигуряващ адхезия, при която дифракционната решетка може да се използва многократно. Основният проблем бе, че не се наблюдава плазмонен резонанс при така изготвените дифракционни решетки. На фиг. 3.11 е показано измереното нормирано

отражение при условия, при които би трябвало да се наблюдава ППР в такива решетки. Вместо това се наблюдават максимуми при дължини на вълните, близки до тези, при които се очаква възникване на ППР. Беше предположено, че основаната причина за това е начина на възбуждане на ППР с полихроматична светлина. Вероятно плазмонна вълна се възбужда в златния слой, отразява се от поликарбонатната подложка, при което променя своята поляризация.

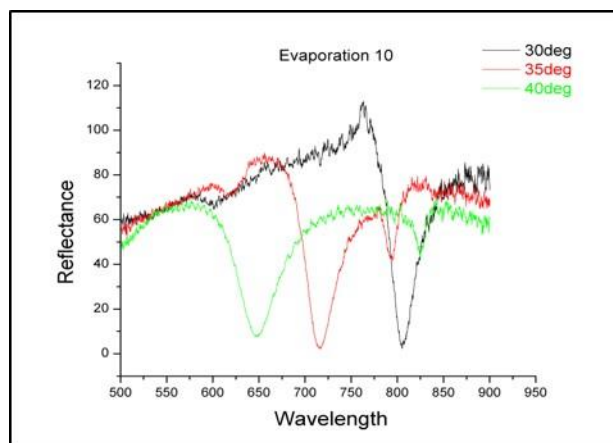
Тъй като плазмонната вълна не се променя при въздействие върху повърхнината, беше предположено, че тя се възбужда на границата метал - поликарбонат. Възможно е също, отражението да е повлияно и от ъгъла на блясъка, както е при всяка дифракционна решетка, осветена с полихроматична светлина. Така или иначе, предполагаемата причина е отражението от поликарбонатната подложка.



Фигура 3.11. Нормирано отражение, измерено на повърхността на позлатена поликарбонатна дифракционна решетка.

За елиминиране на отражението бяха проведени експерименти чрез отлагане на слоеве от поглъщащо вещество върху поликарбоната. След изследване на редица багрила, беше използвано веществото Ксилен цианол, като най-подходящо поради поглъщателната му способност в диапазона на видимата светлина. На фиг. 3.12 е показано отражението от същата поликарбонатна подложка за CD-R с отложен слой багрило и изпарен върху него златен слой с дебелина 110 nm. Очевидно се наблюдава ефективно възбуждане на ППР при елиминиране на отражението от подложката.

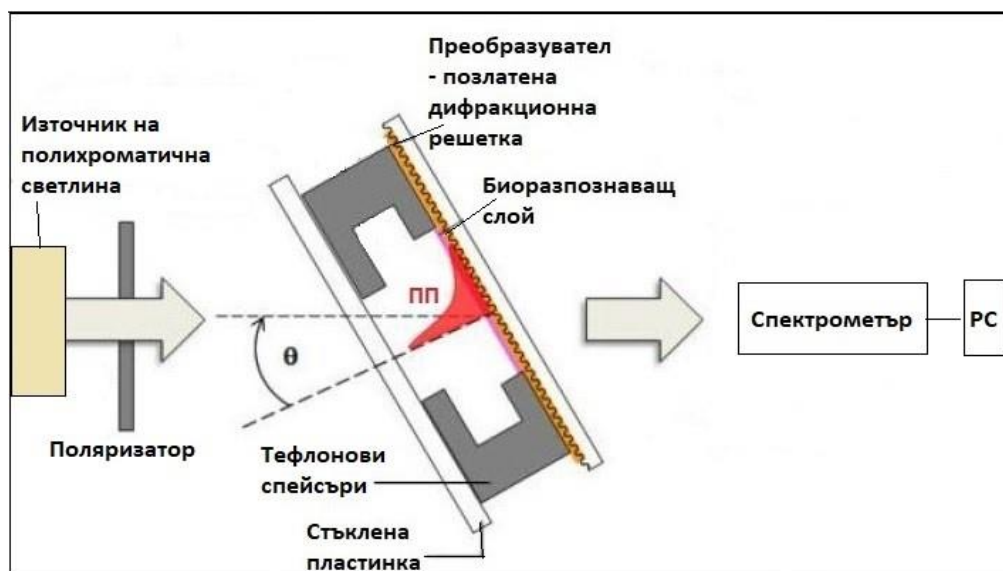
Оказа се, че при комерсиалните CD-R/DVD дискове се отлагат багрила със сходни характеристики. В момента използваме комерсиални дискове, покрити с багрилен слой, върху които отлагаме златното покритие.



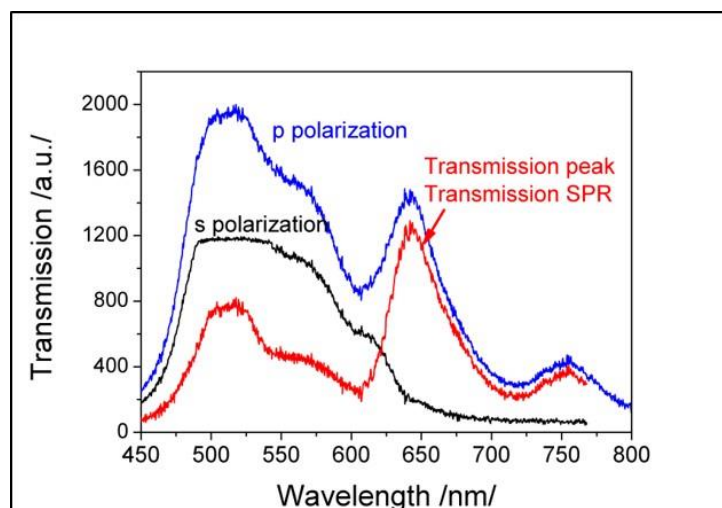
Фигура 3.12. Ефективно възбуждане на ППР на повърхността на поликарбонатна дифракционна решетка с отложен поглъщащ слой и отложен златен слой.

3.4. Възбуждане на два ППР в режим на преминаване

Беше предположено, че в отсъствие на поглъщащ багрилен слой, ПП ще се възбуди при преминаване на светлина през структурата, както е показано на фиг. 3.13. Такива наблюдения вече са докладвани за сензори, базирани на ППР. Осъщественият при нас експеримент повтаря показаното на фигурата. Ъгълът на падане на светлина е $\theta = 45^\circ$, като равнината на падане е перпендикулярна на щрихите на решетката. Както се вижда на графиката на фиг. 3.14, разликата в интензитетите на преминалата светлина между р-поляризация и s-поляризация показва ясно изразен пик при дължина на вълната около $\lambda = 650 \text{ nm}$. Той е в резултат на възбуждения плазмонен резонанс при преминаване.



Фигура 3.13. Възбуждане на ППР в режим на преминаване.



Фигура 3.14. Трансмисионен максимум в резултат на възбуден ППР в режим на преминаване.

Съществуват публикации, в които се изследва приложимостта като биосензор на плазмонния резонанс, възбуден на преминаване. Предимството на тази конфигурация е в това, че светлината преминава само веднъж през структурата, за разлика от режима на отражение. Това дава възможността да се модулира възбуждащата светлина като се нанесе подходящо покритие върху стъклото, покриващо проточната клетка.

3.4. Основни изводи

1. Теоретично е доказано, че хирална азнизоотропна среда може да бъде използвана за едновременно възбуждане на двоен ППР, които се детектират спектрално и едновременно.
2. Експериментално са доказани основните хипотези, на които се основава предположението за възбуждане на двоен ППР. За първи път е осъществено едновременно възбуждане на два ППР в дифракционна решетка.
3. Установени са структурните и технологични особености за изработването на дифракционни решетки за спектрално детектиране на ППР в режим на отражение и преминаване.

ОСНОВНИ ПРИНОСИ

1. На базата на MAPLE технологията е създаден метод за директна имобилизация на металопротеини. Установени са технологични параметри при които отложените слоеве са биоактивни.
2. Разработен е биочип, базиран на ППР в дифракционна решетка, чрез директна имобилизация на Hb и Mb.
3. Достигната е детекция на рекордно ниски концентрации на глюкоза, което потвърждава високата специфичност на директната имобилизация.
4. Теоретично е доказано, че чрез хирална анизотропна структура могат да бъдат възбудени едновременно два плазмонни резонанса в дифракционна решетка, които са спектрално разделени.
5. Експериментално е доказана възможността за възбуждане на двоен плазмонен резонанс в дифракционни решетки чрез моделни експерименти с отложени слоеве азополимер върху дифракционна решетка и чрез възбуждане с кръгово поляризирана полихроматина светлина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря за финансовата подкрепа на Национален Фонд „Научни Изследвания“ на проект ДН 08/18, част от който е настоящия дисертационен труд.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosensors-market798.html?gclid=CjwKCAjwmKLzBRBeIiwACCVihq7o7rrBaip1Z3txOMMnZr5q190J2VvQpLf5US6FQjA53GHJH_elrxoC88IQAvD_BwE
- [2] Duan H. L., Yang C., Shen W, Wang F., Zhu Z., A novel nitrite biosensor based on the direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on MXene-Ti3C2, *Sensors and Actuators B*, 218, 60-66 (2015)
- [3] Murphy E. M., Noack E., Nitric oxide assay using hemoglobin method, *Methods in Enzymology*, 233, 240-250 (1994)
- [4] Takada Y., Otsuka R., Tsukada K. A., Carbon monoxide sensing film based on hemoglobin allostery. *Biomedical Science and Engineering*, 173-180 (2014)
- [5] Yoon J., Lee T., Bapurao G., Jinhee J., Oh B. K., Choi J. W., Electrochemical H₂O₂ biosensor composed of myoglobin on MoS₂ nanoparticle-graphene oxide hybrid structure, *Biosens. Bioelectron.*, 93, 14-20 (2015)
- [6] Yoon J., Shin J. W., Lim J., Electrochemical nitric oxide biosensor based on amine-modified MoS₂/graphene oxide/myoglobin hybrid, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 729-736 (2017)
- [7] Boffi A., Rizzi M., Monacelli F., Ascenzi P., Enhanced response to antibody binding in engineered Betagalactosidase enzymatic sensors, *Biochimica Biophysica Acta*, 1596, 212 – 224 (2002)
- [8] Wu H., Wang X., Qiao M., Zhang H., Jin X., Fan S., “Enhancing sensitivity of hemoglobin-based electrochemical biosensor by using protein conformational intermediate”, *Sensors and Actuators B* 221, 694–699 (2015)
- [9] Belina E., Kisov H., Pavlova E., Borisova E., Dyankov G, Thin hemoglobin layers deposited by MAPLE technology, *AIP Conference Proceedings*, 2019, 2075, 160008-1 – 160008-6, 10th Jubilee International Conference of the Balkan Physical Union, Bulgaria, Sofia (2018)
- [10] Dyankov G., Kisov Ch., Belina E., Pavlova E., Borisova E., Gisbrecht A., Ivanov D., Comparative study on the bio-activity of hemoglobin and myoglobin as recognition materials in biosensors, *Proc. SPIE 2019*, 11047, 1104705-1 – 1104705-6, 20th International Conference and School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications, Bulgaria, Sozopol (2018)
- [11] Grenfell T.C., Perovich D.L., Radiation absorption coefficient of polycrystalline ice from 400 – 1400 nm, *Jour. Geophysical Res.*, 86, 7447-7450 (1981)
- [12] Dyankov G., Belina E., Kisov Hr., Pavlova E., Angelov I., Borisova E., Direct immobilized hemoglobin for glucose monitoring by surface plasmon resonance, *The 9th International Conference on Surface Plasmon Photonics*, 26 – 31 May Copenhagen, Denmark (2019)
- [13] Dyankov G., Eftimov T.A., Malinowski N., Belina E., Kisov H., Mikulic P., Bock W. J., A Highly Efficient Biosensor based on MAPLE Deposited Hemoglobin on LPGs Around Phase Matching Turning Point; *Optics and Laser Technology*, 123 (2020)
- [14] Yang H. M., Teoh J., Yim G. H., Doo Y., Label-Free Analysis of Multivalent Protein Binding using Bioresponsive Nanogels and Surface Plasmon Resonance (SPR), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, (2020)
- [15] Wu S. T., Yang D., *Fundamentals of Liquid Crystal Devices*, John Wiley & Sons, ISBN 0-470-01542-X (2006)
- [16] Yeh P., Gu C., *Optics of Liquid Crystal Displays*, Wiley series in pure and applied optics, ISBN 0-471-18201-X (2009)
- [17] Wen C., Gauza S., Lu R. and Wu S., *Refractive Indices of Liquid Crystals for Display Applications*, IEEE (2005)