

Національна академія наук України,
Інститут молекулярної біології і генетики

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СОБОЛЕВСЬКИЙ МАКСИМ СЕРГІЙОВИЧ

УДК 535-2; 535-7; 577.

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА ВИСОКОЧУТЛИВОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ НА
ОСНОВІ ПОСИЛЕНОГО НАНОЧАСТИНКАМИ ЗОЛОТА
ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ ДЛЯ АНАЛІЗУ ДНК-
МАРКЕРА ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

09 БІОЛОГІЯ

091 БІОЛОГІЯ

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Соболевський М.С.

Науковий керівник Солдаткін Олександр Олексійович, доктор біологічних наук,
с.н.с.

Київ - 2026

АНОТАЦІЯ

Соболевський М.С. Розробка високочутливої біосенсорної системи на основі посиленого наночастинками золота поверхневого плазмонного резонансу для аналізу ДНК-маркера хронічної мієлоїдної лейкемії. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 091 Біологія та біохімія — Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2026.

У даній роботі представлена новітня гібридизаційна біосенсорна система на основі спектрометрії поверхневого плазмонного резонансу (ППР) з використанням колоїдних наночастинок золота (НЧЗ) для сендвіч-детекції генетичного маркера хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) – олігонуклеотида гібридного гена *BCR-ABL1*. В основі функціонування розробленої біосенсорної системи покладено вперше запропонований підхід щодо застосування НЧЗ у гібридизаційному сендвіч-аналізі маркера ХМЛ, а характеристики відповідного біоселективного елемента згаданої системи дозволяють його адаптацію до багатьох існуючих фізичних методів перетворення сигналів у біосенсориці, таких як спектрометрія поверхневого плазмонного резонансу, електроімпедансна спектроскопія (EIS), вольтамперометрія, тощо.

Метою дисертаційної роботи була розробка та оптимізація гібридизаційної біосенсорної системи на основі спектрометрії ППР у поєднанні з НЧЗ та сендвіч-аналізом для високочутливої та селективної детекції олігонуклеотидної послідовності гена *BCR-ABL1*.

Аналіз наукової літератури виявив, що важливість досліджень, спрямованих на швидку та економічну детекцію генетичних маркерів ХМЛ полягає в тому, що це захворювання піддається терапії та лікуванню лише в своїй безсимптомній фазі, коли його неможливо діагностувати жодними іншими

методами крім детекції пухлинної ДНК в організмі. Наразі провідним методом такої детекції є кількісна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка успішно впроваджена в медицині завдяки своїй винятковій чутливості та межі детектування. Наразі відомі випадки ПЛР-детекції генетичних маркерів захворювань без біопсії кісткового мозку завдяки наднизькій межі детектування ПЛР, яка дозволяє визначення таких маркерів у плазмі крові в концентрації до 100 фМ. Такі маркери відносять до вільної циркулюючої ДНК, яка виходить у кровотік при руйнуванні уражених захворюванням клітин та є першим із діагностичних критеріїв, які з'являються при патогенезі будь-якого захворювання.

Діагностика безсимптомних захворювань можлива в процесі скринінгу – регулярного клінічного аналізу організму на наявність одного чи багатьох захворювань. Недоліком ПЛР у цій сфері застосування є її залежність від одноразових реагентів – ДНК-праймерів та ферментів – що часто робить відповідний аналіз занадто коштовним для проведення регулярного скринінгу безсимптомних захворювань, таких як ХМЛ.

У роботі обґрунтовано вибір біосенсорних методів детекції як оптимальних для скринінгу ХМЛ із огляду на можливість багаторазового використання в складі біосенсорного аналізу деяких біомолекул, що має значно здешевити діагностику цього захворювання.

Принцип функціонування розробленої біосенсорної системи базується на рефрактометричній детекції афінних взаємодій між біомолекулами: гібридизація між ДНК-мішенню зі складу досліджуваного зразка та ДНК-зондом, попередньо іммобілізованим на чутливій поверхні сенсорного елемента. ППР-біосенсор без застосування наночастинок, сигнал якого прямо залежить від зміни показника заломлення середовища ДНК-зондів при гібридизації з ними ДНК-мішеней, був розроблений Мацишиним та ін. у 2016 р. Він дозволяє проведення до 50

повторних вимірювань на одному й тому ж біоселективному елементі, що відповідним чином здешевшує собівартість кожного з вимірювань. Важливим недоліком цього біосенсора є його межа детектування – 50 нМ проти 16 фМ в ППР.

Дана робота представляє розвиток біосенсорних технологій, направлених на детекцію маркерів ХМЛ у значно нижчих концентраціях. Головним результатом цієї роботи є зниження межі детектування ППР-біосенсора більш ніж в 600 разів. Досягти цього вдалося завдяки запропонованому новому підходу, в основі якого лежить посилення наночастинками золота поверхневого плазмонного резонансу для аналізу ДНК-маркера хронічної мієлоїдної лейкемії. Це включає оптимізацію процесів іммобілізації ДНК на чутливій поверхні ППР, створення нових методик синтезу і біофункціоналізації НЧЗ, вивчення взаємодії НЧЗ з чутливою поверхнею ППР з утворенням нанорозмірних сендвіч-структур, кожна з яких включає ДНК-зонд із чутливої поверхні ППР, ДНК-мішень з досліджуваного зразка та ДНК-зонд, функціоналізований колоїдною наночастинкою золота.

Перший етап дослідження полягав у розрахунковій роботі, направлений на оцінку можливостей покращення аналітичних характеристик ППР-біосенсорів. Був прослідкований зворотний зв'язок між величинами чутливості ППР-сенсора та довжиною згасання електричного поля ППР у досліджуваному зразку. Таким чином, наночастинки золота були визначені як засоби підвищення чутливості та зниження межі детектування ППР-біосенсора. Також був встановлений алгоритм визначення ефективності гібридизації біосенсорної сендвіч-системи на основі ППР.

Другий етап передбачав створення та порівняльну характеристизацію багатьох варіантів гібридизаційних ППР-біосенсорів. Вперше було оцінено можливість використання цитратного буферного розчину для іммобілізації ДНК-зондів на чутливій поверхні ППР, а також нижчої концентрації фосфатного буферного

розчину для тих же цілей. За результатами проведених дослідів було встановлено оптимальні параметри середовища та умови функціонування біосенсорної системи для досягнення найкращих її аналітичних характеристик.

Третій етап включав розробку нової методики синтезу колоїдних НЧЗ, оптимізацію процедур їх біофункціоналізації та застосування отриманих НЧЗ для посилення біосенсорного сигналу ППР. Вперше в світі був проведений та описаний синтез НЧЗ методом Туркевича з солі золота AuCl_3 . У синтезі НЧЗ ця сіль золота є оптимальною через те, що AuCl_3 дає можливість більшого контролю параметрів синтезу НЧЗ, а отримані НЧЗ характеризуються меншою дисперсністю та більшою біобезпечністю, ніж НЧЗ, синтезовані з HAuCl_4 .

Синтезовані НЧЗ були кон'юговані з ДНК-зондами з метою їх біофункціоналізації та електростерично стабілізовані за допомогою 6-меркапто-1-гексанолу (MCH) та ліпоевої кислоти (LA). Були успішно проведені дослід з прямого зв'язування кон'югатів ДНК-НЧЗ з чутливою поверхнею ППР з подальшою регенерацією чутливої поверхні. Був визначений оптимальний спосіб модифікації поверхні НЧЗ з метою нівелювання їх неспецифічної агрегації в умовах гібридаційного дослідження.

Четвертий етап полягав в розробці методики застосування та аналізі аналітичних характеристик НЧЗ-вмісної ДНК-чутливої біосенсорної системи для сендвіч-аналізу ДНК-маркера гібридного гена *BCR-ABL1*. Розробленою біосенсорною методикою було успішно детектовано наявність у досліджуваному зразку олігонуклеотидів-мішеней у концентрації 80 пМ, що в 625 разів менше за межу детектування аналогічного біосенсора без застосування НЧЗ. Додатково було описано оптимальні умови зберігання колоїдного компонента розробленої біосенсорної системи з метою збереження аналітичних характеристик біосенсорної системи у часі.

За результатами виготовлення фізичних і біохімічних сенсорних компонентів та оптимізації їх одночасної роботи було створено гібридизаційну біосенсорну систему на основі спектрометрії ППР з використанням НЧЗ та сендвіч-аналізу, що відрізняється такими основними аналітичними характеристиками:

- лінійний діапазон 80 пікомоль – 200 наномоль/л,
- мінімальна межа детектування – 80 пікомоль/л,
- відтворюваність роботи з відносним стандартним відхилення 6,64% (при концентрації 80 нМ);
- час повного аналізу - 60 хвилин.

Мінімальна межа детектування може бути зменшена при збільшенні часу аналізу.

Наукова новизна.

Вперше математично обґрунтовано доцільність використання наночастинок золота в ДНК-біосенсорному аналізі та розраховано параметри ППР-біосенсорної системи, оптимальні для високочутливої детекції ДНК-маркера ХМЛ.

Вперше показано ефекти підвищення чутливості, селективності та межі детектування ППР-сенсорів для визначення ДНК-маркера ХМЛ при використанні біофункціоналізованих НЧЗ.

Вперше розроблено біосенсорну систему для детекції олігонуклеотидної послідовності онкогена *BCR-ABL1* (патент на винахід № 130005 та патент на корисну модель № 156960) на основі посиленої наночастинками золота спектрометрії поверхневого плазмонного резонансу.

Вперше запропоновано нову спеціалізовану процедуру синтезу біобезпечних наночастинок золота з низькою дисперсністю (патент на корисну модель № 163065 та подано патент на винахід (заявка # а 2025 04948 від 10.10.2025).

Підібрано та оптимізовано нову процедуру модифікації НЧЗ зондовими олігонуклеотидами, ліпоєвою кислотою та меркаптогексаноном задля забезпечення біофункціональності та колоїдної стабільності НЧЗ у складі розробленої біосенсорної системи.

Практичне значення.

Розроблена в роботі біосенсорна система перевершує традиційні методи за межею детектування, шириною лінійного діагностичного визначення, простотою експлуатації, низькою собівартістю вимірювання та можливістю до мініатюризації та автоматизації процедури аналізу. Порівняно з існуючими біосенсорами для ДНК-маркерів ХМЛ, розроблена біосенсорна система є першим високочутливим пристроєм, біоселективний елемент якого працює з використанням НЧЗ та сендвіч-аналізу, що відкриває можливості для його адаптації до всіх фізичних перетворювачів біосенсорного сигналу, чутливих до наночастинок золота.

Розроблений спосіб синтезу НЧЗ розрахований на практичне використання в умовах дотримання біобезпеки при використанні НЧЗ чітко визначених розмірів.

Матеріали дисертаційної роботи були використані в лекціях та практичних та лабораторних роботах кафедри трансляційної медичної біоінженерії Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут» (Додаток Б) та кафедри молекулярної біології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету (Додаток В). Виконано метрологічну атестацію в ДП «Укрметртестстандарт» (Додаток Г).

Результати дисертаційної роботи, а саме розроблені способи синтезу й модифікації НЧЗ та загальна біосенсорна система, мають **перспективи** практичного застосування для експрес-діагностики безсимптомної стадії ХМЛ в

умовах клінічних лабораторій, моніторингу ефективності лікування онкологічних пацієнтів, скринінгових обстежень населення.

Розроблена технологія створює підґрунтя для створення портативних point-of-care пристроїв для моніторингу важливих аналітів безпосередньо біля ліжка пацієнта або в умовах амбулаторної практики, що особливо актуально для регіонів з обмеженим доступом до централізованих лабораторій. Подальший розвиток запропонованої біосенсорної системи може бути направлений на оптимізацію фізичних, електронних та гідродинамічних її компонентів. В рамках виконання даної дисертаційної роботи було **сформовано низку рекомендацій** щодо подальшого вдосконалення системи та кроків щодо її впровадження. Це включає виконання робіт по експериментальному встановленню біобезпечності використаних наночастинок; покращенню гідрофільності, термостабільності та зручності встановлення вимірювальної проточної комірки; збільшенню кількості одночасно задіяних сенсорних елементів; автоматизації подачі зразків у вимірювальну проточну комірку; дегазації рідин на вході в гідродинамічну систему; стандартизації та масовому виготовленню замінних деталей; мінімізації об'єму досліджуваного зразка з дотриманням герметичності всіх частин системи та їхніх з'єднань; підбору хімічно інертних матеріалів внутрішніх поверхонь гідродинамічної системи, пробірок та наконечників піпеткових дозаторів; розробці протоколу очищення поверхонь, забруднених агрегованими НЧЗ; покращенню адгезії золотого напилення до поверхні сенсорного елемента ППР; повторній переробці використаних наночастинок золота та сенсорних елементів ППР; дизайну перистальтичних насосів, придатних для точного контролю швидкості току рідини до 50 мкл/хв та оптимізації програмного забезпечення спектрометра ППР.

Ключові слова: біосенсори, біологічне оцінювання, поверхневий плазмонний резонанс, гібридизація ДНК, сендвіч-аналіз, наночастинок,

взаємодія наночастинок, колоїдні золі наночастинок, наночастинки золота, рак, онкогени, хронічна мієлоїдна лейкемія, філадельфійська хромосома, BCR/ABL, клінічна значущість, експресія генів, рідинна біопсія.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті в наукових виданнях

1. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Pyeshkova V.M., Errachid A., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of a Highly Sensitive SPR Biosensor for BCR–ABL Gene Sequence Detection Using a Novel Gold Nanoparticle–Enhanced Sandwich Assay Format. *Micromachines* 2026, 17, 426. <https://doi.org/10.3390/mi17040426>. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристизація та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.*
2. Золотопупова С.С., Худецький І.Ю., Соболевський М.С. Біобезпека виробництва та використання ДНК-біосенсорів. *Біомедична інженерія і технологія* 2025, 17. <https://doi.org/10.20535/.2025.17.331628>. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, консультування з питань наноструктур та спектрометрії ППР, рецензування та редагування статті.*
3. Sobolevskyi M.S., Kucherenko. I.S., Lopatynskyi A.M., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Synthesis of monodisperse nanospheres by citrate reduction of AuCl₃ for their usage in DNA hybridization biosensors. *Biotechnologia Acta T.* 2025, 18, 96-99. <https://doi.org/10.15407/biotech18.02.096>. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристизація та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.*

4. Sobolevskyi M.S., Holubiev I.Iu., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Optimization of Parameters of Saline Sodium Citrate Buffer for Stability of Colloidal Gold Nanoparticles Used in DNA Hybridization Biosensor. Innovative Biosystems and Bioengineering 2024, 9, 12-20. <https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.310991>. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.*
5. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Matsishin M.J., Dzyadevych S.V. Soldatkin A.P. Application of modified gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry. Applied Nanoscience 2023, 13, 7521–7529. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2>. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.*

Патенти

1. Соболевський М.С., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для визначення послідовності олігонуклеотидів філадельфійської хромосоми. Патент на винахід №130005. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1879802/> *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристизація та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання патенту.*
2. Соболевський М.С., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Гібридизаційна біосенсорна система на основі поверхневого плазмонного

резонансу для детекції послідовності олігонуклеотидів філадельфійської хромосоми. Патент на корисну модель №156960. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1816094/> *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристика та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання патенту.*

3. Соболевський М.С., Лопатинський А.М., Дзядевич С.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Спосіб прецизійного синтезу наночастинок золота цитратним відновленням золота (III) хлориду. Патент на корисну модель №163065. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1923454/> *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез та характеристика наночастинок золота, фотонна кореляційна спектроскопія, обробка результатів, написання патенту.*

Тези доповідей на наукових конференціях

1. Sobolevskiy M.S., Lopatynskiy A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Electrosterical stabilization of citrate-bound gold nanoparticles for signal enhancement of hybridization DNA biosensor. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2025)”, 20-23 August 2025, Ivano-Frankivsk, Ukraine, Book of Abstracts – P. 466.
2. Sobolevskiy M.S. Kucherenko I.S. Lopatynskiy A.M. Dzyadevych S.V. Soldatkin O.O. Precision synthesis of citrate-capped gold nanoparticles for enhancement of DNA hybridization biosensors. XIX All-Ukrainian Conference of young scientists, May 20-21, 2025, Book of Abstracts – P. 40.
3. Соболевський М.С., Кучеренко І.С., Лопатинський А.М. Чегель В.І., Самойлов А.В., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О., Оптимізація наночастинок золота, які використовуються в гібридизаційній біосенсорній системі на основі

- поверхневого плазмонного резонансу. IV Міжнародна науково-практична конференція «Природничі науки та освіта: сучасний стан і перспективи розвитку» 7-8 листопада 2024 р., м. Харків, Збірник наукових праць – с. 100-101.
4. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V. Enhancing the response of a hybridization SPR biosensor using modified gold nanoparticles. BioGENext: Next Generation Therapy Conference, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine; Biopolym. Cell. 2024; 40(3):204-204. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AE7>.
 5. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Optimization of gold nanoparticles employed in hybridization biosensor system based on surface plasmon resonance. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2024)”, 21-24 August 2024, Uzhhorod, Ukraine, Book of Abstracts – P. 543.
 6. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Surface plasmon resonance detection of the sequence of Philadelphia chromosome oligonucleotides with nanoparticle-mediated signal enhancement. XVIII All-Ukrainian Conference of young scientists, May 21-22, 2024, Book of Abstracts – P. 55.
 7. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Samoylov A.V. SPR-based detection of point mutations in 21-base oligonucleotide sequences. XXI International conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: Advancements in life sciences”, book of abstracts (Kyiv, 24-26 April, 2024) – P. 199.
 8. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Matsishin M.J., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Hybridization biosensor system based on surface plasmon resonance for detection of the sequence of oligonucleotides of the Philadelphia chromosome. International research and

practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023)”, 16-19 August 2023, Lviv, Ukraine – P. 544.

9. Sobolevskyi M.S., Rachkov A.E., Samoylov A.V., Ushenin Yu.V., Soldatkin A.P. Optimization of the development of a bioselective element of the SPR biosensor for the detection of oligonucleotide sequences of the Philadelphia chromosome. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l’Université Bourgogne Franche Comté. 24-25 Novembre 2022, Dijon, France, p. 28.

SUMMARY

Sobolevskyi M.S. Development of a highly sensitive biosensor system based on gold nanoparticles-enhanced surface plasmon resonance for the analysis of a DNA marker of chronic myeloid leukemia. - Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 Biology and Biochemistry - Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

This work presents a novel hybridization SPR-biosensor system based on surface plasmon resonance (SPR) spectrometry with the use of colloidal gold nanoparticles (AuNPs) for sandwich detection of a genetic marker of chronic myeloid leukemia (CML) - an oligonucleotide of the hybrid gene *BCR-ABL1*. The functioning of the developed biosensor system is based on the first proposed approach to the application of AuNPs in hybridization sandwich assays for detection of marker of CML, and the characteristics of the corresponding bioselective element of the system allow its adaptation to many existing physical biosensor signal conversion methods, such as surface plasmon resonance (SPR) spectrometry, electrical impedance spectroscopy (EIS), voltammetry etc.

The **aim** of the dissertation was to develop and optimize a hybridization biosensor system based on SPR spectrometry in conjunction with colloidal AuNPs and sandwich analysis for highly sensitive and selective detection of the oligonucleotide sequence of the *BCR-ABL1* gene.

The **analysis of the scientific literature** revealed that the importance of research aimed at rapid and cost-effective detection of genetic markers of CML lies in the fact that this disease is amenable to therapy and treatment only in its asymptomatic phase, when it cannot be diagnosed by any other methods except for the detection of tumor DNA in the body. Currently, the leading method of such detection is quantitative

polymerase chain reaction (PCR), which has been successfully implemented in medicine due to its exceptional sensitivity and detection limit. Currently, there are known cases of PCR detection of genetic markers of diseases without bone marrow biopsy due to the ultra-low detection limit of PCR, which allows the determination of such markers in blood plasma at a concentration of up to 100 fM. Such markers are referred to as free circulating DNA, which enters the bloodstream when diseased cells are destroyed and is the first diagnostic criterion that appears in the pathogenesis of any disease.

Diagnostics of asymptomatic diseases is possible in the process of screening - regular clinical analysis of the body for the presence of one or more diseases. The disadvantage of PCR in this area of application is its dependence on disposable reagents - DNA primers and enzymes - which often makes the corresponding analysis too expensive for regular screening of asymptomatic diseases, such as CML.

The work justifies the choice of biosensor detection methods as optimal for CML screening due to the repeated use of biomolecules in the composition of biosensors for detection of certain biomolecules, which should significantly reduce the cost of diagnosing the corresponding disease.

The principle of operation of the developed biosensor system is based on refractometric detection of affinity interactions between biomolecules: hybridization between the DNA target from the composition of the sample under study and the DNA probe, previously immobilized on the sensitive surface of the sensor element. A SPR biosensor, whose signal directly depends on the change in the refractive index of the medium of DNA probes upon hybridization of DNA targets with them, was developed by Matyshyn et al. in 2016. It allows for up to 50 repeated measurements on the same bioselective element, which accordingly reduces the cost of each measurement. An important disadvantage of this biosensor is its detection limit – 50 nM versus 16 fM in PCR.

This work presents the development of biosensor technologies aimed at detecting CML markers at much lower concentrations. The main result of this work is the reduction of the detection limit of the SPR biosensor by more than 600 times. This was achieved thanks to the proposed new approach, which is based on the enhancement of surface plasmon resonance with gold nanoparticles for the analysis of a DNA marker of chronic myeloid leukemia. This included optimizing the processes of DNA immobilization on the SPR sensitive surface, development of new methods of synthesis and biofunctionalization of AuNPs and studying of interaction of AuNPs with the SPR sensitive surface to form nanosized sandwich structures, each of which includes a DNA probe from the SPR sensitive surface, a DNA target from the sample under study, and a DNA probe functionalized with a colloidal gold nanoparticle.

The **first stage** of the study consisted of computational work aimed at assessing the possibilities of improving the analytical characteristics of SPR biosensors.

The relationship between the sensitivity values of the SPR sensor and the length of the SPR electric field decay in the sample under study was traced. Thus, gold nanoparticles were identified as a means of increasing the sensitivity and reducing the detection limit of the SPR biosensor. An algorithm for determining the hybridization efficiency of the sandwich biosensor system based on SPR was also established.

The **second stage** involved the creation and comparative characterization of many variants of hybridization SPR biosensors. For the first time, the possibility of using a citrate buffer solution for immobilizing DNA probes on the sensitive surface of the SPR was assessed, as well as a lower concentration of phosphate buffer solution for the same purposes. The results of the experiments established the optimal environmental parameters and operating conditions of the biosensor system to achieve its best analytical characteristics.

The **third stage** included development of new method of synthesis of colloidal NPs, optimization of procedures of their biofunctionalization, and application of the

developed AuNPs to amplify the SPR biosensor signal.

For the first time in the world, the synthesis of AuNPs by the Turkevich method from the gold salt AuCl_3 was carried out and described. In the synthesis of AuNPs, this gold salt is optimal because AuCl_3 allows for greater control over the parameters of the synthesis of nanoparticles, and the obtained nanoparticles are characterized by lower dispersion and greater biosafety than nanoparticles synthesized with HAuCl_4 .

The synthesized AuNPs were conjugated with DNA probes for the purpose of their biofunctionalization and electrostatically stabilized using 6-mercapto-1-hexanol (MCH) and lipoic acid (LA). Experiments on direct binding of DNA-AuNP conjugates to the SPR sensor surface with subsequent regeneration of the sensitive surface were successfully conducted. The optimal method of modifying the surface of AuNPs was determined in order to eliminate their nonspecific aggregation under the conditions of hybridization studies.

The **fourth stage** consisted in describing the methodology for the application and analytical characteristics of the AuNP-containing DNA-sensitive biosensor system for sandwich analysis of the DNA marker of the hybrid gene *BCR-ABL1*. The developed biosensor methodology was successfully used for detection of target oligonucleotides in the sample under study at a concentration of 80 pM, which is 625 times lower than the detection limit of a similar biosensor without the use of AuNPs. Additionally, the optimal storage conditions for the colloidal component of the developed biosensor system were described in order to preserve its analytical characteristics of the biosensor system over time.

Based on the results of manufacture of physical and biochemical sensor components and optimizing their simultaneous operation, a hybridization SPR biosensor system based on SPR spectrometry with the use of AuNPs and sandwich analysis, which is characterized by the following analytical characteristics:

- linear range: 80–200 picomoles/l,

- limit of detection – 80 picomoles/l,
- reproducibility of results with a relative standard deviation 6.64% at a concentration of 80 nM;
- time of complete analysis - 60 minutes.

Scientific novelty.

For the first time, the feasibility of using gold nanoparticles in DNA biosensor analysis has been mathematically substantiated and the parameters of the SPR biosensor system optimal for highly sensitive detection of the CML DNA marker have been calculated.

For the first time, the effects of increasing the sensitivity, selectivity, and detection limits of SPR sensors for determining the CML DNA marker when using biofunctionalized nanoparticles have been shown.

For the first time, a biosensor system for detecting the oligonucleotide sequence of the *BCR-ABL1* oncogene (patent for invention No. 130005 and patent for utility model No. 156960) based on surface plasmon resonance spectrometry enhanced with gold nanoparticles has been developed.

For the first time, a new specialized procedure for the synthesis of biosafe gold nanoparticles with low dispersion has been proposed (patent for utility model No. 163065 and a patent for the invention was filed).

A new procedure for modifying nanoparticles with probe oligonucleotides, lipoic acid, and mercaptohexanol was also selected and optimized to ensure biofunctionality and colloidal stability of nanoparticles as part of the developed biosensor system.

Practical significance.

The developed in the study biosensor system surpasses traditional methods in terms of detection limit, width of linear detection range, ease of operation, low measurement cost and the possibility of miniaturization and automation of the analysis procedure. Compared to existing biosensors for DNA markers of CML, the developed

biosensor system is the first highly sensitive device the bioselective element of which works using AuNPs and sandwich analysis. This opens up possibilities for its adaptation to all physical transducers of the biosensor signal sensitive to gold nanoparticles. The developed AuNP synthesis method is designed for practical use in conditions of limited resources and the need for small volumes of precision gold nanospheres.

The developed method of synthesis of AuNPs is designed for practical use in conditions of biosafety when using AuNPs of clearly defined sizes.

The materials of the qualification work were used in lectures and practical and laboratory work of the Department of Translational Medical Bioengineering of the National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute" (Appendix 1) and the Department of Molecular Biology and Bioinformatics of the Institute of High Technologies of Kyiv National University (Appendix 2). Metrological certification was performed at the State Enterprise "Ukrmetrteststandart" (Appendix 3).

The results of the dissertation work, namely the developed methods of synthesis and modification of AuNPss and the general biosensor system, have **prospects** for practical application for express diagnostics of asymptomatic stage of CML in clinical laboratories, monitoring of the effectiveness of treatment of oncological patients, screening examinations of the population.

The developed technology creates the basis for the creation of portable point-of-care devices for monitoring of important analytes directly at the patient's bedside or in outpatient practice, which is especially relevant for regions with limited access to centralized laboratories. Further development of the proposed biosensor system can be devoted to the optimization of its physical, electronic and hydrodynamic components. As part of this dissertation work, a **number of recommendations were formed** for further improvement of the system and steps for its implementation. Namely, the implementation of work on experimentally establishing the biosafety of the nanoparticles used; improving the hydrophilicity, thermal stability and ease of

installation of the measuring flow cell; increasing the number of simultaneously used sensor elements; automating the injection of samples to the measuring flow cell; degassing liquids at the entrance to the hydrodynamic system; standardization and mass production of replaceable parts; minimization of the volume of the test sample while maintaining the tightness of all parts of the system and their connections; selection of chemically inert materials for the internal surfaces of the hydrodynamic system, test tubes and pipette tips; development of a cleaning protocol for surfaces contaminated with aggregated nanoparticles; improvement of the adhesion of gold sputtering to the surface of the SPR sensor element; reprocessing of used gold nanoparticles and SPR sensor elements; design of peristaltic pumps suitable for precise control of liquid flow rates up to 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ and optimization of the SPR spectrometer software.

Keywords: biosensors, biological evaluation, surface plasmon resonance, DNA hybridization, sandwich assay, nanoparticles, colloidal sols of nanoparticles, interaction of nanoparticles, gold nanoparticles, cancer, oncogenes, chronic myeloid leukemia, Philadelphia chromosome, BCR/ABL, clinical relevance, gene expression, liquid biopsy.

List of publications of the applicant on the topic of the dissertation

Scientific articles

1. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Pyeshkova V.M., Errachid A., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of a Highly Sensitive SPR Biosensor for BCR–ABL Gene Sequence Detection Using a Novel Gold Nanoparticle–Enhanced Sandwich Assay Format. *Micromachines* 2026, 17, 426. <https://doi.org/10.3390/mi17040426>. *The applicant's personal contribution is analysis of literature data, synthesis, characterization and biofunctionalization of gold nanoparticles, SPR spectrometry, processing of results, writing and preparing*

the article for publication.

2. Zolotopupova S.S., Khudetsky I.Yu., Sobolevskyi M.S. Biosafety of production and use of DNA biosensors. Biomedical Engineering and Technology 2025, 17. <https://doi.org/10.20535/.2025.17.331628>. *Personal contribution of the applicant – analysis of literature data, consulting on nanostructures and SPR spectrometry, reviewing and editing the article.*
3. Sobolevskyi M.S., Kucherenko. I.S., Lopatynskyi A.M., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Synthesis of monodisperse nanospheres by citrate reduction of AuCl₃ for their usage in DNA hybridization biosensors. Biotechnologia Acta T. 2025, 18, 96-99. <https://doi.org/10.15407/biotech18.02.096>. *The applicant's personal contribution is analysis of literature data, synthesis, characterization and biofunctionalization of gold nanoparticles, SPR spectrometry, processing of results, writing and preparing the article for publication.*
4. Sobolevskyi M.S., Holubiev I.Iu., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Optimization of Parameters of Saline Sodium Citrate Buffer for Stability of Colloidal Gold Nanoparticles Used in DNA Hybridization Biosensor. Innovative Biosystems and Bioengineering 2024, 9, 12-20. <https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.310991>. *The applicant's personal contribution is analysis of literature data, synthesis and biofunctionalization of gold nanoparticles, SPR spectrometry, processing of results, writing and preparing the article for publication.*
5. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Matsishin M.J., Dzyadevych S.V. Soldatkin A.P. Application of modified gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry. Applied Nanoscience 2023, 13, 7521–7529. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2>. *The applicant's personal*

contribution is analysis of literature data, biofunctionalization of gold nanoparticles, SPR spectrometry, processing of results, writing and preparing the article for publication.

Patents

1. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Dzyadevich S.V., Soldatkin O.P. Biosensor system for determining the sequence of Philadelphia chromosome oligonucleotides. Patent for invention №130005. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1879802/>. *The applicant's personal contribution is analysis of literature data, synthesis, characterization and biofunctionalization of gold nanoparticles, SPR spectrometry, processing of results, writing a patent.*
2. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Dzyadevich S.V., Soldatkin O.P. Hybridisation biosensor system based on surface plasmon resonance for detection of Philadelphia chromosome oligonucleotide sequence. Utility model patent №156960. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1816094/>. *The applicant's personal contribution is analysis of literature data, synthesis, characterization and biofunctionalization of gold nanoparticles, SPR spectrometry, processing of results, writing a patent.*
3. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Dzyadevych S.V., Kucherenko I.S., Soldatkin O.O. Method for precision synthesis of gold nanoparticles via citrate reduction of gold(III) chloride. Utility model patent No. 163065. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1923454/>. *Personal contribution of the applicant – analysis of literature data, synthesis and characterization of gold nanoparticles, photon correlation spectroscopy, processing of results, writing of the patent.*

Abstracts of reports at scientific conferences

1. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Electrosterical stabilization of citrate-bound

- gold nanoparticles for signal enhancement of hybridization DNA biosensor. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2025)”, 20-23 August 2025, Ivano-Frankivsk, Ukraine, Book of Abstracts – P. 466.
2. Sobolevskyi M.S. Kucherenko I.S. Lopatynskyi A.M. Dzyadevych S.V. Soldatkin O.O. Precision synthesis of citrate-capped gold nanoparticles for enhancement of DNA hybridization biosensors. XIX All-Ukrainian Conference of young scientists, May 20-21, 2025, Book of Abstracts – P. 40.
 3. Sobolevskyi M.S., Kucherenko I.S., Lopatynskyi A.M. Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O., Optimization of gold nanoparticles used in a hybridization biosensor system based on surface plasmon resonance. IV International Scientific and Practical Conference “Natural Sciences and Education: Current State and Development Prospects” November 7-8, 2024, Kharkiv, Collection of Scientific Papers – pp. 100-101.
 4. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V. Enhancing the response of a hybridization SPR biosensor using modified gold nanoparticles. BioGENext: Next Generation Therapy Conference, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine; Biopolym. Cell. 2024; 40(3):204-204. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AE7>.
 5. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Optimization of gold nanoparticles employed in hybridization biosensor system based on surface plasmon resonance. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2024)”, 21-24 August 2024, Uzhhorod, Ukraine, Book of Abstracts – P. 543.
 6. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Surface plasmon resonance detection of the sequence of Philadelphia chromosome oligonucleotides with nanoparticle-mediated

- signal enhancement. XVIII All-Ukrainian Conference of young scientists, May 21-22, 2024, Book of Abstracts – P. 55.
7. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Samoylov A.V. SPR-based detection of point mutations in 21-base oligonucleotide sequences. XXI International conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: Advancements in life sciences”, book of abstracts (Kyiv, 24-26 April, 2024) – P. 199.
 8. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Matsishin M.J., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Hybridization biosensor system based on surface plasmon resonance for detection of the sequence of oligonucleotides of the Philadelphia chromosome. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023)”, 16-19 August 2023, Lviv, Ukraine – P. 544.
 9. Sobolevskyi M.S., Rachkov A.E., Samoylov A.V., Ushenin Yu.V., Soldatkin A.P. Optimization of the development of a bioselective element of the SPR biosensor for the detection of oligonucleotide sequences of the Philadelphia chromosome. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l’Université Bourgogne Franche Comté. 24-25 Novembre 2022, Dijon, France, p. 28.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
SUMMARY	14
ЗМІСТ	25
ВСТУП.....	28
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	38
1.1. Аналітичні методи на основі гібридизації нуклеїнових кислот	38
1.1.1. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.....	39
1.1.2. Секвенування	41
1.1.3. Саузерн-блотинг	44
1.1.4. Гібридизаційні ДНК-біосенсиори.....	46
1.2. Хронічна мієлоїдна лейкемія	51
1.2.1. Значення гібридного гена <i>BCR-ABL1</i> у розвитку ХМЛ	54
1.2.2. Будова гена <i>BCR-ABL1</i>	56
1.2.3. Діагностика хронічної мієлоїдної лейкемії	57
1.3. Застосування наночастинок золота у ДНК-біосенсорах	61
1.4. Підсумки огляду літератури.....	63
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	65
2.1. Реагенти	65
2.2. Спектрометр ППР	65
2.3. Сенсорний елемент спектрометра ППР	66
2.4. Вимірювальна проточна комірка	68
2.5. Синтез та характеристика НЧЗ	69
2.6. Імобілізація та гібридизація олігонуклеотидів у біосенсорній системі	70
2.7. Дизайн біосенсорної системи.....	77

2.8. Формування зондових комплексів ДНК-НЧЗ та їх колоїдна стабілізація	79
2.9. Методика вимірювання.....	80
2.10. Програмне забезпечення, обробка результатів	83
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	84
3.1. Принципи посилення ППР наночастинками золота	84
3.1.1. Спектрометрія повного внутрішнього відбиття	85
3.1.2. Спектрометрія поверхневого плазмонного резонансу	92
3.1.3. Вплив НЧЗ на аналітичні характеристики ППР-біосенсора.....	98
3.1.4. Підсумки розділу 3.1.....	101
3.2. Підбір оптимальних умов іммобілізації тіолованих олігонуклеотидів на чутливій поверхні спектрометра ППР.....	102
3.2.1. Дослідження процесів іммобілізації та гібридизації олігонуклеотидів Rh-хромосоми на сенсорній поверхні.....	102
3.2.2. Визначення експлуатаційних характеристик різних варіантів біоселективних елементів на основі mod-Rh	110
3.2.3. Підсумки розділу 3.2.....	114
3.3. Розробка підходів підвищення чутливості та селективності ДНК-біосенсорів за рахунок детекції послідовностей ДНК модифікованих НЧЗ	114
3.3.1. Розробка та оптимізація методики синтезу монодисперсних НЧЗ	115
3.3.2. Розробка підходу захисту від агрегації наночастинок золота модифікованих олігонуклеотидами спеціальними блокувальними молекулами	120
3.3.3. Вивчення ефектів від біосенсорної детекції олігонуклеотидів модифікованих НЧЗ	123
3.3.4. Підсумки розділу 3.3.....	126

3.4. Розробка ДНК-біосенсорної сендвіч-системи на основі НЧЗ для детекції олігонуклеотида гена <i>BCR-ABL1</i>	128
3.4.1. Вивчення аналітичних характеристик розробленої сендвіч-системи	131
3.4.2. Дослідження специфічності функціонування розробленої біосенсорної системи на основі сендвіч-аналізу 80-мерної мішені BCR-ABL	134
3.4.3. Дослідження відтворюваності роботи біосенсорної системи на основі сендвіч-аналізу 80-мерної мішені BCR-ABL	135
3.4.4. Підбір оптимальних умов для зберігання та роботи з компонентами біосенсорної системи	138
3.4.5. Підсумки розділу 3.4	143
3.5. Рекомендації для подальшої роботи	145
ВИСНОВКИ	150
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	152
ДОДАТОК А	174
ДОДАТОК Б	179
ДОДАТОК В	180
ДОДАТОК Г	181

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. В сучасній лабораторній діагностиці та в фундаментальних біологічних дослідженнях одне з головних місць займають методи визначення ДНК та РНК. Завдяки великому об'єму накопичених даних про геноми живих організмів та широкій сфері їх застосування, за останні 70 років була розроблена та вдосконалена ціла низка аналітичних методів, які дозволяють встановлювати наявність, концентрацію та послідовність азотистих основ полінуклеотидів у досліджуваних зразках [1-7]. Наразі більшість потреб молекулярної біології в галузі генетичних досліджень задовольняється із використанням наступних методик: кількісна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), секвенування, Саузерн- та Нозерн-блотинг і гібридизаційні ДНК-біосенсиори [8-58]. Серед усіх сучасних методів гібридизаційні ДНК-біосенсиори є найбільш перспективними для швидкої та економічної детекції олігонуклеотидних діагностичних маркерів різноманітних захворювань. Прикладом захворювання, яке на ранньому етапі діагностують лише за молекулярними маркерами, є хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ).

Патологічні зміни при ХМЛ виникають не одразу, а поступово протягом тривалого періоду часу. Причина такого патогенезу в тому, що при хронічній лейкемії онкогенна трансформація стовбурових клітин відбувається одночасно з виробленням відповідних зрілих лейкоцитів, які здатні виконувати функції імунного захисту. Внаслідок цього у перебігу захворювань цієї групи виділяють 3 фази: хронічну, під час якої в крові зростає кількість функціональних лейкоцитів, прискорену, яка характеризується стійкістю до терапії та появою нових мутацій, та бластну кризу – вихід недиференційованих клітин у кров та їх проліферація поза кістковим мозком [58-75]. Саме через це важливою є розробка

діагностичних методів ХМЛ, які дозволяють виявлення безсимптомної фази захворювання, спираючись лише на молекулярні маркери, наприклад, онкоген *BCR-ABL1*.

Початком розвитку ХМЛ вважається проходження у плюрипотентній гемопоетичній стовбуровій клітині реципрокної хромосомної транслокації $t(9;22)$ з утворенням філадельфійської хромосоми, яка несе гібридний ген *BCR-ABL1*. Це надає її потомству проліферативну перевагу над здоровими гемопоетичними клітинами, наслідком чого є проліферація онкотрансформованих клонів та заміна ними нормальних клітин крові. Таким чином, у пацієнта з ХМЛ кількість як диференційованих елементів крові, так і мієлобластних клітин у кістковому мозку поступово збільшується [76-85].

За поточними діагностичними протоколами, першим етапом клінічного аналізу на ХМЛ є підрахунок лейкоцитарної формули пацієнта. Якщо при цьому виявляється підвищена кількість гранулоцитів, далі може бути проведена біопсія кісткового мозку з наступним цитогенетичним дослідженням мієлобластних клітин. Сучасними молекулярно-біологічними методами таких досліджень є кількісна полімеразна ланцюгова реакція та біосенсиори на основі колориметрії, імпедіометрії, вольтамметрії та ППР. Найпоширенішими у медичній діагностиці є методи з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [86-94].

Попри наявності в ПЛР таких переваг, як низька межа детектування та значна гнучкість методики стосовно аналізованих ДНК-послідовностей, з нею пов'язана низка фундаментальних недоліків. Так, фундаментальним викликом у ПЛР-діагностиці ХМЛ є наявність багатьох альтернативних мутацій, які ведуть до розвитку цього захворювання. Для уникнення хибнонегативних результатів необхідне передбачення можливості детектування будь-якого з відповідних молекулярних маркерів, що в випадку ПЛР означає наявність у кожному одноразовому діагностичному наборі праймерів, які відповідають багатьом

варіантам гібридного гена *BCR-ABL1* [95-98]. Іншим викликом у розробці ПЛР-тестів на ХМЛ є забезпечення їхньої простоти та доступності. Сучасні системи для ПЛР-тестування на ХМЛ є або дорогавартісними автоматичними апаратами, такими як *Xpert BCR-ABL1 Monitor Assay* виробництва *Cepheid* (США), або дешевшими тестовими наборами, які вимагають від лабораторного працівника більшої технічної обізнаності та пов'язані з більшим ризиком контамінації зразків під час їх обробки. В обох випадках суттєвою складовою вартості ПЛР-аналізу є реагенти, які не використовуються повторно: праймери, ферменти та флуоресцентні мітки [99-101].

Багаторазове використання біомолекул можливе в біосенсорних методах діагностики ХМЛ, серед яких найбільш простими та придатними для масштабування є гібридизаційні ДНК-біосенсиори на основі спектроскопії поверхневого плазмонного резонансу [90-102]. Єдиним їх технічним недоліком, який стоїть на заваді їх впровадженню в клінічну діагностику ХМЛ, є зависока межа детектування. Способом покращення аналітичних характеристик ДНК-біосенсорів є модифікація олігонуклеотидів, які зв'язуються з їх поверхнею, наночастинками золота (НЧЗ). Цей формат вимірювання, відомий як сендвіч-аналіз, передбачає утворення хімічних зв'язків між лігандом зонда, цільовою молекулою та міченим лігандом [102-108], на жаль, при розробці біосенсорів для діагностики маркерів ХМЛ ще не застосовувався.

Таким чином, розробка НЧЗ-вмісної гібридизаційної біосенсорної системи на основі спектрометрії ППР із забезпеченням низької межі детектування та високої відтворюваності сендвіч-аналізу є актуальною науковою задачею, що має важливе практичне значення для медичної діагностики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт

відділу біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалась в рамках наступних проєктів:

- «Дослідження нових підходів інтеграції біологічного матеріалу з мікроелектронними датчиками в портативних системах персоніфікованої медицини» за конкурсом НФДУ «Передова наука в Україні 2026-2028» (№ держ. реєстрації 0126U003404, 2026-2028 рр.);
- Дослідження особливостей формування сучасних біоселективних елементів на основі наноматеріалів різної природи для електрохімічних біосенсорів та сенсорних масивів із заданими та керованими властивостями", за конкурсом НФДУ «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» (№ держ. реєстрації 0120U104529, 2020-2022 рр.);
- НДР в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» «Високопродуктивний спектрометр ППР з сенсорним чипом у форматі мікромасиву (мікроарею). Розробка приладу і програмного забезпечення. Розділ 1. Розробка приладу і програмного забезпечення». Номер держреєстрації 0120U105250 (2014 – 2018)
- НДР в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» «Високопродуктивний спектрометр ППР з сенсорним чипом у форматі мікромасиву (мікроарею). Розробка приладу і програмного забезпечення. Розділ 2. Дослідна експлуатація». Номер держреєстрації 0118U005170 (2018 – 2022)
- Відомча тематика 2.2.4.22 «Нові електрохімічні та оптичні біосенсиори на основі функціональних наноструктурованих матеріалів» (№ держ. реєстрації 0117U002879, 2018-2022 рр)

- Відомча тематика 2.2.4.22 «Складні мультифункціональні біосенсорні системи на основі ензимів, каскадів ензиматичних реакцій та біоміміків» (№ держ. реєстрації 0123U100964, 2023-2027 pp)
- Проект «Використання золотих наночастинок для покращення операційних характеристик ДНК-сенсорів на базі поверхневого плазмонного резонансу» в рамках Грантів НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки 2024-2025 pp. Номер держреєстрації 0124U002066
- грант № 951887 «BioNanoSens «Deeping collaboration on novel biomolecular electronics based on «smart» nanomaterials», профінансований Horizon 2020 (2020-2024 pp.);
- грант SFI-PD-Ukraine-00017453 від Simons Foundation на підтримку Інституту молекулярної біології і генетики (2024-2026 pp.).

Мета і завдання дослідження.

*Метою дисертаційної роботи є розробка та оптимізація високочутливої біосенсорної системи на основі посиленого наночастинками золота поверхневого плазмонного резонансу для сендвіч-аналізу концентрації олігонуклеотидної послідовності гена *BCR-ABL1*, як маркера хронічної мієлоїдної лейкемії.*

Відповідно до мети роботи було визначено наступні *завдання*:

1. Продемонструвати та довести можливість застосування наночастинок золота для біосенсорної детекції взаємодій між молекулами ДНК онкогена *BCR-ABL1*.
2. Довести можливість покращення аналітичних характеристик ППР-біосенсора для детекції маркера ХМЛ за рахунок використання наночастинок золота.
3. Запропонувати та оптимізувати процедуру сендвіч-аналізу та принцип функціонування біосенсорної системи на його основі.

4. Розробити методику синтезу НЧЗ та процедуру модифікації їх поверхні задля забезпечення їх біобезпечності, прецизійності розміру, біофункціональності та колоїдної стабільності.
5. Оцінити вплив параметрів досліджуваних розчинів на роботу розроблюваної системи та підібрати оптимальні умови її функціонування.
6. Вивчити відтворюваність роботи біосенсорної системи при визначенні олігонуклеотидної послідовності гена *BCR-ABL1*.
7. Дослідити аналітичні характеристики розробленої біосенсорної системи та підтвердити перспективність запропонованого діагностичного методу.

Об'єкт дослідження – гібридизаційна ДНК-біосенсорна система для детекції олігонуклеотидної маркерної послідовності онкогена *BCR-ABL1* та НЧЗ-вмісна біосенсорна сендвіч-система на їх основі.

Предмет дослідження – біохімічні та фізичні аспекти виготовлення та експлуатації високочутливої біосенсорної системи на основі посиленого наночастинками золота поверхневого плазмонного резонансу для аналізу ДНК-маркера хронічної мієлоїдної лейкемії, оптимальні умови зберігання колоїдного компонента біосенсорної сендвіч-системи, а саме: вивчення механізмів синтезу, біофункціоналізації та колоїдної стабілізації НЧЗ, іммобілізації олігонуклеотидів на чутливий елемент ППР, гібридизації іммобілізованих зондових олігонуклеотидів із олігонуклеотидами-мішенями з досліджуваного зразка.

Методи дослідження. У роботі використано наступні методи досліджень: спектрометрію ППР – як основний метод реєстрації аналітичного сигналу біосенсорів та біосенсорних систем при визначенні наявності та концентрації олігонуклеотидної послідовності онкогена *BCR-ABL1*; спектрофотометрію – для визначення концентрації біофункціоналізованих НЧЗ, які використовуються в якості колоїдного компонента розробленої сендвіч-системи; фотонну кореляційну спектроскопію – як метод визначення розміру та дисперсності

новосинтезованих НЧЗ; методи синтезу НЧЗ (цитратне відновлення за Туркевичем) – для формування наночастинок золота, призначених для подальшої біофункціоналізації та включення в розроблену сендвіч-систему; метод трансмісійної електронної мікроскопії – для аналізу стану агрегації різних зразків НЧЗ; методи статистичної обробки даних – для визначення достовірності та відтворюваності отриманих результатів і розрахунку аналітичних характеристик біосенсорів.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше розроблено математичну модель для розрахунку фізичних параметрів ППР-біосенсорних систем та оцінки їх придатності для детектування біомолекул різних лінійних розмірів. З допомогою цієї моделі доведено доцільність використання НЧЗ для розробки ППР-біосенсорної системи для детекції олігонуклеотидного маркера ХМЛ із покращеними аналітичними характеристиками.

Вперше досягнуто підвищення чутливості, селективності та межі детектування ППР-сенсорів для визначення олігонуклеотидного маркера ХМЛ при використанні біофункціоналізованих НЧЗ.

Розроблено новітню біосенсорну систему для детекції олігонуклеотидної послідовності онкогена *BCR-ABL1* (патент на винахід № 130005 та патент на корисну модель № 156960) на основі посиленої НЧЗ спектроскопії поверхневого плазмонного резонансу.

Розроблено нову спеціалізовану процедуру синтезу прецизійних біобезпечних наночастинок золота з низькою дисперсністю (патент на корисну модель № 163065 та подано патент на винахід).

Розроблено та оптимізовано нову процедуру модифікації НЧЗ ДНК-зондами, меркаптогексанолом та ліпоєвою кислотою задля забезпечення

колоїдної стабільності та біофункціональності НЧЗ у складі розробленої біосенсорної системи.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена біосенсорна система перевершує традиційні методи аналізу за межею детектування, простотою експлуатації, низькою собівартістю вимірювання та можливістю до мініатюризації та автоматизації процедури аналізу. Порівняно з існуючими біосенсорами для ДНК-маркерів ХМЛ, розроблена система є першою високочутливою НЧЗ-вмісною сендвіч-системою, що відкриває можливості для її адаптації до всіх фізичних перетворювачів біосенсорного сигналу, чутливих до наночастинок золота. Розроблений спосіб синтезу НЧЗ розрахований на практичне використання в умовах обмежених ресурсів та потреби в малих об'ємах прецизійних наносфер золота.

Розпочато метрологічну атестацію і впровадження розробленої системи: в ДП «Укрметртестстандарт» затверджено методику біофункціоналізації НЧЗ № МВ 030-36-2025 (Додаток Г). Матеріали дисертаційної роботи були використані в лекціях та практичних та лабораторних роботах кафедри трансляційної медичної біоінженерії Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут» (Додаток Б) та кафедри молекулярної біології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету (Додаток В).

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних досліджень, викладених у дисертації, отримано за безпосередньої участі автора. Здобувачем самостійно проведено планування та виконання основних експериментів, оптимізацію складу середовища іммобілізації й гібридизації ДНК та умов вимірювання, біофункціоналізацію НЧЗ, розробку та експлуатацію НЧЗ-вмісної біосенсорної системи для сендвіч-аналізу зразків на ДНК-маркер ХМЛ, статистичну обробку та інтерпретацію отриманих даних, підготовку публікацій

до друку. Математичне моделювання процесів повного внутрішнього відбиття та ППР проведено в Інституті фізики напівпровідників НАН України спільно з к.т.н. Дорожинським Г.В. та к.т.н. Самойловим А.В. Синтез НЧЗ та вимірювання параметрів новосинтезованих НЧЗ методом фотонної кореляційної спектроскопії проведено в Інституті фізики напівпровідників НАН України у співпраці з к.фіз-мат.н. Лопатинським А.М. та д.фіз-мат.н. Чегелем В.І. Спектрофотометричне визначення колоїдної стабільності НЧЗ в різних хімічних середовищах здійснено спільно з Голубєвим І.Ю. Дослідження агрегації НЧЗ методом трансмісійної електронної мікроскопії виконано в Інституті мікробіології та вірусології НАН України у співпраці з к.б.н. Харчуком М.С. Технічну підтримку щодо апаратного та програмного забезпечення надавали в Інституті фізики напівпровідників НАН України к.т.н. Ляпін О.М. та к.т.н. Христосенко Р.В. Визначення оптимальних параметрів іммобілізації зондової ДНК виконувалося спільно з к.б.н. Рачковим О.Е. Консультації щодо розробки біосенсорної системи проводились к.б.н. Мацишиним М.О., академіком НАН України, д.б.н., проф. Дзядевичем С.В. та академіком НАН України, д.б.н., проф. Солдаткіним О.П. Планування досліджень, обговорення та аналіз отриманих результатів проводились разом із науковим керівником, д.б.н., с.н.с О.О. Солдаткіним. Особистий внесок здобувача у спільних публікаціях зазначено в анотації до дисертації.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження були апробовані на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях:

- Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche Comté (м. Діжон, Франція, 24–25 листопада 2022 р.);
- Міжнародна конференція «Nanotechnology and Nanomaterials» НАНО-2023 (м. Львів, Україна, 16–19 серпня 2023 р.);
- XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, Україна, 21–22 травня 2024 р.);

– Міжнародна конференція «Nanotechnology and Nanomaterials» НАНО-2024 (м. Ужгород, Україна, 21–24 серпня 2024 р.);

– Міжнародна конференція «Biogenext» (м. Київ, Україна, 17–20 вересня 2024 р.);

– IV Міжнародна науково-практична конференція «Природничі науки та освіта: сучасний стан і перспективи розвитку» 7-8 листопада, 2024 р.;

– Конференція «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (м. Київ, Україна, 5–6 травня 2025 р.);

– XIX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, Україна, 20–21 травня 2025 р.);

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей у наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus (сумарний імпаکت-фактор становить 6,969), та 9 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, оформлено 3 патенти.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, результатів і обговорення, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації – 181 сторінка. Робота містить 45 рисунків і 5 таблиць. Список використаної літератури охоплює 149 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Аналітичні методи на основі гібридизації нуклеїнових кислот

В сучасній лабораторній діагностиці та в фундаментальних біологічних дослідженнях чи не найголовніше місце займають методи визначення ДНК та РНК. Завдяки великому об'єму накопичених даних про геноми живих організмів та широкій сфері їх застосування, за останні 70 років була розроблена та вдосконалена ціла низка аналітичних методів, які дозволяють встановлювати наявність, концентрацію та послідовність азотистих основ полінуклеотидів у досліджуваних зразках [1-7]. Наразі більшість потреб молекулярної біології в галузі генетичних досліджень задовольняється використанням наступних методів: кількісна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), секвенування, Саузерн- та Нозерн-блотинг і гібридизаційні ДНК-біосенсиори.

Порівняння аналітичних характеристик методів молекулярно-генетичної діагностики можна проводити з використанням таких понять, як чутливість, специфічність і межа детектування.

Чутливість – це відношення кількісного відгуку до концентрації молекули-мішені у досліджуваному зразку. Величина відгуку чутливіших методів більш суттєво залежить від приросту концентрації детектованих молекул-мішеней.

Специфічність – це співвідношення кількісного відгуку, отриманого при виявленні певної концентрацій молекули-мішені, до відгуку, отриманого при

відсутності молекул-мішеней у досліджуваному зразку. Значення специфічності може бути визначене для багатьох різних концентрацій молекули-мішені.

Межа детектування – це концентрація молекули-мішені, за якої відгук метода втричі перевищує шумовий сигнал. Вища межа детектування означає необхідність додаткових кроків у підготовці біологічних зразків до тестування, таких як концентрування зразка випаровуванням або ампліфікація ДНК за допомогою ПЛР.

1.1.1. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі. ПЛР у реальному часі є найпоширенішим з усіх відомих методів аналізу ДНК на даний момент. Її точність та гнучкість стали запорукою використання в численних сферах людської діяльності, зокрема в військовій справі [8], лабораторній діагностиці [5-7], сільському господарстві [9, 10], та при контролі якості продуктів харчування [2-4].

Принцип класичної ПЛР полягає в контрольованій реплікації ДНК. Для цього до очищеного зразка ДНК додаються наступні компоненти: термостабільна ДНК-полімераза, дезоксинуклеозидтрифосфати, буферний розчин, а також два типи праймерів, послідовності яких відповідають 5'-кінцям сенс- та антисенс-ланцюгів цільового полінуклеотида. Хід ПЛР регулюється за допомогою температурного контролю, завдяки якому напівконсервативно утворені подвійні спіралі ДНК денатурують та стають матрицями для побудови нових молекул. Відповідно, при кожному циклі ПЛР концентрація цільової послідовності ДНК у розчині зростає у геометричній прогресії. На практиці такий підхід дозволяє збільшувати (ампліфікувати) концентрацію ДНК з 16×10^{-15} моль/л до понад 10^{-6} моль/л [11]. За необхідності проведення ампліфікації молекули РНК, а не ДНК, до компонентів реакції додається зворотна транскриптаза. Такий варіант ПЛР має назву ПЛР із зворотною транскрипцією.

Існує велика кількість способів оцінити результат ампліфікації ПЛР, найпростіший з яких полягає в електрофорезі кінцевого розчину ДНК з візуалізацією результатів ампліфікації за допомогою флуоресцентного барвника, наприклад, бромистого етидію [12, 13]. Втім, на даний момент більшість аналітичних протоколів на основі ПЛР включають в себе забарвлення молекул ДНК безпосередньо під час ампліфікації (в реальному часі) [14-17].

Для якісної та кількісної оцінки складу зразка під час ПЛР застосовуються короткі ДНК-зонди з флуоресцентними мітками, що здатні випромінювати світло лише в складі дволанцюгової ДНК. Якщо послідовність такого зонда буде комплементарною до продукту ПЛР, то після кожного циклу ампліфікації може бути проведена флуориметрична оцінка зразка, результатами якої є дані про наявність та поточну концентрацію цільової молекули ДНК. Сигнал флуориметра в такому випадку зростатиме в часі, доки не вичерпається запас дезоксинуклеотидтрифосфатів, необхідних для синтезу нових ДНК-ланцюгів [18].

Кількісна ПЛР є процесом реплікації молекули ДНК, кожен крок якого контролюється з визначенням концентрації олігонуклеотида, який реплікується, за допомогою флуоресцентних міток і може проводитися в режимі реального часу. Метод ПЛР характеризується високою пропускнуою здатністю та винятково низькою межею детектування: деякі її різновиди здатні забезпечувати детекцію ДНК-мішені за наявності менш ніж 10 таких молекул на мікролітр [11], що відповідає 16,6 фемтомоль на літр. Аналітичні характеристики кількісної ПЛР дозволяють дослідникам говорити про перспективи клінічного впровадження рідинних біопсій для неінвазивного забору біологічного матеріалу та його аналізу на наявність ДНК-маркерів у лейкоцитах, екзосомах або у вільному циркулюючому вигляді [19, 20].

За всіх описаних переваг кількісної ПЛР, її недоліком є потреба у наявності кваліфікованого оператора, адже велика кількість складових, які мають бути додані до досліджуваного зразка перед початком полімеразної реакції, означає значний ризик помилки оператора або випадкової контамінації зразка. У випадку такого форс-мажору часто втрачається не лише досліджуваний зразок, а й дороговартісні реагенти для ПЛР. Окремим недоліком кількісної ПЛР є необхідність використання прецизійних ПЛР-ампліфікаторів із флуориметричними аналізаторами.

1.1.2. Секвенування. Сучасною аналітичною технікою, що тісно пов'язана з ПЛР, є секвенування ДНК. Секвенування – це процес встановлення послідовності мономерів у полімері ДНК, РНК або білка. Найперша подібна процедура була проведена Фредериком Сенгером на молекулі інсуліну в 1955 році, що стало поштовхом до формування центральної догми молекулярної біології та до подальшого вивчення структури та функцій ДНК [21, 22].

Суть підходу Сенгера до секвенування білків полягала в розділенні великих досліджуваних молекул на бібліотеки – коротші пептиди – таким чином, щоб кожен білок був гідролізований за одними й тими ж пептидними зв'язками. Далі бібліотеки гідролізували з утворенням коротких амінокислотних послідовностей, що перекривалися між собою. Такі послідовності фракціонувалися шляхом електрофорезу, який на той момент був новітнім методом для дискримінації великих молекул за їх масою. Після цього кожна з послідовностей проходила повний гідроліз та хроматографічне розділення амінокислот, утворених в результаті такого гідролізу. Висновок про склад і порядок амінокислот у бібліотеці робився на основі співставлення амінокислотних складів кожної з коротких послідовностей та визначення діапазонів перекриття між ними [23].

Даний підхід може застосовуватися для секвенування будь-яких лінійних полімерів, в тому числі ДНК та РНК.

В процесі підготовки генетичного матеріалу до секвенування ключове місце посідає процедура рестрикції – розбиття оригінальних полінуклеотидів (хромосом, плазмід тощо) на коротші молекули, що підлягатимуть подальшому аналізу. Цей біохімічний процес проводиться з застосуванням рестриктаз – ензимів, що каталізують реакцію розриву фосфодіестерного зв'язку. Рестриктази класифікують за сайтами рестрикції, тобто такими послідовностями ДНК та епігенетичними модифікаціями, що активують цей ензим. Наприклад, ендонуклеаза EcoRI проводить розрізання ДНК по фрагменту GAATTC, тоді як рестриктаза TaqI розпізнає послідовності TCGA. Висока специфічність ендонуклеаз рестрикції стала запорукою прогресу біотехнології, особливо в галузі розшифрування значних обсягів генетичної інформації [24, 25].

Так, у 1977 році за авторством Сенгера вийшла стаття з описом методу секвенування коротких полінуклеотидів, що використовується й донині [21, 26, 27]. Порядок дій в сучасному варіанті секвенування за Сенгером відповідає одному циклу ПЛР, під час якого відбувається приєднання праймерів до секвенованої ДНК, подовження ланцюга ДНК-полімеразою та денатурація утворених подвійних спіралей. Відповідно, для його реалізації необхідні ті ж складники, що й для ПЛР, а також *дидезоксинуклеозидтрифосфати* (дАТФ, дТТФ, дГТФ і дЦТФ), кожен різновид яких мічений специфічною флуоресцентною міткою.

Особливість дидезоксирибози, як вуглеводної складової нуклеотида порівняно з дезоксирибозою полягає в бракуванні в неї одного атому кисню, зв'язаного з 3'-атомом вуглецю, а отже, в неможливості утворення ефірного зв'язку між нею та фосфатною групою наступного нуклеотида. Приєднання такого нуклеотида ДНК-полімеразою під час синтезу ланцюга ДНК призводить

до термінації цього процесу. При співвідношенні концентрацій дидезоксинуклеозидтрифосфатів та дезоксинуклеозидтрифосфатів у реакційній суміші, що рівне 0,01, результатом роботи ДНК-полімерази буде розчин молекул ДНК довжиною від 1 до 300 нуклеотидів. Їх розділення за довжиною досягається шляхом електрофорезу, а визначення їх послідовності – за кольором їх флуоресцентної мітки [21].

Перевагами секвенування за Сенгером, що забезпечили його актуальність по сьогоднішній день, є простота та виняткова точність. Імовірність помилки при визначенні певної азотистої основи за цим методом складає до 0,1% [28]. Основним недоліком такого секвенування є низька пропускну здатність: оскільки за один цикл секвенування (20-180 хвилин) може бути проаналізована лише одна послідовність довжиною до 1 кб. Аналіз довших послідовностей ДНК за методом Сенгера може бути значно тривалішим та дорожчим порівняно з іншими методами секвенування [29].

Сучасні дослідження в галузі секвенування ДНК направлені в першу чергу на збільшення кількості полінуклеотидів, що можуть бути одночасно секвеновані. Такі методики відомі за збірною назвою секвенування наступного покоління [30, 31]. Типовим представником цього класу аналітичних методів є йонне напівпровідникове секвенування, що наразі використовується як у дослідницьких, так і в клінічних лабораторіях для аналізу послідовностей ДНК довжиною до 48 мільярдів азотистих основ [32-34].

Суть даного методу наступна: аналізовані молекули (бібліотеки) ДНК проходять рестрикцію для утворення набору полінуклеотидів-матриць довжиною до 600 азотистих основ. Далі ці матриці ампліфікують шляхом емульсійної ПЛР для утворення наночастинок, на поверхні кожної з яких знаходиться лише один тип послідовності ДНК. Такі наночастинок вносяться на поверхню чипа, який містить до 80 мільйонів нанорозмірних комірок, чутливих

до зміни рН. Отримання даних про послідовність полінуклеотидів з кожної наночастинки відбувається шляхом почергового введення всередину чипа розчинів різних дезоксинуклеозидтрифосфатів у присутності ДНК-полімерази та реєстрації йонів водню, наявність яких свідчить про успішне приєднання нового нуклеотида. Після секвенування ДНК у всіх комірках чипа (що може займати до 2 годин) мільйони отриманих послідовностей співставляються програмними методами для винесення висновку про порядок азотистих основ у початковій молекулі-бібліотеці [28, 32-35].

Універсальність методик секвенування часто відображається в їхній складності й дороговизні. У випадках, коли необхідно оцінити наявність лише однієї маркерної послідовності ДНК, найчастіше використовуються методи з застосуванням ДНК-зондів, комплементарних до таких маркерів та мічених радіоактивною, флуоресцентною чи хромогенною міткою, наприклад, Саузерн-блотинг [36, 37].

1.1.3. Саузерн-блотинг. Саузерн-блотинг полягає в розділенні рестрикованих полінуклеотидів шляхом електрофорезу з їх подальшою гібридизацією з міченими ДНК-зондами. Завдяки цьому досягається не лише детекція послідовностей, комплементарних до таких ДНК-зондів, а й визначення на електрофореграмі фракції аналізованих молекул, що містять такі послідовності. Ця перевага саузерн-блотингу перед кількісною ПЛР дозволяє використання цього методу як підготовчого етапу перед секвенуванням (для контролю розміру бібліотеки), в аналізі геномної ДНК (для визначення кількості копій певного гена в геномі) та при детекції епігенетичних змін (наприклад, за використання рестриктаз, чутливих до сайтів метилювання) [36,38].

Послідовність дій при виконанні Саузерн-блотингу наступна: ізольована ДНК обробляється однією або декількома рестриктазами для розрізання кожного

з початкових полінуклеотидних ланцюгів за одними й тими ж сайтами. Після цього отримані ДНК-фрагменти проходять гелевий електрофорез, мета якого – розділити ці молекули за масою. В результаті однакові фрагменти концентруються в певних ділянках гелю, що дозволяє ізолювати значну кількість молекул рестрикованої ДНК з послідовністю, що представляє інтерес для подальшого дослідження, і суть Саузерн-блотингу полягає в диференціації даних фракцій ДНК за наявністю чи відсутністю певної маркерної послідовності [36,39].

Для проявлення результатів Саузерн-блотингу ключовим етапом є перенесення ДНК з електрофорезного гелю на нітроцелюлозну або нейлонову мембрану. Такий вибір складу мембрани продиктований її вищим коефіцієнтом зв'язування з нуклеїновими кислотами, аніж в агарозному або акриламідному гелі, що сприяє ефективному переносу ДНК на неї при контакті з електрофорезним гелем. Використання нітроцелюлозної мембрани передбачає попередню денатурацію ДНК всередині гелю шляхом підвищення рН, після чого одинарні ланцюги дисоціюють від гелю внаслідок застосування буферного розчину з високою йонною силою, наприклад, 20×SSC [39].

Отримання даних про послідовність ДНК за цим методом відбувається шляхом нанесення зондового олігонуклеотида з флуоресцентною, радіоактивною або хромогенною міткою на блоти на поверхні мембрани з нітроцелюлози або нейлону. Після відмивання надлишкових мічених молекул відбувається проявлення тих блотів, з якими ДНК-зонд встановив комплементарні зв'язки. Дані про аналізовану ДНК, отримані таким чином, використовуються під час наступних її електрофорезів, оскільки за використання однакових рестриктаз, хімічного середовища та фізичних параметрів електрофорезу розподіл фракцій цієї ДНК на ньому буде завжди однаковим [36-39].

Серед усіх сучасних методів детекції ДНК Саузерн-блотинг є найменш вимогливим до дослідницького обладнання. Втім, його недоліком є висока межа детектування. За даними ThermoFisher, найменша маса ДНК, яку може детектувати саузерн-блотинг, складає 60 пікограм [40]. Для стандартного олігонуклеотида виробництва Metabion довжиною 24 нуклеотиди [41] ця маса відповідає кількості речовини від 7,5 фемтомоль (полі-А, молекулярна маса – 7896 г/моль) до 8,7 фемтомоль (полі-Ц, молекулярна маса – 6936 г/моль). Враховуючи, що ПЛР дозволяє детекцію ДНК у концентрації від 16,6 фемтомоль на літр [11], детекція ДНК в тій же концентрації за допомогою Саузерн-блотингу можлива, якщо об'єм досліджуваного зразка складає як мінімум 0,45 л.

Природно, що отримання більшого обсягу біоптату в пацієнта може бути пов'язаним із більшими ризиками для його здоров'я. Це обмежує промислове застосування Саузерн-блотингу галузями, де можливо забезпечити великий об'єм досліджуваного субстрату (сільське господарство, харчова промисловість).

1.1.4. Гібридизаційні ДНК-біосенсиори. З огляду на недоліки поточних методів детекції ДНК, постає питання пошуку альтернативних технологій, що характеризувалися б низькою вартістю устаткування й обслуговування, не потребували б тривалого навчання персоналу та дозволяли б швидку детекцію певних ДНК-мішеней. Саме такими якостями можна охарактеризувати гібридизаційні ДНК-біосенсиори.

Біосенсор – це компактний та багаторазовий аналітичний прилад, що генерує сигнал на основі біохімічних реакцій. Вважається, що такі прилади мають дві складові: біологічну (біоселективний чутливий елемент) та фізичну (фізичний перетворювач), за типом кожної з яких прийнято класифікувати конкретні біосенсиори [42-45]. Наприклад, біосенсор для визначення концентрації аспартатамінотрансферази шляхом розщеплення цим ферментом молекул

аспартату, що супроводжується зміною сили струму, яка реєструється амперометрично, є ферментним амперометричним біосенсором [46].

В порівнянні з традиційними аналітичними методами біосенсиори за визначенням мають низку переваг, низька вартість пристрою, багаторазовість, портативність, а також придатність їх до автоматизації, що дозволяє суттєво зменшити навантаження на оператора. Гібридизаційні ДНК-біосенсиори є типом біосенсиорів, чий відгук залежить від того, чи відбулась гібридизація між молекулами ДНК з досліджуваного зразка (мішенями) та молекулами ДНК зі складу біоселективного елемента біосенсора (зондами) заздалегідь іммобілізовані на фізичний перетворювач. Такі афінні взаємодії можуть відслідковуватися за допомогою кількох типів фізичних перетворювачів. Вже згаданий ферментативний спосіб детекції біомолекул може бути реалізований з використанням специфічних ДНК-рестриктаз. Втім, набагато більш простими є методи, що спираються на пряме відслідковування зміни фізичних параметрів шару ДНК-зондів при приєднанні до нього ДНК-мішеней з досліджуваного розчину [43, 47-50].

Такими параметрами є маса біоселективного елемента, яка може відслідковуватись акустичними та мікромеханічними методами [51, 52] дипольний момент шару рідини, що межує з чутливим елементом (імпедіометричні методи) [50], товщина біоселективного елемента (інтерферометричні методи) [53], його оптична густина (спектрофотометричні методи) [54] та показник заломлення (рефрактометричні методи) [49, 55].

Серед параметрів чутливого елемента ДНК-біосенсора товщина біологічного шару та оптична густина виділяються як такі, що зазнають найменших змін при гібридизації; отже, їх відслідковування є найменш придатним для детекції олігонуклеотидних мішеней. Серед решти параметрів з фізичної точки зору найбільш простим та найменш інвазивним є

відслідковування зміни показника заломлення біоселективного елемента біосенсора. Наразі найпоширеніший тип рефрактометричних біосенсорів заснований на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [56].

До переваг використання ППР-біосенсорів над вищеперерахованими методами належать: низька вартість виготовлення та обслуговування ППР-спектрометра, простота використання системи, низька тривалість аналізу; висока чутливість і специфічність вимірювання та можливість аналізу без використання молекулярних міток та ензимів у режимі реального часу. Недоліком даного методу є зависока межа детектування, що часто стоїть на заваді використанню спектрометрії ППР для аналізування біологічних зразків [49,57].

Поверхневий плазмонний резонанс спостерігається у тонких шарах металів (до 100 нм) і полягає в збудженні коливань вільних електронів металу під дією променя світла з певною довжиною хвилі, яке падає під певним кутом до поверхні металу. Енергія світла при цьому перетворюється в енергію коливань поверхневого плазмону – електромагнітної хвилі, яка поширюється вздовж шару металу й проникає вглиб середовища, яке межує з шаром металу, на 200-300 нм (рис. 1.1) [58]. Кут, при якому плазмоном поглинається вся енергія світла, має назву резонансного кута. Резонансний кут ППР може змінюватись у залежності від показника заломлення речовини, яка межує з металом, який залежить від наявності адсорбованої на поверхні металу речовини. Дослідження показують, що збільшення резонансного кута на 0,12 кутового градуса відповідає зміні поверхневої густини адсорбованої речовини (молекул олігонуклеотидів) на 100 нг/см² [59,60]. Спектрометрія ППР полягає у визначенні резонансного кута шляхом вимірювання інтенсивності світла, відбитого від плівки металу під різними кутами.

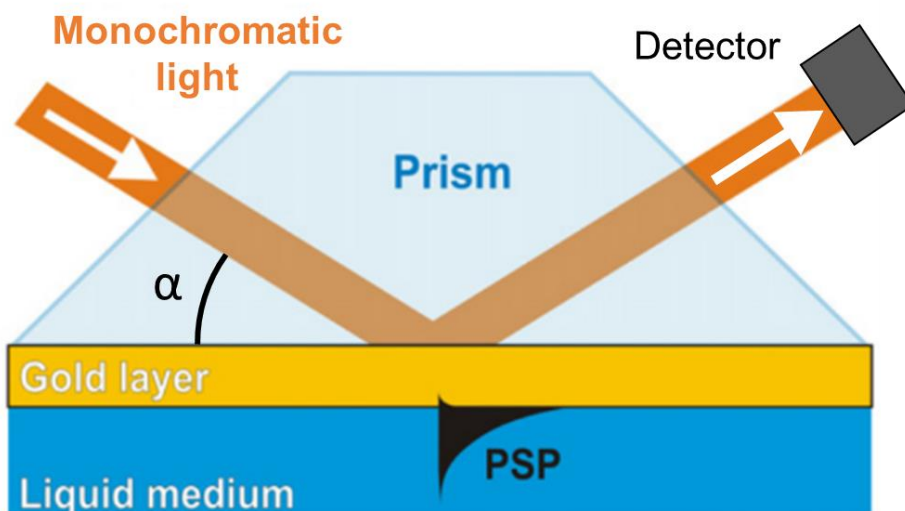


Рис. 1.1. Будова ППР-сенсора на основі плівки золота. α – кут падіння світла на поверхню золота, PSP – поверхневий плазмон [58]

У гібридизаційних ППР-біосенсорах у якості сенсорної поверхні фізичного перетворювача використовується скляна пластина з тонким золотим напиленням, яке виступає субстратом для ковалентного зв'язування олігонуклеотидів-зондів. При біосенсорному вимірюванні поверхня відповідної пластини контактує з розчином з цільовими олігонуклеотидами, який є предметом аналізу. Визначаючи інтенсивність світла, відбитого від сенсорної пластини під різними кутами та вимірюючи зміну резонансного кута до та після введення зразка, можна робити висновок про те, чи відбулася сорбція олігонуклеотидів, тобто чи гібридизувалися між собою олігонуклеотиди-зонди та олігонуклеотиди-мішені з аналізованого розчину [59, 60].

Імобілізація ДНК-зондів полягає в модифікації поверхні золота тіольованими олігонуклеотидами з утворенням біоселективного елемента – моношару ДНК-зондів. Фізико-хімічні умови імобілізації мають значний вплив на ефективність подальшої гібридизації: можливість проходження гібридизації між вільним та зв'язаним олігонуклеотидом залежить від того, чи відстань між іммобілізованими зондами достатньо велика, щоб запобігти електростатичним та

стеричним перешкодам для їхнього наближення. Через наявність негативного заряду вздовж цукрово-фосфатних кістяків ДНК такі перешкоди нівелюються лише при щільності зондів, нижчої ніж 10^{12} молекул на см^2 . Літературні дані вказують на можливість утворення моношарів ДНК з поверхневими концентраціями вище 10^{13} молекул на см^2 ; отже, аналітичні характеристики ППР-біосенсорів можуть знижуватися при надлишку зондів. Загалом ефективність гібридизації залежить від декількох факторів, у тому числі від йонної сили середовища гібридизації та від довжини зондового олігонуклеотида [58].

Такий стан молекулярної системи, в якому через велику кількість зв'язаних із сенсорним чіпом олігонуклеотидів гібридизація мішеней із іммобілізованими зондами більше не є енергетично вигідною, має назву насичення моношару одноланцюгової ДНК. Відсоткова кількість зондів, які можуть гібридизуватися з олігонуклеотидами-мішенями перед насиченням поверхні біосенсора, визначається як ефективність гібридизації. Оскільки сигнал ППР-біосенсора є пропорційним кількості гібридизованих олігонуклеотидів, ефективність гібридизації може бути обчислена як відношення максимального сигналу ППР, викликаного гібридизацією мішеней із зондами, до сигналу, викликаного іммобілізацією ДНК-зондів при модифікації сенсорної поверхні [60].

Склад та концентрація буфера, що виступає середовищем іммобілізації, мають найбільше значення для ефективності гібридизації та інших аналітичних характеристик біосенсора. Підбір концентрації H^+ та інших одновалентних катіонів дозволяє знизити електростатичне відштовхування ланцюгів ДНК настільки, наскільки необхідно для покращення аналітичних характеристик отриманого ДНК-біосенсора. Основним буфером, для гібридизації ДНК є цитратно-сольовий розчин (SSC), а для іммобілізації ДНК на сенсорну поверхню ППР прийнято використовувати розчин KH_2PO_4 [49,58].

Правильний підбір умов виготовлення біоселективного елемента дозволяє спростити процес подальшої експлуатації ППР-біосенсора до послідовних етапів введення у вимірювальну комірку досліджуваного зразка, промивочного буфера та розчину для регенерації біоселективного елемента (відокремлення ДНК-мішеней від зондів) з можливістю автоматизації цього процесу. Крім того, тривалість аналізу, яку забезпечують сучасні ППР-біосенсиори, вимірюється хвилинами з моменту введення досліджуваного зразка [49,57]. В сукупності наведені фактори роблять технологію спектрометрії ППР привабливою для швидкої детекції олігонуклеотидних діагностичних маркерів різноманітних захворювань. Прикладом захворювання, яке на ранньому етапі діагностують лише за молекулярними маркерами, є хронічна мієлоїдна лейкемія.

1.2. Хронічна мієлоїдна лейкемія

Лейкемії— це онкологічні захворювання, які вражають кістковий мозок і призводять до підвищення рівня лейкоцитів у крові. За класифікацією ВООЗ 2016 року, лейкемії розрізняють за двома основними ознаками: за характером перебігу (гострий або хронічний) та за типом уражених клітин (мієлоїдний або лімфоїдний). Таким чином, чотири основні їх типи – це гостра мієлоїдна лейкемія (ГМЛ), хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), гостра лімфоїдна лейкемія (ГЛЛ) і хронічна лімфоїдна лейкемія (ХЛЛ). У межах цих великих груп лейкемії розрізняють за молекулярними механізмами, характерними для кожного підтипу

захворювання. Розвиток цитогенетичних та молекулярно-генетичних методів зумовлює постійне розширення та доповнення класифікації лейкемій [61, 62].

Гострі лейкемії викликаються змінами в геномі та епігеномі мієлоїдних чи лімфоїдних клітин, що зумовлює раптове та неконтрольоване підвищення швидкості їх проліферації. Такі зміни включають хромосомні транслокації та відповідні гібридні білки *BCR-ABL1* (t(9;22)(q34.1;q11.2)) та *ETV6-RUNX1* (t(12;21)(p13.2;q22.1)), які регулюють клітинний цикл при ГЛЛ, і *PML-RARA* (t(15;17)(q24;q21)) з *PCM1-JAK2* (t(8;9)(p22;p24.1)), які підтримують плюрипотентність мієлобластів за ГМЛ [63-66]. Точкові мутації теж відіграють суттєву роль у канцерогенезі: наслідком однієї амінокислотної заміни в активному сайті ізоцитратдегідрогенази IDH1 або IDH2 є гіперметилування ДНК в ядрі – одна з основних причин розвитку ГМЛ [67].

Основною гістологічною ознакою ГМЛ та ГЛЛ є висока частка недиференційованих клітин у тканині кісткового мозку. У нормі цей показник становить до 5%, тоді як при гострій лейкемії клітини-попередники становлять понад 20% від загальної кількості клітин в органі. Їх неконтрольована проліферація призводить до зменшення кількості здорових клітин та об'єму міжклітинної речовини; результатом цього є викид у кров мієло- або лімфобластів [61, 68, 69]. З цим пов'язується поява таких симптомів, як виснаження, зниження імунітету, збільшення селезінки, часті кровотечі та синці [70].

Важливими цитологічними та гістологічними критеріями в діагностиці гострої лейкемії є клінічні аналізи крові та біопсія кісткового мозку. На підставі цих аналізів найчастіше приймаються рішення про проведення подальших цитогенетичних та молекулярно-біологічних досліджень для точного визначення підтипу захворювання. В окремих випадках ГМЛ може бути діагностована цитологічними методами шляхом виявлення тілець Ауера в мієлобластних

клітинах. Ці паличкоподібні азурофільні кристалічні утворення виникають внаслідок злиття лізосом; механізми їх утворення до кінця не вивчені, але виникають вони лише при мієлопроліферативних розладах [71, 72].

У випадку ХМЛ та ХЛЛ патологічні зміни виникають не одразу, а поступово протягом тривалого періоду часу. Причина такого патогенезу в тому, що при хронічній лейкемії онкогенна трансформація стовбурових клітин відбувається одночасно з виробленням відповідних зрілих лейкоцитів, які здатні виконувати функції імунного захисту. Внаслідок цього у перебігу захворювань цієї групи виділяють 3 фази: хронічну, під час якої в крові зростає кількість функціональних лейкоцитів, прискорену, яка характеризується стійкістю до терапії та появою нових мутацій, та бластну кризу – вихід недиференційованих клітин у кров та їх проліферація поза кістковим мозком [61, 73].

Своєчасна діагностика хронічних лейкемій складна в першу чергу тим, що їх хронічна та прискорена фази здебільшого пов'язані з легкими симптомами, такими як втомлюваність, біль у суглобах та кістках, втрата апетиту та збільшення черевної порожнини, спричинене спленомегалією. Діагностика ХМЛ та ХЛЛ в хронічній фазі найчастіше відбувається шляхом виявлення відхилень лейкоцитарної формули пацієнта та при подальших дослідженнях молекулярних маркерів лейкоцитів [73, 74].

Фундаментальним проривом у вивченні причин виникнення лейкемій стало відкриття філадельфійської хромосоми, виявленої у пацієнтів з ХМЛ у 1960 році. Філадельфійська хромосома стала першим з охарактеризованих цитогенетичних маркерів злоякісного захворювання. Її вивчення призвело до більш детального розуміння патогенезу ХМЛ [75]. Філадельфійська хромосома кодує онкоген BCR-ABL, продуктом якого є гібридний онкобілок, який викликає злоякісну трансформацію клітин та є молекулярним маркером розвитку ХМЛ.

1.2.1. Значення гібридного гена *BCR-ABL1* у розвитку ХМЛ. Причиною утворення філадельфійської хромосоми є реципрокна транслокація між 9 та 22 хромосомами $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (рис.1.2) [76].

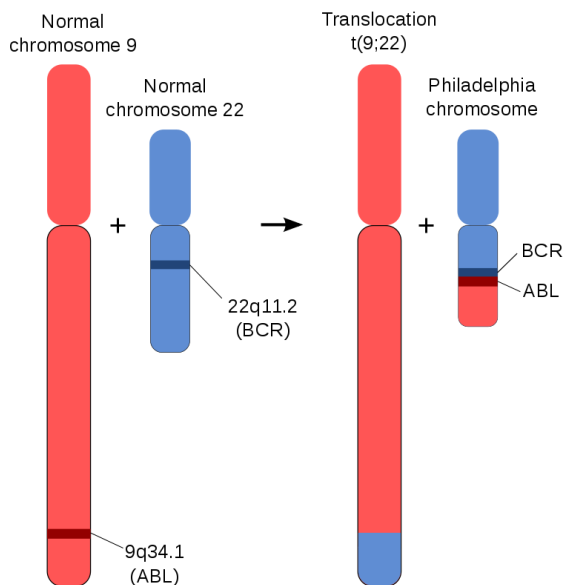


Рис.1.2. Будова філадельфійської хромосоми [76]

Першим ідентифікованим партнером транслокації був онкоген *ABL1*, зазвичай розташований у складі 9-ї хромосоми [77], а згодом було картовано і ген *BCR* на 22-й хромосомі [78]. У 1990 році було встановлено, що трансформуючий потенціал онкобілка *BCR-ABL1* пов'язаний з порушенням регуляції тирозинкінази *ABL*, яке ускладнює її деактивацію [64]. Того ж року були отримані модельні тварини: *BCR-ABL1*-позитивні гемопоетичні клітини були введені мишам, що викликало мієлопроліферативний розлад, подібний за симптомами до ХМЛ людини [79]. Дослідження процесів розвитку *BCR-ABL1*-позитивних лейкемій дозволило синтез специфічного інгібітора тирозинкінази до 1990 року та його впровадження в клінічну практику з 2001 року.

На сьогодні основні препарати, що використовуються при ХМЛ, є похідними феніламінопіримідину: іматиніб, нілотиніб, дазатиніб тощо. Завдяки

їх клінічному застосуванню, у 2017 році тривалість життя пацієнтів після виявлення ХМЛ становила понад 5 років у 90% випадків, в той час як до 2000 року тривалість життя після встановлення діагнозу в середньому становила від 3 до 5 років [80, 81]. Через те, що терапія інгібіторами тирозинкінази найефективніша під час хронічної фази ХМЛ, рання діагностика є критично важливою для успіху терапії цього захворювання. Тому особлива увага вчених приділяється розробці методів діагностики ХМЛ та вивченню молекулярних механізмів виникнення ХМЛ [82].

Іонізуюче випромінювання вважається фактором ризику розвитку ХМЛ [79,83]. Поява гібридного гена *BCR-ABL1* спостерігалася при γ -опроміненні культур мієлоїдних клітин людини *in vitro* [84]. У досліджах, де лімфоцити людини опромінювали нейтронами, частота транслокації хромосом 9 та 22 була в 11 разів вищою, ніж передбачалося теоретично [85]. Крім того, була спостережена колокалізація 9 та 22 хромосом у центральній частині ядра клітини під час переходу від фази S до фази G2 клітинного циклу. Це вказує на можливість виникнення транслокації, коли хромосоми 9 та 22 зближуються одна з одною у цей момент клітинного циклу.

1.2.2. Будова гена *BCR-ABL1*. Ген *ABL1* завжди розривається в одній ділянці – 5' сайті довжиною 300 кб (рис.1.3). Найчастіше розрив локалізується між екзонами b1 та a1, та трапляються випадки розриву в ділянці перед екзоном b1 або після екзону a1. Таким чином, гібридний ген *BCR-ABL1* може мати в своєму складі обидва екзони b1 та a1, лише екзон a1 або жоден з них [86].

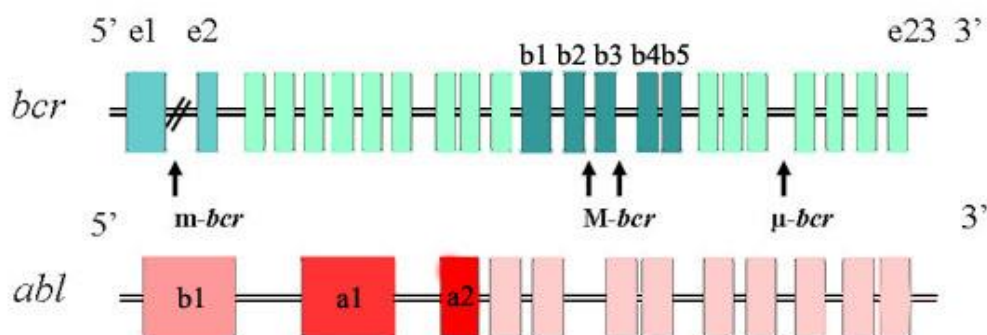


Рис.1.3. Сайти розриву генів BCR і ABL1: e1-e23 – екзони гена BCR, b1-b5 – екзони області M-BCR, b1, a1 – екзони гена ABL1 [86]

Ген BCR натомість має три окремі ділянки виникнення розривів (рис. 1.3). У 95% випадків ХМЛ та у 25–30% випадків ГЛЛ розрив гена BCR знаходиться у ділянці розміром 5,8 кб, яка має назву M-BCR [87]. Ця ділянка містить п'ять екзонів, які можна класифікувати як b1–b5 або як екзони 12–16 (e12–e16) від початку гена. Більшість розривів локалізуються в інтроні після екзона 13 (b2) або 14 (b3). Таким чином, найчастіше виникають гібридні гени з перебудовою e13a2 (b2a2) або e14a2 (b3a2). У 20% пацієнтів були виявлені обидві форми через альтернативний сплайсинг екзона 14 [84, 86, 88]. В обох випадках результуюча мРНК має довжину 8,5 кб та кодує білкову послідовність із масою 210 кДа.

У деяких випадках ХМЛ та ГМЛ розриви в гені BCR відбуваються зі сторони 5'-кінця M-BCR в ділянці, яка називається m-BCR та має вигляд інтрона довжиною 54,4 кб (рис. 1.3). Відповідна гібридна мРНК довжиною 7 кб кодує білкову послідовність масою 190 кДа.

Третя ідентифікована область точки розриву розташована з 3'-кінця M-BCR між екзонами e19 та e20 і має назву μ -BCR. Гібридний ген, утворений у результаті відповідних транслокацій, має злиття e19a2, а його транскрипція веде до синтезу білка масою 230 кДа [86].

1.2.3. Діагностика хронічної мієлоїдної лейкемії. Діагностичні методи, які використовуються в клінічній практиці для визначення лейкемій, включають використання цитологічних критеріїв, доповнених цитохімічними дослідженнями. З'ясування ж природи конкретного лейкемічного клону відбувається шляхами імунофенотипування та цитогенетичного аналізу. Імунофлуоресцентні та імуноферментні аналізи з використанням моноклональних антитіл дозволяють точніше ідентифікувати рідкісні форми та варіанти лейкемій, а отже, застосовувати відповідні протоколи лікування [88].

За поточними діагностичними протоколами, першим етапом клінічного аналізу на ХМЛ є підрахунок лейкоцитарної формули пацієнта. Якщо при цьому виявляється підвищена кількість гранулоцитів, далі може бути проведена біопсія кісткового мозку з наступним цитогенетичним дослідженням мієлобластних клітин. Сучасними молекулярно-біологічними методами таких досліджень є кількісна полімеразна ланцюгова реакція [89] та біосенсиори на основі колориметрії [90], імпедіометрії [91], вольтамперметрії [92, 93] та ППР [49, 94]. Найпоширенішими у медичній діагностиці є методи з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Детекція олігонуклеотидних маркерів *BCR-ABL1* за допомогою кількісної ПЛР успішно використовується для оцінки ефективності терапії, моніторингу мінімальної залишкової хвороби та виявлення рецидивів ХМЛ [89,95-97]. Як було наведено в розділі 1.1.1, межа детектування кількісної ПЛР складає порядка 16,6 фМ, що дозволяє використання цього методу для рідинної біопсії, яка не

вимагає операційного втручання. Фундаментальним викликом у ПЛР-діагностиці ХМЛ є наявність багатьох альтернативних мутацій, які ведуть до розвитку цього захворювання (див. розділ 1.2.2). Для уникнення хибнонегативних результатів необхідне передбачення можливості детектування будь-якого з відповідних молекулярних маркерів, що в випадку ПЛР означає наявність у кожному одноразовому діагностичному наборі праймерів, які відповідають багатьом варіантам гібридного гена *BCR-ABL1*. З прогресом досліджень цього гена кількість відомих його варіантів постійно збільшується [89, 98].

Іншим викликом у розробці ПЛР-тестів на ХМЛ є забезпечення їхньої простоти та доступності. Прикладом простої у використанні ПЛР-системи діагностики ХМЛ є *Xpert BCR-ABL1 Monitor Assay* виробництва *Cepheid* (США). Система використовує мікрофлюїдику для безпосередньої обробки зразків периферичної крові в картриджі для екстракції РНК, кількісної ПЛР та детекції флуоресценції в автономному приладі «все в одному». Втім, оглядачі зазначають значну вартість такого приладу, яка обмежує його практичне використання [89, 99, 100]. Більш доступним рішенням є ручне виділення олігонуклеотидів зі зразка тканини та подальший їх аналіз за допомогою тестового набору, наприклад, *QXDx BCR-ABL %IS Kit* виробництва *Bio-Rad* (США). Такий підхід вимагає більшої технічної обізнаності лабораторного працівника та пов'язаний із більшим ризиком контамінації зразків під час їх обробки [101]. В обох випадках суттєвою складовою вартості ПЛР-аналізу є реагенти, які не використовуються повторно: праймери, ензими та флуоресцентні мітки.

Багаторазове використання біомолекул можливе в біосенсорних методах діагностики ХМЛ. Наприклад, колориметричний біосенсор, розроблений Peng та ін., працює шляхом приєднання до пари зонд-мішень дендримера з каталітичними властивостями, внаслідок чого реєструється зміна кольору

середовища з безбарвного на синій [90]. Даний підхід забезпечує межу детектування порядку 19 фМ, але вимагає проведення складної процедури виготовлення дендримера, який, на відміну від зонда, після аналізу неможливо використати повторно.

Не менш суттєві результати були досягнуті Avelino та ін. з використанням методу електроімпедансної спектроскопії (EIS). У 2016 році ця група вчених продемонструвала можливість детекції олігонуклеотидів гена *BCR-ABL1* концентрацією 0,0694 фМ. Цього вдалося досягти на EIS-біосенсорі з чутливим елементом на основі композиту з наночастинок золота та електропровідного полімеру, який характеризується значною площею поверхні та до якого електростатично приєднані зондові олігонуклеотиди [91]. При всіх перевагах цього біосенсора його недоліками можна назвати нековалентний тип іммобілізації зондів та складність виготовлення гібридного полімеру.

В наступній роботі 2022 року ця ж група вчених оголосила про розробку біосенсора з простішим біоселективним елементом та фізичним перетворювачем на основі вольтамперометрії. Сигнал такого біосенсора генерується внаслідок виникнення електростатичних перешкод при гібридизації з зондами великої кількості молекул-мішеней, що ускладнює транспорт аніонів фероціаніду до чутливої поверхні та їх відновлення. Межа детектування – 1,34 фМ [92].

Інший вольтамперометричний біосенсор розробки Yu та ін. використовує для покращення аналітичних характеристик ферментну мітку, яка приєднується до пари зонд-мішень, та електрокаталітичний полімер, яким вкривається чутливий елемент. Результат – зниження межі детектування до 0,05 фМ [93].

Усі вищенаведені біосенсори до маркерів гена *BCR-ABL1*, незважаючи на їхні переваги перед ПЛР, об'єднує один недолік: низька пропускну здатність. Іншими словами, визначення конкретного варіанта перебудови цього гібридного гена електрохімічними біосенсорними методами вимагає аналіз зразка на ряді

різних чутливих елементів. Для прискорення цього процесу існують багатоканальні сенсори, такі як *MultiPalmSens4* та *MultiEmstat4*, але їх виготовлення є складним через необхідність усунення електричних перешкод від багатьох одночасно працюючих каналів. Більш простим є процес масштабування чутливих елементів оптичних біосенсорів через локальність ефекту ППР [102].

Так, Wu та ін. у 2016 році продемонстрували можливість детекції багатьох різних олігонуклеотидів гена *BCR-ABL1* на одному сенсорному елементі ППР. Для цього на 48 окремих ділянок цього сенсорного елемента були нанесені ДНК-зонди з різними послідовностями (однаковими в межах кожної ділянки). Оптичний сигнал (інтенсивність світла відбитого від кожної з ділянок) оцінювався цифровою камерою та був показником кількості ДНК-мішеней із досліджуваного зразка, які гібридизувалися з певною зондовою послідовністю. Даний метод отримав назву візуалізації ППР або ППРi. Межа детектування вимірювання ППРi-біосенсора до ХМЛ становила $10,29 \times 10^6$ фМ [94].

ППР-біосенсори до ХМЛ розробляються і в Україні в результаті співпраці ІФН НАН України та ІМБГ НАН України. У тому ж 2016 році було запропоновано дві стратегії, засновані на зменшенні іонної сили гібридизаційного буфера та підвищенні температури, для отримання ППР-біосенсора для детекції олігонуклеотидів генів *BCR-ABL1*. Запропонований біосенсор був здатний розрізняти повну (при 50 °C) та часткову гібридизацію (при 40 °C) між зондом, ДНК-мішенню та негативним контролем і характеризувався межею детектування, рівною 50×10^6 фМ [49, 103].

Порівнюючи кількісну ПЛР, електрохімічні та оптичні біосенсори в галузі діагностики ХМЛ, можна зробити висновок про більшу гнучкість ПЛР-аналізів, кращу межу детектування електрохімічних біосенсорів та значнішу простоту й доступність оптичних біосенсорів. Кожен із цих методів здатен зайняти відкриті ніші в медичній діагностиці цього захворювання (скринінг безсимптомної фази

ХМЛ, діагностика ХМЛ у країнах, що розвиваються) за умови нівелювання своїх недоліків, у першу чергу – зависокої межі детектування.

Незважаючи на велику кількість розробок біосенсорів для визначення ДНК-маркерів ХМЛ, жодна з них не доведена до практичного застосування і не впровадженна в клінічну діагностику через наявність суттєвих недоліків. Отже, розробка нових методів та підходів діагностики ХМЛ все ще є вельми актуальним завданням.

1.3. Застосування наночастинок золота у ДНК-біосенсорах

Аналітичні характеристики ДНК-біосенсорів можуть бути значно покращені, коли олігонуклеотиди, що зв'язуються з їх поверхнею, модифіковані наночастинами золота (НЧЗ) [47, 58, 104]. Потенційним способом реалізації цього ефекту для покращення аналітичних характеристик гібридизаційних ППР-біосенсорів є збільшення відгуку біосенсора шляхом приєднання спеціально розроблених молекул ДНК, зв'язаних із НЧЗ, до ДНК-дуплексів, які складаються з ДНК-зондів та олігонуклеотидів-мішеней. Цей формат вимірювання, відомий як сендвіч-аналіз, передбачає утворення хімічних зв'язків між лігандом зонда, цільовою молекулою та міченим лігандом [105-108].

Відомо, що саме включенням до складу багатьох нових біосенсорів наночастинок було досягнене покращення їхніх аналітичних характеристик [109, 110]. НЧЗ є особливо цікавими субстратами для іммобілізації лігандів у біосенсоріці та інших біотехнологіях завдяки здатності виступати в якості

молекулярних міток. Найбільш цікаві характеристики НЧЗ – це висока молекулярна маса та незвичайні оптичні властивості порівняно з макроскопічними матеріалами, такі як здатність поглинати падаюче світло з генерацією локалізованого поверхневого плазмона (ЛПП). Завдяки низькій відстані згасання електричного поля ЛПП це явище використовується в ЛППР-біосенсорах для виявлення біомолекул розміром менше 10 нм. Селективне виявлення більших молекул, таких як олігонуклеотиди, може бути досягнуто за допомогою ППР-біосенсорів з дальністю поширення еванесцентного поля ППР до 200 нм [111]. У таких біосенсорах біофункціоналізовані колоїдні наночастинки можуть бути використані для відстеження біомолекулярних взаємодій на поверхні сенсора завдяки зчепленню між поверхневими плазмонами поверхні ППР-сенсора та наночастинками [112].

На даний момент цей підхід призвів до значного прогресу у виявленні фізіологічних концентрацій біомолекул. До них належать такі молекули, як ДНК-маркер вірусної саркоми, члени родини miRNA-200, miRNA MIR16-2 та маркери клітин раку товстої кишки людини HCT116 [105-108]. Ключовим завданням у розробці аналітичних методів гібридизації ДНК є запобігання самогібридизації молекул зонда, зберігаючи при цьому умови, які сприяють ефективній та специфічній гібридизації з цільовою мішенню. Таким чином, розробка будь-якого нового методу виявлення ДНК повинна починатися з оцінки енергій взаємодії (гібридизації) між відповідними парами олігонуклеотидів.

Крім ППР-біосенсорів, сендвіч-аналіз із НЧЗ може використовуватись і у біосенсорах інших типів. Наприклад, метод ЕІС, чутливий до зміни електричного дипольного моменту біоселективного елемента, був успішно використаний для детекції НЧЗ у складі олігонуклеотидної сендвіч-структури [113]. Вольтамперометричний біосенсор, розроблений для визначення ХМЛ шляхом генерації сигналу внаслідок виникнення електростатичних перешкод при

гібридизації ДНК-мішеней із ДНК-зондами [92], має такий же потенціал до оптимізації сендвіч-структурами, бо НЧЗ, вкрита багатьма негативно зарядженими олігонуклеотидами, здатна створювати додаткові стеричні й електростатичні перешкоди на чутливій поверхні біосенсора та підвищувати його відгук.

На даний момент невідомі випадки застосування НЧЗ для детекції ДНК-маркерів ХМЛ методом сендвіч-аналізу. Такий аналіз був би дуже цікавим, новим і перспективним для діагностики цього захворювання, оскільки дозволив би значне покращення аналітичних характеристик біосенсорних діагностичних методів.

1.4. Підсумки огляду літератури

В огляді було сформульовано проблеми медичної діагностики, які можуть бути вирішені шляхом розробки та оптимізації нових ДНК-біосенсорів за допомогою застосування наночастинок золота:

1. Здешевлення та автоматизація існуючих процесів детекції олігонуклеотидних молекулярних маркерів;
2. Відкриття принципово нових галузей застосування аналітичних методів на основі ДНК.

Головною задачею огляду було визначення недоліків поточних методів діагностики хронічної мієлоїдної лейкемії та оцінка можливостей застосування нових біосенсорних систем на основі наноматеріалів для нівелювання цих

недоліків. Було зроблено висновок про те, що поточні діагностичні процедури мають потенціал для використання ДНК-біосенсорних методів як альтернатив методам, заснованим на полімеразній ланцюговій реакції в персонафікованій медичній діагностиці у важкодоступних місцях з міркувань зниження навантаження на операторів та зменшення собівартості одинарного вимірювання. Найважливішим недоліком ДНК-біосенсорів, який належить усунути для можливості аналізу біологічних зразків, є зависока величина їх межі детектування – 50 нМ. З літературних даних на тему застосування наноматеріалів у біомолекулярній електроніці був також зроблений висновок про можливість покращення аналітичних характеристик ДНК-біосенсорів шляхом використання ДНК-зондів, модифікованих наночастинками золота, для утворення нанорозмірних сендвіч-структур на чутливій поверхні ДНК-біосенсора. За умови зниження межі детектування таким методом розроблена ДНК-чутлива біосенсорна система може не лише бути впроваджена на заміну полімеразній ланцюговій реакції, а й використовуватися окремо від неї в якості швидкого, точного та недорогого методу скринінгу безсимптомної фази хронічної мієлоїдної лейкемії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Реагенти

У цьому дослідженні були використані такі реагенти: сечовина, KH_2PO_4 , SSC, ліпоева кислота (LA) та 6-меркапто-1-гексанол (MCH) (Fluka, Швейцарія), олігонуклеотиди (Metabion, Німеччина), золота (III) хлорид, золота (III) гідрохлорид тригідрат (Roth, Німеччина), цитрат натрію (MyChem, КНР), 7% HCl (Thermo Fisher Scientific, США); всі реагенти були якості Pro Analysi. Всі розчини готували з використанням деіонізованої води Milli-Q та зберігали за температури 4°C . Перед введенням у біосенсорну систему розчини нагрівали в водяній бані до кімнатної температури та дегазували за допомогою ультразвукової бані Bandelin Sonorex Super (Німеччина) протягом трьох хвилин.

2.2. Спектрометр ППР

Дослідження процесів іммобілізації та гібридизації ДНК проводили за допомогою двоканального пристрою «Плазмон-6», розробленого Інститутом

фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України (рис. 2.1). В даній системі компактно суміщено декілька модулів: модуль оптичного блоку в конфігурації Кречмана, модуль обертання призми, базовий модуль керування ППР сенсором [57].



Рис. 2.1. Зовнішній вигляд сенсора «Плазмон-6»

2.3. Сенсорний елемент спектрометра ППР

В якості сенсорної поверхні ППР-біосенсора використовується шар золота товщиною 45 нм, нанесений на поверхню оптичного скла марки Ф1, для якого характерний значний показник заломлення (1,5991 при довжині хвилі світла 650 нм). Для покращення адгезії золота до скла під шаром золота знаходиться тонке напилення хрому товщиною 2 нм. З міркувань багаторазовості хром та золото наносяться не безпосередньо на поверхню призми, а на поверхню змінної скляної

пластинки (скло Ф1), яка може бути встановлена на поверхню призми з використанням імерсійної рідини з тим самим показником заломлення, що й скло Ф1.

Сенсорним елементом спектрометра ППР «Плазмон-6» є відповідна скляна пластинка з золотим напиленням розміром 15*15 мм (рис. 2.2), яка виготовляється в Інституті фізики напівпровідників НАН України. Модифікації пластинки біомолекулами з формуванням біоселективного елемента ППР-біосенсора передусь закріплення на призмі приладу з використанням імерсійної олії (Merck, Німеччина).

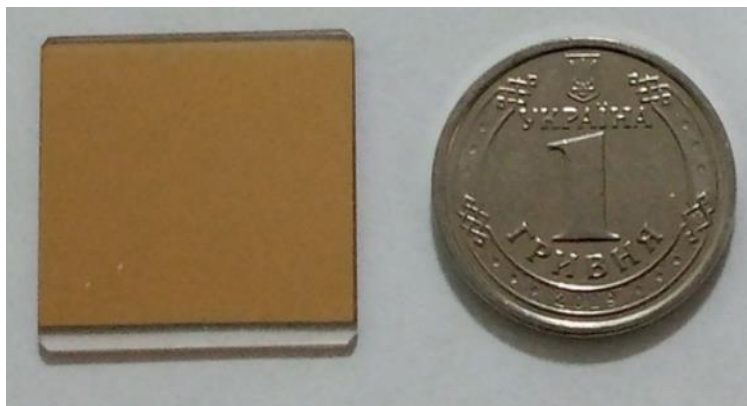


Рис. 2.2. Скляна пластинка з золотим напиленням

Відпрацьовані скляні пластинки можуть бути використані повторно шляхом зняття металевого напилення розведеною соляною кислотою, яка розчиняє 2 нм шар хрому.

2.4. Вимірювальна проточна комірка

Вимірювальна проточна комірка складається з трьох компонентів, накладених один на одного. Їх перелік у порядку знизу догори: сенсорна поверхня (див. розділ 2.3), прокладка з силіконової гуми та пластикова кришка зі входним та вихідним патрубком (рис.2.3).

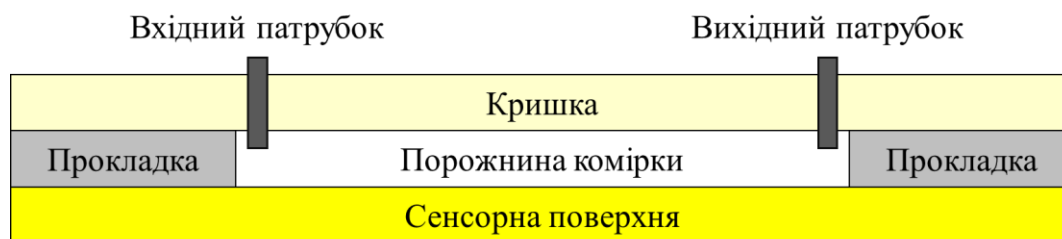
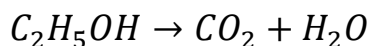


Рис. 2.3. Схема вимірювальної проточної комірки спектрометра ППР «Плазмон-6», вид у розрізі

Висота порожнини комірки – 1 мм, площа її основи – 13 мм². З міркувань відсутності забруднення поверхонь порожнини комірки проточна вимірювальна комірка збирається в атмосферному середовищі одразу після очищення сенсорного елемента та його встановлення на призму спектрометра ППР. Після цього порожнина комірки наповнюється водою Milli-Q через вхідний патрубок.

Повне заповнення порожнини комірки (з відсутністю бульбашок повітря) можливе за досягнення достатньої гідрофільності поверхонь порожнини комірки. З цією метою прокладка з силіконової гуми була багаторазово пропущена крізь полум'я спиртового пальника, яке містить значну концентрацію гарячої водяної пари згідно з хімічним рівнянням горіння етилового спирту:



Внаслідок підвищення своєї температури атоми в складі силіконової гуми частково поляризуються та встановлюють електростатичні зв'язки з молекулами води. Ці зв'язки є достатньо стійкими, щоб зберігати гідрофільність прокладки в атмосферному середовищі до 10 хвилин, а в водному середовищі – необмежений час.

Точні параметри гідрофілізації силіконової гуми (час одноразового контакту з полум'ям, кількість пропускань крізь полум'я тощо) залежать від використаного пальника, хімічного складу та форми прокладки. Найбільший ризик при вищеписаній обробці силіконової гуми пов'язаний із можливістю загоряння гуми при перевищенні температури в якійсь із її точок, і як наслідок – приведення такої прокладки в непридатність. У цій роботі гідрофілізація прокладки була досягнута внаслідок повторно-короткочасних контактів прокладки з полум'ям пальника протягом 3 хв із чергуванням сторін прокладки (верхньої та нижньої), які були звернені догори чи донизу в певний момент часу.

2.5. Синтез та характеристика НЧЗ

Виготовлення НЧЗ проводилося за однією з двох різних модифікацій методу Туркевича [114]. Спочатку 20 мл 1 мМ $HAuCl_4$ або $AuCl_3$ нагрівали до кипіння при постійному перемішуванні. До цього розчину додавали 2 мл 1% (38,7 мМ) цитрату натрію. Нагрівання та перемішування продовжували протягом кількох

хвилин, доки колоїд не почав набувати насиченого червоного кольору, що є ознакою відновлення більшості йонів золота [115].

Синтезовані НЧЗ зберігали при температурі 4°C. За даними Dong та ін., НЧЗ, отримані з використанням HAuCl_4 та цитрату натрію у молярному співвідношенні вище 2,4, є монодисперсними сферичними структурами розміром близько 10–20 нм, стабілізованими йонами цитрату [116]. НЧЗ, використані в цій роботі, характеризувалися піком поглинання світла приблизно при 520 нм [117–120].

Діаметри досліджуваних НЧЗ були оцінені за допомогою системи фотонної кореляційної спектроскопії серії Malvern Zetasizer Nano (Велика Британія). Зображення ТЕМ досліджуваних НЧЗ були отримані за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1400 (Jeol, Японія).

Концентрацію досліджуваних НЧЗ вимірювали за законом Бугера-Ламберта-Бера: $A = \epsilon CL$, де A – оптична густина, ϵ – молярний коефіцієнт екстинкції, C – концентрація, а L – довжина оптичного шляху. Для розрахунку молярного коефіцієнта екстинкції НЧЗ було використано метод Liu et al. [121, 122]. Оптична густина НЧЗ визначалася за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000, США.

2.6. Імобілізація та гібридизація олігонуклеотидів у біосенсорній системі

Зв'язування тіольованих олігонуклеотидів із золотом є добре відомим методом іммобілізації ДНК-зондів на поверхні золотого сенсора [49]. Висока

афінність тіольних груп до золота сприяє утворенню стабільних ковалентних зв'язків Au–S.

Крім того, одноланцюгові олігонуклеотиди здатні взаємодіяти з поверхнею золота, утворюючи зв'язки між нуклеотидами та атомами золота, маючи таким чином кілька точок контакту з чутливою поверхнею ППР-біосенсора, що ускладнює процес гібридизації такого олігонуклеотида-зонда з олігонуклеотидом-мішенню. При великій кількості таких контактів чутливість біосенсора значно знижується, через що постає потреба в механізмі блокування вільної поверхні золота. Він полягає в іммобілізації молекул меркаптогексанолу (MCH) (рис.2.6а) на поверхні золота, яка відбувається одразу після модифікації сенсора зондовими олігонуклеотидами.

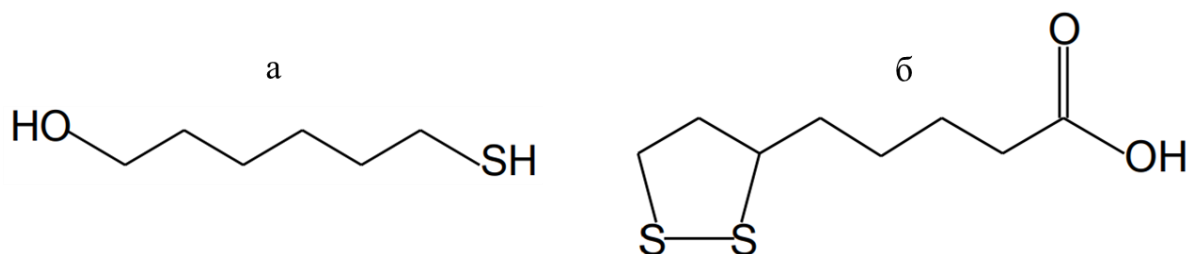


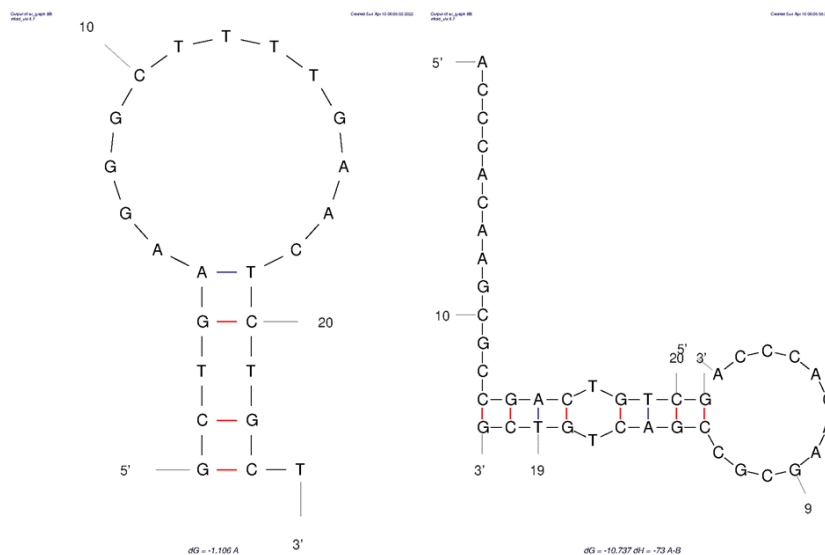
Рис. 2.6. Хімічна структура органічних сполук, що використовуються для блокування вільної поверхні золота: *a* – 6-меркапто-1-гексанол (MCH); *b* – ліпоева кислота (LA)

Таким чином блокуються сайти небажаного зв'язування ДНК-зондів, а коротка довжина молекул MCH не створює стеричних перешкод під час подальшої гібридизації [127,128].

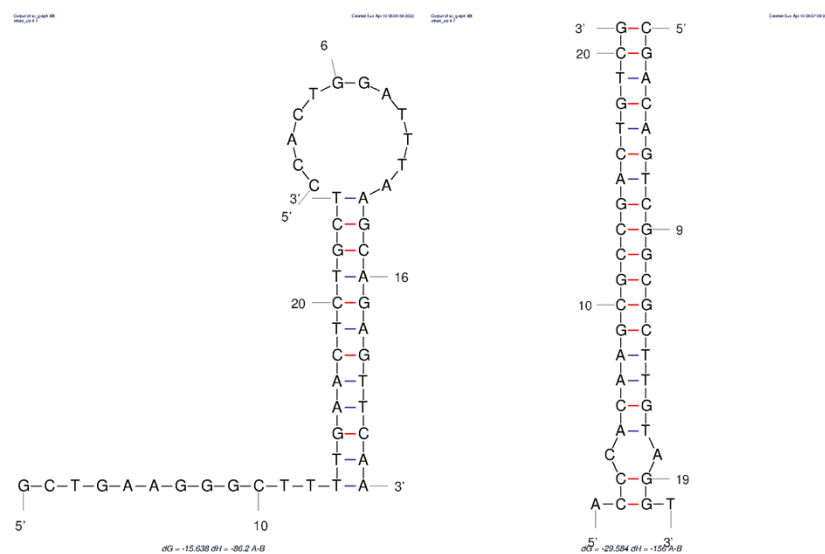
Принцип, за яким досягається селективне розрізнення кількох мішеней за допомогою одного зонда, напряму пов'язаний з вільною енергією взаємодії між цими молекулами. Згідно з другим законом термодинаміки, серед усіх можливих

фізичних процесів з більшою імовірністю будуть проходити ті, що викликають суттєвіше зменшення вільної енергії Гіббса (ΔG) в системі [129].

В сенсорній комірці гібридизаційного ППР-біосенсора можливими процесами утворення вторинної структури молекул ДНК є фолдинг (за рахунок внутрішньомолекулярних взаємодій), селф-гібридизація (за рахунок взаємодії двох молекул ДНК з однаковими послідовностями) та гібридизація з іншою молекулою ДНК (рис. 2.7). Той з процесів, що має найменше значення ΔG , буде проходити з більшою ймовірністю; при гібридизації молекул ДНК ΔG буде тим менше, що більший відсоток комплементарності мішені до зонда.



А) $\Delta G = -1,1$ ккал/моль; Б) $\Delta G = -10,7$ ккал/моль;



В) $\Delta G = -15,6$ ккал/моль; Г) $\Delta G = -29,6$ ккал/моль;

Рис. 2.7. Приклади побудови вторинної структури ДНК шляхом фолдингу (а), селф-гібридизації (б) та гібридизації 2 різних олігонуклеотидів (в, г). З підвищенням комплементарності молекул ДНК зменшується ΔG гібридизації

Таким чином, розробивши методику, що дозволить формувати сигнал в залежності від кількості випадків гібридизації зондів з мішенями в сенсорній комірці, ми отримаємо змогу визначати подібність послідовності зонда та мішені.

Відповідно до завдань, поставлених у цій роботі, для іммобілізації та гібридизації на золотій сенсорній поверхні були обрані послідовності ДНК, що знаходяться на межі між генами BCR та ABL1 при перебудові e13a2 (b2a2).

Вибір послідовності олігонуклеотидного зонда проводили на основі його комплементарності до послідовностей обох генів, задіяних у формуванні Ph⁻-хромосоми, та здатності до внутрішньомолекулярних і міжмолекулярних взаємодій, що може бути теоретично передбачена шляхом розрахунків термодинамічних параметрів таких взаємодій за допомогою веб-сервера DINAMelt [130]. Олігонуклеотид, оптимальний з міркувань низької ймовірності фолдингу та селф-гібридизації отримав назву mod-Ph та був обраний предметом даного дослідження.

Для утворення стійких ковалентних зв'язків із золотою сенсорною поверхнею зондові молекули ДНК були модифіковані з 5'-кінця тіольною групою через гексаметиленову перемичку (SH-(CH₂)₆-).

Для іммобілізації тіольованих олігонуклеотидів на поверхні золота часто використовують умови запропоновані Herne і Tarlov [127], а саме в 1 М фосфатному буфері (KH₂PO₄, рН 4) протягом 120 хв. Вважається, що при низькій величині рН та високій іонній силі електростатичне відштовхування негативно заряджених ланцюгів ДНК мінімізується, що створює сприятливі умови для високої густини іммобілізації тіольованих олігонуклеотидів на поверхні золота. З іншого боку, занадто висока густина іммобілізованих олігонуклеотидів може спричинити зниження швидкості та ефективності наступного процесу гібридизації з (також негативно зарядженими) комплементарними фрагментами нуклеїнових кислот. Згідно з Peterson та співавторами, концентрації фосфатного буферного розчину, що є оптимальними для іммобілізації з метою подальшої гібридизації, є вищими за 0.4 М [131]. Тому, щоб дослідити процеси, що відбуваються в фосфатному буфері меншої концентрації, іммобілізацію

тіольованого олігонуклеотида mod-Ph концентрацією 1 μM проводили у фосфатному буфері (pH 4) концентрацією 0,25 і 0,5 М протягом 60 хв. при кімнатній температурі.

Іншим буферним розчином для іммобілізації був обраний цитратний буферний розчин. Цитратний буфер концентрацією 1 М (pH 3) складається з 0,082 М цитрату натрію та 0,9 М цитрату. Концентрації розчинів цитрату, в яких проводилася іммобілізація mod-Ph, дорівнювали 0,02, 0,1 та 0,25 М.

Для селективної гібридизації з зондом mod-Ph у серії дослідів з визначення оптимального методу іммобілізації ДНК-зондів було обрано олігонуклеотиди P1 концентраціями 50, 100, 200 та 400 нМ та Vscx14 концентрацією 200 нМ. Перший з них є повністю комплементарним до іммобілізованого на сенсорній поверхні олігонуклеотида-зонда mod-Ph. Другий олігонуклеотид є комплементарним лише до 12-основного фрагменту mod-Ph, похідного від гена VCR. Вибір таких цільових послідовностей був проведений з метою тестування здатності біосенсора ППР до диференціювання олігонуклеотидів, характерних для ХМЛ (P1) та для нормального геному (Vscx14). Термодинамічні характеристики цих олігонуклеотидів, а саме ΔG фолдингу (утворення олігонуклеотидом водневих зв'язків із самим собою) та гібридизації двох однакових молекул наведені в таблиці 2.1. Значення вільної енергії Гіббса (ΔG) розраховували за допомогою веб-сервера DINAMelt [129].

Таблиця 2.1

Нуклеотидна послідовність та ΔG фолдингу та селф-гібридизації в середовищі 2×SSC

Назва молекули ДНК	Нуклеотидна послідовність	ΔG фолдингу, ккал/моль	ΔG гібридизації 2 молекул, ккал/моль
mod-Ph	GCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCT	-1,1	-3,1
P1	AGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGC	-0,4	-3,6
Bcrex14	CCACTGGATTTAAGCAGAGTTCAA	-2,3	-6,2
80-mer BCR-ABL	TCATCGTCCACTCAGCCACTGGAT TTAAGCAGAGTTCAAAAGCCCTTC ACTTTGAGCCTCAG	-7,1	-9,1
SH-DP	TTTTTTTTTTGGCTGAGTGGACGATGA	-0,3	-2,4

У розробленій біосенсорній системі нанорозмірні сендвіч-структури формуються на поверхні сенсора у вимірювальній комірці ППР-спектрометра шляхом афінних взаємодій за участю трьох молекул одноланцюгової ДНК. А саме: зондовий тіольований олігонуклеотид mod-Ph (SH-(CH₂)₆-GCT GAA GGG CTT TTG AAC TCT GCT), комплементарний 24-основній ділянці олігонуклеотида-мішені 80-mer BCR-ABL, та другий зондовий тіольований олігонуклеотид (SH-(CH₂)₆-TTT TTT TTT GGC TGA GTG GAC GAT GA), комплементарний іншій ділянці мішені 80-mer BCR-ABL довжиною 18 азотистих основ. Зонд mod-Ph є іммобілізованим на чутливій поверхні ППР-спектрометра, а зонд SH-DP іммобілізований на поверхні золотих наночастинок, що зумовлює їх наближення до поверхні ППР-сенсора, якщо на ній присутній 80-mer BCR-ABL.

Відповідно, якщо 80-mer BCR-ABL вводиться у вимірювальну проточну комірку, відбуваються дві гібридизаційні взаємодії, після яких вимірюється відгук біосенсора шляхом порівняння рівня сенсорного сигналу до та після введення в нього цільового розчину з 80-mer BCR-ABL.

2.7. Дизайн біосенсорної системи

Дослідження процесів гібридизації олігонуклеотидів проводилося на двоканальному спектрометрі ППР «Плазмон-6» в оптичній конфігурації Кречмана (рис. 2.1а, б), розроблений в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України [125]. Поверхня сенсорного елемента цього пристрою є шаром золота товщиною 50 нм на пластині з оптичного скла; об'єм аналітичної комірки становить 120 мкл. Перед модифікацією золотом поверхню скляної пластини (чіпа) очищують свіжоприготованим розчином «Піранья» (суміш концентрованої H_2SO_4 та 30% H_2O_2 у співвідношенні 3:1; обережно: розчин «Піранья» надзвичайно їдкий, схильний до розкладання та виділяє тепло під час приготування) за кімнатної температури протягом 3 хвилин, потім ретельно промивають дистильованою та деіонізованою водою та сушать на повітрі.

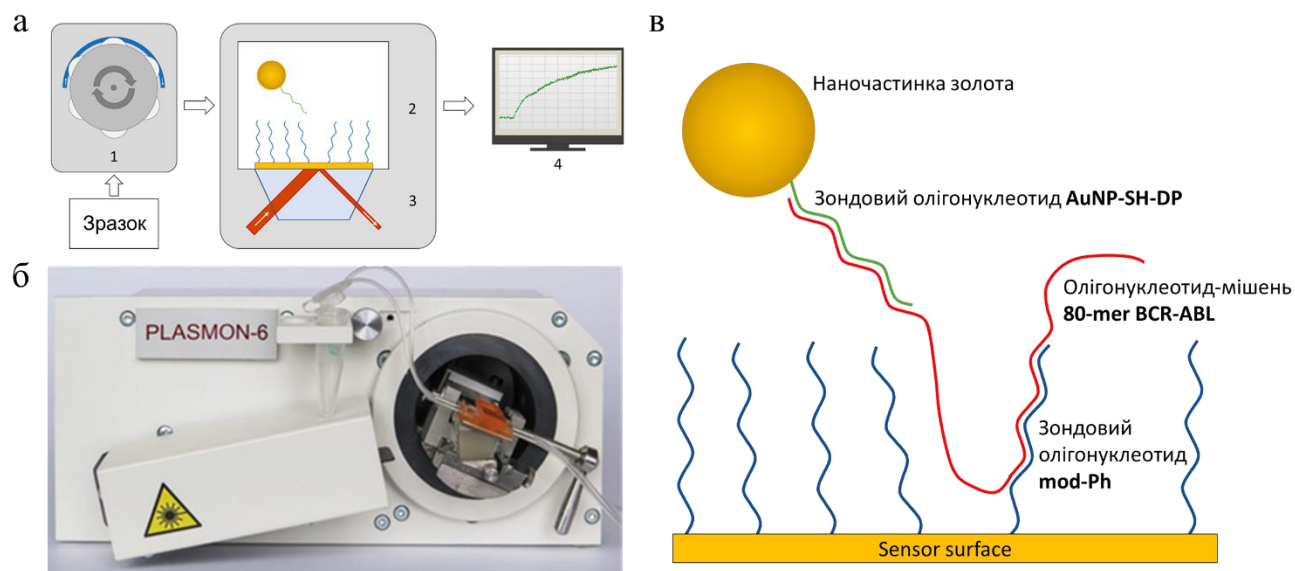


Рис. 2.5. *а* – схема системи ППР-біосенсора: перистальтичний насос (1), біоселективний елемент (2), спектрометр ППР (3) та комп'ютер із програмним забезпеченням для обробки сигналів (4); *б* – спектрометр ППР «Плазмон-6»; *в* – Схема сендвіч-аналізу, який використовується у розробленій гібридизаційній біосенсорній системі на основі ППР

Очищений чіп встановлювався на призму спектрометра за допомогою імерсійної рідини з таким самим показником заломлення, як і призма та чіп. Швидкість потоку (зазвичай 40 мкл/хв) через вимірювальну проточну комірку контролювалася перистальтичним насосом (Ismatec, США) [126]. Сигнал ППР оброблявся за допомогою програмного забезпечення Biosuplar, розробленого Mivitec GmbH. Усі експерименти проводилися за кімнатної температури (+22°C).

2.8. Формування зондових комплексів ДНК-НЧЗ та їх колоїдна стабілізація

Зонди SH-DP, призначені для збільшення відгуку ППР при детекції мішені 80-mer BCR-ABL, модифіковані з 5'-кінця тіольною групою так само, як mod-Ph. При контакті SH-DP з цитрат-зв'язаними НЧЗ (рис.2.2) це дозволяє контрольовану функціоналізацію поверхні НЧЗ шляхом заміни електростатично зв'язаних іонів цитрату ковалентно зв'язаними тіольованими молекулами [123].

Модифікацію тіольованих олігонуклеотидів наночастинками та подальше приєднання блокуючих молекул (MCH та LA) до таких НЧЗ проводили шляхом інкубації 750 нМ олігонуклеотидів SH-DP у золі 2,5 нМ НЧЗ протягом 12 годин у середовищі 0,1×SSC (1,5 мМ тринатрій цитрат, 15 мМ NaCl, pH 7,0) при кімнатній температурі, після чого до утворених кон'югатів додавали розчин MCH та LA у 0,1×SSC, доки концентрація як MCH, так і LA не дорівнювала 2 мкМ. Отриманий розчин інкубували протягом 1 години за кімнатної температури для досягнення іммобілізації MCH та LA на вільній поверхні НЧЗ. Далі НЧЗ переносили у середовище деіонізованої води Milli-Q шляхом двох 30-хвилинних центрифугування при відносній відцентровій силі 13226 відносних одиниць, після чого супернатант видаляли. Молярну концентрацію тіольованих олігонуклеотидів обирали на основі розрахунку її співвідношення до концентрації НЧЗ на рівні 300:1 [124]. Отриманий колоїд зондових олігонуклеотидів SH-DP, модифікованих НЧЗ, стабілізованими MCH та LA, далі називали AuNP-SH-DP (рис.2.4).

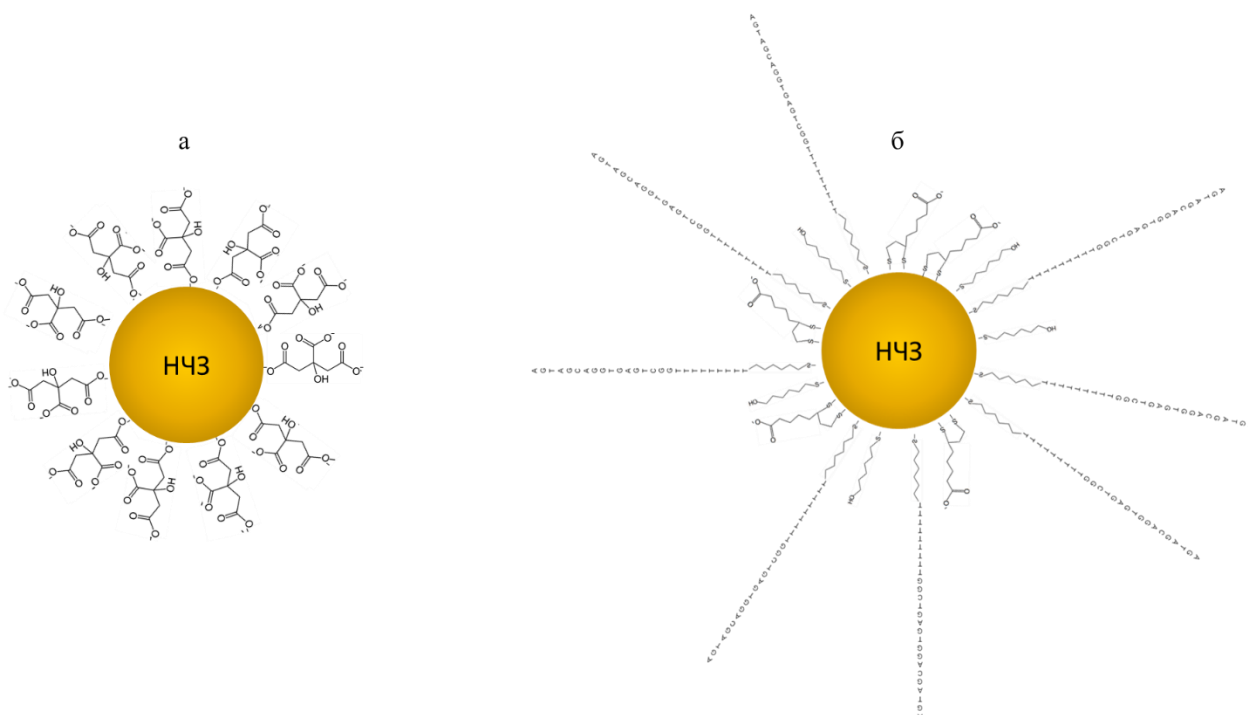


Рис. 2.4. Схематичне зображення досліджуваних наночастинок золота: *а* – стабілізовані іонами цитрату; *б* – модифіковані тіольованими олігонуклеотидами, а також MCH та LA

2.9. Методика вимірювання

Підготовка біоселективного елемента ДНК-біосенсорної системи включає два основні етапи: іммобілізацію олігонуклеотидного зонда та пасивацію вільної поверхні чіпа (рис. 2.8). Для іммобілізації тіольованого зонда, 1 мкМ mod-Ph у 0,5 М KH_2PO_4 (рН 3,8) вводили у вимірювальну проточну комірку та інкубували протягом 1 години. Зонди mod-Ph є повністю комплементарними мішеням 80-mer

BCR–ABL. Після цього ділянки на поверхні золота, вільні від іммобілізованого mod-Ph, блокували 0,1 мМ водним розчином MCH [127].

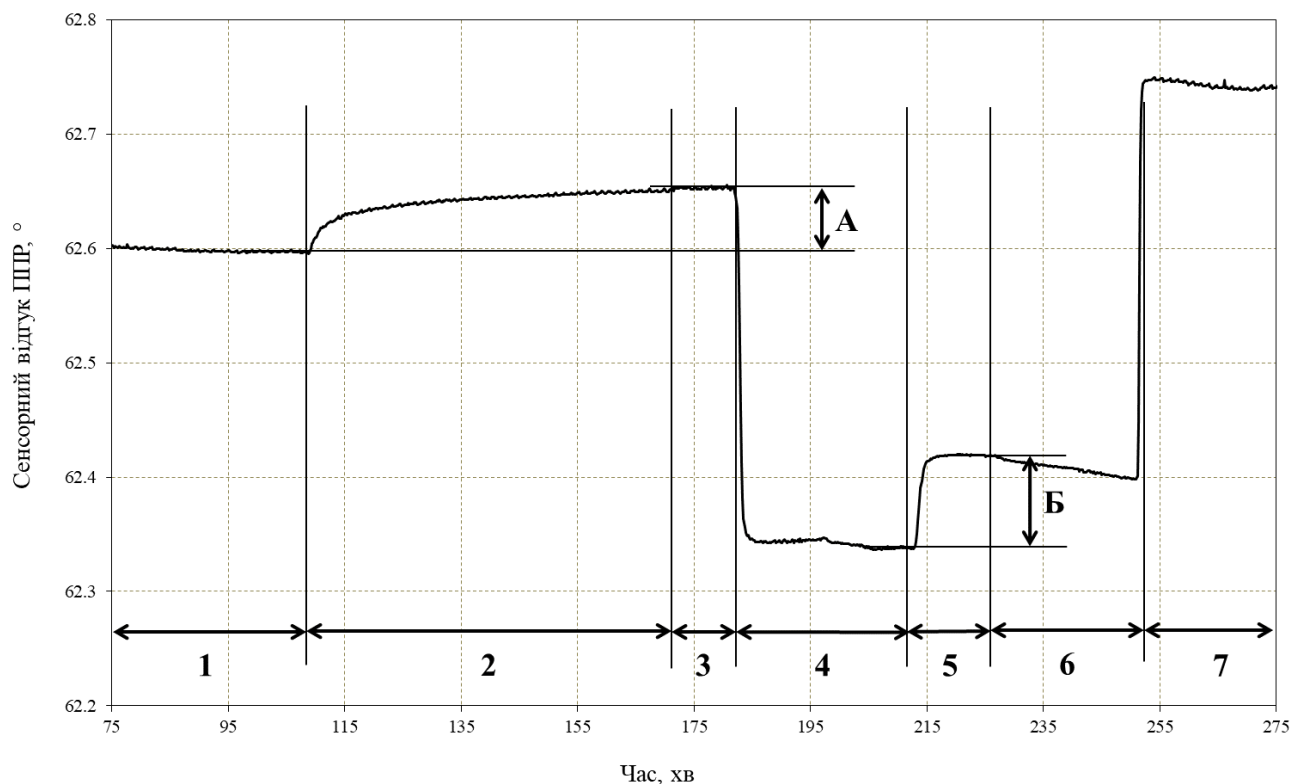


Рис. 2.8. Типова сенсограма іммобілізації із зазначенням експериментальних етапів. Вісь x: час (хв); вісь y: резонансний кут (°). 1 – промивання буфером для іммобілізації (0,5 М KH_2PO_4 , рН 3,8); 2 – ін'єкція 1 мкМ тіольованого зондового олігонуклеотида (mod-Ph) з подальшою стоп-інкубацією; 3 – промивання іммобілізаційним буфером; 4 – промивання водою; 5 – ін'єкція MCH із подальшою стоп-інкубацією; 6 – промивання водою; 7 – промивання 2×SSC. *a* – рівень іммобілізації mod-Ph; *б* – рівень іммобілізації MCH

На початку кожного експерименту з виявлення 80-mer BCR–ABL встановлювали стабільну базову лінію шляхом ретельного промивання поверхні золотої пластини, функціоналізованої зондами mod-Ph, робочим буфером 2×SSC

(30 mM цитрат натрію, 300 mM NaCl, pH 7). Усі наступні експерименти проводили в тому ж розчині. Далі, досліджуваний зразок, що містить олігонуклеотид 80-mer BCR-ABL у певній концентрації, вводили у вимірювальну проточну комірку та інкубували протягом 10 хвилин, що призводило до зміни відгуку біосенсорної системи. Після цього, для посилення відгуку сенсора на мішень 80-mer BCR-ABL, вводили модифіковані наночастинками золота зонди SH-DP (AuNP-SH-DP) у концентрації 450 пМ (розділ 2.6), та інкубували протягом 60 хвилин для утворення молекулярних сендвіч-комплексів шляхом гібридизації (схематично зображено на рис. 2.5в). Що більша кількість мішеней 80-mer BCR-ABL зі зразка гібридизувалася з олігонуклеотидами mod-Ph, тим більше зондів AuNP-SH-DP вбудовувалися в отримані сендвіч-комплекси, що призводило до вищого сигналу ППР. Відгук біосенсорної системи на зразок із ДНК-мішенню визначався шляхом віднімання сигналу ППР, виміряного до введення зразка, від сигналу ППР, виміряного після послідовного додавання зразка та зондів AuNP-SH-DP з формуванням сендвіч-структур.

Для повторного використання ДНК-сенсора гібридизовані ДНК-дуплекси дисоціювали обробкою 8 М розчином сечовини. Ефективність регенерації оцінювали шляхом порівняння базової лінії ППР, зареєстрованої після обробки сечовиною, з початковою базовою лінією.

2.10. Програмне забезпечення, обробка результатів

Сигнал спектрометра ППР «Плазмон-6» оброблявся в програмі «Biosuplar» компанії Mivitech (<http://www.biosuplar.de/software.htm>).

Для обробки експериментальних даних, отриманих під час роботи, використовували стандартні методи варіаційної статистики. Дослідження проводили щонайменше в 3 повторностях. При статистичній обробці результатів визначали середнє арифметичне та його стандартне відхилення, а дані вважали значущими при $p < 0,05$. Обробку даних та розрахунки проводили за допомогою програмного забезпечення OriginLab та Microsoft Excel [132]. Вторинні структури молекул ДНК та значення вільної енергії Гіббса (ΔG) розраховували за допомогою веб-сервера DINAMelt [129].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Принципи посилення ППР наночастинками золота

Оптимізація аналітичних пристроїв починається з визначення їх технічних параметрів, зміна яких здатна покращити аналітичні характеристики такого пристрою при детекції певної молекули-мішені (у даному випадку – 80-mer BCR-ABL). Для визначення таких параметрів було прийнято рішення про побудову математичної моделі біосенсорної детекції олігонуклеотидів за допомогою спектрометра ППР із використанням математичних методів хвильової фізики поверхневого плазмонного резонансу, а також явища, на якому заснований ППР – повного внутрішнього відбиття (ПВВ).

Крім цього, методами математичного моделювання можливо оцінити ефективність гібридизації – одну з фундаментальних аналітичних характеристик ППР-біосенсорів. У випадку біосенсорної системи на основі сендвіч-аналізу з використанням НЧЗ цей показник може бути представлений відсотком площі чутливого елемента (сенсорної пластини), зайнятим наночастинками золота.

Специфіка сендвіч-аналізу дозволяє збільшення сенсорного відгуку та, відповідно, ефективності гібридизації шляхом підвищення концентрації НЧЗ, які вводяться в вимірювальну проточну комірку після введення до неї досліджуваного зразка та вступають у взаємодію з ДНК-мішенями, адсорбованими на чутливій поверхні. Мінімальну концентрацію НЧЗ, при якій

досягається 100% ефективність гібридизації, можна визначити як оптимальну для використання в розробленій біосенсорній методиці.

3.1.1. Спектрометрія повного внутрішнього відбиття. Показник заломлення (n) середовища – це співвідношення швидкості світла в вакуумі до швидкості світла в певному середовищі. Вимірюючи це значення, з'являється можливість розрізнити середовища з різними показниками заломлення: ДНК і воду, ДНК і кров, і навіть одноланцюгову й дволанцюгову ДНК [133-135].

Показники заломлення більшості матеріалів залежать від довжини хвилі світла, яке з ними взаємодіє. Прикладом такої залежності (дисперсії), важливим для біосенсорики, є дисперсія оптичного скла марки Ф1, яке використовується в багатьох оптичних сенсорах, зокрема приладах серії «Плазмон». Для інфрачервоного (ІЧ) світла з довжиною хвилі 1000 нм, показник заломлення скла Ф1 складає 1,5875, для 650 нм (червоне світло, яке використовується в спектрометрах «Плазмон») – 1,5991, а для довжини хвилі 250 нм ультрафіолетового випромінювання (УФ) – 1,7861.

Уявімо два прозорі діелектрики, що щільно контактують між собою в одній площині. З міркувань, що стануть очевидними в наступному розділі, назвемо показник заломлення першого діелектрика n_1 , а другого діелектрика – n_3 . Уявімо, що зі сторони діелектрика n_1 на площину контакту діелектриків падає промінь світла під кутом α до прямої, перпендикулярної до площини контакту діелектриків.

Залежність напрямку вихідного променя від показників заломлення діелектриків n_1 і n_3 та від кута падіння світла сформульована у вигляді закону Снеліуса:

$$n_1 \sin \alpha = n_3 \sin \beta \quad (1)$$

де n_1 – показник заломлення першого діелектрика, n_3 – показник заломлення другого діелектрика, α – кут падіння, β – кут заломлення.

Явищем, яке випливає з закону Снеліуса, є повне внутрішнє відбиття (ПВВ). У випадку, коли $n_1 > n_3$, існує такий кут $\alpha_{ПВВ}$, при якому $\sin\beta = 1$, отже, кут β дорівнює $\pi/2$ (90°), і заломлене світло не потрапляє в товщу діелектрика n_3 :

$$\sin \alpha_{ПВВ} = \frac{n_3}{n_1} \quad (2)$$

де $\alpha_{ПВВ}$ – кут повного внутрішнього відбиття.

При збільшенні α понад $\alpha_{ПВВ}$ значення $\sin\beta$ перевищує одиницю, і закон Снеліуса (1) перестає діяти, а промінь світла, що падає на межу діелектриків, повністю відбивається в перше середовище.

Цікавість ПВВ для аналітичної електроніки полягає в можливості неінвазивного визначення показника заломлення досліджуваного зразка (n_3). Межа контакту діелектриків n_1 та n_3 в такому випадку має назву чутливої (сенсорної) поверхні. Оскільки саме питання розрізнення одноланцюгової ($n=1,456$) й дволанцюгової ($n=1,53$) ДНК покладається в основу гібридизаційних ДНК-біосенсорів, був побудований графік залежності $\alpha_{ПВВ}$ від n_3 (рис. 3.1):

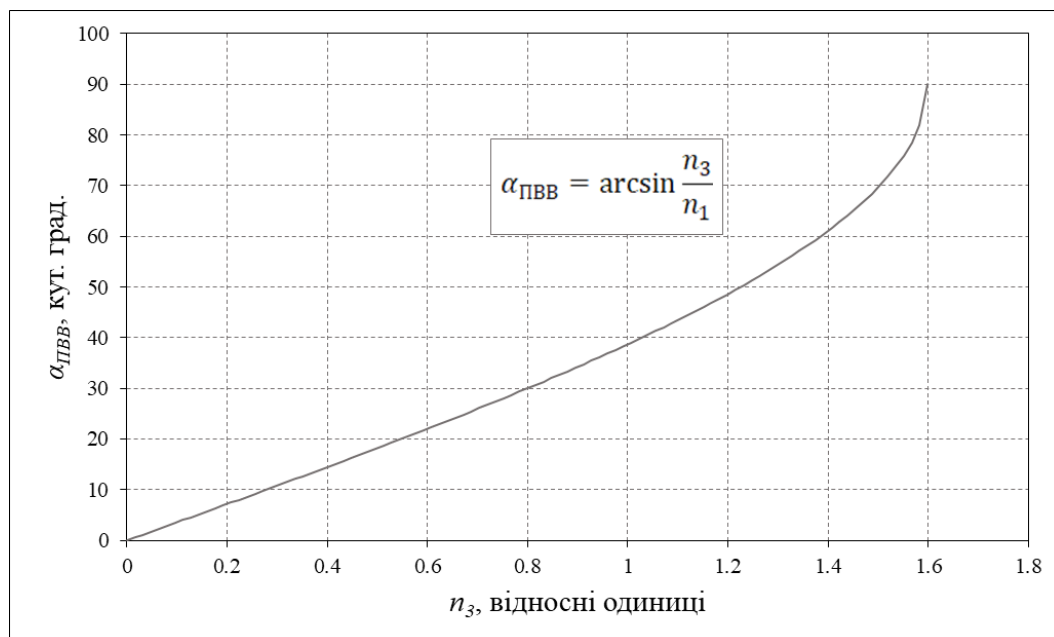


Рис. 3.1. Графік залежності кута ПВВ від показника заломлення досліджуваного зразка (n_3) згідно з законом Снеліуса. $n_1 = 1,5991$

Оскільки функція $\arcsin \frac{n_3}{n_1}$ не визначена при $\frac{n_3}{n_1} > 1$, то n_3 можливо визначити за умови, що $\frac{n_3}{n_1} < 1$, тобто $n_3 < n_1$. Практичний сенс даних розрахунків можна продемонструвати на прикладі розрізнення одноланцюгової та дволанцюгової ДНК. Згідно з рис. 3.1, різниця між показниками заломлення, рівними 1,456 та 1,53 може відповідати різниці між кутами ПВВ, рівними $65,576^\circ$ та $73,095^\circ$, що перевищує 7° при кутовій роздільній здатності сучасних аналізаторів, меншій за $0,01^\circ$.

Одиничне визначення $\alpha_{ПВВ}$ за допомогою таких приладів можливе шляхом вимірювання інтенсивності світла, відбитого від межі діелектриків n_1 та n_3 під різними кутами α . Цей процес відомий як спектрометрія ПВВ, а відповідні аналітичні прилади – спектрометри ПВВ. Для отримання залежності їхнього сенсорного відгуку від кута падіння світла був побудований наступний графік на основі рівнянь Френеля:

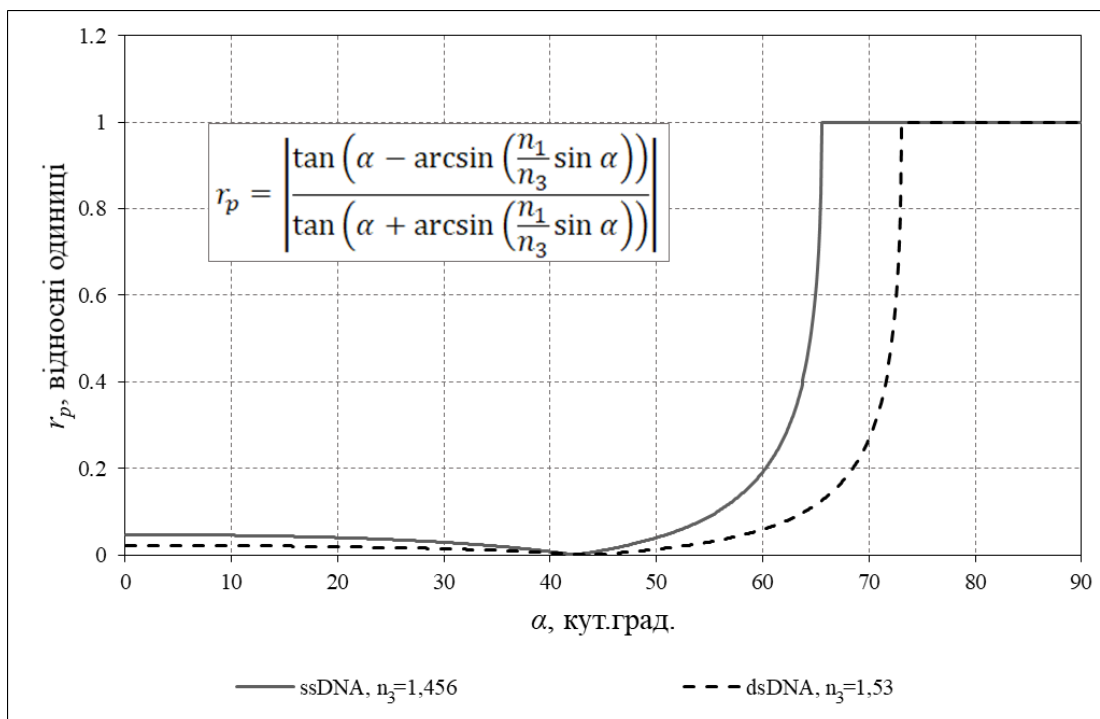


Рис. 3.2. Значення коефіцієнта відбиття p -поляризованого світла при різних кутах падіння на межу діелектриків n_1 та n_3 . $n_1 = 1,5991$

З графіків на рис. 3.2 можна побачити різницю між спектрами ПВВ для двох типів ДНК, зокрема між їхніми кутами ПВВ, які відповідають абсцисам виходу графіків на плато. Варто звернути увагу, що дані графіки правдиві для p -поляризованого світла, яке використовується в приладах серії «Плазмон».

У реальних ДНК-біосенсорах заміна одноланцюгової ДНК на дволанцюгову відбувається внаслідок гібридизації ДНК-мішеней із зондовими олігонуклеотидами, які іммобілізовані на чутливій поверхні біосенсора. Це означає, що для коректної детекції саме тих ДНК-мішеней, які комплементарні до ДНК-зондів, ПВВ-біосенсор має відрізняти наявність ДНК біля чутливої поверхні ПВВ-біосенсора від наявності ДНК в товщі досліджуваного зразка.

Отже, закономірне питання до рівняння (2) стосується глибини зондування діелектрика n_3 променем світла при ПВВ та, як наслідок, при ППР. У підборі параметрів фізичного перетворювача таким чином, щоби ця глибина зондування

не перевищувала лінійний розмір ДНК-мішені 80-mer BCR-ABL, полягає один з основних аспектів оптимізації досліджуваного ДНК-біосенсора.

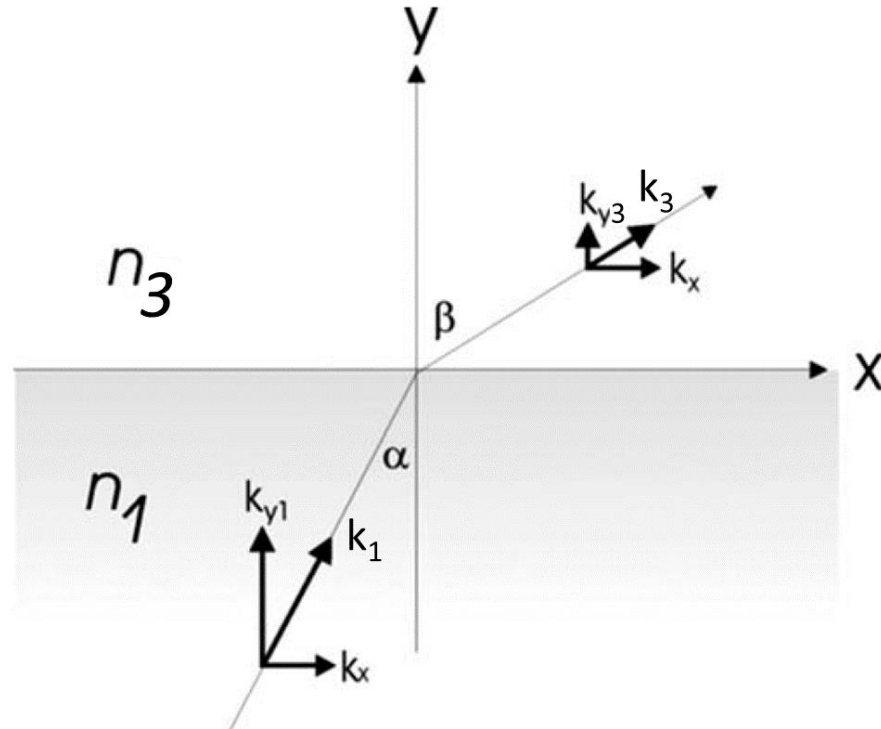


Рис. 3.3. Заломлення світла під кутом падіння α на межі розділу діелектриків n_1 та n_3 [102]

На рис. 3.3 наведена схема заломлення електромагнітної хвилі на межі розділу між діелектриками n_1 та n_3 . k_1 та k_3 – хвильові вектори; їхні напрями паралельні напрямам поширення відповідних хвиль, а їх величини визначаються наступним чином:

$$k_i = \sqrt{k_{xi}^2 + k_{yi}^2 + k_{zi}^2} = n_i \frac{2\pi}{\lambda} = n_i \frac{\omega}{c} = n_i \frac{2\pi\nu}{c} \quad (3)$$

де λ – довжина хвилі в вакуумі, ω – циклічна частота, ν – частота, c – швидкість світла в вакуумі.

Оскільки будь-яке явище заломлення променя світла можна описати в двох координатах, вектори k_{zi} були прийняті як рівні нулю.

Шляхом заміни в рівнянні (1) $\sin\alpha$ на $\frac{k_{x1}}{k_1}$ та $\sin\beta$ на $\frac{k_{x3}}{k_3}$, був отриманий наступний вираз:

$$n_1 \frac{k_{x1}}{k_1} = n_3 \frac{k_{x3}}{k_3} \quad (4)$$

Який був спрощений підстановкою $k_i = n_i \frac{2\pi}{\lambda}$ (3) з отриманням:

$$k_{x1} = k_{x3} = k_1 \sin\alpha = k_3 \sin\beta \quad (5)$$

Отже, всі хвильові вектори в осі X можна вважати рівними між собою в будь-якому випадку та позначати як k_x . Величини вертикальних векторів (в осі Y) були отримані через теорему Піфагора (3) з підстановкою $k_x = k_1 \sin\alpha$, наприклад:

$$k_{y3} = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{n_3^2}{n_1^2} - \sin^2 \alpha} \quad (6)$$

З рівняння (6) можна побачити, що при $\sin \alpha > \frac{n_3}{n_1}$ (умова ПВВ згідно з (2)) під знаком кореня з'являється від'ємне число і величина k_{y3} перестає бути дійсною. З цього можна зробити висновок, що в такому випадку в діелектрику n_3 існує лише хвиля k_x , яка поширюється в площині контакту діелектриків. Її хвильове рівняння можна записати таким чином:

$$E_3 = E_0 e^{-ik_{y3}y} e^{i\omega t - ik_x x} \quad (7)$$

Де E_3 – напруженість електричного поля в діелектрику n_3 , E_0 – амплітуда електричного поля, t – час, x та y – координати згідно з рис.1.3, $i = \sqrt{-1}$.

Враховуючи, що k_{y3} має латеральну (уявну) величину, з рівняння (7) можна побачити, що E_3 експоненційно зменшується зі збільшенням y . Іншими словами, фотони світлового променя не переходять межі двох середовищ, але їхнє електромагнітне поле виходить за неї. Розраховувавши відстань, на яку це поле поширюється вглиб діелектрика n_3 , можна зробити висновок про те, наскільки близько до сенсорної поверхні має знаходитись молекула, щоб вплинути на спостережене значення n_3 та бути детектованою ПВВ-сенсором. У хвильовій фізиці така відстань має назву відстані згасання та розраховується як відстань, на якій напруженість поля зменшується в e разів.

Нехай y_e – відстань згасання електричного поля в діелектрику n_3 . Тоді $\frac{E_3(0)}{E_3(y_e)} = e$. Застосувавши до цього рівняння (6) і (7), можна отримати наступне:

$$y_e = \frac{1}{n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\sin^2 \alpha - \frac{n_3^2}{n_1^2}}} \quad (8)$$

Як можна побачити з рівнянь (2) та (8), у випадку, коли α наближається до $\alpha_{ПВВ}$, відстань згасання електричного поля наближається до нескінченності. Іншими словами, найкращий можливий ПВВ-сенсор був би чутливим до зміни середовища n_3 на дуже значній відстані від сенсорної поверхні. Це зробило б його сигнал слабко залежним від проходження афінних взаємодій, локалізованих лише на цій сенсорній поверхні, наприклад, від гібридизації ДНК. Втім, поза околom $\alpha_{ПВВ}$ відстань згасання може бути порядком сотень нанометрів. Наприклад, $\alpha_{ПВВ} = 65,576^\circ$ при $n_1 = 1,5991$ та $n_3 = 1,456$ згідно з (2). Згідно з (8), y_e в такій системі при $\alpha = 80^\circ$ та $\lambda = 650 \times 10^{-9}$ м становила б 172,4 нм, що відповідає довжині

522-основного олігонуклеотида [136]. Для порівняння, довжина ДНК-мішені 80-mer BCR-ABL складає 26,4 нм.

Отже, з проведених розрахунків можна зробити висновок про фундаментальну недоцільність розробки гібридизаційних ПВВ-біосенсорів для детекції маркера ХМЛ через слабку залежність їхнього відгуку від змін складу середовища на близькій відстані до чутливої поверхні. Втім, метод спектрометрії ППР дозволяє відслідковувати зміну кута ППР, величина якого значно перевищує величину $\alpha_{ПВВ}$. Отже, він міг би бути з більшим успіхом використаний для детекції змін лише в найближчому до сенсорної поверхні шарі діелектрика n_3 .

3.1.2. Спектрометрія поверхневого плазмонного резонансу. Згідно з сучасними фізичними уявленнями, метали на елементарному рівні можна розглянути як регулярно розташовані атоми, у просторі між якими вільно переміщуються електрони. Аналіз руху цих електронів згідно з рівняннями Максвелла може показати однакові закономірності для електронів у металі та в стані плазми. Наприклад, при наданні їм імпульсу електромагнітною хвилею вони здатні на коливання з частотою цієї хвилі; таким чином утворюється нова хвиля коливань електронної густини. Таку хвилю прийнято називати терміном «плазмон» – сумішшю слів «плазма» та «електрон». В деяких джерелах використовується також термін «плазмон-поляритон» як об'єднане поняття одночасного збудження електромагнітною хвилею плазмона та поляритона (синхронної електричної поляризації атомів у діелектрику) [102, 137]. Через локалізацію плазмонів на поверхнях металів такі хвилі часто називають поверхневими плазмонами (ПП) (рис. 3.4).

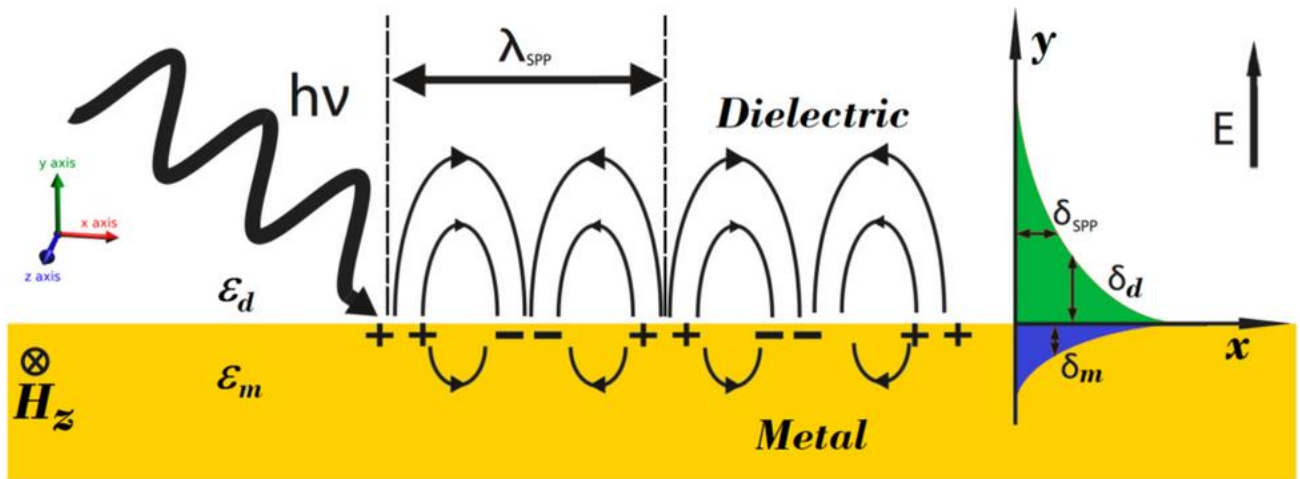


Рис. 3.4. Схематичне зображення взаємодії між світлом та електронами металу зі збудженням плазмон-поляритона. Плазмону відповідають коливання густини зарядів (+ та -) на поверхні металу [137]

Теорія, яка пояснює ці ефекти, має велику цікавість для біосенсорики, бо кут, під яким спостерігається таке збудження, безпосередньо залежить від показника заломлення середовища, з яким межує шар металу. Згідно з цією теорією, світло передає плазмону свою енергію внаслідок вступу цих двох хвиль у резонанс, що веде до згасання відбитого від металу світла. Не випадково, що ця теорія широко відома як поверхневий плазмонний резонанс.

Перш ніж розглядати випадок тонкої плівки золота в спектрометрі ППР «Плазмон-6», метал можна представити як напівнескінченне середовище. Контактувати з металом може діелектрик n_1 , звідки приходиме світло для збудження плазмона. Згідно з рівняннями Максвелла [138], хвильовий вектор плазмона на поверхні цього металу набуває наступного вигляду:

$$k_{\text{ПП1-2}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{n_1^2 \varepsilon_2}{n_1^2 + \varepsilon_2}} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{n_1^2 \varepsilon_2}{n_1^2 + \varepsilon_2}} \quad (9)$$

де ε_2 – діелектрична провідність металу, яка в даному випадку може вважатися рівною квадрату показника заломлення металу.

Отже, величину діелектричної провідності металу так само можна вважати функцією довжини хвилі падаючого світла. Напрям же хвильового вектора плазмона паралельний площині контакту діелектрика n_1 з металом ε_2 . Значить, для збудження плазмона шляхом ППР необхідно, щоби хвильовий вектор падаючого світла в металі був паралельним поверхні металу (умова, яка задовольняється при ПВВ, коли $k_y \notin \mathbb{R}$). Другою обов'язковою умовою ППР є умова рівності хвильових векторів плазмона та світла, яке падає на метал.

Розглянемо конкретну величину $k_{\text{ПП1-2}}$ у приладі серії «Плазмон». Згідно з літературними даними, при $\lambda=650 \times 10^{-9}\text{м}$ $n_1=1,5991$, а $\varepsilon_2=-12.5397$:

$$k_{\text{ПП1-2}} = \frac{2\pi}{650 \times 10^{-9}} \sqrt{\frac{1,5991^2 \times (-12.5397)}{1,5991^2 - 12.5397}} = 17324700.3 \frac{1}{\text{м}} \quad (10)$$

Отже, для збудження плазмона з такими параметрами необхідно, щоб k_x падаючого світла був рівний $17324700.3 \frac{1}{\text{м}}$. Виходячи з рівнянь (3) та (5):

$$k_x = n_1 \frac{2\pi}{\lambda} \sin \alpha = 17324700.3 = 1,5991 \frac{2\pi}{650 \times 10^{-9}} \sin \alpha \quad (11)$$

тобто:

$$\sin \alpha = \frac{17324700.3 \times 650 \times 10^{-9}}{1,5991 \times 2\pi} = 1.1208 \quad (12)$$

що не видається можливим, оскільки значення функції синуса не може перевищувати одиницю. З метою узагальненої перевірки можливості збудження плазмона на поверхні макроскопічного золота була розроблена відповідна математична модель, на основі якої були побудовані графіки на рис. 3.5.

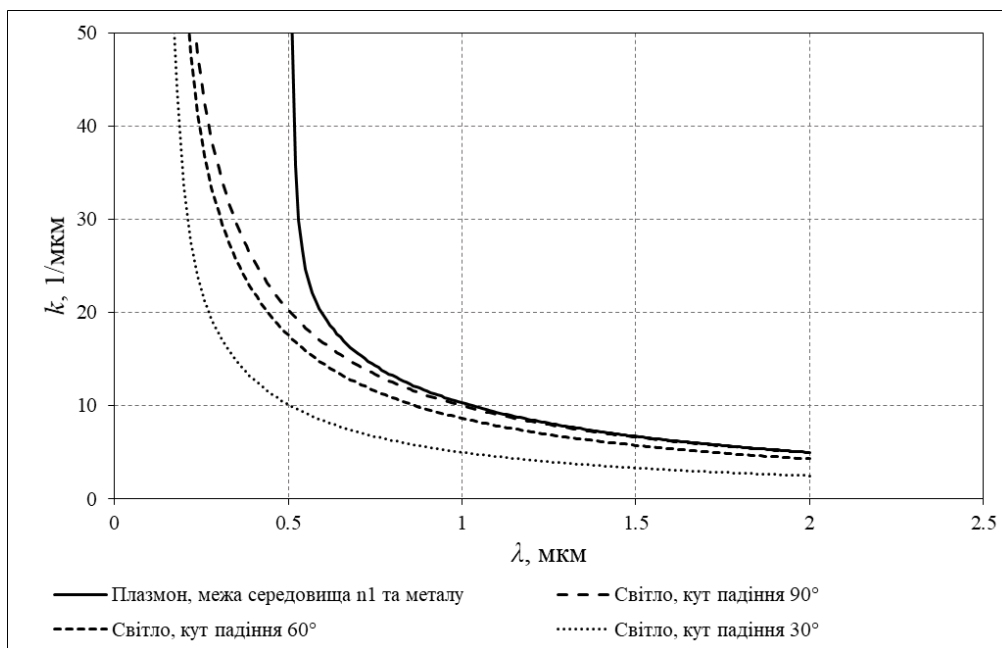


Рис. 3.5. Графіки залежності хвильових векторів ПП (рівняння 9) та падаючого світла (рівняння 11) від довжини хвилі при різних кутах падіння світла. ППР можливий при перетині суцільної лінії з пунктирною

З рис. 3.5 можна побачити, що найсприятливіші з можливих умов для ППР пов'язані з падінням на метал світла великої довжини хвилі під кутом, близьким до 90° . З аналізу рівнянь (9) та (11) можна встановити, що рівність відповідних хвильових векторів ніколи не зможе бути досягнута, оскільки ε металу завжди від'ємна, а n_1^2 завжди додатній; відповідно, значення $\sqrt{\frac{\varepsilon_2}{n_1^2 + \varepsilon_2}} = \sin \alpha$ завжди більше за 1. Це відповідає відсутності спостереження ППР у товстих шарах металів.

Для пояснення того, чому ППР спостерігається лише в тонких шарах металів, необхідне розуміння того, як енергія світла може переходити в енергію ПП. Як згадувалося в розділі 3.1.1, при ПБВ світло поза межею контакту двох середовищ можна описати як згасаючу хвилю, яка поширюється в межах відстані згасання y_e . Ця хвиля має горизонтальний напрям поширення, тож за наявності в

межах відстані згасання u_e іншої межі метал-діелектрик, де будуть задоволені всі умови ППР, енергія хвилі буде поглинена плазмоном. Оскільки умова рівності хвильових векторів залежить від α (див. рівняння 11), ППР спостерігатиметься лише у певному вузькому діапазоні кутів падіння світла.

Отже, було розглянуто випадок, в якому замість напівнескінченного середовища металу ε_2 з діелектриком n_1 контактує тонка плівка цього ж металу (в приладах серії «Плазмон» її товщина складає близько 50 нм). З протилежного боку цієї плівки знаходитиметься діелектрик n_3 , за який було прийнято воду. В цьому випадку поверхневі плаزمони можуть існувати як на межі n_1 - ε_2 , так і на межі ε_2 - n_3 , а хвильовий вектор ПП на межі ε_2 - n_3 розраховувався наступним чином:

$$k_{\text{ПП2-3}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_2 n_3^2}{\varepsilon_2 + n_3^2}} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\varepsilon_2 n_3^2}{\varepsilon_2 + n_3^2}} \quad (13)$$

Відповідно, рис. 3.5 був доповнений додатковим графіком, наведеним на рис. 3.6:

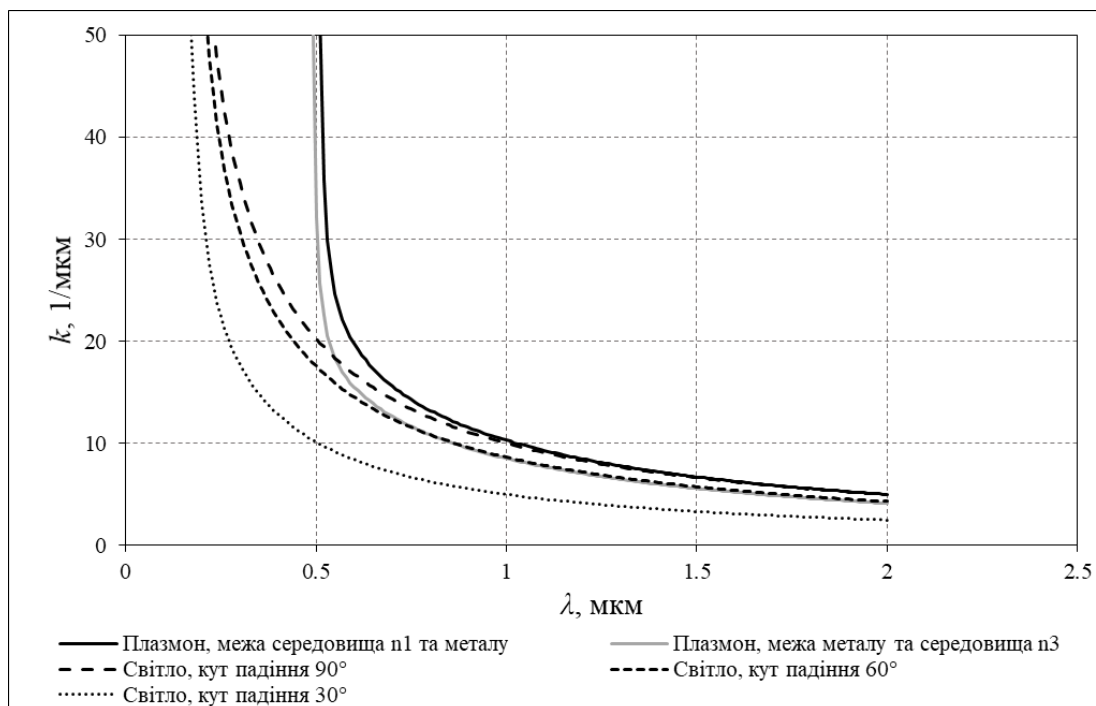


Рис. 3.6. Графіки залежності хвильових векторів ПП (рівняння 9 та 13) та падаючого світла (рівняння 11) від довжини хвилі при різних кутах падіння світла. ППР можливий при перетині суцільної лінії з пунктирною

Як можна побачити з рис. 3.6, поверхневий плазмон може бути збуджений шляхом ППР на тій поверхні металевої плівки, що межує з діелектриком n_3 . Для проходження ППР необхідно освітити таку плівку зі сторони діелектрика n_1 світлом довжиною хвилі 540-550 нм під кутом 90° (паралельно до поверхні металу, що на практиці неможливо) або довжиною хвилі 800-810 нм під кутом 60° . В приладах серії «Плазмон» (650 нм) згідно з рівністю $k_x = k_{\text{ПП}2-3}$ (рівняння 11 та 13) ППР може бути спостережений під кутом $63,952^\circ$, коли діелектриком n_3 є вода ($n_3=1,3313$). Кут ППР при детекції дволанцюгової ДНК ($n_3=1,456$) є натомість $86,816^\circ$.

З визначенням кута ППР була отримана можливість розрахувати довжину згасання електричного поля світла в діелектрику n_3 . Підстановка в рівняння (8) цього кута та інших значень, актуальних для спектрометрів «Плазмон»

($\lambda=650 \times 10^{-9}\text{м}$, $n_1=1,5991$, $n_3=1,456$) дає результат близько 157,9 нм, що відповідає довжині 478-основного олігонуклеотида, розташованого перпендикулярно до сенсорної поверхні ППР. Отже, детекція менших олігонуклеотидів (наприклад, ДНК-мішені 80-mer BCR-ABL) буде пов'язана з меншою чутливістю відповідного ППР-біосенсора.

3.1.3. Вплив НЧЗ на аналітичні характеристики ППР-біосенсора.

Природно, що в реальності олігонуклеотидні зонди та мішені не завжди займатимуть лінійне вертикальне положення; крім того, велика довжина ДНК-зонда означає зростання стеричних перешкод для специфічної гібридизації з мішенню та зростання неспецифічного сенсорного відгуку [139]. ППР-детекція коротших ДНК-мішеней можлива у випадку посилення поля ПП у безпосередній близькості до сенсорної поверхні, наприклад, посередництвом його зчеплення з полем ЛПП наночастинки золота (НЧЗ):

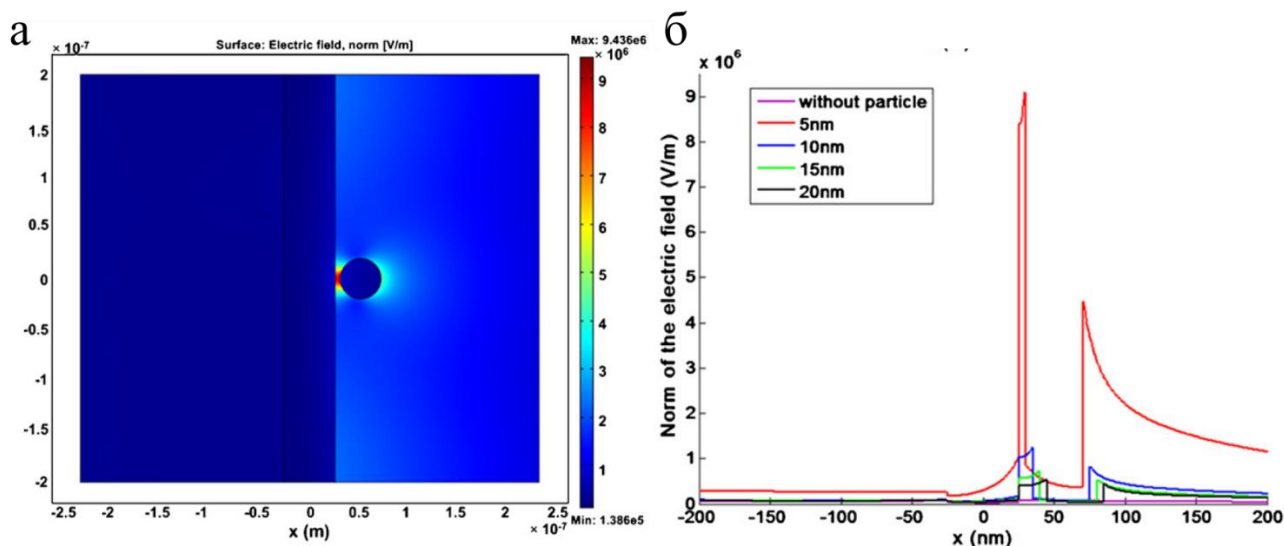


Рис. 3.7. *а* – візуалізація зчеплення електричних полів ПП та ЛПП з багатократним зростанням напруженості поля поруч із НЧЗ; *б* – графіки залежності напруженості електричного поля від відстані до чутливої поверхні ППР. Різні кольори відповідають різним відстаням між чутливою поверхнею ППР та наночастинкою [140]

Саме використанню цього ефекту для покращення аналітичних характеристик гібридизаційних ППР-біосенсорів присвячена дана робота. За даними Zeng та ін., електричне поле на поверхні сенсора посилюється тим більше, що ближче до неї знаходяться наночастинки золота, а обсяг посилення може складати до 86,3 разів порівняно з відсутністю НЧЗ (рис. 3.7). Саме такі умови створюються на поверхні запропонованої біосенсорної системи при утворенні сендвіч-структур та осіданні НЧЗ з їхнього складу на чутливу поверхню ППР під дією сили тяжіння.

Отже, відстань згасання електричного поля НЧЗ-вмісної біосенсорної системи складає до 5 нм, що робить її більш придатною для детекції ДНК-мішені 80-mer BCR-ABL (довжиною 26,4 нм), ніж попередньо розглянуті в цьому розділі методи. Зменшення відстані між чутливою поверхнею ППР та НЧЗ з 26,4 нм до 5

нм можливе через падіння НЧЗ на чутливу поверхню під дією сили тяжіння протягом стоп-інкубації до моменту стеричного контакту між моношаром МСН чутливої поверхні ППР та моношаром блокувальних молекул поверхні НЧЗ (МСН та LA).

Як було сказано на початку розділу, з наведених даних також можливо розрахувати значення ефективності гібридизації біосенсорної системи. У традиційних ДНК-біосенсорах відповідне значення розраховується як співвідношення відгуку біосенсора на гібридизацію ДНК до відгуку біосенсора на іммобілізацію ДНК-зондів, а його фізичний сенс полягає у відсотковій кількості ДНК-зондів на поверхні біосенсора, які гібридизувалися з ДНК-мішенями після введення певного досліджуваного зразка.

У випадку НЧЗ-вмісної біосенсорної системи ефективністю гібридизації можна визначити відношення кількості НЧЗ, зв'язаних із чутливою поверхнею ППР-сенсора, до максимально можливої кількості зв'язаних із нею НЧЗ. Задача з визначення цього значення є менш прямолінійною, бо спектрометр ППР реєструє приєднання до своєї чутливої поверхні наночастинок золота опосередковано через посилення електричного поля в найближчих 5 нм, і відповідно – пропорційного збільшення сприйнятого показника заломлення всіх молекул, які знаходяться у цьому проміжку. Абсолютна більшість таких молекул – це МСН та ДНК-зонди *mod-Ph*, іммобілізовані на чутливій поверхні ППР. Отже, шляхом визначення сенсорного відгуку на іммобілізацію цих молекул та помноження його на 86,3 були отримані максимально можливі відгуки на НЧЗ у складі нанорозмірних сендвіч-структур на сенсорній поверхні:

$$S_{max} = 86,3 \times (S_{mod-Ph} + S_{МСН}) \quad (14)$$

, де S_{max} – максимальний відгук на НЧЗ, S_{mod-Ph} – відгук на іммобілізацію mod-Ph, S_{MCH} – відгук на іммобілізацію MCH.

Значення S_{max} можуть бути використані для визначення ефективності гібридизації наступним чином:

$$C_{hybr} = S_{AuNPs}/S_{max} \quad (15)$$

, де C_{hybr} – ефективність гібридизації, $S_{HЧЗ}$ – відгук на введення AuNP-SH-DP.

3.1.4. Підсумки розділу 3.1. У результаті проведеної роботи з математичного моделювання фізичних процесів, на яких засновується пропонована гібридизаційна ППР-біосенсорна система для детекції олігонуклеотидної послідовності гена *BCR-ABL1*, були отримані алгоритми обчислення відгуку спектрометрів ПБВ та ППР в оптичних одиницях та в кутових градусах. Ці алгоритми були використані для підтвердження можливості оптимізації сучасних гібридизаційних ДНК-біосенсорів для детекції маркерів гена *BCR-ABL1* шляхом застосування колоїдних наночастинок золота, в результаті чого досягається багатократне покращення аналітичних характеристик отриманої біосенсорної системи зі зменшенням довжини згасання електричного поля ППР з 157,9 нм (традиційний ППР-біосенсор) до 5 нм (пропонована біосенсорна система). Менша довжина згасання електричного поля ППР у середовищі вимірювальної проточної комірки означає більшу чутливість ППР до зміни показника заломлення тої частини цього середовища, в якій безпосередньо відбуваються процеси гібридизації олігонуклеотидів, та меншу залежність ППР від показника заломлення в товщі вимірювальної проточної комірки, який не є цікавим у контексті гібридизаційного аналізу.

Також був розроблений алгоритм визначення ефективності гібридизації (рівняння 14 та 15), призначений для додаткової порівняльної характеристики пропонованої біосенсорної системи на фоні аналогів.

3.2. Підбір оптимальних умов іммобілізації тіюльованих олігонуклеотидів на чутливій поверхні спектрометра ППР

У термодинамічній системі, якою є проточна сенсорна комірка, значний вплив на ΔG (див. розділ 2.6) та, відповідно, на рівень сенсорного відгуку при гібридизації ДНК справляють стеричні й електростатичні ефекти, викликані високою поверхневою густиною шару зондових олігонуклеотидів. У цій частині роботи був оцінений вплив складу та концентрації буферного розчину для іммобілізації на поверхневу густину ДНК-зондів після їх іммобілізації та на аналітичні характеристики чутливих сенсорних елементів, які були модифіковані з використанням відповідних розчинів.

3.2.1. Дослідження процесів іммобілізації та гібридизації олігонуклеотидів Rh-хромосоми на сенсорній поверхні. Даний розділ присвячений висвітленню результатів досліджень впливу умов іммобілізації ДНК-зонда mod-Rh на його рівень гібридизації з ДНК-мішенями P1 та Bcrex14 на сенсорній поверхні ППР. Для цього був виміряний рівень іммобілізації даних

ДНК-зондів на сенсорній поверхні в середовищі фосфатного буферного розчину KH_2PO_4 (рН 4,0) та цитратного буферного розчину $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (рН 3,0).

Значення відгуків ППР, які були отримані при іммобілізації ДНК-зонда *mod-Ph* на чутливій поверхні ППР у різних буферних розчинах (0,02 М $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,1 М $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,25 М $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,25 М KH_2PO_4 та 0,5 М KH_2PO_4), представлені на рис. 3.8.

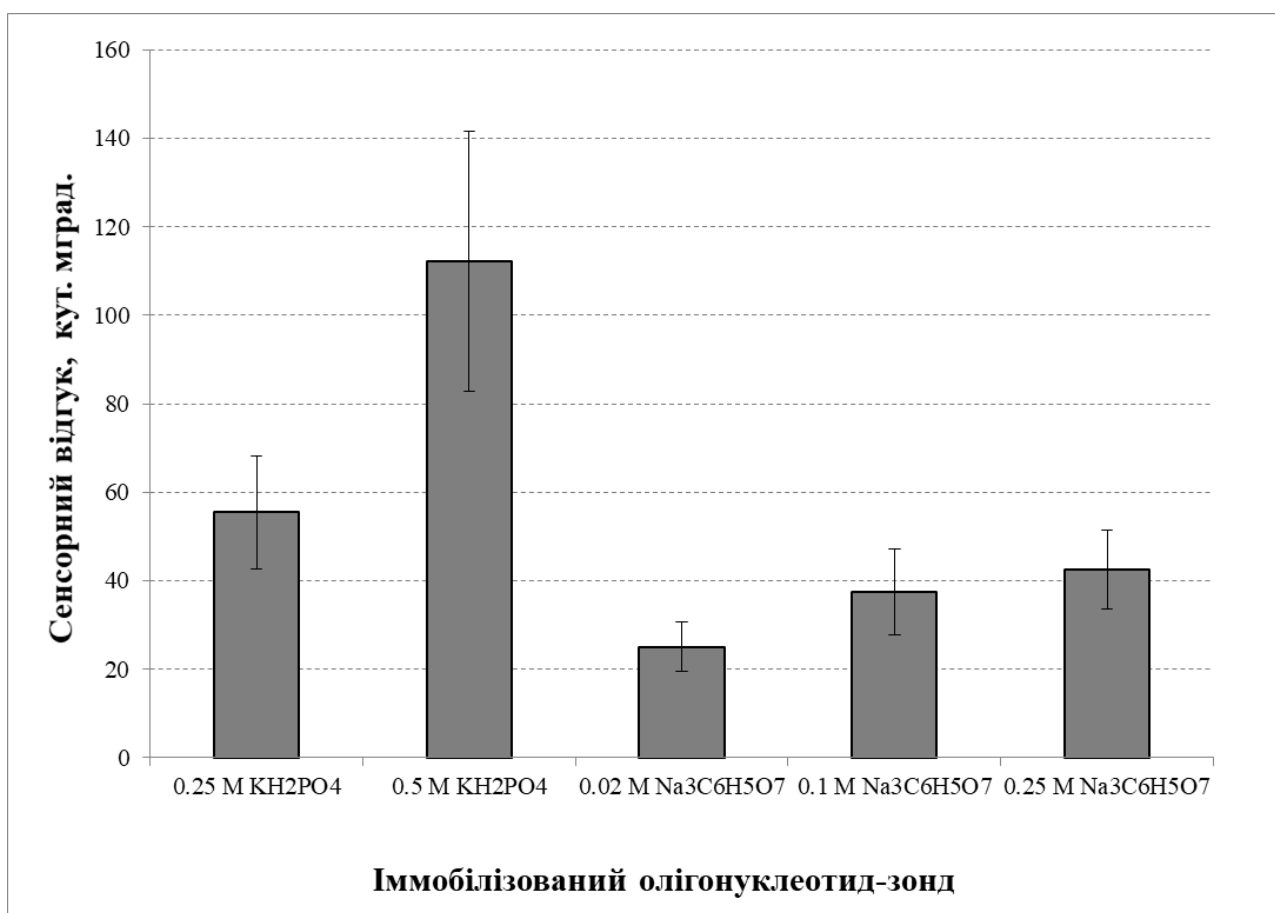


Рис. 3.8. Відгуки ППР, які відображають ефективність іммобілізації ДНК-зондів *mod-Ph* на сенсорній поверхні ППР у середовищах буферних розчинів різного складу та концентрації

Занадто висока поверхнева густина іммобілізованого зонда не призводить до найбільш ефективної гібридизації, оскільки такі ДНК-зонди можуть стерично і

електростатично перешкоджати гібридизації з комплементарними цільовими послідовностями (мішенями) [131]. Отже, біоселективні елементи ППР із меншою кількістю іммобілізованих зондових олігонуклеотидів можуть характеризуватися кращими значеннями селективності й ефективності гібридизації.

Взаємозв'язок рівня гібридизації з концентрацією олігонуклеотидів-мішеней у досліджуваному розчині був оцінений із використанням повністю комплементарної молекули ДНК Р1. Дослідження ефективності гібридизації було проведено для сенсорів з ДНК-зондами іммобілізованими в різних буферних розчинах (0,02 М цитратному розчині, 0,1 М цитратному розчині, 0,25 М цитратному розчині, 0,25 М KH_2PO_4 та 0,5 М KH_2PO_4). Середні значення й стандартні відхилення відповідних даних у кожній серії дослідів зображені на рис. 3.9-3.13.

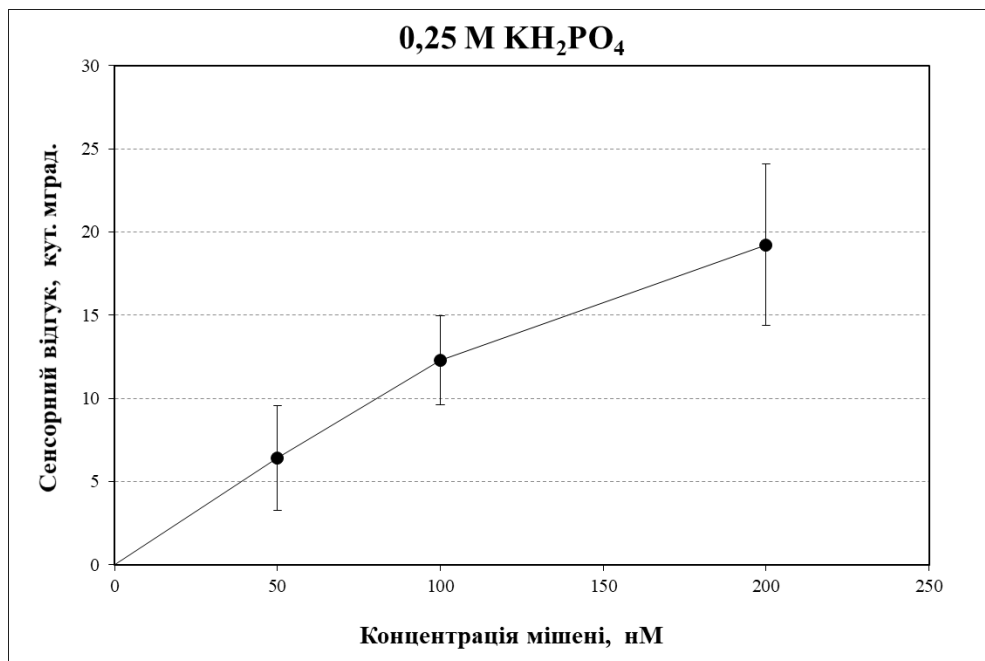


Рис. 3.9. Залежність рівнів гібридизації ДНК mod-Ph із Р1 від концентрації мішені Р1. Середовище іммобілізації mod-Ph – 0,25 М KH_2PO_4

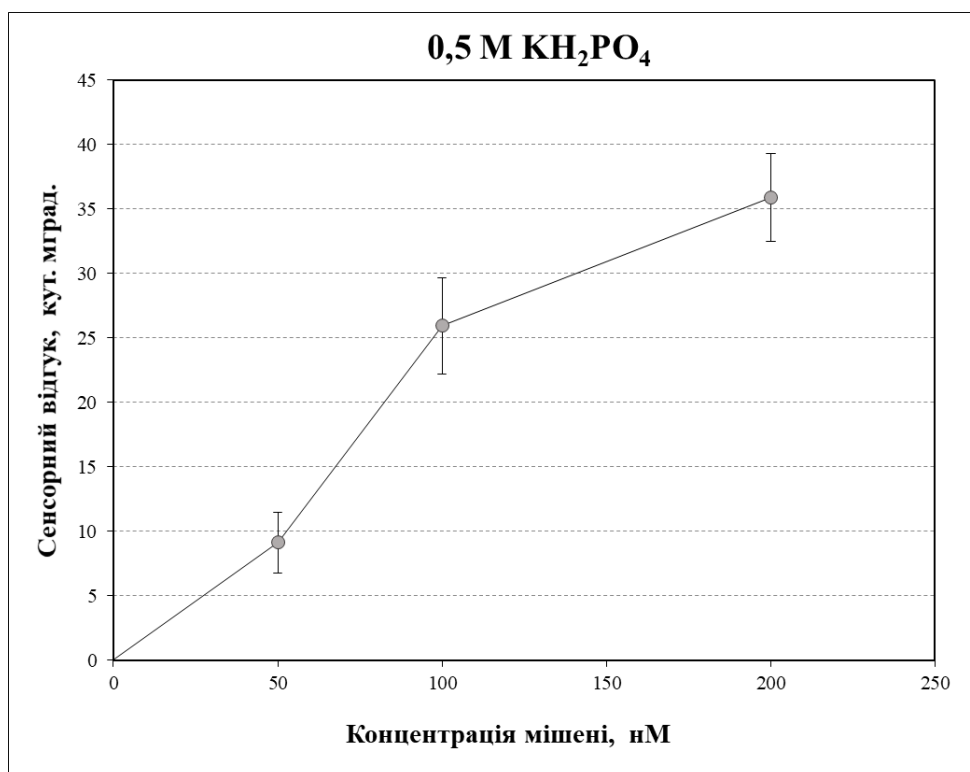


Рис. 3.10. Залежність рівнів гібридизації ДНК mod-Ph із P1 від концентрації мішені P1. Середовище іммобілізації mod-Ph – 0,5 М KH_2PO_4

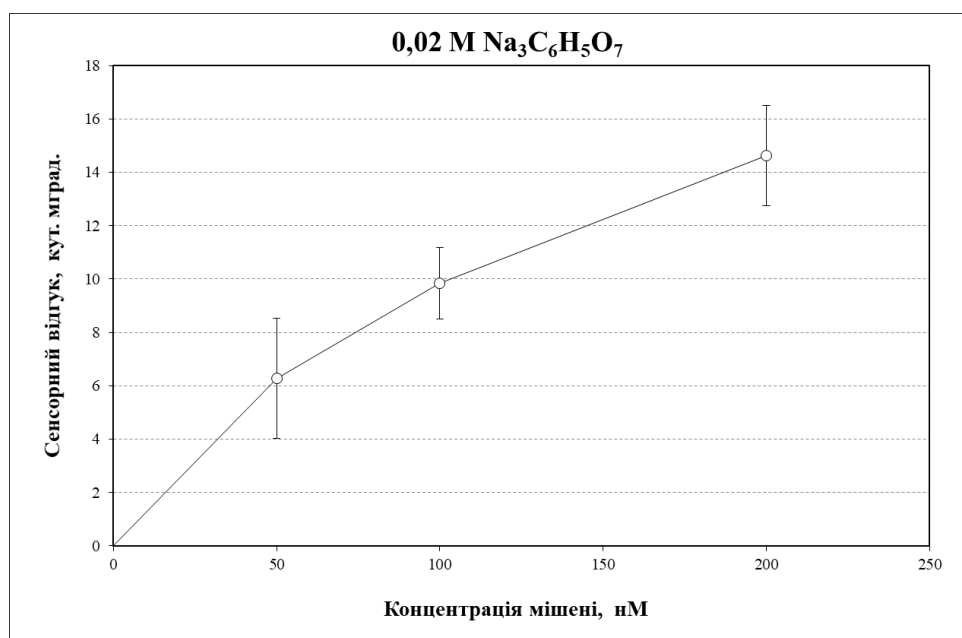


Рис. 3.11. Залежність рівнів гібридизації ДНК mod-Ph із P1 від концентрації мішені P1. Середовище іммобілізації mod-Ph – 0,02 М цитратний буфер

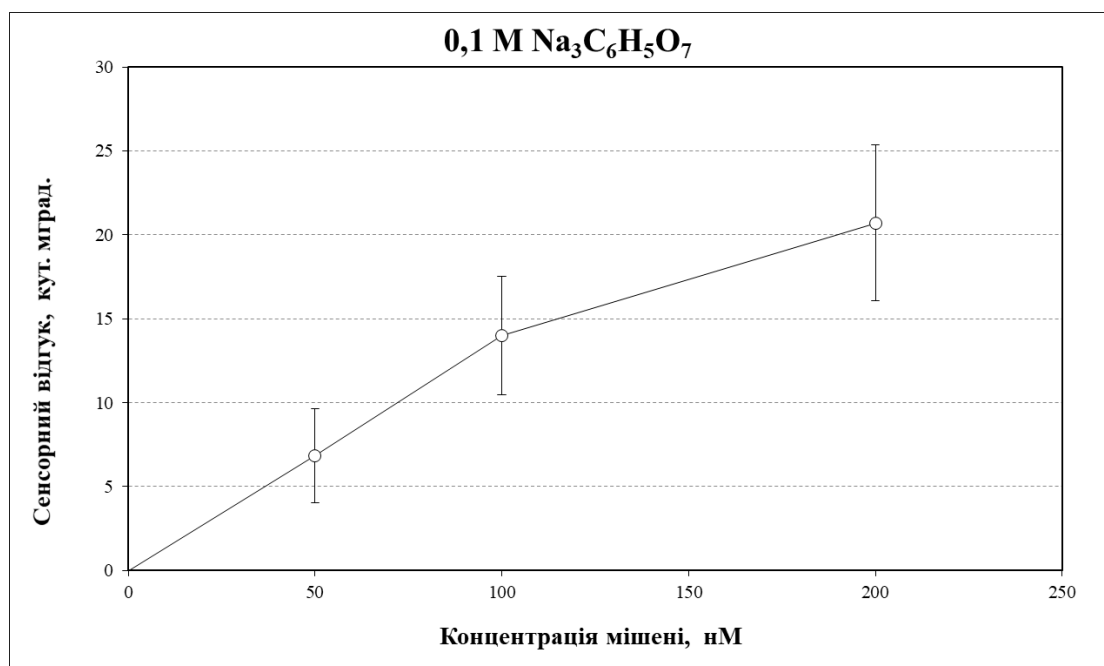


Рис. 3.12. Залежність рівнів гібридизації ДНК mod-Ph із Р1 від концентрації мішені Р1. Середовище іммобілізації mod-Ph – 0,1 М цитратний буфер

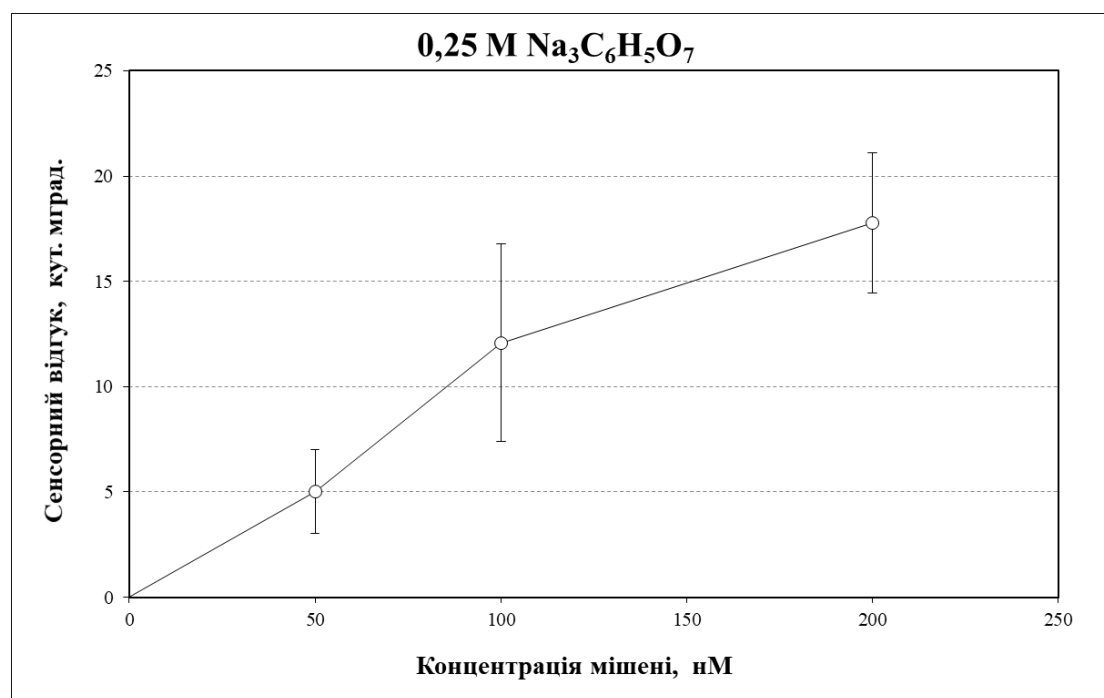


Рис. 3.13. Залежність рівнів гібридизації ДНК mod-Ph із Р1 від концентрації мішені Р1. Середовище іммобілізації mod-Ph – 0,25 М цитратний буфер

Введення в вимірювальну проточну комірку гібридизаційного ДНК-біосенсора зразків мішені P1 із концентраціями від 50 до 200 нМ зумовлює сенсорні відгуки, величина яких майже лінійно залежить від концентрації олігонуклеотида P1 у кожному з п'яти експериментів (для різних іммобілізаційних умов).

Для визначення селективності сенсорних елементів, які були сформовані з застосуванням різних буферних розчинів, проводились вимірювання рівнів гібридизації ДНК-зондів mod-Ph як із повністю комплементарними мішенями (P1), так і з напівкомплементарними мішенями (Vscex14). Для експериментального визначення рівнів селективності сформованих біоселективних елементів, олігонуклеотиди-мішені в концентрації 200 нМ у буферному розчині 2×SSC були введені до вимірювальної проточної комірки гібридизаційного ППР-біосенсора. Отримані експериментальні результати було порівняно з теоретично розрахованими значеннями ΔG відповідних гібридизацій. На рис. 3.14 наведено значення зміни вільної енергії процесу гібридизації зонда mod-Ph із мішенями P1 та Vscex14 розраховані за допомогою веб-сервера DINAMelt [129].

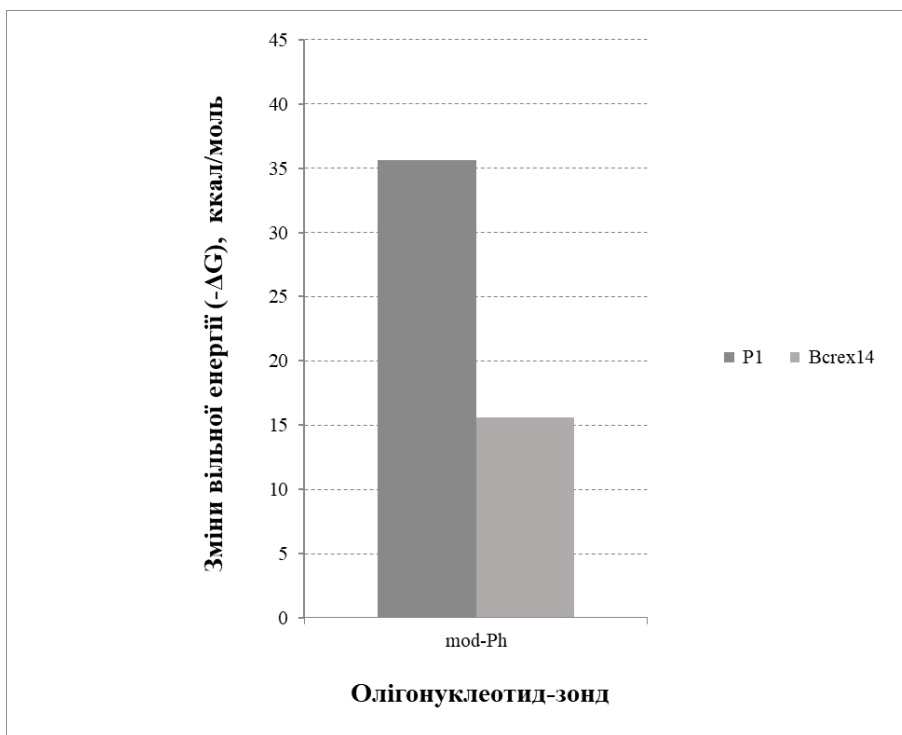


Рис. 3.14. Розраховані значення зміни вільної енергії процесу гібридизації зонда mod-Ph із мішенями P1 та Bcrex14 у середовищі $2\times\text{SSC}$ [129]

Співставлення цих значень зі значеннями ΔG селф-гібридизації або фолдингу кожного з олігонуклеотидів у цій парі (Таблиця 2.1 розділу 2.6) показує, протікання якого серед зазначених процесів є найбільш імовірним. Порівняння ж величин ΔG гібридизації зонда mod-Ph із повністю комплементарною мішенню (P1) та ΔG гібридизації між тим самим зондом і частково комплементарною мішенню (Bcrex14) свідчить про те, наскільки можливим є розрізнення цих мішеней гібридизаційним ДНК-сенсором, модифікованим відповідним зондом. Співставлення значень ΔG попарної гібридизації mod-Ph із P1 або Bcrex14 зі значеннями ΔG з таблиці 2.1 (розділ 2.6) дає змогу зробити висновок про значну перевагу гібридизації між зондами та мішенями над небажаною гібридизацією між однаковими молекулами (селф-гібридизацією) та над небажаним утворенням водневих зв'язків між різними нуклеотидами однієї молекули (фолдингом) в умовах експерименту.

Значення, наведені на рисунку 3.14, підтвердили можливість дискримінації повністю та частково комплементарних ДНК-мішеней іммобілізованими олігонуклеотидами-зондами mod-Ph. Значення ΔG гібридизації цього зонда з ДНК-мішенню P1 (-35,6 ккал/моль) є більш ніж вдвічі більшим за ΔG відповідної його взаємодії з мішенню Bcrex14 (-15,6 ккал/моль); відмінність між цими значеннями сягає 20 ккал/моль. Це зумовлює сприятливіші термодинамічні умови для проходження гібридизаційної взаємодії mod-Ph із P1, отже, в сенсорній комірці її кількість таких ДНК-дуплексів переважатиме над кількістю дуплексів mod-Ph із BCRex14. Виходячи з цього, очікуваним результатом серії експериментів з оцінки селективності ППР-біосенсора, біофункціоналізованого зондами mod-Ph, є більший сенсорний відгук при введенні в вимірювальну проточну комірку розчину мішені P1.

Результати вимірювання рівнів сенсорних відгуків ППР на введення 200 нМ розчинів мішеней P1 і Bcrex14 у вимірювальні проточні комірки п'ятих варіантів сенсорних елементів представлені на рис. 3.15.

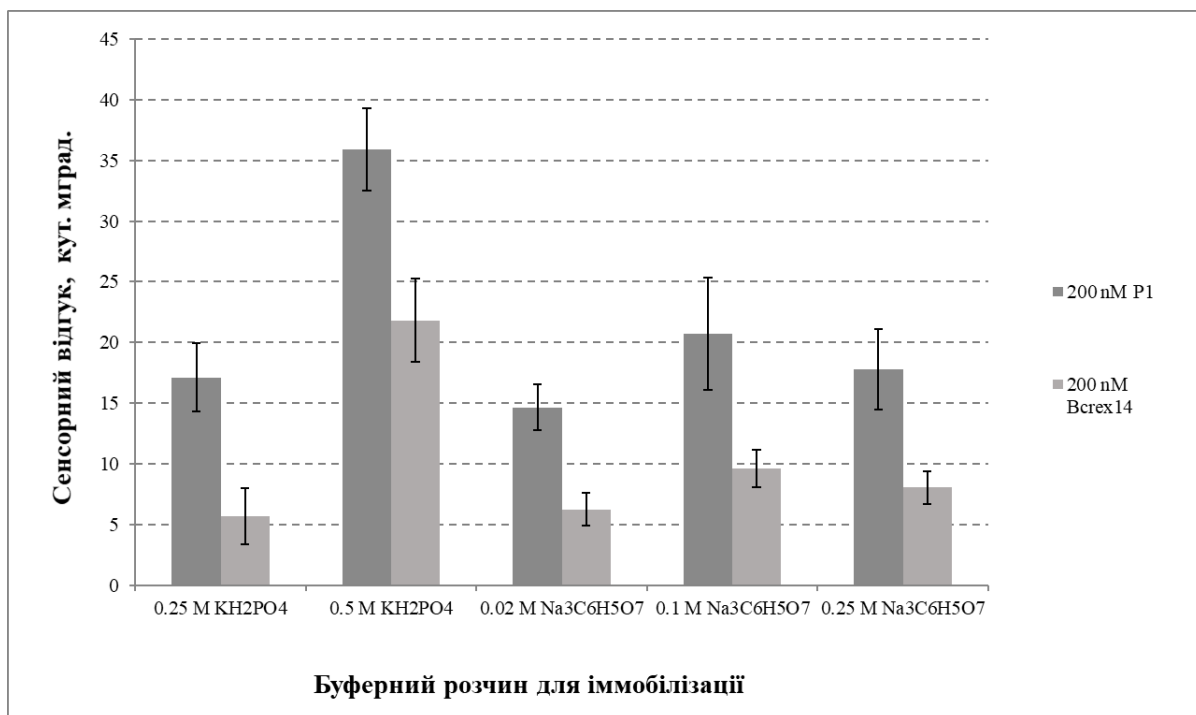


Рис. 3.15. Рівні сенсорних відгуків ППР, які відображають процеси гібридизації олігонуклеотидів-мішеней (200 нМ) у залежності від складу та концентрації буферного розчину для іммобілізації mod-Ph

Отримані дані свідчать про те, що модифікація чутливої поверхні ППР-спектрометра ДНК зондами mod-Ph у середовищі будь-якого серед досліджених буферних розчинів дозволяє розрізняти зразки 200 нМ мішеней P1 та Bcrex14. Результати розрахунків (рис. 3.14) було підтверджено експериментально отриманими значеннями (рис. 3.15), що дає можливість встановити, що гібридизація з меншою величиною ΔG спричиняє більші відгуки ППР-біосенсора.

3.2.2. Визначення експлуатаційних характеристик різних варіантів біоселективних елементів на основі mod-Ph. Виходячи з отриманих результатів по вивченню впливу буферного середовища на ефективність іммобілізації зондів та подальшої гібридизації цільової мішені з цими зондами, були обчислені

величини ефективності гібридизації, представлені в таблиці 3.1. Фізичний сенс даних значень – це частка іммобілізованих ДНК-зондів, які були гібридизовані (утворили дволанцюгові структури) з ДНК-мішенями.

Таблиця 3.1

Ефективність іммобілізації зондів mod-Ph та їх гібридизації з Р1 у залежності від середовища іммобілізації mod-Ph на чутливій поверхні ППР

Іммобілізаційний буферний розчин	Рівень іммобілізації 1 мкМ зонда mod-Ph, кут. град., $\times 10^{-3}$	Рівень гібридизації 200 нМ мішені Р1, кут. град., $\times 10^{-3}$	Ефективність гібридизації, %
0,25 М KH_2PO_4	55,5	19,2	34,6
0,5 М KH_2PO_4	112,3	35,9	31,9
0,02 М цитратний буфер	25,1	14,6	58,1
0,1 М цитратний буфер	37,5	20,7	55,2
0,25 М цитратний буфер	42,5	17,8	41,9

Оцінка чутливості ППР-біосенсора на основі зондів mod-Ph, була проведена з використанням ДНК-мішеней Р1 відомих концентрацій. Найменшою концентрацією Р1 для досліджень було взято таку концентрацію, за якої був відгук ППР-сенсора, втричі більший за шум базової лінії. Таке значення для мішені Р1 становило 50 нМ та було визначено межею детектування ППР-біосенсора на основі зонда mod-Ph. Найбільшою концентрацією Р1 для дослідження становило 200 нМ. Проміжним значенням концентрації ДНК-мішені Р1 було обрано 100 нМ.

Шляхом лінійної апроксимації калібрувальних кривих, що наведені на рис. 3.9-3.13, обчислювались коефіцієнти чутливості біосенсорів, які були модифіковані ДНК-зондами mod-Ph у різних середовищах (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Рівні гібридизації mod-Ph і різних концентрацій P1 та розрахована чутливість ППР-біосенсорів на основі різних варіантів іммобілізації mod-Ph

Іммобілізаційний буферний розчин	Рівень гібридизації з P1, кут. мград			Чутливість, кут. мград/нМ
	50 нМ	100 нМ	200 нМ	
0,25 М KH_2PO_4	6,4	12,3	19,2	0,103
0,5 М KH_2PO_4	9,1	25,9	35,9	0,195
0,02 М цитратний буфер	6,3	9,8	14,6	0,081
0,1 М цитратний буфер	6,8	14	20,7	0,112
0,25 М цитратний буфер	5	12,1	17,8	0,096

Аналіз даних (таблиця 3.2) гібридизації mod-Ph із P1 показав, що найбільша чутливість притаманна біоселективним елементам, біофункціоналізованим в середовищі буферного розчину 0,5 М KH_2PO_4 та дорівнювала 0,195 кут. мград/нМ. Для решти сенсорних елементів чутливість до мішені P1 була в діапазоні від 0,08 до 0,12 кут. мград/нМ.

Значення селективності – відношення рівнів специфічної та неспецифічної гібридизації мішеней із зондами – для кожного варіанту ППР-біосенсора були отримані як відповідні співвідношення між рівнями відгуків на гібридизації ДНК-зонда mod-Ph із мішенню P1 і того ж зонда mod-Ph із Bcrex14 (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Значення селективності досліджених модифікацій ППР-біосенсора при розрізненні мішеней P1 та Bcrex у відносних одиницях

	Середовище іммобілізації зонда mod-Ph				
	0,25 М KH ₂ PO ₄	0,5 М KH ₂ PO ₄	0,02 М цитратний буфер	0,1 М цитратний буфер	0,25 М цитратний буфер
Відношення рівня гібридизації mod-Ph із P1 до рівня гібридизації mod-Ph із Bcrex14	3,03	1,645	2,342	2,162	2,209

Високі значення селективності свідчать про кращу здатність біосенсора до розрізнення повністю й частково комплементарних ДНК-мішеней. Селективність ППР-біосенсора означає його здатність до розрізнення зразків, у яких наявні чи відсутні послідовності ДНК Ph-хромосоми.

У досліджених варіантах біоселективних елементів, модифікованих зондами mod-Ph, найбільша різниця між рівнями неспецифічної та специфічної гібридизації спостерігалась для сенсорів виготовлених при використанні 0,25 М KH₂PO₄ для іммобілізації зондів mod-Ph. Використання цієї модифікації ППР-біосенсора дозволяє розрізняти ДНК-мішені P1 та Bcrex14 із селективністю, рівною 3,03 відносним одиницям. Отже, була спостережена закономірність, яка полягала в більшій величині селективності сенсорних елементів ППР, чим більша ефективність гібридизації (табл. 3.3).

3.2.3. Підсумки розділу 3.2. Результатом висвітлених у цьому розділі досліджень є встановлення того, що точне детектування послідовностей ДНК Рн-хромосоми найперспективнішими з досліджених ППР-біосенсорів є ті, що модифіковані ДНК-зондами mod-Rh у середовищі 0,25 М KH_2PO_4 , тоді як буферний розчин 0,5 М KH_2PO_4 рекомендований для виготовлення сенсорів для менш селективної детекції малих концентрацій ДНК-мішеней у досліджуваних зразках.

Зроблено висновок, що з огляду на ефективність гібридизації та селективність оптимальним середовищем для біофункціоналізації чутливої поверхні ППР-біосенсора ДНК-зондами є розчин 0,25 М KH_2PO_4 . Оцінено, що межею детектування послідовності гена *BCR-ABL1* (олігонуклеотид Р1) всіма дослідженими модифікаціями ППР-біосенсорів (традиційної конструкції) є 50 нМ.

3.3. Розробка підходів підвищення чутливості та селективності ДНК-біосенсорів за рахунок детекції послідовностей ДНК модифікованих НЧЗ

Наступна частина нашої роботи була зосереджена на розробці підходів покращення селективності та чутливості ДНК-біосенсорів, за рахунок детекції послідовностей ДНК, попередньо модифікованих НЧЗ. Середній діаметр модифікованих наночастинок золота має становити від 10 до 20 нм. Використання НЧЗ такого розміру зумовлене двома факторами. По-перше, НЧЗ,

синтезовані методом Туркевича з середнім діаметром ~ 20 нм або більше, зазвичай є високо полідисперсними. Це може значно ускладнити вимірювання їх концентрації, оскільки молярний коефіцієнт екстинкції розраховується з використанням лише середнього діаметра наночастинок (див. розділ 2.5) [121]. По-друге, використання НЧЗ діаметром менше 4 нм, які мають цитотоксичні та генотоксичні властивості, є неприйнятним з точки зору біологічної безпеки [141].

Зазвичай HAuCl_4 широко використовується як джерело атомів Au для синтезу НЧЗ; втім, між різними науковими роботами існує значна розбіжність у розмірних характеристиках синтезованих НЧЗ [57,115,116,142]. Синтез НЧЗ зі сполуки AuCl_3 може дати можливість більшого контролю параметрів синтезу НЧЗ з отриманням НЧЗ меншої дисперсності та більшої біобезпечності, ніж НЧЗ, синтезовані з HAuCl_4 .

Ще однією з причин таких нестабільних результатів може бути розкладання HAuCl_4 під час зберігання з утворенням нанорозмірних кластерів золота. Перевищення часу зберігання цієї солі зумовлюється тим, що HAuCl_4 часто комерційно доступний у обсягах не менше 1 грама. Наукова лабораторія з невеликою продуктивністю наночастинок золота може бути схильна до закупівлі меншої партії сполуки-попередника, наприклад, AuCl_3 [143,144]. Виходячи з цього, було вирішено дослідити вплив обох методів синтезу НЧЗ на їх кінцевий розмір.

3.3.1. Розробка та оптимізація методики синтезу монодисперсних НЧЗ.

Після синтезу НЧЗ за методом, описаним у розділі 2.5, діаметр отриманих НЧЗ був оцінений методом динамічного розсіювання світла з використанням системи фотонної кореляційної спектроскопії серії Malvern Zetasizer Nano. На рис. 3.16 показано розподіл розмірів НЧЗ, синтезованих різними методами, як функцію діаметра частинок, а також ТЕМ-зображення НЧЗ, отриманих шляхом

цитратного відновлення AuCl_3 , як без, так і з додатковим 10-хвилинним кип'ятінням.

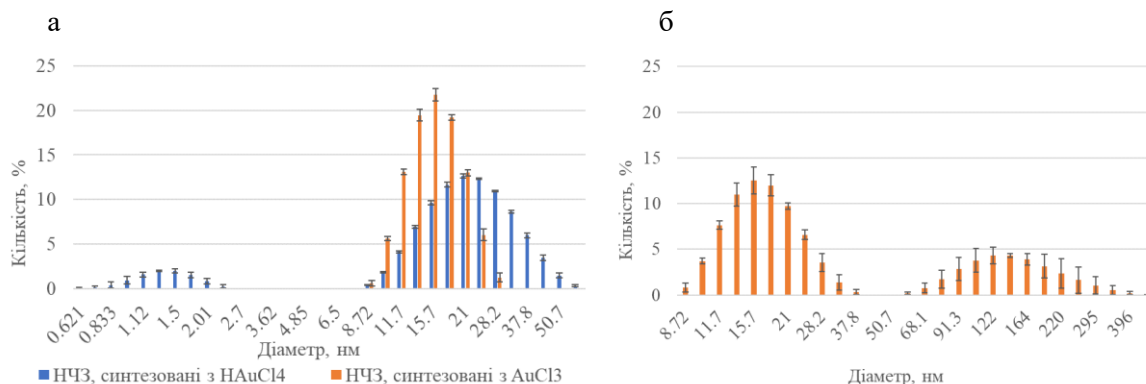


Рис. 3.16. *а* – Розподіл діаметрів частинок НЧЗ, синтезованих з різних солей золота, побудований як функція діаметра частинок; *б* – Розподіл діаметрів частинок НЧЗ, синтезованих з AuCl_3 з додатковими 10 хвилинами кип'ятіння. Вісь X: діаметр НЧЗ (нм); вісь Y: відносна інтенсивність розсіювання світла, що вноситься НЧЗ заданого діаметра

З розподілу розмірів на рисунку 3.16а видно, що НЧЗ, синтезовані з HAuCl_4 , відрізняються від тих, що описані Dong та ін. [116]. Зокрема, частинки демонструють більшу полідисперсність, більший середній діаметр та додатковий другий пік у діапазоні діаметрів до 4 нм. Ця гетерогенність, разом із потенційною токсичністю, пов'язаною з надмалими наночастинками, робить ці НЧЗ непридатними для включення до біосенсорної системи. Навпаки, заміна HAuCl_4 на AuCl_3 призвела до отримання монодисперсних НЧЗ з розподілом розмірів, який близько відповідає літературним даним; зокрема, середній діаметр частинок становив 16,77 нм [117]. Відповідно, ці НЧЗ були обрані для включення до біосенсорної системи з метою покращення її аналітичних характеристик.

Також було виявлено, що якщо реакційну суміш не охолоджувати одразу після початку переходу кольору від чорного до червоного, у реакційній посудині

утворюється видимий синій осад (рис. 3.17). Результати фотонно-кореляційної спектроскопії для цього колоїду НЧЗ представлені на рисунку 3.16b. З діаграми видно, що цей зразок відрізнявся наявністю фракції частинок діаметром 50–450 нм. Це можна пояснити тим, що за високих температур електростатичні взаємодії між НЧЗ та карбоксильними групами лимонної кислоти послаблюються, що призводить до зниження колоїдної стабільності таких НЧЗ та їх коалесценції у більші агрегати золота, які мають характерний синій колір. Простий спосіб запобігти цьому ефекту – припинити кип'ятіння передчасно (тобто, поки колоїд ще темний), а потім інкубувати колоїд у темряві при 22 °С протягом 96 годин, щоб забезпечити відновлення всіх іонів Au^{3+} , які могли залишитися в розчині.

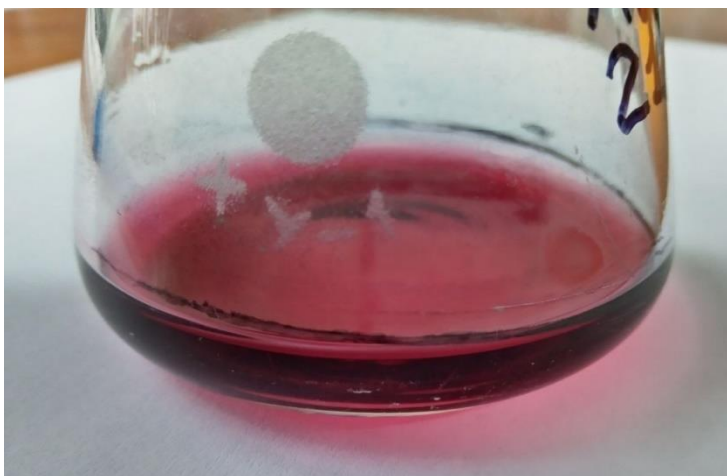


Рис. 3.17. Видимий синій осад над меніском колоїду НЧЗ після надмірного кипіння

Для обрання оптимального способу синтезу НЧЗ було проведене детальне дослідження розмірного розподілу колоїдів НЧЗ, синтез яких був зупинений в один із трьох моментів часу:

- Розчин починає змінювати колір з чорного на червоний;
- Розчин повністю змінює колір з чорного на червоний;

- Розчин повністю змінює колір з чорного на червоний і продовжує кипіння протягом 30 секунд.

Колоїди НЧЗ, синтезовані кожним із трьох наведених способів, були досліджені методом фотонної кореляційної спектроскопії. Результати цих вимірювань представлені на рис. 3.18. З усіх досліджених НЧЗ, ті, в яких кипіння було припинено найраніше, були визначені як найменш полідисперсні. Саме вони були відібрані для модифікації тіольованими олігонуклеотидами, щоб перевірити ефективність синтезованих НЧЗ у посиленні сигналу ППР.

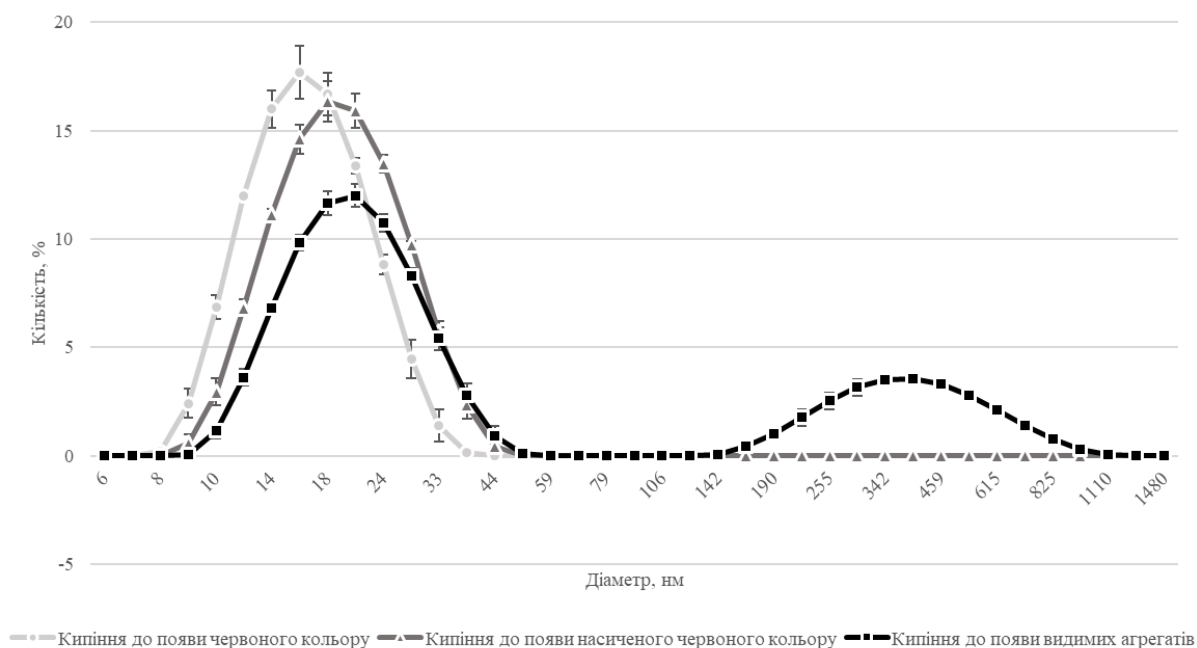


Рис.3.18. Розподіл за розмірами зразків НЧЗ, синтезованих з різною тривалістю кипіння

та χ , а саме при прямій ППР-детекції олігонуклеотидів, модифікованих НЧЗ. Для цього до НЧЗ були ковалентно приєднані зондові олігонуклеотиди, комплементарні до зондової молекули ДНК, іммобілізованої на поверхні сенсора ППР-спектрометра.

Принцип, за яким ППР-біосенсор дозволяє селективно розрізняти кілька ДНК-мішеней за допомогою одного зондового олігонуклеотида, безпосередньо пов'язаний з вільною енергією взаємодії між цими молекулами. Згідно з другим законом термодинаміки, серед усіх можливих фізичних процесів більш імовірно відбуваються ті, які викликають більш значне зниження вільної енергії Гіббса (ΔG) у системі [129].

Згідно з дослідженнями гібридизації ДНК, сприятливіші умови для неї пов'язані з вищою концентрацією позитивно заряджених іонів, які блокують негативний заряд фосфатних залишків ланцюгів ДНК та нівелюють електростатичний бар'єр для їх конвергенції та утворення водневих зв'язків між азотистими основами [145]. Цей ефект чисельно відображено в таблиці 3.4, де описано значення ΔG гібридизації ДНК у буферних розчинах, що використовувалися в цьому дослідженні. Всі розрахунки проводилися для умов 22 °C та концентрації олігонуклеотидів 100 нМ.

Таблиця 3.4

Значення зміни вільної енергії Гіббса досліджуваних пар олігонуклеотидів, розраховані для буферних розчинів SSC різної кратності.

Пари олігонуклеотидів	ΔG у 0.1×SSC	ΔG у 0.2×SSC	ΔG у 2×SSC
mod-Ph та SH-DP	-5.4	-6	-8
mod-Ph та SH-P1	-28.6	-30.3	-36

З наведених вище значень ми робимо висновок, що гібридизація mod-Ph та SH-P1 переважає над аналогічним процесом між mod-Ph та SH-DP, а найвищі значення ΔG досягаються в середовищі 2×SSC, що теоретично дозволить розрізняти сигнали від цих молекул з найвищою специфічністю.

Наступна експериментальна робота в межах цього розділу була розділена на два основні етапи: мінімізація неспецифічного сигналу біосенсора на основі взаємодії НЧЗ із сенсорною поверхнею ППР, та визначення чутливості та специфічності біосенсора при розрізненні зразків SH-P1 або SH-DP, модифікованих НЧЗ, в однакових концентраціях.

3.3.2. Розробка підходу захисту від агрегації наночастинок золота модифікованих олігонуклеотидами спеціальними блокувальними молекулами. Як показали результати попередніх дослідів, наночастинок можуть бути схильні до неспецифічної агрегації на поверхні сенсора, що негативно впливає на експлуатаційні характеристики біосенсора [57,146,147]. Агрегація (кластеризація) металевих наночастинок зумовлена силами Ван-дер-Ваальса, що виникають внаслідок спонтанної делокалізації електронів атомів поверхні наночастинок, що призводить до виникнення дипольного моменту в таких атомах та каскадної поляризації сусідніх атомів на відстані від 0,2 до 0,5 нм [148]. Слабке електростатичне притягування, яке виникає в таких умовах між наночастинками, що зближуються, призводить до їх незворотного злиття зі зміною їх хімічних та фізичних властивостей. Способи запобігання процесам агрегації наночастинок включають модифікацію їх поверхні щільним шаром незаряджених полімерів, зміна конформації яких під час зближення двох наночастинок є енергетично не вигідною (стерична стабілізація). Заряджені молекули, іммобілізовані на поверхні наночастинок, можуть виступати ще одним джерелом сил відштовхування між ними (електростатична стабілізація). Найцікавішим та найперспективнішим підходом є поєднання цих двох методів, яке називається електростеричною стабілізацією наночастинок [147].

Наразі MCH та LA часто використовуються в біотехнології при роботі з золотом для захисту його вільної поверхні від небажаної взаємодії з іншими

молекулами в середовищі. Відповідно, на першому етапі роботи з ППР-біосенсором необхідно було визначити оптимальну концентрацію МСН та LA в розчині для модифікації цитрат-зв'язаних НЧЗ, яка б одночасно була достатньо високою для створення стеричних та електростатичних перешкод для неспецифічної взаємодії між НЧЗ, і достатньо низькою, щоб мінімізувати витіснення іммобілізованих молекул ДНК з поверхні наночастинок цими стабілізуючими агентами.

Результати таких експериментів з гібридизації представлені на рис. 3.19 у вигляді сенсограм (графіків відгуку ППР залежно від часу), які відповідають ін'єкції НЧЗ, модифікованих некомплементарними олігонуклеотидами SH-DP, у сенсорну комірку. Графіки показують значний вплив концентрації стабілізуючих агентів не лише на швидкість зростання ППР-сигналу, але й на рівень відгуку сенсора після ін'єкції 8 М сечовини – середовища, яке сприяє дисоціації гібридизованих молекул ДНК, але не впливає на агрегати НЧЗ, що утворюються на поверхні сенсора біоаналізатора. Було показано, що застосування 1 мкМ стабілізуючих агентів недостатньо для запобігання агрегації НЧЗ на поверхні сенсора. Використання 2 мкМ МСН та LA створило достатній захист поверхні НЧЗ для повного усунення їх агрегації. Крім того, отримані результати опосередковано вказують на недостатній внесок заряду ДНК у захист поверхні НЧЗ та перешкоджання їх неспецифічній агрегації.

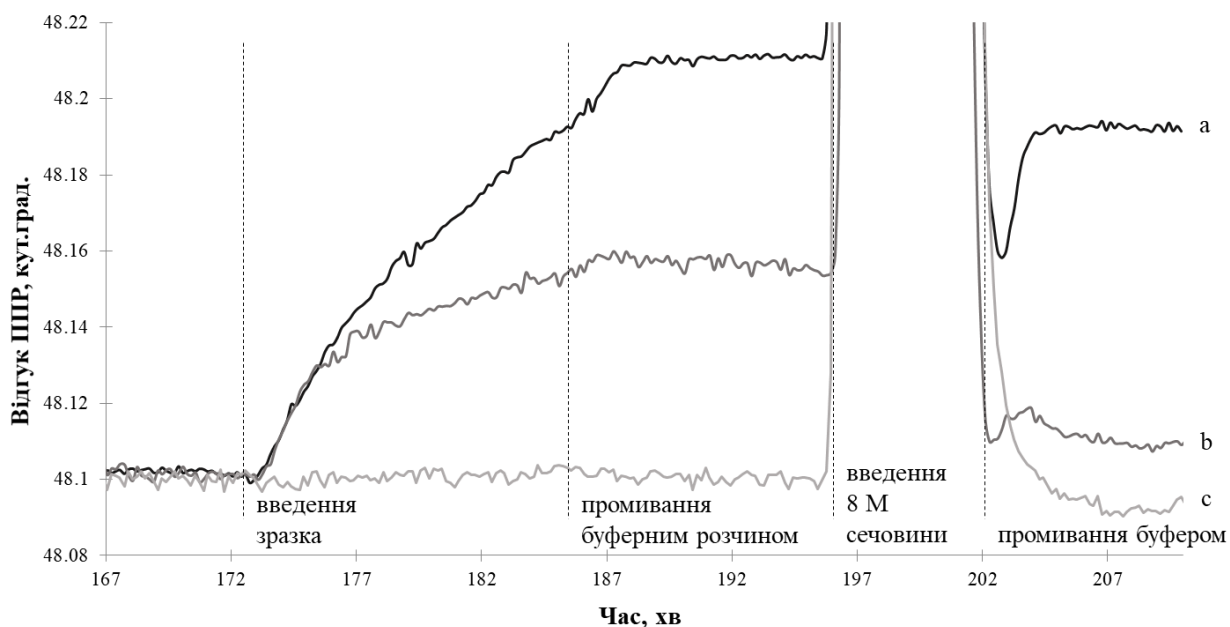


Рис. 3.19. Сенсограми ППР з розбивкою на етапи експериментів з неспецифічної гібридизації між олігонуклеотидами mod-Ph, іммобілізованими на поверхні біосенсора, та олігонуклеотидами SH-DP, іммобілізованими на поверхні НЧЗ, стабілізованих цитрат-аніонами без тіольованих блокуючих молекул (a) або функціоналізованими в розчині 6-меркапто-1-гексанолу та ліпоєвої кислоти з концентраціями цих молекул, що дорівнюють 1 мкМ (b) та 2 мкМ (c). Середовище гібридизації – $0,2\times\text{SSC}$, концентрація НЧЗ – 2,5 нМ

Подальші результати дослідження впливу концентрації стабілізуючих агентів під час модифікації НЧЗ на неспецифічний відгук ППР-біосенсора показано на рисунку 3.20. Експерименти проводилися з некомплементарними олігонуклеотидами для візуалізації неспецифічної сорбції наночастинок на поверхні сенсора. На основі отриманих результатів для подальшої гібридизації в середовищі $2\times\text{SSC}$ були відібрані НЧЗ, функціоналізовані в розчині 0,75 мкМ тіольованого олігонуклеотида, 2 мкМ MCH, 2 мкМ LA та $0,1\times\text{SSC}$.

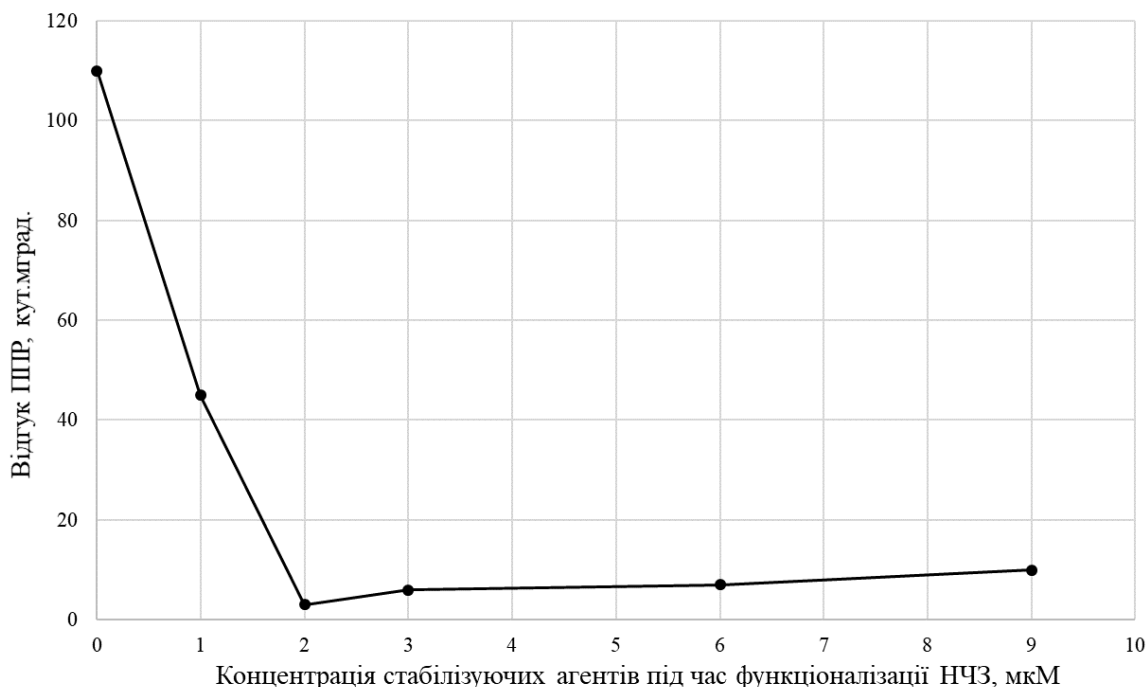


Рис. 3.20. Залежність неспецифічної сенсорної відповіді ППР при введенні НЧЗ, функціоналізованих тіольованими олігонуклеотидами SH-DP, від концентрації стабілізуючих молекул (6-меркапто-1-гексанолу та ліпоєвої кислоти) у різних концентраціях. Гібридизацію проводили у середовищі $0,2\times\text{SSC}$, концентрація НЧЗ становила 450 пМ

3.3.3. Вивчення ефектів від біосенсорної детекції олігонуклеотидів модифікованих НЧЗ. Експерименти визначення чутливості та специфічності ППР-біосенсора при розрізненні олігонуклеотидів, модифікованих НЧЗ, були проведені на моделі взаємодії двох комплементарних зондових олігонуклеотидів mod-Ph та SH-P1 і двох некомплементарних олігонуклеотидів mod-Ph та SH-DP, з яких mod-Ph був іммобілізований на поверхні біосенсора, а SH-P1 та SH-DP були зв'язані з відповідними НЧЗ. Використання НЧЗ як молекулярної мітки в ДНК-біосенсорах значно підвищило рівень відгуку ППР-сенсора, завдяки чому межу виявлення біосенсора можна зменшити на кілька порядків (рис. 3.21).

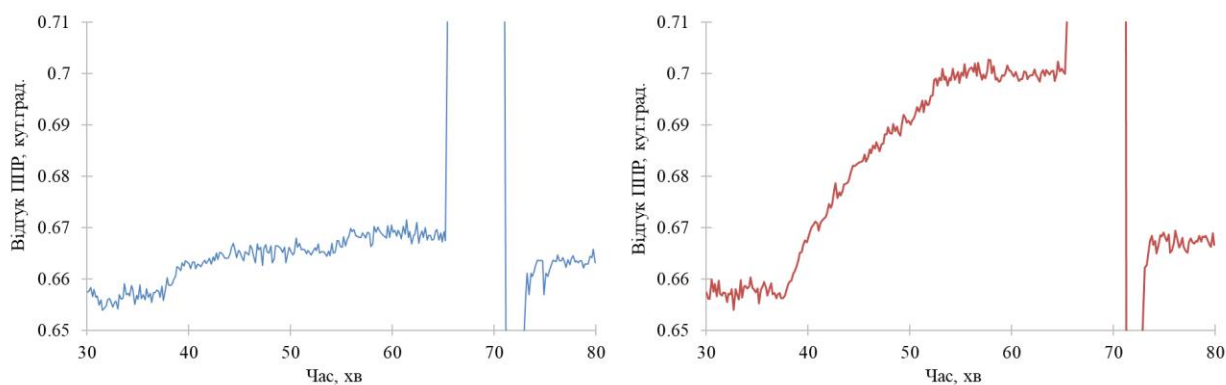


Рис. 3.21. ППР-сенсограми, що відповідають гібридизації між іммобілізованими олігонуклеотидами mod-Ph та вільним 100 нМ P1 (а), а також SH-P1, зв'язаним з 450 пМ НЧЗ (б). Середовище гібридизації – $2\times\text{SSC}$

Межа детектування, чутливість та лінійний діапазон ППР-біосенсора без застосування НЧЗ були охарактеризовані раніше Мацишиним та ін. [126]. Порівняння відгуків сенсора на олігонуклеотиди з мітками у вигляді наночастинок золота та без них (рис. 3.22) показує значний вплив таких модифікацій на результати відповідних вимірювань. Специфічність отриманого біосенсора дорівнювала 1,6 відносним одиницям, що корелює зі специфічністю ППР-біосенсора для виявлення немодифікованих олігонуклеотидів [49]. Однак, коли концентрація таких олігонуклеотидів нижча за 20 нМ, відгук ППР-сенсора стає меншим за 6 кутових мград., тоді як шумовий сигнал біосенсора становить 2 кут. мград [126]. За визначенням межі виявлення (концентрація аналіту, що викликає відгук розміром утричі перевищує шумовий сигнал), такі результати не є статистично значущими. Зі значень, показаних на рис. 3.22, можна зробити висновок, що межа детектування біосенсора зменшилася щонайменше на 2 порядки.

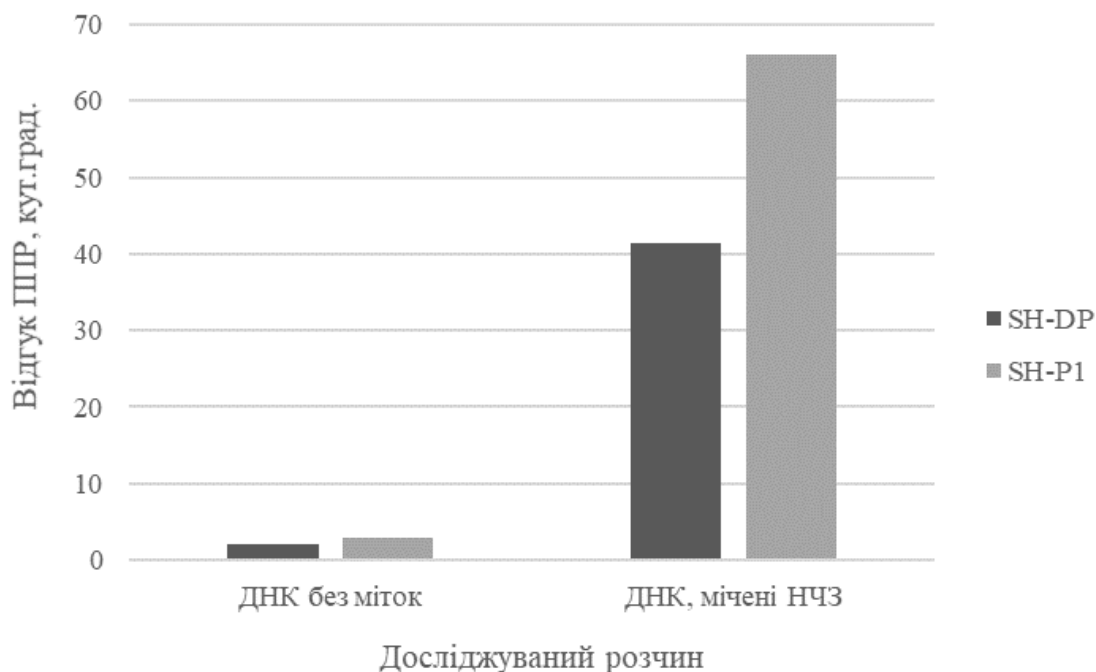


Рис. 3.22. Сенсорні відгуки ППР на олігонуклеотиди SH-DP та SH-P1 у вільному стані та з модифікацією наночастинками золота. Гібридизацію проводили у середовищі $2\times\text{SSC}$, концентрація молекул у розчині становила 450 пМ

Для підтвердження високої відтворюваності відгуків ППР-біосенсора було отримано 9 відгуків біосенсорної системи на додавання до проточної вимірювальної комірки SH-DP, модифікованих НЧЗ, концентрацією 450 пМ (рис. 3.23). Як видно з графіка, система мала добре відтворювані відгуки з похибкою вимірювання $\text{RSD} = 15\%$.

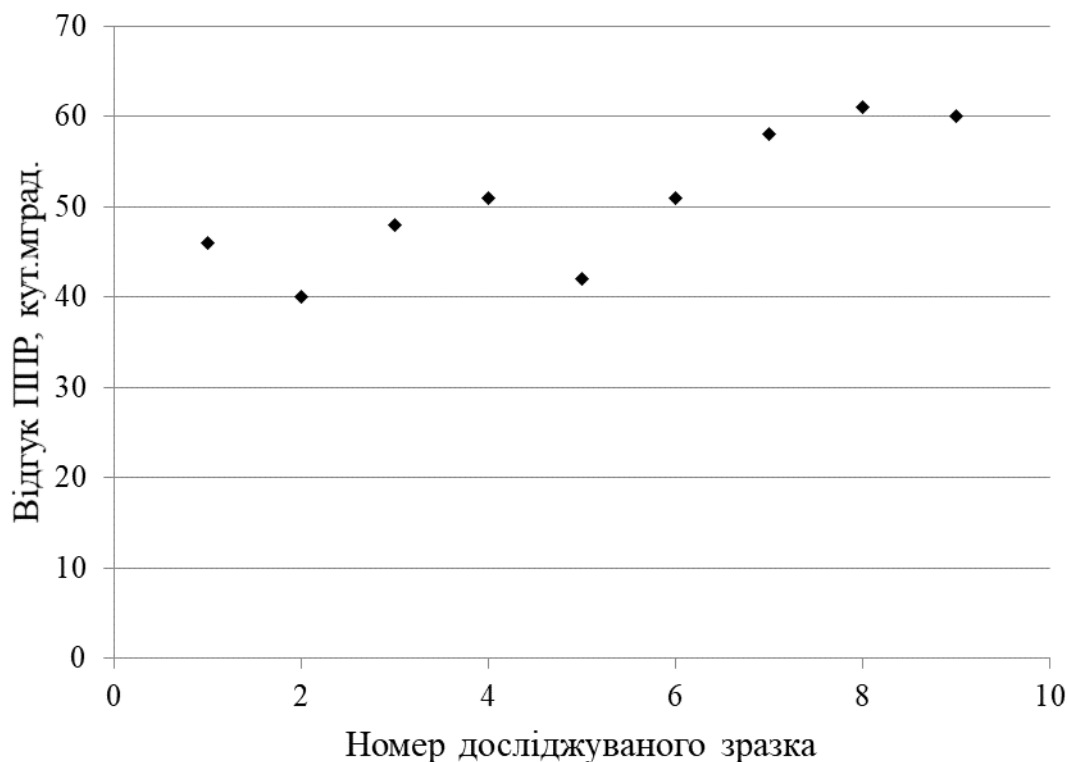


Рис. 3.23. Сенсорні відгуки ППР при детекції HS-DP, модифікованих НЧЗ. Гібридизацію проводили у середовищі $2\times\text{SSC}$, концентрація AuNPs-SH-DP у розчині становила 450 пМ

3.3.4. Підсумки розділу 3.3. В результаті досліджень, висвітлених у цьому розділі, було оцінено принципову можливість використання НЧЗ у біосенсорах гібридизації ДНК на основі ППР-спектрометрії з метою покращення характеристик цих пристроїв. Було показано, що для успішного застосування НЧЗ повинні бути функціоналізовані стабілізуючими молекулами, щоб запобігти їх спонтанній агрегації на поверхні ППР-біосенсора.

Було розроблено новий метод цитратного відновлення для синтезу НЧЗ з AuCl_3 для отримання високомонодисперсних наночастинок золота з оптимальним діаметром для їх біобезпечного застосування.

Оптимальний метод функціоналізації 2,5 нМ 13 нм НЧЗ полягав в їх інкубації в розчинах 0,75 мкМ тіольованого олігонуклеотида, 2 мкМ МСН та 2

мкМ LA. Використання нижчих концентрацій стабілізуючих агентів призводило до посилення неспецифічного сигналу біосенсора через агрегацію НЧЗ на поверхні сенсора.

Відповідні наночастинки Au, функціоналізовані стабілізуючими молекулами та модифіковані тіольованими олігонуклеотидами SH-DP та SH-P1, були проаналізовані на ППР-біосенсорі з біоселективним шаром на основі зондів mod-Ph. За результатами цих експериментів було зроблено висновок, що специфічність цієї біосенсорної системи дорівнювала 1,6 відносним одиницям. Рівні сенсорного відгуку, отримані з використанням модифікованих наночастинок золота в концентрації, яка дорівнює 450 пМ, були порівнянні з рівнями немодифікованих олігонуклеотидів SH-P1 у концентраціях, більш ніж у 100 разів вищих.

Крім того, важливим наслідком покращення колоїдної стабільності модифікованих НЧЗ у розчині для процесу гібридизації була можливість їх дисоціації від олігонуклеотидів, іммобілізованих на золотій поверхні ППР-спектрометра. Так, введення 8 М розчину сечовини в аналітичну комірку дозволила повну регенерацію біосенсора після кожного експерименту з гібридизації, що дало змогу проводити експерименти з гібридизації багаторазово з використанням того самого чипа ППР-біосенсора без втрати чутливості. Отже, це дало можливість значно збільшити тривалість роботи такого пристрою.

3.4. Розробка ДНК-біосенсорної сендвіч-системи на основі НЧЗ для детекції олігонуклеотида гена *BCR-ABL1*

Даний розділ описує біосенсорну систему, в якій наночастинки золота (НЧЗ) використовуються для посилення ППР та ампліфікації сигналу ППР-спектрометра у складі нанорозмірної сендвіч-системи. Схематичний вигляд принципу роботи такої біосенсорної системи приведено на рис. 2.5в (матеріали та методи). Для підвищення чутливості сенсора олігонуклеотидні зонди (SH-DP), комплементарні до ДНК-мішені (80-mer BCR–ABL), попередньо модифікуються НЧЗ для утворення кон'югату ДНК-НЧЗ (AuNP-SH-DP). Потім AuNP-SH-DP взаємодіє з вільною ділянкою мішені одноланцюгової ДНК (80-mer BCR–ABL), яка раніше зв'язувалася з іммобілізованими ДНК-зондами (mod-Ph). Приєднання до сенсорної поверхні AuNP-SH-DP призводить до значного зростання відгуку ППР. Як показано на рисунку 3.24, після додавання AuNP-SH-DP спостерігалось більш ніж 10-кратне збільшення відгуку біосенсора на ДНК-мішень внаслідок гібридизації між AuNP-SH-DP та мішенню 80-mer BCR–ABL.

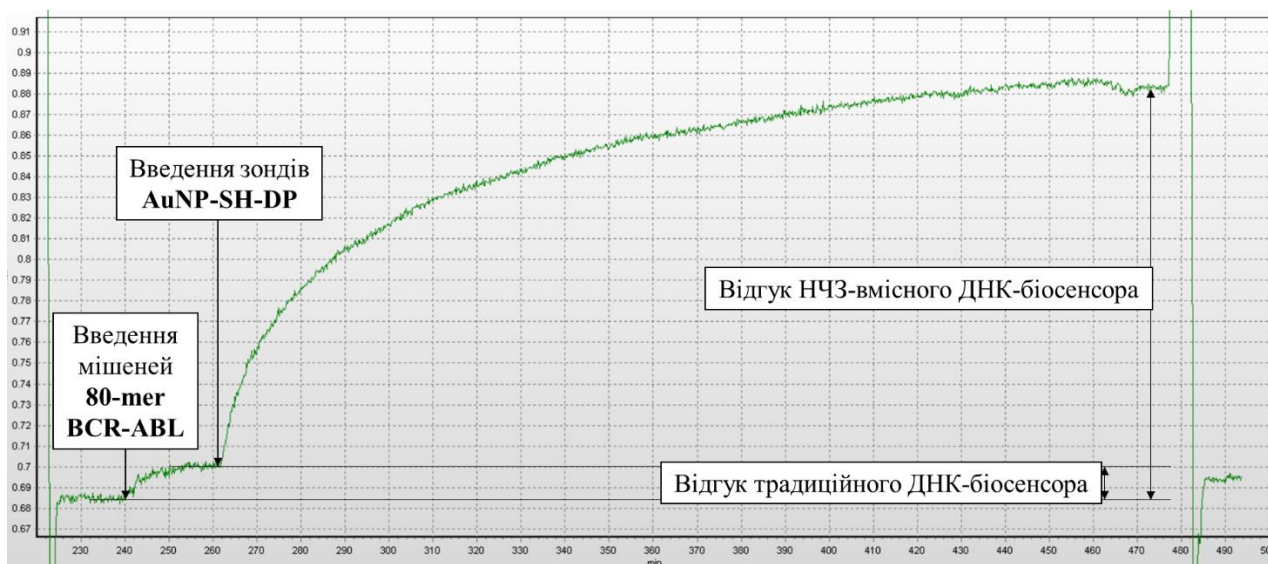


Рис. 3.24. Відгук ППР-біосенсора в реальному часі на введення 800 нМ розчину мішені 80-mer BCR–ABL. Гібридизаційне середовище – буферний розчин $2 \times \text{SSC}$, концентрація AuNP-SH-DP – 450 пМ. Вісь у: відгук ППР-спектрометра (градуси, °); вісь х: час (хв)

Ключовим завданням у розробці аналізу гібридизації ДНК є запобігання самогібридизації молекул зонда з одночасною підтримкою умов, які сприяють ефективній та специфічній гібридизації з цільовою мішенню. Тому розробка будь-якого нового аналізу для виявлення ДНК повинна починатися з оцінки енергій гібридизації відповідних пар олігонуклеотидів.

У таблиці 3.5 представлено розраховані значення зміни вільної енергії Гіббса досліджуваних пар олігонуклеотидів у буферних розчинах SSC різної іонної сили. Всі розрахунки були проведені за допомогою веб-сервера DINAMelt за умов 22 °C та концентрації олігонуклеотидів 100 нМ [149].

Таблиця 3.5

Значення зміни вільної енергії Гіббса досліджуваних пар олігонуклеотидів, розраховані для буферних розчинів SSC різної кратності. Всі розрахунки проводилися для умов 22 °С та концентрації олігонуклеотидів 100 нМ.

Пари олігонуклеотидів	ΔG у 0.1×SSC	ΔG у 0.2×SSC	ΔG у 2×SSC
mod-Ph та SH-DP	-5.4	-6.0	-8.0
mod-Ph and 80-mer BCR-ABL	-28.8	-30.6	-36.5
80-mer BCR-ABL and SH-DP	-22.1	-23.4	-27.7

На основі розрахованих значень, представлених у Таблиці 3.5, можна зробити висновок, що гібридизація ДНК-зондів mod-Ph та SH-DP з мішенню 80-mer BCR-ABL є термодинамічно сприятливішою за гібридизацію зонд-зонд між mod-Ph та SH-DP. Найбільш негативні значення ΔG , що відповідають найсильнішим взаємодіям, були досягнуті в буфері 2×SSC. Як було показано раніше Мацишиним та ін., різниця між значеннями ΔG гібридизації ДНК-зонда з різними мішеннями повинна бути щонайменше дворазовою, щоб забезпечити їх надійну дискримінацію за допомогою ППР-спектрометрії [49]. У випадку мішені 80-mer BCR-ABL така різниця коливається від 3,46 до 4,56 відносних одиниць.

Ще одним питанням, яке було з'ясовано за допомогою веб-сервера DINAMelt, була можливість виявлення олігонуклеотидів гена BCR-ABL1, що містять точкові мутації. У буферних розчинах 2×SSC найвище значення ΔG гібридизації між mod-Ph та 80-mer BCR-ABL з одиничною невідповідністю азотистої основи становило -30,1, а найвище значення ΔG гібридизації між mod-Ph та 80-mer BCR-ABL з одиничною невідповідністю становило -25,5. Це вказує

на високу спорідненість зондів до цільових послідовностей гена BCR–ABL1, навіть за наявності точкових мутацій у мішені.

3.4.1. Вивчення аналітичних характеристик розробленої сендвіч-системи. Тривалість часу від моменту введення в вимірювальну комірку НЧЗ-вмісної біосенсорної системи аліквоти НЧЗ до стабілізації та виходу сигналу біосенсорної системи на плато різнилася залежно від концентрації 80-мерного BCR-ABL та складала від 90 до 160 хвилин. Порівняно зі швидкістю отримання сигналу традиційного ППР-біосенсора (зазвичай ~10 хвилин), ця тривалість аналізу є надзвичайно довгою (Рис.3.25). Відповідно, необхідно було вибрати більш прийнятний час аналізу для розробленої біосенсорної системи. Щоб визначити оптимальний час інкубації AuNP-SH-DP, ми порівняли відтворюваність сигналів НЧЗ-вмісної біосенсорної системи, записаних через 10, 30, 60 та 160 хвилин після початку інкубації AuNP-SH-DP, з кінцевим відгуком при досягненні сигналом плато. Відповідні відгуки НЧЗ-вмісної біосенсорної системи для різних концентрацій 80-mer BCR-ABL (100 пМ–800 нМ) показані на рисунку 3.26; 100% відповідає максимальному сигналу біосенсора, який досяг плато.

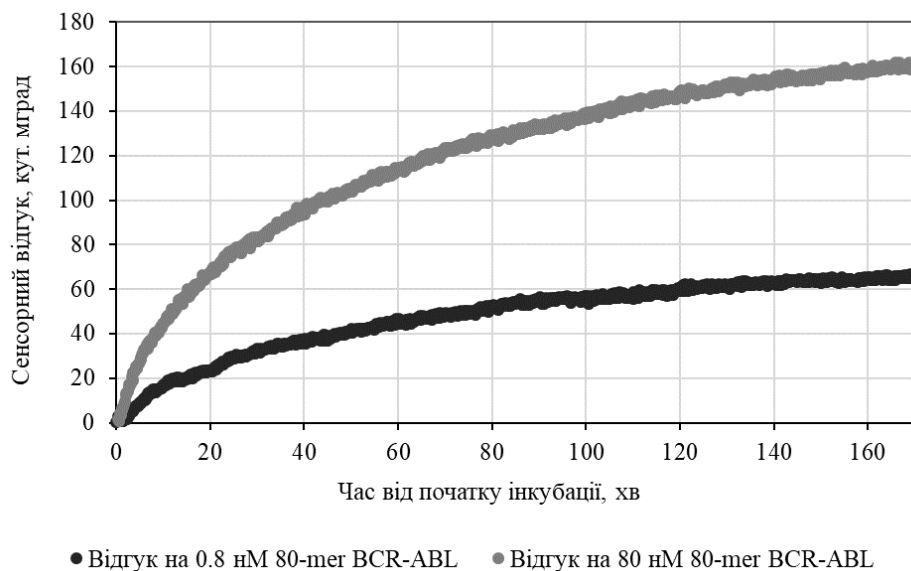


Рис. 3.25. Відгуки біосенсорної системи на різні концентрації 80-мер BCR-ABL в реальному часі. Гібридизаційне середовище: буферний розчин 2×SSC, концентрація AuNP-SH-DP: 450 пМ

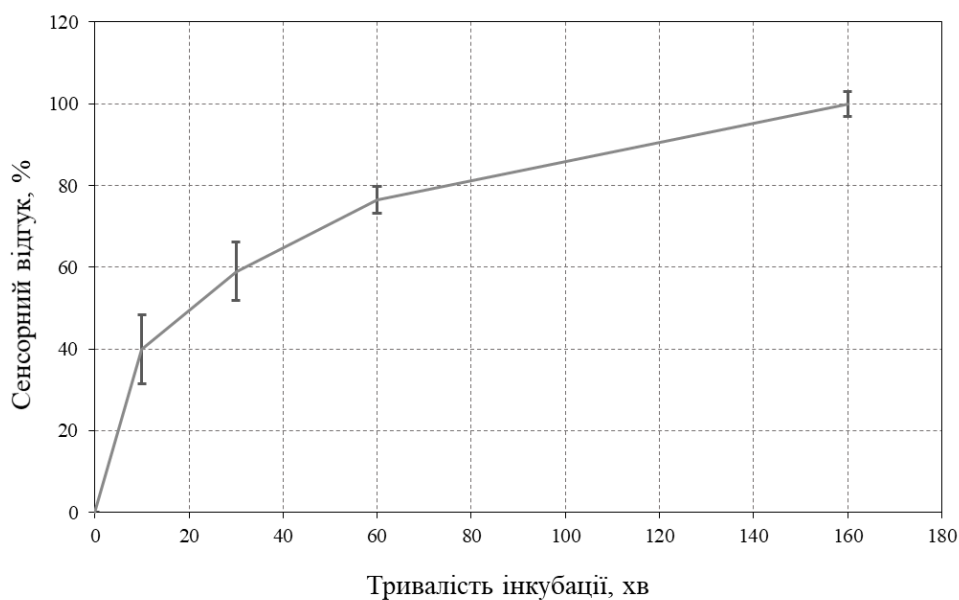


Рис. 3.26. Вплив часу інкубації AuNP-SH-DP на величину та відтворюваність відгуку біосенсорної системи. Гібридизаційне середовище: буферний розчин 2×SSC, концентрація AuNP-SH-DP: 450 пМ, концентрація цільової ДНК: 100 пМ–800 нМ. Примітка: 100% відповідає максимальному (плато) сигналу, досягнутому за найдовшого часу інкубації

Згідно з отриманими даними, для досягнення стандартного відхилення нижче 5% потрібна інкубація AuNP-SH-DP протягом щонайменше 60 хвилин. Як показано на Рисунку 3.26, загальний час аналізу можна суттєво скоротити, але наслідком буде зменшення відтворюваності вимірювань. Всі наступні експерименти з гібридизації проводилися з фіксованим часом інкубації 60 хвилин.

У цій роботі час інкубації 60 хвилин було обрано для забезпечення достатньо повної гібридизації та максимізації посилення сигналу, що було основною метою цього дослідження. Однак ми визнаємо, що подальша оптимізація цього етапу є важливою для практичного застосування. Потенційні стратегії скорочення часу інкубації включають: збільшення ефективної концентрації зондів, кон'югованих з НЧЗ, оптимізацію складу буфера та іонної сили для прискорення кінетики гібридизації, використання температурного контролю гібридизації та впровадження активного перемішування або мікрофлюїдного потоку для покращення масопереносу. Крім того, формат із залученням НЧЗ забезпечує суттєве покращення чутливості аналізу порівняно з традиційним гібридизаційним ППР-аналізом, що може виправдати довший час аналізу, залежно від вимог застосування. Крім того, для високих концентрацій 80-mer BCR-ABL, можливо навіть не застосовувати останній етап додавання AuNP-SH-DP, а орієнтуватись на первинний відгук системи, хоча звісно відтворюваність такого аналізу буде значно гірша, але значно скоротиться і час аналізу.

На рисунку 3.27 представлені калібрувальні криві двох біосенсорів: НЧЗ-вмісного ППР-біосенсора (сендвіч-типу) та традиційного ППР-біосенсора з прямою детекцією ДНК. Згідно з отриманими результатами, використання НЧЗ у складі ППР-біосенсорної системи помітно збільшує відгук ППР-біосенсора та значно зменшує межу детектування ДНК-мішеней.

Як показано на рисунку 3.27, НЧЗ-вмісний ППР-біосенсор демонструє лінійну характеристику в логаритмічному масштабі в діапазоні цільових концентрацій 80-mer BCR–ABL від 80 пМ до 200 нМ.

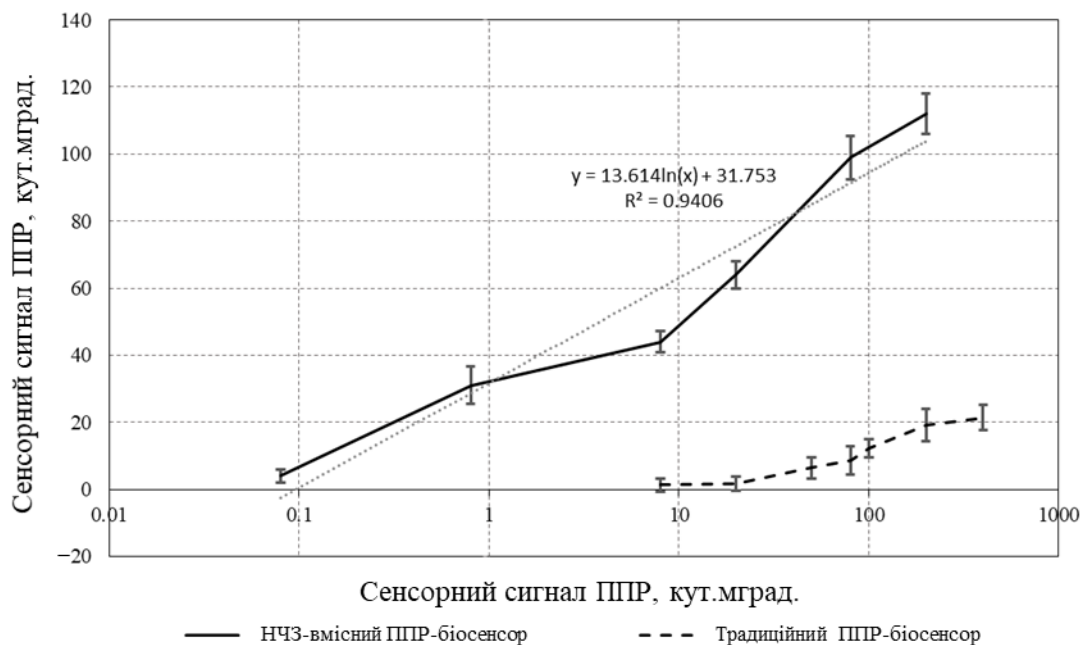


Рис. 3.27. Калібрувальні криві для кількісного визначення мішені 80-mer BCR-ABL у розчині з використанням НЧЗ-вмісного ППР-біосенсора та традиційного ППР-біосенсора. Гібридизаційне середовище: буферний розчин 2×SSC; концентрація AuNP-SH-DP: 450 пМ; вісь у: специфічний відгук ППР (кут.мград.); вісь х: концентрація 80-мерної мішені BCR-ABL (нМ). Відгук ППР визначали відносно сигналу, отриманого для деіонізованої води Milli-Q

3.4.2. Дослідження специфічності функціонування розробленої біосенсорної системи на основі сендвіч-аналізу 80-мерної мішені BCR-ABL. Для аналізу специфічності запропонованої НЧЗ-вмісної біосенсорної системи, були проведені експерименти за відсутності та присутності ДНК-мішені 80-mer BCR-ABL у досліджуваних зразках. Сенсограми таких вимірювань показано на рисунку 3.28.



Рис. 3.28. (а) Неспецифічний відгук біосенсора за відсутності одноланцюгових ДНК-мішеней у вимірювальній комірці; (б) відгук біосенсорної системи на ін'єкцію ДНК-мішені 80-мер BCR–ABL (80 нМ) у вимірювальну комірку з подальшим введенням AuNP–SH–DP; (в) відгук біосенсора на введення ДНК-мішені 80-мер BCR–ABL (80 пМ) у вимірювальну комірку з подальшим введенням AuNP–SH–DP. Гібридизаційне середовище: 2×SSC; концентрація AuNP-SH-DP: 450 пМ; вісь у: відгук ППР (градуси, °); вісь х: час (хв)

Використовуючи рисунок 3.28б як приклад, специфічного відгуку біосенсорної системи на певну концентрацію ДНК-мішені 80-мер BCR-ABL (80 нМ) була розрахована шляхом віднімання величини неспецифічного відгуку ($0,017^\circ$) від рівня вимірюваного сигналу ($0,107^\circ$). Відповідно, специфічний відгук НЧЗ-вмісного біосенсора на ДНК-мішень 80-мер BCR-ABL (80 нМ) у цьому випадку становила $0,090^\circ$.

На рисунку 3.28в наведений відгук розробленої біосенсорної системи на введення 80 пМ 80-мер BCR-ABL, а саме на фоні неспецифічного відгуку ($0,017^\circ$) можна бачити специфічний відгук ($0,007^\circ$), що відповідає відгуку, в три рази більшому за шум сигналу. Відповідно, відгук на цю концентрацію (80 пМ) ми і вважаємо межею детектування розробленої біосенсорної системи.

3.4.3. Дослідження відтворюваності роботи біосенсорної системи на основі сендвіч-аналізу 80-мерної мішені BCR-ABL. Щоб оцінити відтворюваність сигналу запропонованої НЧЗ-вмісної біосенсорної системи при

виявленні послідовності гібридного гена BCR–ABL1, було зареєстровано низку її відгуків, пов'язаних із введенням однакової концентрації (80 нМ) мішені 80-mer BCR–ABL у вимірювальну проточну комірку (Рисунок 3.29,а). Результати демонструють високу відтворюваність розробленої НЧЗ-вмісної біосенсорної системи.

Для оцінки потенційної варіації сигналу запропонованої біосенсорної системи від партії до партії, НЧЗ, які використовувалися для посилення відгуку, були взяті з двох незалежно приготованих партій (Рисунок 3.29а). Помітних відмінностей у відтворюваності між партіями не спостерігалось (партія 1: $90,5 \pm 7,1$; партія 2: $95,4 \pm 5,8$; середнє значення $\pm$ стандартне відхилення).

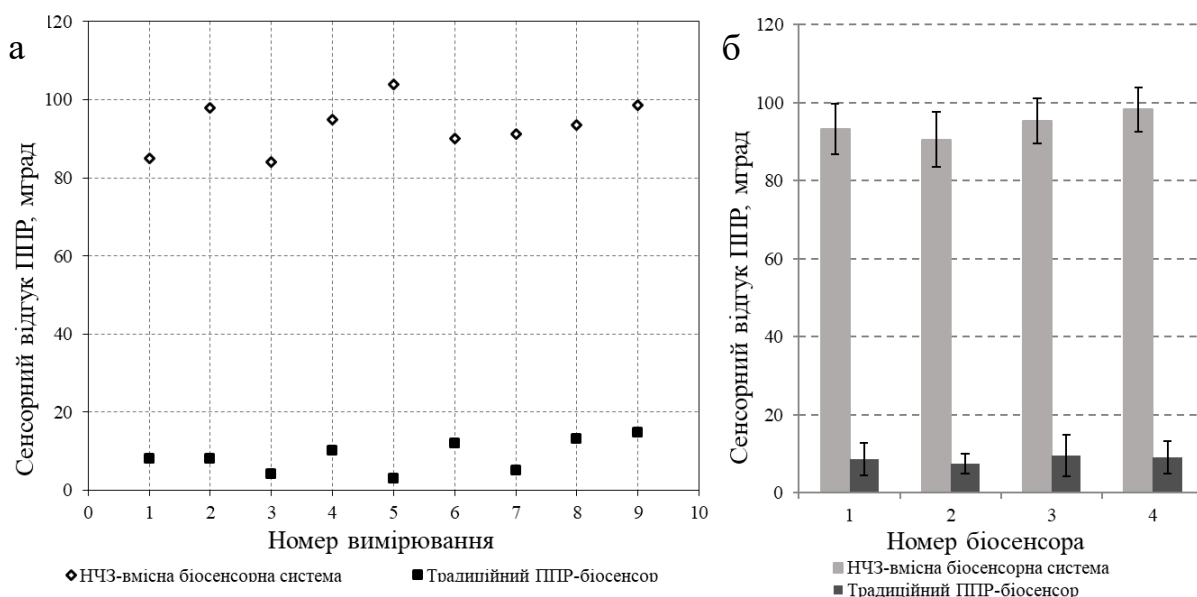


Рис. 3.29. Відтворюваність сигналів ППР-біосенсора для виявлення ДНК-мішені 80-mer BCR–ABL при концентрації 80 нМ. (а) Дев'ять різних відповідей біосенсора, отриманих з НЧЗ з двох різних партій (вимірювання 1–4 та 5–9); (б) Середні значення та стандартні відхилення відповідей чотирьох різних ППР біосенсорів. Гібридизаційне середовище: $2 \times \text{SSC}$, концентрація AuNP-SH-DP: 450 пМ

Як показано на рисунку 3.29а, ППР-біосенсорна система у сендвіч-форматі, давала високо відтворювані відповіді з відносним стандартним відхиленням (RSD) 6,96%, тоді як традиційний ППР-біосенсор виявив ту саму концентрацію цільової ДНК зі значно вищою варіабельністю (RSD = 43,64%). Загальне стандартне відхилення розробленої ППР-біосенсорної системи, дорівнює 6,64% (рисунк 3.29b). Хоча похибка вимірювання формату без НЧЗ зменшується при вищих концентраціях цілі, ППР-біосенсиори зазвичай застосовуються в сценаріях, де досягнення найнижчої можливої межі виявлення є критично важливим. Відтворюваність може бути додатково покращена за допомогою приладів спектроскопії ППР, оснащених терморегульованою проточною коміркою та за допомогою автоматизації процедури вимірювання.

Порівняно з традиційним ППР-біосенсором [49], НЧЗ-вмісна ППР-біосенсорна система для виявлення послідовності гена BCR–ABL1 (маркер Філадельфійської хромосоми) дозволила кількісне визначення мішені 80-mer BCR–ABL зі значно вищою чутливістю та значно нижчою межею детектування. Межа детектування генетичного маркера гена BCR–ABL1 з використанням відповідної біосенсорної системи становила 80 пМ, що в 625 разів нижче, ніж межа детектування традиційного ППР-біосенсора (50 нМ). При концентрації ДНК-мішені, рівній 80 нМ, відгук НЧЗ-вмісної біосенсорної системи був більш ніж у десять разів вищим, ніж відгук традиційного ППР-біосенсора. Це робить розроблену НЧЗ-вмісну біосенсорну систему більш перспективною для детекції олігонуклеотидів гена BCR–ABL1 у реальних біологічних зразках. Крім того, під час роботи з низькими концентраціями ДНК-мішені, НЧЗ-вмісна біосенсорна система демонструвала значно меншу похибку вимірювання порівняно з традиційним біосенсором ППР.

3.4.4. Підбір оптимальних умов для зберігання та роботи з компонентами біосенсорної системи. Розробка пристрою, що використовує під час аналізу колоїдні наночастинки, вимагає встановлення умов, сприятливих для тривалого зберігання таких наночастинок. Ця частина роботи присвячена визначенню рівня колоїдної стабільності НЧЗ, використаних у розробленій біосенсорній системі, в буферних розчинах SSC різної кратності, а також у деіонізованій воді Milli-Q.

Колоїдна стабільність НЧЗ визначалася як співвідношення концентрації монодисперсних колоїдних НЧЗ в досліджуваному зразку до концентрації таких НЧЗ в контрольному зразку. Згідно з літературними даними, більші агрегати НЧЗ характеризуються більшими значеннями довжини хвилі піка їх спектру поглинання світла [116]. Це підтверджується результатами спектрофотометрії золів НЧЗ (дані наведено у розділі 3.3.1), а саме зразка монодисперсних НЧЗ (рис. 3.16с) та зразка агрегованих НЧЗ (рис. 3.16d). Відповідні результати наведені на рис. 3.30.

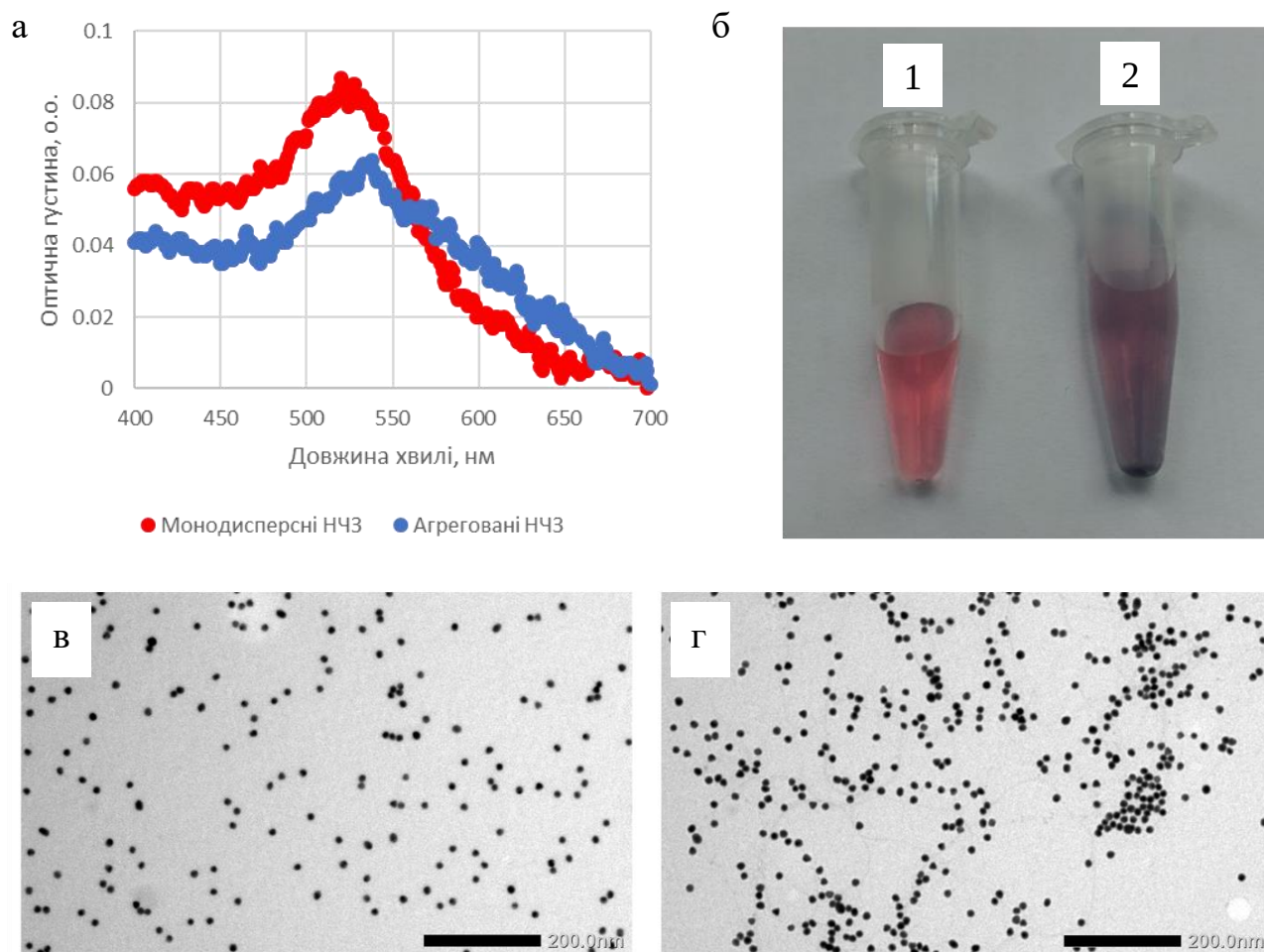


Рис. 3.30. Спектри поглинання (а) та звичайна фотографія (б) неагрегованих (1) та частково агрегованих (2) НЧЗ; в – ТЕМ-зображення монодисперсних НЧЗ; г – ТЕМ-зображення частково агрегованих НЧЗ

З отриманих даних видно, що неагреговані наночастинки золота (НЧЗ) мають найвищу оптичну гуστину при довжині хвилі 520 нм, тобто вони поглинають світло в синьому спектрі та є проникними для хвиль, які відповідають червоному кольору [114]. У свою чергу, агреговані наночастинки золота мають нижчу оптичну гуστину при довжині хвилі 520 нм та вищу при 650 нм, що сприймається людським оком як набуття синього відтінку (рис. 3.30).

Оптична густина золю НЧЗ пов'язана з його концентрацією відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера, як описано в розділі 2.5. За умов рівності довжини

пробігу світла 0,1 см значення оптичної густини дорівнювало 0,38525. Для розрахунку молярного коефіцієнта екстинкції НЧЗ із середнім діаметром 16,77 нм було використано метод Liu та ін. [121]. Застосування розрахунків авторів дозволило встановити, що такий коефіцієнт дорівнює $5,74 \times 10^8$ о.о. $\times$ моль⁻¹ $\times$ см⁻¹. Підстановка цих значень у закон Бугера-Ламберта-Бера дозволила визначити, що концентрація синтезованих НЧЗ дорівнює $6,7 \times 10^{-9}$ моль/л або 6,7 нМ.

Колоїд, отриманий в результаті синтезу, а також його розведення в ультрарачистій воді Milli-Q, були використані для побудови калібрувальної кривої для визначення концентрації НЧЗ за їх оптичною густиною (Рисунок 3.31).

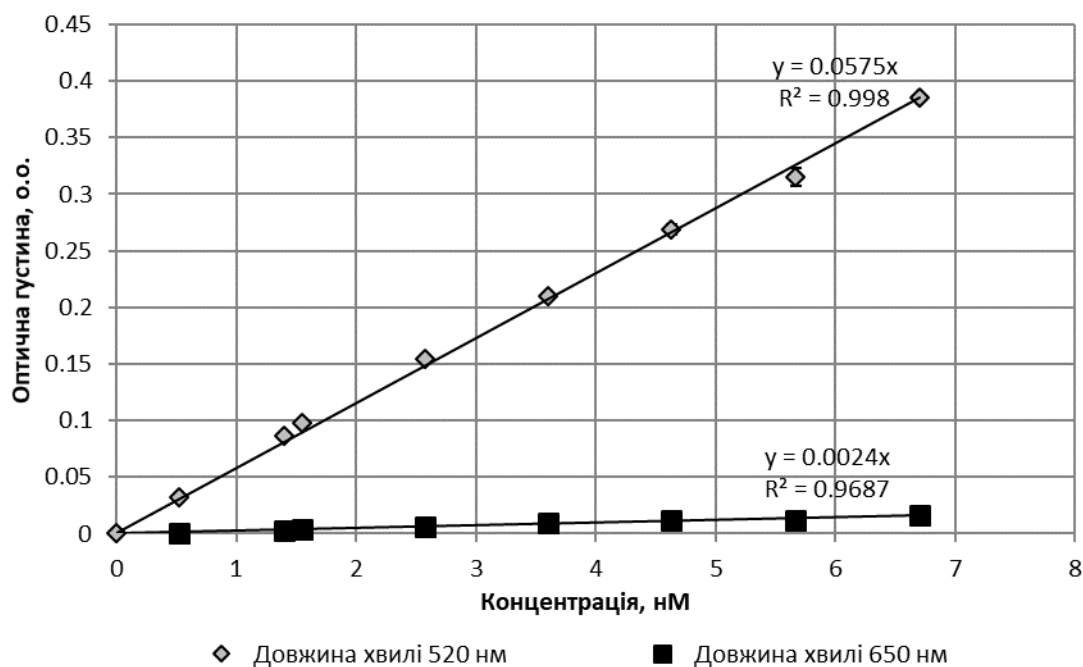


Рис. 3.31. Калібрувальні криві залежності оптичної густини зразка на різних довжинах хвиль від концентрації досліджуваних НЧЗ. Довжина пробігу світла в спектрофотометрі дорівнювала 0,1 см

Наступним етапом було з'ясування параметрів буферних розчинів для найкращого функціонування та зберігання модифікованих наночастинок золота.

З метою вибору найкращого середовища для операційної стабільності модифікованих наночастинок золота було проведено низку експериментів. Вони полягали у стимулюванні агрегації наночастинок золота шляхом зменшення відстані між ними за допомогою послідовних центрифугувань. Тривалість кожного центрифугування дорівнювала 30 хв, а відносна відцентрова сила – 13226 відносних одиниць. Після кожного з таких центрифугувань зразки наночастинок золота ресуспендували з подальшим вимірюванням їх оптичної густини. Їх концентрацію, розраховану за законом Бугера-Ламберта-Бера, порівнювали з початковою концентрацією, після чого робили висновок про кількість наночастинок золота, які зазнали незворотної агрегації та не зазнали ресуспендування.

Спочатку описаний вище експеримент було проведено для наночастинок золота, модифікованих лише блокуючими молекулами, без їх модифікації олігонуклеотидами. Для експериментів було обрано чотири буферні середовища: деіонізовану воду Milli-Q, $0,1\times\text{SSC}$, $0,2\times\text{SSC}$ та $2,0\times\text{SSC}$ (рисунок 3.32).

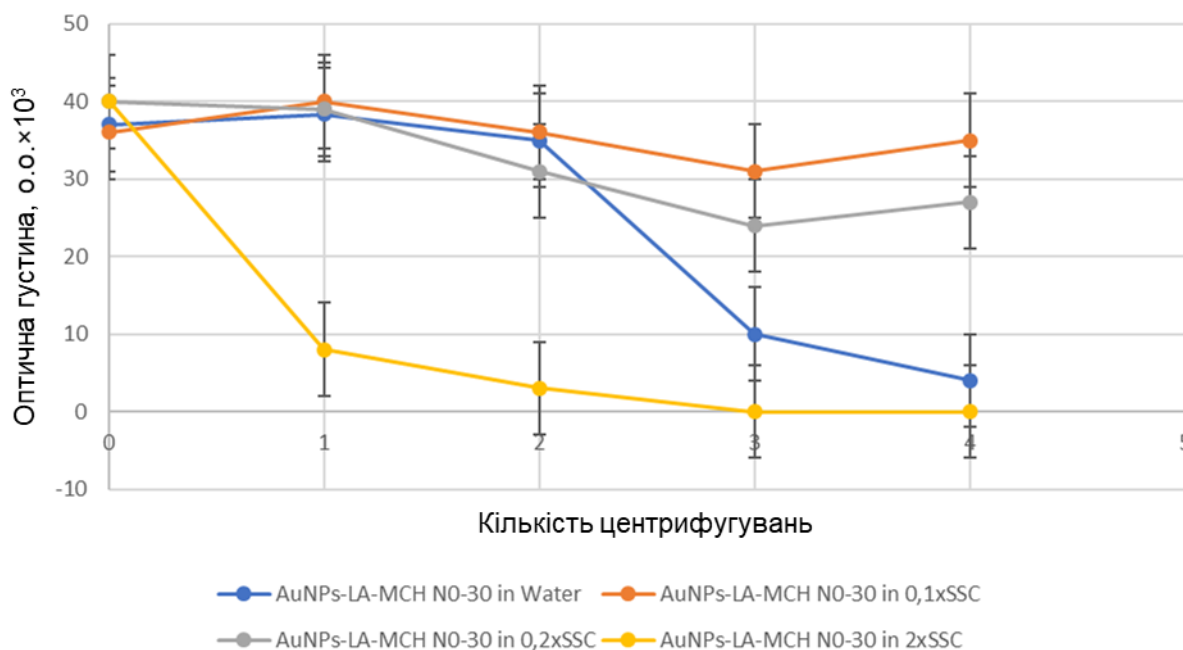


Рис. 3.32. Вплив центрифугування у воді та середовищах SSC різної кратності на колоїдну стабільність НЧЗ, модифікованих блокуючими молекулами

З наведених даних видно, що в хімічних середовищах, таких як деіонізована вода та $2.0 \times \text{SSC}$, наночастинки золота, модифіковані лише меркаптогексанолом та ліпоєвою кислотою, агрегують та випадають у осад. У концентрованому розчині SSC така реакція відбувається через занадто високу іонну силу буферного розчину. У деіонізованій воді природу цього процесу можна пояснити гідрофобною взаємодією між неполярними блокуючими молекулами на поверхні НЧЗ.

Нижче наведено графік результатів досліджень залежності оптичної густини від кількості центрифугувань наночастинок золота, модифікованих олігонуклеотидами та блокуючими молекулами (Рисунок 3.33). Буферні середовища були такими ж, як і раніше: деіонізована вода Milli-Q, $0,1 \times \text{SSC}$, $0,2 \times \text{SSC}$ та $2,0 \times \text{SSC}$.

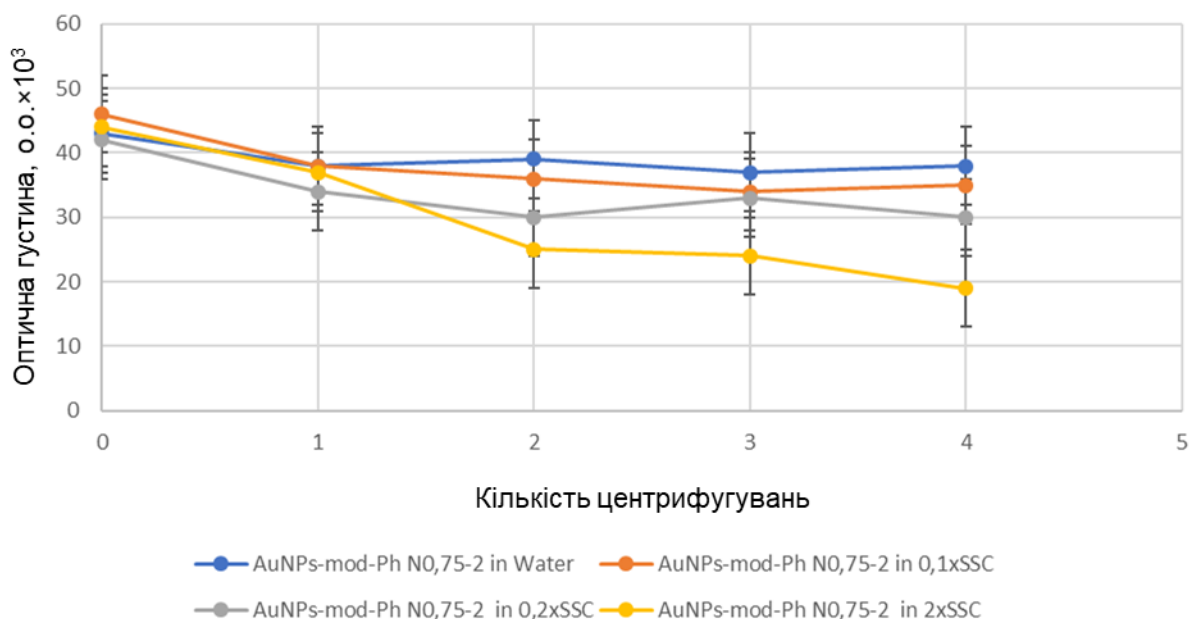


Рис. 3.33. Вплив центрифугування у воді та середовищах SSC різної кратності на колоїдну стабільність НЧЗ, модифікованих олігонуклеотидами та блокуючими молекулами

В результаті дослідження впливу центрифугування у воді та середовищах SSC різної кратності на колоїдну стабільність НЧЗ, модифікованих олігонуклеотидами та блокуючими молекулами, було виявлено, що агрегація наночастинок була не такою активною, як у попередньому експерименті. Це було пов'язано з тим, що тіюльовані олігонуклеотиди та поверхневі блокуючі молекули повністю покривали НЧЗ, створюючи як електростатичні, так і стеричні перешкоди для агрегації, що робило їх більш стабільними в розчині. Тому, після аналізу результатів на графіку, було встановлено, що найкращі умови для використання НЧЗ, модифікованих таким чином, виникають як у деіонізованій воді, так і в розчинах SSC низької кратності, особливо $0,1 \times \text{SSC}$.

3.4.5. Підсумки розділу 3.4. Основною метою цього розділу роботи було зниження межі детектування ППР-біосенсорів шляхом збільшення специфічного

сигналу таких біосенсорів з додаванням модифікованих НЧЗ. Для цього необхідно було всебічно дослідити взаємодію з біоселективним елементом гібридизаційного ППР-біосенсора наночастинок золота, модифікованих олігонуклеотидами та блокуючими молекулами, а також вибрати оптимальні умови для операційної стабільності вже модифікованих НЧЗ.

Розроблено новий підхід до виявлення послідовності гена e13a2 BCR–ABL1, сконструювавши ППР-біосенсорну систему сендвіч-типу на основі гібридизації молекул ДНК, функціоналізованих НЧЗ. Показано, що використання зондових олігонуклеотидів, кон'югованих зі стабілізованими НЧЗ, у біосенсорному аналізі на основі ППР може збільшити специфічний відгук біосенсорної системи на олігонуклеотиди гена BCR–ABL1 у кілька разів.

Оцінено вплив часу інкубації AuNP–SH–DP на відгук біосенсорної системи. Відтворювані відгуки сенсора були досягнуті при часі інкубації 60 хвилин. Хоча це збільшує загальний час аналізу, формат з посиленням НЧЗ забезпечує суттєво покращену чутливість виявлення порівняно зі звичайним ППР-аналізом, що може виправдати довший час аналізу залежно від застосування. Подальше скорочення часу інкубації може бути досягнуто шляхом оптимізації концентрації зонда, умов гібридизації та масопереносу.

Було встановлено, що розроблена НЧЗ-вмісна ППР-біосенсорна система досягла межі детектування 80 пМ, що більш ніж у 500 разів нижче, ніж у традиційного ППР-біосенсора. Розроблена ППР-біосенсорна система забезпечує лінійний діапазон виявлення на логарифмічній шкалі концентрацій для мішені *BCR-ABL1* від 80 пМ до 200 нМ, що робить його перспективним підходом для визначення ДНК-маркера гена *BCR-ABL1* у реальних біологічних зразках. Розроблений підхід до біосенсорної детекції ДНК може бути адаптований для посилення сигналу в інших ППР-біосенсорах на основі гібридизації ДНК,

зокрема в аналізах для одночасного виявлення кількох варіантів гена *BCR-ABL1* (наприклад, e13a2 та e14a2).

Після побудови калібрувальних кривих залежності оптичної густини від концентрації досліджуваних наночастинок золота було виявлено, що співвідношення оптичної густини неагрегованих НЧЗ при довжинах хвиль 520 нм та 650 нм становило ≥ 20 , що є показником низького рівня агрегації наночастинок.

Було визначено, що агрегація наночастинок золота, модифікованих тіольованими олігонуклеотидами та блокуючими молекулами, відбувається менш активно, ніж наночастинок золота, модифікованих лише блокуючими молекулами. Це пов'язано з тим, що тіольовані олігонуклеотиди та блокуючі молекули повністю покривають НЧЗ, створюючи як електростатичні, так і стеричні перешкоди для їх агрегації.

Також в цьому розділі було показано, що досліджувані НЧЗ можуть бути використані у складі гібридизаційного ДНК-біосенсора у середовищі $2.0 \times \text{SSC}$. Для їх тривалого зберігання оптимальним середовищем було визначено $0.1 \times \text{SSC}$.

3.5. Рекомендації для подальшої роботи

Дана робота є результатом фізико-математичних та молекулярно-генетичних досліджень, направлених на розробку гібридизаційної біосенсорної сендвіч-системи, заснованої на спектрометрії ППР, для детекції генетичного маркера ХМЛ.

Подальша оптимізація розробленої біосенсорної системи може бути спрямована на два основні напрямки: зниження межі детектування олігонуклеотидної послідовності онкогена *BCR-ABL1* та оптимізацію біосенсорної системи для детекції біологічних зразків. Обидва ці напрямки потребують попереднього вирішення наступних технічних питань, пов'язаних із апаратним та програмним забезпеченням системи:

1. **Підбір хімічно інертних матеріалів** внутрішніх поверхонь гідродинамічної системи, пробірок та наконечників піпеткових дозаторів. Протягом виконання дослідів, результати яких висвітлені в цій роботі, неодноразово виявлялося небажане осадження НЧЗ на поверхнях пластикових деталей із певних партій у вигляді світло-червоного нальоту при повній відсутності такого ефекту на аналогічних деталях із інших партій. Причиною цього ефекту може бути неоголошена постачальником цих матеріалів тривалість складського зберігання пластику, протягом якого пластик починав деградувати, або невстановлена різниця в складі пластику. Підбір хімічно інертних матеріалів включає в тому числі і встановлення причин такого ефекту та оптимізацію довгострокового зберігання цитрат-зв'язаних НЧЗ, а загальне завдання цього напряму діяльності – уникнення небажаних взаємодій між НЧЗ та будь-якими об'єктами, які вступають з ними в контакт.

2. **Мінімізація об'єму досліджуваного зразка** з дотриманням герметичності всіх частин системи та їхніх з'єднань. Наразі головна причина, з якої об'єм досліджуваного зразка не може бути меншим за 100 мкл, пов'язана з конструкцією вимірювальної проточної комірки (див. Рис. 2.3 розділу 2.4), а саме – з товщиною прокладки з силіконової гуми, яка наразі є не меншою за 1 мм. Зменшення товщини цієї прокладки значно зменшить кількість реагентів, необхідних для виготовлення та експлуатації біосенсорної системи, в першу чергу – олігонуклеотидних зондів та НЧЗ, що значно зменшить собівартість

аналізу. Наразі існують фторопластові прокладки товщиною до 200 мікрон, але відсутність пружності фторопласту зумовлює нерівномірне його прилягання до кришки комірки, через що втрачається герметичність зібраної вимірювальної проточної комірки.

3. **Покращення гідрофільності та термостабільності вимірювальної проточної комірки.** Гідрофільність вимірювальної проточної комірки є обов'язковою умовою функціонування біосенсорної системи, адже неповне змочування комірки рідиною призводить до появи у комірці бульбашок повітря, які спотворюють результати аналізу. Виявлення бульбашок повітря є неможливим у термостабілізованій комірці поточної конструкції, оскільки вона є непрозорою.
4. **Збільшення кількості одночасно задіяних сенсорних елементів.** Зважаючи на значну тривалість аналізу, яку має розроблена біосенсорна система (60 хвилин), розробка багатоканального спектрометра ППР є доцільною для прискорення отримання експериментальних результатів.
5. **Автоматизація подачі зразків у вимірювальну проточну комірку.** Цей напрям є обов'язковим для успішної реалізації ідеї багатоканального спектрометра ППР через надмірну кількість дій оператора, яка вимагатиметься у випадку одночасного ручного перемикавання рідких середовищ на вході в біосенсорну систему. Внутрішній об'єм такого перемикача має бути мінімальним із максимальним уникненням крос-контамінації рідин.
6. **Дегазація рідин на вході в біосенсорну систему.** Наразі введенню будь-якої рідини (досліджуваного зразка, промивочного буферного розчину, колоїду НЧЗ тощо) в біосенсорну систему передують тривала та кропітка процедура ультразвукової дегазації цієї рідини з попереднім її нагрівом.
7. **Контроль адгезії золотого напилення до поверхні сенсорного елемента ППР.** Неякісне напилення золота на чутливий елемент ППР спричиняє вихід у повітря НЧЗ. Для мінімізації втрати реагентів усі чутливі золоті елементи мають

проходити ретельний контроль якості перед їх використанням в складі біосенсорної системи та інших ППР-біосенсорів.

8. **Повторна переробка використаних наночастинок золота та сенсорних елементів ППР.** НЧЗ є біологічно активними наноструктурами, і в приміщеннях, де з ними ведеться робота, має виконуватись їх належна переробка з метою нівеляції впливу на організм людини та повторного використання золота.
9. **Розробка протоколу очищення поверхонь, забруднених агрегованими НЧЗ.** На лабораторному посуді, в якому відбувається синтез та зберігання НЧЗ, часто виникають плями осаджених НЧЗ чорного кольору, стійкі до більшості хімічних засобів.
10. **Дизайн перистальтичних насосів,** придатних для точного контролю швидкості току рідини до 50 мкл/хв. Зазвичай відомі моделі насосів розраховані на значно більші об'єми та швидкість прокачування.
11. **Оптимізація програмного забезпечення спектрометра ППР** з метою зменшення кількості дій оператора для проведення вимірювання, а отже – покращення швидкості та якості його роботи.

Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

1. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Pyeshkova V.M., Errachid A., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of a Highly Sensitive SPR Biosensor for BCR–ABL Gene Sequence Detection Using a Novel Gold Nanoparticle–Enhanced Sandwich Assay Format. *Micromachines* 2026, 17, 426. <https://doi.org/10.3390/mi17040426>.
2. Золотопупова С.С., Худецький І.Ю., Соболевський М.С. Біобезпека виробництва та використання ДНК-біосенсорів. *Біомедична інженерія і технологія* 2025, 17. <https://doi.org/10.20535/2025.17.331628>.
3. Sobolevskyi M.S., Kucherenko. I.S., Lopatynskyi A.M., Dzyadevych S.V.,

Soldatkin O.O. Synthesis of monodisperse nanospheres by citrate reduction of AuCl_3 for their usage in DNA hybridization biosensors. *Biotechnologia Acta T.* 2025, 18, 96-99. <https://doi.org/10.15407/biotech18.02.096>.

4. Sobolevskyi M.S., Holubiev I.Iu., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Optimization of Parameters of Saline Sodium Citrate Buffer for Stability of Colloidal Gold Nanoparticles Used in DNA Hybridization Biosensor. *Innovative Biosystems and Bioengineering* 2024, 9, 12-20. <https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.310991>.
5. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Matsishin M.J., Dzyadevych S.V. Soldatkin A.P. Application of modified gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry. *Applied Nanoscience* 2023, 13, 7521–7529. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2>.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі розроблено та оптимізовано нову НЧЗ-вмісну гібридизаційну ППР-біосенсорну систему для сендвіч-аналізу генетичного маркера *BCR-ABL1* хронічної мієлоїдної лейкемії.

1. Використовуючи фізико-математичні методи, доведено можливість застосування наночастинок золота для більш ефективної біосенсорної детекції взаємодій між олігонуклеотидами ДНК, зокрема фрагментами онкогена *BCR-ABL1*.
2. Розроблено алгоритм аналізу ефективності гібридизаційних взаємодій, призначений для порівняльної характеристикації гібридизаційних ППР-біосенсорів.
3. Доведено можливість покращення межі детектування (2-3 порядки) аналізу біомолекул ППР-біосенсорами для детекції маркера ХМЛ за рахунок використання наночастинок золота.
4. Розроблено та оптимізовано процедуру сендвіч-аналізу з використанням двостадійної гібридизації олігонуклеотидної послідовності гена *BCR-ABL1* з олігонуклеотидними зондами на ППР-біосенсорі та наночастинок золота. Запропоновано принцип функціонування біосенсорної системи на основі цього сендвіч-аналізу.
5. Розроблено новий метод синтезу НЧЗ з AuCl_3 для отримання високомонодисперсних наночастинок золота з оптимальним діаметром для їх біобезпечного застосування.
6. Визначено оптимальний метод функціоналізації НЧЗ стабілізуючими агентами (2 мкМ МСН та 2 мкМ LA) з метою забезпечення найкращої

колоїдної стабільності частинок у розчині. Встановлено, що використання нижчих концентрацій стабілізуючих агентів призводить до посилення неспецифічного сигналу біосенсора через агрегацію НЧЗ на поверхні сенсора.

7. Показано, що використання зондових олігонуклеотидів, кон'югованих зі стабілізованими НЧЗ, у біосенсорному сендвіч-аналізі багатократно збільшує специфічний відгук біосенсорної системи на олігонуклеотиди гена *BCR-ABL1*.
8. Оцінено вплив параметрів досліджуваних розчинів на роботу розроблюваної системи та підібрано оптимальні умови її функціонування. Показано, що досліджувані НЧЗ можуть бути використані у складі гібридизаційного ДНК-біосенсора у середовищі $2.0 \times \text{SSC}$, а для їх тривалого зберігання оптимальним середовищем було визначено $0.1 \times \text{SSC}$.
9. Встановлено, що відтворюваність роботи розробленої біосенсорної системи ($\text{RSD} = 6.96\%$) є значно кращою, ніж відтворюваність традиційного ППР-біосенсора ($\text{RSD} = 43.64\%$). В той же час розроблена біосенсорна система має вищу тривалість вимірювання (60 хв), ніж традиційний ППР-біосенсор (10 хв). Тривалість аналізу в розробленій біосенсорній системі може бути зменшена; при цьому погіршується відтворюваність її роботи.
10. Встановлено, що розроблена в роботі ППР-біосенсорна система забезпечує лінійний діапазон виявлення мішені *BCR-ABL1* концентрацією від 80 пМ до 200 нМ, що робить його перспективним підходом для визначення генетичного маркера гена *BCR-ABL1* у реальних біологічних зразках.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kogan, S. C., Doherty, M., & Gitschier, J. (1987). An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *The New England journal of medicine*, 317(16), 985–990. <https://doi.org/10.1056/NEJM198710153171603>
2. Feng P. (1997). Impact of molecular biology on the detection of foodborne pathogens. *Molecular biotechnology*, 7(3), 267–278. <https://doi.org/10.1007/BF02740817>
3. Venkitanarayanan, K. S., Faustman, C., Crivello, J. F., Khan, M. I., Hoagland, T. A., & Berry, B. W. (1997). Rapid estimation of spoilage bacterial load in aerobically stored meat by a quantitative polymerase chain reaction. *Journal of applied microbiology*, 82(3), 359–364. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00368.x>
4. Olsen, J. E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P. E., Popovic, T., Rasmussen, H. N., & Olsvik, O. (1995). Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International journal of food microbiology*, 28(1), 1–78. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00159-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00159-4)
5. Mahony J. B. (2008). Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 716–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-07>
6. Kaminski, M. M., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Zhang, F., & Collins, J. J. (2021). CRISPR-based diagnostics. *Nature biomedical engineering*, 5(7), 643–656. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7>

7. Bluth M. H. (2018). Introduction: Molecular Medicine in the Common Era: Applications and Impact of Molecular Pathology in Health and Disease. *Clinics in laboratory medicine*, 38(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.03.001>
8. Грек А.М., Чернявський О.Ю., Галак О.В., Каракуркчі Г.В., Матикін О.В. (2014). Призначення та завдання біологічної розвідки підрозділів військ рхб захисту при біологічному зараженні в сучасних умовах – ISSN 2218-1555. Збірник наукових праць Академії внутрішніх військ МВС України. Вип. 1 (23).
9. Fang, J., Zhu, X., Wang, C., & Shangguan, L. (2016). Applications of DNA Technologies in Agriculture. *Current genomics*, 17(4), 379–386. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160331203224>
10. Baldi, P., & La Porta, N. (2020). Molecular Approaches for Low-Cost Point-of-Care Pathogen Detection in Agriculture and Forestry. *Frontiers in plant science*, 11, 570862. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.570862>
11. Tastanova, A., Stoffel, C. I., Dzung, A., Cheng, P. F., Bellini, E., Johansen, P., Duda, A., Nobbe, S., Lienhard, R., Bosshard, P. P., & Levesque, M. P. (2021). A Comparative Study of Real-Time RT-PCR-Based SARS-CoV-2 Detection Methods and Its Application to Human-Derived and Surface Swabbed Material. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 23(7), 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.009>
12. Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
13. Bogiel, T., Kwiecińska, P., Górniak, R., Kanarek, P., & Mikucka, A. (2024). The Use of Gel Electrophoresis to Separate Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplicons Allows for the Easy Identification and Assessment of the Spread of Toxigenic *Clostridioides difficile* Strains. *Gels (Basel, Switzerland)*, 10(12), 818. <https://doi.org/10.3390/gels10120818>

14. Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387.
<https://doi.org/10.3390/genes13122387>
15. Bouchez, T., Blieux, A.L., Dequiedt, S. et al. (2016). Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. *Environ Chem Lett* 14, 423–441.
<https://doi.org/10.1007/s10311-016-0581-3>
16. Holst-Jensen, A., Rønning, S. B., Løvseth, A., & Berdal, K. G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 375(8), 985–993.
<https://doi.org/10.1007/s00216-003-1767-7>
17. Yeh, S. H., Tsai, C. Y., Kao, J. H., Liu, C. J., Kuo, T. J., Lin, M. W., Huang, W. L., Lu, S. F., Jih, J., Chen, D. S., & Chen, P. J. (2004). Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of hepatology*, 41(4), 659–666.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.06.031>
18. Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2005). Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in clinical chemistry*, 40, 219–259. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(05\)40006-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(05)40006-2)
19. Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C., Pacey, S., Baird, R., & Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature reviews. Cancer*, 17(4), 223–238. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.7>
20. Haviar V. O., Bratyshchenko A. S., Skrypnikova O. S., Kariaka S. V., Honcharenko A. I., Todoryshyn D. P., Khokhliuk O. A., Rosohatska I. V., Kashuba V. I., Kononenko O. A., Vikarchuk M. V., Panasenko G. V., Mankovska O. S. (2025). Non-invasive biomarkers for bladder cancer: a study on lncRNAs and

DNA methylation. *Biopolymers and Cell*, 41(1), 52-62.

<https://doi.org/10.7124/bc.000B0E>

21. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.

<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

22. Totomoch-Serra, A., Marquez, M. F., & Cervantes-Barragán, D. E. (2017). Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000Research*, 6, 1016.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.11610.1>

23. Sanger, F., & Thompson, E. O. (1953). The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *The Biochemical journal*, 53(3), 353–366.

<https://doi.org/10.1042/bj0530353>

24. Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases--a historical perspective and more. *Nucleic acids research*, 42(12), 7489–7527. <https://doi.org/10.1093/nar/gku447>

25. Williams R. J. (2003). Restriction endonucleases: classification, properties, and applications. *Molecular biotechnology*, 23(3), 225–243.

<https://doi.org/10.1385/mb:23:3:225>

26. Sanches, P. R. S., Charlie-Silva, I., Braz, H. L. B., Bittar, C., Freitas Calmon, M., Rahal, P., & Cilli, E. M. (2021). Recent advances in SARS-CoV-2 Spike protein and RBD mutations comparison between new variants Alpha (B.1.1.7, United Kingdom), Beta (B.1.351, South Africa), Gamma (P.1, Brazil) and Delta (B.1.617.2, India). *Journal of virus eradication*, 7(3), 100054.

<https://doi.org/10.1016/j.jve.2021.100054>

27. Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., & Vinjé, J. (2011). Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerging infectious diseases*, 17(8), 1389–1395.
<https://doi.org/10.3201/eid1708.101837>
28. Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
29. Ledergerber, C., & Dessimoz, C. (2011). Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Briefings in bioinformatics*, 12(5), 489–497.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbq077>
30. Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
31. Giani, A. M., Gallo, G. R., Gianfranceschi, L., & Formenti, G. (2019). Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.002>
32. Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
33. Pennisi E. (2010). Genomics. Semiconductors inspire new sequencing technologies. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5970), 1190.
<https://doi.org/10.1126/science.327.5970.1190>
34. Merriman, B., Ion Torrent R&D Team, & Rothberg, J. M. (2012). Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*, 33(23), 3397–3417. <https://doi.org/10.1002/elps.201200424>
35. Akhras, M. S., Pettersson, E., Diamond, L., Unemo, M., Okamoto, J., Davis, R. W., & Pourmand, N. (2013). The Sequencing Bead Array (SBA), a next-

generation digital suspension array. PloS one, 8(10), e76696.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076696>

36. Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503–517. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0)

37. Glenn G. (2013). Chapter Five - Analysis of DNA by Southern Blotting. *Methods in Enzymology*, 529, 47-53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00005-7>

38. Green, M. R., & Sambrook, J. (2021). Analysis of DNA by Southern Blotting. *Cold Spring Harbor protocols*, 2021(7), 10.1101/pdb.top100396. <https://doi.org/10.1101/pdb.top100396>

39. Brown T. (2001). Southern blotting. *Current protocols in immunology*, Chapter 10, . <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1006as06>

40. Nucleic Acid Detection on Gels, Blots and Arrays—Section 8.4 [Електронний ресурс] / ThermoFisher Scientific - Режим доступу до ресурсу: <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/nucleic-acid-detection-and-genomics-technology/nucleic-acid-detection-and-quantitation-in-electrophoretic-gels-and-capillaries>

41. Are there guidelines that should be taken into account when designing oligonucleotides? [Електронний ресурс] / Metabion - Режим доступу до ресурсу: <https://www.metabion.com/faqs/are-there-guidelines-that-should-be-taken-into-account-when-designing-oligonucleotides>

42. Dincer, C., Bruch, R., Costa-Rama, E., Fernández-Abedul, M. T., Merkoçi, A., Manz, A., Urban, G. A., & Güder, F. (2019). Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla.), 31(30), e1806739. <https://doi.org/10.1002/adma.201806739>

43. Hua, Y., Ma, J., Li, D., & Wang, R. (2022). DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. *Biosensors*, 12(3), 183.
<https://doi.org/10.3390/bios12030183>
44. Chen, C., & Wang, J. (2020). Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. *The Analyst*, 145(5), 1605–1628.
<https://doi.org/10.1039/c9an01998g>
45. Sa'adon, S. A., Jasni, N. H., Hamzah, H. H., & Othman, N. (2024). Electrochemical biosensors for the detection of protozoan parasite: a scoping review. *Pathogens and global health*, 118(6), 459–470.
<https://doi.org/10.1080/20477724.2024.2381402>
46. Мруга, Д. О., Дзядевич, С. В., & Солдаткін, О. О. (2022). Біосенсор для визначення АЛТ. *Сенсорна електроніка і мікросистемні технології*, 19(1/2), 30–44. <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2022.1/2.239789>
47. Sobolevskyi, M. S., Lopatynskyi, A. M., Samoylov, A. V., Dorozinsky, G. V., Lyapin, O. M., Khrystosenko, R. V., Chegel, V. I., Pyeshkova, V. M., Errachid, A., Dzyadevych, S. V., & Soldatkin, O. O. (2026). Development of a Highly Sensitive SPR Biosensor for BCR–ABL Gene Sequence Detection Using a Novel Gold Nanoparticle–Enhanced Sandwich Assay Format. *Micromachines*, 17(4), 426.
<https://doi.org/10.3390/mi17040426>
48. Wu, Q., Zhang, Y., Yang, Q., Yuan, N., & Zhang, W. (2019). Review of Electrochemical DNA Biosensors for Detecting Food Borne Pathogens. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 19(22), 4916. <https://doi.org/10.3390/s19224916>
49. Matsishin, M. J., Ushenin, I.uV., Rachkov, A. E., & Solatkin, A. P. (2016). SPR Detection and Discrimination of the Oligonucleotides Related to the Normal and the Hybrid bcr-abl Genes by Two Stringency Control Strategies. *Nanoscale research letters*, 11(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1226-y>

50. Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). A review on impedimetric biosensors. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 248–262. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.942456>
51. Zhang, Y., Luo, J., Flewitt, A. J., Cai, Z., & Zhao, X. (2018). Film bulk acoustic resonators (FBARs) as biosensors: A review. *Biosensors & bioelectronics*, 116, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.028>
52. Alvarez, M., Carrascosa, L. G., Moreno, M., Calle, A., Zaballos, A., Lechuga, L. M., Martínez-A, C., & Tamayo, J. (2004). Nanomechanics of the formation of DNA self-assembled monolayers and hybridization on microcantilevers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 20(22), 9663–9668. <https://doi.org/10.1021/la0489559>
53. Gao, S., Sun, L. P., Li, J., Jin, L., Ran, Y., Huang, Y., & Guan, B. O. (2017). High-sensitivity DNA biosensor based on microfiber Sagnac interferometer. *Optics express*, 25(12), 13305–13313. <https://doi.org/10.1364/OE.25.013305>
54. Aslan, M., & Levent, A. (2026). Electrochemical and spectrophotometric investigation of DNA interactions with TURKOVAC and Pfizer-BioNTech vaccines: Implications for biosensor sensitivity. *Analytica chimica acta*, 1389, 345060. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2026.345060>
55. Chiavaioli, F., Giannetti, A., Baldini, F. (2020). From Refractometry to Biosensing with Optical Fibres. *Optical Fibre Sensors*. <https://doi.org/10.1002/9781119534730.ch10>
56. Chen, Y., Liu, J., Yang, Z., Wilkinson, J. S., & Zhou, X. (2019). Optical biosensors based on refractometric sensing schemes: A review. *Biosensors & bioelectronics*, 144, 111693. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111693>
57. Sobolevskyi, M., Soldatkin, O., Lopatynskyi, A., Chegel, V., Samoylov, A., Matsishin, M., Dzyadevych, S., Soldatkin, A. (2023). Application of modified

gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry. *Applied Nanoscience*, 12(13), 7521–7529. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2>

58. Šípová, H., & Homola, J. (2013). Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: a review. *Analytica chimica acta*, 773, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.040>

59. Su, X., Wu, Y. J., & Knoll, W. (2005). Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization. *Biosensors & bioelectronics*, 21(5), 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.01.006>

60. Tang, Q., Su, X., & Loh, K. P. (2007). Surface plasmon resonance spectroscopy study of interfacial binding of thrombin to antithrombin DNA aptamers. *Journal of colloid and interface science*, 315(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.06.040>

61. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>

62. Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019–5032. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>

63. Sun, C., Chang, L., & Zhu, X. (2017). Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget*, 8(21), 35445–35459. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16367>

64. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J., & Witte, O. N. (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4946), 1079–1082.
<https://doi.org/10.1126/science.2408149>
65. Patterer, V., Schnittger, S., Kern, W., Haferlach, T., & Haferlach, C. (2013). Hematologic malignancies with PCM1-JAK2 gene fusion share characteristics with myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB, and FGFR1. *Annals of hematology*, 92(6), 759–769. <https://doi.org/10.1007/s00277-013-1695-3>
66. Liquori, A., Ibañez, M., Sargas, C., Sanz, M. Á., Barragán, E., & Cervera, J. (2020). Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. *Cancers*, 12(3), 624.
<https://doi.org/10.3390/cancers12030624>
67. Molenaar, R. J., Thota, S., Nagata, Y., Patel, B., Clemente, M., Przychodzen, B., Hirsh, C., Viny, A. D., Hosano, N., Bleeker, F. E., Meggendorfer, M., Alpermann, T., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., van Noorden, C. J., Radivoyevitch, T., Carraway, H. E., Makishima, H., Miyano, S., ... Maciejewski, J. P. (2015). Clinical and biological implications of ancestral and non-ancestral IDH1 and IDH2 mutations in myeloid neoplasms. *Leukemia*, 29(11), 2134–2142.
<https://doi.org/10.1038/leu.2015.91>
68. Percival, M. E., Lai, C., Estey, E., & Hourigan, C. S. (2017). Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. *Blood reviews*, 31(4), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.01.003>
69. Jain, D., Singh, T., & Arora, P. (2007). Down syndrome with microgranular variant of acute promyelocytic leukemia in a child: a case report. *Journal of medical case reports*, 1, 147. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-1-147>

70. Clarke, R. T., Van den Bruel, A., Bankhead, C., Mitchell, C. D., Phillips, B., & Thompson, M. J. (2016). Clinical presentation of childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Archives of disease in childhood*, 101(10), 894–901. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311251>
71. Sanz, M. A., Grimwade, D., Tallman, M. S., Lowenberg, B., Fenaux, P., Estey, E. H., Naoe, T., Lengfelder, E., Büchner, T., Döhner, H., Burnett, A. K., & Lo-Coco, F. (2009). Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 113(9), 1875–1891. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-150250>
72. Sehgal, T., & Sharma, P. (2023). Auer rods and faggot cells: A review of the history, significance and mimics of two morphological curiosities of enduring relevance. *European journal of haematology*, 110(1), 14–23. <https://doi.org/10.1111/ejh.13872>
73. Tefferi A. (2006). Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 240–245. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.240>
74. Hallek M. (2025). Chronic Lymphocytic Leukemia: 2025 Update on the Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. *American journal of hematology*, 100(3), 450–480. <https://doi.org/10.1002/ajh.27546>
75. Nowell, P. C., & Hungerford, D. A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 25, 85–109.
76. Rowley J. D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290–293. <https://doi.org/10.1038/243290a0>

77. Bartram, C. R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M. A., Davies, T., & Stone, M. (1983). Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 306(5940), 277–280. <https://doi.org/10.1038/306277a0>
78. Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., & Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 36(1), 93–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90077-1)
79. Daley, G. Q., Van Etten, R. A., & Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4944), 824–830. <https://doi.org/10.1126/science.2406902>
80. Gambacorti-Passerini, C., Antolini, L., Mahon, F. X., Guilhot, F., Deininger, M., Fava, C., Nagler, A., Della Casa, C. M., Morra, E., Abruzzese, E., D'Emilio, A., Stagno, F., le Coutre, P., Hurtado-Monroy, R., Santini, V., Martino, B., Pane, F., Piccin, A., Giraldo, P., Assouline, S., ... Kim, D. W. (2011). Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(7), 553–561. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr060>
81. Hehlmann, R., Lauseker, M., Sauße, S., Pfirrmann, M., Krause, S., Kolb, H. J., Neubauer, A., Hossfeld, D. K., Nerl, C., Gratwohl, A., Baerlocher, G. M., Heim, D., Brümmendorf, T. H., Fabarius, A., Haferlach, C., Schlegelberger, B., Müller, M. C., Jeromin, S., Proetel, U., Kohlbrenner, K., ... Hasford, J. (2017). Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia*, 31(11), 2398–2406. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.253>

82. Antonenko, S. V., & Telegeev, G. D. (2020). Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl level in K562 cells. *Experimental oncology*, 42(2), 109–114. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14533>
83. Jiang, X., Lopez, A., Holyoake, T., Eaves, A., & Eaves, C. (1999). Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12804–12809. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12804>
84. Corso, A., Lazzarino, M., Morra, E., Merante, S., Astori, C., Bernasconi, P., Boni, M., & Bernasconi, C. (1995). Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Annals of hematology*, 70(2), 79–82. <https://doi.org/10.1007/BF01834384>
85. Deininger, M. W., Bose, S., Gora-Tybor, J., Yan, X. H., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (1998). Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer research*, 58(3), 421–425.
86. Ross, D. M., O'Hely, M., Bartley, P. A., Dang, P., Score, J., Goyne, J. M., Sobrinho-Simoes, M., Cross, N. C., Melo, J. V., Speed, T. P., Hughes, T. P., & Morley, A. A. (2013). Distribution of genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia: analysis of 308 patients. *Leukemia*, 27(10), 2105–2107. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.116>
87. Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., & Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 36(1), 93–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90077-1)
88. Rabbitts T. H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 372(6502), 143–149. <https://doi.org/10.1038/372143a0>

89. Zenebe, B., Nigussie, H., Belay, G., & Seboka, N. (2023). A review on characterization of BCR - ABL transcript variants for molecular monitoring of chronic myeloid leukemia phenotypes. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 28(1), 2284038. <https://doi.org/10.1080/16078454.2023.2284038>
90. Peng, Y., Shen, H., Tang, S., Huang, Z., Hao, Y., Luo, Z., Zhou, F., Wang, T., & Feng, W. (2018). Colorimetric determination of BCR/ABL fusion genes using a nanocomposite consisting of Au@Pt nanoparticles covered with a PAMAM dendrimer and acting as a peroxidase mimic. *Mikrochimica acta*, 185(8), 401. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2940-1>
91. Avelino, K. Y. P. S., Frias, I. A. M., Lucena-Silva, N., Gomes, R. G., de Melo, C. P., Oliveira, M. D. L., & Andrade, C. A. S. (2016). Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 148, 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.029>
92. Avelino, K. Y. P. S., Oliveira, L. S., Santos, M. R., Lucena-Silva, N., Andrade, C. A. S., & Oliveira, M. D. L. (2022). Electrochemical DNA biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 147, 108176. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108176>
93. Yu, R., Xue, J., Wang, Y., Qiu, J., Huang, X., Chen, A., & Xue, J. (2022). Novel Ti₃C₂Tx MXene nanozyme with manageable catalytic activity and application to electrochemical biosensor. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01317-9>
94. Wu, J., Huang, Y., Bian, X., Li, D., Cheng, Q., & Ding, S. (2016). Biosensing of BCR/ABL fusion gene using an intensity-interrogation surface plasmon

resonance imaging system. *Optics Communications*, 377, 24-

32. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2016.05.035>

95. Zhen, C., & Wang, Y. L. (2013). Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: international standardization of *BCR-ABL1* quantitation. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 15(5), 556–564.

<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.010>

96. Bennour, A., Saad, A., & Sennana, H. (2016). Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Critical reviews in oncology/hematology*, 97, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.020>

97. Javed, A., Mukhtar, H., Kubra, K. T., Lodhi, S., & Abaidullah, S. (2020). Detection of BCR-ABL fusion gene and its transcript variants in chronic myeloid leukaemia patients - a multi-comparison study. *JPMMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 70(10), 1748–11752. <https://doi.org/10.5455/JPMA.30606>

98. Zhou, X., Li, A., Kong, D., Shi, Y., Zhang, P., & Shan, N. (2025). The silent players: Atypical BCR-ABL isoforms as biomarkers and therapeutic hurdles in CML pathogenesis (Review). *Oncology reports*, 54(6), 162.

<https://doi.org/10.3892/or.2025.8995>

99. Dufresne, S. D., Belloni, D. R., Levy, N. B., & Tsongalis, G. J. (2007). Quantitative assessment of the BCR-ABL transcript using the Cepheid Xpert BCR-ABL Monitor assay. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(6), 947–950. <https://doi.org/10.5858/2007-131-947-QAOTBT>

100. Enjeti, A., Granter, N., Ashraf, A., Fletcher, L., Branford, S., Rowlings, P., & Dooley, S. (2015). A longitudinal evaluation of performance of automated *BCR-ABL1* quantitation using cartridge-based detection system. *Pathology*, 47(6), 570–574. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000293>

101. Kongruang, A., Limsuwanachot, N., Magmuang, S., Areesirisuk, P., Niparuck, P., Siriboonpiputtana, T., & Rerkamnuaychoke, B. (2023). Committed

change of real-time quantitative PCR to droplet digital PCR for monitoring BCR::ABL1 transcripts in tyrosine kinase inhibitor treated CML. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 28(1), 2256199.

<https://doi.org/10.1080/16078454.2023.2256199>

102. Schasfoort, R. B. M. (Richard B. M.). (2017). *Handbook of surface plasmon resonance* (2nd;2nd;2; ed.). Royal Society of Chemistry.

103. Avelino, K. Y. P. S., Silva, R. R., da Silva Junior, Alberto G., Oliveira, M. D. L., & Andrade, C. A. S. (2017). Smart applications of bionanosensors for BCR/ABL fusion gene detection in leukemia. *Journal of King Saud University. Science*, 29(4), 413-423. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.08.002>

104. Merkoçi A. (2010). Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors. *Biosensors & bioelectronics*, 26(4), 1164–1177. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.028>

105. Bellassai, N., D'Agata, R., Marti, A., Rozzi, A., Volpi, S., Allegretti, M., Corradini, R., Giacomini, P., Huskens, J., & Spoto, G. (2021). Detection of Tumor DNA in Human Plasma with a Functional PLL-Based Surface Layer and Plasmonic Biosensing. *ACS sensors*, 6(6), 2307–2319. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00360>

106. Li, Q., Wang, Q., Yang, X., Wang, K., Zhang, H., & Nie, W. (2017). High sensitivity surface plasmon resonance biosensor for detection of microRNA and small molecule based on graphene oxide-gold nanoparticles composites. *Talanta*, 174, 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.048>

107. Yonzon, C. R., Jeoung, E., Zou, S., Schatz, G. C., Mrksich, M., & Van Duyne, R. P. (2004). A comparative analysis of localized and propagating surface plasmon resonance sensors: the binding of concanavalin A to a monosaccharide functionalized self-assembled monolayer. *Journal of the American Chemical Society*, 126(39), 12669-12676. <https://doi.org/10.1021/ja047118q>

108. Chen, Z., Meng, C., Wang, X., Chen, J., Deng, J., Fan, T., Wang, L., Lin, H., Huang, H., Li, S., Sun, S., Qu, J., Fan, D., Zhang, X., Liu, Y., Shao, Y., & Zhang, H. (2024). Ultrasensitive DNA origami plasmon sensor for accurate detection in circulating tumor DNAs. *Laser & Photonics Reviews*, 18(10), n/a. <https://doi.org/10.1002/lpor.202400035>
109. Shkotova, L., Zinchenko, O., Arkhypva, V., & Dzyadevych, S. (2023). Potentiometric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles. *Applied Nanoscience*, 13(7), 5133-5138. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02715-z>
110. Soldatkin, O. O., Soldatkina, O. V., Piliponskiy, I. I., Rieznichenko, L. S., Gruzina, T. G., Dybkova, S. M., Dzyadevych, S. V., & Soldatkin, A. P. (2022). Application of gold nanoparticles for improvement of analytical characteristics of conductometric enzyme biosensors. *Applied Nanoscience*, 12(4), 995-1003. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01807-6>
111. Hao, K., He, Y., Lu, H., Pu, S., Zhang, Y., Dong, H., & Zhang, X. (2017). High-sensitive surface plasmon resonance microRNA biosensor based on streptavidin functionalized gold nanorods-assisted signal amplification. *Analytica chimica acta*, 954, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.006>
112. Kurita, R., Yanagisawa, H., Yoshioka, K., & Niwa, O. (2015). On-Chip Sequence-Specific Immunochemical Epigenomic Analysis Utilizing Outward-Turned Cytosine in a DNA Bulge with Handheld Surface Plasmon Resonance Equipment. *Analytical chemistry*, 87(22), 11581–11586. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03520>
113. Fu, Y., Yuan, R., Xu, L., Chai, Y., Zhong, X., & Tang, D. (2005). Indicator free DNA hybridization detection via EIS based on self-assembled gold nanoparticles and bilayer two-dimensional 3-mercaptopropyltrimethoxysilane onto a gold substrate. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.10.008>

114. Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>
115. Wuithschick, M., Birnbaum, A., Witte, S., Sztucki, M., Vainio, U., Pinna, N., Rademann, K., Emmerling, F., Kraehnert, R., & Polte, J. (2015). Turkevich in new robes: Key questions answered for the most common gold nanoparticle synthesis. *ACS Nano*, 9(7), 7052-7071. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01579>
116. Demokritou, P., Pyrgiotakis, G., Moudgil, B. M., Carpinone, P. L., & Dong, J. (2020). Synthesis of precision gold nanoparticles using turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*, 37, 224-232. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>
117. Chegel, V., Rachkov, O., Lopatynskyi, A., Ishihara, S., Yanchuk, I., Nemoto, Y., Hill, J. P., & Ariga, K. (2012). Gold nanoparticles aggregation: Drastic effect of cooperative functionalities in a single molecular conjugate. *Journal of Physical Chemistry. C*, 116(4), 2683-2690. <https://doi.org/10.1021/jp209251y>
118. Goncharenko, N. A., Pavlenko, O. L., Dmytrenko, O. P., Kulish, M. P., Lopatynskyi, A. M., & Chegel, V. I. (2019). Gold nanoparticles as a factor of influence on doxorubicin–bovine serum albumin complex. *Applied Nanoscience*, 9(5), 825-833. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0748-2>
119. Goncharenko, N. A., Pavlenko, O. L., Dmytrenko, O. P., Kulish, M. P., Lopatynskyi, A. M., Goncharova, O. O., Tsegelna, A. V., Demydov, P. V., & Chegel, V. I. (2020). Understanding prodrugs: Complexation in aqueous solutions of doxorubicin, bovine serum albumin and gold nanoparticles. *Applied Nanoscience*, 10(8), 2941-2949. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01060-y>
120. Bulavin, L. A., Goncharenko, N. A., Dmytrenko, O. P., Pavlenko, O. L., Kulish, M. P., Goncharova, O., Demydov, P. V., Lopatynskyi, A. M., & Chegel, V. I. (2019). Heteroassociation of antitumor agent doxorubicin with bovine serum albumin

in the presence of gold nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 284, 633-638.

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.017>

121. Liu, X., Atwater, M., Wang, J., & Huo, Q. (2007). Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>

122. Soboleskyi, M., Holubiev, I., Lopatynskyi, A., Samoylov, A., Dorozinsky, G., Liapin, O., Khrystosenko, R., Chegel, V., Dzyadevych, S., & Soldatkin, O. (2025). Optimization of parameters of saline sodium citrate buffer for stability of colloidal gold nanoparticles used in DNA hybridization biosensor. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, 9(2), 12-20.

<https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.310991>

123. Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D., & Blum, L. J. (2007). DNA biosensors and microarrays. *Chemical Reviews*, 108(1), 109-139.

<https://doi.org/10.1021/cr0684467>

124. Liu, B., & Liu, J. (2017). Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Analytical Methods*, 9(18), 2633-2643. <https://doi.org/10.1039/c7ay00368d>

125. Dorozinsky, G. (2013). Reducing measurement uncertainty of instruments based on the phenomenon of surface plasmon resonance. *American Journal of Optics and Photonics (Print)*, 1(3), 17.

<https://doi.org/10.11648/j.ajop.20130103.12>

126. Matsishin, M., Rachkov, A., Lopatynskyi, A., Chegel, V., Soldatkin, A., & El'skaya, A. (2017). Selective amplification of SPR biosensor signal for recognition of rpoB gene fragments by use of gold nanoparticles modified by thiolated DNA. *Nanoscale Research Letters*, 12(1), 252-6.

<https://doi.org/10.1186/s11671-017-2031-y>

127. Herne, T. M., & Tarlov, M. J. (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 119(38), 8916-8920. <https://doi.org/10.1021/ja9719586>

128. Levicky, R., Herne, T. M., Tarlov, M. J., & Satija, S. K. (1998). Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study. *Journal of the American Chemical Society*, 120(38), 9787-9792. <https://doi.org/10.1021/ja981897r>

129. Markham, N. R., & Zuker, M. (2005). DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl-2), W577-W581. <https://doi.org/10.1093/nar/gki591>

130. Saglio, G., Storlazzi, C. T., Giugliano, E., Surace, C., Anelli, L., Rege-Cambrin, G., Zagaria, A., Velasco, A. J., Heiniger, A., Scaravaglio, P., Gomez, A. T., Gomez, J. R., Archidiacono, N., Banfi, S., & Rocchi, M. (2002). A 76-kb duplicon maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: Possible involvement in the genesis of the philadelphia chromosome translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 99(15), 9882-9887. <https://doi.org/10.1073/pnas.152171299>

131. Peterson, A. W., Heaton, R. J., & Georgiadis, R. M. (2001). The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic acids research*, 29(24), 5163–5168. <https://doi.org/10.1093/nar/29.24.5163>.

132. Saiapina, O. Y., Berketa, K., Sverstiuk, A. S., Fayura, L., Sibirny, A. A., Dzyadevych, S., & Soldatkin, O. O. (2024). Adaptation of conductometric monoenzyme biosensor for rapid quantitative analysis of L-arginine in dietary supplements. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 24(14), 4672. <https://doi.org/10.3390/s24144672>

133. Optical constants of H₂O, D₂O (Water, heavy water, ice) [Електронний ресурс] / RefractiveIndex.info - Режим доступу до ресурсу: <https://refractiveindex.info/?shelf=main&book=H2O&page=Hale>

134. Optical constants of Blood [Електронний ресурс] / RefractiveIndex.info - Режим доступу до ресурсу: <https://refractiveindex.info/?shelf=other&book=blood&page=Liu>

135. Singh, R., Priye, V., & Chack, D. (2022). Highly sensitive refractive index-based sensor for DNA hybridization using subwavelength grating waveguide. Technical Review - IETE, 39(6), 1463-1472. <https://doi.org/10.1080/02564602.2021.2016076>

136. Сиволоб А. (2023). Молекулярна біологія (друге видання). ВПЦ «Київський Університет»

137. Aftab, M., Mansha, M. S., Iqbal, T., & Farooq, M. (2024). Surface plasmon excitation: Theory, configurations, and applications. Plasmonics (Norwell, Mass.), 19(4), 1701-1719. <https://doi.org/10.1007/s11468-023-02095-2>

138. Raether, H., Höhler, G., & Niekisch, E. A. (1988). Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. Springer Tracts in Modern Physics, 111

139. Chou, C., Chen, C., Lee, T., & Peck, K. (2004). Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. Nucleic Acids Research, 32(12), e99-e99. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh099>

140. Zeng, S., Yu, X., Law, W., Zhang, Y., Hu, R., Dinh, X., Ho, H., & Yong, K. (2013). Size dependence of au NP-enhanced surface plasmon resonance based on differential phase measurement. Sensors and Actuators. B, Chemical, 176, 1128-1133. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.09.073>

141. Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: What we have learned so far? Journal of Nanoparticle Research :

An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology, 12(7), 2313-2333.
<https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>

142. Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. The Journal of Physical Chemistry. B, 110(32), 15700-15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>

143. Gold(III) chloride trihydrate [Электронный ресурс] / Sigma-Aldrich - Режим доступа до ресурсу:
<https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sigald/g4022>

144. Gold(III) chloride [Электронный ресурс] / Sigma-Aldrich - Режим доступа до ресурсу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/aldrich/334049>

145. Lang, B. E., & Schwarz, F. P. (2007). Thermodynamic dependence of DNA/DNA and DNA/RNA hybridization reactions on temperature and ionic strength. Biophysical Chemistry, 131(1), 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.09.007>

146. Rachkov, A., Patskovsky, S., Soldatkin, A., & Meunier, M. (2011). Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the rpoB genes of mycobacterium tuberculosis. Talanta (Oxford), 85(4), 2094-2099. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.032>

147. Zhao, W., Brook, M. A., & Li, Y. (2008). Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology, 9(15), 2363-2371. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800282>

148. Hirschfelder, J. O., Curtiss, Charles F. (Charles Francis), & Bird, R. Byron (Robert Byron). (1954). Molecular theory of gases and liquids. Wiley.

149. Two State Melting Hybridization [Электронный ресурс] / The UNAFold Web Server - Режим доступа до ресурсу:
<https://www.unafold.org/Dinamelt/applications/two-state-melting-hybridization.php>

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті в наукових виданнях

1. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Pyeshkova V.M., Errachid A., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Development of a Highly Sensitive SPR Biosensor for BCR–ABL Gene Sequence Detection Using a Novel Gold Nanoparticle–Enhanced Sandwich Assay Format. *Micromachines* 2026, 17, 426. <https://doi.org/10.3390/mi17040426>. Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристизація та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.
2. Золотопупова С.С., Худецький І.Ю., Соболевський М.С. Біобезпека виробництва та використання ДНК-біосенсорів. *Біомедична інженерія і технологія* 2025, 17. <https://doi.org/10.20535/.2025.17.331628>. Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, консультування з питань наноструктур та спектрометрії ППР, рецензування та редагування статті.
3. Sobolevskyi M.S., Kucherenko. I.S., Lopatynskyi A.M., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Synthesis of monodisperse nanospheres by citrate reduction of AuCl₃ for their usage in DNA hybridization biosensors. *Biotechnologia Acta T.* 2025, 18, 96-99. <https://doi.org/10.15407/biotech18.02.096>. Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристизація та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.
4. Sobolevskyi M.S., Holubiev I.Iu., Lopatynskyi A.M., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Lyapin O.M., Khrystosenko R.V., Chegel V.I., Dzyadevych S.V.,

Soldatkin O.O. Optimization of Parameters of Saline Sodium Citrate Buffer for Stability of Colloidal Gold Nanoparticles Used in DNA Hybridization Biosensor. Innovative Biosystems and Bioengineering 2024, 9, 12-20.

<https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.310991>. Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.

5. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Matsishin M.J., Dzyadevych S.V. Soldatkin A.P. Application of modified gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry. Applied Nanoscience 2023, 13, 7521–7529. <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2>. Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання та підготовка статті до друку.

Патенти

1. Соболевський М.С., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Біосенсорна система для визначення послідовності олігонуклеотидів філадельфійської хромосоми. Патент на винахід №130005. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1879802/> Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристика та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання патенту.

2. Соболевський М.С., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Гібридаційна біосенсорна система на основі поверхневого плазмонного резонансу для детекції послідовності олігонуклеотидів філадельфійської хромосоми. Патент на корисну модель №156960.

<https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1816094/> Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез, характеристика та біофункціоналізація наночастинок золота, спектрометрія ППР, обробка результатів, написання патенту.

3. Соболєвський М.С., Лопатинський А.М., Дзядевич С.В., Кучеренко І.С., Солдаткін О.О. Спосіб прецизійного синтезу наночастинок золота цитратним відновленням золота (III) хлориду. Патент на корисну модель №163065. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1923454/> Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, синтез та характеристика наночастинок золота, фотонна кореляційна спектроскопія, обробка результатів, написання патенту.

Тези доповідей на наукових конференціях

1. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dorozinsky G.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Electrosterical stabilization of citrate-bound gold nanoparticles for signal enhancement of hybridization DNA biosensor. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2025)”, 20-23 August 2025, Ivano-Frankivsk, Ukraine, Book of Abstracts – P. 466.

2. Sobolevskyi M.S. Kucherenko I.S. Lopatynskyi A.M. Dzyadevych S.V. Soldatkin O.O. Precision synthesis of citrate-capped gold nanoparticles for enhancement of DNA hybridization biosensors. XIX All-Ukrainian Conference of young scientists, May 20-21, 2025, Book of Abstracts – P. 40.

3. Соболєвський М.С., Кучеренко І.С., Лопатинський А.М. Чегель В.І., Самойлов А.В., Дзядевич С.В., Солдаткін О.О., Оптимізація наночастинок золота, які використовуються в гібридизаційній біосенсорній системі на основі поверхневого плазмонного резонансу. IV Міжнародна науково-практична

конференція «Природничі науки та освіта: сучасний стан і перспективи розвитку» 7-8 листопада 2024 р., м. Харків, Збірник наукових праць – с. 100-101.

4. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V. Enhancing the response of a hybridization SPR biosensor using modified gold nanoparticles. BioGENext: Next Generation Therapy Conference, 17-20 September 2024, Kyiv, Ukraine; Biopolym. Cell. 2024; 40(3):204-204. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000AE7>.
5. Sobolevskyi M.S., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin O.O. Optimization of gold nanoparticles employed in hybridization biosensor system based on surface plasmon resonance. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2024)”, 21-24 August 2024, Uzhhorod, Ukraine, Book of Abstracts – P. 543.
6. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Surface plasmon resonance detection of the sequence of Philadelphia chromosome oligonucleotides with nanoparticle-mediated signal enhancement. XVIII All-Ukrainian Conference of young scientists, May 21-22, 2024, Book of Abstracts – P. 55.
7. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Samoylov A.V. SPR-based detection of point mutations in 21-base oligonucleotide sequences. XXI International conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: Advancements in life sciences”, book of abstracts (Kyiv, 24-26 April, 2024) – P. 199.
8. Sobolevskyi M.S., Soldatkin O.O., Lopatynskyi A.M., Chegel V.I., Samoylov A.V., Matsishin M.J., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Hybridization biosensor system based on surface plasmon resonance for detection of the sequence of oligonucleotides of the Philadelphia chromosome. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023)”, 16-19 August 2023, Lviv, Ukraine – P. 544.

9. Sobolevskyi M.S., Rachkov A.E., Samoylov A.V., Ushenin Yu.V., Soldatkin A.P. Optimization of the development of a bioselective element of the SPR biosensor for the detection of oligonucleotide sequences of the Philadelphia chromosome. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l'Université Bourgogne Franche Comté. 24-25 Novembre 2022, Dijon, France, p. 28.

ДОДАТОК Б

Довідка про використання результатів дисертаційної роботи.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Декан факультету біомедичної інженерії
 Національного технічного університету
 України «Київський політехнічний
 інститут імені Ігоря Сікорського»
 Олександр ГАЛКІН
 2026 р.

ДОВІДКА ПРО ВИКОРИСТАННЯ

результатів дисертаційної роботи Соболевського Максима Сергійовича
 «Розробка високочутливої біосенсорної системи на основі посиленого наночастинками
 золота поверхневого плазмонного резонансу для аналізу ДНК-маркера хронічної мієлоїдної
 лейкемії»
 в освітньому процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії
 Національного технічного університету України
 «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Ми, що нижче підписалися, комісія у складі: завідувач кафедри трансляційної медичної біоінженерії Бесараб О.Б., доценти Луценко Т.М. та Голембіовська О.І., склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Соболевського Максима Сергійовича «Розробка високочутливої біосенсорної системи на основі посиленого наночастинками золота поверхневого плазмонного резонансу для аналізу ДНК-маркера хронічної мієлоїдної лейкемії» у навчальному процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії, а саме: результати роботи враховано при розробці навчальних програм (силабусів) та впроваджено з 2025/2026 н.р. у викладанні дисциплін «Біомолекулярна електроніка» (теми занять та лабораторних робіт: «Сенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу», «Біосенсор поверхневого плазмонного резонансу для детектування специфічних олігонуклеотидних послідовностей») для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти спеціальності G22 «Біомедична інженерія»

Завідувач кафедри ТМБ, к.т.н., доц.



Олександр БЕСАРАБ

доцент кафедри ТМБ,
 к.т.н., доц.



Тетяна ЛУЦЕНКО

доцент кафедри ТМБ,
 к.фарм.н., доц.



Олена ГОЛЕМБІОВСЬКА

ДОДАТОК В

Довідка про використання результатів дисертаційної роботи.



Проспект Глушкова, 4-г, м Київ, 03187, тел. (044)5213566

Довідка

Видана Соболевському Максиму Сергійовичу про те, що результати його дисертаційної роботи «Розробка високочутливої біосенсорної системи на основі посиленого наночастинками золота поверхневого плазмонного резонансу для аналізу ДНК-маркера хронічної мієлоїдної лейкемії», поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю «091 Біологія та біохімія», увійшли до лекційних курсів, практичних та лабораторних робіт з дисциплін «Основи біоелектроніки», «Нанобіоаналітичні системи» та «Фізико-хімічні основи біомолекулярної електроніки», які викладаються для бакалаврів та магістрів Навчально-наукового інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Директор

Навчально-наукового інституту високих технологій

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

доктор хімічних наук, професор



Ігор КОМАРОВ

Завідувач кафедри

молекулярної біотехнології та біоінформатики

ННІ високих технологій

кандидат біологічних наук, доцент

Олексій НИПОРКО

ДОДАТОК Г

Обкладинка затвердженої методики по модифікації наночастинок золота.

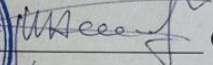
МІНЕКОНОМІКИ

ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
«ВСЕУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР
СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

**Науково-виробничий інститут вимірювань складу, властивостей і кількості
речовин і матеріалів та оцінки відповідності засобів вимірювальної техніки
(Інститут № 2)**

ЗАТВЕРДЖУЮ

В. о. директора інституту № 2
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»

 О.О. Мельников

«31» грудня 2025 р.



МЕТРОЛОГІЯ

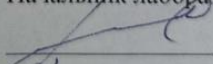
**ЗОЛІ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА МОДИФІКОВАНІ
ОЛІГОНУКЛЕОТИДАМИ ТА БЛОКУВАЛЬНИМИ
МОЛЕКУЛАМИ**

Методика готування та оцінювання непевності

МВ 030-36-2025

РОЗРОБЛЕНО

Начальник лабораторії відділу № 36

 С.В. Кулик

«31» грудня 2025 р.

Київ – 2025