**Глава 3: Аномалия Вуда для оптического и магнитооптического биосенсора. Изменение оптических свойств наноструктур при взаимодействии поверхностного и локализованного плазмонов**

3.1. Технология изготовления, методики

Структура исследуемых биосенсоров представлена схематически на рис. 3.1 a) b). Периодическая решетка диэлектрических нановыступов, сделанных из водородный силсесквиоксан (HSQ, Hydrogen silsesquioxane) наносилась на кварцевую подложку. Электронная литография была произведена с помощью коммерческого прибора Raith при ускоряющем напряжении 50 кВ. Далее образцы отжигались для окончательного преобразования HSQ в SiOx. На следующем этапе наносилась тонкая пленка титана Ti, толщиной 2-5 нм, с последующим осаждением золота толщиной 80 нм (для структур 1 типа) и толщиной 40 нм (для структур 2 типа) (см. рис.3.1 с) и d)). Экспериментальные образцы были сделаны в МГТУ им. Баумана в НОЦ "Функциональные Микро/Наносистемы".

Данные образцы изготавливались с целью детектирования липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). ЛПНП - важнейший биомаркер кардиоваскулярного риска, так как является основным переносчиком холестерина в крови. На сегодняшний день, в клинической практике оценка концентрации ЛПНП рассчитывается косвенным методом, исходя из концентрации холестерина и триглицеридов [Nauck M, Warnick GR, Rifai N., Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation]. Такой метод определения уступает прямым методам детектирования ЛПНП [Choi SY1, Park HE, Kim MK, Shin CS, Cho SH, Oh BH, Difference between calculated and direct-measured low-density lipoprotein cholesterol in subjects with diabetes mellitus or taking lipid-lowering medications.].

3.1.1. Методика подготовки поверхности для регистрации биомолекулярных реакций

Первичная очистка образца с целью избавления от органического загрязнения производилась в кислородной плазме. Далее на образец наносилась маска из полиметилсилоксана (ПДМС) толщиной 1 мм (см рис. 3.2 a)). Маска представляла собой набор упорядоченно расположенных отверстий диаметром 1.5 мм, совпадающих с центрами чипов на образце ( топология расположения чипов на кристалле представлена на рис. 3.2 a)).

Протокол нанесения был разработан для максимизации специфического детектирования аналита -ЛПНП и контроля неспецифического связывания. Была выбрана методика с использованием дисульфида углерода (CS2), при которой создается ковалентная связь аминогрупп антител с поверхностью золота. Для специфического и неспецифического связывания использовались поликлональные антитела к белкам ApoB () для неспецифического связывания - ApoE-ab, cоответсвтенно.

На первом этапе функционализации раствор антител с CS2 в натрий-фосфатном буфере (PBS) наносился на чипы. Раствор объемом порядка 1 мкл оставался на чипе в течении 2 часов (этап инкубации). Далее раствор отбирался и снималась PDMS маска. Поверхность сенсоров промывалась PBS и высушивалась.