

dc_2021_22

PLAZMONIKUS ELVŰ BIOÉRZÉKELŐK KUTATÁSA

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Bonyár Attila

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

BUDAPEST

2022

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	i
Rövidítések jegyzéke.....	iii
1. Bevezetés.....	1
1.1. A disszertáció felépítése.....	3
2. Szakirodalmi áttekintés.....	4
2.1. A plazmonika elméleti háttere.....	4
2.1.1. Rövid történet.....	4
2.1.2. A Drude-féle fémmodell.....	5
2.1.3. A felületi plazmon polaritonok.....	8
2.1.4. A lokalizált felületi plazmonrezonancia.....	11
2.1.5. Az LSPR mérési elrendezések és az LSPR-képző (LSPRi).....	15
2.1.6. A felületerősített Raman-spektroszkópia.....	17
2.2. Nanotechnológiák elemző összevetése.....	19
2.2.1. Folyadékfázisú szintézis és felületkémia.....	21
2.2.2. Heterogén kémiai szintézis.....	21
2.2.3. Sablonmentes rétegleválasztás és hőkezelés.....	22
2.2.4. Sablonalapú rétegleválasztás és hőkezelés.....	22
2.2.5. Direktírásvos litográfiák.....	23
2.2.6. Nanoimprint-litográfia (NIL).....	24
2.3. Az LSPRi-szenzorelemek minősítése.....	24
2.4. Összefoglalás – célkitűzések.....	28
3. Modellezés és szimuláció.....	29
3.1. Plazmonikus rendszerek szimulációs lehetőségei.....	29
3.1.1. Időtartománybeli véges differenciák módszere (FDTD).....	29
3.1.2. Végeselem-módszer (FEM).....	30
3.1.3. Diszkrét dipólus közelítés (DDA).....	30
3.1.4. Peremelem-módszer (BEM).....	30
3.2. Az MNPBEM-megoldó bemutatása.....	31
3.2.1. A retardált (teljes) megoldó.....	31
3.2.2. A kvázistatikus (egyszerűsített) megoldó.....	34
3.3. Az erősítési tényezők.....	35
3.3.1. A tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényező.....	35

3.3.2.	A molekuláris érzékenység erősítési tényező	37
3.3.3.	Összefoglalás, tervezési irányelvek	43
3.4.	Komplex nanorészecske-rendszerek vizsgálata	44
3.5.	Kitekintés, az eredmények hasznosulása.....	49
4.	Plazmonikus nanokompozit fejlesztése SERS- és LSPR- alkalmazásokhoz.....	50
4.1.	A fejlesztés háttere	50
4.2.	Kísérleti eszközök és módszerek.....	51
4.3.	Az előállítási technológia bemutatása	53
4.3.1.	A nanorészecske-elrendezés kontrollálása.....	53
4.3.2.	A nanorészecske-elrendezés transzferálása és a stabilitás vizsgálata	55
4.3.3.	Az Au NP–epoxi szenzorelem főbb tulajdonságainak összefoglalása.....	59
4.4.	A nanokompozit szenzorelem vizsgálata BEM-szimulációval.....	60
4.4.1.	LSPR-szimulációk	62
4.4.2.	SERS-szimulációk	64
4.5.	SERS-alkalmazás	67
4.5.1.	Normál üzemmódú mérések	67
4.5.2.	Mélységi pásztázás.....	70
4.6.	LSPR-alkalmazás	73
4.7.	Kitekintés, az eredmények hasznosulása.....	77
5.	In-situ jelerősítési eljárás vizsgálata	79
5.1.	A vizsgálatok háttere.....	79
5.2.	Kísérleti eszközök és módszerek.....	81
5.3.	Eredmények és értékelésük	83
5.3.1.	A HCR-effektus validációja szenzorfelületen.....	83
5.3.2.	A detektálási küszöb (<i>LOD</i>) kiterjesztésének vizsgálata	86
5.3.3.	Multi-bioérzékelés és szelektív jelkiemelés HCR-rel.....	87
5.3.4.	Kitekintés, további tervek	89
6.	Összefoglalás	90
6.1.	Az új tudományos eredmények összefoglalása.....	90
6.2.	A tézisekhez kapcsolódó közlemények.....	93
7.	Köszönetnyilvánítás.....	95
8.	Irodalomjegyzék	96
9.	Függelék.....	109

Rövidítések jegyzéke

- AFM – atomic force microscope – atomerő-mikroszkóp
- ARG – antibiotic resistance gene – antibiotikumrezisztencia-gén
- ATR – attenuated total reflection – csillapított teljes visszaverődés
- BEM – boundary element method – peremelem-módszer
- BK – befoglaló kör (nanorészecske-átmérő meghatározási módszer)
- BSA – bovin serum albumin – szarvasmarhaszérum-albumin
- CCD – charge coupled device – töltéscsatolt eszköz
- CEITEC – Central European Institute of Technology, kutatóintézet, Brno, Csehország
- CL – colloidal lithography – kolloidlitográfia
- COP – cikloolefin polimer
- CPS – counts per second – másodpercenkénti beütésszám
- CVD – chemical vapour deposition – kémiai gőzfázisú leválasztás
- DAAD – Deutscher Akademischer Austauschdienst – bilaterális német-magyar K+F program
- DDA – discrete dipole approximation – diszkrét dipólus közelítés
- DNA/DNS – deoxyribonucleic acid – dezoxiribonukleinsav
- DR – dynamic range – dinamikus tartomány
- EBL – electron beam lithography – elektronsugaras litográfia
- EDS – energy dispersive X-ray spectroscopy – energiadiszipatív röntgenspektroszkópia
- EF – enhancement factor – erősítési tényező
- EK – ekvivalens (átmérőjű) kör (nanorészecske-átmérő meghatározási módszer)
- ENA – elliptical nanohole arrays – elliptikus nanolyuk-rendszerek
- FDTD – finite difference time domain – időtartománybeli véges differenciák módszere
- FEM – finite element method – végelem-módszer
- FIB – focused ion beam – fókuszált ionnyaláb
- FOM – figure of merit – jósági tényező
- FWHM – full width at half maximum – félértékszélesség
- HCL – hole-mask colloidal lithography – lyuk-maszk kolloidlitográfia
- HCR – hybridization chain reaction – hibridizációs láncreakció
- IR – infrared – infravörös
- LCA – (nano) Lycurgus cup array – (nano) Lükurgosz-kehely-rendszerek
- LCTF – liquid crystal tunable filter – folyadékkristályos hangolható szűrő
- Leibniz-IPHT – Leibniz Institute of Photonic Technology (Jéna, Németország)

LFIEF – local field intensity enhancement factor, lokális térintenzitás-erősítési tényező
LOD – limit of detection – detektálási küszöb
LSPR – localized surface plasmon resonance – lokalizált felületi plazmonrezonancia
MCH – 6-mercapto-1-hexanol – hat szénatom hosszúságú alkántiol
MP – megapixel
NA – numerikus apertúra
NAPLIFE – Nanoplasmonic Laser Inertial Fusion Experiment – Nanoplaszmonikus Lézerfúziós
Kísérlet (Nemzeti Kutatólaboratóriumi együttműködés neve)
NIL – nanoimprint lithography – nanoimprint-litográfia
NP – nanoparticle – nanorészecske
PAA – porous anodic alumina – pórusos alumínium-oxid
PBS – phosphate-buffered saline – foszfáttal puffertelt sóoldat
PCR – polymerase chain reaction – polimeráz-lánreakció
PDMS – polydimethylsiloxane – dimetil-polisziloxán
PET – polietilén-tereftalát
PMMA – poly(methyl methacrylate) – poli(metil-metakrilát)
PS – polystyrene – polisztirol
QCM – quartz crystal microbalance – kvarckristály-mikromérleg
RIE – reactive ion etching – reaktív ionmarás
RIS – refractive index sensitivity – tömbi törésmutató-változás érzékenysége
RIU – refractive index unit – törésmutató egység
RNA/RNS – ribonucleic acid – ribonukleinsav
RNIL – reversal nanoimprint lithography – fordított nanoimprint-litográfia
SA – sztreptavidin
SEM – scanning electron microscope – pásztázó elektronmikroszkóp
SERS – surface enhanced Raman scattering/spectroscopy – felületerősített Raman-szórás
SPP – surface plasmon polariton – felületi plazmon polariton
SPR – surface plasmon resonance – felületi plazmonrezonancia
STEM – scanning transmission electron microscope – pásztázó transzmissziós
elektronmikroszkóp
SU-8 – epoxigyanta-alapú negatív fotoreziszt
TEM – transmission electron microscope – transzmissziós elektronmikroszkóp
UV – ultraviolet – ultraibolya
XPS – X-ray photoelectron spectroscopy – röntgenfotoelektron-spektroszkópia

1. Bevezetés

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).

Az affinitástípusú bioérzékelők legnagyobb előnye a kémiai érzékelőkkel szemben a nagyfokú szelektivitásuk, vagyis az arra való képességük, hogy komplex mintából (vérből, nyálból, vizeletből) a mátrix egyéb összetevőitől függetlenül mutassák ki a detektálni kívánt molekulák jelenlétét és mennyiségét. Az úgynevezett jelölésmentes (label-free) bioérzékelők mindezt a célmolekulák jelölése (pl. fluoreszcens) nélkül, azok natív tulajdonságaiból (pl. tömeg, töltés, optikai sűrűség) tudják különböző jelképző technikákkal megtenni. Ezek szerint megkülönböztetünk elektrokémiai, szilárdtestalapú és optikai elvű bioérzékelőket is.

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, amelyek 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 plazmonrezonanciás képalkotással. μ -Builder – mintakezelő-mintamozgató mikrofluidikai rendszerek fejlesztése). Hallgatóként és doktoranduszként is volt módom dolgozni a felsorolt projekteken, amik kapcsán megismerkedtem az elektrokémiai és optikai bioérzékelők hátterével. 2007 tavasza óta, kb. 15 éve foglalkozom bioérzékelők kutatás-fejlesztésének aktuális kérdéseivel.

¹ 1962, Clark és Lyons enzimalapú vércukormérője [1]

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

A plazmonrezonancia a fémek delokalizált elektronjainak külső elektromágneses gerjesztés hatására kialakuló kollektív rezgése. Gyakorlati alkalmazhatóságuk szempontjából számunkra a kvantumkorlátozott rendszerekben, vékonyrétegekben, vagy nanorészecskéken kialakuló felületi plazmonok az igazán érdekesek. A vékonyrétegek felületén kialakuló terjedő felületi plazmonrezonancia (SPR), ill. a nanorészecskéken kialakuló lokalizált felületi plazmonrezonancia (LSPR) ugyanis bizonyos nemesfémek esetén (pl. arany, ezüst) látható tartományba eső fénnel is gerjeszthető. Mivel a kialakuló rezonancia frekvenciája nagymértékben függ a fémréteget vagy részecskét körülvevő közeg dielektromos tulajdonságaitól, a jelenség így használható a fém felületén lejátszódó molekuláris kötődési folyamatok megfigyelésére, az optikai közeg törésmutatójának mérésén keresztül.

Az elmúlt közel négy évtized alatt³ az SPR az optikai bioérzékelők egyik meghatározó képviselőjévé nőtte ki magát [3]. Nagy 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-képalkotás 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 labordiagnosztika szintjén. Az SPR-elv miniatürizált, hordozható diagnosztikai eszközökbe történő integrálása szempontjából megoldást jelenthet a nanoanyagok és a lokalizált felületi plazmonrezonancia alkalmazása. Mivel az LSPR a nanorészecskéken könnyebben gerjeszthető, LSPR-szenzorok egyszerűbb, transzmissziós elvű optikával is használhatóak, ami jelentősen könnyebben integrálható úgy, hogy a képalkotás lehetősége megmaradjon (LSPRi). Az elmúlt évtizedem 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 egy másik 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). Tipikus példa a polimeráz-láncreakció (PCR), amelyet nukleotidérzékelők esetén használhatunk arra, hogy a

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

detektálható nukleotidok mennyiségét enzimek segítségével felsokszorozzuk. Bár a PCR napjainkban már integrálható mikrofluidikai környezetbe is [6], ezek a mintaelőkészítő lépések érezhetően megbonyolítják (és nem utolsó sorban megdrágítják) a detektálási folyamatot, jelentős nehézségeket állítva ezzel a hordozható diagnosztikai eszközökbe történő integrálás elé is. Bizonyos esetekben, pl. a nukleotidérzékelőknél, a mintaelőkészítési lépések elengedhetetlenek, hiszen a baktériumok és vírusok genetikai állománya nem áll közvetlenül rendelkezésre. Az analizálandó patogénre specifikus DNS- vagy RNS-molekulák kinyeréséhez a baktériumokat/vírusokat először szét kell roncsolni (lízis), majd a kinyert genomot enzimekkel fel kell darabolni. Ezek az eljárások jellemzően veszteségesek a kinyert, analizálható szekvenciák tekintetében. Ilyen esetekben az érzékelő detektálási küszöbének jósága a mintaelőkészítés vállaláról veszi le a terhet, hiszen a releváns koncentráció-tartomány egyszerűbb előkészítési eljárásokkal is mérhetővé válhat. A kutatómunkám és a következő fejezetekben bemutatott téziseim közös pontja, hogy a fejlesztések *a plazmonikus elvű affinitástípusú bioérzékelők detektálási küszöbének javítására (kisebb detektálható koncentrációk felé tolására) törekednek.*

1.1. A disszertáció felépítése

A bioérzékelők eddigi bemutatásából jól látszik, hogy kutatás-fejlesztésük egy erősen multidiszciplináris terület, és ez a jellegzetesség a disszertációban is megfigyelhető. Három területre tagolt téziseim közül az első plazmonikus nanorészecske-rendszerek modellezésére és a nanorészecske-elrendezések szimulációval történő optimalizálására összpontosít (3. fejezet). A második terület szenzorelem előállítási technológiák fejlesztésével, és az új szenzorelem érzékelőként történő alkalmazásával foglalkozik (4. fejezet). A harmadik terület egy in-situ, molekuláris jelersítési mechanizmus kísérleti igazolását mutatja be (5. fejezet). A kutatási terület elméleti hátterét, illetve a vonatkozó technológiák elemző bemutatását tartalmazza a 2. fejezet, de az egyes területek kutatási előzményeit egyenként is ismertetem a fő fejezetek első részében. Kiemelendő, hogy minden tématerülethez kapcsolódóan a kutatómunka hazai és nemzetközi együttműködésekhez köthető. Ezeket az együttműködések szintén bemutatom a fő fejezetek elején, kiemelve, az egyes partnerek hozzájárulását, elkülönítve a saját eredményeimtől.

A disszertáció benyújtásának idején (2022 első fele) a kutatás mindhárom bemutatásra kerülő területen aktívan folytatódik, a jelen mű egy pillanatkép a területek aktuális állásáról. Eredményeim így folyamatosan hasznosulnak és alkalmazásra kerülnek az együttműködések keretein belül, de alapját képezik benyújtott nemzetközi kutatás-fejlesztési pályázatnak is. Ezért minden fő fejezet végén egy külön alfejezetben bemutatom a kijelentett tudományos tézisekkel lezárt területek jelenleg is aktív kutatási folyamatait, az eredmények hasznosulását, valamint a további terveket is.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A plazmonika elméleti háttere

A fejezet célja elméleti háttérrel biztosítani a plazmonika számos alkalmazási területe közül az érzékelőként történő alkalmazáshoz, a teljesség igénye nélkül, a disszertáció céljainak és eredményeinek érthetőségét szem előtt tartva. A plazmonika elméleti hátteréről és szenzorokban történő alkalmazásáról számos jó könyv (pl. Dimitrev, 2012 [7], vagy Trügler 2016 [8]) és összefoglaló cikk (pl. Homola, 2008 [4], Wang, 2019 [5], Li, 2015 [9]) érhető el, amelyekből az érdeklődő olvasó tájékozódhat. Jelen áttekintés is döntően ezekre a felsorolt munkákra támaszkodik.

2.1.1. Rövid történet

A felületi plazmon polaritonok első dokumentált megfigyelése R.W. Wood nevéhez köthető, aki 1902-ben vett észre érdekes sötét foltokat egy polikromatikus fénnel megvilágított diffrakciós rács spektrumában [10]. Bár Lord Rayleigh már 1907-ben próbált magyarázatot adni a jelenségre [11], azt először Fano kötötte a diffrakciós rács felületén gerjesztett elektromágneses hullámokhoz 1941-ben (közel 40 évvel az eredeti megfigyelés után [12]). A felületi plazmonok koncepcióját először Ritchie vezette be a vékonyrétegekben mozgó elektronok energiavesztésének leírására 1957-ben [13], ezt két évvel később Powell és Swan igazolta kísérletileg [14]. A felületi plazmonok kényelmes és reprodukálható gerjesztésének kidolgozására további közel 10 évet kellett várni, amikor 1968-ban Otto [15], ill. Kretschmann és Raether [16] egymástól függetlenül mutattak be egyszerű eljárásokat a célra. A prizmák közbeiktatásával csillapított teljes visszaverődés vizsgálatán alapuló kísérleti elrendezéseik megalapozták a felületi plazmonrezonancia alkalmazás orientált kutatását, a legtöbb ma kereskedelmi forgalomban kapható SPR-berendezés azóta is a reflexiós-elvű Kretschmann-geometriát használja (lásd a 2.1.3 alfejezetben). Az 1980-as évek elejére megvalósuló alkalmazások közül megemlítendő a fémek elektrokémiai határrétegét SPR-rel vizsgáló (Gordon, 1980 [17]), illetve az első SPR gázérezkelős alkalmazás is (Nylander, 1982 [18]). Az utóbbi csoporthoz köthető az első SPR-alapú bioérezkelő publikálása is (Liedberg, 1983 [3]). Ennek hatására fejlesztési projektek indultak (1983-ban a Pharmacia-nál, majd 1986-tól egy külön cégnél, a Pharmacia Biosensor-nál) az SPR-technológia kereskedelmi forgalomba helyezésére, aminek eredményeként az első SPR-berendezést 1990-ben adták el BIAcore néven [19]. Az elmúlt három évtizedben az SPR-berendezések hatalmas fejlődésen átesve az optikai bioérezkelők meghatározó képviselőivé nőttek ki magukat, köszönhetően kiemelkedő érzékenységüknek (akár 10^{-7} RIU [4]), illetve az SPR-képzőalkotásnak (SPRi), ami akár több 1000 párhuzamos mérést is lehetővé tesz egy szenzorfelületen [5]. A nanotechnológiai eljárások fejlődésével a nanorészecskéken, nanoszerkezeteken lokalizált felületi plazmonrezonancia (LSPR) is kiaknázzhatóvá vált bioérezkelési célra. A lokalizált plazmonok

egyszerűbb gerjeszthetősége miatt ezek a megoldások előrevetítik az SPR-elv integrálását kisméretű, hordozható diagnosztikai eszközökbe. A legkorszerűbb (state-of-the-art) ezen a téren a Nicoya cég 2020-ban piacra dobott 16 csatornás LSPR-berendezése (Alto), amely digitális mikrofluidikával kombinálva egyszerűsíti a mintakezelést is [20]. LSPRi-berendezés a disszertáció írásának időpontjában (2022) még nem kapható kereskedelmi forgalomban.

2.1.2. A Drude-féle fémmodell

A plazmon egy bozon-jellegű kvázirészecske, amelyet a plazmaoszilláció kvantált leírására használunk. A plazmaoszilláció kialakulásának feltétele, az anyagon belüli elemi töltések elmozdulásra való képessége egy külső elektromágneses tér hatására, illetve egy helyrehúzó erő jelenléte. A fémekre mindkét feltétel teljesül: a delokalizált vezetési elektronok képesek elmozdulni külső gerjesztés hatására, a helyrehúzó erőről pedig a lokalizált atomtörzsek gondoskodnak. Ez az elsőre meglepően egyszerű megközelítés – szabad elektronok mozgása rögzített ionok alkotta rácsban – alkalmas a fémek optikai tulajdonságainak szinte teljeskörű leírására. A modell alapjait Paul Drude fektette le 1900-ban [21], [22], majd 1905-ben Lorentz, 1933-ban pedig Sommerfeld és Bethe is kiegészítették (a Pauli-elv figyelembevételével, illetve a Maxwell-Boltzmann-eloszlás Fermi-Dirac-eloszlásra cserélésével közelítették az elméletet mérési eredményekkel) [23]. A modellt itt most csak az érzékelési alapelvek megértéséhez szükséges mértékben tárgyaljuk.

Drude az elektronok mozgásának leírására egy időben periodikus gerjesztés hatására gyorsuló, valamint ütközések következtében lassuló oszcilláló mozgást használt, ahol az elektronok szabadon mozognak a hozzájuk képest jelentősen nehezebb és így relatíve lokalizált háttérionokhoz képest, az (1) egyenletnek megfelelően (Drude-modell, [8] alapján).

$$m_e \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} + m_e \gamma \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} = -e \mathbf{E} e^{-i\omega t} \quad 1$$

Az egyenletben e és m_e a szabadelektronok elemi töltése és effektív tömege, \mathbf{E} és ω a külső elektromágneses gerjesztés amplitúdója és körfrekvenciája, γ pedig a csillapítást leíró tag. Amennyiben feltételezzük, hogy $\mathbf{r}(t) = \mathbf{r}_0 e^{-i\omega t}$, illetve, hogy a polarizáció (\mathbf{P}) makroszkopikusan felírható $\mathbf{P} = -en_e \mathbf{E}$ alakban, akkor Maxwell konstitutív egyenlete alapján az elektromos eltolásvektor (\mathbf{D}) a (2) egyenlet szerint alakul.

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \mathbf{E} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} = \varepsilon_0 \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} \right) \mathbf{E} \quad 2$$

A (2) egyenletben szereplő két lényeges paraméter, a fémek frekvenciafüggő komplex permittivitása ($\varepsilon_r(\omega)$), valamint az ω_p tömbi plazmafrekvencia a (3) és (4) egyenletekben fejezhetőek ki. (ε_0 a vákuum permittivitását, n_e pedig az elektronok sűrűségét jelöli a fémekben).

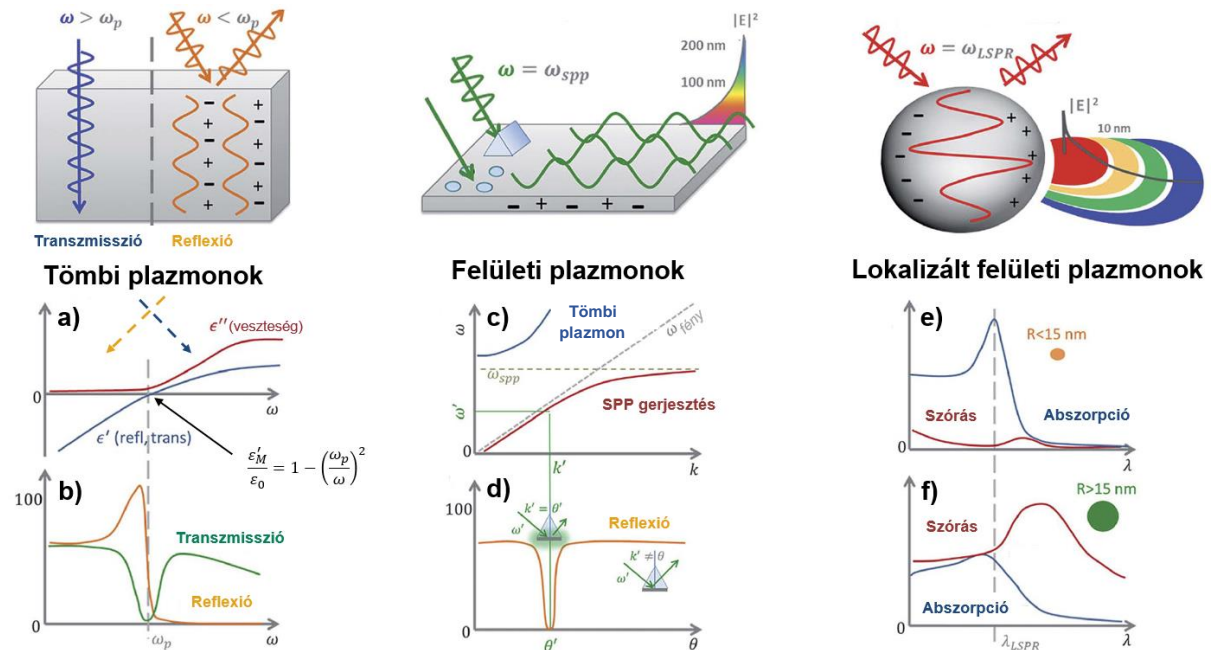
$$\varepsilon_r(\omega) = \varepsilon_r'(\omega) + i\varepsilon_r''(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} + i \frac{\omega_p^2 \gamma}{\omega^3 + \omega \gamma^2} \quad 3$$

$$\omega_p = \sqrt{\frac{n_e e^2}{m_e^* \epsilon_0}} \quad 4$$

Amennyiben a (3) egyenletben elhanyagoljuk a csillapítást (vagyis $\omega \gg \gamma$ közelítéssel élünk) a frekvenciafüggő permittivitás valós része az (5) egyenletre egyszerűsödik.

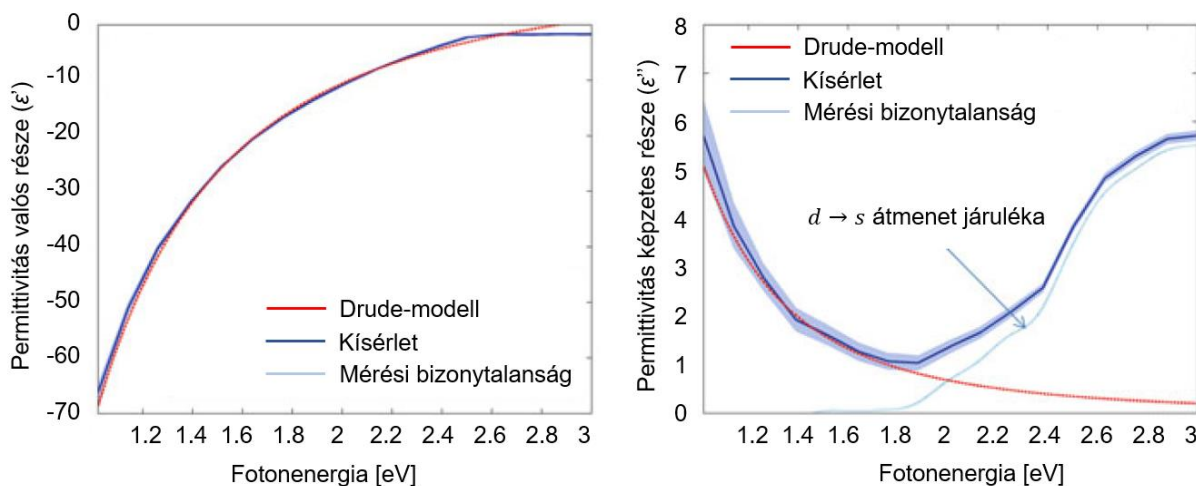
$$\epsilon'_r(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad 5$$

Ez alapján az 1. ábra bal oldalán is látható módon a permittivitás valós része $\omega = \omega_p$ körfrekvenciánál előjelet vált, és így a fémek optikai viselkedése két különböző tartományra különül. Amennyiben $\omega > \omega_p$ a permittivitás valós része pozitív, így a törésmutató ($n = \sqrt{\epsilon}$) valós értéket vesz fel. Azonban, ha $\omega < \omega_p$ a negatív permittivitás imaginárius törésmutatót eredményez, ami következményeként az elektromágneses hullám nem terjedhet az anyagon belül. Az elektronok 180° -al eltolt fázissal oszcillálnak az elektromágneses gerjesztéshez képest, ami a hullám reflexióját és az anyag tömbi részének leárynyékolását okozza. $\omega > \omega_p$ esetén az elektronok nem tudják mozgásukkal lekövetni a gyorsan változó teret, az árnyékolás nem tud megvalósulni, az anyag átlátszóvá válik [23]. Mivel ω_p a legtöbb fém esetén az ultraibolya (UV) tartományba esik, így ezen fémek felülete a látható tartományban erősen tükrözi a fényt, ahogyan azt megszoktuk, jellegzetes szín (pl. arany, réz) a sávok közötti elektronátmenet (és foton elnyelés) eredményeként alakulhat ki.



1. ábra. A három plazmontípus illusztrációja, magyarázó ábrákkal. Bal: tömbi plazmonok: **a)** A komplex permittivitás frekvenciafüggése; **b)** a transzmisszió és a reflexió frekvenciafüggése. Közép: felületi plazmon polariton: **c)** A $\omega-k$ diszperziós relációk; **d)** a reflexió függése a beesési szögtől. Jobb: Lokalizált felületi plazmonok: **e-f)** A szórás és az abszorpció frekvenciafüggése különböző nanorészecske méretek esetén. [9]

Ezek a sávátmenetek jellemzően a Fermi-szint közelében lévő vegyértékelektronok magasabb energiaállapotba gerjesztését jelentik. Ez arany és ezüst esetén is $d \rightarrow s$ átmenetet jelent, de amíg ezüst esetén a $4d \rightarrow 5s$ átmenet energiája az UV tartományba esik, arany esetén az $5d \rightarrow 6s$ távolság relativisztikus hatások miatt lecsökken [24], a kisebb energia pedig az UV felől a látható–kék tartományba tolja az elnyelést, jellegzetes sárga színt adva az aranyknak [25]. A Drude-modell ((1) és (3) egyenletek szerinti leírásának) alapvető problémája, hogy nem veszi figyelembe ezeket az átmeneteket, így csak kis fotonenergiáknál (infravörös tartomány) közelíti jól ezeket a fémeket. Ahogy a 2. ábrán is látható, arany esetén a Drude-modellből számolt permittivitás képzetes része 1.9 eV fölött (kb. 650 nm alatt) nem közelíti jól a kísérletileg mért adatokat (Johnson és Christy adatai, 1972-ből [26]).



2. ábra. Az arany permittivitásának valós és képzetes része a Drude-modellből számolva, valamint összevetve kísérletileg mért adatokkal (Johnson és Christy, 1972 [26]). A modellben a csillapítási tag $\gamma = 0.1[\text{fs}^{-1}]$ volt [8].

A Drude-modell Lorentz általi kiterjesztése a szabad vezetési elektronok mellett a kötött vegyértékelektronok átmeneteinek hatását hivatott figyelembe venni (vagyis $\epsilon = \epsilon_{szabad} + \epsilon_{kötött}$). Az elektronátmenetben szerepet vállaló vegyértéksávokra k index jelölést használva a Lorentz-Drude-modell a (6) és (7) egyenletek szerint írja le az elektronok mozgásegyenletét, illetve a permittivitást [27], ahol K_k egy rugóállandó jellegű mennyiség, f_k és ω_k pedig a sávátmenetet leíró Lorentz-oszcillátorok erőssége és körfrekvenciája.

$$m_e \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} + m_e \gamma_k \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} + K_k \mathbf{r} = -e \mathbf{E} e^{-i\omega t} \quad 6$$

$$\epsilon_r(\omega) = \epsilon_{r,Drude}(\omega) + \sum_k \frac{f_k \omega_k^2}{\omega_k^2 - \omega^2 - i\omega \gamma_k} \quad 7$$

A Lorentz által így módon kiegészített Drude-modell már jól közelíti a kísérletileg mérhető permittivitásokat. Jelentőségét jól jelzi, hogy a később bemutatásra kerülő szimulációs szoftverek a mai napig használják fémek optikai viselkedésének számolására (3. fejezet).

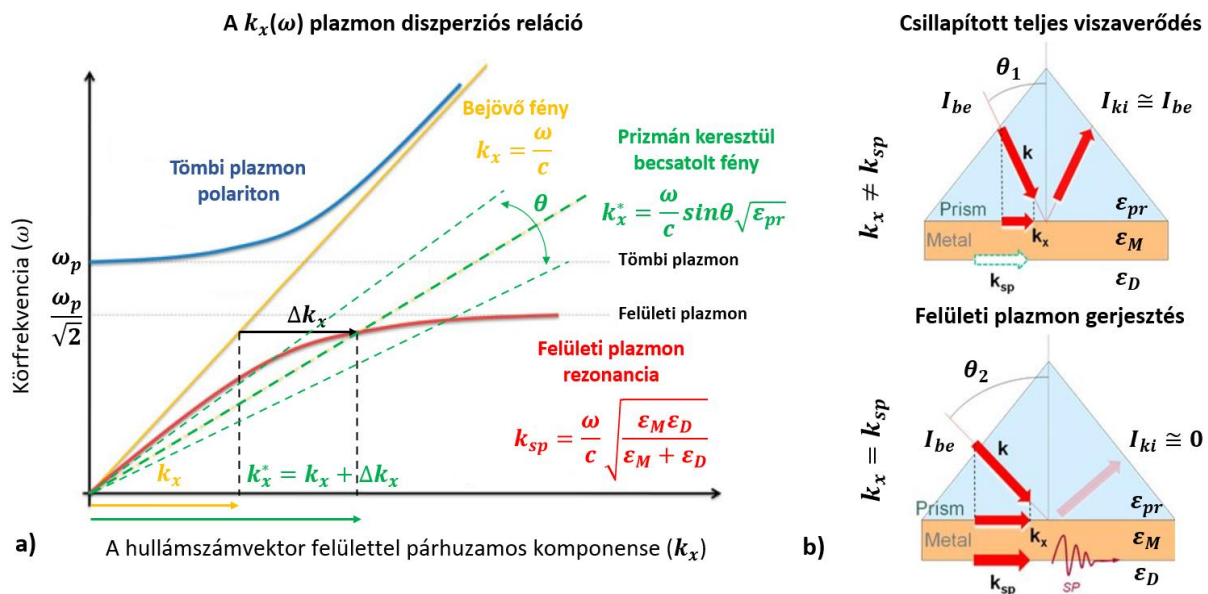
2.1.3. A felületi plazmon polaritonok

Ha a tömbi fémet vékonyréteggé zsugorítjuk és az elektronokat bezárjuk egy kétdimenziós nanoszerkezetbe, akkor a külső elektromágneses térrel a felületen terjedő elektronsűrűség-hullámokat, felületi plazmon polaritonokat (SPP) tudunk gerjeszteni (1. ábra középső oszlopa). A polariton egy szintén bozon jellegű kvázirészecske, használata arra utal, hogy a fém felületén (a fém-dielektrikum határfelületen) az elektronsűrűség hullám csatolva van az őt gerjesztő elektromágneses hullámhoz.

A csatolás létrejöttéhez és az SPP keltéshez számos gerjesztési kritériumnak kell eleget tenni. Ezek megértéséhez tanulmányoznunk kell a felületi plazmonok $k_x(\omega)$ úgynevezett diszperziós relációját, amelyet a (8) egyenlet ad meg [9]. A diszperziós reláció megértését segíti a 3. ábra illusztrációja is.

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad 8$$

A 3. ábrán és a (9) egyenletben k_{sp} a felületi plazmonok, k_x pedig a bejövő fény hullámszámvektorának felülettel párhuzamos komponense, p-polarizált fény esetén. A fém és a vele érintkező dielektrikum permittivitásait ϵ_M és ϵ_D jelölik, c pedig a fény vákuumbeli sebessége ($\omega = ck$). A diszperziós relációt terjedelmi korlátok miatt levezetés nélkül adom meg. A részletes levezetés több irodalomban is megtalálható (pl. [8]). Röviden, a Helmholtz-alakban felírt hullámegyenlet ($(\nabla^2 + k^2)\mathbf{E} = 0$) kell megoldani a homogén permittivitással rendelkező térrészekre (ϵ_M, ϵ_D), valamint fel kell írni a fém-dielektrikum átmenet megfelelő peremfeltételeit is. Az így adódó egyenletrendszer megoldása k_x -re a diszperziós reláció.



3. ábra. A felületi plazmonok $k_x(\omega)$ diszperziós relációja fém-levegő határfelület esetén, valamint a gerjesztési kritériumok teljesülésének szemléltetése egy prizma-fém-dielektrikum átmenet (Kretschmann-elrendezés) esetén [8].

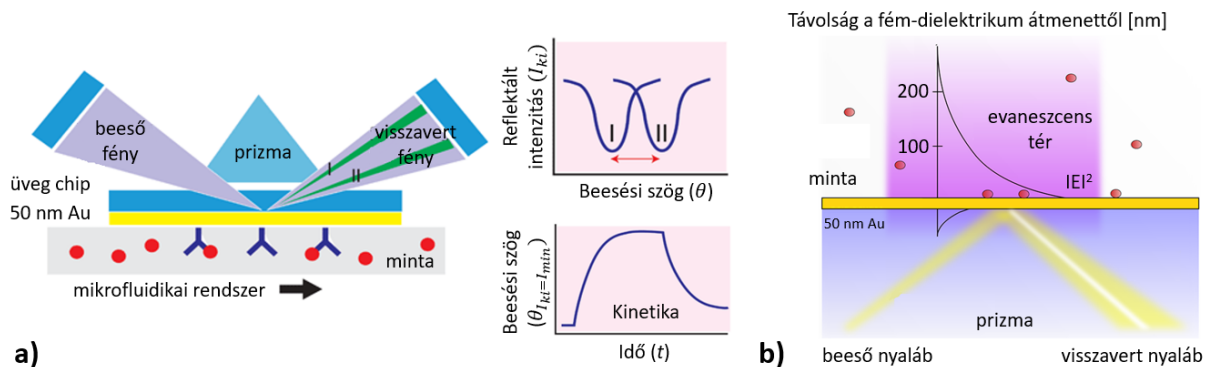
Összevetve a diszperziós relációt ((8) egyenlet) a Drude-moddal ((3) és (4) egyenletek), több permittivitásra vonatkozó kritériumot is megfogalmazhatunk. Mivel a felületen terjedő plazmonmódus létezésének feltétele, hogy k_{sp} -nek legyen valós része, illetve, hogy $\varepsilon'_M < 0$, adódik az $\varepsilon'_M \varepsilon'_D < 0$ és $\varepsilon'_M + \varepsilon'_D < 0$ feltételegyüttes (8)-ból. Mivel $\varepsilon'_D > 0$, ezekből a $|\varepsilon'_M| > |\varepsilon'_D|$ kritériumot kapjuk a fém és a dielektrikum permittivitásának viszonyára. A fémekben jelentkező ohmikus veszteségek elhanyagolhatóságához továbbá fontos, hogy $|\varepsilon'_M| > |\varepsilon''_M|$ legyen, ami az általunk használt fémekre teljesül az optikai tartományon (lásd a 2. ábrán).

A permittivitásra vonatkozó kritériumok teljesítése önmagában nem elégséges felületi plazmonok gerjesztéséhez. A 3. ábrán levegő-fém átmenetre illusztrált módon ugyanis egy adott gerjesztési frekvenciához tartozóan a felületi plazmonok hullámszáma mindig nagyobb az őket gerjeszteni kívánó fényénél. Vagyis $k_{sp} > k_x$, ε'_M és ε'_D eltérő előjele miatt, a sárga és piros görbék soha nem metszik egymást. A hullámszám (vagy impulzus, $\mathbf{p} = \hbar \mathbf{k}$) különbség ($\Delta \mathbf{k}_x$) leküzdésére dolgozta ki Kretschmann a prizmán keresztüli gerjesztést, ahogy 3. ábra jobb oldalán látható. A fényt vékonyrétegbe egy prizmán keresztül becsatolva, a fény levegőben érvényes diszperziós egyenesét (sárga) elforgatja a beesési szög (θ) és a prizma törésmutatójának ($\sqrt{\varepsilon_{pr}}$) függvényében (zöld egyenesek), amely így a felületi plazmonok diszperziós görbéjével (piros) metszésbe hozható ($\mathbf{k}_x^* = \mathbf{k}_x + \Delta \mathbf{k}_x = \mathbf{k}_{sp}$).

A Kretschmann-elrendezés hatalmas előnye, hogy rögzített permittivitások ($\varepsilon_M, \varepsilon_D, \varepsilon_{pr}$) és gerjesztési frekvencia (ω) esetén a feltétel teljesülése csak nagyon keskeny szögtartományon belül valósul meg (lásd 1. ábra d), továbbá, hogy ez a szögpozíció nagyon érzékenyen reagál ε_D változásaira. Ez teszi lehetővé a felületi plazmonrezonancia érzékelőként történő alkalmazását, ahol a klasszikus elrendezések a fém vékonyréteggel érintkező közeg permittivitásának megváltozását a rezonancia-kondíció teljesüléséhez szükséges szögváltozásra vezetik vissza, ezt pedig beesési szög pásztázással és a felületről visszavert intenzitás mérésével oldják meg a (9) egyenlet szerint.

$$\mathbf{k}_x^* = \mathbf{k}_{sp} \rightarrow \frac{\omega}{c} \sin \theta \sqrt{\varepsilon_{pr}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_M \varepsilon_D}{\varepsilon_M + \varepsilon_D}} \quad 9$$

A 3. és 4. ábrákon illusztrált módon, a rezonancia-kondíciótól eltérő beesési szögek esetén, a prizmán keresztül érkező fény csillapított teljes visszaverődést (ATR) szenved, a detektorban mért reflektált intenzitás nagy ($I_{ki} \cong I_{be}$). Plazmongerjesztés esetén a visszavert intenzitás drasztikusan lecsökken ($I_{ki} \cong 0$), így a becsatolási szöget pásztázva, a visszavert intenzitás minimumának keresésével vehető fel a vékonyréteg felületen végbemenő folyamatok kinetikáját leíró $\theta_{I_{ki}=I_{min}}(t)$ görbe [28].



4. ábra. a) A Kretschmann-elrendezés illusztrációja egy mikrofluidikai rendszerrel kombinált bioérzékelős mérési környezetben. A reflektált intenzitás (I_{ki}) – beesési szög (θ) összefüggés, valamint az ebből számolható $\theta_{I_{ki}=I_{min}}(t)$ kinetika illusztrációja célmolekulák bekötődése esetén. **b)** A fém-dielektrikum határfelületen kialakuló, a vizsgált mintába behatoló, exponenciális lecsengésű evanescens tér szemléltetése [29].

Megjegyzendő, hogy amíg a hullámegyenlet megoldásaként adódó \mathbf{k}_x komplex mennyiség, valós és képzetes tagokkal ($\mathbf{k}_x = \mathbf{k}'_x + i\mathbf{k}''_x$), a felületre merőleges irányú \mathbf{k}_z komponens tisztán képzetes ($\mathbf{k}_z = i\mathbf{k}''_z$). Ez azt jelenti, hogy az elektromágneses hullám a határfelülethez van kötve, a felületre merőleges irányban nem terjed. Ebben az *evanescens térben* a térerősség exponenciálisan csökken a távolsággal ($E(z) = E_0 e^{-|k_z|z}$). Azt a távolságot, amin belül a térerősség az $1/e$ részére csökken behatolási mélységnek, vagy fémek esetén szkinmélységnek nevezzük és a (10) egyenlet alapján írhatjuk fel a közegekre.

$$\begin{cases} \xi_D = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{\varepsilon_D}} \sqrt{\frac{\varepsilon_M + \varepsilon_D}{\varepsilon_D}} & \text{dielektrikumban} \\ \xi_M = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{\varepsilon_M}} \sqrt{\frac{\varepsilon_M + \varepsilon_D}{\varepsilon_M}} & \text{fémekben} \end{cases} \quad 10$$

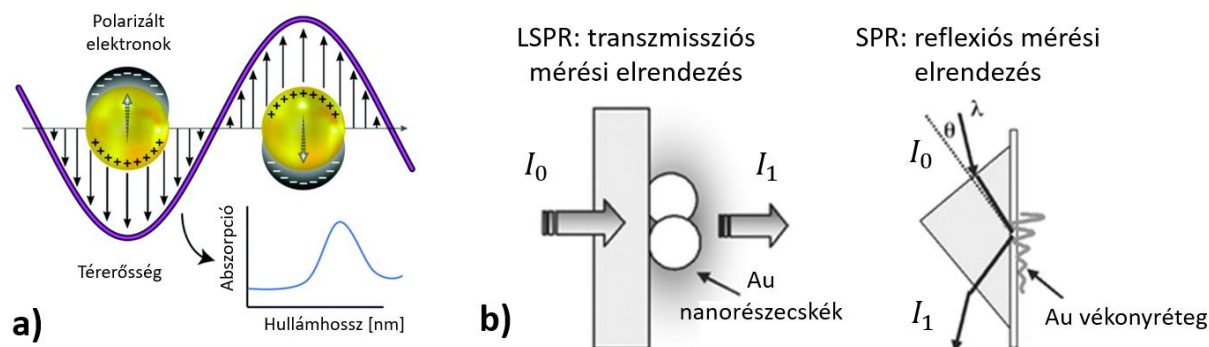
Az evanescens tér szerepe az érzékelési folyamatokban jelentős, mivel a vékonyréteggel érintkező dielektrikum tulajdonságainak a változásai ezen a térrészen belül képesek visszahatni a plazmonrezonanciára. Bioérzékelős alkalmazásoknál nagy előny, hogy vizes közegben az evanescens tér behatolási mélysége a közegben kb. 200 nm, ami összemérhető a vizsgált biomolekulák méretével. Az SPR így jellemzően felületi hatásokra érzékeny, tömbi hatásokra érzéketlen eszköz. A klasszikus SPR-berendezésekhez képest, amelyek fókuszált lézernyalábot és fotodetektort használtak, a modern SPRi (képalkotó) berendezésekben CCD-kamera segítségével egy akár több cm^2 -es felület minden felbontott pontjából kaphatunk információt a lejátszódó folyamatokról. A 2000-es évek második felében a BME-ETT is fejlesztett egy ilyen eszközt, amit az 5. fejezet kísérleteihez használtam [T23]. A felbontóképesség elvi határa SPRi esetén a felületen terjedő plazmonok terjedési úthossza, ami a veszteségi tagból $\delta = 1/2k''_x$ -ként számolható [8], közelítőleg 10 μm [30].

2.1.4. A lokalizált felületi plazmonrezonancia

Amennyiben a gerjesztett fémdarab mérete minden dimenzió mentén jelentősen kisebbnek tekinthető, mint a megvilágító fény hullámhossza (azaz 0D-s nanoanyagokat használunk), úgy a fém nanorészecske vezetési elektronjai polarizálódnak a gerjesztő térerősség irányának megfelelően, és az ionrács ez ellen ható Coulomb-erői következtében oszcillálni kezdenek az 5. ábrán illusztrált módon [31]. A jelenséget lokalizált felületi plazmonrezonanciának (LSPR) hívjuk (a plazmonokat, pedig ritkán részecske plazmon polaritonoknak [8]).

Mivel a nanorészecskéken gerjesztett LSPR rezonanciafrekvenciája komplex módon függ a részecske anyagától, alakjától, méretétől, a közeg törésmutatójától és az esetleges részecskék közötti csatolásoktól is, ezért a rezonancia-kondíciót nehéz analitikus formában felírni. Egyszerű nanogömbökre Mie harmonikus oszcillátoron alapuló modelljéből számolható $\omega_{LSPR} = \omega_p / \sqrt{1 + 2\varepsilon_D}$ közelítést használhatjuk [32], ahol a 2-es szorzótényező függ a geometriától [33].

Az LSPR nagy előnye az SPR-rel szemben, hogy a lokalizált plazmonok könnyebb gerjeszthetősége miatt egyszerű transzmissziós mérési elrendezésekben használhatjuk őket, ami jelentősen könnyebben integrálható, mint az SPR precíz szögpozicionálást igénylő reflexiós elrendezése (lásd 5.b ábra). A plazmonrezonancia csúcsának pozíciója (a hullámhossz függvényében, széles spektrumú megvilágítást használva) egyszerűen mérhető a transzmissziós ($T = I_1/I_0 \times 100\%$) vagy abszorpciós ($A = \lg(I_0/I_1)$) spektrumokon keresztül.

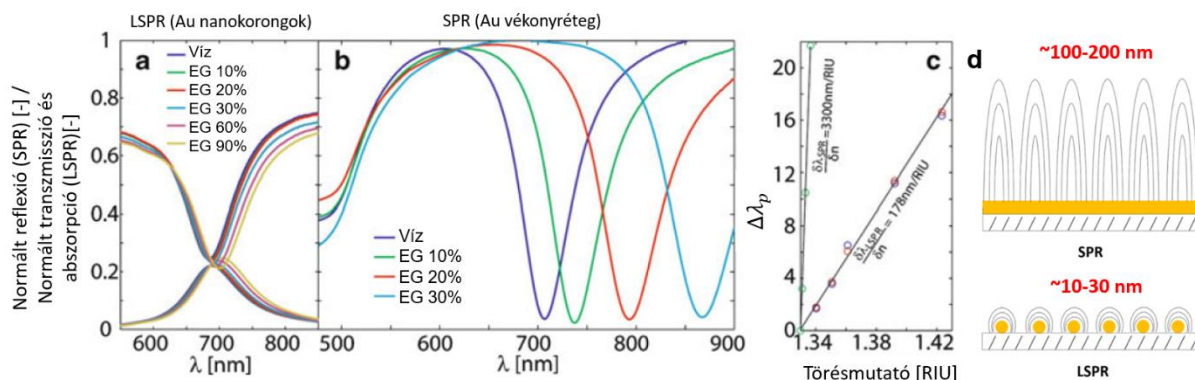


5. ábra. a) A lokalizált felületi plazmonrezonancia illusztrációja. **b)** Az LSPR transzmissziós mérési elrendezésének összevetése az SPR Kretschmann-elvű reflexiós elrendezésével.

Az LSPR-alapú érzékelők jóságának számszerűsítésére a leggyakrabban a tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott érzékenységet (*RIS*, bulk refractive index sensitivity) használják, ami a plazmonrezonancia csúcsának elmozdulása ($\Delta\lambda_p$) a nanorészecskét körülvevő közeg törésmutató-változásának (Δn) függvényében, a (11) egyenlet szerint [34].

$$RIS = \frac{\Delta\lambda_p}{\Delta n} \quad 11$$

A különböző alakú és típusú nanorészecskék így definiált érzékenysége rendkívül széles skálán mozog. Egy 2014-es összefoglaló cikk a kolloid formában szintetizált nanorészecskékre (lásd 2.2.1. alfejezet) kísérletileg mért érzékenységeket a 71 nm/RIU (arany nanogömbök) és 1933 nm/RIU (arany nanoketrecék) között találta [35]. Általánosan elmondható, hogy egzotikusabb alakzatokkal, a csúcs és élhatások maximalizálásával növelhető az érzékenység, de ennek az ára a bonyolultabb/költségesebb technológia, nagyobb szórás, rosszabb reprodukálhatóság lesz (lásd részletesen a 2.2. alfejezetben). Megjegyzendő, hogy mivel az LSPR-spektrum jelentősen szélesebb az SPP-nél (okairól lásd [31]), és mivel a túl széles spektrum limitálhatja az elérhető molekuláris érzékenységet és *LOD*-t gyakorlati alkalmazásoknál [36], egyre többen használják az *FOM* jósági tényezőt (figure of merit) a szenzorok minősítésére, ami a *RIS* osztva a plazmonrezonancia csúcsának féllértékszélességével (*FWHM*, full width at half maximum) [37]. Bár a legtöbb LSPR-érzékelő *FOM* értéke 10 RIU⁻¹ alatt van (lásd 2.3. alfejezet) történtek kísérletek ultranagy (730 RIU⁻¹) *FOM* értékkel rendelkező nanoszerkezetek előállítására is [38].



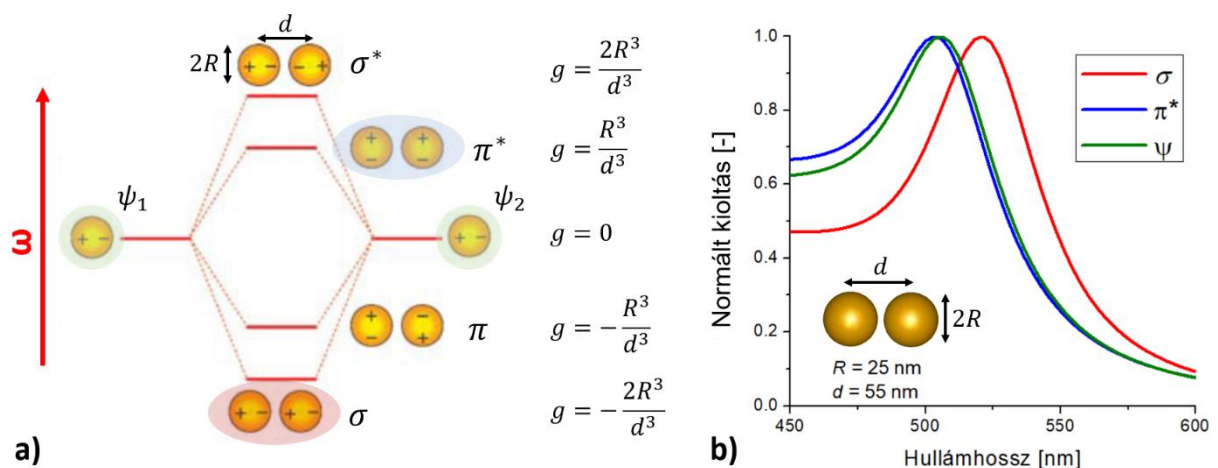
6. ábra. a-c) Egy Au nanokorong-alapú LSPR-érzékelő, illetve egy Au vékonyréteg-alapú SPR-érzékelő kalibrációs görbéi különböző arányú víz–etilénglikol keverékekkel mérve [7]. **d)** Az evanescens tér különböző behatolási mélységének szemléltetése SPR- és LSPR-szenzorok esetén [39].

A fizikai érzékenység (*RIS*) önmagában nem jellemzi tökéletesen az LSPR-érzékelők képességeit. Még a legjobb *RIS*-el rendelkező nanorészecskék sem érik el a klasszikus SPR kb. 3300 nm/RIU érzékenységét, de bioérzékelők esetén a detektálandó célmolekulák koncentrációjára vonatkoztatott érzékenységük ($\Delta\lambda_p/\Delta c$) közel sem alárendelt [40]. A 6. ábra által illusztrált példában arany nanokorongok (80 nm átmérő, 50 nm vastagság) LSPR érzékenységét hasonlították össze klasszikus 50 nm vastag arany vékonyréteg SPR érzékenységével. Bár az ábrán látható módon a nanokorongok tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott érzékenysége jelentősen elmarad az SPR-től (178 nm/RIU – 3300 nm/RIU), a molekuláris érzékenységük meglepően hasonló volt (1 mg/ml sztreptavidint (SA) kötöttek biotinilált BSA-val (szarvasmarhaszérum-albumin) borított felülethez, amire az LSPR 0,57 nm, az SPR 0,55 nm rezonanciaeltolódással válaszolt) [41]. A drasztikus különbség oka, hogy az SPR kb. 100–200 nm-es behatolási mélységéhez képest az LSPR behatolási mélysége

a mintába mindössze kb. 10–30 nm, ami megegyezik a vizsgált molekulák (pl. DNS, RNS, antitestek) nagyságrendjével [9].

Bár az LSPR törésmutató-érzékenysége legalább egy nagyságrenddel elmarad az SPR mögött, a fókuszáltabb közeltére miatt sokkal hatékonyabban használja ki azt. A plazmonrezonancia közeltérének erőssége tovább növelhető a nanorészecskék között csatolt plazmonrezonancia jelenségének kiaknázásával. Csatolt rezonancia SPP/SPP, SPP/LSPR és LSPR/LSPR között is kialakítható, amennyiben a struktúrák egymás közeltérében (effektíven az ξ_D behatolási mélységen belül, lást (10) egyenlet) helyezkednek el [42]. A struktúrák közötti csatolás új hibrid rezonancia módusok megjelenésével, a rezonanciacsúcs eltolódásával és jelentős térerősség növekedéssel jár [43]. A hibrid módusok leírását a legegyszerűbb esetben – két csatolt nanogömb, úgynevezett plazmonikus dimer struktúra – esetén a 7. ábra szemlélteti.

Az egyedülálló nanogömbök rezonancia módusához képest (ψ_1, ψ_2) amennyiben a lineárisan polarizált gerjesztő fény polarizációja a dimerek hossz tengelyével párhuzamos, úgy szigma (σ, σ^*), amikor arra merőleges pi (π, π^*) hibrid módusokról beszélhetünk [44]. A polarizáció mellett különbség a móduspárok között, hogy amíg a σ és π^* esetben a nanorészecskék egymással (és a gerjesztő térrel) fázisban rezonálnak, addig a σ^* és π esetekben a részecskék rezonanciája egymástól 180° -al eltér [45]. Mivel az ellenfázisban rezonáló nanorészecskékre a dipólmomentumok kioltják egymást, a dimer ezen módusa „sötét” (nemsugárzó) lesz, szemben a „világos” (sugárzó) (ψ, σ, π^*) módusokkal [46]. Megjegyzendő, hogy speciálisan polarizált fényel a sötét módusok is gerjeszthetők és a spektrumban láthatóvá tehetők, ez azonban komplikált optikát igényel [46], [47]. Polarizálatlan fényel történő megvilágítás esetén mindkét világos módus (σ, π^*) gerjesztődik, de a σ jelentősen nagyobb mértékben (min. háromszor nagyobb kioltás) [45]. Ahogy a 7. ábrán látható, a σ módusnak a legalacsonyabb a frekvenciája, ami az elnyelési spektrum vörös irányú eltolódását okozza.



7. ábra. a) Csatolt arany nanogömbök hibrid plazmonrezonancia módusainak szemléltetése. A g értékek a (12) egyenletbe helyettesítésével közelíthető a rezonancia csúcsa levegőn ([48] alapján). **b)** Saját BEM-szimulációk a három világos módus (ψ, σ, π^*) szemléltetésére 50 nm átmérőjű, egymástól 5 nm távolságra elhelyezkedő csatolt arany nanogömbök esetén.

Komplex alakú és elrendezésű nanorészecske-rendszerekre a hibrid-plazmonrezonancia leírása analitikusan rendkívül komplexé válik, a csatolt rendszerek tulajdonságait így numerikus szimulációval szokták vizsgálni. A legegyszerűbb esetre, a 7. ábrán látható csatolt arany nanogömbökre, levegő közegben ad analitikus közelítést a (12) egyenlet. Az egyenletet DDA-szimulációkkal (diszkrét dipólus közelítés) számolt rezonancia csúcsok alapján vezették le, g értékeit a különböző hibrid módusokra a 7. ábrán tüntettem fel. (A szimulációban használt paraméterek értékei $\hbar\omega_p = 9 \text{ eV}$; $\hbar\tau = 0,05 \text{ eV}$; $\varepsilon_b = 9$ [48].)

$$\omega_{LSPR} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2 + \varepsilon_b}} \sqrt{\frac{1 + g}{1 + \eta g} - \frac{i\tau^{-1}}{2}}, \quad \eta = \frac{\varepsilon_b - 1}{\varepsilon_b + 2} \quad 12$$

A (12) egyenlet és a 7. ábra a) részén feltüntetett g értékek alapján igazolható, hogy a σ módus gerjesztése által keltett vörös irányú rezonanciaeltolódás mértéke is jelentősen nagyobb⁴ a π^* módus által keltett kék irányú elhangolódásnál, ahogy a 7. ábra b) részén is látható. A σ hibrid módusról összességében tehát elmondható, hogy 1) könnyen gerjeszthető, akár polarizálatlan fényel is, 2) a gerjesztésével tapasztalható rezonanciaeltolódás, valamint a 3) kioltásának a mértéke is jelentősen nagyobb a π^* módusnál, 4) gerjesztésével nagymértékben növelhető a részecskék között fókuszált közeltér erőssége [49]. Utóbbival kapcsolatban fontos kiemelni, hogy a térerősítés kb. 1 nm-es részecskék közötti távolsággal bezáróan működik, 1 nm alatt a távolság-térerőség reláció megfordul [50]. Mind a részecskék között meginduló alagútáram, mind az egymással érintkező részecskék közötti közvetlen elektrontranszfer csökkenti a térerősítést [51], [52].

A σ hibrid módus gerjesztésének hatására végbemenő rezonanciaeltolódás hatását több numerikus szimuláción alapuló megközelítéssel vizsgálták már egyszerűbb nanorészecske-rendszerekre [48]; kísérletileg pedig megemlítendő, hogy ez a jelenség az úgynevezett plazmonvonalzó (plasmon ruler) alapja [53]. A korábbi vizsgálatokról általánosan elmondható, hogy a céljuk elsősorban a csatolt plazmonrezonancia módusok rezonanciafrekvenciájának a megállapítása. A csatolt módusok törésmutatóra vonatkoztatott érzékenységét csak kevesen vizsgálták, főleg 2015 előtt, amikor saját szimulációimmal elkezdtem a területtel foglalkozni, dedikáltan a csatolt plazmonrezonancia kiaknázásából adódó megnövelt érzékenység feltérképezésével. A szimulációs munkám háttérét részletesebben bemutatom a 3. fejezetben.

Megemlítendő, hogy az LSPR számos más tulajdonságában is jelentősen eltér az SPP-től. A nanorészecskéken lokalizált plazmonok szórás formájában kicsatolnak a távotérbe (szemben az SPR-rel) [54], a nanorészecskén, illetve közeltérben pedig az elektronok szóródási vesztesége hőt termel, ami fűti a környezetet (lásd termoplazmonika [55]). Ezek következtében a lokalizált plazmonok élettartama jelentősen kisebb a felületi plazmonokénál [56]. A nanorészecskéken lokalizált plazmonrezonancia ezen különlegességeit számos alkalmazási

⁴ $\sqrt{(1 + g)/(1 + \eta g)}$ értéke a σ módusra $\sim 0,97$, míg a π^* módusra $\sim 1,01$ -nek adódik a 7. ábra alapján, ami kb. 15 nm, ill. 5 nm elhangolódás. A pontos értékek függenek az arany szimulációban használt permittivitásától is.

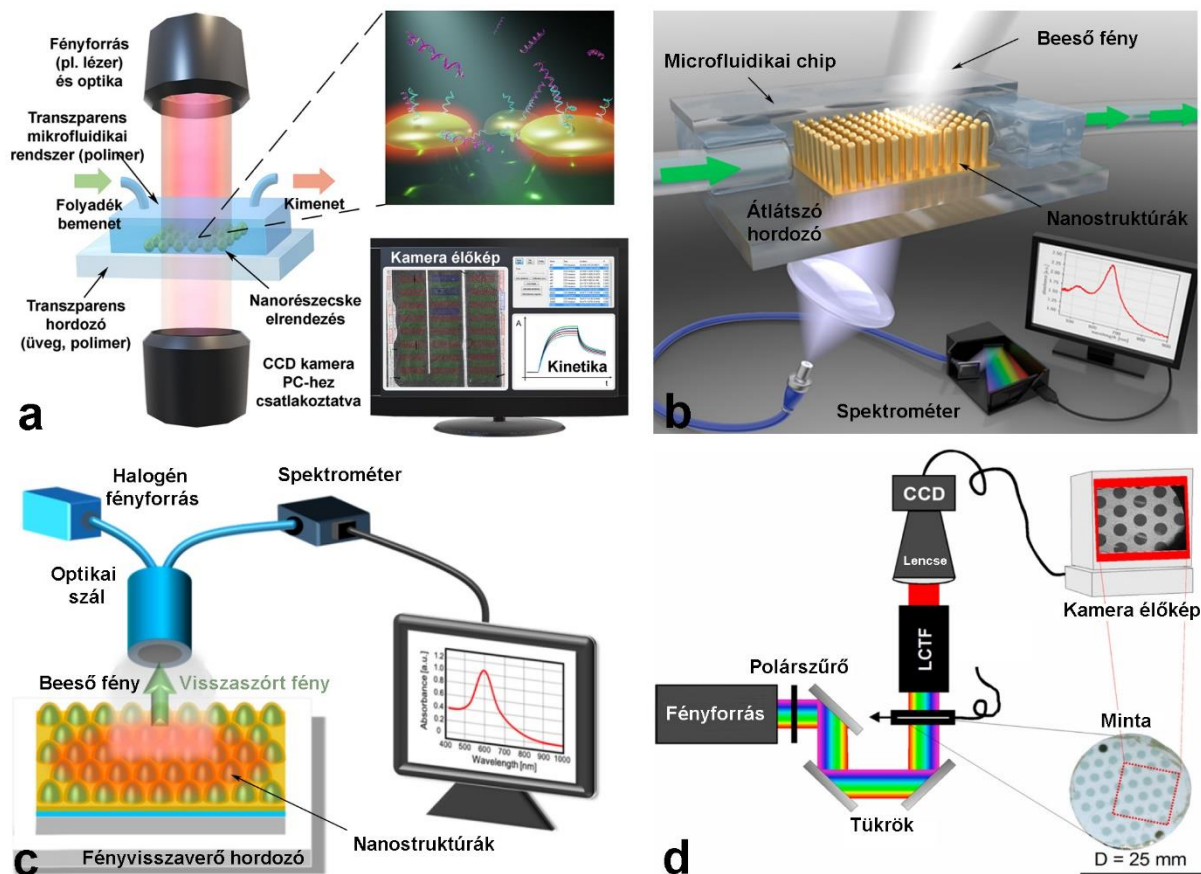
terület próbálja kiaknázni, a gyógyásztól (pl. rákterápia [57]), a szereléstechnológián át [58] a nukleáris fizikáig [59], de ezen alkalmazási lehetőségek részletes tárgyalása túlmutat a jelen disszertáció keretein.

2.1.5. Az LSPR mérési elrendezések és az LSPR-képalkotás (LSPRi)

Plazmonikus nanorészecskéket jellemzően két alapvető mérési konfigurációban használhatunk LSPR-érzékelőként: kolloid formában, illetve egy szilárd hordozó felületére rögzítve [60]. Utóbbi lehet például optikai szál [35], vagy egy vékony, mérési módtól függően fényáteresztő vagy fényvisszaverő hordozó (chip) [61]. Amennyiben a hordozó felületén különálló nanorészecskéket vizsgálunk egyrészecske-spektroszkópiáról beszélünk (single-particle LSPR). Minden konfigurációnak megvan a maga előnye. A kolloid-kolorimetrián alapuló tesztek általában egyszerűek, gyorsak és olcsók [62], míg egyrészecske-spektroszkópiával kivételesen jó, akár egyedi molekulák kimutatását is lehetővé tevő detektálási küszöbököt is értek már el [63]. Az SPR-képalkotás (SPRi) kapcsán ismertetett nagy számú párhuzamos mérés lehetősége azonban csak a chipalapú LSPR-konfigurációkkal valósítható meg, ezért a továbbiakban ezekre összpontosítunk.

Az LSPR/LSPRi megkülönböztetést az SPR/SPRi elnevezésekkel analóg módon használom. Az egy pontban mérő LSPR-rel szemben LSPR-képalkotás (LSPRi) esetén egy nagy felületet (pár cm^2 tartomány) mérünk párhuzamosan egy kamera segítségével. A vizsgált területen belül biztosítani kell, hogy a szenzor tulajdonságai minden mérési pontban azonosak legyenek, ezt csak nanorészecske-elrendezések, és a részecskék alakja, mérete és elhelyezése fölötti nagyfokú kontrollal érhetjük el. LSPRi-berendezéseknél, ahogy a 8. ábra a) részén látható, az SPRi-berendezésekhez hasonlóan a szélessávú (pl. halogén) fényforrást és spektrométert egy monokromatikus fényforrásra (pl. adott hullámhosszúságú lézer) és CCD- [64] vagy CMOS-kamerára [65] cseréljük. A defókuszált nyalábbal levilágított területen a kamera az érzékelési folyamatokból adódó plazmonrezonancia csúcs hullámhossz-eltolódását intenzitás-változásra fordítja. A kamera élőképen kijelölt területeken az intenzitás-változás valósi idejű kinetika formájában követhető nyomon. A mérési területek párhuzamosítása így hardveres multiplexálás nélkül, tisztán szoftveres képfeldolgozással valósul meg, a laterális és időbeli felbontást is a CCD-kamera tulajdonságai szabják meg (pl. $8 \mu\text{m}^2$ és 200 ms [64]). Fontos hangsúlyozni a különbséget a valódi LSPRi-képalkotás és a multiplexált LSPR között, ahol vagy fókuszált nyalábbal és fotodetektorral (a klasszikus SPR mintájára) vagy spektrométerrel, időben elválasztva, különböző területeken mérve oldják meg az eltérő mérési pontok (csatornák) kiértékelését [20], [66].

A 8. ábra a) részén illusztrált transzmissziós elrendezés mellett, használhatunk a chipalapú LSPRi kiértékeléséhez ferdeszögű beesést (8. ábra b), illetve reflexiós mérési elrendezést is (c). Bár ezeknél az irodalmi példáknál spektrométerrel értékelik ki a hullámhossz-eltolódását, ez LSPRi-hez CCD-kamerára cserélhető.

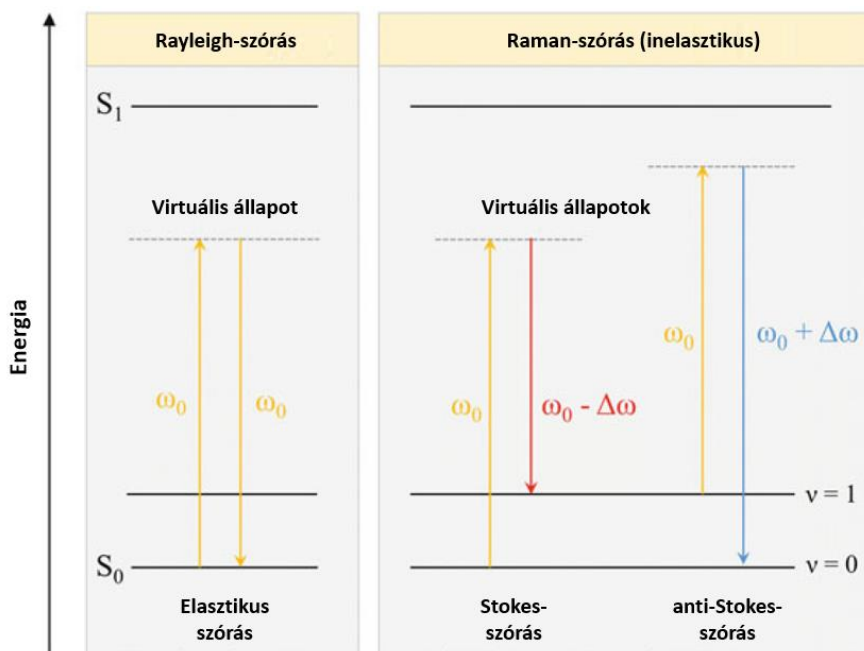


8. ábra. a) Egy tipikus transzmissziós elvű LSPRi mérési elrendezés illusztrációja, monokromatikus fényforrással és CCD-kamerával [T9]. b) Transzmissziós elvű LSPR-elrendezés ferdeszögű beeséssel és spektrométerrel [67]. c) Reflexiós elvű LSPR-elrendezés spektrométerrel [68]. d) Hiperspektrális LSPRi-elrendezés, szélessávú fényforrással, folyadékkristályos hangolható sáváteresztő szűrővel (LCTF, liquid crystal tunable filter) és CCD-kamerával [69].

Külön említést érdemel 8. ábra d) részén illusztrált LSPR-alapú hiperspektrális képalkotás (hyperspectral imaging). Ebben az esetben a CCD-kamera a mért terület minden pontjában egy intenzitás spektrumot rögzít (videó formájában). Ez megtehető egy hangolható keskenysávú fényforrás használatával, vagy a 8. ábrán illusztrált módon szélessávú fényforrás és hangolható sáváteresztő szűrő segítségével (LCTF, liquid crystal tunable filter) [70]. Az eljárás előnye, hogy a plazmoncsúcs pozíciója meghatározható, így rugalmasabban illeszthető adott alkalmazásokhoz szemben a monokromatikus fényforrást használó sima LSPRi-vel, ahol a fényforrás hullámhosszát a rezonancia görbe inflexiós pontjára kell tervezni a minél nagyobb érzékenység elérése érdekében. Hátránya, hogy a hardveres komponensek jelentősen drágábbak (pl. LCTF) és a képfeldolgozás is bonyolultabb. Megemlítendő, hogy a disszertáció beadásának időpontjában a jénai Leibniz Intézet Bionanofotonika Csoportjával (Leibniz-IPHT), illetve magyar és német cégekkel közösen pályázunk egy hordozható LSPRi-alapú hiperspektrális képalkotó berendezés fejlesztésére (német-magyar EUREKA).

2.1.6. A felületerősített Raman-spektroszkópia

A nemesfém nanorészecskék intenzív plazmonterét sikerrel kiaknázó analitikai eljárások közül kiemelkedik a felületerősített Raman-szórás (SERS) és ráépülő ultraérzékeny vibrációs spektroszkópia eljárás [71]. A Raman-szórás elmélyült fizikai leírására a jelen műben terjedelmi korlátok miatt nincs lehetőség, a részletes elméleti háttér angol [72] és magyar nyelvű [73] irodalmakban is megtalálható.



9. ábra. A Rayleigh- és Raman-szórás illusztrációja energiadiagramon. Az S_0, S_1 energiaszintek elektronállapotokat (sávokat) jelölnek, molekulák esetén a $\nu = 0, 1, \dots$ vibrációs alszinteket jelölnek [8].

A Raman-folyamat lényegét a 9. ábra energiadiagramja szemlélteti. A fényszórás klasszikus elektrodinamikai magyarázata szerint a gerjesztő fény időben oszcilláló elektromos tere polarizálja a gerjesztett anyagban a szórócentrumnak tekintett atomokat, illetve molekulákat, a kialakuló dipólusok pedig önmaguk is elektromágneses sugárzást emittálnak [72]. Rugalmas szóródás esetén a szórt foton frekvenciája megegyezik a gerjesztésével, ez a Rayleigh-folyamat ($\omega_s = \omega_0$). Az először 1928-ban Chandrashekhara Venkata Raman indiai tudós által leírt jelenség alapján a monokromatikus fény egy közegben történő Rayleigh-szórása során a szórt fény spektrumában megfigyelhetünk $\omega_0 + \Delta\omega$, illetve $\omega_0 - \Delta\omega$ frekvenciájú csúcsokat is. A megjelenő rugalmatlanul szórt intenzitás csúcsok egyik jellemzője, hogy a gerjesztéshez képest mérhető frekvenciaeltolódás mértéke ($\pm\Delta\omega$) független a gerjesztés frekvenciájától (ω_0), és karakterisztikus a minta szórócentrumaira. A $\pm\Delta\omega$ frekvenciaeltolódásnak megfelelő energiavesztés molekula esetén általában forgási vagy rezgési átmenetre jellemző, míg kristályok esetén általában a fononok vesznek részt a Raman-

szórásban. A karakterisztikus Raman-csúcsok beazonosítása a mintában lehetővé teszi a vizsgált anyag molekuláinak beazonosítását.

A felületerősített Raman-szórás segítségével fémes nanorészecskék vagy nanoszerkezetek plazmonterében a Raman-szórás (alapvetően nem túl jó) hatás keresztmetszete sok nagyságrenddel növelhető. A szakirodalom a jelenség magyarázatára két hatásmechanizmust is megkülönböztet [74]. A kémiai erősítési modell alapján a vizsgált molekulák és a fém nanorészecskék között kialakuló új kémiai kötések, a hozzájuk tartozó új energiaállapotok és töltésátadási folyamatok állnak az erősítés háttérében. A kémiai erősítés mértékét a szakirodalom a 10^3 nagyságrendbe helyezi [75]. A számunkra érdekesebb elektromágneses erősítési modell közvetlenül a nanorészecskék plazmonterével magyarázza a Raman-szórás hatás keresztmetszet-növekedését. A (13) egyenlet alapján, az elérhető SERS-erősítési tényező ($SERS EF_E$) akár a 10^{10} – 10^{11} nagyságrendbe is eshet [76] és mértéke az elektromágneses térerősség negyedik hatványával arányos [77].

$$SERS EF_E(\omega) = \frac{E(\omega, r, \theta)^4}{E_0(\omega, r, \theta)^4} \quad 13$$

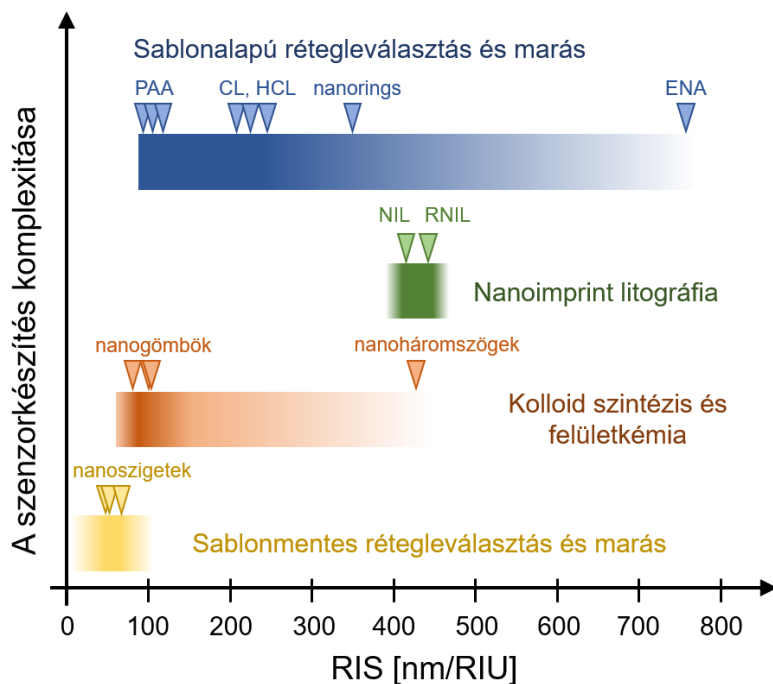
A (13) egyenletben ω a gerjesztő és a Raman-szórt sugárzás körfrekvenciája, E_0 a nanorészecskére beeső (referencia) térerősség, E a nanorészecske plazmonterében kialakult térerősség, r, θ pedig a polárkoordináták, mivel a lokális térerősség pozíció függő a nanorészecskék közelében. Ekkora Raman-szórás hatás keresztmetszet növekedés akár egyedi molekulák detektálását is lehetővé teszi [78]. Az elektromágneses erősítési modellben két folyamat is hozzájárulhat a hatás keresztmetszet növeléséhez. A nanorészecskék plazmontere erősítheti a beeső, molekulákat gerjesztő elektromágneses teret, illetve a molekulák által emittált Raman-szórt fotonokat is [74]. A minél jobb Raman-intenzitás eléréséhez így a nanorészecskék közötti térerősség, illetve az így kialakuló úgynevezett „hot-spotok” sűrűségének maximalizálása mellett alkalmazástól függően szükséges a SERS-felületek plazmonrezonanciájának hangolása is, a detektálni kívánt célmolekulák tulajdonságaival és a gerjesztő fényforrás frekvenciájával összhangban. Ez az előállítási nanotechnológiák optimalizálását teszi szükségessé, amire a közelmúltban a területen zajló fejlesztések fókuszában volt. Erről jó áttekintést nyújtanak az alábbi összefoglaló cikkek [77], [79], [80].

Mivel a (13) egyenlet alapján a $SERS EF$ közvetlen kapcsolatban van a nanorészecskék plazmonterének erősségével így egy jó indikátor az előállítási technológiák optimalizálásához. (Megjegyzendő, hogy a SERS-felületek analitikai tulajdonságainak számszerűsítésére számos más erősítési tényezőt is definiál a szakirodalom, lásd [81]). Bár kutatómunkám elsődleges célja plazmonikus, LSPR-alapú bioérzékelők fejlesztése, ezen előnyök miatt az 4.5. alfejezetben vizsgálom a saját fejlesztések során előállított plazmonikus szenzorelemek tulajdonságait a SERS-erősítési tényezőjükön keresztül is.

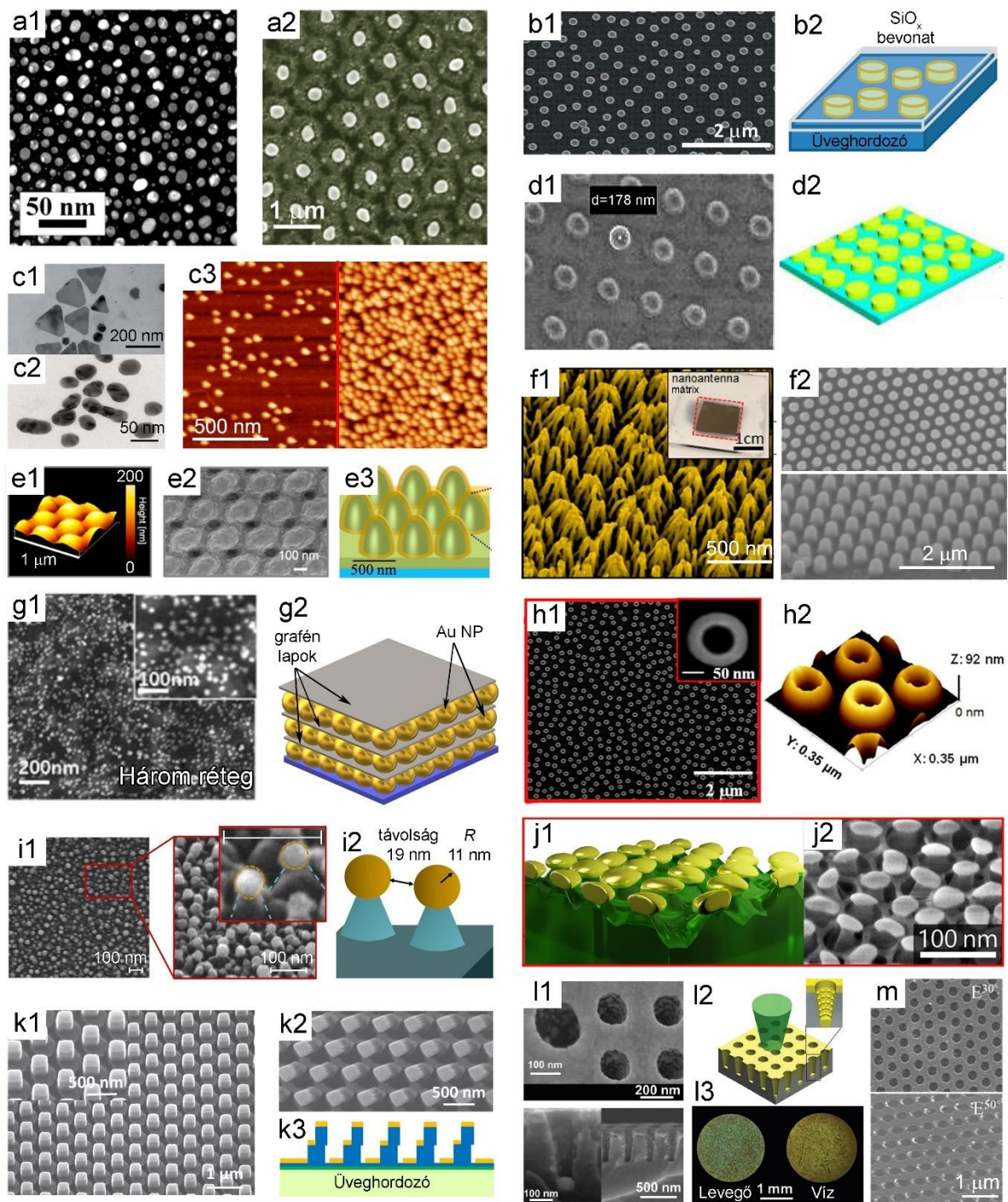
2.2. Nanotechnológiák elemző összevetése

A fejezet célja az LSPRi-szenzorok előállítására alkalmas nanotechnológiák bemutatása és egymással való összevetése. Egy ideális technológiának erre a célra sok követelményt kellene teljesíteni, úgymint: a nanorészecskék alakjának, méretének és egymástól vett távolságának (elrendezésének) szabályozása egy nagy szenzorfelületen (több cm^2), úgy, hogy a részecskék jól tapadjanak a hordozóhoz; mindezt egy felskálázható és lehetőleg minél olcsóbb technológiával. Mivel ezen követelmények egyszerre történő kielégítése a gyakorlatban nem könnyű (bizonyos technológiák esetén azok részben ellent is mondhatnak egymásnak), ezért egy adott alkalmazáshoz az optimális LSPRi-szenzorelem előállítási technológia kompromisszumokat igényel, és a döntésünknek figyelembe kell vennie az egyes technológiák előnyeit és hátrányait.

Mivel a korszerű nanotechnológiák elmélyült ismerete szükséges volt a saját (együttműködés keretein belül végrehajtott) fejlesztéseink irányának kijelöléséhez, a szakirodalomban fellelhető technológiákat részletes vizsgálatnak vettem alá. A témában 2020-ban írtam egy egyszerűsített áttekintő (review) cikket, amely az ACS Applied Nano Materials újságban jelent meg. A fejezetben leírtak erre a cikkre épülnek, ami az itt bemutatottnál részletesebb elemzéseket is tartalmaz [T9]. Az 10. ábra összefoglalja az áttekintett technológiacsaládok komplexitását az elérhető törésmutatóra vonatkoztatott érzékenységek függvényében (RIS), a 11. ábra pedig konkrét példákkal illusztrálja az előállított LSPR-szenzorelemeket. A következő alfejezetekben az egyes technológiacsaládok főbb lehetőségeit ismertetem röviden.



10. ábra. Az áttekintett, LSPRi-vel kompatibilis szenzorelemek előállítására alkalmas nanotechnológiák komplexitásának összehasonlítása az elérhető tömbi törésmutatóra vonatkoztatott érzékenységük (RIS) függvényében [T9].



11. ábra. Különböző nanotechnológiákkal előállított, LSPRi-vel kompatibilis szenzorfelületek összehasonlítása. **a1)** TEM-képek ultravékony (2.5 nm) arany nanoszigetekről [82]. **a2)** Rendezett arany nanoszigetek üveghordozón [83]. **b1)** Rendezetlen arany nanokorongok üveghordozón [69], opcionális SiO_x borítással (**b2**) [84]. **c1)** TEM-képek folyadékfázisú szintézissel előállított nanoháromszögekről [85] és nanogömbökről (**c2**) [86]. **c3)** AFM-képek üveghordozóra kikötött, folyadékfázisú szintézissel előállított arany nanorészecskékről, a felületi sűrűségük befolyásolásának illusztrálására [87]. **d1–d2)** Rendezett arany nanokorongok üveghordozón [88]. **e1–e3)** AFM-kép, SEM-kép és 3D-reprezentáció polimer hordozón kialakított rendezett arany nanokúp-rendszerrel [68]. **f1)** SEM-képek vertikálisan

rendezett arany nanoantenna-kötegekről [67]. **f2)** SEM-képek 2D-mátrixba rendezett arany nanokúpokról [89]. **g1–g2)** Egy többrétegű grafén–arany nanorészecske-alapú kompozit struktúra SEM-képe és 3D-illusztrációja [90]. **h1–h2)** SEM-, ill. AFM-képek rendezett arany nanogyűrűkről, üveghordozón [91]. **i1–i2)** SEM-kép, ill. 3D-illusztráció rendezett arany nanogomba-rendszerekről. A nanorészecskék SiO₂ nanooszlopok tetején vannak kialakítva [92]. **j1–j2)** SEM-kép és 3D-illusztráció epoxi felületen kialakított rendezett arany nanogomba-rendszerekről (saját munka) [T10]. **k1–k3)** SEM-képek és illusztráció egy SU-8 oszlopokon kialakított rendezett, többrétegű nanoszerkezetről [93]. **l1–l2)** SEM-képek és 3D-illusztráció rendezett nanoméretű Lükurgosz-kehely-rendszerekről (ezüst nanorészecskék nanoméretű kelyhekben, LCA) [94]. **l3)** Optikai mikroszkópos képek LCA-rendszerekről levegőn és vízben [94]. **m)** SEM-képek elliptikus nanolyuk-rendszerekről (ENA) [95]. Az ábra forrása: [T9].

2.2.1. Folyadékfázisú szintézis és felületkémia

A homogén folyadékfázisú (kolloid) szintézis egyik legnagyobb előnye, hogy segítségével precízen szabályozható a létrehozott nanorészecskék alakja és mérete, széles tartományon belül [96]. Segítségével változatos alakú arany [97] és ezüst [98] nanorészecskéket állíthatunk elő plazmonikus alkalmazásokhoz (pl. 11. ábra c1-c2). A kolloid formában szintetizált nanorészecskék hordozóhoz rögzítéséhez utólagos felületkémiai alkalmazhatunk, leggyakrabban szilánózást (üveghordozókhoz) [99], [100] vagy tiol kémiát (arany felületek esetén) [101]. Az eljárás legnagyobb hátránya a felületre kikötött nanorészecskék felületi sűrűségének limitált kontrollálhatósága. A nanorészecskék közötti csatolt plazmonrezonancia kihasználása fontos lenne az LSPRi-rendszer érzékenységének növeléséhez, azonban az említett felületkémiai módszerekkel a részecskék távolsága nehezen szabályozható, és kis távolságok esetén nagy az aggregáció veszélye is (lásd pl. 11. ábra c3) [87]. Komplexebb alakú nanorészecskék használatával (pl. anizotrop alak, élek, csúcsok alkalmazása) az egyedi nanorészecskék érzékenysége is jelentősen javítható, a legkevésbé érzékeny arany nanogömbökhöz (80–110 nm/RIU [102]) képest, pl. a 11. ábra c1 részén látható nanoháromszögekkel (kb. 470 nm/RIU [85]). A kolloidként szintetizált különböző alakú arany nanorészecskék érzékenységéről jó áttekintést kaphatunk a [35] forrásból.

2.2.2. Heterogén kémiai szintézis

Kolloidszintézis mellett nanorészecskék heterogén szintézisére – vagyis folyadékfázisban, közvetlenül a szilárd hordozó felületére történő leválasztására – is lehetőségünk van fémsó oldatok (pl. hidrogén-tetrakloro-aurát, HAuCl₄ vizes oldata aranyhoz, vagy ezüst nitrát, AgNO₃ vizes oldata ezüsthöz) alkalmazásával. Az eljárás során a leggyakrabban polimer felületek megfelelő funkciós csoportjai közvetlenül redukálják ki az oldott fém kationokat, létrehozva így a felülethez kötött nanorészecskéket [103]. Az így létrejövő polimer–Au/Ag NP felületi nanokompozitokat korábban sikerrel használták plazmonikus bioérzékelőként [104], de a 11. ábra g1-g2 részén láthatunk egy példát grafén–

AuNP nanokompozittra is [90]. A technológia hátránya, hogy nincs kontrollunk a felületen szintetizált nanorészecskék precíz elhelyezése fölött, bár a részecskék sűrűsége a felületi funkciós csoportok sűrűségével valamelyest szabályozható.

2.2.3. Sablonmentes rétegleválasztás és hőkezelés

Arany, illetve ezüst vékonyrétegek vákuumtechnikákkal (pl. vákuumpárologtatás, vákuumporlasztás) történő leválasztása üveg vagy szilícium hordozóra, majd a réteg utólagos hőkezelése egy egyszerű eljárás nanorészecske-rendszerek nagy hordozófelületen történő előállítására. Fontos kiemelni, hogy a hőkezelés egy szilárdfázisú eljárás (solid-state dewetting), ami jóval a leválasztott fémrétegek olvadáspontja alatt történik (350–600°C) [105]. A folyamat feltétele a fém rossz tapadása a hordozóhoz (ami pl. arany és üveg esetén köztudott), a hajtóerő a fématomok felületi diffúziója, ami következtében jellegzetes, lapos nanoszigeteknek nevezett alakzatok jönnek létre (11. ábra, a1) [82]. Bár a technológiai paraméterekkel (kiindulási rétegvastagság, hőkezelés hőmérséklete és ideje) lehetőség van befolyásolni a kialakuló nanosziget-rendszerek geometriai tulajdonságait (átlagos méret és részecskék közötti távolság) [106], és így szabályozni a plazmonikus tulajdonságokat [T13], a limitált kontroll és gyenge részecskék közötti csatolás miatt a nanosziget-rendszerek érzékenysége jellemzően alacsony (lásd az 10. ábrán). A technológia további hátránya a nanoszigetek rossz tapadása a hordozóhoz, ami áramló folyadéknak kitéve (bioérzékelős alkalmazásoknál), a nanoszigetek lemosását vagy összetapadását okozhatja [107]. Utóbbi probléma megoldására használhatunk egy CVD-vel leválasztott vékony üveg védőbevonatot, (pl. 7 nm SiO_x, lásd 11. ábra b2) [84], illetve magasabb hőmérsékletű hőkezelést, amely során a nanoszigetek részlegesen az üveghordozóba süllyednek, és így stabilizálódnak [108]. Megjegyzendő, hogy mindkét megoldással rontunk az amúgy sem túl jó érzékenységünkön. Egy érdekes lehetőség a nanoszigetek előállítási technológiájának kombinálása reaktív ionmarással (RIE). A 11. ábra i1-i2 részén illusztrált esetben az arany nanoszigetek maszkoltak az üveghordozó marásához, létrehozva így a nanogombára emlékeztető alakzatokat [92].

2.2.4. Sablonalapú rétegleválasztás és hőkezelés

Az előző alfejezetben részletezett technológiát kiterjeszthetjük sablonok alkalmazásával, ami megoldást jelenthet a szintetizált nanorészecskék alakjának és elrendezésének szabályozására. Erre a célra leggyakrabban használt sablonok kolloidlitográfiával (colloidal lithography, CL) [109], vagy lyuk-maszk kolloidlitográfiával (hole-mask colloidal lithography, HCL) [69] készülnek. Például a hordozó felületén önszerveződő polisztirol (PS) monorétegek [110] áldozati réteggént történő alkalmazásával létrehozhatunk rendezett nanoszigeteket (lásd 11. ábra a2) [83], nanokorongokat [111], elliptikus nanolyukakat [95], nanogyűrűket (lásd 11. ábra h1-h2) [91], vagy nanocsokornyakkendő (bow-tie) [112] struktúrákat is. Bár a technológiával nagy felületeken egyenletesen szabályozható a nanorészecskék alakja és elrendezése, a sablon áldozati jellege

miatt a részecskék felületi kitöltöttsége (vagy a részecskék közötti távolság/récskeméret arány) limitált lesz, ami megmagyarázza a jellemzően közepszerű érzékenységet.

Egy másik lehetséges sablon a nanorészecskék kontrollált felületi szintéziséhez a pórusos alumínium-oxid (porous anodic alumina, PAA) [67]. Polírozott alumínium felületből kiindulva, az elektrolit, valamint az anódos oxidáció elektrokémiai paramétereinek megválasztásával [113] kontrollálható a kialakuló hexagonális elrendezésű pórusos alumínium-oxid pórusmérete [114], ami így nanotálak (nanobowl) [T10] vagy nanocsövek (nanotube) [67] formájában is alkalmazható sablonként nanoszerkezetek létrehozásához. A hexagonális nanotál elrendezés előnye, hogy a vékonyréteg-leválasztás és utólagos hőkezelés során, a technológiai paraméterekkel beállítható a létrejövő arany nanorészecskék elrendezése, mérete és a részecskék közötti távolság is [115], ami így lehetővé teszi a csatolt plazmonrezgések érzékenységnövelő hatásának maximalizálását. Az ezzel a technológiával általunk egy nemzetközi együttműködésben készült struktúra (polimer felületére történő átültetése után) látható a 11. ábra j1-j2 részén [T10]. A technológia részletesen bemutatásra kerül a 4. fejezetben. A hexagonális PAA-nanocsövek egyik elterjedt alkalmazása utólagos elektrokémiai feltöltésük nemesfémekkel, így nanocsöveket, nanovezetékeket létrehozva [116]. A 11. ábra f1 része egy ily módon létrehozott nanoantenna-alapú szenzort szemléltet [67]. Megjegyzendő, hogy a PAA-felületre közvetlenül leválasztott (és nem hőkezelt) fém vékonyrétegből is hoztak már létre működő LSPR-érzékelőt [117].

A 11. ábra 11-13 része egy hasonló, bár jelentősen komplikáltabb technológiával készült szenzort szemléltet. Az úgynevezett nano-Lükurgosz-kelyhek (nano-Lycurgus cup arrays, LCA) sablonja két lépésben készült, egy üveghordozón lézerinterferencia litográfiával kialakított nanokúp elrendezés PET- hordozóra (polietilén-tereftalát) történő átmásolásával (lenyomatképzéssel) [118]. Az ezüst nanorészecskékkel feltöltött LCA-k érzékenysége bár rekord jó (8066 nm/RIU), ahogy 11. ábra 13 részén is látható, a felület inhomogenitása (repedések, foltok) túl nagy LSPR-alkalmazásokhoz [94].

2.2.5. Direktírasos litográfiák

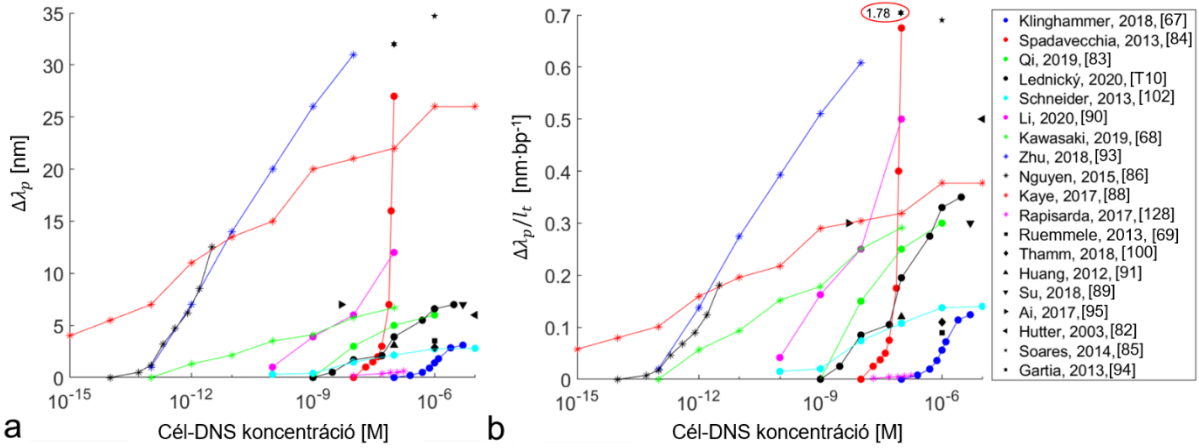
Az elektronsugaras (EBL) [119] és ionsugaras (FIB) [120] direktírasos litográfiák nagy előnye, hogy kb. 10 nm-es pontossággal képesek szabályozni a létrehozott nanoalakzatok méretét és pozícióját. Hátrányuk, hogy nagy felületek (cm²) írása rendkívül költséges és időigényes ezekkel az eljárásokkal, ezért közvetlenül nem szokták LSPRi-szenzorelem gyártásra használni őket. A 11. ábra d) részén bemutatott nanokorong-elrendezés teljes területe is mindössze kb. 30 μm² [88]. EBL- vagy FIB-eljárással készült kemény formákat (maszkokat) használhatunk kiindulásként, illetve sablonként is további technológiákhoz, mint pl. a következő részben ismertetett nanoimprint-litográfiához. Így bár az eredeti kemény forma gyártási költsége továbbra is magas, a segítségükkel (a kemény forma ismételt felhasználásával) gyártott polimer másolatokra, mint szenzorelemekre vetítve a gyártási költségek csökkenthetők.

2.2.6. Nanoimprint-litográfia (NIL)

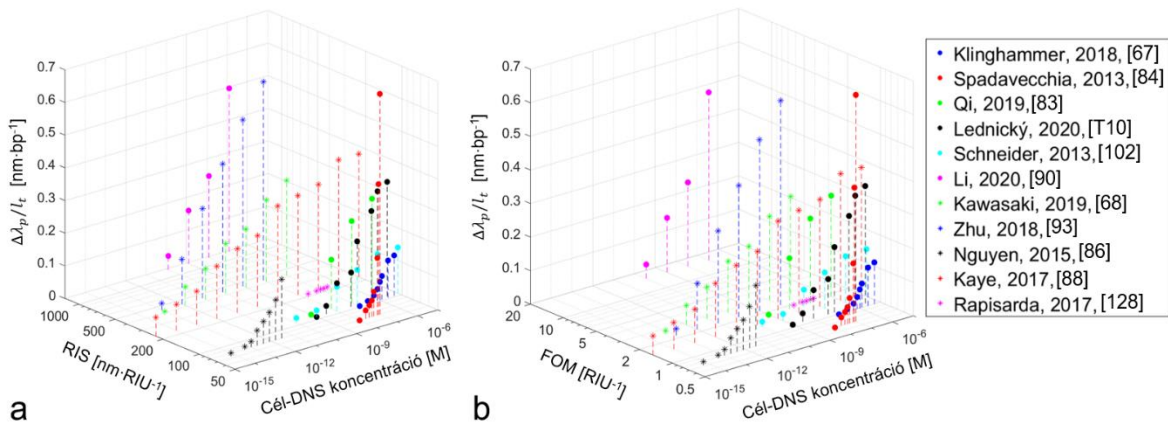
A NIL egy technológiacsalád, tagjainak közös vonása, hogy egy keményebb forma (sablon) felhasználásával hozunk létre nanostrukturált mintázatot egy puhább anyagban, jellemzően polimer gyantában, amit utólag kikeményítünk [121]. Több NIL-típust is megkülönböztetünk aszerint, hogy milyen egyéb eljárásokkal kombináljuk a nanoimprintet, például lift-off [122], sablonvetköztetés (template stripping) [123], kopolimer-litográfia [124], vagy a fordított (reversal) nanoimprint-litográfia (RNIL) [125]. A nanoimprint-litográfia költségét jelentősen befolyásolja a kemény sablon előállítási technológiája. A gyártók a kemény (szilícium-, zafír-, vagy üvegalapú) sablon mellett már polimeralapú replikákat is forgalmaznak (például lásd „standard molds” és „molded samples”, [126]), amelyek szintén használhatók a NIL kiindulásaként. A 11. ábra e) részén látható nanokúp-rendszer egy COP-alapú (cikloolefin polimer), molyszem (moth-eye) struktúrát tartalmazó sablon segítségével készült [68]; a 11. ábra k) részén látható kompozit struktúrához pedig SU-8 fotorezisztet és egy köztes polimer maszkot használtak RNIL-lel [93].

2.3. Az LSPRi-szenzorelemek minősítése

Ahogy a 2.1.4 alfejezetben tárgyaltuk az LSPR-szenzorelemek jóságát általánosan a tömbi törésmutató-érzékenységgel (RIS , (11) egyenlet), és az ebből számolt FOM értékkel, ($FOM = RIS/FWHM$) szokás minősíteni. Az egy adott célmolekulára vonatkoztatott analitikai teljesítőképesség két legfontosabb mérőszáma a detektálási küszöb (legkisebb kimutatható célmolekula-koncentráció, LOD), és a dinamikus tartomány (az LOD és a szenzorjel telítődése között átfogott koncentráció-tartomány, DR). Ezek a mérőszámok affinitástípusú bioérzékelők esetén rendkívül nagymértékben függenek a célmolekulák típusától, méretétől, valamint a szelektív megkötésükre hivatott, nanorészecskék felületére rögzített receptorréteg hatékonyságától is. Ez a változatosság rendkívül megnehezíti a különböző nanotechnológiákkal előállított LSPR-szenzorelemek jóságának objektív megítélését. Ezért a 2020-as áttekintő cikkemben az LSPR-szenzorok fizikai érzékenységének és analitikai teljesítőképességének számszerű összevetésére csak nukleotidérzékelőkkel publikált adatokat használtam [T9]. A DNS/RNS-molekulák előnye, hogy kis méretük miatt (kb. 0.33 nm bázisonként) az elterjedten használt receptor-célmolekula hosszúságok mellett (jellemzően 30 bázispár alatt), a molekulák nem nyúlnak túl a nanorészecskék plazmonterén (10–30 nm), szemben a nagyobb antigénekkal, így jó összehasonlítási alapot adnak. A 12. és 13. ábrákon a detektált cél-DNS-molekulák koncentrációjának függvényében ábrázoltam az adott koncentráció esetén mért LSPR-rezonanciacsúcs eltolódását ($\Delta\lambda_p$), valamint a célmolekulák bázisszámára (l_t) vetített eltolódását ($\Delta\lambda_p/l_t$). A 12. ábrán az összes 11. ábrán ismertetett nanostruktúra válaszát ábrázoltam, a 13. ábrán a jobb áttekinthetőség érdekében a RIS és FOM függvényében csak azokat a megoldásokat tüntettem fel, ahol a teljes dinamikus tartomány meg volt adva, nem csak egy mérési pont.



12. ábra. A különböző technológiákkal előállított LSPRi-szenzorelemek teljesítőképességének összevetése. **a)** A mért szenzorválasz (plazmonrezonancia-csúcseltolódás, $\Delta\lambda_p$) a cél-DNS-molekula koncentrációjának függvényében. **b)** A cél-DNS bázisszámra vetített csúcseltolódás a célmolekula-koncentráció függvényében ($\Delta\lambda_p/l_t$). A b) ábrán Gartia, 2013-as adatpontja jelentősen kilóg a skáláról, ezt egy piros ellipszis jelzi. [T9]



13. ábra. A cél-DNS-bázisszámra vetített csúcseltolódás ($\Delta\lambda_p/l_t$) a cél-DNS-koncentráció, valamint a *RIS* (**a**) és *FOM* (**b**) függvényében. Az ábrán csak azok a szenzorok szerepelnek, ahol a teljes dinamikus méréstartomány (DR) meg volt adva a cikkben. [T9]

A szenzorok válaszában cél-DNS-molekula hosszúságra történő normálásával ($\Delta\lambda_p/l_t$) kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy mivel a nanorészecskék plazmonterem nem egyenletes, hanem a részecske felületétől számítva meredeken lecseng (lásd (10) egyenlet), így a cél-DNS-molekulák hosszúságának növelésével tapasztalt járulékos jelnövekmény nem lesz arányos és hosszabb cél-DNS-molekulára ($\Delta\lambda_p/l_t$) kisebb lehet [102]. LSPR-szenzorok válaszjelének számításához ($\Delta\lambda_p$) felületre leválasztott rétegek esetén két megközelítést használnak elterjedten az irodalomban. A (14) egyenlet a korábban ismertetett exponenciális térerősség-lecsengést veszi alapul, ahol n_t a nanorészecskék felületére leválasztott, t vastagságú réteg törésmutatója, n_r a mérési referencia közeg (pl. puffer, levegő) törésmutatója [127]. Különböző nanorészecske-elrendezések esetén a modellt a kísérleti adatokhoz általában a ξ_D behatolás mélység ((10) egyenlet) hangolásával illesztik [88], [128], [129].

$$\Delta\lambda_p = RIS(n_l - n_r)(1 - e^{-\frac{2t}{\xi_D}}) \quad 14$$

A másik elterjedt megközelítés alapján a nanorészecskék plazmonterének lecsengését hatványfüggvénnyel közelítik, amiből a jelválaszra a (15) egyenlet adódik [130].

$$\Delta\lambda_p = RIS(n_l - n_r) \left(1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{t}{r_0}\right)^3} \right) \quad 15$$

A két modell alkalmazása az LSPR-szenzorelemek válaszáának és jóságának megbecslésére fenntartásokkal kezelendő az alábbi okok miatt. 1) Látszik, hogy a plazmonter lecsengésének jellege és behatolási mélység is struktúrától függő, önkényesen megválasztható paraméterek. 2) A modellek nem veszik figyelembe a részecskék közötti esetleges csatolás hatását. 3) A nanorészecskék felületére kötött DNS-molekulák sűrűsége több mint egy nagyságrendnyi eltérést mutathat az alkalmazott immobilizációs, ill. hibridizációs eljárások függvényében (pl. a pufferek ionerőssége által szabályozva a DNS-molekulák felületi sűrűsége $1 \times 10^{12} - 3 \times 10^{13}$ molekula/cm² között változhat [131], [132]). A DNS-molekulák orientációját, és így a réteg effektív vastagságát a DNS-molekulák hossza és felületi sűrűsége együttesen, egymással összefüggésben határozzák meg [133].

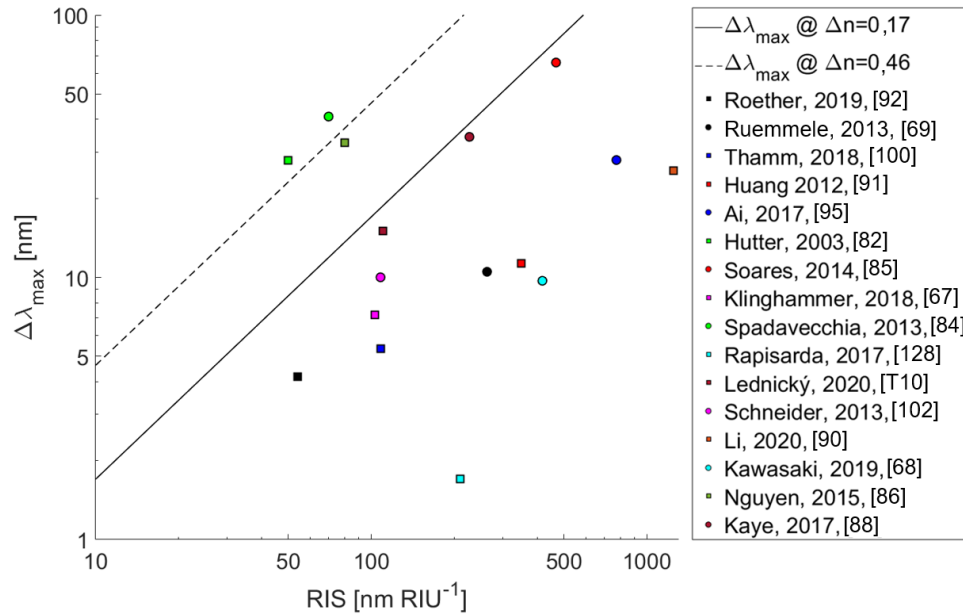
Az elmondottak alapján kevésbé meglepő, hogy nem rajzolódik ki erős korreláció a 13. ábra fizikai paramétereit (*RIS*, *FOM*) és a szenzorok analitikai teljesítménye (*LOD*, *DR*) között. Az ellentmondásokra példa, hogy az egyik legjobb *LOD*-t mutató szenzor (50 fM, Nguyen, 2015 [86]) rendelkezett az egyik legrosszabb fizikai érzékenységgel (80 nm/RIU), míg az egyik legjobb érzékenyséű szenzor (1251 nm/RIU, Li, 2020 [90]) 100 pM-os detektálási küszöbe összemérhető nála nagyságrenddel rosszabb érzékenyséű megoldásokkal. A dinamikus tartományban is drasztikus különbségeket láthatunk a kevesebb mint egy nagyságrend átfogástól [84] a rendkívüli, közel tíz nagyságrend átfogásig [88].

Objektívebb összehasonlítási alapot kapunk, amennyiben a szenzorok maximális jelválasztát vetjük össze a törésmutató-érzékenyséjükkel. A (16) egyenlet alapján ilyenkor azt feltételezzük, hogy a nanorészecske plazmonterét 100%-ban kitölti a felületére leválasztott, maximális sűrűségű DNS-réteg. Nukleotidérzékelők esetén ilyenkor n_l értékébe bele kell számítani a receptor-DNS-, cél-DNS-molekulák, valamint az esetleges felületkezelések (pl. MCH-blokkoló) hatását is.

$$\Delta\lambda_{max} \cong RIS(n_l - n_r) \quad 16$$

Az irodalomban a sűrű, pufferben mért DNS-rétegek törésmutatóját 1,5-el szokták közelíteni [88], [102], [134], ami az alkalmazott pufferoldatok (1,33–1,34) és a DNS-molekulák törésmutatója között van (1,75 [135]). Egyes publikációkban a mérések referencia közege levegő, itt 1,462-vel közelítik a DNS-réteg törésmutatóját [85], [136], [137]. A többi receptorréteg építéshez használt kismolekula törésmutatója is 1,4–1,5 között változik [136] (pl.

MCH-ra 1,45 [138]). A (16)-os egyenlet így kijelöli a szenzorok jelválaszának elvi maximumát. Mivel bizonyos szenzorok levegőt, más szenzorok puffert használtak referencia közegként, a 14. ábrán mindkét közegre bejelöltem a határokat ($\Delta n = 1,462 - 1 = 0,432$; $\Delta n = 1,5 - 1,33 = 0,17$ levegőre és pufferre).



14. ábra. Az összehasonlított LSPRi-szenzorelemek maximális jelválasza (abszorpciós csúcsetolódás, $\Delta\lambda_{max}$) a szenzor fizikai érzékenységének függvényében (RIS). A maximális jelválasz alatt a tiszta (referencia) felülethez képest mérhető, receptor-DNS, esetleges felületkezelések és cél-DNS-molekulák *együttes* hatását értjük. A két vonal a levegő, illetve pufferben használt szenzorok esetén mérhető elméleti maximum. A négyzet jelölők esetén pufferben, a kör jelölők esetén levegő referenciával használták a szenzorokat. [T9]

A 14. ábrán a különböző technológiákkal előállított LSPR-alapú nukleotidérzékelők RIS és $\Delta\lambda_{max}$ értékei alapvetően gyengén korrelálnak egymással (a korrelációs együttható a teljes adathalmazra 0,22). Ez csak részben írható a kiugró adatpontok rovására, eleve jelentős eltérések vannak az azonos RIS -sel rendelkező szenzorok maximális jelválaszai között. Például a négy, kb. 100 nm/RIU érzékenységű szenzorral 5–15 nm közötti $\Delta\lambda_{max}$ jeleket mértek. Ez a különbség még nagyobb a 200 nm/RIU körüli szenzorok esetén (2–34 nm).

Megfigyelhető továbbá, hogy három publikált szenzor is az elvi $\Delta\lambda_{max}$ érték fölött jelentett jelváltozásokat. Ezek közül egy megoldás felületre kötött, kolloid formában szintetizált nanorészecskéket használt, két megoldás pedig arany nanoszigeteket. Mivel mindkét technológiánál probléma a felülethez gyengén kötött nanorészecskék/nanoszigetek leválása és aggregációja, feltételezhető, hogy az áramló folyadékban a hordozóról levált és összetapadt részecskék miatt mértek hamis jelet ezeknél a szenzoroknál. Ezen a ponton megjegyzendő, hogy több publikált szenzornál kifogásolhatók a mintakezelési eljárások, mint például a felületre felvitt DNS-receptorréteg, vagy a kialakult receptor-célmolekula-komplex öblítése ioncserélt vízzel.

2.4. Összefoglalás – célkitűzések

A szakirodalom segítségével bemutatott példákon keresztül láthattuk, hogy a nanorészecske-alapú lokalizált felületi plazmonrezonancia (LSPR) legnagyobb ígérete a klasszikus, vékonyréteg alapon már elterjedt felületi plazmonrezonanciás képalkotó (SPRi) berendezések integrálása kisméretű, hordozható mérőberendezésekbe. Az egy csepp mintából (pl. vér, nyál, vizelet), egy szenzorelemmel végezhető nagy számú párhuzamos teszt jelentősen lecsökkenthetné a PoC-diagnosztika költségeit. Az integrált LSPRi-berendezés megvalósításához a legnagyobb teher a szenzorelem létrehozását célzó nanotechnológiákon van. A szenzorok alapvető tulajdonságainak (érzékenység, detektálási küszöb) maximalizálása mellett az LSPRi-konceptió speciális igényeket támaszt a szenzorelemekkel szemben, úgy, mint a nagy felületen egyenletes nanorészecske-elrendezés.

Az LSPR-szenzorelem fejlesztése során a szakirodalomban követett elsődleges irány a törésmutató-érzékenység maximalizálása (*RIS*, *FOM*), de láthattuk, hogy ez nem minden esetben eredményez nagyobb molekuláris érzékenységet vagy detektálási küszöböt (*LOD*). Felvetésem szerint a jelenség (és látszólagos ellentmondás) 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 plazmontér tervezésével és a célalkalmazáshoz (a detektálandó célmolekula méretéhez) illesztésével a szenzorelemek hatékonysága jelentősen növelhető lenne.

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 alakjának és méretének 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 (a detektálandó célmolekula típusától és méretétől) 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 SERS-hordozóként.

3. Modellezés és szimuláció

3.1. Plazmonikus rendszerek szimulációs lehetőségei

A plazmonikus rendszerek, pl. nanorészecske-elrendezések optikai szimulációinak egyik általános célja a rendszer optikai hatáskeresztmetszeteinek meghatározása. Amennyiben az elektromágneses gerjesztés hatására plazmonrezonancia alakul ki egy részecskén, úgy az ehhez szükséges energia eltűnik (kioltódik) a gerjesztő nyalábból. A gerjesztett oszcilláló elektronok az energiájukat kétféleképpen adhatják le. Egyrészt foton emittálásával (távoltérbe történő fényszórás), illetve disszipációs folyamatokon keresztül (hőgenerálás ütközéseken keresztül). Ezeknek a jelenségeknek a leírására használhatjuk a kioltási (extinction, $C_{ext}(\omega)$), szórási (scattering, $C_{sca}(\omega)$), illetve abszorpciós (absorption, $C_{abs}(\omega)$) hatáskeresztmetszeteket, amelyek közötti kapcsolatot a (17) egyenlet adja meg.

$$C_{ext}(\omega) = C_{sca}(\omega) + C_{abs}(\omega) \quad 17$$

A hatáskeresztmetszetek felület dimenziójú, hullámhosszfüggő mennyiségek, a spektrumokon megjelenik a nanorészecske-elrendezés karakterisztikus plazmonrezonancia csúcsa. A kioltási hatáskeresztmetszetet a (18) egyenlet alapján definiálhatjuk, ahol egy részecskét (vagy részecskerendszert) egy A felületre helyezünk, amit $P_{be}(\omega)$ teljesítményű bemenő gerjesztéssel világítunk meg. A kimenő teljesítményt ($P_{ki}(\omega)$) a felülettől távol mérjük, hogy a szórt fény ne befolyásolja a mérést. A kioltási hatáskeresztmetszet tehát a gerjesztő nyaláb energiavesztését jellemzi. A (18) egyenletben a saját szimulációkban is alkalmazott síkhullám (s.h.) gerjesztésre esetén $\mathbf{E}(\omega)$ a térerősség η pedig a közeg impedanciája, vagyis $\eta = \sqrt{\mu\mu_0/(\epsilon\epsilon_0)}$.

$$C_{ext}(\omega) = A \frac{P_{ki}(\omega)}{P_{be}(\omega)} \stackrel{s.h.}{\Rightarrow} \frac{P_{ki}(\omega)}{|\mathbf{E}(\omega)|^2/(2\eta(\omega))} \quad 18$$

A következő alfejezetekben pár sorban bemutatom a nanorészecske-elrendezések optikai hatáskeresztmetszeteinek meghatározására alkalmas főbb szimulációs megközelítéseket.

3.1.1. Időtartománybeli véges differenciák módszere (FDTD)

Az FDTD (finite difference time domain) egy kézenfekvő eljárás nanorészecskék optikai válaszána vizsgálatára a Maxwell-egyenletek közvetlen megoldásán keresztül. Ehhez mind a teret (a nanorészecskéket, illetve az őket körülvevő közeget), mind az időtartományt diszkretizáljuk. A vizsgált térrész határán a peremfeltételeket általában elnyelőre állítjuk, hogy eredményeinket ne befolyásolják a reflexiók. Az anyagi tulajdonságokat (a nanorészecskék és a közeg permittivitását) rácspontonként kell definiálni. Az elektromágneses tér időbeli válasza a teljes térrészre közvetlenül számolható. Az FDTD elterjedtnek tekinthető plazmonikus rendszerek modellezése terén, több multifizikai szimulációs szoftver is tartalmazza (pl.

ANSYS család Lumerical programja [139]). Az eljárás hátránya, hogy a térfogati diszkretizáció miatt memória- és számításiigényes [8].

3.1.2. Végeselem-módszer (FEM)

A FEM (finite element method) szintén térfogati diszkretizáláson alapul. A lényeges különbség az FDTD-hez képest, hogy amíg az FDTD időfüggő rendszert használ, addig a FEM klasszikusan időfüggetlen vagy harmonikus problémák megoldására használható. Az eljárás szintén elterjedt plazmonikus rendszerek vizsgálatára, FEM-alapú megoldót tartalmaz pl. a COMSOL Multiphysics RF (rádiófrekvenciás) modulja is [140]. Hátránya, hogy a térfogati diszkretizálás miatt az FDTD-hez hasonlóan nagy a számításiigénye.

3.1.3. Diszkrét dipólus közelítés (DDA)

A DDA (discrete dipole approximation) az egyik legkorábbi módszer egyedi alakzatok elektromágneses szórásai és abszorpciós hatáskeresztmetszetének számításához, a módszer alapjait már 1964-ben lefektették majd 1973-ban alkalmazták [141]. Az eljárás lényege röviden, hogy a vizsgált alakzatot N darab elemi dipólusra osztjuk fel, majd iterációval megoldjuk az $\tilde{\mathbf{A}} \cdot \tilde{\mathbf{P}} = \tilde{\mathbf{E}}_{be}$ mátrixegyenletet, ahol $\tilde{\mathbf{P}}$ az ismeretlen, dipólusok polarizációját jellemző, $3N$ -es komplex vektor, $\tilde{\mathbf{E}}_{be}$ a gerjesztés $3N$ -es komplex vektora, $\tilde{\mathbf{A}}$ pedig egy $3N \times 3N$ -es komplex mátrix. A megoldás menetét és a módszer elméleti háttérét részletesen tárgyalják az alábbi referenciák [142], [143]. Az optikai hatáskeresztmetszetek a $\tilde{\mathbf{P}}$ mátrix ismeretében kiszámolhatóak. A DDA előnye, hogy tetszőleges alakzat vizsgálható vele, és csak a vizsgált részecske térfogatát kell diszkretizálni. Hátránya, hogy a térfogati diszkretizáció miatt számításiigényes, továbbá a vizsgálható méretek is limitáltak: a részecskeméretnek (a) és permittivitásnak (ϵ) teljesítenie kell az $\frac{|a\sqrt{\epsilon}|}{\lambda} < 5$ relációt. A DDA-t több ingyenesen is elérhető megoldóban implementálták már plazmonikus rendszerek szimulációjához, pl. a DDSCAT [144] vagy nanoDDSCAT [145].

3.1.4. Peremelem-módszer (BEM)

A BEM (boundary element method) eljárás a korábbi módszerekkel szemben nem a teljes vizsgált térfogatot, csak a nanorészecskék felületét diszkretizálja. A részecskék optikai válaszána számításához a diszkrét felületelemeken (határelemek, vagy peremelemek) oldjuk meg a Maxwell-egyenleteket. A megközelítés egyértelmű előnye a kisebb számítás és memóriaigény. (A BEM-módszer számítási igénye $V^2N(\omega)$ -el arányos, ami a DDA esetén $V^3N(\omega)$, ahol V a térfogat, $N(\omega)$ pedig a vizsgált diszkrét frekvenciapontok száma. A BEM-eljárást 2014-ben Ulrich Hohenester és Andreas Trügler implementálták MATLAB alapon plazmonikus rendszerek szimulációjához [8], [146]–[148]. Az MNPBEM (Metallic NanoParticle Boundary Element Method) névre keresztelt megoldó ingyenesen elérhető. A BEM-módszer előnyei miatt a saját modellezési munkámhoz ezt az eljárást választottam.

3.2. Az MNPBEM-megoldó bemutatása

A fejezet célja az MNPBEM-megoldó működésének rövid ismertetése. A megoldó részletes elméleti háttérének tárgyalására terjedelmi okokból nincs lehetőség. A bemutatott levezetés részletek, illetve levezetés nélkül közölt összefüggések nem a sajátjaim, és hivatkozott szakirodalmakban részletesen ki vannak fejtve (lásd A. Trügler könyve [8]). A cél a BEM-eljárás elektromágneses szimulációra történő alkalmazásának fogalmi szintű megismertetése.

3.2.1. A retardált (teljes) megoldó

A BEM-megközelítés alapvető építőelemei a $\phi(\mathbf{r})$ skalárpotenciál (elektrosztatikus potenciál) és $\mathbf{A}(\mathbf{r})$ vektorpotenciál (mágneses vektorpotenciál). A Maxwell-egyenletek Fourier-térben felírt alakjából az elektromos térerősség és mágneses indukció a (19) és (20) egyenletekkel fejezhető ki a potenciálok segítségével. A kvázistatikus közelítéssel szemben a retardált esetben a vákuumbeli hullámszám $k \neq 0$.

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = ik\mathbf{A}(\mathbf{r}) - \nabla\phi(\mathbf{r}) \quad 19$$

$$\mathbf{B}(\mathbf{r}) = \nabla \times \mathbf{A}(\mathbf{r}) \quad 20$$

Mindkét potenciál kielégíti a számára felírható inhomogén Helmholtz-egyenletet (21) és (22) szerint, ahol ρ és \mathbf{j} a tömbi töltéssűrűség, illetve áramsűrűség vektor. A potenciálok közötti kapcsolatot a Lorenz-mérték alapján a (23) egyenlet adja meg.

$$\nabla^2\phi + k^2\phi = -\frac{\rho}{\varepsilon} \quad 21$$

$$\nabla^2\mathbf{A} + k^2\mathbf{A} = -\mu\mathbf{j} \quad 22$$

$$\nabla\mathbf{A} = ik\varepsilon\phi \quad 23$$

A differenciálegyenlet-rendszer megoldásához a BEM-megoldó egy $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ Green-függvényt [149] vezet be a (24) és (25) egyenletek szerint. Az egyenletekben a j a különböző, eltérő permittivitással és hullámszámmal ($k_j = \sqrt{\varepsilon_j}k$) rendelkező közegek ($\mathbf{r} \in V_j$) indexe.

$$(\nabla^2 + k_j^2)G_j(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = -4\pi\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad 24$$

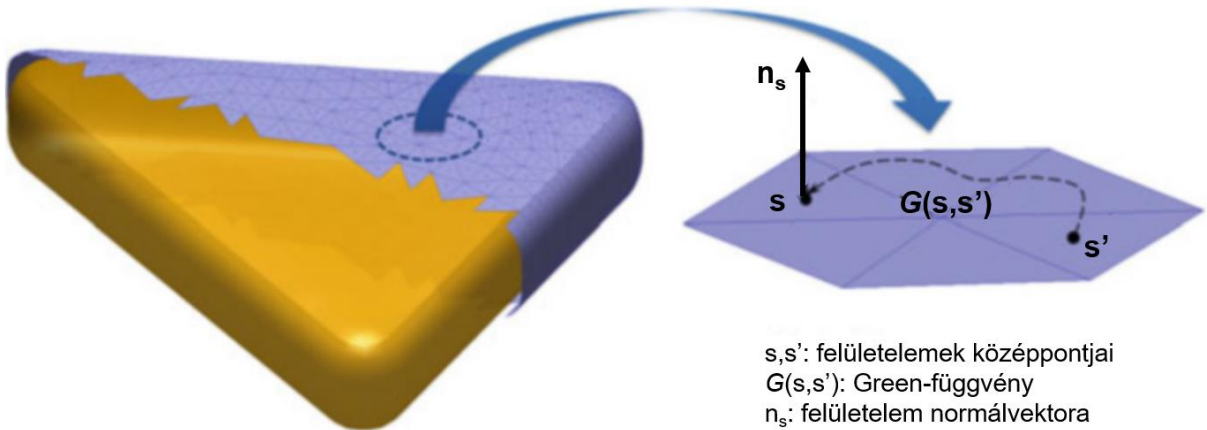
$$G_j(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \frac{e^{ik_j|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \quad 25$$

A Green-függvény használatával a skalár- és vektorpotenciálokra adódó megoldás integrális alakját az $\mathbf{r} \in V_j$ pontban a (26) és (27) egyenletek adják meg.

$$\phi(\mathbf{r}) = \phi^k(\mathbf{r}) + \oint_{V_j} G_j(\mathbf{r}, \mathbf{s})\sigma_j(\mathbf{s})da \quad 26$$

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}) = \mathbf{A}^k(\mathbf{r}) + \oint_{V_j} G_j(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \mathbf{h}_j(\mathbf{s}) da \quad 27$$

Az egyenletekben $\phi^k(\mathbf{r})$ és $\mathbf{A}^k(\mathbf{r})$ a külső gerjesztésből adódó skalár- és vektorpotenciálok (a megoldóban definiálhatunk például külső síkhullám vagy rezgő dipólus gerjesztéseket is). Egy nanorészecskére nézve tehát láthatjuk, hogy a potenciálok meghatározásához a részecske zárt felülete mentén kell integrálnunk, ahol a $\sigma_j(\mathbf{s})$ a felületi töltéssűrűség eloszlás, $\mathbf{h}_j(\mathbf{s})$ pedig a felületi áramsűrűség eloszlás. A BEM-eljárás a (26) és (27) egyenletek megoldásához a nanorészecske felszínét felületelemekre osztja, amelyek középpontjához hozzárendeli a felületelem töltés- és áramsűrűség értékeit a 15. ábrán látható módon.



15. ábra. Illusztráció egy nanoprizma felszínének felületelemekre osztására. A diszkrétizált töltés- és áramsűrűség értékek ($\sigma_j(\mathbf{s})$, $\mathbf{h}_j(\mathbf{s})$) a felületelemek középpontjához van rendelve. Közöttük a kapcsolatot a Green-függvény ($G_j(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$) írja le [8].

A diszkrét felületelemek segítségével, a (26) és (27) egyenletek átírhatók mátrixos formába, amivel már numerikusan kezelhetővé válnak. A (28) egyenlet a (27) egyenlet átírására ad példát, ahol $G_{j, ll'}$ a j indexű részecske $N_j \times N_j$ méretű Green-mátrixa, N_j a részecske diszkrét felületelemeinek a száma, $\Delta S_{j, l'}$ pedig az l' felütelelem mérete (lásd a 15. ábrát) [150].

$$\oint_{V_j} G_j(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \mathbf{h}_j(\mathbf{s}) da \approx \sum_{l'=1}^{N_j} G_{j, ll'} \sigma_j(s_{l'}) \Delta S_{j, l'} \quad 28$$

A külső gerjesztés (ϕ^k és \mathbf{A}^k) hatására a felületen kialakuló töltés- és áramsűrűségek ($\sigma_j(\mathbf{s})$ és $\mathbf{h}_j(\mathbf{s})$) meghatározásához figyelembe kell vennünk a Maxwell-egyenletekből adódó határfeltételeket [151]. Ehhez a felületet tekintjük úgy, mint amin a külső gerjesztés hatására egyszerre jelennek meg külső és belső töltés- (σ_1, σ_2), illetve áramsűrűség ($\mathbf{h}_1, \mathbf{h}_2$) értékek (lásd 16. ábrán), amelyek kielégítik a határfelületre érvényes folytonossági kritériumokat,

vagyis az elektromos tér érintő (29) és normális irányú (31), valamint a mágneses tér normális (30) és érintő irányú (32) komponenseinek folytonosságát [146].

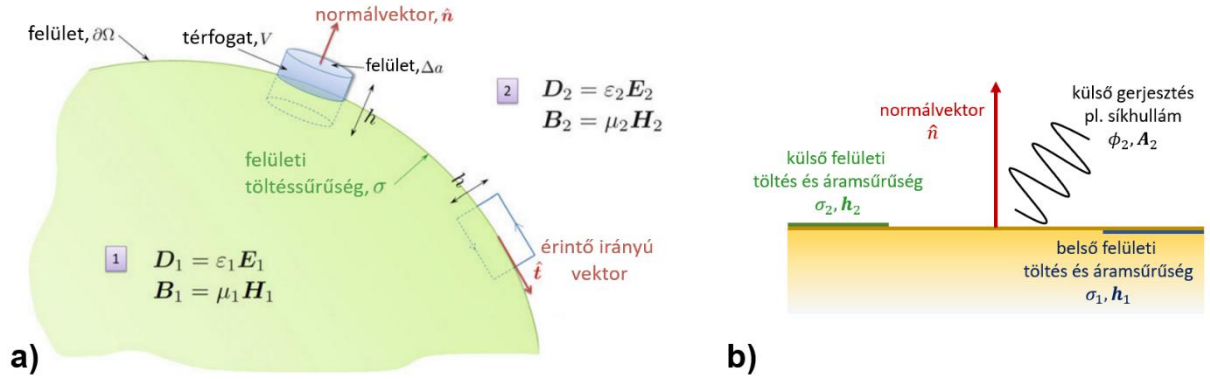
$$G_1\sigma_1 - G_2\sigma_2 = \phi_2^k - \phi_1^k \quad 29$$

$$G_1\mathbf{h}_1 - G_2\mathbf{h}_2 = \mathbf{A}_2^k - \mathbf{A}_1^k \quad 30$$

$$\begin{aligned} H_1\varepsilon_1\sigma_1 - H_2\varepsilon_2\sigma_2 - ik\hat{\mathbf{n}}(G_1\varepsilon_1\mathbf{h}_1 - G_2\varepsilon_2\mathbf{h}_2) \\ = \hat{\mathbf{n}}[\varepsilon_1(ik\mathbf{A}_1^k - \nabla\phi_1^k) - \varepsilon_2(ik\mathbf{A}_2^k - \nabla\phi_2^k)] \end{aligned} \quad 31$$

$$H_1\mathbf{h}_1 - H_2\mathbf{h}_2 - ik\hat{\mathbf{n}}(G_1\mu_1\varepsilon_1\sigma_1 - G_2\mu_2\varepsilon_2\sigma_2) = \Delta\mathbf{A}_k^* + ik\hat{\mathbf{n}}(\mu_1\varepsilon_1\phi_1^k - \mu_2\varepsilon_2\phi_2^k) \quad 32$$

A (29) – (32) egyenletekben az egyszerűség kedvéért az alábbi jelöléseket használtam: $G_1=G_{11} - G_{21}$, $G_2=G_{22} - G_{12}$, $H_1=H_{11} - H_{21}$, $H_2=H_{22} - H_{12}$, ahol H a Green-függvény felületre merőleges irányú deriváltjából számolható (pl. $H_{12} = \hat{\mathbf{n}}\nabla G_{12} \pm 2\pi$). A külső gerjesztésekre pedig $\Delta\phi_k = \phi_2^k - \phi_1^k$, illetve $\Delta\mathbf{A}_k = \mathbf{A}_2^k - \mathbf{A}_1^k$ [146].



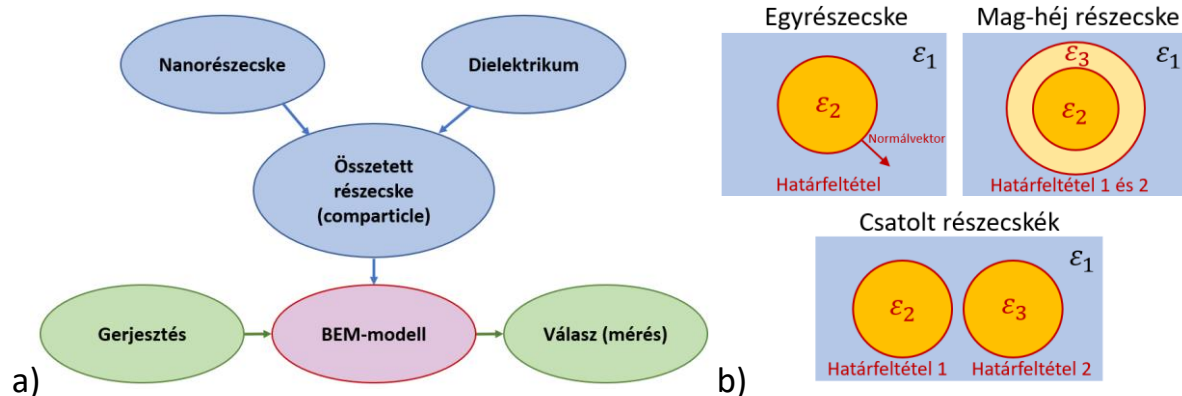
16. ábra. a) Két eltérő közeg határfelületének ($\partial\Omega$) illusztrációja. A normálvektor ($\hat{\mathbf{n}}$) kifelé mutat (az 1-es közeg felől a 2-es közeg felé). **b)** A külső, illetve belső felületen kialakuló felületi töltés- és áramsűrűségek illusztrációja, külső síkhullám gerjesztés esetén [8].

A BEM-megoldó működése ezek alapján a következőképpen foglalható össze. Az összeállított modellben a külső gerjesztéseknek megfelelően először kiszámoljuk a felületelemek töltés- és áramsűrűség értékeit a (29) – (32) egyenletek segítségével, ami alapján a skalár- és vektorpotenciál értékek meghatározhatóak a (26) és (27) egyenletekkel. Ezek ismeretében az elektromos térerősség és mágneses indukció a (19) és (20) egyenletekkel számolható ki. Az optikai hatáskeresztmetszetek meghatározása a teljesítményfluxus alapján (a Poynting-vektor Ω felületre integrálásával) az utolsó lépés. Ez a levezetés nélkül közölt (33) és (34) egyenletekkel tehető meg, ahol \Re a valós részt, * pedig a komplex konjugáltat jelöli [8].

$$C_{sca} = \frac{c}{n_b} \oint_{\partial\Omega} \Re(\hat{\mathbf{n}}(\mathbf{E} \times \mathbf{B}^*)) da \quad 33$$

$$C_{ext} = -\frac{c}{n_b} \oint_{\partial\Omega} \Re(\hat{\mathbf{n}}(\mathbf{E} \times \mathbf{B}^*_{be} + \mathbf{E}^*_{be} \times \mathbf{B})) da \quad 34$$

A modellezés és szimuláció folyamatát a 17. ábra a) része szemlélteti. A modellben definiálni kell a nanorészecske-elrendezés geometria paramétereit, valamint a nanorészecskéket, illetve az őket körülvevő közeget jellemző permittivitást. A megoldó ezekből egy összetett részecskét (comparticle) formál, ahol minden modellben definiált részecskére egyértelmű a permittivitások, illetve külső-belső határfelületek hozzárendelése. Ezek megadásával egyedi részecskék, csatolt részecskék, illetve egymásba ágyazott részecskék is definiálhatóak (17. ábra b).



17. ábra a) Az MNPBEM-megoldóban készített BEM-modell és szimuláció folyamatábrája. **b)** Különböző, közegbe ágyazott nanorészecske-elrendezések illusztrációi. A geometriák, a permittivitások és a határfeltételek együtt alkotják az összetett részecskét (comparticle) [147].

3.2.2. A kvázistatikus (egyszerűsített) megoldó

Speciális esetekben, amennyiben olyan nanorészecskéket vizsgálunk, melyek mérete jelentősen kisebb az elektromágneses gerjesztés hullámhosszánál (pl. 50 nm-nél kisebb átmérőjű nanogömbök) használhatjuk a kvázistatikus megoldót, amely a $k \approx 0$ közelítéssel leegyszerűsíti a (19) egyenletet. A (35) egyenlet ebben a formában megegyezik az elektrosztatikus problémák megoldására használható Poisson-egyenlettel.

$$\nabla^2 \phi = -\frac{\rho}{\varepsilon} \quad 35$$

A kvázistatikus esetben a Green-függvény ($G_j(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$) és a felületre merőleges irányban képzett deriváltja ($F(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$) is jelentősen egyszerűsödik, a (36) egyenletnek megfelelően.

$$G_j(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \frac{1}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}; \quad F(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = \hat{\mathbf{n}} \nabla G(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \quad 36$$

Ebben az egyszerűsített esetben a külső gerjesztő potenciál hatására a nanorészecskék felületén kialakuló töltéssűrűség a (37) egyenlet szerint számolható (levezetést lásd [8]).

$$\sigma = -\left\{2\pi \frac{\varepsilon_2 + \varepsilon_1}{\varepsilon_2 + \varepsilon_1} \mathbb{1} + F\right\}^{-1} \frac{\partial \phi^k}{\partial n} \quad 37$$

A következő fejezetekben bemutatásra kerülő saját szimulációs vizsgálataimhoz alapértelmezetten mindig a teljes (retardált) megoldót használtam.

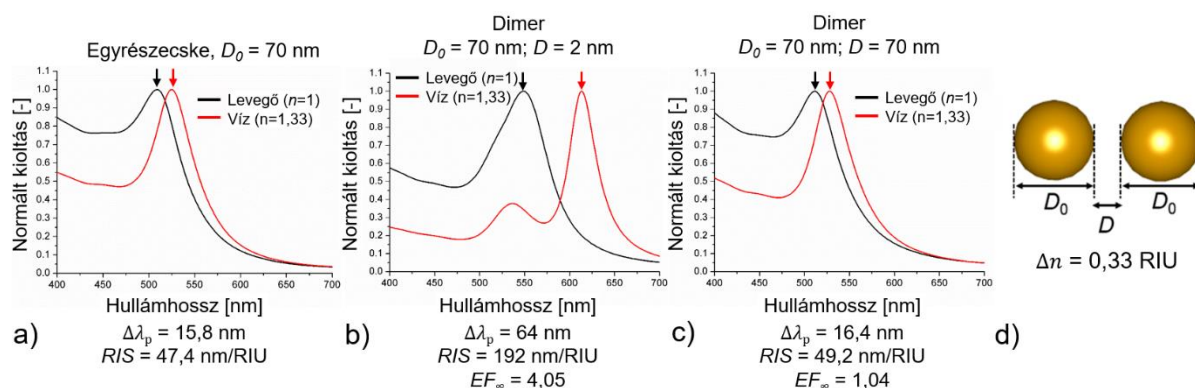
3.3. Az erősítési tényezők

3.3.1. A tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényező

A nanorészecskék között fellépő plazmonikus csatolásból származó tömbi törésmutató-változásból (Δn) származó érzékenység (RIS) erősítésének számszerű jellemzésére 2016-ban vezettem be a tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényezőt (EF), a (38) egyenlet szerint [T16]. Definíció szerint az erősítési tényező a többrészecskés elrendezés (pl. dimerek, azaz részecskepárok) és az egyedi részecske tömbi törésmutató-érzékenységeinek aránya. Így azonos alakú és méretű részecskéket feltételezve, az erősítési tényező tisztán a plazmonikus csatolásból származó jelnövekményt számszerűsíti.

$$EF_B = \frac{RIS_{dim}}{RIS_{sp}} = \frac{\frac{\Delta\lambda_{p,dim}}{\Delta n}}{\frac{\Delta\lambda_{p,sp}}{\Delta n}} = \frac{\Delta\lambda_{p,dim}}{\Delta\lambda_{p,sp}} \quad 38$$

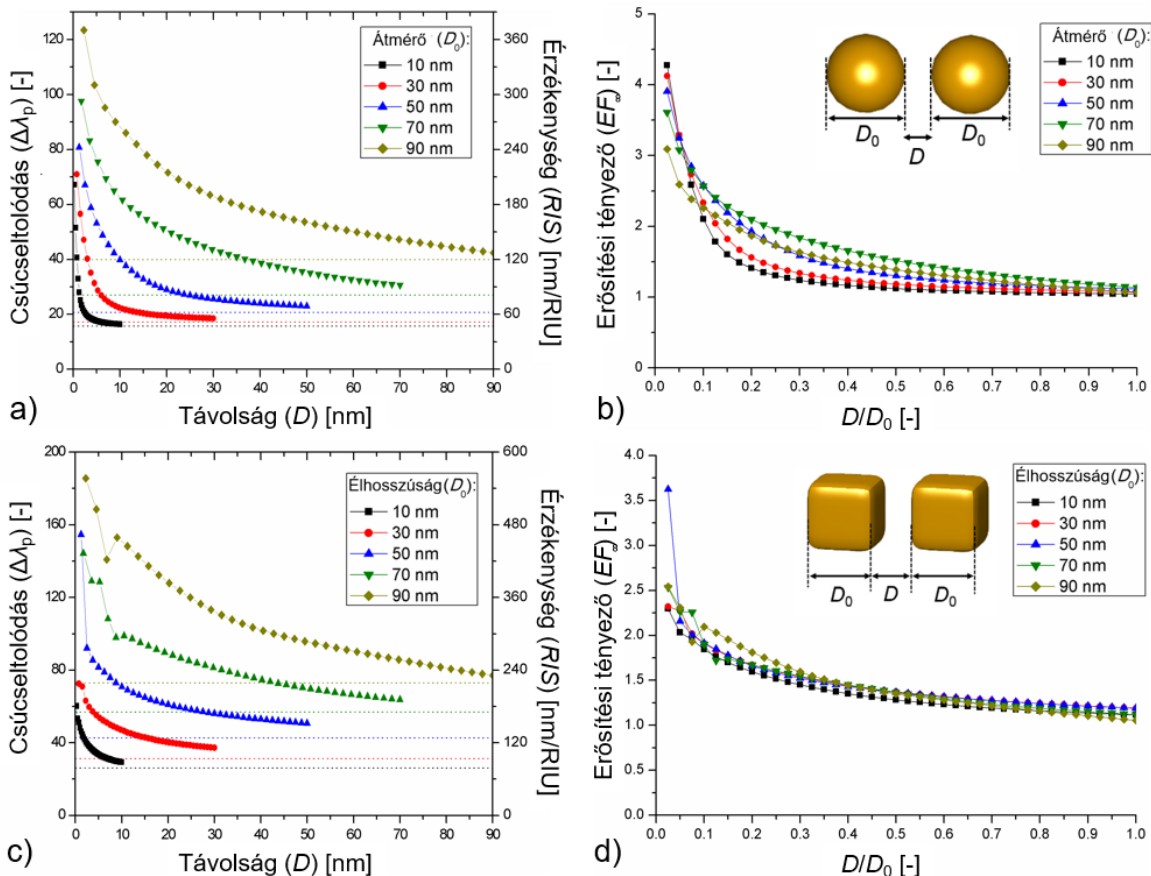
Az általam bevezetett formalizmust Szántó Géza (Dr. Csarnovics Istvánnal közös doktoranduszunk) bevonásával 2017 óta sikerrel alkalmaztuk arany, illetve ezüst nanogömbökből, illetve nanokocka dimerekből álló részecske-rendszerek erősítési tényezőjének vizsgálatára [T14], [T19]. Az erősítési tényező számítását egy egyszerű, arany nanogömb dimerekből álló esetre szemlélteti a 18. ábra.



18. ábra. A plazmonrezonancia csúcsának BEM-szimulációból számolt eltolódása különböző közegekben (levegő, $n = 1$ és víz, $n = 1.33$) egy szimpla arany nanogömb (a) és egy egymástól különböző távolságokban elhelyezett nanogömb részecskepár (dimer) esetén (b, c). d) Az alkalmazott jelölések: D – részecskék közötti távolság, D_0 – nanorészecske-átmérő.

A szimulációkat a bemutatott MNPBEM-megoldóval végeztük. A nanogömböket és a nanokockákat a beépített „trisphere”, illetve „tricube” függvényekkel hoztuk létre, és azok 256, illetve 486 felületelemből álltak. A kioltási spektrumokat a „retardált” megoldóval számoltuk ki, amely a teljes Maxwell-egyenletekkel dolgozik. A törésmutató-érzékenységek meghatározásához a kioltási spektrumokat levegőben ($n = 1$), illetve vízben ($n = 1.33$) is kiszámoltuk, az egyrészecskés, valamint kétrészecskés elrendezések törésmutató-érzékenységét, valamint az erősítési tényezőt a (38) egyenlet alapján számoltuk. A

szimulációkhoz a megoldó beépített törésmutató-adatbázisai közül a Johnson és Christy 1972-es mérésein alapulót használtuk [26]. Gerjesztéshez egy lineárisan polarizált síkhullámot alkalmaztunk, ahol a terjedési irány merőleges, a polarizációs vektor párhuzamos a kétrészecskés elrendezés szimmetriatengelyével (lásd 18. ábra), amely így alkalmas a nanorészecskék közötti σ csatolt módus gerjesztésére. Levegő és víz között változtatva a törésmutatót egy 70 nm átmérőjű szimpla arany nanogömb érzékenysége 47,4 nm/RIU (18. ábra a) része). Részecskepárok esetén, amennyiben a részecskék közötti távolság kicsi az érzékenység jelentősen megnőhet, pl. 2 nm esetén kb. 4-szeresre (18. ábra b) része). A részecskék közötti távolság növelésével a törésmutató-érzékenység konvergál az egyedi részecskék értékéhez, ahogy fokozatosan gyengül a plazmonikus csatolás a részecskék között. A plazmonrezonancia csúcsának eltolódása ($\Delta\lambda_p$), a tömbi törésmutató-érzékenység (RIS) és az ezekből számolt erősítési tényező (EF) is exponenciális lecsengést mutat a részecskék közötti távolság növelésének függvényében, ahogy az a 19. ábrán jól megfigyelhető arany nanogömbökből és nanokockákból álló részecskepárok esetén.



19. ábra a) Különböző átmérővel (D_0) rendelkező arany nanogömb részecskepárok kioltási csúcsának eltolódása ($\Delta\lambda_p$, $\Delta n = 0,33$ esetén), valamint az ebből számolt tömbi törésmutató-érzékenység (RIS) a nanogömbök közötti távolság (D) függvényében. **b)** A (17) alapján a különböző átmérőjű részecskepárokra számolt erősítési tényező (EF) a dimenziómentes D/D_0 függvényében. A **c)** és **d)** ábrák különböző D_0 élhosszúságú nanokockákra adják meg a csúcseltolódást, érzékenységet és erősítési tényezőt, az **a)** és **b)** ábrákhoz hasonlóan. [T14]

Fontosnak tartom kiemelni, hogy bár a 19. ábra exponenciális karakterisztikái emlékeztethetnek a plazmonvonalzó elvből a csatolt nanorészecskék plazmonrezonancia-eltolódására ismert exponenciális lecsengésekre [152], ott $\Delta\lambda_p$ a rezonancia csúcs csatolásból származó eltolódását jellemzi rögzített törésmutató esetén, nálunk viszont a törésmutató-változásból származó jelnövekményt mutatja.

A 19. ábrán jól látszik, hogy a nanogömbök és nanokockák érzékenysége a méretükkel nő, valamint, ha a részecskék közötti távolság $D/D_0 = 1$ fölé nő, a plazmonikus csatolásból származó erősítés megszűnik ($EF \cong 1$). Ahhoz, hogy jelentős erősítésről beszélhessünk, a nanorészecskék közötti távolságot érdemes $D/D_0 < 0,1$ alá csökkenteni. Ekkor arany nanogömbök esetén 3–4×, arany nanokockák esetén 2–2,5× erősítéssel számolhatunk. Önmagában érdekes, hogy bár a nanokockák érzékenysége nagyobb a nanogömböknél (azonos élhosszúság–átmérő páros esetén), a nanogömbök erősítése tényezője nagyobb egy adott D/D_0 értékre.

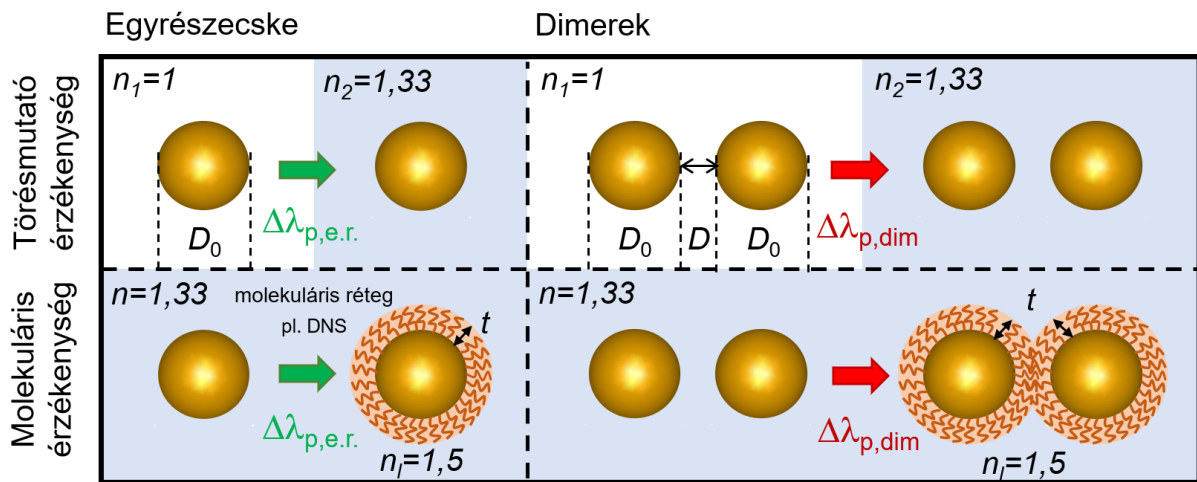
Az $EF - D/D_0$ karakterisztikák nagy segítséget jelenthetnek a szenzorelemek előállítási technológiáinak optimalizálásához, elsősorban azokban az esetekben, ahol adott a megfelelő kontroll a részecskék alakja és elrendezése fölött (lásd a 2.2. fejezetben). Bár a $D/D_0 < 0,1$ tartomány elsöre elérhetetlennek tűnhet, több lehetőség is van a megvalósítására. Folyadékfázisban szintetizált részecskékkel nm alatti pontossággal állítottak már be egymáshoz képest nanorészecskéket, például DNS-molekulák segítségével (lásd a már említett plazmonvonalzó elvet [153], [154]). Szilárd hordozók felületén elektronsugaras, ionsugaras, illetve nanoimprint-litográfia segítségével is hoztak létre nanorészecske-elrendezéseket a $0,08 < D/D_0 < 1$ tartományon [155], [156]. A 4. fejezetben bemutatásra kerülő plazmonikus nanokompozit fejlesztése során is ezt a tartományt céloztam meg. Bioérzékelős alkalmazásokat szem előtt tartva azonban nem elég a *RIS* maximalizálására törekedni, a nanorészecske-elrendezések optimalizálásához meg kell vizsgálni a molekuláris érzékenységet is.

3.3.2. A molekuláris érzékenység erősítési tényező

A molekuláris érzékenység a nanorészecskék felületére felvitt, ideális esetben ismert vastagságú és törésmutatójú molekuláris réteg hatására bekövetkező plazmonrezonancia-eltolódásból fejezhető ki. Mivel ebben az esetben nem a részecskéket körülvevő teljes tömbi közeg törésmutatója változik, csak egy felületközeli réteg törésmutatója, ezért az irodalomban szokás felületi érzékenységgént (surface sensitivity) is hivatkozni rá [157]. A molekuláris réteg kiépüléséből (pl. DNS-immobilizáció) vagy megváltozásából (pl. DNS-hibridizáció) adódó csúcseltolódást az érzékenység (S) számításánál szokás anyagmennyiségre vagy koncentrációra (c) vonatkoztatni (pl. $S = \Delta\lambda_p / c_{\text{DNS}}$ alakban).

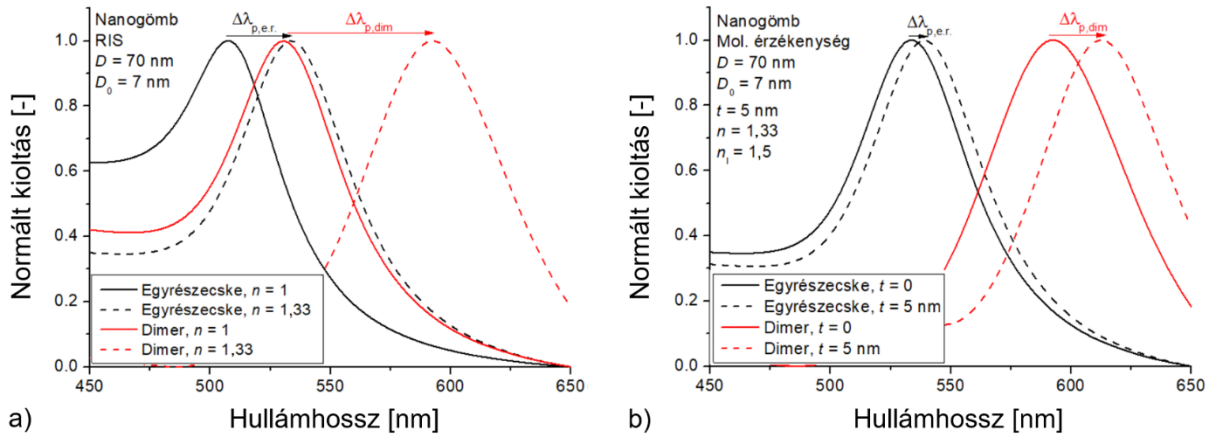
Ahogy korábban a 14. ábra elemzése kapcsán tárgyaltuk, LSPR-szenzorok esetén nagy különbségeket tapasztalhatunk az egyes érzékelők tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott (*RIS*), illetve molekuláris érzékenységei (S) között. Az eltérések lehetséges okának megértéséhez az utóbbi részletes vizsgálatára van szükség. A tömbi törésmutató és molekuláris

érzékenység közötti különbséget a 20. ábra szemlélteti egyrészecskés, illetve dimer elrendezésekre arany nanogömbök esetén. A kioltási spektrumok változása egy konkrét esetben (70 nm átmérő, 7 nm részecskék közötti távolság, 5 nm rétegvastagság) a 21. ábrán látható. A molekuláris érzékenységre is definiálhatunk erősítési tényezőt a (38) egyenletnek megfelelően azzal a különbséggel, hogy itt $\Delta\lambda_p$ egy adott ($t = x$ nm) vastagságú réteg hatására bekövetkező csúcseltolódást jelöl. Mivel a tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott erősítési tényező megfelel annak az esetnek, ahol a részecskéket egy végtelenül vastag réteggel vonjuk be ($t = \infty$), így az egyértelmű jelölések végett a molekuláris érzékenység erősítési tényezőt egy adott rétegvastagságra a továbbiakban $EF_{t=x}$ formában, a tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényezőt EF_∞ formában fogom jelölni.



20. ábra. A tömbi törésmutató-érzékenység, illetve a molekuláris érzékenység számításához használt szimulációs kondíciók illusztrálása egyrészecskék, valamint részecskepárok (dimerek) esetén. Az alkalmazott jelölések: D – részecskék közötti távolság, D_0 – nanorészecske-átmérő, $\Delta\lambda_p$ – plazmonrezonancia-eltolódás, t – a molekularéteg (dielektrikum) vastagsága, n_1 – a molekularéteg (dielektrikum) törésmutatója. [T3]

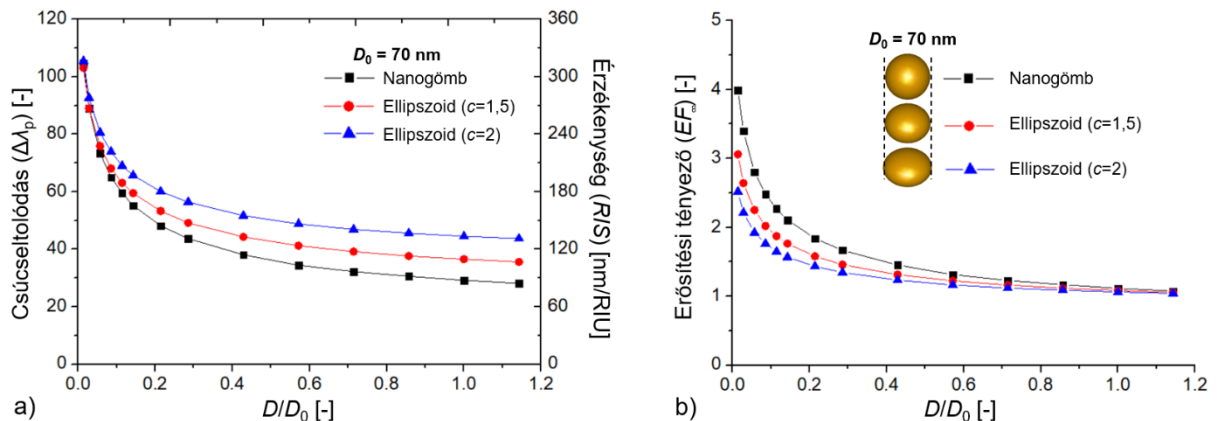
A szimulációkban a tömbi törésmutató-érzékenységet továbbra is levegő és víz közötti közeg váltással határoztam meg ($\Delta n = 0,33$). A molekuláris érzékenység meghatározásához a nanorészecskéket egy konstans törésmutatójú dielektrikum réteggel vontam be, amely a felületre rögzített DNS-molekularéteget hivatott modellezni. A réteg törésmutatójának $n_1 = 1,5$ értéket választottam, amivel a szakirodalomban is közelíteni szokás a DNS-monorétegeket [88], [102]. A külső, részecskéket körülvevő közeg ebben az esetben víz, mivel a molekularétegek felületre rögzítése általában folyadékfázisban történik. Az egyetlen jelentősebb eltérés az előző (3.3.1) alfejezetben bemutatott szimulációkhoz képest, hogy az arany nanorészecskék törésmutatójához McPeak 2015-ös törésmutató-adatbázisát használtam [158]. Bár ez alapértelmezetten nem része az MNPBEM-megoldónak, összevetve a korábban használt Johnson és Christy adatbázissal úgy találtuk, hogy a számolt spektrumok jobban közelítik a valóságot (a NAPLIFE-projekt keretein belül, arany nanorudak modellezése során). A molekuláris erősítési tényezővel kapcsolatos számításokat egyedül végeztem.



21. ábra. A tömbi törésmutató-érzékenység **(a)** és a molekuláris érzékenység **(b)** összehasonlítása a kioltási spektrum csúcsának eltolódásán keresztül egyrészecskés ($\Delta\lambda_{p,e.r.}$), illetve részecskepár ($\Delta\lambda_{p,dim}$) elrendezésekre. [T3]

A 21. ábra illusztrációjára (ahol $D/D_0 = 0,1$), a tömbi törésmutató változásból adódó csúcseltolódások $\Delta\lambda_{p,e.r.} = 26,3$ nm egyrészecskére ($RIS_{e.r.} = 78,9$ nm/RIU) és $\Delta\lambda_{p,dim} = 62,6$ nm a dimer elrendezésre ($RIS_{dim} = 187,8$ nm/RIU), amiből a tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényező $EF_{\infty} = 2,38$. Egy 5 nm vastag, $n_1 = 1,5$ törésmutatójú molekuláris réteg nanorészecskék felületére kötéséből adódó csúcseltolódások $\Delta\lambda_{p,e.r.} = 6,1$ nm és $\Delta\lambda_{p,dim} = 18,2$ nm, amiből $EF_{t=5nm} = 2,98$ adódik. A két erősítési tényező különbségéből látszik, hogy a nanorészecskék közötti csatolás jobban erősíti a molekuláris réteg felületre kötéséből adódó jelváltozást, szemben a tömbi törésmutató-változással. Kérdés, hogy mi ennek az oka, illetve hogyan tudjuk felhasználni ezt a jelenséget az érzékelők tervezésénél a nanorészecske-elrendezés optimalizálására, nukleotidérzékelőket szem előtt tartva.

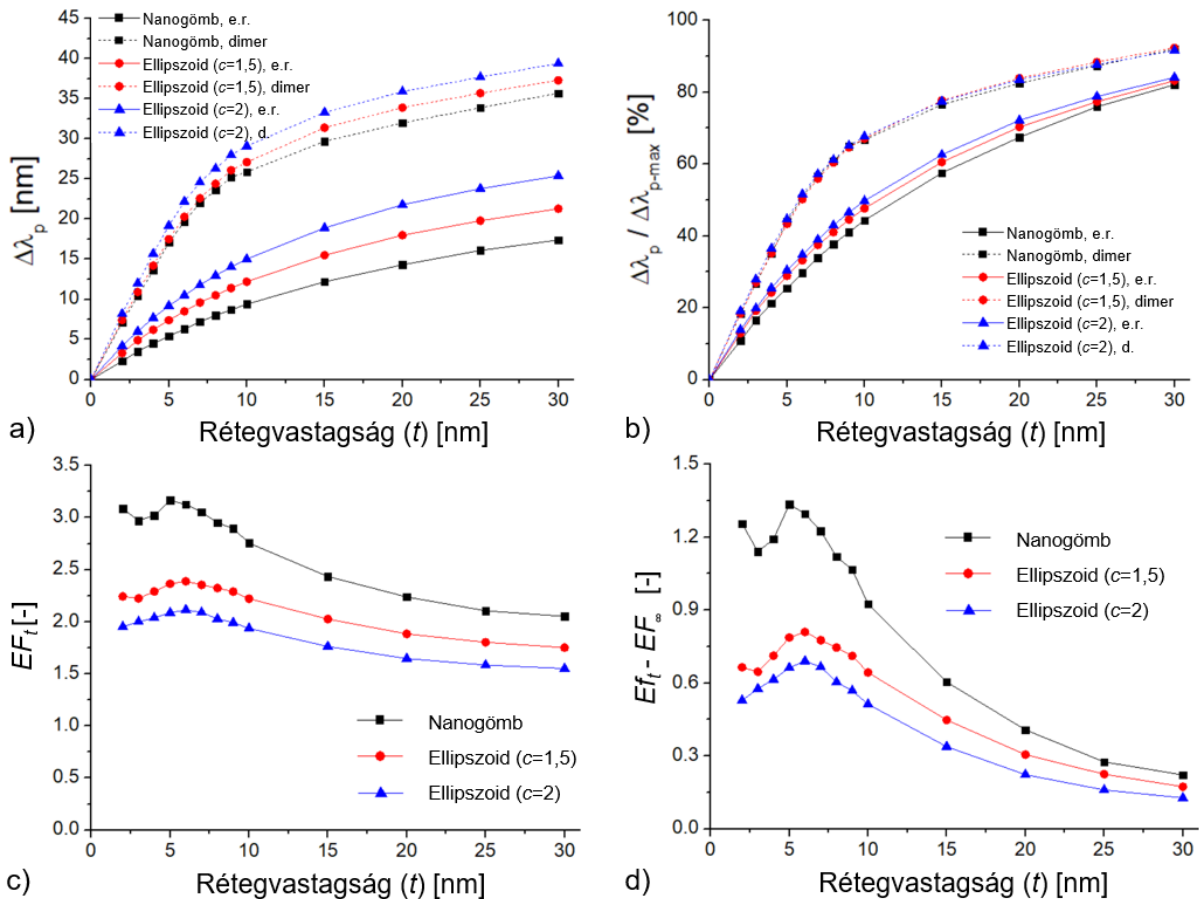
A 4. fejezetben bemutatásra kerülő nanokompozit szenzorelem fejlesztésével való kapcsolódás miatt a molekuláris erősítés vizsgálatát nanogömbök mellett nanoellipszoidokból álló részecskepárokon végeztem el.



22. ábra. a) A plazmonrezonancia csúcseltolódása és az ebből számolt tömbi törésmutató-érzékenység (RIS) a dimenziómentes D/D_0 függvényében nanogömb, illetve különböző nanoellipszoidok esetére. **b)** A törésmutató-érzékenységből számolt erősítési tényezők. [T3]

Az ellipszoidok két tengelyének (longitudinális/transzverzális) arányát egy c paraméterrel jellemzem. A 22. ábrán láthatjuk a tömbi törésmutató-változásra vonatkoztatott érzékenységek, valamint erősítési tényezők alakulását a D/D_0 függvényében három esetre ($c = 1; 1,5; 2$), ahol $c = 1$ a nanogömböknek felel meg. Láthatóan a c értékének növelésével az ellipszoidok egy adott elrendezéshez tartozó érzékenysége nő, azonban az erősítési tényezőjük csökken, így főleg kis távolságok esetén ($D/D_0 < 0,1$) a közöttük lévő különbségek lecsökkennek (22. ábra a).

A molekuláris érzékenységek feltérképezéséhez az egy, illetve kétrészecskés elrendezéseket növekvő vastagságú, $n_1 = 1,5$ törésmutatójú réteggel vontam be. A $D_0 = 70$ nm, $D = 10$ nm ($D/D_0 = 0,14$) eset eredményét láthatjuk a 23. ábrán a három nanorészecske-típusra.



23. ábra. a) A plazmonrezonancia csúcseltolódása egyrészecskés (e.r.) és dimer (d) elrendezésekre különböző vastagságú (t) dielektrikum bevonat hatására ($n_1 = 1,5$, víz közegben, $n = 1,33$). A nanorészecskék átmérője 70 nm (D_0), 10 nm részecskék közötti távolsággal (D). b) Relatív csúcseltolódás ($\Delta\lambda_p / \Delta\lambda_{p-max}$) a különböző rendszerekre, ahol a maximális csúcseltolódás ($\Delta\lambda_{p-max}$) a teljes részecskéket körülvevő közeg törésmutatójának 1,5-ös értékére értendő. c) A molekuláris érzékenység erősítési tényező (EF_t) a rétegvastagság függvényében. d) A molekuláris és tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényezők különbsége az egyes elrendezésekre. [T3]

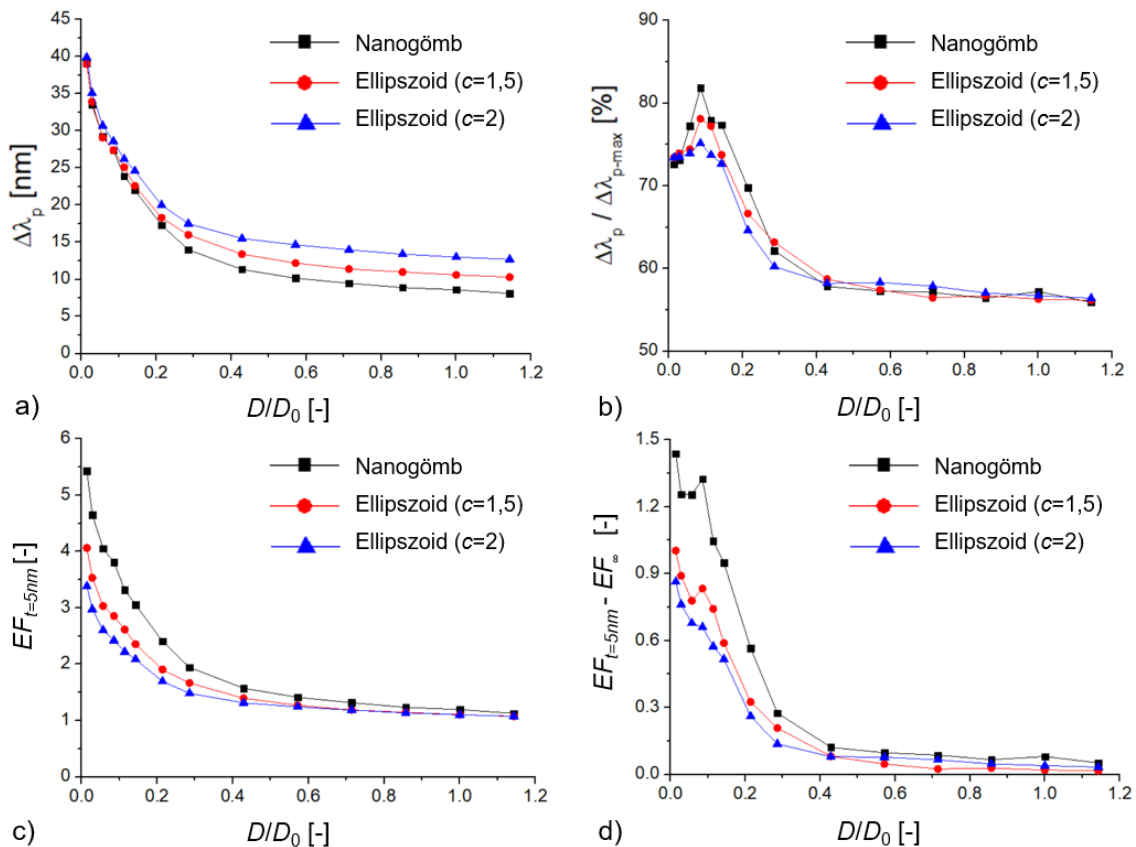
A 23. ábra a) és b) grafikonjain láthatjuk, hogy a kétrészecskés elrendezések nagyobb jelet adnak azonos rétegvastagság esetén a szimpla nanorészecskékénél, a vártnak megfelelően. Emellett fontos különbséget figyelhetünk meg az egyrészecskés és dimer elrendezéseket jellemző görbék menetében is. A 23. ábra b) részén látható relatív csúcstelődást ($\Delta\lambda_p/\Delta\lambda_{p-max}$) az egyes elrendezések maximális jelválaszának figyelembevételével számoltam ki, ahol $\Delta\lambda_{p-max}$ a teljes részecskét körülvevő közeg törésmutatójának 1,5-ös értéke esetén értendő (vagyis megfelel az $1,5-1,33 = 0,17$ tömbi törésmutató változásra adott válasszal). A $\Delta\lambda_p/\Delta\lambda_{p-max}$ görbék jól láthatóan meredekebbek a részecsképarók esetén, szemben a szimpla részecskékkel. A különbség szemléletesen azt jelenti, hogy rögzített maximális törésmutató-változás esetén ($\Delta n = 0,17$) a dimer elrendezések hatékonyabban használják ki a szenzor dinamikus tartományát. Például szimpla nanogömbök esetén egy 7 nm-es réteg felvitele a maximálisan elérhető jel 34%-át kelti, ami részecsképarók esetén 57%-ra nő (az ábrán illusztrált méretre és részecskék közötti távolságra).

A $\Delta\lambda_p/\Delta\lambda_{p-max}$ karakterisztikák visszavezethetők arra, hogy a nanorészecskék felületére felvitt rétegek milyen hatékonyan fedik le a részecskék plazmonterét. A $t = \infty$ esetben ez 100% ($\Delta\lambda_{p-max}$). Szimpla részecskék esetén a növekvő rétegvastagság hatására bekövetkező csúcstelődás szépen visszaadja az exponenciális térerősség-lecsengés alapján várt jelleget. A 23. ábra a) grafikonjának görbéire illesztve a (14) egyenletet, az effektív behatolási mélység (decay length, ξ_D) meghatározható az egyes elrendezésekre. Egyrészecskés esetben az exponenciális illesztés nagyon jó ($R^2 = 0,999$), a három különböző alakú részecskére $\xi_D = 33$ nm ($c = 1$), 27,2 nm ($c = 1,5$), és 25,4 nm ($c = 2$) adódik. A fordított arányosság c és ξ_D között azt jelzi, hogy nanoellipszoidok esetén a longitudinális módus tere fókuszáltabb, kisebb a tér effektív behatolási mélysége. A részecsképarókhöz tartozó görbékre illesztve a (14) egyenletet $\xi_D = 16$ nm ($c = 1$), 15,8 nm ($c = 1,5$), és 15 nm ($c = 2$) adódik, bár megjegyzendő, hogy a görbék jellege szemre is eltér az ideális exponenciálistól. Az effektív behatolási mélység jelentősen lecsökkent az egyrészecskés esethez képest, ami a részecskék közötti csatolás, és a plazmontér részecskék közé fókuszálásának következménye. (A csatolt részecskék közötti térerősség eloszlását lásd később a 4.4. fejezetben a 38. ábrán). Amennyiben a nanorészecskék felületére felvitt réteggel ebben a fókuszált plazmontérben dolgozunk a csatolt részecskék között (jellemzően a $t < D$ tartományon), úgy az egyedi részecskékénél hatékonyabban tudjuk kihasználni a nanorészecskék dinamikus tartományát.

Ez jól megfigyelhető a 23. ábra c) és d) grafikonjain szemléltetett erősítési tényezők alapján is. A molekuláris érzékenység erősítési tényező a tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényezővel szemben nem konstans, függ a felvitt molekuláris réteg vastagságától. EF_t a rétegvastagság növelésével EF_∞ -be tart, de ahogy a 23. ábra d) részén látható $EF_t > EF_\infty$ a teljes tartományon. Az erősítési tényezők különbsége az egyes nanorészecskékre főleg a $t < D$ tartományon jelentős, továbbá fontos megfigyelés, hogy EF_t -nek $t = D/2$ körül lokális maximuma van (a 23. ábrán 5 nm rétegvastagságnál). Szemléletesen a különbség EF_t , ill. EF_∞

között azt jelenti, hogy egy adott vastagságú molekuláris réteg részecskékre kötése csatolt, RIS_{dim} érzékenységgű részecskepár esetén akkora jelet szolgáltat, mint egy $RIS_{dim} \times EF_t / EF_\infty$ szimpla részecse adna (például nanogömbökre $t = 5$ nm-nél az EF_t / EF_∞ tényező 1,77). Ez a megfigyelés magyarázatot ad arra, hogy azonos vagy kisebb RIS -sel rendelkező csatolt nanorészecske-rendszerek hogyan adhatnak nagyobb, vagy megegyező jelet a molekuláris bekötődési folyamatokról, mint csatolatlan, de nagyobb RIS -sel rendelkező egyedi részecskék.

A 23. ábrán látható lokális maximum lehetővé teszi, hogy egy adott alkalmazáshoz megtervezzük az optimális részecskék közötti távolságot, ismert molekuláris rétegvastagság esetén. A 24. ábra grafikonjai rögzített molekuláris rétegvastagság ($t = 5$ nm) mellett, változó részecskék közötti távolsággal számolva szemléltetik az abszolút és relatív jelválaszt, valamint az ezekből számolt erősítési tényezőket, a 23. ábrához hasonlóan. A görbék jellege hasonlít a 22. ábra karakterisztikáihoz, azonban a $\Delta\lambda_p / \Delta\lambda_{p-max}$ és $EF_t - EF_\infty$ görbéken itt is megjelenik a lokális maximum a $D = 7-10$ nm tartományban ($t = D/2$ körül). A 24. ábra b) grafikonja alapján például arany nanogömbök esetén optimális részecskék közötti távolság esetén a plazmonter kb. 82%-a kihasználható a $t = 5$ nm vastag molekuláris réteggel.



24. ábra. a) A plazmonrezonancia csúcseltolódása különböző dimer elrendezések esetén a dimenziómentes D/D_0 függvényében ($D_0 = 70$ nm), a nanorészecskéket borító $t = 5$ nm molekuláris réteg esetén ($n_1 = 1,5$, víz közegben, $n = 1,33$). **b)** Relatív csúcseltolódás ($\Delta\lambda_p / \Delta\lambda_{p-max}$) a különböző rendszerekre. **c)** A molekuláris érzékenység erősítési tényező ($EF_{t=5nm}$) a D/D_0 függvényében. **d)** A molekuláris és tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényezők különbsége az egyes elrendezésekre. [T3]

3.3.3. Összefoglalás, tervezési irányelvek

Az előző alfejezetben bemutatott eredmények alapján látható, hogy az általam bevezetett tömbi törésmutató, illetve molekuláris érzékenység erősítési tényezők számításán alapuló módszertan alkalmas tetszőleges típusú (alakú, vagy anyagi összetételű) nanorészecskéből álló rendszerben a részecskék elrendezésének optimalizálására a plazmonikus csatolásból adódó jelnövekmény maximalizálása céljából. Mivel az eljárást elsősorban a saját szenzorelem fejlesztési technológiák optimalizálásra vezettem be, a fejezet zárásaként összefoglalnám a fontosabb, szenzorelem tervezést és technológia optimalizálást elősegítő következtetéseket, amelyeket a saját fejlesztéseknél (4. fejezet) figyelembe vettem.

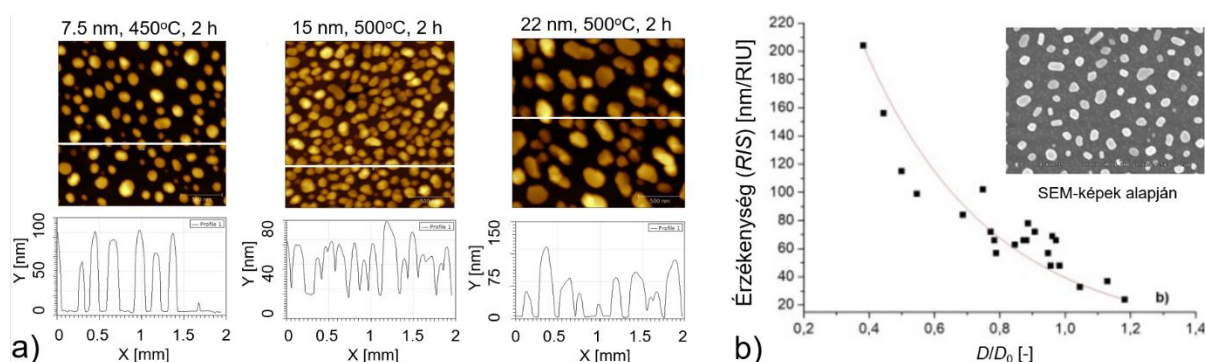
- Látható, hogy a tömbi törésmutató-érzékenység (RIS) a nanorészecskék közötti távolság csökkentésével exponenciálisan nő, ezért a távolság csökkentése egy általános cél lehet. Jelentős érzékenységnövekedést ($2-4\times$ erősítés) a $D/D_0 < 0,1$ tartományon várhatunk (19. ábra).
- A nanorészecskék méretével és alakjával kapcsolatban egyrészt láthattuk, hogy a nagyobb nanorészecskék nagyobb abszolút RIS -sel rendelkeznek, ellipszoidok esetén pedig szintén előnyös a longitudinális/transzverzális tengelyek arányának növelése.
- A molekuláris érzékenységek vizsgálata rávilágított, hogy molekuláris rétegek esetén a nanorészecskék közötti plazmonikus csatolásból adódó jelerősítés meghaladhatja a RIS erősítési tényezőből becsült értéket ($EF_t > E_\infty$), valamint a molekuláris erősítés növelése szempontjából is előnyös a részecskék közötti távolság csökkentése.
- Láthattuk, hogy molekuláris érzékenység erősítési tényezőnek (EF_t) lokális maximuma van $t = D/2$ körül, ami egy jó irányelv a részecskék közötti távolság tervezéséhez, egy adott, ismert vastagágú molekuláris réteg esetén.

Bioérzékelős alkalmazásokat szem előtt tartva hangsúlyozni kell az utolsó pont fontosságát, és a nanorészecskék közötti távolság illesztését a használt receptor-célmolekula-rendszert figyelembe véve. Nukleotidérzékelők esetén a gyakorlati alkalmazásokban használt receptor és cél-DNS-szekvenciák hossza jellemzően 15–30 bázispár [T9]. Ez 5–10 nm-es rétegvastagságot jelent (t), amihez viszonylag kényelmesen tervezhető az optimális 10–20 nm-es részecskék közötti távolság ($D = 2t$) [T10]. Immunoérzékelők esetén figyelembe kell venni, hogy a jellemzően 10 nm-es mérettartományba eső antitest tetejére fog ülni a célmolekula, ami alkalmazástól függően a 10–100 nm-es tartományban lehet. Nagyobb célmolekulák esetén a túlságosan fókuszált plazmontér hátrányossá válhat, a behatolási mélységet a részecskék közötti távolság beállításával illeszteni kell az alkalmazáshoz. A $D < 2t$ távolságra tervezés nukleotidérzékelők esetén is hátrányos lehet, amennyiben a túl szűk résben a sztérikus gátlás miatt nem tudnak kiépülni a DNS-rétegek mindkét részecskén, vagy nem megy végbe a DNS-hibridizáció. A felsorolt szempontokat a 4. fejezetben bemutatott nanokompozit szenzorelem tervezése során figyelembe vettem.

3.4. Komplex nanorészecske-rendszerek vizsgálata

Az alfejezet célja, hogy egy gyakorlati példával illusztráljam az általam kidolgozott szimulációs módszertan alkalmazhatóságát komplex nanorészecske-rendszerek esetén. A feladat nanorészecske-rendszerek plazmonikus csatolásból adódó érzékenységnövekményének elkülönítése a többi geometriai paramétertől (alak és méret).

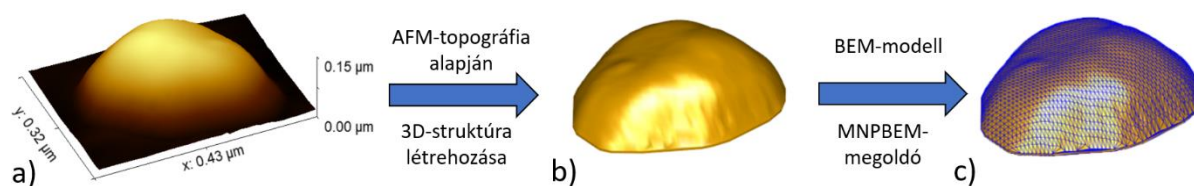
A vizsgált nanorészecske-rendszer üveg hordozón létrehozott arany nanoszigetekből áll, amelyek előállításának optimalizálásával, illetve a nanosziget-rendszerek LSPR- és SERS-alkalmazásával 2013 óta foglalkozunk a Debreceni Egyetem Kísérleti Fizika Intézetének munkatársaival közösen (Dr. Csarnovics István és csoportja). Ahogy a 2.2.3. alfejezetben részletesen bemutatam, a nanoszigetek előállítása üveghordozón egy szilárdfázisú eljárás, úgynevezett sablonmentes vékonyréteg-leválasztás és utólagos hőkezelés. Az üveg felületére vékonyréteg-technikával leválasztott, maximum párszor 10 nm vastagságú arany vékonyréteg 300-600°C közötti hőkezelésével alakíthatóak ki nanoszigetek a vékonyrétegből. A kiindulási rétegvastagsággal, a hőkezelés hőmérsékletével és idejével szabályozható a kialakuló nanosziget-rendszerek geometriája: az átlagos szigetméret (átmérő) és közöttük lévő távolság. A nanoszigetek pár hátrányos tulajdonsága ellenére (pl. rossz tapadás az üveghordozóhoz), az egyszerű előállítási technológia miatt egy használható alternatíva lehet több alkalmazáshoz [84], [92], [107]. A debreceni kollégákkal folytatott együttműködésünk kapcsán AFM és SEM segítségével vizsgáltuk az előállítás technológiai paramétereit és a nanosziget-rendszerek geometriai tulajdonságai közötti kapcsolatot, amit összevetettünk az optikai spektroszkópia segítségével mért tömbi törésmutató-érzékenységekkel [T18], [T21], [T22].



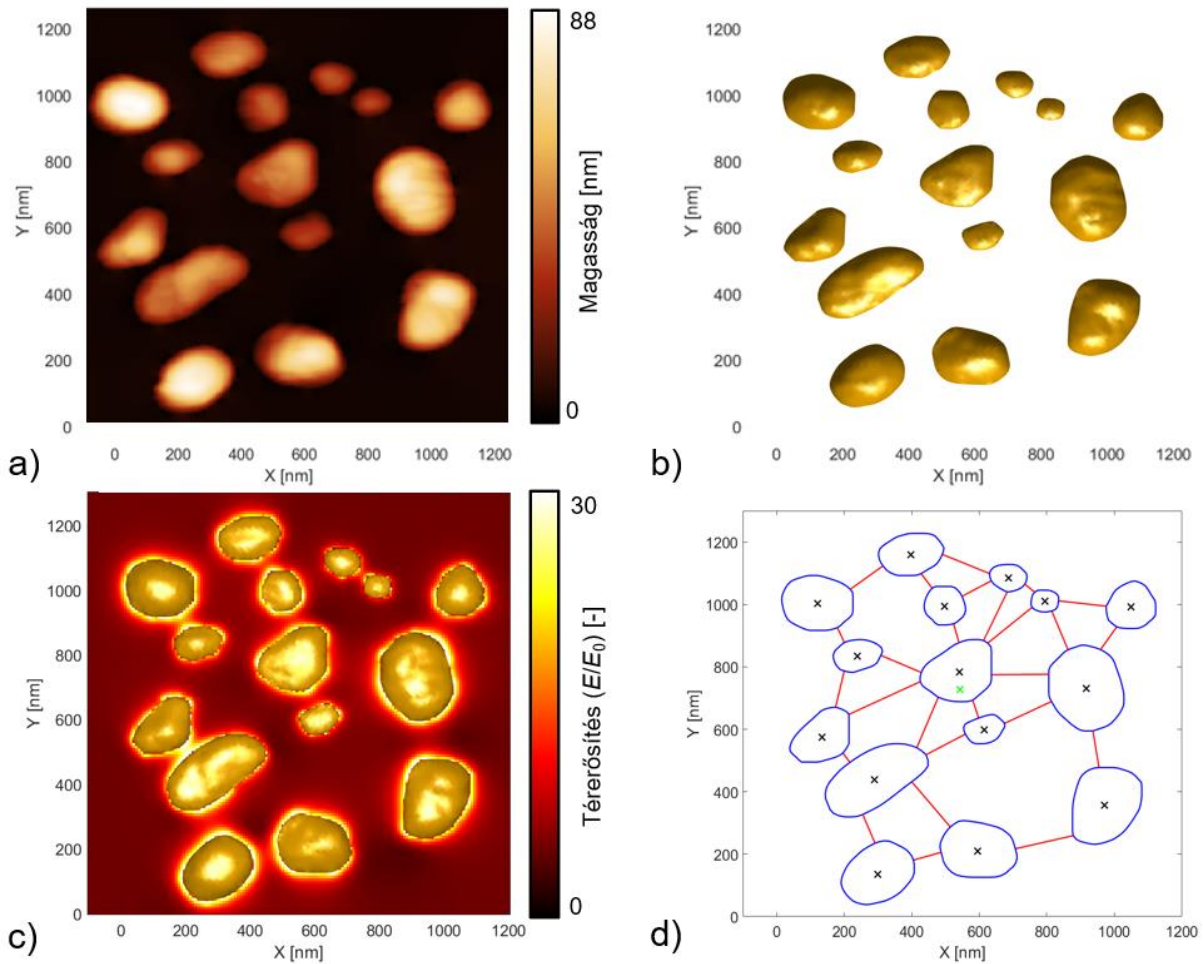
25. ábra. a) Különböző technológiai paraméterekkel (kiindulási rétegvastagság, hőmérséklet és hőkezelési idő) előállított arany nanosziget-rendszerek AFM-képei, alul keresztmetszeti profilokkal. Saját mérések egy Veeco diInnova típusú AFM-mel, kopogtató üzemmódban, Budget Sensors TAP 150-G tűvel [T21]. **b)** A különböző paraméterekkel előállított nanosziget-rendszerek tömbi törésmutató-érzékenysége (RIS) a dimenziómentes D/D_0 függvényében. A nanoszigetek geometriai paramétereinek meghatározása SEM-képek (Hitachi S-4300) alapján történt a National Instruments Vision Assistant szoftverrel [T13].

A 25. ábra a) részén az eltérő technológiai paraméterekkel előállított arany nanosziget-rendszereken készült AFM-képek és keresztmetszeti profilok illusztrálják, hogyan szabályozható a részecskék mérete és sűrűsége az üveghordozó felületén. A b) ábrán látható tömbi törésmutató-érzékenység (RIS) – D/D_0 összefüggés meghatározásához SEM-képeket használtunk. Az ábra minden pontja egy-egy különböző technológiai paraméterrel előállított és így eltérő geometriai tulajdonságokkal rendelkező nanosziget elrendezést jelöl. Bár az összes mérési pontot figyelembevéve a RIS – D/D_0 összefüggés az előző fejezetben látottakra emlékeztető exponenciális jelleget mutat, az eredmények részletesebb kiértékelésénél nem magától értetődő, hogy a mért törésmutató-érzékenység mennyiben a szigetek méretének, illetve a részecskék közötti csatolásnak a következménye. A nanoszigetek alakja egyrészt szabálytalan, másrészt mind a méretük, mind a részecskék közötti távolság nagy szórással rendelkezik. A 25. ábra b) részének adatpontjait az átlagos D és D_0 értékekkel számoltuk SEM-képenként, amely az egyes nanosziget-rendszerek esetén min. 50–100 részecske paramétereinek átlagolását jelenti. Az előző fejezetben láthattuk, hogy a nagyobb részecskék és a kisebb részecskék közötti távolság egymástól függetlenül is nagyobb RIS -t eredményeznek. A nanoszigetek közötti plazmonikus csatolásból származó érzékenységnövekedés így tisztán kísérleti módszerekkel (a RIS optikai spektroszkópiával történő mérésével) nem különíthető el a méret és az alak hatásától, és így közvetlenül nem határozható meg ezekre a komplex rendszerekre.

A probléma kezelésére egy saját modullal bővítettem az MNPBEM-megoldót, amely lehetővé teszi egyedi, szabálytalan geometriák létrehozását AFM-képek alapján. (Az MNPBEM-megoldó eredetileg csak szabályos alakú nanorészecskék, (pl. gömbök, rudak, korongok, kockák, gyűrűk) létrehozását és modellezését tartalmazza). A 26. és 27. ábrákon illusztrált működésű kód felismeri az AFM-képeken a nanoszigetet, 3D struktúrát hoz létre belőlük, majd megalkotja a BEM-részecskemodellt (comparticle-t). A részecskék beolvasása a felhasználó által paramétrezhető (pl. AFM-képpontok mintavételezése) a felületelemek számának optimalizálása érdekében. A modul automatikusan meghatározza a beolvasott nanorészecske-elrendezés geometriai paramétereit. Egy nanosziget átmérőjét a területével egyező (ekvivalens) területű kör átmérőjeként definiáltam, a szigetek közötti távolság pedig az első szomszédok között értelmezett. Az átlagos részecskék közötti távolság meghatározásánál lehetőség van a túl nagy távolságok szűrésére egyedi kondíciókkal pl. $D < n \cdot D_0$ feltétellel (n skálátényező), amely így a csatolás szempontjából nem releváns távolságokat kiszűri.



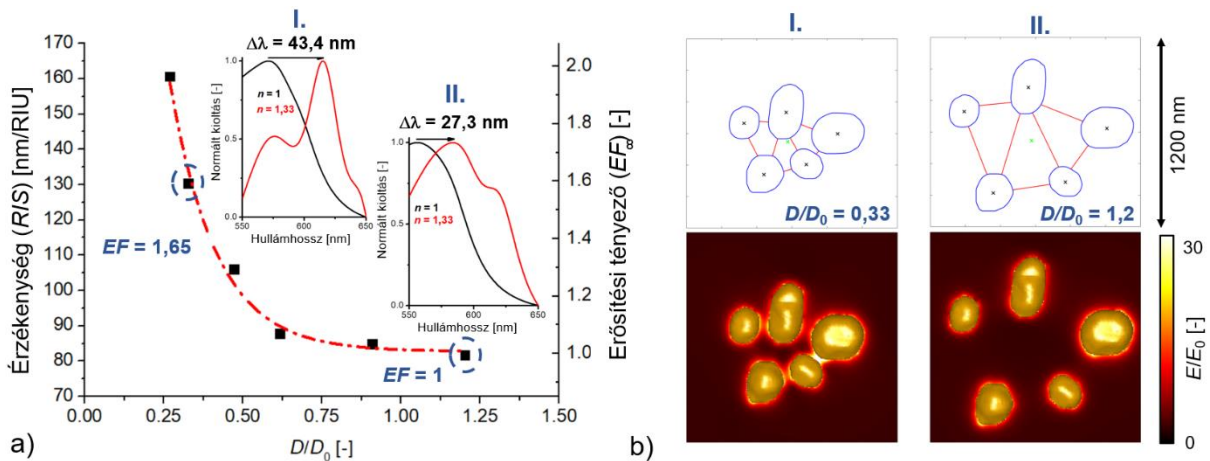
26. ábra. Az AFM-képek alapján felépített BEM-modell létrehozásának lépései. a) AFM-topográfia; b) 3D-struktúra létrehozása; c) a struktúra beolvasása az MNPBEM-megoldóba.



27. ábra. **a)** Egy 15 részecskéből álló nanosziget-rendszer AFM-képe. A részecskéket 7 nm arany vékonyréteg üveghordozóra porlasztása után 2 órán át tartó 500°C-on végzett hőkezeléssel hoztam létre. Az AFM-kép egy Veeco Bruker AFM-mel készült kopogtató üzemmódban, Budget Sensors TAP 150-G tűvel. **b)** Az AFM-kép alapján az MNPBEM-megoldóban létrehozott 3D-modell a részecske-elrendezésről. **c)** Az elektromos térerősség erősítésének (E/E_0) mértéke az elrendezésre 550 nm-es hullámhosszú elektromágneses gerjesztés esetén. Az gerjesztés egy felületre merőleges (Z) irányban haladó síkhullám négy, XY-síkban lineárisan polarizált komponenssel. A polarizáció vektora az X-tengellyel 0°, 45°, 90° és 135°-ot zárt be az egyes komponensek esetén.). **d)** A részecskeelrendezés geometria tulajdonságainak meghatározása (saját kóddal). A kék vonal a részecskék területét jelöli, a piros a részecskék közötti legrövidebb távolságot. A fekete × jelölő a részecskék geometriai középpontját jelöli, a zöld × jelölő pedig az egész elrendezés tömegközéppontját (2D-ben).

A nanoszigetek közötti plazmonikus csatolás érzékenységre gyakorolt hatásának meghatározása szempontjából a modul egy kritikus, általam írt része a nanoszigetek közötti távolság arányos csökkentésének és növelésének lehetősége. A nanoszigetek egymáshoz képesti közelítése/távolítása alaktartó módon sugárirányban történik, az elrendezés tömegközéppontja (zöld × jelölő a 27. ábrán) és az egyes nanoszigetek középpontjai közötti távolság (fekete × jelölők) arányos növelésével, csökkentésével. Egy öt nanoszigetből álló

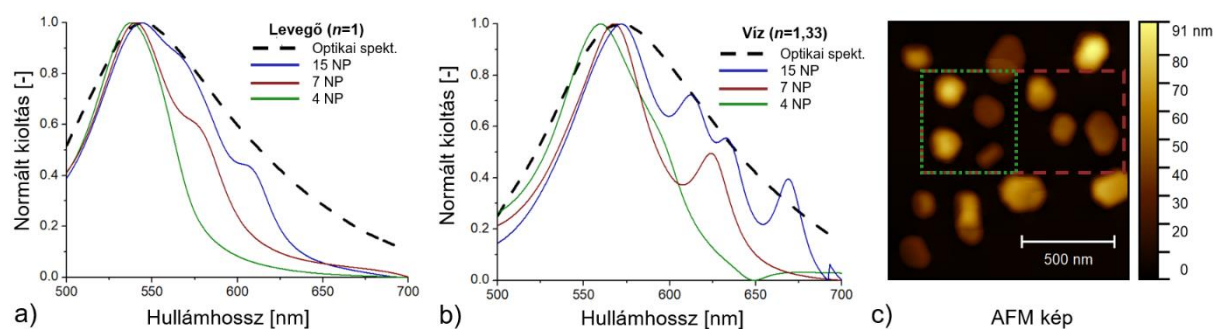
elrendezés esetére láthatunk illusztrációt a 28. ábrán. Az I-es pont az eredeti mért elrendezés az AFM-kép alapján. A térerősítés (E/E_0) térképen jól látható az egymáshoz közeli részecskék közötti plazmonikus csatolás. A II-es pontban az eltávolított részecskék között a csatolás már megszűnt. A $RIS - D/D_0$ görbén (lásd 28. ábra a)) ennek a pontnak az érzékenységét referenciaként választva ($EF_\infty = 1$) az eredeti elrendezés erősítési tényezője meghatározható ($EF_\infty = 1,65$). Az a) ábra spektrumai az érzékenység meghatározásához szimulált kioltási csúcsok helyzetét mutatják két különböző közegben (levegő: $n = 1$, fekete, és víz: $n = 1,33$, piros, $\Delta n = 0,33$) számolva, amelyekből a csúcseltolódás ($\Delta\lambda_p$) meghatározható. Az exponenciálisan illeszkedő görbe felvételéhez (piros, szaggatott) az elrendezés nanoszigeteit különböző mértékben távolítottam/közelítettem egymáshoz.



28. ábra. a) Egy öt részecskéből álló nanosziget-rendszer esetén az AFM-képből alkotott MNPBEM-modell alapján meghatározott tömbi törésmutató-érzékenység és belőle számolt erősítési tényező (lásd (17) egyenlet) a dimenziómentes D/D_0 függvényében. A D/D_0 értéket a szimulációkban a részecskék egymáshoz képesti arányos közelítésével és távolításával változtattam. Ehhez az elrendezés tömegközéppontja (zöld marker) és a részecskék középpontja (fekete marker) közötti távolságot növeltem/csökkentettem egyenlő mértékben (vagyis a részecskék közelítése/távolítása az elrendezés középpontjához képest sugárirányban történt). A b) ábra illusztrálja az I-es és II-es pontokban a részecskeelrendezést és a geometriai viszonyokat, valamint az elektromos térerősség erősítésének (E/E_0) mértékét 550 nm-es hullámhosszú elektromágneses gerjesztés esetén.

A 28. ábráról levonható egyik fontos következtetés alapján a változó alakú és mérettel rendelkező komplex nanorészecske-rendszerek is az exponenciális $RIS - D/D_0$ összefüggésnek engedelmeskednek (rögzített D_0 és változtatott D esetén). A másik levonható következtetés az, hogy az eljárással a plazmonikus csatolásból adódó érzékenységnövekedés elkülöníthető a változó nanosziget alak és méret hatásától. A vizsgált öt nanoszigetből álló rendszer érzékenysége csatolatlan nanoszigetek esetén kb. 80 nm/RIU lenne, ami a csatolás hatására 132 nm/RIU-ra nőtt ($EF_\infty = 1,65$). A különböző komplex nanorészecske-rendszerek csatolása így számszerűsíthetővé és egymással összevethetővé válik.

Az eredmények értelmezésével kapcsolatban fontos megjegyezni, hogy egy adott technológiai paraméterekkel előállított nanosziget elrendezés pontos jellemzéséhez minél több nanosziget együttes vizsgálata szükséges. A kiragadott, alacsony részecskeszámú esetek, mint például a 28. ábra szorosan csatolt szigetcsoportja nem reprezentatív a teljes elrendezésre nézve, további részecskék bevonásával a számolt EF csökken. A feladat nagy számítási igénye miatt a jövőben a debreceni együttműködésünk keretein belül, a debreceni KIFÜ-szuperszámítógép (Kormányzati Informatikai Fejlesztési Ügynökség) segítségével, min. 20 db nanoszigetet tartalmazó AFM-képek alapján tervezzük a különböző technológiákkal előállított nanosziget-rendszerek összehasonlítását. A 29. ábrán látható módon a szimulációba bevett részecskék számának növelése egyre jobban közelíti a valóságban a makroszkopikus mintán mérhető elnyelési spektrumokat.



29. ábra. AFM-képek alapján nanosziget-elrendezésekre számolt kioltási spektrumok levegőn (a) és vízben (b). A c) ábrán látható AFM-képen a zöld négyzet jelöli a négyrészecskés elrendezést (4 NP, zöld), a piros téglalap a hétrészecskés elrendezést (7 NP, piros), a teljes kép pedig a 15-részecskés elrendezést (15 NP, kék). A fekete szaggatott vonalak a mintán optikai spektroszkópiával (Avantes Avaspec 2048-4DT) mért elnyelési spektrumok levegőn és vízben. Az összevethetőség végett a spektrumokat normáltam.

Az AFM-képek alapján végzett BEM-szimulációk relevanciájával kapcsolatban három fontos limitáló tényezőt ki kell emelni.

1) Az AFM-méréstechnikából adódóan, a pásztázást végző tű geometriájának és a nanoszigetek geometriájának konvolúciója miatt a nanoszigetek laterális mérete a valóságostól nagyobb lehet a képeken. Ez egy AFM-méréstechnikában ismert probléma, ami ellen a felületi struktúrákhoz viszonyítva jelentősen hegyesebb tű használatával, illetve utólagosan a tű geometriájának modellezésével és dekonvolúcióval védekezhetünk [159]. Mivel a nanoszigetek alapvetően lapos struktúrák (a struktúrák magasság/átmérő aránya átlagosan 0,5 alatti), megfelelően hegyes és tiszta tű esetén a nanoszigetek laterális méretnek tágulása kb. 10–15%-ra becsülhető [160]. Mivel azonban a nanoszigetek közötti plazmonikus csatolás mértéke nagyon érzékenyen függ a szigetek közötti távolságtól, ez a hatás is jelentős lehet. A saját AFM-képeket ezért a modulba történő beolvasása előtt a Gwyddion nevű szoftver segítségével előkészítettem, és a struktúrákból dekonvolúcióval kivontam egy a szoftver által becsült tűgeometriát.

2) Bár az MNPBEM-megoldó lehetővé teszi a részecskék alatti üveghordozó figyelembevételét a modellben, a szubsztrátum használata jelentősen megnöveli a számítási igényt és a futási időt. A saját futtatásaimban ezért a hordozó nem volt figyelembevéve a 29. ábra számolásainak kivételével. Ebben az esetben a retardált helyett a kvázistacionárius megoldót használtam és a nanosziget elrendezés alá egy 1,51-es törésmutatójú, üveghordozót modellező szubsztrátumot helyeztem. A disszertáció írásának idején Szántó Géza doktoranduszommal dolgozunk az üveghordozó eredményekre gyakorolt hatásának feltérképezésén, valamint a szimulációkban történő minél hatékonyabb figyelembevételén.

3) A nanoszigetek számának növelése a modellben jelentősen növeli a számítások memóriaigényét és a futási időt is. A felületelemek száma csökkenthető a beolvasott részecskék felbontásának csökkentésével, a geometria pontosságának kárára. A sokrészecskés (min. 20 db nanoszigetet tartalmazó) elrendezések vizsgálatához a debreceni KIFÜ-szuperszámítógépének kapacitásait tervezzük igénybe venni.

3.5. Kitekintés, az eredmények hasznosulása

A tömbi törésmutató-érzékenység erősítési tényezőt (*EF*) 2016-ban vezettem be nanorészecskék között fellépő plazmonikus csatolásból származó érzékenység (*RIS*) erősítésének számszerű jellemzésére [T16]. A formalizmust azóta Szántó Géza (Dr. Csarnovics Istvánnal közös doktoranduszunk) bevonásával sikerrel alkalmaztuk számos, különböző alakú és összetételű arany nanorészecskéből álló rendszer optimalizálására. Vizsgáltuk többek között arany és ezüst nanokockákból és nanogömb dimerekből álló részecskerendszerek távolságtól függő érzékenységét [T14], [T19]. Megmutattuk továbbá, hogy kis átalakítással az erősítési tényező formalizmus alkalmas mag-héj nanostruktúrák, illetve belőlük felépített kétrészecskés rendszerek esetén a mag, illetve héj sugárány, illetve részecskék közötti távolság optimalizálására, az érzékenység maximalizálásának érdekében [T1], [T5]. A disszertáció írásának időpontjában egy nemzetközi együttműködés keretein belül a jénai Leibniz Intézet Bionanofotonika Csoportjánál (Leibniz-IPHT) kísérletileg előállított arany és ezüst nanoprizmák érzékenységének optimalizálását segítjük szimulációinkkal. Ezen közös eredményekből tézist nem kívánok megfogalmazni.

Az üveghordozón hőkezeléssel létrehozott arany nanoszigetek létrehozásával és optimalizálásával 2013 óta foglalkozunk a Debreceni Egyetem Kísérleti Fizika Intézetének munkatársaival együttműködésben. Részeredmények után [T18], [T21], [T22] a 2018-ban megjelent cikkünk foglalja össze a technológia optimalizálásának eredményeit LSPR- és SERS-alkalmazásokhoz [T13]. Utóbbi területet azóta Pál Petra (Dr. Csarnovics István doktorandusza) vitte tovább sikeresen [161], [162]. A tervezést segítő MNPBEM-megoldóhoz fejlesztett programom 2020-ra érte el végső formáját, ennek gyakorlatba ültetésén a disszertáció megírásának idején is dolgozunk Szántó Géza doktorandusszal.

4. Plazmonikus nanokompozit fejlesztése SERS- és LSPR-alkalmazásokhoz

4.1. A fejlesztés háttere

A fejezetben bemutatásra kerülő plazmonikus nanokompozit fejlesztésének története a disszertáció írásának idején már közel hét évre nyúlik vissza. 2014-2015 között meghívott előadóként részt vettem az EUROTRAINING (FP7 – 316526) „Train-the-trainers” előadás sorozatán, amelynek során nyolc alkalommal tartottunk kétnapos továbbképzést „Nanotechnology for Electronics” témakörben közép-kelet-európai városok felsőoktatási intézményeiben (Bukarest, Kolozsvár, Temesvár, Újvidék, Rzeszów, Kassa, Brno és Budapest) [163]. 2015 március 24–25-én a Brnói Műszaki Egyetemen (Brno University of Technology) tartottunk kurzust az egyetem, és a vele szoros együttműködésben álló CEITEC-kutatóintézet (Central European Institute of Technology) hallgatóinak és munkatársainak. Az „Enhancing Biosensors with Nanotechnology” (Bioérzékelők tulajdonságainak javítása nanotechnológiák segítségével) című előadásomban szó volt a plazmonikus elvű bioérzékelők fejlesztési lehetőségeiről, és arról is, hogy milyen elvárásaink lennének egy „ideális” nanotechnológiával szemben, az LSPR-szenzorok tulajdonságainak optimalizálása szempontjából (lásd. 2. fejezet).

Az előadásom után egy érdeklődő hallgató, Tomáš Lednický, megkeresett, hogy szeretné, ha vetnék egy pillantást a technológiára, amivel a diplomája kapcsán dolgozik, mivel szerinte az kis átalakításokkal alkalmas lehetne LSPR-szenzorok előállításához, és eleget tesz az általam felsorolt komplex kritériumrendszernek. Tomáš a diplomájában pórusos alumínium-oxid (PAA) előállításával és karakterizálásával foglalkozott, a létrehozott nanostruktúrákat pedig sablonként többrétegű nanostruktúrák (nanovezetékek) szintézisére használta [164]. A technológia felkeltette az érdeklődésemet és kezdetét vette az éveken át tartó együttműködésünk, ami kapcsán fontosnak érzem kiemelni, hogy dedikált (formális) finanszírozási keretek nélkül, a lelkesedésünk által hajtva zajlott. A közös ötleteink fizikai megvalósítása, az arany–epoxi plazmonikus nanokompozit kifejlesztése a CEITEC-ben történt és döntően Tomáš érdeme, nem jöhetett volna létre magasszintű szakmai jártassága, ügyessége és legfőképpen kitartása nélkül. A technológia fejlesztése a 2021 tavaszán befejezett PhD-értekezésének jelentős részét képezi [165]. Az előállítási technológia részletes háttere kifejtésre kerül Tomáš disszertációjában, én csak az alkalmazások megértése szempontjából szükséges részletességgel fogom tárgyalni azokat. Az általa előállított nanokompozitok tesztelése és LSPR-alapú nukleotidérzékelőként, valamint SERS-felületként történő alkalmazása a BME-ETT-n, illetve a Wigner FK-val együttműködésben történt.

A nanokompozitok továbbfejlesztése jelen disszertáció írása idején is tart, az új generációs szenzorelemek alkalmazását új nemzetközi partnerekkel terjesztjük ki (Leibniz-IPHT, Jéna, Németország, illetve Minhói Egyetem, Portugália). Ezekről az irányokról röviden említést teszek a 4.7. alfejezet kitekintésében.

4.2. Kísérleti eszközök és módszerek

A nemzetközi együttműködés keretein belül fejlesztett arany–epoxi nanokompozitok előállítására és tesztelésére a CEITEC-ben, további tesztelésére és alkalmazására a BME-ETT-n és a Wigner FK-ban történt. A minták előállítását, morfológiai és optikai vizsgálatát Tomáš Lednický végezte a CEITEC-ben. Az elpostázott nanokompozitokat Budapesten LSPR-szenzorként és SERS-hordozóként is teszteltük. Az LSPR-alapú nukleotidérzékelős kísérleteket (4.4 fejezet) teljes egészében személyesen végeztem el, a SERS-méréseket Shereen Zangana doktoranduszom hajtotta végre (4.5 fejezet), a Wigner FK részéről Dr. Rigó István és Dr. Veres Miklós segítségével.

A minták morfológiáját a CEITEC-ben pásztázó, transzmissziós, illetve pásztázó-transzmissziós elektronmikroszkóppal (SEM, TEM, ill. STEM) is vizsgálták. A SEM-képek egy FEI Verios 460L berendezéssel készültek, szekunder elektron üzemmódban, 5 kV gyorsítófeszültséggel. A TEM-vizsgálatokhoz a minták vékonyítását (kb. 100 nm-re) FIB-SEM Tescan LYRA3, illetve FEI Helios NanoLab 660 berendezésekkel végezték. A TEM- és EDS-képek (energiadisziperzív röntgenspektroszkópia) egy Carl Zeiss LIBRA200FE berendezéssel készültek, egy Bruker Quantax 200 EDS-detektorral. Az STEM-képek a FEI Helios NanoLab 660 berendezéssel készültek, világos látóterű üzemmódban, 30 kV gyorsítófeszültséggel. A minták felületi elemösszetételének vizsgálata XPS segítségével (röntgenfotoelektron-spektroszkópia) történt, egy Kratos Analytical AXIS Supra berendezéssel, és egy monokromatikus Al K α forrással (1486.6 eV).

A CEITEC-ből postai úton megkapott arany–epoxi nanokompozit mintákat használat előtt oxigén plazmával tisztítottuk, egy Diener Atto berendezéssel, 20 W teljesítmény, 0.4 mbar nyomás mellett. A tisztítás időtartama 15 s – 90 s között változott, 15 s-os lépésekben. Tisztítás előtt és után a hordozók állapotát optikai spektroszkópiával vizsgáltuk, amennyiben tisztítás után a spektrum változott, úgy megismételtük a 15 s-os tisztítási lépést, a spektrum stabilizálódásáig.

Az optikai spektroszkópiás mérésekhez Budapesten egy Avantes Avaspec 2048-4DT spektrométert és Avantes Avalight DHS halogén fényforrást használtunk, a látható hullámhossz tartományon (500–700 nm). A CEITEC-ben erre a célra egy Ocean Optics JAZ spektrométert használt Tomáš, szintén halogén fényforrással. A szenzorelemek tömbi törésmutató-érzékenységeinek (*RIS*) meghatározásához levegőn és vízben mértük az abszorpciós spektrumot, a *RIS* linearitásának ellenőrzéséhez Budapesten különböző koncentrációjú szacharóz vizes oldatokat használtam. A spektrumok kiértékelését (abszorpciós csúcs meghatározása illesztés után) mindkét helyszínen egy általam írt MATLAB-alapú szoftverrel végeztük.

Minden LSPR- és SERS-kísérlethez (DNS-immobilizáció, hibridizáció, öblítés) azonos pufferoldatot használtunk 0,75 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 6,8, Millipore vízben oldva. Az LSPR-kísérleteknél vizsgáltam a puffer ionerősségének a hatását, 0,5; 0,75; ill. 1 M-os NaCl

koncentráció és azonos foszfát koncentráció (50 mM Na₂HPO₄) mellett. A receptor- és cél-DNS-molekulák egyaránt 20 bázis hosszúságú szekvenciák, az 5'→3' irányban: CGTACATCTTCTTCCTTTTT-[ThiC6]; ill. AGGAAGAAGATGTACGACCA bázisokkal (Sigma Aldrich, Németország). A receptor-DNS-molekulák immobilizációja az arany nanorészecskék felületére 1 μM-os oldatból, egy éjszakán keresztül (kb. 16 óra) történt. Immobilizáció után a chipet 30 percre 1 mM-os 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) oldattal kezeltük a nem-specifikusan kötött DNS-molekulák felületről történő eltávolítása érdekében. A cél-DNS-molekulák hibridizációjára 2 órát hagytunk. Minden lépés között a szenzorelemek felületét alaposan leöblítettük pufferrel. Az LSPR-méréseket puffer környezetben végeztük, a szenzorelem felületére cseppentett puffert egy mikroszkóp tárgylemezzel fedtük le. A SERS-méréseket a felület száradása után végeztük.

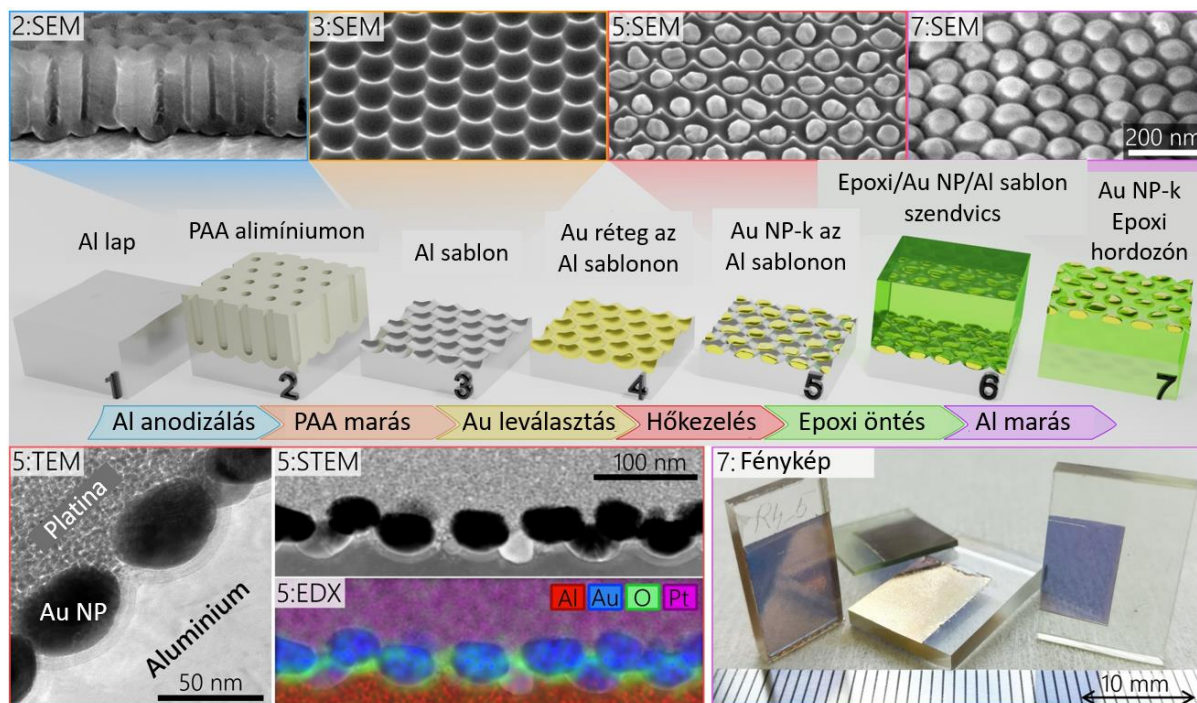
A SERS-kísérleteket a Wigner FK-ban egy Renishaw InVia micro-Raman-spektrométerrel végeztük. A gerjesztő lézer hullámhossza 788 nm volt, 100% teljesítménnyel. Az expozíciós idő 10 s volt, és 5 spektrumot gyűjtöttünk (akkumuláltunk). Megjegyzendő, hogy a 788 nm-es gerjesztés nem esik egybe az arany-epoxi nanokompozitok plazmonikus elnyelési csúcsával (kb. 535–625 nm, közegektől és molekuláris rétegtől függően). Végeztünk tesztek a plazmonrezonanciához közelebb eső gerjesztésekkel, 532 nm és 633 nm-es lézerekkel is, de úgy találtuk, hogy ezeken a hullámhosszokon igen alacsony lézer teljesítmény (1%) mellett is sérül a felület. A jelenséget szemmel látható elszíneződés, a karakterisztikus DNS-molekulára jellemző Raman-sávok eltűnése és amorf szénre jellemző csúcsok megjelenése kíséri, és feltételezhető oka az epoxi hordozó degradációja termikus hatások következtében. A 788 nm-es gerjesztés mellett, maximális lézerteljesítmény esetén sincs nyoma az epoxi hordozó sérülésének, a karakterisztikus Raman-csúcsok intenzívek és időben is stabilisak [T11].

A Raman-méréseket két üzemmódban végeztük. A *normál üzemmód* esetén a nanokompozit felületére fókuszált lézernyaláb átmérője kb. 1,8 μm volt, amit egy 50× objektív állított elő (LWD50X, NA = 0,55). Ennél az üzemmódnál a fókuszt manuálisan állítottuk be a Raman-spektrum folyamatos mérésével, a csúcsok intenzitásának maximalizálásával. A *Z-scan* üzemmód esetén a fókuszt egy Renishaw MS30 precíziós motorizált mintaasztal (encoded stage) segítségével 100 nm-es lépésekkel automatizáltan változtattuk maximum -20 μm – 20 μm mélységi tartományon belül. A konfokális optikai rendszer így lehetővé teszi a hordozó felületre merőleges irányú térképezést, kb. 100 nm-es felbontással.

4.3. Az előállítási technológia bemutatása

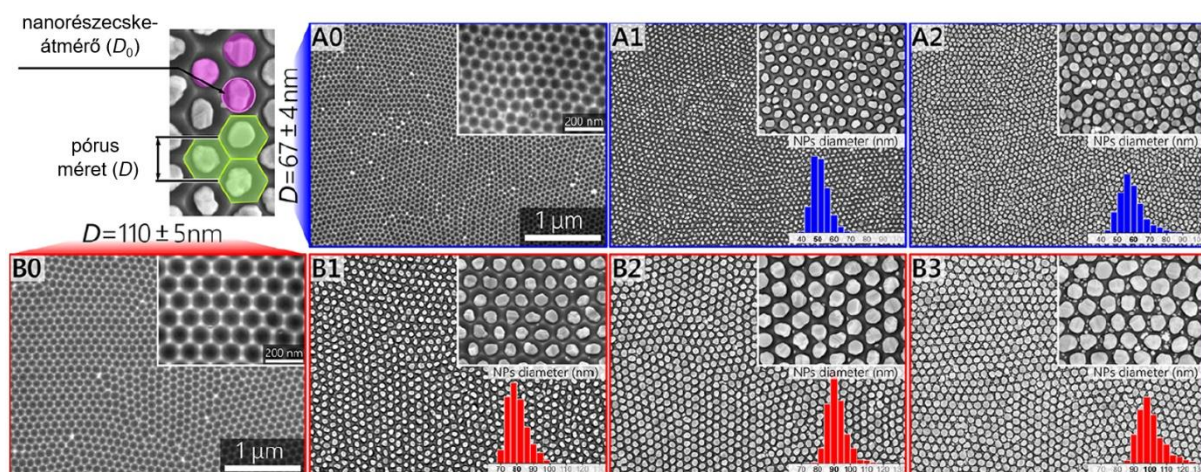
4.3.1. A nanorészecske-elrendezés kontrollálása

Az Au NP–epoxi felületi nanokompozit szenzorelemek előállítási technológiáját a 30. ábra szemlélteti. A sablon alapját egy alumínium lemezből (99.999%, 250 μm vastag, Goodfellow) kivágott, 25 mm \times 50 mm alapterületű lap képezi, amely az anódos oxidálás előtt mechanikai polírozáson, hőkezelésen és elektrokémiai polírozáson is átesett [T10]. Az anódos oxidálás két eltérő környezetben történt. Az A-típusú minták esetén (lásd 31. ábra) az oxidálás 0,3 M-os kénsavban történt 25 V előfeszítés mellett, 0°C-on 15 órán keresztül, míg a B-típusú mintákhoz 0,3 M-os oxálsavat használtunk, 40 V előfeszítés mellett, 7°C-on 20 órán keresztül. A technológiai paraméterek korábbi optimalizálási munkákon alapulnak [114], [164], [165]. Az így kialakuló, kb. 50 μm vastag pórusos alumínium-oxid (PAA) hexagonálisan rendezett cellái 67 ± 4 nm és 110 ± 5 nm átmérőjűek az A- és B-típusok esetén. A PAA szelektív eltávolítása 0,42 M-os foszforsav és 0,2 M króm-trioxid vizes oldatának keverékével történt, 65°C-on 2 óra alatt, amit ioncserélt vízben majd metanolban történő ultrahangos tisztítás követett. A kialakuló nanotálas sablonok SEM-képei (A0, B0) láthatók a 31. ábrán.



30. ábra. A plazmonikus arany NP–epoxi felületi nanokompozit szenzorelemek előállítási technológiájának részletes illusztrációja. A technológia lépései: 1) A kiindulási alumínium lap tisztítása és polírozása. 2) PAA létrehozása az Al felületen kontrollált anódos oxidálással. 3) A PAA marása után létrejön a nanotálas sablon. 4) Arany vékonyréteg leválasztása a sablon felületére. 5) A nanorészecskék létrehozása hőkezeléssel. 6) Epoxigyanta öntése, majd kikeményítése a sablon és a nanorészecskék tetején. 7) Az alumínium hordozó eltávolítása kémiai marással, létrejön a felületi nanokompozit. A SEM-, TEM- és EDX-képek a folyamat egyes lépéseit illusztrálják. A 7. pontban az elkészült szenzorelemek láthatóak [T10].

A következő lépésekben arany vékonyréteg-leválasztással, majd utólagos hőkezeléssel kialakított nanorészecskék pozícióját a nanotálak elrendezése és a pórusok mérete (D_p) határozza meg. A nanotálak hexagonális rendezettsége pár μm -es átmérőjű doménekben belül teljesen hibahely mentes. A részecskék közötti távolság (D) a részecskék átmérőjével (D_0) szabályozható, a legegyszerűbb közelítéssel $D = D_p - D_0$. A nanorészecskék átmérője azonban nem változtatható folytonosan: a technológiai paraméterek függvényében (a leválasztott vékonyréteg vastagsága, a hőkezelés hőmérséklete és ideje) csak bizonyos munkapontokban érhetünk el jó minőségű nanorészecske-elrendezést, amely mentes a részecske-összenövésektől, illetve a nagy, hexagonálisan elrendezett részecskék közötti kisméretű törmelékektől (pl. 31. ábra B3 esetén). Az optimális munkapontok kiválasztásának részletes indoklása megtalálható a cikkünk kiegészítő információ között [T10], a megfigyelt jelenségek jó egyezést mutatnak a nanorészecskék hasonló sablonon hőkezeléssel történő előállítását tárgyaló korábbi munkákkal [115], [166], [167].



31. ábra. A nanorészecskék mérete és elrendezése fölötti kontroll illusztrációja SEM-képekkel. Az A0 és B0 képeken a két eltérő anódos oxidálással (25 V, kénsavban, illetve 40 V oxálsavban) készült nanotálak sablonok felülete látható részecskék nélkül. Az A1, A2, illetve B1, B2 és B3 nanorészecske-elrendezések arany vékonyrétegek ismételt leválasztásával és hőkezelésével készültek (a pontos paramétereket lásd a szövegben) [T10].

A nanorészecskék átmérője tehát diszkrét lépésekben, rétegleválasztás és hőkezelés szekvenciális ismétlésével változtatható. Az optimális rétegvastagságok 6 nm + 5 nm az A1 és A2 típusú minták esetén, illetve 8 nm + 7 nm + 5.5 nm a B1, B2 és B3 típusú minták esetén. A hőkezelési hőmérséklet és idő 300°C és 5 perc, minden lépésnél. Ahogy a 30. ábra TEM-képein látható, a kialakuló nanorészecskék nem szabályos gömbök, az alakjuk sferoidként (kéttengelyű forgási ellipszoidként) közelíthető. A részecskék méretének meghatározása TEM-és SEM-képek alapján történt, az átlagos méreteket az 1. táblázat foglalja össze. A szabálytalan alak miatt a részecskék átmérőjének (D_0) definiálása nem magától értetődő, ezért ezt két megközelítéssel is meghatároztuk. Az átlagos méret szempontjából helyesebb megközelítés alapján a sferoid nanorészecskék hosszabb tengelyét felülnézeti SEM-képek alapján a

nanorészecskék területével megegyező területű kör (EK) átmérőjeként határozhatjuk meg [165]. Mivel a szenzorelemek alkalmazása során a nanorészecskék között kialakuló legkisebb távolságok kritikusak a térerősség szempontjából, a nanorészecske-átmérőt a nanorészecskéket befoglaló legkisebb átmérőjű kör (BK) átmérőjeként is megadtam [T10]. A részecskeméret-eloszlás figyelembevételével a 4.5. fejezet SERS-alkalmazása kapcsán fogok részletesen foglalkozni. A táblázatból látható, hogy a nanotálás sablon segítségével előállított nanorészecske-elrendezések D/D_0 értéke három típus esetén is (A2, B2, B3) előnyösebb, mint a sablonmentes hőkezeléssel üveg felületen előállított nanoszigetek esetén elért legjobb $D/D_0 = 0,4$ érték (lásd 3.4. alfejezet, 25. ábra). A technológia további nagy előnye, hogy a 31. ábrán szemléltetett szabályos hexagonális részecske elrendezés több cm^2 felületen valósul meg, ahogy a 30. ábra fényképén, a kész szenzorelemekeken látszik.

1. Táblázat. A különböző típusú nanorészecske-elrendezések geometria tulajdonságainak (átmérő/vastagság arány, ill. D/D_0) összefoglalása.

Sablon típusa	A-típus ($D_p=68\pm 3$ nm)		B-típus ($D_p=109\pm 4$ nm)		
Minta típusa	A1	A2	B1	B2	B3
Átlagos átmérő (D_0), ekvivalens területű kör [165]	39,0 \pm 1,8 nm	52,9 \pm 1,5 nm	65,3 \pm 1,4 nm	83,1 \pm 1,9 nm	86,5 \pm 2,0 nm
Átlagos D/D_0 (EK)	0,74	0,28	0,68	0,31	0,17
Átmérő/vastagság arány [165]	2,3	1,7	1,9	1,7	1,5
Átlagos átmérő (D_0), legkisebb befoglaló kör [T10]	51 \pm 5 nm	60 \pm 7 nm	79 \pm 6 nm	92 \pm 6 nm	102 \pm 9 nm
Átlagos D/D_0 (BK)	0,33	0,13	0,38	0,18	0,07

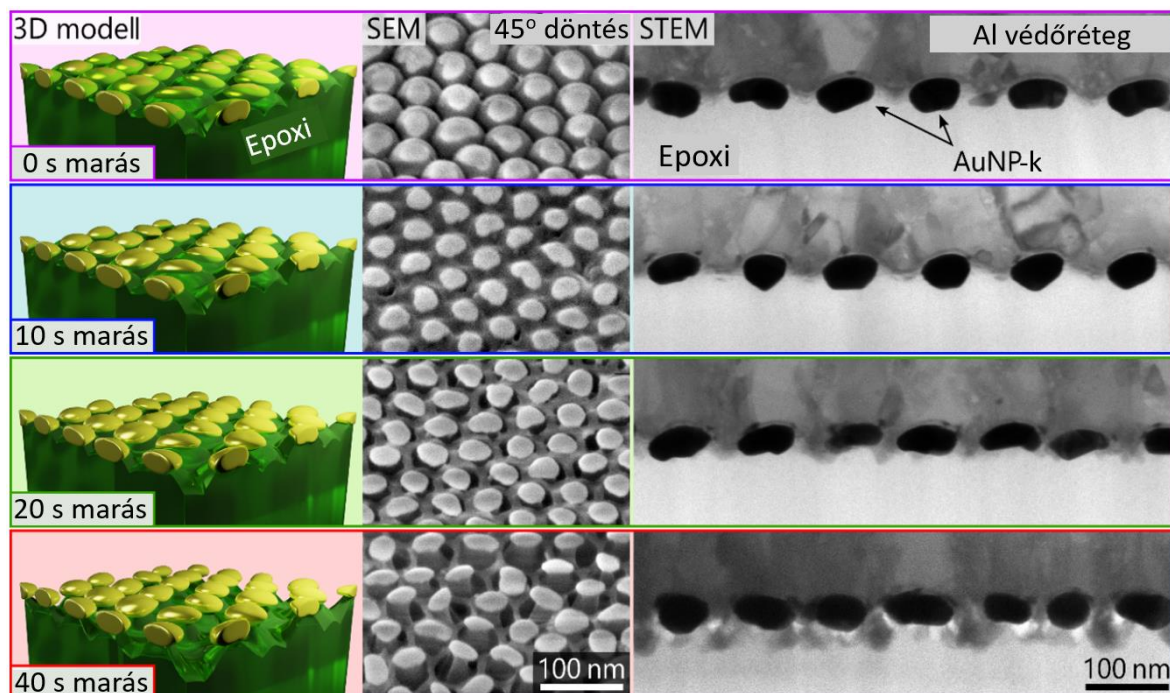
4.3.2. A nanorészecske-elrendezés transzferálása és a stabilitás vizsgálata

A plazmonikus szenzorelemek előállításának egy kritikus lépése a nanorészecske-elrendezés transzferálása (átültetése) egy optikailag átlátszó, villamos szempontból szigetelő hordozóra. A szintézishez használt alumínium sablon egyrészt nem teszi lehetővé a transzmissziós LSPR mérési elrendezésben történő alkalmazást, másrészt, mivel a részecskék nem tapadnak jól a sablon felületéhez, áramló folyadék közegben a nanorészecske-elrendezés integritása sérülne. Az átültetés során fontos, hogy megőrizzük a nanorészecskék elrendezését, ne veszítsünk részecskét és elkerüljük az egymással való összetapadásukat is. A nanorészecskék funkcionalitásának megőrzése érdekében fontos, hogy a felületük tiszta és elérhető legyen, vagyis ne sülljedjenek bele a polimer hordozóba. A technológiának így tartalmaznia kell egy tisztítási lépést, ahol az alumínium sablon kémiai marása után (lásd 7. lépés a 30. ábrán) plazmamarás segítségével távolítjuk el a nanorészecskék felületét esetlegesen borító polimert. A plazmamarást precízen kell kontrollálni, túlmarás (alámaródás)

esetén a részecskék leválhatnak a polimer hordozóról. A jó tapadás elengedhetetlen mikrofluidikai környezetben, ahol a részecskék áramló folyadéknak vannak kitéve.

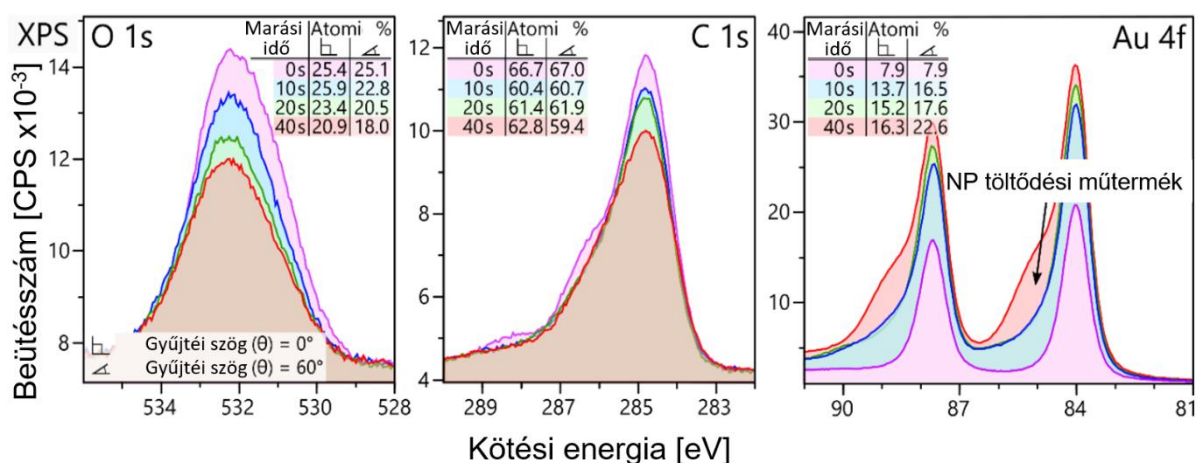
Az évek során több átlátszó polimert is kipróbáltunk hordozóként. Bioérzékelős alkalmazásokat szem előtt tartva, a mikrofluidikai rendszerekkel való könnyű integrálhatóság végett a PDMS (dimetil-polisziloxán) és PMMA (poli(metil-metakrilát)) volt a két elsősorú jelöltünk, de egyik polimerrel sem sikerült megőrizni a nanorészecske-elrendezés funkcionalitását az átültetés után. Bár eltérő technológiával előállított Au NP – PDMS felületi nanokompozitokkal hoztak létre működőképes LSPR-bioérzékelőket [103], [104] és mi is sikerrel használtuk őket SERS-re [T15], részletes vizsgálatok során úgy találtuk, hogy ezen érzékelők stabilitása rendkívül rossz. A térhálósított PDMS-hordozóból a nem teljesen kötött, elmozdulásra képes láncok idővel (napok alatt) elszennyeznek az arany nanorészecskék felületét, ami nagyfokú érzékenység romlással jár. A PDMS ellenállósága miatt ráadásul nehezen távolítható el az arany felületéről, például fluor tartalmú plazmamarással (pl. SF₆:O₂ gázok 5:1 arányú keverékével), ami bonyolítja a technológiát. (A részletek bemutatására területi okokból nincs lehetőség, az eredmények publikálása előkészítés alatt áll). A PMMA esetén a problémát az alacsony üvegesedési hőmérséklet (105°C) jelenti, ami miatt plazmamarás közben a hordozó könnyen meglágyul, ami a nanorészecskék hordozóba süllyedésével jár.

A problémákat egy kétkomponensű epoxigyantával sikerült kiküszöbölni (Elan-tron W 363 és EC 570, 100:33 tömegarányban). Az epoxi előnye, hogy a termoplasztikus (hőre lágyuló) PMMA-val szemben egy termoszet (hőre keményedő) polimer, aminek a termikus és kémiai ellenállósága is jobb. A PDMS-sel szembeni előnye, hogy egyszerű oxigén plazma segítségével kontrolláltan marható, ami nem teszi szükségessé veszélyes gázok alkalmazását.



32. ábra. 3D-illusztrációk (bal), SEM-képek (középső oszlop) valamint STEM-képek (jobb) az epoxigyanta szelektív plazmamarásának szemléltetésére egy B1-típusú minta esetén. [T10]

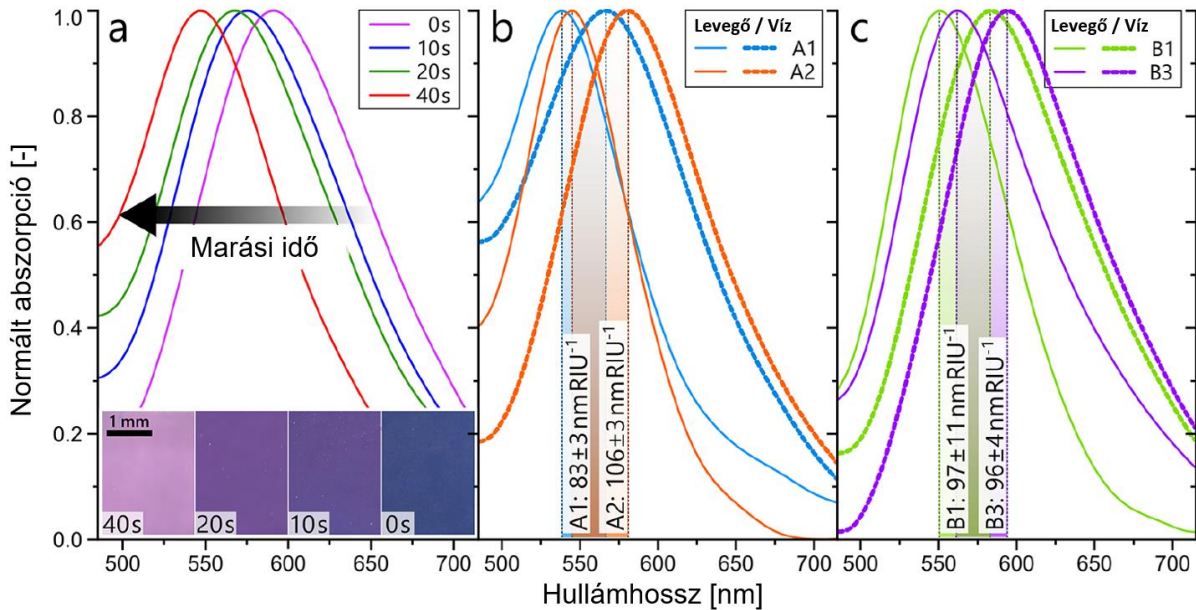
Az alumínium sablon felületén lévő nanorészecske-elrendezésre öntve az epoxigyantát, kikeményítés után (12 óra, 50°C-on) egy kb. 3 mm vastag hordozó formálható, amely az alumínium sablon eltávolítása (35%-os sósav és 2 M réz(II)-klorid vizes oldatának keverékével) és tisztítás után a 30. ábrán látható szenzorelemekké áll elő. Az epoxigyanta plazmamarása a CEITEC-ben egy PlasmaPro 80 RIE-berendezéssel (Oxford Instruments Plasma Technology) történt 6,7 Pa nyomás, 50 W teljesítmény és 50 sccm O₂ gáz áramlási sebesség mellett. A különböző ideig (0 s, 10 s, 20 s és 40 s) mart Au NP–epoxi felületekről készült SEM-képeket láthatunk a 32. ábrán, a kialakuló, „nanogombákra” emlékeztető struktúrákat szemléltető 3D-illusztrációval. A mintákról plazmamarás előtt és után készült XPS-spektrumokat mutatja a 33. ábra. A spektrumok megerősítik a SEM- és STEM-képeken látható változásokat, az epoxira jellemző karakterisztikus oxigén- és szén-csúcsok folyamatosan csökkennek, míg az arany csúcsának intenzitása nő a plazmamarás idejének függvényében.



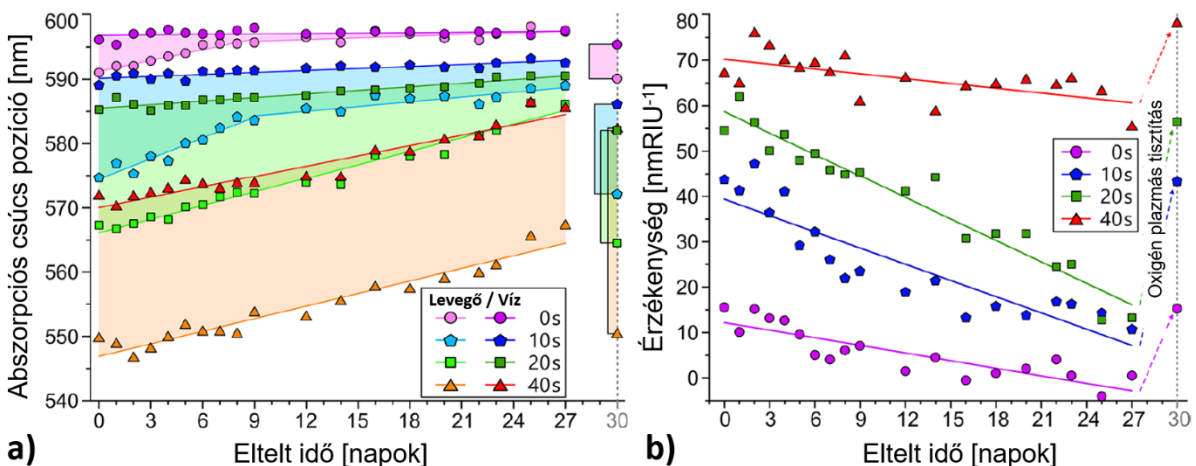
33. ábra. Különböző ideig (0 s, 10 s, 20 s és 40 s) plazmamarásnak kitett B1-típusú Au NP–epoxi nanokompozitok XPS-spektrumai. A mérések a 32. ábrán látható mintákon készültek. A spektrumok az O 1s (bal), C 1s (közép) és Au 4f karakterisztikus csúcsok intenzitásának változását (CPS: counts per second, másodpercenkénti beütésszám) szemléltetik, 60°-os gyűjtési szög (θ) mellett. A spektrumok melletti táblázatok a plazmamarási idő függvényében az elemek becsült atomszázalékát adják meg 0° és 60° gyűjtési szögek esetén. [T10]

Az epoxi arany felületéről történő kontrollált eltávolítása jól megfigyelhető a minták abszorpciós spektrumainak változásán keresztül is, ahogy a 34. ábrán is látható. Ahogy a nanorészecskék körül csökken az epoxi mennyisége, folyamatosan csökken a plazmonterület kitöltő anyag effektív törésmutatója, ami a rövidebb hullámhossz felé tolja a rezonancia csúcsát. Ez a változás párhuzamos a szenzorok törésmutató-érzékenységének (RIS) növekedésével (lásd a 34. és 35. ábrákat). A nanorészecske-elrendezés integritása 40 s plazmamarás után leromlik, a részecskék leválnak a felületről (áramló folyadékban, vagy ragasztószalaggal tesztelve [T10]). A 35. ábra a nanokompozitok hosszútávú stabilitásnak vizsgálati eredményeit foglalja össze. Az arany nanorészecskék felülete a normál atmoszferikus körülmények melletti tárolás során könnyen elszennyeződhet, ami a szenzorok

érzékenységének romlásához vezet. Kis teljesítményű, rövid ideig tartó (20 W teljesítmény, 0,4 mbar, 15 s) oxigén plazmás tisztítás segítségével a szenzorok érzékenysége azonban könnyen regenerálható.



34. ábra. a) Normált abszorpciós spektrumok különböző ideig (0 s, 10 s, 20 s és 40 s) plazmamarásnak kitett A1-es típusú nanokompozitokról, az alsó sorban az adott állapothoz tartozó optikai mikroszkópos képekkel. b) A1- és A2-típusú minták normált abszorpciós spektruma 30 s plazmamarás után levegőn és vízben mérve, az érzékenységek feltüntetésével. c) B1- és B3-típusú minták normált abszorpciós spektruma 30 s plazmamarás után levegőn és vízben mérve, az érzékenységek feltüntetésével. [T10]



35. ábra. a) Különböző ideig (0 s, 10 s, 20 s és 40 s) plazmamarásnak kitett A1-es típusú nanokompozitok abszorpciós csúcsának helyzete levegőn és vízben mérve az eltelt napok függvényében, normal atmoszferikus laborkörülmények között történő tárolás esetén. b) Az azonos mintákon átszámolt tömbi törésmutató-érzékenységek az eltelt idő függvényében. Az utolsó lépés a 30. napon alacsony teljesítményű oxigén plazmával történő tisztítás hatását szemlélteti, amellyel a szenzorelemek érzékenysége az eredeti értékre regenerálható. [T10]

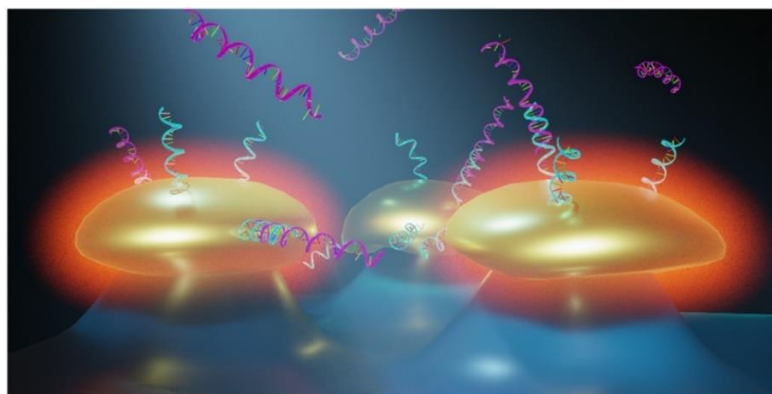
Az oxigén plazmás felülettisztítással kapcsolatban megjegyzendő, hogy a kisebb teljesítmény és rövidebb kezelési idő ellenére marja az epoxi hordozót is, így hosszú távon a szenzorelemek tönkremeneteléhez vezethet. Saját kísérleteink során a szenzorok 3–5 tisztítási ciklust is kibírtak érzékenységmentesség nélkül.

4.3.3. Az Au NP–epoxi szenzorelem főbb tulajdonságainak összefoglalása

A technológia bemutatása után az alábbi pontok foglalják össze a CEITEC-es együttműködésben kifejlesztett Au NP–epoxi felületi nanokompozit szenzorelem főbb jellemzőit a korábban ismertetett, alkalmazáspecifikus elvárások tükrében, illetve a konkurens nanotechnológiákkal előállított szenzorelemek tulajdonságaival összevetésben (részletesen lásd a 2.2, ill. 2.3. fejezeteket).

- 1) *Kontrollált nanorészecske-elrendezés*: az előállítási technológiával a nanorészecskék mérete és a közöttük lévő távolság is szabályozható egy hexagonális elrendezésben. A kialakuló D/D_0 értékek kb. a 0,8–0,1 közötti tartományban vannak (lásd 1. táblázat), amivel a plazmonrezonancia csúcsa 535–625 nm között hangolható.
- 2) *Felskálázható technológia*: a sablonalapú technológiának köszönhetően a szenzorelemek felülete a több cm^2 nagyságrendben van, amin belül a hexagonális nanorészecske-elrendezés egyenletes.
- 3) *Robusztusság*: az epoxi felületére kötött nanorészecskék jól tapadnak a hordozóhoz, nincs nanorészecske leválás vagy összetapadás áramló folyadék közegben sem. A szenzorelemek hosszú távon stabilisak, a felületük érzékenység romlás nélkül tisztítható alacsony teljesítményű plazmával.

Az előállított szenzorelemeket sikerrel alkalmaztam LSPR-érzékelőként és SERS-hordozóként is DNS-érzékelésre. A konkrét alkalmazási eredmények bemutatása előtt a következő alfejezetben BEM-szimulációk segítségével vizsgálom a 36. ábrán látható „nanogomba” struktúrák várható tulajdonságait.

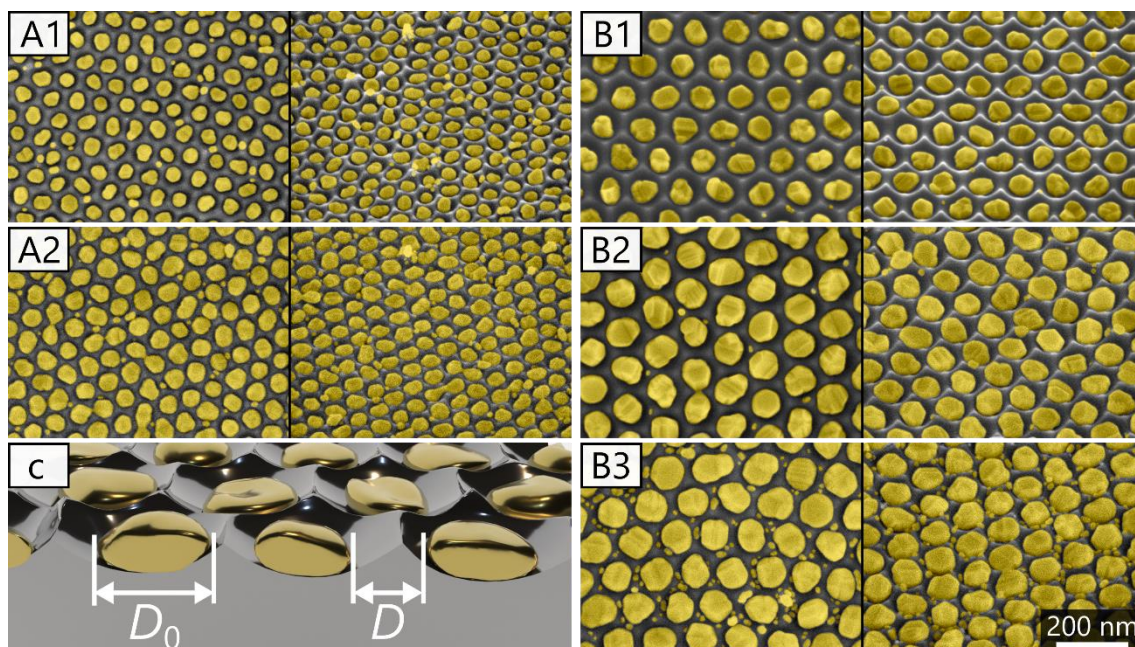


36. ábra. Az Au NP–epoxi felületi nanokompozit szenzorelem felületén plazmamarás után kialakuló, nanogombákra emlékeztető alakzatok, és alkalmazásuk DNS-érzékelésre – 3D illusztráció. [T10]

4.4. A nanokompozit szenzorelem vizsgálata BEM-szimulációval

A különböző nanorészecske-elrendezések BEM-szimulációját sajátkezűleg végeztem a 3. fejezetben részletesen tárgyalt eljárások segítségével. A 30., 31. és 36. ábrákon jól látszik, hogy a nanorészecskék alakja szabálytalan, alattuk az epoxi hordozó pedig az alamaródás mértékétől függő alakú platformokat formál. A nanokompozit pontos rekonstrukciója a BEM-modellel így nem lehetséges, de ezt nem is tekintetem szükségesnek. A szimulációk elsődleges célja a különböző elrendezések tulajdonságainak feltérképezése LSPR- és SERS-alkalmazásokra és a várható teljesítőképességük (törésmutató-érzékenység és erősítési tényezők) előzetes megbecslése. A szenzorelemek alkalmazhatóságának tekintetében a végső szót az éles LSPR- és SERS-kísérletek mondják ki (4.5 és 4.6 fejezetek), de a szimulációk hozzájárulhatnak a kísérleti eredmények értelmezéséhez, és így visszacsatolhatnak a technológia további optimalizálásához is.

A szimulációkban a részecskéket 256 felületelemből álló sferoidokkal közelítettem. Az öt különböző elrendezés geometria paramétereit SEM-képek alapján Tomáš Lednický határozta meg (lásd 37.ábra), nagy számú részecske felhasználásával (1100 – 3600 db között elrendezésenként). A részecskék átmérőjét (D_0) két módszerrel is meghatározta: egyrészt a nanorészecskék területével ekvivalens területű kör (röviden EK) átmérőjeként [165], másrészt a nanorészecskéket befoglaló legkisebb átmérőjű kör (röviden BK) átmérőjeként [T10].



37. ábra. A SERS-hordozók átlagos részecskeméretének meghatározásához használt SEM-képek (a nanorészecskék festésével). Az öt hordozó (A1, A2, B1, B2, B3) SEM-képeiből páronként a bal oldali felülnézet, a jobb oldali 45°-ban döntött nézet. A c) ábra egy 3D-illusztráció a részecskék elhelyezkedéséről, valamint a részecske átmérő és részecskék közötti távolság értelmezéséről [T4].

2. Táblázat. A BEM-szimulációkhoz használt nanorészecske-elrendezések bemeneti geometriai paraméterei, valamint a szimulációkkal meghatározott LSPR- és SERS-erősítési tényezők és törésmutató-érzékenységek.

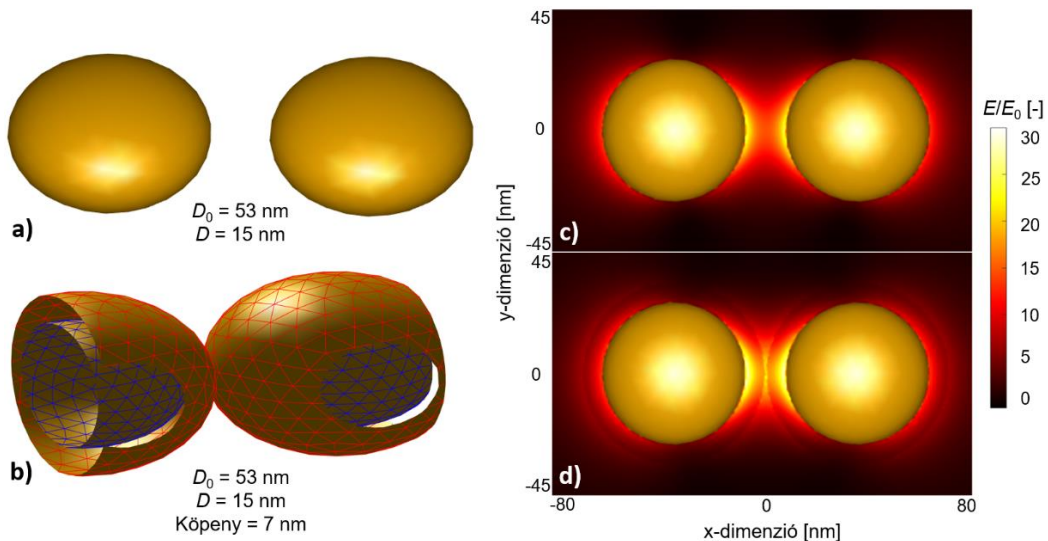
	Param.	Kondíció	A-típus ($D_p=68$ nm)		B-típus ($D_p=109$ nm)		
			A1	A2	B1	B2	B3
Bemeneti geometriai paraméterek	D_0 [nm]	Ekvivalens területű kör (EK)	39	53	65	83	87
	D [nm]	Ekvivalens területű kör (EK)	29	15	44	26	22
	D/D_0	Ekvivalens területű kör (EK)	0,74	0,28	0,68	0,31	0,17
	D_0 [nm]	Legkisebb befoglaló kör (BK)	51	60	79	92	102
	D [nm]	Legkisebb befoglaló kör (BK)	17	8	30	17	7
	D/D_0	Legkisebb befoglaló kör (BK)	0,33	0,13	0,38	0,18	0,07
	Átmérő/ vastagság	Mindkét esetben	2,3	1,7	1,9	1,7	1,5
LSPR	RIS [nm/RIU]	EK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	162	177	181	238	253
	$\Delta\lambda_{p-max}$ [nm]	EK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	27,5	30	31	40,5	43
	EF_∞	EK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	1,09	1,31	1,09	1,27	1,36
	$EF_{t=7nm}$	EK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	1,11	1,56	1,18	1,53	1,8
	RIS [nm/RIU]	BK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	196	223	228	286	371
	$\Delta\lambda_{p-max}$ [nm]	BK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	33	38	39	48.5	63
	EF_∞	BK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	1,2	1,53	1,21	1,39	1,7
	$EF_{t=7nm}$	BK, dimer, átlag, $\Delta n = 1.5-1.33$	1,36	2,19	1,37	1,91	3,31
SERS	$SERS EF_E$	EK, hexagonális, eloszlás, $\lambda = 785$ nm	$2,8 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	2×10^4	$3,2 \times 10^4$
	$SERS EF_E$	BK, hexagonális, átlag, $\lambda = 785$ nm	$6,7 \times 10^3$	5×10^4	$1,3 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$

A 2. táblázatban feltüntetett bemeneti paraméterek esetén a két módszerrel (EK, BK) meghatározott átmérők átlagos értékeit használtam az „átlag” kondícióval megjelölt pontokban. A SERS-erősítési tényezők számításánál egy esetben vettem figyelembe a teljes részecskeátmérő eloszlást, a később részletezett módon. Az LSPR-paraméterek meghatározásához az elemi cella egy két részecskéből álló (dimer) elrendezés volt (lásd 38.

ábra), míg a $SERS EF_E$ meghatározásához az elemi cella a hét részecskéből álló hexagonális elrendezés volt (40. ábra). Az LSPR- és SERS-szimulációk közötti lényeges különbség, hogy az LSPR elnyelési csúcs meghatározásához egy teljes spektrumot fel kell venni. Az esetben a csúcsot egy 20 nm-es tartományra leszűkítve 0,2 nm-es felbontással kerestem, ami 100 különböző hullámhosszon vett szimulációs pont. A $SERS EF_E$ -hez csak egy hullámhossz (a megvilágító lézer 785 nm-es hullámhossza) mellett szimulált térerősség-eloszlásra van szükség. Mivel a SERS-szimulációk így jelentősen gyorsabban futnak, esetükben lehetőség volt figyelembe venni a hexagonális elrendezést, illetve a részecskeméret-eloszlást is. LSPR esetén erre nem volt lehetőség. Egy esetben, a B3-típusú elrendezés, EK méretei mellett ellenőriztem a kétrészecskés elrendezés és a hétrészecskés hexagonális elrendezés LSPR-érzékenység (RIS), illetve erősítési tényező (EF_{∞}) értékeit és azok $\pm 5\%$ -on belül voltak.

4.4.1. LSPR-szimulációk

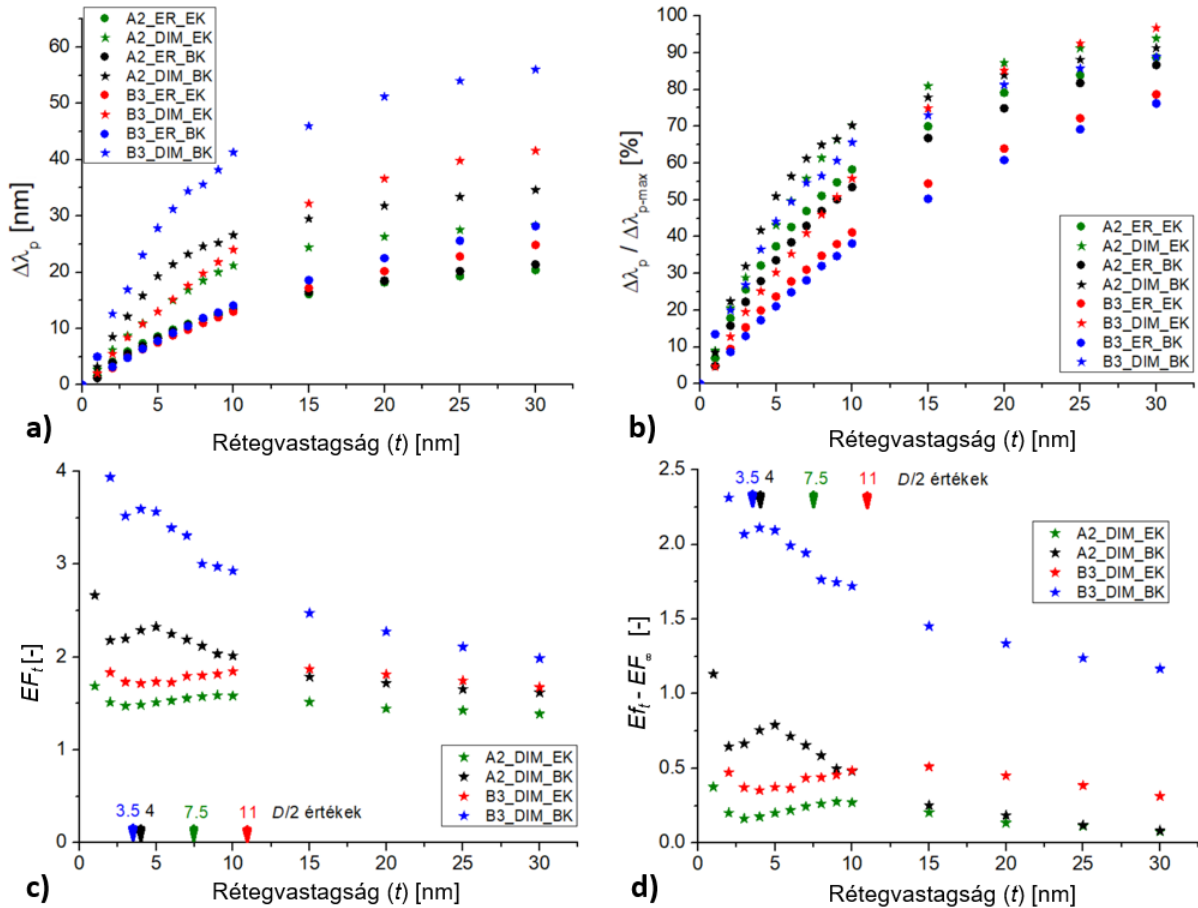
Az LSPR-szimulációk kétrészecskés elemi celláját a 38. ábra szemlélteti az A2-típusra.



38. ábra. **a)** Az A2-es nanorészecske-elrendezés dimer elemi cellájának illusztrációja (EK-eset). **b)** Metszeti kép a nanorészecskéket körülvevő 7 nm vastagságú dielektrikum köpenyről (kék háló – nanorészecske, piros háló – köpeny). **c)** A térerősítés mértéke a két nanorészecske között a plazmonrezonancia hullámhosszán (580 nm), $n = 1,33$ dielektrikumban. Az ábra felülnézet a két ellipszoidról (xy sík, $z = 0$ mellett). **d)** A térerősítés mértéke a nanorészecskéket borító 7 nm vastag $n_1 = 1,5$ dielektrikum köpeny esetén (külső közeg: $n = 1,33$).

A DNS-érzékelős alkalmazásokat szem előtt tartva a törésmutató-érzékenységet (RIS) az $n_1 = 1,33$; $n_2 = 1,5$ (víz, illetve sűrű DNS-réteg, lásd 4.2 alfejezet) értékek között határoztam meg. A 3. fejezetben ismertetett metodikának megfelelően a csatolás hatásának feltérképezésére a részecskéket növekvő vastagságú dielektrikum réteggel ($n_t = 1,5$) borítottam be, és így meghatároztam a plazmonrezonancia-eltolódás ($\Delta\lambda_p$) mértékét, valamint az erősítési tényezőt (EF_t) a rétegvastagság függvényében. A részletes eredményeket az A2- és B3-típusú nanorészecske-elrendezésekre a 39. ábra szemlélteti. Mivel a célzott

alkalmazásnál a 20-bázispár hosszúságú DNS-réteg vastagsága hibridizáció után kb. 7 nm-nek becsülhető, ezért a 2. táblázatban az $EF_{t=7nm}$ értékeket adtam meg az összes elrendezésre. A számszerű eredményeken, illetve a 39. ábra c) és d) részein látható, hogy elsősorban az A2 és B3-típusú nanorészecske-elrendezések esetén várhatunk jelentős, plazmonikus csatolásból adódó növekményt az erősítési tényezőben.



39. ábra a) A csatolt nanorészecske dimerek plazmonrezonancia-eltolódása ($\Delta\lambda_p$) a részecskéket körülvevő köpeny ($n_1 = 1,5$, külső közeg: $n = 1,33$) vastagságának függvényében. **b)** A plazmonrezonancia-eltolódása a maximális jelválasz ($\Delta\lambda_{p-max}$; $\Delta n = 1,5 - 1,33$) százalékaként kifejezve. **c)** A molekuláris erősítési tényező (EF_t) a rétegvastagság (t) függvényében. **d)** A molekuláris és tömbi erősítési tényezők különbsége ($EF_t - EF_\infty$). A rövidítések jelentése: ER: egyrészecske; DIM: dimer; EK: ekvivalens kör átmérője; BK: legkisebb befoglaló kör átmérője.

Az eredmények értelmezésénél vegyük figyelembe azt, hogy a nanorészecskék szabálytalan alakja miatt az EK-módszerrel meghatározott nanorészecske-átmérő várhatóan alul, a BK-módszer pedig felülbecsüli a nanorészecske-rendszerek tényleges érzékenységét és erősítési tényezőjét. Szintén figyelembe kell venni, hogy a nanorészecskéket alulról tartó epoxi tartópillérek (lásd 32. és 36. ábrák) egy jelentős részét kitarják a nanorészecskék plazmonterének, ami a szimulációkban nem volt figyelembevéve. Mivel ennek a térrésznek a

törésmutatója nem változik az érzékelési folyamat során, a maximális jelválasz ($\Delta\lambda_{p-max}$) és érzékenység (RIS) is arányosan csökken a valóságban. A szimulációk alapján becsülhető plazmontér behatolási mélységet a Függelékben vetem össze a megvalósított plazmonikus nanokompozit méréseiből adódó értékekkel. Elmondható, hogy a 39. ábra görbéi jellegre visszaadják a 3. fejezetben ismertetett eredményeket: a szorosan pakolt nanorészecskék a csatolt plazmonrezonancia következtében hatékonyabban használják ki a dinamikus tartományukat: az A2- és B3-típus esetén pl. a 7 nm-es DNS-réteg által okozott jelválasz, a teljes dinamikus tartomány kb. 60%-a (BK-esetben). Ahogy a 2. táblázatban láthatjuk, az EF_t a B3-típusú hordozóra akár 2–3× erősítést is előre jelez a tervezett alkalmazásra.

4.4.2. SERS-szimulációk

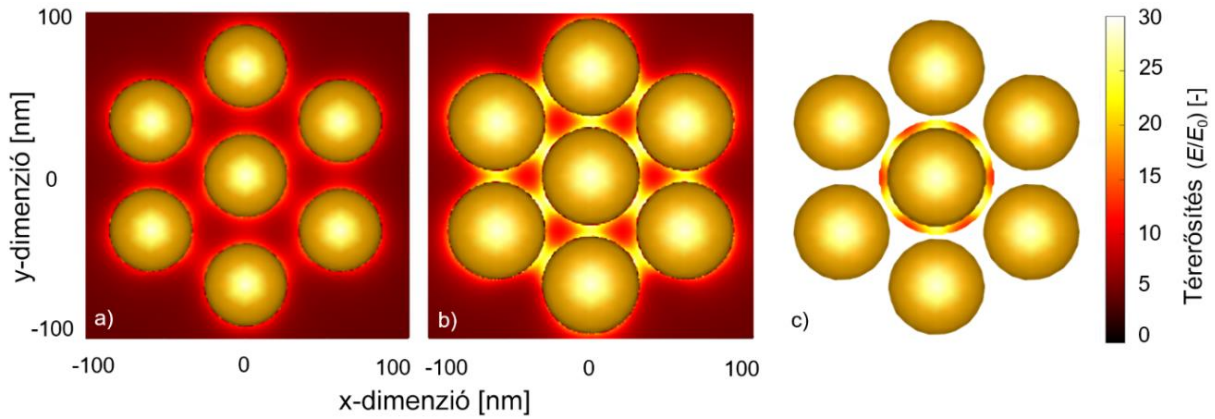
A *SERS EF* meghatározásához kiindulásként a szakirodalomban elterjedten használt lokális térintenzitás-erősítési tényező (LFIEF, local field intensity enhancement factor) megközelítést használtam [168]. A (39) egyenlet alapján felírt *LFIEF* azt adja meg, mennyivel nő az elektromágneses tér intenzitása a plazmonikusan aktív nanorészecske jelenlétében ($E(\lambda, r, \theta)$) a nanorészecske nélküli, referencia térintenzitáshoz (megvilágításhoz) képest ($E_0(\lambda, r, \theta)$). A *LFIEF* nyilvánvalóan hullámhossz (λ) és helyfüggő (r, θ a polárkoordináták). Segítségével a (40) egyenlet alapján írhatjuk fel az egyik legegyszerűbb fizikai SERS-erősítési tényezőt, amire szokás $|E|^4$ közelítésként is hivatkozni [77]. Az összefüggést levezetés nélkül adom meg megjegyezve, hogy több feltételezést és egyszerűsítést is tartalmaz, ami a vonatkozó irodalomban tanulmányozható [77], [168].

$$LFIEF(\lambda, r, \theta) = \frac{E(\lambda, r, \theta)^2}{E_0(\lambda, r, \theta)^2} \quad 39$$

$$SERS\ EF_E(\lambda, r, \theta) = LFIEF(\lambda, r, \theta)^2 = \frac{E(\lambda, r, \theta)^4}{E_0(\lambda, r, \theta)^4} \quad 40$$

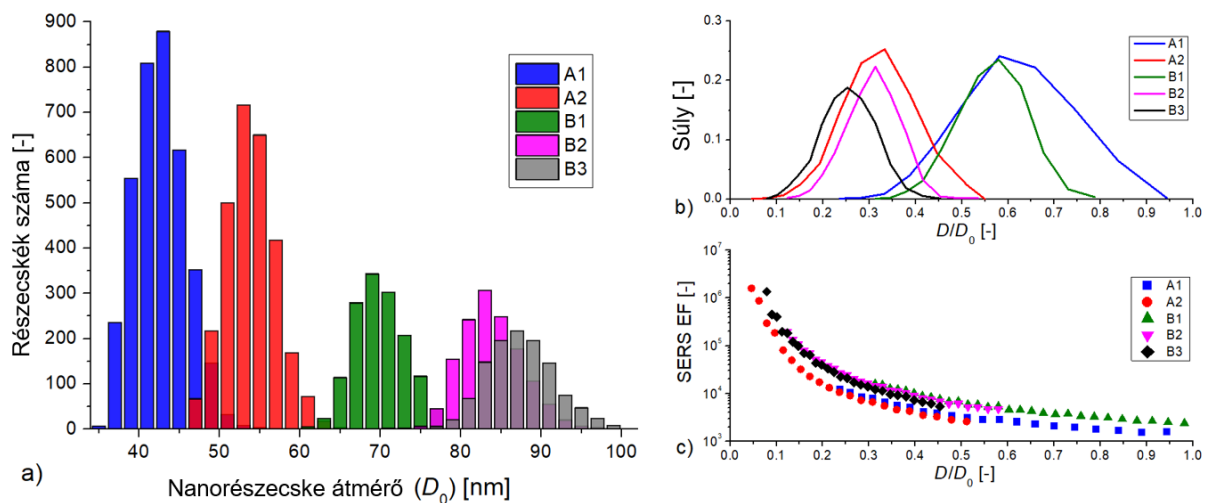
Az öt különböző nanorészecske-elrendezés eredő SERS-erősítési tényezőjének BEM-szimulációval történő meghatározásához a 40. ábrán látható, hét részecskéből álló hexagonális elrendezéseket használtam elemi cellaként. Mivel a 4.5 alfejezetben bemutatásra kerülő kísérletekben a nanorészecskék felületére kötött DNS-molekulák karakterisztikus Raman-csúcsainak intenzitását mértük, ezért a *SERS EF_E* meghatározásához csak a kísérletek szempontjából releváns, nanorészecskék körüli 7 nm-es szélességű térrészt (héjat) vettem figyelembe, ami kb. megegyezik a felületre kötött DNS-réteg vastagságával. A nanorészecske-elrendezések síkjában értelmezett, 40. c) ábrán illusztrált héjon számolt átlagos *SERS EF_E* a (41) egyenlettel írható le, ahol r_0 a részecske sugara és $r_l = 7\text{ nm}$.

$$SERS\ EF_E(\lambda) = \frac{\int_0^{2\pi} \int_{r_0}^{r_0+r_l} \frac{E(\lambda, r, \theta)^4}{E_0(\lambda, r, \theta)^4} dr d\theta}{(r_0 + r_l)^2 \pi - r_0^2 \pi} \quad 41$$



40. ábra. A hexagonális nanorészecske-elrendezéseken BEM-eljárással számolt térerősség erősítés (E/E_0) szemléltetése. Az elrendezés az A-típusú SERS-hordozó elemi cellájának fel meg. Az a) és b) képeken a pórusátmérő azonos (68 nm), de a részecskék átmérője eltérő: 51 nm és 60 nm. A c) ábra a (41) egyenletnek megfelelő 7 nm-es régiót szemlélteti a nanorészecskék körül, amin az átlagos $SERS EF_E$ kiszámításra került [T4].

A 40. ábrán illusztrált szimulációkhoz az elektromágneses gerjesztés egy Z-irányban haladó síkhullám három, XY-síkban lineárisan polarizált komponenssel. A polarizáció vektora az X-tengellyel 0° , 60° és 120° -ot zárt be az egyes komponensek esetén, az eredő tér ezek összegeként került meghatározásra. A gerjesztési hullámhossz 785 nm volt, illeszkedve a kísérleteknél használt lézerhez. A célom az volt, hogy a $SERS EF_E$ meghatározásához figyelembe tudjam venni a nanorészecskék méretének eloszlását, ehhez a SEM-képek alapján (37. ábra) rendelkezésemre álltak mind az EK-, mind a BK-módszerrel meghatározott nanorészecske-átmérőt jellemző hisztogramok. A 41. a) ábrán látható az EK-eljárással számolt részecskeátmérő-eloszlás, valamint a hisztogramokból számolt súlyfüggvények is (b).



41. ábra. a) A SEM-képek alapján, EK-módszerrel meghatározott nanorészecske-átmérőt jellemző hisztogramok az öt különböző típusú SERS-hordozóra. b) A hisztogramok alapján számolt súlyfüggvények. c) A (41) egyenlet alapján BEM-szimulációval számolt SERS-erősítési tényezők a D/D_0 paraméter függvényében [T4].

Az eloszlások figyelembevételéhez a két különböző pórusmérettel D_p rendelkező sablonra (68 nm az A-típusúra, 109 nm a B-típusúra, lásd 1. táblázat) 1 nm-es felbontással számoltam ki a (41) egyenlet alapján a különböző méretű nanorészecskék esetén (D_0) a $SERS EF_E$ -t. Az így meghatározott értékek láthatók a 41. c) ábrán a D/D_0 függvényében, ami egyszerűen számolható a pórus- és részecskeátmérők ismeretében ($D = D_p - D_0$).

Az öt különböző nanorészecske-elrendezésre az eredő $SERS EF_E$ a súlyfüggvény (W_i) segítségével a (42) egyenlet alapján számolható. Az i index a D/D_0 függvényében értelmezett diszkrét súlyfüggvény és $SERS EF$ értékekre vonatkozik, a részecske eloszlás szempontjából releváns tartományon ($0 < D/D_0 < 1$).

$$SERS EF_E(\lambda) = \sum_{i=1}^n SERS EF_i * W_i \quad 42$$

Bár a 41. ábrán csak az EK-eljárással meghatározott részecskeátmérőknek megfelelő eloszlásokat tüntettem fel, a számításokat a BK-eljárásra is elvégeztem, az eredményeket a 2. táblázatban adtam meg. Ahogy a 41. c) ábrán látható, a $SERS EF$ a $D/D_0 < 0,2$ tartományon meredeken nő, vagyis a SERS-erősítés a számunkra releváns mérettartományon érzékeny a részecskék közötti távolságra. Ez magyarázza az EK- és BK-módszerekkel meghatározott részecskeátmérővel számolt $SERS EF$ közötti nagy különbségeket, ami akár két nagyságrend is lehet (lásd B3 típusú hordozó).

A 4.5 alfejezetben bemutatásra kerülő kísérleti eredmények összevetéséhez a (39) és (40) egyenletekkel leírt fizikai SERS-erősítési tényezőt használtam, mert ez teremti a legközvetlenebb kapcsolatot a nanorészecske-elrendezés, a plazmonikus csatolásból adódó térerősítés, és a ténylegesen mérhető karakterisztikus Raman-intenzitások között. A szakirodalomban számos eltérő módon számolt SERS-erősítési tényező is elterjedt, ezek háttéréről és alkalmazhatóságáról jó összefoglalást ad az alábbi összefoglaló cikk [81]. A fizikai erősítési tényező mellett saját munkámban meghatároztam egy, a nanorészecske-elrendezések SERS-teljesítményét a kémiai érzékelés és a szubsztrátum szempontjából jobban jellemző erősítési tényezőt is a (43) egyenlet alapján.

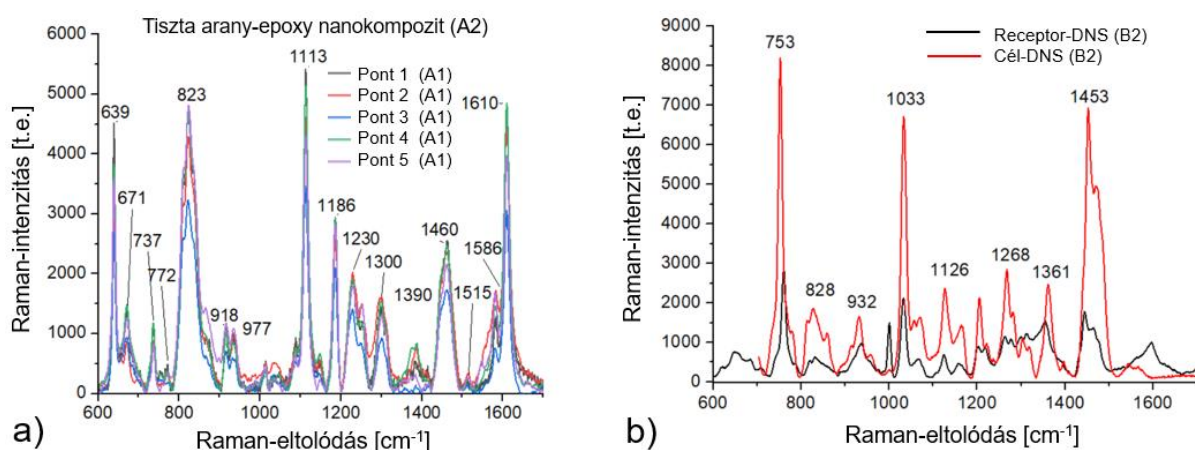
$$SERS EF_S = \frac{I_{SERS}/N_{Surf}}{I_{RS}/N_{Vol}} \quad 43$$

Az egyenletben I_{SERS} és I_{RS} a nanorészecske-elrendezésen mért SERS-intenzitás, illetve tömbi oldatban normál Raman-spektroszkópiával mért intenzitások. N_{Surf} és N_{Vol} a gerjesztési térfogatban található molekulák száma, ami SERS esetén a nanorészecskék felületére kötött molekulákat jelenti. A (43) egyenlet alapján meghatározható $SERS EF_S$ a szubsztrátum szempontjából jobban jellemzi a felületet, de a precíz meghatározásához pontos számításokra van szükség a gerjesztési térfogatokra és bennük található molekulamennyiségekre vonatkozóan. Ezek nagy terjedelme miatt a számításokat a Függelékben részletezem.

4.5. SERS-alkalmazás

4.5.1. Normál üzemmódú mérések

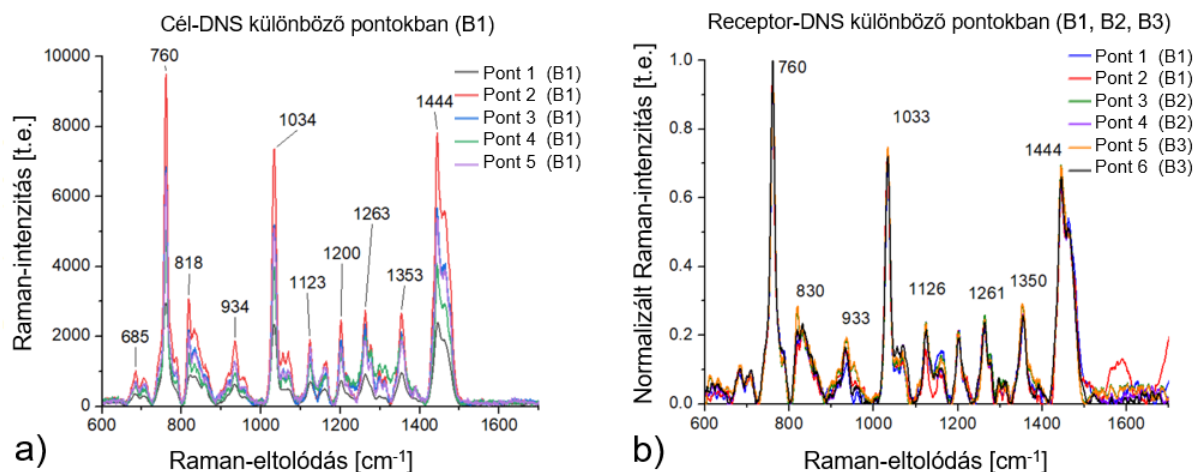
A normál üzemmódban végrehajtott (lásd 4.2 fejezet) SERS-mérések eredményeinek jellegzetes Raman-spektrumait a 42. és 43. ábrák szemléltetik tiszta arany–epoxi hordozó esetén, illetve DNS-immobilizáció és hibridizáció után. A mérések ismételhetségének szemléltetése érdekében a 42. a) és a 43. a) ábrákon azonos hordozón öt különböző pontban mért spektrumot is feltüntettem, a 43. b) ábra pedig a hordozók közötti reprodukálhatóságot szemlélteti, három hordozón két-két különböző pontban mért spektrumokkal. Az eltérő hordozókon mérhető, jelentősen eltérő Raman-intenzitások összevethetősége érdekében a spektrumokat normáltam a 760 cm^{-1} -nél található csúcs intenzitására.



42. ábra. a) Egy tiszta arany–epoxi nanokompozit (A2-típus) SERS-hordozón öt különböző pontban mért Raman-spektrumok, a karakterisztikus csúcsok jelölésével. **b)** Raman-spektrumok receptor-DNS-immobilizáció (fekete) és cél-DNS-hibridizáció után, egy B2-típusú SERS-hordozón. A spektrumok normál üzemmódban (lásd 4.2 alfejezet) készültek [T4].

Az ábrákon is feltüntetett Raman-csúcsok azonosításához a 3. táblázat nyújt segítséget. A tiszta epoxi hordozón mért Raman-spektrumok (42. ábra, a) domináns csúcsai a polimer karakterisztikus rezgéseinek feleltethetők meg, úgymint az epoxi gyűrű deformációja két helyen 640 cm^{-1} -nél és 1113 cm^{-1} -nél, a $-\text{CH}$ csoport rezgése 822 cm^{-1} -nél, $-\text{CH}_2$ deformáció 1460 cm^{-1} -nél, valamint az aromás gyűrűben található szénatomok közötti kötések nyújtórezgései 1610 cm^{-1} -nél [169], [170]. DNS-immobilizáció és hibridizáció után az epoxi csúcsok háttérbe szorulnak és megjelennek a DNS-molekulákra karakterisztikus csúcsok. Bár minden DNS-bázisnak és a cukor-foszfát gerincnek is számos különböző karakterisztikus Raman-csúcsa van, a rendelkezésre álló gazdag szakirodalom segítségével a fontosabb csúcsok könnyen beazonosíthatóak [171]–[177]. A dominánsabb csúcsok a $745\text{--}753\text{ cm}^{-1}$ timin, C5-CH_3 nyújtórezgése; $828\text{--}835\text{ cm}^{-1}$ a foszfodiészter, O-P-O nyújtórezgése és a timin C4-C5 nyújtórezgése (kombinált); $888\text{--}898\text{ cm}^{-1}$ és $925\text{--}935\text{ cm}^{-1}$ a dezoxiribóz C-C rezgése, valamint a $1021\text{--}1033\text{ cm}^{-1}$ a timin C-N-C hajlítórezgése [171]. A purin bázisok (guanin,

adenin) csúcsai jellemzően 1100 cm^{-1} fölött jelennek meg, de a timinnek és a dezoxiribóznak is vannak még itt rezgései (lásd 3. táblázat).



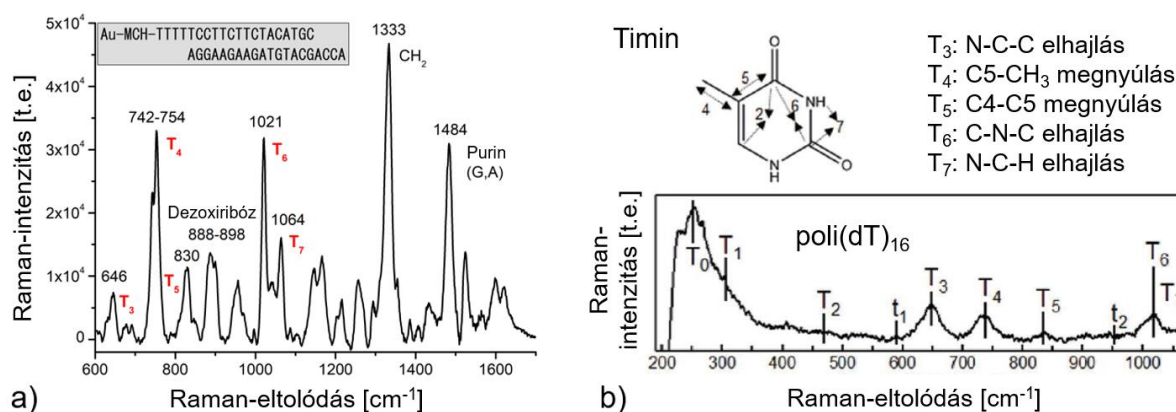
43. ábra. a) A DNS-molekulák Raman-spektruma DNS-hibridizáció után az arany–epoxi nanokompozit felületén mérve öt különböző pontban a B1-típusú hordozón. **b)** A DNS-molekulák Raman-spektruma receptor-DNS-immobilizáció után, három különböző típusú hordozó (B1, B2, B3) két-két különböző pontjában mérve. A spektrumokat az összevethetőség érdekében normáltam a 760 cm^{-1} -nél található csúcs intenzitására [T4].

3. Táblázat. Az arany–epoxi nanokompozit SERS-hordozó felületén mért Raman-csúcsok hozzárendelése karakterisztikus rezgési módusokhoz [T4].

Epxi		DNS	
Pozíció [cm^{-1}]	Hozzárendelés	Pozíció [cm^{-1}]	Hozzárendelés
640	Epoxi gyűrű deformáció	646–650	Timin, N-C-C hajlító
822	-CH bólogató	745–753	Timin, C5-CH ₃ nyújtó
1113	Epoxi gyűrű deformáció	828–835	Foszfodiészter, O-P-O megnyúlás és timin C4-C5 nyújtó
1460	-CH ₂ deformáció	888–898, 925–935	Dezoxiribóz C-C rezgés
1610	Aromás gyűrű nyújtó	1021–1033	Timin, C-N-C hajlító
		1064	Timin, N-C-H hajlító
		1177–1179	Timin
		1256–1263	Adenin, citozin
		1333–1341 1350–1361	Guanin, adenin
		1441–1448	Dezoxiribóz
		1478–1484	Guanin, adenin

A 42. b) ábrán látható, hogy azonos hordozón mérve tapasztalhatunk eltéréseket a receptor-DNS-immobilizáció után, illetve a DNS-hibridizáció után mért csúcsok pozíciójában

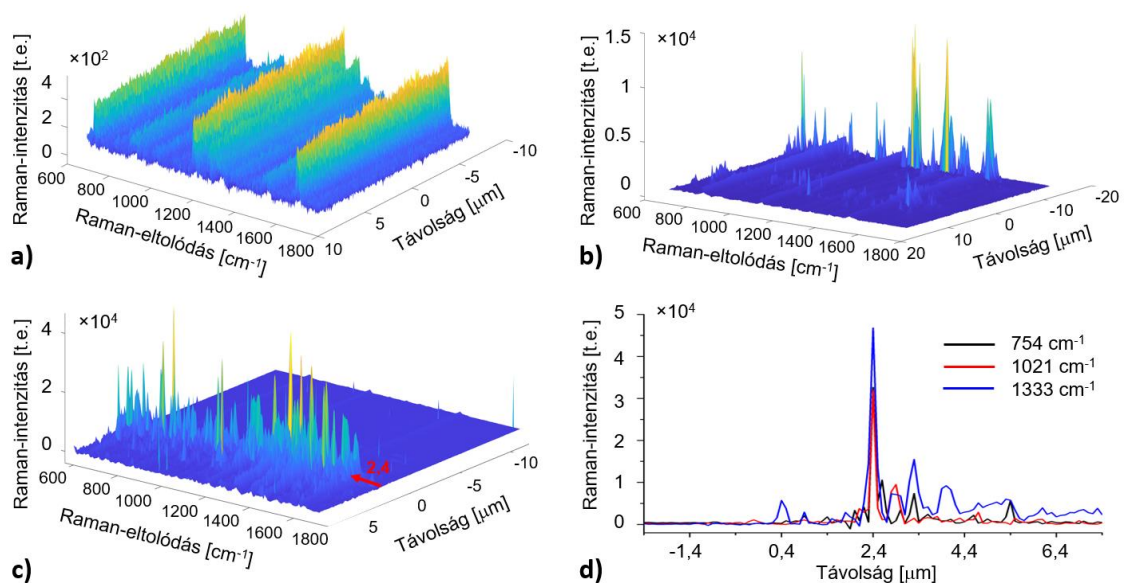
és intenzitásában. Ezek a különbségek felhasználhatóak lennének a hibridizáció detektálására, de megjegyzendő, hogy csúcspozíciók és intenzitások varianciája jelentősen megnehezítheti a kvantitatív jelölésmentes DNS-hibridizáció detektálást SERS-sel. A spektrumok varianciája természetes, a SERS jellegéből adódik és számos oka van. Mind a négy DNS-bázisnak sok (a vizsgált hullámszám tartományon akár tíz különböző karakterisztikus rezgése is lehet, egy reális receptor–célmolekula páros pedig változó összetételben tartalmaz bázisokat, így a Raman-spektruma is rendkívül összetett [171]. Az, hogy a bázisok közül melyek csúcsai lesznek a dominánsak a mért spektrumban a bázis felületen való elhelyezkedésétől függ. A nagy térintenzitással rendelkező tartományokba („hot-spotokban”, lásd 40. ábra) került bázisok Raman-szórási hatáskeresztmetszete jóval nagyobb a felülettől távolabb elhelyezkedő bázisokhoz képest. Mivel a kísérleteinkhez használt receptor-DNS-molekula pirimidin bázisokban gazdag (20 bázisból 17 timin vagy citozin), és mivel a receptor arany nanorészecskéhez legközelebbi vége egy 5 bázis hosszúságú poli-T szekvenciával indul (lásd 44. ábra, a)), a mért spektrumainkban a timin bázisok mindig dominánsak lesznek. Mivel a receptorokkal szemben a cél-DNS-molekulák szekvenciája purin bázisokban (guanin, adenin) gazdag, a purin csúcsok megjelenése vagy intenzitásának a növekedése a DNS-hibridizáció indikátora vagy mérőszáma lehet. De ahogy a 44. ábrán egy cél-DNS-hibridizáció után mért spektrumon jól látszik, a cél-DNS jelenléte sem tudja arányaiban csökkenteni a timin bázisok karakterisztikus csúcsait, a 1100 cm^{-1} alatti tartományon öt timinhez köthető csúcs is jól beazonosítható (összevetésnek lásd a 44. ábra b) részén feltüntetett irodalmi példát egy 16-bázis hosszúságú poli-timin szekvencia Raman-spektrumáról). Az arany nanorészecskék felületétől távolabb elhelyezkedő purin bázisok mérhető jelét nagyban befolyásolja a DNS-molekulák változó orientációja, ami a nanorészecskék alakjának és elhelyezkedésének szórásával kombinálva magyarázatot ad a spektrumok varianciájára. A jelölésmentes DNS-hibridizáció SERS-sel történő számszerűsítésének problémájával több cikk is foglalkozik [178], saját munkámnak ez közvetlenül nem volt célja.



44. ábra. a) Cél-DNS-hibridizáció után mért Raman-spektrum egy B2-típusú SERS-hordozón. A spektrum a mélységi pásztázás (Z-scan) üzemmódban készült (lásd 4.2 alfejezet) [T4]. **b)** Egy 16 bázis hosszúságú poli-timin nukleotid Raman-spektruma, a karakterisztikus csúcsok és a hozzájuk tartozó vibrációs módusok feltüntetésével [171].

4.5.2. Mélységi pásztázás

Az arany nanorészecske–epoxi felületi nanokompozit hordozók SERS-alkalmasságának minősítéséhez, a különböző nanorészecske-elrendezéseken végzett elméleti számítások előrejelzésének igazolásához a különböző típusú hordozókon, azonos csúcspozícióban mért Raman-intenzitások összevetése szükséges. Annak érdekében, hogy biztosak lehessünk abban, hogy az különböző hordozókon mért intenzitások azonos mérési körülmények között készültek és a hordozó legjobb lehetséges teljesítményét tükrözik, az összevetéshez a hordozókon Z-scan üzemmódban készült spektrumokat használtam. Z-scan esetén a lézernyaláb fókuszálása a hordozó felületén manuálisan történik, hasonlóan a normál üzemmóddhoz. Ehhez a kiindulási ponthoz képest a Renishaw MS30 precíziós motorizált mintaasztal (encoded stage) egy maximum $-20\ \mu\text{m} - 20\ \mu\text{m}$ mélységi tartományon belül képes $100\ \text{nm}$ -es felbontással feltérképezni a mintát. A konfokális optikai rendszer miatt biztosak lehetünk benne, hogy minden lépésben a minta $100\ \text{nm}$ -es vastagságú szeletéből származó SERS-jel adja a domináns járulékot a mért spektrumhoz. A Z-scan eredményeként kapott spektrumokat szemlélteti 3-dimenziós megjelenítésben a 45. ábra. Az a) képen egy olyan pásztázás látható, ahol a $\pm 10\ \mu\text{m}$ -es tartományon belül nem találoztunk a nanorészecske réteggel. Az epoxi hordozóra karakterisztikus csúcsok sávokat alkotnak, az intenzitásuk kicsi. Abban az esetben, ha az átfogott pásztázási tartományon megtalálhatóak a nanorészecskék, egy keskeny sávban, látványos, nagyintenzitású csúcsok jelennek meg, mint a 45. ábra b) és c) képein. A b) kép B1-típusú hordozón mért eredményein még jól kivehetőek az a) képen látható, kisebb intenzitású sávok, ahogy az is megfigyelhető, hogy a kiugró csúcsok pozíciója ezektől eltér, mivel ezek a DNS-molekulákra jellemzőek.



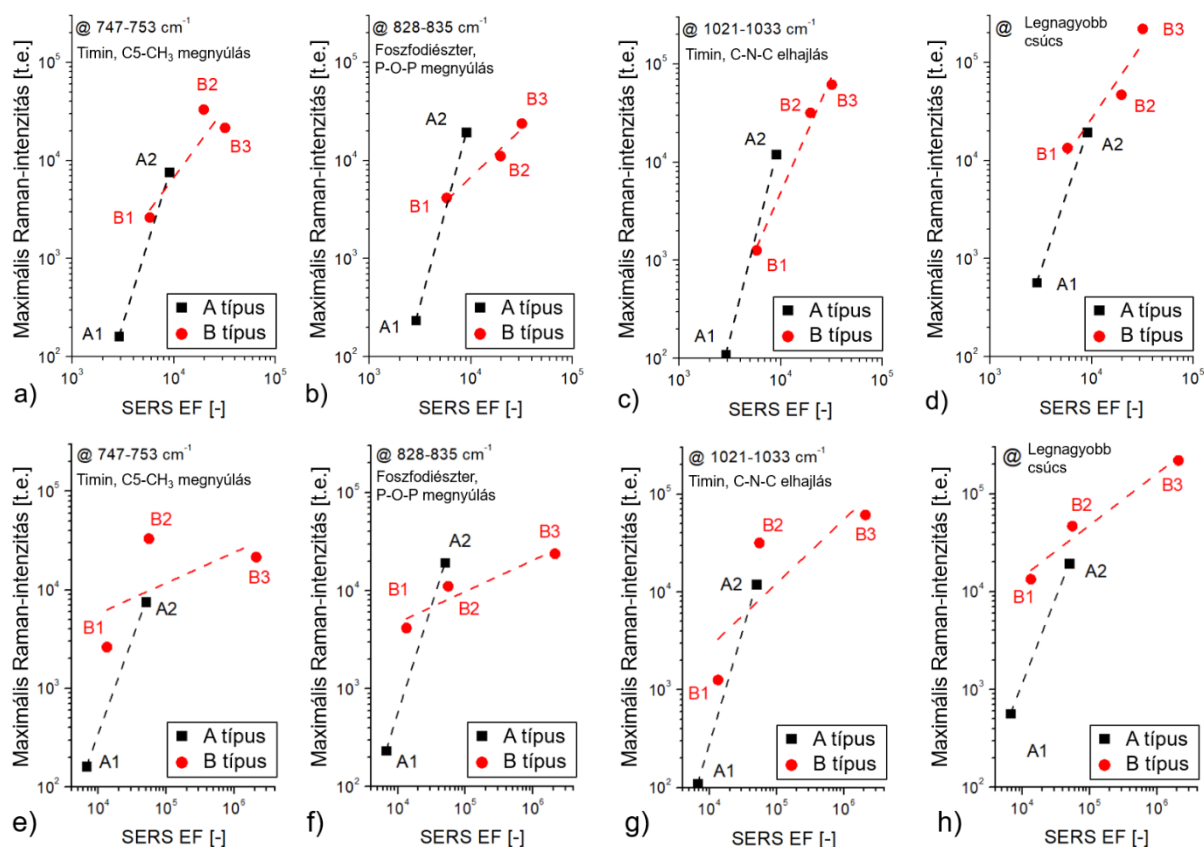
45. ábra. a-c) Z-scan üzemmódban felvett Raman-spektrumok különböző hordozókon. a) arany–epoxi nanokompozit, A1-típus; b) DNS-hibridizáció után, B1-típus; c) DNS-hibridizáció után, B2-típus. d) Keresztmetszeti profilok a c) ábra három kiválasztott hullámszáma (Raman-eltolódása) alapján. [T7]

Az állítást alátámasztja, hogy 44. ábra a) részén bemutatott spektrum a 45. ábra c) képeinek 2,4 μm -es mélységében mért spektrumnak felel meg (piros nyíllal jelölve). Ahogy a 45. ábra d) részének keresztmetszeti profiljain látszik ebben a pozícióban a távolság függvényében egy nagyon keskeny csúcs látható a Raman-sávok intenzitásában. Ez a két timin csúcsra (754 és 1021 cm^{-1}) kifejezetten hegyes, az 1333 cm^{-1} -nél található purin bázisokra jellemző csúcs az epoxi hordozó irányából (2,4 μm fölötti tartomány) is mutat jelet, feltehetően azért, mert a sáv átlapol a DNS-molekulákra nem specifikus tartományokkal (pl. $-\text{CH}_2$ [179]).

A Z-scan mérések eredménye megerősíti, hogy SERS esetén a mért jel jelentős része egy nagyon kis térrészből származik. Ez a kb. 100 nm vastagságú szelet megfeleltethető a nanorészecske-elrendezés síkjának, figyelembe véve a felület érdességét/hullámosságát és lézerfolt kb. 1 μm -es átmérőjét (ebben az üzemmódban). AFM-mérések alapján, 1 μm^2 -es pásztázási terület esetén, a B3-típusú hordozónak az átlagos felületi érdessége (S_a) 10–30 nm között mozgott, míg a maximális Z-irányú átfogás (maximális távolság a magasság pontok között) minden esetben 150 nm alatt volt. Z-scan esetén tehát a maximális csúcshintenzitás a nanorészecske-elrendezés síkjából származik és a konfokális elrendezés miatt optimális mérési beállításokkal adódik, vagyis megbízható összehasonlítási alap a különböző típusú hordozók teljesítményének számszerűsítéséhez. A 45. ábra b) és c) képein az is megfigyelhető, hogy a Z-scan elején manuálisan beállított fókuszsík (a normál üzemmód esetén használt eljárásnak megfelelően) nagy mértékben eltér a nanorészecskék tényleges síkjától (2,4, ill. 15 μm az ábrákon), ez pedig jelentős hatással lehet a mért intenzitásokra normál üzemmód esetén.

A Z-scan üzemmódban, a nanorészecske-elrendezés síkjában mért, és így maximális intenzitású Raman-csúcsokat a 46. ábra hasonlítja össze a 4.4 alfejezetben BEM-módszerrel számolt SERS-erősítési tényezőkkel. Három karakterisztikus csúcs mellett, az egyes spektrumok legnagyobb intenzitású csúcsait is összevettem. A korreláció a geometria paraméterek, és ezek alapján számolt *SERS EF*, valamint a hordozók teljesítménye között szembetűnő, az egyes karakterisztikus csúcsok mért intenzitásának korábban tárgyalt varianciája ellenére is. A 46. ábra a-d) grafikonjain az EK-módszerrel (ekvivalens kör átmérője) meghatározott nanorészecske méretből számolt *SERS EF* van feltüntetve, míg az e-h) grafikonokon a részecskeátmérőt a BK-módszerrel (legkisebb befoglaló kör) határoztuk meg. A maximálisan mérhető Raman-intenzitások az egyes DNS-molekulákra karakterisztikus pozíciókban több, mint két nagyságrendet fognak át az öt különböző típusú hordozó között. A B3/A1 intenzitás arány a legnagyobb intenzitású csúcsokra (d ábra) ~386, az egyes DNS-csúcsokra 100–560 között mozog (a-c). A szimulációval számolt SERS-erősítési tényezők átfogása az EK-esetben kb. egy nagyságrenddel kisebb ($SERS EF_{B3}/SERS EF_{A1} \cong 11$), BK esetén azonban jól közelíti az intenzitások arányát ($SERS EF_{B3}/SERS EF_{A1} \cong 316$). Az eredmények alapján a BK-közelítés (amely felülről közelíti a részecskék átmérőjét) jobban becsüli a nanorészecske-elrendezés SERS-teljesítőképességét, mint az EK-közelítés. Az eltérések oka a részecskék szabálytalan alakjában keresendő, ami következtében gyakran kialakulhatnak a felületen az EK-részecskeméretből számolt átlagos részecsketávolságnál kisebb távolságok,

ahogy a 37. ábra SEM-képein jól megfigyelhető. Ahogy a 41. ábra c) részén láthattuk, a *SERS EF* nagyon érzékeny ezen a tartományon a részecskék közötti távolság csökkenésére, ezen lokális „hot-spotok” járuléka pedig jelentős a mért Raman-intenzitásokban.

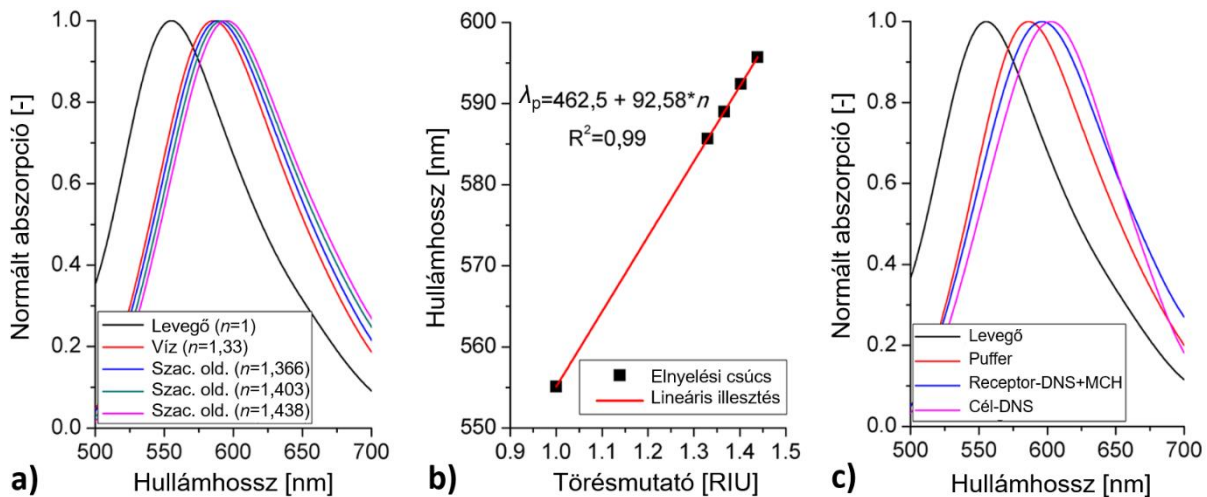


46. ábra. A különböző hordozókon Z-scan módban, a nanorészecske-elrendezés síkjában mért karakterisztikus Raman-csúcsok intenzitása a 4.4 alfejezetben BEM-szimulációval számolt *SERS EF* függvényében. A felső sorban (a-d) az EK-, az alsó sorban (e-h) a BK-módszerrel meghatározott átmérővel számolt *SERS EF* értékek szerepelnek (lásd 2. táblázat). A d) és h) ábrákon a spektrumok legnagyobb intenzitással rendelkező csúcsai vannak feltüntetve. [T4]

Össességében az arany nanorészecske-epoxi felületi nanokompozit alkalmas SERS-felületként történő használatra. DNS-rétegeken végzett mérésekkel, a hordozók mélységi iránya mentén felvett spektrumokkal (Z-scan) igazoltam, hogy a mért karakterisztikus Raman-csúcsok a nanorészecske-elrendezés síkjából származnak, és hogy a mérhető jel stabil és reprodukálható a kb. 1-2 cm²-es hordozók felületén. Megmutattam továbbá, hogy a különböző nanorészecske-elrendezések geometriai tulajdonságai és SERS-teljesítményük szorosan összefügg, a részecskék közötti távolság csökkentésével több mint két nagyságrendnyi karakterisztikus Raman-intenzitás növekedés érhető el. Összevetési alapul a BEM-szimulációkból számolt, fizikai SERS-erősítési tényezőt használtam, mivel ez adja vissza a legszemléletesebben a részecskék között fókuszált közeltér hatását. A szubsztrátumot jellemző *SERS EF₅* erősítési tényező a $3,1 \times 10^3$ – $1,9 \times 10^6$ tartományban van az A1–B3-típusú hordozók között. *SERS EF₅* részletes levezetése és összevetése *SERS EF_E*-vel a Függelékben olvasható.

4.6. LSPR-alkalmazás

Az arany nanorészecske–epoxi felületi nanokompozit LSPR-alapú nukleotid-érzékelőként történő alkalmazásának első lépéseként megvizsgáltam a különböző típusú elrendezések tömbi törésmutató-érzékenységeit (*RIS*). A kalibrációt ismert törésmutatójú oldatokkal (pl. víz és szacharóz vizes oldata) hajtottam végre. Egy tipikus karakterisztikát és a hozzá tartozó abszorpciós spektrumokat szemlélteti a 47. ábra a) és b) része egy B3-típusú szenzorelem esetén. A mért szenzorelem érzékenysége 92,6 nm/RIU, és jól láthatóan a karakterisztika lineáris a számunkra releváns törésmutató tartományon (1,33–1,5).



47. ábra. a) Egy B3-típusú mintán különböző közegekben (levegő, víz és szacharóz vizes oldatai) mért normált abszorpció spektrumok. **b)** Az a) ábrán látható spektrumok csúcspozíciói a közegek törésmutatójának függvényében, lineáris illesztéssel. **c)** Egy B3-típusú mintán mért normált abszorpció spektrumok levegőn, pufferben, valamint DNS-immobilizáció és DNS-hibridizáció után (puffer: 0,75 M NaCl–50 mM Na₂HPO₄). [T10]

A különböző típusú nanokompozitok geometriai paramétereit tömbi törésmutató-érzékenységei között nem sikerült igazolni a szimulációs eredmények által előrejelzett korrelációt. A szimuláció nem vette figyelembe a nanorészecskéket tartó epoxi tartóoszlopok hatását, amelyek rögzített törésmutatóval takarják ki a részecskék plazmonterének egy részét és így ezzel arányosan csökkentik a szenzorelemek érzékenységét. A 34. és 35. ábrákon látható módon az epoxi réteg nanorészecskék felületéről történő eltávolításával (oxigén plazma maratással) a szenzorelemek érzékenysége fokozatosan nő. Az érzékenység maximalizálásának gátat szab, hogy túlzott alamarás esetén a nanorészecskék leválhatnak az epoxi tartóoszlopokról, ami a szenzorelem tönkremenetelét jelenti. A különböző geometria paraméterekkel rendelkező nanorészecske-elrendezések esetén jelentős különbség mutatkozik abban, mennyire könnyű túlmarni a felületet. A nanorészecskék sűrűségének növelésével azok hatékonyan maszkolják (védik) az alattuk lévő epoxit, ami így lassabban maródik. Az eltérő technológiai paraméterekkel előállított szenzorelemek esetén így az arany nanorészecskék alatti eltérő mértékű epoxi takarásból adódóan a mérhető *RIS* is eltérő lesz.

A nukleotidérzékelős kísérletek idején, 2019-ben, a legjobb mért *RIS* [nm/RIU] értékek az egyes típusokra a következők voltak 83 ± 3 (A1), 106 ± 3 (A2), 97 ± 11 (B1) és 96 ± 4 (B2) és 104 ± 7 (B3). A 2. táblázat EK-módszerrel meghatározott nanorészecske-átmérőiből számolt *RIS* értékekkel összevetve a mért *RIS* értékek rendre kisebbek a számolt értékeknel: 51% (A1), 60% (A2), 54% (B1), 40% (B2) és 41% (B3). Ebből látszik, hogy egyrészt az epoxi pillérek különböző mértékben takarják ki a nanorészecskék plazmonterét (40–62%), másrészt a két legsűrűbb elrendezés (B2, B3) esetén a legnagyobb az epoxi hatása az említett árnyékoló hatás miatt. (Megjegyzendő, hogy 2019 óta az előállítási technológia további jelentős fejlesztésen esett át, aminek hatására a B3-típusú hordozóval elérhető legnagyobb érzékenység 130 nm/RIU-ra nőtt. A fejlesztés részleteit lásd a 4.7. alfejezetben). Az arany nanorészecskék oxigén plazmával szemben mutatott maszkoló hatása a szenzorelemek tisztítása szempontjából egy előnyös tulajdonság: a B2–B3-típusú hordozók átlag öt tisztítási ciklust (alacsony teljesítményű oxigén plazmával, lásd 4.2 alfejezet) kibírnak tapasztalható érzékenységromlás nélkül. Ezek előnyei, valamint a szimulációk molekuláris erősítési tényezőre vonatkozó előrejelzései miatt a nukleotidérzékelő tesztekhez a B3-típusú szenzorelemeket használtam.

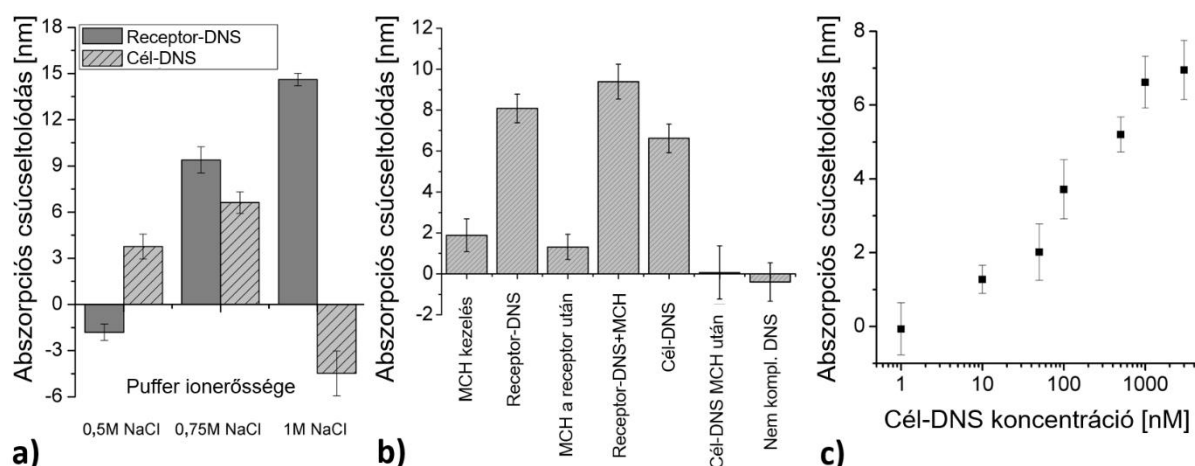
A 47. ábra c) részén láthatjuk egy szenzorelem abszorpciós spektrumának változását a DNS-érzékelés különböző fázisaiban. A számszerű eredményeket negatív kontrollokkal kiegészítve a 48. ábra foglalja össze. A spektrumokat minden esetben a DNS-oldatok elkészítéséhez használt pufferben vettem fel, az egyes lépések között (DNS-immobilizáció után, MCH-kezelés után és DNS-hibridizáció után) is ezzel a pufferrel mostam a szenzorokat, amelyeket a folyamat során soha nem szárítottam ki. A 48. ábrán feltüntetett abszorpciós csúcsetolódások ($\Delta\lambda_p$) így minden esetben az előző lépés pufferben felvett referenciájához viszonyítva értendők. A lépéseket a 4. táblázat összegzi (a részleteket lásd a 4.2 fejezetben).

4. Táblázat. Az LSPR-nukleotidérzékelő tesztek lépéseinek sorrendje.

Lépés száma	Idő	A lépés leírása
#1	-	Referencia mérés pufferben, tiszta szenzorelemen
#2	Éjszaka	Receptor-DNS-immobilizáció, 1 μ M pufferben
#3	-	Öblítés és mérés pufferben
#4	30 p	1 mM MCH-kezelés
#5	-	Öblítés és mérés pufferben
#6	120 p	Cél-DNS-hibridizáció, különböző koncentrációkkal, pufferben
#7	-	Öblítés és mérés pufferben

A mérésekhez használt puffer ionerősségének optimalizálása érdekében három különböző NaCl koncentráció (0,5; 0,75 és 1 M) mellett végeztem méréseket, aminek az eredményei a 48. ábra a) részén láthatók. Az eredeti elgondolás szerint a korábbi nukleotid-

érzékelős munkáim során használt 0,5 M-os NaCl koncentrációt terveztem használni az arany nanorészecske–epoxi szenzorelemekkel is (lásd [T20]). Ezen a koncentráción meglepő módon a szenzorelem egy kismértékű, de reprodukálható $-1,8 \pm 0,5$ nm eltolódással válaszolt a DNS-immobilizációra, majd egy $+3,8 \pm 0,8$ nm eltolódással a DNS-hibridizációra (1 μ M-os oldattal). Várakozásaink szerint a DNS-molekulából álló réteg nagyobb törésmutatója miatt a DNS-immobilizáció során a spektrumnak vörös irányú eltolódással kellene válaszolnia. A kék irányú eltolódás azonban nem precedens nélküli az irodalomban: Roether munkájában szintén egy jól reprodukálható, 2-3 nm mértékű kék irányú eltolódást figyeltek meg DNS-immobilizáció hatására [92]. Mások az abszorpciós csúcs alacsonyabb hullámhossz irányába történő eltolódását ilyen esetekben egyértelműen a nanorészecskék közötti plazmonikus csatolás gyengülésével (decoupling) hozták összefüggésbe [180], [181]. A B3-típusú nanorészecske-elrendezés esetén, a nanorészecskék szabálytalan alakja miatt könnyen előfordulhat, hogy a részecskék közötti távolság összemérhetővé válik a DNS-réteg 7 nm-es vastagságával, vagy akár ez alá esik (lásd a 31. és 37. ábrák SEM-képeit). A DNS-molekulák negatívan töltött cukorfoszfát gerincéből adódó elektrosztatikus taszítás miatt a szorosan pakolt nanorészecskéket a taszítás eltolhatja egymástól (kibillentve őket a csatolás síkjából), vagy teljesen eltávolíthat egyes részecskéket a felületről. A hipotézis tesztelése érdekében a DNS-immobilizációt megismételtem jelentősen nagyobb ionerősségű pufferoldatokkal (0,75 M és 1 M NaCl, mindkettő 50 mM Na_2HPO_4 mellett).



48. ábra. a) Abszorpciós LSPR-csúcseltolódás receptor-DNS-immobilizáció, valamint cél-DNS-hibridizáció után, különböző ionerősségű pufferekben mérve egy B3-típusú mintán. b) A kontroll kísérletek eredményei, 0,75 M NaCl-t tartalmazó pufferben, egy B3-típusú mintán mérve, az MCH-kezelés, illetve a nemkomplementer cél-DNS hatásának elkülönítésére. c) A B3-típusú minta szenzorkarakterisztikája: abszorpciós csúcseltolódás a cél-DNS-koncentrációjának függvényében. (Az ismétlésszám minden esetben $n = 4-5$.) [T10]

Nagyobb ionerősségű pufferoldatokat elterjedten használnak az irodalomban a DNS-molekulák közötti elektrosztatikus taszítás csökkentése érdekében. A Debye-hossz [182] csökkentése lehetővé teszi sűrűbb DNS-rétegek létrehozását felületeken [132], amit

leggyakrabban nagy NaCl koncentrációval (pl. 1 M) érnek el [183], [184]. A 48. a) ábrán látható módon mindkét esetben erős, vörös irányú eltolódás volt mérhető a DNS-immobilizáció + MCH-kezelés után ($9,4 \pm 0,8$ nm (0,75 M NaCl) és $14,6 \pm 0,4$ nm (1 M NaCl)). A cél-DNS-hibridizáció okozta jelváltozás mértéke a 0,75 M NaCl esetben ($6,6 \pm 0,7$ nm) szintén számottevően nagyobb a 0,5 M-os esetnél. Ezzel szemben 1 M-os ionerősség esetén a DNS-hibridizáció egy nagy kék irányú eltolódást okozott ($4,5 \pm 1,5$ nm), ebben az esetben teljesen bizonyosan a nanorészecske-elrendezés integritásának sérülése miatt. A kétórás hibridizáció után mosás közben szemmel is látható volt a nanorészecskék leválása az epoxi felületéről, a foltokban hiányzó nanorészecskék SEM-képeken is jól kivehetőek (lásd a vonatkozó cikkünk kiegészítő információ részét [T10]). Hasonló drasztikus integritás sérülés alacsonyabb ionerősségek esetén nem volt megfigyelhető (több használati ciklus során sem), így ez egyértelműen a túl nagy DNS-molekula felületi borítottság rovására írható.

A további kísérleteket (negatív kontroll mérések, illetve cél-DNS-koncentráció vizsgálata) ennek megfelelően a 0,75 M NaCl-t tartalmazó pufferrel végeztem, a 47. c) ábra is erre az esetre illusztrálja az abszorpciós csúcs megváltozását ($1 \mu\text{M}$ -os cél-DNS-koncentráció esetén). A 48. b) ábrán bemutatott negatív kontroll mérési eredmények alapján az MCH-réteg (tisztá arany felületre kötve) $1,9 \pm 0,8$ nm eltolódást okozott, amíg a DNS-receptorréteg felvitele után alkalmazva a kezelést $1,3 \pm 0,6$ nm jel volt mérhető. A DNS-immobilizáció (önmagában, MCH-kezelés nélkül) $8,1 \pm 0,7$ nm választ adott. A mérési adatok alapján a nanokompozit plazmonterének behatolási mélysége becsülhető. A $\xi_D = 16,5$ nm behatolási mélység jó egyezést mutat a BEM-szimulációkból EK- és BK-közelítéssel részecskepárokra számolt értékekkel ($22,9$ nm, ill. $15,4$ nm). A részletes levezetést lásd a Függelékben.

Összevetve a receptor-DNS-immobilizáció és cél-DNS-hibridizáció által szolgáltatott jeleket ($8,1$ ill. $6,6$ nm) a hibridizációs határfok kb. 81%-nak adódik. Ez az érték nagyon jó egyezést mutat az irodalommal: Gong és Levicky cikkükben nagyon részletesen vizsgálták a puffer ionerősség, a DNS-molekulák felületi borítottsága, illetve a DNS-hibridizációs hatékonyság közötti összefüggéseket [132]. A méréseik alapján a hibridizációs hatékonyság 70–90% között van $(2-8) \times 10^{12}$ db/cm² DNS receptor sűrűség esetén a 0,33–1 M ionerősségű puffer tartományon (a 0,75 M-os esetet konkrétan nem vizsgálták). A saját méréseimben elért 81% közel van az általuk maximálisan elért kb. 92%-hoz (1 M ionerősségű pufferben).

A különböző cél-DNS-koncentrációkkal logaritmusos léptékben felvett szenzorkarakterisztikát a 48.c) ábra szemlélteti. A szenzor jele $1 \mu\text{M}$ koncentráció körül kezd telítődni. A méréseket terhelő viszonylag nagy szórás ($\pm 0,3-0,8$ nm) több tényező együttes hatásaként adódik, beleértve a szenzorelemek közötti eltéréseket, illetve az azonos szenzoron vett eltérő mérési területek hatását is. Mikrofluidikai cellában végezve a méréseket, ami így nem igényelné a szenzorelem spektrométerből történő eltávolítását az egyes lépések végrehajtásához, és folyamatos megfigyelést tenne lehetővé egy adott területen, a mérések szórása jelentősen csökkenthető lenne. A szenzorelem detektálási küszöbe az $LOD = 3\sigma$ szabály alapján, az üres pufferben mért minta jelnek szórását $\sigma = 0,1$ nm-nek véve kb. 5 nM.

A szenzorunk teljesítőképessége (detektálási küszöb, átfogott mérési tartomány stb.) a 12. – 14. ábrákon került összehasonlításra a többi LSPRI-technológiával kompatibilis, irodalomban publikált nukleotidérzékelővel. A szenzorelem (2019-es generációjának) teljesítőképességével kapcsolatban az alábbi megfigyeléseket tehetjük.

A szenzorelem maximális abszorpciós csúcstelődása receptor-DNS-immobilizáció + MCH-kezelés + cél-DNS-hibridizáció esetén $8,1 + 1,3 + 6,6 = 16$ nm volt. A 2. táblázat alapján ez a jel jelentősen elmarad a BEM-szimulációból EK-, ill. BK-közelítéssel számolt $\Delta\lambda_{p-max}$ értékektől, ahogy ezzel párhuzamosan a szenzorelemek *RIS* értéke is jelentősen kisebb. Mivel a szimulációk nem vették figyelembe az epoxi réteg hatását, így a mért jelválasz és *RIS* értékekből arra következtethetünk, hogy a nanorészecskék plazmonterének nagy részét az epoxi tölti ki. A plazmamarás optimalizálásával az érzékenység tovább javítható (ahogy azt az újabb generációs szenzorelemek bizonyították, lásd a 4.7 fejezet kitekintésében).

A 14. ábra összehasonlítása alapján az is látható, hogy a szenzorunkon a DNS-bekötődés jelválasza a dinamikai tartománynak több mint 80%-át használja ki, így jobban teljesített, mint a többi kb. 100 nm/RIU érzékenységgel rendelkező szenzorelem. Az eredmény alapján a nanorészecskék sűrűségéből adódó közeltér fókuszálás működik (az effektív behatolási mélység csökken, lásd a Függelékben), segítségével hatékonyabbá tehető a DNS-molekulák detektálása. A BEM-szimulációból számolt molekuláris érzékenységet ($EF_{t=7nm} = 1,8-3,3$; EK–BK közelítésre) figyelembe véve hasonlatosan azt mondhatjuk, hogy a csatolt nanorészecskéket tartalmazó kb. 100 nm/RIU érzékenységű szenzorunk jelválasza kb. egy 180–330 nm/RIU érzékenységű, csatolatlan részecskéket tartalmazó szenzor válaszának felel meg. A csatolásból adódó érzékenységnövekedés figyelembevétele így módon magyarázatot adhat a 14. ábra összehasonlításában a szenzorelemek jelválaszáinak eloszlására.

4.7. Kitekintés, az eredmények hasznosulása

A bemutatott nanokompozit szenzorelem kifejlesztése, tulajdonságainak vizsgálata és alkalmazása az elmúlt közel nyolc évem meghatározó részét képezte. A disszertációban bemutatott eredményeken túlmenően a szenzorelem továbbfejlesztése és további alkalmazásokra történő tesztelése a disszertáció beadásának időpontjában (2022. tavasz) is javában zajlik. A fontosabb új eredmények és célok (a teljesség igénye nélkül) az alábbiak.

- 1) A legjelentősebb Tomáš által eszközölt fejlesztés a nanorészecskék transzferének módosítása egy 500 nm vastagságú SiO₂ réteg közbeiktatásával az arany nanorészecskék és az epoxi hordozó közé. Az SiO₂ réteg elektronsugaras vékonyréteg-párologatással került leválasztásra az arany nanorészecskék felületére. Az epoxi hordozóra történő átragasztás után az SiO₂ réteg szelektív plazmamarásával állítható elő az immáron SiO₂ pilléreken nyugvó Au NP nanogomba struktúra [165]. Az SiO₂ réteg alkalmazásával a *RIS* jelentősen megnőtt, a legjobb mért érzékenység az új szenzorokon 150 nm/RIU körül van.

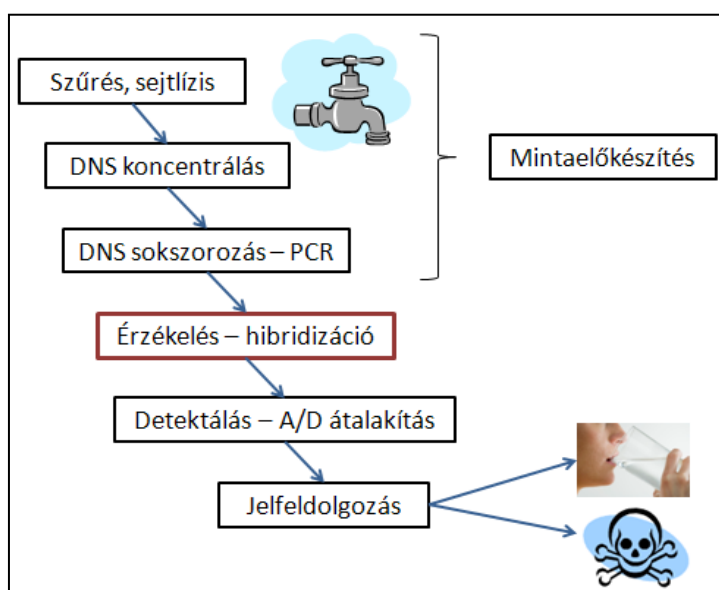
- 2) Az új generációs szenzorelemek tulajdonságait 2022 tavaszán egy DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) bilaterális együttműködés keretein belül a jénai Leibniz-IPHT kutatóival közösen vizsgáljuk (Dr. Wolfgang Fritzsche intézetvezető és Dr. Csáki Andrea csoportvezetők közreműködésével). Tomáš egy Marie Curie posztdoktori pályázat beadásán dolgozik, aminek keretein belül Jénában dolgozna a szenzorelemek továbbfejlesztésén és alkalmazásán. A tervezett alkalmazás antibiotikumrezisztencia-gének (ARGk) detektálása LSPRi-alapú nukleotidérzékelővel.
- 3) Az egyik kiemelt célunk a nanokompozit szenzorelemek plazmontér-lecsengésének kísérleti vizsgálata. Ez megtehető a felületre szekvenciálisan leválasztott ismert törésmutatójú és vastagságú rétegek segítségével. Az eljárásban a jénai partnernek már van gyakorlata [185]. A vizsgálatok eredménye a különböző nanorészecske-elrendezéseken igazolhatja a szimulációs eredményeket, a tér fókuszálását és a jobb molekuláris érzékenységet a sűrű elrendezések esetén.
- 4) A német féllel közösen 2022 tavaszán beadtunk egy EUREKA-pályázatot is, amely keretein belül egy hiperspektrális LSPRi-berendezést szeretnénk fejleszteni. A berendezéshez a BME-ETT fejleszti a mikrofluidikát, amely alkalmas lesz a nanokompozit szenzorelemek befogadására. A tervezett alkalmazás nehézfémionok párhuzamos detektálása felszíni vizekben aptameralapú receptorok segítségével.
- 5) 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 LSPR-szenzorelemek gázérzékelős tesztelésében [186], [187]. Az eredményeik alapján elmondásaik szerint az új generációs Au NP – SiO₂ – epoxi szenzorelemeink minden általuk korábban tesztelt LSPR-érzékelőnél érzékenyebbnak bizonyultak. Az eredmények közös publikációra való előkészítése folyamatban van.
- 6) 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-állományának detektálására új generációs Au NP – SiO₂ – epoxi szenzorelemeinket használja SERS-hordozóként, eredményesen.

5. In-situ jelerősítési eljárás vizsgálata

5.1. A vizsgálatok háttere

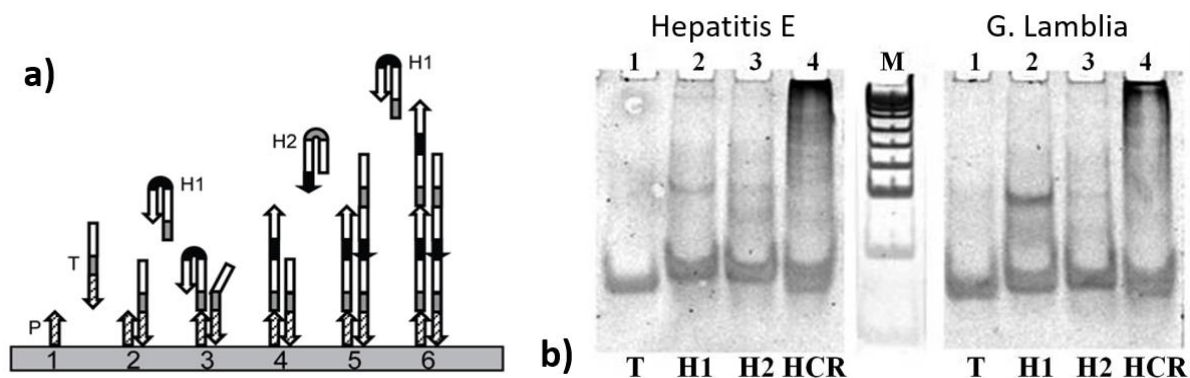
Affinitástípusú bioérzékelők esetén in-situ jelerősítés alatt olyan jelölésmentes eljárásokat értünk, amelyek képesek megnövelni a célmolekula bekötődése által szolgáltatott jelet a célmolekulához szelektíven kötő újabb molekulák segítségével [188]. Az in-situ kifejezés arra utal, hogy a folyamat a szenzorfelületen megy végbe, a kialakuló molekulakomplex járulékos tömege, optikai sűrűsége, töltése stb. szolgáltatja a magában álló célmolekulánál jelentősen nagyobb jelet. Ez a keresett célmolekula detektálási küszöbének (*LOD*) kiterjesztését teszi lehetővé. A célmolekulához szelektíven kötő erősítőmolekulákhoz konjugálhatunk más anyagokat, pl. nanorészecskéket is a hatás erősítésére (pl. tömegnövelés kvarckristály-mikromérlegeknél (QCM) [189]). A lehetőségekről jó áttekintést kaphatunk az alábbi összefoglaló művekből [190], [191].

Az in-situ jelerősítési eljárások szükségességére tökéletes példa a DINAMICS (Diagnostic Nano & Microtech Sensors) EU FP-6-os projekt célja, amiben a BME-ETT konzorciumi tagként vett részt 2007-2011 között [192]. A projekt célja patogének ivóvízből történő kimutatása volt, elektrokémiai és optikai nukleotidérzékelők segítségével. Ahogy a 49. ábra folyamatán látszik a konkrét DNS/RNS-hibridizáció előtt számos mintaelőkészítési lépés van, kezdve a víz szűrésétől, a patogének szeparálásán és lízisén keresztül a nukleotidok esetleges PCR-rel történő sokszorozásáig. Mivel az alkalmazott érzékelési elv detektálási küszöbe nagyban befolyásolja a mintaelőkészítés komplexitását, alakult egy munkacsoport jelerősítési eljárások tesztelésére, az *LOD* kiterjesztésének céljából. A Dr. Giampaolo Zuccheri által vezetett csoport a DNS-hibridizációs láncreakciót (HCR) javasolta erre a célra.



49. ábra. A patogének kimutatását ivóvízből DNS-érzékelővel megvalósító DINAMICS EU-FP6 projekt folyamatábrája.

A DNS-molekulák könnyű testreszabhatósága és szintézise, valamint a szelektív összekapcsolódásokon keresztül megvalósuló önszerveződésük számos érzékelési megközelítés, valamint jelerősítési eljárás alapjául szolgálhat [193]. Ezek közé sorolható a Dirks és Pierce által 2004-ben kidolgozott HCR [194], amely lényege, hogy önmagukban passzív, úgynevezett hajtú DNS-molekulák egy iniciátor jelenlétében egymással láncreakció-szerűen összekapcsolódva hoznak létre egy nagyobb komplexet (részletesen lásd a 50. ábra a) részén). Amennyiben a folyamat iniciátora az érzékelési folyamat keresett célmolekulája, úgy a HCR a célmolekula által keltett jel szelektív erősítésére is használható.



50. ábra. a) A DNS-molekulák hibridizációs láncreakció (HCR) folyamatának szemléltetése szenzorfelületen. A reakció lépései: 1: A receptor-DNS (P, probe) immobilizációja a szenzorra. 2: A célmolekula (T, target) hibridizációja a receptorhoz. 3: Az 1-es hajtú-DNS (H1, hairpin) hibridizációja a target szabad végéhez, ezzel egyidejűleg a H1 hajtú szerkezetének felnyílása. 4: A H2 hibridizál a H1 elérhető szekvenciájával, a H2 molekula felnyílik. 5-6: A H1 hibridizál a H1 elérhető részével, és a folyamat láncreakció-szerűen halad tovább. **b)** A HCR komponenseinek, valamint termékeinek elektroforézissel történő igazolása két DNS-rendszerrel (*Hepatitis E* vírus (bal) és *Giardia lamblia* (jobb)) [T20].

Dirks és Pierce eredeti cikkükben tömbi oldatban igazolták a HCR működőképességét, elektroforézis segítségével [194], a 50. ábra b) részéhez hasonló módon. Saját kísérleteinket megelőzően a HCR-t tömbi oldatokban, illetve jelöléses eljárásokkal csatoltan alkalmazták sikerrel bioérzékelőkben [195]–[198]. Jelölésmentes bioérzékelők esetén a HCR kimenetele és az elérhető jelerősítés mértéke nem magától értendő. A jelátalakító felületére rögzített állapotban a DNS-molekulák mozgásának szabadsági foka kisebb, mint tömbi oldatban, a túl hosszú molekulák egymást gátolva akadályozhatják a nagyobb komplexek kialakulását a felületen. Plazmonikus elvű érzékelőknél továbbá számolni kell a térerősség felülettől történő lecsengésével, és így az érzékenység arányos csökkenésével, hosszú molekulák esetén.

Céljaink ezek alapján az alábbiak voltak: 1) Igazolni a HCR-effektus alkalmazhatóságát jelölésmentes, plazmonikus nukleotidérzékelők esetén a célmolekula által szolgáltatott jel in-situ erősítésére. 2) Meghatározni a célmolekula detektálási küszöbének kiterjeszhetőségét a HCR-elvvel. 3) Igazolni a HCR-elv alkalmazhatóságát cél-DNS jelének szelektív kiemelésére multi-bioérzékelő környezetben, több komplementer receptor- és cél-DNS-páros jelenlétében.

5.2. Kísérleti eszközök és módszerek

A kísérletekben a BME-ETT oldaláról rajtam kívül Ring Balázs tanszéki mérnök, illetve Pénzes Gyula diplomázó hallgatóm vettek részt. A felhasznált DNS-molekulák elnevezéseit és szekvenciáit az 5. táblázat foglalja össze. A receptor-DNS- és cél-DNS-molekulák a *Giardia lamblia* vízben élő egysejtű kórokozó β -giardin génjéből származnak [199], a hajtú-DNS-molekulákat (H1 és H2) kifejezetten a hibridizációs láncreakcióhoz terveztük, szelektíven. A receptor-DNS 2 – cél-DNS 2, illetve a receptor-DNS 3 – cél-DNS 3 komplementer szekvenciák, amiket negatív kontroll mérésekhez, illetve a multi-bioérzékelés igazolására használtunk. Minden DNS-molekulát a Sigma-Aldrich-től szereztünk be.

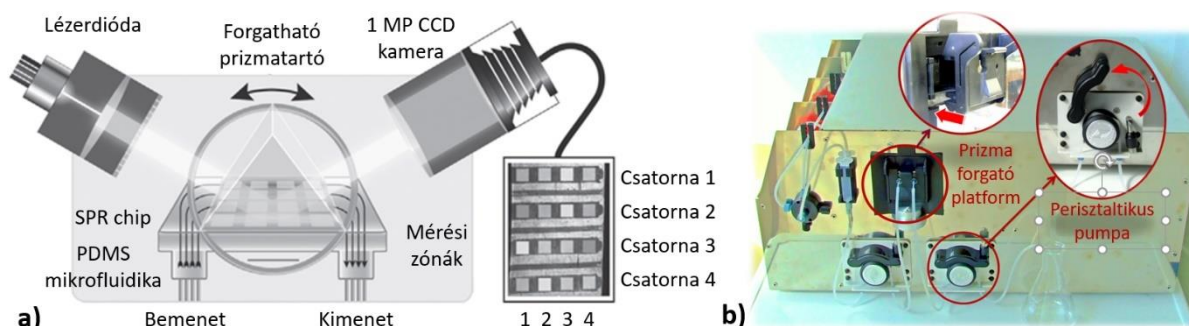
5. táblázat. A kísérletekhez használt DNS-molekulák elnevezése és szekvenciái.

Elnevezés	DNS-szekvencia (5' → 3')
Receptor-DNS 1 (Giardia)	CGTACATCTTCTTCCTTTTT-SH
Cél-DNS 1 (Giardia)	AGGAAGAAGATGTACGACCAGCTCAACGAGAAGGT CGCAG
Hajtú-DNS 1 (H1)	TCAACGAGAAGGTCGCAGTAAGTCCTGCGACCTTCT CGTTGAGCTGGT
Hajtú-DNS 2 (H2)	GACTTACTGCGACCTTCTCGTTGAACCAGCTCAACG AGAAGGTCGCAG
Receptor-DNS 2	HS-ATGCATGCATTAGCATGCTA
Cél-DNS 2	TGGAGAAGTATGATCGACACAGTTTTTTTTTTTAGCATG CTAATGCATGCAT
Receptor-DNS 3	HS-GGTTCCGAAAGTTGGAA
Cél-DNS 3	TTCCAACCTTTCGGAACC

Minden kísérlethez (DNS-immobilizáció, hibridizáció, öblítés) azonos pufferoldatot használtunk 0,5 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 6,8, Millipore vízben oldva. A DNS-immobilizáció a multi-bioérzékelős kísérletek esetén 3 μ M-os receptor-DNS-oldatokból történt a mikrofluidikai cellában, egy éjszakán keresztül. Ebben az esetben az arany vékonyréteg SPR-chipet egy Diener Atto plazmakamrában tisztítottuk a DNS-receptor rögzítése előtt, 5 percig O₂ plazmában, 50 W teljesítményen és 0,4 mbar nyomáson. A HCR-elvet igazoló és *LOD* kiterjesztéses mérések esetén az SPRi-chipeket a bolognai partner (Giampaolo Zuccheri) funkcionálizálta receptor-DNS-sel, PBS-ben oldott 3 μ M-os oldatból, ezeket postai kézbesítés után használtuk. Immobilizáció után a chipet 30 percre 1 mM-os 6-mercapto-1-hexanol (MCH) oldattal kezeltük a nem-specifikusan kötött DNS-molekulák felületről történő eltávolítása érdekében. A DNS-hibridizáció minden esetben a mikrofluidikai cellában történt, mérés közben. Minden kísérletet szobahőmérsékleten végeztünk.

Az SPRi-mérésekhez a BME-ETT saját fejlesztésű SPRi-berendezését használtuk [T23]. A 51. ábra a) részén látható módon az eszköz Kretschmann-konfigurációban mér, kb.

25°-os beesési szög mellett. A fényforrás egy 680 nm-es szuperlumineszcens lézerciódó, a detektor pedig egy 1 MP felbontású CCD-kamera. Az SPRi-chipet (50 nm arany réteg 20 mm × 20 mm-es üveghordozón, 5 nm króm adhéziós réteggel, Mivitec GmbH, Németország) egy egyedi, PDMS-alapú (dimetil-polisziloxán) mikrofluidikai cella rögzíti a prizmához (immerziós olaj illesztéssel). A PDMS-cella négy párhuzamos csatornát tartalmaz (lásd 52. ábra, a), gyártása 3D-gyorsprototipizálással, öntőforma 3D-nyomtatása, majd PDMS-öntés és polimerizáció történt. Az öntőforma Objet Eden 3D-nyomtatóval készült, FullCure 720 modellanyag és FullCure 705 támaszanyag használatával. A PDMS-cella öntéséhez Sylgard 184-es elasztomert (prepolimer keverék) és térhálósítót kevertünk 10:1 arányban (Dow Corning, USA). (További részletekért lást [T24]). A prizmatartó platform (a chippel és mikrofluidikai rendszerrel együtt) forgatható, a beesési szög változtatásával az SPR-rezonancia helye megtalálható és a műszer érzékenysége megfelelően kalibrálható. Mérések közben a platform rögzített pozícióban van, a CCD-kamerán mért intenzitás a kalibráció alapján közvetlenül átszámolható törésmutató változásra. Az eszköz maximális érzékenysége (NaCl hígítási sorral kalibrálva) kb. 1×10^{-6} RIU volt, intenzitás egységenként, ami alatt a CCD-kamera 12 bites AD-átalakítójának 4096-os digitális skáláját értjük [T23].



51. ábra. a) Az SPRi-berendezés mérési elvének illusztrációja [T20], **b)** a BME-ETT saját fejlesztésű, egyedi kialakítású SPRi-berendezésének megfelelően [T23].

A 51. ábra b) részén látható egyedi SPRi-eszköz előnye a nagyfokú modularitása. A mikrofluidikai rendszer áttervezése egyedi igényekre akár egy napos átfutással is megoldható, az eszközhöz kapcsolt perisztaltikus- és fecskendőpumpákkal széles áramlási tartományt át lehet fogni. A HCR-kísérletek esetén a minták és a puffer áramlási sebessége 5 μ l/perc volt.

Az *LOD* kiterjesztését célzó kísérleteket, valamint a negatív kontroll kísérletek egy részét a tanszéki SPRi-berendezés mellett megismételtük a svájci projekt partner Biacore X100 (GE Healthcare) egy pontban mérő SPR-berendezésével is. Az általuk (Fabio M. Spiga) használt eljárások (mosópuffer összetétele, áramlási sebesség, DNS-koncentrációk) megegyeztek a saját kísérleteinkkel. Egy jelentős különbség volt, hogy míg mi nem regeneráltuk a DNS-receptorréteget (egy funkcionális chipet csak egyszer használtunk), addig a svájciak 7 M urea oldattal távolították el a receptorokba kötött cél-DNS-molekulákat, így egy chipet többször is felhasználtak [T20].

5.3. Eredmények és értékelésük

5.3.1. A HCR-effektus validációja szenzorfelületen

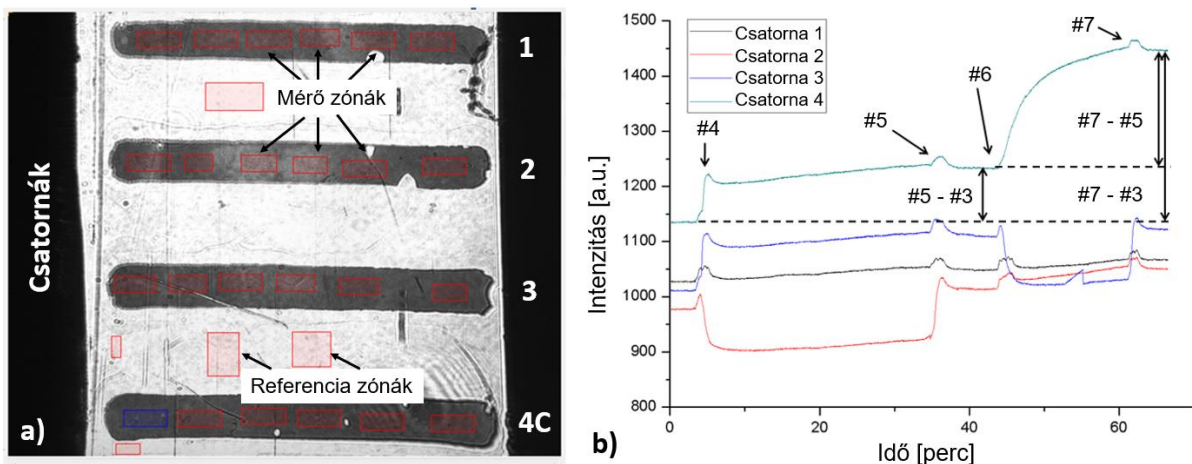
A kísérletek első részének célja a hibridizációs láncreakció folyamat lejátszódásának igazolása volt, szenzorfelülethez kötött DNS-receptor esetén. A HCR-jelenség igazolása sok, körültekintően megválasztott kontroll mérést tett szükségessé. A 6. táblázat és az 53. ábra az összesen 8 különböző kondíció ellenőrzésére végzett mérési lépéseket, és eredményeiket foglalja össze. A sok párhuzamos mérés ideális feladat az SPRi-nek. A mérésekhez használt négycsatornás mikrofluidikai rendszerben (52. ábra a) része) receptor-DNS-molekulákkal funkcionizált chipenként három csatornában 3+3 kondíciót lehetett tesztelni. A negyedik csatornában folyamatosan mérőpuffer áramlott, ez a hőmérsékleti hatások figyelemmel kísérésére és kompenzálására szolgál. Egy konkrét mérést mutat be a 52. ábra b) része. (Megjegyzés: mivel az 1 mM MCH-oldat teljesen telítésbe vitte a skálát, így az ábra az MCH-kezelés utána puffer alapvonalal (#3 lépés) kezdődik.)

6. Táblázat. A HCR-kontroll kísérletekhez a mikrofluidikai cellában elvégzett lépések számozása, a folyamat leírása, és a tesztelt kondíciók meghatározásának módja. A csatornák jelölésénél a 4A, 4B, 4C különböző kísérleti összeállításokat jelölnek. Az 1-3 csatornák a kontroll miatt változatlanok voltak.

Lépés száma	A folyamat leírása, tesztelt kondíció	Idő	Csatorna jelölése	Számolt jelek
#1	Kiindulási állapot, receptor-DNS-molekulákkal funkcionizált felület, áramló mosópuffer	10 p	Összes	-
#2	1 mM MCH-kezelés	30 p	Összes	-
#3	Öblítés mosópufferrel (alapvonal)	10 p	Összes	-
#4	1 μ M nemkomplementer DNS (cél-DNS 3) vagy 1 μ M cél-DNS (Giardia)	30 p	2 3,4	-
#5	Öblítés mosópufferrel (alapvonal)	5 p	Összes	#5-#3
#6	1 μ M nemkomplementer DNS (cél-DNS 3) vagy 1 μ M hajtú-DNS 1 (H1) vagy 1 μ M hajtú-DNS 2 (H2) vagy 1 μ M HCR keverék (0,5 μ M H1 + 0,5 μ M H2)	20 p	3 4A 4B 2,4C	-
#7	Öblítés mosópufferrel (alapvonal)	5 p	Összes	#7-#3
#8	1 μ M hajtú-DNS 1 (H1) vagy 1 μ M hajtú-DNS 2 (H2)	20 p	4B 4A	-
#9	Öblítés mosópufferrel (alapvonal)	5 p	Összes	#9-#3

SPR-mérések esetén a szenzorfelületre kötött molekulák számszerűsítésére mindig az adott ciklus elején és végén a mosópuffer áramoltatása mellett felvett alapvonal jeleket

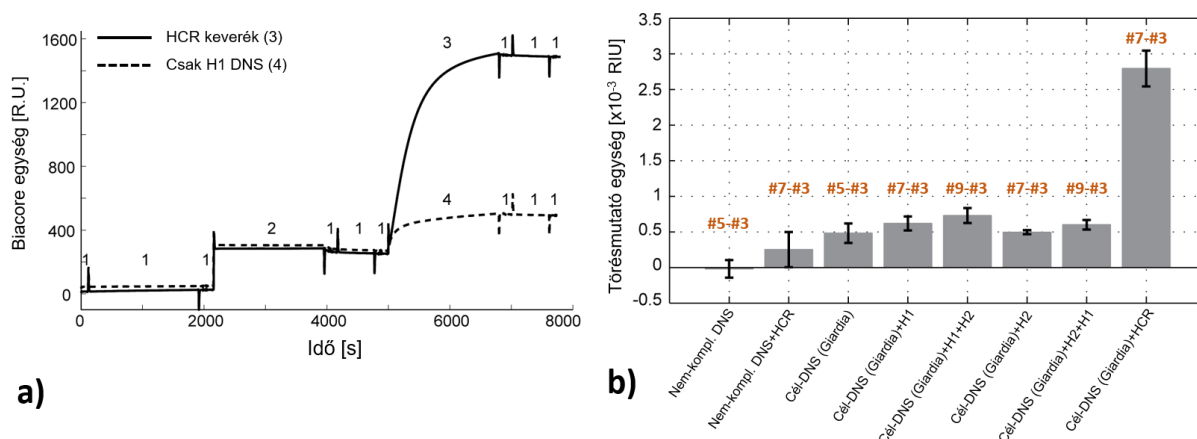
használjuk. Azonos mosópufferben felvett alapvonalai jelek használatával kiküszöbölhetők a különböző oldatkoncentrációk által okozott tömbi hatások, ahogy az a 52.b. ábrán is látható. Itt a nemkomplementer cél-DNS (cél-DNS 3 az 1. táblázatban), törzsoldata (30 μM) 1mM PBS-oldatban (foszfáttal pufferelt sóoldat) állt rendelkezésre, ezt hígítottam a mérés előtt 1 μM koncentrációra, a mosópufferrel (0,5 M NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , pH 6.8). Így a nemkomplementer oldatok törésmutatója a puffer hígítása miatt alacsonyabb a mosópuffernél, illetve a cél-DNS 1 és hajtú-DNS-oldatok pufferkoncentrációjánál is, amelyeket előállításához kizárólag a mosópuffert használtam. Ezért a nemkomplementer-DNS megjelenése egy jól látható alapjel esést okoz a puffer tömbi hatásai miatt (pl. Csatorna 2: #4 és Csatorna 3: #6, a 52.b ábrán). A mosópuffert újból beküldve a csatornába az alapjel visszaő (Csatorna 2: #5 és Csatorna 3: #7), a nemkomplementer-DNS hatása így ezek között az alapjeli értékek között mérhető le (#5-#3, ill. #7-#5). Megjegyzés: a 52.b ábrán látható apró csúcsokat a PDMS-csatorna bemenetére kötött szilikon csövek mechanikus megnyomásával szándékosan helyeztem el, a fázisok váltásának jelölésére.



52. ábra. a) Az SPRi-berendezés kamera képe a négycsatornás PDMS-alapú mikrofluidikai rendszerről, mérés előtt. b) Egy négycsatornás mérés kinetikái a különböző mérési fázisok jelölésével (lásd 6. táblázat). A csatornákból tesztelt folyamatok: 1 – kontroll (áramló puffer); 2 – nemkomplementer cél-DNS 3 majd HCR, 3 – cél-DNS (Giardia) majd nemkomplementer-DNS 3, 4 - cél-DNS (Giardia) majd HCR. (A 6. táblázat jelölései alapján a 4C eset). [T20]

A 52.b ábrán illusztrált mérés esetén az alábbi kondíciók tesztelése történt a négy csatornában. A 3-as és 4-es csatornák kaptak a receptorral komplementer cél-DNS-t, amíg a 2-es csatornában nemkomplementer cél-DNS 2 áramlott. A komplementer cél-DNS jele a befecskendezés után már percekkel később stabil, jól látható növekményt produkált (#5-#3). A nemkomplementer cél-DNS jele a pufferhatás okozta csökkenés után ezzel szemben visszaáll az alapjelre (figyelembe véve az 1-es csatorna segítségével mért alapjelvándorlást is.) A hajtú-DNS-keverék a 4-es csatornán egy nagyon szép kinetikával rendelkező jelet adott (#7-#5), amely nem jelenik meg a negatív kontroll 2-es csatornán. A 3-as csatornán a nemkomplementer cél-DNS 2 az említett pufferhatáson kívül ismét nem adott számottevő jelet.

A 53.a ábrán összehasonlítás képpen látható két (a svájci partnerek által) Biacore X100-as, egy pontban mérő SPR-berendezéssel mért kinetika. Összevetve a BME-ETT saját SPRi-berendezésével mért jelekkel (52.b ábra) látszik, hogy mind a cél-DNS (Giardia) bekötődése, mind a HCR lefolyása jellegre és egymáshoz viszonyított mértékre is hasonló. Az 1 μM cél-DNS-molekulák hatása mindkét esetben szinte azonnali (ez a nagy célmolekula koncentráció gyorsan szaturálja a receptorréteget), az 1 μM HCR-keverék hatására mért kinetika pedig mindkét esetben kb. 20 perc alatt áll be. A négycsatornás SPRi-vel mért összes kontroll kísérlet eredménye alapján (53.b ábra) a cél-DNS + HCR együttes alkalmazása kb. 4–5 \times nagyobb jelet eredményezett az önmagában vett cél-DNS-hibridizációnál ($\sim 0,6 \times 10^{-3}$ RIU $\rightarrow \sim 2,8 \times 10^{-3}$ RIU). A hajtú-DNS-molekulák szekvenciális hozzáadásával mért inkrementális jelnövekmény (H1 \rightarrow H2), illetve annak hiánya nem megfelelő sorrend (H2 \rightarrow H1) esetén megerősíti, hogy a HCR esetén mért jelentős jelugrás a 50. ábra sémájának megfelelő láncreakció, azaz sok hajtú molekula kötődésének együttes hatása. A képződő komplex méretének megbecslése több okból kifolyólag sem lehetséges pontosan. Egyrészt az SPR evanescens terén belül a felülettől távolodva csökken az érzékenység, a behatolási mélységen túl pedig a szenzorelem érzéketlen a változásokra. Másrészt a hosszú duplaszálú DNS-spirálok orientációja sem tekinthető merőlegesnek a felületre.

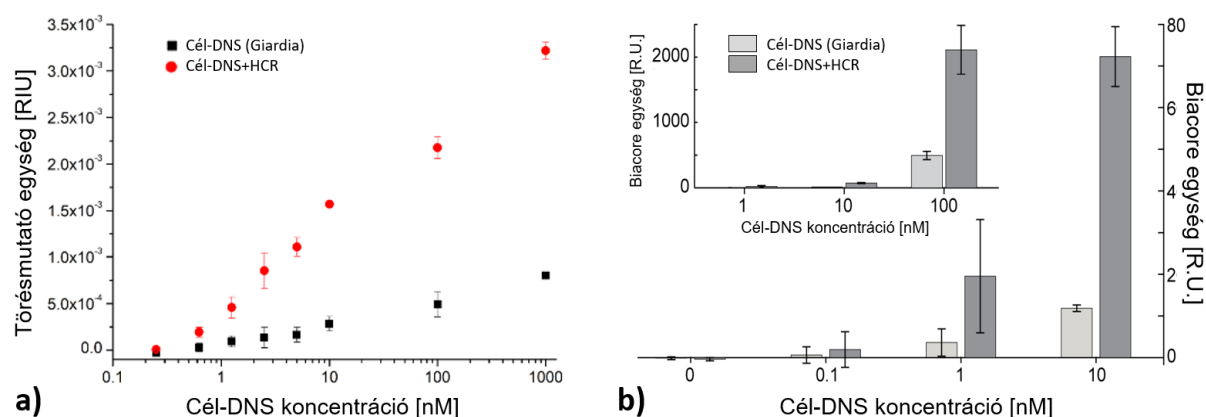


53. ábra. a) Biacore X100-as egy pontban mérő SPR-berendezéssel mért kinetikák. Az egyes szakaszok számozása: 1 – puffer áramoltatása; 2 – 1 μM cél-DNS (Giardia); 3 – hajtú-DNS-keverék (1 μM HCR, 0,5 μM H1 + 0,5 μM H2); 4 – 1 μM hajtú-DNS 1 (H1) önmagában. **b)** A HCR-effektus különböző lépéseinek ellenőrzésére végzett kontroll kísérletek eredményei a BME-ETT SPRi-berendezésével mért adatok alapján. A Cél-DNS (Giardia)+H1+H2 jelölések a hajtú-DNS-molekulák szekvenciális hozzáadását jelentik megfelelő (H1 \rightarrow H2) és fordított (H2 \rightarrow H1) sorrendben. A HCR-reakció során a mindkét hajtú-DNS egyszerre van jelen. A különbségi jelek számítása a 6. táblázat jelölése alapján történt (ismétlésszám: $n = 4-12$) [T20].

Összességében kijelenthető, hogy a HCR-folyamat végbe tud menni funkcionalizált szenzorfelületen és jelentős, 4–5 \times jelnövekményt eredményezhet SPR esetén. A kijelentést erősíti, hogy a kísérletek két független műszerrel lettek elvégezve, közel azonos eredménnyel.

5.3.2. A detektálási küszöb (*LOD*) kiterjesztésének vizsgálata

A kísérletek második részének a célja az volt, hogy megvizsgáljuk mennyivel terjeszthető ki a cél-DNS (*Giardia*) SPR-berendezéssel mért detektálási küszöbe a HCR használatával. A 54. ábrán összehasonlítottam a BME-ETT SPRi-berendezésével, valamint a svájci partner Biacore X100-as SPR-berendezésével mért szenzorkarakterisztikákat. A saját mérések szintén a négycsatornás mikrofluidikai cellában készültek. Az állandó kontroll (1-es) csatorna mellett (lásd 52. ábra) három csatornában három különböző cél-DNS-koncentrációt futtattam a 250 pM – 1 μ M tartományon. A HCR-keverék koncentrációja minden esetben azonos volt (1 μ M HCR, 0,5 μ M H1 + 0,5 μ M H2). A svájciak a koncentrációt logaritmusos léptékben változtatták a 100 pM – 100 nM tartományon, a HCR-keverékük koncentrációja szintén 1 μ M volt. A duplikált mérések célja az önellenőrzés mellett az volt, hogy a készülő publikációban a szenzorkarakterisztikát egy kereskedelmi forgalomban kapható (nem saját fejlesztésű) berendezéssel mérve tudjuk megadni. A Biacore SPR-berendezések saját mértékegysége (Biacore unit, [R.U.]) kb. 1×10^{-6} törésmutató egység változásnak feleltethető meg [200]. A megjelent cikkbe így a nagyobb ismétlésszámmal végrehajtott SPR-mérések eredménye (54.b ábra) került be [T20].



54. ábra. A cél-DNS-molekulák (*Giardia*), illetve a cél-DNS + HCR jelnövekmény a cél-DNS-koncentráció függvényében **a)** a BME-ETT saját SPRi-berendezésével mérve (ismétlésszám: $n = 3$); illetve **b)** a Biacore X100-as berendezéssel, a svájci partnerek által mérve (ismétlésszám: $n = 5-8$) [T20].

A különböző berendezésekkel mért eredmények alapján a HCR a cél-DNS-koncentrációtól függő mértékben 4–7 \times jelnövekményt eredményezett az 1 nM – 1 μ M tartományon. A legkisebb detektált cél-DNS-koncentráció a saját SPRi-mérések esetén 1,25 nM-ról 625 pM-ra csökkent. Figyelembe véve a mikrofluidikai rendszerben használt áramlási sebességet (5 μ l/perc) valamint a cél-DNS-hibridizáció időtartamát (30 perc), a koncentrációk átszámolhatók anyagmennyiségre, amely így 90 fmol-nak, ill. 180 fmol-nak adódik a két koncentrációra. Az $LOD = 3\sigma$ szabály alapján, az üres minta zaját 2×10^5 RIU-nak véve, detektálási küszöbre 1,2 nM, illetve 200 pM adódna a HCR-nélküli és HCR-rel erősített cél-DNS-detektálásra, de az utóbbi esetén a 250 pM-t nem sikerült egyértelműen

kimutatni. Megjegyzendő, hogy a mérések ismétlésszáma alacsony volt az SPRi-kísérleteknél. Az SPRi- és SPR-eredmények összevetésénél feltűnő a Biacore X100-as SPR-rel mért eredmények nagy szórása. A különbség az eltérő módon végrehajtott mérésekben keresendő. Amíg mi az összes méréshez frissen funkcionizált DNS-receptorréteget használtunk és egy receptorréteget nem használtunk fel újra, addig a svájci partner a HCR-reakció után 7 M urea oldattal regenerálta a felületet. Az urea, mint erős kaotróp szer a hidrogénkötések felbontásával denaturálja a DNS-komplexeket, így újra elérhetővé teszi a receptorokat. A DNS-szenzorok regenerációjának hatásfoka azonban nem tökéletes, a regeneráció érzékenység vesztéssel jár a ciklusok számának növelésével [201], ami lehetséges magyarázat a nagyobb szórásokra.

5.3.3. Multi-bioérzékelés és szelektív jelkiemelés HCR-rel

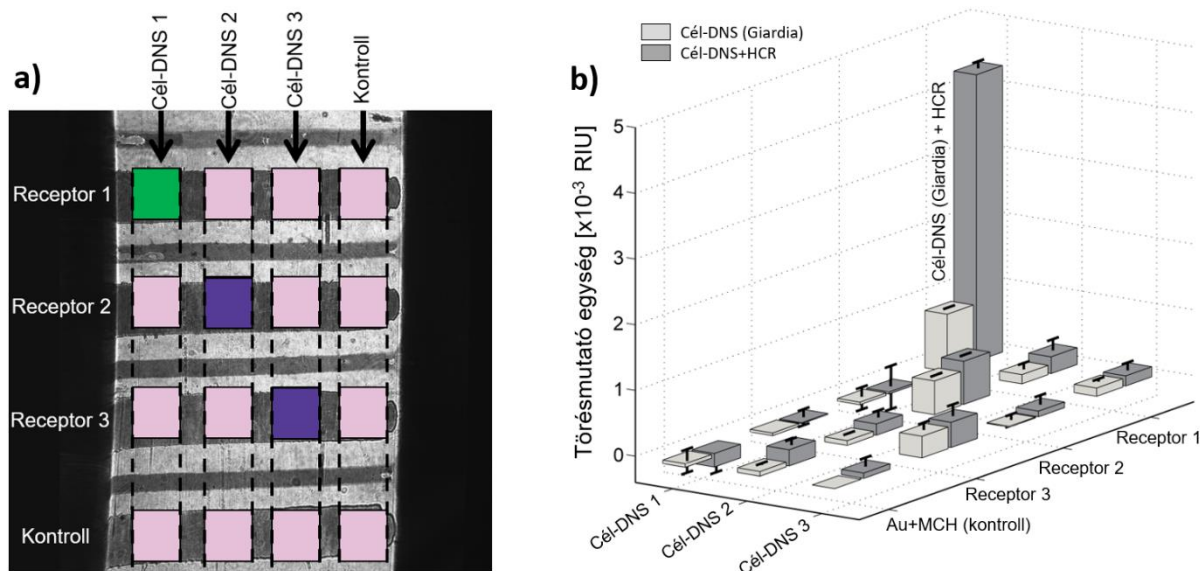
A HCR-jelenség SPR-szenzorfelületen történő validációja, és az *LOD* kiterjeszhetőségének vizsgálata után utolsó célunk annak igazolása volt, hogy a HCR alkalmas multi-bioérzékelők esetén egy csatorna jelének szelektív kiemelésére. Az ehhez tervezett 3×3-as multi-bioérzékelő (három egymással komplementer receptor- és cél-DNS-párból álló rendszer) létrehozásának és tesztelésének lépéseit és a kísérletsorozat csatorna-kiosztását a 7. táblázat mutatja be.

7. táblázat. A multi-bioérzékelős HCR-kísérletek szekvenciája a négycsatornás rendszerben.

Lépés száma	Idő	Csatorna 1	Csatorna 2	Csatorna 3	Csatorna 4
#1	Éjszaka	3 μ M receptor-DNS 1 (Giardia)	3 μ M receptor-DNS 2	3 μ M receptor-DNS 3	Mosópuffer
#2	10 p	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer
#3	30 p	1 mM MCH	1 mM MCH	1 mM MCH	1 mM MCH
Csatorna szétszedés és forgatás 90°-al					
#4	10 p	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer
#5	30 p	1 μ M cél-DNS 1 (Giardia)	1 μ M cél-DNS 2	1 μ M cél-DNS 3	Mosópuffer
#6	10 p	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer
#7	30 p	1 μ M HCR keverék	1 μ M HCR keverék	1 μ M HCR keverék	Mosópuffer
#8	10 p	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer	Mosópuffer

A legjelentősebb különbség a korábbi mérésekhez képest, hogy eddig a teljes SPRi-chip felületét funkcionizáltuk egy receptor-DNS-sel, míg most három különböző receptort kell a chip különböző területeire kötni. Ehhez a DNS-immobilizációt is a mikrofluidikai cellában végeztük (egy éjszakát állt az immobilizációs oldat a csatornában), majd az MCH-

kezelés után (#3 lépés) a csatornarendszert 90° -al elforgattuk a funkcionalizált szenzorfelületen, így a 55.a ábrán látható metszetek jöttek létre a receptor-DNS-molekulák sávjai és a csatornák között. A 16 lehetséges metszéspontból három esetben várhatunk komplementer-DNS-bekötődést (lila és zöld négyzetek). A cél-DNS bekötődése után a HCR-keveréket mindhárom csatornába beinjektáljuk, azonban mivel a hajtú-DNS-molekulák csak a cél-DNS 1 (Giardia) molekulára nyitnak ki, így láncreakciót és szelektív jelnövekményt csak ebben a csatornában (zöld négyzet) várunk. Az eredményeket a 55.b ábra szemlélteti.



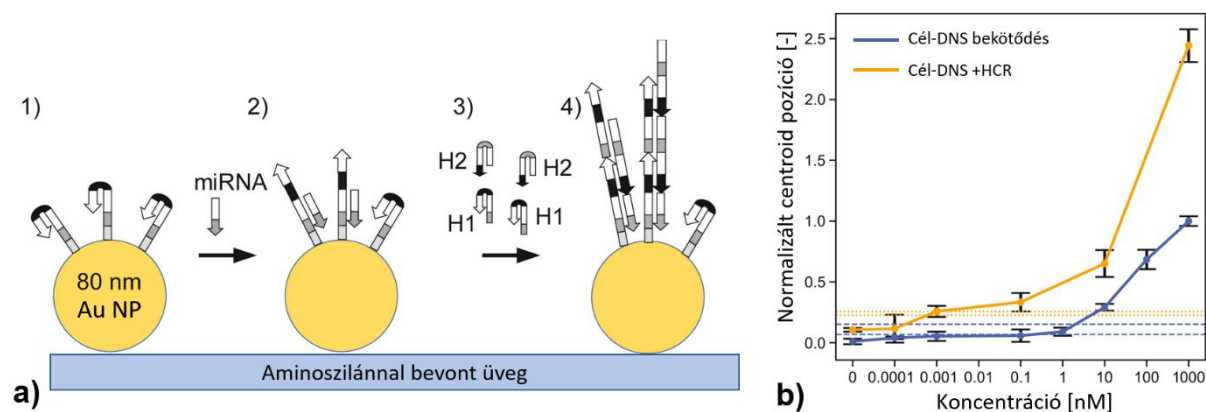
55. ábra. a) Az SPRi-berendezés kamera képe a mérésekhez használt négycsatornás PDMS mikrofluidikai rendszerről. A függőleges vonalak a felület funkcionalizálását követő 90° -os elforgatás után jelölik a csatornákat és a kialakuló 16 metszéspontot. **b)** A multi-bioérzékelős kísérletek eredménye (ismétlésszám: $n = 3$) [T20].

A komplementer cél-DNS molekulák hibridizációja mindhárom receptor-célmolekula páros esetén mérhető (a negatív kontrolloktól elkülönülő) jelet adott. A HCR csak a hajtú-DNS-molekulákkal komplementer cél-DNS 1 (Giardia) esetén ment végbe. Megjegyzendő, hogy a cél-DNS 1 hibridizáció és az azt követő HCR is nagyobb jelet adott, mint a korábbi, 5.3.1. alfejezetben ismertetett kísérletek esetén: itt $\sim 0,8 \times 10^{-3}$ RIU $\rightarrow \sim 4,2 \times 10^{-3}$ RIU volt a mért jel a két esetben. A különbség feltételezett oka, hogy ennél a mérőszorozatnál az SPRi-chipek funkcionalizálása közvetlenül a DNS-hibridizáció előtt történt, míg a korábbi kísérleteknél a chipet a bolognai partner funkcionalizálta, azokat mi hetekkel később használtuk fel a mérésekre. Megjegyzendő, hogy a mikrofluidikai cella is fejlesztéseken esett át a mérőszorozatok között (ahogy a 52.a és 55.a képek összevetéséből is látszik). A csatornák megerősített peremet és elválasztásokat kaptak a jobb tömítés érdekében.

Az eredmények alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a HCR alkalmas a kívánt cél-DNS-molekula jelének egyértelmű és határozott kiemelésére multi-bioérzékelők esetén. Mivel a HCR-folyamat beindulása a cél-DNS, mint iniciátor jelenlététől függ, az eljárás alkalmas lehet hamis-pozitív szenzorjelek kiküszöbölésére is.

5.3.4. Kitekintés, további tervek

A relevanciája miatt kitekintésként érdemes megemlíteni, hogy 2019-ben Dr. Giampaolo Zuccheri csoportja a jénai Leibniz-IPHT intézettel együttműködésben megismételték a hibridizációs láncreakciós kísérletet nanorészecske-alapú LSPR-szenzorokkal. A 2020-ban publikált munkájuk során rövid mikro-RNS-láncok detektálása volt a cél [202]. A 23 nukleobázis hosszúságú cél-RNS-lánchoz 46–46 hosszúságú hajtú-DNS-molekulákat (H1 és H2) használtak, vagyis a láncok hossza összemérhető a mi korábbi kísérleteinkkel. A folyamat illusztrációja és a főbb eredmények láthatók az 56. ábrán.



56. ábra. a) A hibridizációs láncreakció folyamatának szemléltetése üveghordozóra rögzített, 80 nm átmérőjű arany nanogömbök esetén. **b)** A HCR-jelerősítés mértéke különböző cél-DNS koncentrációk esetén (kék – csak a cél-DNS bekötődés, sárga – HCR után). [202]

Az LSPR-érzékelővel a mikro-RNS-molekulák detektálási küszöbe kb. 1 nM volt. Bár ez nagyságrendileg megegyezik a 4.6. fejezetben bemutatott nanokompozit alapú LSPR-érzékelőnk *LOD*-jával, megjegyzendő, hogy a jelváltozás mértéke itt sokkal kisebb. Amíg a mi esetünkben 1 μ M-os cél-DNS hatására kb. 7 nm-t változott a spektrum, addig itt 1 μ M-os cél-RNS mindössze 0,5 nm eltolást okoz, a nanogömbök alacsonyabb érzékenysége miatt. A jobb *LOD* oka jelen esetben a jénaiak fejlettebb mérés technikából adódó kisebb mérési zajja.

A saját SPR-es mérésekkel összevetésben két érdekes különbséget is megfigyelhetünk az 56. ábra b) grafikonján. Egyrészt a maximális HCR hatására mért jelnövekmény itt mindössze 2 \times körül van, szemben az SPR-nél tapasztalt 4–7 \times jelnövekménnyel. Ezzel szemben az *LOD* kiterjesztése LSPR-nél jóval nagyobb (három nagyságrend 1 nM \rightarrow 1 pM), mint SPR-nél volt (egy nagyságrend alatt). Ez az eredmény szépen összevág azzal, hogy SPR esetén a plazmonter behatolási mélysége jóval nagyobb, a felépülő HCR-komplexből többet látunk (nagyobb jelnövekmény), mint LSPR esetén. Az LSPR fókuszáltabb tere viszont lehetővé teszi kevés célmolekula hatékony detektálását.

A HCR-elv láthatóan alkalmas LSPR-érzékelők esetén is az érzékelési tartomány és a detektálási küszöb kitolására, nukleotidérzékelők esetén. A disszertáció beadásának idején a cél a jénai partner mérés technikájának egyesítése a mi nagyobb érzékenységgű nanokompozit-alapú érzékelőinkkel, amivel a detektálási küszöb kitolható lenne a pM alatti tartományokra is.

6. Összefoglalás

6.1. Az új tudományos eredmények összefoglalása

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, a (t1) egyenlet szerint, ahol RIS a tömbi törésmutató-érzékenység, Δn a törésmutató-változás, $\Delta\lambda_p$ a plazmonrezonancia csúcscsúszása, az S és M indexek pedig a szimpla és többrészecskés rendszereket jelölik.

$$EF_{\infty} = \frac{RIS_M}{RIS_S} = \frac{\frac{\Delta\lambda_{p,M}}{\Delta n}}{\frac{\Delta\lambda_{p,S}}{\Delta n}} = \frac{\Delta\lambda_{p,M}}{\Delta\lambda_{p,S}} \quad t1$$

A módszert sikeresen alkalmaztam plazmonikusan csatolt, arany nanogömb, nanokocka, illetve nanszferoid alakú, 10–90 nm átmérőjű dimerek (kétrészecskés 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 publikációk: T1, T3, T5, T6, T12, T16, T14, T19

II. Tézis

Bevezetem a molekuláris érzékenység alapján számolható erősítési tényezőt (EF_t), amely az adott vastagságú (t) molekuláris réteg szimpla (S) illetve többrészecskés (M) elrendezésre kötésével mért csúcscsúszás ($\Delta\lambda_p$) hányadosaként határozható meg, (t2) szerint.

$$EF_t = \frac{\Delta\lambda_{p,t,M}}{\Delta\lambda_{p,t,S}} \quad t2$$

BEM-szimulációk segítségével megmutattam, hogy csatolt nanorészecskék esetén $EF_t > EF_{\infty}$, és a különbség főként a $t < D$ tartományon jelentős ($D/D_0 < 1$). 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 publikációk: T3

III. Tézis

Kidolgoztam egy eljárást komplex nanorészecske-rendszerek plazmonikus viselkedésének BEM-módszerrel történő szimulációjára, atomerő-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 publikációk: 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 cm^2 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 csúcseltolódás 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 publikációk: 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 érzékenyséű 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 térrészéből 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 szenzorelemeken mérhető maximális karakterisztikus Raman-szórás intenzitás, 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 közeltér 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 közelteret 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.

$$SERS EF_S = \frac{I_{SERS}/N_{surf}}{I_{RS}/N_{vol}}; \quad SERS EF_E(\lambda) = \frac{\int_0^{2\pi} \int_{r_0}^{r_0+r_l} \frac{E(\lambda, r, \theta)^4}{E_0(\lambda, r, \theta)^4} dr d\theta}{(r_0 + r_l)^2 \pi - r_0^2 \pi} \quad t3$$

Kapcsolódó publikációk: T2, T4, T7, T11

VI. Tézis

Igazoltam, hogy a DNS hibridizációs láncreakció (HCR) alkalmas plazmonikus elvű nukleotidérzékelők jelének in-situ erősítésére. SPR-képkalkotásos 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 hajtú-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 publikációk: T20

6.2. 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/acsanm.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/acсами.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

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az Elektronikai Technológia Tanszék mindenkori vezetésének, Dr. Harsányi Gábor, valamint Dr. Illés Balázs tanszékvezetőknek és Dr. Jakab László, valamint Dr. Krammer Olivér tanszékvezető-helyetteseknek a kutatáshoz szükséges körülmények megteremtéséért és fenntartásáért.

Köszönöm Dr. Harsányi Gábornak és Dr. Sántha Hunornak, hogy megalapozták a tanszéken ezt a kutatási vonalat, valamint, hogy hallgatóként és doktoranduszként is konzulenseim, témavezetőim voltak ezen a területen, és hogy szakmai iránymutatásukkal segítették a munkámat.

Köszönettel tartozom a BME-ETT minden munkatársának, akik napi szinten társaim a közös munkában.

Köszönömöm Dr. Illyefalvi-Vitéz Zsoltnak a szakmai- és közéleti-tevékenységekben a támogatását és iránymutatását.

Szerencsésnek érzem magam, mert az évek során izgalmas szakmai problémákkal sodort szembe az élet, amiknek a megoldása során számos, széles spektrumból (különböző diszciplínából) érkező kollégával dolgozhattam együtt. Nagyon hálás vagyok ezekért az együttműködésekért, és hiszem azt, hogy a modern világban, multidiszciplináris kutatási területen, csak összefogva van esélyünk a kutatás élvonalába tartozó eredményeket elérni. *A teljesség igénye és az összes társszerző felsorolása nélkül, a jelen tézisfüzetben felsorolt kutatási területek kapcsán az alábbi kollégáknak tartozom kiemelt köszönettel:*

Dr. Tomáš Lednický-nek az arany nanorészecske–epoxi plazmonikus nanokompozit kifejlesztéséhez elvégzett hatalmas munkájáért.

Dr. Csarnovics Istvánnak és Szántó Gézának a Debreceni Egyetemről az arany nanoszigetes, illetve szimulációs témák kapcsán.

Dr. Veres Miklósnak és Dr. Rigó Istvánnak és Shereen Zangana-nak a Raman-spektroszkópiás mérések kapcsán.

Dr. Giampaolo Zuccherinek, Dr. Fabio Spiga-nak, Ring Balázsnak és Péntes Gyulának a HCR mérések kapcsán.

Köszönöm minden doktoranduszomnak és hallgatómnak a napi szintű közös munkát és segítséget.

Az együttműködő partnerek közül kiemelt köszönettel tartozom a NAPLIFE-projekt és a Wigner FK munkatársainak, valamint a Dr. Horváth Róbert által vezetett ELKH-EK-MFA Nanobioszenzorika Csoport munkatársainak is.

Köszönöm a feleségemnek és családomnak az önzetlen támogatást, és végtelen türelmet, ami nélkül ez a mű sem jöhetett volna létre.

8. Irodalomjegyzék

- [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, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [2] Yellow Springs Instrument Company, “Company History,” 2022. <https://www.yysi.com/about/history> (accessed Jan. 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, doi: 10.1016/0250-6874(83)85036-7.
- [4] J. Homola, “Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species,” *Chemical Reviews*, vol. 108, no. 2. 2008. doi: 10.1021/cr068107d.
- [5] D. Wang *et al.*, “Recent advances in surface plasmon resonance imaging sensors,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 6. 2019. doi: 10.3390/s19061266.
- [6] 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, doi: 10.1515/CCLM.2010.063.
- [7] A. Dmitriev, Ed., *Nanoplasmonic Sensors*. New York, NY: Springer New York, 2012. doi: 10.1007/978-1-4614-3933-2.
- [8] A. Trügler, *Optical Properties of Metallic Nanoparticles*, vol. 232. Cham: Springer International Publishing, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-25074-8.
- [9] M. Li, S. K. Cushing, and N. Wu, “Plasmon-enhanced optical sensors: A review,” *Analyst*, vol. 140, no. 2. 2015. doi: 10.1039/c4an01079e.
- [10] R. W. Wood, “On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum,” *Proceedings of the Physical Society of London*, vol. 18, no. 1, 1901, doi: 10.1088/1478-7814/18/1/325.
- [11] Lord Rayleigh, “On the dynamical theory of gratings,” *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 79, no. 532, 1907, doi: 10.1098/rspa.1907.0051.
- [12] U. Fano, “The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld’s Waves),” *Journal of the Optical Society of America*, vol. 31, no. 3, 1941, doi: 10.1364/josa.31.000213.
- [13] R. H. Ritchie, “Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films,” *Physical Review*, vol. 106, no. 5, 1957, doi: 10.1103/PhysRev.106.874.
- [14] C. J. Powell and J. B. Swan, “Origin of the characteristic electron energy losses in aluminum,” *Physical Review*, vol. 115, no. 4, 1959, doi: 10.1103/PhysRev.115.869.
- [15] A. Otto, “Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection,” *Zeitschrift für Physik*, vol. 216, no. 4, 1968, doi: 10.1007/BF01391532.
- [16] E. Kretschmann and H. Raether, “Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light,” *Zeitschrift für Naturforschung A*, vol. 23, no. 12, pp. 2135–2136, Dec. 1968, doi: 10.1515/zna-1968-1247.
- [17] J. G. Gordon and S. Ernst, “Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface,” *Surface Science*, vol. 101, no. 1–3, 1980, doi: 10.1016/0039-6028(80)90644-5.

- [18] C. Nylander, B. Liedberg, and T. Lind, "Gas detection by means of surface plasmon resonance," *Sensors and Actuators*, vol. 3, no. C, 1982, doi: 10.1016/0250-6874(82)80008-5.
- [19] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundström, "Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 10, no. 8, 1995, doi: 10.1016/0956-5663(95)96965-2.
- [20] Nicoya Company, "Alto," 2022. <https://nicoyalife.com/products/spr-instruments/alto/> (accessed Jan. 30, 2022).
- [21] P. Drude, "Zur Elektronentheorie der Metalle," *Annalen der Physik*, vol. 306, no. 3, 1900, doi: 10.1002/andp.19003060312.
- [22] P. Drude, "Zur Elektronentheorie der Metalle; II. Teil. Galvanomagnetische und thermomagnetische Effecte," *Annalen der Physik*, vol. 308, no. 11, 1900, doi: 10.1002/andp.19003081102.
- [23] N. D. Mermin and N. W. Ashcroft, *Solid State Physics*, vol. 1. Brooks Cole, USA, 1976.
- [24] A. Derkachova, K. Kolwas, and I. Demchenko, "Dielectric Function for Gold in Plasmonics Applications: Size Dependence of Plasmon Resonance Frequencies and Damping Rates for Nanospheres," *Plasmonics*, vol. 11, no. 3, 2016, doi: 10.1007/s11468-015-0128-7.
- [25] K. Kolwas and A. Derkachova, "Impact of the interband transitions in gold and silver on the dynamics of propagating and localized surface plasmons," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 7, 2020, doi: 10.3390/nano10071411.
- [26] P. B. Johnson and R. W. Christy, "Optical constants of the noble metals," *Physical Review B*, vol. 6, no. 12, 1972, doi: 10.1103/PhysRevB.6.4370.
- [27] A. D. Rakić, A. B. Djurišić, J. M. Elazar, and M. L. Majewski, "Optical properties of metallic films for vertical-cavity optoelectronic devices," *Applied Optics*, vol. 37, no. 22, 1998, doi: 10.1364/ao.37.005271.
- [28] C. Liu, "Localized surface plasmon resonance biosensors for real-time biomolecular binding study," 2013.
- [29] Xantec Bioanalytics, "Tech Notes: Principles of SPR," 2022. https://www.xantec.com/technotes/spr_principle.php (accessed Jan. 30, 2022).
- [30] C. Howe, M. T. Fromhold, and N. A. Russell, "Surface plasmon resonance on gold microstructures," 2018. doi: 10.1117/12.2300953.
- [31] K. M. Mayer and J. H. Hafner, "Localized surface plasmon resonance sensors," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 6, 2011. doi: 10.1021/cr100313v.
- [32] P. Mulvaney, "Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles," *Langmuir*, vol. 12, no. 3, 1996, doi: 10.1021/la9502711.
- [33] Y. Li, K. Zhao, H. Sobhani, K. Bao, and P. Nordlander, "Geometric dependence of the line width of localized surface plasmon resonances," *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 4, no. 8, 2013, doi: 10.1021/jz4004137.
- [34] Z. Liu, G. Liu, X. Liu, and G. Fu, "Plasmonic sensors with an ultra-high figure of merit," *Nanotechnology*, vol. 31, no. 11, 2020, doi: 10.1088/1361-6528/ab5a00.
- [35] M. H. Tu, T. Sun, and K. T. V. Grattan, "LSPR optical fibre sensors based on hollow gold nanostructures," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 191, 2014, doi: 10.1016/j.snb.2013.09.094.

- [36] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: review," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 54, no. 1, 1999, doi: 10.1016/S0925-4005(98)00321-9.
- [37] Z. Zhang *et al.*, "Plasmonic refractive index sensor with high figure of merit based on concentric-rings resonator," *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 1, 2018, doi: 10.3390/s18010116.
- [38] B. Liu *et al.*, "A Plasmonic Sensor Array with Ultrahigh Figures of Merit and Resonance Linewidths down to 3 nm," *Advanced Materials*, vol. 30, no. 12, 2018, doi: 10.1002/adma.201706031.
- [39] Analytical Technologies, "Knowledge: Comparison between SPR & LSPR," 2020. <https://analytical-online.com/knowledge/comparison-between-lspr-spr> (accessed Jan. 30, 2022).
- [40] A. v. Kabashin *et al.*, "Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing," *Nature Materials*, vol. 8, no. 11, 2009, doi: 10.1038/nmat2546.
- [41] M. Svedendahl, S. Chen, A. Dmitriev, and M. Käll, "Refractometric sensing using propagating versus localized surface plasmons: A direct comparison," *Nano Letters*, vol. 9, no. 12, 2009, doi: 10.1021/nl902721z.
- [42] J. R. Lakowicz, "Plasmonics in biology and plasmon-controlled fluorescence," *Plasmonics*, vol. 1, no. 1, 2006. doi: 10.1007/s11468-005-9002-3.
- [43] E. Prodan, C. Radloff, N. J. Halas, and P. Nordlander, "A Hybridization Model for the Plasmon Response of Complex Nanostructures," *Science*, vol. 302, no. 5644, 2003, doi: 10.1126/science.1089171.
- [44] S. Sheikholeslami, Y. W. Jun, P. K. Jain, and A. P. Alivisatos, "Coupling of optical resonances in a compositionally asymmetric plasmonic nanoparticle dimer," *Nano Letters*, vol. 10, no. 7, 2010, doi: 10.1021/nl101380f.
- [45] N. Zohar, L. Chuntonov, and G. Haran, "The simplest plasmonic molecules: Metal nanoparticle dimers and trimers," *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 21, 2014. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2014.10.002.
- [46] T. S. Deng, J. Parker, Y. Yifat, N. Shepherd, and N. F. Scherer, "Dark Plasmon Modes in Symmetric Gold Nanoparticle Dimers Illuminated by Focused Cylindrical Vector Beams," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 122, no. 48, 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b10415.
- [47] Y. Gao, N. Zhou, Z. Shi, X. Guo, and L. Tong, "Dark dimer mode excitation and strong coupling with a nanorod dipole," *Photonics Research*, vol. 6, no. 9, 2018, doi: 10.1364/prj.6.000887.
- [48] V. Myroshnychenko *et al.*, "Modelling the optical response of gold nanoparticles," *Chemical Society Reviews*, vol. 37, no. 9, 2008, doi: 10.1039/b711486a.
- [49] E. Hao and G. C. Schatz, "Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers," *Journal of Chemical Physics*, vol. 120, no. 1, 2004, doi: 10.1063/1.1629280.
- [50] I. Romero, J. Aizpurua, G. W. Bryant, and F. J. García De Abajo, "Plasmons in nearly touching metallic nanoparticles: singular response in the limit of touching dimers," *Optics Express*, vol. 14, no. 21, 2006, doi: 10.1364/oe.14.009988.
- [51] A. Aubry, D. Y. Lei, S. A. Maier, and J. B. Pendry, "Interaction between plasmonic nanoparticles revisited with transformation optics," *Physical Review Letters*, vol. 105, no. 23, 2010, doi: 10.1103/PhysRevLett.105.233901.

- [52] J. Zuloaga, E. Prodan, and P. Nordlander, “Quantum description of the plasmon resonances of a nanoparticle dimer,” *Nano Letters*, vol. 9, no. 2, 2009, doi: 10.1021/n1803811g.
- [53] C. Sönnichsen, B. M. Reinhard, J. Liphardt, and A. P. Alivisatos, “A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles,” *Nature Biotechnology*, vol. 23, no. 6, 2005, doi: 10.1038/nbt1100.
- [54] I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, “Radiative decay engineering 4. Experimental studies of surface plasmon-coupled directional emission,” *Analytical Biochemistry*, vol. 324, no. 2, 2004, doi: 10.1016/j.ab.2003.09.036.
- [55] G. Baffou, F. Cichos, and R. Quidant, “Applications and challenges of thermoplasmonics,” *Nature Materials*, vol. 19, no. 9. 2020. doi: 10.1038/s41563-020-0740-6.
- [56] C. Sönnichsen *et al.*, “Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods,” *Physical Review Letters*, vol. 88, no. 7, 2002, doi: 10.1103/PhysRevLett.88.077402.
- [57] Y. He, K. Laugesen, D. Kamp, S. A. Sultan, L. B. Oddershede, and L. Jauffred, “Effects and side effects of plasmonic photothermal therapy in brain tissue,” *Cancer Nanotechnology*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s12645-019-0053-0.
- [58] J. E. Morris, *Nanopackaging: Nanotechnologies and electronics packaging*. 2018. doi: 10.1007/978-3-319-90362-0.
- [59] L. P. Csernai, N. Kroo, and I. Papp, “Radiation dominated implosion with nano-plasmonics,” *Laser and Particle Beams*, vol. 36, no. 2, 2018, doi: 10.1017/S0263034618000149.
- [60] A. J. Haes, D. A. Stuart, S. Nie, and R. P. van Duyne, “Using solution-phase nanoparticles, surface-confined nanoparticle arrays and single nanoparticles as biological sensing platforms,” *Journal of Fluorescence*, vol. 14, no. 4. 2004. doi: 10.1023/B:JOFL.0000031817.35049.1f.
- [61] B. Sepúlveda, P. C. Angelomé, L. M. Lechuga, and L. M. Liz-Marzán, “LSPR-based nanobiosensors,” *Nano Today*, vol. 4, no. 3. 2009. doi: 10.1016/j.nantod.2009.04.001.
- [62] S. Unser, I. Campbell, D. Jana, and L. Sagle, “Direct glucose sensing in the physiological range through plasmonic nanoparticle formation,” *Analyst*, vol. 140, no. 2, 2015, doi: 10.1039/c4an01496k.
- [63] M. Sriram, K. Zong, S. R. C. Vivekchand, and J. Justin Gooding, “Single nanoparticle plasmonic sensors,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 10. 2015. doi: 10.3390/s151025774.
- [64] M. P. Raphael, J. A. Christodoulides, S. P. Mulvaney, M. M. Miller, J. P. Long, and J. M. Byers, “A new methodology for quantitative LSPR biosensing and imaging,” *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 3, 2012, doi: 10.1021/ac2023266.
- [65] D. Raghu *et al.*, “Nanoplasmonic pillars engineered for single exosome detection,” *PLoS ONE*, vol. 13, no. 8, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0202773.
- [66] T. Endo *et al.*, “Multiple label-free detection of antigen-antibody reaction using localized surface plasmon resonance-based core-shell structured nanoparticle layer nanochip,” *Analytical Chemistry*, vol. 78, no. 18, 2006, doi: 10.1021/ac0608321.
- [67] S. Klinghammer *et al.*, “Plasmonic Biosensor Based on Vertical Arrays of Gold Nanoantennas,” *ACS Sensors*, vol. 3, no. 7, 2018, doi: 10.1021/acssensors.8b00315.
- [68] 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, doi: 10.1021/acsanm.9b00930.

- [69] J. A. Ruemmele, W. P. Hall, L. K. Ruvuna, and R. P. van Duyne, "A localized surface plasmon resonance imaging instrument for multiplexed biosensing," *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 9, 2013, doi: 10.1021/ac400192f.
- [70] H. Yoshikawa, M. Murahashi, M. Saito, S. Jiang, M. Iga, and E. Tamiya, "Parallelized label-free detection of protein interactions using a hyper-spectral imaging system," *Analytical Methods*, vol. 7, no. 12, 2015, doi: 10.1039/c5ay00738k.
- [71] Z. Zhu, T. Zhu, and Z. Liu, "Raman scattering enhancement contributed from individual gold nanoparticles and interparticle coupling," *Nanotechnology*, vol. 15, no. 3, 2004, doi: 10.1088/0957-4484/15/3/022.
- [72] H. Kuzmany, *Solid-State Spectroscopy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998. doi: 10.1007/978-3-662-03594-8.
- [73] M. Veres, "Nanokristályos gyémánt és más szénszerkezetek Raman szórása különböző gerjesztő hullámhosszakkal," Budapest, 2019.
- [74] L. Guerrini and D. Graham, "Molecularly-mediated assemblies of plasmonic nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, no. 21, 2012, doi: 10.1039/c2cs35118h.
- [75] L. Jensen, C. M. Aikens, and G. C. Schatz, "Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering," *Chemical Society Reviews*, vol. 37, no. 5, 2008, doi: 10.1039/b706023h.
- [76] G. Barbillon, "Fabrication and SERS performances of metal/Si and metal/ZnO nanosensors: A review," *Coatings*, vol. 9, no. 2, 2019. doi: 10.3390/COATINGS9020086.
- [77] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, and L. Fabris, "A review on surface-enhanced Raman scattering," *Biosensors*, vol. 9, no. 2, 2019. doi: 10.3390/bios9020057.
- [78] L. M. Almejadi, S. M. Curley, N. A. Tokranova, S. A. Tenenbaum, and I. K. Lednev, "Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Single Molecule Protein Detection," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-48650-y.
- [79] C. Zong *et al.*, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges," *Chemical Reviews*, vol. 118, no. 10, 2018. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00668.
- [80] J. Langer *et al.*, "Present and future of surface-enhanced Raman scattering," *ACS Nano*, vol. 14, no. 1, 2020. doi: 10.1021/acsnano.9b04224.
- [81] E. C. le Ru, E. Blackie, M. Meyer, and P. G. Etchegoint, "Surface enhanced raman scattering enhancement factors: A comprehensive study," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 111, no. 37, 2007, doi: 10.1021/jp0687908.
- [82] E. Hutter and M. P. Pileni, "Detection of DNA hybridization by gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 27, 2003, doi: 10.1021/jp0342834.
- [83] X. Qi and J. Bi, "Plasmonic sensors relying on nanoparticle arrays created by a template-directed dewetting process," *Optics Communications*, vol. 453, 2019, doi: 10.1016/j.optcom.2019.124328.
- [84] J. Spadavecchia *et al.*, "Approach for plasmonic based DNA sensing: Amplification of the wavelength shift and simultaneous detection of the plasmon modes of gold nanostructures," *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 6, 2013, doi: 10.1021/ac3036316.

- [85] L. Soares *et al.*, “Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensing using gold nanotriangles: Detection of DNA hybridization events at room temperature,” *Analyst*, vol. 139, no. 19, 2014, doi: 10.1039/c4an00810c.
- [86] A. H. Nguyen and S. J. Sim, “Nanoplasmonic biosensor: Detection and amplification of dual bio-signatures of circulating tumor DNA,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 67, 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.09.003.
- [87] 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, doi: 10.3390/nano3010192.
- [88] S. Kaye *et al.*, “Label-free detection of DNA hybridization with a compact LSPR-based fiber-optic sensor,” *Analyst*, vol. 142, no. 11, 2017, doi: 10.1039/c7an00249a.
- [89] H. Su, X. R. Cheng, T. Endo, and K. Kerman, “Photonic crystals on copolymer film for label-free detection of DNA hybridization,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 103, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2017.12.013.
- [90] C. Li *et al.*, “LSPR optical fiber biosensor based on a 3D composite structure of gold nanoparticles and multilayer graphene films,” *Optics Express*, vol. 28, no. 5, 2020, doi: 10.1364/oe.385128.
- [91] C. Huang, J. Ye, S. Wang, T. Stakenborg, and L. Lagae, “Gold nanoring as a sensitive plasmonic biosensor for on-chip DNA detection,” *Applied Physics Letters*, vol. 100, no. 17, 2012, doi: 10.1063/1.4707382.
- [92] J. Roether, K. Y. Chu, N. Willenbacher, A. Q. Shen, and N. Bhalla, “Real-time monitoring of DNA immobilization and detection of DNA polymerase activity by a microfluidic nanoplasmonic platform,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 142, 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.111528.
- [93] S. Zhu, H. Li, M. Yang, and S. W. Pang, “Label-free detection of live cancer cells and DNA hybridization using 3D multilayered plasmonic biosensor,” *Nanotechnology*, vol. 29, no. 36, 2018, doi: 10.1088/1361-6528/aac8fb.
- [94] M. R. Gartia *et al.*, “Colorimetric Plasmon Resonance Imaging Using Nano Lycurgus Cup Arrays,” *Advanced Optical Materials*, vol. 1, no. 1, 2013, doi: 10.1002/adom.201200040.
- [95] B. Ai, P. Basnet, S. Larson, W. Ingram, and Y. Zhao, “Plasmonic sensor with high figure of merit based on differential polarization spectra of elliptical nanohole array,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 38, 2017, doi: 10.1039/c7nr06067j.
- [96] J. Xiao and L. Qi, “Surfactant-assisted, shape-controlled synthesis of gold nanocrystals,” *Nanoscale*, vol. 3, no. 4, 2011, doi: 10.1039/c0nr00814a.
- [97] J. H. Lee, H. Y. Cho, H. K. Choi, J. Y. Lee, and J. W. Choi, “Application of gold nanoparticle to plasmonic biosensors,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7, 2018, doi: 10.3390/ijms19072021.
- [98] A. Loiseau, V. Asila, G. Boitel-Aullen, M. Lam, M. Salmain, and S. Boujday, “Silver-based plasmonic nanoparticles for and their use in biosensing,” *Biosensors*, vol. 9, no. 2, 2019, doi: 10.3390/bios9020078.
- [99] N. E. Cant, K. Critchley, H. L. Zhang, and S. D. Evans, “Surface functionalisation for the self-assembly of nanoparticle/polymer multilayer films,” *Thin Solid Films*, vol. 426, no. 1–2, 2003, doi: 10.1016/S0040-6090(02)01300-7.

- [100] S. Thamm, A. Csàki, and W. Fritzsche, "LSPR detection of nucleic acids on nanoparticle monolayers," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1811, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-8582-1_11.
- [101] J. Magura, A. Zeleňáková, V. Zeleňák, and M. Kaňuchová, "Thiol-modified gold nanoparticles deposited on silica support using dip coating," *Applied Surface Science*, vol. 315, no. 1, 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.07.173.
- [102] T. Schneider, N. Jahr, J. Jatschka, A. Csaki, O. Stranik, and W. Fritzsche, "Localized surface plasmon resonance (LSPR) study of DNA hybridization at single nanoparticle transducers," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 15, no. 4, 2013, doi: 10.1007/s11051-013-1531-7.
- [103] S. Badilescu, J. Prakash, and M. Packirisamy, "Surface Gold and Silver-Polymer Nanocomposite Self-Standing Films," in *Handbook of Polymer and Ceramic Nanotechnology*, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-40513-7_11.
- [104] H. SadAbadi, S. Badilescu, M. Packirisamy, and R. Wüthrich, "Integration of gold nanoparticles in PDMS microfluidics for lab-on-a-chip plasmonic biosensing of growth hormones," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 44, no. 1, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.01.016.
- [105] T. Chung *et al.*, "Nanoislands as plasmonic materials," *Nanoscale*, vol. 11, no. 18, 2019. doi: 10.1039/c8nr10539a.
- [106] A. Serrano, O. R. de La Fuente, and M. A. García, "Extended and localized surface plasmons in annealed Au films on glass substrates," *Journal of Applied Physics*, vol. 108, no. 7, 2010, doi: 10.1063/1.3485825.
- [107] Y. S. Shon *et al.*, "Stability and morphology of gold nanoisland arrays generated from layer-by-layer assembled nanoparticle multilayer films: Effects of heating temperature and particle size," *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, no. 21, 2011, doi: 10.1021/jp110531x.
- [108] A. Vaskevich and I. Rubinstein, "Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) transducers based on random evaporated gold island films: Properties and sensing applications," in *Nanoplasmonic Sensors*, 2012. doi: 10.1007/978-1-4614-3933-2_14.
- [109] S. Dickreuter, J. Gleixner, A. Kolloch, J. Boneberg, E. Scheer, and P. Leiderer, "Mapping of plasmonic resonances in nanotriangles," *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 4, no. 1, 2013, doi: 10.3762/bjnano.4.66.
- [110] X. Ye *et al.*, "Monolayer colloidal crystals by modified air-water interface self-assembly approach," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 10, 2017, doi: 10.3390/nano7100291.
- [111] M. P. Raphael, J. A. Christodoulides, J. B. Delehanty, J. P. Long, P. E. Pehrsson, and J. M. Byers, "Quantitative LSPR imaging for biosensing with single nanostructure resolution," *Biophysical Journal*, vol. 104, no. 1, 2013, doi: 10.1016/j.bpj.2012.11.3821.
- [112] P. C. Wuytens, A. G. Skirtach, and R. Baets, "On-chip surface-enhanced Raman spectroscopy using nanosphere-lithography patterned antennas on silicon nitride waveguides," *Optics Express*, vol. 25, no. 11, 2017, doi: 10.1364/oe.25.012926.
- [113] X. Fan *et al.*, "Assembly of gold nanoparticles into aluminum nanobowl array," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-02552-z.
- [114] W. Lee and S. J. Park, "Porous anodic aluminum oxide: Anodization and templated synthesis of functional nanostructures," *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 15, 2014. doi: 10.1021/cr500002z.
- [115] S. Yang, F. Xu, S. Ostendorp, G. Wilde, H. Zhao, and Y. Lei, "Template-confined dewetting process to surface nanopatterns: Fabrication, structural tunability, and structure-related

- properties,” *Advanced Functional Materials*, vol. 21, no. 13, 2011, doi: 10.1002/adfm.201002387.
- [116] Y. F. Mei *et al.*, “Formation mechanism of alumina nanotubes and nanowires from highly ordered porous anodic alumina template,” *Journal of Applied Physics*, vol. 97, no. 3, 2005, doi: 10.1063/1.1846137.
- [117] T. Ito, Y. Matsuda, T. Jinba, N. Asai, T. Shimizu, and S. Shingubara, “Fabrication and characterization of nano porous lattice biosensor using anodic aluminum oxide substrate,” in *Japanese Journal of Applied Physics*, 2017, vol. 56, no. 6. doi: 10.7567/JJAP.56.06GG02.
- [118] M. R. Gartia *et al.*, “Rigorous surface enhanced Raman spectral characterization of large-area high-uniformity silver-coated tapered silica nanopillar arrays,” *Nanotechnology*, vol. 21, no. 39, 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/39/395701.
- [119] Y. Chen, “Nanofabrication by electron beam lithography and its applications: A review,” *Microelectronic Engineering*, vol. 135. 2015. doi: 10.1016/j.mee.2015.02.042.
- [120] S. Zhu and W. Zhou, “Plasmonic properties of two-dimensional metallic nanoholes fabricated by focused ion beam lithography,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14, no. 3, 2012, doi: 10.1007/s11051-011-0652-0.
- [121] C. C. Yu and H. L. Chen, “Nanoimprint technology for patterning functional materials and its applications,” *Microelectronic Engineering*, vol. 132. 2015. doi: 10.1016/j.mee.2014.10.015.
- [122] B. Cui and T. Veres, “Fabrication of metal nanoring array by nanoimprint lithography (NIL) and reactive ion etching,” *Microelectronic Engineering*, vol. 84, no. 5–8, 2007, doi: 10.1016/j.mee.2007.01.158.
- [123] P. Nagpal, N. C. Lindquist, S. H. Oh, and D. J. Norris, “Ultrasoother patterned metals for plasmonics and metamaterials,” *Science*, vol. 325, no. 5940, 2009, doi: 10.1126/science.1174655.
- [124] S. Krishnamoorthy, S. Krishnan, P. Thoniyot, and H. Y. Low, “Inherently reproducible fabrication of plasmonic nanoparticle arrays for SERS by combining nanoimprint and copolymer lithography,” *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 3, no. 4, 2011, doi: 10.1021/am1011518.
- [125] A. K. G. Tavakkoli *et al.*, “Reverse nanoimprint lithography for fabrication of nanostructures,” *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, vol. 4, no. 8, 2012, doi: 10.1166/nnl.2012.1424.
- [126] J. Scivax Company, “Product List, Standard Mold Samples,” 2019. <https://www.scivax.com/en/service/product/standard-mold/> (accessed Jan. 31, 2022).
- [127] L. S. Jung, C. T. Campbell, T. M. Chinowsky, M. N. Mar, and S. S. Yee, “Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films,” *Langmuir*, vol. 14, no. 19, 1998, doi: 10.1021/la971228b.
- [128] A. Rapisarda, N. Giamblanco, and G. Marletta, “Kinetic discrimination of DNA single-base mutations by localized surface plasmon resonance,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 487, 2017, doi: 10.1016/j.jcis.2016.10.026.
- [129] S. Chen, M. Svedendahl, M. Käll, L. Gunnarsson, and A. Dmitriev, “Ultrahigh sensitivity made simple: Nanoplasmonic label-free biosensing with an extremely low limit-of-detection for bacterial and cancer diagnostics,” *Nanotechnology*, vol. 20, no. 43, 2009, doi: 10.1088/0957-4484/20/43/434015.

- [130] H. Xu and M. Käll, “Modeling the optical response of nanoparticle-based surface plasmon resonance sensors,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 87, no. 2, 2002, doi: 10.1016/S0925-4005(02)00243-5.
- [131] A. W. Peterson, R. J. Heaton, and R. M. Georgiadis, “The effect of surface probe density on DNA hybridization,” *Nucleic Acids Research*, vol. 29, no. 24, 2001, doi: 10.1093/nar/29.24.5163.
- [132] P. Gong and R. Levicky, “DNA surface hybridization regimes,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 14, 2008, doi: 10.1073/pnas.0709416105.
- [133] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, “Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly,” *Biophysical Journal*, vol. 79, no. 2, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76351-X.
- [134] B. P. Maliwal, J. Kuśba, and J. R. Lakowicz, “Fluorescence energy transfer in one dimension: Frequency-domain fluorescence study of DNA–fluorophore complexes,” *Biopolymers*, vol. 35, no. 2, 1995, doi: 10.1002/bip.360350213.
- [135] R. E. Harrington, “The Flow Birefringence of Persistence Length Deoxyribonucleic Acid. Hydrodynamic Properties, Optical Anisotropy, and Hydration Shell Anisotropy,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 92, no. 23, 1970, doi: 10.1021/ja00726a038.
- [136] N. Cottenye *et al.*, “Oligonucleotide nanostructured surfaces: Effect on Escherichia coli curli expression,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 8, no. 12, 2008, doi: 10.1002/mabi.200800081.
- [137] D. E. Gray, S. C. Case-Green, T. S. Fell, P. J. Dobson, and E. M. Southern, “Ellipsometric and interferometric characterization of DNA probes immobilized on a combinatorial array,” *Langmuir*, vol. 13, no. 10, 1997, doi: 10.1021/la962139m.
- [138] R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, and S. K. Satija, “Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 120, no. 38, 1998, doi: 10.1021/ja981897r.
- [139] Ansys Canada Ltd., “Lumerical,” 2022. <https://www.lumerical.com/> (accessed Jan. 31, 2022).
- [140] COMSOL Multiphysics, “RF Module,” 2022. <https://www.comsol.com/rf-module> (accessed Jan. 31, 2022).
- [141] E. M. Purcell and C. R. Pennypacker, “Scattering and Absorption of Light by Nonspherical Dielectric Grains,” *The Astrophysical Journal*, vol. 186, 1973, doi: 10.1086/152538.
- [142] B. T. Draine and P. J. Flatau, “Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 11, no. 4, 1994, doi: 10.1364/josaa.11.001491.
- [143] B. T. Draine, “The discrete-dipole approximation and its application to interstellar graphite grains,” *The Astrophysical Journal*, vol. 333, 1988, doi: 10.1086/166795.
- [144] B. T. Draine and P. J. Flatau, “DDSCAT,” 2022. <http://ddscat.wikidot.com/> (accessed Jan. 31, 2022).
- [145] P. K. Jain *et al.*, “nanoDDSCAT,” 2019.
- [146] J. Waxenegger, A. Trügler, and U. Hohenester, “Plasmonics simulations with the MNPBEM toolbox: Consideration of substrates and layer structures,” *Computer Physics Communications*, vol. 193, pp. 138–150, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.CPC.2015.03.023.

- [147] U. Hohenester and A. Trügler, “MNPBEM - A Matlab toolbox for the simulation of plasmonic nanoparticles,” *Computer Physics Communications*, vol. 183, no. 2, 2012, doi: 10.1016/j.cpc.2011.09.009.
- [148] U. Hohenester, “Making simulations with the MNPBEM toolbox big: Hierarchical matrices and iterative solvers,” *Computer Physics Communications*, vol. 222, 2018, doi: 10.1016/j.cpc.2017.08.010.
- [149] L. Udvardi, “Első rendű lineáris, közönséges differenciálegyenletek Green függvénye,” 2006. <http://newton.phy.bme.hu/~udvardi/SzamModFiz/Green1.pdf> (accessed Feb. 01, 2022).
- [150] G. Szántó, “Fém nanorészecskék lokalizált felületi plazmonrezonancia jelenségének modellezése,” Debrecen, 2019.
- [151] I. Vago, “On the interface and boundary conditions of electromagnetic fields,” *Periodica Polytechnica Electrical Engineering*, vol. 38, no. 2, 1994.
- [152] P. K. Jain, W. Huang, and M. A. El-Sayed, “On the universal scaling behavior of the distance decay of plasmon coupling in metal nanoparticle pairs: A plasmon ruler equation,” *Nano Letters*, vol. 7, no. 7, 2007, doi: 10.1021/nl071008a.
- [153] S. Lee *et al.*, “Controlled Assembly of Plasmonic Nanoparticles: From Static to Dynamic Nanostructures,” *Advanced Materials*, vol. 33, no. 46. 2021. doi: 10.1002/adma.202007668.
- [154] 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, doi: 10.1002/adma.201503885.
- [155] S. Kasani, K. Curtin, and N. Wu, “A review of 2D and 3D plasmonic nanostructure array patterns: Fabrication, light management and sensing applications,” *Nanophotonics*. 2019. doi: 10.1515/nanoph-2019-0158.
- [156] S. Wei, M. Zheng, Q. Xiang, H. Hu, and H. Duan, “Optimization of the particle density to maximize the SERS enhancement factor of periodic plasmonic nanostructure array,” *Optics Express*, vol. 24, no. 18, 2016, doi: 10.1364/oe.24.020613.
- [157] J. Li *et al.*, “Revisiting the surface sensitivity of nanoplasmonic biosensors,” *ACS Photonics*, vol. 2, no. 3, 2015, doi: 10.1021/ph5004779.
- [158] K. M. McPeak *et al.*, “Plasmonic films can easily be better: Rules and recipes,” *ACS Photonics*, vol. 2, no. 3, 2015, doi: 10.1021/ph5004237.
- [159] P. Markiewicz and M. C. Goh, “Atomic force microscope tip deconvolution using calibration arrays,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 66, no. 5, 1995, doi: 10.1063/1.1145549.
- [160] J. Canet-Ferrer, E. Coronado, A. Forment-Aliaga, and E. Pinilla-Cienfuegos, “Correction of the tip convolution effects in the imaging of nanostructures studied through scanning force microscopy,” *Nanotechnology*, vol. 25, no. 39, 2014, doi: 10.1088/0957-4484/25/39/395703.
- [161] P. Pal *et al.*, “A generalized exponential relationship between the surface-enhanced Raman scattering (SERS) efficiency of gold/silver nanoisland arrangements and their non-dimensional interparticle distance/particle diameter ratio,” *Sensors and Actuators, A: Physical*, vol. 314, 2020, doi: 10.1016/j.sna.2020.112225.
- [162] P. Pál, A. Bonyár, M. Veres, L. Juhász, M. Szalóki, and I. Csarnovics, “An investigation of surface-enhanced raman scattering of different analytes adsorbed on gold nanoislands,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 21, 2021, doi: 10.3390/app11219838.

- [163] Eurotraining FP7 (316526), “D2.2.2. Train-the-trainers courses deliverable,” Jun. 2015. Accessed: Jan. 31, 2022. [Online]. Available: <https://cordis.europa.eu/docs/projects/cnect/6/316526/080/deliverables/001-D222TraintheTrainercourses.pdf>
- [164] T. Lednický, “Template Assisted Electrodeposition of Multilayer Nanostructures,” Brno, 2014. Accessed: Jan. 31, 2022. [Online]. Available: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=87436
- [165] T. Lednický, “Utilization of porous anodic alumina for fabrication of nanostructured layers and their photoelectrochemical and optical applications,” Brno, 2021. Accessed: Jan. 31, 2022. [Online]. Available: <https://dspace.vutbr.cz/handle/11012/201764>
- [166] C. M. Müller, F. C. F. Mornaghini, and R. Spolenak, “Ordered arrays of faceted gold nanoparticles obtained by dewetting and nanosphere lithography,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 48, 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/48/485306.
- [167] Q. Hao *et al.*, “Controlled Patterning of Plasmonic Dimers by Using an Ultrathin Nanoporous Alumina Membrane as a Shadow Mask,” *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 9, no. 41, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b11428.
- [168] S. Schlücker, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications*. 2010. doi: 10.1002/9783527632756.
- [169] A. Katunin, K. Krukiewicz, and R. Turczyn, “Evaluation of residual cross-linking caused by self-heating effect in epoxy-based fibrous composites using Raman spectroscopy,” *Chemik*, vol. 68, no. 11, 2014.
- [170] H. Vašková and V. Křesálek, “Quasi real-time monitoring of epoxy resin crosslinking via Raman microscopy,” *International Journal of Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, vol. 5, no. 7, 2011.
- [171] D. M. Sagar *et al.*, “High-Throughput Block Optical DNA Sequence Identification,” *Small*, vol. 14, no. 4, 2018, doi: 10.1002/smll.201703165.
- [172] J. Kim, H. J. Park, J. H. Kim, B. Chang, and H. K. Park, “Label-free detection for a DNA methylation assay using Raman spectroscopy,” *Chinese Medical Journal*, vol. 130, no. 16, 2017, doi: 10.4103/0366-6999.211874.
- [173] A. J. Ruiz-Chica, M. A. Medina, F. Sánchez-Jiménez, and F. J. Ramírez, “On the interpretation of Raman spectra of 1-aminooxy-spermine/DNA complexes,” *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 2. 2004. doi: 10.1093/nar/gkh232.
- [174] A. AW and T. JC, “Double-Stranded DNA Damage Assessed with Raman Spectroscopy,” *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, vol. 5, no. 3, 2016, doi: 10.4172/2161-1009.1000284.
- [175] A. de Angelis *et al.*, “Spermatozoa quality assessment: a combined holographic and Raman microscopy approach,” in *Optical Methods for Inspection, Characterization, and Imaging of Biomaterials II*, 2015, vol. 9529. doi: 10.1117/12.2186393.
- [176] A. Barhoumi, D. Zhang, F. Tam, and N. J. Halas, “Surface-enhanced raman spectroscopy of DNA,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, no. 16, 2008, doi: 10.1021/ja800023j.
- [177] C. Otto, T. J. J. van den Tweel, F. F. M. de Mul, and J. Greve, “Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA bases,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 17, no. 3, 1986, doi: 10.1002/jrs.1250170311.

- [178] Y. Li *et al.*, “Direct Approach toward Label-Free DNA Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Discrimination of a Single-Base Mutation in 50 Base-Paired Double Helices,” *Analytical Chemistry*, vol. 91, no. 13, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b01887.
- [179] A. P. Kotula, A. R. H. Walker, and K. B. Migler, “Raman analysis of bond conformations in the rotator state and premelting of normal alkanes,” *Soft Matter*, vol. 12, no. 22, 2016, doi: 10.1039/c6sm00182c.
- [180] J. Liu *et al.*, “Recent advances of plasmonic nanoparticles and their applications,” *Materials*, vol. 11, no. 10, 2018. doi: 10.3390/ma11101833.
- [181] S. Scarano, C. Berlangieri, E. Carretti, L. Dei, and M. Minunni, “Tunable growth of gold nanostructures at a PDMS surface to obtain plasmon rulers with enhanced optical features,” *Microchimica Acta*, vol. 184, no. 9, 2017, doi: 10.1007/s00604-017-2323-z.
- [182] C. C. Hsieh, A. Balducci, and P. S. Doyle, “Ionic effects on the equilibrium dynamics of DNA confined in nanoslits,” *Nano Letters*, vol. 8, no. 6, 2008, doi: 10.1021/nl080605+.
- [183] X. Zhang, M. R. Servos, and J. Liu, “Surface science of DNA adsorption onto citrate-capped gold nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 28, no. 8, 2012, doi: 10.1021/la205036p.
- [184] S. Jia, C. Bian, J. Sun, J. Tong, and S. Xia, “A wavelength-modulated localized surface plasmon resonance (LSPR) optical fiber sensor for sensitive detection of mercury(II) ion by gold nanoparticles-DNA conjugates,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 114, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.05.004.
- [185] J. Jatschka, A. Dathe, A. Csáki, W. Fritzsche, and O. Stranik, “Propagating and localized surface plasmon resonance sensing — A critical comparison based on measurements and theory,” *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 7, pp. 62–70, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.SBSR.2016.01.003.
- [186] 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, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05153.
- [187] M. Proença *et al.*, “Nanocomposite thin films based on Au-Ag nanoparticles embedded in a CuO matrix for localized surface plasmon resonance sensing,” *Applied Surface Science*, vol. 484, 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.04.085.
- [188] D. Lin, J. Wu, H. Ju, and F. Yan, “Signal amplification for electrochemical immunosensing by in situ assembly of host-guest linked gold nanorod superstructure on immunocomplex,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 45, no. 1, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.01.070.
- [189] J. Y. Lim and S. S. Lee, “Sensitive detection of microRNA using QCM biosensors: Sandwich hybridization and signal amplification by TiO₂nanoparticles,” *Analytical Methods*, vol. 12, no. 42, 2020, doi: 10.1039/d0ay01481h.
- [190] L. Bezingé, A. Suea-Ngam, A. J. Demello, and C. J. Shih, “Nanomaterials for molecular signal amplification in electrochemical nucleic acid biosensing: Recent advances and future prospects for point-of-care diagnostics,” *Molecular Systems Design and Engineering*, vol. 5, no. 1, 2020. doi: 10.1039/c9me00135b.
- [191] S. Cajigas and J. Orozco, “Nanobioconjugates for signal amplification in electrochemical biosensing,” *Molecules*, vol. 25, no. 15, 2020. doi: 10.3390/molecules25153542.
- [192] DINAMICS Project FP6 (26804), “Project Objectives,” 2011. <https://cordis.europa.eu/project/id/26804> (accessed Jan. 31, 2022).

- [193] Q. M. Feng, Y. H. Guo, J. J. Xu, and H. Y. Chen, "Self-Assembled DNA Tetrahedral Scaffolds for the Construction of Electrochemiluminescence Biosensor with Programmable DNA Cyclic Amplification," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 9, no. 20, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b04553.
- [194] R. M. Dirks and N. A. Pierce, "Triggered amplification by hybridization chain reaction," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 43, 2004, doi: 10.1073/pnas.0407024101.
- [195] S. Niu, Y. Jiang, and S. Zhang, "Fluorescence detection for DNA using hybridization chain reaction with enzyme-amplification," *Chemical Communications*, vol. 46, no. 18, 2010, doi: 10.1039/c000166j.
- [196] S. Shimron, F. Wang, R. Orbach, and I. Willner, "Amplified detection of DNA through the enzyme-free autonomous assembly of hemin/G-quadruplex DNAzyme nanowires," *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 2, 2012, doi: 10.1021/ac202643y.
- [197] J. Huang *et al.*, "Pyrene-excimer probes based on the hybridization chain reaction for the detection of nucleic acids in complex biological fluids," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 50, no. 2, 2011, doi: 10.1002/anie.201005375.
- [198] J. Choi, K. Routenberg Love, Y. Gong, T. M. Gierahn, and J. C. Love, "Immuno-hybridization chain reaction for enhancing detection of individual cytokine-secreting human peripheral mononuclear cells," *Analytical Chemistry*, vol. 83, no. 17, 2011, doi: 10.1021/ac2013916.
- [199] R. A. Guy, C. Xiao, and P. A. Horgen, "Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 7, 2004, doi: 10.1128/JCM.42.7.3317-3320.2004.
- [200] R. B. M. Schasfoort, "Chapter 1. Introduction to Surface Plasmon Resonance," in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2017. doi: 10.1039/9781788010283-00001.
- [201] J. A. Goode, J. V. H. Rushworth, and P. A. Millner, "Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes," *Langmuir*, vol. 31, no. 23, 2015. doi: 10.1021/la503533g.
- [202] A. Miti, S. Thamm, P. Müller, A. Csáki, W. Fritzsche, and G. Zuccheri, "A miRNA biosensor based on localized surface plasmon resonance enhanced by surface-bound hybridization chain reaction," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 167, 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112465.
- [203] K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, "Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 119, no. 14, 1997, doi: 10.1021/ja964326c.
- [204] G. Pinto *et al.*, "Functionalizing gold with single strand DNA: novel insight into optical properties via combined spectroscopic ellipsometry and nanolithography measurements," *Soft Matter*, vol. 15, no. 11, 2019, doi: 10.1039/C8SM02589D.
- [205] A. Rzhetskii, "Basic aspects of experimental design in raman microscopy," *Spectroscopy (Santa Monica)*, vol. 31, no. 11, 2016.
- [206] M. Castronovo, "Crowding effects on biochemical reactions of surface-bound DNA," Trieste, 2008. Accessed: Feb. 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.openstarts.units.it/handle/10077/2616>

9. Függelék

A) A SERS EF_S számítása

A SERS EF_S erősítési tényező célja a szubsztrátum szempontjából jellemezni a SERS-erősítési folyamatot az (f1) egyenlet alapján [81].

$$SERS\ EF_S = \frac{\frac{I_{SERS}}{N_{surf}}}{\frac{I_{RS}}{N_{vol}}} = \frac{\frac{I_{SERS}}{n_{surf} \times A_{ex}}}{\frac{I_{RS}}{c_{sol} \times V_{ex}}} \quad f1$$

Az egyenletben I_{SERS} a SERS-hordozón mért intenzitás (egy karakterisztikus csúcsra), I_{RS} pedig a normál Raman-spektroszkópiával tömbi oldaton mért, azonos csúcsához tartozó intenzitás. N_{surf} a gerjesztett felületen, N_{vol} a gerjesztett térfogatban található molekulák száma. Ezek meghatározásához ismernünk kell a SERS esetén a szubsztrátum felületén levilágított terület nagyságát (A_{ex}) valamint a DNS-molekulák felületi sűrűségét (n_{surf}). Sima Raman-spektroszkópia esetén ez a gerjesztési térfogatra (V_{ex}), valamint a DNS-oldat koncentrációjára (c_{sol}) módosul.

Mivel a SERS-mérések esetén a nyaláb fókuszfoltja a SERS-hordozó felületén $100\times$ objektívre $d = 0,9\ \mu\text{m}$, így $A_{ex} = 0,64\ \mu\text{m}^2$. A DNS-molekulák felületi sűrűsége az immobilizációs eljárás alapján becsülhető a szakirodalom alapján, $n_{surf} = 3,5 \times 10^{12}\ \text{db/cm}^2$ [132], [138], [203], [204].

A sima Raman-spektroszkópia esetén a gerjesztési térfogatot forgási ellipszoidnak becsültük [205]. Az $50\times$ objektívre konfokalitás nélkül az ellipszoid mérete $16,7\ \mu\text{m}$, amiből $V_{ex} = 34,8\ \mu\text{m}^3$. A DNS-oldat koncentrációja $c_{sol} = 10\ \text{mM}$ volt.

A gerjesztett térfogatokban található molekulákra nézve az erősítési tényező első komponense: $\frac{c_{sol} \times V_{ex}}{n_{surf} \times A_{ex}} = 9,38 \times 10^3$ -nak adódik.

Az intenzitás tag $\frac{I_{SERS}}{I_{RS}}$ számításához figyelembe kell venni a mérési beállítások eltérését a SERS-, illetve Raman-méréseknél, úgymint expozíciós időt, akkumulációt, valamint lézer teljesítményt. Az expozíciós idő $10\ \text{ms}$, az akkumuláció pedig 5 volt mindkét mérési típus esetén. A lézer teljesítmény mindkét esetben 100% volt a $785\ \text{nm}$ -es lézert használva. Mivel a mérések között jelentős idő eltelt és időközben szervizelték is a spektrométer, aminek kapcsán javult a lézer kicsatolt teljesítménye, az intenzitásokat kompenzáltuk a referencia mérések intenzitás arányával (Si szeleteken, minden mérés megkezdése előtt felvett referencia). A referencia intenzitás aránya $3,7$, így ezt figyelembe kell venni $SERS\ EF_S$ számításánál.

A 8. táblázatban három DNS-molekulákra karakterisztikus csúcs esetén feltüntettem a különböző hordozókon számolható $SERS\ EF_S$ értékeket. Ezek rendre: $747\ \text{cm}^{-1}$: timin, C5-CH₃ megnyúlás; $828\ \text{cm}^{-1}$: foszfodiészter, P-O-P megnyúlás $1021\ \text{cm}^{-1}$: timin, C-N-C elhajlás. A

felhasznált intenzitás adatok megegyeznek a 46. ábrán szerepeltetett értékekkel. Megfigyelhető, hogy a két eltérő módon közelített nanorészecske-átmérő közül a BK-közelítéssel számolt $SERS EF_E$ van közelebb a mérések alapján számolt $SERS EF_S$ értékekkel, de több esetben, pl. az A2- vagy B2-típusú hordozók esetén ez is jelentősen alulbecsüli a szenzorelemek teljesítőképességét.

Kiemelendő, hogy mind a BEM-szimulációkon, mind a mérések alapján számolt erősítési tényező sok olyan bemeneti adatot tartalmaz, amely mérési pontatlansággal van terhelve (részecskék mérete, távolsága, gerjesztett térfogat, felület, molekulaszám figyelembevétele stb.). A bemutatott számítások ezért becslésként kezelendők, de jó közelítést adnak a szenzorelemek teljesítményéről.

8. Táblázat A különböző típusú szenzorelemekeken mért intenzitások alapján számolt ($SERS EF_S$), illetve a BEM-szimulációval számolt ($SERS EF_E$) erősítési tényezők összevetése.

Param.	A-típus		B-típus		
	A1	A2	B1	B2	B3
$SERS EF_S^{747}$	$3,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	5×10^4	$6,3 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$
$SERS EF_S^{828}$	$5,9 \times 10^3$	$4,9 \times 10^5$	1×10^5	$2,8 \times 10^5$	6×10^5
$SERS EF_S^{1021}$	$3,5 \times 10^3$	$3,8 \times 10^5$	4×10^4	1×10^6	$1,9 \times 10^6$
$SERS EF_E^{EK}$	$2,8 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	2×10^4	$3,2 \times 10^4$
$SERS EF_E^{BK}$	$6,7 \times 10^3$	5×10^4	$1,3 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$

B) A plazmontér behatolási mélységének becslése a nanokompozit LSPR-szenzorelemekre

Az arany NP–epoxi felületi nanokompozit plazmonterének behatolási mélysége (ξ_D) megbecsülhető az (f1) egyenlet segítségével (ami megegyezik a disszertációban szereplő (14) egyenlettel), amennyiben a nanorészecskék felszínére ismert vastagságú (t) és törésmutatójú (n_l) réteget viszünk fel.

$$\Delta\lambda_p = RIS(n_l - n_r) \left(1 - e^{-\frac{2t}{\xi_D}}\right) \quad \text{f1}$$

Ez az eset fennáll a nanorészecskék MCH önszerveződő réteggel történő bevonása során, az LSPR szenzorelemek kontroll mérései kapcsán a szükséges méréseket elvégeztem a B3 típusú szenzorelemmel (lásd. 48. ábrán). A szakirodalom alapján az MCH-molekulák hossza $t = 1,2$ nm [138], a törésmutatóját pedig 1,45–1,5 között szokták becsülni [138], [204]. A közelítésünkhöz vegyük az $n_l = 1,475$ középértéket. A mérésekhez használt pufferoldat (0.75M NaCl 50 mM Na₂HPO₄) törésmutatóját vegyük $n_r = 1,34$ -nek. A behatolási mélység kiszámításához használjuk a B3 típusú szenzorelemmel mért átlagos törésmutató-érzékenység ($RIS = 104$ nm/RIU) és csúcstolódás értékeket $\Delta\lambda_p = 1,9$ nm.

Az (f1) egyenlet megoldásával így $\xi_D = 16,5$ nm adódik behatolási mélységnek.

Ahhoz, hogy az eredményt összevegyessük a BEM-szimulációk eredményével, illesszük az (f1) egyenletet a 39. ábra $\Delta\lambda_p(t)$ karakterisztikáira. A B3 típusú szenzorelem részecskéinek méretét két módszerrel is közelítettük (ekvivalens területű kör, EK, illetve legkisebb befoglaló kör, BK). Az eredményeket a különböző kondíciókra a 9. táblázat foglalja össze. A mérések alapján számolt behatolási mélység a részecskepárokon EK- és BK-megközelítéssel számolt eredmények között helyezkedik el, de közelebb van a BK-becsléshez.

9. Táblázat A B3 típusú szenzorelem alapján BEM-módszerrel számolt plazmontér behatolási mélységek (ξ_D , [nm]). A behatolási mélységeket a 39. ábra $\Delta\lambda_p(t)$ karakterisztikáira illesztett (f1) egyenlet alapján határoztam meg. A különböző esetek magyarázatát lásd a 39. ábra vonatkozó részében.

	Ekvivalens területű kör (EK)	Legkisebb befoglaló kör (BK)
Egyrészecske	37,8 nm	42,3 nm
Dimer	22,9 nm	15,4 nm

Az egyértelműen kijelenthető, hogy a mérés alapján becsült effektív behatolási mélység sokkal közelebb van a csatolt dimereken szimuláció alapján számolt értékekhez, mint az egyedi részecskékhez. Amennyiben fordítva gondolkozunk (f1) alapján, egy $\xi_D = 40$ nm-nek véve a behatolási mélységet (egyedi nanorészecskét feltételezve) $\Delta\lambda_p = 0,8$ nm-nek adódna az MCH-monorétegre, ami jelentősen kisebb a mért jelünknel.

A DNS molekulák rétegvastagságának a becsléséhez szintén használhatjuk a kontroll mérésekből receptor-DNS-kötés során mért rezonanciaeltolódás értékét ($\Delta\lambda_p = 8.1$ nm, lásd 48. ábra). Az (f1) egyenlet és a korábban becsült behatolási mélység ($\xi_D = 16,5$ nm) és $n_l = 1,5$ DNS-réteg törémutató közelítéssel a rétegvastagság $t = 5,6$ nm-nek adódik, ami reális a 20 bázis hosszúságú receptor-DNS-molekulára. Összehasonlításképpen M. Castronovo vizsgálta részletesen szimpla és dupla láncú 18 bázis hosszúságú, különböző sűrűségű DNS-molekularétegek vastagságát AFM-nanoborotválással. A rétegeinek vastagsága 5 nm körül volt [206].

Fontos kiemelni, hogy a bemutatott számítás csak *becslés*, az eredmények nagyban függenek a megválasztott anyagparaméterektől. A behatolási mélység és DNS-rétegvastagság pontosabb meghatározása további részletes vizsgálatokat igényel.