Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Instytut Fizyki

Nanodruty srebra jako platformy dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki

Karolina Sulowska

Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem:
Prof. dra hab. Sebastiana Maćkowskiego
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
oraz
Prof. dr hab. inż. Joanny Niedziółki-Jönsson
Instytut Chemii Fizycznej
Polska Akademia Nauk

Toruń 2023

Pragnę serdecznie podziękować wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy.

Składam serdeczne podziękowania promotor prof. dr hab. Joannie Niedziółce-Jönsson za opiekę merytoryczną, pomoc w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, wprowadzenie do świata chemii oraz wszystkie rozmowy. Jednocześnie składam podziękowania prof. dr. hab. Sebastianowi Maćkowskiemu, za poświęcony czas, nieocenione wsparcie naukowe oraz wszystkie informacje zwrotne.

Dziękuję również obecnym jak i byłym członkom Katedry Nanofotoniki oraz zespołu prof. dr hab. Joanny Niedziółki-Jönsson – Kamilowi, Maciejowi, Ewie, Martinowi, Marcinowi, Michałowi, Martynie oraz Nicol za miłą i przyjazną atmosferę pracy.

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW 7

DOROBEK NAUKOWY 9

WSTĘP 11

1. BIOSENSORY 13

1.1 WPROWADZENIE 13
1.2 ELEMENTY BIOSENSORA 14
1.3 TYPY BIOSENSORÓW 15
1.4 PARAMETRY BIOSENSORÓW 19

2. NANOSTRUKTURY METALICZNE 21

2.1 RODZAJE NANOCZĄSTEK METALICZNYCH 21
2.2 ZLOKALIZOWANY REZONANS PLAZMONOWY 23
2.3 KONTROLA GEOMETRII NANOCZĄSTEK METALICZNYCH NA PODŁOŻU 26
2.4 METODY FUNKCJONALIZACJI POWIERZCHNI NANOCZĄSTEK METALICZNYCH 35
2.5 WPŁYW REZONANSU PLAZMONOWEGO NA FLUORESCENCJĘ EMITERÓW 38

3. PRZEGLĄD WYBRANYCH EKSPERYMENTÓW 43

4. TECHNIKI EKSPERYMENTALNE 51

4.1 SPEKTROFOTOMETRIA UV/VIS 51
4.2 FLUORESCENCYJNA MIKROSKOPIA SZEROKIEGO POLA 52
4.3 FLUORESCENCYJNA MIKROSKOPIA KONFOKALNA I SPEKTROSKOPIA CZASOWO-ROZDZIELCZA 53

5. CELE PROJEKTU DOKTORSKIEGO 57

6. SYNTEZA I FUNKCJONALIZACJA POWIERZCHNI NANODRUTÓW SREBRA 59

6.1 SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI OPTYCZNE NANODRUTÓW SREBRA 59
6.2 FUNKCJONALIZACJA POWIERZCHNI NANODRUTÓW SREBRA 62
6.3 KOMPLEKS FOTOAKTYWNY PERYDYNINA-CHLOROFIL-BIAŁKO 63

7. WYKRYWANIE BIAŁKA W ROZTWORZE 65

7.1 OPIS WYKONANIA EKSPERYMENTU 65
7.2 EKSPERYMENT Z DŁUGIM CZASEM (16 H) INKUBACJI 66
7.3 EKSPERYMENT Z KRÓTKIM CZASEM (5 MIN.) INKUBACJI 67
7.4 PODSUMOWANIE ROZDZIAŁU 74

8. WYKRYWANIE BIAŁKA NA PODŁOŻU W CZASIE RZECZYWISTYM 75

8.1 OPIS WYKONANIA EKSPERYMENTU 75
8.2 WPŁYW FUNKCJONALIZACJI NANODRUTÓW SREBRA NA DETEKCJĘ BIAŁKA 76
8.3 DETEKCJA POJEDYNCZYCH BIAŁEK 82

8.4 PODSUMOWANIE ROZDZIAŁU 89

9. WYKRYWANIE BIAŁKA W MIKROKANAŁACH 91

9.1 MODYFIKACJA POWIERZCHNI PODŁOŻY SZKLANYCH 91
9.2 ORIENTACJA NANODRUTÓW SREBRA 92
9.3 WYKRYWANIE BIAŁKA PRZEZ ZORIENTOWANE NANODRUTY SREBRA 97
9.4 PODSUMOWANIE ROZDZIAŁU 100

10. WYKRYWANIE BIAŁKA NA PLAZMONOWYM CZIPIE 103

10.1 MODYFIKACJA POWIERZCHNI PODŁOŻY SZKLANYCH 103
10.2 PRZYGOTOWANIE CZIPÓW 104
10.3 WYKRYWANIE BIAŁKA ZA POMOCĄ PLAZMONOWYCH CZIPÓW 105
10.4 PODSUMOWANIE ROZDZIAŁU 111

PODSUMOWANIE ROZPRAWY 113

BIBLIOGRAFIA 115

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM 125

Wykaz stosowanych skrótów

Akronim	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
AChE	*acetylcholinesterase*	acetylocholinoesteraza
AFM	*Atomic Force Microscope*	mikroskop sił atomowych
Ag@Silica	*silver nanoparticle coated with silica*	nanocząstka srebra pokryta krzemionką
AgNW@cys	*silver nanowire modified with cysteamine*	nanodruty srebra sfunkcjonalizowane cysteaminą
AgNW@cys@biotyna	*silver nanowire modified with cysteamine and biotin*	nanodruty srebra sfunkcjonalizowane cysteaminą i biotyną
AgNWs	*silver nanowires*	nanodruty srebra
AgNWs@PVP	*silver nanoparticle coated with PVP*	nanodruty srebra w otoczce z PVP
APTES	*(3-Aminopropyl)triethoxysilane*	(3-aminopropylo)trietoksysilan
CMOS	*complementary metal-oxide-semiconductor*	komplementarny układ scalony MOS
cys	*cysteamine*	cysteamina
DMSO	*dimethyl sulfoxide*	dimetylosulfotlenek
DNA	*deoxyribonucleic acid*	kwas deoksyrybonukleinowy
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*	test typu ELISA
EtOH	*ethyl alcohol*	alkohol etylowy
H_2O_2	*hydrogen peroxide*	nadtlenek wodoru
IgG	*Immunoglobulin G*	Immunoglobulina G
ITO	*indium tin oxide*	tlenek cyny indu
LED	*light-emitting diode*	dioda emitująca światło
LPR	*localized plasmon resonance*	zlokalizowany rezonans plazmonowy
LSPR	*localised surface plasmon resonances*	zlokalizowany rezonans plazmonów powierzchniowych
MBE	*molecular beam epitaxy*	epitaksja z wiązki molekularnej
MEF	*metal enhanced fluorescence*	plazmonowe wzmocnienie fluorescencji

NH_3	*ammonia*	amoniak
Ni	*nickel*	nikiel
NTA	*nitrilotriacetic acid*	kwas nitrylotrioctowy
OTMS	*octadecyltrimethoxysilane*	octadecylotrimetoksysilan
PA - PdNW	*partially anchored Pd nanowire*	częściowo przytwierdzone palladowe nanodruty
PCM	*phase-change memory*	pamięć oparta o zmianę fazy
PCP	*peridinin-chlorophyll-protein*	perydynina-chlorofil-białko
PDMS	*polydimethylsiloxane*	polidimetylosiloksan
PEF	*surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy*	wspomagana plazmonami powierzchniowymi spektroskopia fluorescencyjna
PEG	*poly(ethylene glycol)*	poli(tlenek etylenu)
PMMA	*poly(methyl methacrylate)*	poli(metakrylan metylu)
PS	*polystyrene*	polistyren
PVP	*polyvinyl alcohol*	poli(alkohol winylowy)
QDs	*quantum dots*	kropki kwantowe
rpm	*revolutions per minute*	obroty na minutę
rps	*revolutions per second*	obroty na sekundę
SAMs	*self-assembled monolayers*	samoorganizujące się monowarstwy
SEM	*scanning electron microscope*	skaningowy mikroskop elektronowy
SERS	*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*	powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska
SIF	*silver island film*	warstwa srebrnych wysp
SIP	*silver island paths*	ścieżki srebrnych wysp
TCSPC	*time correlated single photon counting*	system zliczania pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo
ZnO	*zinc oxide*	tlenek cynku

Dorobek naukowy

Publikacje, w których skład wchodzą wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej:

K. Sulowska, E. Roźniecka, J. Niedziółka-Jönsson, S. Maćkowski "Aligned silver nanowires for plasmonically-enhanced fluorescence detection of photoactive proteins in wet and dry environment" Spectrochimica Acta Part A: 289 (2022), 122225

K. Sulowska, K. Wiwatowski, M. Ćwierzona, J. Niedziółka-Jönsson, S. Maćkowski "Real-time fluorescence sensing of single photoactive proteins using silver nanowires" Methods and Applications in Fluorescence, 8 (4) (2020), 045004

Publikacje, których wyniki są związane z tematyką niniejszej rozprawy doktorskiej:

K. Sulowska, E. Roźniecka , K. Wiwatowski, M. Jańczuk-Richter , M. Jönsson-Niedziółka, J. Niedziółka-Jönsson, S. Maćkowski "Patterned silver island paths as high-contrast optical sensing platforms" Materials Science and Engineering: B, 268 (2021), 115124

M. Jankowska, K. Sulowska, K. Wiwatowski, J. Niedziółka-Jönsson, S. Maćkowski "Real-Time Fluorescence Imaging of His-Tag-Driven Conjugation of mCherry Proteins to Silver Nanowires" Chemosensors, 10 (4) (2022),149

M. Szalkowski, K. Sulowska, M. Jönsson-Niedziółka, K. Wiwatowski, J. Niedziółka-Jönsson, S. Maćkowski, D. Piątkowski "Photochemical Printing of Plasmonically Active Silver Nanostructures" International Journal of Molecular Sciences, 21 (6) (2020), 2006

D. Kowalska, M. Szalkowski, K. Sulowska, D. Buczyńska, J. Niedziółka-Jönsson, M. Jönsson-Niedziółka, J. Kargul, H. Lokstein, S. Maćkowski "Silver Island Film for Enhancing Light Harvesting in Natural Photosynthetic Proteins" International Journal of Molecular Sciences, 21 (7) (2020), 2451

M. Szalkowski, K. Sulowska, J. Grzelak, J. Niedziółka-Jönsson, E. Roźniecka, D. Kowalska, S. Maćkowski "Wide-Field Fluorescence Microscopy of Real-Time Bioconjugation Sensing" Sensors, 18 (1) (2018), 290

J. Grzelak, K. Sulowska, A. Leśniewski, E. Roźniecka, M. Janczuk-Richter, Ł. Richter, M. Łoś, M. Jönsson-Niedziółka, S. Maćkowski, J. Niedziółka-Jönsson "Capturing Fluorescing Viruses with Silver Nanowires" Sensors and Actuators B: Chemical, 273 (2018), 689–695

Publikacje, których tematyka wykracza poza zakres niniejszej rozprawy doktorskiej:

K. Sulowska, K. Wiwatowski, P. Szustakiewicz, J. Grzelak, W. Lewandowski, S. Maćkowski, "Energy Transfer from Photosystem I to Thermally Reduced Graphene Oxide" Materials, 11 (9) (2018), 1567

M. Ćwierzona, K. Sulowska, M. A. Antoniak, M. Żebrowski, M. Nyk, S. Maćkowski, D. Piątkowski "Precise laser-cutting of single silver nanowires for direct measurement of SPPs propagation losses" Applied Physics Letters, 120, (26) (2022), 261108

A. Borodziuk, K. Sulowska, Ł. Zinkiewicz, M. Szymura, A. Reszka, A. Bogucki, B. Sikora, S. Maćkowski, Ł. Kłopotowski "Interaction with Silver Nanowires Disrupts the Excitation Pathways in Upconverting Nanoparticles" The Journal of Physical Chemistry C, 126, 45, (2022), 19219-19228

A. Maroń, J. Palion-Gazda, A. Szłapa-Kula, E. Schab-Balcerzak, M. Siwy, K. Sulowska, S. Maćkowski, B. Machura "Controlling of Photophysical Behavior of Rhenium(I) Complexes with 2,6-Di(thiazol-2-yl)pyridine-Based Ligands by Pendant π-Conjugated Aryl Groups" International Journal of Molecular Sciences, 23 (19) (2022), 11019

M. Małecka, A. Szlapa-Kula, A. M. Maroń, P. Ledwon, M. Siwy, E. Schab-Balcerzak, K. Sulowska, S. Maćkowski, K. Erfurt, B. Machura "Impact of the Anthryl Linking Mode on the Photophysics and Excited-State Dynamics of Re(I) Complexes [ReCl(CO)3(4′-An-terpy-κ2N)]" Inorganic Chemistry, 61 (38) (2022), 15070–15084

M. Ćwik , K. Sulowska, D. Buczyńska , E. Rożniecka , M. Jankowska, S. Maćkowski, J. Niedziółka-Jönsson "Controlling plasmon propagation and enhancement via reducing agent in wet chemistry synthesized silver nanowires" Optics Express, 29 (6) (2021), 8834-8845

G. Szafraniec-Gorol , A. Slodek, D. Zych , M. Vasylieva , M. Siwy, K. Sulowska, S. Maćkowski, I. Taydakov, D. Goriachiy, E. Schab-Balcerzak "Impact of the donor structure in new D–π–A systems based on indolo[3,2,1-jk]carbazoles on their thermal, electrochemical, optoelectronic and luminescence properties" Journal of Materials Chemistry C, 9 (23) (2021), 7351-7362

K. Choroba, S. Kotowicz, A. Maroń, A. Świtlicka, A. Szłapa-Kula, M. Siwy, J. Grzelak, K. Sulowska, S. Maćkowski, E. Schab-Balcerzak, B. Machura "Ground- and excited-state properties of Re(I) carbonyl complexes – Effect of triimine ligand core and appended heteroaromatic groups" Dyes and Pigments, 192 (2021), 109472

D. Buczyńska, M. Ćwik, E. Rożniecka, K. Sulowska, D. Piątkowski, S. Maćkowski, J. Niedziółka-Jonsson "Correlating Plasmon Polariton Propagation and Fluorescence Enhancement in Single Silver Nanowires" The Journal of Physical Chemistry C, 124 (28) (2020), 15418-15424

M. Ćwik, D. Buczyńska, K. Sulowska, E. Rożniecka, S. Maćkowski, J. Niedziółka-Jönsson, "Optical Properties of Submillimeter Silver Nanowires Synthesized Using the Hydrothermal Method" Materials 12 (5) (2019), 721

WSTĘP

Zwiększająca się świadomość ludzkości na zagrożenia związane ze zdrowiem, potrzeba kontroli procesów technologicznych, czy zaostrzające się wymogi ochrony środowiska powodują konieczność kontroli stężenia wielu substancji. Potrzeba ta spowodowała rozwój metod spektroskopowych, elektroanalitycznych, czy chromatograficznych charakteryzujących się dokładnością, czułością i dużą precyzją. Metody te posiadają jednak ograniczenia. Coraz częściej wymagane jest szybkie oznaczanie substancji, ciągłe monitorowanie ich stężenia oraz automatyzacja pomiarów. Oznaczanie substancji w mieszaninie składników jest skomplikowane, dlatego wciąż są poszukiwane i rozwijane metody wykrywania substancji. Rozwiązaniem opisanych problemów jest wykorzystanie sensorów, a zwłaszcza biosensorów.

Biosensory swoją popularność zawdzięczają wielu zaletom, z czego najpopularniejsze to: wysoka czułość i selektywność, niska cena czy możliwość miniaturyzacji. Po zapoznaniu się z literaturą nasuwa się wniosek, że istnieją nieograniczone metody komponowania biosensorów. Projektując biosensor, należy zwrócić uwagę na substancję, która będzie wykrywana oraz parametr, który będzie rejestrowany przez detektor. Ważny jest odpowiedni dobór warstwy receptorowej oraz przetwornika i opracowanie procedury pomiarowej.

Projektowanie biosensorów jest przykładem badań interdyscyplinarnych. W eksperymentach ważna jest wiedza z zakresu chemii (modyfikacja powierzchni), biologii (wiedza o biomolekułach), fizyki (pomiar sygnału), nanotechnologii (synteza nanocząstek), elektroniki czy inżynierii materiałowej. Wiedza uzyskana we współpracy w zespole interdyscyplinarnym pozwala na tworzenie rozwiązań o większej wszechstronności.

Przedmiotem tej pracy jest badanie i zastosowanie nanomateriałów - obejmujące syntezę nanocząstek, modyfikację ich powierzchni oraz kontrolę geometrii na podłożu - pod kątem wykorzystania ich w biosensorach. Wykonano badania nad oddziaływaniem nanostruktur hybrydowych ze światłem. W badaniach wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną oraz konfokalną.

Z punktu widzenia konstrukcji biosensorów, interesującym nanomateriałem są nanodruty srebra, które pod wpływem wzbudzenia mogą wykazywać wzbudzenie plazmonowe. Wzbudzenie plazmonowe jest możliwe dzięki średnicy nanodrutów srebra wynoszącej około 100 nm. Otrzymane nanodruty srebra mają średnią długość ok. 9 µm, dzięki czemu możliwa jest ich lokalizacja za pomocą mikroskopii optycznej. Zaletą nanodrutów srebra jest również możliwość modyfikacji ich powierzchni grupami funkcyjnymi. Synteza nanodrutów srebra jest prosta, a otrzymane nanostruktury wykazują stabilność przez długi czas.

Głównym celem tej pracy jest wykazanie potencjału nanodrutów srebra jako platform biosensorowych umożliwiających wykrywanie pojedynczych białek dzięki plazmonowo wzmocnionej fluorescencji. Z tego względu istotna jest zarówno synteza i modyfikacja powierzchni nanodrutów srebra, wykrywanie białka fotoaktywnego *in-situ* przez nanodruty srebra w zawiesinie, w losowej konfiguracji na podłożu szklanym, jak również poprzez nanodruty zorientowane w kanale mikrofluidycznym oraz jako plazmonowe czipy. W ramach pracy wykorzystano kanały mikrofluidyczne do orientacji nanodrutów srebra. Pomiary wykrywania białka odbywały się przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola.

Praca składa się z dziesięciu rozdziałów i została podzielona na dwie części: część teoretyczną oraz wyniki własne. Rozdziały od 1 do 4 zwierają wprowadzenie niezbędne do zrozumienia podjętej w rozprawie doktorskiej tematyki oraz przedstawiają aktualny stan wiedzy. W rozdziale 1 opisano biosensory oraz zastosowanie nanocząstek do ich budowy. Rozdział 2 zawiera charakterystykę nanostruktur metalicznych ze szczególnym uwzględnieniem opisu metod kontroli ich geometrii. W rozdziale 3 przedstawiono przegląd wybranych doniesień literaturowych prezentujący obecny stan wiedzy. Fluorescencyjną mikroskopię szerokiego pola oraz konfokalną opisano w rozdziale 4.

Druga część rozprawy zawiera wyniki własne, które zostały przedstawione w sześciu rozdziałach. W rozdziale 5 opisano cele projektu doktorskiego. Rozdział 6 stanowi opis syntezy nanodrutów srebra wykorzystywanych w badaniach oraz metodę modyfikacji ich powierzchni. W rozdziale 7 opisano wykrywanie białka przez nanodruty srebra w zawiesinie, wraz z opisem ograniczeń tak zaprojektowanego eksperymentu. W rozdziale 8 zaprezentowano wykrywanie pojedynczego białka w czasie rzeczywistym przez AgNWs ułożone losowo na powierzchni szkła. Rozdział 9 stanowi opis wykrywania białka w kanale mikrofluidycznym umożliwiającym orientację AgNWs. Wykorzystanie ukierunkowanych AgNWs w plazmonowych czipach do wykrywania pojedynczego białka zaprezentowano w rozdziale 10. Ostatni rozdział pracy doktorskiej jest podsumowaniem przedstawionych wyników. Przytoczone w nim zostały najważniejsze rezultaty oraz wskazane dalsze możliwe ścieżki badań. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki potencjał nanodrutów srebra jako platform biosensorowych.

Badania opisane w niniejszej rozprawie wykonano w ramach projektów „Przestrzenna organizacja nanodrutów metalicznych dla zaawansowanej fotoniki" (OPUS 11, Nr 2016/21/B/ST3/02276), „Drukowane nanostruktury metaliczne dla wzmocnionej plazmonowo mobilnej mikroskopii fluorescencyjnej" (PRELUDIUM 20, Nr 2021/41/N/ST7/03528) finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz „Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro – modernizacja Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach Zintegrowanego Programu Uczelni" (2018-2022) współfinansowany z Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój".

1. BIOSENSORY

Niniejszy rozdział zawiera wprowadzenie do tematyki biosensorów. Omówione zostaną w nim elementy typowego biosensora oraz zaprezentowane będą typy biosensorów, a także wymienione zostaną istotne parametry biosensorów. W każdym z tych opisów zwrócono uwagę na zastosowanie nanomateriałów w biosensorach.

1.1 Wprowadzenie

Wraz z rozwojem naukowym, automatyzacją i wzrostem świadomości zagrożeń w otoczeniu człowieka pojawiła się konieczność wykrywania wielu substancji, czy pomiaru paramentów środowiskowych, co doprowadziło do rozwoju technik chemii analitycznej. Informacje o substancjach można uzyskiwać w sposób ciągły (pomiar w czasie rzeczywistym), bądź pobierając próbkę do jednorazowego pomiaru. Aby uzyskać pożądane informacje, opracowano szereg metod analitycznych, takich jak: spektroskopowe (np. fluorescencyjna, Ramana), elektrochemiczne (np. potencjometria, amperometria), chromatograficzne (np. immunochemiczne, elektroforetyczne), techniki spektrometrii masowej (np. MALDI) [1]. Alternatywą dla tych technik są sensory chemiczne, które mogą wydajnie zastąpić wymienione powyżej metody analityczne. W przeciwieństwie do tych metod sensory chemiczne charakteryzują się prostą konstrukcją, zachowując czułość i selektywność klasycznych metod analitycznych [2–5].

Definicja Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, z ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) wskazuje, że sensory chemiczne są to urządzenia, które przetwarzają informację, począwszy od stężenia określonego składnika próbki, po ogólny skład matrycy, na sygnał użyteczny analitycznie [6]. W języku polskim wyrazy sensor i czujnik są używane zamiennie [7]. Definicja sensorów zmieniła się w 1997 roku po publikacji książki pt. „*Sensors for Ion and Molecular Recognition*”, w której przedefiniowano pierwotną definicję sensorów. Autorzy nazwali sondy optyczne (molekularne) sensorami. Efektem tej publikacji był wzrost wykorzystywania nazwy sensor w odniesieniu do sond molekularnych, które według pierwotnej definicji nie są sensorem. Podobnie jest z definiowaniem znaczników (z ang. *labels*) czy ligandów jako sensory i biosensory. Problem z nazewnictwem wynika ze zdolności znaczników czy ligandów do selektywnego rozpoznawania analitu, co może zostać określone wykrywaniem czy też detekcją.

Szczególną grupą sensorów chemicznych są biosensory. Definicja IUPAC z 1992 roku podaje, że biosensor to urządzenie wykorzystujące biochemiczne reakcje, w których pośredniczą izolowane enzymy, przeciwciała, tkanki, organelle lub całe komórki do wykrywania związków chemicznych.

Sygnał pochodzący z biochemicznych reakcji zamieniany jest na sygnał elektryczny, termiczny lub optyczny [8]. Przedrostek „bio” oznacza naturę reakcji oddziaływań pomiędzy warstwą rozpoznającą (na potrzeby pracy zwaną receptorową) a analitem. Według pierwotnej definicji biosensor wykrywał substancje wykazujące aktywność biologiczną, bądź analit w próbkach biologicznych. Definicja ta jest nadal stosowana przez część naukowców.

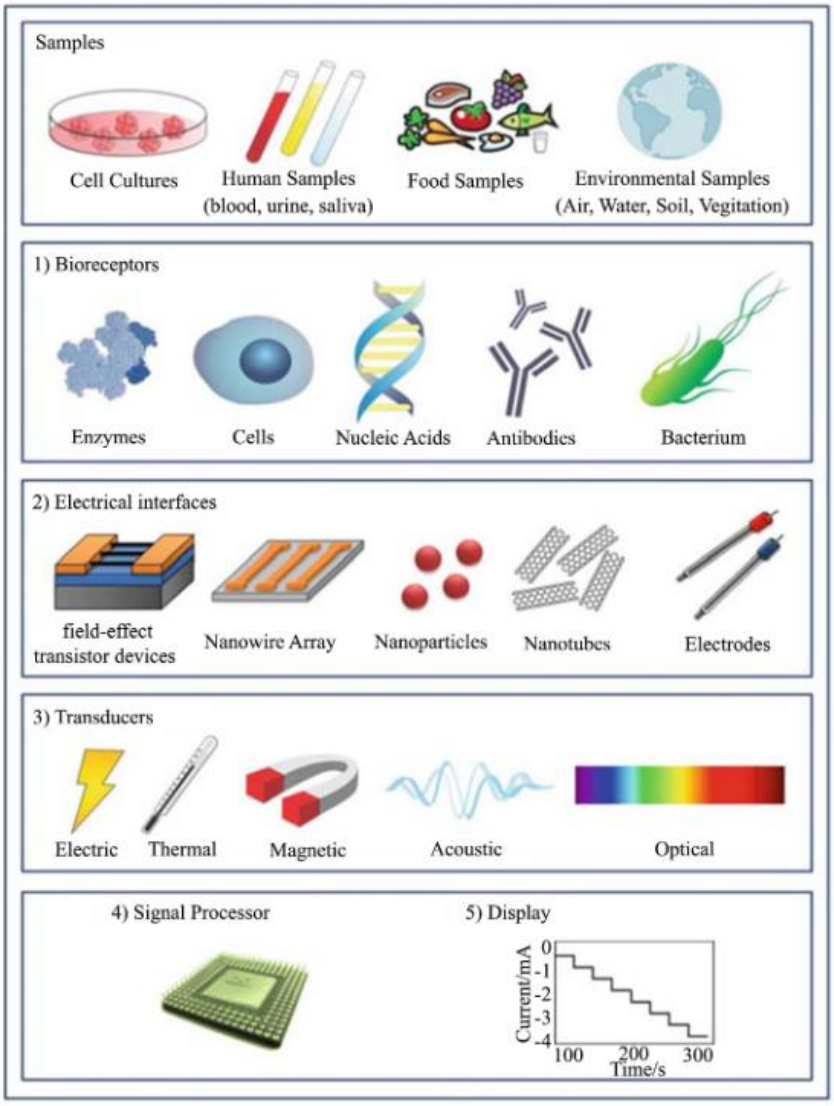
Celem badań nad biosensorami jest produkcja taniego, szybkiego i nieinwazyjnego biosensora, który może dostarczyć wielu danych na podstawie analizy pojedynczej próbki [3,9,10]. Rozwój nanomateriałów sprawił, że wykorzystanie ich w biosensorach stało się możliwe głównie dzięki możliwości modyfikacji ich powierzchni. Nanomateriały, a właściwie układy hybrydowe stały się przez to zdolne do selektywnego wykrywania substancji, w tym białek czy patogenów. Rozwój nanotechnologii spowodował ponowny wzrost wykorzystywania określenia sensor w literaturze. Dla porównania w 1990 roku, według ”Web of science”, opublikowano 2 090 prac z wyrazem sensor, a w roku 2021 opublikowano 84 153. W świecie naukowym pojawił się również termin nanosensory, czyli sensory w postaci cząstek o rozmiarach rzędu nanometrów. Zazwyczaj w tym celu wykorzystuje się rozdyspergowane nanocząstki, z których każda z drobin jest biosensorem. Wykrycie analitu powoduje zmianę barwy zawiesiny. Aby pierwotna definicja sensora została zachowana, muszą one wykrywać analit i jednocześnie generować sygnał analityczny [11].

Poza wykorzystaniem nanocząstek jako biosensorów, istnieją inne sposoby wykorzystania nanomateriałów w sensoryce. Nanomateriały mogą pełnić funkcję platformy biosensorowej do immobilizacji receptorów, mogą być również odpowiedzialne za generowanie sygnału optycznego, czy też jego wzmocnienie [12–14]. W niniejszej pracy nanodruty srebra (AgNWs, z ang. *silver nanowires)* zostaną sprawdzone pod kątem zastosowania ich w biosensorach jako platformy biosensorowe. Zgodnie z definicją AgNWs nie są sensorem, ani biosensorem. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mają na celu pokazanie potencjału tych nanocząstek, aby móc je z sukcesem wykorzystać jako element konstrukcji biosensorów.

1.2 Elementy biosensora

Na rys. 1. przedstawiono zestaw komponentów prostego biosensora, który składa się z warstwy bioreceptorowej oraz przetwornika. Analit, czyli oznaczana substancja wchodzi w reakcje lub oddziałuje w specyficzny sposób z warstwą bioreceptorową. Analit może znajdować się w próbkach komórek, krwi, moczu, śliny, jedzenia czy próbkach pobranych ze środowiska. Bioreceptor jest to biologiczny element rozpoznający analit (np. enzym, komórka, DNA, przeciwciało czy bakteria), stanowi on o specyficzności biosensora (rys. 1.). Aby połączyć bioreceptor z przetwornikiem wykorzystuje się złącze elektryczne. Przykładowymi złączami elektrycznymi mogą być tranzystor polowy, nanodruty, nanocząstki, nanorurki czy elektrody. Element ten najczęściej odpowiada również

za wzmocnienie sygnału. Po wykryciu analitu wygenerowana informacja chemiczna (sygnał biologiczny) zamieniana jest przez przetwornik na mierzalny sygnał (elektryczny, termiczny, magnetyczny, akustyczny lub optyczny). Sygnał powinien zostać zarejestrowany natychmiast po pojawieniu się analitu w warstwie bioreceptorowej. Mimo, że podstawowa zasada działania wszystkich biosensorów jest taka sama, to bioreceptory i przetworniki dobiera się do wykrywanego analitu [2,15,16]. W badaniach zawartych w rozprawie doktorskiej, zgodnie z przedstawionym poniżej schematem, nanodruty srebra wykorzystano jako złącza, na których umieszczono warstwę receptorową.



Rys. 1. Zestawienie możliwych komponentów biosensora. Zaczerpnięto z [15].

1.3 Typy biosensorów

Biosensory podzielono ze względu na rodzaj oddziaływania warstwy receptorowej z analitem, lub na rodzaj przetwornika. W przypadku pierwszego podziału wyróżniono biosensory katalityczne oraz biosensory powinowactwa. Biosensory katalityczne wyróżniają się udziałem warstwy receptorowej w reakcji chemicznej, podczas której powstaje produkt lub ubytek substratu, który powoduje zmianę

sygnału mierzonego w układzie. Jako elementy warstwy receptorowej mogą być zastosowane enzymy, komórki bakterii, grzyby, drożdże, organella komórkowe czy kwasy nukleinowe o właściwościach katalitycznych. W przypadku biosensorów powinowactwa mamy do czynienia z selektywnym wiązaniem lub oddziaływaniem analitu przez warstwę receptorową, powodującym powstanie stabilnych kompleksów. Elementami receptorowymi w tym przypadku mogą być białka, w tym przeciwciała, cząsteczki kwasów nukleinowych lub peptydy [3,4,9, 17].

Podział ze względu na rodzaj przetwornika jest kolejnym sposobem klasyfikacji biosensorów. Najczęściej wyróżnia się biosensory elektrochemiczne, piezoelektryczne, termiczne oraz optyczne. W pracy skupiono się na rozwoju konstrukcji biosensorów optycznych, dlatego zostaną one szerzej opisane.

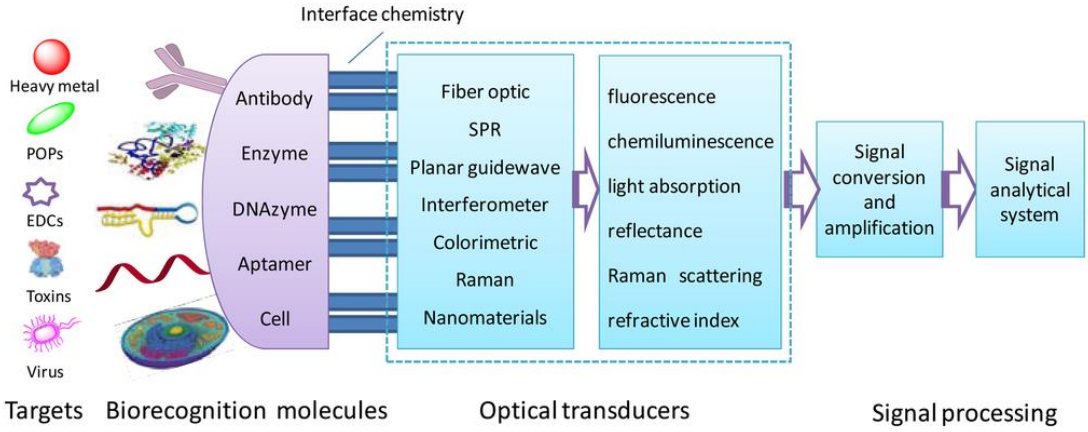
Biosensory elektrochemiczne są najstarszą i najpopularniejszą grupą sensorów. Popularność zawdzięczają stosunkowo krótkiemu czasowi odpowiedzi, wysokiej czułości i selektywności. Typowy biosensor elektrochemiczny składa się z elektrody pracującej, elektrody odniesienia i przeciwelektrody [16]. Właściwości biosensora zależą od materiału z jakiego są wykonane elektrody (co przekłada się na zakres pracy), modyfikacji ich powierzchni oraz możliwości miniaturyzacji powierzchni aktywnej. Rozróżnia się następujące typy biosensorów elektrochemicznych: amperometryczne, potencjometryczne, konduktometryczne [11, 18–20].

Następnym typem są biosensory piezoelektryczne (masowe), w których sygnał pomiarowy uzyskuje się w wyniku adsorpcji cząstek analizowanej substancji na powierzchni sensorów. Biosensory te wytwarzają sygnał elektryczny po przyłożeniu siły mechanicznej do powierzchni kryształu piezoelektrycznego. Mogą pracować w kilku trybach, z których bezpośrednia, wolna od znaczników interakcja z analitem zapewnia maksymalne wykorzystanie zalet platformy piezoelektrycznej. Ich zaletami są: miniaturowe rozmiary, prosta konstrukcja oraz mała moc zasilająca. Sensory te są bardzo czułe, jednak ich wadą jest duża wrażliwość na substancje, które mogą zaburzać odczyt [6, 21].

Biosensory termiczne wykorzystują podstawową właściwość reakcji biologicznych: absorpcję i wydzielanie ciepła. W tych biosensorach wykonywany jest pomiar temperatury płynu, który wszedł w reakcję z enzymem w warstwie bioreceptorowej [22]. Termoczułym elementem przetwornikowym może być termopara lub termistor. Ograniczeniem biosensorów termicznych jest konieczność stosowania termodynamicznie otwartych systemów, aby możliwe było oddziaływanie z analitem, maksymalna odpowiedź jest możliwa w warunkach adiabatycznych [6]. Rozwój biosensorów termicznych nie jest tak szybki, jak pozostałych biosensorów ze względu na ograniczenia związane z pomiarem temperatury oraz niską czułością [23].

Ostatnią grupą biosensorów cieszącą się szerokim zastosowaniem są biosensory optyczne. Wykorzystują one różne formy oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z cząsteczkami

analitu, aby uzyskać informację o składzie próbki, co schematycznie przedstawiono na rys. 2. W sensorach optycznych wykorzystuje się następujące zjawiska optyczne: absorpcję i odbicie promieniowania, fluorescencję, rozpraszanie Ramana, zmianę współczynnika załamania światła oraz interferencję światła (rys. 2.) [12,24,25].



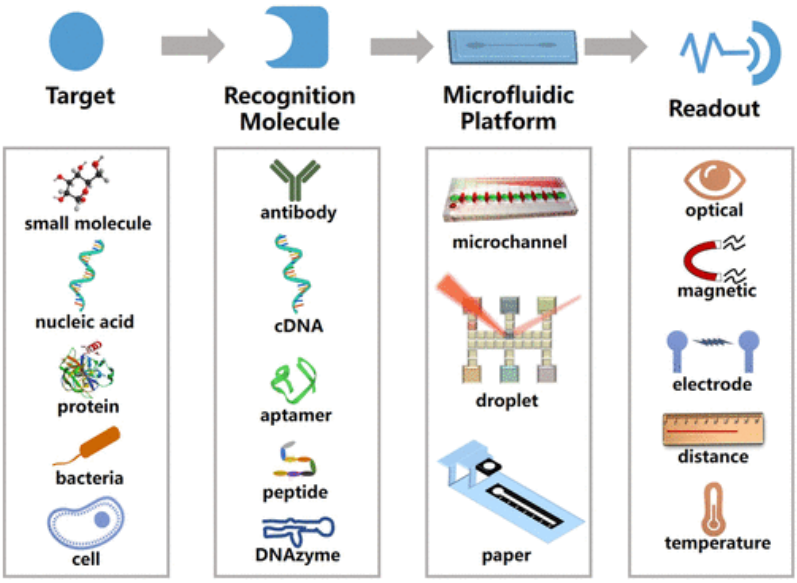
Rys. 2. Schemat prezentujący klasyfikację biosensorów optycznych. Zaczerpnięto z [25].

Na popularność biosensorów optycznych wpływa wieloparametrowość sygnału fluorescencyjnego, możliwe jest rejestrowanie natężenia fluorescencji, anizotropii wydajności kwantowej, czasów życia oraz przesunięcia fazowego fluorescencji w próbce. Do pomiarów wykorzystuje się urządzenia optyczne takie, jak: spektrofluorymetry, spektrofotometry, fotodiody czy luminometry, za pomocą których rejestruje się zmianę absorpcji czy natężenia fluorescencji. Wśród biosensorów popularnością cieszą się czujniki, w których dokonywany jest pomiar natężenia fluorescencji, który może być mierzony bezpośrednio lub pośrednio [5]. Metoda bezpośrednia wykorzystuje fakt, że niektóre próbki wykazują naturalną fluorescencję np.: wieloaromatyczne węglowodory, witamina A i E, koenzymy, karoteny czy białka zawierające tyrozynę. W metodzie pośredniej dokonuje się pomiaru fluorescencji pochodnej związku niefluorescencyjnego lub związków znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Istotna większość substancji, które mają zostać oznaczone nie wykazuje fluorescencji, dlatego konieczne jest przeprowadzenie reakcji uzyskania pochodnej, która wykazuje fluorescencję. Drugą opcją jest przyłączenie do oznaczanej substancji znacznika fluorescencyjnego np. pochodnej ksantenu (fluoresceiny), naftalenu, czy cyjaniny [5]. Znaczniki fluorescencyjne stają się coraz bardziej dostępne, oraz obserwuje się coraz większą standaryzację procedur znakowania.

W konstrukcji biosensorów optycznych można zastosować dodatkowe elementy np.: włókna światłowodowe, nanocząstki metaliczne czy mikrosystemy przepływowe, na powierzchni których osadza się warstwę bioreceptorową. Warstwę receptorową na włóknach światłowodowych można umieścić na dwa sposoby: na końcu czoła włókna światłowodowego albo na powierzchni usuniętego miejscowo płaszcza. Istnieje również możliwość przyłączenia nanocząstek metalicznych na powierzchni włókien światłowodowych [26], czy w mikrosystemach przepływowych [27], bądź

włókien światłowodowych w mikrosystemach przepływowych [28]. Pokazuje to, że istnieją nieograniczone możliwości komponowania sensorów. Badania sensorów optycznych na bazie włókien światłowodowych są bardzo popularne. Sensory na bazie włókien optycznych mają szereg zalet np.: wysoką czułość i możliwość pomiaru w trudno dostępnych miejscach, jednak mają również pewne wady, takie jak: wrażliwość na zakłócenia mechaniczne, czy konieczność kalibracji.

Wykorzystanie w konstrukcji sensorów optycznych platform mikrofluidycznych zyskuje na popularności. Schemat elementów biosensora z wykorzystaniem platform mikrofluidycznych przedstawiono na rys. 2. Platformy mikrofluidyczne można podzielić na mikrokanałowe (przepływ), kropelkowe oraz papierowe. Wykorzystanie platform mikrofluidycznych jest odpowiedzią na potrzebę miniaturyzacji wykorzystywanych biosensorów. Zaletą wykorzystania mikrokanałów jest możliwość pracy w trybie ciągłym, podczas której roztwór analitu może przepływać przez mikrokanał *in-situ*. Z drugiej strony zastosowanie platform kropelkowych umożliwia wykrywanie analitu z małej objętości, np. 1 µl. Platforma biosensorowa może stanowić tani element sensora, który można wymieniać po pomiarze na nowy (platformy papierowe) [29].



Rys. 3. Schemat konstrukcji biosensora opartego o platformy mikrofluidyczne, składającego się z bioreceptora, platformy mikrofluidycznej i typu odczytanego sygnału. Zaczerpnięto z [29].

W pracy wykorzystano technologię platform mikrofluidycznych, z których wybrano mikrokanały wykonane z polimeru. Mikrokanał wykorzystano do orientacji nanodrutów srebra w przepływie.

Przeprowadzone badania nad zaprezentowaniem potencjału nanodrutów srebra jako platform biosensorowych kwalifikują się do kategorii biosensorów optycznych, ponieważ rejestrowane jest natężenie fluorescencji białka z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej.

1.4 Parametry biosensorów

Wyróżnia się kilka parametrów, które są istotne podczas projektowania oraz są ważne z punktu widzenia użytkownika biosensora [14]. Do najważniejszych mierzonych parametrów biosensorów należą:

a) dokładność – zgodność wyników pomiarów z prawdziwymi wartościami stężeń,
b) selektywność – jest to najważniejszy parametr, określa zdolność do pomiaru stężenia analitu w obecności innych składników chemicznych próbki, biosensory wykazują lepszą selektywność niż sensory,
c) specyficzność – zdolność sensora do rozpoznawania i reagowania na określone związki chemiczne lub sygnały, im wyższa specyficzność, tym bardziej sensor jest w stanie rozróżnić docelowe związki od innych związków,
d) czułość – wartość emitowanego sygnału na jednostkę stężenia lub aktywności analitu,
e) zakres dynamiczny – zakres stężenia, w którym czułość jest większa od zera,
f) granica wykrywalności – najmniejsze stężenie analitu jakie można wykryć za pomocą sensora,
g) czas odpowiedzi – czas, po którym wyjściowy sygnał sensora osiąga 63% lub 93% jego wartości po nieskończenie długim czasie ustalania się równowagi, w odpowiedzi na skokową zmianę,
h) czas życia – czas poprawnego działania biosensora.

Współcześnie optymalizacja parametrów pracy biosensorów często odbywa się poprzez wprowadzenie nanomateriałów do elementu sensora nazwanego w poprzednim podrozdziale złączem, które łączy warstwę receptorową z przetwornikiem. Wprowadzenie nanomateriałów do konstrukcji biosensorów pozwala zwiększyć powierzchnię warstwy receptorowej, dzięki dużej powierzchni właściwej nanomateriałów. Bioreceptor może zostać wydajnie osadzony na nanomateriale, dzięki modyfikacji powierzchni nanomateriałów [30]. Nanomateriały o właściwościach przewodzących mogą wpływać na przewodnictwo i sprzyjać kinetyce przeniesienia elektronów do przetwornika. Mogą również zostać one wykorzystane jako przetwornik o kontrolowanej geometrii [31].

Najistotniejszą zaletą zastosowania nanomateriałów metalicznych jest możliwość wzmocnienia sygnału np. fluorescencyjnego, dzięki któremu możliwa jest obserwacja pojedynczych molekuł. Czas wykrycia analitu może zostać skrócony dzięki wykorzystaniu oddziaływań w skali nano. Podsumowując, wbudowanie nanomateriałów w biosensor zwłaszcza przy kontroli geometrii może znacząco poprawić kluczowe dla jego pracy parametry [2, 12–14, 31, 32].

Przedstawione w pracy nanodruty srebra wykorzystano do osadzenia warstwy receptorowej na ich powierzchni. Kontrola przestrzennej orientacji nanodrutów srebra pozwoliła na uproszczenie procedury pomiarowej. W badaniach skorzystano z możliwości wzmocnienia plazmonowego sygnału fluorescencyjnego, co zostanie dokładniej przedstawione w rozdziale *Nanostruktury Metaliczne*.

2. NANOSTRUKTURY METALICZNE

Odkrywanie świata nanomateriałów, który często potrafi zaskoczyć naukowców jest niezwykle interesujące. Już samo spektrum materiałów i kształtów, które chemicy i fizycy potrafią wytworzyć w laboratoriach jest bardzo szerokie. W tym rozdziale opisano rodzaje nanocząstek metalicznych, prezentując zasadność wyboru nanodrutów srebra do badań przeprowadzonych w ramach tej rozprawy. Następnie opisano rezonans plazmonowy w nanocząstkach metalicznych i omówiono metody kontroli geometrii nanocząstek na wybranej powierzchni. Zaprezentowano również metody funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek wykorzystanych w sensoryce. Rozdział kończy się opisem wpływu nanocząstek metalicznych na fluorescencję emiterów.

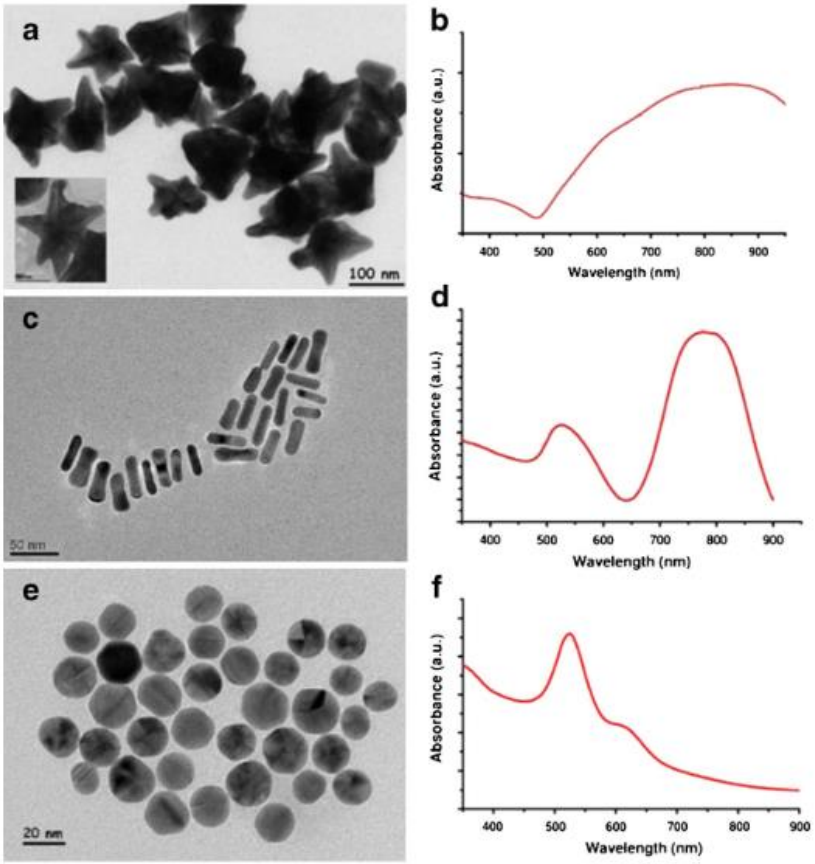
2.1 Rodzaje nanocząstek metalicznych

Według definicji Komisji Europejskiej nanocząstki to materiały, które mają jeden wymiar od 1 nm do 100 nm [33]. Nanocząstki metaliczne można podzielić według wielu klasyfikacji, co wskazuje na bogactwo nanoświata [34]. Pierwszym podziałem jest klasyfikacja ze względu na materiały: srebro, złoto, miedź, krzem, żelazo, nikiel, cynk [35]. Nanocząstki stanowią dodatek do paliw, tuszu, kosmetyków czy są elementem urządzeń, z których na co dzień korzystamy [36–38]. Jednak część metali jest toksyczna, reaktywna, bądź niestabilna, co utrudnia ich szersze zastosowanie [39–42]. Z listy dostępnych metali wyróżnia się złoto oraz srebro, które są stosunkowo stabilne, małotoksyczne oraz wchodzą w interakcje ze światłem widzialnym, wzmacniają/wygaszają fluorescencję fluoroforu znajdującego się w pobliżu nanocząstki [43]. Ich rezonans plazmonowy znajduje się w zakresie widzialnym. Cechy te sprawiają, że srebro i złoto są szeroko badane w kontekście zastosowań medycznych jak: obrazowanie, biodetekcja, diagnostyka, terapia czy podawanie leków [44,45].

Kolejną klasyfikacją są metody otrzymywania nanocząstek metalicznych w zależności od pożądanych własności optycznych materiałów. Metody można przypisać do jednej z dwóch grup: z góry na dół (z ang. *top-down*) oraz z dołu do góry (z ang. *bottom up*) [46–49].

W pierwszym sposobie uzyskiwania nanocząstek metalicznych *top-down*, z materiału w skali makro tworzymy nanomateriał poprzez np. wytrawianie szablonowe [50,51], selektywne usuwanie [52,53], rozpuszczenie [54,55] czy rozkład termiczny [56]. W podejściu *bottom up* z atomów, bądź związków małocząsteczkowych wytwarza się nanostrukturę [57–60]. Kształty, jakie można uzyskać, to między innymi: kostki [61–63], gwiazdy [64–66], sfery [67,68], trójkąty [69–71], pręty [72–75] czy druty [76–78]. Na rys. 4. przedstawiono wybrane nanostruktury złota z odpowiadającym im widmem ekstynkcji. Zmiana kształtu nanostruktury złota przekłada się na zmianę kształtu rezonansu

plazmonowego [79, 80]. Biorąc to pod uwagę, wybór struktury do badań musi zostać dobrze przeanalizowany [81]. Myśląc o wykorzystaniu nanocząstek metalicznych jako elementów biosensorów, należy zwrócić uwagę na to, aby były one stabilne, by metoda otrzymywania była powtarzalna, oraz by możliwe było uzyskiwanie ich na wielką skalę. Nanocząstki złota przedstawione na rys. 4. nie mają zanieczyszczeń, jednak znacząco różnią się od siebie wymiarami w ramach jednej próbki. Warto zwrócić uwagę na to, aby wybrana metoda otrzymywania nanocząstek pozwalała uzyskać jak najbardziej jednorodne nanocząstki. Planując masową produkcję nanocząstek, ważne jest, aby cena wytwarzania nie była wysoka oraz, by do samej syntezy nie wykorzystywano toksycznych związków, a po syntezie pozostawało możliwie jak najmniej odpadów.

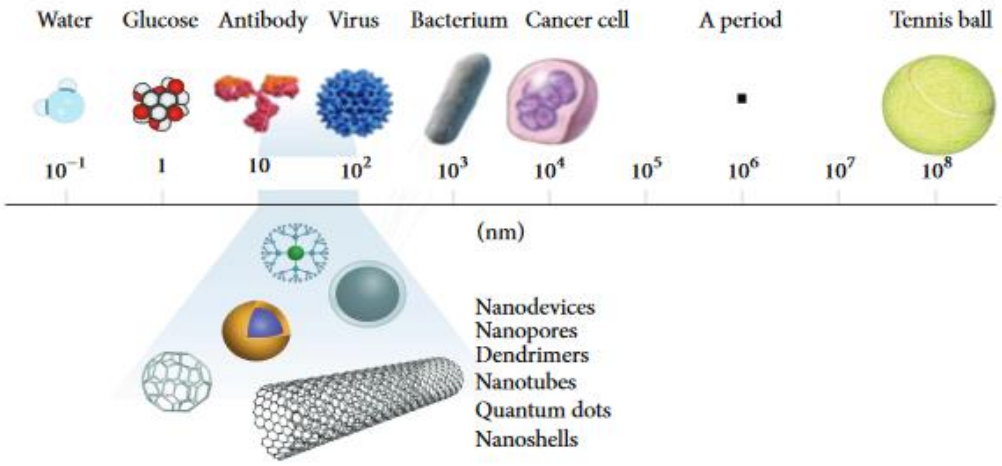


*Rys. 4. Zdjęcie z transmisyjnego mikroskopu elektronowego a) nanogwiazd b) nanopręt*ów *c) nanosfer skorelowane z odpowiadającymi im widmami ekstynkcji (b, d, f). Zaczerpnięto z* [82].

Nanocząstki metaliczne zawdzięczają swoje właściwości rozmiarowi, który powinien być mniejszy niż długość fali elektromagnetycznej, która zainicjuje efekty niewystępujące dla tego samego materiału w skali makro. Wykorzystywaną falą elektromagnetyczną jest światło w zakresie spektralnym 380 - 750 nm. Opis wpływu nanocząstek na fluorofory znajduje się w dalszej części rozprawy.

Wielkość wykorzystywanych w sensoryce nanocząstek ma duże znaczenie. Projektując biosensor, należy zwrócić uwagę na to, jakiej wielkości jest nanocząstka metaliczna, bioreceptor, który będzie na niej umieszczony oraz jakiej wielkości molekułę planuje się wykryć (rys. 5.). Nanocząstki

kuliste o średnicy około 10 nm stosowane są jako nanosensory, jednak gdy ich średnica jest znacząco większa zawiesina staje się niestabilna i zaczynają one opadać. Jeżeli wykorzystamy jako platformy biosensorowe nanocząstki kuliste o średnicy około 10 nm to są one podobnych wymiarów do popularnie stosowanych bioreceptorów np. przeciwciał. Dodatkowo nie jest możliwe zlokalizowanie ich położenia z wykorzystaniem mikroskopii optycznej. Dlatego zastosowanie nanodrutów srebra, które mają jeden wymiar w skali makro, pozwoli na modyfikację ich powierzchni większą ilością bioreceptorów, a co za tym idzie zwiększone zostanie prawdopodobieństwo detekcji analitu. W przypadku wykorzystania nanocząstek jako platform biosensorowych większe nanostruktury o wydłużonych kształtach są lepsze, między innymi za względu na większą powierzchnię i możliwość zlokalizowania ich położenia prostym mikroskopem optycznym.

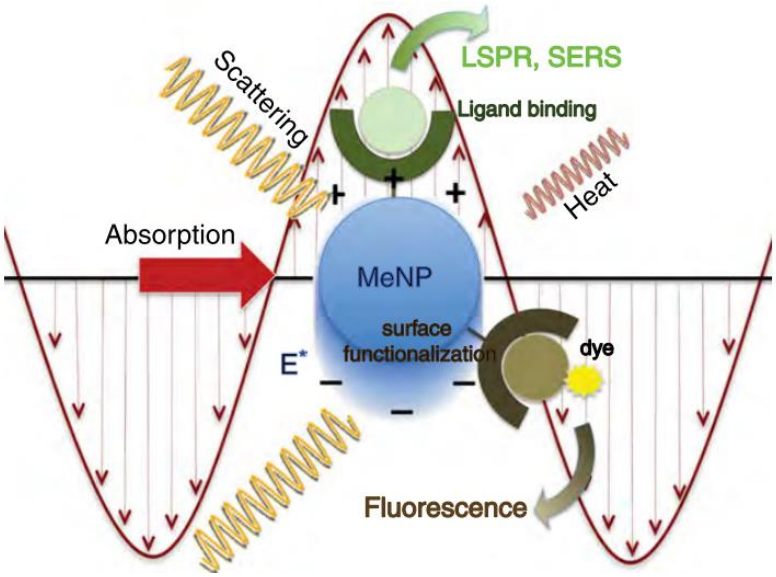


Rys. 5. Porównanie rozmiaru nanomateriałów z innymi materiałami. Zaczerpnięto z [83].

2.2 Zlokalizowany rezonans plazmonowy

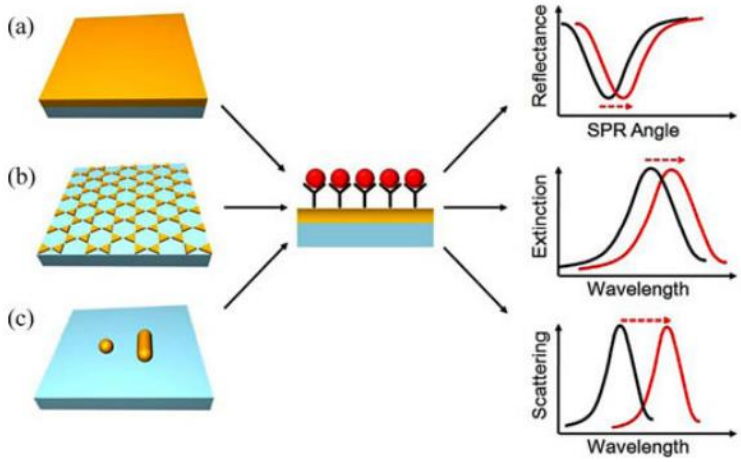
Materiał w skali nano w porównaniu do tego samego materiału w skali makro wchodzi w interakcje ze światłem, ze względu na wielkość porównywalną z długością fali elektromagnetycznej. Fala elektromagnetyczna padająca na nanocząstkę metaliczną sprzęga się z gazem swobodnych elektronów na jej powierzchni, wprawiając go w oscylacje (rys. 6.). Podczas przemieszczenia się chmury elektronowej powstaje siła kulombowska przywracająca stan wcześniejszy [84]. Zjawisko to nazwano zlokalizowanym rezonansem plazmonów powierzchniowych (LSPR, z ang. *localised surface plasmon resonance*) i opisuje je teoria Mie [85]. LSPR zmienia się w zależności od kształtu oraz materiału, z którego wykonane są nanocząstki metaliczne i właśnie z tego powodu syntezowane jest całe spektrum różnorodnych nanocząstek. Na częstotliwość oscylacji wpływa również gęstość elektronów, masa efektywna elektronów oraz stała dielektryczna otoczenia nanocząstki metalicznej, co jest wykorzystywane w sensorach opartych o powierzchniowy rezonans plazmonowy [86]. W przypadku nanocząstek metalicznych stosunek powierzchni do objętości jest większy im mniejsza

jest nanocząstka co powoduje, że zjawisko rezonansu plazmonowego ma charakter lokalny i staje się dodatkowym źródłem lokalnego pola elektromagnetycznego.



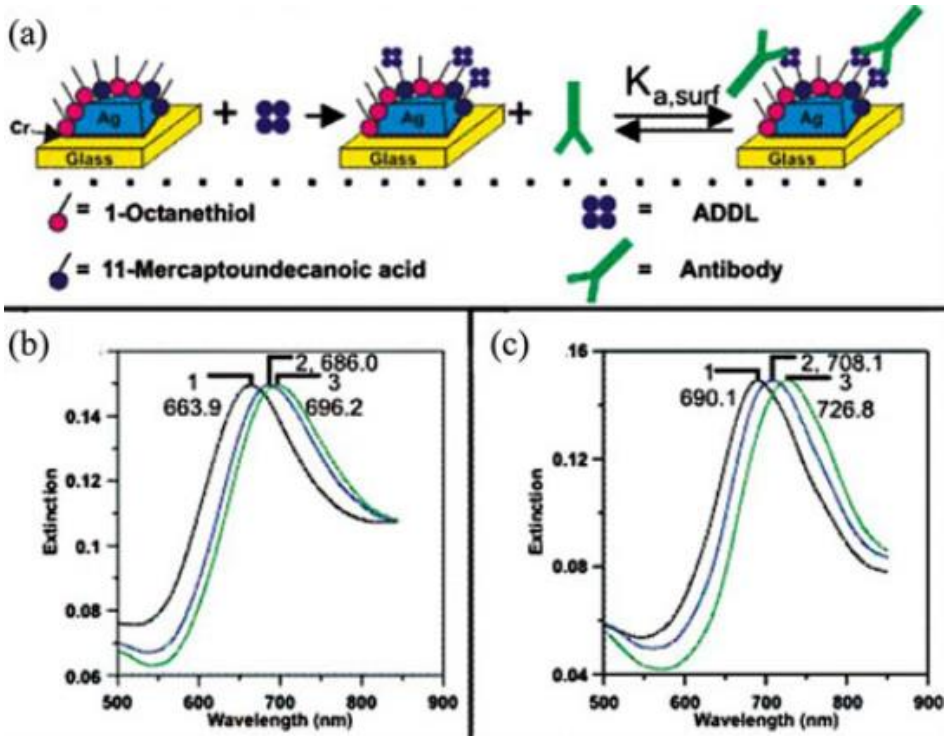
Rys. 6. Schemat przemieszczenia się gazu swobodnych elektronów w nanocząstce metalicznej wraz z możliwymi reakcjami spektroskopowymi dla selektywnej detekcji biomolekuł. Oddziaływanie fali elektromagnetycznej z nanocząstką metaliczną powoduje absorpcję i rozpraszanie padającego promieniowania. Zaczerpnięto z [84].

Powierzchniowy rezonans plazmonowy może znacząco poprawić czułość sensorów, co powoduje rozwój technik pozwalających na obrazowanie w czasie rzeczywistym. Na rys. 6. wyróżniono trzy typy nanosensorów: ciągły film metaliczny, nanocząstki o zorientowanej geometrii oraz pojedyncze nanocząstki. Detekcja analitu może objawiać się w tych nanosensorach poprzez zmianę kąta SPR (SPR, z ang. *surface plasmon resonance*), przesunięcie widma ekstynkcji lub rozpraszania (rys. 7.). Do technik wykorzystywanych w biodetekcji można zaliczyć powierzchniowo wzmocnioną spektroskopię ramanowską (SERS, z ang. *surface enhanced raman spectroscopy*) lub wspomaganą powierzchniowo spektroskopię fluorescencyjną (PEF, z ang. *surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy*).



Rys. 7. Schemat typów nanosensorów, w których możliwe jest wzbudzenie plazmonowe z wybranymi optycznymi sygnałami a) planarne metaliczne nanosensory cienkowarstwowe, b) nanosensory oparte o LSPR, c) nanosensory oparte o pojedyncze nanocząstki. Zaczerpnięto z [87].

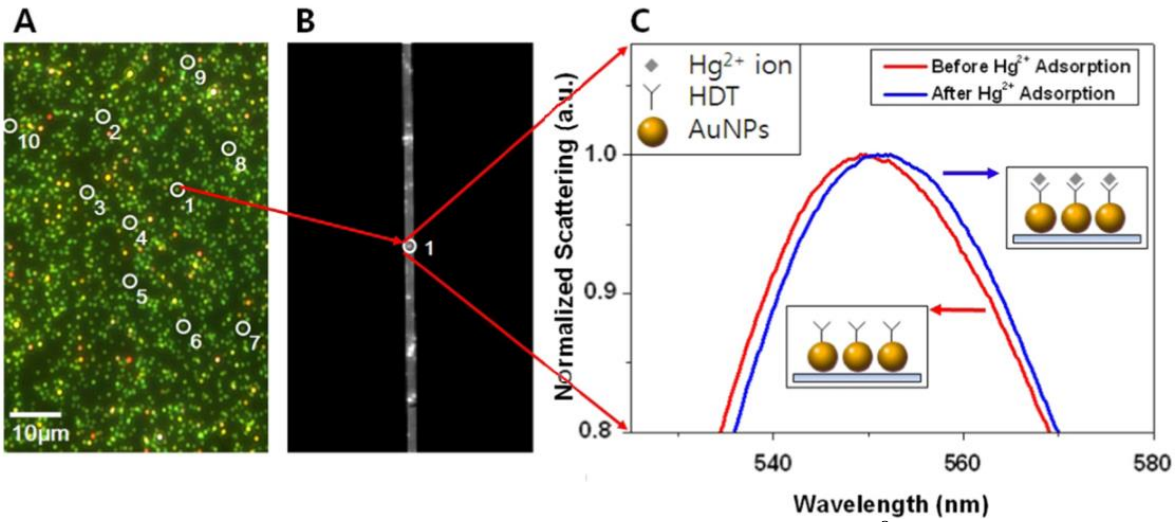
Na rys. 8. przedstawiono przykład nanosensora LSPR opartego na nanotrójkątach srebra, który ma na celu pomoc w zrozumieniu interakcji między dyfundującymi ligandami pochodzącymi z amyloidu (ADDL, z ang. *amyloid derived diffusible ligands*) a przeciwciałem przeciwko ADDL. W nanosensorach LSPR wykonuje się pomiar ekstynkcji, który wskazuje na zmianę współczynnika załamania światła w pobliżu nanostruktury.



Rys. 8. a) Schemat sensora typu LSPR do detekcji ADDL b) i c) Widma LSPR wykonane dla stężenia przeciwciał kolejno 50 nM, 400 nM odpowiednio: 1 po modyfikacji; 2 immobilizacja ADDL; 3 przeciwciało anty-ADDL. Zaczerpnięto z [88].

Ograniczeniem w pomiarach widm ekstynkcji jest możliwość przesunięcia się maksimum ekstynkcji z powodu zmiany stałej dielektrycznej otoczenia, która może być spowodowana innymi czynnikami niż przyłączeniem się przeciwciała do powierzchni nanosensora, np. poprzez zmianę siły jonowej powodując agregację w zawiesinie. Kolejnym ograniczeniem jest limit detekcji, autorzy w publikacji [88] wykazali, że poniżej pewnego stężenia obserwowano niespecyficzne wiązanie przeciwciała z nanosensorem. Te dwa ograniczenia sprawiają, że nanosensory LSPR mogą zafałszować położenie rezonansu plazmonowego oraz posiadać niewystarczającą dokładność.

Rozwiązaniem powyższych ograniczeń były pomiary za pomocą nanosensorów LSPR na pojedynczych nanocząstkach (S-LSPR). Przedstawione na rys. 9. nanocząstki nie są jednorodne, obserwuje się znaczne różnice w natężeniu rozpraszanego światła, co może być spowodowane różnicą w ich średnicy. W przypadku tego eksperymentu ważne jest, aby obserwować tę samą nanocząstkę. Nanosensory S-LSPR charakteryzują się wysoką czułością w porównaniu do innych konwencjonalnych metod. Ich ograniczeniem jest konieczność obserwacji pojedynczej nanocząstki oraz występujące wiązania niespecyficzne.

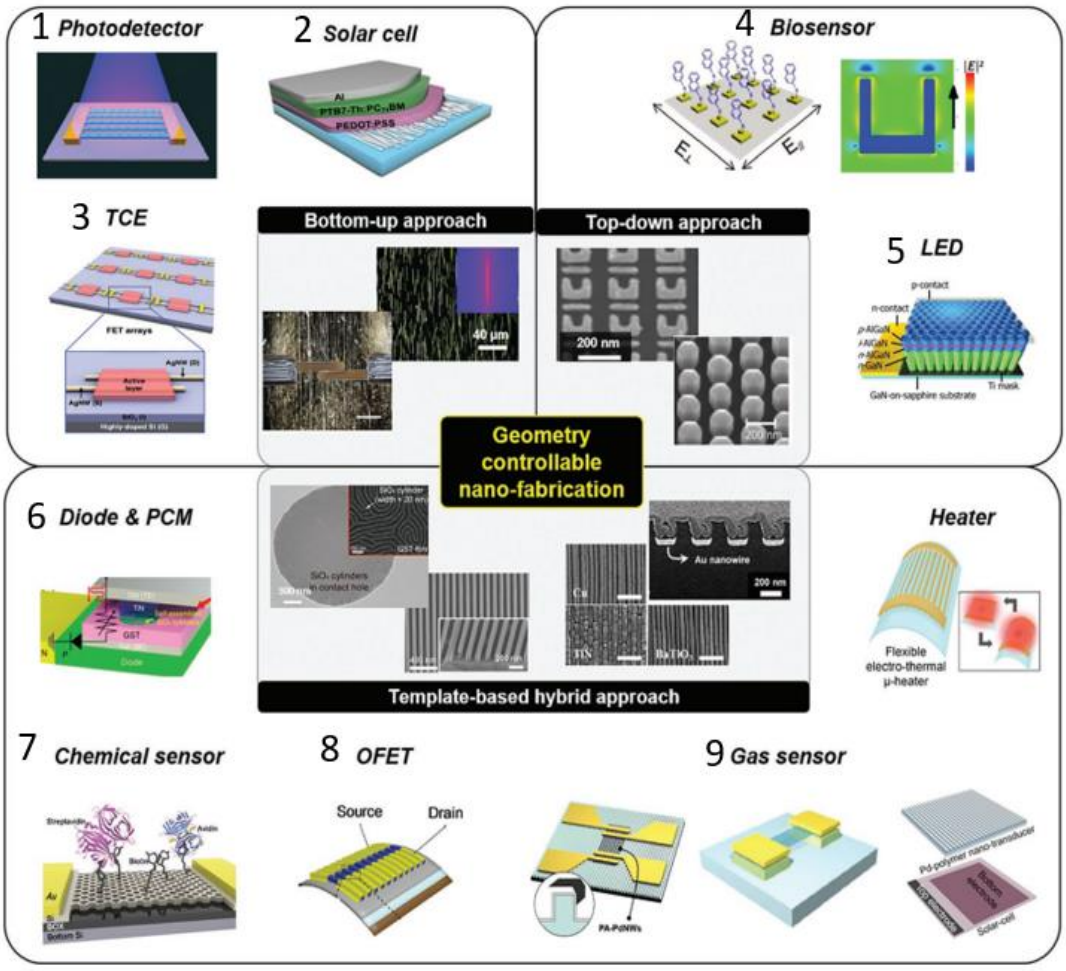


Rys. 9. Nanosensor na pojedynczych cząstkach służący do wykrywania Hg^{2+} a) Mapa wykonana za pomocą mikroskopu szerokiego pola b) Mapa rozpraszania zarejestrowana detektorem CCD z regulowaną szczeliną c) Widmo rozpraszania prezentujące przesunięcie LSPR. Zaczerpnięto z [89].

Z wyżej opisanych powodów dobrą alternatywą dla nanosensorów wydają się być platformy biosensorowe oparte o nanostruktury wydłużone, na których detekcja odbywa się z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. W ten sposób wykorzystywane są właściwości nanocząstek metalicznych, ale one same nie są sensorem. W ramach tej rozprawy nanodruty srebra są platformą sensorową wykorzystującą pomiar natężenia fluorescencji analitu. Sygnał ten może zostać dodatkowo wzmocniony dzięki oddziaływaniom plazmonowym z AgNWs.

2.3 Kontrola geometrii nanocząstek metalicznych na podłożu

Gwałtowny rozwój zastosowania nanocząstek metalicznych w przemyśle wymusił konieczność kontroli ich geometrii. Podział metod kontroli geometrii nanocząstek na podłożu przedstawiono na rys. 10., na którym wyróżniono trzy metody (środkowe grafiki). Dwie metody nawiązują do metod otrzymywania nanostruktur są to: *top-down* i *bottom up*. Trzecia metoda zakłada wykorzystanie szablonu/maski, aby kontrolować geometrię nanocząstek. Nanocząstki o zorientowanym kształcie stosowane są w urządzeniach o zwiększonej wydajności (z ang. *enhanced-performance devices*), które mogą być wykorzystywane w wielu dziedzinach. Na rys. 10. do każdej metody otrzymywania nanocząstek metalicznych o kontrolowanej geometrii zaprezentowano możliwe ich zastosowania, które w dalszej części rozprawy zostaną opisane zgodnie z numeracją oznaczoną na rysunku.

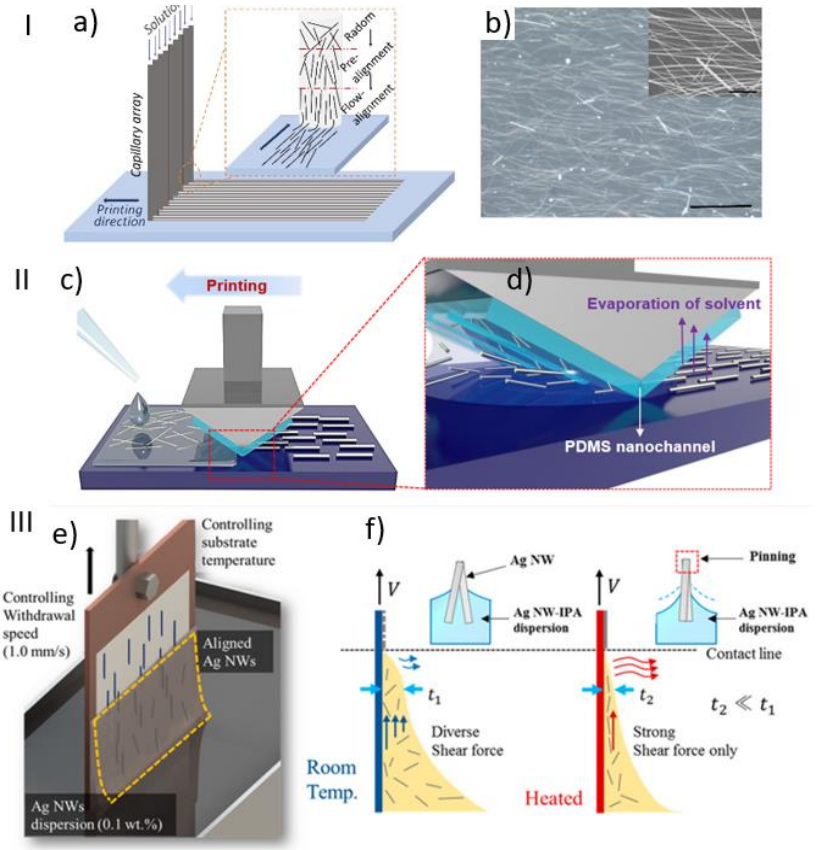


Rys. 10. Schemat podziału wytwarzania nanostruktur o kontrolowanej geometrii: lewy górny róg (podejście bottom up), prawy górny róg (podejście top-down), dolny wiersz (podejście wykorzystujące szablony/maski). Do każdego z wymienionych sposobów zaprezentowano przykłady wykorzystania wytworzonych nanostruktur. Zaczerpnięto z [31].

Podejście *bottom up* polega na kierunkowym osadzaniu wcześniej przygotowanych zawiesin nanomateriałów na granicy ośrodków roztwór/podłoże (1, rys. 10.). Pierwszą metodą jest proces elektroosadzania, dzięki któremu uzyskano zorientowane nanowłókna tlenku cynku (ZnO) [90]. Autorzy pracy opisali proces powstawania nanowłókien jako osadzenie nanostruktur z wykorzystaniem drukarki, podczas którego mieli kontrolę nad położeniem wzdłuż osi x i y. Powstałe nanowłókna ZnO wykorzystano jako fotodetektor ze względu na wysoki współczynnik fotoprzewodzenia, czułość i wykrywalność nanowłókien. Proces ich produkcji jest skalowalny, tani oraz może zostać wykonany na różnych podłożach.

Inną metodą orientacji nanostruktur jest druk kapilarny wykorzystany do orientacji nanodrutów (2, rys. 10.). Pojawia się coraz więcej metod wykorzystujących siły kapilarne do kierunkowania AgNWs. Zorientowane AgNWs wykorzystuje się w ogniwach słonecznych, elektrodach [91], ścieżkach przewodzących, czy w giętkich źródłach światła [92–94]. Część projektu doktorskiego dotyczyła orientacji AgNWs, dlatego wymieniono więcej metod orientacji nanostruktur wykorzystujących siły

kapilarne (rys. 11.). W pierwszej metodzie orientacji AgNWs zostają umieszczone w 25 kapilarach ustawionych prostopadle do podłoża (I, rys. 11.) [91]. Następnie podłoże przesuwa się ze stałą prędkością, a zawiesina ze zorientowanymi AgNWs jest osadzana na podłożu. Woda, w której osadzono AgNWs odparowuje, pozostawiając je na powierzchni wybranego podłoża. Według autorów artykułu AgNWs orientują się w kapilarze przez siły van der Waalsa, siłę hydrodynamiczną oraz oddziaływanie ściany kapilary i łańcucha poli(alkoholu winylowego) (PVP) pokrywającego AgNWs. W drugim przypadku AgNWs zorientowano poprzez przepuszczenie zawiesiny AgNWs umieszczonej na szkiełku przez matrycę ze wzorem z polidimetylosiloksanu (PDMS) w formie rowków, które wymuszały orientację AgNWs (II, rys. 11.) [92]. W trzeciej prezentowanej pracy do orientacji AgNWs wykorzystano technikę wyciągania zanurzeniowego (z ang. *dip coating*), w której wybrane podłoże zanurzono w 0,1 % zawiesinie AgNWs i wyciągano ze stałą prędkością (III, rys. 11.) [95]. AgNWs pod wpływem wyciągania osadzają się na wybranej powierzchni. Autorzy pracy zaobserwowali, że dzieje się to z większą wydajnością, gdy zawiesina jest podgrzana, dzięki czemu rozpuszczalnik szybciej odparowuje z wybranego podłoża. W przypadku wykorzystania tego podejścia do biosensorów wadą może okazać się wysychanie roztworu, czy nawet w przypadku trzecim, podgrzewanie go, co może wpłynąć na stabilność grup funkcyjnych osadzonych na AgNWs.



Rys. 11. a) Schemat techniki orientacji AgNWs poprzez siły kapilarne w układzie mikrofluidycznym b) Zdjęcie wykonane za pomocą mikroskopu optycznego zorientowanych AgNWs. Zaczerpnięto z [91]. *c) Schemat procesu drukowania kapilarnego przy użyciu stempla PDMS z nanorowkami z d) zbliżeniem na proces orientacji AgNWs. Zaczerpnięto z* [92] *Schemat procesu orientacji AgNWs e) Zasada orientacji AgNWs w procesie powlekania zanurzeniowego z f) kontrolą temperaturową. Zaczerpnięto z* [95].

Ostatnią wymienioną metodą z sekcji *bottom up,* jest druk zorientowanych metalicznych nanodrutów (PCAMP, z ang. *polymer-assisted continuous and aligned metal-NW printing*), dzięki któremu z dużą precyzją można wydrukować sieć AgNWs o średnicy 695 nm (3, rys. 10.) [96–98]. Wydrukowane AgNWs są pokryte polimerem PVP, dzięki któremu są stabilne i przewodzą prąd elektryczny. Autorzy sieć AgNWs nazywają typem 3, w którym mają kontrolę nad położeniem AgNWs oraz ich długością. Typ 1 są to losowo zorientowane, krótkie nanodruty na podłożu. Głównym celem jest zastosowanie tak przygotowanej siatki AgNWs w urządzeniach optoelektronicznych, więc autorzy pracy nie testowali, czy wykonane przez nich struktury wykazują rezonans plazmonowy. Ze względu na druk należy przypuszczać, że nie mamy do czynienia z monokrystalicznymi AgNWs tylko z nanocząstkami srebra w PVP uformowanymi w podłużne kształty. W Polsce podobną technologią zajmuje się firma XTPL, która sprzedaje drukarki do ultraprecyzyjnego druku [99]. Niewątpliwie takie struktury posiadają szereg zalet, wadą wydaje się być wykorzystany tusz do druku, który jest tajemnicą firmy, co utrudnia wykonanie modyfikacji powierzchni. Podsumowując metodę *bottom up*, można wyciągnąć wniosek, że gdy z precyzją kontrolowano położenie materiału, utracono część jego właściwości (krystaliczność), natomiast gdy zorientowano AgNWs, to nie posiadano aż takiej precyzji w kontroli ich położenia.

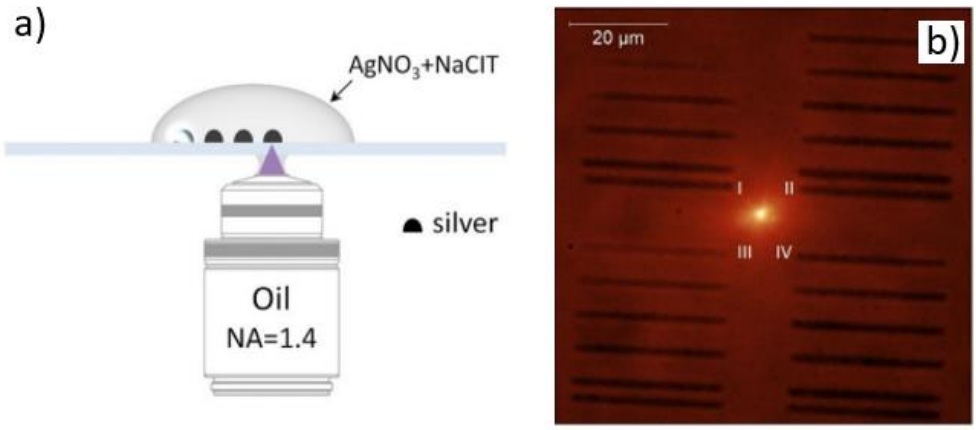
Drugim typem metod kontroli geometrii wytwarzania nanostruktur są metody *top-down* (prawy róg, rys. 10.). Metody *top-down* są znacznie wydajniejsze w kontrolowaniu otrzymanych parametrów geometrycznych jak długość, rozmiar i odstęp pomiędzy wytworzonymi nanostrukturami. Zaletami tych metod są: wysoka wydajność, zastosowanie do dużych powierzchni, rozdzielczość kilku nanometrów, uniwersalność oraz powtarzalność [100]. Do technik wykorzystywanych w tej metodzie należą między innymi litografia wiązką elektronową. Kształt pożądanych nanostruktur jest wytwarzany przy użyciu maski, na którą nanosi się fotorezyst. Kontrola kształtu odbywa się za pomocą wiązki elektronów lub jonów, które padają na próbkę, usuwając materiał lub poprzez późniejsze trawienie nieutwardzonego materiału.

Pierwszym przykładem wykorzystania techniki *top-down* jest biosensor, w którym zastosowano 30 nm struktury srebrne lub złote przy użyciu litografii wiązką elektronów (z ang. *electron beam lithography*) (4, rys. 10.) [101]. Na wybrane podłoże naniesiono warstwę tlenku cyny indu (ITO, z ang. *indium tin oxide*), aby zmniejszyć efekt absorpcji ładunku. Specjalny polimer poli(metakrylan metylu) (PMMA, z ang. *poly(methyl methacrylate*) nawirowano na ITO, a następnie wypalono podłoże w temperaturze 180 °C. Za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, z ang. *scanning electron microscope*) wyposażonego w specjalny system zdefiniowano wzór. Później za pomocą termicznego odparowania naniesiono warstwę wybranego metalu (Ag lub Au) z 2 nm warstwą chromu jako powłoką adhezyjną. Ilość kroków oraz materiałów wskazuje, że metoda jest skomplikowana i kosztowna. W tak przygotowanych nanostrukturach zaobserwowano zlokalizowany rezonans

plazmonowy (LPR, z ang. *localized plasmon resonance*), dzięki któremu podłoża sprawdzają się jako sensory chemiczne i biologiczne. Sam proces przygotowania nanostruktur jest powtarzalny i może się odbywać na dużej powierzchni. Na rys. 10. zamieszczono zdjęcie wykonane za pomocą SEM z wytworzonymi nanostrukturami.

Drugim przykładem techniki *top-down* jest wykorzystanie wzrostu epitaksjalnego z selektywnie ograniczonym obszarem (5, rys. 10.) [102]. Materiałami zastosowanymi w tej technice są: azotek galu (GaN), azotek glinu (AlN), czy azotek glinowo-galowy (AlGaN). Proces, w skrócie przebiega następująco: na szafirowym podłożu ze wzorem n-typu GaN osadzono cienką 10 nm maskę tytanu (Ti). Przed włożeniem podłoża do komory wzrostu epitaksji z wiązki molekularnej (MBE, z ang. *molecular beam epitaxy*) w masce Ti przy pomocy litografii elektronowej i reaktywnego trawienia jonowego utworzono macierz nanootworów. W komorze reakcyjnej w temperaturze 400 °C podłoże Ti zaazotowano, aby zapobiec pęknięciom i degradacji w podwyższonej temperaturze. Następnie ustawiając odpowiednie parametry zapoczątkowano wzrost heterostruktur nanodrutów GaN/AlGaN. Struktury widoczne na rys. 10. są jednorodne, prawie wolne od defektów. Wykonane diody emitujące światło (LED, z ang. *light-emitting diode*), charakteryzują się wysoką wydajnością luminescencji, znakomitym transportem nośników ładunku oraz doskonałymi parametrami elektrycznymi i optycznymi. Właściwości tak wyprodukowanych materiałów są bardzo dobre, jednak jeśli miałyby być zastosowane do szybkiego i taniego sensora, produkcja musiałaby być znacząco tańsza.

Przykładem metody *top-down* spoza podziału zaprezentowanego na rys. 10. jest technika laserowego drukowania ścieżek srebrnych wysp za pomocą redukcji srebra na podłożu szklanym pod wpływem światła [103]. Do wytworzenia laserowo indukowanych srebrnych wysp niezbędny jest układ umożliwiający kontrolę natężenia lasera oraz przesuwanie wiązki lasera po podłożu szklanym, aby uzyskać pożądane wzory (rys 12. (a)). Na rys. 12. przedstawiono mapę transmisji światła białego z widocznymi ścieżkami srebrnych wysp, różnią się one morfologią. Szerokość ścieżek determinowana jest przez średnicę plamki lasera (~200 nm), natomiast na gęstość i wielkość wpływają: stężenie użytych odczynników, czas i moc naświetlania roztworu azotanu srebra. Z drugiej strony po odpowiedniej funkcjonalizacji ścieżek srebrnych wysp, mogą one posłużyć za element platformy biosensorowej.



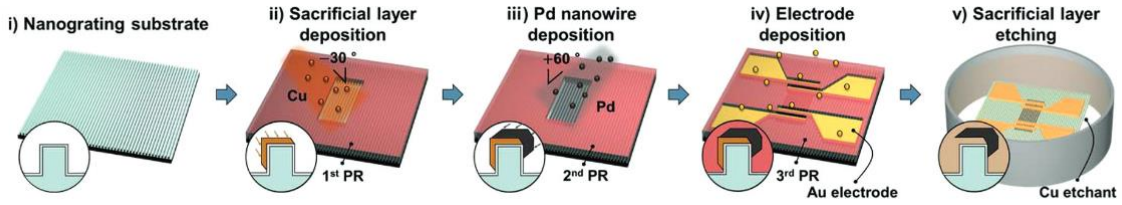
Rys. 12. a) Schemat koncepcji drukowania ścieżek srebrnych wysp za pomocą fotochemicznej redukcji srebra wywołanej laserem b) Mapa transmisji światła białego wykonana za pomocą mikroskopu szerokiego pola wydrukowanych ścieżek srebrnych wysp. Zaczerpnięto z [103].

Ostatnim sposobem wytwarzania zorientowanych precyzyjne nanostruktur jest wykorzystanie szablonów/masek. Ograniczeniem w tej metodzie jest rozdzielczość z jaką można wykonać maski oraz materiały, które nie zawsze można wykorzystać w danej metodzie. Kształt uzyskanych nanostruktur zależy zwykle od wyobraźni wykonujących je naukowców.

Pierwszym przykładem wytwarzania zorientowanych precyzyjne nanostruktur z użyciem maski jest technika litografii kopolimerów blokowych, którą wykorzystano do budowy elastycznej pamięci opartej o zmianę fazy (PCM, z ang. *phase-change memory*) z diodą (6, rys. 10.) [104] oraz sensora chemicznego (7, rys. 10.) [105]. Autorzy pracy wykorzystali samoorganizujące się SiO_x pomiędzy materiałem zmiennofazowym a warstwą grzejną, aby poprawić właściwości matrycy. Uzyskano nanostruktury mające wzór odcisku palca o średnicy 20 nm. W przypadku sensora chemicznego sześciokątne cylindry wykonano z czystego krzemu (Si). Sposób przygotowania podłoży jest następujący: na wybrane podłoże napylono cienką warstwę Si o grubości około 25 nm, na które następnie naniesiono kopolimer poli (styren-random-metakrylan metylu) (P(S-r-MMA)) [106]. Polimer ten składa się z dwóch polimerów polistyrenu (PS) oraz PMMA, które spontanicznie sieciują, z powodu identycznego napięcia międzyfazowego, w postaci pionowo sześciokątnych cylindrów. Następnie wytrawiono PMMA, a pozostawiono wzór z PS. W kolejnym kroku wytrawiono Si plazmowym trawieniem reaktywnymi jonami (RIE, z ang. *reactive ion etching*). Na końcu usunięto PS przy pomocy mokrego wytrawiania oraz maskę. Tak przygotowane podłoża zmodyfikowano (3-aminopropylo)trietoksysilanem (APTES) oraz biotyną-NHS. Przygotowaną platformę wykorzystano do detekcji straptawidyny i awidyny. Autorzy artykułu opisali powstałą nanostrukturę jako czuły elektryczny biosensor, a samo przygotowanie podłoży jako tanie, precyzyjne i proste. Wykorzystanie litografii kopolimerów blokowych umożliwia wytworzenie struktur o interesujących kształtach, jednak sam proces przygotowania pojedynczego podłoża przebiega wieloetapowo, co wynika z badanego w pracy typu sensora.

Dzięki kolejnej technice za pomocą nanoodcisku (z ang. *nanoimprint*) wytworzono zorientowane nanodruty o szerokości 50 nm (8, rys. 10.) [107]. Zorientowane nanodruty 6,13-bis-(triizopropylosililoetynylo) pentacenu (TIPS-PEN) wykorzystano do budowy organicznych tranzystorów polowych (OFETs, z ang. *organic field-effect transistors*). Za pomocą litografii elektronowej wytworzono formę Si o wybranym wzorze. Następnie nakroplono na formę roztwór TIPS-PEN i przykryto podłożem (Si/SiO_2), na którym mają być wytłoczone wzory. Całość ściśnięto. Pod wpływem parowania rozpuszczalnika forma dokładniej styka się z podłożem. Parowanie rozpuszczalnika również wywołuje zarodkowanie i wzrost nanodrutów. Po 30 min. formę usunięto, a na podłożu pozostały nanodruty. Przygotowane podłoża są jednorodne. Ograniczeniem może być dodanie za małej objętości prekursora, który nie wypełni formy. Na tak przygotowane podłoża autorzy artykułu napylili złoto.

W następnej technice przygotowane nanostruktury wykorzystano jako sensor gazu (10, rys. 10.) [108]. Za pomocą techniki polegającej na osadzaniu materiału po wytrawianiu otrzymano częściowo przytwierdzone palladowe nanodruty (PA-PdNW, z ang. *partially anchored Pd nanowire*) o szerokości 150 nm.

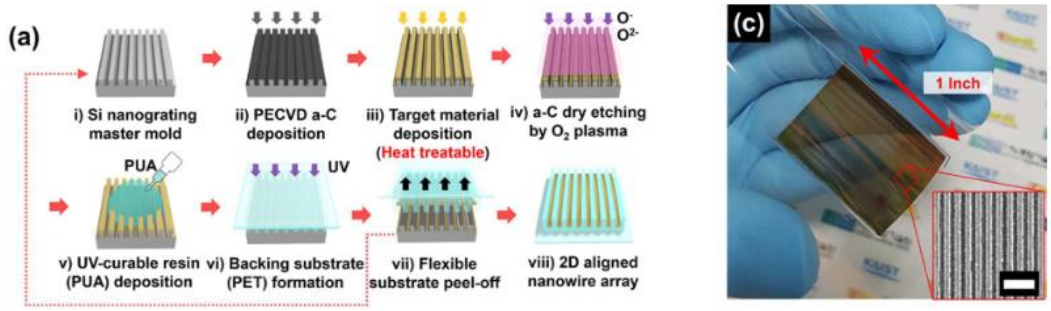


Rys. 13. Schemat przygotowania podłoża z palladowymi nanodrutami częściowo przyłączonymi do podłoża. Zaczerpnięto z [108].

W pierwszym etapie na nanosiatce krzemu o pożądanych wymiarach osadzono tlenek glinu jako izolator elektryczny (rys. 16.). Na podłoże pod kątem 30° napylono miedź. Następnie z drugiej strony pod kątem 60° napylono warstwę palladu. W związku z tym, że jest to czujnik elektryczny naniesiono również złote elektrody. Tak przygotowane podłoże zanurzono w odpowiednim wytrawiaczu, który usunął z podłoża miedź. Na powierzchni pozostały nanodruty częściowo przytwierdzone do podłoża, a częściowo w miejscu, gdzie była miedź, unosiły się nad podłożem. Otrzymane ścieżki są jednorodne i ciągłe na długim obszarze. Samą metodę przygotowania ścieżek uznano jako drogą, prawdopodobnie ze względu na wykorzystane materiały. Wydaje się, że technika ta nadawałaby się do wytworzenia nanodrutów z innych pierwiastków. Ze względu na podłoże krzemowe oraz zakrycie części sensora prawdopodobnie wdrożenie tak przygotowanych ścieżek jako warstwę w sensorach optycznych będzie trudne.

Ostatnim sposobem przygotowania nanostruktur z użyciem maski jest niezależny od materiału oparty na blokowaniu mechanicznym transfer nanodrutów (MINT, z ang. *material-independent mechanical-interlocking-based nanowire-transfer*) (rys. 10.) [109]. Dzięki tej metodzie uzyskano

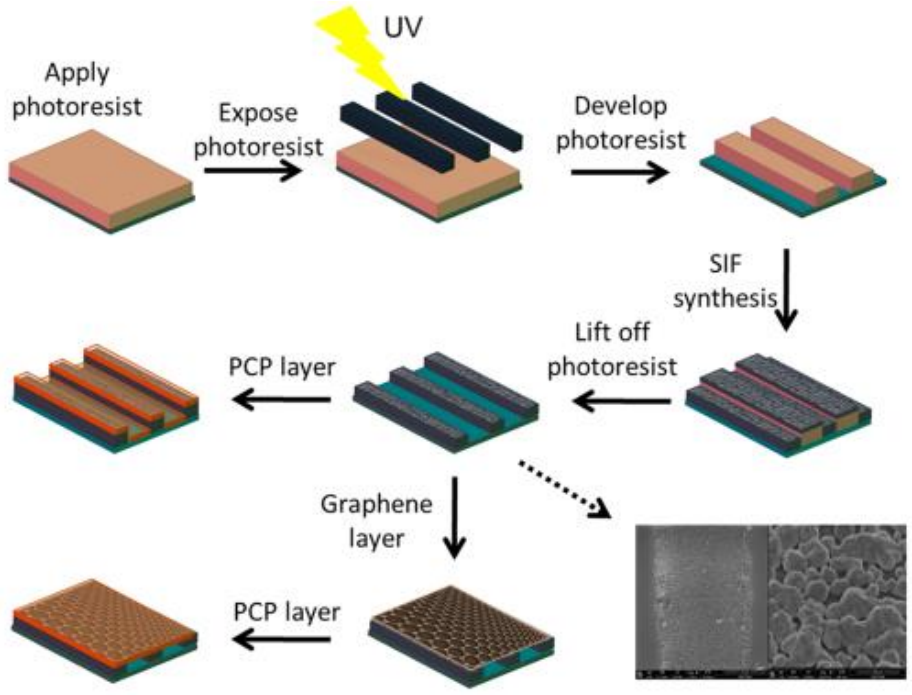
ultradługie nanodruty na dużej powierzchni oraz giętkim podłożu wykonanym z politereftalanu etylenu (PET, z ang. *polyethylene terephthalate*). Podłoża wykorzystano w elastycznej grzałce oraz w sensorze gazu. Średnica uzyskanych nanodrutów to 150 nm, a sama metoda nadaje się do materiałów, takich jak złoto, platyna, miedź oraz tlenek miedzi (I).



Rys. 14. a) Schemat produkcji zorientowanych nanodrutów za pomocą metody MINT c) Zdjęcie gotowego podłoża ze orientowanymi nanodrutami z zdjęciem SEM (skala 1 µm). Zaczerpnięto z [109].

Na rys. 14. zaprezentowano schemat wytwarzania nanodrutów metodą MINT. Na początku wykonano litografią formę z krzemu z wybranym wzorem, na którą napylono metodą chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD, z ang. *chemical vapor deposition*) warstwę węgla amorficznego. Następnie napylono materiał, z którego mają powstać nanodruty, aby później wytrawić węgiel amorficzny za pomocą plazmy tlenowej. Na formie z nanodrutami umieszczono polimer poli-uretanowo-akrylanowy (PUA, z ang. *poly-urethane acrylate*), aby wytworzyć giętkie podłoże, a następnie próbkę utwardzono promieniowaniem UV. Później naniesiono na próbkę poli(tereftalan etylenu) (PET), czyli folię podkładową dla nanodrutów, całość ponownie utwardzono promieniowaniem UV. Na końcu oddzielono podłoże ze zorientowanymi nanodrutami od formy Si. Autorzy nie badali otrzymanych próbek pod kątem aktywności plazmonów. W strukturze istotne były dla nich właściwości przewodnictwa cieplnego. Całą procedurę określono jako tanią, jednak rozpoczęcie produkcji struktur wymaga posiadania kilku kosztownych urządzeń. Uwagę zwraca również nazewnictwo powstałej nanostruktury, czyli druty (z ang. *wires*). Tłumacząc to na język polski, otrzymano słowo drut, bądź przewód, co wydaje się być czymś monokrystalicznym w makroskali. Natomiast przyglądając się zdjęciom SEM zamieszczonym w materiałach dodatkowych artykułu, nie ma pewności, że jest to struktura monokrystaliczna. Wydaje się, że równie dobrą nazwą byłoby określenie ścieżki (z ang. *paths*), oznaczające długie struktury.

Powyższe rozważania dotyczące nazwy *wires* związane są z pracą autorki rozprawy doktorskiej nad metodą uzyskania geometrycznie kontrolowanych nanostruktur z wykorzystaniem fotolitografii oraz nanostruktur zsyntezowanych za pomocą mokrej chemii [110]. Wykonane nanostruktury miały 1 mm długości oraz 20 µm szerokości i zostały nazwane ścieżkami srebrnych wysp (SIP, z ang. *silver island paths*). Same wyspy mają około 100 nm średnicy, dzięki czemu w nanostrukturze zachodzi powierzchniowy rezonans plazmonowy.



Rys. 15. Schemat wytwarzania ścieżek srebrnych wysp z wykorzystaniem wzoru. Zaczerpnięto z [110].

Proces przygotowania próbek przedstawiony na rys. 15. Schemat jest następujący: na czyste szkiełko naniesiono fotorezyst, na którym umieszczono maskę PET z odpowiednim wzorem i utwardzono go przez naświetlanie. Następnie usunięto utwardzony fotorezyst. W kolejnym kroku, szkiełka umieszczono w mieszaninie reakcyjnej umożliwiającej wzrost srebrnych wysp. Tuż po zakończeniu reakcji ze szkiełek usunięto fotorezyst za pomocą acetonu. Na powierzchni szkiełka nakrywkowego pozostały ścieżki srebrnych wysp o wyraźnej granicy pomiędzy szkłem, a srebrnymi wyspami. Powyższa procedura jest stosunkowo prosta, wymaga jedynie specjalistycznego sprzętu do wykonania wzoru na podłożu. Dodatkowo zamiast syntezy srebrnych wysp można nanieść nanostruktury innymi metodami, które nie uszkodzą fotorezystu. Ograniczeniem wykorzystania srebrnych wysp jako podłoża biosensorowego są trudności z ich modyfikacją.

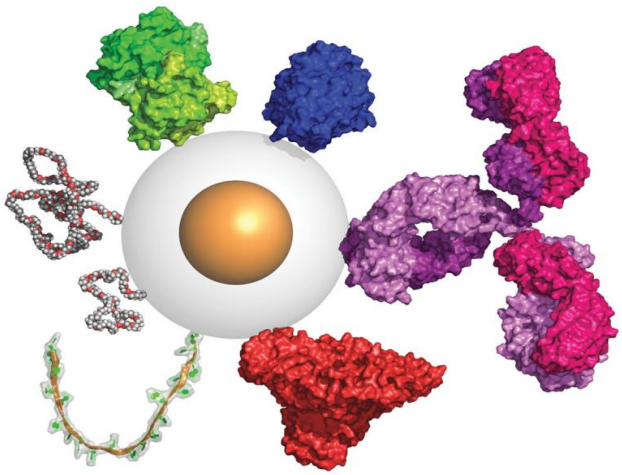
W niniejszym rozdziale dokonano przeglądu metod kontroli geometrii nanostruktur na podłożach. Wybierając odpowiednie podłoże, które będzie użyte w biosensorach optycznych, należy zwrócić uwagę na kilka aspektów. Po pierwsze w przypadku sensorów optycznych wybrana technika badawcza może wymagać obserwacji próbki obiektywem przez podłoże, dlatego należy zwrócić uwagę, czy wybrana technika kontroli geometrii nanostruktur umożliwia zastosowanie przezroczystego podłoża. Drugim aspektem jest wykorzystanie różnych materiałów, z których będą wykonywane nanocząstki. Jak opisano wcześniej, najlepsze do tego celu będą srebro i złoto, które mają pożądane właściwości optyczne oraz są stabilne po modyfikacji. Jeśli możliwe jest zastosowanie tych dwóch materiałów, kluczowym aspektem jest, czy sposób ich otrzymywania oraz kontroli geometrii umożliwi funkcjonalizację nanostruktur. Doświadczenie autorki rozprawy doktorskiej pokazuje, że

funkcjonalizacja często nie jest taka prosta i oczywista, jak się wydaje. Ostatnim, mniej istotnym, ale wartym uwagi czynnikiem, jest koszt syntezy i kontroli geometrii nanostruktur.

2.4 Metody funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek metalicznych

Prowadzone są liczne badania nad modyfikacją powierzchni i funkcjonalizacją nanocząstek. Modyfikacja powierzchni nanocząstek metalicznych stabilizuje je, chroni przed tworzeniem aglomeratów oraz przygotowuje do procesu funkcjonalizacji. Dodatkowo poprzez modyfikację powierzchni nanocząstek zmieniają się również własności samych nanocząstek: biokompatybilność, toksyczność, zwilżalność, adhezja czy ładunek [111]. Modyfikacja powierzchni nanocząstek metalicznych odbywa się głównie poprzez zastosowanie związków zawierających grupę tiolową, ligandy dwusiarczkowe, aminy, kwasy karboksylowe, nitryle lub fosfiny [111,112]. Podczas modyfikacji zwykle wykorzystuje się silne powinowactwo siarki do metali (Ag, Au) wskutek czego powstaje wiązanie kowalencyjne pomiędzy siarką a metalem.

Gdy powierzchnia nanocząstek metalicznych będzie odpowiednio zmodyfikowana, możliwa jest jej dalsza funkcjonalizacja, która ma na celu przyłączenie specyficznych grup umożliwiających reakcję z innymi molekułami, nanocząstkami czy powierzchniami. Gdy nanocząstki mają zostać wykorzystane w sensorach, funkcjonalizacja ich powierzchni może prowadzić do otrzymania warstwy receptorowej wykrywającej analit. Kluczowa jest funkcjonalizacja umożliwiająca selektywne wykrywanie analitu, w przypadku biosensorów będzie to biomolekuła. Na rys. 16. przedstawiono popularne biomolekuły na powierzchni nanocząstki o średnicy 5 nm z otoczką o średnicy 10 nm z zachowaniem skali, są to: PEG, streptawidyna, transferyny, przeciwciało, albumina, jednoniciowy DNA [113]. Małe nanocząstki (średnica około 30 nm) mają porównywalny rozmiar z biomolekułami wykorzystywanymi do modyfikacji ich powierzchni.

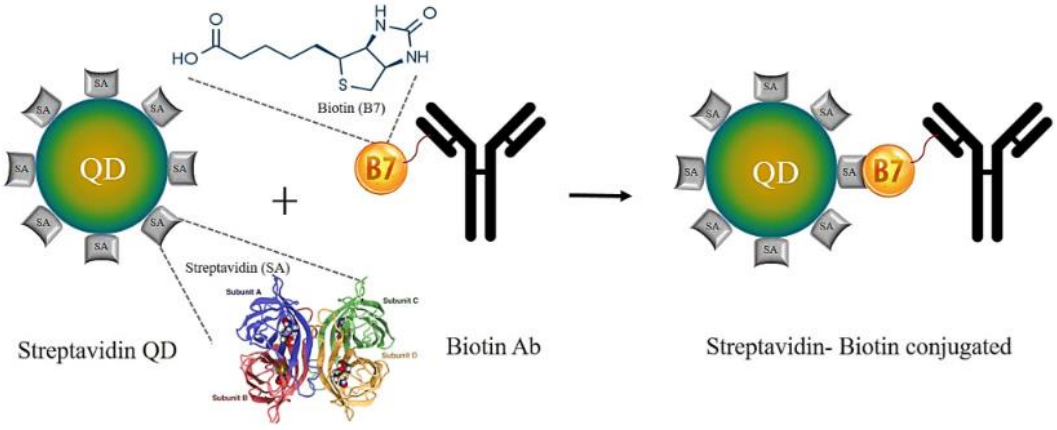


Rys. 16. Schemat przyłączania biomolekuł do nanocząstki (średnica 5 nm) z otoczką (średnica 10 nm), zaprezentowane w skali. Biomolekuły kolejno to PEG (2000 i 5000 g/mol, szare z lewej strony), streptawidyna (zielony), transferyny (niebieski), przeciwciało (IgG, fioletowy), albuminy (czerwony), jednoniciowy DNA (żółto-zielony). Zaczerpnięto z [113].

Koniugację biomolekuł z nanocząstkami można podzielić na następujące sposoby:

a) wiązanie biomolekuł do powierzchni poprzez chemisorpcję np. grup tiolowych,
b) elektrostatyczną adsorpcję dodatnio naładowanych biomolekuł do ujemnie naładowanych nanocząstek lub odwrotnie,
c) wiązanie kowalencyjne przez koniugację grup funkcyjnych, zarówno na cząsteczce, jak i biomolekułach,
d) niekowalencyjne, oparte o powinowactwo receptor-ligand.

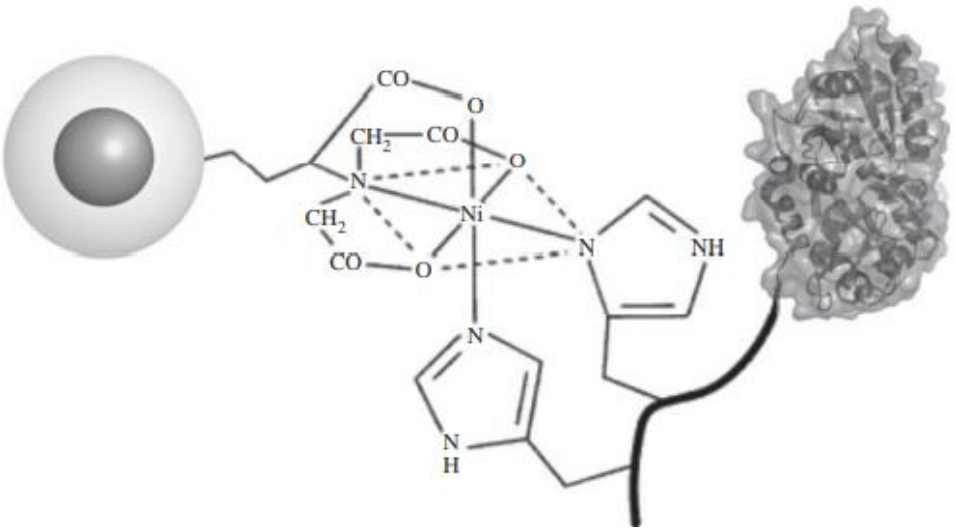
Dużą popularnością jako receptory na powierzchni nanocząstek cieszą się systemy powinowactwa występujące w naturze, z których najpopularniejszym jest awidyna-biotyna oraz kompleks NTA-Ni (kwas nitrylotrioctowy – nikiel)-histydyna [113]**.** W przypadku pierwszego systemu awidyna jest zamiennie stosowana ze streptawidyną, które są białkami tetramerycznymi zbudowanymi z czterech identycznych podjednostek rozpoznających i wiążących biotynę (rys. 17.). Biotyna (witamina H, B7) jest małą cząsteczką w porównaniu do streptawidyny (66 kDa). Niekowalencyjne wiązanie, które powstaje jest najsilniejszym znanym wiązaniem niekowalencyjnym, dzięki czemu pH, temperatura, sole, czy etapy modyfikacji nie są w stanie je uszkodzić [114]. Możliwość tworzenia zawansowanych struktur hybrydowych jest dużą zaletą oddziaływania streptawidyna-biotyna. Struktury takie mogą być wykorzystane jako element biosensorów, służący do umieszczenia bioreceptora na powierzchni nanocząstki.



Rys. 17. Schemat koniugacji streptawidyny z biotyną. Streptawidyna związana jest z kropką kwantową, natomiast biotyna przyłączona jest do przeciwciała. Zaczerpnięto z [114].

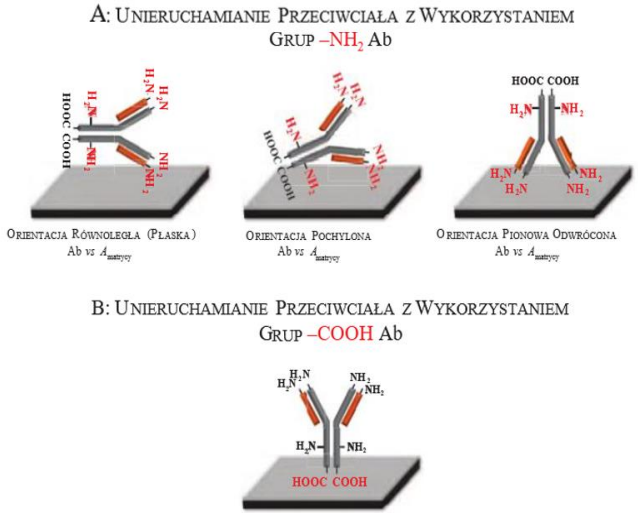
W drugim popularnym systemie łączenia biomolekuł z nanocząstkami wykorzystuje się silne powinowactwo kompleksu NTA-Ni (kwas nitrylotrioctowy – nikiel) do histydyny. Białka w procesie oczyszczania mogą być znakowane histydyną (sześć lub więcej na jedno białko). Udowodniono, że polihistydyna silnie wiąże się z kwasem nitrylooctowym przez kompleks chelatowy z Ni^{2+} lub innymi jonami metali dwuwartościowych (rys. 18.). Podobnie jak w przypadku oddziaływania streptawidyna-biotyna, system ten jest szeroko stosowany do wytwarzania struktur hybrydowych białko-nanocząstka

[115, 116]. Czas koniugacji jest nieznacznie dłuższy niż w przypadku układu streptawidyna-biotyna, jednak nadal jest to poniżej minuty [117].



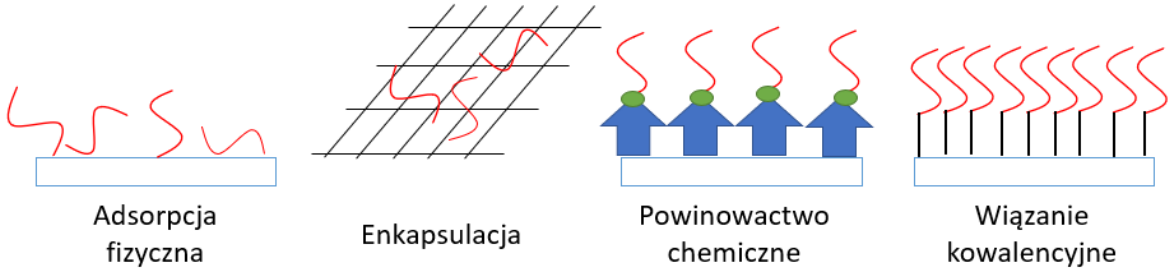
Rys. 18. Schemat koniugacji nanocząstki zmodyfikowanej NTA z białkiem zawierającym histydynę. Zaczerpnięto z [113].

Często wykorzystywane w warstwie bioreceptorowej są przeciwciała, które służą do selektywnego wykrywania antygenów. Mogą być wykorzystane zarówno same, jak i ze znacznikiem fluorescencyjnym, którym może być struktura z kropką kwantową. Jeśli przeciwciało ma zostać elementem warstwy bioreceptorowej musi zostać umieszczone na przetworniku. W przypadku nanosensorów może to być powierzchnia nanocząstki metalicznej. Odkryto wiele sposobów unieruchamiania przeciwciał na powierzchni z wykorzystaniem metod fizycznych i chemicznych oraz przez grupy karboksylowe czy aminowe (rys. 19.) [118–120]. Po funkcjonalizacji należy sprawdzić aktywność przeciwciał, czas aktywności, gęstość przeciwciał na sfunkcjonalizowanej powierzchni oraz potwierdzić, że przeciwciało jest prawidłowo zorientowane. Wykorzystanie przeciwciał przyłączonych do nanocząstek metalicznych w sensorach staje się coraz bardziej popularne ze względu na wysoką czułość i specyficzność [121, 122]



Rys. 19. Schemat orientacji przeciwciała względem zmodyfikowanej powierzchni, z wykorzystaniem wybranych grup funkcyjnych. Zaczerpnięto z [2].

Kolejnym popularnym bioreceptorem jest kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, z ang. *deoxyribonucleic acid*), który również może zostać przyłączony do powierzchni nanocząstek metalicznych. DNA poza kodowaniem informacji genetycznej może pełnić funkcje katalityczne, bądź wykazywać powinowactwo do odpowiednich ligandów, dlatego też jest szeroko stosowany w biosensorach katalitycznych i powinowactwa [123, 124]. Wyróżnia się cztery metody immobilizacji kwasów nukleinowych na wybranych powierzchniach (rys. 20.): adsorpcję fizyczną, enkapsulację, powinowactwo chemiczne oraz wiązanie kowalencyjne. Adsorpcja fizyczna i enkapsulacja nie są popularnymi metodami stosowanymi w wiązaniu DNA do powierzchni nanocząstek metalicznych. Znacznie lepszymi metodami są powinowactwo chemiczne i wiązanie kowalencyjne, ze względu na silne wiązanie DNA do wcześniej sfunkcjonalizowanej/zmodyfikowanej powierzchni. Wybór metody trwałego unieruchomienia DNA powinien być przeprowadzony pod kątem typu biosensora i metody detekcji sygnału analitycznego [125, 126].



Rys. 20. Schemat przedstawiający metody immobilizacji kwasów nukleinowych na powierzchni. Na podstawie [2].

W rozprawie doktorskiej wykorzystano modyfikację powierzchni nanocząstek za pomocą cysteaminy. Następnie do niej przyłączono biotynę, aby wykorzystać oddziaływanie streptawidyna-biotyna. Wykorzystano je ze względu na modelowe białko PCP, które jest wyposażone w streptawidynę.

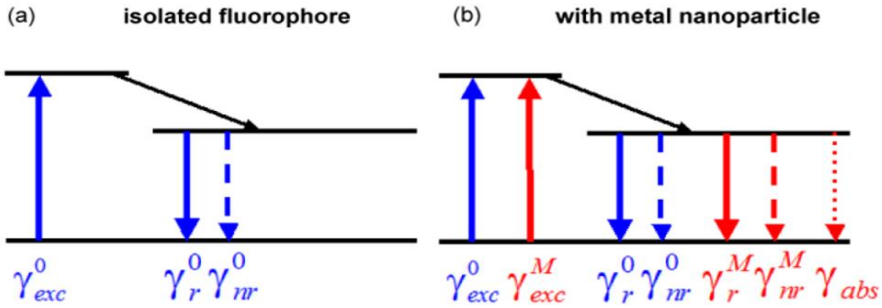
2.5 Wpływ rezonansu plazmonowego na fluorescencję emiterów

Umieszczenie fluoroforu w odpowiedniej odległości od wzbudzonej nanocząstki metalicznej może znacząco wpłynąć na jego właściwości optyczne. Wzbudzona nanocząstka metaliczna staje się źródłem lokalnego pola elektromagnetycznego, które oddziałuje z fluoroforami, skutkiem czego jest sprzężenie plazmonowe pomiędzy metalem a fluoroforem. Odpowiedni dobór materiałów może skutkować zwiększoną wydajnością kwantową fluorescencji oraz poprawą fotostabilności fluoroforu [127].

Fluorofor (dipol) bez kontaktu z nanocząstką metaliczną można opisać następującymi parametrami, co pokazano na uproszczonym diagramie Jabłońskiego z zaznaczonymi poziomami elektronowymi fluoroforu (rys. 21. (a)) [128, 129]:

- γ_{exc}^{0} szybkość wzbudzania, czyli efektywność przejścia cząsteczki do stanu wzbudzonego

- γ_r^0 szybkość radiacyjna, czyli prawdopodobieństwo emisji fotonu podczas relaksacji fluoroforu do stanu podstawowego
- y_{nr}^0 szybkość nieradiacyjna, która opisuje przejście fluoroforu do stanu podstawowego bez emisji promieniowania



Rys. 21. Uproszczony diagram Jabłońskiego przedstawiający procesy w a) izolowanym fluoroforze oraz b) fluoroforze umieszczonym w pobliżu nanocząstki metalicznej. Zaczerpnięto z [128].

Znajomość tych szybkości pozwala obliczyć wydajność kwantową fluorescencji fluoroforu Q_0, która wyraża stosunek szybkości radiacyjnej do sumy szybkości obu kanałów dyssypacji energii [24]:

$$Q_0 = \frac{\gamma_r^0}{\gamma_r + \gamma_{nr}} \tag{1}$$

Drugim parametrem, który opisuje fluorofor, jest czas życia stanu wzbudzonego, wyrażający odwrotność sumy szybkości wszystkich kanałów dyssypacji energii [24]:

$$\tau_0 = \frac{1}{\gamma_r + \gamma_{nr}} \tag{2}$$

W przypadku umieszczenia fluoroforu w pobliżu nanocząstki metalicznej pojawiają się dodatkowe kanały. Kanały oznaczono na rys. 21. (b) kolejno: szybkość wzbudzenia (γ_{exc}^M), szybkość radiacyjna (γ_r^M) oraz nieradiacyjna (γ_{nr}^M) w pobliżu metalicznej nanocząstki. Efekt sprzężenia wzbudzenia plazmonowego w nanocząstce metalicznej ze stanem wzbudzonym fluoroforu nazywamy efektem Purcella. Ze względu na przekaz energii z fluoroforu do nanocząstki metalicznej pojawia się dodatkowy kanał nieradiacyjny: transfer energii z emitera do nanocząstki metalicznej (γ_{abs}). Proces ten prowadzi do wygaszenia fluorescencji i polega głównie na przekształceniu energii w ciepło.

Wydajność kwantowa w pobliżu nanocząstki metalicznej przyjmuje postać:

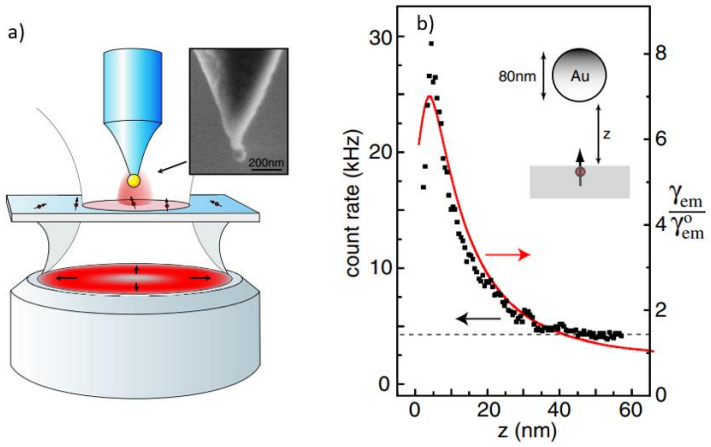
$$Q_m = \frac{\gamma_r + \gamma_r^M}{\gamma_r + \gamma_r^M + y_{nr} + \gamma_{nr}^M + \gamma_{abs}} \tag{3}$$

Czas życia emitera w pobliżu nanocząstki metalicznej można obliczyć według wzoru:

$$\tau_m = \frac{\gamma_r + \gamma_r^M}{\gamma_r + \gamma_r^M + \gamma_{nr} + \gamma_{nr}^M + \gamma_{abs}} \tag{4}$$

Oddziaływanie pomiędzy emiterem a metalicznymi nanocząstkami zależy głównie od właściwości optycznych emiterów, przekrycia widma fluorescencji emitera z widmem ekstynkcji nanocząstki bądź absorpcji emitera z pasmem rezonansu plazmonowego nanostruktury metalicznej, oraz od odległości pomiędzy emiterem a nanocząstką metaliczną. Udowodniono to w eksperymencie

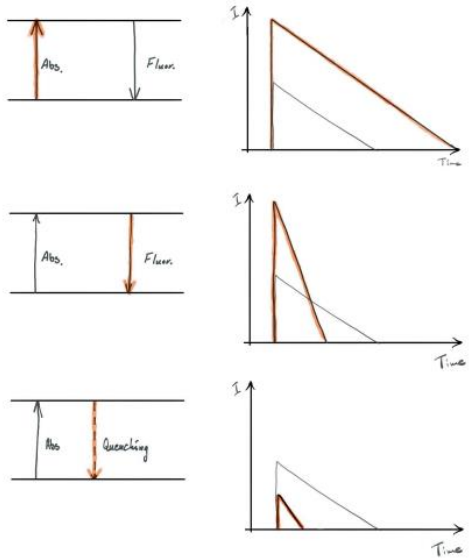
przeprowadzonym przez grupę prof. L. Novotnego [130, 131]. Autorzy publikacji porównali teoretyczne obliczenia z wynikami eksperymentalnymi zmian natężenia fluorescencji pojedynczej molekuły błękitu nilu w funkcji odległości od wzbudzonej laserem nanocząstki złota (d = 80 nm), co przedstawiono na rys. 22. (a). Był to pierwszy eksperyment prezentujący płynne przejście pomiędzy wygaszeniem a wzmocnieniem fluorescencji pojedynczej molekuły.



Rys. 22. a) Schemat układu eksperymentalnego z nanocząstką złota przyczepioną do końca ostrza AFM, b) Wykres przedstawiający natężenie fluorescencji cząsteczki w funkcji odległości od powierzchni. Zaczerpnięto z [130].

Do kontroli odległości nanocząstki metalicznej od molekuły wykorzystano ostrze z mikroskopu sił atomowych (AFM, z ang. *atomic force microscope*), które zbliżano do osadzonej w matrycy polimerowej molekuły (rys. 22. (a)). Na rys. 22. (b) zaprezentowano zmianę natężenia fluorescencji w funkcji odległości nanocząstki metalicznej. Maksimum wzmocnienia fluorescencji występuje w odległości 5 nm od nanocząstki metalicznej, a mniejsze odległości powodują wygaszenie fluorescencji. Wystąpiła zgodność pomiędzy teorią a wynikami eksperymentu. Oznacza to, że dopiero dla odległości poniżej 5 nm dominuje dodatkowy kanał bezpromienistej dyssypacji energii (γ_{abs}). Zanim nanocząstka metaliczna zbliżyła się do fluoroforu do odległości około 40 nm nie wykazywała wzmocnienia fluorescencji, dopiero przekroczenie tej granicy spowodowało stopniowe zwiększanie natężenia fluorescencji fluoroforu. Doświadczenie to pokazuje, że właściwości optyczne fluoroforu w tym samym układzie zmieniają się wraz z odległością. Oznacza to, że odległość jest kluczowa dla efektywności tych oddziaływań.

Wpływ plazmonów na właściwości optyczne fluoroforów może objawiać się: wygaszeniem lub wzmocnieniem fluorescencji oraz zmianą czasu życia fluoroforu. Dzięki metodom spektroskopowym możliwe jest rozróżnienie występujących efektów. Na rys. 23. (po lewej stronie) zaprezentowano wybrane procesy z uproszczonego diagramu Jabłońskiego z zaznaczeniem wzmocnionego kanału, a po prawej narysowano schematyczne wykresy krzywej zaniku fluorescencji fluoroforu przed (czarny) i po (pomarańczowy) zmianie własności optycznych.



Rys. 23. Schemat przedstawiający zmianę spektroskopowej odpowiedzi optycznej fluoroforów sprzężonych z metalicznymi nanocząstkami. Zaczerpnięto z [131].

W pierwszym przypadku wzmocnieniu ulega szybkość absorpcji fluoroforu. Natężenie fluorescencji fluoroforu rośnie, ale czas życia fluorescencji pozostaje bez zmian. W drugim przypadku mamy do czynienia ze wzmocnieniem emisji fluoroforu. Czas zaniku fluorescencji w otoczeniu nanocząstki metalicznej ulega skróceniu przy jednoczesnym silnym wzroście natężenia fluorescencji. Ostatnią możliwością jest transfer energii z fluoroforu do nanocząstki metalicznej. W tym przypadku zaobserwowano silne skrócenie czasu życia fluorescencji fluoroforu, przy jednoczesnym silnym spadku natężenia fluorescencji [131]. Wzrost szybkości wzbudzenia oraz szybkości promieniowania nazywany jest plazmonowym wzmocnieniem fluorescencji (MEF, z ang. *metal enhanced fluorescence* lub PEF, z ang. *plasmon-enhanced fluorescence*) [24].

W przypadku sensorów, aby wykorzystać efekt zmiany spektroskopowej odpowiedzi optycznej fluoroforów sprzężonych z metalicznymi nanocząstkami, najprościej jest zastosować efekt wzmocnienia emisji fluoroforu. Efekt ten można zarejestrować podczas pomiaru krzywej zaniku fluorescencji próbki, jest on również widoczny we wzroście natężenia fluorescencji próbki. Łatwo odróżnić ten efekt od wzmocnienia absorpcji fluoroforu. W przypadku efektu wzmocnienia absorpcji fluoroforu analiza musi być jednak dokładniejsza, ponieważ skrócenie zaniku emisji może wynikać ze zbyt dużego stężenia analitu (efekt stężenia). Równie wymagające są pomiary biosensorów wykorzystujące efekt transferu energii z fluoroforu do nanocząstki metalicznej. W tym przypadku możliwa jest pomyłka z degradacją czy fotowybielaniem próbki.

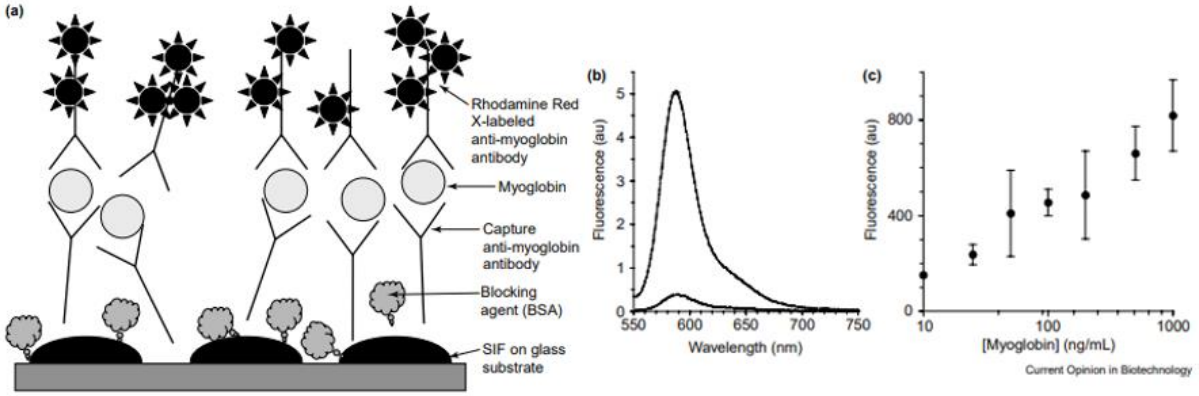
W eksperymentach opisanych w rozprawie doktorskiej częściowo wykorzystano efekt wzmocnienia fluorescencji fluoroforu. Jak wcześniej opisano, efekt ten nie jest konieczny dla zastosowań sensorycznych, ponieważ nanodruty srebra są platformą dla warstwy receptorowej. Jednak, jeśli efekt ten występuje, to stanowi on dodatkową zaletę wykorzystania nanocząstek metalicznych.

3. PRZEGLĄD WYBRANYCH EKSPERYMENTÓW

W niniejszym rozdziale przedstawiono wybrane prace badawcze, które mają pokazać trend badań naukowców oraz wskazać potencjalne problemy. Część publikacji należy do wiodących grup naukowców z prestiżowych uniwersytetów na świecie. Opisano wybrane eksperymenty związane z omawianymi właściwościami nanocząstek metalicznych oraz przykłady wykorzystania nanocząstek metalicznych jako platformy biosensorowe.

MEF wykorzystywano w dziedzinie biotechnologii już na początku XXI wieku, kiedy zauważono pozytywny wpływ nanostruktur plazmonowych na właściwości optyczne fluoroforów znajdujących się w ich pobliżu. Wiele interesujących prac o tej tematyce powstało w grupie badawczej kierowanej przez Josepha Lakowicza. Zwrócił on uwagę na to, że wykrywanie fluoroforu często jest ograniczone przez jego wydajność kwantową, autofluorescencję próbki oraz fotostabilność fluoroforów. Dzięki zastosowaniu MEFu możliwe jest złagodzenie tych ograniczeń fotofizycznych fluoroforów i umożliwienie detekcji nawet dla niskich stężeń.

Na rys. 24. przedstawiono wyniki uzyskane dla planarnego testu immunologicznego wzmocnionego metalem. Do wykonania testu immunologicznego zastosowano test podwójnego wiązania (ELISA, z ang. *enzyme-linked immunosorbent assay)*.

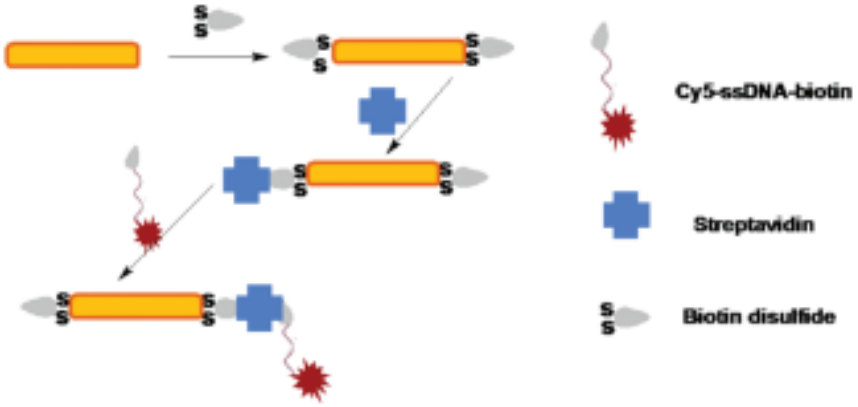


Rys. 24. a) Schemat testu immunologicznego typu ELISA do wykrywania mioglobiny b) Widma natężenia fluorescencji przeciwciał znakowanych rodaminą na warstwie srebrnych wysp oraz na szkle dla stężenia mioglobiny 100 ng/ml c) Wykres przedstawiający korelację stężenia mioglobiny znakowanej przeciwciałami w funkcji natężenia fluorescencji rodaminy. Do pomiarów wykorzystano wzbudzenie 532 nm. Zaczerpnięto z [127].

Opracowano test immunologiczny służący do wykrywania mioglobiny, która jest markerem sercowym. Sama mioglobina nie wykazuje fluorescencji. Mioglobina była wychwytywana przez przeciwciała przyłączone do powierzchni srebrnych wysp. Następnie wykorzystano przeciwciała

znakowane fluoroforem (rodaminą) rozpoznające mioglobinę (rys. 24. (a)). Autorzy pracy porównali natężenie fluorescencji fluoroforu znakowanego przeciwciałami na warstwie srebrnych wysp (SIF, z ang. *silver island film*) oraz na samym szkle (rys. 24. (b)). Wzmocnienie plazmonowe natężenia fluorescencji fluoroforu na SIF wyniosło pomiędzy 10 a 15. Na rys. 24. (c) przedstawiono zakres detekcji mioglobiny, który wynosi od 10 do 1000 ng/mL, badano natężenie fluorescencji w funkcji stężenia mioglobiny. Wyniki te pozwoliły wykryć stężenie mioglobiny poniżej 50 ng/ml. Uwagę zwraca błąd pomiaru natężenia fluorescencji, który w zależności od stężenia mioglobiny potrafi się różnić nawet czterokrotnie [127].

Kolejny wybrany eksperyment przeprowadzony w tej samej grupie badawczej dotyczy pomiaru plazmonowo wzmocnionej fluorescencji pojedynczych fluoroforów przyłączonych do końców nanoprętów złota. Celem eksperymentu było poprawienie fotostabilności oraz wzmocnienie niskiego natężenia fluorescencji poprzez zastosowanie nanoprętów złota. Plazmonowe wzmocnienie fluorescencji fluoroforu jest sterowane przez wykorzystanie nanostruktur o podłużnym kształcie oraz kontroli odległości fluoroforu od końca nanopręta złota.

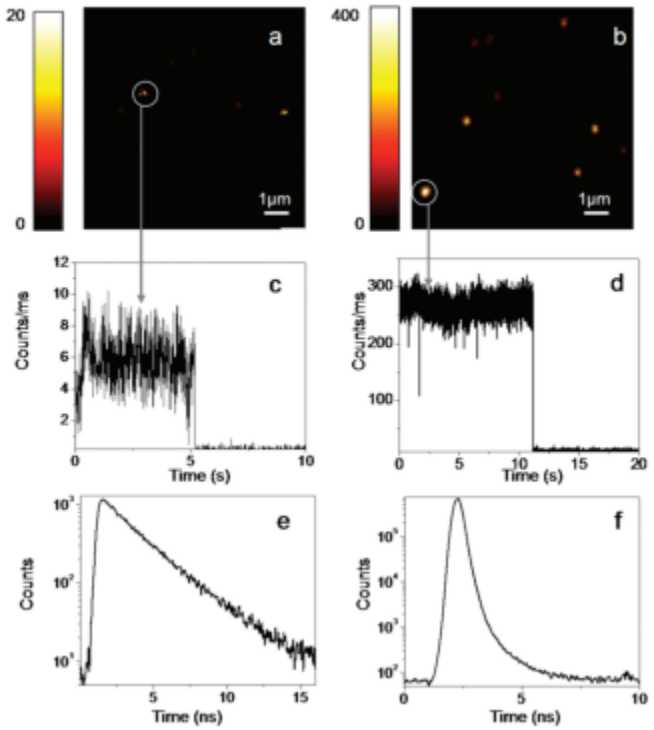


Rys. 25. Schemat koniugacji jednoniciowego DNA znakowanego barwnikiem do nanoprętów złota. Zaczerpnięto z [132].

Na rys. 25. zaprezentowano schemat koniugacji cyjaniny 5 (Cy5), pełniącej funkcję fluoroforu do końca nanopręta złota. Na początku wykorzystano właściwość tiolu do trwałego unieruchamiania na krawędzi nanoprętów złota, a nie z krawędziami powierzchni bocznych. Na końcach nanoprętów złota znajduje się mniej polimeru, dlatego pochodna biotyny z grupą tiolową łączy się do ich końców. Następnie biotyna łączy się ze streptawidyną. Tak przygotowane nanopręty złota inkubowano z nisko stężonym roztworem oligonukleotydów (długość około 8 nm) znakowanych z jednej strony biotyną, a z drugiej Cy5.

Przygotowane nanostruktury hybrydowe osadzono na szkiełku nakrywkowym i wykonano eksperymenty z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. Na rys. 26. (a) i (b) na mapach natężenia fluorescencji Cy5 punkty dla nanostruktury hybrydowej charakteryzują się dużo wyższym natężeniem fluorescencji niż dla pojedynczego ssDNA znakowanego Cy5. W następnym

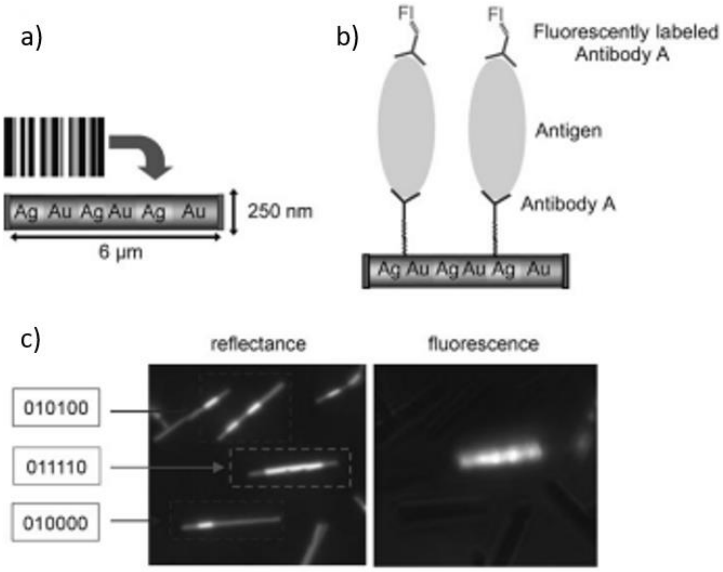
etapie wykonano pomiar natężenia fluorescencji Cy5 w funkcji czasu dla obu próbek (rys. 26. (c) i (d)). W przypadku pojedynczego ssDNA znakowanego Cy5 fotowybielanie nastąpiło po 5 s, a dla Au/Cy5-ss-DNA, zaobserwowano fotowybielenie po ponad 10 sekundach. W obu przypadkach jest to jednoetapowy zanik fluorescencji do poziomu tła. Na końcu zaprezentowano krzywe zaniku fluorescencji Cy5 dla obu przypadków (rys. 26. (e) i (f)). W pierwszym przypadku wyznaczony czas życia wynosił 2,51 ns, a dla drugiej próbki 0,33 ns. Obserwuje się znaczące skrócenie czasu życia fluoroforu w obecności nanoprętów złota [132]. Wyniki te wskazują na możliwość wykorzystania tak przygotowanych nanostruktur jako sond fluorescencyjnych do bioobrazowania. Minusem wykorzystania fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej jest brak możliwości badań mokrych próbek oraz obrazowania w czasie rzeczywistym.



Rys. 26. a)- b) Mapy natężenia fluorescencji kolejno Cy5-ss-DNA oraz Au/Cy5-ss-DNA wykonane z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego c)- d) Zmiany natężenia fluorescencji kolejno Cy5-ss-DNA oraz Au/ Cy5-ss-DNA wskazanych na mapach a) i b) w funkcji czasu e) i f) Kolejno krzywe zaniku fluorescencji Cy5-ss-DNA oraz Au/ Cy5-ss-DNA. Moc wzbudzenia: 100 nW, długość fal wzbudzającej 633 nm. Filtr wąskopasmowy na torze emisji 685/35 nm. Zaczerpnięto z [132].

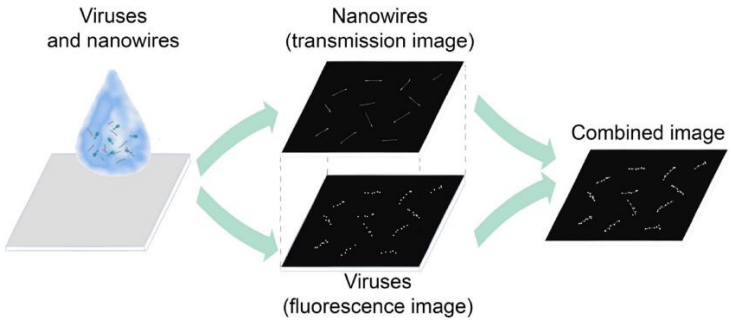
Szybki rozwój wiedzy o wpływie MEF na fluorofory oraz metod wytwarzania nanostruktur metalicznych sprawił, że pojawiało się wiele nowatorskich podejść do wytworzenia platform biosensorowych. Na rys. 27. przedstawiono platformy biosensorowe o morfologii nanodrutów złota, srebra oraz niklu, wykonanych poprzez elektroosadzanie. Zastosowanie różnych metali pozwala kodować nanodruty, aby później łatwo je identyfikować.

Przykład pojedynczego nanodrutu przedstawiono na rys. 27. (a), z zaznaczeniem segmentów z różnych metali. Autorzy porównują tak przygotowane nanodruty do kodów kreskowych. Partie nanodrutów można od siebie odróżniać (mapy odbicia światła), dzięki czemu w jednej próbce mogą być nanodruty zmodyfikowane i bez modyfikacji. Podobnie jak w przykładzie z warstwami srebrnych wysp zastosowano modyfikację nanostruktur metodą ELISA z przeciwciałami i znacznikiem fluorescencyjnym. Do pomiarów wykorzystano odwrócony mikroskop fluorescencyjny z trybem ciemnego pola. Mapa odbicia służy identyfikacji wzoru segmentów metali (rys. 27. (c)). Natomiast mapa natężenia fluorescencji dostarcza informacji o koniugacji nanodrutu pokrytego przeciwciałami z antygenem znakowanym fluoroforem (rys. 27. (c)). Na rys. 27. (c) tylko jeden nanodrut z kilku posiada przyłączone przeciwciała ze znacznikiem fluorescencyjnym. Autorzy podkreślają zalety wykorzystania metalicznych nanodrutów jako platform biosensorowych i wskazują, że cały eksperyment może zostać wykonany w czasie 3-4 godzin, co sprawdzi się w przypadku szybkiej diagnostyki medycznej.



Rys. 27. a) Schemat przygotowanych nanodrutów metalicznych z segmentami srebra i złota oraz niklowymi końcami, z porównaniem do kodu kreskowego b) Schemat struktury hybrydowej z znakowanym przeciwciałem (test immunologiczny w typu ELISA) c) Mapa odbicia oraz natężenia fluorescencji fluoroforów z nanodrutami o różnych segmentach. Zaczerpnięto z [133].

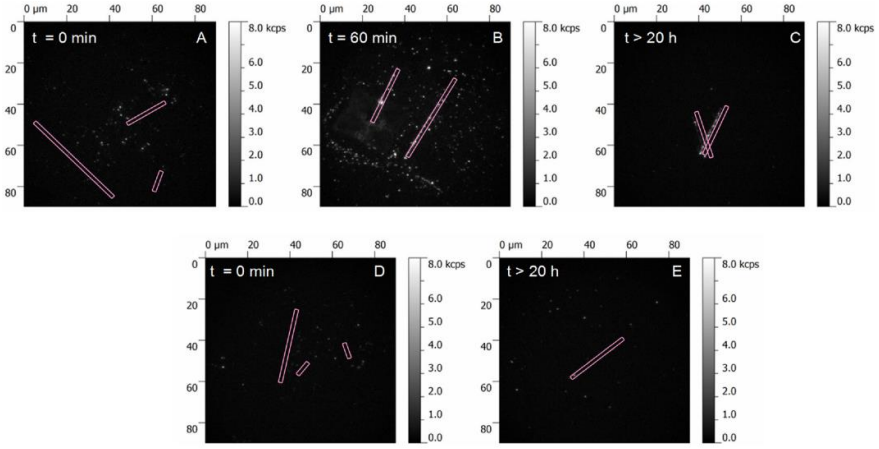
W kolejnej wybranej pracy również wykorzystano nanodruty srebra (AgNWs, z ang. *silver nanowires*) jako platformy biosensorowe [122]. Nanodruty srebra zmodyfikowano za pomocą przeciwciał przeciwko wirusowi bakteryjnemu T7 i następnie umieszczono w jednej próbówce z barwionymi wirusami T7 (rys. 28.). Po wybranym czasie pobierano próbkę i wykonywano, za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola, mapę transmisji światła białego. Miała ona na celu lokalizację pozycji AgNWs. Następnie wykonano mapę natężenia fluorescencji znakowanych AgNWs. Korelacja tych dwóch map pozwala określić, czy wirusy bakteryjne zostały wychwycone przez przeciwciała.



Rys. 28. Schemat wykrywania wirusów poprzez korelację mapy transmisji światła białego z mapę natężenia fluorescencji znakowanych wirusów. Zaczerpnięto z [122].

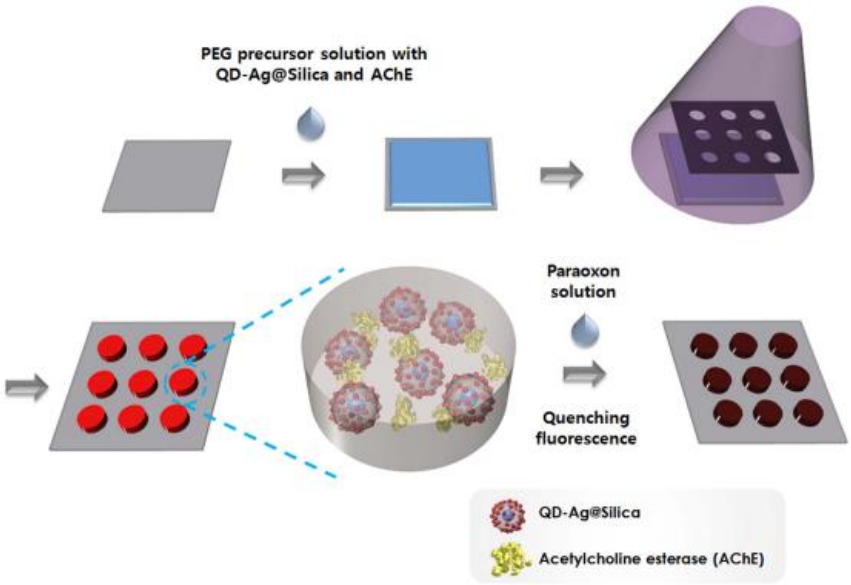
Na rys. 29. przedstawiono mapy natężenia fluorescencji znaczonych wirusów T7 oraz kontur AgNWs poznany dzięki mapie transmisji światła białego. Pierwszą mapę wykonano zaraz po zmieszaniu zawiesiny znakowanych przeciwciałami AgNWs z wirusami T7, czas ten oznaczono jako T0. Na skorelowanej mapie widoczne są białe punkty oznaczające znakowane wirusy. Miejsca, gdzie znajdują się AgNWs pozostają czarne, co oznacza, że wychwytywanie wirusów przez przeciwciała nie jest szybkim procesem. Kolejny pomiar wykonano po 60 min. Po tym czasie, w miejscach gdzie znajdują się AgNWs, pojawiają się punkty interpretowane jako wirusy. Ostatni prezentowany pomiar wykonano po ponad 20 godzinach inkubacji. Większość wirusów bakteryjnych jest w miejscu pozycji AgNWs.

Jako próbę odniesienia wykonano analogiczne pomiary różniące się jedynie zastosowanymi AgNWs bez modyfikacji. Zaprezentowane mapy natężenia fluorescencji po 0 s oraz 20 h w miejscach AgNWs nie wykazały obecności wirusów. Oznacza to, że AgNWs modyfikowane przeciwciałami wykrywają wirusy w specyficzny sposób. Problemem w tym modelu eksperymentu jest konieczność korelacji mapy transmisji i fluorescencji fluoroforu, aby zlokalizować losowo ułożone AgNWs.



Rys. 29 Mapy natężenia fluorescencji znakowanych wirusów T7 oraz nanodrutów srebra zmodyfikowanych przeciwciałami wykonane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola po czasie inkubacji a) 0 s, b) 60 min, c) ponad 20 godzinach oraz d) i e) dla próbki z niemodyfikowanymi nanodrutami srebra. Zaczerpnięto z [122].

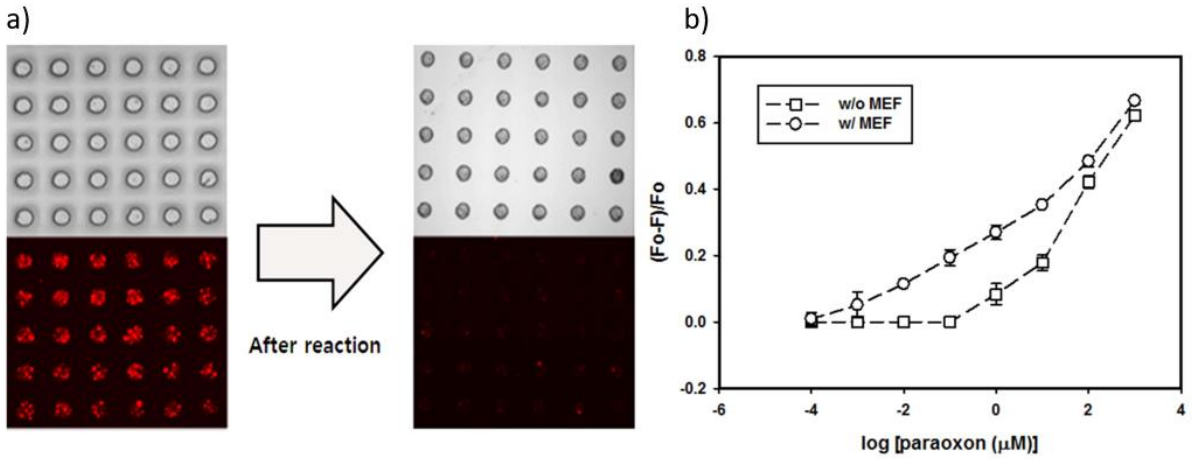
Sposobem na rozwiązanie problemu z losowo ułożonymi nanocząstkami jest kontrola ich położeń np. poprzez orientację ich w mikromacierze [134]. W wybranej publikacji naukowcy opracowali biosensor fluorescencyjny do wykrywania paraoksonu, jednego z najbardziej znanych neurotoksycznych związków fosforoorganicznych. Mikromacierz przygotowano z poli(glikolu etylenowego) (PEG, z ang. *poly(ethylene glycol)*), w której umieszczono acetylocholinoesterazę (AChE, z ang. *acetylcholinesterase*) oraz kropki kwantowe (QDs, z ang. *quantum dots*) jako znaczniki fluorescencyjne.



Rys. 30. Schemat wytwarzania mikromacierzy hydrożelowych zawierających QD-Ag@Silica oraz substancję do detekcji paraoksonu (AchE). Zaczerpnięto z [134].

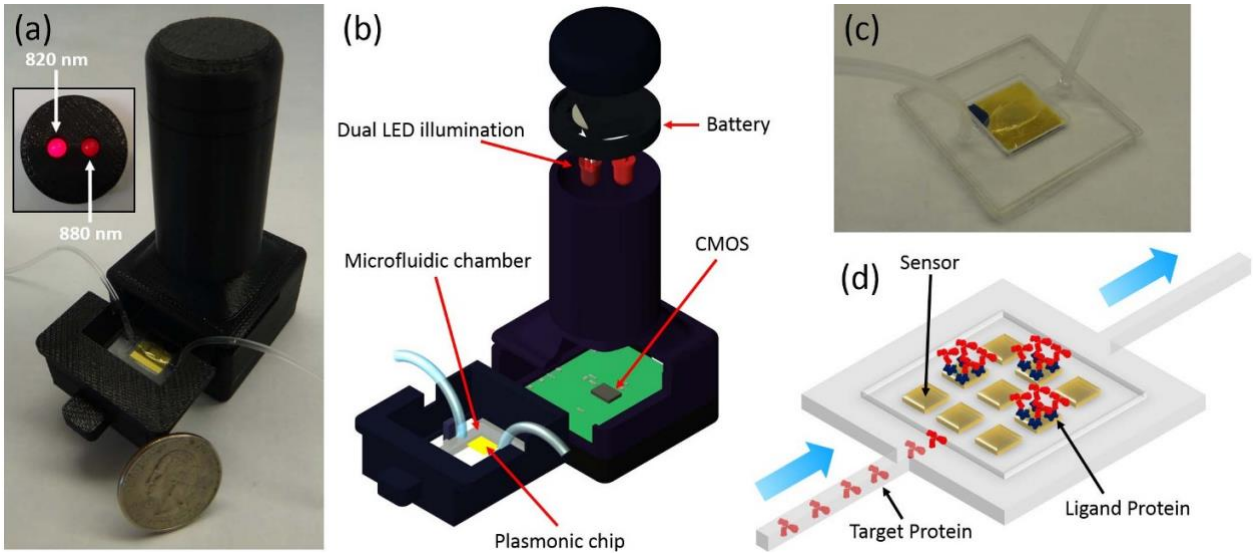
Plazmonowe wzmocnienie fluorescencji osiągnięto poprzez przyłączenie kropek kwantowych do pokrytych krzemionką nanocząstek srebra (Ag@Silica). W zoptymalizowanych warunkach wykazano 5-krotny wzrost intensywności fluorescencji w porównaniu z systemem bez MEF.

Na rys. 31. (a) przedstawiono mapę transmisji prezentującą pozycję mikromacierzy wraz z korespondującą mapą natężenia fluorescencji QDs. Po dodaniu do mikromacierzy, paraokson ulegał hydrolizie pod wpływem AChE, wytwarzając p-nitrofenol, który następnie powodował wygaszanie fluorescencji QDs. Wykorzystanie nanocząstek srebra spowodowało znaczne zwiększenie wykrywalności paraoksonu, z $2{,}0\times10^{-7}$ M do $1{,}0\times10^{-10}$ M (rys. 31. (b)). Czas reakcji paraoksenu z AChE to jedna godzina. Detekcję wykonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Wyniki te pokazują, że wykorzystanie zjawiska MEF pozwala zwiększyć limit detekcji oraz skrócić jej czas.



Rys. 31. Wykrywanie paraoksonu przy użyciu mikromacierzy hydrożelowych zawierających QD-Ag@Silica i AchE. a)Mapy światła białego oraz natężenia fluorescencji przed i po reakcji AChE z paraoksonem b) Zmiana wartości (F0 - F)/F0 w funkcji stężenia paraoksonu. Zaczerpnięto z [134].

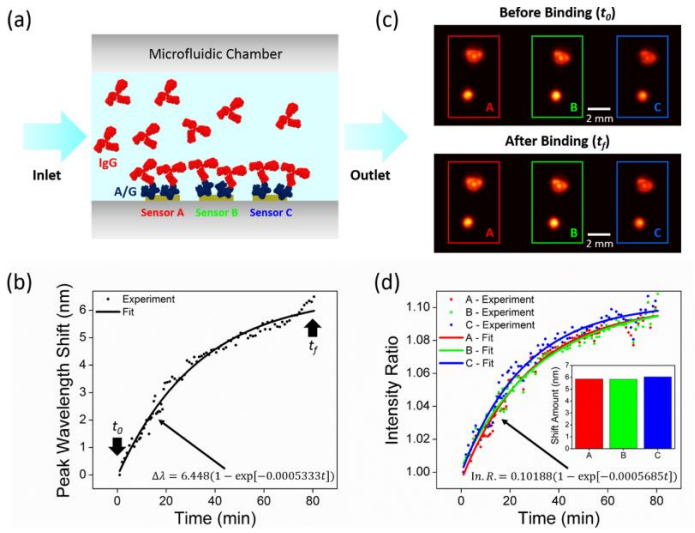
Ostatnia wybrana do przeglądu publikacja łączy w sobie MEF oraz geometrycznie kontrolowane nanostruktury [135]. Dzięki zastosowaniu mikrofluidyki detekcja fluorescencji odbywała się w czasie rzeczywistym w szerokim polu obrazowania. Na potrzeby eksperymentu do obrazowania wykorzystano urządzenie biosensorowe wykonane przez autorów publikacji (rys. 32. (b)), wykorzystujące dwie diody o długości fali 820 nm oraz 880 nm. Urządzenie to jest również wyposażone w układ do mikrofluidyki, detektor CMOS oraz wbudowany układ opto-elektroniczny, pozwalający rejestrować wzory dyfrakcyjne nanostruktur na plazmonowym czipie podczas przepływu w czasie rzeczywistym. Plazmonowy czip jest warstwą złota wykonaną za pomocą napylania oraz litografii UV.



Rys. 32. a) Zdjęcie urządzenia służącego do wykrywania próbek na plazmonowym czipie z wykorzystaniem kanału mikroprzepływowego b) Schemat urządzenia ze zdjęcia. c) Zdjęcie kanału mikroprzepływowego na plazmonowym czipie. d) Schemat plazmonowych czipów ze sposobem dostarczania analitu. Zaczerpnięto z [135].

Warstwa złota jest modyfikowana za pomocą białka A i G i ma za zadanie wykrywać przeciwciała IgG (Immunoglobuliny G) (rys. 33. (a)). Plazmonowy czip był cały czas oświetlany

jednocześnie przez obie diody, które były zlokalizowane po obu stronach rezonansu plazmonowego złotych nanosensorów. Gdy przeciwciało przywiązało się do nanosensora zmienił się współczynnik załamania światła w pobliżu nanostruktury. Skutkowało to przesunięciem częstotliwości plazmonowych modów. Sygnał wzmacniał się w jednym z wzorców dyfrakcyjnych i jednocześnie został stłumiony w drugim. Następnie obraz zanalizowano cyfrowo i generowano wynik (rys. 33. (b)). Przedstawione wyniki mają bardzo duży potencjał ze względu na pomiar w czasie rzeczywistym. Minusem pozostaje brak możliwości obserwacji pojedynczych zdarzeń w czasie rzeczywistym.



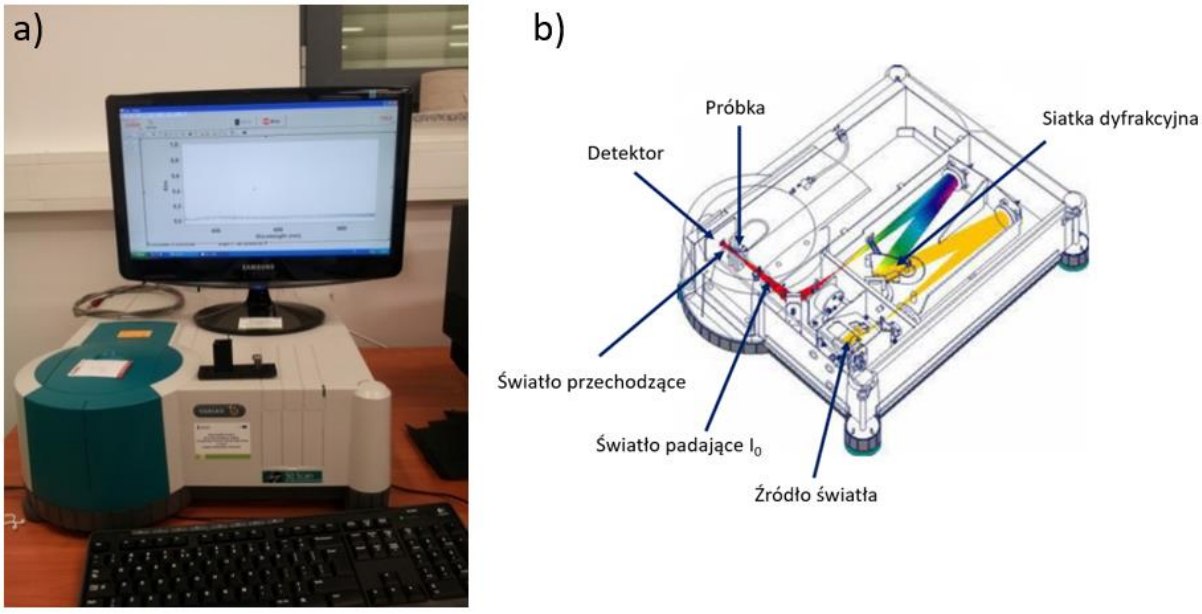
Rys. 33. a) Schemat wykrywania przeciwciał przez plazmonowy czip b) Wykładnicze dopasowanie wyników uzyskanych w czasie rzeczywistym c) Wzorce dyfrakcyjne przed i po związaniu przeciwciał d) Wyniki eksperymentu. Zaczerpnięto z [135].

4. TECHNIKI EKSPERYMENTALNE

W rozdziale opisano najważniejsze metody i układy pomiarowe wykorzystane do badań zawartych w rozprawie. Rozdział rozpoczęto od przedstawienia podstawowej techniki jaką jest spektrofotometria UV/VIS umożliwiająca charakteryzację własności optycznych wykorzystywanych w badaniach materiałów, a zakończono opisem zaawansowanych technik mikroskopii fluorescencyjnej, w tym mikroskopii fluorescencyjnej szerokiego pola oraz konfokalnej.

4.1 Spektrofotometria UV/VIS

Pomiary widm absorpcji lub ekstynkcji badanych materiałów wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS firmy Varian Cary 50 (rys. 34. (a)). Urządzenie to pozwala na pracę w zakresie spektralnym od 200 nm do 1100 nm. Dzięki pomiarowi widma absorpcji białek fotoaktywnych otrzymano informację czy białko to nie uległo degradacji. Natomiast w przypadku nanocząstek metalicznych pomiar ich widma ekstynkcji dostarczył informacji o położeniu i kształcie pasma rezonansu plazmonowego.



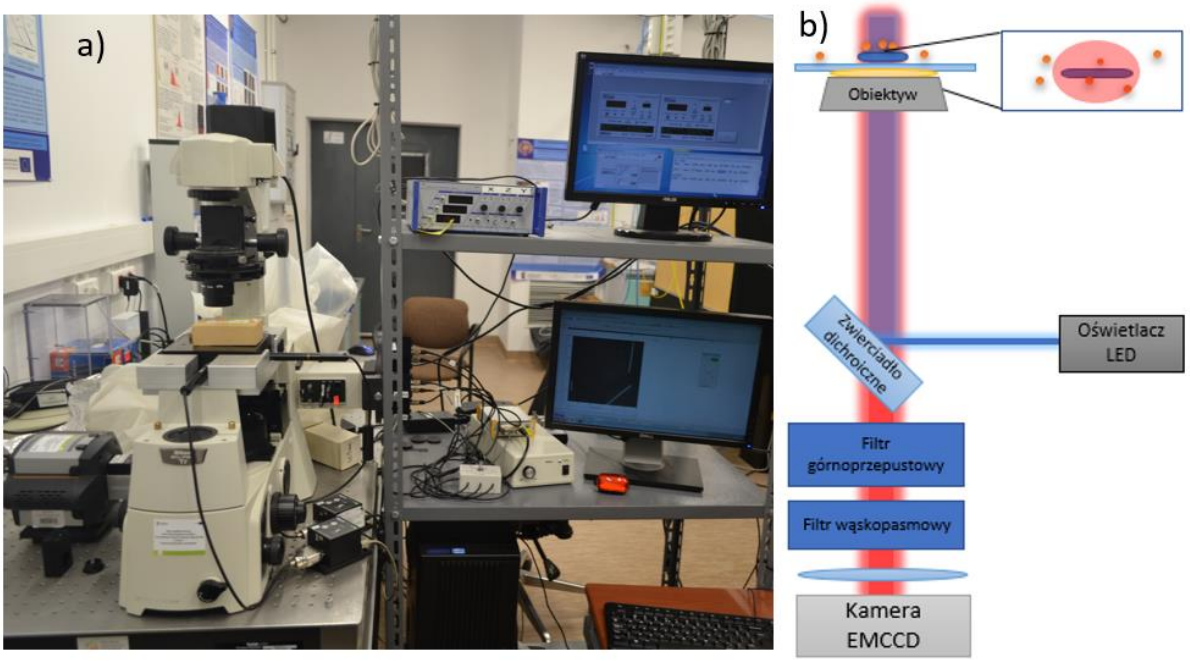
Rys. 34. a) Zdjęcie wykorzystywanego spektrofotometru UV-VIS Varian Cary 50 oraz b) Schemat i zasada działania spektrofotometru.

Schemat spektrofotometru przedstawiono na rys. 34. (b). Światło pochodzące z lampy ksenonowej skierowane jest do komory, w której znajdują się dwa zwierciadła i siatka dyfrakcyjna, tworzące monochromator umożliwiający rozdzielenie światła białego na światło o różnych barwach i wybranie z niej pożądanej długości fali. Następnie światło zostaje skupione w miejscu, gdzie umieszcza się próbkę. Po przejściu wiązki przez próbkę natężenie światła przechodzącego rejestrowane

jest przez detektor, w tym przypadku przez fotodiodę krzemową. Jest ona połączona z komputerem posiadającym oprogramowanie pomiarowe, które pozwala na automatyczne odjęcie sygnału rozpuszczalnika od sygnału próbki.

4.2 Fluorescencyjna mikroskopia szerokiego pola

Większość pomiarów opisanych w rozprawie doktorskiej wykonano przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola przedstawionego na rys. 35. (a), należącego do Katedry Nanofotoniki IF UMK. Mikroskop bazuje na korpusie Nikon Eclipse Ti-U z dodatkowymi elementami umożliwiającymi wzbudzenie próbki oraz detekcję sygnału. Układ ten pozwala na rejestrację map oraz kinetyk natężenia fluorescencji, a także map transmisji światła białego.



Rys. 35. a) Zdjęcie użytego w eksperymentach fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola w Katedrze Nanofotoniki IF UMK. b) Schemat fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola.

Podczas eksperymentów najpierw korzystano z możliwości rejestrowania map transmisyjnych próbek, aby wybrać najlepsze miejsce do pomiarów (bez przekrywających się nanodrutów srebra). W takim trybie pracy do oświetlenia próbki stosowana jest lampa halogenowa. Światło przechodzące przez próbkę zbierane jest przez obiektyw, a następnie rejestrowane przez kamerę EMCCD.

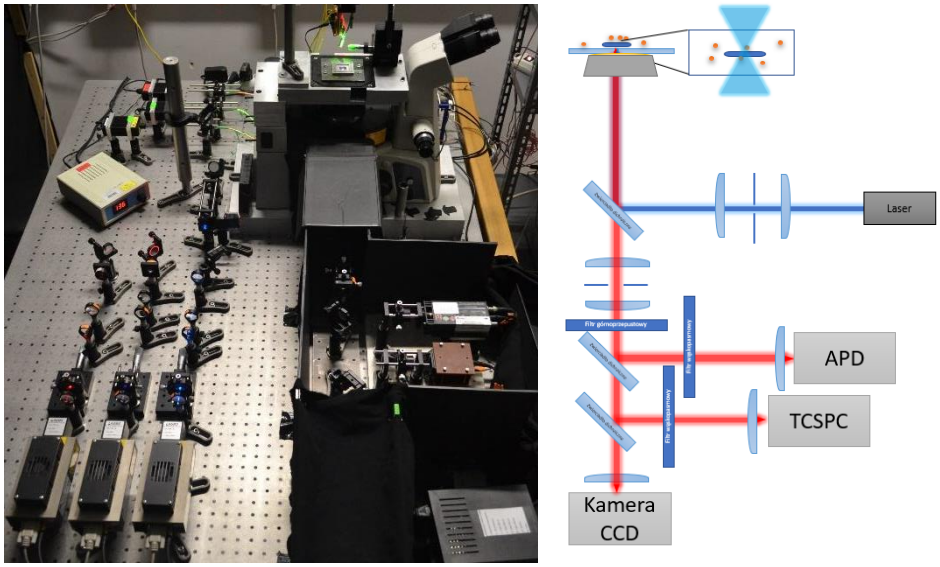
Źródłem światła w użytym fluorescencyjnym mikroskopie szerokiego pola są oświetlacze LED (Prizmatix) o długościach fal 365/405/480/535/630 nm z dodatkowo zamontowanymi filtrami emisyjnymi. Promieniowanie wzbudzające jest kierowane do obiektywu przez zwierciadło dichroiczne (FF665), które ma za zadanie odbić promieniowanie o krótszych długościach fal niż 650 nm i przepuścić to o dłuższych długościach fal. Z obiektywu wychodzi wiązka równoległa, jednorodnie oświetlająca duży obszar próbki. Zastosowano obiektyw immersyjny (Nikon) o powiększeniu 100x i aperturze

numerycznej 1.4, który pozwala obrazować obszar o rozmiarach do 90 x 90 μm. Ten sam obiektyw służy do zbierania sygnału pochodzącego z próbki który po przejściu przez zwierciadło dichroiczne jest kierowany za pomocą zwierciadła na tor detekcji. Na początku sygnał trafia na zestaw filtrów optycznych. Zastosowano filtry górnoprzepustowe (FELH650, FEL650, Thorlabs) oraz filtr pasmowy (ET675/20, Chroma lub FB670/10, Thorlabs). Odpowiedni dobór filtrów pozwala kontrolować, jaki zakres spektralny fali trafia na detektor oraz zredukować sygnał niezwiązany z emisją z próbki. Filtry emisyjne są umieszczone tuż przed detektorem, którym w użytym układzie eksperymentalnym jest kamera EMCCD model iXon3 firmy Andor. Detektor ten charakteryzuje się matrycą o rozmiarze 1024 x 1024 pikseli. Wydajność kwantowa w zakresie spektralnym wykorzystywanego emitera wynosiła ponad 90 %. Największą zaletą kamery EMCCD jest funkcja wzmocnienia rejestrowanego sygnału (EM, z ang. *electron multiplying*), która umożliwia znaczną poprawę stosunku sygnału do szumu. Podczas korzystania z tej opcji kamery sterowano napięciami przykładanymi do elektrod znajdujących się w każdym z układów elektronicznych tworzących piksele kamery. Zastosowanie funkcji *EMgain* umożliwia pomiar fluorescencji emiterów o niskiej wydajności kwantowej, a co ważniejsze, możliwe jest obrazowanie fluorescencji pojedynczych molekuł. Funkcja ta wykorzystywana była również podczas rejestrowania kinetyk fluorescencji.

Zaletą korzystania podczas eksperymentów z fluorescencyjnej mikroskopii szerokiego pola jest szybkość pomiarów, łatwość obsługi i możliwość obserwacji fluorescencji pojedynczych molekuł, co zapewnia zamontowany detektor. Wykonując całą mapę fluorescencji w ciągu 0,1 s, otrzymano informację o natężeniu fluorescencji na dużym obszarze w krótkim czasie. Natomiast rejestracja kinetyk fluorescencji daje informację o dynamice fluorescencji, co jest idealnym rozwiązaniem do badań nad platformami biosensorowymi.

4.3 Fluorescencyjna mikroskopia konfokalna i spektroskopia czasowo-rozdzielcza

Trzecią techniką stosowaną do badań zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej jest fluorescencyjna mikroskopia konfokalna. Technika ta umożliwia rejestrację map natężenia fluorescencji, krzywych zaniku oraz widm fluorescencji próbki. W przeciwieństwie do fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola, przy pomocy którego otrzymano mapy natężenia fluorescencji próbki w jednym pomiarze, dla tej techniki charakterystyczny jest pomiar w wybranym punkcie, bądź punkt po punkcie, aby otrzymać mapę natężenia fluorescencji. Układ eksperymentalny również znajduje się na wyposażeniu Katedry Nanofotoniki IF UMK. Do jego budowy zastosowano korpus Eclipse Ti-S firmy Nikon (rys. 36. (a)). Fluorescencyjny mikroskop konfokalny zbudowany przez dr. inż. Kamila Wiwatowskiego oraz autorkę niniejszej rozprawy doktorskiej.



Rys. 36. a) Zdjęcie fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego w Katedrze Nanofotoniki IF UMK, b) Uproszczony schemat budowy i działania fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego.

Fluorescencyjny mikroskop konfokalny zbudowano na stole optycznym. Dodatkowo cały układ odizolowano od światła, aby zablokować światło pochodzące z otoczenia (diody, ekrany komputerów). Układ optyczny jest uniwersalny, a poniżej opisane elementy optyczne dedykowane są pomiarom przeprowadzonym w niniejszej pracy. Źródłem promieniowania wzbudzającego był laser impulsowy o długości fali 485 nm firmy Becker&Hickl. Pierwszym elementem optycznym, na który trafia promieniowanie wzbudzające, jest filtr przestrzenny, który jest układem dwóch soczewek i przesłony konfokalnej o aperturze 25 µm umieszczonej pomiędzy nimi. Funkcją przesłony konfokalnej jest eliminacja z wiązki innych modów niż podstawowy mod gaussowski. Po przejściu przez filtr przestrzenny wiązka trafia na układ dwóch soczewek, który poszerza średnicę wiązki tak, aby wypełniła całą aperturę wejściową obiektywu. Następnie wiązka wprowadzana jest do korpusu firmy Nikon za pomocą peryskopu, czyli układu dwóch zwierciadeł.

W korpusie mikroskopu wiązka trafia na płytkę światłodzielącą 50:50. Połowa promieniowania kierowana jest na obiektyw immersyjny (Nikon) o powiększeniu 60x i aperturze numerycznej 1.4. Zdolność rozdzielcza mikroskopu jest definiowana przez średnicę plamki lasera, która jest zależna od zastosowanego obiektywu. Średnicę plamki lasera wychodzącą z obiektywu policzono z wykorzystaniem kryterium Rayleigha [136]:

$$r_{Airy} = \frac{1{,}22\,\lambda}{2\,NA} = \frac{1{,}22*485}{2*1{,}4} \approx 211\,nm \qquad (5)$$

gdzie: λ - długość fali promieniowania lasera, NA - apertura numeryczna obiektywu

Kryterium Rayleigha określa najmniejszą odległość pomiędzy dwoma obrazowanymi punktami, przy której możliwe jest jeszcze ich rozróżnienie.

Skupiona wiązka lasera wychodząca z obiektywu trafiała na próbkę, znajdującą się na stoliku piezoelektrycznym. W zastosowanym układzie wiązka wzbudzająca była nieruchoma, a podczas rejestrowania danych przesuwał się stolik piezoelektryczny, na którym umieszczona była próbka. Sygnał pochodzący z próbki był rejestrowany przez ten sam obiektyw, następnie padał on na płytkę światłodzielącą i za pomocą kolejnego zwierciadła był kierowany do części detekcyjnej mikroskopu. W tej części układu znajduje się przesłona konfokalna. Dzięki zastosowaniu przesłony konfokalnej w części detekcyjnej usunięto sygnał pochodzący z próbki poza miejscem skupienia wiązki. Sygnał po przejściu przez przesłonę konfokalną trafiał na filtr górnoprzepustowy (HQ655LP, Chroma), aby usunąć promieniowanie o długości fali poniżej 655 nm. Następnie za pomocą zwierciadeł sygnał kierowany jest na jeden z trzech detektorów.

Pierwszym pomiarem, który wykonuje się za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego jest mapa fluorescencji badanej próbki. Otrzymana mapa powinna odpowiadać tej uzyskanej za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola. Do rejestracji sygnału wykorzystano fotodiodę lawinową (APD) (SPCM-AQRH-16, Perkin Elmer). Przed fotodiodą umieszczono filtr pasmowy odpowiadający fluorescencji emitera (ET675/20, Chroma) oraz soczewkę skupiającą sygnał na obszarze aktywnym detektora. Maksymalny wymiar otrzymanej mapy fluorescencji może wynosić 100 x 100 μm i jest ograniczony zakresem przesuwu stolika piezoelektrycznego. Mapy fluorescencji zapisywano dzięki wykorzystaniu oprogramowania napisanego w środowisku programistycznym LabVIEW. Czas rejestracji mapy fluorescencji zależny jest od kroku przesuwu stolika piezoelektrycznego i wymiaru mapy. Średni czas otrzymywania mapy natężenia fluorescencji wynosi około 15 min. Z tego powodu ta technika nie może zostać wykorzystana do obrazowania w czasie rzeczywistym w szerokim polu obrazowania.

Drugim typem pomiaru, który wykonuje się za pomocą opisywanej techniki, jest pomiar widm fluorescencji próbki. W tym celu w układzie zamontowano kamerę CCD firmy Andor, model iDus DV 420A-BU. Przed kamerą sygnał ulegał dyspersji na pryzmacie Amiciego, zbudowanym z trzech pryzmatów o różnym współczynniku załamania światła. Zaletą pryzmatu Amiciego jest rozszczepienie wiązki i jednoczesne symetryczne rozchodzenie się wiązki wychodzącej względem osi optycznej toru detekcyjnego. Wiązka wychodząca skupiana była przez soczewkę na matrycy kamery CCD. Kamera iDus posiada matrycę 1024 x 255 pikseli, o wymiarze piksela 26 x 26 μm. Program sumuje sygnał z poszczególnych kolumn i przetwarza go na widmo fluorescencji. Dla zastosowań sensorycznych pomiar widma fluorescencji może być jedną z możliwości wykazania, że sygnał pochodzi od badanego emitera, a nie np. zanieczyszczeń.

Ostatnim wykonywanym pomiarem była rejestracja krzywych zaniku natężenia fluorescencji dzięki wbudowaniu do układu systemu czasowo skorelowanego zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC z ang. *time correlated single photon counting*). W tym przypadku detektorem jest szybka

fotodioda lawinowa idQuantique id100-50, przed którą umieszczono filtr pasmowy (ET675/20, Chroma) oraz soczewkę skupiającą sygnał na obszarze aktywnym detektora. W skład systemu zliczania pojedynczych fotonów wchodzi laser impulsowy, fotodioda lawinowa oraz karta pomiarowa (SPC-150, Becker&Hickl), które są za sobą połączone. Laser generuje impuls światła (z częstotliwością 20 MHz) jednocześnie z sygnałem elektrycznym doprowadzanym do karty pomiarowej. Gdy do fotodiody lawinowej dotrze foton ze wzbudzonej impulsem światła próbki jest on korelowany z impulsem referencyjnym. Karta analizuje czas jaki upłynął pomiędzy wysłaniem impulsu światła a zarejestrowaniem fotonu i w wyniku tego tworzony jest histogram natężenia fluorescencji w funkcji czasu. Podczas pomiaru należy zarejestrować taką ilość zdarzeń, aby z otrzymanego histogramu określić czas zaniku fluorescencji. Dla białek fotoaktywnych metoda ta może zostać uznana za destrukcyjną, ponieważ pomiar zwykle trwał kilkadziesiąt sekund i białka po pewnym czasie ulegają fotowybielaniu. Na opisywanym fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym możliwa jest obserwacja krzywych zaniku fluorescencji pojedynczych białek.

5. CELE PROJEKTU DOKTORSKIEGO

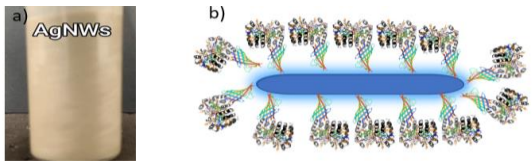
Autorka doktoratu na studiach magisterskich czynnie uczestniczyła w badaniach naukowych, których wyniki opublikowano w artykułach naukowych. Stały się one motywacją do kontynuowania pracy na studiach doktoranckich. Pierwszy z nich dotyczył wykrywania bakteriofagów przez nanodruty srebra, co dokładnie opisano w rozdziale *Przegląd Wybranych Eksperymentów* [122]. Drugi z nich opisuje obserwację za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola koniugacji *in-situ* białka PCP ze zmodyfikowanymi nanodrutami srebra [137]. Ta dwa artykuły naukowe stały się preludium do eksperymentów dotyczących wykorzystania nanodrutów srebra jako platform sensorowych.

Głównym celem projektu doktorskiego było zwiększenie potencjału nanodrutów srebra jako platform dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki. Cel ten planowano osiągnąć poprzez zaprojektowanie, a następnie przetestowanie różnych metod wykorzystania nanodrutów srebra jako platform biosensorowych.

Etapy realizacji projektu doktorskiego:

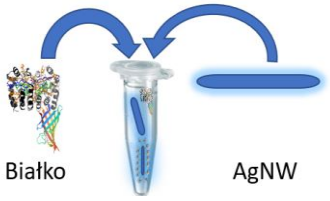
1. **Synteza i modyfikacja powierzchni nanodrutów srebra**

   Pierwszy etap pracy związany był z syntezą nanodrutów srebra, aby otrzymać próbki o możliwie jak najbardziej monodyspersyjne. Następnie opracowano metodę modyfikacji powierzchni nanodrutów srebra, którą wykorzystano w dwojaki sposób. Po pierwsze modyfikacja powierzchni nanodrutów srebra umożliwiała selektywną koniugację białka do powierzchni nanodrutów. Po drugie, nanodruty srebra mogły zostać trwale związane z podłożem szklanym, co jest istotne przy potencjalnym wykorzystaniu nanodrutów srebra jako platform biosensorowych.



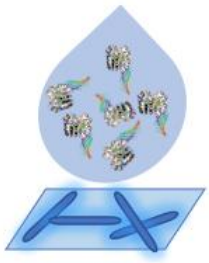
2. **Wykrywanie białka fotoaktywnego przez nanodruty srebra w roztworze**

   W pierwszym eksperymencie wykrywanie białka odbywało się w zawiesinie, w której umieszczono sfunkcjonalizowane nanodruty srebra oraz białko fotoaktywne. Celem było wykrycie wszystkich białek w roztworze poprzez długi czas inkubacji, co powinno umożliwić wykrycie białka o niskim stężeniu.



3. **Zastosowanie nanodrutów srebra na podłożu szklanym do wykrywania białka**

Drugim podejściem do wykrywania białka było wykorzystanie sfunkcjonalizowanych nanodrutów srebra osadzonych na podłożu szklanym. Nanodruty srebra osadzono w losowy sposób na podłożu szklanym. Celem była detekcja pojedynczych białek w czasie rzeczywistym. W tak zaprojektowanym eksperymencie spodziewano się obserwacji koniugacji pojedynczych białek do AgNWs.

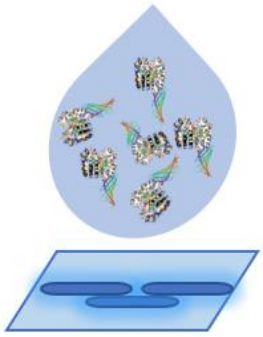


4. **Wpływ orientacji nanodrutów srebra na detekcję białka**

Wyniki uzyskane w poprzednim etapie wskazały na potrzebę orientacji nanodrutów srebra. W tym celu zaprojektowano i wykonano układ mikrofluidyczny, dzięki któremu możliwa była trwała orientacja nanodrutów srebra na zmodyfikowanym podłożu szklanym. Wykrywanie białka rejestrowano w czasie rzeczywistym w roztworze wprowadzonym do kanału, co zapobiegało parowaniu rozpuszczalnika.

5. **Badanie właściwości czipu ze zorientowanymi nanodrutami srebra**

Ostatnim etapem projektu doktorskiego było wykonanie plazmonowego czipu zawierającego ukierunkowane nanodruty srebra. Celem było otrzymanie czipu umożliwiającego wykrywanie białka w niskich stężeniach z zachowaniem aktywności plazmonowej nanodrutów srebra.



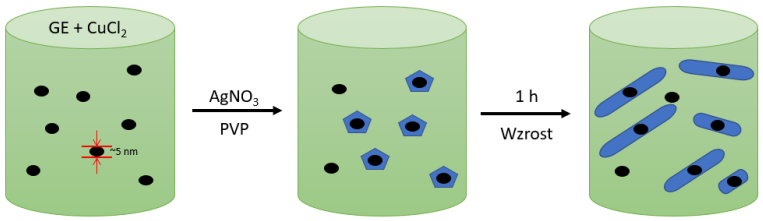
6. SYNTEZA I FUNKCJONALIZACJA POWIERZCHNI NANODRUTÓW SREBRA

W niniejszym rozdziale przedstawiono materiały wykorzystane w eksperymentach zawartych w rozprawie doktorskiej. Na początku przedstawiono metodę syntezy nanodrutów srebra oraz ich własności optyczne. Następnie opisano schemat funkcjonalizacji powierzchni nanodrutów srebra. Na końcu przedstawiono najistotniejsze dla rozprawy doktorskiej informacje o wykorzystywanym do badań emiterze - kompleksie fotoaktywnym perydinina-chlorofil-białko.

6.1 Synteza i właściwości optyczne nanodrutów srebra

Nanodruty srebra wykorzystane w badaniach zsyntezowano z użyciem metody poliol [122]. Metoda ta polega na redukcji azotanu srebra ($AgNO_3$) i chlorku miedzi (II) ($CuCl_2$) za pomocą glikolu etylenowego (GE). Atomy miedzi oraz zredukowane jony srebra tworzą klastry, które następnie formują zarodki. Na zarodkach na wybranych płaszczyznach krystalograficznych adsorbuje się polimer PVP. Następnie rozpoczyna się rozrost w jednym wymiarze, ponieważ polimer PVP blokuje wzrost w pozostałych wymiarach.

Syntezę przeprowadzono w następujący sposób: we fiolkach ze szkła oranżowego o objętości 30 ml umieszczono owalny element mieszający oraz 5 ml EG. Fiolki umocowano pionowo w łaźni olejowej i podgrzano do temperatury 155 °C. Po osiągnięciu zadanej temperatury odczekano 60 min. Po tym czasie dodano 40 µl roztworu 4 mM $CuCl_2$ x 2 H_2O w GE i odczekano 10 min. Wykorzystując pompę infuzyjną, dodawano jednocześnie roztwory o stężeniu molowym 94 mM $AgNO_3$ oraz 114 mM PVP po 3 ml z prędkością 27 ml/h. Po zakończeniu dodawania roztworów, fiolki szczelnie zamknięto i nadal mieszając pozostawiono na 60 min w temperaturze 155 °C. Syntezę zakończono poprzez gwałtowne schłodzenie mieszaniny.

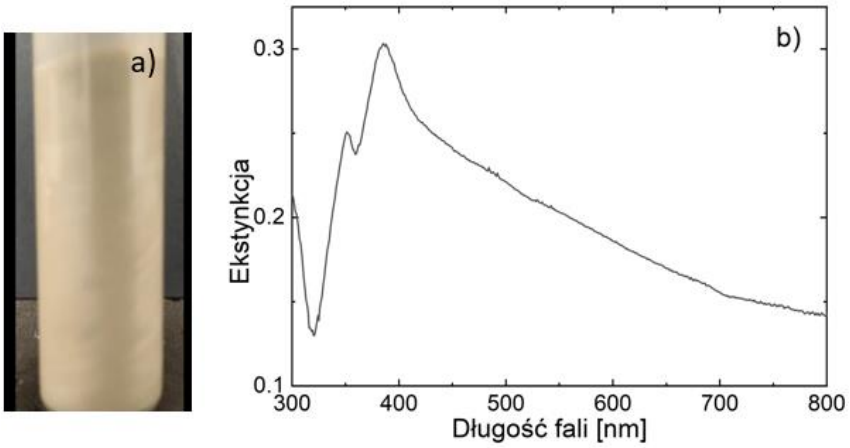


$$2\,HOCH_2 - CH_2OH \rightarrow 2\,CH_3CHO + H_2O$$
$$2CH_3CHO + CuCl_2 \rightarrow CH_3CO - COCH_3 + Cu + 2HCl$$

Rys. 37. Schemat syntezy nanodrutów srebra za pomocą metody poliol z zarodkami Cu. Na podstawie [138].

Proces oczyszczania AgNWs z GE przeprowadzono w następujący sposób: mieszaninę z każdej fiolki podzielono na 4 części, do każdej z nich dodano 8 ml acetonu HPLC. Każdą fiolkę odwirowano z prędkością 2000 rps przez 20 min. W tym czasie AgNWs osadziły się na dnie fiolek. Usunięto aceton z fiolek i do każdej fiolki dodano 2 ml wody destylowanej. Proces wirowania powtórzono. Oczyszczanie w wodzie destylowanej wykonano dwukrotnie, aby usunąć resztki acetonu i nanocząstek srebra, które powstają w procesie syntezy. Na końcu AgNWs zawieszono w 2 ml wody Milli-Q i umieszczono w ciemnej fiolce w lodówce. Tak przygotowane AgNWs w dalszej części pracy będą oznaczane AgNWs@PVP, ponieważ na powierzchni pozostaje cienka otoczka PVP, która je stabilizuje. Nanodruty srebra mogą być latami przechowywane w tych warunkach bez utraty ich właściwości.

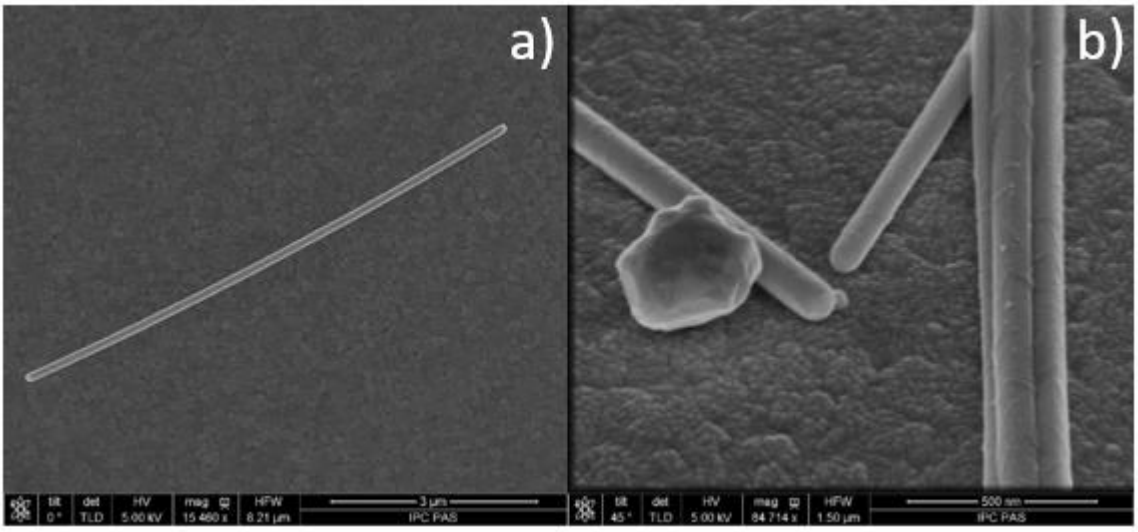
Właściwości optyczne nanodrutów srebra przedstawiono poniżej. Otrzymano zawiesinę o opalizującym szarosrebrnym odcieniu (rys. 38. (a)). Za pomocą spektrofotometru UV-VIS wykonano pomiar ekstynkcji zawiesiny AgNWs (rys. 38. (b)). Otrzymane widmo ekstynkcji jest podobne do tych zaprezentowanych w literaturze, dlatego można stwierdzić, że są to AgNWs [138]. Pasmo rezonansu plazmonowego AgNWs przypada dla długości fali około 400 nm i rozciąga się aż do podczerwieni. Dzięki temu AgNWs mogą wpłynąć na własności optyczne fluoroforów w szerokim zakresie spektralnym, czego nie są w stanie osiągnąć inne nanocząstki metaliczne. W kolejnym kroku próbka z AgNWs była obrazowana za pomocą mikroskopu optycznego, aby określić ilość nanocząstek srebra. Ilość nanodrutów srebra i nanocząstek srebra jest inna dla każdej syntezy, pomimo wykonywania zawsze takiej samej procedury. Ze względu na złożoność eksperymentów dotyczących wykorzystania AgNWs jako platform biosensorowych nie skupiano się na optymalizacji syntezy i wykorzystywano zawiesimy AgNWs, które były pozbawione dużej ilości nanocząstek srebra.



Rys. 38. a) Zdjęcie zawiesiny AgNWs b) Przykładowe widmo ekstynkcji zawiesiny nanodrutów srebra.

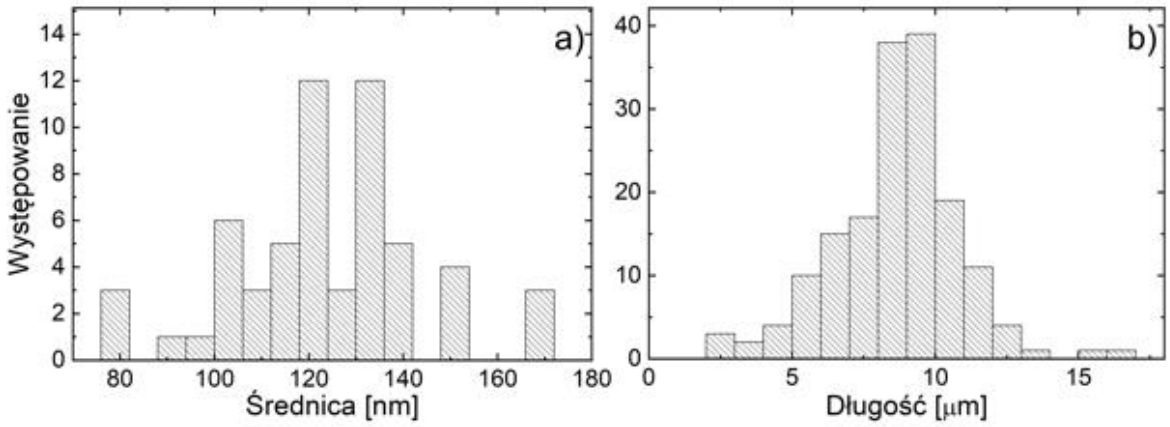
Rozkłady średnic i długości AgNWs wyznaczono ze zdjęć uzyskanych za pomocą SEM (rys. 39.). Na podłoże ITO nakropiono 15 µl AgNWs w stosunku 1:10 z wodą destylowaną i następnie rozwirowano za pomocą powlekacza obrotowego z prędkością 20 rps. Na rys. 39. (a) zaprezentowano zdjęcie SEM pojedynczego nanodrutu srebra, którego powierzchnia wydaje się jednorodna, a końce

zaokrąglone. Na zdjęciu wykonanym pod kątem 45º i z większym powiększeniem zaobserwowano, że powierzchnia AgNWs pokryta jest polimerem PVP (rys. 39. (a)).



Rys. 39. Zdjęcia nanodrutów srebra wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego a) pojedynczy AgNW w podstawowym trybie SEM b) AgNWs w trybie ustawienia próbki pod kątem 45°.

Na podstawie uzyskanych zdjęć SEM wykonano analizę średnic i długości AgNWs. Na rys. 40. zaprezentowano histogramy prezentujące rozkład średnic i długości AgNWs. Średnia wartość średnic z 58 nanodrutów wynosi 123 nm. Odchylenie standardowe wynosi 20 nm. Pomiar długości wyznaczono z 165 nanodrutów. Średnia wartość długości wynosi 8,6 µm, a odchylenie standardowe wynosi 2,2 µm.



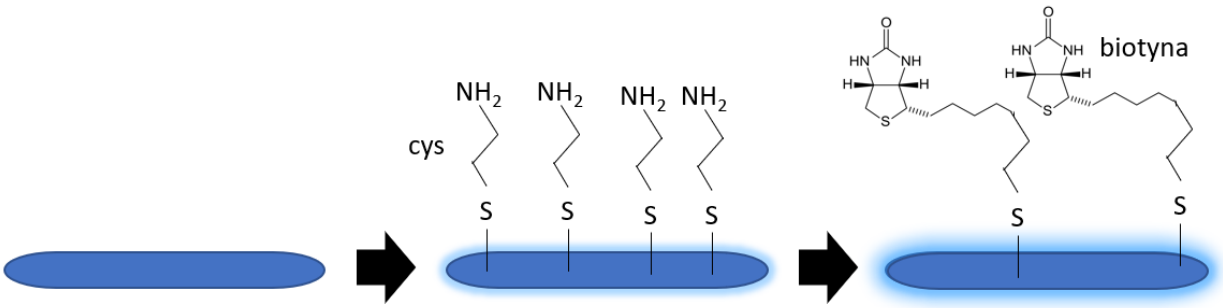
Rys. 40. Histogram ilustrujący dyspersję a) średnic oraz b) długości nanodrutów srebra.

W kontekście zastosowania AgNWs w masowej produkcji wybrana metoda syntezy ma duży potencjał. Bazując na doświadczeniu prof. Grzegorza Celichowskiego z grupy prof. Jarosława Grobelnego, wiadomo jest, że niewielkim nakładem pracy można przeskalować syntezę AgNWs metodą poliol. Możliwe jest zwiększenie objętości wykorzystywanych roztworów, co przełoży się na ilość zsyntezowanych AgNWs, a dodatkowo uzyskana zawiesina zawierać będzie liczne AgNWs. Po optymalizacji warunków syntezy powinno być możliwe zmniejszenie ilości nanocząstek w zawiesinie AgNWs. Planując masową produkcję, należy uwzględnić wybór metody poliol jako słuszny z powodu

pozostającej niewielkiej ilości odpadów po syntezie. Do syntezy potrzeba niewiele odczynników oraz nie jest wymagana droga aparatura. Pozostaje jedynie aceton oraz woda. Opisane cechy syntezy AgNWs pokazują, że jest ona dobrym wyborem w kontekście potencjalnych zastosowań komercyjnych.

6.2 Funkcjonalizacja powierzchni nanodrutów srebra

Do eksperymentów w tej rozprawie wykorzystano dwuetapowy proces funkcjonalizacji powierzchni AgNWs. Funkcjonalizacja powierzchni ma za zadanie umiejscowić receptor do specyficznego rozpoznawania białka. Powierzchnia nanodrutów zostanie wykorzystana jako platforma dla grup funkcyjnych, które można określić jako warstwę receptorową. W pierwszym etapie do powierzchni AgNWs dołączana jest cysteamina, a następnie do niej biotyna-NHS (rys. 41.). Przepis zaczerpnięto z publikacji [137].



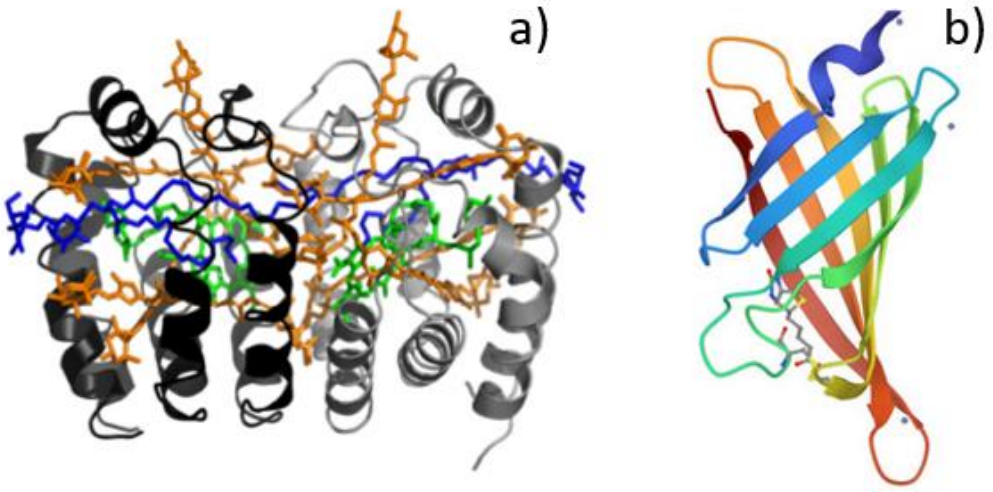
Rys. 41. Schemat funkcjonalizacji powierzchni nanodrutów srebra za pomocą cysteaminy i biotyny.

W pierwszym kroku 100 µl AgNWs@PVP odwirowano z prędkością 2000 rpm przez 20 min. Roztwór znad osadu wymieniono na 100 µl alkoholu etylenowego (EtOH), w którym rozdyspergowano AgNWs i dodano 100 µl roztworu 0,5 mM cysteaminy (Sigma-Aldrich, 30070). Cysteamina połączyła się z powierzchnią AgNW poprzez siarkę, natomiast wolna pozostała grupa aminowa. Tak przygotowaną zawiesinę pozostawiono na 2 godziny w temperaturze 4 °C, a po tym czasie odwirowano z prędkością 2000 rpm przez 20 min, po czym usunięto nadmiar EtOH. Nie doprowadzając do wyschnięcia pokrytych cysteaminą nanodrutów (AgNW@cys), dodano 100 µl dimetylosulfotlenku HPLC (DMSO), a po zdyspergowaniu AgNWs wkroplono 1 µg/ml biotyny-NHS (Sigma-Aldrich, B4531). Zawiesinę pozostawiono na noc w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej.

Po 16 h funkcjonalizacji zawiesinę AgNW@cys@biotyna odwirowano z prędkością 6000 rpm przez 20 min. Następnie po usunięciu nadmiaru DMSO, AgNWs rozdyspergowano w 200 µl wody Milli-Q. Jednym z problemów funkcjonalizacji jest właściwa ilość grup funkcyjnych na modyfikowanej powierzchni, gdy będzie ich za mało emiter nie pokryje jednorodnie powierzchni AgNWs. Zmodyfikowane AgNWs posiadają aktywną powierzchnię przez kilka miesięcy, jednak, aby wykluczyć degradację zmodyfikowanej powierzchni AgNWs i jej negatywny wpływ na uzyskane wyniki, przed każdym eksperymentem wykonywano nową funkcjonalizację.

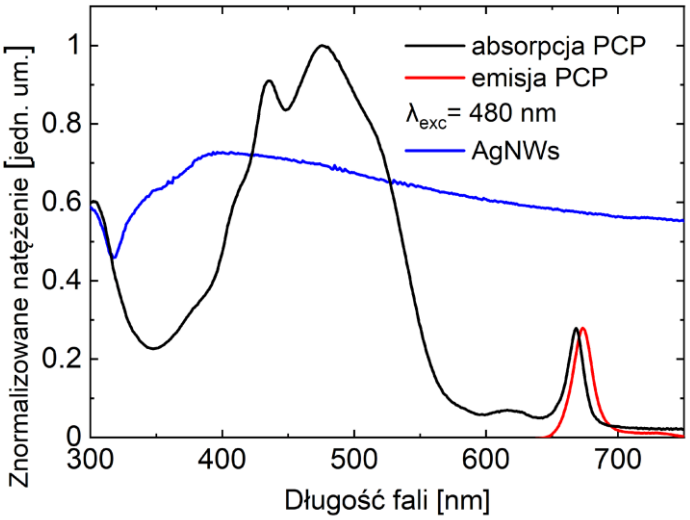
6.3 Kompleks fotoaktywny perydynina-chlorofil-białko

Emiterem użytym w badaniach opisanych w rozprawie doktorskiej jest kompleks barwnikowo-białkowy perydynina-chlorofil-białko (PCP, z ang. *peridinin-chlorophyll-protein*) z dołączoną streptawidyną. Jest to rozpuszczalne w wodzie białko występujące naturalnie w algach *Amphidinium carterae* z rodziny Dinoflagellates, w których pełni funkcję antenową. Naturalnie PCP występuje w formie trymerów. PCP wykorzystywane do eksperymentów zakupiono w firmie BD-Pharmingen (nr 554064), w której jest sprzedawane jako monomer PCP z dołączoną streptawidyną [139]. W skład monomeru wchodzi osiem perydynin, dwa chlorofile *a* oraz matryca białkowa (rys. 42. (a)). Wielkość całej molekuły wynosi około 4 nm, a same chlorofile są w odległości około 1,7 nm od siebie [140]. Strukturę PCP określono z rozdzielczością 2.0 Å [140], dzięki zastosowaniu krystalografii rentgenowskiej. Streptawidyna jest białkiem tetramerycznym, prawie dwukrotnie większym od PCP, a jej strukturę zaprezentowano na rys. 42. (b).



Rys. 42. a) Struktura monomeru kompleksu perydynina-chlorofil-białko z oznaczonymi chlorofilami a (zielony), perydyninami (pomarańczowy) oraz matrycą białkową (szary) b) Struktura monomeru streptawidyny z E. Coli. Zaczerpnięto z [141].

Widmo absorpcji oraz emisji PCP przedstawiono na rys. 43. Widmo absorpcji PCP charakteryzuje się intensywnym i szerokim pasem w zakresie spektralnym od 350 nm do 550 nm, za które odpowiadają perydyniny, natomiast absorpcji chlorofilu przypisane są dwa pasma 440 nm (pasmo Soreta) oraz 660 nm (pasmo Q_y). Stosunek perydynin do chlorofili wynosi 4:1, co sprawia, że są one głównym pigmentem odpowiedzialnym za absorpcję światła. Emisja oznaczona na rys. 43. pochodzi z chlorofili i ma maksimum dla długości fali 673 nm [131,140,142]. Na rys. 43. umieszczono widmo ekstynkcji zawiesiny AgNWs, które przekrywa się z widmem absorpcji PCP.



Rys. 43. Znormalizowane widmo absorpcji (czarny) emisji kompleksu fotoaktywnego PCP (czerwony) oraz ekstynkcji AgNWs (niebieski).

Kompleks fotoaktywny PCP był już szeroko stosowany w kontekście badań optycznych nanostruktur hybrydowych, włączając w to oddziaływanie ze wzbudzeniem plazmowym obecnym w nanodrutach srebra [131, 143, 144], jak i w kontekście przekazu energii do warstwy grafenu [145, 146]. Tak szerokie wykorzystywanie PCP zawdzięcza cechom, takim jak: stabilność, dostępność, rozpuszczalność w wodzie, szerokie widmo absorpcji oraz prosta struktura. W badaniach wykonanych w ramach rozprawy doktorskiej białko PCP użyto jako układ modelowy.

7. WYKRYWANIE BIAŁKA W ROZTWORZE

W niniejszym rozdziale przedstawiono podejście, w którym nanodruty srebra inkubowano z białkiem PCP w roztworze i następnie osadzono w matrycy polimerowej. Spodziewano się, że białko fotoaktywne PCP wydajnie skoniuguje ze zmodyfikowanymi nanodrutami srebra. Założono, że białko fotoaktywne PCP skoniuguje równomiernie z wszystkim AgNWs i zobrazowanie kilku drutów da pogląd na całą próbkę. Podejście to miało pozwolić na wykrywanie białka fotoaktywnego w niskim stężeniu. Na początku rozdziału opisano szczegóły eksperymentu umożliwiające jego powtórzenie. Następnie zaprezentowano wyniki wykrywania białka z długim (16 h) oraz krótkim (5 min) czasem inkubacji.

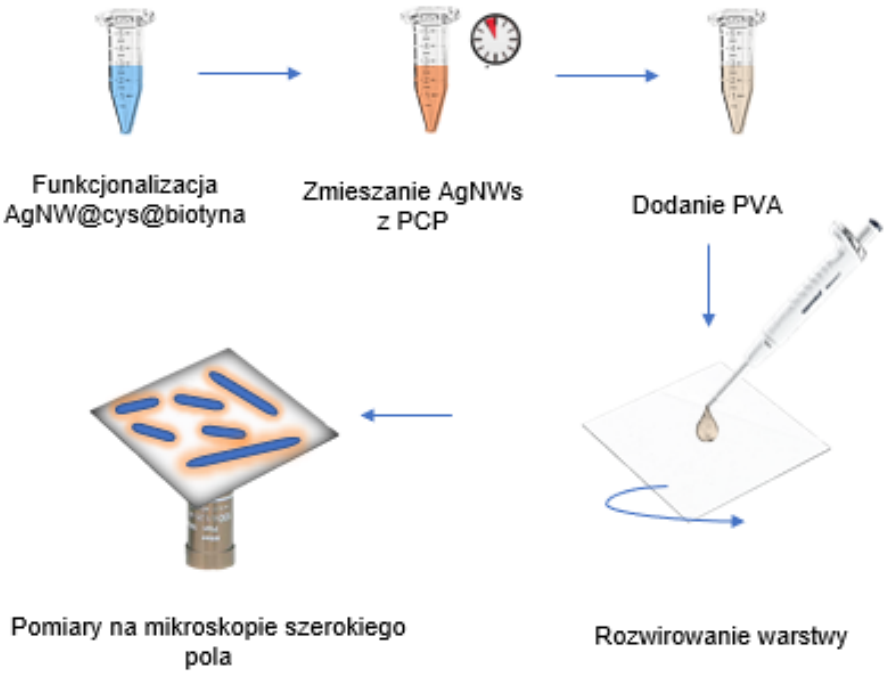
7.1 Opis wykonania eksperymentu

Eksperymenty przeprowadzono w plastikowej próbówce, w której do stałej objętości zawiesiny AgNWs dodawano białko fotoaktywne PCP o zmniejszającym się stężeniu (rys. 44.). Następnie po określonym czasie koniugacji do mieszaniny dodano roztwór poli(alkoholu winylowego) (PVP). PVP jest to polimer, dzięki któremu możliwe jest zatrzymanie koniugacji i utworzenie jednorodnej warstwy po rozwirowaniu roztworu. Polimer PVA zakupiono w Sigma Aldrich (11773, M_w = 125 000).

Do 10 µl AgNWs dodano 5 µl białka fotoaktywnego PCP o stężeniu 0,2 µg/ml. Po 16 h koniugacji dodano do próbki 15 µl polimeru PVA, aby otrzymać końcowe stężenie polimeru 0,2 %. Szkiełka umyto w roztworze Hellmanexu, który jest alkaicznym roztworem stosowanym do czyszczenia elementów optycznych, opracowanym przez firmę Hellma. Szkiełka nakrywkowe w teflonowym statywie umieszczono w 2% wodnym roztworze Hellmanexu i całość wstawiono do płuczki ultradźwiękowej w 35°C na 30 min. Następnie wymieniono roztwór Hellmanexu na wodę destylowaną i kontynuowano mycie szkiełek jeszcze przez 15 min. Opisaną procedurę mycia szkiełek stosowano do wszystkich podłoży szklanych wykorzystywanych do badań zamieszczonych w rozprawie doktorskiej. Otrzymaną zawiesinę AgNWs, PCP i PVA nawirowano na czyste szkiełko nakrywkowe za pomocą powlekacza obrotowego, aby utworzyć jednorodną warstwę. Prędkość wirowania dla wszystkich próbek wynosiła 20 rps. Otrzymana warstwa miała grubość około 50 nm.

Przygotowane próbki zostały zbadane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola opisanego w rozdziale *Techniki Eksperymentalne*. Mikroskop fluorescencyjny szerokiego pola pozwala na wykonanie map natężenia fluorescencji o rozmiarze 90 x 90 µm w czasie 0,1 s. Do wzbudzenia fluorescencji PCP wykorzystano oświetlacz LED o długości fali 480 nm o mocy 100 µW.

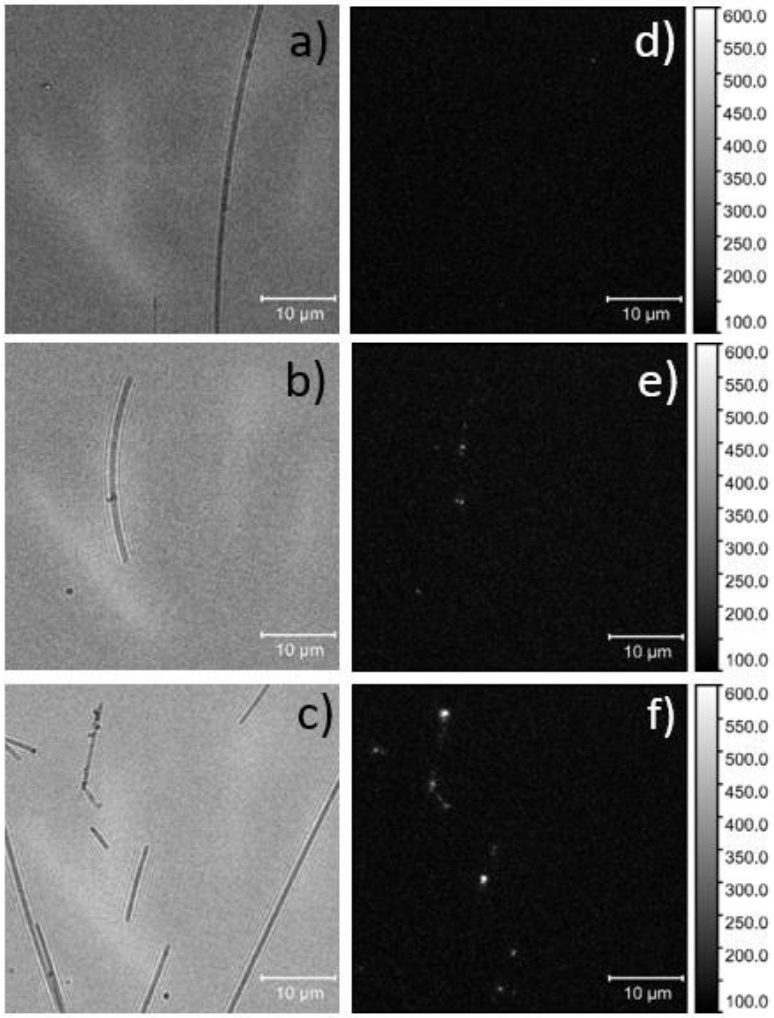
Wykorzystano filtr FELH650 i 675/25. Wzmocnienie sygnału wynosiło 100, a czas akwizycji 0,1 s. Opisane parametry są identyczne w eksperymencie z długim i krótkim czasem inkubacji.



Rys. 44. Schemat eksperymentu wykrywania białka fotoaktywnego poprzez koniugację ze sfunkcjonalizowanymi AgNWs w roztworze.

7.2 Eksperyment z długim czasem (16 h) inkubacji

Pierwszy eksperyment przedstawia wykrywanie białka PCP o stężeniu 0,2 µg/ml po 16 h inkubacji. Tak zaprojektowany eksperyment miał umożliwić przyłączenie się wszystkich białek fotoaktywnych PCP do AgNWs. Stężenia białka dobrano na podstawie wcześniejszych testów. Mapy transmisji oraz odpowiadające im mapy natężenia fluorescencji PCP otrzymane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola przedstawiono na rys. 45. Zaletą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola jest otrzymanie mapy transmisji i fluorescencji w dokładnie tym samym miejscu, co pozwala na określenie, czy na powierzchni AgNWs znajduje się skoniugowane białko PCP. Na rys. 45. (a-c) przedstawiono zestaw map transmisji AgNWs. Na mapach transmisji są widoczne jako ciemne linie. Odpowiadające im mapy natężenia fluorescencji PCP przedstawiono na rys. 45. (d-f). Na mapach fluorescencji PCP zaobserwowano nieliczne jasne punkty, które po porównaniu z mapą transmisji odpowiadają pozycji AgNWs. Zdecydowana większość powierzchni AgNWs pozostaje ciemna, co oznacza że białko PCP nie przyłączyło się do AgNWs lub uległo degradacji. Eksperyment z długim czasem inkubacji nie pozwolił na wykrycie białka PCP przez nanodruty srebra.



Rys. 45. Mapy transmisji (a-c) oraz odpowiadające im mapy natężenia fluorescencji PCP (d-f) na AgNWs w matrycy PVA po 16 h koniugacji.

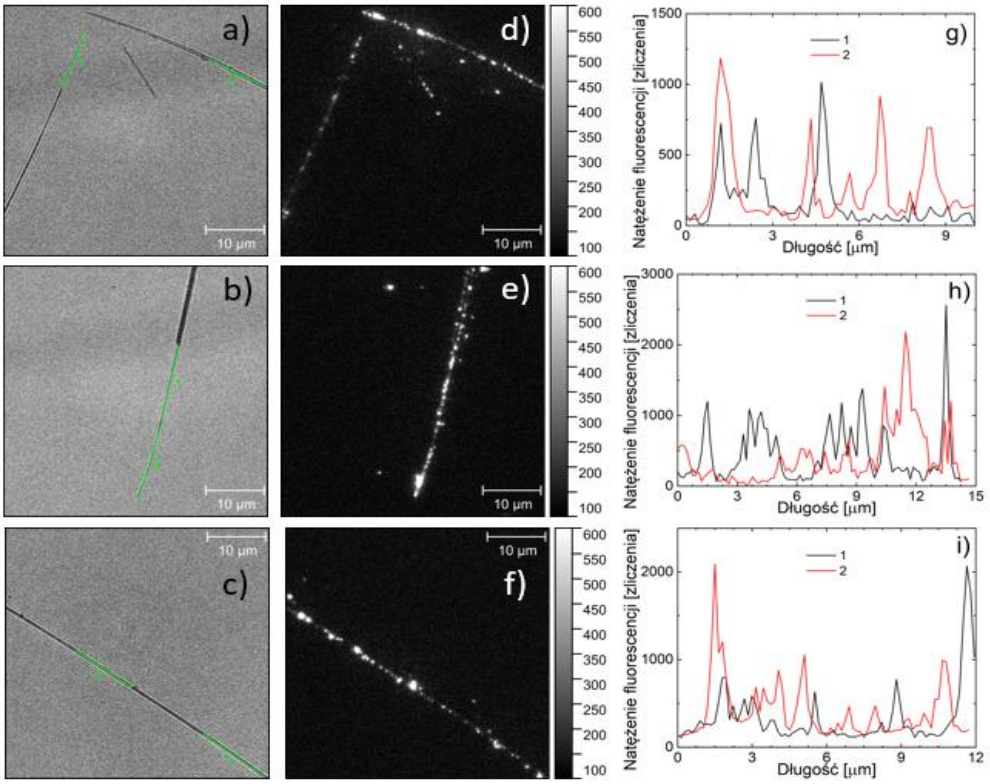
7.3 Eksperyment z krótkim czasem (5 min.) inkubacji

Po 16 h koniugacji białka z nanodrutami srebra zdecydowano się na inne podejście do eksperymentu. Czas koniugacji skrócono do 5 min. Jest to przybliżony czas odpowiadający wykonaniu domowych testów diagnostycznych. Na podstawie wcześniejszych eksperymentów wiadomo, że koniugacja jest szybka, około 2 sekund [137]. Jednak przy niskim stężeniu białka, musi ono znaleźć się w pobliżu powierzchni AgNWs i dlatego konieczny jest dłuższy czas inkubacji. Uznano, że objętość zawiesiny AgNWs będzie taka sama dla całej serii pomiarowej, natomiast zwiększana będzie objętość roztworu białka PCP o tym samym stężeniu (0,2 µg/ml). Zastosowane proporcje AgNWs oraz PCP wymieniono w tab. 1. Na podstawie współczynnika ekstynkcji roztworu PCP zmierzonego przed eksperymentem, oszacowano, ile molekuł PCP znajduje się w wykorzystywanych roztworach (tab. 1.). Oszacowano również ilość AgNWs znajdujących się w 10 µl zawiesiny. Wartości te są wartościami przybliżonymi, zaprezentowanie ich ma na celu zobrazowanie stosunku AgNWs do PCP.

	Proporcje (PCP 0,2 µg/ml)	Ilość PCP w dodawanej objętości	Stężenie PCP µg/ml	Ilość PCP/AgNWs, przy założeniu, że mamy 1,5 miliona AgNWs
1.	10 ul AgNWs + 1 ul PCP	1,3E+08	0,0182	~ 100
2.	10 ul AgNWs + 5 ul PCP	6,6E+08	0,0667	~ 440
3.	10 ul AgNWs + 15 ul PCP	2,0E+09	0,12	~ 1300
4.	10 ul AgNWs + 30 ul PCP	3,9E+09	0,15	~ 2600
5.	10 ul AgNWs + 60 ul PCP	7,9E+09	0,17	~ 5200

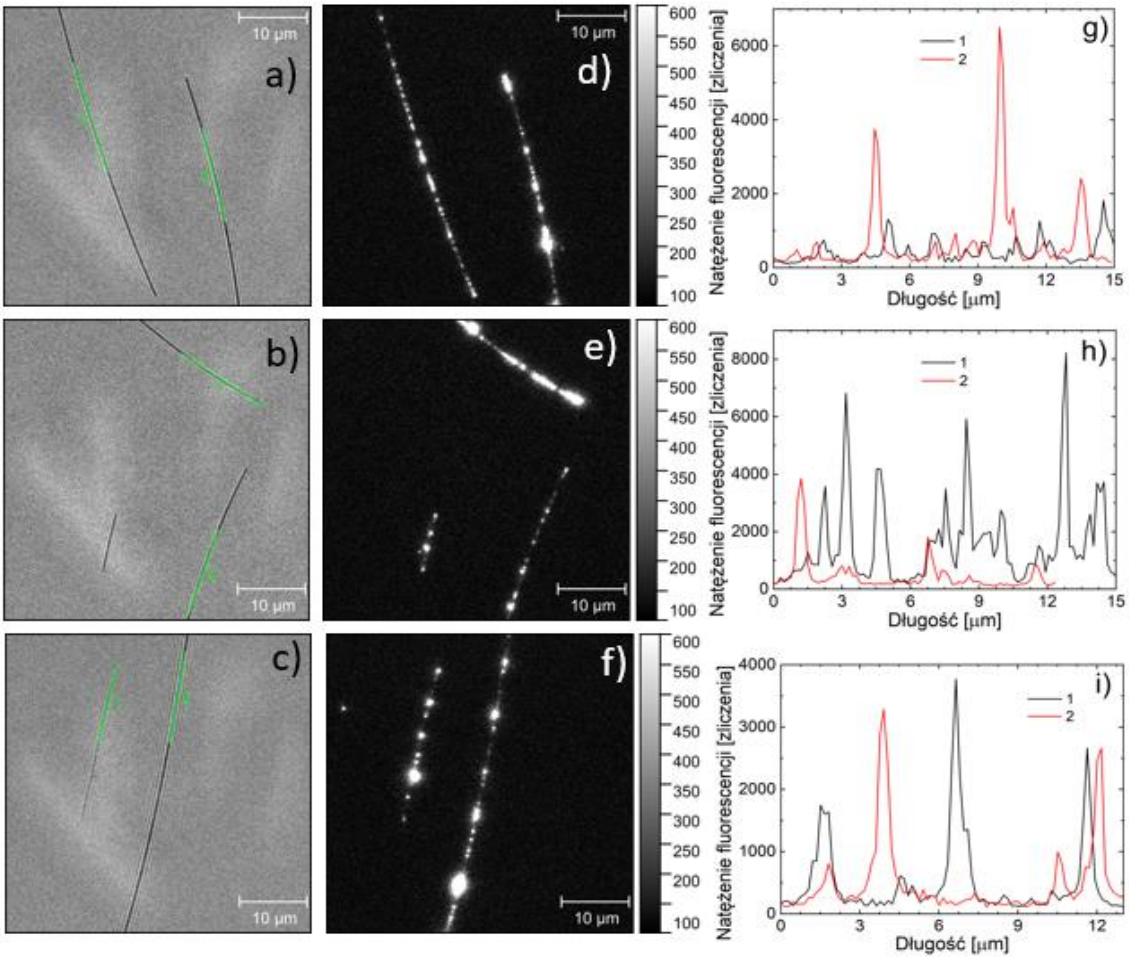
Tab. 1. Przybliżone proporcje AgNWs oraz PCP wraz z wyliczeniem stężenia PCP w danej objętości.

Pierwszą próbkę przygotowano poprzez zmieszanie 10 µl AgNWs i 60 µl PCP. Po 5. min. dodano 70 µl polimeru PVA. Następnie 40 µl tak otrzymanej zawiesiny rozwirowano na szkiełku nakrywkowym. Stężenie PCP dla tej próbki wynosiło 0,17 µg/ml. Na mapach transmisji światła białego przedstawionych na rys. 46. (a-c), znajdują się nanodruty srebra. Zlokalizowanie AgNWs w trybie transmisyjnym nie było proste, ponieważ było ich mało na podłożu szklanym. Na mapach natężenia fluorescencji PCP na AgNWs wykonanych dla tych samych obszarów, zaobserwowano jasne punkty, które pokrywają powierzchnię AgNWs w sposób ziarnisty (rys. 46. (d-f)). Jasne punkty odpowiadają emisji PCP. Emisja ta jest silnie skorelowana z położeniem AgNWs, które są pokryte białkiem fotoaktywnym w sposób niejednorodny. Tę obserwację potwierdzają wykresy, na których przedstawiono przekrój wzdłuż wybranych AgNWs (rys. 46. (g-i)). Piki, widoczne na wykresie mają natężenie od 800 do 2500 zliczeń. Świadczy to o silnej tendencji białka do tworzenia aglomeratów. Jest to wynik jakościowo różny od wyniku eksperymentu, w którym koniugacja prowadzona była przez 16 h.



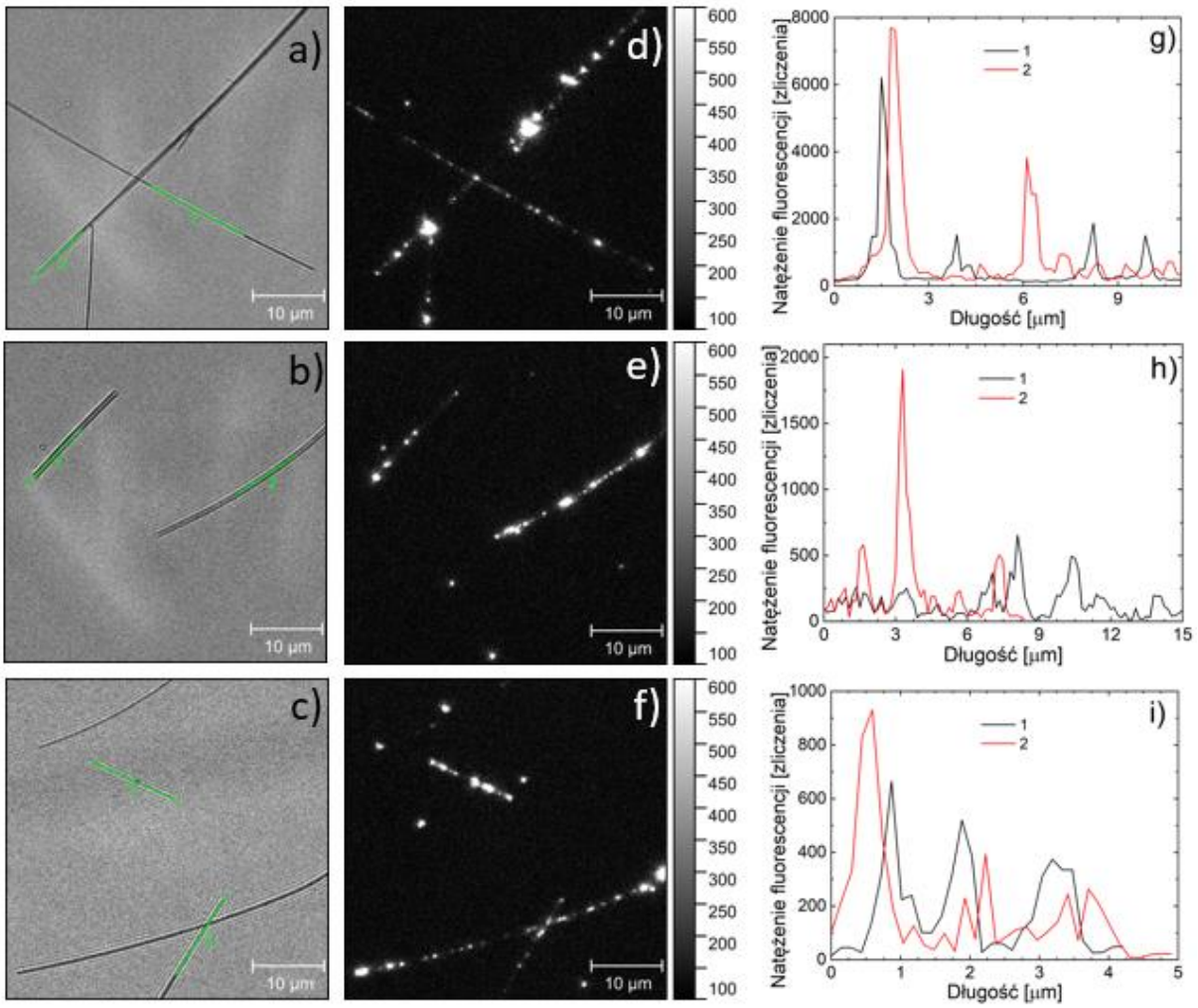
Rys. 46. Przykładowe mapy transmisji AgNW (a-c) oraz natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs (d-f) i osadzonych w matrycy PVA dla proporcji 10 µl AgNW i 60 µl PCP wraz z przekrojami wzdłuż wybranych AgNWs (g-i).

Drugą zbadaną próbkę wykonano z proporcji: 10 µl AgNWs i 30 µl PCP koniugowanych przez 5 min. Następnie dodano 40 µl polimeru PVA i 40 µl rozwirowano na szkiełku nakrywkowym. Stężenie PCP dla tej próbki wynosiło 0,15 µg/ml. Wybrane do obrazowania AgNWs przedstawiono na mapie transmisji światła białego (rys. 47. (a-c)). Na mapach natężenia fluorescencji PCP na AgNWs wykonanych dla tych samych obszarów, zaobserwowano jasne punkty (rys. 47. (d-f)). Na próbce zauważono mniej punktów wykazujących silną fluorescencję. Średnia wartość natężenia fluorescencji PCP jest zbliżona do próbki o proporcjach 10 ul AgNW i 60 ul białka. Potwierdzają to wykonane przekroje wzdłuż badanych AgNWs (rys. 47. (g-i)). Na wykresach odnotowano piki, które mają od 1000 zliczeń do prawie 8000 zliczeń, co świadczy o obecności aglomeratów PCP na powierzchni AgNWs. Zmniejszenie objętości PCP o połowę nie wpłynęło na jednorodność pokrycia AgNWs. W publikacjach, w których koniugowano białka do nanodrutów srebra nie zaobserwowano wcześniej efektu niejednorodnego pokrycia powierzchni AgNWs [147–149]. Jednak w tych publikacjach wykorzystywano nadmiar białka, dłuższy czas koniugacji oraz niezwiązane białka usuwano poprzez trzykrotne odwirowanie koniugatu. Być może odwirowanie niezwiązanych kompleksów fotoaktywnych pomogłoby usunąć nadmiar zaglomerowanych białek, jednak skupiono się na celu eksperymentu.



Rys. 47. Przykładowe mapy transmisji AgNW (a-c) oraz natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs (d-f) i osadzonych w matrycy PVA dla proporcji 10 µl AgNW i 30 µl PCP wraz z przekrojami wzdłuż wybranych AgNWs (g-i).

Trzecią próbkę przygotowano z następujących proporcji: 10 µl AgNWs i 15 µl PCP koniugowanych przez 5 min. Do próbki dodano 25 µl polimeru PVA i całość identycznie, jak w poprzednim przypadku, rozwirowano. Stężenie PCP dla tej próbki wynosiło 0,12 µg/ml. Na rys. 48. (a-c) zaprezentowano mapy transmisji światła białego z odnalezionymi AgNWs. Znalezione AgNWs często pokrywają się i leżą jeden na drugim, jeśli było to możliwe unikano takich miejsc. Mapy natężenia fluorescencji przedstawiają jasne punkty (rys. 48. (d-f)). Jasne punkty zinterpretowano w poprzednich próbkach jako aglomeraty białka PCP. Aglomeratów PCP na powierzchni AgNWs jest zauważalnie mniej niż w drugiej próbce. Przekroje wzdłuż wybranych AgNWs zaprezentowano na rys. 48. (g-i). Widoczne piki mają od 200 do prawie 8000 zliczeń, jednak zdecydowana większość ma poniżej 1000 zliczeń.

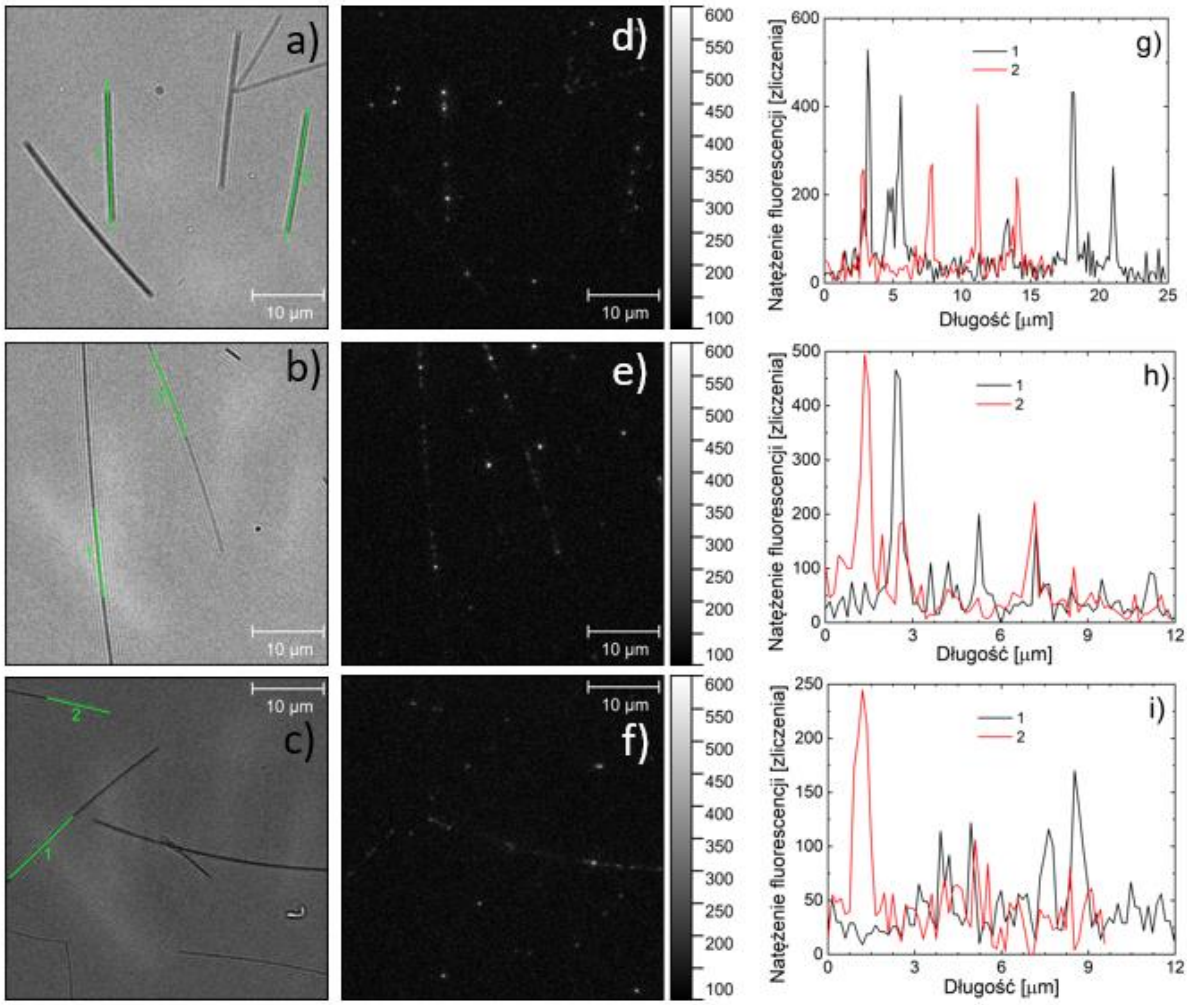


Rys. 48. Przykładowe mapy transmisji AgNW (a-c) oraz natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs (d-f) i osadzonych w matrycy PVA dla proporcji 10 µl AgNW i 15 µl PCP wraz z przekrojami wzdłuż wybranych AgNWs (g-i).

Czwartą próbkę wykonano dla proporcji 10 µl AgNWs i 5 µl PCP koniugowanych przez 5 min. Następnie dodano 15 µl polimeru PVA i całość rozwirowano. Stężenie PCP dla tej próbki wynosiło 0,0667 µg/ml. Mapy transmisji światła białego (rys. 49. (a-c)) przedstawiają znalezione AgNWs. Ich ilość zauważalnie wzrosła. Na rys. 49. (d-f) przedstawiono mapy natężenia fluorescencji PCP

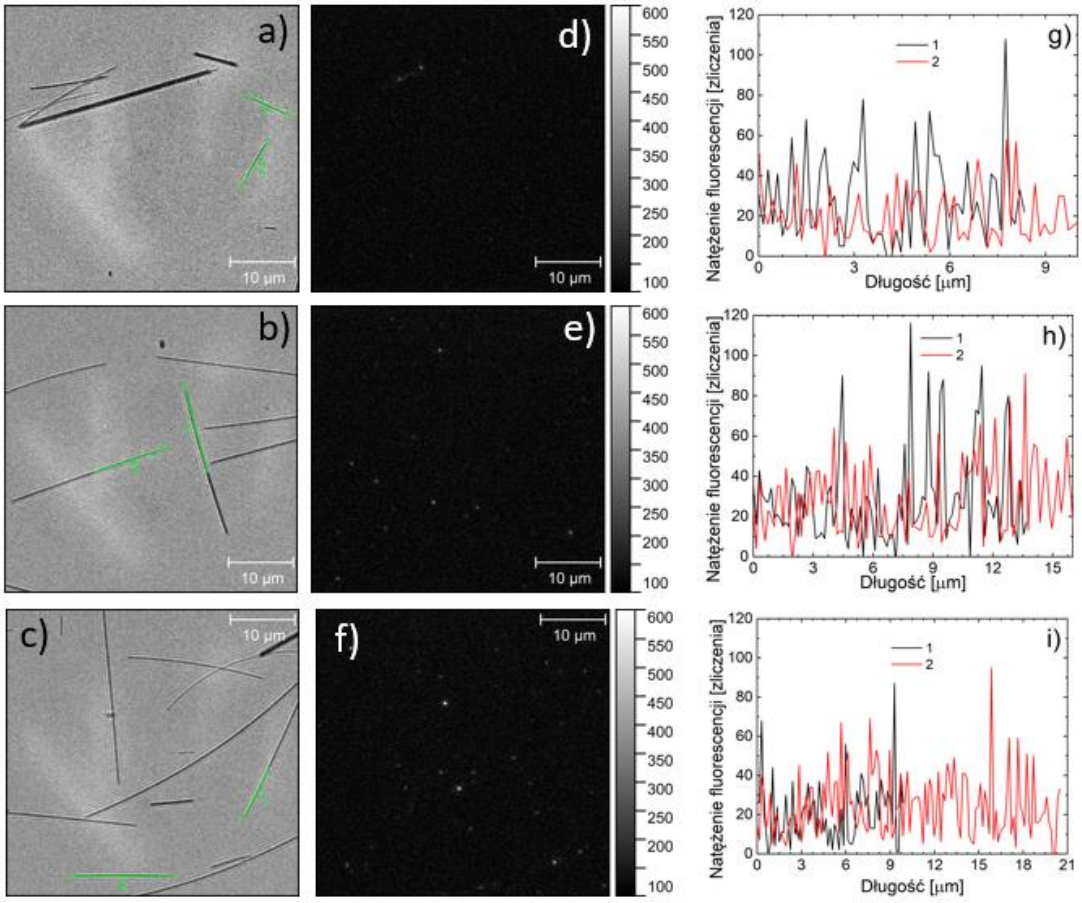
skoniugowanego z AgNWs. Zaobserwowano na niej odseparowane pojedyncze punkty, których natężenie fluorescencji jest mniejsze i bardziej homogeniczne niż na rys. 48. Nie wszystkie punkty odpowiadają położeniu AgNWs. Punkty są interpretowane jako białko PCP. Rys. 49. (g-i) prezentuje przekroje wzdłuż wybranych AgNWs. Na umieszczonych przekrojach AgNWs rozrzut natężeń fluorescencji PCP wynosi od 100 do 600 zliczeń. Piki o natężeniu 300 zliczeń mogą pochodzić od pojedynczego PCP, te o większym natężeniu pochodzą prawdopodobnie od aglomeratów złożonych z dwóch białek fotoaktywnych PCP. Warto również zwrócić uwagę, na to, że średnica plamki promieniowania wychodzącego z obiektywu jest znacznie większa od rozmiaru białka PCP, więc możliwe jest rejestrowanie sygnału z wielu molekuł w tym samym czasie.

Podsumowując wynik przeprowadzonego eksperymentu, próbka jest jednorodna. Białko PCP pozostało aktywne po 5 min koniugacji, co oznacza, że po długotrwałej, trwającej 16 h koniugacji uległo ono degradacji. Możliwe jest też wykrywanie fluorescencji pojedynczych białek.



Rys. 49. Przykładowe mapy transmisji AgNW (a-c) oraz natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs (d-f) i osadzonych w matrycy PVA dla proporcji 5 µl AgNW i 30 µl PCP wraz z przekrojami wzdłuż wybranych AgNWs (g-i).

Piątą próbkę uzyskano dla proporcji 10 µl AgNWs + 1 µl PCP + 11 µl PVA, dane zaprezentowano na rys. 50. Stężenie PCP dla tej próbki wynosiło 0,0182 µg/ml. Na zaprezentowanych mapach transmisji światła białego widoczne są AgNWs, których jest znacznie więcej na obrazowanym obszarze, niż w przypadku poprzednich próbek (rys. 50. (a-c)). Na mapach natężenia fluorescencji PCP widoczne są pojedyncze punkty na całej mapie (rys. 50. (d-f)). Nie zaobserwowano korelacji pozycji punktów z pozycją AgNWs. Pojedyncze PCP nie przyłączyło się do AgNWs, ale jednocześnie nie uległo degradacji. Przekroje wzdłuż wybranych AgNWs zaprezentowano na rys. 50. (g-i). Piki na przekrojach są słabo widoczne i ich natężenia nie przekraczają 120 zliczeń. Widoczny jest szum pochodzący od kamery EMCCD. Potwierdza to obserwację, że PCP nie przyłączyło się do powierzchni AgNWs. Istnieje możliwość, że białka fotoaktywnego PCP jest stosunkowo mało w zawiesinie i nie zdążyło przyłączyć się do AgNWs w ciągu 5 min. Wykonano obrazowanie dla 5-ciu miejsc, w których zebrano około 40 nanodrutów srebra, co przy założeniu, że w probówce umieszczono 1,5 miliona AgNWs daje 0,003 %. Eksperyment ten wskazuje, że istnieje limit detekcji ilości białka przez AgNWs w zawiesinie. Limit ten nie wynika z braku możliwości rejestrowania natężenia fluorescencji PCP. Wynika on prawdopodobnie z przebadania zbyt małej ilości nanodrutów srebra. Dla stężenia 0,0182 µg/ml PCP czas inkubacji 5 min okazał się za krótki. Z drugiej strony wydłużenie czasu inkubacji prowadzi do degradacji białka.

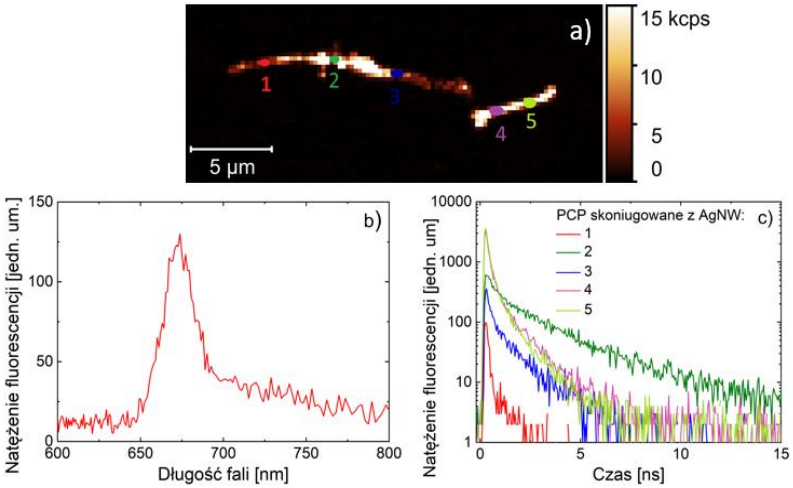


Rys. 50. Przykładowe mapy transmisji AgNW (a-c) oraz natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs (d-f) i osadzonych w matrycy PVA dla proporcji 1 µl AgNW i 30 µl PCP wraz z przekrojami wzdłuż wybranych AgNWs (g-i) .

Poza pomiarami map natężenia fluorescencji PCP za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola, wykonano pomiary z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. Mikroskopia konfokalna pozwala na pomiar widm oraz krzywych zaniku fluorescencji. Mapa natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs (rys. 51. (a)), jakościowo przypomina mapę uzyskaną za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii szerokiego pola. Białko fotoaktywne PCP pokrywa powierzchnię AgNWs w sposób niejednorodny.

Na wybranej mapie natężenia fluorescencji PCP wskazano punkt na powierzchni AgNWs, w którym wykonano pomiar widma fluorescencji PCP. Przykładowe widmo fluorescencji zmierzone w pkt 1 zaprezentowano na rys. 51. (b). Zmierzone widmo fluorescencji PCP kształtem i położeniem spektralnym potwierdza, że obserwowany sygnał pochodzi od białek fotoaktywnych PCP.

Na rys. 51. (c) przedstawiono zestaw krzywych zaniku fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs zmierzonych dla badanej próbki wzbudzonej laserem impulsowym o długości fali 485 nm. Miejsca wykonania pomiarów krzywej zaniku fluorescencji oznaczono na mapie natężenia fluorescencji PCP (rys. 51. (a)). Zaobserwowano korelację pomiędzy natężeniem fluorescencji PCP na mapie natężenia fluorescencji, a natężeniem krzywej zaniku fluorescencji PCP. Zmiany w dynamice fluorescencji PCP są widoczne, zwłaszcza dla dłuższego AgNWs. Objawia się to zmianą nachylenia krzywej zaniku fluorescencji PCP pomiędzy punktami o różnym natężeniu fluorescencji PCP. Dynamika zmiany krzywej zaniku fluorescencji PCP wskazuje na dużą niejednorodność próbki. Gdy zbadano obszar o niższym natężeniu fluorescencji białka fotoaktywnego PCP, czas zaniku jest bardzo krótki (0,1 ns), co oznacza silne wzmocnienie plazmonowe fluorescencji białka fotoaktywnego PCP. W przypadku miejsc o dużym natężeniu fluorescencji PCP czas jest coraz dłuższy (1 ns), a sama krzywa zaniku fluorescencji przybiera jednowykładniczy charakter. Wydłużenie czasów zaniku fluorescencji PCP związane jest z tworzeniem aglomeratów PCP i w konsekwencji coraz słabszym oddziaływaniem plazmonowym z AgNWs.



Rys. 51. a) Mapa natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego do AgNWs z zaznaczonymi punktami pomiarowymi, b) Widmo fluorescencji PCP zarejestrowane w pkt 1, c) Krzywe zaniku fluorescencji PCP zarejestrowane w miejscach zaznaczonych na mapie natężenia fluorescencji PCP

7.4 Podsumowanie rozdziału

Badania przedstawione w tym rozdziale miały na celu sprawdzenie wydajności wykrywania białka fotoaktywnego przez AgNWs podczas inkubacji w zawiesinie. Wyniki wskazują, że proces koniugacji białka PCP z nanodrutami srebra w zawiesinie jest efektywny. Zaobserwowano zależność ilości białka na nanodrutach srebra od jego stężenia. Wyznaczono limit wykrywania białka PCP przez AgNWs w zawiesinie wynoszący 0,0667 µg/ml. Wykazano efekt wzmocnienia plazmonowego PCP przez nanodruty srebra poprzez pomiar czasów zaniku fluorescencji białka.

Założenie, że obserwacja kilkunastu AgNWs daje pogląd na zachowanie całej próbki okazało się błędne. W ramach jednej próbki część AgNWs była bardziej pokryta białkiem niż pozostałe AgNWs. Co więcej, w tak przyjętej metodologii eksperymentu trudno wyznaczyć czas inkubacji. Udowodniono, że wydłużenie czasu inkubacji nie wpływa na zwiększenie limitu wykrywania białka (16 h), a powoduje degradację białka. Nieprzewidzianym skutkiem inkubacji AgNWs z białkiem było tworzenie aglomeratów PCP na powierzchni AgNWs. Może to być związane z wykorzystaniem wody do rozcieńczania AgNWs i białka PCP, przez co wartość pH powodowała wzajemne oddziaływania białek PCP. Punkt izoelektryczny PCP wynosi 7.4, dlatego w kolejnych eksperymentach wykrywania białka w zawiesinie należałoby wykorzystać bufor PBS. Z drugiej strony, wysychający bufor PBS krystalizuje, co znacząco utrudnia pomiary za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola.

Ze względu na wszystkie opisane ograniczenia nie przeprowadzano optymalizacji procesu wykrywania białka w zawiesinie. Skupiono się na wykrywaniu białka przez AgNWs osadzone na podłożu. Obserwacja ich powierzchni w czasie rzeczywistym powinna umożliwić rejestrację tych procesów.

8. WYKRYWANIE BIAŁKA NA PODŁOŻU W CZASIE RZECZYWISTYM

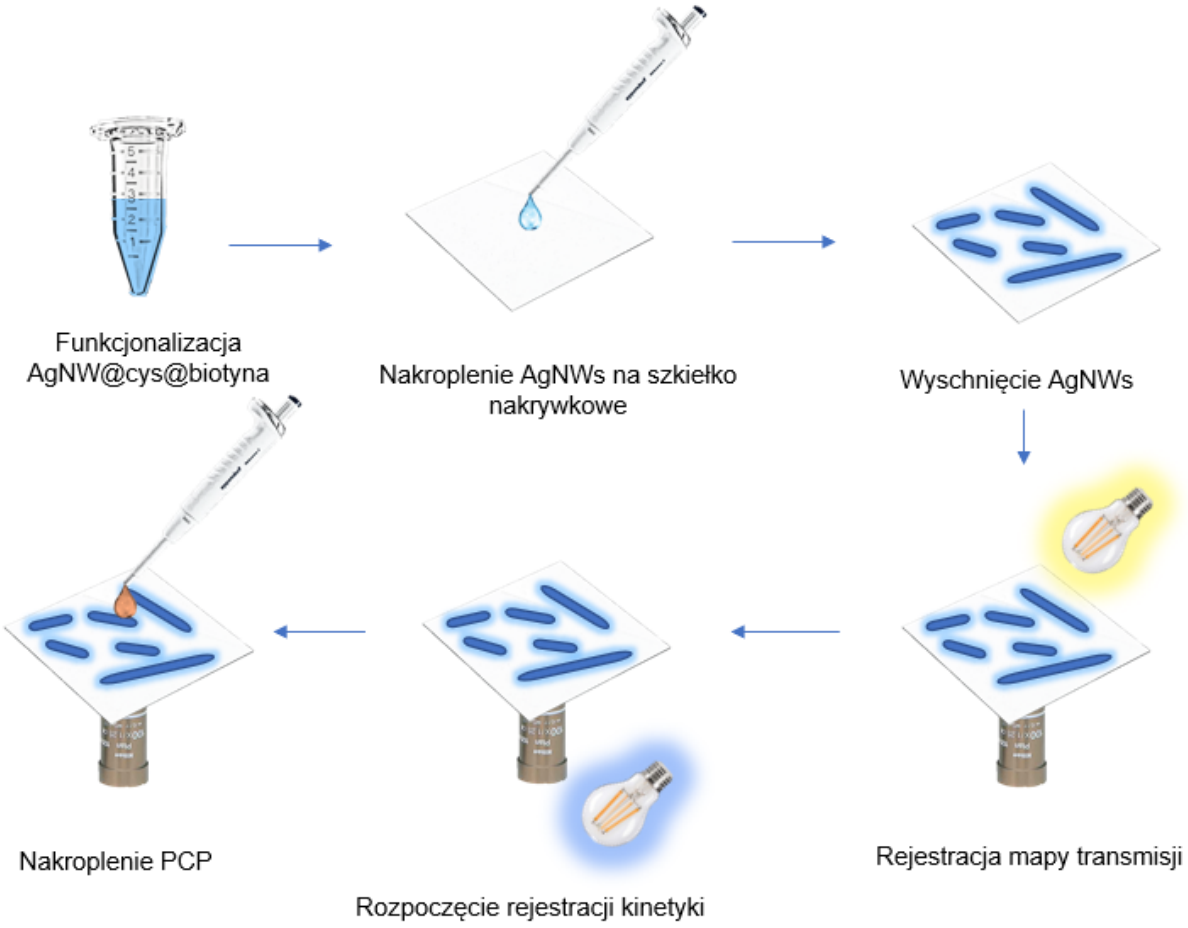
W niniejszym rozdziale opisano podejście, w którym nanodruty srebra osadzono na podłożu szklanym, a wykrywanie białka odbywało się podczas rejestracji kinetyki map natężenia fluorescencji. Sprawdzono wpływ modyfikacji powierzchni nanodrutów srebra na wykrywanie białka. Sprawdzono limit detekcji białek fotoaktywnych przez nanodruty srebra, w dążeniu do wykrywania pojedynczych molekuł przez nanodruty srebra. Wyznaczono wzmocnienie plazmonowe białka na nanodrutach srebra przy koniugacji w czasie rzeczywistym. Na początku rozdziału przedstawiono procedurę wykonania eksperymentu. W pierwszej części zaprezentowano wyniki dotyczące wpływu funkcjonalizacji powierzchni nanodrutów srebra na koniugację. W drugiej części opisano eksperymenty wykazujące wpływ funkcjonalizacji powierzchni AgNWs na detekcję białka. W trzeciej części zaprezentowano wyniki detekcji pojedynczych białek skoniugowanych z nanodrutami srebra.

8.1 Opis wykonania eksperymentu

Eksperyment w czasie rzeczywistym wykazujący wpływ funkcjonalizacji powierzchni nanodrutów srebra na koniugację białka fotoaktywnego PCP przygotowano w następujący sposób (rys. 52.):

1. Zsyntezowano AgNWs zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale *Synteza i funkcjonalizacja powierzchni nanodrutów srebra*.
2. Sfunkcjonalizowano powierzchnię AgNWs zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale *Synteza i funkcjonalizacja powierzchni nanodrutów srebra*.
3. Przygotowano AgNWs na powierzchni szkiełka nakrywkowego poprzez nakroplenie 15 µl rozcieńczonych (1:100) AgNW@cys@biotyna (bądź AgNW@PVP) i nawirowano je za pomocą powlekacza obrotowego (20 rps).
4. Umieszczono szkiełko nakrywkowe z AgNWs na stoliku fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola.
5. Zlokalizowano pojedyncze, odseparowane AgNWs w trybie transmisyjnym światła białego oraz zapisano mapę transmisji światła białego.
6. Przełączono układ w tryb fluorescencyjny z ustawionym oświetlaczem i zestawem filtrów odpowiednich do wybranego emitera, które opisano w części rozprawy doktorskiej *Techniki Eksperymentalne*.
7. Ograniczano rejestrowany obszar do 600 x 600 pixeli.

8. Wybrano czas ekspozycji pojedynczej mapy na 0,1 s, ustawiano kinetykę fluorescencji na 1000 klatek, co przełożyło się na ponad 3 min. rejestracji mapy natężenia fluorescencji próbki.
9. Wzmocnienie sygnału (EMgain) dobrano do stężenia PCP, aby nie prześwietlić kamery EMCCD.
10. Ustawiano oświetlacz LED w trybie ciągłym z mocą 100 mW.
11. Rozpoczęto rejestrowanie kinetyki map natężenia fluorescencji próbki.
12. Wykonano pomiary próbek referencyjnych - same AgNWs po funkcjonalizacji nie wykazują fluorescencji.
13. Nakroplono 2 µl roztworu PCP o wybranym stężeniu.
14. Zapisano kinetykę po zakończeniu pomiaru.

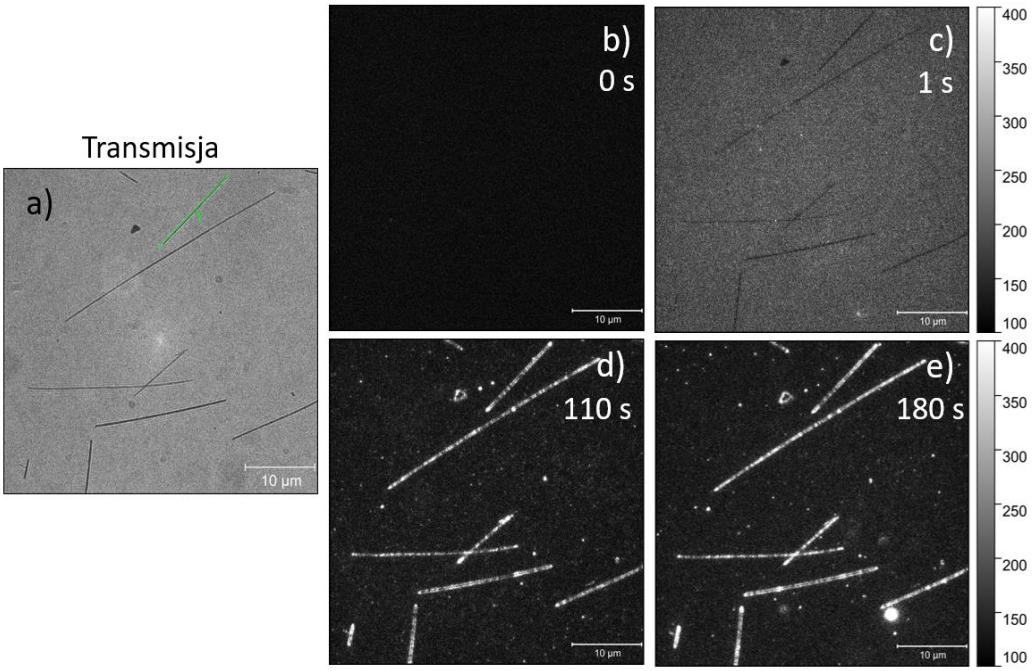


Rys. 52. Schemat eksperymentu detekcji białka fotoaktywnego PCP w czasie rzeczywistym.

8.2 Wpływ funkcjonalizacji nanodrutów srebra na detekcję białka

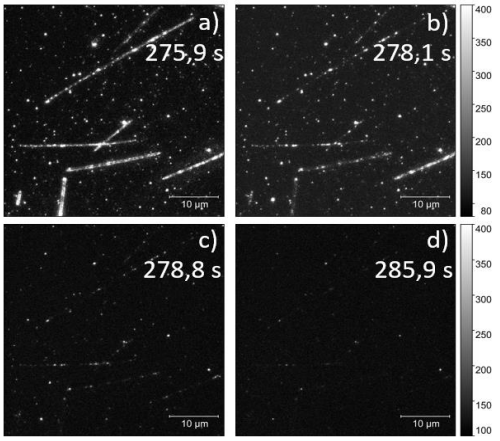
Wyniki uzyskane dla 0,2 µg/ml roztworu PCP nakroplonego na sfunkcjonalizowane AgNWs umieszczono na rys. 53. Do wzbudzenia fluorescencji PCP wykorzystano oświetlacz LED o długości fali 480 nm o mocy 100 µW. Do zebrania sygnału wykorzystano obiektyw immersyjny 100x. Na ścieżce detekcji wykorzystano filtry FELH650 i 670/10. Wzmocnienie sygnału wynosiło 100, a czas akwizycji 0,1 s. Wybrane miejsce z AgNWs przedstawiono na mapie transmisji światła białego (rys. 53. (a)). Nanodruty srebra widoczne są jako ciemne kreski. Z zarejestrowanej kinetyki map natężenia

fluorescencji PCP przedstawiono jedynie wybrane mapy. Na rys. 53. (b) zaprezentowano mapę wykonaną dla t = 0 s. Mapa fluorescencji jest jednorodna. AgNW@cys@biotyna na powierzchni szkła nie wykazują fluorescencji w obrazowanym zakresie spektralnym, a średnia wartość szumu wynosi 118 zliczeń. Druga mapa natężenia fluorescencji PCP to moment po 1 s od nakroplenia roztworu PCP (rys. 53. (c)). Zaobserwowano, że wartość poziomu sygnału na całej mapie zauważalnie wzrosła (średnia 197) oraz pojawiły się ciemne obszary w miejscach, gdzie są AgNWs. Na mapie natężenia fluorescencji PCP wykonanej po 110 s widoczne są jasne kreski w miejscach, odpowiadających położeniu AgNWs (rys. 53. (d)). AgNWs są pokryte w przeważającej większości białkiem fotoaktywnym. Zaobserwowano wyższe natężenie fluorescencji PCP na AgNWs niż na szkle. Na powierzchni szkła zaobserwowano aglomeraty białka PCP, które nie są dostrzegalne na AgNWs w takim stopniu, jak podczas wykrywania białka w roztworze. Na mapie natężenia fluorescencji PCP uzyskanej dla t = 180 s AgNWs są pokryte PCP w większym stopniu niż po 110 s (rys. 53. (f)). Białko fotoaktywne PCP przyłącza się do AgNWs sekwencyjnie. Świadczy to o dużej gęstości biotyny na powierzchni nanodrutów srebra. Kontrast pomiędzy PCP skoniugowanym z AgNWs, a białkiem fotoaktywnym PCP na szkle jest duży, co wskazuje na wzmocnienie plazmonowe fluorescencji PCP przez AgNW. Koniugacja białka PCP do AgNWs jest szybka i wydajna. Białko PCP w ciągu kilku sekund przyłącza się do AgNWs. Całą kinetykę natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs zamieszczono pod linkiem. Na kinetyce natężenia fluorescencji PCP koniugacja białka PCP do AgNWs nastąpiła już po 8 s od momentu nakroplenia roztworu PCP. W tle na kinetyce widoczny jest aglomerat o silnym natężeniu fluorescencji w obrazowanym obszarze, który przepływa co jakiś czas.



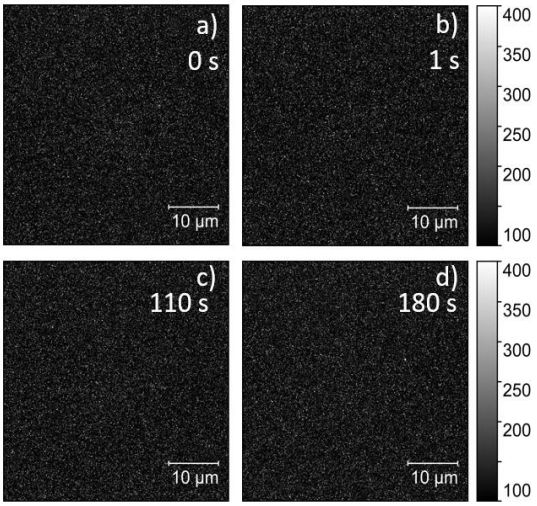
Rys. 53. Detekcja białka o stężeniu 0,2 µg/ml w czasie rzeczywistym (AgNW@cys@biotyna) a) Obraz transmisji światła białego AgNWs osadzonych na szkiełku nakrywkowym. b) i c) Mapa fluorescencji PCP w tym samym obszarze sekundę przed i po umieszczeniu roztworu na szkiełku nakrywkowym. d) i e) Mapy fluorescencji PCP odpowiadające czasom 110 s oraz 180 s po nakropleniu PCP na szkiełko nakrywkowe [150].

Interesującym aspektem jest rejestracja kinetyki map natężenia fluorescencji PCP aż do momentu wyschnięcia kropli PCP w obrazowanym obszarze. Wybrane mapy natężenia fluorescencji PCP przedstawiono na rys. 54. (a). Na pierwszej mapie natężenia fluorescencji PCP widocznych jest dużo aglomeratów białek PCP na powierzchni szkła. Na drugiej mapie natężenia fluorescencji PCP zaobserwowano spadek natężenia fluorescencji PCP na AgNWs (rys. 54. (b)). Fluorescencja pochodząca od aglomeratów pozostaje na podobnym poziomie natężenia. Na trzeciej mapie natężenia fluorescencji PCP zauważono znaczący spadek natężenia PCP na AgNWs oraz dużą ilość aglomeratów na szkle (rys. 54. (c)). Na czwartej mapie natężenia fluorescencji PCP zaobserwowano nieliczne punkty wykazujące fluorescencję (rys. 54. (d)). Wynik ten wskazuje na degradację białka w czasie odparowania rozpuszczalnika (po 5. min). Opisana kinetyka jest zamieszczona pod linkiem.



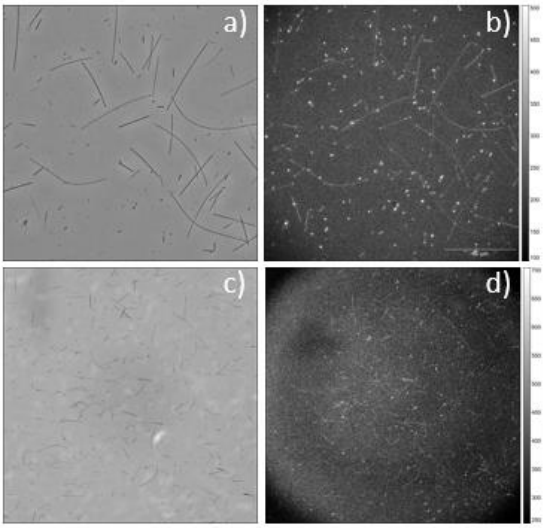
Rys. 54. Mapy natężenia fluorescencji PCP podczas wysychania roztworu białka PCP (a-d) [150].

Dodatkowo przy tym eksperymencie wykonano próbę odniesienia. Dokładnie dla takich samych parametrów ustawionych na fluorescencyjnym mikroskopie szerokiego pola nakroplono jedynie wodę Milli-Q wykorzystaną do rozcieńczania PCP. Mapy natężenia fluorescencji próbki po 4 różnych czasach zaprezentowano na rys. 55. Uzyskane mapy natężenia fluorescencji są jednorodne. Widoczne są tylko dwa punkty przez całą kinetykę natężenia fluorescencji, które pokrywają się z pozycją krzyżujących się AgNWs. Kinetykę natężenia fluorescencji próbki umieszczono pod linkiem.



Rys. 55. Mapy natężenia fluorescencji PCP z nakroploną wodą (a-d).

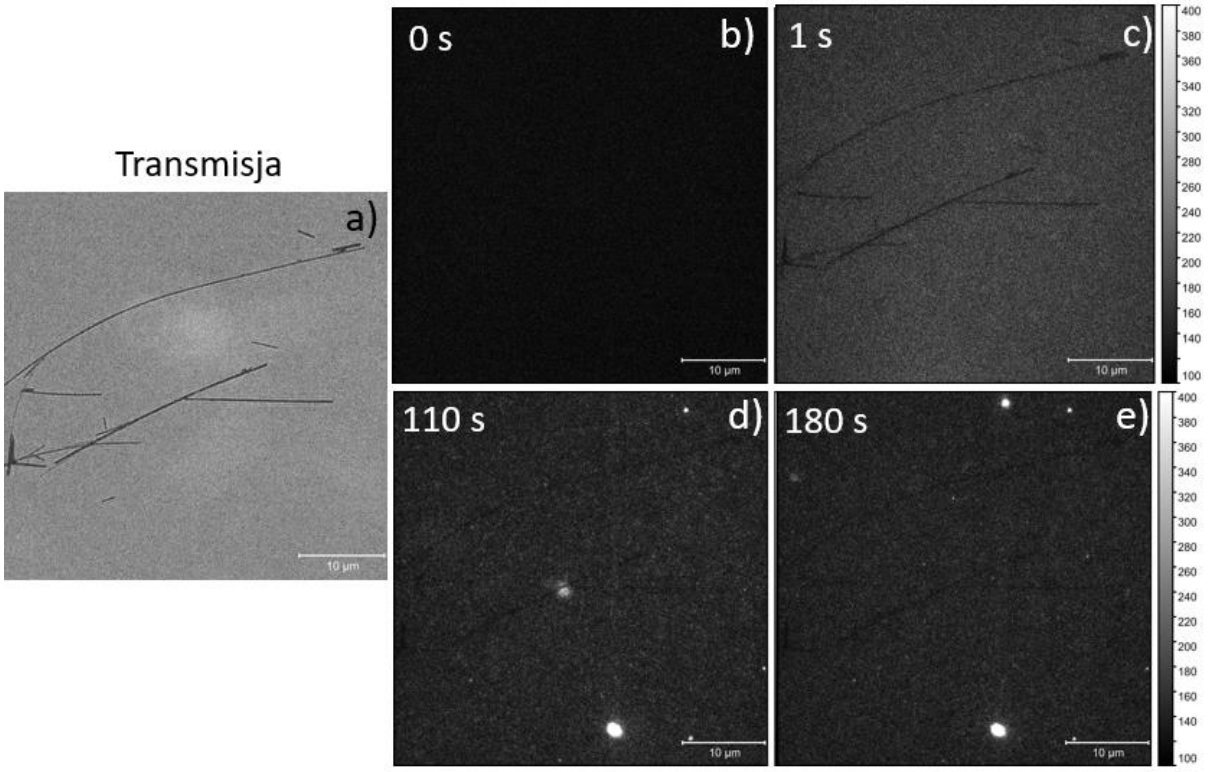
Drugim interesującym zagadnieniem jest możliwość obserwacji koniugacji w czasie rzeczywistym bez użycia obiektywu immersyjnego. W tym celu wykorzystano obiektywy powietrzne 50x oraz 10x, które mają mniejszą aperturę numeryczną (NA) (odpowiednio 0,80 i 0,30). Parametry eksperymentu przeprowadzonego z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola wybrano tak, aby rejestrować sygnał z jak największego obszaru próbki. Mapę transmisji wraz z odpowiadającą jej mapą natężenia fluorescencji PCP zarejestrowaną z użyciem obiektywu 50x zaprezentowano na rys. 56. (a) i (b). Położenie AgNWs jest jednoznacznie widoczne, ze względu na kontrast natężenia fluorescencji PCP na AgNWs i szkle. Kinetyka map natężenia fluorescencji PCP nakroplonego na AgNWs jest dostępna pod linkiem. Drugi zaprezentowany zestaw (rys. 56. (c) i (d)) uzyskano przy pomocy obiektywu 10x (wzmocnienie sygnału wynosiło 300). W tym przypadku trudniej określić pozycję AgNWs na pojedynczej mapie natężenia fluorescencji PCP. Pozycja AgNWs jest widoczna na kinetyce map natężenia fluorescencji PCP, która jest dostępna pod linkiem. Wyniki te pokazują, że do pomiarów natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs, dzięki wzmocnieniu plazmonowemu PCP możliwe jest wykorzystanie obiektywów powietrznych o małej aperturze numerycznej.



Rys. 56. Mapy natężenia fluorescencji PCP na AgNWs wraz ze korelowaną mapą transmisji wykonane dla obiektywów 50x (a – b) po 37 s od nakroplenia PCP oraz 10x (c – d) po 82 s od nakroplenia PCP.

Wpływ funkcjonalizacji na koniugację białka fotoaktywnego PCP sprawdzono poprzez wykonanie eksperymentu, w którym AgNW@cys@biotyna zostały zamienione na AgNW@PVP. Wszystkie inne parametry pozostały takie same. Celem doświadczenia było sprawdzenie, czy modyfikacja powierzchni AgNWs w przypadku tak zaprojektowanego wykrywania białka PCP jest konieczna. Na rys. 57. przedstawiono zestaw danych uzyskanych dla niesfunkcjonalizowanych AgNWs. Stężenie białka PCP wynosiło 0,2 μg/ml. Mapa transmisji światła białego przedstawia wybrane niesfunkcjonalizowane AgNWs (rys. 57. (a)). Na mapie natężenia fluorescencji PCP widać, że niesfunkcjonalizowane AgNWs nie wykazują fluorescencji w wybranym zakresie spektralnym (rys. 57. (b). Na mapie natężenia fluorescencji PCP wykonanej po nakropleniu białka obserwuje się wzrost

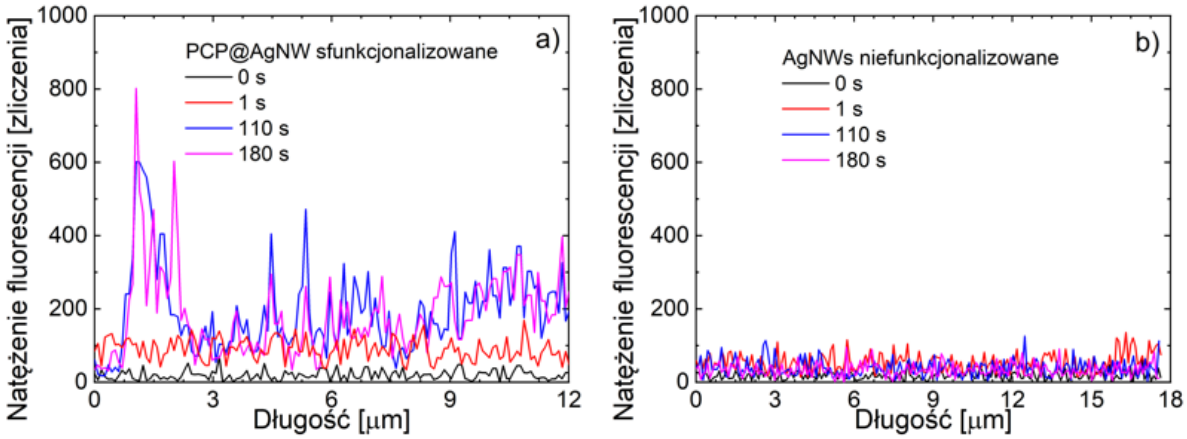
sygnału na szkle, co jest związane z obecnością dużej ilości PCP w roztworze. Miejsca, w których znajdują się AgNWs są widoczne jako ciemne kreski, ponieważ sygnał w tych pozycjach jest niższy. Białko fotoaktywne PCP nie przyłączyło się do AgNWs. Analogiczny wynik zaobserwowano w przypadku sfunkcjonalizowanych AgNWs w ciągu pierwszej sekundy (rys. 53. (c)). Na mapie natężenia fluorescencji PCP po 110 s PCP mimo upływu czasu nie przyłączyło się do powierzchni AgNWs (rys. 57. (d)). Dodatkowo na rejestrowanym obszarze znalazły się duże aglomeraty wykazujące silną fluorescencję. Kolejna mapa natężenia fluorescencji po 180 s jest identyczna, jak ta po 110 s (rys. 57. (e)). Całą kinetykę natężenia fluorescencji PCP umieszczono pod linkiem. Eksperyment ten pokazuje, że funkcjonalizacja powierzchni AgNWs jest kluczowa dla wykrywania fotoaktywnych białek.



Rys. 57. Detekcja białka o stężeniu 0,2 µg/ml w czasie rzeczywistym (AgNW@PVP). a) Obraz transmisji światła białego AgNWs osadzonych na szkiełku nakrywkowym. b) i c) Mapa fluorescencji PCP sekundę przed i po umieszczeniu roztworu na szkiełku nakrywkowym. d) i e) Mapy fluorescencji PCP w tym samym obszarze odpowiadające czasom 110 s oraz 180 s po nakropleniu PCP na szkiełko nakrywkowe [150].

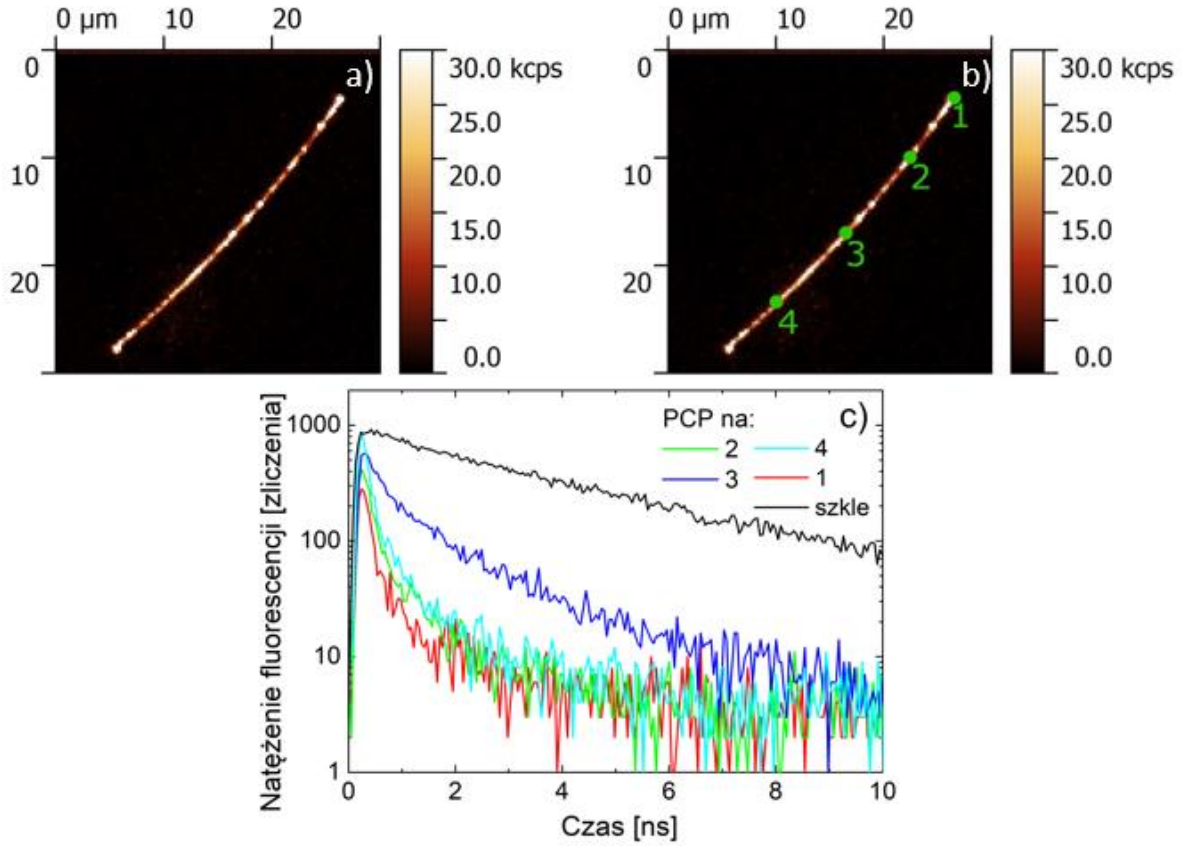
Na rys. 58. przedstawiono przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż AgNW@cys@biotyna oraz AgNW@PVP. Przekroje uzyskano przed nakropleniem PCP oraz 1 s, 110 s i 180 s po nakropleniu PCP. W tym celu wybrano reprezentatywne AgNWs oznaczone na zielono na rys. 53. (a) oraz rys. 57. (a). Przekroje wykonano w programie Gwyddion. Na rys. 58. zaprezentowano tło (t = 0 s) przed nakropleniem roztworu PCP, które wynosi około 150 zliczeń (zliczenia ciemne). Po nakropleniu podnosi się ono o około 30 zliczeń. Pozycja AgNW nie jest wyraźnie oznaczona, uwidacznia się ona dla przekroju uzyskanego z mapy natężenia fluorescencji wykonanej po czasie 110 s. Wartość natężenia

fluorescencji PCP waha się od 180 do 700. Wartości natężenia fluorescencji PCP różnią się od tych uzyskanych w rozdziale *Wykrywanie białka w roztworze,* ze względu na inny typ próbki. Pokrycie AgNW nie jest idealnie jednorodne, natomiast nie obserwuje się aglomeratów białek fotoaktywnych PCP jak w przypadku koniugacji białka PCP z AgNWs w roztworze. Na końcu AgNW sygnał jest znacznie wyższy, co jest spowodowane koniugacją większej ilość białek fotoaktywnych PCP. W przypadku niemodyfikowanego nanodrutu srebra (rys. 58.) sygnał po dodaniu białka jest o około 10 zliczeń wyższy w tle, niż na AgNW. Natężenie fluorescencji na AgNW przez całą kinetykę pozostaje bez zmian. Oznacza to, że fotoaktywne białko PCP nie koniuguje do AgNW@PVP.



Rys. 58. Przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż nanodrutu srebra zmodyfikowanego a) oraz niemodyfikowanego b) uzyskane przed nakropleniem PCP, 1 s, 110 s oraz 180 s po nakropleniu PCP.

Dla sfunkcjonalizowanego AgNW skoniugowanego z PCP w celu potwierdzenia obserwacji wzmocnienia fluorescencji białka PCP wykonano pomiar krzywych zaniku fluorescencji PCP z wykorzystaniem fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. Uzyskaną mapę natężenia fluorescencji PCP przedstawiono na rys. 59. Jest ona podobna do mapy natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNW uzyskanej za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola. Następnie wykonano pomiar krzywych zaniku fluorescencji dla stężonego białka PCP skoniugowanego z AgNWs i porównano go z krzywą zaniku fluorescencji uzyskaną dla PCP w warstwie polimeru PVA na szkiełku nakrywkowym. Cały AgNW wydaje się być pokryty białkiem PCP, jednak widoczne są miejsca, które charakteryzują się wyższym natężeniem fluorescencji PCP. Do pomiaru krzywej zaniku fluorescencji wybrano miejsca, które wykazywały różne poziomy natężenia fluorescencji PCP, oznaczono je na zielono na rys. 59. (a). W przypadku koniugatu PCP z AgNWs zaobserwowano silne skrócenie zaniku fluorescencji PCP względem PCP na szkle. Czas zaniku fluorescencji PCP skoniugowanego do AgNWs wynosi około 0,25 ns dla pkt. 2,3,4, zaś dla pkt. 1 wynosi 0,71 ns. W przypadku próbki, na której PCP znajdowało się na szkle otrzymano czas zaniku równy 4 ns. Otrzymane czasy zaniku pozwoliły oszacować wartość wzmocnienia plazmonowego, które wyniosło 16. Tak silne skrócenie krzywych zaniku fluorescencji świadczy o wydajnym wzbudzeniu plazmonowym w nanodrutach srebra i jego silnym oddziaływaniu z białkiem PCP [131].



Rys. 59. a-b) Mapa natężenia fluorescencji PCP (0,2 µg/ml) zmierzona za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego, oryginalna mapa oraz mapa z zaznaczonymi punktami oznaczającymi miejsca, gdzie zmierzono krzywe zaniku fluorescencji PCP c) Krzywe zaniku fluorescencji PCP zmierzone dla kompleksów PCP skoniugowanych z nanodrutami srebra (0,2 µg/ml) [150].

8.3 Detekcja pojedynczych białek

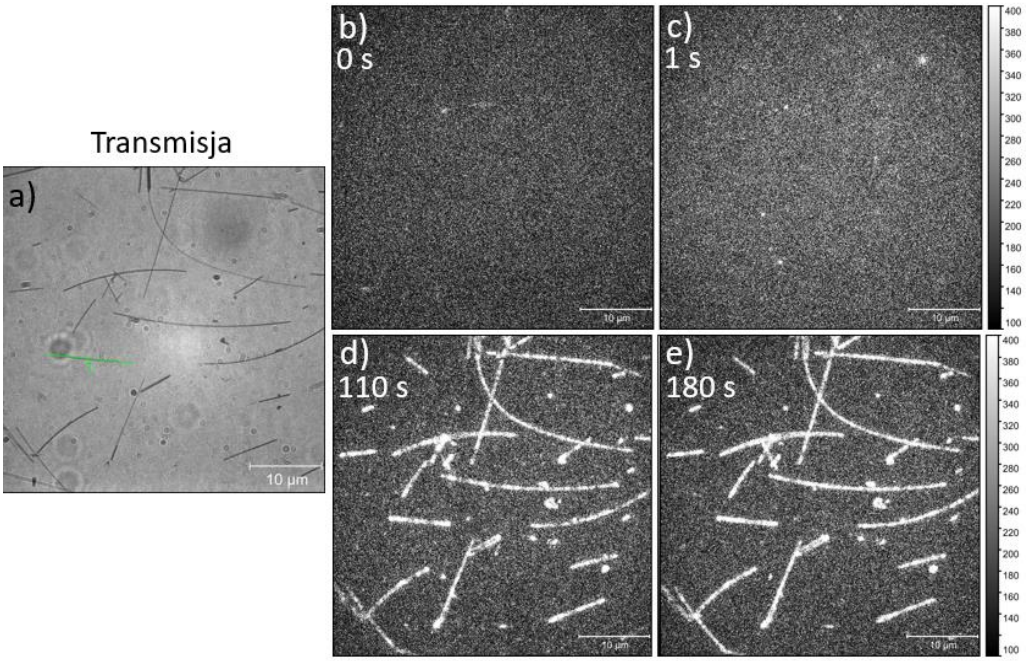
Celem eksperymentu było wykazanie, że możliwa jest detekcja pojedynczych białek PCP koniugujących z AgNWs w czasie rzeczywistym. Było to testowane poprzez zmniejszanie stężenia PCP w nakraplanym roztworze, aż do otrzymania pojedynczych białek PCP.

Eksperyment wykonano zgodnie z *Opisem wykonania eksperymentu*. Wzmocnienie sygnału wynosiło 800, a interwały czasowe pozostały bez zmian. Na rys. 60. przedstawiono wynik eksperymentu, w którym stężenie roztworu PCP nakroplonego na podłoże ze sfunkcjonalizowanymi AgNWs wynosiło 8 ng/ml. Przedstawiono mapę transmisji światła białego pozwalającą określić położenie nanodrutów srebra (rys. 60.). Wybrano miejsce, gdzie znajdują się liczne AgNWs z niewielką ilością nanocząstek srebra. Na rys. 60. (b-e) przedstawiono mapy natężenia fluorescencji przed nakropleniem PCP oraz po 1 s, 110 s i 180 s od momentu nakroplenia PCP. Mapa natężenia fluorescencji tuż przed nakropleniem PCP jest jednorodna, pozycja AgNWs nie jest na niej widoczna (rys. 60. (b)). Sekundę po nakropleniu roztworu PCP natężenie fluorescencji na mapie nieznacznie rośnie, pozostając jednorodne (rys. 60. (c)). Następnie po 100 s obserwuje się intensywną fluorescencję PCP w miejscach

odpowiadających położeniom AgNWs (rys. 60. (d)). Dla mapy uzyskanej po t = 180 s zaobserwowano intensywny sygnał fluorescencji PCP w miejscach odpowiadających położeniu AgNWs na podłożu (rys. 60. (e). Oznacza to, że białko PCP przyłączyło się do AgNWs.

Na mapie natężenia fluorescencji PCP tuż po nakropleniu nie zaobserwowano znacznego podniesienia sygnału, tak jak miało to miejsce dla roztworu PCP o stężeniu 0,2 μg/ml (rys. 60. (b)). Nie pojawia się również ciemniejszy obszar odpowiadający położeniu AgNWs. Na mapie natężenia fluorescencji PCP zaobserwowano kilka jaśniejszych punktów, które mogą odpowiadać aglomeratom PCP (rys. 60. (c)). Na mapie natężenia fluorescencji PCP (rys. 60. (d)) wszystkie AgNWs pokryte są w całości PCP. Poziom zliczeń na szkle pozostaje bez zmian od momentu nakroplenia roztworu PCP. Po nakropleniu obraz ulega nieznacznemu rozjaśnieniu, co świadczy o obecności białka w roztworze, ale nie na powierzchni szkła. Brak zauważalnego podniesienia się sygnału w tle oznacza, że fotoaktywnych białek PCP jest znacznie mniej niż dla stężenia 0,2 μg/ml i większość białek PCP koniuguje się do powierzchni AgNWs. Całą kinetykę fluorescencji otrzymaną dla stężenia PCP 8 ng/ml umieszczono pod linkiem.

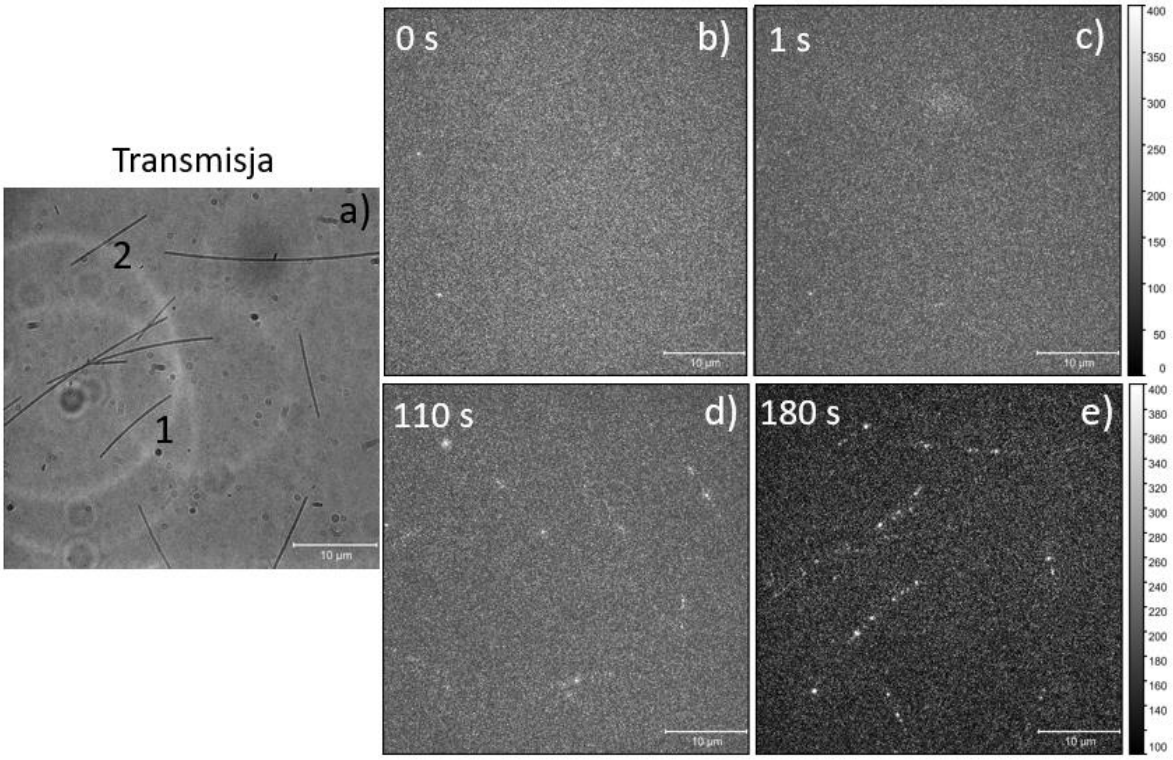
Ważnym wynikiem uzyskanym w detekcji białka o stężeniu 8 ng/ml jest obserwacja jednorodnie rozświetlonych AgNWs. Wskazuje to, że liczba grup funkcyjnych na powierzchni AgNWs jest odpowiednio duża, a sama koniugacja białka z AgNWs jest wydajna. Gęste pokrycie powierzchni AgNWs grupami funkcyjnymi jest niezwykle istotne, gdyż celem jest detekcja pojedynczych białek i w związku z tym dokładne pokrycie powierzchni AgNWs przez biotynę jest kluczowe.



Rys. 60. Detekcja białka o stężeniu 8 ng/ml w czasie rzeczywistym (AgNW@cys@biotyna). a) Obraz transmisji światła białego AgNWs osadzonych na szkiełku nakrywkowym z oznaczonym AgNW wybranym do analizy. b) - c) Mapa fluorescencji PCP sekundę przed i po umieszczeniu roztworu na szkiełku nakrywkowym w tym samym obszarze. d) - e) Mapy fluorescencji PCP odpowiadające czasom 110 s oraz 180 s po nakropleniu PCP na szkiełko nakrywkowe.

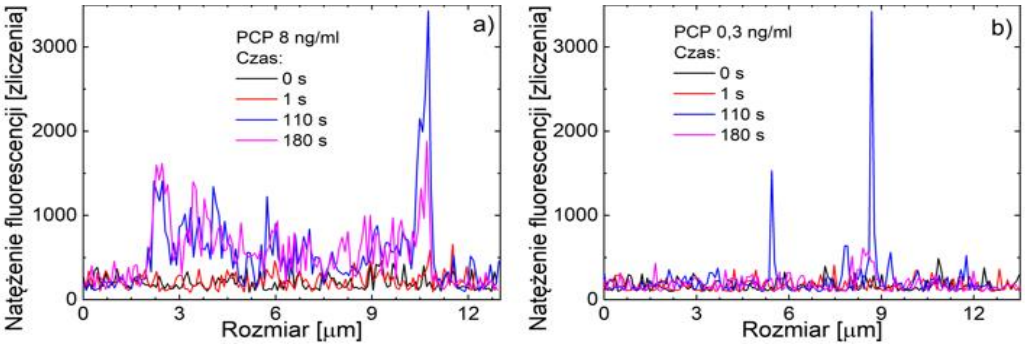
Na rys. 61. przedstawiono wybrane mapy z kinetyki natężenia fluorescencji zmierzonej dla białka PCP o stężeniu 0,3 ng/ml nakroplonego na sfunkcjonalizowane AgNWs. Sposób wykonania eksperymentu oraz wszystkie parametry są takie same jak w eksperymencie detekcji białka o stężeniu 8 ng/ml. Na mapie transmisji światła białego przedstawiono położenie sfunkcjonalizowanych AgNWs (rys. 61. (a)). Na rys. 61. (b-e) przedstawiono mapy natężenia fluorescencji przed nakropleniem PCP oraz po 1 s, 110 s i 180 s od momentu nakropleniu PCP. Mapa fluorescencji uzyskana przed nakropleniem roztworu PCP jest jednorodna, a pozycja AgNWs nie jest na niej widoczna (rys. 61. (b)). Na mapie otrzymanej dla t = 0 s pokazano, że AgNWs nie wykazują fluorescencji w wybranym zakresie spektralnym. Sekundę po nakropleniu roztworu PCP sygnał na mapie natężenia fluorescencji pozostaje na tym samym poziomie (rys. 61. (c)). Zaobserwowano pojawienie się kilku punktów o silnej fluorescencji. Dla mapy uzyskanej po t = 100 s zaobserwowano pojedyncze punkty o zbliżonym natężeniu fluorescencji (rys. 61. (d)). Punkty te są skorelowane z pozycją AgNWs, która jest znana po pomiarze mapy transmisji, nie zauważono jasnych punktów na powierzchni szkła. Punkty przypisano pojedynczym białkom fotoaktywnym skoniugowanym z nanodrutami srebra. Następnie po 180 s obserwuje się wzrost liczby pojedynczych punktów na powierzchni AgNWs (rys. 61. (d)). Oznacza to, że białka PCP przez cały czas rejestracji kinetyki fluorescencji są wychwytywane przez AgNWs i nie opadają na podłoże szklane.

Moment nakroplenia PCP ciężko jednoznacznie określić, ponieważ nie obserwuje się zmiany poziomu tła. Oszacowano, że w 2 µl roztworu PCP o stężeniu 8 ng/ml znajduje się około 400 000 szt. białka PCP. Po nakropleniu tak silnie rozcieńczonego roztworu białka fotoaktywnego PCP przypadki przyłączenia się białka do nanodrutów srebra są sporadyczne, więc określenie pozycji AgNWs bez mapy transmisji światła białego jest niemożliwe. Wraz z upływem czasu liczba pojedynczych zdarzeń wzrasta i możliwe jest odtworzenie kształtu AgNWs umieszczonego na podłożu (rys. 61. (d)). Widoczna jest korelacja punktów na mapie natężenia fluorescencji dla t = 180 s z pozycją AgNWs na uzyskanej mapie transmisji (rys. 61. (a)). Cała kinetyka fluorescencji otrzymana dla stężenia PCP 0,3 ng/ml znajduje się pod linkiem.



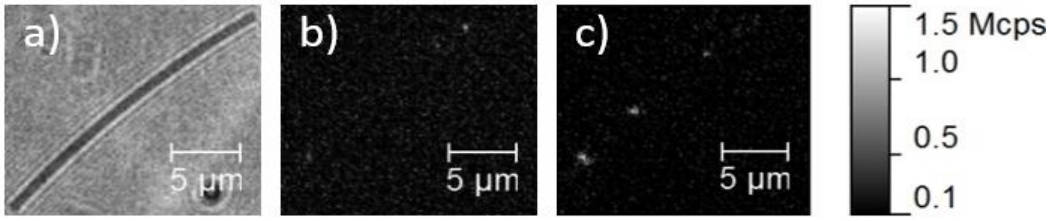
Rys. 61. Detekcja pojedynczego białka o stężeniu 0,3 ng/ml w czasie rzeczywistym (AgNW@cys@biotyna). a) Obraz transmisji światła białego AgNWs osadzonych na szkiełku nakrywkowym. b) - c) Mapa fluorescencji PCP sekundę przed i po umieszczeniu roztworu na szkiełku nakrywkowym. d) - e) Mapy fluorescencji PCP w tym samym obszarze odpowiadające czasom 110 s oraz 180 s po nakropleniu PCP na szkiełko nakrywkowe [150].

Na rys. 62. przedstawiono przekroje natężenia fluorescencji PCP o stężeniu 8 ng/ml oraz 0,3 ng/ml wzdłuż sfunkcjonalizowanych AgNWs. Przekroje uzyskano dla t = 0 s oraz dla 1 s, 110 s i 180 s po nakropleniu PCP. Na rys. 62. (a) początkowo tło jest na tym samym poziomie (0 s i 1 s), a początek i koniec AgNW jest niewidoczny. Po 110 s zaobserwowano początek i koniec AgNWs, dzięki wzrostowi natężenia fluorescencji PCP przyłączającego się do AgNWs. Możliwe jest jednoznaczne określenie początku i końca AgNW. Sygnał na jednym z końców AgNW jest ponad 2 razy wyższy niż na drugim. Sam środek AgNW charakteryzuje się niższym natężeniem sygnału, co świadczy o mniejszej ilości przyłączających się białek PCP. Po 180 s natężenie fluorescencji PCP na AgNWs jest podobne do tego po 110 s. Oznacza to, że PCP przyłączyło się efektywnie do powierzchni AgNWs i nie ma wolnych grup funkcyjnych. W przypadku roztworu PCP o stężeniu 0,3 ng/ml tło dla przekrojów uzyskanych po czasie 0 s, 1 s, 110 s i 180 s pozostaje na stałym poziomie, co uniemożliwia dokładne określenie pozycji AgNW (rys. 62. (b)). Dla t = 0 s i t =1 s sygnał pozostaje na tym samym poziomie, bez wyraźnych pików świadczących o przyłączonym białku PCP. Na przekroju uzyskanym po 110 s widoczne są dwa intensywne piki pochodzące od PCP. Sygnał ten można interpretować jako pochodzący od pojedynczych białek, jest on na poziomie około 300 zliczeń. Obserwowano 3 takie sygnały po 110 s, a po 180 s zauważono kolejne 2.



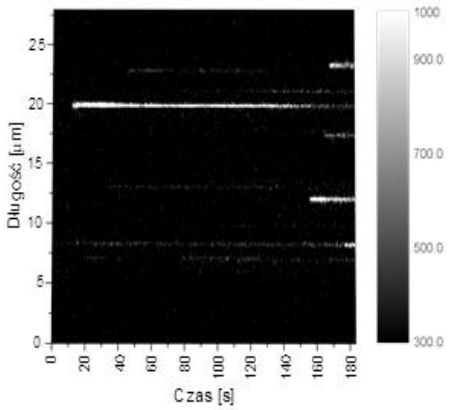
Rys. 62. Przekroje natężenia fluorescencji PCP o stężeniu 8 ng/ml oraz 0,3 ng/ml wzdłuż zmodyfikowanego nanodrutu srebra uzyskane przez nakropleniem PCP, przed nakropleniem PCP, 1 s, 110 s oraz 180 s po nakropleniu PCP.

Dane otrzymane dla roztworu PCP o stężeniu 0,3 ng/ml poddano dalszej analizie. Na rys. 63. zaprezentowano pojedynczy nanodrut srebra oznaczony na rys. 61. (a) jako nr 1. Przedstawiono mapę transmisji światła białego wraz z korelującymi mapami natężenia fluorescencji PCP, które zarejestrowano po 60 s i 180 s. Wynika z nich, że po 60 s 1 białko PCP przyłączyło się do AgNW (rys. 61. (b)), natomiast po 180 s widoczny jest sygnał pochodzący od 3 białek (rys. 61. (c)).



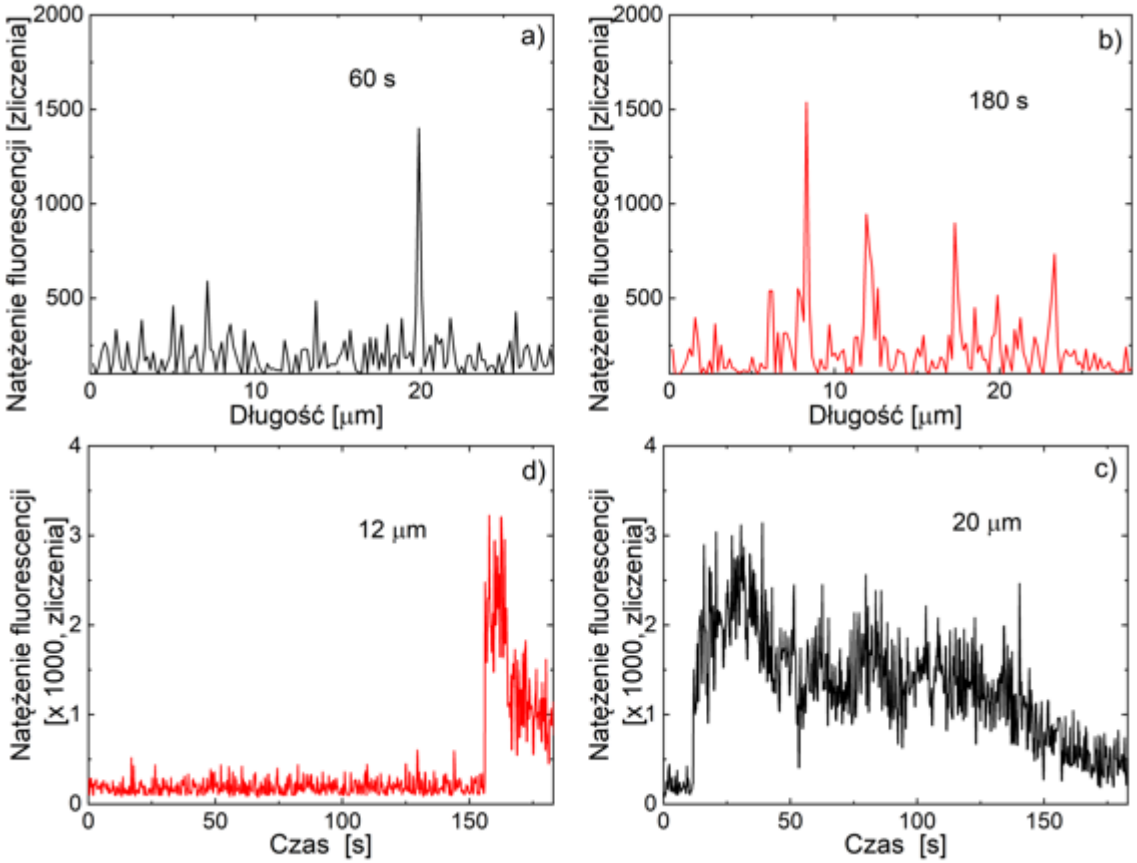
Rys. 63. a) Mapa transmisji światła białego wybranego nanodrutu srebra, b-c) Mapy natężenia fluorescencji białka fotoaktywnego PCP skoniugowanego z nanodrutem srebra wykonane po czasie 60 s oraz 180 s od nakroplenia PCP, skala dla obu map natężenia fluorescencji PCP jest taka sama (PCP o stężeniu 0,3 ng/ml).

Dla AgNW oznaczonego na rys. 61. (a) jako nr 2 wykreślono natężenie fluorescencji PCP wzdłuż AgNW w funkcji czasu (rys. 64.). Przyłączenie fotoaktywnego białka PCP do nanodrutu srebra zaobserwowano po około 10 sekundach, co wskazuje, że koniugacja białka PCP, nawet w tak niskim stężeniu, jest możliwa do zarejestrowania. Wyniki eksperymentów wskazują, że AgNWs osadzone na podłożu szklanym mogą być z powodzeniem wykorzystane do szybkiego wykrywania analitu.



Rys. 64. Zachowanie natężenia fluorescencji PCP w funkcji czasu dla wybranego AgNW z zarejestrowanej kinetyki map natężenia fluorescencji PCP o stężeniu 0,3 ng/ml [150].

Z zaprezentowanego natężenia fluorescencji PCP wzdłuż AgNW w funkcji czasu otrzymano przekroje natężenia fluorescencji wzdłuż nanodrutu srebra uzyskane po 60 s i 180 s oraz przebiegi czasowe natężenia fluorescencji PCP przedstawione dla wybranych pozycji PCP na AgNW (rys. 65.). Na przekrojach wygenerowanych po czasie 60 i 180 s widać piki pochodzące od pojedynczego białka PCP przyłączającego się do AgNW (rys. 65. (a) i (b)). W pierwszym przypadku zaobserwowano tylko jeden dobrze rozdzielony pik, natomiast po 180 s można wyróżnić co najmniej cztery. Z wygenerowanych przekrojów wybrano dwa punkty, które pojawiają się na pozycji 12 i 20 µm i wykreślono dla nich przebiegi czasowe fluorescencji PCP skoniugowanych z nanodrutem srebra (rys. 65. (c) i (d)). Wygenerowanie przebiegu czasowego emitera pozwoliło określić moment przyłączenia PCP do nanodrutu srebra oraz zaobserwować zmiany jego natężenia fluorescencji. W przypadku przebiegu czasowego przedstawionego na rys. 65. (c) prawdopodobnie obserwowano skoniugowany aglomerat PCP. W drugim przypadku zachowanie natężenia fluorescencji PCP pozwala z większym prawdopodobieństwem przypuszczać, że zaobserwowano pojedyncze PCP, ze względu na dwuetapowe fotowybielanie obserwowane wcześniej dla pojedynczych kompleksów PCP [151].

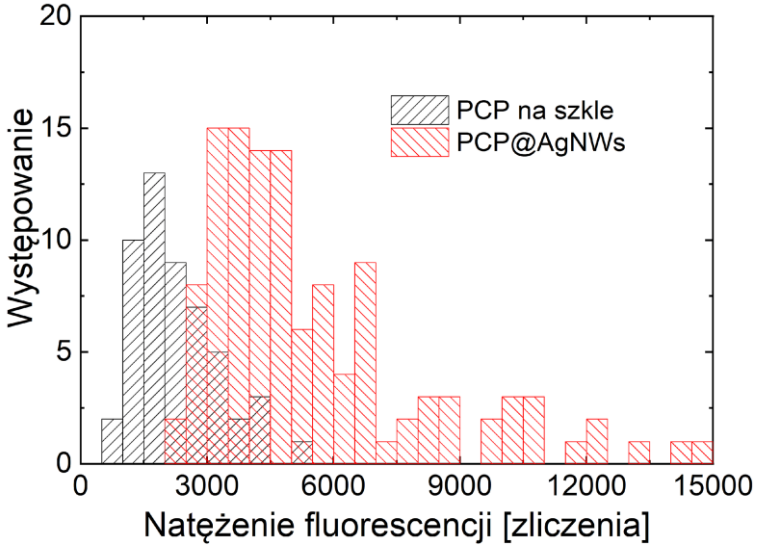


Rys. 65. Analiza danych uzyskanych dla białka fotoaktywnego PCP o stężeniu 0,3 ng/ml dla próbki ze sfunkcjonalizowanymi nanodrutami srebra. a-b) Przekroje natężenia fluorescencji wzdłuż nanodrutu srebra uzyskane po 60 s i 180 s. c-d) Przebiegi czasowe natężenia fluorescencji PCP przedstawione dla wybranych pozycji PCP na AgNW (z rys. 64. [150]*).*

Dla eksperymentu przeprowadzonego dla roztworu PCP o stężeniu 0,3 ng/ml oszacowano wzmocnienie plazmonowe fluorescencji pojedynczego białka PCP skoniugowanego ze srebrnymi

nanodrutami. Na rys. 66. przedstawiono histogram natężenia fluorescencji pojedynczego PCP skoniugowanego z AgNWs oraz znajdującego się na szkle. Do tej analizy wybrano białka z kinetyki map natężenia fluorescencji pojedynczego PCP. Wyselekcjonowano punkty, które interpretowano jako fluorescencję pojedynczych kompleksów PCP. Podczas selekcji punktów wybierano takie, które wykazywały zachowanie podobne do tego widocznego na rys. 65. (d). Punkty uzyskano z sumowania natężenia fluorescencji PCP z obszaru 9 x 9 pikseli. W pobliżu wybranego punktu wykonywano analogiczny pomiar na podłożu szklanym, aby odjąć tło. Z analizy odrzucono punkty o sumie natężenia fluorescencji wyższej niż 20 000 zliczeń.

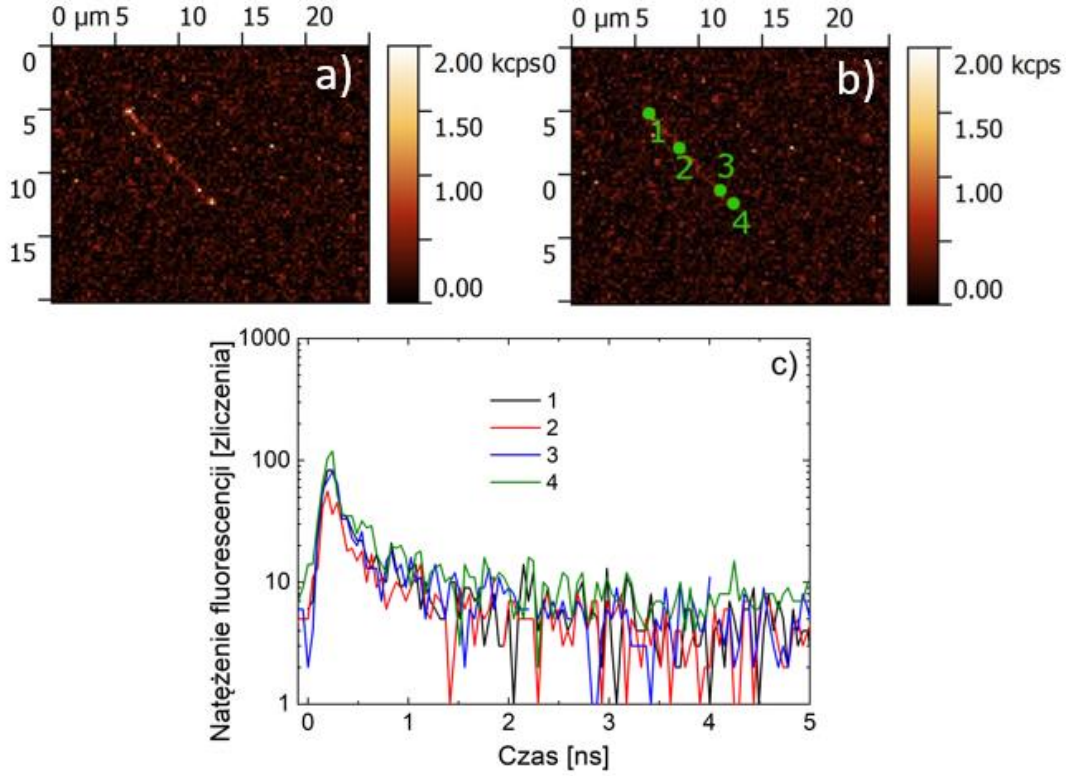
Ze zmierzonych kinetyk natężenia fluorescencji PCP wybrano 120 punktów na AgNWs oraz 50 na podłożu szklanym. W przypadku pojedynczego PCP na podłożu szklanym zaobserwowano znaczną liczbę punktów o sumie natężenia fluorescencji powyżej 8 000 zliczeń. Średnie wartości natężenia fluorescencji wynosiły odpowiednio 5 700 zliczeń, a na podłożu szklanym 2 300 zliczeń, co daje współczynnik wzmocnienia równy 2,5. Wyznaczone eksperymentalnie wartości i rozkłady natężenia fluorescencji pojedynczych białek PCP skoniugowanych z nanodrutami srebra zależą od położenia PCP na AgNW. Natężenie fluorescencji PCP zmierzone dla białka przyłączonego do AgNWs na płaszczyźnie powyżej szkła jest niższe niż dla tego przyłączonego do powierzchni AgNW bliżej podłoża. Jednak nawet taki współczynnik wzmocnienia jest wystarczający do uzyskania bardzo wysokiego kontrastu dla eksperymentów obrazowania fluorescencyjnego przeprowadzonego dla pojedynczych białek fotoaktywnych.



Rys. 66. Histogram przedstawiający natężenie fluorescencji pojedynczych kompleksów PCP skoniugowanych z nanodrutami srebra (czerwony) oraz osadzonych na podłożu szklanym (czarny) (PCP o stężeniu 0,3 ng/ml) [150].

Aby potwierdzić wzmocnienie plazmonowe wykonano pomiary czasowo-rozdzielcze dla próbki z pojedynczym PCP skoniugowanym do AgNW. Uzyskane mapy przedstawiono na rys. 67. AgNW jest widoczny na mapie natężenia fluorescencji PCP ze względu na nieznaczną różnicę w natężeniu sygnału. Pomiar krzywej zaniku wykonano w punktach oznaczonych na zielono na rys. 67.

Krzywe zaniku fluorescencji PCP przedstawione na wykresie (rys. 67. (d)) są znacznie skrócone. Pomiar krzywej zaniku fluorescencji daje bezpośrednią miarę wzmocnienia radiacyjnego. Pomiar krzywych zaników fluorescencji był trudny, ponieważ jak wcześniej pokazano, gdy kropla odparuje wysycha PCP wydaje się ulegać degradacji. Trudność pomiaru wynika z braku polimeru PVA, w przeciwieństwie do pomiarów zaprezentowanych na rys. 51.



Rys. 67. a-b) Mapa natężenia fluorescencji PCP zmierzona za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego, oryginalna mapa oraz mapa z zaznaczonymi punktami oznaczającymi miejsca, gdzie zmierzono krzywe zaniku fluorescencji PCP c) krzywe zaniku fluorescencji mierzone dla kompleksów PCP skoniugowanych z nanodrutami srebra (PCP o stężeniu 0,3 ng/ml).

8.4 Podsumowanie rozdziału

Wyniki opisane w niniejszym rozdziale miały na celu sprawdzenie wydajności wykrywania białka *in-situ* przez nanodruty srebra osadzone na podłożu. Zaletą tak wykonywanego eksperymentu jest wykorzystywanie małych objętości roztworu (2 µl). Wyniki wskazują, że możliwa jest obserwacja przyłączania pojedynczych białek PCP skoniugowanych z nanodrutami srebra. Powierzchnia nanodrutów srebra musi być właściwie zmodyfikowana, aby białko fotoaktywne przyłączyło się do AgNWs. Białko PCP nie wykazuje tendencji do tworzenia aglomeratów na AgNWs, co zaobserwowano przy koniugacji w probówce. Czas koniugacji białka z AgNWs jest krótki, wyniósł kilka sekund.

Ograniczeniem tej metody jest losowa orientacja AgNWs na podłożu. Podczas eksperymentów należy uważnie dokonać wyboru miejsca, w którym będzie odbywała się detekcja, co wymaga dodatkowych kilku minut poszukiwania AgNWs.

Aby poprawić efektywność detekcji białka fotosyntetycznego przez AgNWs, należy kontrolować położenie AgNWs. W przypadku tych struktur kontrola położenia odbywa się przez orientację AgNWs. Jednocześnie powierzchnia podłoża powinna być hydrofobowa, aby roztwór białka nie rozpływał się.

9. WYKRYWANIE BIAŁKA W MIKROKANAŁACH

W niniejszym rozdziale rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki eksperymentów, których celem było zorientowanie AgNWs na powierzchni szkiełka nakrywkowego. Sprawdzono, czy możliwa jest orientacja nanodrutów srebra w kanale mikrofluidycznym. Następnie przetestowano trwałość unieruchamiania AgNWs do podłoża oraz sprawdzono, czy nanodruty srebra zachowały zdolność wykrywania białka. Jednym z celów orientacji AgNWs było pominięcie etapu wykonywania mapy transmisji podczas pomiarów za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola. Na początku rozdziału przedstawiono procedurę modyfikacji powierzchni podłoży szklanych. Następnie opisano sposób orientacji nanodrutów srebra. W kolejnej części przedstawiono wyniki eksperymentów dotyczących wykrywania białka przez zorientowane nanodruty srebra.

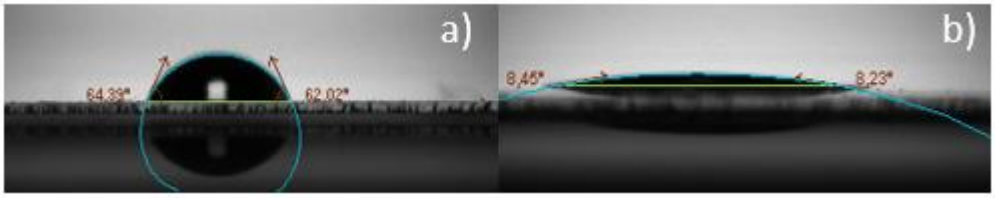
9.1 Modyfikacja powierzchni podłoży szklanych

Do trwałego zorientowania AgNWs koniecznie jest ich unieruchomienie na powierzchni podłoża. Aby unieruchomić AgNWs na szkle wykorzystano silan (3-aminopropylo)trietoksysilanem (APTES), następnie do niego przyłączono streptawidynę, która miała za zadanie unieruchomić AgNWs modyfikowane biotyną [152].

Czyste i wysuszone szkiełka nakrywkowe przyklejono do polistyrenowej szalki Petriego. Szalkę Petriego umieszczono w eksykatorze nad dwoma naczyniami z prekursorem APTESu i katalizatorem trietyloaminy w proporcji 3 : 1. Reakcja przebiegała w temperaturze pokojowej w atmosferze gazu obojętnego (azotu) przez 2 godziny. Po tym czasie usunięto odczynniki z eksykatora i po ponownym napełnieniu eksykatora azotem szkiełka nakrywkowe pozostawiono na 2 dni, aż do zakończenia procesu sieciowania i starzenia próbek.

Właściwości hydrofobowo-hydrofilowe modyfikowanego szkła zbadano za pomocą goniometru Attension® będącego na wyposażeniu Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (IChF PAN). Dla porównania zmierzono kąty zwilżania dla niezmodyfikowanego szkiełka. Na każde szkiełko nakrywkowe nakroplono po 1 µl wody destylowanej w trzech miejscach i wykonano po 60 pomiarów kątów zwilżania dla każdej kropli (rys. 68.). Dla podłoża zmodyfikowanego APTES średnia wartość kąta zwilżania wynosi 60 ± 3°, zgodnie z informacją dostępną w literaturze wartość ta powinna wynosić 64,8 ± 2,2° [153]. Pomiar kątów zwilżania wykazał, że modyfikacja podłoża silnie wpływa na

zmianę kąta zwilżania w porównaniu z niemodyfikowanym szkiełkiem, dla którego kąt zwilżania wynosi 9 ± 2°.



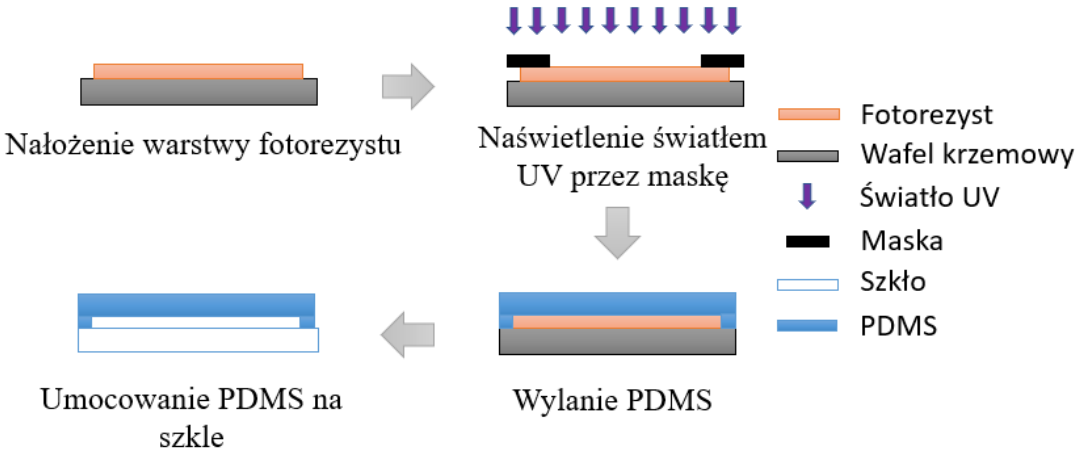
Rys. 68. Przykładowe zdjęcia kropli wody destylowanej na powierzchni zmodyfikowanej a) APTES oraz streptawidyną oraz b) szkiełku nakrywkowym wykonane goniometrem.

9.2 Orientacja nanodrutów srebra

Do zorientowania AgNWs na powierzchni szkiełka nakrywkowego wykorzystano mikrokanały wytworzone przy pomocy standardowej litografii. Kanały mikrofluidyczne powstały dzięki współpracy z dr. hab. Martinem Jönsson-Niedziółką oraz dr Ewą Rożniecką w IChF PAN.

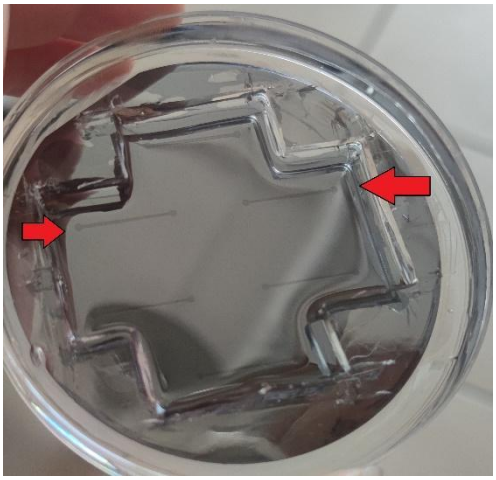
Proces przygotowania mikrokanałów na waflu krzemowym składa się z następujących etapów (rys. 69.):

1. W pierwszym etapie nałożono warstwę fotorezystu SU-8 2100 na wafel krzemowy za pomocą powlekacza obrotowego. Następnie warstwę fotorezystu naświetlono światłem ultrafioletowym przez maskę, co powoduje usieciowanie tylko tych miejsc, które nie są zasłonięte przez maskę.
2. Nieusieciowany fotorezyst usunięto poprzez zanurzenie w roztworze AZ 400 K, a powstałe struktury w warstwie fotorezystu utworzyły wzór mikrokanału. Otrzymano w ten sposób mikrokanały o szerokości 1 mm, wysokości 100 µm oraz długości1,3 cm.
3. Następnie w jednorazowym naczyniu wymieszano bazę elastomeru silikonowego (typ SYLGARD 184, DOW) ze środkiem sieciującym w proporcji 10 : 1. Otrzymano kompozyt polidimetylosiloksan (PDMS).
4. Naczynie z kompozytem umieszczono w eksykatorze z podłączoną pompą próżniową w celu usunięcia pęcherzyków gazu.
5. Następnie kompozyt PDMS wylano na mikrokanały na waflu krzemowym i całość umieszczono w piecu w temperaturze 65 ˚C na 90 min, aby PDMS się usieciował.
6. Po usieciowaniu przycięto PDMS do wymiaru szkiełka nakrywkowego.



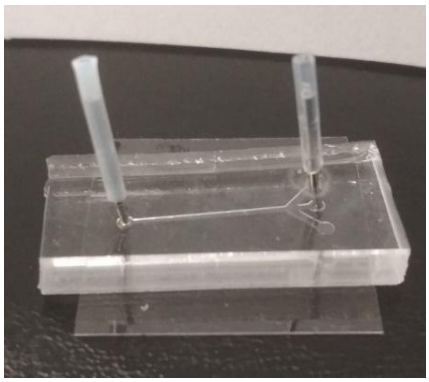
Rys. 69. Schemat przygotowania mikrokanałów PDMS na szkiełku nakrywkowym.

Przygotowanie mikrokanałów wymaga wielu etapów i specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego, a także odpowiedniej wiedzy i doświadczenia w dziedzinie mikrofabrykacji. Na rys. 70. przedstawiono zdjęcie wafla krzemowego z mikrokanałami i usieciowanym PDMS przed jego wycięciem.



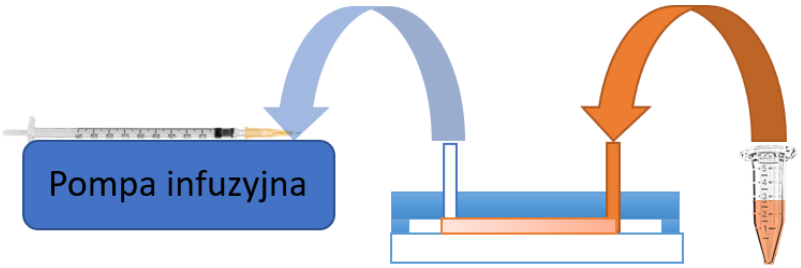
Rys. 70. Zdjęcie wafla krzemowego przyklejonego do szalki Petriego z 6. mikrokanałami.

Proces przygotowywania podłoży do układania nanodrutów srebra kończy złączenie wybranego szkiełka nakrywkowego z PDMS. W tym celu aktywuje się je w urządzeniu czyszczącym plazmą tlenową (PDC-001, Harrick-Plasma) przez 60 s. Pod wpływem aktywacji plazmą usunięte zostają organiczne zanieczyszczenia węglowe, a powstają grupy hydroksylowe (-OH). Po wyjęciu szkiełko nakrywkowe jest sklejane z PDMS i kompozyt jest trwale związany z podłożem. Gotowe podłoże szkło-PDMS przedstawiono na rys. 71., umieszczono w nim ścięte igły, do których podłączony jest wężyk silikonowy. Otwory w PDMS najlepiej wykonać ściętą igłą biopsyjną.



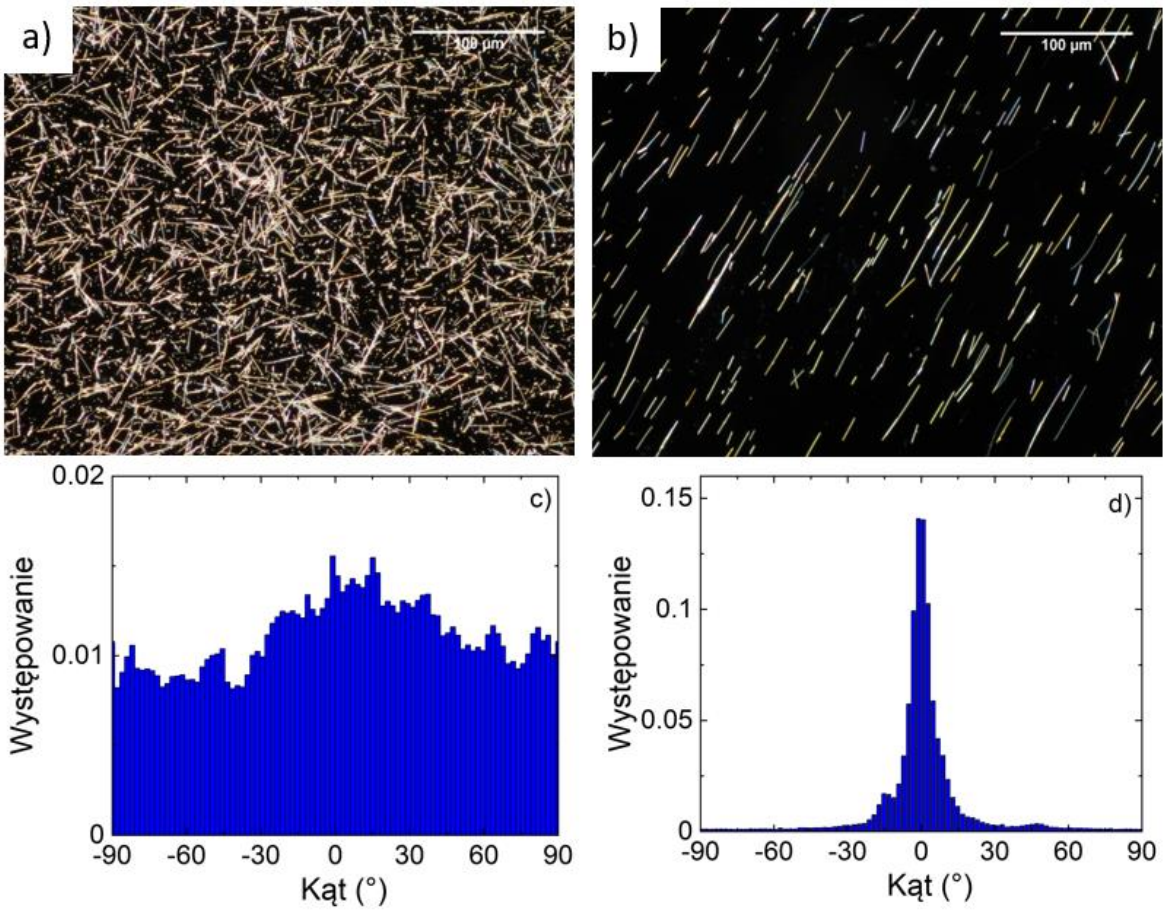
Rys. 71. Zdjęcie szkiełka nakrywkowego z kanałem mikrofluidycznym PDMS.

Nanodruty srebra orientowano na powierzchni szkła podczas wymuszonego przepływu zawiesiny przez mikrokanał przy pomocy pompy infuzyjnej w trybie zasysania 200 µl/min (rys. 72.). Umożliwia to zastosowanie niewielkiej objętości zawiesiny AgNWs. w proporcji 1 cz. AgNWs i 20 cz. H_2O, aby uzyskać odseparowane do siebie AgNWs na powierzchni zmodyfikowanego szkła.



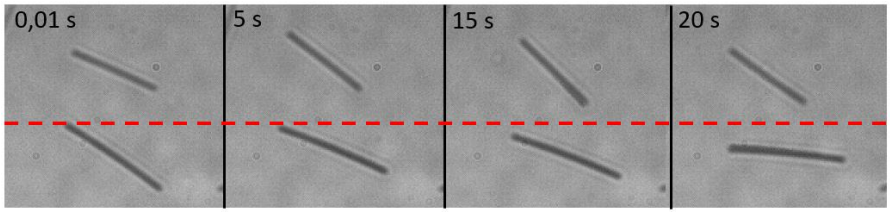
Rys. 72. Schemat wprowadzania AgNWs oraz białka fotoaktywnego PCP do mikrokanału.

Na rys. 73. zaprezentowano zdjęcia AgNWs nakroplonych za pomocą pipety na szkiełko (rys. 73. (a)) oraz zorientowanych w kanale mikrofluidycznym AgNWs (rys. 73. (b)). Zdjęcia wykonano w IChF PAN za pomocą mikroskopu optycznego w trybie ciemnego pola. AgNWs w przypadku nakroplenia na szkiełko za pomocą pipety są rozłożone w losowy sposób, co potwierdzają histogramy rozkładu kątów ułożenia AgNWs (rys. 73. (c)). W przypadku orientacji AgNWs, wykorzystując przepływ w kanale mikrofluidycznym, zauważono, że przeważająca większość AgNWs ułożona jest w tym samym kierunku. Potwierdza to histogram przedstawiony na rys. 73. (d). Oznacza to, że opracowana technika orientacji AgNWs pozwala uzyskać wysokiej jakości próbki w powtarzalny sposób.



Rys. 73. Zajęcia wykonane za pomocą mikroskopii optycznej w trybie ciemnego pola przedstawiające porównanie AgNWs a) nakroplonych za pomocą pipety z b) ułożonych w kanale mikrofluidycznym. Histogramy c) i d) odpowiednio przedstawiają analizę rozkładu kątów orientacji AgNWs, oszacowanej na podstawie uzyskanych zdjęć dla badanych podłoży [154].

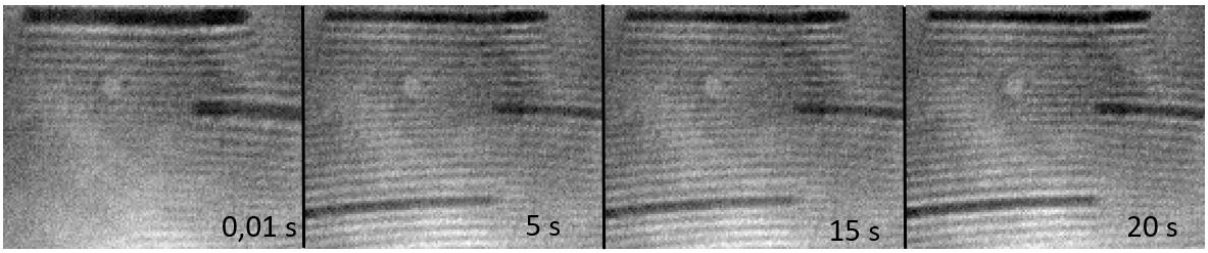
W celu wykazania stabilności umocowania AgNWs na podłożu szklanym wykonano pomiar, w którym wodną zawiesinę AgNWs wprowadzono do kanału mikrofluidycznego umieszczonego na szkiełku nakrywkowym. Wybrane klatki z zarejestrowanego filmu uzyskane za pomocą mikroskopu szerokiego pola dla próbki zorientowanych AgNWs na niemodyfikowanym szkle przedstawiono na rys. 74.. Zaobserwowano za pomocą kamery Andor iXon x3, że w przypadku niesfunkcjonalizowanego podłoża, AgNWs zaczynają się poruszać. Cała kinetyka otrzymana dla zorientowanych AgNWs na niemodyfikowanym szkle znajduje się pod linkiem.



Rys. 74. Klatki z filmu uzyskanego pomocą mikroskopu szerokiego pola w trybie transmisyjnym dla czasu akwizycji 0,1 s, dla AgNWs w kanale mikrofluidycznym na szkiełku podstawowym bez modyfikacji [154].

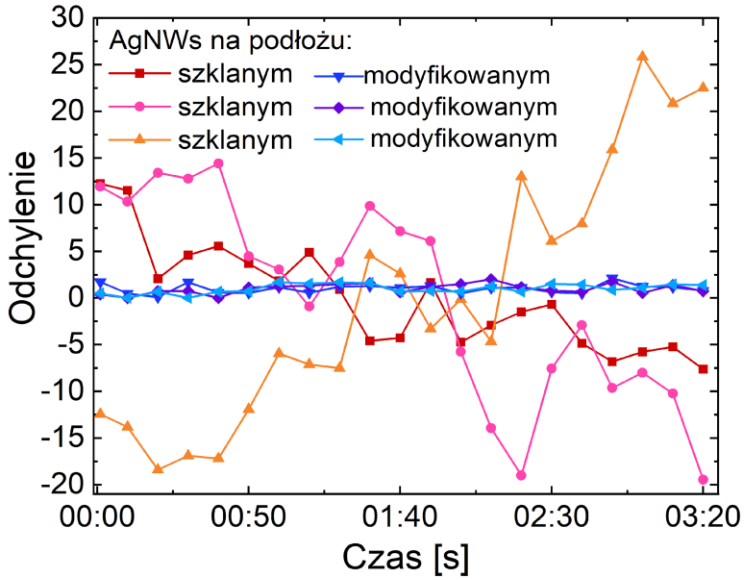
Z tego powodu zdecydowano się na modyfikację szkiełka nakrywkowego za pomocą silanu APTES, do którego istnieje możliwość chemicznego związania streptawidyny. Wykorzystano w ten

sposób oddziaływanie streptawidyna-biotyna, aby trwale unieruchomić zmodyfikowane biotyną AgNWs do powierzchni. Na rys. 75. przedstawiono klatki z filmu wykonanego przy pomocy mikroskopu szerokiego pola dla szkiełka zmodyfikowanego APTES z przyłączoną streptawidyną. Po wykonaniu takiej samej operacji jak dla niemodyfikowanego szkła, zaobserwowano, że AgNWs nie fluktuują. Cała kinetyka otrzymana dla zorientowanych AgNWs na modyfikowanym szkle znajduje się pod linkiem.



Rys. 75. Klatki z filmu uzyskanego w trybie transmisyjnym za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola dla czasu akwizycji 0,1 s, dla AgNWs w kanale mikrofluidycznym na których AgNWs na szkiełku podstawowym modyfikowanym streptawidyną [154].

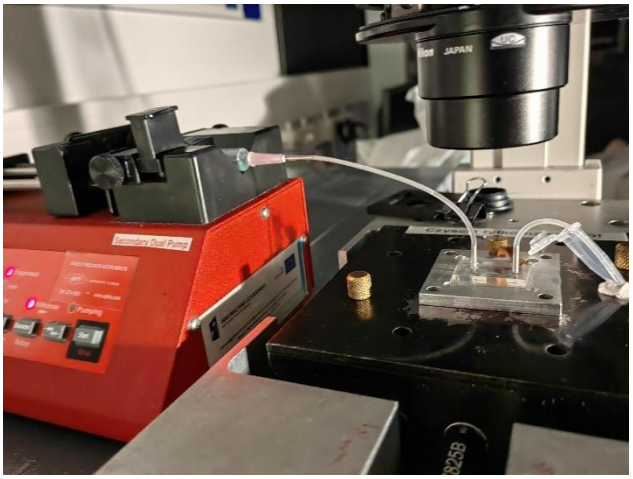
W celu porównania wpływu funkcjonalizacji podłoża na stabilność AgNWs na powierzchni wykonano wykres przedstawiający odchylenie kątowe trzech wybranych nanodrutów srebra w funkcji czasu (rys. 76.). W przypadku próbki ze szkłem niemodyfikowanym widoczne są wyraźne zmiany położenia AgNWs w czasie, sięgające 20°. Jest to spowodowane obecnością wody i ruchami Browna. Obserwacja ta świadczy o braku związania AgNWs do podłoża, ponieważ występują pomiędzy nimi jedynie oddziaływania niespecyficzne. W przypadku próbki ze szkłem zmodyfikowanym, AgNWs są trwale unieruchomione na powierzchni szkła pokrytego streptawidyną, co wskazuje na istnienie silnych oddziaływań między AgNWs a streptawidyną, a sama streptawidyna jest trwale związana z powierzchnią szkła. Modyfikacja szkiełka nakrywkowego jest ważnym krokiem, który pozwala na uzyskanie trwałego unieruchomienia AgNWs na powierzchni.



Rys. 76. Zmiana kąta położenia AgNWs w funkcji czasu w ciągu 300 s wybranego pojedynczego AgNWs z badanego podłoża [154].

9.3 Wykrywanie białka przez zorientowane nanodruty srebra

Eksperymenty koniugacji białka fotoaktywnego PCP ze zmodyfikowanymi nanodrutami srebra w kanale mikrofluidycznym wykonano przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola. Na rys. 77. przedstawiono układ do pomiaru *in-situ* w przepływie składający się z: pompy infuzyjnej, kanału mikrofluidycznego umieszczonego na stoliku fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola. Układ przepływowy działał w trybie zasysania.

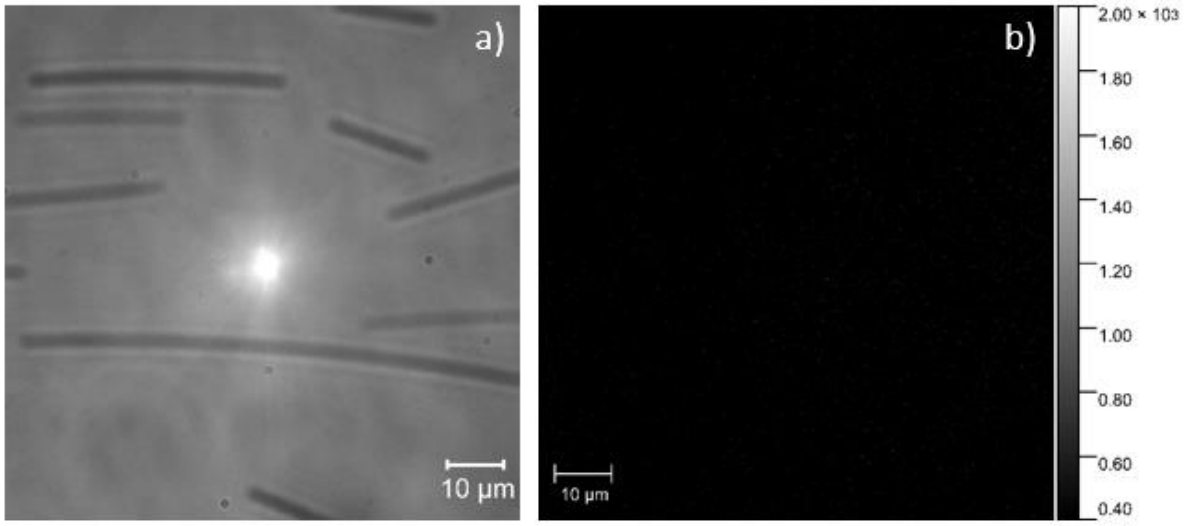


Rys. 77. Zdjęcie zamocowanego układu mikrofluidycznego na fluorescencyjnym mikroskopie szerokiego pola.

Opis pomiarów wykrywania białka w kanałach mikrofluidycznych przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola:

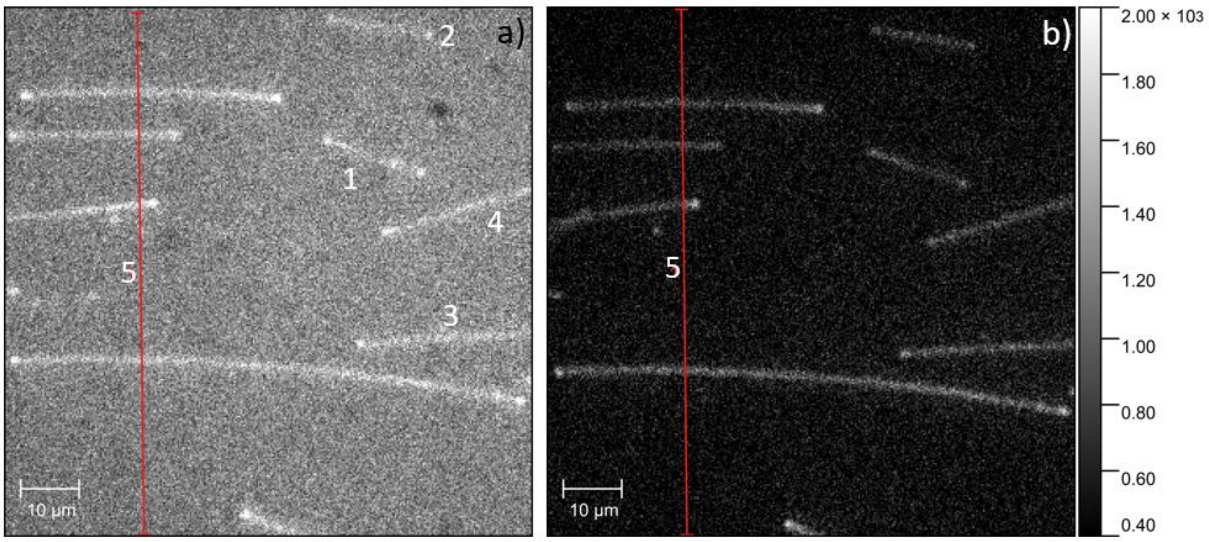
1. Przepłukano kanał mikrofluidyczny 1 ml buforu PBS.
2. Wybrano miejsce w kanale mikrofluidycznym, dla którego rejestrowano moment przyłączania się AgNWs do podłoża.
3. Rozpoczęto rejestrację kinetyki podczas orientacji AgNWs (prędkość zasysania 200 µl/min).
4. Przepłukano kanał mikrofluidyczny 1 ml buforu PBS, aby usunąć niezwiązane AgNWs.
5. Przełączono mikroskop w tryb fluorescencyjny.
6. Rozpoczęto rejestrację kinetyki fluorescencji PCP wprowadzonego do mikrokanału z wykorzystaniem oświetlacza LED w trybie pracy ciągłej.
7. Przepłukano kanał mikrofluidyczny 1 ml buforu PBS, aby usunąć niezwiązane PCP.
8. Rozpoczęto rejestrację kinetyki fluorescencji białka PCP wypłukiwanego z mikrokanału.

Miejsce ze zorientowanymi AgNWs wybrano po przepuszczeniu buforu PBS przez mikrokanał. Mapę transmisji światła białego przedstawiono na rys. 78. (a), zaprezentowano na niej wybrane zorientowane nanodruty srebra.



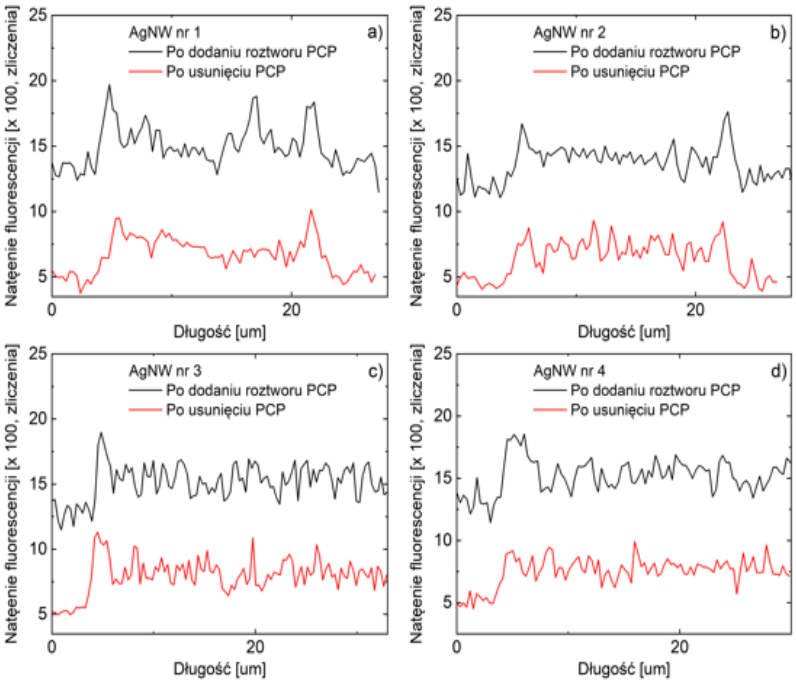
Rys. 78. a) Mapa transmisji światła białego b) mapa fluorescencji zorientowanych AgNWs na podłożu zmodyfikowanym silanem APTES i streptawidyną.

Po wybraniu miejsca ze zorientowanymi AgNWs przystąpiono do rejestracji kinetyki map natężenia fluorescencji PCP, które po chwili wtłoczono do mikrokanału (100 µl). Na rys. 78. (b) zaprezentowano, że AgNWs po zorientowaniu w kanale mikrofluidycznym na zmodyfikowanym podłożu nie wykazują fluorescencji. Na rys. 79. (a) przedstawiono mapę natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs w kanale mikrofluidycznym po 35 sekundach od dodania roztworu PCP. AgNWs są poziomymi liniami wyraźnie widocznymi na tle fluorescencji białka PCP w roztworze. Końce AgNWs są bardziej rozświetlone niż środki. Większe natężenie fluorescencji białka fotoaktywnego PCP na AgNWs wskazuje na wzmocnienie plazmonowe w nanodrutach srebra, co potwierdzono w rozdziale *Wykrywanie białka na podłożu w czasie rzeczywistym*. Kontrast pomiędzy fluorescencją PCP na AgNWs i szkle jest mniejszy niż w eksperymencie z wykorzystaniem obiektywu immersyjnego o powiększeniu 100x (rys. 53.). W kanale znajduje się wiele białek PCP, których fluorescencja może być rejestrowana przez obiektyw powietrzny 50x. Postanowiono zwiększyć kontrast pomiędzy AgNWs a tłem poprzez wypłukanie niezwiązanego PCP z mikrokanału. Na rys. 79. (b) zaprezentowano to samo miejsce co na rys. 78., ale po wypłukaniu PCP. Pozycja AgNWs jest wyraźniej widoczna, ponieważ tło jest niższe. Kinetyki zmierzone dla AgNWs zorientowanych na szkle przed dodaniem PCP oraz po wypłukaniu PCP znajdują się odpowiednio pod linkiem oraz linkiem.



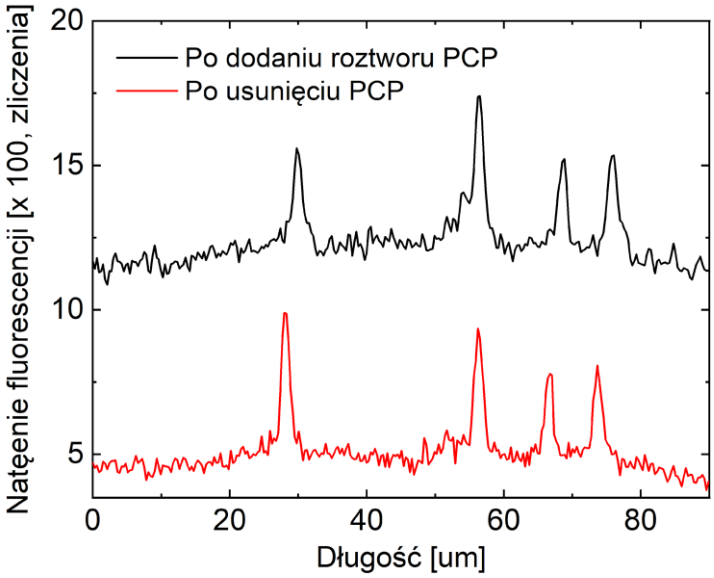
Rys. 79. Mapy natężenia fluorescencji PCP skoniugowanego ze zorientowanymi zmodyfikowanymi AgNWs w kanale mikrofluidycznym: porównuje się klatki tego samego obszaru próbki po wstrzyknięciu roztworu PCP a) i po usunięciu roztworu PCP b) [154].

Na wykresach (rys. 80.) zaprezentowano przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż 4 drutów AgNWs po wstrzyknięciu roztworu PCP (czarny) i usunięciu (czerwony) roztworu PCP oznaczone nr. od 1 do 4. Dane uzyskano z sumowania 4 pixeli. Pozycja AgNWs w przypadku wykresów nr 1 i 2 jest wyraźnie widoczna. Natężenie fluorescencji PCP na pierwszym AgNW jest wyższe niż w przypadku drugiego. Średni sygnał na AgNWs wynosi 15 000, a szum można przyjąć na poziomie 13 500, daje to stosunek sygnału do szumu 1,11. W przypadku zestawu nr 2, sygnał wynosi około 14 200, a szum około 11 500. Daje to stosunek sygnału do szumu 1,29. Analogiczna sytuacja jest dla pary nr 3 i 4, jednak w tym przypadku zaobserwowano jedynie część AgNWs.



Rys. 80. Przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż AgNWs po wstrzyknięciu roztworu PCP (czarny) i usunięciu (czerwony) roztworu PCP.

Na wykresie (rys. 81.) zaprezentowano przekroje przez całą mapę natężenia fluorescencji PCP, oznaczone na rys. 79. nr. 5. Zaobserwowano piki, których sygnał pochodzi od czterech AgNWs, dla których stosunek sygnału do szumu jest podobny i wynosi 0,5. Na czerwono na rys. 79. zaprezentowano przekrój po usunięciu niezwiązanego PCP, stosunek sygnału do szumu poprawia się i wynosi 1.



Rys. 81. Przekroje natężenia fluorescencji PCP przez całą wykonaną mapę natężenia fluorescencji po wstrzyknięciu roztworu PCP (czarny) i usunięciu (czerwony) roztworu PCP [154].

Do pomiarów fluorescencji PCP w układzie mikrofluidycznym wykorzystano obiektyw powietrzny 50x, ponieważ jest on mniej czuły na poruszanie się próbki. Wybranie miejsca, w którym będzie rejestrowana kinetyka zorientowania AgNWs na powierzchni szkła wymaga uwagi, aby obrazowany obszar był z płaszczyzny szkła, a nie PDMS. Podłoże szklane jest czyste, więc wybranie odpowiedniej płaszczyzny nie jest proste. Dodatkowo może zdarzyć się, że AgNWs w wybranym obszarze nie osadzą się i nie uda się zarejestrować momentu unieruchomienia zorientowanych AgNWs na podłożu. Podczas eksperymentu nie można dopuścić do sytuacji, aby w układzie pojawił się pęcherzyk powietrza.

9.4 Podsumowanie rozdziału

Badania przedstawione w tym rozdziale miały na celu sprawdzenie wydajności orientowania AgNWs w kanale mikrofluidycznym. Wyniki jasno wskazują, że AgNWs orientują się na powierzchni szkła, jednak aby orientacja była trwała konieczne jest unieruchomienie AgNWs za pomocą grup funkcyjnych na zmodyfikowanej powierzchni szkła. Udowodniono, że białko fotoaktywne koniuguje się do zorientowanych AgNWs, więc modyfikacja nie wpływa na biologiczną aktywność białka. Cały proces wykrywania białka przez AgNWs w kanale mikrofluidycznym odbywa się w roztworze bez zagrożenia odparowania rozpuszczalnika. Pomiary w przepływie umożliwiają śledzenie reakcji, które

wymagają dłuższego czasu [117] i [148]. Planowane są dalsze eksperymenty z mniejszym stężeniem białka fotoaktywnego PCP, aby określić limit detekcji dla obiektywu powietrznego.

Wadą zastosowania kanału mikrofluidycznego jest konieczność użycia większej objętości AgNWs oraz analitu – białka fotoaktywnego PCP (100 µl). Co więcej, podczas rejestracji kinetyki map natężenia fluorescencji czasami tracono sygnał przez poruszenie podłożem podczas wtłaczania roztworu. Modyfikacja podłoża zachowuje aktywność APTES przez około 14 dni oraz wymaga wielu etapów przygotowania, co uznano za wadę.

W kolejnym etapie zaproponowano wykorzystanie kanałów mikrofluidycznych do przygotowania plazmonowych czipów. Do ich wytworzenia użyto trwalszej i uniwersalnej metody modyfikacji podłoża.

10. WYKRYWANIE BIAŁKA NA PLAZMONOWYM CZIPIE

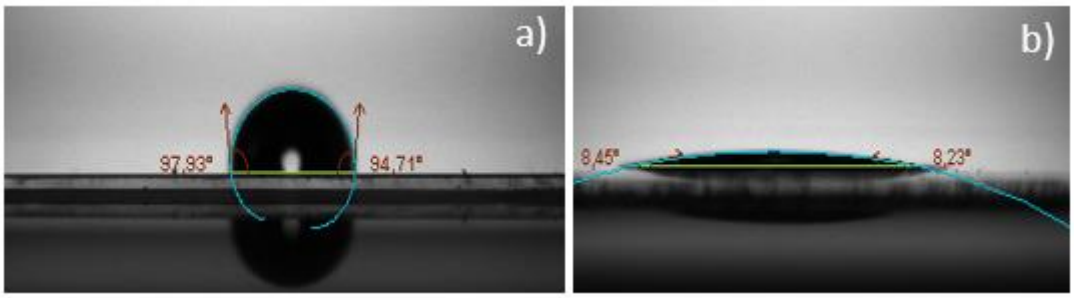
W niniejszym rozdziale rozprawy doktorskiej opisano wykorzystanie nanodrutów srebra jako plazmonowych czipów. Skupiono się na uproszczeniu metody modyfikacji powierzchni podłoża. Sprawdzono, czy zmiana modyfikacji podłoża umożliwia orientację nanodrutów srebra. Przetestowano, czy grupy funkcyjne na nanodrutach srebra przetrwały po zdjęciu mikrokanału, a także, czy AgNWs wykrywają białko. Na początku rozdziału przedstawiono opracowaną procedurę modyfikacji powierzchni podłoży szklanych. Następnie opisano proces przygotowania czipów. Kolejną częścią są pomiary wykrywania białka za pomocą plazmonowych chipów.

10.1 Modyfikacja powierzchni podłoży szklanych

W celu osadzenia AgNWs na powierzchni podłoża w jednoetapowej modyfikacji przetestowano wybrane metody modyfikacji powierzchni z wykorzystaniem samoorganizujących się warstw (SAMs) [155, 156]. Z przetestowanych metod najlepsze rezultaty otrzymano dla podłoży szklanych zmodyfikowanych za pomocą silanu octadecylotrimetoksysilnu (OTMS). OTMS zastosowano, aby otrzymać hydrofobową powierzchnię szkła, na której będą osadzane nanodruty srebra. Natomiast nie powinny osadzać się na nim emitery. Zmiana właściwości hydrofilowych szkła powinna również spowodować, że kropla wody nie będzie rozlewać się na powierzchni, co spowoduje, że będzie wolniej odparowywać.

Modyfikację podłoża za pomocą OTMS wykonano w następujący sposób: szkiełka nakrywkowe w stojaku teflonowym umyto w płuczce ultradźwiękowej przez 10 min w acetonie, a następnie w dichloroetanie. Na końcu przepłukano je kilkukrotnie wodą destylowaną. Następnie szkiełka zanurzono w roztworze: nadtlenku wodoru (H_2O_2 30%): amoniaku (NH_3) w proporcjach 5:1:1, a całość umieszczono w łaźni wodnej na mieszadle magnetycznym z funkcją grzania w temperaturze 70°C przez 60 min. Po 1 h szkiełka dokładnie przepłukano wodą destylowaną i umieszczono w piecu laboratoryjnym w temperaturze 100 °C na 4 godziny. W kolejnym kroku suche szkiełka w stojaku teflonowym włożono do zlewki z 4 % roztworem OTMS w toluenie. Zlewkę zamknięto szczelnie w eksykatorze na 7 dni. Po wyjęciu szkiełek nakrywkowych z roztworu OTMS przepłukano je toluenem, a następnie kilka razy EtOH. Szkiełka wysuszono sprężonym azotem, umieszczono w stojaku i zamknięto w eksykatorze. Zmodyfikowane OTMS szkiełka nakrywkowe zachowują swoje właściwości przez kilka miesięcy.

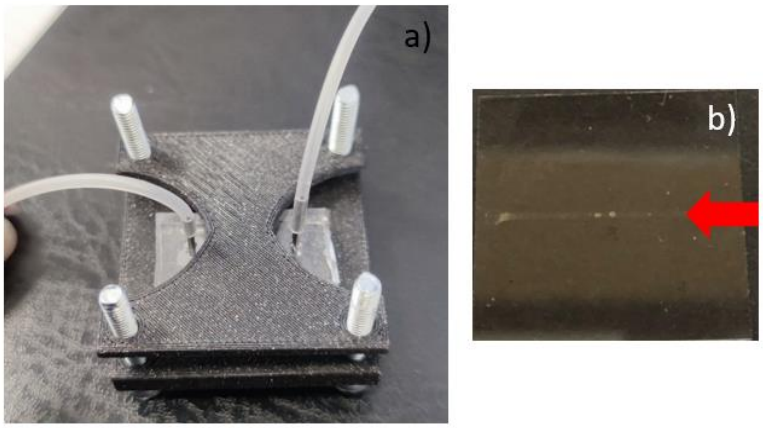
Modyfikację szkła OTMS sprawdzono poprzez pomiar kąta zwilżania za pomocą goniometru Attension®. Wykonano pomiar odniesienia dla czystego niemodyfikowanego szkiełka nakrywkowego, przykładowe zdjęcia kropel znajdują się na rys. 82. Na oba szkiełka nakroplono po 1 µl wody destylowanej w trzech miejscach i wykonano po 60 pomiarów kątów zwilżania dla każdej strony kropli. W przypadku podłoża modyfikowanego OTMS średnia dla wszystkich pomiarów wynosi 96 ± 2°. Według autorów przepisu na modyfikacje kąt zwilżania powinien wynosić 107 ± 4°, jednak eksperymenty wykonano na podłożu tlenku cyny indu (ITO). Różnica może również wynikać z ilości wody w toluenie. Dla szkiełka niemodyfikowanego średnia wyniosła 9 ± 2°. Otrzymane wyniki, świadczą o tym, że powierzchnię szkła nakrywkowego pokryto OTMS i jest ona hydrofobowa.



Rys. 82. Przykładowe zdjęcia kropli wody destylowanej na powierzchni zmodyfikowanej a) OTMS oraz b) szkiełku nakrywkowym wykonane goniometrem.

10.2 Przygotowanie czipów

Metoda przygotowania plazmonowych czipów ze zorientowanymi AgNWs pokrywa się w większości kroków z metodą przygotowywania kanałów mikrofluidycznych opisaną w rozdziale *Wykrywanie białka w mikrokanałach*. Różnicą jest brak aktywacji powierzchni PDMS za pomocą urządzenia czyszczącego plazmą tlenową. Na zmodyfikowanym szkiełku nakrywkowym umieszczono mikrokanał PDMS. Całość złączono w plastikowym uchwycie z otworami na igły skręcanym na 4 śruby. Uchwyt wydrukowano za pomocą drukarki 3D (rys. 83. (a)). Następnie wykorzystując pompę infuzyjną w trybie zasysania, wtłoczono do mikrokanału zmodyfikowane AgNWs. Gdy zawiesina AgNWs zbliżała się do końca, dokroplono do plastikowej próbówki wodę Milli-Q, aby usunąć niezwiązane AgNWs. Następnie usunięto ścięte igły z PDMS, rozkręcono uchwyt i delikatnie oddzielono szkło z AgNWs od PDMS (rys. 83. (b)).



Rys. 83. a) Zdjęcie układu do przygotowania plazmonowego czipu ze zorientowanymi AgNWs b) Zdjęcie plazmonowego czipu.

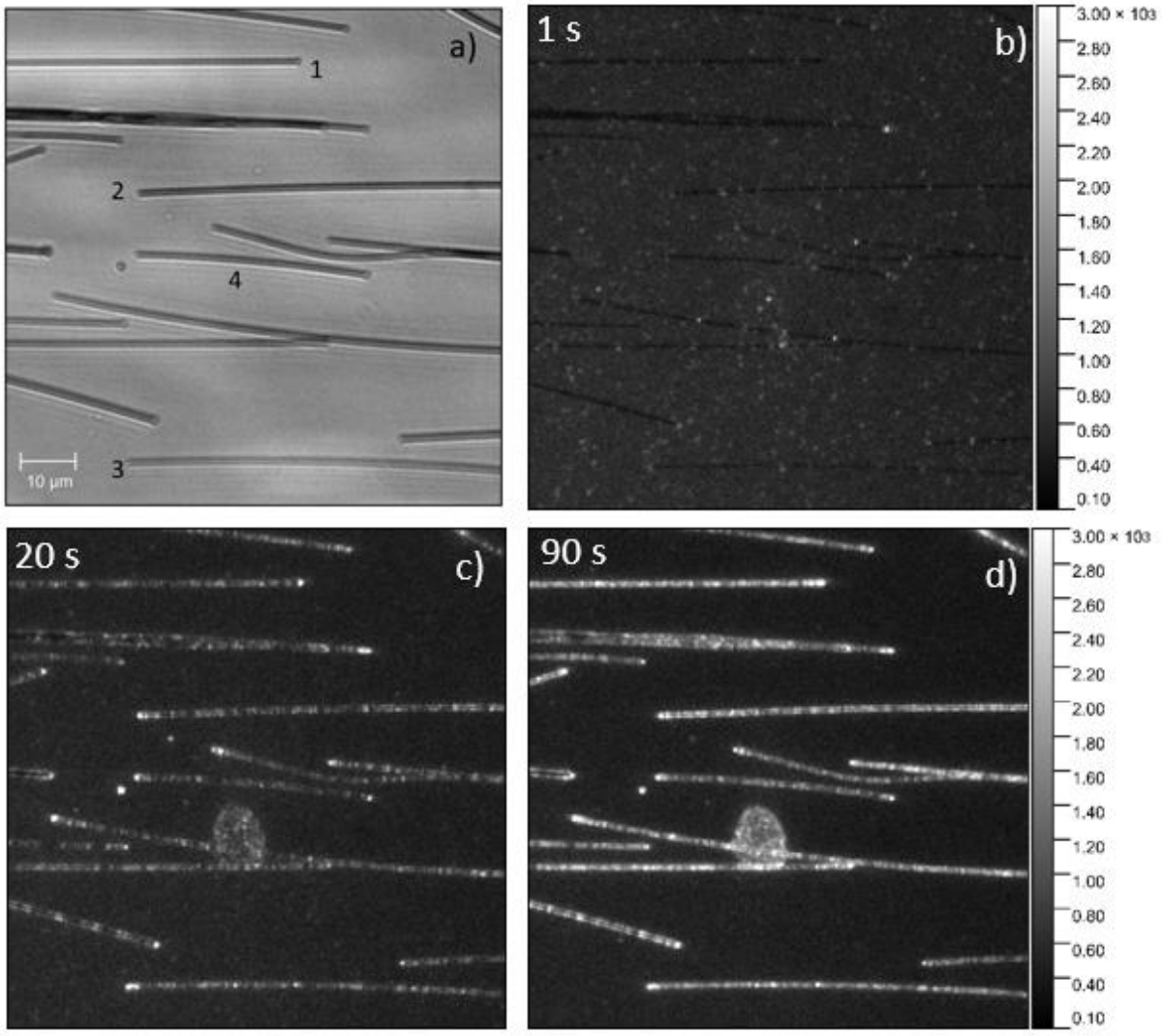
10.3 Wykrywanie białka za pomocą plazmonowych czipów

W pierwszej kolejności sprawdzono, czy proces modyfikacji powierzchni AgNWs był efektywny i jest w nich wystarczająca ilość grup funkcyjnych. W tym celu wykonano eksperyment z wykorzystaniem białka fotoaktywnego PCP o stężeniu 0,2 μg/ml na losowo osadzonych AgNWs na niemodyfikowanym szkiełku.

Po wykonaniu testu sprawdzającego modyfikację AgNWs wykonano docelowe eksperymenty. Na rys. 84. (a) przedstawiono mapę transmisji światła białego na plazmonowym czipie AgNWs. Pomiary wykonano na fluorescencyjnym mikroskopie szerokiego pola z plazmonowym czipem umieszczonym na standardowym stoliku. Nanodruty srebra zorientowano w jednym kierunku. Modyfikacja za pomocą OTMS prowadzi do efektywnego unieruchamiania AgNWs. W tym przypadku jest ich o wiele więcej w wybranym obszarze w porównaniu z eksperymentami, gdzie były one osadzane na niemodyfikowanym szkiełku nakrywkowym. Zaobserwowano znaczny wzrost ilości osadzonych nanodrutów srebra w na podłożu modyfikowanym OTMS również w porównaniu do podłoża modyfikowanego APTES-streptawidyna (rys. 78. (a)).

Na mapie natężenia fluorescencji próbki przed nakropleniem PCP zaobserwowano jednorodne tło. Sekundę po nakropleniu roztworu zawierającego PCP na powierzchni podłoża OTMS zaobserwowano aglomeraty białka (rys. 78. (b)). Miejsca, gdzie znajdują się AgNWs są ciemne, ale można na nich zaobserwować kilka aglomeratów PCP. Na mapie natężenia fluorescencji PCP, którą wykonano po 20 s, zaobserwowano AgNWs pokryte białkiem PCP (rys. 78. (c)). Stopień pokrycia AgNWs jest wystarczający, aby zaobserwować silny kontrast pomiędzy AgNWs a podłożem szklanym. Oznacza to, że natężenie fluorescencji PCP skoniugowanego z AgNWs jest znacznie wyższe niż tych na szkle. W tle zaobserwowano znacznie mniej aglomeratów PCP niż na pierwszej mapie natężenia fluorescencji tuż po nakropleniu PCP. AgNWs nie utraciły właściwości wykrywających białko

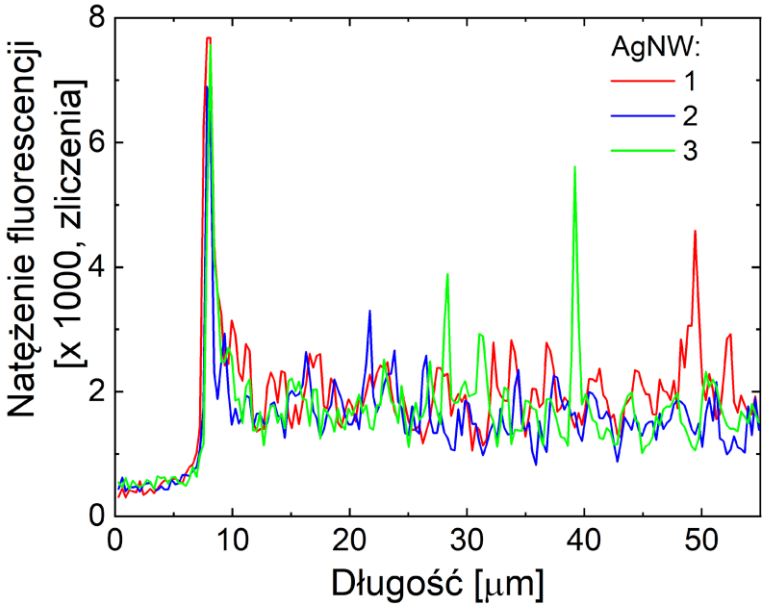
fotoaktywne PCP wskutek orientacji na powierzchni podłoża zmodyfikowanego OTMS i usunięciu kanału PDMS. Na ostatniej mapie natężenia fluorescencji PCP, którą wykonano po 90 s kontrast pomiędzy AgNWs, a białkiem PCP jest znacznie wyższy, niż po czasie 20 s od nakroplenia roztworu PCP (rys. 78. (d)). Białko PCP jednorodnie pokryło powierzchnię AgNWs. Kinetykę natężenia fluorescencji PCP (0,2 μg/ml) nakroplonego na plazmonowy czip umieszczono pod linkiem.



Rys. 84. a) Mapa transmisji światła białego zorientowanych nanodrutów srebra wraz z mapami natężenia fluorescencji PCP (0,2 μg/ml) na plazmonowym czipie ze zorientowanymi AgNWs w wybranych odstępach czasu 1 s b), 20 s c) i 90 s d) od nakroplenia roztworu białka fotoaktywnego PCP [154].

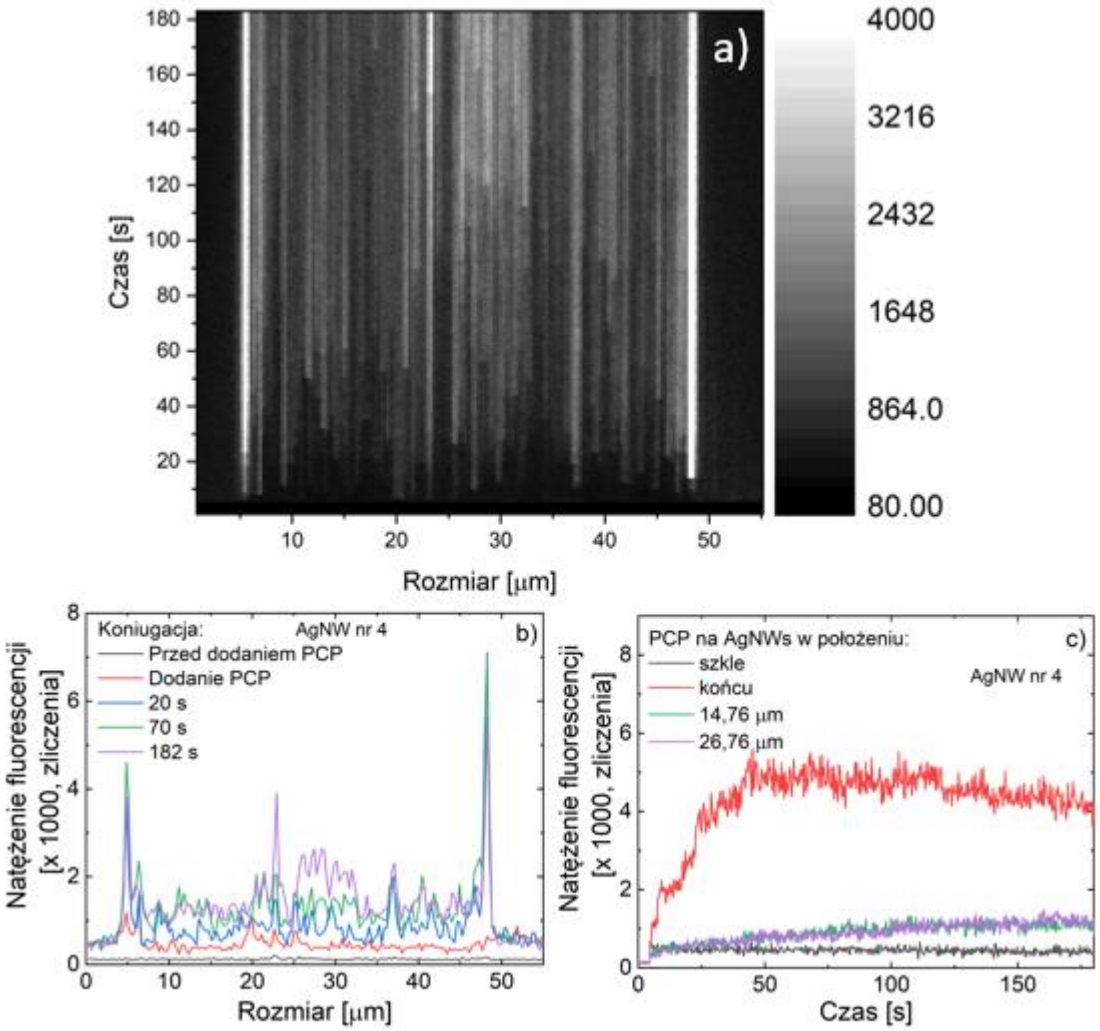
Na rys. 85 zaprezentowano przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż trzech AgNWs po 20 s od nakroplenia białka fotoaktywnego PCP. Wybrane AgNWs oznaczono na rys. 84 (a). Na wykresie zaprezentowano przekrój przez tło, końcówkę AgNW oraz ponad 40 μm jego długości. Wartości dla tła pokrywają się dla wszystkich trzech AgNWs. Sygnał na końcach jest również zbliżony dla każdego z AgNWs. W przypadku sygnału uzyskanego wzdłuż powierzchni AgNWs sygnał w każdym przypadku jest niejednorodny, oscylacje ± 500 zliczeń. Pojawia się również kilka miejsc o wyższym natężeniu

fluorescencji PCP, które przypisano aglomeratom. Sygnały na AgNWs mają zbliżoną wartość, co przypisano podobnej ilości białka koniugującego do AgNWs.



Rys. 85. Przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż trzech AgNWs po 20 s od nakroplenia białka fotoaktywnego PCP.

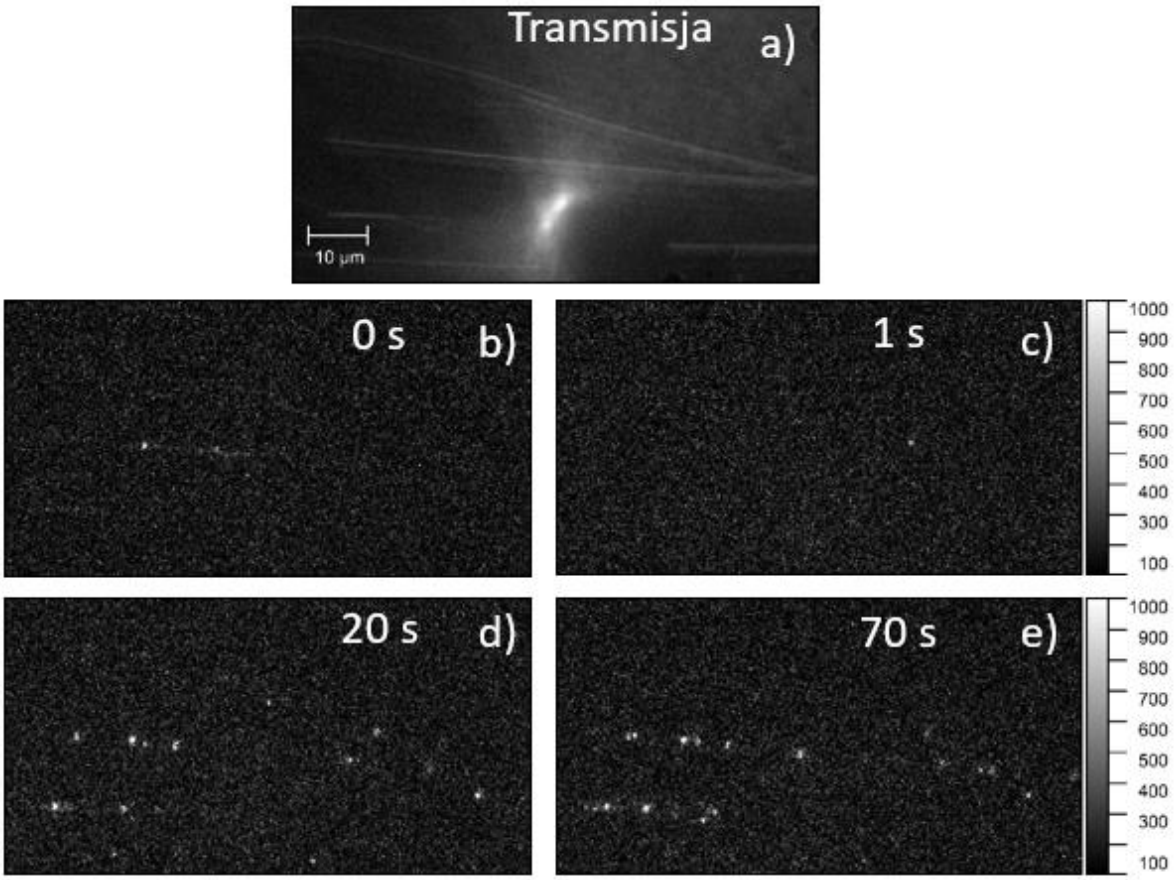
Kinetykę natężenia fluorescencji PCP zanalizowano w analogiczny sposób jak w rozdziale Wykrywanie białka na podłożu w czasie rzeczywistym. Na rys. 86. przedstawiono zachowanie natężenia fluorescencji PCP w funkcji czasu dla AgNW oznaczonego nr 4 (rys. 84. (a)) oraz na części podłoża. Jasne pionowe paski odpowiadają fluorescencji białka PCP, które skoniugowało z AgNW. Proces koniugacji poszczególnych białek jest widoczny przez cały czas rejestracji kinetyki. Końce AgNW wykazują wyższe natężenie fluorescencji PCP praktycznie przez cały czas obserwacji. Przekroje natężenia fluorescencji PCP przedstawiono na rys. 86. (b). Zaobserwowano nasycenie natężenia fluorescencji PCP po 70 s, co może wskazywać, że prawie cała powierzchnia nanodrutu srebra badanego w eksperymencie jest pokryta specyficznie przyłączonym białkiem. Przebiegi czasowe natężenia fluorescencji PCP jednoznacznie wskazały moment dodania białka PCP (rys. 86. (c)). Natężenie fluorescencji PCP na szkle nieznacznie zmniejszyło się od momentu nakroplenia roztworu na powierzchnię czipu AgNWs. Natężenie fluorescencji PCP na AgNWs jest wielokrotnie wyższe niż na szkle, od 2 do nawet 7 razy. Jest jednak niższe niż na końcach AgNW, na których wartości są nawet 7-krotnie wyższe. Świadczy to o silnym lokalnym wzmocnieniu fluorescencji PCP, bądź o gromadzeniu się dużej ilości białek w pobliżu końców AgNWs. Na końcu AgNW zaobserwowano narastanie natężenia fluorescencji przez długi czas (do około 50 s). W związku z tak silnymi wzmocnieniami fluorescencji PCP przetestowano AgNWs w kierunku wykrywania pojedynczych białek fotoaktywnych.



Rys. 86. a) Zachowanie natężenia fluorescencji PCP w funkcji czasu dla wybranego AgNW oznaczonego na czerwono na rys z zarejestrowanej kinetyki map natężenia fluorescencji PCP b) Przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż nanodrutu srebra uzyskane przez nakropleniem PCP, w chwili nakraplania PCP oraz po 20 s, 70 s i 182 s. c) Przebiegi czasowe natężenia fluorescencji PCP przedstawione dla wybranych pozycji PCP na AgNW (środek i koniec) oraz na szkle [154].

Wyniki detekcji pojedynczych białek fotoaktywnych PCP na zorientowanych AgNWs przedstawiono na rys. 87. Wyniki uzyskano za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu szerokiego pola z obiektywem immersyjnym o powiększeniu 100x. W tym przypadku pojedyncze białko zaobserwowano już przy stężeniu o dwa rzędy wielkości mniejszym w porównaniu z poprzednim pomiarem wykrywania pojedynczych białek przez losowo ułożone AgNWs (2 ng/ml). Podczas powtarzania eksperymentów zauważono, że warunki atmosferyczne wpływają na zachowanie białka PCP w eksperymentach w czasie rzeczywistym. Zdarzały się dni, kiedy pojedyncze PCP było obserwowane już dla stężenia (2 ng/ml), ale zwykle pojedyncze białko PCP obserwowano dla stężenia 0,3 ng/ml. Procedurę rozcieńczania białka starano się wykonywać w identyczny sposób. Do późniejszych eksperymentów wykorzystywano również specjalne plastikowe probówki Protein LoBind firmy Eppendorf ograniczające wiązanie się białka PCP do powierzchni probówki.

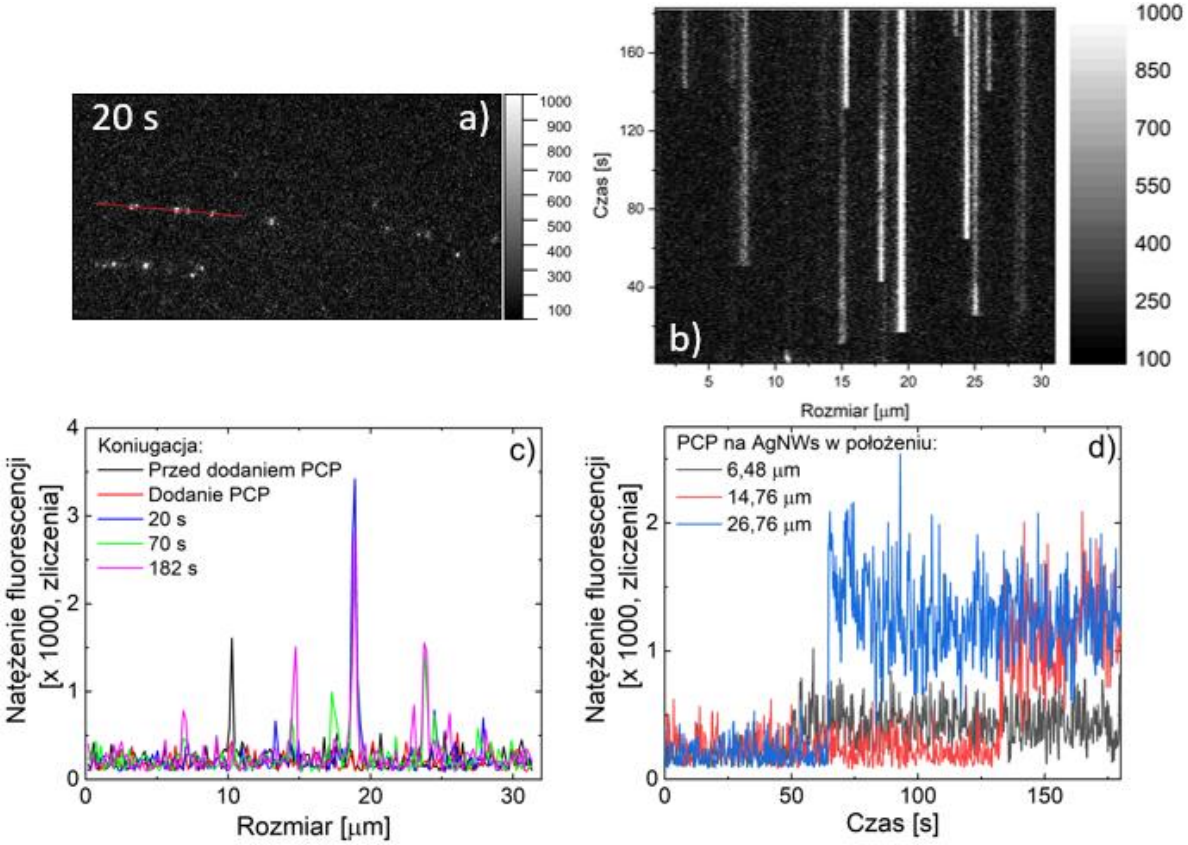
Mapę transmisji światła białego zapisano w innym kontraście, jednak nie przeszkadza to w określeniu pozycji zorientowanych AgNWs (rys. 87. (a)). Przed nakropleniem PCP zaobserwowano dwa punkty odpowiadające pozycji AgNWs wykazujące fluorescencję w takim samym zakresie spektralnym, co białko PCP (rys. 87. (b)). Jednak po nakropleniu roztworu PCP punkty te przestały wykazywać fluorescencję (rys. 87. (c)), a w innym miejscu pojawia się pojedynczy punkt wykazujący fluorescencję. Pojedynczy punkt zinterpretowano jako pojedyncze białko przyłączone do zmodyfikowanego AgNWs, co potwierdzono poprzez wykonanie przekrojów natężenia fluorescencji PCP. Z czasem na mapie natężenia fluorescencji zaobserwowano więcej białek PCP przyłączonych do powierzchni AgNWs. Kinetykę natężenia fluorescencji PCP dla zorientowanych AgNWs umieszczono pod linkiem.



Rys. 87. a) Mapa transmisji światła białego przedstawiająca zorientowane AgNWs. Mapy natężenia fluorescencji PCP przed nakropleniem kropli PCP na plazmonowym czipie ze zorientowanymi AgNWs b), w czasie nakraplania roztworu PCP c) oraz po 20 e) i 70 e) sekundach od nakroplenia kropli [154].

Ponownie dokonano analizy otrzymanych wyników z wykorzystaniem programu napisanego w środowisku programistycznym LabVIEW. Na rys. 88. (a) przedstawiono mapę natężenia fluorescencji pojedynczych PCP z zaznaczonym na czerwono przekrojem, z którego wykonano wykres przedstawiający zachowanie natężenia fluorescencji PCP w funkcji czasu (rys. 88 (b)). Białe paski na mapie oznaczają białko PCP, które przyłączyło się do powierzchni AgNW. Białko PCP przyłącza się

przez cały czas rejestracji kinetyki. Wartości natężenia fluorescencji PCP można podzielić na dwie grupy, mniej intensywne zinterpretowano jako pojedyncze PCP, natomiast miejsca o wyższym natężeniu jako aglomeraty. Na przekroju wykreślonym dla różnych czasów natężenia fluorescencji PCP, zaobserwowano 3 wartości zliczeń (rys. 88. (c)). Pojedyncze białko PCP odpowiada wartościom poniżej 1 000 zliczeń. Aglomeraty, na których znajdują się dwa białka PCP, które mają około 1 500 zliczeń oraz jeden pik ma ponad 3 000 zliczeń. Na ostatnim wykresie (rys. 88. (d)) przedstawiono przebiegi czasowe natężenia fluorescencji PCP dla trzech wybranych białek fotoaktywnych PCP. Białko zachowywało się stabilnie w czasie rejestrowania kinetyki map natężenia fluorescencji PCP i nie ulega szybkiemu fotowybielaniu.



Rys. 88. a) Mapa natężenia fluorescencji pojedynczego PCP, na której zaznaczono analizowany obszar. b) Zachowanie natężenia fluorescencji PCP w funkcji czasu dla wybranego AgNW d) Przekroje natężenia fluorescencji PCP wzdłuż nanodrutu srebra uzyskane przez nakropleniem roztworu PCP, w chwili nakraplania PCP oraz po 20 s, 70 s i 182 s. d) Przebiegi czasowe natężenia fluorescencji PCP przedstawione dla wybranych pozycji PCP na AgNW.

10.4 Podsumowanie rozdziału

W tym rozdziale sprawdzano, czy nanodruty srebra w formie plazmonowych czipów pozostały zdolne do wykrywania białka fotoaktywnego na podłożu. Zastosowana modyfikacja podłoża umożliwiła orientację AgNWs, co przełożyło się na wzrost ilości AgNWs na powierzchni. Wykazano, że AgNWs nie utraciły właściwości wykrywania białka. Nawet bez wiedzy na temat położenia nanodrutów srebra na podłożu, informacja o ich ułożeniu w kierunku poziomym jest wystarczająca do jednoznacznej interpretacji obserwowanych jasnych punktów jako związanych z białkami skoniugowanymi z nanodrutami srebra. Wykorzystanie plazmonowego czipu pozwoliło na detekcję pojedynczych białek dzięki zastosowaniu obiektywu immersyjnego.

PODSUMOWANIE ROZPRAWY

W niniejszej rozprawie zaprezentowana została nowatorska metoda orientacji nanodrutów srebra w kanale mikrofluidycznym. Celem przeprowadzonych badań było wykazanie potencjału nanodrutów srebra jako platform biosensorowych umożliwiających wykrywanie pojedynczych białek dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki. Potencjał udało się wykazać w ramach trzech eksperymentów. Rozważono różne konfiguracje wykrywania białka przez nanodruty srebra.

W pierwszej konfiguracji przetestowano układ, gdzie wykrywano białko przez AgNWs w zawiesinie. Próbki wykonano tak, aby powierzchnia wykrywająca białko pozostała taka sama, dlatego w każdej próbce umieszczono stałą objętość zawiesiny AgNWs. Na początku zdecydowano się na 16 h czas inkubacji, który okazał się za długi, ponieważ powodował degradację białka. Następnie czas skrócono do 5 min, co umożliwiło wykrycie białka przez nanodruty srebra i nie spowodowało degradacji białka. Do próbek po inkubacji dodano polimer PVA i z wykorzystaniem powlekacza obrotowego tworzono warstwę. Na próbce wykonywano obrazowanie około 40 AgNWs, Tak zaproponowana metoda wykrywania AgNWs wykazała, że PCP przyłącza się do powierzchni nanodrutów srebra. Wykazano, że PCP zostało plazmonowo wzmocnione, ponieważ czas zaniku fluorescencji ulega skróceniu. Ograniczeniem tej metody czas inkubacji, który nie może być za długi (degradacja białka) oraz za krótki (brak wykrycia białka przez AgNWs).

W drugiej konfiguracji AgNWs osadzono na podłożu, a detekcję białka wykonywano *in-situ*. AgNWs osadzono w sposób losowy, co spowodowało, że czas na wybranie miejsca obrazowania był długi. Wykazano, że dla tak przygotowanej próbki możliwa była obserwacja pojedynczych białek. Ponadto zaprezentowano, że kropla roztworu białka rozlewała się po powierzchni szkła i pod wpływem oświetlania rozpuszczalnik odparowywał. Konsekwencją odparowania jest degradacja białka. Innym ważnym wynikiem jest wykazanie, że powierzchnia AgNWs modyfikowanego biotyną wykrywa białko. W przypadku AgNWs bez modyfikacji nie zaobserwowano efektu wzmocnienia fluorescencji białka.

W trzeciej konfiguracji nanodruty srebra trwale zorientowano w kanale mikrofluidycznym, co jest nowatorskim sposobem kontroli geometrii tych nanostruktur. Wykazano, że modyfikacja podłoża jest konieczna do unieruchomienia AgNWs. Udowodniono, że AgNWs po zorientowaniu nadal posiadają zdolność wykrywania białek. Wykorzystanie kanału mikrofluidycznego podczas detekcji białka zapobiega wysychaniu rozpuszczalnika. Dodatkowo istnieje możliwość usunięcia nieskoniugowanego białka, co zwiększa kontrast.

W czwartej konfiguracji wykonano plazmonowe czipy. Dzięki zastosowaniu modyfikacji podłoża OTMSem zwiększono ilość AgNWs na podłożu oraz jego trwałość. Wykazano, że AgNWs nie

tracą zdolności wykrywania białka, dodatkowo dla tak przygotowanego podłoża wykryto pojedyncze białka.

Przeprowadzone badania dowodzą, że srebrne nanodruty mogą zostać wykorzystane jako platformy biosensorowe dla plazmonowo wzmocnionej fluorescencyjnej biosensoryki, w szczególności mogą być wykorzystywane do wykrywania pojedynczych białek. Powierzchnię AgNWs można sfunkcjonalizować wieloma bioreceptorami, co sprawia, że wykorzystanie AgNWs jest jako platform jest uniwersalne.

BIBLIOGRAFIA

[1] Szczepaniak, W. *Metody Instrumentalne w Analizie Chemicznej*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2022.

[2] Malinowska, E.; Wróblewski, W.; Brzózka, Z.; *Sensory Chemiczne i Biosensory*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2022.

[3] Pandey, C. M.; Malhotra, B. D. *Biosensors: Fundamentals and Applications*; De Gruyter, 2019.

[4] Bhalla, N.; Jolly, P.; Formisano, N.; Estrela, P. Introduction to Biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, *60* (1), 1–8.

[5] Solnica B., Sztefko. K. *Medyczne Laboratorium Diagnostyczne Metodyka i Aparatura;* PZWL Wydaw. Lek., 2015.

[6] Brzózka, Z.; Wróblewski, W. *Sensory Chemiczne*; Warszawa : Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, 1999.

[7] Wolfbeis, O. S. Editorial: Probes, Sensors, and Labels: Why Is Real Progress Slow? *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (38), 9864–9865.

[8] Nagel, B.; Dellweg, H.; Gierasch, L. M. Glossary for Chemists of Terms Used in Biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64* (1), 143–168.

[9] Ozkan, S. A.; Uslu, B.; Sezgintürk, M. K. *Biosensors*; CRC Press: Boca Raton, 2022.

[10] Bauch, M.; Toma, K.; Toma, M.; Zhang, Q.; Dostalek, J. Plasmon-Enhanced Fluorescence Biosensors: A Review. *Plasmonics* **2014**, *9* (4), 781–799.

[11] Karimi-Maleh, H.; Orooji, Y.; Karimi, F.; Alizadeh, M.; Baghayeri, M.; Rouhi, J.; Tajik, S.; Beitollahi, H.; Agarwal, S.; Gupta, V. K.; Rajendran, S.; Ayati, A.; Fu, L.; Sanati, A. L.; Tanhaei, B.; Sen, F.; Shabani-nooshabadi, M.; Asrami, P. N.; Al-Othman, A. A Critical Review on the Use of Potentiometric Based Biosensors for Biomarkers Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *184*, 113252.

[12] Naresh, V; Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* **2021**, *21* (4), 1109.

[13] Seo, S. E.; Tabei, F.; Park, S. J.; Askarian, B.; Kim, K. H.; Moallem, G.; Chong, J. W.; Kwon, O. S. Smartphone with Optical, Physical, and Electrochemical Nanobiosensors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **2019**, 77, pp 1–11.

[14] Malhotra, B. D.; Ali, M. A. *Nanomaterials in Biosensors*; Nanomaterials for Biosensors; Elsevier, 2018.

[15] Nestor, U.; Frodouard, H.; Theoneste, M. A Brief Review of How to Construct an Enzyme-Based H2O2 Sensor Involved in Nanomaterials. *Adv. Nanoparticles* **2021**, *10* (01), 1–25.

[16] Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8* (3), 1400–1458.

[17] Saadati, A.; Hassanpour, S.; Guardia, M. de la; Mosafer, J.; Hashemzaei, M.; Mokhtarzadeh, A.; Baradaran, B. Recent Advances on Application of Peptide Nucleic Acids as a Bioreceptor in Biosensors Development. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *114*, 56–68.

[18] Ding, J.; Qin, W. Recent Advances in Potentiometric Biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2020**, *124*, 115803.

[19] Hayat, A.; Catanante, G.; Marty, J. Current Trends in Nanomaterial-Based Amperometric Biosensors.

Sensors **2014**, *14* (12), 23439–23461.

[20] Wang, J. Amperometric Biosensors for Clinical and Therapeutic Drug Monitoring: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19* (1–2), 47–53.

[21] Pohanka, M. The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2017**, 496–506.

[22] Ramanathan, K.; Danielsson, B. Principles and Applications of Thermal Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16* (6), 417–423.

[23] Lammers, F.; Scheper, T. *Thermal Biosensors in Biotechnology*; Springer1999

[24] Bauch, M.; Toma, K.; Toma, M.; Zhang, Q.; Dostalek, J. Plasmon-Enhanced Fluorescence Biosensors: A Review. *Plasmonics* **2014**, *9* (4), 781–799.

[25] Long, F.; Zhu, A.; Shi, H. Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. *Sensors* **2013**, *13* (10), 13928–13948.

[26] Chiavaioli, F.; Baldini, F.; Tombelli, S.; Trono, C.; Giannetti, A. Biosensing with Optical Fiber Gratings. *Nanophotonics* **2017**, *6* (4), 663–679.

[27] Jiang, Y.; Wang, H.; Li, S.; Wen, W. Applications of Micro/Nanoparticles in Microfluidic Sensors: A Review. *Sensors* **2014**, *14* (4), 6952–6964.

[28] Krześniak, A.; Gabler, T.; Janik, M.; Koba, M.; Jönsson-Niedziółka, M.; Śmietana, M. A Microfluidic System for Analysis of Electrochemical Processing Using a Highly Sensitive Optical Fiber Microcavity. *Opt. Lasers Eng.* **2022**, *158*, 107173.

[29] Song, Y.; Lin, B.; Tian, T.; Xu, X.; Wang, W.; Ruan, Q.; Guo, J.; Zhu, Z.; Yang, C. Recent Progress in Microfluidics-Based Biosensing. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (1), 388–404.

[30] Kwon, O. S.; Song, H. S.; Park, T. H.; Jang, J. Conducting Nanomaterial Sensor Using Natural Receptors. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (1), 36–93.

[31] Seo, M.; Yoo, J.; Jo, M.; Yoon, J. Geometrically Structured Nanomaterials for Nanosensors, NEMS, and Nanosieves. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (35), 1907082.

[32] Badshah, M. A.; Koh, N. Y.; Zia, A. W.; Abbas, N.; Zahra, Z.; Saleem, M. W. Recent Developments in Plasmonic Nanostructures for Metal Enhanced Fluorescence-Based Biosensing. *Nanomaterials*. **2020**, 10 (9), 1–22.

[33] Nanomaterials Definition Matters. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (3), 193–193.

[34] Heiligtag, F. J.; Niederberger, M. The Fascinating World of Nanoparticle Research. *Mater. Today* **2013**, *16* (7–8), 262–271.

[35] Khan, S. A. Metal Nanoparticles Toxicity: Role of Physicochemical Aspects. In *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications*; Elsevier, 2020.

[36] Stark, W. J.; Stoessel, P. R.; Wohlleben, W.; Hafner, A. Industrial Applications of Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (16), 5793–5805.

[37] Anu Mary Ealia, S.; Saravanakumar, M. P. A Review on the Classification, Characterisation, Synthesis of Nanoparticles and Their Application. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2017**, *263*, 032019.

[38] De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (22), 4225–4241.

[39] Auffan, M.; Rose, J.; Wiesner, M. R.; Bottero, J.-Y. Chemical Stability of Metallic Nanoparticles: A

Parameter Controlling Their Potential Cellular Toxicity in Vitro. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (4), 1127–1133.

[40] Niazi, J. H.; Gu, M. B. Toxicity of Metallic Nanoparticles in Microorganisms- a Review. In *Atmospheric and Biological Environmental Monitoring*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2009.

[41] Sawicki, K.; Czajka, M.; Matysiak-Kucharek, M.; Fal, B.; Drop, B.; Męczyńska-Wielgosz, S.; Sikorska, K.; Kruszewski, M.; Kapka-Skrzypczak, L. Toxicity of Metallic Nanoparticles in the Central Nervous System. *Nanotechnol. Rev.* **2019**, *8* (1), 175–200.

[42] Singla, R.; Guliani, A.; Kumari, A.; Yadav, S. K. Metallic Nanoparticles, Toxicity Issues and Applications in Medicine. In *Nanoscale Materials in Targeted Drug Delivery, Theragnosis and Tissue Regeneration*; Springer Singapore: Singapore, 2016.

[43] Huang, Z.; Jiang, X.; Guo, D.; Gu, N. Controllable Synthesis and Biomedical Applications of Silver Nanomaterials. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11* (11), 9395–9408.

[44] Chen, P.-C.; Periasamy, A. P.; Harroun, S. G.; Wu, W.-P.; Chang, H.-T. Photoluminescence Sensing Systems Based on Copper, Gold and Silver Nanomaterials. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *320–321*, 129–138.

[45] Venkatesan, J.; Gupta, P. K.; Son, S. E.; Hur, W.; Seong, G. H. Silver-Based Hybrid Nanomaterials: Preparations, Biological, Biomedical, and Environmental Applications. *J. Clust. Sci.* **2022,** *34*, 23–43.

[46] Yu, H.-D.; Regulacio, M. D.; Ye, E.; Han, M.-Y. Chemical Routes to Top-down Nanofabrication. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (14), 6006.

[47] Biswas, A.; Bayer, I. S.; Biris, A. S.; Wang, T.; Dervishi, E.; Faupel, F. Advances in Top–down and Bottom–up Surface Nanofabrication: Techniques, Applications & Future Prospects. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2012**, *170* (1–2), 2–27.

[48] Oh, D. K.; Jeong, H.; Kim, J.; Kim, Y.; Kim, I.; Ok, J. G.; Rho, J. Top-down Nanofabrication Approaches toward Single-Digit-Nanometer Scale Structures. *J. Mech. Sci. Technol.* **2021**, *35* (3), 837–859.

[49] M. N, M. N.; Hashim, U.; Md Arshad, M. K.; Ruslinda, A. R.; Rahman, S. F. A.; Fathil, M. F. M.; Ismail, M. H. Top-Down Nanofabrication and Characterization of 20 Nm Silicon Nanowires for Biosensing Applications. *PLoS One* **2016**, *11* (3), e0152318.

[50] Zacharatos, F.; Gianneta, V.; Nassiopoulou, A. G. Highly Ordered Hexagonally Arranged Nanostructures on Silicon through a Self-Assembled Silicon-Integrated Porous Anodic Alumina Masking Layer. *Nanotechnology* **2008**, *19* (49), 495306.

[51] Qiao, Y.; Wang, D.; Buriak, J. M. Block Copolymer Templated Etching on Silicon. *Nano Lett.* **2007**, *7* (2), 464–469.

[52] Zhang, Z.; Wang, L.; Wang, J.; Jiang, X.; Li, X.; Hu, Z.; Ji, Y.; Wu, X.; Chen, C. Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods as a Light-Mediated Multifunctional Theranostic Platform for Cancer Treatment. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (11), 1418–1423.

[53] Fujita, T.; Okada, H.; Koyama, K.; Watanabe, K.; Maekawa, S.; Chen, M. W. Unusually Small Electrical Resistance of Three-Dimensional Nanoporous Gold in External Magnetic Fields. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101* (16), 166601.

[54] Yu, H.-D.; Yang, D.; Wang, D.; Han, M.-Y. Top-Down Fabrication of Calcite Nanoshoot Arrays by Crystal Dissolution. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (29), 3181–3184.

[55] Mulvihill, M. J.; Ling, X. Y.; Henzie, J.; Yang, P. Anisotropic Etching of Silver Nanoparticles for

Plasmonic Structures Capable of Single-Particle SERS. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (1), 268–274.

[56] Yu, H.-D.; Tee, S. Y.; Han, M.-Y. Preparation of Porosity-Controlled Calcium Carbonate by Thermal Decomposition of Volume Content-Variable Calcium Carboxylate Derivatives. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (39), 4229–4231.

[57] Ariga, K.; Hill, J. P.; Ji, Q. Layer-by-Layer Assembly as a Versatile Bottom-up Nanofabrication Technique for Exploratory Research and Realistic Application. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (19), 2319.

[58] Cavallini, M.; Facchini, M.; Massi, M.; Biscarini, F. Bottom–up Nanofabrication of Materials for Organic Electronics. *Synth. Met.* **2004**, *146* (3), 283–286.

[59] Khanna, V. K. Bottom-up Nanofabrication; Springer, 2016.

[60] Nugroho, F. A. A.; Iandolo, B.; Wagner, J. B.; Langhammer, C. Bottom-Up Nanofabrication of Supported Noble Metal Alloy Nanoparticle Arrays for Plasmonics. *ACS Nano* **2016**, *10* (2), 2871–2879.

[61] Yu, D.; Yam, V. W.-W. Controlled Synthesis of Monodisperse Silver Nanocubes in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (41), 13200–13201.

[62] Im, S. H.; Lee, Y. T.; Wiley, B.; Xia, Y. Large-Scale Synthesis of Silver Nanocubes: The Role of HCl in Promoting Cube Perfection and Monodispersity. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44* (14), 2154–2157.

[63] Huang, C.-J.; Wang, Y.-H.; Chiu, P.-H.; Shih, M.-C.; Meen, T.-H. Electrochemical Synthesis of Gold Nanocubes. *Mater. Lett.* **2006**, *60* (15), 1896–1900.

[64] Garcia-Leis, A.; Garcia-Ramos, J. V.; Sanchez-Cortes, S. Silver Nanostars with High SERS Performance. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (15), 7791–7795.

[65] Chirico, G.; Borzenkov, M.; Pallavicini, P. *Gold Nanostars*; SpringerBriefs in Materials; Springer International Publishing: Cham, 2015.

[66] Senthil Kumar, P.; Pastoriza-Santos, I.; Rodríguez-González, B.; Javier García de Abajo, F.; Liz-Marzán, L. M. High-Yield Synthesis and Optical Response of Gold Nanostars. *Nanotechnology* **2008**, *19* (1), 015606.

[67] Schwartzberg, A. M.; Olson, T. Y.; Talley, C. E.; Zhang, J. Z. Synthesis, Characterization, and Tunable Optical Properties of Hollow Gold Nanospheres. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (40), 19935–19944.

[68] Wiley, B.; Sun, Y.; Mayers, B.; Xia, Y. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver. *Chem. - A Eur. J.* **2005**, *11* (2), 454–463.

[69] Chandran, S. P.; Chaudhary, M.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Sastry, M. Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe Vera Plant Extract. *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22* (2), 577–583.

[70] Rai, A.; Singh, A.; Ahmad, A.; Sastry, M. Role of Halide Ions and Temperature on the Morphology of Biologically Synthesized Gold Nanotriangles. *Langmuir* **2006**, *22* (2), 736–741.

[71] Koetz, J. The Effect of Surface Modification of Gold Nanotriangles for Surface-Enhanced Raman Scattering Performance. *Nanomaterials* **2020**, *10* (11), 2187.

[72] Li, B.; Jiang, B.; Tang, H.; Lin, Z. Unconventional Seed-Mediated Growth of Ultrathin Au Nanowires in Aqueous Solution. *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 6349-6354.

[73] Link, S.; El-Sayed, M. A. Shape and Size Dependence of Radiative, Non-Radiative and Photothermal Properties of Gold Nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*. **2000**, 19 (3), 409–453.

[74] Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17–18), 1870–1901.

[75] Zhu, J.-J.; Liao, X.-H.; Zhao, X.-N.; Chen, H.-Y. Preparation of Silver Nanorods by Electrochemical Methods. *Mater. Lett.* **2001**, *49* (2), 91–95.

[76] Jones, R.; Draheim, R.; Roldo, M. Silver Nanowires: Synthesis, Antibacterial Activity and Biomedical Applications. *Appl. Sci.* **2018**, *8* (5), 673.

[77] Zhang, P.; Wyman, I.; Hu, J.; Lin, S.; Zhong, Z.; Tu, Y.; Huang, Z.; Wei, Y. Silver Nanowires: Synthesis Technologies, Growth Mechanism and Multifunctional Applications. *Mater. Sci. Eng. B* **2017**, *223*, 1–23.

[78] Li, C. C.; Chen, L. B.; Li, Q. H.; Wang, T. H. Seed-Free, Aqueous Synthesis of Gold Nanowires. *CrystEngComm*. **2012,** *14***,** 7549-7551

[79] Wiley, B. J.; Im, S. H.; Li, Z.-Y.; McLellan, J.; Siekkinen, A.; Xia, Y. Maneuvering the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanostructures through Shape-Controlled Synthesis. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 15666–15675.

[80] Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209–217.

[81] Giannini, V.; Fernández-Domínguez, A. I.; Heck, S. C.; Maier, S. A. Plasmonic Nanoantennas: Fundamentals and Their Use in Controlling the Radiative Properties of Nanoemitters. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3888–3912.

[82] Liang, Z.; Sun, J.; Jiang, Y.; Jiang, L.; Chen, X. Plasmonic Enhanced Optoelectronic Devices. *Plasmonics* **2014**, *9* (4), 859–866.

[83] Amin, M. T.; Alazba, A. A.; Manzoor, U. A Review of Removal of Pollutants from Water/Wastewater Using Different Types of Nanomaterials. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2014**, *2014*, 1–24.

[84] Höppener, C.; Novotny, L. Exploiting the Light-Metal Interaction for Biomolecular Sensing and Imaging. *Quarterly Reviews of Biophysics*. **2012,** *45(2*), 209-55.

[85] Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (40), 8410–8426.

[86] Wang, J.; Lin, W.; Cao, E.; Xu, X.; Liang, W.; Zhang, X. Surface Plasmon Resonance Sensors on Raman and Fluorescence Spectroscopy. *Sensors* **2017**, *17* (12), 2719.

[87] Choi, I.; Choi, Y. Plasmonic Nanosensors: Review and Prospect. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2012**, *18* (3), 1110–1121.

[88] Haes, A. J.; Hall, W. P.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P. A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps toward an Assay for Alzheimer's Disease. *Nano Lett.* **2004**, *4* (6), 1029–1034.

[89] Song, H. D.; Choi, I.; Yang, Y. I.; Hong, S.; Lee, S.; Kang, T.; Yi, J. Picomolar Selective Detection of Mercuric Ion (Hg 2 +) Using a Functionalized Single Plasmonic Gold Nanoparticle. *Nanotechnology* **2010**, *21* (14), 145501.

[90] Liu, X.; Gu, L.; Zhang, Q.; Wu, J.; Long, Y.; Fan, Z. All-Printable Band-Edge Modulated ZnO Nanowire Photodetectors with Ultra-High Detectivity. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (1), 4007.

[91] Wu, F.; Li, Z.; Ye, F.; Zhao, X.; Zhang, T.; Yang, X. Aligned Silver Nanowires as Transparent Conductive Electrodes for Flexible Optoelectronic Devices. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4* (47), 11074–11080.

[92] Kang, S.; Kim, T.; Cho, S.; Lee, Y.; Choe, A.; Walker, B.; Ko, S.-J.; Kim, J. Y.; Ko, H. Capillary Printing

of Highly Aligned Silver Nanowire Transparent Electrodes for High-Performance Optoelectronic Devices. *Nano Lett.* **2015**, *15* (12), 7933–7942.

[93] Al-Milaji, K. N.; Huang, Q.; Li, Z.; Ng, T. N.; Zhao, H. Direct Embedment and Alignment of Silver Nanowires by Inkjet Printing for Stretchable Conductors. *ACS Appl. Electron. Mater.* **2020**, *2* (10), 3289–3298.

[94] Meng, L.; Zhang, M.; Deng, H.; Xu, B.; Wang, H.; Wang, Y.; Jiang, L.; Liu, H. Direct-Writing Large-Area Cross-Aligned Ag Nanowires Network: Toward High-Performance Transparent Quantum Dot Light-Emitting Diodes. *CCS Chem.* **2021**, *3* (8), 2194–2202.

[95] Choi, J. H.; Shin, M. G.; Jung, Y.; Kim, D. H.; Ko, J. S. Fabrication and Performance Evaluation of Highly Sensitive Flexible Strain Sensors with Aligned Silver Nanowires. *Micromachines* **2020**, *11* (2), 156.

[96] Lee, Y.; Min, S.-Y.; Kim, T.-S.; Jeong, S.-H.; Won, J. Y.; Kim, H.; Xu, W.; Jeong, J. K.; Lee, T.-W. Versatile Metal Nanowiring Platform for Large-Scale Nano- and Opto-Electronic Devices. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (41), 9109–9116.

[97] Min, S.-Y.; Kim, T.-S.; Kim, B. J.; Cho, H.; Noh, Y.-Y.; Yang, H.; Cho, J. H.; Lee, T.-W. Large-Scale Organic Nanowire Lithography and Electronics. *Nat. Commun.* **2013**, *4* (1), 1773.

[98] Lee, Y.; Min, S.-Y.; Lee, T.-W. Large-Scale Highly Aligned Nanowire Printing. *Macromol. Mater. Eng.* **2017**, *302* (8), 1600507.

[99] [Dostęp z dnia 1.03.2023] xtpl.com/pl/.

[100] Simeone, F. C.; Albonetti, C.; Cavallini, M. Progress in Micro- and Nanopatterning via Electrochemical Lithography. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (44), 18987–18994.

[101] Xu, X.; Peng, B.; Li, D.; Zhang, J.; Wong, L. M.; Zhang, Q.; Wang, S.; Xiong, Q. Flexible Visible–Infrared Metamaterials and Their Applications in Highly Sensitive Chemical and Biological Sensing. *Nano Lett.* **2011**, *11* (8), 3232–3238.

[102] Le, B. H.; Zhao, S.; Liu, X.; Woo, S. Y.; Botton, G. A.; Mi, Z. Controlled Coalescence of AlGaN Nanowire Arrays: An Architecture for Nearly Dislocation-Free Planar Ultraviolet Photonic Device Applications. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (38), 8446–8454.

[103] Szalkowski, M.; Sulowska, K.; Jönsson-Niedziółka, M.; Wiwatowski, K.; Niedziółka-Jönsson, J.; Mackowski, S.; Piątkowski, D. Photochemical Printing of Plasmonically Active Silver Nanostructures. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (6).

[104] Mun, B. H.; You, B. K.; Yang, S. R.; Yoo, H. G.; Kim, J. M.; Park, W. I.; Yin, Y.; Byun, M.; Jung, Y. S.; Lee, K. J. Flexible One Diode-One Phase Change Memory Array Enabled by Block Copolymer Self-Assembly. *ACS Nano* **2015**, *9* (4), 4120–4128.

[105] Jeong, C. K.; Jin, H. M.; Ahn, J.-H.; Park, T. J.; Yoo, H. G.; Koo, M.; Choi, Y.-K.; Kim, S. O.; Lee, K. J. Electrical Biomolecule Detection Using Nanopatterned Silicon via Block Copolymer Lithography. *Small* **2014**, *10* (2), 337–343.

[106] Bates, C. M.; Maher, M. J.; Janes, D. W.; Ellison, C. J.; Willson, C. G. Block Copolymer Lithography. *Macromolecules* **2014**, *47* (1), 2–12.

[107] Kim, K.; Rho, Y.; Kim, Y.; Kim, S. H.; Hahm, S. G.; Park, C. E. A Lattice-Strained Organic Single-Crystal Nanowire Array Fabricated via Solution-Phase Nanograting-Assisted Pattern Transfer for Use in High-Mobility Organic Field-Effect Transistors. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (16), 3209–3215.

[108] Lee, J.-S.; Seo, M.-H.; Choi, K.-W.; Yoo, J.-Y.; Jo, M.-S.; Yoon, J.-B. Stress-Engineered Palladium Nanowires for Wide Range (0.1%–3.9%) of H 2 Detection with High Durability. *Nanoscale* **2019**, *11* (35), 16317–16326.

[109] Seo, M.-H.; Choi, S.-J.; Park, S. H.; Yoo, J.-Y.; Lim, S. K.; Lee, J.-S.; Choi, K.-W.; Jo, M.-S.; Kim, I.-D.; Yoon, J.-B. Material-Independent Nanotransfer onto a Flexible Substrate Using Mechanical-Interlocking Structure. *ACS Nano* **2018**, *12* (5), 4387–4397.

[110] Sulowska, K.; Roźniecka, E.; Wiwatowski, K.; Janczuk-Richter, M.; Jönsson-Niedziółka, M.; Niedziółka-Jönsson, J.; Mackowski, S. Patterned Silver Island Paths as High-Contrast Optical Sensing Platforms. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*. **2021**, *268*, 115124

[111] Neouze, M. A.; Schubert, U. Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands. *Monatshefte fur Chemie* **2008**, *139* (3), 183–195.

[112] Chandrakala, V.; Aruna, V.; Angajala, G. Review on Metal Nanoparticles as Nanocarriers: Current Challenges and Perspectives in Drug Delivery Systems. *Emergent Mater.* **2022**, *5* (6), 1593–1615.

[113] Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368* (1915), 1333–1383.

[114] Fatima, I.; Rahdar, A.; Sargazi, S.; Barani, M.; Hassanisaadi, M.; Thakur, V. K. Quantum Dots: Synthesis, Antibody Conjugation, and HER2-Receptor Targeting for Breast Cancer Therapy. *J. Funct. Biomater.* **2021**, *12* (4), 75.

[115] Zhang, Y.; Gambardella, A.; Üçüncü, M.; Geng, J.; Clavadetscher, J.; Bradley, M.; Lilienkampf, A. Multifunctional, Histidine-Tagged Polymers: Antibody Conjugation and Signal Amplification. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (89), 13856–13859.

[116] Torres-González, L.; Díaz-Ayala, R.; Vega-Olivencia, C.; López-Garriga, J. Characterization of Recombinant His-Tag Protein Immobilized onto Functionalized Gold Nanoparticles. *Sensors* **2018**, *18* (12), 4262.

[117] Jankowska, M.; Sulowska, K.; Wiwatowski, K.; Niedziółka-Jönsson, J.; Mackowski, S. Real-Time Fluorescence Imaging of His-Tag-Driven Conjugation of MCherry Proteins to Silver Nanowires. *Chemosensors* **2022**, *10* (4), 149.

[118] Vashist, S. K.; Luong, J. H. T. Antibody Immobilization and Surface Functionalization Chemistries for Immunodiagnostics. In *Handbook of Immunoassay Technologies*; Elsevier, 2018.

[119] Welch, N. G.; Scoble, J. A.; Muir, B. W.; Pigram, P. J. Orientation and Characterization of Immobilized Antibodies for Improved Immunoassays (Review). *Biointerphases* **2017**, *12* (2), 02D301.

[120] Ruiz, G.; Tripathi, K.; Okyem, S.; Driskell, J. D. PH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (4), 1182–1191.

[121] Nunna, B. B.; Mandal, D.; Lee, J. U.; Singh, H.; Zhuang, S.; Misra, D.; Bhuyian, M. N. U.; Lee, E. S. Detection of Cancer Antigens (CA-125) Using Gold Nano Particles on Interdigitated Electrode-Based Microfluidic Biosensor. *Nano Converg.* **2019**, *6* (1), 3.

[122] Grzelak, J. .; Sulowska, K.; Lesniewski, A.; Rozniecka, E.; Janczuk-Richter, M.; Richter, L.; Los, M.; Jonsson-Niedziolka, M.; Mackowski, S.; Niedziolka-Jonsson, J. Capturing Fluorescing Viruses with Silver Nanowires. *Sensors Actuators, B Chem.* **2018**, *273*, 689-695.

[123] He, P.; Chen, H.; Sun, J.; Wang, Q.; Tang, X.; Zhang, Y.; Zhu, F.; Shen, Z. Use of DNA Nanosensors

Based on Upconverting Nanoparticles for Detection of Nosema Bombycis by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Folia Microbiol. (Praha).* **2022**, *67* (3), 419–425.

[124] Yue, X.; Qiao, Y.; Gu, D.; Qi, R.; Zhao, H.; Yin, Y.; Zhao, W.; Xi, R.; Meng, M. DNA-Based PH Nanosensor with Adjustable FRET Responses to Track Lysosomes and PH Fluctuations. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (19), 7250–7257.

[125] Bally, M.; Vörös, J. Nanoscale Labels: Nanoparticles and Liposomes in the Development of High-Performance Biosensors. *Nanomedicine* **2009**, *4* (4), 447–467.

[126] Yang, C.; Wang, Y.; Marty, J.-L.; Yang, X. Aptamer-Based Colorimetric Biosensing of Ochratoxin A Using Unmodified Gold Nanoparticles Indicator. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (5), 2724–2727.

[127] Aslan, K.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Matveeva, E.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Metal-Enhanced Fluorescence: An Emerging Tool in Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. **2005**, *16* (1), 55-62.

[128] Mackowski, S. Hybrid Nanostructures for Efficient Light Harvesting. *J. Phys. Condens. Matter* **2010**, *22* (19), 193102.

[129] Geddes, C. D.; Lakowicz, J. R. Metal-Enhanced Fluorescence. *Journal of Fluorescence*. **2002**, *12* (2), 121–129

[130] Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Physical Review Letters*. **2006**, *96* (11), 113002

[131] Niedziółka-Jönsson, J.; Mackowski, S. Plasmonics with Metallic Nanowires. *Materials (Basel).* **2019**, *12* (9), 1418.

[132] Fu, Y.; Zhang, J.; Lakowicz, J. R. Plasmon-Enhanced Fluorescence from Single Fluorophores End-Linked to Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5540–5541.

[133] Tok, J. B.-H.; Chuang, F. Y. S.; Kao, M. C.; Rose, K. A.; Pannu, S. S.; Sha, M. Y.; Chakarova, G.; Penn, S. G.; Dougherty, G. M. Metallic Striped Nanowires as Multiplexed Immunoassay Platforms for Pathogen Detection. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45* (41), 6900–6904.

[134] Kim, M.; Kwon, J. E.; Lee, K.; Koh, W.-G. Signal-Amplifying Nanoparticle/Hydrogel Hybrid Microarray Biosensor for Metal-Enhanced Fluorescence Detection of Organophosphorus Compounds. *Biofabrication* **2018**, *10* (3), 035002.

[135] Coskun, A. F.; Cetin, A. E.; Galarreta, B. C.; Alvarez, D. A.; Altug, H.; Ozcan, A. Lensfree Optofluidic Plasmonic Sensor for Real-Time and Label-Free Monitoring of Molecular Binding Events over a Wide Field-of-View. *Sci. Rep.* **2014**, *4* (1), 6789.

[136] Pawley, J. B *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*; Springer, 2006.

[137] Szalkowski, M.; Sulowska, K.; Grzelak, J.; Niedziółka-Jönsson, J.; Roźniecka, E.; Kowalska, D.; Mackowski, S. Wide-Field Fluorescence Microscopy of Real-Time Bioconjugation Sensing. *Sensors (Switzerland)* **2018**, *18* (1), 290

[138] Sun, Y.; Yin, Y.; Mayers, B. T.; Herricks, T.; Xia, Y. Uniform Silver Nanowires Synthesis by Reducing AgNO 3 with Ethylene Glycol in the Presence of Seeds and Poly(Vinyl Pyrrolidone). *Chem. Mater.* **2002**, *14* (11), 4736–4745.

[139] [Dostęp z dnia 2.03.2023] *www.bdbiosciences.com/en-us/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/percp-streptavidin.554064*.

[140] Hofmann, E.; Wrench, P. M.; Sharples, F. P.; Hiller, R. G.; Welte, W.; Diederichs, K. Structural Basis of Light Harvesting by Carotenoids: Peridinin-Chlorophyll-Protein from Amphidinium Carterae. *Science (80-.).* **1996**, *272* (5269), 1788–1791.

[141] [Dostęp z dnia 7.02.2023] *www.rcsb.org/*

[142] Carbonera, D.; Valentin, M.; Spezia, R.; Mezzetti, A. The Unique Photophysical Properties of the Peridinin-Chlorophyll-a-Protein. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2014**, *15* (4), 332–350.

[143] Kowalska, D.; Krajnik, B.; Olejnik, M.; Twardowska, M.; Czechowski, N.; Hofmann, E.; Mackowski, S. Metal-Enhanced Fluorescence of Chlorophylls in Light-Harvesting Complexes Coupled to Silver Nanowires. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 1–12.

[144] Ćwik, M.; Sulowska, K.; Buczyńska, D.; Roźniecka, E.; Domagalska, M.; Maćkowski, S.; Niedziółka-Jönsson, J. Controlling Plasmon Propagation and Enhancement via Reducing Agent in Wet Chemistry Synthesized Silver Nanowires. *Opt. Express* **2021**, *29* (6), 8834.

[145] Kaminska, I.; Wiwatowski, K.; Mackowski, S. Efficiency of Energy Transfer Decreases with the Number of Graphene Layers. *RSC Adv.* **2016**, *6* (104), 102791–102796.

[146] Wiwatowski, K.; Podlas, P.; Twardowska, M.; Maćkowski, S. Fluorescence Studies of the Interplay between Metal-Enhanced Fluorescence and Graphene-Induced Quenching. *Materials.* **2018.** *11* (10), 1916.

[147] Olejnik, M.; Krajnik, B.; Kowalska, D.; Twardowska, M.; Czechowski, N.; Hofmann, E.; Mackowski, S. Imaging of Fluorescence Enhancement in Photosynthetic Complexes Coupled to Silver Nanowires. *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102* (8), 083703.

[148] Szalkowski, M.; Janna Olmos, J. D.; Buczyńska, D.; Maćkowski, S.; Kowalska, D.; Kargul, J. Plasmon-Induced Absorption of Blind Chlorophylls in Photosynthetic Proteins Assembled on Silver Nanowires. *Nanoscale*. **2017**, *9*, 10475-10486.

[149] Kowalska, D.; Szalkowski, M.; Ashraf, K.; Grzelak, J.; Lokstein, H.; Niedziolka-Jonsson, J.; Cogdell, R.; Mackowski, S. Spectrally Selective Fluorescence Imaging of Chlorobaculum Tepidum Reaction Centers Conjugated to Chelator-Modified Silver Nanowires. *Photosynth. Res.* **2018**, *135* (1–3), 329–336.

[150] Sulowska, K.; Wiwatowski, K.; Ćwierzona, M.; Niedziółka-Jönsson, J.; Maćkowski, S. Real-Time Fluorescence Sensing of Single Photoactive Proteins Using Silver Nanowires. *Methods Appl. Fluoresc.* **2020**, *8* (4), 045004

[151] Wörmke, S.; Mackowski, S.; Brotosudarmo, T. H. P.; Jung, C.; Zumbusch, A.; Ehrl, M.; Scheer, H.; Hofmann, E.; Hiller, R. G.; Bräuchle, C. Monitoring Fluorescence of Individual Chromophores in Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex Using Single Molecule Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. **2007**, *1767* (7), 956-964.

[152] Ebner, A.; Hinterdorfer, P.; Gruber, H. J. Comparison of Different Aminofunctionalization Strategies for Attachment of Single Antibodies to AFM Cantilevers. *Ultramicroscopy*. **2007**, *107* (10-11), 922-927.

[153] Rankl, M.; Laib, S.; Seeger, S. Surface Tension Properties of Surface-Coatings for Application in Biodiagnostics Determined by Contact Angle Measurements. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2003**, *30* (3), 177–186.

[154] Sulowska, K.; Roznіecka, E.; Niedziółka-Jönsson, J.; Mackowski, S. Aligned Silver Nanowires for Plasmonically-Enhanced Fluorescence Detection of Photoactive Proteins in Wet and Dry Environment.

Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. **2023**, *289*, 122225.

[155] Glass, N. R.; Tjeung, R.; Chan, P.; Yeo, L. Y.; Friend, J. R. Organosilane Deposition for Microfluidic Applications. *Biomicrofluidics*. **2011**, 5(3), 036501–036507.

[156] Markovich, I.; Mandler, D. Preparation and Characterization of Octadecylsilane Monolayers on Indium-Tin Oxide (ITO) Surfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **2001**, *500* (1-2), 453–460.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Silver nanowires as platforms for plasmonically enhanced fluorescence biosensing

Silver nanowires can be considered as a bridge between the *micro* world and the *nano* world. On the one hand, thanks to their average length of about 10 μm, they are visible with an optical microscope. On the other hand, they exhibit plasmon resonance, thanks to diameters of about 100 nm. The additional advantage of silver nanowires concerns flexibility with their surface modifications with on-demand functional groups. The synthesis of silver nanowires is simple, fast, and the obtained nanostructures remain stable over months.

The scientific focus of this dissertation was to experimentally demonstrate the potential of silver nanowires as a plasmonically enhanced fluorescence sensoric platform for the detection of single proteins. In this study, functionalized silver nanowires were tested for the detection of the photoactive protein peridinin-chlorophyll-protein, used as a model complex. Through the series of well-designed experiments, the optimized configuration of silver nanowires in the context of applications in biosensorics has been elucidated. For measurements, a fluorescence wide-field microscope was used to record kinetics of fluorescence intensity maps. In the initial experiment, incubation of proteins with silver nanowires in solution was tested. Subsequent stages focused on experiments where silver nanowires were deposited on a substrate. These included a novel method for orienting and attaching silver nanowires to the surface in a microfluidic channel. Protein detection by silver nanowires both embedded in the channel and in a plasmonic chip configuration was tested. Importantly, the orientation of silver nanowires and their surface functionalization have been shown to facilitate measurements and enable efficient protein detection using a wide-field fluorescence microscope. In addition, plasmonic enhancement of protein fluorescence was demonstrated and detection limits were determined. The conducted studies have shown that silver nanowires can be successfully used as plasmonically active biosensor platforms.