

ЗАТВЕРДЖУЮ
В.О. Директора
Інституту фізики напівпровідників
імені В.Є. Лашкарьова НАН України



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу у 2021 році в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок
«Новітня SERS-нано платформа для ефективного детектування біомолекул та патогенів»

Назва конкурсу: Підтримка досліджень провідних та молодих учених

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0204

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок № 2020.02/0204, «Новітня SERS-нано платформа для ефективного детектування біомолекул та патогенів»:

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу Підтримка досліджень провідних та молодих учених, протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21.

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2022 рік

Тривалість виконання Проєкту у 2021 році

Початок – 29.04.2021 р.

Закінчення – 15.12.2021 р.

Загальна вартість Проєкту, грн. 7 622 300.

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік: 1 060 600;

2-й рік: 3 828 800;

3-й рік: 2 732 900.

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

До виконання Проєкту буде залучено 10 виконавців, з них:

доктори наук - 2;

кандидати наук - 5 ;

інші працівники - 3.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ-СУБВИКОНАВЦЯ ПРОЄКТУ

Грантоотримувач:

Інститут фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (ІФН).

Адреса: 03028, м. Київ, просп. Науки, 41.

Код ЄДРПОУ: 05416952.

Серед важливих напрямів діяльності інституту - оптика і спектроскопія напівпровідникових матеріалів і наноструктур, фізика і технологія сенсорних систем.

У Проєкті дослідники з ІФН виконують завдання з виготовлення SERS-підкладок з певними характеристиками (від еталонної гладкої плівки металу до мульти-підкладок для мультиплексного детектування), хімічного синтезу плазмонних наночастинок (НЧ), модифікації поверхні SERS-підкладок, характеризації отриманих SERS-підкладок фізичними методами, спектроскопічних досліджень, досліджень SERS-спектрів біомолекул і встановлення залежності ефективності SERS-сигналу від морфології підкладки та функціоналізації її поверхні.

Міждисциплінарна команда ІФН складається з семи дослідників, серед яких двоє докторів наук, провідних експертів в галузі оптики наноструктур, раманівської і SERS-спектроскопії (Володимир Джаган – керівник Проєкту, і Володимир Юхимчук) і п'ятеро молодих науковців (Олександр Грешук, фізик, к.ф.-м.н.; Ольга Капуш., хімік, к.х.н.; М. Борова, біолог, к.б.н.; Оксана Ісаєва, фізик; Назар Мазур, фізик).

ІФН має технологічне обладнання для УФ-літографії, термічного напилення металів, імпульсного фотонного та термічного відпалів, установки для дослідження мікро-раманівських спектрів, фотолюмінесценції оптичного пропускання та відбивання; атомно-силовий мікроскоп, ІЧ Фур'є спектрофотометр та інше необхідне обладнання.

Субвиконавець:

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (ІХБГ).

Адреса: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А.

Код ЄДРПО: 02128514.

Серед основних напрямів досліджень інституту - вивчення молекулярно-біологічних і клітинно-біологічних механізмів життєдіяльності рослинних клітин; розробка нових молекулярних біотехнологій та нанобіотехнологій рослин; розробка молекулярно-генетичних і біохімічних методів фітосанітарного, медико-біологічного контролю продовольчої сировини, харчових добавок, продуктів і кормів та наукових засад біобезпеки.

У Проєкті на дослідників цього інституту покладаються завдання, які не можуть бути виконані командою ІФН, а саме відбір і підготовка біомолекул та інших біологічних матеріалів; підбір ефективних лігандів для модифікації поверхні підкладок, сумісних з антитілами та іншими біомолекулами, що будуть застосовуватися в процесі виконання проєкту; забезпечення функціоналізації SERS-підкладок біомолекулами різної природи (антитілами та аптамерами), характеризація експериментальними біологічними методами.

Команда ІХБГ складається з трьох дослідників: досвідченого вченого Ярослава Пірка, к.б.н., спеціаліста з нанобіотехнологій і молекулярної генетики, та двох молодих вчених-біологів - Світлани Плоховської і Анастасії Бузіашвілі, чий досвід роботи і знання є достатніми для успішного виконання Проєкту.

ІХБГ має все необхідне обладнання для виконання біологічної частини Проєкту. Він оснащений культуральними кімнатами для вирощування асептичних тканин та клітин, ламінарними боксами, термостатами та шейкерами для вирощування клітин, ампліфікаторами для проведення ПЛР, високошвидкісними центрифугами, спектрофотометром, флюориметром, системами для електрофорезу ДНК, РНК і білків, системами для переносу ДНК, РНК і білків на мембрани для подальшої візуалізації та аналізу, конфокальним лазерним скануючим мікроскопом, люмінесцентним мікроскопом.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мега Проєкту

Розробка фізико-хімічних принципів надчутливого і селективного детектування біомолекул і патогенів методом SERS-спектроскопії і нових підходів до формування наноструктурованих SERS-підкладок.

4.2. Основні завдання Проєкту

- Отримання нового типу високоефективних SERS-підкладок шляхом формування наноструктур у вигляді інвертованих пірамід на поверхні скла чи полімерної плівки.
- Функціоналізація поверхонь підкладок певними типами молекул-лінкерів та біомолекул шляхом (i) фіксації на поверхні молекул-лінкерів та/або (ii) фіксації біомолекул-аналітів (мішеней).
- Встановлення залежності ефективності SERS-сигналу від морфології підкладки та функціоналізації її поверхні.

4.3. Детальний зміст Проєкту

Сучасний стан проблеми

Для застосування SERS для селективного виявлення біомолекул важливо створити SERS-активні підкладки, які б мали високу чутливість, відтворюваність, латеральну однорідність і довготривалу стабільність. Також необхідно подолати ряд проблем при детектуванні реальних зразків, забезпечити селективну адсорбцію та специфічність детектування. Тому вивчення нових плазмонних наноструктур і раціональний дизайн SERS-підкладок на їх основі необхідні для розвитку SERS до рівня «зрілої» технології.

Новизна Проєкту

Для ефективного SERS-детектування біологічних об'єктів вперше буде застосовано:

- Морфологію "інвертованих пірамід" для збільшення кількості "гарячих точок";
- Деформацію підкладки як інструмент регулювання морфології;
- Колоїдні металеві НЧ для додаткового підсилення сигналу;
- Іони металів як лінкери біомолекул;
- Мульти-SERS-підкладки для мультиплексного детектування - головна інновація Проєкту.

Методологія дослідження

Після відпрацювання технології окремих елементів наноструктур і встановлення закономірностей підсилення раманівського сигналу від певних типів біомолекул планується виготовлення комплексних підкладок: скомбінувавши в одній "макро-підкладці" кілька "мікро-підкладок" з різними параметрами плазмонного резонансу, морфології та хімії поверхні, можна суттєво підвищити шанси на детектування певних молекул.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Відповідно до поставлених завдань на 2021 рік, перерахованих у календарному плані, нами було отримано SERS-підкладки на основі оксидів та полімерів, з наноструктурованою поверхнею, модифікованою шаром плазмонних наночастинок (НЧ) золота або срібла, та функціоналізованою відповідно до конкретних задач – для селективного прив'язування певних типів біомолекул, покращення формування "гарячих точок" між плазмонними НЧ, або ж тестування певних молекул як раманівських/SERS-маркерів. Виготовлення SERS-підкладок на полімерній та оксидній основах здійснювалося з варіюванням технологічних параметрів формування острівцевого темплата (спосіб структурування, висота та латеральні розміри інвертованих наноострівців/пірамід, їх поверхнева щільність) та параметрів формування шару плазмонних наноструктур (вид металу, спосіб нанесення, температура та тривалість відпалу, атмосфера, в якій відбувається відпал) інвертованої структури. Завданням Субвиконавця, була розробка та оптимізація методів функціоналізації поверхні отриманих SERS-підкладок малими за розмірами молекулами-лігандами і біомолекулами.

До методів дослідження, які використовувалися на даному етапі відносяться раманівська спектроскопія, інфрачервона Фур'є спектроскопія, рентгенівська фотоелектронна спектроскопія, атомна силова мікроскопія, скануюча електронна мікроскопія, спектроскопія оптичного поглинання і пропускання.

Завдяки застосуванню оригінальних підходів до багаторівневого структурування поверхонь на основі оксидів та полімерів, розроблено SERS-підкладки з підтвердженою здатністю до детектування малих кількостей біомолекул та малих за розмірами молекул, які використовуються в ролі раманівських маркерів (репортерів). Відтворювано детектовані величини складали до 10^{-7} для антитіл, амінокислот та інших біомолекул (зокрема, глутатіон), та до 10^{-8} М для раманівських/SERS-маркерів (родамін 6G, кристалічний фіолетовий, малахітовий зелений).

Структурування поверхні підкладки в мікронному та субмікронному масштабі мало на меті забезпечення більш рівномірного розподілу аналіту по поверхні підкладки, порівняно з пласкою поверхнею, та акумулювання молекул аналіту в місцях потенційної концентрації плазмонних "гарячих точок". Наступним етапом здійснювалося формування наноструктурованого шару з властивостями локалізованого плазмонного резонансу. Використовувалися два основних підходи – (i) термічне напилення тонкого (до 10 нм) шару металу з наступним відпалом до утворення ізольованих металевих НЧ, або ж (ii) осадження попередньо синтезованих металевих НЧ з колоїдного розчину. Обидва підходи дозволяють керувати параметрами сформованих плазмонних НЧ, головним з яких є спектральне положення смуги плазмонного резонансу, та є порівняно простими і недорогими в реалізації. Встановлено, що перевагою першого підходу є відсутність додаткових органічних компонентів (на відміну від лігандів у випадку колоїдних металевих НЧ), що дозволяє безпосередню іммобілізацію функціональних шарів або біомолекул на такі плазмонні підкладки. Однак, незаперечною перевагою другого підходу, є можливість керованої агрегації НЧ, що забезпечує більш високу ймовірність утворення "гарячих точок" (тобто нанометрових зазорів між металевими НЧ, в яких має місце максимальна концентрація електричних полів плазмонів) після осадження на поверхню SERS-підкладки. Саме при потраплянні молекул аналіта в "гарячі точки" спостерігається найбільше підсилення раманівського сигналу. Шляхом дослідження різних молекулярних та іонних "агрегаційних агентів" (тобто об'єктів, що спричиняють бажану агрегацію металевих НЧ) було встановлено найбільш оптимальні. До них належать як солі нітратів (н-д AgNO_3 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) або хлоридів (н-д NaCl , CsCl), так і деякі біомолекули, що виступають в ролі самих аналітів, зокрема цистеїн та глутатіон. Щодо останніх, то значні агрегаційні властивості можна пояснити наявністю різних функціональних груп, зокрема тіольної групи, що здатна утворювати ковалентний хімічний зв'язок не лише зі сріблом, але й із золотом (яке зазвичай вважається не здатним до утворення хімічних зв'язків). На основі отриманих нами даних є підстави зробити припущення про те, що для деяких антитіл притаманні також агрегаційні властивості, принаймні це могло б пояснити можливість спостерігати на них SERS-спектри, в той час коли інші антитіла за однакових експериментальних умов не проявляли ознак підсилення їх раманівських спектрів. Однак для остаточного висновку по цьому питанню, на наступних етапах виконання проекту, у тісній співпраці з командою Субвиконавця, будуть проведені більш детальні мікроскопічні дослідження на предмет кореляції ступеня агрегації НЧ в присутності антитіл та інтенсивності їх раманівських (SERS) спектрів.

В результаті виконання даного етапу досліджень встановлено, що найбільш ефективними є SERS-підкладки сформовані поєднанням обох вищезазначених, (i) та (ii), способів формування шару плазмонних НЧ на мікроструктурованій основі. За даними результатами подану до друку статтю. Загалом за результатами виконаних досліджень, у поточному році опубліковано три статті та ще дві подано до друку, та представлено чотири доповіді на конференціях.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Створення завершеної науково-технічної продукції на даному етапі проекту не передбачалося. Відпрацьована згідно календарного плану та технічного завдання технологія отримання тонких металевих плівок та адсорбування на них молекул-лінкерів (лігандів) та біомолекул необхідна для розробки наноструктурованих металізованих SERS-підкладок на наступних етапах.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проектів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)


Даного проекту не стосується, він виконується в напрямку фундаментальних досліджень.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.

Отримані на даному етапі виконання проекту результати будуть використані для наступних етапах реалізації SERS-платформи, запропонованої в цьому проекті, а також для підготовки наукових публікацій авторами проекту. Крім того, отримані фундаментальні фізичні та хіміко-біологічні знання можуть бути використані іншими фахівцями у викладанні сучасних дисциплін пов'язаних з нанофізикою, нанотехнологіями, сенсорикою та ін.

Науковий керівник Проекту

провідний науковий співробітник
Володимир ДЖАГАН



(підпис)