

## ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРНЫХ И ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЛАЗМОННЫХ ПЛЕНОК СЕРЕБРА ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА КОНЪЮГАТА IgG-FITC

О. С. Кулакович<sup>1\*</sup>, А. А. Щербович<sup>2</sup>, А. А. Романенко<sup>1</sup>, И. В. Коктыш<sup>2</sup>,  
Я. И. Мельникова<sup>2</sup>, С. В. Гапоненко<sup>1</sup>, С. А. Маскевич<sup>2</sup>

УДК 544.77:661.848.562:535.372/343.2

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2023-90-1-48-55>

<sup>1</sup> Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь; e-mail: o.kulakovitch@ifanbel.bas-net.by

<sup>2</sup> Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова  
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

(Поступила 26 октября 2022)

Проведена оптимизация коэффициента усиления флуоресценции коньюгата иммуноглобулина G, меченного изотиоцианатом флуоресцина (IgG-FITC), как иммунофлуоресцентного маркера в зависимости от оптических и топографических параметров пленки коллоидного серебра на поверхности стандартного полистирольного плстишета для иммуноанализа. Выявлены факторы, влияющие на усиление флуоресценции. С помощью спектроскопии с временным разрешением, анализа спектров возбуждения флуоресценции, а также иммуноферментного определения относительных концентраций IgG-FITC, адсорбированного на твердой фазе, показано, что усиление флуоресценции является плазмон-резонансным процессом. Наиболее важным параметром, коррелирующим с коэффициентом усиления флуоресценции, является оптическая плотность пленки коллоидного серебра на длине волны возбуждения и испускания IgG-FITC. Максимальный коэффициент усиления в 10.2 раза получен для пленок серебра с наибольшей оптической плотностью.

**Ключевые слова:** плазмон-усиленная флуоресценция; наночастица серебра; полиэлектролит; иммунофлуоресцентный анализ; иммуноглобулин G, меченный изотиоцианатом флуоресцина.

Optimization of the fluorescence enhancement factor of the conjugate of immunoglobulin G labeled with fluorescein isothiocyanate (IgG-FITC) as an immunofluorescent marker was carried out depending on the optical and topographic parameters of a colloidal silver film on the surface of a standard polystyrene plate for immunoassay. Factors influencing fluorescence enhancement were identified. Using time-resolved spectroscopy, analysis of fluorescence excitation spectra, and enzyme immunoassay determination of the relative concentrations of IgG-FITC adsorbed on the solid phase, it was shown that fluorescence enhancement is a plasmon-resonance process. The most important parameter correlated with the fluorescence enhancement factor is the optical density of silver colloidal film at the excitation and emission wavelengths of IgG-FITC. The maximum enhancement factor of 10.2 times was obtained for silver films with the highest optical density.

**Keywords:** plasmon-enhanced fluorescence, silver nanoparticle, polyelectrolyte, immunofluorescence analysis, immunoglobulin G labeled with fluorescein isothiocyanate.

**Введение.** В настоящее время флуоресцентные методы обнаружения широко используются в иммунодиагностике. Для повышения чувствительности флуоресцентного анализа в качестве субстратов апробируются различные твердофазные системы, содержащие плазмонные частицы серебра и золота [1—10]. В таких системах вблизи поверхности металлических наночастиц (НЧ) происходит

## OPTIMIZATION OF STRUCTURAL AND OPTICAL PARAMETERS OF PLASMON SILVER FILMS FOR IgG-FITC FLUORESCENT ANALYSIS

О. С. Кулакович<sup>1\*</sup>, А. А. Щербович<sup>2</sup>, А. А. Раманенка<sup>1</sup>, И. В. Коктыш<sup>2</sup>, Я. И. Мельникова<sup>2</sup>,  
С. В. Гапоненко<sup>1</sup>, С. А. Маскевич<sup>2</sup> (<sup>1</sup> B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: o.kulakovitch@ifanbel.bas-net.by; <sup>2</sup> International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus)

локализация электромагнитного излучения падающей световой волны, а также увеличение скорости излучательных переходов, что позволяет повысить интенсивность регистрируемого сигнала флуоресцентной метки, а значит, улучшить аналитические возможности метода.

В работах [7, 11—14] описаны универсальные технологии электростатического осаждения НЧ Ag для создания наноструктурированных пленок на поверхности различных диэлектрических материалов. Продемонстрировано, что такие “металлизированные” покрытия можно использовать для усиления флуоресценции ряда меченых изотиоцианатом флуоресцина (FITC) белков, включая бычий сывороточный альбумин [2, 11], иммуноглобулин G человека (IgG) [7], моноклональные антитела к альфа-фетопротеину и комплексы антиген–антитело [13]. Применение такого подхода и интеграция НЧ Ag в стандартную процедуру анализа с использованием 96-луночного планшета позволили существенно повысить чувствительность иммунофлуоресцентного метода определения простат-специфического антигена (ПСА) [14]. Интенсивность регистрируемого флуоресцентного сигнала в присутствии НЧ Ag повышалась в 2.3—3.2 раза по сравнению с сигналом, полученным при иммобилизации тест-системы на интактной поверхности полистирольного планшета; отношение сигнал/шум возрастало до двух раз.

Формат 96-луночного планшета позволяет проводить автоматический и одновременный анализ большого количества образцов за короткий промежуток времени [15]. Модификация планшетов металлическими НЧ — актуальная задача для разработки высокоеффективных тестов, основанных на плазмонном усилении флуоресценции. Для металлизации пластин чаще всего используются два подхода: формирование пленки на поверхности пластин путем химического восстановления металла [15, 16] и осаждение на пластину предварительно синтезированных коллоидных металлических НЧ [17, 18]. Более сложный и дорогой метод металлизации — создание плазмонных пленок, которые используются в качестве дна планшета, литографическими методами [19, 20]. Для систем такого рода оптимизация иммунологического анализа в зависимости от топографических и связанных с ними оптических параметров пленок коллоидного серебра ранее не выполнялась.

Цель настоящей работы — исследование морфологических и спектральных характеристик наноструктурированных пленок серебра, а также флуоресцентных характеристик иммобилизованного коньюгата IgG-FITC в зависимости от поверхностной плотности НЧ Ag. Исследования интересны с точки зрения получения максимального усиления флуоресценции. С увеличением количества НЧ в пленке, с одной стороны, может увеличиться количество “горячих точек”, ответственных за усиление сигнала, с другой — аугментация агрегатов с повышенной концентрацией НЧ в пленке за счет длинноволнового расположения их полос поглощения может способствовать безызлучательной передаче энергии от флуоресцентной метки к металлу и тушению флуоресценции [21]. В рамках теоретических расчетов все факторы учесть сложно, так как коэффициент усиления обычно моделируется для одиночных плазмонных НЧ или агрегатов из двух-трех НЧ [22]. Результаты исследования могут помочь минимизировать затраты на Ag-содержащие реагенты при металлизации планшетов, что важно с точки зрения снижения затрат при использовании их в качестве твердой фазы для рутинного иммуноанализа.

**Эксперимент.** Использованы нитрат серебра, цитрат натрия, полиэлектролит (ПЭ) поли-L-лизин гидробромид (молекулярная масса >30000 Sigma), иммуноглобулин класса G, меченный изотиоцианатом флуоресцина (IgG-FITC), фосфатно-солевой буфер (PBS). Эксперименты проводили в прозрачных плоскодонных 96-луночных полистироловых высокосвязывающих планшетах для иммуноанализа с покрытием дна “Микролон-600” (каталожный номер 762071, Greiner, Германия) и рабочим объемом лунки 350 мкл.

Для измерения оптической плотности и флуоресцентного анализа использован планшетный лидер CLARIOstarPlus (BMGLabtech, Германия). При регистрации интенсивности флуоресценции получены параметры: длины волн возбуждения и регистрации 483 и 530 нм, спектральная ширина щелей 14 нм (возбуждение) и 30 нм (регистрация). Спектры флуоресценции IgG-FITC зарегистрированы при возбуждении 440 нм и спектральной ширине щелей 16 нм (возбуждение) и 10 нм (регистрация). Оптическая плотность золей серебра измерена на спектрофотометре Cary-500 (Varian, США).

Золь серебра синтезирован методом цитратного восстановления нитрата серебра [23]. НЧ Ag осаждались в лунку планшета на поверхность, предварительно покрытую ПЭ; время осаждения НЧ Ag варьировалось в пределах 1 сут. Таким образом получены пленки серебра AgC1, AgC2, AgC3 с увеличением времени осаждения НЧ. Пленка AgC4 формировалась на поверхности лунок из золя Ag после его длительного хранения в течение нескольких месяцев. Спектральные зависимости исходных

золей золота для приготовления пленок AgC1—AgC3 и AgC4 представлены на рис. 1, *a*. Затем лунки металлизированного планшета обрабатывали поли-L-лизином. Для определения коэффициента усиления флуоресценции интенсивность сигнала флуоресценции металлизированных лунок сравнивали с сигналом в исходных лунках, покрытых поли-L-лизином, с учетом поверхностной плотности осажденных молекул IgG-FITC.

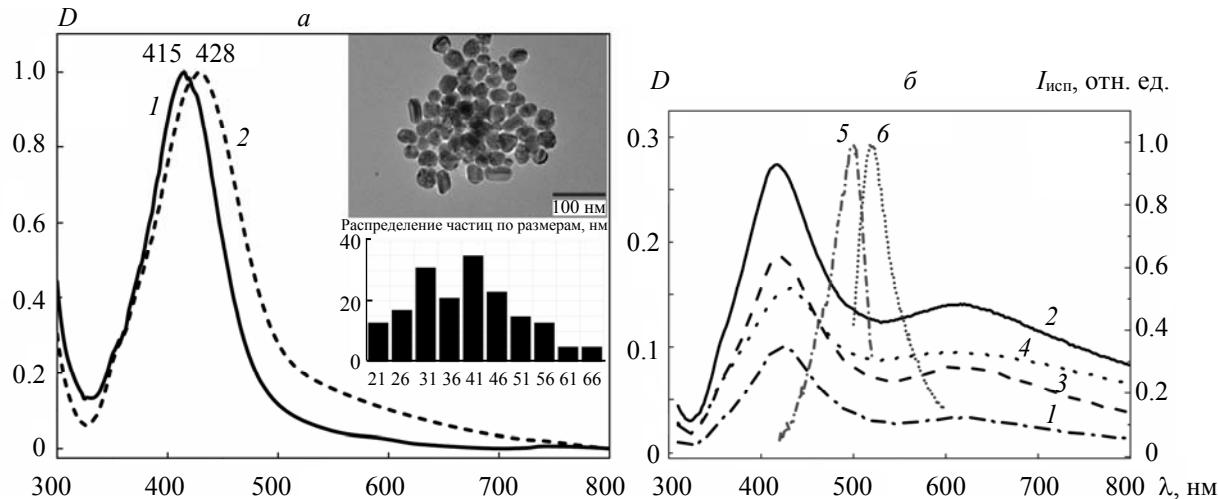


Рис. 1. Нормированные спектральные зависимости оптической плотности гидрозолей серебра, используемых для получения пленок серебра AgC1—AgC3 (1) и AgC4 (2) (*а*), на вставке — ПЭМ-изображение и гистограмма распределения по размерам НЧ Ag; *б* — спектральные зависимости оптической плотности системы AgC<sub>n</sub>—ПЭ—IgG-FITC под буферным слоем и спектры поглощения (5) и испускания IgG-FITC (6), AgC1 (1), AgC2 (2), AgC3 (3) и AgC4 (4)

Изображения атомно-силовой микроскопии (АСМ) пленок Ag получены на микроскопе NtegraEx с головкой SFC113NTF (NT-MDT, Россия) и обработаны с использованием программного обеспечения для анализа данных сканирующей зондовой микроскопии Gwyddion. На основе обработки четырех изображений для каждого вида пленок рассчитана доля площади поверхности, занятая НЧ ( $\eta$ ). Фотографии просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) НЧ Ag получены на микроскопе JEOL JEM-2100.

Спектры возбуждения флуоресценции и кинетики затухания флуоресценции образцов измерены при комнатной температуре на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Scientific, США). В качестве детектора использовано ФЭУ PPD-850 (Horiba Scientific). Кинетики затухания флуоресценции измерены методом время-коррелированного счета фотонов, в качестве источника возбуждения использован импульсный светодиод PLS-450 (PicoQuant, Германия) с  $\lambda_{\text{исп}} = 455$  нм. Деконволюция с инструментальным откликом системы и аппроксимация кинетик затухания флуоресценции тремя экспонентами проведены в программе DAS6 (Horiba Scientific). Среднее время жизни возбужденного состояния IgG-FITC определено по формуле  $\tau_{\text{ср}} = \sum a_i \tau_i^2 (\sum a_i \tau_i)^{-1}$ , где  $\tau_i$  и  $a_i$  — время жизни и весовой множитель *i*-й компоненты.

В лунки полистироловых планшетов и планшетов, модифицированных НЧ Ag, с последующим покрытием поли-L-лизином, добавляли постоянное количество IgG-FITC в 150 мкл 10 мМ PBS (рН 7.4) и инкубировали в темноте по стандартной методике при 4 °C. Затем планшеты промывали тем же буфером и измеряли интенсивности флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 483$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 530$  нм) с использованием ридера. Оценку относительной сорбции IgG-FITC проводили иммуноферментным методом. В лунки полистироловых планшетов с предварительно иммобилизованным IgG-FITC добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (соотношение 1:10000), инкубировали в течение 1.5 ч при +37 °C, дважды промывали PBS, затем добавляли субстратно-хромогенную смесь. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с помощью ридера. Относительную сорбцию IgG-FITC определяли путем расчета коэффициентов сорбции белка — отношение оптической плотности сорбированного белка на лунках, покрытых пленкой серебра, к оптической плотности сорбированного белка на лунках, покрытых ПЭ.

**Результаты и их обсуждение.** Спектральные зависимости металлизированных луночных планшетов с меченым IgG-FITC, заполненных PBS, а также спектры использованных для их получения гидрозолей серебра и результаты ПЭМ НЧ Ag представлены на рис. 1. Средний размер НЧ Ag  $41 \pm 12$  нм, существует значительная вариация их размеров. В спектрах пленок Ag на поверхности планшета наблюдаются характерные широкие полосы с максимумами в диапазоне 420—430 нм, связанные с локализованным плазмонным резонансом (ЛПР) в НЧ Ag, а также в диапазоне 600—620 нм, обусловленные поглощением агрегатов НЧ [24]. Спектрально-оптические параметры пленок серебра, а также топография поверхности зависят от технологии их получения. Увеличение оптической плотности пленки в диапазоне 420—430 нм наблюдается с увеличением времени осаждения НЧ при переходе от AgC1 к AgC3. Кроме того, происходит коротковолновое смещение ( $\sim 2$  нм) положения максимума ЛПР ( $\text{AgC1} < \text{AgC2} < \text{AgC3}$ ) с одновременным увеличением поверхностной плотности НЧ Ag ( $\eta$ ) (рис. 2). Такие различия в положении полосы ЛПР для пленок с разным временем осаждения серебра могут быть связаны с различиями в диэлектрической проницаемости среды [25], которая в свою очередь зависит от локального микроокружения и морфологии пленки в целом, судить о которой можно по данным ACM (рис. 2).

Коэффициенты заполнения монослоя  $\eta = 15 \pm 3$ ,  $37 \pm 8$  и  $97 \pm 3$  % для пленок AgC1, AgC2 и AgC3, соответственно, в определенной степени коррелируют с оптической плотностью в максимуме полосы поглощения, связанной с ЛПР (0.10, 0.19, 0.27). Коэффициент заполнения для пленки AgC3 больше теоретически возможного для монослоя 75 %, т. е. в данном случае сформирована пленка толщиной более монослоя. Такой вывод следует из анализа ACM-данных. Поэтому оптическая плотность в максимуме ЛПР, вероятно, в большей степени отражает концентрацию неагрегированных НЧ на поверхности, чем величина  $\eta$ , которая определяется поверхностной плотностью как неагрегированных, так и агрегированных НЧ Ag.

Сравнение ACM-изображений (рис. 2) показывает, что значения  $\eta$  для пленок AgC1 ( $15 \pm 3$  %) и AgC4 ( $21 \pm 4$  %) близки, а спектральные зависимости оптической плотности AgC1 и AgC4 существенно различаются из-за разных концентраций агрегированных НЧ. Более близкие значения оптической плотности у пленок AgC2 и AgC4 (рис. 1,  $\delta$ ), однако морфологии их существенно различаются: пленка AgC2 состоит как из изолированных НЧ Ag, так и из агрегатов нескольких частиц, расположенных в горизонтальной плоскости, а AgC4 — из изолированных частиц, а также плоских и объемных агрегатов (рис. 2). Именно объемные агрегаты являются причиной заниженного значения  $\eta$  для пленки AgC4. Эти агрегаты, вероятно, в значительной степени ответственны за формирование длинноволновой полосы поглощения в области 600—700 нм пленки AgC4. Поэтому оптические плотности для AgC2 и AgC4 близки, несмотря на различия в относительной поверхностной плотности НЧ.

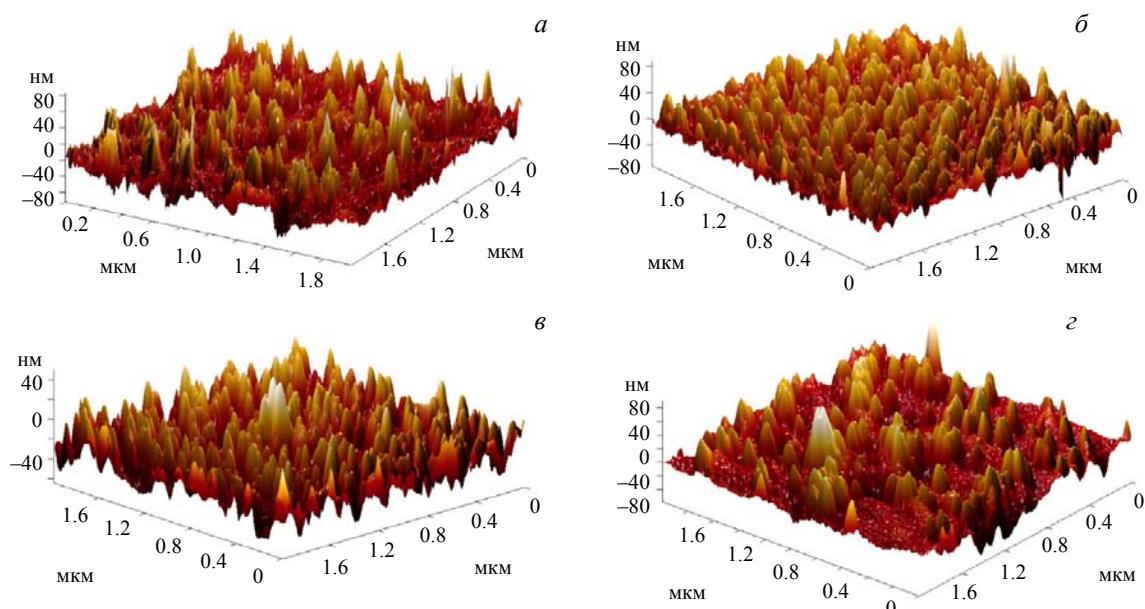


Рис. 2. ACM-изображения пленок AgC1 (a), AgC2 (б), AgC3 (в) и AgC4 (г)

Используем отношение оптических плотностей пленок при 420 и 625 нм ( $D_{625}/D_{420}$ ) для обсуждения роли плазмонов, связанных с неагрегированными и агрегированными НЧ Ag, в усиении флуоресценции IgG-FITC. Для AgC2 и AgC4  $D_{625}/D_{420} = 0.43$  и  $0.62$ , что может указывать на большую долю изолированных крупных агрегатов для AgC4 по сравнению с AgC2. Для пленок AgC3  $D_{625}/D_{420} = 0.51$  и AgC1  $D_{625}/D_{420} = 0.33$ . В ряду AgC1, AgC2, AgC3 отношение  $D_{625}/D_{420}$  возрастает, что, вероятно, связано с увеличением доли крупных агрегатов и уменьшением доли одиночных НЧ в пленке на поверхности лунок по данным ACM.

Значительное перекрытие спектров поглощения и флуоресценции FITC со спектральной зависимостью оптической плотности плазмонных пленок (рис. 1, б) указывает на возможность эффективного резонансного переноса энергии локализованных плазмонов на FITC и наоборот.

Рассмотрим характеристики флуоресценции IgG-FITC, осажденного в лунках планшета, содержащих плазмонные пленки AgC1, AgC2, AgC3 и AgC4. Для всех типов пленок Ag наблюдается более интенсивная флуоресценция адсорбированного IgG-FITC по сравнению с неметаллизированными лунками. Изменение интенсивности флуоресценции меченого модельного иммуноглобулина IgG-FITC при адсорбции на плазмонной пленке, покрытой ПЭ, может быть следствием влияния ряда факторов, описанных в [1, 6, 26] и специально исследованных в [4, 27—31]. Например, усиление флуоресценции металлическими НЧ связано с увеличением как интенсивности падающего поля за счет возбуждения плазмонного резонанса [1] и резонансного взаимодействия плазмонов и молекул флуорофора в ближнем поле, так и скорости спонтанного излучения за счет изменения плотности фотонных состояний [32] и специфических взаимодействий флуорофоров с ПЭ [5].

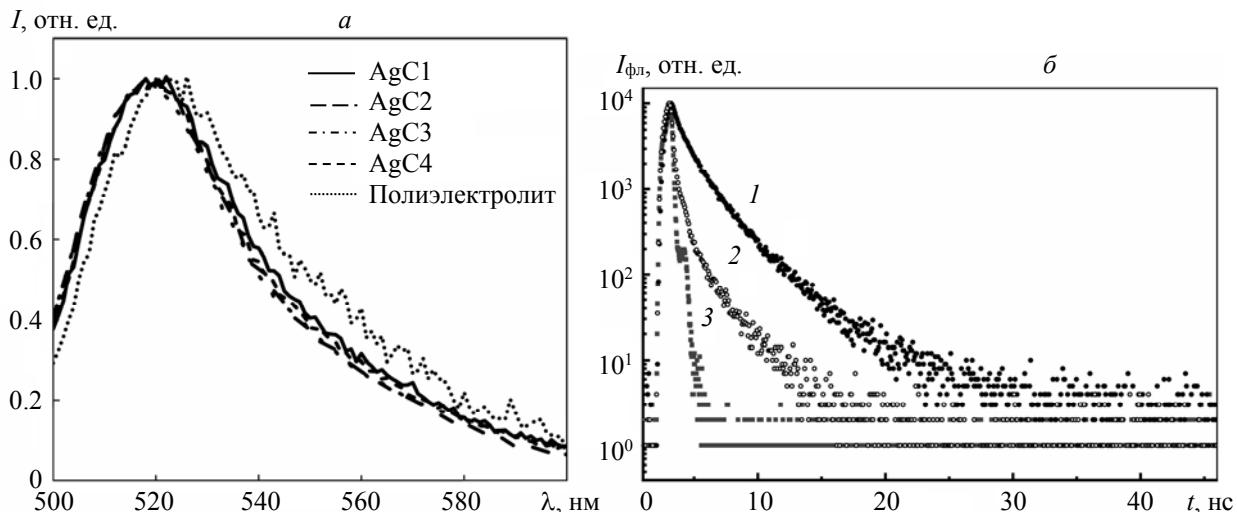


Рис. 3. Нормированные спектры флуоресценции IgG-FITC, адсорбированных на различных типах поверхностей модифицированного планшета (а); кинетики затухания флуоресценции образцов IgG-FITC ( $\lambda_{\text{пер}} = 520$  нм): 1 — без НЧ Ag, 2 — AgC3 с НЧ Ag, 3 — инструментальный отклик системы (б)

Характерные спектральные параметры флуоресценции IgG-FITC представлены на рис. 3. Образец IgG-FITC в лунках, модифицированных поли-L-лизином, характеризуется максимумом флуоресценции при 521 нм. Металлизация планшета отражается на параметрах флуоресценции меченого белка. Наблюдаются сужение спектра и смещение его максимума в синюю сторону. Для спектров возбуждения флуоресценции IgG-FITC после их адсорбции на металлизированную поверхность планшета также характерен гипсохромный сдвиг на 5 нм (рис. 4, а), что может быть связано как с изменением конформации белка при сорбции, так и с резонансным влиянием плазмонной пленки на процесс эмиссии света IgG-FITC. Влияние резонансных взаимодействий плазмонных НЧ на флуоресценцию IgG-FITC подтверждается данными кинетики затухания флуоресценции (рис. 3, б) и анализа спектральной зависимости коэффициента усиления флуоресценции (рис. 4, б).

Среднее время затухания флуоресценции для IgG-FITC в лунках без Ag 1.68 нс, тогда как для IgG-FITC в металлизированных лунках AgC3 0.24 нс (рис. 3, б). Ускорение кинетики затухания флуоресценции качественно согласуется с данными для BSA-FITC [2] и HSA-FITC [1], адсорбированных на островковых пленках Ag, полученных вакуумным напылением. Спектральная зависимость коэффициента усиления флуоресценции (рис. 4, б) получена делением зарегистрированного спектра возбуждения флуоресценции образца IgG-FITC с НЧ Ag на спектр возбуждения флуоресценции образца без НЧ Ag. Корреляция положения максимума коэффициента усиления флуоресценции с областью плазмонного резонанса в пленке Ag свидетельствует об участии НЧ Ag в процессах возбуждения флуоресценции и испускания света IgG-FITC. Наиболее эффективное возбуждение флуоресценции IgG-FITC происходит в области 450 нм на длинноволновом крыле плазмонной полосы пленки Ag.

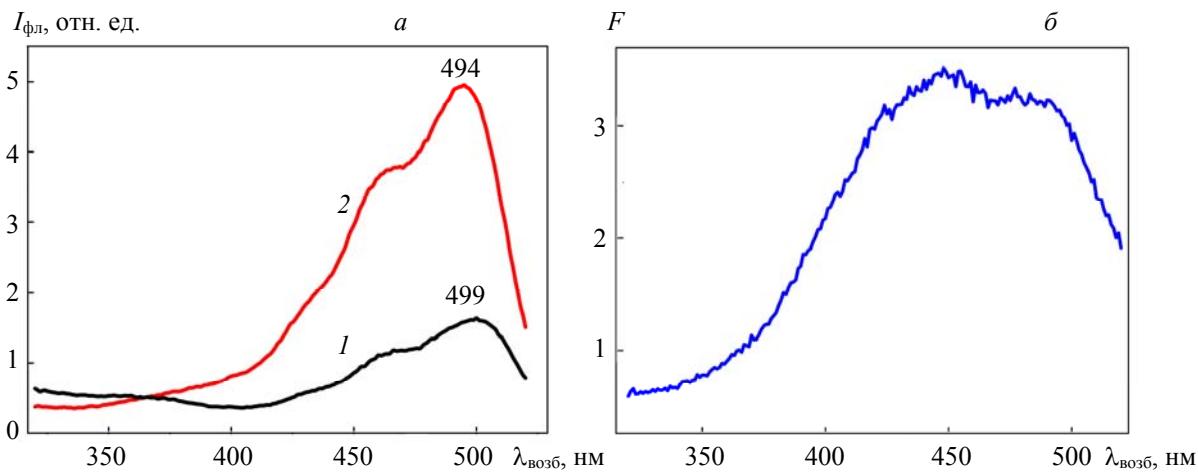


Рис. 4. Спектры возбуждения флуоресценции (а) образцов без НЧ Ag (1) и с НЧ AgC3 (2) и рассчитанная на их основе спектральная зависимость коэффициента плазмонного усиления флуоресценции  $F$  для IgG-FITC при  $\lambda_{\text{пер}} = 570$  нм (б)

Следует отметить, что конъюгаты IgG-FITC в металлизированных лунках показали хорошую стабильность и воспроизводимость сигнала флуоресценции, интенсивность флуоресценции на одном уровне в течение одного и более месяцев при условии хранения образцов при температуре +4 °C под слоем буферного раствора.

Оптические плотности пленок AgC1, AgC2, AgC3 и AgC4 равны 0.038, 0.072, 0.104 и 0.071 на  $\lambda_{\text{возб}} = 483$  нм и 0.019, 0.040, 0.071 и 0.050 на  $\lambda_{\text{исп}} = 530$  нм IgG-FITC соответственно (рис. 1, б). Длины волн возбуждения и регистрации выбирали в соответствии со стандартными процедурами иммунофлуоресцентного анализа с использованием FITC. Согласно данным рис. 3, а и рис. 4, б, стандартные условия возбуждения флуоресценции FITC близки к оптимальным с учетом плазмонрезонансного взаимодействия. Коэффициент усиления флуоресценции определяли по соотношению интенсивностей флуоресценции FITC в присутствии и в отсутствие коллоидов Ag ( $F = I_{\text{Ag}}/I_{\text{noAg}}$ ). Коэффициенты усиления флуоресценции для пленок AgC1, AgC2, AgC3 и AgC4 составили 3.2, 5.3, 10.2 и 5.2 соответственно.

При переходе от AgC1 к AgC3 с увеличением концентрации НЧ в пленке коэффициент плазмонного усиления флуоресценции увеличивается от 3.2 до 10.2 (в 3.6 раза). Оптическая плотность при этом возрастает в 2.8 раза на длине волны возбуждения и в 3.5 раза на длине волны излучения. Максимальное усиление флуоресценции IgG-FITC получено для пленки AgC3. Пленки AgC2 и AgC4, которые характеризуются наиболее близкими оптическими плотностями на длинах волн возбуждения и испускания флуорофора, но различаются степенью агрегации НЧ Ag, демонстрируют близкие коэффициенты усиления флуоресценции.

Повышение интенсивности флуоресценции в присутствии пленок Ag может быть связано не только с плазмонным усилением, но и с увеличением количества адсорбированных молекул на металлизированной поверхности лунок по сравнению с неметаллизированными лунками. С учетом этого проведен иммуноферментный анализ для определения относительной сорбции молекул IgG-FITC в лунках с плазмонными пленками и в отсутствие пленок Ag. Во всех случаях IgG-FITC сорбировал-

ся на слой поли-L-лизина, нанесенный на твердую фазу. Получены соотношения коэффициентов сорбции белков на поверхности: AgC1:AgC2:AgC3:AgC4:без Ag 1.04:1.03:1.18:1.12:1.00 соответственно. Следовательно, металлизация приводит к увеличению сорбции меченых антител на 3—18 % в зависимости от морфологии пленки Ag.

Пленки AgC2 и AgC4, характеризующиеся разной степенью агрегации НЧ и одновременно наиболее близкими значениями оптической плотности на длинах волн возбуждения и излучения флуорофора, а также практически равными коэффициентами усиления флуоресценции адсорбированного IgG-FITC ( $F = I_{\text{Ag}}/I_{\text{noAg}}$ ), имеют скорректированный коэффициент усиления флуоресценции  $F_{\text{кор}}(\text{AgC2}) = 5.1$  и  $F_{\text{кор}}(\text{AgC4}) = 4.6$ . Таким образом, агрегация НЧ Ag на поверхности не оказывает существенного влияния на итоговый коэффициент усиления в исследуемой плазмонной системе. Наиболее важным параметром является оптическая плотность на длинах волн возбуждения и испускания флуорофора. Это подтверждается наличием агрегатов в самой плотной пленке AgC3, которая демонстрирует максимальное усиление флуоресценции. Необходимо дальнейшее изучение механизмов усиления флуоресценции в исследуемой системе и вклада плазмонных НЧ как в возбуждение флуорофора, так и в эффективность испускания.

**Заключение.** Изучена зависимость коэффициента усиления флуоресценции модельного иммуноглобулина, меченного изотиоцианатом флуоресцеина, от морфологии и оптических свойств наноструктурированных пленок серебра на поверхности полистиролового микропланшета для иммуноанализа. Концентрация наночастиц серебра в пленке является более значимым морфологическим параметром, влияющим на интенсивность флуоресценции IgG-FITC по сравнению с взаимным расположением наночастиц в пленке серебра. Разница в относительной концентрации IgG-FITC для различных пленок серебра, по данным иммуноферментного анализа, не превышает 18 %. По этой причине увеличение интенсивности флуоресценции метки на металлизированном планшете в 3—10 раз в зависимости от оптической плотности пленки серебра связано преимущественно с плазмонным эффектом. В пользу плазмон-резонансного взаимодействия флуорофора с наночастицами серебра пленки свидетельствуют также семикратное снижение среднего времени жизни возбужденного состояния IgG-FITC в присутствии плазмонных наночастиц, повышение эффективности возбуждения флуоресценции IgG-FITC в области расположения плазмонной полосы 420—430 нм, значительное уменьшение полуширины спектров флуоресценции. Полученные результаты перспективны для повышения чувствительности иммунофлуоресцентного анализа и создания приборов и методов экспресс-количественной иммунодиагностики.

Международный экологический институт имени Сахарова БГУ благодарит за финансовую поддержку Республиканский фонд фундаментальных исследований (проект № Ф22ТУРЦ-007).

Авторы признательны П. В. Карпач, И. Ф. Свекло за помощь в получении АСМ-изображений и С. Н. Гилевичу за синтез конъюгатов IgG-FITC.

- [1] J. R. Lakowicz, J. Malicka, S. D'Auria, I. Gryczynski. *Anal. Biochem.*, **320** (2003) 13—20
- [2] О. С. Кулакович, Н. Д. Стрекаль, М. В. Артемьев, А. П. Ступак, С. А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **73** (2006) 797—800 [O. S. Kulakovich, N. D. Strekal', M. V. Artem'ev, A. P. Stupak, S. A. Maskevich, S. V. Gaponenko. *J. Appl. Spectr.*, **73** (2006) 892—896]
- [3] K. Kneipp. *Phys. Today*, **60** (2007) 40—46
- [4] M. I. Stockman. *Phys. Today*, **64** (2011) 39—44
- [5] A. Steinbrück, A. Csaki, W. Fritzsche. *Rev. Plasmon.*, Ed. Geddes, **2010** (2012) 1—38
- [6] N. D. Strekal, S. A. Maskevich. *Rev. Plasmon.*, Ed. Geddes, **2010** (2012) 283—302
- [7] А. А. Романенко, С. В. Ващенко, В. В. Станкевич, А. Я. Луневич, Ю. Ф. Глухов, С. В. Гапоненко. *Журн. прикл. спектр.*, **81** (2014) 228—232 [A. A. Ramanenka, S. V. Vaschenko, V. V. Stankovich, A. Y. Luneyich, Y. F. Glukhov, S. V. Gaponenko. *J. Appl. Spectr.*, **81** (2014) 228—232]
- [8] J. Luan, A. Seth, R. Gupta, Zh. Wang, P. Rathi, S. Cao, H. Gh. Derami, R. Tang, B. Xu, S. Achilefu, J. J. Morrissey, S. Singamaneni. *Nat. Biomed. Eng.*, **4** (2020) 518—530
- [9] В. Ф. Аскирка, Д. В. Гузатов, С. А. Маскевич. *Опт. и спектр.*, **129** (2021) 223—231 [V. Askirka, D. V. Guzatov, S. A. Maskevich. *Opt. and Spectr.*, **129** (2021) 261—269]
- [10] M. Wang, M. Wang, G. Zheng, D. Zhenxiang, M. Yongqing. *Nanoscale Adv.*, **3** (2021) 2448—2465

- [11] D. V. Guzatov, S. V. Vaschenko, V. V. Stankevich, A. Ya. Lunevich, Y. F. Glukhov, S. V. Gaponenko. *J. Phys. Chem. C*, **116** (2012) 10723—10733
- [12] A. Muravitskaya, O. Kulakovich, P. M. Adam, S. Gaponenko. *Phys. Status Solidi (b)*, **255** (2018) 1700491
- [13] S. Vaschenko, A. Ramanenka, O. Kulakovich, A. Muravitskaya, D. Guzatov, A. Lunevich, A. Ya. Lunevich, Y. F. Glukhov, S. Gaponenko. *Proc. Eng.*, **140** (2016) 57—66
- [14] И. В. Коктыш, Я. И. Мельникова, О. С. Кулакович, А. А. Романенко, С. В. Ващенко, А. О. Муравицкая, С. В. Гапоненко, С. А. Маскевич. *Журн. прикл. спектр.*, **87** (2020) 808—815
- [15] I. V. Koktysh, Ya. I. Melnikova, O. S. Kulakovich, A. A. Ramanenka, S. V. Vaschenko, A. O. Muravitskaya, S. V. Gaponenko, S. A. Maskevich. *J. Appl. Spectr.*, **87** (2020) 870—876]
- [16] Ch. Wang, X. Wang, Ch. Li, X. Xu, W. Ye, G. Qiu, D. Wang. *Talanta*, **222** (2021) 121544
- [17] R. Knoblauch, C. D. Geddes. *Nanoscale*, **11** (2019) 4337—4344
- [18] K. Aslan, P. Holley, C. D. Geddes. *J. Immunol. Methods*, **312** (2006) 137—147
- [19] R. I. Nooney, O. Stranik, C. McDonagh, B. D. MacCraith. *Langmuir*, **24** (2008) 11261—11267
- [20] G. Hawa, L. Sonnleitner, A. Missbichler, A. Prinz, G. Bauer, C. Mauracher. *Anal. Biochem.*, **549** (2018) 39—44
- [21] J. Luan, J. J. Morrissey, Z. Wang, H. Gh. Derami, K. K. Liu, S. Cao, Q. Jiang, C. Wang, E. D. Kharasch, R. R. Naik, S. Singamaneni. *Light Sci. Appl.*, **7** (2018) 1—13
- [22] R. Gill, E. C. Le Ru. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13** (2011) 16366—16372
- [23] V. V. Klimov, D. V. Guzatov. *Quantum Electron.*, **37** (2007) 209—230
- [24] P. C. Lee, D. Meisel. *J. Phys. Chem.*, **86** (1982) 3391—3395
- [25] J. M. Gorham, A. B. Rohlfing, K. A. Lippa, R. I. MacCuspie, A. Hemmati, R. D. Holbrook. *J. Nanopart. Res.*, **16** (2014) 2339
- [26] D. V. Guzatov, S. V. Gaponenko, H. V. Demir. *Z. Phys. Chem.*, **232** (2018) 1431—1441
- [27] Q. Su, Ch. Jiang, D. Gou, Y. Long. *ACS Appl. Bio Mater.*, **4** (2021) 4684—4705
- [28] K. Sokolov, G. Chumanov, T. M. Cotton. *Anal. Chem.*, **70** (1998) 3898—3905
- [29] O. Kulakovich, N. Strekal, M. Artemyev, A. Stupak, S. Maskevich, S. Gaponenko. *Nanotechnology*, **17** (2006) 5201—5206
- [30] A. L. Feng, M. L. You, L. Tian, S. Singamaneni, M. Liu, Zh. Duan, T. J. Lu, F. Xu, M. Lin. *Sci. Rep.*, **5** (2015) 7779
- [31] B. Ф. Аскирка, И. Г. Мотевич, С. А. Маскевич, Н. Д. Стрекаль. Докл. НАН Беларуси, **63** (2019) 29—36 [V. F. Askirkha, I. G. Motovich, S. A. Maskevich, N. D. Strekal. Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus, **63** (2019) 29—36]
- [32] O. Soltwedel, O. Ivanova, M. Hohne, M. Gopinadhan, Ch. A. Helm. *Langmuir*, **26** (2010) 15219—15228
- [33] S. V. Gaponenko. *Introduction to Nanophotonics*, Cambridge University Press, Cambridge UK (2010)