

dc_2021_22



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar
Elektronikai Technológia Tanszék

PLAZMONIKUS ELVŰ BIOÉRZÉKELŐK KUTATÁSA

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Dr. Bonyár Attila

Egyetemi docens

BUDAPEST

2022

1. Az értekezés tárgya és előzményei

Az első bioérzékelő megjelenésének 60-éves évfordulóján¹ kijelenthetjük, hogy szerepük és jelentőségük robbanásszerűen nőtt az utóbbi évtizedekben [1]. Ehhez nagyban hozzájárult a kézi vércukormérők (enzimeket alkalmazó, katalitikus elvű bioérzékelők [2]) elterjedése már a 20. század végén². A 21. századra a bioérzékelők másik nagy családja, az affinitástípusú bioérzékelők is meghatározóvá váltak a betegségdiagnosztika, környezeti vizsgálatok, patogének kimutatása és genetikai vizsgálatok terén. Az affinitástípusú bioérzékelőkön belül az immunoérzékelők antigén-antitest kulcs-zár összekötődéseket, a nukleotidérzékelők pedig a komplementer DNS- vagy RNS-molekulák közötti összekapcsolódásokat használják célmolekulák szelektív detektálására. 2020-ra a COVID-19 vírus okozta világjárvány miatt mondhatni a hétköznapi ember számára is nyilvánvalóvá vált a bioérzékelők fontossága. A COVID-19 vírus, és a fertőzöttség ténye – a példának okáért – különböző immunoérzékelőkkel és nukleotidérzékelővel is detektálható (közvetlenül antigénként, vagy a rá specifikus antitest jelenlétén keresztül immunoérzékelővel, illetve az RNS-állományán keresztül nukleotidérzékelővel).

A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Elektronikai Technológia Tanszékén a bioérzékelők kutatás-fejlesztését Dr. Harsányi Gábor és Dr. Sántha Hunor honosították meg a 2000-es évek elején. Az évtized közepén a tanszék konzorciumi partnerként részt vett négy EU-FP-6-os együttműködésben, melyek célja affinitástípusú bioérzékelő-platformok és vonatkozó mikrofluidikai rendszerek fejlesztése volt. (DINAMICS – kombinált elektrokémiai és optikai nukleotidérzékelő fejlesztése patogének detektálására ivóvízből. DVT-IMP – mélyvénás trombózis veszélyeztetettségének megállapítása vérből, elektrokémiai immunoérzékelővel. RaSP – vírusos megbetegedések detektálása vérből felületi plazmonrezonancia képalkotással. μ -Builder – mintakezelő-mintamozgató mikrofluidikai rendszerek fejlesztése). A projektekhez csatlakozva, 2007 tavasza óta, kb. 15 éve foglalkozom bioérzékelők kutatás-fejlesztésének aktuális kérdéseivel.

A felületi plazmonrezonancia (SPR) – a fémek delokalizált elektronjainak külső elektromágneses gerjesztés hatására kialakuló kollektív rezgése – az optikai közeg törésmutatójának monitorozásán keresztül teszi lehetővé a fém felületén lejátszódó molekuláris kötődési folyamatok megfigyelését. Az elmúlt közel négy évtized alatt³ az SPR az optikai bioérzékelők egyik meghatározó képviselőjévé nőtte ki magát [3]. Nagy

¹ 1962, Clark és Lyons enzim alapú vércukormérője [1]

² 1975, az első kereskedelmi forgalomban kapható vércukormérő (Yellow Spring Instruments) [2]

³ 1983, az első kísérleti SPR alapú immunoérzékelő, a piacon 1990-ben (Biacore) [3]

érzékenysége (akár 10^{-7} RIU, törésmutató egység [4]) és a jelölésmentes méréssel szolgáltatott valós idejű kinetika (molekuláris folyamatok időbeli lefolyása) mellett az új konstrukciók nagy előnye az SPR-képzés lehetősége (imaging, SPRi). Egy modern SPRi-berendezéssel egy mindössze 1 cm^2 felületű szenzorelemmel akár több 1000 pontban is tudunk párhuzamosan mérni, ami más elektrokémiai, vagy szilárdtest alapú eljárásokhoz mérten hatalmas áteresztőképesség [5].

Az SPR-bioérzékelők talán egyetlen hátránya, hogy a klasszikusan reflexiós optikát használó úgynevezett Kretschmann-típusú elrendezés nehezen integrálható kis méretekre, ezért az SPR és SPRi megragadt a labor diagnosztika szintjén. Az SPR-elv miniaturizált, hordozható diagnosztikai eszközökbe történő integrálása szempontjából megoldást jelenthet a nanoanyagok és a lokalizált felületi plazmonrezonancia (LSPR) alkalmazása. Mivel az LSPR a nanorészecskéken könnyebben gerjeszthető, az LSPR-szenzorok egyszerűbb, transzmissziós elvű optikával is használhatóak, ami jelentősen könnyebben integrálható úgy, hogy a képzés lehetősége megmaradjon (LSPRi). Az elmúlt évtizedek kutatás-fejlesztési erőfeszítéseit így ez az általános irány és célkitűzés határozta meg: *LSPRi elvű, optikai bioérzékelők fejlesztése, a hordozható diagnosztikai eszközökbe történő egyszerű integrálhatóságra törekedve.*

A bioérzékelők egyik kiemelten fontos tulajdonsága a detektálási küszöb (limit of detection, *LOD*), ami a legkisebb kimutatható célmolekula-koncentráció a mintában. A gyakorlati alkalmazások tekintetében ez szabja meg használhatjuk-e az érzékelőt egy adott célra. Amennyiben a bioérzékelő *LOD*-ja nem éri el (és jó esetben haladja meg) a célmolekuláink adott biológiai rendszerben (natív mintában, pl. levett vérben) releváns koncentrációját, akkor a molekulákat közvetlenül nem fogjuk tudni detektálni és számszerűsíteni. Ilyen esetekben a levett mintán (az érzékelő alkalmazása előtt) olyan mintaelőkészítési folyamatok válnak szükségessé, amelyek megnövelik a célmolekulák mennyiségét (azok szeparálásával, koncentrálásával, esetleg sokszorozásával). A kutatómunkám és téziseim közös pontja, hogy a fejlesztések a *plazmonikus elvű affinitástípusú bioérzékelők detektálási küszöbének javítására (kisebb detektálható koncentrációk felé tolására) törekednek.*

A nanorészecskéken alapuló LSPR-szenzorok jellemzésére leggyakrabban a tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott érzékenységet (*RIS*, refractive index sensitivity, [nm/RIU]) használják a szakirodalomban. A *RIS* azt mutatja meg, hogy a nanorészecskét körülvevő közeg egységnyi törésmutatójának megváltozására mekkora eltolódást szenved a plazmonrezonancia hullámhossza, amely az optikai elnyelési (abszorpció) csúcs eltolódásával határozható meg kísérletileg. Mivel a *RIS*

nyilvánvalóan összefügg a szenzor molekuláris érzékenységével és detektálási küszöbével is, ezért egy kézenfekvő, általános paraméter a szenzorok jellemzéséhez.

Az LSPR-érzékelők fejlesztésének általános célja ezért a *RIS* maximalizálása, bár ez korán sem egyszerű, hiszen az függ az alkalmazott nanorészecskék alakjától, méretétől és elrendezésétől is [6]. Utóbbival kapcsolatban meg kell említeni a csatolt plazmonrezonanciát: az egymás közelterében elhelyezkedő részecskéken a lokalizált plazmonok csatolódnak tudnak (a rezgések nem lesznek függetlenek egymástól). A csatolt plazmonrezgések korábbi vizsgálata során megfigyelték, hogy a csatolás mértékében a rezonancia elnyelési csúcsa a kisebb energiák felé tolódik (még hozzá a részecskék közötti távolságtól exponenciálisan függő mértékben, ez az úgynevezett plazmonikus vonalzó elv alapja [7]), illetve megállapítást nyert azt is, hogy a csatolt plazmonrezgések érzékenysége (*RIS*) nagyobb az azonos részecskékből álló csatolatlan plazmonrezgések érzékenységénél [8]. A csatolt rezgések érzékelőkben történő kiaknázásával kapcsolatban számos nyitott kérdés fogalmazható meg. Nem tiszta, hogy a különböző alakú, méretű vagy összetételű részecskék esetén a csatolásból adódó érzékenységnövekedés hogyan függ a részecskék közötti távolságtól, illetve, hogy ez hogyan optimalizálható egy adott célalkalmazáshoz.

A plazmonikus szenzorelemek érzékenységének maximalizálása, mint általános követelmény, nagy elvárásokat támaszt az előállítási technológiákkal szemben. A részecskék anyaga, alakja, mérete és elrendezése mind befolyással vannak a szenzor érzékenységére. A csatolt plazmonrezgések szempontjából előnyös kis részecskék közötti távolság (10 nm-es nagyságrend) egy kifejezetten erős, nehezen realizálható elvárás. Az LSPRi-elvű bioéztékelős alkalmazás további speciális követelményeket támaszt a szenzorokkal szemben: a szenzorelemnek nagy felülettel kell rendelkeznie (cm^2 -es nagyságrendbe eső), a nagyszámú párhuzamos mérés lehetősége miatt, amin belül a részecskék alakjának, méretének és elrendezésének egyenletesnek kell lennie. Továbbá, a részecskéknek jól kell tapadnia egy lehetőleg átlátszó hordozóhoz, amire a transzmissziós elvű, könnyen integrálható optika miatt van szükség. A gazdaságos gyárthatóság tömegtermelésre alkalmas technológiákkal szintén fontos szempont.

2020 tavaszán írtam egy összefoglaló cikket az LSPRi-célra a fenti kritériumok szerint alkalmas plazmonikus nanoérzékelő előállítási technológiákból [T9]. Általánosan kijelenthető, hogy az optimális technológia kiválasztása kompromisszumot igényel, a komplex feltételrendszer gyakran több kritériuma is sérülhet. Például, amelyik technológia képes jól kontrollálni az alakot és méretet (folyadékfázisú szintézis), ott az utólagos nanorészecske-kikötés egy hordozóra, kontrollált elrendezéssel nem megoldható [9]. Amely technológia egyszerre kontrollálja az alakot, méretet és elhelyezkedést (pl. elektronsugaras litográfia), az

nem gazdaságos cm^2 -es felületekre [10]. A skálázhatóság szempontjából nagy előnnyel kecsegtetnek az úgynevezett sablonalapú technológiák, mint például a NIL (nanoimprint lithography), ahol egy nagy felületű, természetes forrásból származó, vagy mesterségesen előállított nanomintázatot használva kiindulási alapként, vékonyréteg és transzfer technológiák segítségével állítják elő a fémes részecskékből álló elrendezéseket [11].

A vonatkozó szakirodalomból szintén látható, hogy az LSPR-szenzorelemek fejlesztése során követett elsődleges irány, a *RIS* maximalizálása, nem minden esetben eredményez nagyobb molekuláris érzékenységet vagy detektálási küszöböt (*LOD*-t) [T9]. A jelenség lehetséges magyarázata, hogy a szenzorelemeket nem, vagy csak ritkán optimalizálják a célalkalmazáshoz, továbbá nem veszik figyelembe és használják ki a nanorészecskék közötti csatolt plazmonrezonanciát. A változatos alakú és méretű nanorészecskék plazmonterének lecsengése eltérő, továbbá a részecskék közötti csatolással fókuszálható. Felvetésem szerint a részecskék körüli plazmonter tervezésével és célalkalmazáshoz (a detektálandó célmolekula méretéhez) illesztésével a szenzorelemek hatékonysága jelentősen növelhető lenne.

A jelölésmentes bioérzékelők egy további nagy előnye, hogy közvetlenül a célmolekula jelenlétét detektálják, nem szükséges a célmolekula módosítása, jelölőkkel (pl. fluoreszcens molekulákkal). A szenzorok érzékenységének és detektálási küszöbének további növelésére lehetőséget nyújthat in-situ jelerősítési eljárások alkalmazása, amelyek a jelölésmentes detektálás (a célmolekula receptorhoz történő bekötődése) után növelik meg a bekötődésből származó jelet, a célmolekulához szintén szelektíven kötő további molekulákkal [12].

2. Célkitűzések és módszerek

A felvázolt gondolatmenet folytatásaként a munkám elsődleges célkitűzései a következő pontokban fogalmazhatók meg:

1) Kidolgozni egy szimulációs eljárást, amivel tetszőleges nanorészecske-elrendezésre a nanorészecskék közötti csatolt plazmonrezonanciából adódó járulékos érzékenységnövekmény számszerűsíthető, illetve elkülöníthető a részecske alak és méret hatásától.

2) A szimulációs eljárás alkalmazása komplex, sokrészecskés rendszerekre, valamint a segítségével megmutatni, hogy a nanorészecske-elrendezések geometriai paraméterei (alak, méret és részecskék közötti távolság) alkalmazástól (detektálandó célmolekula típustól és mérettől) függően optimalizálhatóak.

3) A szimulációs vizsgálatok következtetéseire alapozva megtervezni és optimalizálni egy nanorészecske-elrendezést, amely nukleotidérzékelőket szem előtt tartva a DNS-molekulák mérettartományára optimalizálja a nanorészecske-elrendezés geometriai paramétereit.

4) Az optimalizált nanorészecske-elrendezésen alapuló szenzorelem létrehozása és tesztelése LSPR-alapú nukleotidérzékelőként, valamint felületerősített Raman-spektroszkópiára (SERS) alkalmas hordozóként.

5) Egy molekuláris szintű in-situ jelerősítési eljárás, a hibridizációs láncreakció (HCR) vizsgálata és alkalmazhatóságának igazolása plazmonikus elvű nukleotid-érzékelők érzékenységének és detektálási küszöbének növelésére.

Az 1-2) célok megvalósításához a kifejezetten plazmonikus szerkezetek modellezésére és szimulációjára fejlesztett MNPBEM (Metallic NanoParticle Boundary Element Method [13]) nevű szimulációs modult használtam MATLAB R2019b környezetben. A peremelem módszer (BEM, boundary element method) a végelemhez hasonlóan diszkretizált térelemeken dolgozik, azonban csak a struktúrák felületi egységein oldja meg a Maxwell-egyenleteket, így jelentősen csökkentve a számítási igényt.

A 3-5) célok megvalósulása részben hazai és nemzetközi együttműködések keretén belül történt. A külföldi partnerek közül kiemelendő a csehországi Central European Institute of Technology (arany nanorészecske – epoxi nanokompozit előállítás), valamint a Bolognai Egyetem Biokémiai Intézete (hibridizációs láncreakció tanulmányozása). A hazaiak közül a Debreceni Egyetem Kísérleti Fizika Intézetét (arany nanosziget-rendszerek vizsgálata), illetve a Wigner Fizikai Kutatóközpontot (Raman-spektroszkópiás vizsgálatok) emelném ki.

A kísérleti kutatás számos modern mikroszkópos és analitikai vizsgálati eljárás alkalmazását tette szükségessé, beleértve az atomerő-mikroszkópiát (AFM, Veeco diInnova), pásztázó elektronmikroszkópiát (SEM, FEI Verios 460L, ill. Hitachi S-4300), transzmissziós elektronmikroszkópiát (TEM, Carl Zeiss LIBRA200FE és STEM, FEI Helios NanoLab 660), energiadisziperzív röntgenspektroszkópiát (EDS, Bruker Quantax 200), röntgenfotoelektron-spektroszkópiát (XPS, Kratos Analytical AXIS Supra), optikai spektrofotometriát (Avantes Avaspec 2048-4DT) és Raman-spektroszkópiát (Renishaw InVia micro-Raman spektrofotométer) is. A felületi plazmonrezonanciás mérésekhez a BME- ETT saját fejlesztésű SPRI-berendezését [T23] és kapcsolódó mikrofluidikai rendszerét [T24] használtam.

3. Új tudományos eredmények

I. Tézis

Modellezésen és BEM-szimuláción alapuló módszert dolgoztam ki az összetett plazmonikus rendszerek csatolt plazmonrezonanciájából adódó tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott érzékenységnövekmény számszerű jellemzésére. A megközelítés az *erősítési tényezőn* (EF , enhancement factor) keresztül számszerűsíti, hogy a több nanorészecskéből álló összetett plazmonikus rendszer érzékenysége mennyivel nagyobb egy azonos geometriájú és méretű, szimpla nanorészecske érzékenységénél, az (1) egyenlet szerint, ahol RIS a tömbi törésmutató-érzékenység, Δn a törésmutató-változás, $\Delta\lambda_p$ a plazmonrezonancia csúcseltolódása, az S és M indexek pedig a szimpla (S) és többrészecskes (M) rendszereket jelölik.

$$EF_{\infty} = \frac{RIS_M}{RIS_S} = \frac{\frac{\Delta\lambda_{p,M}}{\Delta n}}{\frac{\Delta\lambda_{p,S}}{\Delta n}} = \frac{\Delta\lambda_{p,M}}{\Delta\lambda_{p,S}} \quad 1$$

A módszert sikeresen alkalmaztam plazmonikusan csatolt, arany nanogömb, nanokocka, illetve nanoszferoid alakú, 10–90 nm átmérőjű dimerek (kétrészecskes elrendezések) vizsgálatára. Megállapítottam, hogy a csatolásból adódó törésmutató-érzékenység növekedése a dimenziómentes D/D_0 értéktől exponenciálisan függ, valamint, hogy az erősítés a $D/D_0 < 0,5$ határ alatt válik számottevővé (ahol D_0 a részecskék átmérője és D a részecskék közötti távolság). Nagy erősítések (3–4×) eléréséhez a részecskéket $D/D_0 < 0,1$ tartomány alá kell közelíteni egymáshoz.

Kapcsolódó közlemények: T1, T3, T5, T6, T12, T16, T14, T19

II. Tézis

Bevezettem a molekuláris érzékenység alapján számolható erősítési tényezőt (EF_t), amely az adott vastagságú (t) molekuláris réteg szimpla (S) illetve többrészecskes (M) elrendezésre kötésével mért csúcseltolódás ($\Delta\lambda_p$) hányadosaként határozható meg a (2) egyenlet szerint.

$$EF_t = \frac{\Delta\lambda_{p,t,M}}{\Delta\lambda_{p,t,S}} \quad 2$$

BEM-szimulációk segítségével megmutattam, hogy csatolt nanorészecskék esetén $EF_t > EF_\infty$, és a különbség főként a $t < D$ tartományon jelentős (ha $D/D_0 < 1$, és ahol D_0 a részecskék átmérője és D a részecskék közötti távolság). Megmutattam továbbá, hogy az $EF_t(D/D_0)$ függvénynek $t=D/2$ körül lokális maximuma van, ami felhasználható ismert molekuláris rétegvastagság esetén a plazmonikus rendszerek geometriájának optimalizálására, a molekuláris érzékenység maximalizálása érdekében.

Kapcsolódó közlemények: T3

III. Tézis

Kidolgoztam egy eljárást komplex nanorészecske-rendszerek plazmonikus viselkedésének BEM-módszerrel történő szimulációjára, atomierő-mikroszkópos (AFM) képek alapján. Az eljárás lehetőséget teremt számos ($n \times 10$), eltérő alakú és méretű nanorészecskéből álló összetett rendszer modellezésére úgy, hogy önkényes, közelítő geometriák helyett, a részecskék valódi, AFM-mel mért alakja és felülete a modell bemenete.

Az eljárást sikeresen alkalmaztam üveghordozón hőkezeléssel előállított változó geometriájú (méretű és eloszlású) arany nanosziget-rendszerek plazmonikus viselkedésének vizsgálatára. Igazoltam, hogy a változó geometriájú nanosziget-rendszerekre a korábban általunk kísérletileg megfigyelt exponenciális $RIS - D/D_0$ kapcsolat az átlagos részecske méret (D_0) és közöttük lévő átlagos távolság (D) együttes hatása. Továbbá, az AFM-képek alapján felállított modellek segítségével igazoltam, hogy a nanorészecskék közötti plazmonikus csatolásból adódó járulékos érzékenységnövekedés elkülöníthető az átlagos részecske méret és geometria hatásától.

Az eljárásom segítségével a nanorészecske-elrendezésre számszerűsíthető erősítési tényező (EF) hozzájárul az arany nanosziget-rendszerek előállítási technológiájának optimalizálásához az I. és II. tézisben megfogalmazott tervezési irányelvek mentén.

Kapcsolódó közlemények: T13, T18, T21, T22

IV. Tézis

Megmutattam, hogy az I. és II. tézisben megfogalmazott tervezési irányelvek szerint optimalizált nanorészecske-elrendezések, valamint az ezek alapján fejlesztett plazmonikus nanokompozitok alkalmasak nagy érzékenységű LSPR-szenzorelemként történő alkalmazásra, DNS-molekulák jelenlétének kimutatására és a vizsgált mintában lévő mennyiségük számszerűsítésére.

A plazmonikus nanokompozit szenzorelemeket a brnoi CEITEC-intézettel együttműködésben fejlesztettünk, LSPR-alapú nukleotidérzékelős alkalmazásokat szem előtt tartva. Az Au nanorészecske – epoxi felületi nanokompozit több cm² felületen tartalmaz hexagonálisan elrendezett arany szferoid nanorészecskéket. A szabályos elrendezésben D/D_0 értéke a kb. 0,8–0,1 tartományon szabályozható

Tiollal csoporttal módosított, 20 bázis hosszúságú DNS-receptor és 20 bázis hosszúságú komplementer cél-DNS-molekulák segítségével a nanokompozit alkalmazásával a célmolekula detektálási küszöbét 5 nM-ban állapítottam meg. A plazmonikus szenzor lineáris tartománya 10 nM – 1 mM között volt, a maximális DNS-bekötődés hatására mért plazmonrezonancia csúcsetolódás pedig $6,6 \pm 0,7$ nm. A kísérletekhez a *Giardia lamblia* vízben élő parazita β -*giardin* génjének egy specifikus szekvenciáját használtam cél-DNS-nek.

Kapcsolódó közlemények: T8, T9, T10, T17

V. Tézis

Megmutattam, hogy a III. tézisben ismertetett, az I. és II. tézisek tervezési irányelvei alapján fejlesztett plazmonikus nanokompozitok alkalmasak nagy érzékenységű SERS-felületként történő alkalmazásra, DNS-molekulák kimutatásához.

A minta felületére merőleges irányban végzett pásztázó Raman-spektroszkópia segítségével igazoltam, hogy a DNS-molekulákra karakterisztikus Raman-csúcsok a minta 100–300 nm-es vastagságú térrészből származnak, ami, figyelembe véve a minta felületének hullámosságát és gerjesztés fókuszoltját, a részecskék síkjának felel meg.

Igazoltam, hogy a nanorészecske elrendezések D/D_0 értékei meghatározzák szenzorelemek mérhető maximális karakterisztikus Raman-szórás intenzitását, valamint az intenzitásokból számítható $SERS EF_S$ (3) mértékét. A különböző D/D_0 értékkel jellemezhető nanorészecske eloszlásokra a SEM-képek alapján modellezett és BEM-módszerrel számolt közelítő erősítések alapján definiáltam egy $SERS EF_E$ erősítési tényezőt (3), amely a DNS-molekulák kimutatása szempontjából hasznos erősítést a hexagonális részecskeelrendezés elemi celláján számolja. Az elektromos közelítést a részecskék közötti csatolás síkjában, a részecskék körüli $r_l = 7 \text{ nm}$ szélességű körgyűrűre átlagolva vettem figyelembe, ahol $r_0 = D_0/2$ a részecskék átlagos sugara. Megmutattam, hogy a különböző nanorészecske-elrendezésekre $SERS EF_S$ és $SERS EF_E$ egymással összefüggésben a 10^4 – 10^6 nagyságrendben van.

$$SERS EF_S = \frac{I_{SERS}/N_{Surf}}{I_{RS}/N_{Vol}}; \quad SERS EF_E(\lambda) = \frac{\int_0^{2\pi} \int_{r_0}^{r_0+r_l} \frac{E(\lambda, r, \theta)^4}{E_0(\lambda, r, \theta)^4} dr d\theta}{(r_0 + r_l)^2 \pi - r_0^2 \pi} \quad 3$$

Kapcsolódó közlemények: T2, T4, T7, T11

VI. Tézis

Igazoltam, hogy a DNS hibridizációs láncreakció (HCR) alkalmas plazmonikus elvű nukleotidérzékelők jelének in-situ erősítésére. SPR-képképző mérésekkel a tiollal módosított 20 bázis hosszúságú receptor-DNS és 40 bázis hosszúságú cél-DNS-molekula hibridizációjának vizsgálata kapcsán alábbi megállapításokat tettem:

A HCR alkalmazásával a vizsgált 250 pM – 1 mM célmolekula koncentráció tartományon a célmolekula bekötődéséhez képest 4 – 7 × jelerősítés érhető el. A HCR segítségével a célmolekulák detektálási küszöbe (LOD) 1,25 nM-ról 625 pM-ra volt kiterjeszhető. Igazoltam továbbá, hogy a HCR alkalmas egy 3×3 -as multi bioérzékelő (3 receptor – 3 célmolekula párosból álló rendszer) esetén a hajtó-DNS-sel komplementer célmolekula által szolgáltatott jel szelektív kiemelésére.

A kísérletekhez a BME-ETT saját fejlesztésű SPRI-berendezését, valamint mikrofluidika rendszerét használtam. A kísérletekhez használt DNS szintén a *Giardia lamblia* vízben élő parazita β -*giardin* génjének egy specifikus szekvenciája volt.

Kapcsolódó közlemények: T20, T23, T24

4. A tézisekhez kapcsolódó közlemények

[T1] G. Szántó, **A. Bonyár**, I. Csarnovics, “Dimers of gold-silver core-shell nanospheres: the effect of interparticle gap on the refractive index sensitivity and extinction spectrum,” *Photonics and Nanostructures – Fundamentals and Applications*, vol. 31, 2022, doi: 10.1016/j.photonics.2022.101023

[T2] S. Zangana, T. Lednicky, I. Rigó, and **A. Bonyár**, “Determination and Comparison of the SERS Enhancement Factor for Nanocomposite Substrates,” in *Proceedings of the IEEE International Spring Seminar on Electronics Technology, 2022*, (in press)

[T3] **A. Bonyár**, “Maximizing the Surface Sensitivity of LSPR Biosensors through Plasmon Coupling—Interparticle Gap Optimization for Dimers Using Computational Simulations,” *Biosensors*, vol. 11, no. 12, p. 527, Dec. 2021, doi: 10.3390/bios11120527.

[T4] **A. Bonyár**, S. Zangana, T. Lednický, I. Rigó, I. Csarnovics, and M. Veres, “Application of gold nanoparticles–epoxy surface nanocomposites for controlling hotspot density on a large surface area for SERS applications,” *Nano-Structures & Nano-Objects*, vol. 28, 2021, doi: 10.1016/j.nanoso.2021.100787.

[T5] G. Szántó, I. Csarnovics, and **A. Bonyár**, “Numerical investigation of the refractive index sensitivity of Au/Ag core-shell nanostructures for sensing applications,” *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 32, 2021, doi: 10.1016/j.sbsr.2021.100414.

[T6] G. Szántó, **A. Bonyár**, and I. Csarnovics, “Influence of the Shape of Metallic Nanoparticles on their Extinction Cross Section and Refractive Index Sensitivity,” in *Proceedings of the IEEE International Spring Seminar on Electronics Technology, 2021*, doi: 10.1109/ISSE51996.2021.9467561.

[T7] S. Zangana, T. Lednicky, I. Rigó, and **A. Bonyár**, “The Effect of Focal Plane on the SERS performance of a Gold-Epoxy Nanocomposite,” in *Proceedings of the IEEE International Spring Seminar on Electronics Technology, 2021*, doi: 10.1109/ISSE51996.2021.9467592.

[T8] R. Al-Zubaidi, T. Lednicky, and **A. Bonyár**, “Influence of Incidence Angle and Light Polarization on the Refractive Index Sensitivity of a Gold-Epoxy Nanocomposites Sensor,” in *Proceedings of the IEEE International Spring Seminar on Electronics Technology, 2021*, doi: 10.1109/ISSE51996.2021.9467654.

[T9] **A. Bonyár**, “Label-Free Nucleic Acid Biosensing Using Nanomaterial-Based Localized Surface Plasmon Resonance Imaging: A Review,” *ACS Applied Nano Materials*, vol. 3, no. 9, 2020, doi: 10.1021/acsnanm.0c01457.

[T10] T. Lednický and **A. Bonyár**, “Large Scale Fabrication of Ordered Gold Nanoparticle-Epoxy Surface Nanocomposites and Their Application as Label-Free Plasmonic DNA Biosensors,” *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 12, no. 4, 2020, doi: 10.1021/acsnami.9b20907.

- [T11] S. Zangana, T. Lednicky, I. Rigó, I. Csarnovics, M. Veres, and **A. Bonyár**, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of DNA Molecules on Gold/Epoxy Nanocomposite Substrates," in *Proceedings of the IEEE International Symposium for Design and Technology in Electronics Packaging* 2020. doi: 10.1109/SIITME50350.2020.9292267.
- [T12] G. Szántó, I. Csarnovics, and **A. Bonyár**, "Optical properties of core-shell Ag@Au and Au@Ag nanoparticles," in *Proceedings of the IEEE International Symposium for Design and Technology in Electronics Packaging* 2020. doi: 10.1109/SIITME50350.2020.9292277
- [T13] **A. Bonyár**, I. Csarnovics, M. Veres, L. Himics, A. Csik, J. Kámán, L. Balázs, S. Kökényesi, "Investigation of the performance of thermally generated gold nanoislands for LSPR and SERS applications," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 255, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.08.063.
- [T14] **A. Bonyár**, I. Csarnovics, and G. Szántó, "Simulation and characterization of the bulk refractive index sensitivity of coupled plasmonic nanostructures with the enhancement factor," *Photonics and Nanostructures – Fundamentals and Applications*, vol. 31, 2018, doi: 10.1016/j.photonics.2018.05.004.
- [T15] **A. Bonyár**, Zs. Izsold, A. Borók, I. Csarnovics, L. Himics, M. Veres, G. Harsányi, "PDMS-Au/Ag Nanocomposite Films as Highly Sensitive SERS Substrates," *Proceedings*, vol. 2, no. 13, p. 1060, Nov. 2018, doi: 10.3390/proceedings2131060.
- [T16] **A. Bonyár**, "Simulation of the Refractive Index Sensitivity of Coupled Plasmonic Nanostructures," in *Procedia Engineering*, 2016, vol. 168. doi: 10.1016/j.proeng.2016.11.316.
- [T17] **A. Bonyár**, T. Lednický, and J. Hubálek, "LSPR Nanosensors with Highly Ordered Gold Nanoparticles Fabricated on Nanodimpled Aluminium Templates," in *Procedia Engineering*, 2016, vol. 168. doi: 10.1016/j.proeng.2016.11.390.
- [T18] **A. Bonyár**, I. Csarnovics, M. Veres, L. Himics, A. Csík, J. Kámán, L. Balázs, S. Kökényesi, "Investigation of the Performance of Thermally Generated Au/Ag Nanoislands for SERS and LSPR Applications," in *Procedia Engineering*, 2016, vol. 168. doi: 10.1016/j.proeng.2016.11.384.
- [T19] **A. Bonyár**, G. Szántó, and I. Csarnovics, "Coupled surface plasmon resonance on gold nanocubes - Investigation by simulation," *Proceedings of the IEEE International Symposium for Design and Technology in Electronics Packaging* 2016. doi: 10.1109/SIITME.2016.7777263
- [T20] F. M. Spiga, **A. Bonyár**, B. Ring, M. Onofri, A. Vinelli, H. Sántha, C. Guiducci, G. Zuccheri, "Hybridization chain reaction performed on a metal surface as a means of signal amplification in SPR and electrochemical biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 54, 2014, doi: 10.1016/j.bios.2013.10.036
- [T21] **A. Bonyár**, B. Wimmer, and I. Csarnovics, "Development of a localised surface plasmon resonance sensor based on gold nanoparticles," in *Proceedings of the IEEE International Spring Seminar on Electronics Technology* 2014. doi: 10.1109/ISSE.2014.6887627

[T22] **A. Bonyár**, B. Wimmer, and I. Csarnovics, "Investigation of thermally generated gold nanoparticles with AFM," in *Proceedings of the IEEE International Symposium for Design and Technology in Electronics Packaging*, 2013. doi: 10.1109/SIITME.2013.6743639

[T23] **A. Bonyár**, H. Sántha, B. Ring, and G. Harsányi, "A custom-developed SPRi instrument for biosensor research," in *IFMBE Proceedings*, 2011, vol. 37. doi 10.1007/978-3-642-23508-5_273

[T24] **A. Bonyár**, H. Sántha, B. Ring, M. Varga, J. G. Kovács, and G. Harsányi, "3D Rapid Prototyping Technology (RPT) as a powerful tool in microfluidic development," in *Procedia Engineering*, 2010, vol. 5. doi: 10.1016/j.proeng.2010.09.105

5. Az eredmények hasznosulása

A disszertációban bemutatott eredményeim hazai és nemzetközi kutatás-fejlesztési együttműködések keretein belül is alkalmazásra kerültek. Ezek részletezése előtt fontosnak tartom kiemelni az oktatásban megvalósult hasznosulást is. A tézisekhez kapcsolódó területeken számos magas színvonalú diplomamunka, díjazott TDK-dolgozat (OTDK I. hely [14]) született, valamint folyamatban van három PhD-kutatás is.

Az általam 2016-ban bevezetett tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényező (EF) formalizmus alkalmazása különböző alakú és összetételű nanorészecskékből álló rendszerek optimalizálása Szántó Géza doktorandusz PhD-munkájának alapjait képezi (Dr. Csarnovics Istvánnak közös doktoranduszunk, Debreceni Egyetem Kísérleti Fizika Intézet). Az arany és ezüst nanokockákból és nanogömbökből álló dimer részecske-rendszerek távolságtól függő érzékenységének vizsgálata mellett megmutattuk, hogy kis átalakítással az erősítési tényező formalizmus alkalmas maghéj nanostruktúrák, illetve belőlük felépített kétrészecskés rendszerek esetén a mag, illetve héj sugár, illetve részecskék közötti távolság optimalizálására, az érzékenység maximalizálásának érdekében. Szintén Szántó Géza dolgozik az AFM-képek alapján történő szimulációt lehetővé tevő modul alkalmazhatóságának kiterjesztésén is.

Az arany nanorészecske – epoxi nanokompozittal kapcsolatban bemutatott eredményeken túl a szenzorelemek továbbfejlesztése és különböző alkalmazásokra történő tesztelése folyamatosan zajlik. A legjelentősebb fejlesztés a nanorészecskék transzferének módosítása egy 500 nm vastagságú SiO_2 réteg közbeiktatásával az arany nanorészecskék és az epoxi hordozó közé. Az új generációs arany nanorészecske – epoxi nanokompozit szenzorelemek tulajdonságait 2022 tavaszán egy DAAD (Deutscher Akademischer AustauschDienst) bilaterális együttműködés keretein belül a jénai Leibniz-IPHT kutatóival közösen vizsgáljuk (Dr. Wolfgang

Fritzsche intézetvezető és Dr. Csáki Andrea csoportvezetők közreműködésével). A német féllel közösen 2022 februárban beadtunk egy EUREKA-pályázatot is, amely keretein belül egy hiperspektrális LSPRI-berendezést szeretnénk fejleszteni. A berendezéshez a BME-ETT fejleszti a mikrofluidikát, amely kompatibilis lesz a nanokompozit szenzorelemek befogadására. A pályázat keretein belül tervezett alkalmazás nehézfémionok multiplexált detektálása felszíni vizekben aptameralapú receptorok segítségével. További tervezett alkalmazási a német együttműködés kapcsán antibiotikum rezisztencia gének (ARGk) detektálása LSPRI-alapú nukleotid-érzékelővel.

A szenzorelemek gázérzékelőként történő alkalmazhatóságának vizsgálatára 2021 tavaszán felvettük a kapcsolatot a Dr. Joel Borges (Universidade do Minho) által vezetett portugál csoporttal, akik nagy jártassággal rendelkeznek az LSPRI-szenzorelemek gázérzékelős tesztelésében [15]. Az eredményeik alapján elmondásaik szerint az új generációs Au NP – SiO₂ – epoxi szenzorelemeink minden általuk korábban tesztelt LSPRI-érzékelőnél érzékenyebbek bizonyultak. Az eredmények közös publikációra való előkészítése folyamatban van.

A magyar NAPLIFE, Nanoplazmonikus Lézeres Fúzió Kutatólaboratórium program (amely nanotechnológiai mintakészítés munkacsoportjának a disszertáció írásának időpontjában a vezetője vagyok) egyik másodlagos célja szelektív COVID RNS-detektálás megvalósítása Raman-spektroszkópia és SERS segítségével. A Wigner FK munkatársai (Dr. Veres Miklós vezetésével) erre a célra kidolgoztak egy jelölőmolekulán alapuló detektálási eljárást, illetve fejlesztés alatt áll egy hordozható asztali mérőberendezés is (mindkettő szabadalmi oltalom elbírálás alatt áll). A projekt a COVID-vírus RNS-ének detektálására új generációs Au NP – SiO₂ – epoxi szenzorelemeinket használja SERS-hordozóként, eredményesen. A nanokompozit szenzorelemek SERS-re történő alkalmazása Shereen Zangana doktorandusz disszertációjának alapjait fogja képezni.

A hibridizációs láncreakció (HCR) in-situ jelerősítési eljárás a a DINAMICS (Diagnostics with Microtech and Nanotech Sensors) EU FP-6 nemzetközi projekt keretein belül hasznosult 2012-2014 között.

Csoportom és a szakterület új eredményeit folyamatosan integrálom az általam oktatott tárgyakba a BME-VIK MSc és doktori képzésein (Nanotudomány, Bio-nanoszenzorika, Nanoelektronika, nanotechnológia).

6. Hivatkozások

- [1] L. C. Clark and C. Lyons, "Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, no. 1, 1962.
- [2] Yellow Springs Instrument Company, "Company History," 2022. <https://www.yysi.com/about/history> (Feb. 30, 2022)
- [3] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing," *Sensors and Actuators*, vol. 4, no. C, 1983.
- [4] D. Wang et al., "Recent advances in surface plasmon resonance imaging sensors," *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 6, 2019.
- [5] B. Foglieni et al., "Integrated PCR amplification and detection processes on a Lab-on-Chip platform: A new advanced solution for molecular diagnostics," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 48, no. 3, 2010.
- [6] H. Chen, X. Kou, Z. Yang, W. Ni, J. Wang, "Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 24, no. 10, 2008.
- [7] S. Lerch and B. M. Reinhard, "Quantum Plasmonics: Optical Monitoring of DNA-Mediated Charge Transfer in Plasmon Rulers," *Advanced Materials*, vol. 28, no. 10, 2016.
- [8] E. Martinsson, et al., "Optimizing the Refractive Index Sensitivity of Plasmonically Coupled Gold Nanoparticles," *Plasmonics*, vol. 9, no. 4, 2014.
- [9] S. E. Williams, P. R. Davies, J. L. Bowen, and C. J. Allender, "Controlling the nanoscale patterning of aunps on silicon surfaces," *Nanomaterials*, vol. 3, no. 1, 2013.
- [10] S. Kaye et al., "Label-free detection of DNA hybridization with a compact LSPR-based fiber-optic sensor," *Analyst*, vol. 142, no. 11, 2017.
- [11] D. Kawasaki, H. Yamada, K. Maeno, K. Sueyoshi, H. Hisamoto, and T. Endo, "Core-Shell-Structured Gold Nanocone Array for Label-Free DNA Sensing," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 2, no. 8, 2019.
- [12] S. Cajigas and J. Orozco, "Nanobioconjugates for signal amplification in electrochemical biosensing," *Molecules*, vol. 25, no. 15, 2020.
- [13] U. Hohenester and A. Trügler, "MNPBEM - A Matlab toolbox for the simulation of plasmonic nanoparticles," *Computer Physics Communications*, vol. 183, no. 2, 2012.
- [14] Zs. Izsold, A. Borók, „Mikrofluidikai rendszerekbe integrált nanokompozitok fejlesztése plazmonikus bioérzékelőkhöz és SERS-hez”, OTDK Dolgozat, 2019.
- [15] M. Proença, M. S. Rodrigues, J. Borges, and F. Vaz, "Optimization of Au:CuO Nanocomposite Thin Films for Gas Sensing with High-Resolution Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 92, no. 6, 2020.