APŽVALGINIS STRAIPSNIS

Paviršiaus plazmonų rezonansas ir jo pritaikymas biomedicininiams tyrinėjimams

Asta Kaušaitė[1, 2], Almira Ramanavičienė[1, 2], Viktoras Mostovojus[1], Arūnas Ramanavičius[1]
Vilniaus universiteto [1]Nanotechnologijų ir medžiagotyros centras,
[2]Imunologijos instituto Imunoanalizės ir nanotechnologijų laboratorija

Raktažodžiai: *imunosensorius, biomedicininiai tyrinėjimai, imunoanalizė, biologinis jutiklis, paviršiaus plazmonų rezonansas.*

Santrauka. *Pastaraisiais metais paviršiaus plazmonų rezonanso metodas tapo vienu pagrindinių tiriant bei nustatant afiniškai sąveikaujančias medžiagas. Paviršiaus plazmonų rezonanso biologiniai jutikliai vis dažniau naudojami biochemijoje, bioanalizinėje chemijoje, nustatant naujų vaistų savybes biomedicininiais tyrimais, tiriant DNR hibridizaciją, diagnozuojant bakterijų ir virusų sukeltas ligas, nustatant hormonus, steroidus, imunoglobulinus, tiriant kraujo plazmos koaguliaciją. Šiais jutikliais galima analizuoti labai panašios cheminės sandaros medžiagų mišinius, nes yra detektuojamos tik tos analitės, kurios specifiškai sąveikauja su paviršiaus plazmonų rezonanso jutiklio paviršiuje imobilizuota biologiškai aktyviąja medžiaga. Paviršiaus plazmonų rezonanso biologiniai jutikliai taikomi betarpiškai analitės sąveikai su imobilizuotąja biologiškai aktyviąja medžiaga nustatyti realiu laiku, t. y. taip galima nuodugniai ištirti šių medžiagų sąveikos kinetiką. Tačiau, naudojant paviršiaus plazmonų rezonanso metodą, galima tirti tiek analitės asociaciją su imobilizuotąja afiniškai sąveikaujančia medžiaga, tiek ir susidariusio komplekso disociaciją. Šie biologiniai jutikliai, imobilizavus biologiškai aktyviąją medžiagą, skirtą analitei nustatyti ir sėkmingai parinkus susidariusio komplekso disociacijos sąlygas, daugeliu atveju gali būti naudojami net kelioms dešimtims matavimų iš naujo neimobilizuojant biologinio atpažinimo medžiagos. Todėl šis metodas dabar yra vienas perspektyviausių ligando–receptoriaus, antigeno–antikūno ir kitų afiniškai sąveikaujančių medžiagų sąveikai nustatyti, taigi vis dažniau naudojamas ligų diagnostikai ir biomedicininiams tyrinėjimams.*

Įvadas

Labai svarbus šiuolaikinės medicinos uždavinys yra išsami ir tiksli ligų diagnostika, kurią žymiai pagreitina biologinių medžiagų analizė, be to, remiantis šios analizės duomenimis, galima išvengti diagnostikos klaidų (1). Taikant įprastinius cheminius analizės metodus, neįmanoma nustatyti daugelio biologiškai aktyviųjų medžiagų dėl didelės trukdančių medžiagų įvairovės tiriamuosiuose objektuose. Kokybiškai naujas medicininės diagnostikos pasiekimas – bioanalizės metodai ir biologiniai jutikliai. Medicininėje diagnostikoje biologiniai jutikliai yra perspektyviausias analizės metodas, nes jie gali būti lengvai integruojami mikroschemų lustuose, be to, naudojant tokius įrenginius analitinėse sistemose, galima padidinti biocheminių metodų jautrumą, analizės greitį, sumažinti mėginio tūrį, matavimus atlikti spalvotuose ir neskaidriuose tirpaluose (2). Pagal analitei nustatyti naudojamos biocheminės sąveikos pobūdį biologiniai jutikliai skirstomi į katalizinius biologinius jutiklius ir afiniškumo jutiklius (1). Afiniškumo biologiniais jutikliais galima nustatyti žymiai didesnį analičių kiekį nei kataliziniais. Atliekant biomedicininius tyrimus, perspektyviausi yra tokie afiniškumo jutikliai, kuriais galima atlikti betarpišką analitės sąveikos nustatymą su imobilizuotąja biologiškai aktyviąja medžiaga realiu laiku, nes taip galima tiksliau charakterizuoti sąveikaujančias medžiagas. Šiuo požiūriu labai perspektyvūs paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) biologiniai jutikliai. Šie jutikliai dažnai naudojami nustatant biologiškai aktyviųjų medžiagų kinetines, termodinamines ir pusiausvyros konstantas (3).

Paviršiaus plazmonų rezonanso reiškinys buvo se-

Adresas susirašinėti: A. Ramanavičius, VU Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, 08409 Vilnius
El. paštas: arunas@imi.lt

niai žinomas ir XX a. 7-ajame dešimtmetyje šis metodas buvo pritaikytas tiriant plonus medžiagų sluoksnius (4) ir stebint šviesos bangų sąveiką su metalų paviršiais (5), tačiau biologiniams tyrimams pirmą kartą jis buvo panaudotas tik 1983 m. B. Liedbergo ir kolegų (6, 7). Nuo tada PPR metodas buvo žymiai patobulintas ir tapo labai perspektyviu biologiškai aktyviųjų medžiagų tyrimo metodu, turinčiu daug biomedicininio pritaikymo galimybių.

Dabar PPR biologiniai jutikliai vis plačiau naudojami biomedicininiams tyrinėjimams, todėl pagrindinis šio straipsnio tikslas yra apžvelgti PPR panaudojimo galimybes biomedicinoje ir medicininėje diagnostikoje.

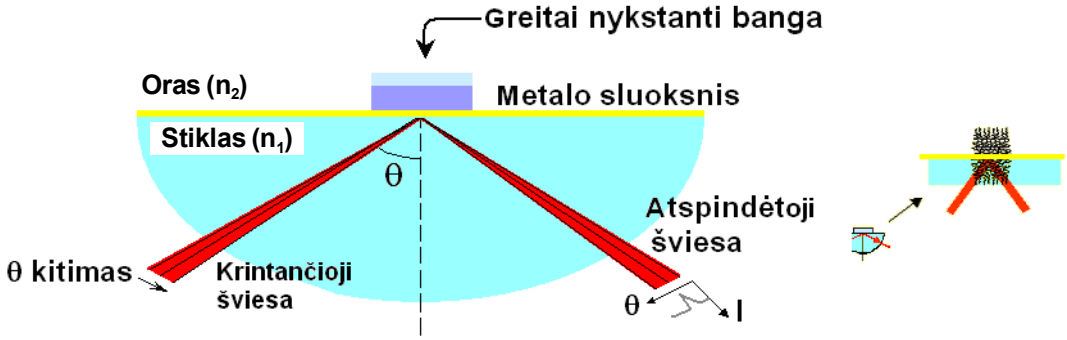
Paviršiaus plazmonų rezonanso reiškinys

Anomalios difrakcijos reiškinys difrakcinėse gardelėse, atsirandantis dėl paviršiaus plazmonų (PP) sužadinimo, pirmą kartą buvo aprašytas R. W. Woodo dar XX a. pradžioje (8). Praktiškas ir paprastas metodas, kaip optiniu būdu metalų paviršiuose sužadinti PP, 1968 m. buvo pasiūlytas E. Kretschmanno (9) ir A. Otto (10). Nuo tada PP intensyviai tyrinėjami, nustatytos pagrindinės jų savybės (11, 12).

PPR remiasi vienu pagrindinių optikos reiškinių – visiškuoju vidaus atspindžiu (VVA). PPR – tai kvantinis optinis-elektrinis reiškinys, kuris yra registruojamas, kai plokščiai poliarizuotos šviesos bangos atsispindi nuo tauriojo metalo sluoksnio esant VVA sąlygoms (13). VVA galimas tik sąlyčio paviršiuje tarp dviejų medžiagų, turinčių skirtingus lūžio rodiklius n_1 ir n_2 ($n_1>n_2$). Esant VVA sąlygoms, šviesos energija, pernešama fotonų, metalo paviršiuje perduodama elektronams, kurie priverčiami osciliuoti tam tikru dažniu. Šie virpesiai ir vadinami plazmonų rezonansu. Energijos perdavimas įvyksta tik esant tam tikram rezonansą sukeliančiam šviesos bangos ilgiui – tai toks bangos ilgis, kuriam esant energijos kvantas perneštas fotonų tiksliai atitinka plazmonų kvantinį energijos lygmenį. Kai krintančios šviesos bangos kampas atitinka kampą, kuriam esant galimas PPR, krintančio fotono ir plazmono energija bei judesio kiekio momentas sutampa ir fotono energija perduodama plazmonui. Šis reiškinys matomas kaip ryškus atsispindėjusios šviesos intensyvumo sumažėjimas (7) (1 pav.). Esant VVA, atspindėtieji fotonai sukuria elektrinį lauką. Plazmonai sukuria panašų lauką, kuris registruojamas kitoje metalo sluoksnio pusėje. Šis laukas vadinamas greitai nykstančia banga, nes bangos amplitudė mažėja eksponentiškai didėjant atstumui nuo sąlyčio paviršiaus. Greitai nykstanti banga visiškai užgęsta maždaug vieno šviesos bangos ilgio atstumu nuo metalo paviršiaus (14). Tokia greitai nykstanti banga, kuri tęsiasi iki 300 nm nuo metalo paviršiaus, puikiai tinka biologiniams tyrinėjimams, nes daugelio afiniškai sąveikaujančių biologiškai aktyviųjų medžiagų molekulių ir jų tarpusavio kompleksų matmenys yra mažesni nei 300 nm. Greitai nykstančios bangos ilgis yra toks pat kaip ir krintančios šviesos bangos, o jos energija išsisklaido šilumos pavidalo. Tačiau greitai nykstantis elektrinis laukas sąveikauja su metalu. Būtent šios srities optinių savybių pokytis ir sukelia PPR signalą, kuriuo ir pagrįstas PPR panaudojimas biologiniuose jutikliuose.

Bangos ilgis, kuriam esant vyksta maksimali šviesos absorbcija, vadinamas rezonansiniu bangos ilgiu. PPR bangos ilgį nulemia trys faktoriai: metalas, metalo paviršiaus struktūra ir su metalu kontaktuojančios aplinkos prigimtis. Todėl bet koks aplinkos, esančios plazmonų lauko veikimo ribose, arba tos terpės cheminės sudėties pokytis sąlygoja šviesos bangos ilgio, kuriame įvyksta rezonansas, pokytį, o to pokyčio dydis kiekybiškai susijęs su cheminės sudėties pokyčio dydžiu.

PPR kampas priklauso nuo metalo sluoksnio savybių, krintančios šviesos bangos ilgio ir medžiagų abiejose metalo sluoksnio pusėse lūžio rodiklių (13). Kadangi lūžio rodiklis priklauso nuo temperatūros, todėl matavimus reikia atlikti pastovioje temperatūroje. Tačiau kai kuriais atvejais ši priklausomybė gali būti naudinga (15). Labai svarbu, kad krintanti šviesa būtų monochro-



1 pav. **Greitai nykstančio elektrinio lauko susidarymas**

matinė ir poliarizuota, nes nepoliarizuota šviesa PPR nesukelia (14).

Metalai, naudojami PPR jutikliams konstruoti

Norint stebėti PPR reiškinį, paviršius, naudojamas PPR jutiklyje, privalo būti laidus bei rezonuoti atitinkamo bangos ilgio šviesoje (16). Dėl šios priežasties dažniausiai naudojami metaliniai paviršiai. Metalai, kurie tenkina šią sąlygą, yra sidabras, auksas, varis, aliuminis, natris ir indis. Parenkant metalus jutiklių konstravimui, svarbūs du apribojimai. Pirma, veikiamas šviesos paviršius turi būti iš gryno metalo, kuris nesioksiduotų ore ir nesudarytų sulfidų. Metalas negali reaguoti su medžiagomis, esančiomis atmosferoje arba tirpale (16), turi tikti biologiškai aktyviųjų medžiagų, atliekančių receptorių funkciją ir specifiškai sąveikaujančių su analite, imobilizavimui. Antra, cheminis antikūnų ar kitų molekulių prijungimas prie metalo paviršiaus negali labai susilpninti PPR. Iš visų tinkamų naudoti metalų dažniausiai naudojamas auksas. Jis sukelia stiprų, lengvai išmatuojamą PPR signalą artimojoje infraraudonojoje spektro srityje, yra chemiškai inertiškas biologiškai aktyviųjų medžiagų imobilizavimui naudojamiems tirpikliams ir juose ištirpintoms medžiagoms (13), labai atsparus oksidacijai ir kitiems atmosferos teršalams, bet yra pakankamai reaktyvus ir gali būti pasidengęs daugeliu savitvarkių monosluoksnių (SAM). Kiti metalai mažiau tinkami PPR biologinių jutiklių konstravimui. Kai kurie iš jų yra per brangūs (pvz., In), labai reaktyvūs (pvz., Na), pernelyg lengvai oksiduojasi (pvz., Ag), pasižymi plačia atspindžio intensyvumo nuosvira (pvz., Cu ar Al) (2A pav.).

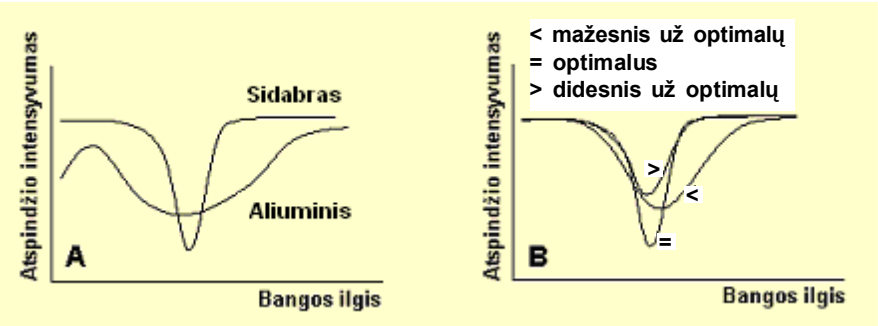
Konstruojant PPR biologinius jutiklius, labai svarbus metalo sluoksnio storis (2B pav.). Jis privalo būti žymiai mažesnis nei naudojamos šviesos bangos ilgis (7). Jei sluoksnio storis didesnis nei optimalus, atspindėtosios šviesos nuosvyra tampa negili, o esant mažesniam sluoksnio storiui, ji labai išplatėja (14), todėl dažniausiai praktiniams tikslams naudojamas PPR generuojantis paviršius yra 50±2 nm storio aukso sluoksnis ant stiklinio ar plastikinio pagrindo.

PPR sukelti ir registruoti naudojamos konfigūracijos

Rezonanso sąlyga, kuri sudaro galimybę perduoti fotonų energiją plazmonams, priklauso nuo kvantinio mechaninio kriterijaus, susijusio su fotonų ir plazmonų energija bei judesio kiekiu. Fotonų energija ir judesio kiekis privalo tiksliai atitikti plazmonų energiją ir judesio kiekį. Fotonų ir plazmonų judesio kiekio momentas gali būti aprašytas dydžio ir krypties vektorine funkcija. Komponenčių santykinis dydis pakinta, kai pakinta krintančios šviesos kampas arba bangos ilgis. Tačiau plazmonai yra izoliuoti aukso sluoksnio plokštumoje, todėl PPR yra svarbus vien tik paviršiui lygiagretus komponentės vektorius. Vadinasi, krintančios šviesos energija ir kampas privalo būti kaip tik toks, kokio reikia, kad sukeltų PPR. Dėl lygaus metalo paviršiaus nėra tokio šviesos bangos ilgio, kuris tenkintų šias sąlygas. Todėl sukurtos tokios PPR prietaisų konfigūracijos, kurios pakeičia fotonų judesio kiekį taip, kad yra tenkinamos PPR sąlygos. Yra trys pagrindinės PPR prietaisų konfigūracijos, kurios gali sukelti ir išmatuoti paviršiaus plazmonų rezonansą (16). Tai prizmėmis, gardelėmis ir optiniais šviesolaidžiais pagrįstos PPR sistemos (3 pav.).

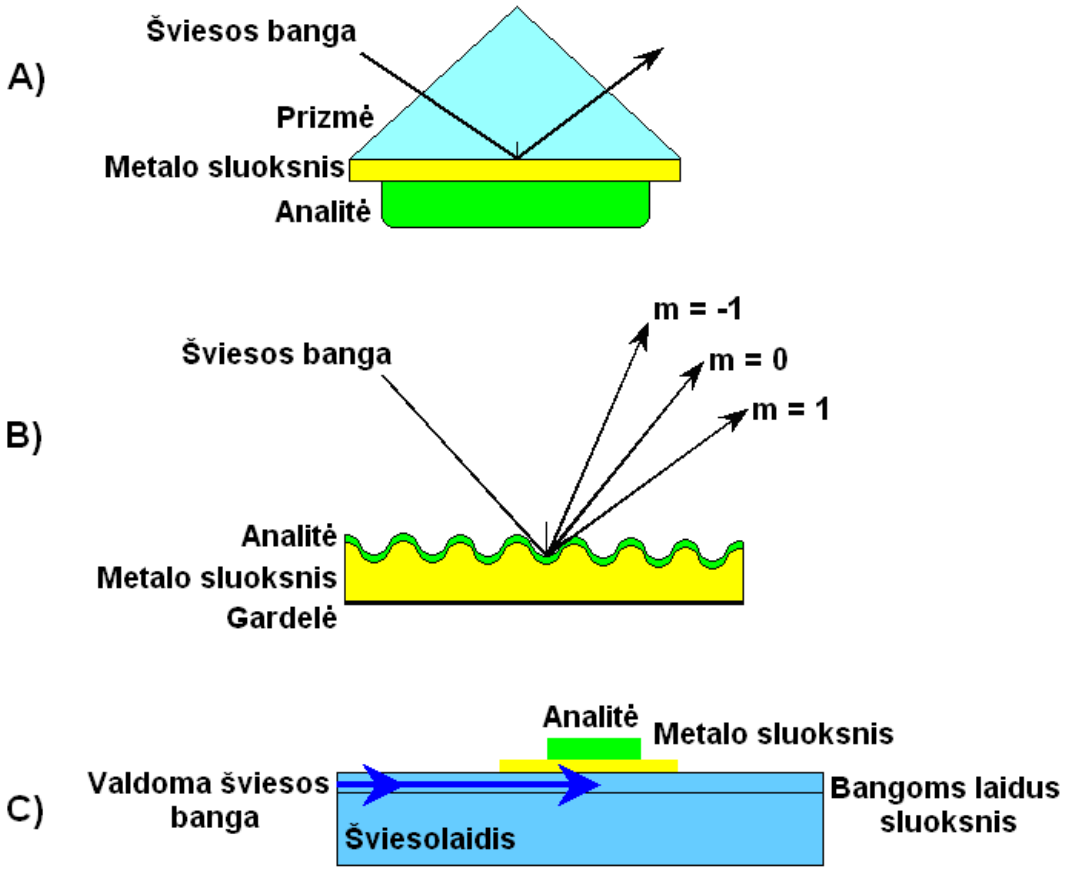
Dabar pirmenybė teikiama gardelinei PPR sistemai (3B pav.). Ji mažiausiai kainuoja ir galimas didžiausias konstravimo medžiagų pasirinkimas. Daugelis gardelių formų gali sukelti PPR, tačiau optimali paviršiaus geometrija yra sinusinė gardelė. Gardelės periodas (atstumas nuo smailės iki smailės) ir amplitudė (atstumas nuo smailės viršūnės iki žemiausio kritimo taško) nusako rezonanso bangos ilgį. Bendras sinusinės geometrijos vienodumas lemia PPR signalo stiprumą.

Prizme pagrįsta PPR sistema (3A pav.) gali būti naudojama įvairiose konfigūracijose. Otto konfigūracijoje (10, 17) tarp metalo ir visiškojo vidaus atspindžio



2 pav. **Atspindžio intensyvumo priklausomybė nuo PPR sukelti naudojamo metalo (A) ir metalo sluoksnio storio (B)**

PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas.



3 pav. **Plačiausiai naudojamos PPR jutiklių konfigūracijos**
A – prizminė paviršiaus plazmonų rezonanso (PPR) sistema (VVA metodas); B – gardelinė PPR sistema; C – optiniais šviesolaidžiais pagrįsta PPR sistema.

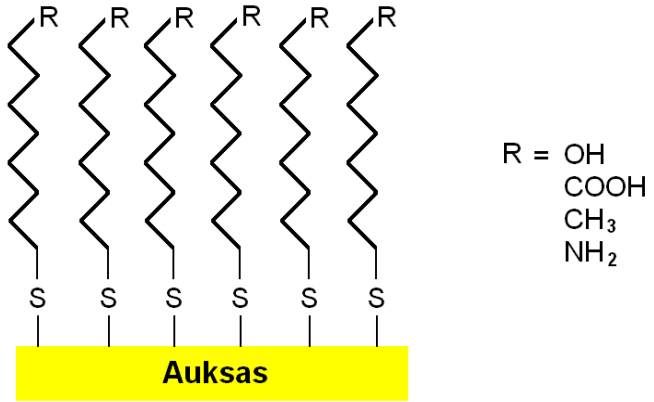
paviršiaus yra tarpas, užpildytas mažesnį lūžio rodiklį turinčia medžiaga. Tokia konfigūracija yra efektyvi tiriant PPR kietosiose medžiagose. Konstruojant PPR biologinius jutiklius, dažniausiai naudojamos Kreschmanno prizmės. Kreschmanno konfigūracijoje (9) metalo sluoksnis yra patalpinamas tiesiogiai ant visiškojo vidaus atspindžio paviršiaus. Tokia konfigūracija sudaro galimybę efektyvesniam paviršiaus plazmonų rezonanso sukėlimui. Trečioji konfigūracija yra panaši į Otto konfigūraciją, tačiau joje naudojamas ypatingas sluoksnis, sustiprinantis visiškąjį vidinį atspindį.

Optinių šviesolaidžių panaudojimas PPR jutikliuose (3C pav.) suteikia daug naujų pritaikymo galimybių, nes galima efektyviai kontroliuoti šviesos savybes, sumažinti sistemos dydį ir padidinti patvarumą. Šviesolaidžiais pagrįstų PPR prietaisų jautrumas yra beveik toks pat kaip ir PPR prietaisų su Kreschmanno prizmėmis.

PPR jutiklio paviršiaus modifikavimas biologinio atpažinimo medžiagomis

PPR jutiklio lusto paviršiaus sudėtį sąlygoja jo naudojimo paskirtis. Gamintojai siūlo skirtingai modifikuotus lustus, tačiau dažniausiai stiklinis paviršius yra padengiamas inertiniu metalu. Vėliau metalo paviršiuje imobilizuojamos biologinio atpažinimo medžiagos (BAM). Tam naudojami įvairūs būdai: fizikinė adsorbcija, kovalentinis prijungimas, įterpimas į polimerines matricas, imobilizavimas per tiolines grupes. Vis dėlto plačiausiai BAM imobilizavimui naudojami savitvarkiai monosluoksniai ir dekstrano hidrogeliai.

SAM formuoti aukso paviršiuje naudojami įvairūs organiniai sieros junginiai (18): tioliai, disulfidai ir sulfidai. Dažniausiai naudojami tioliai: aminalkantioliai, karboksialkantioliai, hidroksialkantioliai (13) (HS–(CH_2)n–R, n=5–10) ir n-alkantioliai (HS–(CH_2)n–CH_3, n>10). SAM susidarymas vyksta dėl stiprių cheminių sąveikų tarp aukso paviršiaus ir sieros. Chemosorbcijos būdu molekulės absorbuojasi aukso paviršiuje. Tada dėl van der Waalso, sterinių, stūmos ir elektrostatinių sąveikų molekulės aukso paviršiuje išsidėsto lygiagrečiai ir suformuoja stabilų monosluoksnį (18) (4 pav.). SAM lengviausiai suformuojamas pamerkus auksinį



4 pav. **Aukso sluoksnis, padengtas savitvarkių monosluoksnių (SAM)**

paviršių į alkantiolio tirpalą. Naudojant pakeistų alkantiolių mišinius, galima auksinį jutiklio lusto paviršių modifikuoti skirtingomis savybėmis pasižyminčiais SAM (19). Suformuoto SAM paviršiuje kovalentiškai imobilizuojamos BAM, gebančios atrankiai sąveikauti su pasirinktomis analitėmis: antikūnai, vienagrandės DNR sekos, fermentai ar kiti afiniškumu pasirinktoms analitėms pasižymintys reagentai.

Siekiant sudaryti hidrofilinį sluoksnį, jutiklio paviršius padengiamas ~100 nm storio karboksimetildekstrano plėvele. Prie aukso paviršiaus karboksimetildekstrano molekulės yra prijungiamos per alkantiolių jungiamąjį sluoksnį (20). Karboksimetildekstranas yra naudojamas kovalentiniam ligando prijungimui prie jutiklio paviršiaus per aminogrupes, tiogrupes arba aldehidines grupes. Kadangi karboksimetildekstranos sluoksnis yra išbrinkęs ir tame sluoksnyje yra 95–98 proc. vandens, tai sąveika tarp kovalentiškai imobilizuotos BAM ir analitės, su kuria BAM sąveikauja, vyksta šioms medžiagoms žymiai giminingesnėje aplinkoje nei tuo atveju, kai ši sąveika vyksta tiesiogiai ant jutiklio paviršiaus, padengto metalu ir (arba) SAM (7). Tačiau dekstrano hidrogelio sluoksniu padengtas paviršius ploto vienete turi daugiau jungimosi vietų, o tai padidina imobilizuotų BAM skaičių ploto vienete metodo jautrumą (21).

PPR jutiklių panaudojimas bioanalizei

PPR biologinis jutiklis – tai įrenginys, skirtas detektuoti biologiškai aktyviųjų medžiagų tarpusavio sąveikoms. Kaip ir daugelyje jutiklių tai pasiekiama BAM imobilizuojant PPR jutiklio lusto paviršiuje. PPR jutikliais galima atlikti jautrius ir kiekybiškus plataus biocheminių analičių spektro tyrimus. Daugeliu atveju nebūtina ruošti mėginio prieš patalpinant šį mėginį į jutiklį. Analitės molekulių koncentracijos gali būti išmatuotos stebint PPR signalo pokyčius. Kai jutiklis patalpinamas į mėginį, turintį analitės molekulių, šios dėl jų specifinės sąveikos su imobilizuotomis BAM molekulėmis, prisijungia prie jutiklio paviršiaus. Susidariusių imobilizuotosios BAM ir analitės kompleksų paviršinė koncentracija yra proporcinga analitės, esančios tirpale, koncentracijai. Šis aplinkos, esančios PPR jutiklio lusto paviršiuje, sudėties pokytis ir sukelia PPR signalo pokytį. Šis pokytis yra proporcingas prisijungusių molekulių paviršinei koncentracijai (22). Tarp prijungtų molekulių paviršinės koncentracijos ir PPR kampo pokyčio yra tiesinė priklausomybė (23). Tačiau ši priklausomybė dažniausiai taikoma baltymų tarpusavio sąveikoms tirti. (24). Tiriant kitų molekulių tarpusavio sąveikas, reikalingas papildomas analizinės sistemos gradavimas. Lyginant registruojamą PPR poslinkį su gradavimo kreive, galima nustatyti tirpale esančios analitės koncentraciją.

PPR reiškinys buvo žinomas gana seniai, tačiau jo panaudojimo galimybė biologiniams tyrinėjimams pirmą karta buvo išbandyta tik 1983 m. (6). Nuo tada PPR metodas patobulintas iki labai perspektyvaus biomolekulių tyrimo metodo, turinčio daugybę pritaikymo galimybių. Dabar PPR yra labai jautrus tyrimo metodas (21, 25, 26), naudojamas tiriant ligando–receptoriaus sąveiką, baltymų adsorbciją ant polimerų paviršių (27), įvairių molekulių adsorbciją aukso paviršiuje (28, 29), baltymų sąveikas su SAM aukso paviršiuje (30), baltymų sąveikas su fosfolipidų sluoksniais (31, 32), DNR (33, 34), fermento–substrato sąveiką (35), baltymų prisijungimą prie DNR (36), antigeno–antikūno sąveiką (37–39), nustatant kinetines, termodinamines ar pusiausvyros konstantas ir t. t.

Anksčiau biologiškai aktyviųjų medžiagų molekulių sąveika buvo tiriama naudojant imunoanalizės metodus (imunofermentinę analizę (IFA), radioimuninę analizę (RIA)), pusiausvirinę dializę, afininę chromatografiją ar spektroskopinės analizės metodus, tačiau PPR turi kelis svarbius pranašumus palyginus su tradiciniais metodais:

1) prisijungimas yra stebimas tiesiogiai visą laiką kol

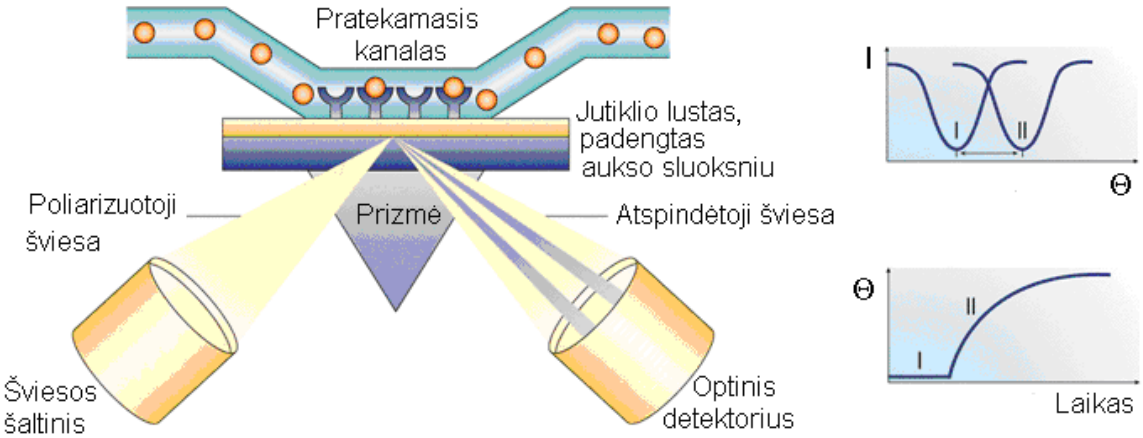
vyksta sąveika;

2) nebūtina kitais fizikiniais metodais registruojamomis žymėmis žymėti sąveikaujančių molekulių (pvz., radioaktyviomis, fluorescencinėmis arba fermentinėmis).

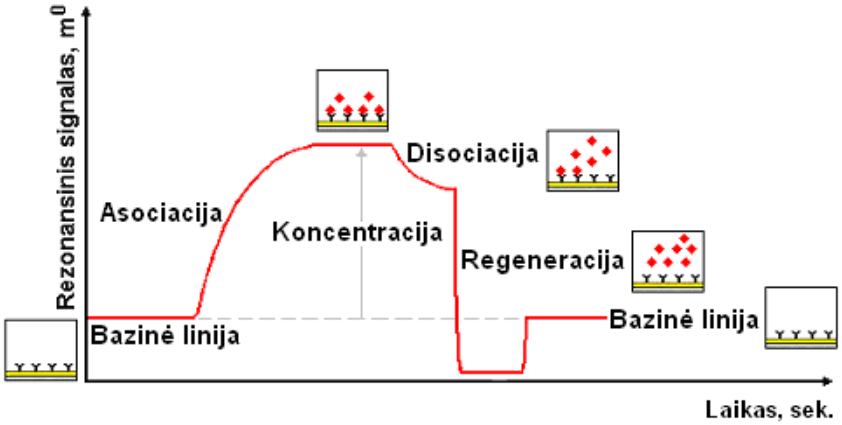
PPR reiškinys yra visiškai nejautrus cheminėms reakcijoms. Tai yra didelis pranašumas, nes PPR specifiškumas priklauso tik nuo molekulių porų parinkimo, kurios tarpusavyje gali sudaryti kompleksus. Vienas kompleksą sudarančios poros narys yra indikatorius, kitas – pasirinkta analitė (t. y. medžiaga, kurią mes norime kiekybiškai nustatyti). Bet kokios molekulių poros, kurios pasižymi specifiniu prisijungimu, gali būti pritaikytos PPR tyrimams. Tai gali būti antigenas ir antikūnas, vienagrandės DNR mėginys ir jam komplementari DNR seka, fermentas ir jo substratas.

PPR signalas yra detektuojamas matuojant atspindėtosios šviesos intensyvumą. Įvykus PPR, detektuojamas ryškus atspindėtosios šviesos intensyvumo sumažėjimas. Tiriant molekulių sąveikas, PPR pokyčių atsiranda, kai tiriamajam tirpalui leidžiama sąveikauti su jutiklio lusto paviršiumi. Atliekant daugelio biologiškai aktyviųjų medžiagų analizę, viena iš sąveikaujančių medžiagų yra kovalentiškai prijungiama prie jutiklio paviršiaus (5 pav.). Mėginys, kuriame yra analitė, sąveikaujanti su imobilizuotąja medžiaga, yra patalpinamas į pratekamąją gardelę, sukonstruotą ant jutiklio lusto paviršiaus. Tada jutiklio paviršius apšviečiamas lazerio spinduliu ir registruojamas atspindžio intensyvumas, t. y. PPR signalas. Šis signalas matuojamas nepertraukiamai visą laiką ir atspindimas kreivėje, kuri vadinama sensograma (6 pav.). Sensorgramos duomenis galima taikyti tiek analičių koncentracijoms nustatyti, tiek ir sąveikaujančių molekulių asociacijos ir disociacijos konstantoms apskaičiuoti.

Tyrimas pradedamas pro gardelę leidžiant grynąjį buferį (0–100 sek.). Suleidus mėginį, analitė prisijungia prie paviršiuje prijungto ligando, o tai sąlygoja PPR signalo padidėjimą (100–300 sek.). Vėliau, leidžiant buferį (300–420 sek.), analitė disocijuoja į buferio tirpalą



5 pav. **PPR pritaikymas kinetinei biologiškai aktyviųjų medžiagų tarpusavio sąveikos analizei**
PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas.



6 pav. **Būdinga PPR biologinio jutiklio sensograma, gauta registruojant tarpmolekulinio komplekso susidarymą bei to komplekso disociaciją ir biologinio jutiklio regeneravimą**
PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas.

ir stebimas PPR signalo sumažėjimas. Siekiant visiškai pašalinti analitę, prieš kitą matavimą sensoriaus paviršius yra regeneruojamas (420–520 sek.) perleidžiant pro gardelę regeneruojantį tirpalą (dažnai tam naudojamas 100 mmol/L HCl). Po to, siekiant atkurti bazinę liniją, vėl perleidžiamas buferis (520–600 sek.).

PPR signalas – tai signalas tik iš labai mažo metalinio sluoksnio tūrio. Tai yra labai didelis privalumas tais atvejais, kai reikia stebėti mėginių, turinčių suspenduotųjų dalelių, lūžio rodiklius. Svarbu tai, kad metalo paviršius, kuris yra aktyvus lūžio rodiklio pokyčiams, yra gana mažas ir priklauso nuo optinių konkrečios sistemos savybių. Daugeliui sistemų, kuriose naudojama prizmės ir lazerinis sužadinimas, PPR aktyvus paviršius yra ~1 mm^2. Baltymo koncentracijos padidėjimas jutiklio paviršiuje sukelia lūžio rodiklio pokytį, kuris yra tiesiogiai proporcingas prisijungusio baltymo kiekiui. Įrodyta, kad 1 ng/mm^2 paviršinės baltymo koncentracijos pokytis sukelia 1×10^{-3} RIU (lūžio rodiklio vienetai) lūžio rodiklio pokytį, arba 0,10° PPR kampo pokytį.

PPR jutiklių, kuriuose naudojamos Kretschmanno prizmės, jautris priklauso nuo to, kaip tiksliai nustatomas rezonanso kampas. Jautriausios konstrukcijos, kurių skiriamoji geba yra ~1×10^{-4} RIU, PPR kampo pokytį gali išmatuoti 0,005° tikslumu. Remiantis šiais duomenimis, galima nustatyti teorinę baltymo paviršinės koncentracijos nustatymo ribą. Apskaičiuota, kad PPR jutikliams su Kretschmanno prizmėmis minimali nustatoma paviršinė koncentracija yra 50 pg/mm^2. Toks jautris gali būti realizuotas tik jutiklio paviršiuje vykstant specifinėms sąveikoms. Tirpalai, pavyzdžiui, buferiniai, lūžio rodikliui taip pat turi įtakos, tačiau daugeliu atvejų ši įtaka yra nežymi. Kai baltymo koncentracija tirpale 100 μg/ml, tirpalo lūžio rodiklis padidėja tik $1{,}8\times10^{-5}$ RIU ir šis lūžio rodiklio padidėjimas yra per menkas, kad turėtų įtakos lūžio rodiklio pokyčiui, kuris įvyksta jutiklio paviršiuje dėl specifinės sąveikos.

PPR jutikių atsakas, atsirandantis dėl molekulių sąveikos, iš esmės yra toks pats įvairiems baltymams ir biomolekulėms esant toms pačioms jų koncentracijoms. Taip yra todėl, kad lūžio rodiklis daugeliui skirtingų makromolekulių iš esmės yra vienodas nepaisant sudėties. Todėl lūžio rodiklio pokytis duotajai koncentracijai (1×10^{-3} RIU 1 ng/mm^2) sukels vienodą PPR signalą nepriklausomai nuo to, kokia tai biomolekulė. Kitos medžiagos, tokios kaip buferiniai tirpalai arba druskos, turi įtakos jutiklio signalui priklausomai nuo individualaus jų lūžio rodiklio ir joninės jėgos. Tačiau šių poveikių dydis yra tik apie 1×10^{-2} RIU ir gali būti pašalintas naudojant tokius pačius tirpalus ir analitei, ir lyginamiesiems tirpalams. Analizė PPR jutikliais gali būti atliekama plačiame analitės koncentracijų diapazone. Žemutinė nustatymo riba yra rezonansinio kampo pokytis 10^{-3} laipsnio (10 RU – rezonansiniai vienetai), kuris atitinka prie ligando prisijungusios analitės koncentraciją 10 pg/mm^2.

Analičių nustatymo tikslumą PPR metodu riboja nustatomos analitės dydis. Kadangi PPR signalas priklauso nuo medžiagos, prisijungusios prie jutiklio paviršiaus, masės, tai labai mažos analitės (M<1000) sukelia labai mažą PPR jutiklio atsaką. Analitės, kurių molekulinė masė yra mažesnė nei 180 g/mol, PPR metodu beveik negali būti nustatomos. Neseniai sukurtais signalo triukšmo santykio pagerinimo būdais jau galima nustatyti tokias mažas analites, tačiau tam reikalinga labai didelė paviršinė aktyvaus imobilizuoto ligando koncentracija (~1 mmol/l), o tai sunkiai pasiekiama. Be to, esant tokiai didelei paviršinei ligando koncentracijai, tiksli kinetinė analizė yra neįmanoma dėl masės pernašos apribojimų ir pakartotinai vykstančio analitės prisijungimo prie ligando. Taigi mažoms analitėms įmanoma tik pusiausvirinė analizė ir tik esant optimalioms sąlygoms. Nepaisant visko, sukurta daug mažos molekulinės masės analičių nustatymo metodikų atliekant tam tikras papildomas chemines modifikacijas (40). Analizuojant mažos molekulinės masės biologines molekules, labai praverčia ir netiesioginiai analitės koncentracijos nustatymo metodai. Nustatant analitės koncentraciją netiesioginiais metodais, į analitės mėginį, prieš jį suleidžiant į analizatorių, įdedama konkuruojamoji biomolekulė. Konkuruojamosios biomolekulės, kurios tirpale nėra susijungusios su analite, yra laisvos ir gali sąveikauti su jutiklio paviršiuje imobilizuotu ligandu. Šios laisvos biomolekulės ir nustatomos. Šiuo metodu analitės koncentracija gali būti nustatyta 10^{-3}–10^{-10} mol koncentracijų intervale. Žemutinė koncentracijos nustatymo riba priklauso nuo tyrimams naudojamos sistemos ir sąveikai nustatyti naudojamo metodo. Yra daug kitų veiksnių, turinčių įtakos instrumento jautrumui: analitės tekėjimo greitis, biologinis aktyvumas, laikas, kurį analitė kontaktuoja su jutiklio paviršiumi. Dabar PPR biologiniais jutikliais galima nustatyti tokias mažos molekulinės masės analites, kurios yra svarbios aplinkosaugai (simazinas ir atrazinas), medicinai ar maisto kontrolei (fumonisinas B1, sulfametazinas ir sulfadiazinas).

Greitai nykstančios bangos (300–400 nm) prasiskverbimo gylis taip pat priklauso nuo nustatomų makromolekulių ar dalelių dydžio. Todėl didesnės nei 400 nm dydžio molekulės negali būti tiksliai nustatomos, nes šiuo atveju signalas tiesiogiai nepriklauso nuo prisijungusių molekulių kiekio. Esant tokioms sąlygoms, kiekybinė ar kinetinė analizė negali būti atliekama,

tačiau galima tirti vienų ar kitų makromolekulių prisijungimą. PPR biologiniais jutikliais nustatomos tokios didelės molekulinės masės analitės, kaip bakteriniai patogenai: *Escherichia coli, Salmonella enteritidis* ir *Listeria monocytogenes*. Pagrindiniai sunkumai, nustatant bakterines analites, esant mažesnėms jų koncentracijoms, susiję su mažu antigeno koncentracijos ir bendrosios ląstelinės medžiagos santykiu bei lėta bakterinių ląstelių difuzija į jutiklio paviršių.

PPR jutiklių pritaikymas biomedicinoje

Labai svarbi šiuolaikinės analizės užduotis – sudėtingų biologinių objektų analizė bei greita, išsami ir tiksli diagnostika. Dažnai įprastiniais cheminiais metodais neįmanoma nustatyti daugelio mus dominančių medžiagų dėl didelės trukdančių medžiagų įvairovės tiriamuosiuose objektuose. PPR biologiniais jutikliais galima analizuoti panašios cheminės sudėties medžiagų mišinius, nes tik tos analitės (pvz., hormonai, vaistai, navikų žymės ir kt.), kurios specifiškai sąveikauja su imobilizuotąja biologiškai aktyviąja medžiaga, yra detektuojamos remiantis jų biologiniu specifiškumu imobilizuotai molekulei.

Dabar PPR metodas yra naudojamas aplinkos objektų tyrimams, žemės ūkyje naudojamų pesticidų ir antibiotikų tyrimams, maisto priedų nustatymui, karinių ir civilinių biologinių bei cheminių oro teršalų nustatymui, cheminių ir biocheminių gamybos procesų kontrolei. Pastarąjį dešimtmetį PPR metodas buvo plačiai naudojamas ir biomedicinoje. Svarbu pažymėti, kad mokslinėje literatūroje paskelbus apie PPR reiškinio pritaikymą bioanalizėje, PPR biologiniai jutikliai buvo labai greitai komercializuoti, todėl dabar jie taikomi daugelyje biomedicinos laboratorijų. Šis metodas turi daug privalumų, kurių pagrindinis yra labai didelis PPR jautrumas lūžio rodiklio pokyčiams terpėje greta metalo paviršiaus. Tai suteikia galimybę tiksliai išmatuoti molekulių adsorbciją metalo paviršiuje bei jų sąveikas su specifiniais ligandais (35). Bet kokia molekulių pora, kuri pasižymi specifine sąveika, gali būti pritaikyta PPR tyrimams – tai gali būti antigenas ir antikūnas, vienagrandės DNR mėginys ir jam komplementari DNR seka, fermentas ir jo substratas, alyva ir dujos ar skystis, tirpus alyvoje, chelantas ir metalo jonas ir t. t.

Pirmieji darbai, naudojant PPR metodą, buvo sutelkti į antigeno–antikūno sąveikos registravimą (39), pvz., streptavidino–biotino reakciją ir IgG tyrinėjimus (41). Viena iš naujų PPR biologinių jutiklių pritaikymo biomedicinoje sričių yra sąveikų baltymas–RNR ir baltymas–DNR tyrinėjimas (36), nustatomi netgi imobilizuoto baltymo konformaciniai pokyčiai (42). PPR metodas buvo panaudotas hepatitui B diagnozuoti (43), vėžį slopinamajam baltymui APC vidiniam domenui, atsakingam už jo biochemines savybes, nustatyti (44), žmogaus glikoproteino jungimosi su monokloniniais antikūnais sąveikos kinetikos tyrimams (31), neuropeptido P prisijungimo prie monokloninių antikūnų sąlygų ir sąveikos kinetikos tyrimams (45). Kita biomedicininio PPR taikymo sritis yra T ląstelių receptorių sąveikos su singenetiniais ar alogeniniais ligandais tyrinėjimai (46).

Reikėtų pažymėti tai, kad biomedicinoje PPR metodas naudojamas ne tik atliekant realaus laiko ligando–receptoriaus kinetinę analizę, bet tiriant ir DNR hibridizaciją (47), receptoriaus–DNR sąveiką (48), antikūnų imunoreakcingumą (49), antikūno–antigeno sąveikos stiprumą ir šios sąveikos kinetiką (50), fermento–substrato sąveiką (35), vaistų absorbciją (51), reguliaciniuose procesuose dalyvaujančių peptidų sąveikos su juos atpažįstančiais antikūnais tyrimams (52), vaistų sąveikai su reguliatoriniais baltymais tyrimams (40), kraujo plazmos koaguliacijos kinetikos tyrimams (53), nustatant DNR ir RNR polimerazių kanalizuojamų reakcijų produktus (54), tiriant hormonus (55), nustatant vaistų likučius (56), analizuojant steroidus, imunoglobulinus, virusus (57), identifikuojant bakterijas ir bakterinius antigenus (58, 59), nustatant poliklonines antikūnus ir atliekant kiekybinę imunoanalizę (60). Naudojant PPR metodą, galima diagnozuoti bakterijų ir virusų sukeltas ligas, nustatyti hormonų, steroidų bei imunoglobulinų koncentracijas, tirti kraujo plazmos koaguliaciją. Daugelio šalių biomedicinos laboratorijose PPR jutikliais nustatomos šios plačiu biologiniu aktyvumu pasižyminčios medžiagos: morfinas (61), metamfetaminas (62), teofilinas, kofeinas, ksantinas, streptomicinas (63).

Išvados

PPR metodas biomolekulių tyrimams naudojamas palyginti neseniai, bet pastaraisiais metais šis metodas tapo vienu pagrindinių metodų tiriant bei nustatant afiniškai sąveikaujančias biologiškai aktyviąsias medžiagas. Šis metodas turi daug privalumų lyginant su kitais bioanaliziniais tyrimo metodais, nes: daugeliu atveju nebūtina ruošti mėginio prieš jo tyrimą; nėra būtinybės kitais fiziniais metodais registruojamomis žymėmis žymėti sąveikaujančių molekulių; prisijungimas stebimas tiesiogiai visą laiką kol vyksta sąveika; PPR signalo kinetinės kreivės gali būti panaudotos įvairios cheminės sudėties medžiagų charakteristikoms nustatyti. PPR jutikliais galima atlikti ir kokybinę, ir kiekybinę biologiškai aktyviųjų medžiagų analizę. Šiais jutikliais galima atlikti plataus spektro biomedicininiu požiūriu svarbių analičių tyrimus, todėl šie jutikliai vis dažniau naudojami ir mokslinėse, ir klinikinėse biomedicininius tyrimus atliekančiose laboratorijose.

Surface plasmon resonance and its application to biomedical research

Asta Kaušaitė[1, 2], Almira Ramanavičienė[1, 2], Viktoras Mostovojus[1], Arūnas Ramanavičius[1]
[1]Center of Nanotechnology and Material Science, [2]Laboratory of Immunoanalysis and Nanotechnology, Institute of Immunology, Vilnius University, Lithuania

Key words: immunosensor; biomedical research; immunoassay; biosensor; surface plasmon resonance.

Summary. In the recent years, surface plasmon resonance (SPR) has become one of the major methods for studying and determination of biologically active materials exhibiting affinity interactions. SRP biosensors are increasingly used in biochemistry and bioanalytical chemistry to determine antibody-antigen interactions, to investigate DNA hybridization, to diagnose bacteria- and virus-induced diseases, to identify hormones, steroids, and immunoglobulins, to investigate blood plasma coagulation. Using SPR biosensors, it is possible to analyze the mixtures of substances with a very similar chemical structure because SPR allows identifying only those analytes that specifically interact with biologically active substance immobilized on the surface of SPR biosensor. SPR biosensors are applied to monitor interactions between immobilized biologically active substance and analyte in real-time without labeling. On the other hand, it is possible to investigate not only association of analyte with immobilized material, but also the dissociation of a newly formed complex. SPR biosensors in many cases may be used to perform up to 50 measurements with the same SPR chip with an immobilized biological recognition element. Therefore, at present SPR is one of the most promising methods for determining the interactions between ligand and receptor, antigen and antibody, thus being increasingly used in diagnostics and biomedical research.

Correspondence to A. Ramanavičius, Institute of Immunology, Vilnius University, Molėtų 29, 08409 Vilnius, Lithuania. E-mail: arunas@imi.lt

Literatūra

1. Ramanavičius A, Herberg FW, Hutschenreiter S, Zimmermann B, Lapėnaitė I, Kaušaitė A, et al. Biomedical application of surface plasmon resonance biosensors (Review). Acta Medica Lituanica 2005;3:1-9.
2. Ramanavičienė A, Ramanavičius A. Application of polypyrrole for the creation of immunosensors. Crit Rev Anal Chem 2002;32:331-6.
3. Quinn JG, O'Kennedy R. Biosensor-based estimation of kinetic and equilibrium constants. Anal Biochem 2001;290:36-46.
4. Pockrand I, Swalen JD, Gordon JG, Philpott MR. Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies. Surface Sci 1978;74:237-44.
5. Gordon JG, Ernst S. Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface. Surf Sci 1980;101:499-506.
6. Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sens Actuat 1983; 4:299-304.
7. Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started. Biosens Bioelectron 1995;10:i-ix.
8. Wood RW. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. Phil Magm 1902;4:396-402.
9. Kretschmann E, Raether H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. Z Naturforsch 1968;23A: 2135-6.
10. Otto A. Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. Z Physik 1968;216:398-410.
11. Raether H. Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. Berlin: Springer-Verlag; 1988.
12. Maystre D. General study of grating anomalies from electromagnetic surface modes. In: Boardman AD, editor. Electromagnetic surface modes. Belfast: John Wiley and Sons; 1982. p. 661-724.
13. BIACORE technology handbook. BIACORE AB, Uppsala, Sweden; 1998. Available from: URL: http://bia.ustc.edu.cn/www.biacore.com/pdf/TN/TN_1.pdf
14. Nagata K. Significance of the real-time analysis of biological interactions. In: Nagata K, Handa H, editors. Real-time analysis of biomolecular interactions. Springer; 2000. p. 3-9.
15. Roos H, Karlsson R, Nilshans H, Persson A. Thermodynamic analysis of protein interactions with biosensor technology. J Mol Recognit 1998;11:204-10.
16. Ordal MA, Long LL, Bell RJ, Bell SE, Bell RR, Alexander RW, et al. Optical properties of metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared. Appl Opt 1983;11:1099-119.
17. Otto A. A new method for exciting non-radioactive surface plasma oscillations. Phys Stat Sol 1968;26:K99-101.
18. Schonenberger C, Jorritsma J, Sondaghuethorst JAM, Fokkink LGJ. Domain structure of self-assembled alkanethiol monolayers on gold. J Phys Chem 1995;99:3259-71.
19. Self-assembled alkenetthiol monolayers. Dojindo molecular technologies, Gaithersburg, Maryland, USA; 2003. p. 1-15. Available from: URL: http://www.dojindo.com
20. Lofas S, Johansson B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. J Chem Soc Chem Commun

1990;21:1526-8.
21. Liedberg B, Lundstrom I, Stenberg E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. Sens Actuat B 1993;11:63-72.
22. Quinn JG, O'Neill S, Doyle A, McAtamney C, Diamond D, MacCraith BD, et al. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. Anal Biochem 2000;281:135-43.
23. Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. J Coll Interface Sci 1991;143:513-26.
24. Davis TM, Wilson WD. Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. Anal Biochem 2000;284:348-53.
25. Rich RL, Myszka DG. Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature. J Mol Recognit 2002;15:352-76.
26. Rich RL, Myszka DG. Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature. J Mol Rec 2001;14:273-94.
27. Barrett DA, Hartshorne MS, Hussain MA, Shaw PN, Davies MC. Resistance to non-specific protein adsorption by poly (vinylalcohol) thin films adsorbed to a poly(styrene) support matrix studied using surface plasmon resonance. Anal Chem 2001;73:5232-9.
28. Kalyuzhny G, Vaskevich A, Schneeweiss MA, Rubinstein I. Transmission surface-plasmon resonance (T-SPR) measurements for monitoring adsorption on ultrathin gold island films. Chemistry 2002;8:3849-57.
29. Caruso F, Rodda E, Furlong DN, Haring V. DNA binding and hybridization on gold and derive surfaces. Sens Actuat B 1997; 41:189-97.
30. Lahiri J, Isaacs L, Tien J, Whitesides GM. A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: a surface plasmon resonance study. Anal Chem 1999;71:777-90.
31. Regnault V, Arvieux J, Vallar L, Lecompte T. Immunopurification of human β_2-glycoprotein I with a monoclonal antibody selected for its binding kinetics using a surface plasmon resonance biosensor. J Immunol Methods 1998;211:191-7.
32. Roy MO, Pugniere M, Jullien M, Chopineau J, Mani JC. Study of hydrophobic interactions between acylated proteins and phospholipid bilayers using BIACORE. J Mol Recognit 2001;14:72-8.
33. Jordan CE, Frutos AG, Thiel AJ, Corn RM. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. Anal Chem 1997;69:4939-47.
34. Watts HJ, Yeung D, Parkes H. Real-time detection and quantification of DNA hybridization by optical biosensor. Anal Chem 1995;67:4283-9.
35. Englebienne P, van Hoonacker A, Verhas M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. Spectroscopy 2003;17:255-73.
36. Buckle M. Surface plasmon resonance applied to DNA-protein complexes. In: Moss T, editor. DNA-protein interactions principles and protocols. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001. vol. 148, p. 535-46.
37. Salamon Z, Tollin G. Surface plasmon resonance studies of complex formation between cytochrome c and bovine cytochrome c oxidase incorporated into a supported planar lipid bilayer. I. Binding of cytochrome c to cardiolipin/phosphatidylcholine membranes in the absence of oxidase. Biophys J 1996;71:848-57.
38. Akimoto T, Sasaki S, Ikebukuro K, Karube I. A surface plasmon resonance sensor probe with a novel integrated reference sensor surface. Anal Chim Acta 2000;417:125-31.
39. Luo J, Zhou J, Zou W, Shen P. Antibody-antigen interactions measured by surface plasmon resonance: global fitting of numerical integration algorithms. J Biochem (Tokyo) 2001; 130:553-9.
40. Frostell-Karlsson A, Remaeus A, Roos H, Andersson K, Borg P, Hamalainen M, et al. Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. J Med Chem 2000;43:1986-92.
41. Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. Sens Actuat B 1999;54:3-15.
42. Sota H, Hasegawa Y, Iwakura M. Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance. Anal Chem 1998;70:2019-24.
43. Tung S, Gimenez J, Przysiecki CT, Mark G. Characterization of recombinant hepatitis B surface antigen using surface plasmon resonance. J Pharm Sci 1998;87:76-80.
44. Deka J, Kuhlmann J, Muller O. A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein T. Eur J Biochem 1998;253:591-7.
45. Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype 0111. Infect Immunol 1998;66:2434-40.
46. Garcia CK, Tallquist MD, Pease LR. Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13838-43.
47. Thiel AJ, Frutos AG, Jordan CE, Corn RM, Smith LM. In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces. Anal Chem 1997;69:4948-56.
48. Cheskis B, Freedman LP. Modulation of nuclear receptor interactions by ligands: kinetic analysis using surface plasmon resonance. Biochem 1996;35:3309-18.
49. Adamczyk M, Mattingly PG, Shreder K, Yu S. Surface plasmon resonance (SPR) as a tool for antibody conjugate analysis. Bioconjugate Chem 1999;10:1032-7.
50. Kaganer E, Pogreb R, Davidov D, Willner I. Surface plasmon resonance characterization of photoswitchable antigen-antibody interactions. Langmuir 1999;15:3920-3.
51. Danielan E, Karlen A, Karlsson R, Winiwarter S, Hansson A, Löfas S, et al. SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: correlation with fraction absorbed in humans. J Med Chem 2000;43:2083-6.
52. van Regenmortel MHV, Choulier L. Recognition of peptides by antibodies and investigations of affinity using biosensor technology. Comb Chem High Throughput Screen 2001;4:385-95.
53. Hansson KM, Vikinge TP, Ranby M, Tengvall P, Lundstrom I, Johansen K, et al. Surface plasmon resonance (SPR) analysis of coagulation in whole blood with application in prothrombin time assay. Biosens Bioelectron 1999;14:671-82.
54. Kai E, Sawata S, Ikebukuro K, Iida T, Honda T, Karube I. Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance. Anal Chem 1999;71:796-800.
55. Forbes BE, Hartfield PJ, McNeil KA, Surinya KH, Milner

SJ, Cosgrove LJ, et al. Characteristics of binding of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II analogues to the type 1 IGF receptor determined by BIAcore analysis – correlation of bindingaffinity with ability to prevent apoptosis. Eur J Biochem 2002;269:961-8.
56. Rich RL, Day YS, Morton TA, Myszka DG. High-resolution and high-throughput protocols for measuring drug/human serum albumin interactions using BIACORE. Anal Biochem 2001;296:197-207.
57. Fisher RJ, Rein A, Fivash M, Urbaneja MA, Casas-Finet JR, Medaglia M, et al. Sequence-specific binding of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein to short oligonucleotides. J Virol 1998;72:1902-9.
58. Kok RG, D'Argenio DA, Ornston LN. Mutation analysis of PobR and PcaU, closely related transcriptional activators in *Acinetobacter*. J Bacteriol 1998;180:5058-69.
59. Haruki M, Noguchi E, Kanaya S, Crouch RJ. Kinetic and stoichiometric analysis for the binding of *Escherichia coli* ribonuclease HI to RNA-DNA hybrids using surface plasmon resonance. J Biol Chem 1997;272:22015-22.
60. Mullett WM, Lai EPC, Yeung JM. Surface plasmon resonance-based immunoassays. Methods 2000;22:77-91.
61. Miura N, Ogata K, Sakai G, Uda T, Yamazoe N. Detection of morphine in ppb range by using SPR (surface-plasmon resonance) immunosensor. Chem Lett 1997;8:713-4.
62. Sakai G, Nakata S, Uda T, Miura N, Yamazoe N. Highly selective and sensitive SPR immunosensor for detection of methamphetamine. Electrochim Acta 1999;44:3849-54.
63. Lai EPC, Fafara A, VanderNoot VA, Kono M, Polsky B. Surface plasmon resonance sensors using molecularly imprinted polymers for sorbent assay of theophylline, caffeine and xanthine. Can J Chem 1998;76:265-73.

Straipsnis gautas 2006 09 20, priimtas 2007 04 17
Received 20 September 2006, accepted 17 April 2007