



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA

Anželika Damaškaitė

Pagrindinių studijų programa Chemija
Magistro studijų baigiamasis darbas

POLIDOPAMINO TAIKYMAS BIOLOGINIUOSE JUTIKLIUOSE

Darbo vadovas
dr. Anton Popov

(leidimas ginti, data, parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

Vilnius 2020



VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

Anželika Damaškaitė
Study programme Chemistry
Master thesis

APPLICATION OF POLYDOPAMINE IN BIOLOGICAL SENSORS

Scientific adviser
dr. Anton Popov

(permission to defend, date, signature)

Date of submission _____
Registration No. _____

Vilnius 2020

TURINYS

IVADAS.....	4
1. LITERATŪRINĖ DALIS.....	6
1.1. Polidopaminas.....	6
1.1.1. Polidopamino cheminės ir fizikinės savybės.....	6
1.1.2. Polidopamino sintezės metodai.....	7
1.1.3. Biomolekulių imobilizavimas ant polidopaminu modifikuotų paviršių.....	8
1.1.4. Polidopamino taikymas biologiniuose jutikliuose.....	9
1.1.5. Polidopamino kartu su cinko oksido nanostruktūromis taikymo sritys.....	10
1.2. Cinko oksidas.....	11
1.2.1. Cinko oksidas: savybės, sintezė ir taikymas.....	11
1.2.2. Cinko oksido nanostruktūros.....	12
1.2.2.1. Cinko oksido nanostruktūrų cheminės ir fizikinės savybės.....	12
1.2.2.2. Fluorescencija.....	13
1.2.2.3. Cinko oksido nanostruktūrų sintezės metodai.....	13
1.2.2.4. Cinko oksido nanostruktūrų taikymas biologiniuose jutikliuose.....	14
2. EKSPERIMENTO METODIKA.....	16
2.1. Medžiagos ir reagentai.....	16
2.2. Priemonės ir prietaisai.....	18
2.3. Programinė įranga.....	18
2.4. Polidopamino ir cinko oksido sluoksnių sintezės metodika.....	18
2.5. Susintetintų sluoksnių charakterizavimo metodika.....	18
2.6. Elektrocheminių matavimų metodika.....	19
2.7. Biomolekulių imobilizavimo metodika.....	19
2.7.1. Jaučio serumo albumino imobilizavimas.....	19
2.7.2. Kovalentinis jaučio serumo albumino imobilizavimas.....	19
2.7.3. Jaučio serumo albumino imobilizavimas naudojant glutaro aldehydą.....	20
2.7.4. Antikūnų užnešimas.....	20
2.8. Baltymų koncentracijos nustatymo metodika.....	20
3. EKSPERIMENTINĖ DALIS.....	22
3.1. Susintetintų polidopamino ir cinko oksido sluoksnių tyrimai.....	22
3.2. Biomolekulių imobilizavimo tyrimai.....	24
IŠVADOS.....	33
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	34
SANTRAUKA.....	38
SUMMARY.....	39

ĮVADAS

Per pastaruosius kelis dešimtmečius nanotechnologijos paskatino mokslo ir technologijų plėtrą. Jūrinių midijų baltymų, pasižyminčių adhezinėmis savybėmis, nagrinėjimas įkvėpė mokslininkus atrasti polidopaminą (PDA). Kaip ir jūrinių midijų baltymų taip ir polidopamino struktūroje aptinkamos katecholinės ir amino grupės. Šių grupių kombinacija lemia stiprią adheziją prie įvairių paviršių. PDA gali būti taikomas paviršių dengimui ir tai susiję ne tik su stiprios adhezijos savybe, bet taip pat ir pačios medžiagos pigumu, dengimo proceso paprastumu bei lengvai kontroliuojamomis dengimo sąlygomis. PDA danga yra gaunama dopamino savaiminės polimerizacijos metu ir nors šiuo metu reakcijos mechanizmas iki galo nėra žinomas, mokslininkai tikisi artimiausiu metu išsiaiškinti tikslų mechanizmą ir galbūt dar labiau praplėsti taikymo galimybes [1]. Šiuo metu, be paviršių dengimo, PDA taip pat taikomas vaistų pernašoje, kadangi PDA nanodalelių paviršių galima lengvai modifikuoti prijungiant vaistų molekules, o pats PDA yra biosuderinamas su organizmo ląstelėmis [2]. PDA paviršiuje galima lengvai imobilizuoti įvairius baltymus, pvz., antikūnus ir sukurti atrankų bei pasižymintį greitu aptikimu imuninį jutiklį [3].

Dėl nanotechnologijų plėtros padidėjo ne tik PDA taikymas, bet taip pat daugelyje pramonės sričių pradėjo didėti metalų oksidų nanodalelių taikymo atvejų. Iš daugybės skirtingų metalų daugiausiai dėmesio patraukė cinkas, pasižymintis stipriu redukciniu potencialu, vidutiniu aktyvumu bei turintis penkis stabilus izotopus. Nors gali būti įvairių nanostruktūrinių cinko darinių, pvz., sulfidai, feritai, fosfidai, selenidai ar teluridai, plačiausiai taikomos cinko oksido nanodalelės (ZnO ND), kurios yra biologiškai suderinamos su žmogaus ląstelėmis. Nors jų citotoksiškumas dar iki galo nėra ištirtas, jau yra žinoma, kad vėžinėms ląstelėms ZnO ND yra toksiškos, kuomet tokios pačios šių dalelių koncentracijos poveikis sveikoms žmogaus ląstelėms yra nereikšmingas, todėl yra galimybė naudoti ZnO ND gydant vėžinius susirgimus [4]. Kita svarbi ZnO ND savybė, dėl kurios jos plačiai taikomos medicinoje yra antibakterinis ir dezinfekuojantis poveikis, todėl jos naudojamos dermatologinėse priemonėse nuo uždegimų ir niežulio, taip pat ZnO ND pagreitina žaizdų gijimą. Kadangi ZnO ND absorbuoja ultravioletinę (UV) spinduliuotę jos yra naudojamos gaminant kremus nuo saulės bei tekstilės pramonėje kuriant savaime išsivalančius, vandeniui atsparius ir UV bangas nepraleidžiančius drabužius. Tokie drabužiai labai pravestų, pvz., kariuomenėje, kur drabužiai labai greitai išsitepia, o galimybės juos išsiplauti kartais nebūna. Dar viena ZnO ND pritaikymo galimybė yra elektronikos pramonė. Dėl plačios draustinių energijų juostos ir stiprios ryšio energijos ZnO ND naudojamos fotoelektronikos įrenginiuose, įrenginiuose emituojančiuose paviršines akustines bangas, įvairiuose jutikliuose, UV lazeriuose bei saulės elementuose, o dėl liuminescencinių savybių jos pritaikomos televizorių gamyboje [5]. ZnO ND turi aukštą izoelektrinę tašką, todėl tinka baltymų imobilizavimui kuriant biologinius jutiklius, taip pat ZnO ND naudojimas kuriant biojutiklius užtikrina didelį jutiklio paviršiaus plotą, didelį stabilumą, biosuderinamumą bei pagerina elektronų pernašos savybes. Naudojant biojutiklius su ZnO ND galima nustatinėti tokias medžiagas kaip cholesterolis, gliukozė, kortizolis, vandenilio peroksidas, glutamatas ir kt. Derinant ZnO ND naudojimą su polimerais kuriami fermentiniai biojutikliai, kuriuose užtikrinama tiesioginė elektronų pernaša tarp elektrodo ir fermento aktyvaus centro, o tai pagerina amperometrinių matavimų rezultatus [6].

Darbo tikslas: Sukonstruoti elektrocheminį imuninį jutiklį tinkamą antikūnų prieš jaučio serumo albuminą nustatymui, panaudojant polidopaminą jaučio serumo albumino imobilizavimui jutiklio paviršiuje.

Darbo uždaviniai:

1. Susintetinti bei ištirti ZnO nanostrypus ITO dengto stiklo paviršiuje.
2. Atlikti jaučio serumo albumino imobilizaciją skirtingais būdais ant ITO dengto stiklo per polidopamino sluoksnį.
3. Ištirti sukonstruotų imuninių jutiklių veikimą bei gebėjimą nustatyti specifinius antikūnus.

1. LITERATŪRINĖ DALIS

1.1. Polidopaminas

1.1.1. Polidopamino cheminės ir fizikinės savybės

Polidopamino cheminė sudėtis ir molekulinė struktūra yra panaši į gerai žinomą eumelaniną. Taigi ir fizinės PDA savybės iš esmės sutampa su natūraliai gamtoje aptinkamo eumelanino savybėmis. Eumelaninas pasižymi plačią absorbcijos juostą ultravioletinėje ir regimosios šviesos srityse, o daugiau nei 99 % absorbuotų fotonų energijos yra paverčiama šiluma. Tokia plati absorbcijos juosta ir aukšta fototerminė konversija apsaugo žmones ir gyvūnus nuo ultravioletinės spinduliuotės poveikio. PDA, kaip pagrindinio eumelanino pigmento, absorbcijos savybės yra panašios, todėl dėl stiprios ultravioletinių bangų absorbcijos polidopaminas pasižymi panašiu fotoapsauginiu efektu kaip eumelaninas. Absorbcija ultravioletinėje srityje yra aiškinama dopamino oksidacijos reakcija iki dopachromo ir dopaindolo, o sugertis besitęsianti nuo regimosios šviesos srities iki artimosios infraraudonosios šviesos srities yra nulemta savaiminės polimerizacijos procesu. Aukščiau minėtų reakcijų metu susidarantys junginiai turi skirtingas energijos juostas tarp HOMO ir LUMO orbitalių UV, RŠ ir artimojoje IR srityse, kas ir nulemia platų absorbcijos spektrą. Žadinant PDA ultravioletine spinduliuote pasireiškia silpna fluorescencija, kurios maksimumas yra ties 400 – 550 nm bangos ilgiu, o pats spinduliavimas priklauso nuo sužadavimo bangos ilgio. Toks, nuo sužadavimo priklausantis, spinduliavimas gali būti paaiškintas tuo pačiu, aukščiau aprašytu, principu, pagal kurį skirtingi komponentai turi skirtingas sužadavimo energijas ir skirtingą kvantinę išeią.

PDA struktūroje yra aptinkamos katecholinės, amino bei imino funkcinės grupės. Per šias funkcinės grupes gali būti imobilizuotos biomolekulės arba pats polidopaminas gali jungtis prie biomolekulių ar metalų paviršių. Tikslus polidopamino jungimosi prie kitų paviršių mechanizmas iki šiol nėra žinomas. Vienas iš galimų polidopamino adhezijos prie organinių paviršių mechanizmų remiasi katecholinių grupių oksidacija iki chinonų šarminėje terpėje ir kovalentinių ryšių sudarymas per arilo grupes. Su metalais arba metalų oksidais polidopaminas gali sudaryti chelatinis kompleksus arba jungtis sudarant koordinacinę ryšį, kuris susidaro dalyvaujant katecholinėms polidopamino grupėms. Daugiavalenciai metalų jonai gali prisijungti prie skirtingų polidopamino funkcinų grupių priklausomai nuo terpės pH. Skirtingas pH aktyvuoja skirtingas polidopamino funkcinės grupes, pvz., kai $\text{pH} < 5$, aktyvuojamos karboksilo grupės, kai $\text{pH} \approx 7$, aktyvuojamos fenolio hidroksilo grupės, o esant didesniai pH metalų jonai prijungiami per azoto ligandus [7].

Dopamino savaiminės polimerizacijos metu vandeninėje terpėje sukuriamas hidrofiliškas ir biosuderinamas polimeras, kuriuo galima padengti bet kokį paviršių, pradedant nanodalelėmis ir baigiant makroskopinių dydžių objektais, arba panaudoti molekulių išpaudų technologijose. Pirmą kartą PDA buvo pritaikytas molekulių išpaudais modifikuotuose jutikliuose nikotino nustatymui, o vėliau buvo pritaikytas įvairių baltymų ir virusų aptikimui dėl to, kad sintetinamas vandeninėje terpėje, kuri, skirtingai negu organiniai tirpikliai, nesumažina biomolekulių aktyvumo [8]. PDA dengti paviršiai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis, priklausomai nuo PDA dangos morfologijos, o paviršiaus morfologija priklauso nuo paruošimo sąlygų, ypač nuo to, koks tirpalas buvo naudojamas ruošiant dangą. Atliktų tyrimų duomenimis geriausiomis antimikrobinėmis savybėmis pasižymi danga ruošta

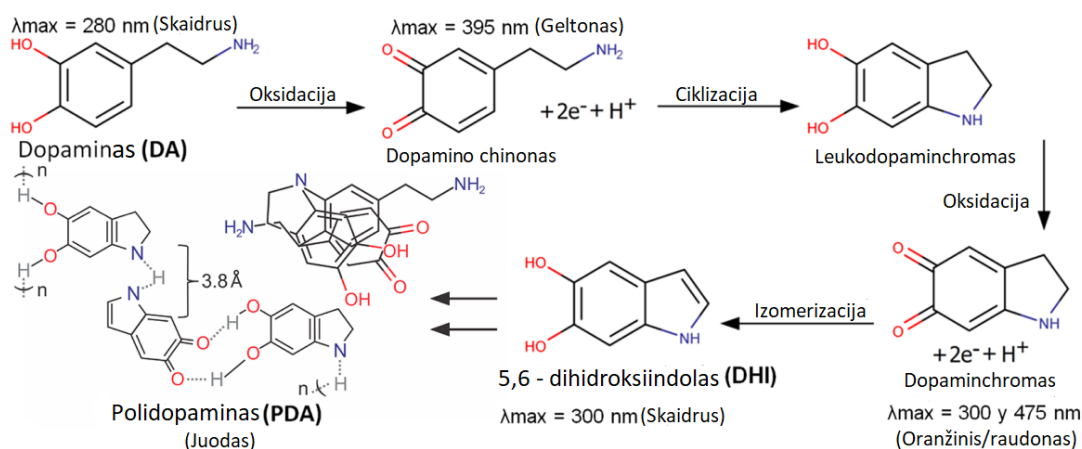
tris(hidroksimetil)aminometano (Tris) buferyje, o PDA danga ruošta natrio hidrokarbonato tirpale beveik nepasižymi tokiomis savybėmis. Sintetinant PDA Tris buferyje, į PDA sluoksnį kovalentiškai įsiterpia Tris buferio molekulės, kas sukelia PDA dalelių dydžio padidėjimą dėl agregacijos bei sumažina paviršiaus šiurkštumą. Susidariusiame paviršiuje atsiranda nukleofilinės – OH grupės, kurios atstumia neigiamai įkrautas bakterijas, tokias kaip, pvz., *E. coli*. Taigi, tinkamai paruošti polidopamino sluoksniai gali būti pritaikyti, pvz., žaizdų gydymui [9].

Nuo naudojamų buferinių tirpalų priklauso biomolekulių imobilizavimas ant PDA sluoksnio. Elektrocheminio impedanso spektroskopijos (EIS) metodu buvo tirta jaučio serumo albumino (JSA) imobilizacija ant PDA sluoksnio naudojant Tris bei fosfatinius buferius (PBS). Kai JSA ant PDA sluoksnio imobilizuojamas PBS buferyje, pasidengia visas polidopamino paviršius. Jeigu imobilizuojame JSA molekules naudojant Tris buferį, tai ne visas polidopamino paviršius pasidengia JSA. Taip yra dėl kovalentinio Tris buferio įsiterpimo į polidopamino sluoksnį, kuris užima JSA rišančias vietas. EIS tyrimas parodė, kad naudojant Tris buferį PDA sluoksnio varža yra mažesnė, lyginant su varža, kai naudojamas PBS buferis, ir tą lemia dėl neužbaigtos polimerizacijos atsiradusios chinonų funkcinės grupės, galinčios pernešti elektronus. Naudojant PBS buferį dopamino polimerizacija vyksta iki galo ir sumažėja elektronų pernešančių funkcinių grupių skaičius, ką įrodo EIS tyrimo metu stebima padidėjusi varža. Taigi, PBS buferis palengviną jaučio serumo albumino molekulių imobilizaciją, o norint blokuoti JSA jungiančias sritis galima naudoti Tris buferį [10].

1.1.2. Polidopamino sintezės metodai

Dopaminas (DA) yra neurotransmiteris, kuris gali formuoti plonus polidopamino sluoksnius savaiminės polimerizacijos būdu šarminėje terpėje ant įvairių paviršių, pvz., nanodalelių. Tokiu būdu galima susintetinti PDA dengtas silicio nanodaleles su jaučio hemoglobino (JHb) įspaudais. Tokioms nanodalelėms paruošti JHb yra ištirpinamas Tris buferyje su silicio nanodalelėmis ir visas tirpalas maišomas kambario temperatūroje 3 valandas. Po to pridedama dopamino ir tirpalas inkubuojamas 12 valandų. Po reakcijos silicio nanodalelės su įspaustomis JHb molekulėmis surenkamos centrifuguojant ir plaunamos dejonizuotu vandeniu siekiant pašalinti nesureagavusius monomerus. Vėliau pašalinamas šablonas, naudotas įspaudams formuoti, o pačios dalelės užšaldomos tolimesniam naudojimui [11].

PDA galima susintetinti dopamino cheminės oksidacijos metu naudojant įvairius oksidatorius, pvz., amonio persulfatą, deguonį ar natrio perkarbonatą buferiniuose tirpaluose. PDA sluoksnio storis ant paviršiaus priklauso nuo dopamino koncentracijos bei polimerizacijos laiko. Kitas svarbus parametras yra pH, kadangi dopaminchromas – tarpinis produktas susidarantis vykstant pirmam polimerizacijos etapui – yra linkęs susidaryti esant šarminiam pH. Vykstant dopamino oksidacijai matomas spalvos pokytis nuo bespalvio iki tamsiai rudo, kas rodo įvairių dopaminchromo formų susidarymą. Tolimesnės oksidacijos metu susidaro dopamino chinonas, kuris intramolekulinės ciklizacijos metu virsta leukodopaminchromu, o toliau oksiduojamas reorganizuojasi į 5, 6 – dihidroksiindolą, kuris yra pagrindinis polidopamino struktūros blokas [12].



1 pav. Dopamino polimerizacijos schema [12].

Oksiduojančiomis sąlygomis PDA galima susintetinti panaudojant cheminį garų nusodinimą ant stiklo substrato. Prieš sintezę dopamino hidrokloridas per naktį išdžiovinamas aukštoje temperatūroje esant kalcio hidrido, tam, kad būtų pašalinta drėgmė. Reakcija vykdoma vamzdinėje krosnyje esant 300 °C temperatūrai azoto atmosferoje, oksidatoriais naudojant koncentruotą sieros rūgštį ir labai gryną natrio sulfatą. Reakcijos laiką galima reguliuoti priklausomai nuo to, kokio storio sluoksnį norime gauti [13].

Aukščiau aprašytas oksidacijos procesas kuomet iš dopamino susidaro PDA per kelias tarpines stadijas vyksta ir tuomet, kai atliekama elektrocheminė sintezė. Elektrochemiškai sintetinant PDA galima pasirinkti potencialų ruožą nuo -0,6 V iki +0,8 V. Sintezė gali būti atliekama įvairiais greičiais, o sluoksnio storis priklauso nuo pasirinkto ciklų skaičiaus. Šis metodas leidžia ne tik susintetinti PDA sluoksnį, bet taip pat iš ciklinėse voltamperogramose matomų oksidacijos – redukcijos smailių matyti, kaip vyksta pati sintezė [14].

1.1.3. Biomolekulių imobilizavimas ant polidopaminu modifikuotų paviršių

Biomolekulių imobilizavimas paviršiuje yra svarbus daugelyje sričių, tokių kaip ląstelės ir molekulinė biologija, analizinė chemija bei tarpdisciplininiuose srityse, tokiose kaip medicininė diagnostika ir bioprocesų inžinerija. Yra įvairios imobilizavimo strategijos, tokios kaip, pavyzdžiui kovalentinio ar nekovalentinio imobilizavimo metodai. Prie nekovalentinių metodų priskiriami adsorbicija ir afininė imobilizacija. Labiausiai žinomi tokio imobilizavimo pavyzdžiai yra avidino – biotino sąveika ar DNR sąveikos. Kovalentiniam imobilizavimui dažnai reikalingos pagalbinės medžiagos, pvz., N-hidroksisukcinimidas (NHS) ar maleimidas, dalyvaujančios konjugacijos reakcijose tarp aktyvių funkcinių grupių [15].

Biomolekulės ant PDA sluoksnio gali būti imobilizuotos per tiolius ar aminus Šifo bazių reakcijos metu. Tokios imobilizacijos pavyzdys gali būti JSA baltymo imobilizavimas ant polidopamino paviršiaus per amino grupę esančią JSA baltymo polipeptidinės grandinės pabaigoje [16]. Dar vienas pavyzdys yra fermento – gliukozės oksidazės – imobilizavimas PDA modifikuotu grafeno oksido paviršiuje. Grafeno

oksidas buvo modifikuojamas PDA elektrostatinės sąveikos pagalba: esant pH 8,5 teigiamai įkrautas dopaminas lengvai pritraukia neigiamai įkrautą grafeno oksidą. Vėliau šarminėje terpėje vyksta savaiminė dopamino polimerizacija ir formuojasi PDA sluoksnis dengiantis grafeno oksido paviršių, o gliukozės oksidazė per amino grupes Šifo bazių reakcijos metu yra absorbuojama PDA sluoksnyje esančių chinono grupių [17].

Baltymų sąveikai su PDA paviršiumi įtakos turi polidopamino sluoksnio paruošimos sąlygos. Kaip jos įtakoja baltymų imobilizaciją galima nustatyti paviršiaus plazmonų rezonanso metodu. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad PDA sluoksniai susintetinti esant aukštesniam pH pasižymėjo geresne talpa baltymų imobilizavimui. Ar daugiau ar mažiau baltymų gali imobilizuoti sluoksnis priklauso ir nuo PDA nusodinimui naudojamo buferinio tirpalo, pvz., vykdant imobilizaciją ant sluoksnio nusodinto Tris buferyje imobilizuojama daugiau baltymų lyginant su PBS buferiu. Tačiau didinant baltymų koncentraciją pastebimas pokytis: daugiau baltymų imobilizuojasi kai naudojamas sluoksnis nusodintas PB buferyje. Tą galima paaiškinti tuo, kad specifinių sričių kiekis PDA sluoksnyje nusodintame PB buferyje yra didesnis negu sluoksnyje nusodintame Tris buferyje [18].

1.1.4. Polidopamino taikymas biologiniuose jutikliuose

PDA gali būti pritaikytas imunoanalizėje, pavyzdžiui, egzosomų tyrimui. Egzosomos tai 30 – 150 nm skersmens pūslelės, kurias išskiria dauguma eukariotinių ląstelių. Jos vaidina svarbų vaidmenį daugelyje ląstelių procesų, tokių kaip ląstelių komunikacija ir imuninis atsakas. Egzosomų tyrimas gali būti naudingas ankstyvai onkologinių ligų detekcijai, tačiau tokie metodai kaip Western blot ar imunofermentinė analizė reikalauja didelio mėginio kiekio, analizės procesas yra ilgas ir nepasižymi dideliu jautrumu. Palengvinti egzosomų tyrimus gali mikrofluidinė technologija, pagrįsta sąsaja tarp grafeno oksido ir PDA, kuri padidina nustatymo efektyvumą ir efektyviai slopina nespecifinę egzosomų adsorbciją. Tokia sistema gali būti pritaikyta imunofermentinės analizės testuose pagerinant jos jautrumą ir specifiškumą [19]. PDA panaudojimas padeda net tik pagerinti imuninių jutiklių savybes, bet taip pat ir praplėsti jų taikymo galimybes dėl savo struktūrinių savybių, kurios leidžia prijungti įvairias tiek neorganines, tiek organines medžiagas [20].

Dėl PDA sluoksnio paruošimo paprastumo, puikių regeneracinių savybių ir didelio specifiškumo, jis gali būti panaudotas biomolekulių tarpusavio sąveikos tyrimams, pvz., tiriant baltymų sąveikos kinetiką kvarco kristalo mikrogravimetrijos (KKM) metodu. Ant KKM jutiklio lusto savaiminės dopamino polimerizacijos būdu suformuojamas PDA sluoksnis, kuriame Šifo bazių reakcijos metu imobilizuojami antikūnai. Palyginimui paruošiamas dar vienas KKM jutiklio lustas, kurio paviršius yra karboksilintas, o antikūnai prijungiami per amino grupes. Tyrimas vykdomas PBS buferyje, pridėdam tam tikrą kiekį antigeno ir realiu laiku stebint jo sąveiką su antikūnu. Po sąveikos paviršius regeneruojamas ir regeneracija taip pat stebima realiu laiku. Tyrimų rezultatai gauti naudojant lustą su PDA stipriai koreliuoja su rezultatais, gautais naudojant lustą su karboksilintu paviršiumi ir tai rodo, kad polidopaminas gali būti sėkmingai pritaikytas kvarco kristalo mikrogravimetrijos tyrimuose, be to, jis gali palengvinti tyrimus, kadangi paviršiaus modifikavimas polidopaminu yra paprastas, neribojamas baltymo pI reikšme, o galimybė jutiklį panaudoti kelis kartus sumažina analizės savikainą [21].

Taikant polidopaminą molekulių įspaudais modifikuotų polimerų technologijose, galima sukurti sistemą atrankiam analitės nustatymui sudėtingose matricose, pvz., baltymų nustatymui realiuose

mėginiuose [22]. Molekulių įspaudais modifikuotu polidopaminu padengus magnetinių nanodalelių paviršių, padidėja dalelių gebėjimas prijungti tam tikrus baltymus. Kadangi polidopaminas turi molekulių įspaudus, skirtus atpažinti tam tikrus baltymus, tai tokių nanodalelių pagalba galima nustatyti, pvz., vieną baltymą baltymų mišinyje. Polidopaminu dengtų magnetinių nanodalelių giminingumas tam tikriems baltymams, leidžia jas pritaikyti, pvz., baltymų grynimui [23]. Molekulių įspaudais modifikuotu polidopaminu padengus grafeno kvantinius taškus buvo sukurtas elektrochemiliuminescencinis (ECL) jutiklis *Escherichia coli* O157:H7 patogeno nustatymui. Naudojant tokį jutiklį registruojama ECL signalo priklausomybė nuo patogeno koncentracijos, kuri išreiškiama kolonijas formuojančiais vienetais (KFV) esančiais 1 ml. Didėjant patogeno koncentracijai, ECL signalas yra sustiprinamas. Mažiausia koncentracija, kuria gali nustatyti toks jutiklis yra 8 KFV/ml, o tiesiškumo intervalas yra $10 - 10^7$ (KFV)/ml, taigi toks jutiklis pasižymi dideliu jautrumu nustatomam patogeniui. Tie patys kvantiniai taškai buvo panaudoti tyrimui su *Salmonella* bakterijomis, tačiau jos nesustiprino ECL signalo, taigi toks jutiklis taip pat pasižymi ir atrankumu [24].

Elektrochemiliuminescenciniuose tyrimuose naudojamos fluorescencinės neorganinės nanodalelės tokios kaip kvantiniai taškai, anglies nanotaškai ir tauriųjų metalų nanoklasteriai yra ne tokios efektyvios kaip organinės nanodalelės, kurios dėl savo efektyvumo, struktūrinės įvairovės, biosuderinamumo ir netoksiškumo gali įveikti neorganinių nanodalelių apribojimus. Viena iš tokių nanodalelių yra polidopamino organinė nanodalelė, kuri yra tinkamas luminoforas elektrochemiliuminescenciniams tyrimams. Be to, tokie jutikliai, kuriuose naudojamos organinės polidopamino molekulės pasižymi greitai aptikimu ir dideliu jautrumu analitėms, esančioms realiuose mėginiuose, pvz., paratiroidinui esančiam žmogaus kraujo plazmoje. Paratiroidinas tai hormonas, kurio gyvavimo trukmė yra vos kelios minutės, o normali koncentracija gali svyruoti nuo 11 iki 54 pg/ml. Naudojant jutiklį su PDA organinėmis molekulėmis galima greitai ir tiksliai nustatyti net mažas hormono koncentracijas, kadangi jo nustatymo tiesiškumo intervalas yra 0,05 – 0,8 ng/ml, o aptikimo riba yra 17 pg/ml [25].

PDA pasižymi fluorescencijos gesinimo efektu dėl fluorescencijos rezonanso energijos perdavimo. Fluorescenciniuose biojutikliuose galima naudoti metalo – organines medžiagas padengtas PDA, kuris neturi jokios neigiamos įtakos šių medžiagų savybėms. Dėl polidopamino dangos analitė negali reaguoti su metalu, esančiu metalo – organinės medžiagos struktūroje, kas leidžia sumažinti analizės netikslumus, o polidopamino funkcinės grupės, tokios kaip, pvz., amino, leidžia priartėti prie biomolekulės paviršiaus ir pagerinti fluorescencijos gesinimo efektyvumą [26].

1.1.5. Polidopamino kartu su cinko oksido nanostruktūromis taikymo sritys

Aeronautikoje, automobilių pramonėje, gaminant antikorozines dangas, bei skydus, apsaugančius nuo elektromagnetinių trukdžių naudojami epoksidiniai nanokompozitai, į kurių sudėti įvairios medžiagos, tokios kaip anglies nanovamzdeliai, grafenas, metalų oksidai ir kt. Epoksidiniai kompozitai pasižymi puikiu cheminiu ir terminiu atsparumu bei antikorozinėmis savybėmis, o į jų sudėtį įeinantis cinko oksidas padidina atsparumą ultravioletinei spinduliuotei. Tačiau cinko oksido nanodalelės gali būti linkusios aglomeruotis, todėl kartais jas reikia modifikuoti. Vienas iš modifikacijos variantų yra PDA pridėjimas gaminant nanokompozitą. Modifikuojant PDA pasiekama gera cinko oksido nanodalelių dispersija ir taip pagerinamos jo mechaninės ir terminės savybės nepažeidžiant fluorescencijos savybių [27].

Impregnuojant cinko oksido nanodaleles ant medvilninių audinių paviršiaus galima sukurti superhidrofobiškus, savaimę nusivalančius, antimikrobinius ir apsaugotus nuo UV spinduliuotės audinius. Plačiausiai paplitęs tokių audinių kūrimo metodas yra nanodalelių dispersija paruošta hidroterminėmis sąlygomis, tačiau metode naudojama aukšta temperatūra gali pažeisti patį audinį. Šią problemą padeda išspręsti polidopaminas. Oksiduojančiomis sąlygomis dopaminas yra polimerizuojamas ant audinio paviršiaus, o vėliau hidroterminiu metodu, tačiau jau žemesnėje temperatūroje, ant polidopamino auginamos cinko oksido nanodalelės. Tokiu būdu nepažeidžiant paties audinio yra paruošiama patvari, visas savybes išsaugojusi danga [28].

Laboratoriniuose tyrimuose naudojant fotoelektrocheminį imunojutiklį galima stebėti imuninio komplekso susidarymą. Pagrindiniai reikalavimai, keliami tokiam jutikliui, yra gebėjimas atpažinti specifinę analitę analizuojamame tirpale ir analizinio signalo pavertimas išmatuojamu dydžiu. Didelę įtaką analizės kokybei daro nespecifinės sąveikos registravimas, todėl labai svarbu tinkamai paruošti su analite sąveikaujantį paviršių, kad būtų sumažinta nespecifinė sąveika. Kaip n-tipo puslaidininkis, ant FTO stiklo susintetintas cinko oksido nanostruktūrų sluoksnis, yra tinkamas naudoti fotoelektrocheminiuose jutikliuose. Taip pat cinko oksido nanostruktūrų sluoksnis gali būti padengtas polidopaminu, kuris ne tik pagerina jautrumą srovės stiprio pokyčiams, bet taip pat yra naudojamas biomolekulių imobilizavimui ir nespecifinės sąveikos sumažinimui. Dėl polidopamino specifiškumo šis jutiklis yra jautrus analitėms esančioms sudėtingoje, pavyzdžiui, pieno matricoje [29].

1.2. Cinko oksidas

1.2.1. Cinko oksidas: savybės, sintezė ir taikymas

Pastaruoju metu cinko oksidui skiriamas didelis dėmesys dėl jo pranašumų prieš kitus puslaidininkius, tokius kaip, pvz., GaN. Išskirtinė cinko oksido savybė yra didelė draustinė energijos juosta, kuri yra maždaug 3,23 eV, kuomet GaN ji yra tik 2,25 eV [30]. Cinko oksido kristalai gali turėti tris struktūras: kubinę, sfalerito ir viurcito. Dėl viurcito kristalo anizotropijos cinko oksidas pasižymi tiek nepoliniu tiek poliniu paviršiumi. Kai kristalo gardelės galuose yra vienodas Zn ir O atomų skaičius, kristalas pasižymi nepolinėmis savybėmis. Kai kristalo gardelės galuose yra nevienodas Zn ir O atomų skaičius, kristalas pasižymi polinėmis savybėmis. Tokie paviršiaus skirtumai mažina kristalo paviršiaus energiją, nes Zn gali adsorbuoti –OH grupes, o O gali adsorbuoti –H grupes. Skirtingo poliškumo paviršiai skirtingai reaguos su organinėmis molekulėmis, taip pat struktūriniai skirtumai gali turėti įtakos elektroninėms savybėms. Norint pakeisti paviršiaus energiją arba patį paviršių, atliekamos modifikacijos, pvz., į kristalą įterpiami kiti elementai, pvz., Al, Ga, In, Cl, Cd ar Mg [31]. Norint žymiai padidinti specifinį paviršiaus plotą galima panaudoti didesnę mangano kiekį [32].

Cinko oksido milteliai gali būti susintetinti skirtingais metodais, pvz., druskų, turinčio cinko, skilimo metu, zolių – gelių metodu, nusodinimo metodu, cheminių garų pernešimo metodu ir pan. Daugumai šių metodų reikalinga aukšta temperatūra, kurios pagalba formuojami kontroliuojamos formos ir dydžio cinko oksido miltelių agregatai [33]. Neretai cinko oksido sintezei yra naudojami hidroterminis arba solvoterminis metodai. Hidroterminės sintezės metu cinko oksidas sintetinamas iš metalo druskų, hidroksidų ar miltelių ištirpintų vandenyje esant 100 – 300 °C temperatūrai ir 100 MPa slėgiui. Tokios ekstremalios sąlygos leidžia gauti cinko oksidą, ko negalėtume padaryti normaliomis sąlygomis. Šis

metodas yra gana paprastas ir pigus, tačiau yra sunku kontroliuoti susidarančias daleles. Solvoterminės sintezės metu vanduo kaip tirpiklis nėra naudojamas. Šis metodas naudojamas, kai reikalinga dalelių dydžių ir formos kontrolė bei norima išvengti priešlaikinės aglomeracijos, tačiau yra ekonomiškai nepalankus dėl naudojamų organinių tirpiklių [33, 34].

Cinko oksidas pasižymi pjezoelektrinėmis savybėmis. Pjezoelektrinių medžiagų paviršiuje sklindančios paviršinės akustinės bangos yra lydimos elektrinio lauko ir tai sudaro galimybę kurti elektrinį signalą apdorojančius prietaisus tokius kaip osciliatorius, kurie plačiai naudojami telekomunikacijose. Tai yra viena iš cinko oksido panaudojimo sričių. Kadangi pjezoelektrikas yra jautrus temperatūros, slėgio ar masės pokyčiams, jį galima pritaikyti kuriant biojutiklius, kuriuose funkcionalizuotas paviršius sudaro ryšius su specifinėmis molekulėmis, dėl ko atsiranda masės pokytis paviršiuje. Cinko oksidas yra mažiau jautrus radiacijos poveikiui negu kitos, panašių savybių turinčios medžiagos, kas įgalina jo pritaikymą kosmoso pramonėje [35]. Cinko oksidas pasižymi dideliu kvantiniu efektyvumu trumpųjų bangų regione, todėl yra tinkama medžiaga scintiliatoriams, t.y. medžiagoms, kurios jonizuojamos skleidžia šviesos blyksnius. Palyginus, scintiliatoriaus su cinko oksidu liuminescencijos gyvavimo trukmė yra apie 1 ns, kuomet scintiliatoriaus, pagaminto iš itrio aliuminio oksido su cerio intarpais, liuminescencijos gyvavimo trukmė yra net 50 ns. Trumpa gyvavimo trukmė yra svarbi norint charakterizuoti ultragreituosius šviesos šaltinius, naudojamus ekstremalioje ultravioletinėje litografijoje arba atliekant eksperimentus su laisvųjų elektronų lazeriais. Kadangi cinko oksidas gali būti susintetintas naudojant skirtingas technikas, įmanoma gauti įvairių formų ir dydžių struktūras, taigi galima gauti mažo dydžio cinko oksido daleles, kurios, palyginus su dideliais kristalais, turi geresnes perspektyvas ateities optoelektronikos prietaisuose [36].

1.2.2. Cinko oksido nanostruktūros

1.2.2.1. Cinko oksido nanostruktūrų cheminės ir fizikinės savybės

Cinko oksido nanostruktūros pasižymi geru terminiu ir cheminiu stabilumu. Keičiant sintezės sąlygas galima kontroliuoti jų morfologiją bei gan lengvai atlikti paviršiaus funkcionalizavimą. ZnO nanostruktūros gali būti plačiai taikomos įvairiose srityse: fotokatalizėje, fotodetektoriuose, saulės baterijose, nanogeneratoriuose, šviesą emituojančiuose dioduose ir pan. [37, 38]. ZnO nanostruktūros turi puslaidininkinių savybių, todėl gali būti panaudotos hibridinių p – tipo organinių puslaidininkinių gamyboje [39]. Taip pat ZnO nanostruktūros gali būti pritaikytos gaminant antimikrobinius paviršius, kadangi jų paviršius yra atsparus bakterijų adhezijai [40].

ZnO nanostrypelių (ZnO NS) sintezės metu naudojant purškimo pirolizės (angl. *spray pyrolysis*) metodą bei keičiant sintezės sąlygas, galima kontroliuoti ZnO NS paviršiaus morfologiją, nuo kurios priklauso ZnO NS optinės ir elektrinės savybės, pvz., didinant substrato temperatūrą, optinis pralaidumas ir elektrinis laidumas yra sustiprinami [41]. ZnO NS sluoksnio morfologija taip pat priklauso ir nuo paties substrato, pvz., ant aukso sluoksnio sintetinti cinko oksido nanostrypeliai yra tvarkingai orientuoti ir glaudžiai išsidėstę, o nanostrypelių sintetintų ant sidabro sluoksnio paviršinis tankis yra labai mažas [42]. ZnO NS laidumas padidėja ne tik keičiant morfologiją, bet taip pat veikiant jį UV spinduliuote, kuomet užpildytos valentinės juostos elektronai yra sužadunami ir pereina į neužpildytą laidumo juostą [43].

Anizotropinės medžiagos paviršiaus išlinkimas, šiurkštumas, įvairūs defektai bei cheminiai ir fizikiniai procesai vykstantys paviršiuje gali turėti įtakos paviršiaus savybėms. Pavyzdžiui, paviršiaus defektai gali sugauti fotoelektronus, kas žymiai sumažintų energijos konversijos efektyvumą saulės baterijose. Šią ir kitas problemas gali išspręsti ZnO nanostruktūros. Nanostruktūrizuotas ZnO pasižymi dideliu paviršiaus plotu bei kitomis unikaliomis savybėmis, kas leidžia pagerinti prietaisų veikimą [44].

ZnO nanostruktūros pasižymi fotoluminescencija, kurios maksimumai gali būti ultravioletinėje ir regimosios šviesos srityse (mėlynos ir žalios spalvos bangų ilgių dalyje). Fotoluminescencija keliuose spektro vietose rodo, kad ji priklauso nuo ZnO nanostruktūrų sluoksnio paruošimo metodų ir auginimo sąlygų. Įprastai fotoluminescencijos spektras susideda iš dviejų juostų, todėl „žalioji“ fotoluminescencija yra aiškinama elektronų judėjimu iš laidumo juostos į laisvąsias cinko vietas nanokristalo struktūroje arba elektronų judėjimu iš tų laisvųjų vietų į valentinę juostą [45].

1.2.2.2. Fluorescencija

ZnO nanostruktūros pasižymi fluorescuojančiomis savybėmis, o jų fluorescencijos maksimumas stebimas ties maždaug 377 nm bangos ilgiu. Modifikuojant ZnO nanostruktūras kitomis medžiagomis, pvz., auksu, galima padidinti fluorescencijos efektyvumą [46]. Modifikuojant ZnO nanostruktūras konjuguotais polimerais galima padidinti fluorescencijos gesinimo efektyvumą [47].

Nanostruktūrizuoto ZnO panaudojimas fluorescencijai sustiprinti tiriant baltymų sąveikas parodė, kad jis yra viena iš tinkamiausių medžiagų signalo stiprinimui tiriant platų biomolekulių spektrą [48]. Kuriant naujus vaistus ar nustatant ligą ankstyvoje stadijoje labai svarbi kuo mažesnė biomolekulių aptikimo riba. Tyrimams naudojant imunofermentinės analizės metodą, fluorescencijos signalą sustipriną fermentinės reakcijos, tačiau analizė trunka ilgai ir naudojami brangūs reagentai. Kaip alternatyva fermentams gali būti naudojamos nanomedžiagos, pvz., metalų nanolaidai, dar vadinami „nanoantenomis“, tačiau jie taip pat yra brangūs. ZnO nanostruktūros pasižymi panašiomis fluorescencijos stiprinimo savybėmis, o kadangi jos gali būti susintetintos ant bet kokio paviršiaus labai paprastais metodais, tai įgalina jų taikymą analizinėse sistemose fluorescencijos signalo stiprinimui [49].

Biomolekulių fluorescencijai ir jos intensyvumo stiprinimui dar gali būti naudojami ZnO NS modifikuoti fluoroforais [50]. Kadangi galima susintetinti įvairių geometrinių formų ZnO nanostruktūras, jas galima taikyti biomolekulių fluorescenciniame vaizdinime naudojant poliarizuotą šviesą, kur optinis atsakas priklauso nuo šviesos poliarizacijos, jos kritimo kampo, ir nuo naudojamos anizotropinės nanomedžiagos geometrinės orientacijos [51].

1.2.2.3. Cinko oksido nanostruktūrų sintezės metodai

Cinko oksido nanostruktūros dažniausiai sintetamos ant silicio substratų bei ITO arba FTO sluoksniais dengtų stiklų pirmiausia ant jų paruošiant ZnO sėklų sluoksnį. Galimos įvairios ZnO nanostruktūrų sintezės technikos, tačiau plačiausiai naudojamas yra nusodinimo verpimo būdu metodas [52]. ZnO sėklų sluoksnis dažniausiai formuojamas zolių – gelių metodu iš cinko acetato dihidrato, 2 – metoksietanolio ir monoetanolamino, kurie atitinkamai yra prekursorius, tirpiklis ir stabilizatorius. ZnO nanostruktūros ant tokio paruošto sluoksnio gali būti auginamos hidroterminiu metodu iš vandeninio cinko nitrato heksahidrato ir heksametilentetraamino (HMTA) tirpalo [53].

Cinko oksido nanostrypeliai gali būti auginami iš ZnO sėklų sluoksnio ant FTO stiklo taikant nusodinimo verpimo būdu metodą. Išvalytas FTO stiklas gali būti padengtas ZnO sėklų sluoksniu disperguojant ZnO nanodaleles. Tirpalas, naudojamas kaip ZnO nanostrypelių prekursorius gali būti paruoštas ekvimoliniu santykiu sumaišius cinko acetato dihidratą ir heksametiletilentetraaminą vandenyje. ZnO nanostrypelių sintezė gali būti atliekama FTO stiklą su ZnO sėklomis merkiant į paruoštą tirpalą ir laikant 90 °C temperatūroje 3 val. Gautas sluoksnis praplaunamas vandeniu, išdžiovinamas ir gali būti taikomas tyrimams [54]. Galimas ir kitas to paties metodo variantas, kuomet ZnO nanostrypelių prekursoriaus tirpalas ruošiamas naudojant didesnės koncentracijos tirpalą, kuriame ekvimoliniu santykiu sumaišyti cinko nitrato heksahidratas ir HMTA, tačiau sintetinant šiuo metodu sintezės trukmė gali pailgėti 1 val. [55].

ZnO nanostruktūros gali būti sintetintos ir elektrocheminiu metodu, naudojant trijų elektrodų sistemą: FTO stiklą kaip darbinį elektrodą, prisotintą Kolomelio elektrodą kaip palyginamąjį elektrodą ir cinko strypelį kaip pagalbinį elektrodą. Sintezę galima atlikti 80 °C temperatūros vandeniniame ZnCl₂ tirpale esant KCl, kuris padidina tirpalo elektrinį laidumą. Sintezės trukmė šiuo atveju gali būti 1000 s, o užduotas potencialas -1 V lyginamojo elektrodo atžvilgiu. Keičiant sintezės parametrus galima susintetinti norimo tankio ir aukščio ZnO nanostrypelių sluoksnį [56].

1.2.2.4. Cinko oksido nanostruktūrų taikymas biologiniuose jutikliuose

Cinko oksido biosuderinamumas bei aukštas izoelektrinis taškas leidžia elektrostatinės sąveikos būdu imobilizuoti fermentus, kurių izoelektrinis taškas yra žemas. Be to, didelis cheminis stabilumas, netoksiškumas ir galimybė pernešti elektronus leidžia cinko oksidą naudoti biomolekulių imobilizavimui be elektronų pernašos tarpininko ir taikyti implantuojamuose biojutikliuose [57]. DNR izoelektrinis taškas yra žemas, todėl elektrostatinės sąveikos pagalba ją galima imobilizuoti ant cinko oksido nanostruktūrų. Tokias sistemas galima naudoti jutikliuose, kurie remiasi fluorescencijos pokyčiais, kadangi DNR buvimas mėginyje gesina ZnO nanovamzdelių fluorescenciją [58].

Galima kurti biologinių jutiklių sistemas, kuriose substratas bus naudojamas ne tik biomolekulėms imobilizuoti, bet taip pat ir sustiprinti fluoroforų fluorescencinius signalus. Metalais sustiprintos fluorescencijos efektas stebimas naudojant medžiagas iš nanostruktūrizuotų metalų, kuris pasireiškia dėl sustiprintos plazmonų adsorbcijos, tačiau šio metodo taikymas yra apribotas dėl aukštos kainos ir jautrumo fluorescencijos gesinimui. Tam tikro storio dielektrinis sluoksnis gali būti pritaikytas siekiant atskirti fluoroforus nuo metalų, tam kad būtų išvengta fluorescencijos gesinimo. ZnO NS yra pigus metalo oksidas, pasižymintis geru fluorescencijos stiprinimu. Be to, lyginant su metaliniais paviršiais, signalo stiprinimas yra stiprus ir taip pat galima išvengti fluorescencijos gesimo netgi tuo atveju, kai fluoroforai yra tiesiogiai prijungti prie ZnO NS. Tokia sistema gali būti pritaikyta klinikiuose tyrimuose, pvz., nustatant du labai svarbus biožymeklius – karcinoembrioninį antigeną ir α – fetoproteiną [59].

Fermentiniai gliukozės jutikliai, kuriuose gliukozės oksidazė gali būti imobilizuota ant įvairių medžiagų, dažnai nukentčia dėl nepakankamo stabilumo ir fermento aktyvumo praradimo imobilizacijos metu. Sprendžiant šią problemą, buvo sukurti elektrocheminiai biojutikliai, kuriuose naudojami nanostruktūrizuoti elektrodai ir nenaudojami fermentai. Vienas iš tokių jutiklių pavyzdžių yra jutiklis su stikliškosios anglies elektrodu modifikuotu platinos nanostruktūromis. Nepaisant to, kad šis jutiklis

pasižymėjo didesniu jautrumu ir nustatymo tikslumu, jis reikalauja trijų elektrodų sistemos. Siekiant supaprastinti jutiklį, buvo sukurtas neelektrocheminis gliukozės jutiklis su ZnO nanostruktūromis. ZnO NS pasižymi fotoluminescencijos gesinimo efektu ir gali dalyvauti gliukozės oksidacijos reakcijoje, kuri yra panaši į fermento – gliukozės oksidazės katalizuojamą reakciją, kaip fotokatalizatorius [60]. Šios reakcijos metu gliukozė skyla į vandenilio peroksidą ir gliukono rūgštį. Dėl vandenilio peroksido formavimosi cinko oksido nanostrypelių fotoluminescencijos intensyvumas mažėja kuomet didėja gliukozės koncentracija tirpale. Tokio jutiklio privalumai yra lengva, vienpakopė ZnO nanostrypelių sintezė, jutiklis nereikalauja brangių substratų, kadangi nustatymas remiasi paprasta fluorescencija, nereikia papildomų elektrodų, o lyginant su kitais gliukozės jutikliais, pasižymi didesniu jautrumu ir žema aptikimo riba [61].

Lauko tranzistoriai, kuriuose puslaidininkinių savybių turintys ZnO NS veikia kaip laidus kanalas, gali būti panaudoti kaip dar viena sistema gliukozės nustatymui. ZnO NS paremtas lauko tranzistorius gliukozės koncentracijos signalą verčia elektriniu signalu, o didelis ZnO NS paviršiaus ir tūrio santykis užtikrina didelį jutiklio jautrumą ir žemą aptikimo ribą [62].

Cinko oksido nanostruktūros gali būti naudojamos ir elektrochemiluminescenciniuose (ECL) tyrimuose, pvz., nustatant vėžinius susirgimus. Yra daug metodų navikų nustatymui, pvz., imunofermentinė analizė, fluorescencinė imunoanalizė, elektrocheminė imunoanalizė, kvarco kristalo mikrogravimetrija, paviršiaus plazmonų rezonansas, chemiluminescencinė imunoanalizė ir kt. Elektrochemiluminescencija yra viena iš chemiluminescencijos formų, kur šviesos emisija yra generuojama elektrocheminių reakcijų metu. Palyginus su įprastu elektrocheminiu ir chemiluminescenciniu metodais, ECL yra jautresnė ir pasižymi plačiu tiesiniu dinaminio intervalu. ECL signalo sustiprinimui galima naudoti luminolį, kuris aktyviai veikia esant šarminei terpei, tačiau turi silpną įtaką signalui neutralioje terpėje. Naudojant puslaidininkines nanodaleles, tokias kaip, pvz., ZnO nanodalelės, galima padidinti luminolio įtaką signalo jautrumui ir sukurti ECL sistemą tinkančią naudoti antrinius antikūnus [63].

2. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Medžiagos ir reagentai

Dopamino hidrochloridas („Sigma Aldrich“, JAV);
Tris(hidroksimetil)aminometanas („Carl Roth“, Vokietija);
Polietileniminas („Sigma Aldrich“, JAV);
Cinko acetatas („Sigma Aldrich“, JAV);
Metanolis („Carl Roth“, Vokietija);
Cinko nitratas („Sigma Aldrich“, JAV);
Heksametilentetraminas („Carl Roth“, Vokietija);
Natrio acetato trihidratas („Carl Roth“, Vokietija);
Dinatrio vandenilio fosfato dodekahidratas („Carl Roth“, Vokietija);
Kalio divandenilio fosfatas („Riedel-De Haen AG“, Vokietija);
Kalio chloridas („Carl Roth“, Vokietija);
Kalio heksacianoferatas (III) („Sigma Aldrich“, JAV);
Kalio heksacianoferato (II) trihidratas („Carl Roth“, Vokietija);
Jaučio serumo albuminas („Carl Roth“, Vokietija);
Antikūnai prieš jaučio serumo albuminą („Immunology Consultants Laboratory, Inc., JAV);
Krienu peroksidaze žymėtų antikūnų prieš GLV IgG klasės antikūnus konjugatas („IDvet“, Prancūzija);
Glutaro aldehidas, 25 % („Carl Roth“, Vokietija);
N-hidroksisukcinimidas („Sigma Aldrich“, JAV);
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimididas („Sigma Aldrich“, JAV);
Roti®-Nanoquant („Carl Roth“, Vokietija);
Natrio hidroksidas („Scharlau“, Ispanija);
Natrio dodecilsulfatas („Carl Roth“, Vokietija).

Polidopamino (PDA) sintezė atliekama Tris buferyje, kuris ruošiamas 0,606 g tris(hidroksimetil)aminometano ištirpinant dejonizuotame vandenyje ir matavimo kolboje praskiedžiant iki 500 ml. Paruošto buferio koncentracija 10 mmol L⁻¹, pH 8,5. PDA sintezei gaminami 0,1 mg mL⁻¹ ir 0,5 mg mL⁻¹ koncentracijų dopamino tirpalai. Pirmas tirpalas ruošiamas 5 mg dopamino hidrochlorido ištirpinant Tris buferyje ir praskiedžiant matavimo kolboje iki 50 ml. Antras tirpalas ruošiamas 25 mg dopamino hidrochlorido ištirpinant Tris buferyje ir praskiedžiant matavimo kolboje iki 50 ml. PDA sluoksnio su polietileniminu (PEI) sintezei ruošiamas PEI tirpalas. 0,5 g PEI yra ištirpinama Tris buferyje ir praskiedžiama iki 10 ml. Paruošto tirpalo koncentracija yra 50 mg mL⁻¹.

Cinko oksido sintezei ruošiami dviejų rūšių tirpalai. Pirmas tirpalas ruošiamas 1 mg cinko acetato ištirpinant 1 ml metanolio. Paruošto tirpalo koncentracija yra 1 mg mL⁻¹. Antras tirpalas ruošiamas 0,474 g cinko nitrato ir 0,350 g heksametilentetramino ištirpinant dejonizuotame vandenyje ir praskiedžiant matavimo kolboje iki 50 ml. Paruoštame tirpale abiejų medžiagų koncentracijos yra 0,05 mol L⁻¹.

Elektrocheminiams matavimams naudojamas fosfatinis buferis (PBS), kuris ruošiamas 2,051 g natrio acetato, 8,954 g dinatrio vandenilio fosfato dodekahidrato, 3,402 g kalio divandenilio fosfato ir

3,725 g kalio chlorido ištirpinant dejonizuotame vandenyje ir praskiedžiant matavimo kolboje iki 500 ml. Paruošto buferio koncentracija yra $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.

Elektrocheminiams matavimams taip pat naudojamas tirpalas, susidedantis iš kalio heksacianoferato (III), kalio heksacianoferato (II) trihidrato ir kalio chlorido. Tirpalas ruošiamas 0,082 g kalio heksacianoferato (III), 0,106 g kalio heksacianoferato (II) trihidrato ir 0,373 g kalio chlorido ištirpinant dejonizuotame vandenyje ir praskiedžiant matavimo kolboje iki 50 ml. Tirpale esančių medžiagų koncentracijos atitinkamai yra 5 mmol L^{-1} , 5 mmol L^{-1} ir $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Jaučio serumo albumino (JSA) imobilizavimui ruošiamas JSA etaloninis tirpalas 1 mg liofilizuoto JSA ištirpinant 1 ml PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra 1 mg mL^{-1} . Imobilizavimas atliekamas naudojant kelis skirtingų koncentracijų JSA tirpalus, paruoštus skiedžiant etaloninį JSA tirpalą. Pirmas tirpalas ruošiamas 250 μl etaloninio JSA tirpalo praskiedžiant 250 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Antras tirpalas ruošiamas 50 μl etaloninio JSA tirpalo praskiedžiant 450 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Trečias tirpalas ruošiamas 25 μl etaloninio JSA tirpalo praskiedžiant 475 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Ketvirtas tirpalas ruošiamas 5 μl etaloninio JSA tirpalo praskiedžiant 495 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$. Penktas tirpalas ruošiamas 2,5 μl etaloninio JSA tirpalo praskiedžiant 497,5 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$.

Kovalentiniam JSA imobilizavimui ruošiami $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ koncentracijos N – hidroksisukcinimido (NHS) ir $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ koncentracijos N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido (EDC) tirpalai. NHS tirpalas ruošiamas 0,012 g NHS ištirpinant 1 ml PBS buferio. EDC tirpalas ruošiamas 0,077 g EDC ištirpinant 1 ml PBS buferio. Paruošti tirpalai išpilstomi į mažus mėgintuvėlius ir laikomi šaldiklyje.

Imobilizuoto baltymo koncentracijai nustatyti sudaroma kalibracinė kreivė, kuriai sudaryti naudojami dviejų skirtingų koncentracijų etaloniniai darbiniai JSA tirpalai. Pirmas tirpalas ruošiamas 2 μl etaloninio JSA tirpalo praskiedžiant 198 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Antras tirpalas ruošiamas 40 μl etaloninio JSA tirpalo praskiedžiant 360 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Antikūnų prieš jaučio serumo albuminą (Anti-JSA) užnešimui ruošiamas etaloninis Anti-JSA tirpalas 100 μl komercinio Anti-JSA praskiedžiant 1 ml PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Imobilizavimas atliekamas naudojant kelis skirtingų koncentracijų Anti-JSA tirpalus, kurie ruošiami skiedžiant etaloninį Anti-JSA tirpalą. Pirmas tirpalas ruošiamas 300 μl etaloninio Anti-JSA tirpalo praskiedžiant 200 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $60 \mu\text{g mL}^{-1}$. Antras tirpalas ruošiamas 150 μl etaloninio Anti-JSA tirpalo praskiedžiant 350 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Trečias tirpalas ruošiamas 75 μl etaloninio Anti-JSA tirpalo praskiedžiant 425 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ketvirtas tirpalas ruošiamas 50 μl etaloninio Anti-JSA tirpalo praskiedžiant 450 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Penktas tirpalas ruošiamas 25 μl etaloninio Anti-JSA tirpalo praskiedžiant 475 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Šeštasis tirpalas ruošiamas 12,5 μl etaloninio Anti-JSA tirpalo praskiedžiant 487,5 μl PBS buferio. Paruošto tirpalo koncentracija yra $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2. Priemonės ir prietaisai

Automatinės pipetės Research („Eppendorf“, JAV);
Analizinės svarstyklės KERN ABJ 220 – 4M („Kern & Sohn“, Vokietija);
Potenciostatas PalmSens4 („PalmSens BV“, Nyderlandai);
Spektrofotometras Perkin Elmer Lambda 25 („Perkin Elmer“, JAV);
Indikatorinis elektrodas – indžio ir alavo oksidų (ITO) sluoksniu dengti stiklai („Sigma Aldrich“, JAV);
Lyginamasis elektrodas – Ag/AgCl 3 mol L^{-1} KCl („Metrohm AG“, Šveicarija);
Pagalbinis elektrodas – Pt elektrodas.

2.3. Programinė įranga

Elektrocheminiai tyrimai buvo atliekami naudojant „PSTrace 5.8“ programinę įrangą. Spektrofotometriniai tyrimai atlikti naudojant „UV Winlab“ programinę įrangą. Gauti duomenys apdoroti „Origin 2017“ programa, darbas parašytas naudojantis „Microsoft Word 2016“ programa.

2.4. Polidopamino ir cinko oksido sluoksnių sintezės metodika

Polidopaminas sintetinamas ant ITO dengto stiklo. Prieš sintezę $7 \times 17 \times 0,7$ mm dydžio stiklai valomi 15 min acetone ultragarso vonelėje, po to nuplaunami ir 15 min valomi dejonizuotame vandenyje ultragarso vonelėje. Baigus valyti stiklai paliekamas išdžiūti ore. Nuvalyti ITO stiklai dvipusės lipnios juostos pagalba pritvirtinami Petri lėkštelės ($\varnothing 9$ cm) dugne išlaikant vienodus atstumus tarp stiklų. Paruoštas dopamino tirpalas iš karto supilamas į Petri lėkštelę, uždengiama dangteliu ir pastoviai maišant paliekama 1 val. Sintezei pasibaigus dopamino tirpalas atsargiai išpilamas, stiklai nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir paliekami išdžiūti ore. Sintetinant PDA sluoksnį su PEI, pirmiausia ant ITO dengto stiklo užnešamas PDA sluoksnis pagal aukščiau aprašytą metodiką iš $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ dopamino tirpalo, o praėjus 1 val. nuo sintezės pradžios pridedama 10 ml PEI tirpalo (PEI koncentracija sintezės tirpale yra 10 mg mL^{-1}) ir paliekama dar 1 val. Sintezei pasibaigus tirpalas su polimerais atsargiai išpilamas, stiklai nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir paliekami išdžiūti ore.

Cinko oksido nanostrypeliai sintetinami pagal literatūroje aprašytą metodiką [64]. Ant ITO dengto stiklo užlašinama $30 \mu\text{l}$ 1 mg mL^{-1} cinko acetato tirpalo metanolyje. Mėginiai paliekami kambario temperatūroje kol neišgaruos metanolis. Po to mėginiai įdedami į krosnį ir paliekami 1 val. $350 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje. Po to modifikuoti ITO stiklai inkubuojami 50 mmol L^{-1} cinko nitrato ir 50 mmol L^{-1} heksametilentetramino vandeniniame tirpale 2 val. esant $90 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūrai. Sintezei pasibaigus gauti mėginiai nuplaunami dejonizuotu vandeniu ir paliekami išdžiūti ore.

2.5. Susintetintų sluoksnių charakterizavimo metodika

Tiriamų sluoksnių paviršiaus sąveika su vandeniu nustatoma matuojant kontaktinį kampą Theta Lite Optical („Biolin Scientific“, Suomija) tensiometru. Kontaktiniam kampui matuoti ant objektinio staliuko padedamas ITO stiklas su tiriamu sluoksniu ir užlašinamas $5 \mu\text{l}$ tūrio vandens lašas. Kontaktinio kampo skaičiavimai atliekami naudojant „Attension Theta“ programą.

2.6. Elektrocheminių matavimų metodika

Susintetintų sluoksnių elektrocheminiam charakterizavimui atliekamas ciklinės voltamperometrijos tyrimas. Į elektrocheminių matavimų celę dedamas ITO stiklas su susintetintu sluoksniu. Į celę pilama 3 ml 5 mmol L⁻¹ kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L⁻¹ kalio heksacianoferato (II) ir 0,1 mmol L⁻¹ kalio chlorido tirpalo. Naudojama trijų elektrodų sistema (2 pav.), susidedanti iš indikatorinio elektrodo (ITO stiklas su atitinkama susintetinta medžiaga), lyginamojo elektrodo (Ag/AgCl 3 mol L⁻¹ KCl) ir pagalbinio elektrodo (Pt elektrodas). Skleidžiant potencialą nuo -0,3 iki +0,7 V užregistruojamas srovės stipris esant skirtingiems greičiams: 20, 30, 50, 80, 100, 150 ir 200 mV s⁻¹.

Srovės stiprio pokyčiai nustatomi diferencinės pulsinės voltamperometrijos metodu. Naudojama aukščiau aprašyta sistema, potencialas skleidžiamas nuo -0,4 iki +0,8 V, srovės stipris registruojamas esant 50 mV s⁻¹ potencialo skleidimo greičiui.



2 pav. Elektrocheminių matavimų sistema.

2.7. Biomolekulių imobilizavimo metodika

2.7.1. Jaučio serumo albumino imobilizavimas

Jaučio serumo albumino imobilizavimas atliekamas ITO dengtą stiklą su PDA sluoksniu patalpinant į elektrocheminių matavimų celę ir ant jo užpilant 40 μl JSA tirpalo. Celė su mėginiu paliekama 2 val. šaldytuve. Praėjus laikui JSA tirpalas automatinės pipetės pagalba nusiurbiamas ir paliekamas tolimesniems matavimams. Sluoksnis tris kartus praplaunamas nedideliu kiekiu PBS buferio siekiant pašalinti neisimobilizavusį JSA.

2.7.2. Kovalentinis jaučio serumo albumino imobilizavimas

JSA imobilizuojamas panaudojant 0,1 mol L⁻¹ koncentracijos N – hidroksisukcinimido (NHS) ir 0,4 mol L⁻¹ koncentracijos N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido (EDC) tirpalus. Imobilizacijai ruošiamas tirpalas, susidedantis iš NHS, EDC ir atitinkamos imobilizuojamo JSA koncentracijos tirpalo.

Bendras tirpalo tūris yra 60 µl. Paruoštas tirpalas užpilamas ant celėje esančio mėginio ir paliekama 30 min. Praėjus laikui, tirpalas automatinės pipetės pagalba yra nusiurbiamas, o mėginys tris kartus praplaunamas nedideliu kiekiu PBS buferio.

2.7.3. Jaučio serumo albumino imobilizavimas naudojant glutaro aldehidą

JSA imobilizuojamas naudojant glutaro aldehido garus. ITO dengtas stiklas su PDA sluoksniu patalpinamas į elektrocheminių matavimų celę, ant jo užpilama 40 µl JSA tirpalo ir paliekama 30 min kambario temperatūroje. Praėjus laikui, tirpalas automatinės pipetės pagalba yra nusiurbiamas, o celė su mėginiumi laikoma 15 min virš 25 % glutaro aldehido tirpalo. Po to sluoksnis tris kartus praplaunamas nedideliu kiekiu PBS buferio siekiant pašalinti neisimobilizavusį JSA.

2.7.4. Antikūnų užnešimas

Antikūnai prieš jaučio serumo albuminą užnešami ant imobilizuoto JSA. Tam tikslui ant mėginio užpilama 40 µl Anti-JSA tirpalo ir paliekama 30 min kambario temperatūroje. Po to automatinės pipetės pagalba tirpalas yra nusiurbiamas ir paliekamas tolimesniems tyrimams. Mėginys praplaunamas tris kartus nedideliu kiekiu PBS buferio siekiant pašalinti nesurištus antikūnus. Analogiškai yra imobilizuojami nespecifiniai antikūnai.

2.8. Baltymų koncentracijos nustatymo metodika

Imobilizuoto JSA koncentracija nustatoma Bradfordo baltymų koncentracijos nustatymo metodu. Tam tikslui sudaroma kalibracinė kreivė naudojant etaloninius darbinis JSA tirpalus. Į vienkartinės plastikines kiuvetes įpilamas atitinkamas PBS buferio ir JSA etaloninio darbinio tirpalo kiekis (1 lentelė). Į kiekvieną kiuvetę įpilama po 400 µl 5 kartus skiesto Bradfordo reagento (Roti®-Nanoquant tirpalas). Bendras tirpalo kiekis kiuvetėje 0,5 ml. Pridėjus Bradfordo reagento palaukiama 5 minutes.

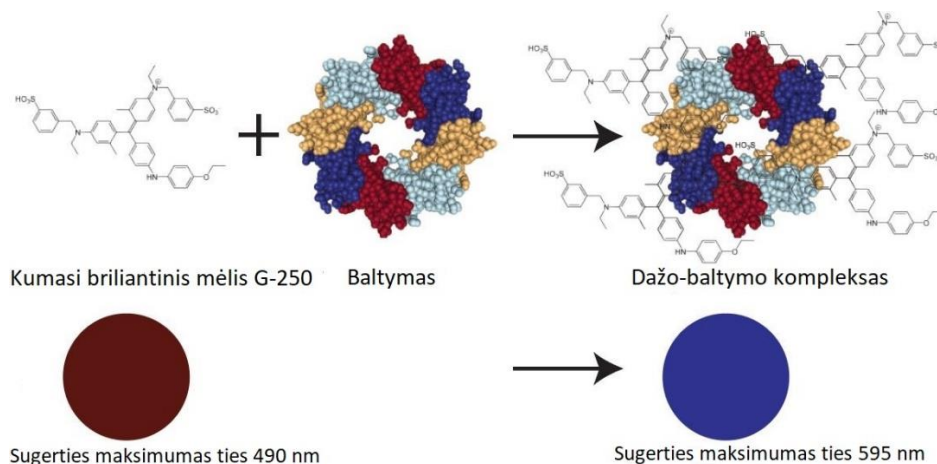
1 lentelė. Supilamų reagentų tūriai kalibraciniams tirpalams paruošti.

PBS, µl	10 µg mL ⁻¹ JSA, µl	100 µg mL ⁻¹ JSA, µl	Roti®-Nanoquant, µl	JSA koncentracija, µg mL ⁻¹
100	-	-	400	0
90	10		400	1
75	25		400	2,5
50	50		400	5
80			20	400
75		25	400	25
50		50	400	50
25		75	400	75

Kiuvetės įstatomos į spektrofotometrą ir matuojama sugertis ties 590 nm ir 450 nm bangų ilgiais. Palyginamuoju tirpalu naudojamas PBS buferis. Kalibracinė kreivė sudaroma brėžiant JSA koncentracijos priklausomybę nuo sugerties ties minėtų bangos ilgių santykiu (A_{590}/A_{450}).

Tiriamasis JSA tirpalas yra ruošiamas į kiuvetę pilant 90 μ l PBS buferio ir 10 μ l surinkto po imobilizavimo JSA tirpalo. Pridedama 400 μ l Bradfordo reagento, palaukiama 5 min. ir matuojama sugertis. Pagal kalibracinę kreivę nustatoma tiriamojo JSA tirpalo koncentracija. Įvertinamas praskiedimas ir apskaičiuojama imobilizuoto baltymo koncentracija. Analogiškai nustatoma imobilizuotų antikūnų koncentracija.

Tyrime naudojamo Bradfordo reagento sudėtyje yra dažas, vadinamas Kumasi briliantiniu mėliu G-250 (angl. *Coomassie brilliant blue G-250*). Įpilus šio reagento į baltymo tirpalą stebimas dažo spalvos pokytis iš rudai – raudonos į mėlyną, o spektrofotometru registruojamas absorbcijos spektro poslinkis nuo 465 nm iki 595 nm.



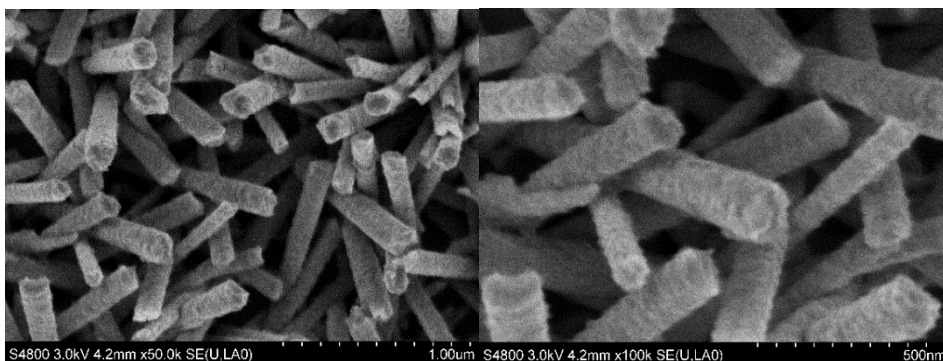
3 pav. Dažo sąveikos su baltymu schema [65].

Dažas gali būti trijų joninių formų: katijoninės, neutralios bei anijoninės. Stabili katijoninė forma būdinga dvigubai protinizuotam dažui ir esant labai žemam pH. Tokios formos dažo spalva yra raudona. Esant šiek tiek didesniai pH dažas gali pereiti į neutralią formą ir tapti žalios spalvos. Stabili anijoninė forma susidaro kai dažas deprotonuojamas esant šiek tiek didesniai pH negu būdingas neutraliai formai. Anijoninės formos dažo spalva yra mėlyna. Būdamas anijoninės formos dažas elektrostatinės sąveikos pagalba jungiasi prie baltymų molekulių, kadangi jo struktūroje esančios sulfo grupės gali sąveikauti su baltymo arginino, histidino, lizino, tirozino, triptofano ir fenilalanino liekanomis. Dažo spalvos intensyvumas priklauso nuo tirpale esančio baltymo kiekio – kuo daugiau baltymo, tuo intensyvesnė spalva [66].

3. EKSPERIMENTINĖ DALIS

3.1. Susintetintų polidopamino ir cinko oksido sluoksnių tyrimai

Tyrimų pradžioje buvo susintetinti ZnO nanostrypai ant stiklų padengtų ITO sluoksniu pagal 2.4. skyriuje aprašytą metodiką. Sintezės pabaigoje buvo aptiktos baltos struktūros stiklo, padengto ITO sluoksniu, paviršiuje. Susintetintų struktūrų paviršiaus morfologija buvo iširta skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (4 pav.).

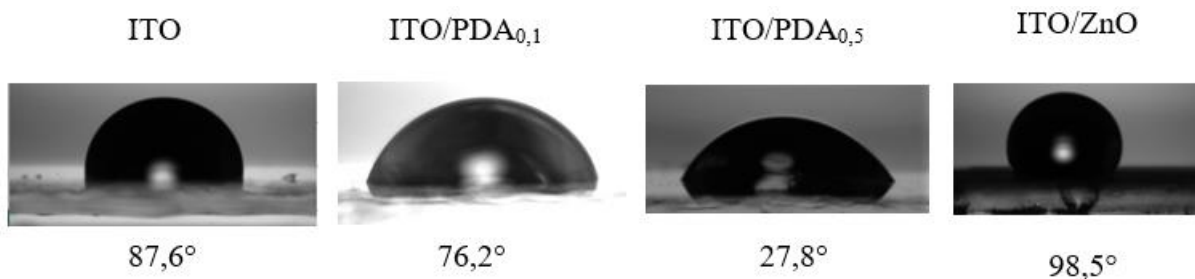


4 pav. Ant ITO sluoksniu padengto stiklo susintetintų ZnO nanostrypų nuotraukos gautos skenuojančiu elektroniniu mikroskopu.

Nuotraukose matomi ZnO nanostrypai yra netvarkingai išsidėstę, dauguma nanostrypų yra panašaus dydžio. Vidutinis nanostrypų storis yra 13 nm. Toks dydis beveik atitinka literatūroje [64], pagal kurią buvo sintetinami nanostrypai, nurodytam dydžiui.

Taip pat buvo atlikti eksperimentai, norint nustatyti optimalias PDA užnešimo sąlygas. Darbai buvo atlikti pagal 2.4. skyriuje aprašytą metodiką. Sintezės metu tirpale formavosi rudos spalvos PDA polimeras. Tyrimų metu buvo pastebėta, kad praplauti su dejonizuotu vandeniu mėginiai įgijo rusvą spalvą, tuo metu mėginiai prieš sintezę buvo bespalviai. Vizualiai ITO/PDA_{0,5} mėginių spalva buvo intensyvesnė, palyginus su ITO/PDA_{0,1} mėginiais.

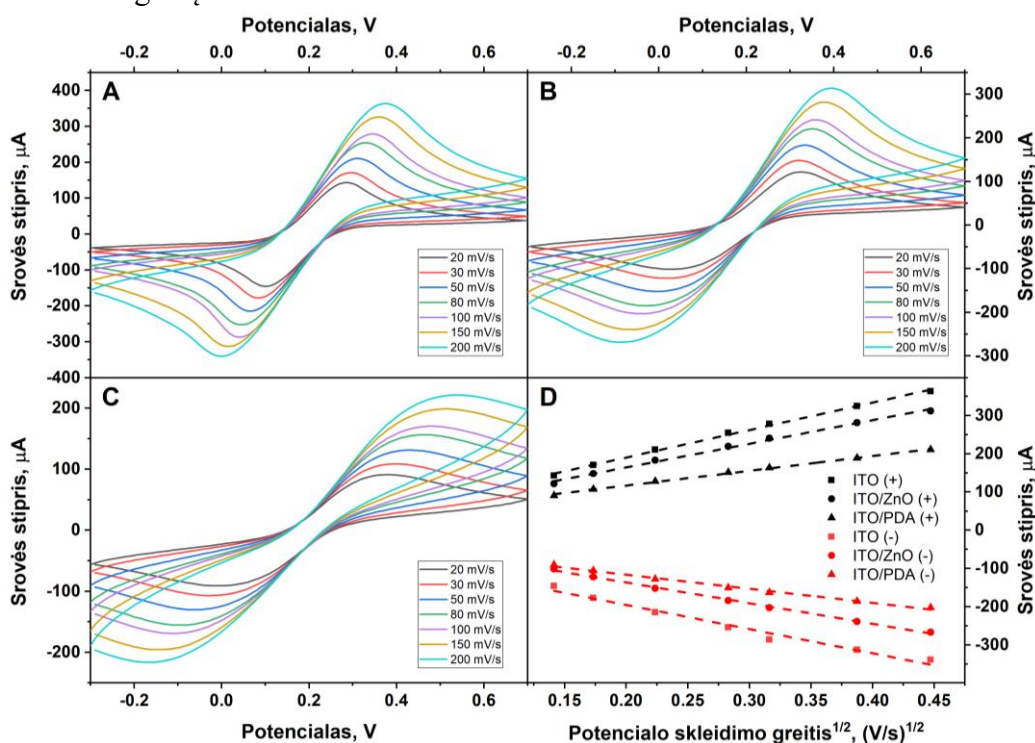
Papildomai ITO/PDA bei ZnO mėginiai buvo iširti naudojant kontaktinio kampo matavimo metodą pagal 2.5. skyriuje aprašytą metodiką. Tokie tyrimai padeda įvertinti paviršiaus hidrolifiškumą, kuris yra svarbus parametras biomolekulių imobilizavimui, bei įvertinti paviršiaus pokyčius po modifikavimo. 5 paveiksle yra pateiktos vandens lašo ant tiriamų paviršių nuotraukos.



5 pav. Kontaktinio kampo matavimo nuotraukos.

Matuojant kontaktinį kampą galima nustatyti paviršiaus hidrofilumą. Jeigu vandens lašo kontaktinis kampas yra mažesnis negu 30° , tai paviršius yra grynai hidrofilinis, o jeigu didesnis negu 90° , tai paviršius yra grynai hidrofobinis [67]. Pamatuotas kontaktinis kampas ant stiklo padengto ITO sluoksniu buvo lygus $87,6^\circ$. Susintetinus PDA sluoksnį ant stiklo padengto ITO sluoksniu buvo registruojamas kontaktinio kampo sumažėjimas. Kontaktinis kampas sumažėjo iki $76,2^\circ$, kai buvo naudojamas $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ dopamino tirpalas PDA sluoksniu užnešimui (ITO/PDA_{0,1}). Tuo metu kai PDA sluoksnis buvo susintetintas iš $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ dopamino tirpalo (ITO/PDA_{0,5}) paviršiaus hidrofilumas padidėjo, nes kontaktinis kampas sumažėjo jau iki $27,8^\circ$. Paviršiaus hidrofilumo padidėjimas susijęs su amino bei hidroksi funkcinėmis grupėmis, esančiomis PDA molekulėse. Skirtumą tarp ITO/PDA_{0,1} ir ITO/PDA_{0,5} mėginių kontaktinių kampų galima paaiškinti to, kad naudojant $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ dopamino koncentraciją ne visas paviršius yra padengtas PDA sluoksniu. Tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas ITO/PDA_{0,5} sluoksnis. ITO/ZnO mėginių atveju vandens lašo kontaktinis kampas buvo lygus $98,5^\circ$. Taigi po ZnO nanostrypų sintezės stiklo dengto ITO sluoksniu mėginių hidrofilumas sumažėjo.

Darbo metu buvo vertinamas PDA taikymas, konstruojant elektrocheminius biologinius jutiklius. Todėl buvo atlikti paruoštų mėginių elektrocheminiai tyrimai pagal 2.6. skyriuje aprašytą metodiką. 6 paveiksle yra pavaizduotos mėginių ciklinės voltamperogramos, užrašytos naudojant skirtingą potencialo skleidimo greitį.



6 pav. ITO (A), ITO/ZnO (B) ir ITO/PDA (C) mėginių ciklinių voltamperogramų 3 ciklai esant 20, 30, 50, 80, 100, 150, 200 mV/s potencialo skleidimo greičiui. (D) ITO, ITO/ZnO ir ITO/PDA mėginių srovės stiprio ties maksimumų vietomis priklausomybės nuo šaknies iš potencialo skleidimo greičio grafikai. Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – $\text{Ag/AgCl } 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas $-0,3 - +0,7 \text{ V}$ intervale. Tirpalas: 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (II) ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ kalio chlorido.

Ciklinės voltamperometrijos (CV) grafikuose (6 pav. a - c) matomos kalio heksacianoferato oksidacijos ir redukcijos smailės. Kaip matoma iš pateiktų grafikų, smailių aukštis ir padėtis priklauso nuo to, koks yra potencialo skleidimo greitis bei koks tiriamas sluoksnis yra naudojamas. Kintant elektrodo potencialo vertei atsiranda smailės prie tam tikrų potencialo verčių. Taip yra todėl, kad vyksta kalio heksacianoferato oksidacijos ir redukcijos procesai. Didėjant elektrodo potencialo vertei atsiranda oksidacijos smailės, kadangi prie teigiamo potencialo pradeda vykti kalio heksacianoferato oksidacijos procesas ir atsiranda anodinė srovė, lemianti srovės stiprio padidėjimą. Mažėjant elektrodo potencialo vertei prasideda redukcijos procesas ir atsiranda katodinė srovė, lemianti srovės stiprio sumažėjimą, dėl ko atsiranda redukcijos smailės [68]. Ciklinėje voltamperometrijoje svarbus yra potencialo skleidimo greitis. Didesnis potencialo skleidimo greitis lemia difuzijos sluoksnio storio sumažėjimą, dėl ko stebimas srovės stiprio padidėjimas. Elektrochemiškai grįžtamiems elektrono pernašos procesams, kuriuos lemia medžiagų difuzija, būdinga tiesinė priklausomybė tarp srovės stiprio verčių ties oksidacijos/redukcijos smailių maksimumais ir šaknies iš potencialo skleidimo greičio [69]. Tiriamų mėginių atveju stebimos tiesinės smailių srovės stiprio verčių priklausomybės nuo potencialo skleidimo greičio (pav. 6D), taigi galima sakyti, kad visose sistemose yra vykdoma grįžtama elektrono pernaša, kurią lemia difuzijos procesas.

Tiesės krypties koeficientas priklauso nuo tiriamo mėginio. Didžiausias koeficientas (oksidacijos procesui - 717,7) buvo registruojamas ITO dengto stiklo mėginio atveju. Padengus ITO dengtą stiklą ZnO sluoksniu krypties koeficientas sumažėja maždaug per 100 kaip oksidacijos taip ir redukcijos atveju, o padengus ITO dengtą stiklą PDA sluoksniu, krypties koeficientas sumažėja maždaug per 330 oksidacijos atveju ir maždaug per 260 redukcijos atveju. Koreliacijos koeficientas visuose atvejuose svyravo nuo 0,989 iki 0,999.

Taip pat, panaudojus tiesės krypties koeficiento vertes (pav. 6D), galima apskaičiuoti mėginių difuzijos koeficientus. Difuzijos koeficientas aprašo dalelių (atomų, molekulių ar jonų) judėjimą, kuris priklauso nuo terpės, kurioje vyksta difuzija. Kuo didesnis difuzijos koeficientas, tuo greičiau juda dalelės [70]. Norint apskaičiuoti šį koeficientą yra naudojama Randles – Sevcik lygtis:

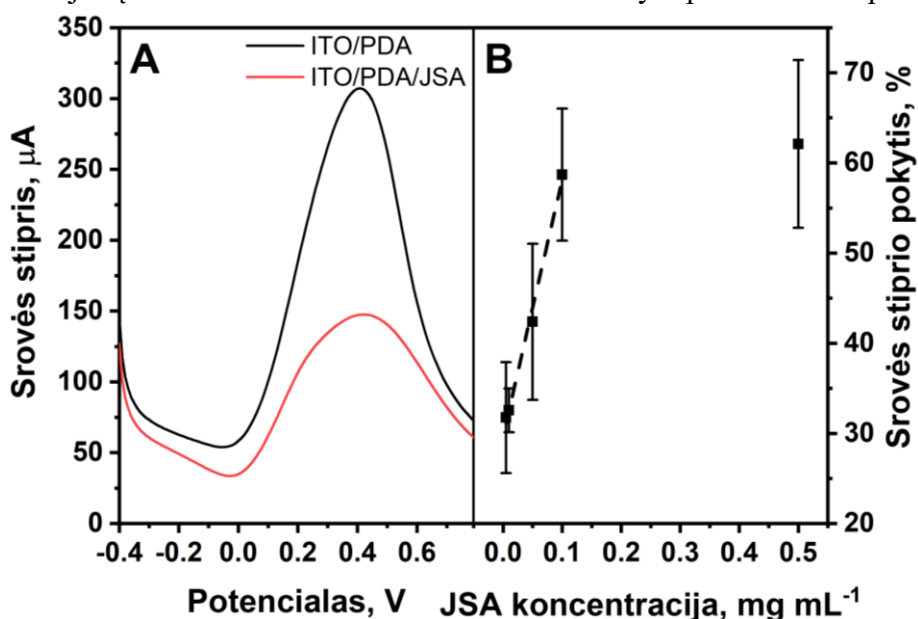
$$i_p = 0,4463nFAC \sqrt{\frac{nFvD}{RT}}$$

Kur i_p – srovės stipris (A) maksimumo vietoje, n yra perneštų elektronų skaičius, F - Faradėjaus konstanta ($C \text{ mol}^{-1}$), A – elektrodo paviršiaus plotas (cm^2), C – reagento koncentracija (mol cm^{-3}), v – potencialo skleidimo greitis (V/s), D – reagento difuzijos koeficientas ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), R – dujų konstanta ($\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) ir T – temperatūra (K) [69]. Elektrodo plotas buvo – $0,159 \text{ cm}^2$. ITO, ITO/ZnO ir ITO/PDA apskaičiuoti difuzijos koeficientai atitinkamai buvo $1,88 \times 10^{-6}$, $1,39 \times 10^{-6}$ ir $5,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Tokiu būdu ITO mėginio laidumas turi būti didesnis nei ITO/ZnO mėginio laidumas, kuris yra didesnis nei ITO/PDA mėginio laidumas.

3.2. Biomolekulių imobilizavimo tyrimai

Darbo metu buvo vertinamos PDA panaudojimo galimybės, kuriant imuninį jutiklį. Kaip modelinė sistema buvo pasirinkta jaučio serumo albumino (JSA) ir antikūnų prieš JSA pora. Norint nustatyti antikūnų koncentraciją tirpale yra svarbu užnešti jo antigeną ant elektrocheminio jutiklio paviršiaus.

Šiame tyrime buvo parenkamas optimalus JSA baltymo imobilizacijos variantas. Tyrimai buvo atliekami užnešant PDA sluoksnį ant stiklo dengto ITO sluoksniu. JSA baltymas buvo imobilizuojamas pagal 2.7.1. skyriuje aprašyta metodiką. ITO dengtas stiklas su PDA sluoksniu buvo įtvirtinimas celėje. Į celę buvo įpilama 40 μl skirtingų koncentracijų JSA tirpalų ir paliekama šaldytuve 2 val. Po to mėginys buvo praplaunamas 3 kartus PBS buferiu. JSA baltymo imobilizacija buvo vertinama pagal rezultatus, gautus atliekant diferencinės impulsinės voltamperometrijos (DIV) tyrimus. DIV matavimai buvo atliekami prieš ir po JSA baltymo imobilizacijos ant ITO/PDA sluoksnio. JSA imobilizacija buvo vertinama pagal srovės stiprio sumažėjimą ties maksimumo vieta. Gauti rezultatai yra pavaizduoti 7 paveiksle.

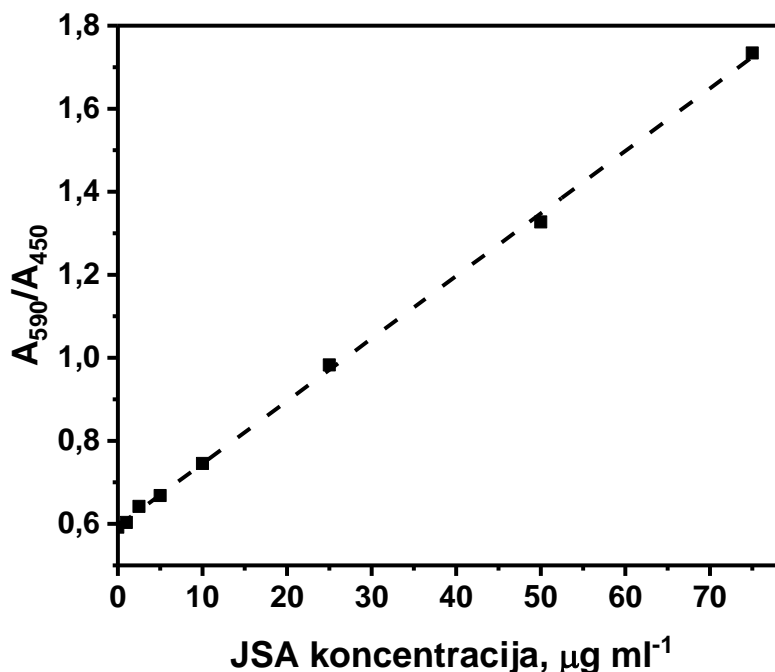


7 pav. (A) Mėginio diferencinės impulsinės voltamperometrijos matavimai prieš (ITO/PDA) ir po (ITO/PDA/JSA) JSA imobilizacijos iš $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ JSA tirpalo. (B) Srovės stiprio ties maksimumo vieta pokyčio priklausomybė nuo imobilizacijai naudojamo JSA tirpalo koncentracijos. Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – $\text{Ag/AgCl } 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas $-0,4 - +0,8 \text{ V}$ intervale, potencialo skleidimo greitis 50 mV s^{-1} . Tirpalas: 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (II) ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ kalio chlorido.

7 paveikslo A dalyje matome, kad srovės stipris sumažėja po baltymo imobilizacijos, kas patvirtina sėkmingą JSA imobilizaciją ant PDA sluoksnio, nes imobilizuotas baltymas blokuoja elektrodo paviršių ir tokiu būdu sumažėja sistemos laidumas. Baltymų imobilizacija PDA paviršiuje vyksta dėl to, kad JSA per amino grupes, esančias baltymo molekulėje, sudaro Šifo bazes su PDA. Naudojant skirtingas JSA baltymo koncentracijas buvo nustatyta, kad srovės stiprio pokytis priklauso nuo imobilizuoto baltymo kiekio – kuo mažesnė imobilizacijai naudojamo JSA tirpalo koncentracija, tuo mažesnis yra srovės stiprio pokytis. Imobilizacijai naudojant JSA tirpalus, kurių koncentracija buvo lygi $5, 10, 50, 100$ ir $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, srovės stipris atitinkamai sumažėjo $31,8 \pm 6,2, 32,6 \pm 2,4, 42,4 \pm 8,7, 58,7 \pm 7,3$ ir $62,1 \pm 9,3 \%$. JSA koncentracijos intervale nuo 5 iki $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ galioja tiesinė priklausomybė ($r = 0,998$). Atsižvelgiant į srovės stiprio pokyčio dydį, tolimesnėms tyrimams buvo naudojamas

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ JSA tirpalas, nes didinant pradinę JSA koncentraciją iki 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ buvo imobilizuojamas panašus baltymo kiekis kaip ir 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mėginio atveju.

Norint papildomai įvertinti koks baltymo kiekis isimobilizuoja ITO/PDA mėginio paviršiuje buvo atlikti tyrimai, naudojant Bradfordo baltymų koncentracijos nustatymo metodą pagal 2.8. skyriuje aprašytą metodiką. Baltymo koncentracija buvo nustatoma tirpaluose, kurie buvo surinkti nuo mėginio po imobilizacijos. Pirmiausia buvo sudaryta kalibracinė kreivė (8 pav.) JSA koncentracijos nustatymui intervale nuo 0 iki 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

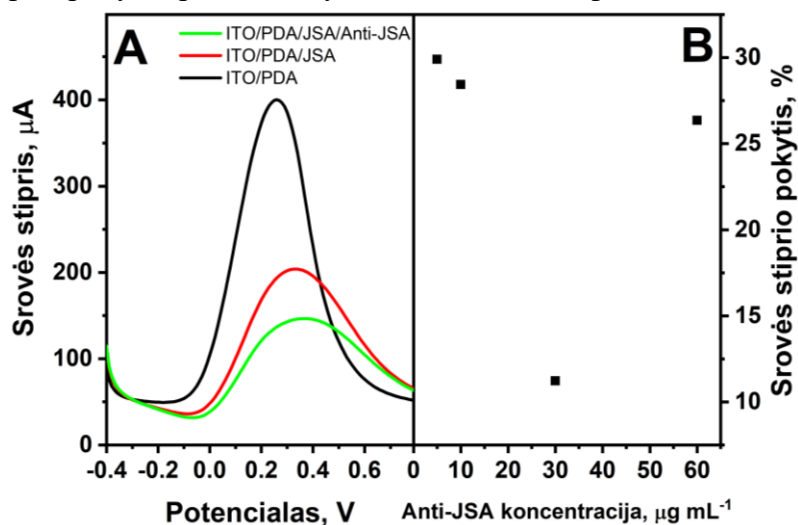


8 pav. Kalibracinė kreivė JSA tirpalo koncentracijos nustatymui.

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad analizinis signalas tiesiškai priklauso nuo JSA baltymo koncentracijos intervale nuo 0 iki 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0,999$). Tolimesniam baltymo koncentracijos nustatymui buvo naudojama tiesės lygtis $y = 0,0151x + 0,5945$. Nustačius JSA koncentraciją tirpaluose, surinktuose po imobilizacijos, buvo apskaičiuojamas imobilizuotas baltymo kiekis mėginių paviršiuje, įvertinus pradinį baltymo kiekį tirpaluose. Taigi buvo nustatyta, kad ant mėginių, kurių padengimui baltymu buvo naudojami 50, 100 ir 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pradinės koncentracijos tirpalai, buvo atitinkamai imobilizuota 0,98, 2,43 bei 3,23 μg JSA baltymo. Nustatyti baltymo koncentraciją tirpaluose, kurių paruošimui buvo panaudotos 10 ir 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracijos, nepavyko, kadangi tirpalų paruošimui buvo naudotas per mažas baltymo kiekis, kad galima būtų atlikti nustatymą pagal sudarytą kalibracinę. Nepaisant to, kad imobilizuotų iš 100 ir 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracijų tirpalų, baltymo kiekiai skyrėsi per 0,8 μg , srovės stiprio pokyčiai (7B pav.) beveik nesiskyrė. Tai galima paaiškinti tuo, kad baltymo kiekis yra nustatomas iš surinktų tirpalų, tuo metu po tirpalo surinkimo mėginiai yra 3 kartus praplaunami PBS buferiu. Taigi praplovimo stadijos metu galimai nuplaunama dalis baltymo nuo mėginio paviršiaus.

Toliau ant PDA sluoksnio su JSA buvo užnešami antikūnai prieš JSA (Anti-JSA) pagal 2.7.4. skyriuje aprašytą metodiką. 40 μl skirtingos koncentracijos Anti-JSA tirpalų buvo užpilama ant mėginio ir paliekama 30 min kambario temperatūroje. Po to mėginys buvo praplaunamas 3 kartus PBS buferiu.

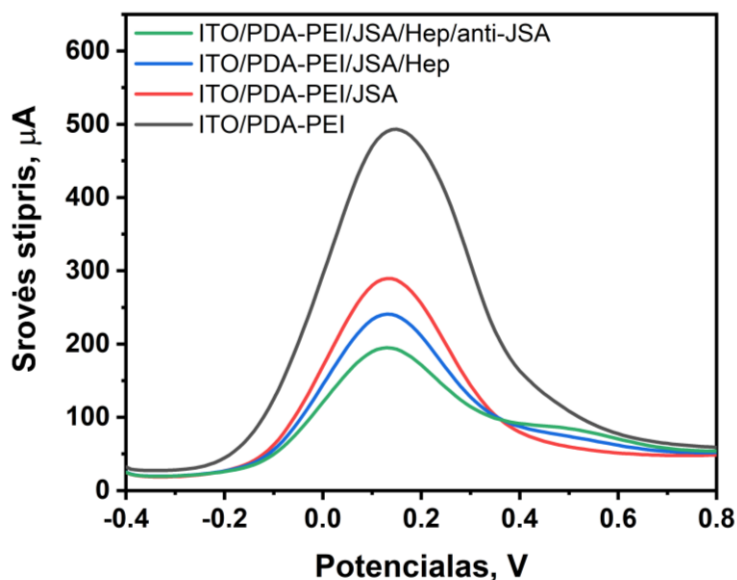
Anti-JSA užnešimas buvo vertinamas DIV matavimų pagalba. 9 paveiksle pateiktos DIV matavimų kreivės bei srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo Anti-JSA tirpalo koncentracijos.



9 pav. (A) Mėginio diferencinės impulsinės voltamperometrijos matavimai prieš (ITO/PDA) ir po (ITO/PDA/JSA) JSA imobilizacijos iš $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ JSA tirpalo bei po Anti-JSA antikūnų užnešimo (ITO/PDA/JSA/Anti-JSA) iš $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-JSA antikūnų tirpalo. (B) Srovės stiprio ties maksimumo vietos pokyčio priklausomybė nuo naudojamo Anti-JSA antikūnų tirpalo koncentracijos. Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – $\text{Ag/AgCl } 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas $-0,4 - +0,8 \text{ V}$ intervale, potencialo skleidimo greitis 50 mV s^{-1} . Tirpalas: 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (II) ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ kalio chlorido.

Iš pateikto grafiko (pav. 9A) matome, kad po Anti-JSA antikūnų užnešimo srovės stipris sumažėja dar labiau, negu po JSA imobilizacijos. Taip yra todėl, kad PDA paviršiuje susiformuoja imuninis antikūno ir antigeno (JSA) kompleksas, kuris blokuoja elektrodo paviršių ir dėl to mažėja sistemos laidumas. Tačiau tyrimo metu nebuvo pastebėta priklausomybė tarp pradinio antikūnų tirpalo koncentracijos ir srovės stiprio pokyčio (pav. 9B). Naudojant mažos koncentracijos antikūnų tirpalus srovės stipris pakisdavo apie 30 %, kuomet naudojant didesnių koncentracijų antikūnų tirpalus srovės stipris svyravo nuo maždaug 11 iki 26 %. Taip pat tyrimo metu rezultatai blogai atsikartodavo. Tokius rezultatus galėjo lemti mėginio praplovimas po antikūnų užnešimo ir tolimesnis papildomas mėginio paviršiaus praplovimas, kuriuo metu galėjo nusiplauti dalis JSA baltymo. Rezultatų svyravimus tarp eksperimentų galima paaiškinti galimais skirtumais praplovimo metu. Bradfordo metodu atlikti tyrimai parodė, kad naudojant 30 ir $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracijų Anti-JSA antikūnų tirpalus jutiklio paviršiuje prisijungia atitinkamai $1,12$ ir $1,86 \mu\text{g}$ antikūnų.

Norint pagerinti JSA baltymo imobilizavimą, ITO dengto stiklo paviršiuje buvo susintetintas polidopamino - polietilenimino (PDA-PEI) sluoksnis pagal 2.4. skyriuje aprašytą metodiką. Tokiu būdu į PDA sluoksnį buvo įvestas PEI polimeras, kuris pasižymi didelių amino grupių kiekiu. JSA baltymo imobilizavimui buvo pasirinktas kovalentinis variantas, kai N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimidu (EDC) ir N – hidroksisukcinimidu (NHS) atkyvuojamos karboksi grupės JSA paviršiuje ir tokiu būdu baltymas jungiasi prie paviršiaus, sudarydamas kovalentinius ryšius su PDA ir PEI amino grupėmis. Tyrimo rezultatai pavaizduoti 10 paveiksle.



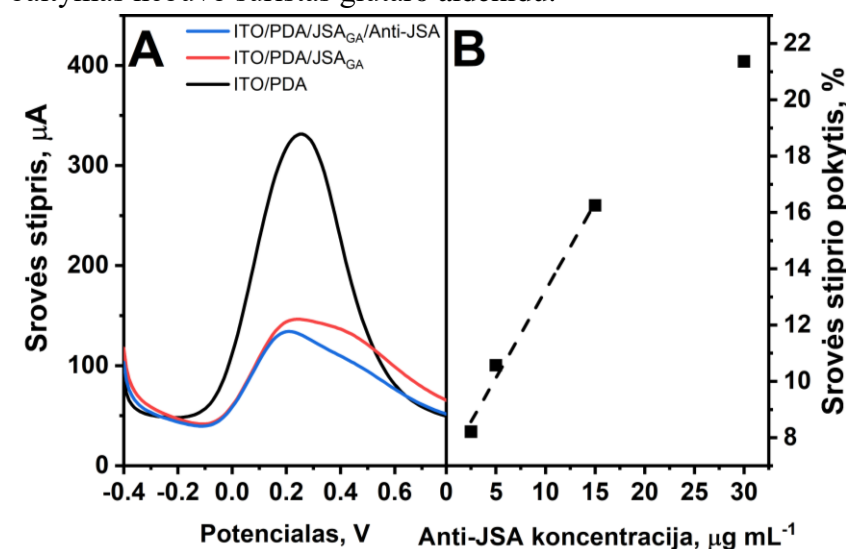
10 pav. Mėginio diferencinės impulsinės voltamperometrijos matavimai prieš (ITO/PDA-PEI) ir po (ITO/PDA-PEI/JSA) JSA imobilizacijos iš $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ JSA tirpalo naudojant NHS ir EDC bei po sistemos modifikavimo heparinu (ITO/PDA-PEI/JSA/Hep) ir antikūnų užnešimo (ITO/PDA-PEI/JSA/Hep/Anti-JSA). Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – $\text{Ag/AgCl } 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas -0,4 – +0,8 V intervale, potencialo skleidimo greitis 50 mV s^{-1} . Tirpalas: 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (II) ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ kalio chlorido.

Rezultatai parodė, kad po JSA baltymo imobilizacijos srovės stipris sumažėjo per 41 %. Atsižvelgus į tai, kad buvo naudojama gan maža ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) JSA koncentracija, tam, kad būtų sumažintas JSA baltymo molekulių, kurios įsimobilizavimo tik dėka absorbcijos susidarant Šifo bazėms, skaičius buvo naudojama papildoma jutiklio paruošimo stadija. Po JSA baltymo kovalentinio imobilizavimo jutiklio paviršius buvo blokuojamas su heparinu (ITO/PDA-PEI/JSA/Hep) tam, kad Anti-JSA antikūnai negalėtų absorbuotis PDA paviršiuje. Po heparino imobilizacijos srovės stipris papildomai sumažėjo per 46 % nuo ITO/PDA-PEI/JSA signalo. Tokiu būdu galima teigti, kad ši jutiklio paruošimo stadija buvo sėkminga. Atlikus tyrimus su Anti-JSA antikūnais buvo nustatyta, kad kaip ir prieš tai atliktame eksperimente su JSA baltymu, imobilizuotu per 2 val. šaldytuve, nėra aiškios priklausomybės tarp analizinio signalo ir antikūnų koncentracijos. Tyrimas, atliktas naudojant Bradfordo metodą parodė, kad naudojant 15 ir $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-JSA koncentracijos tirpalus prisijungia tik $0,55$ ir $1,13 \mu\text{g}$ antikūnų. Baltymų nusiplovimą nuo paviršiaus galima paminėti kaip faktorių, lemiantį signalo svyravimus tarp eksperimentų.

Norint eliminuoti galimą JSA baltymo nuplovimą nuo ITO/PDA mėginių paviršiaus buvo nuspręsta taikyti surišimą bifunkciniu reagentu – glutaro aldehidu, kuris turėtų stipriau surišti JSA su PDA. Imobilizacija vykdoma pagal 2.7.3. skyriuje aprašytą metodiką. Iš pradžių ant celėje įtvirtinto ITO/PDA mėginio buvo užpilama $40 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ JSA tirpalo ir palaikoma 30 min, o paskui mėginys celėje buvo laikomas 15 min virš 25 % glutaro aldehido tirpalo. Taigi surišimas vykdavo glutaro aldehido garais. DIV tyrimais buvo nustatyta, kad srovės stiprio pokytis yra praktiškai vienodas (apie 60 %) kai JSA baltymas buvo imobilizuojamas su glutaro aldehidu ir kai imobilizacija buvo vykdoma laikant JSA tirpalą virš mėginio 2 val. šaldytuve. Tolimesniuose tyrimuose, kur taikomas imobilizavimas glutaro

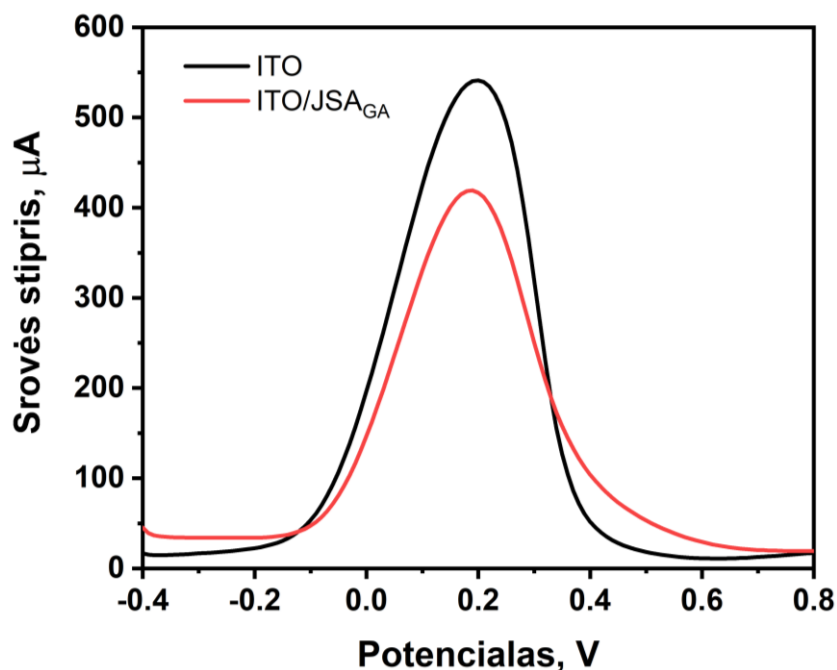
aldehido garais buvo nuspręsta naudoti $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ JSA baltymo koncentraciją, nes tokiu būdu jutiklio paviršius užtiktinai pasidengė baltymu.

Užnešus Anti-JSA ant PDA mėginio, kuriame JSA imobilizuotas glutaro aldehido garais buvo stebimas srovės stiprio sumažėjimas (pav. 10A) dėl besiformuojančio imuninio komplekso. Tyrimų metu buvo pastebėta, kad srovės stiprio pokytis (pav. 10B) priklauso nuo naudojamo Anti-JSA tirpalo koncentracijos – kuo didesnė koncentracija tuo didesnis srovės stiprio pokytis. Tyrimuose buvo naudojami $2,5$, 5 , 15 ir $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracijų Anti-JSA tirpalai, o srovės stiprio pokytis atitinkamai buvo $8,22$, $10,57$, $16,25$ ir $21,36 \%$. Anti-JSA koncentracijų intervale nuo $2,5$ iki $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ galioja tiesinė srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo antikūnų koncentracijos ($r = 0,995$). Atliktas Bradfordo tyrimas parodė, kad jutiklio paviršiuje naudojant 15 ir $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ koncentracijų Anti-JSA tirpalus prisijungė atitinkamai $1,24$ ir $1,92 \text{ } \mu\text{g}$ antikūnų. Tokiu būdu naudojant $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ antikūnų tirpalą prisijungia $1,7$ kartų didesnis antikūnų kiekis, negu tuo atveju kai buvo naudojami ITO/PDA/JSA mėginiai, kuriuose baltymas nebuvo surištas glutaro aldehidu.



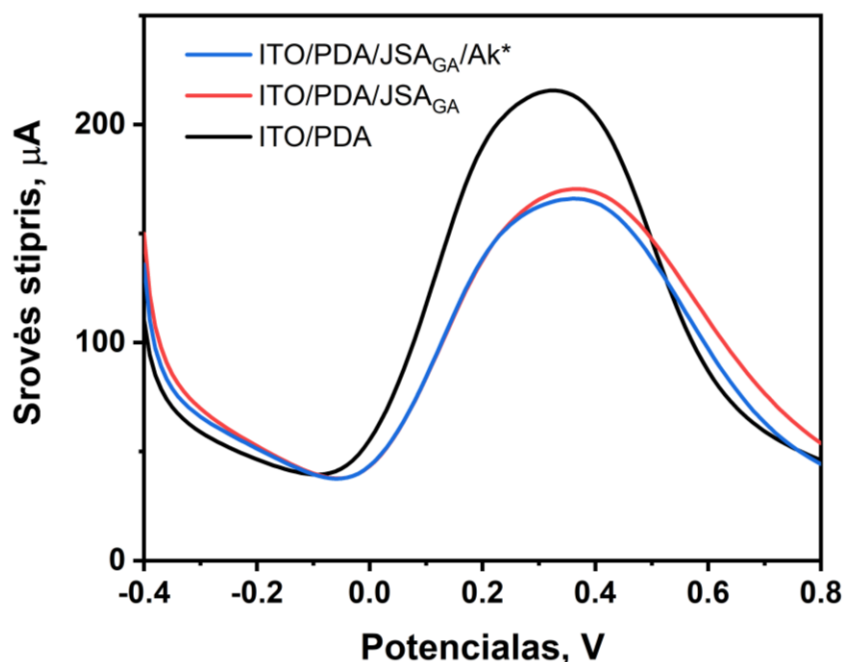
11 pav. (A) Mėginio diferencinės impulsinės voltamperometrijos matavimai prieš (ITO/PDA) ir po (ITO/PDA/JSA_{GA}) JSA imobilizacijos iš $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ JSA tirpalo naudojant glutaro aldehidą bei po Anti-JSA prisijungimo (ITO/PDA/JSA_{GA}/Anti-JSA) naudojant $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-JSA tirpalą. (B) Srovės stiprio ties maksimumo vieta pokyčio priklausomybė nuo naudojamo Anti-JSA tirpalo koncentracijos. Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – $\text{Ag/AgCl } 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas $-0,4 - +0,8 \text{ V}$ intervale, potencialo skleidimo greitis 50 mV s^{-1} . Tirpalas: 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (II) ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ kalio chlorido.

Norint įvertinti PDA įtaką JSA baltymo imobilizavimui buvo atliktas palyginamasis DIV tyrimas, kuriuo metu tarpusavyje buvo palyginti ITO dengtas stiklas ir ITO dengtas stiklas su glutaro aldehido garais imobilizuotu JSA iš $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ JSA tirpalo (12 pav.). Po imobilizacijos srovės stipris sumažėjo per $122 \text{ } \mu\text{A}$ arba $22,55 \%$. Srovės stiprio pokytis kai sistemoje naudojamas PDA sluoksnis tomis pačiomis imobilizavimo sąlygomis yra $58,7 \pm 7,3 \%$, taigi PDA taikymas pagerina JSA baltymo imobilizaciją. Šiuo atveju baltymo imobilizacija įvyksta ne tik dėl Šifo bazių susidarymo, bet ir dėl to, kad glutaro aldehidas suriša tarpusavyje baltymo bei PDA struktūroje esančios amino grupes. Tokiu būdu pagerinama JSA baltymo imobilizacija.



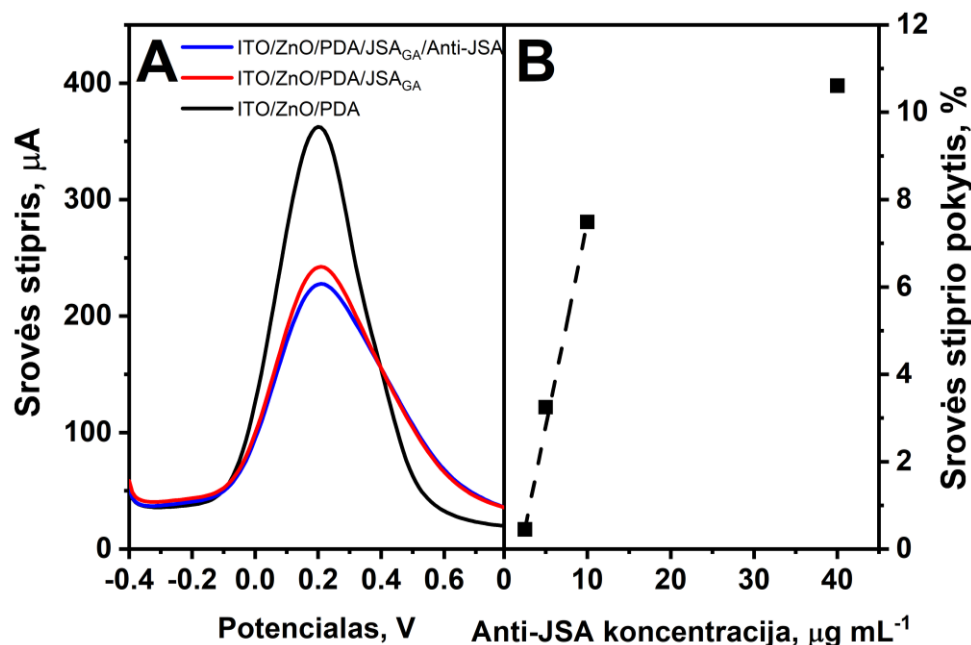
12 pav. Mėginio diferencinės impulsinės voltamperometrijos matavimai prieš (ITO) ir po (ITO/JSA_{GA}) JSA imobilizacijos iš $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ JSA tirpalo naudojant glutaro aldehidą. Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – $\text{Ag/AgCl } 3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas $-0,4 - +0,8 \text{ V}$ intervale, potencialo skleidimo greitis 50 mV s^{-1} . Tirpalas: 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L^{-1} kalio heksacianoferato (II) ir $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ kalio chlorido.

Norint įvertinti tiriamo imuninio jutiklio atrankumą buvo atliktas tyrimas naudojant nespecifinius antikūnus. Kaip nespecifiniai antikūnai buvo parinkti fermentu (krienų peroksidaze) žymėti antikūnai prieš galvijų leukemijos viruso IgG klasės antikūnus (Anti-Ak). Anti-Ak antikūnai buvo užnešami tokiu pačiu principu kaip ir Anti-JSA antikūnai. Analizinis signalas buvo registruojamas DIV pagalba (13 pav.) Po nespecifinių antikūnų užnešimo ant JSA srovės stipris sumažėjo per $4 \mu\text{A}$ arba $2,35 \%$. Atsižvelgus į tai, kad Bradfordo metodu buvo nustatyta, kad Anti-Ak koncentracija naudojamame tirpale buvo $180 \mu\text{g mL}^{-1}$, šis sumažėjimas yra nereikšmingas, kadangi naudojant Anti-JSA antikūnus srovės stiprio pokytis yra žymiai didesnis, net kai naudojamas $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-JSA koncentracijos tirpalas. Taigi, taip paruoštas imuninis jutiklis pasižymi antrankumu. JSA baltymo imobilizavimas, naudojant 25% glutaro aldehido tirpalą, yra tinkamas metodas ruošiant elektrocheminį imuninį jutiklį.



13 pav. Mėginio diferencinės impulsinės voltamperometrijos matavimai prieš (ITO/PDA) ir po (ITO/PDA/JSA_{GA}) JSA imobilizacijos iš 100 µg mL⁻¹ JSA tirpalo naudojant glutaro aldehidą garus bei po Anti-Ak antikūnų sąveikos (ITO/PDA/JSA_{GA}/Ak*). Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – Ag/AgCl 3 mol L⁻¹ KCl, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas -0,4 – +0,8 V intervale, potencialo skleidimo greitis 50 mV s⁻¹. Tirpalas: 5 mmol L⁻¹ kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L⁻¹ kalio heksacianoferato (II) ir 0,1 mmol L⁻¹ kalio chlorido.

Tyrimų pabaigoje pasirinktas JSA baltymo imobilizavimo variantas buvo pritaikytas konstruojant elektrocheminį jutiklį su ZnO nanostrypais. ZnO nanostrypai buvo susintetinti ITO dengto stiklo paviršiuje. Po to ITO/ZnO mėginys buvo padengtas PDA sluoksniu naudojant 0,5 mg mL⁻¹ dopamino tirpalą. Tolimesnis ITO/ZnO/PDA sluoksnio modifikavimas JSA baltymu ir Anti-JSA užnešimas buvo atliktas pagal 2.7. skyriuje aprašyta metodiką. Gauti rezultatai pavaizduoti 14 paveiksle.



14 pav. (A) Mėginio diferencinės impulsinės voltamperometrijos matavimai prieš (ITO/ZnO/PDA) ir po (ITO/ZnO/PDA/JSA_{GA}) JSA imobilizacijos iš 100 μg mL⁻¹ JSA tirpalo naudojant glutaro aldehidą bei po Anti-JSA prisijungimo (ITO/PDA/JSA_{GA}/Anti-JSA) naudojant 10 μg mL⁻¹ Anti-JSA tirpalą. (B) Srovės stiprio ties maksimumo vieta pokyčio priklausomybė nuo naudojamo Anti-JSA tirpalo koncentracijos. Naudota trijų elektrodų sistema: indikatorinis – ITO dengtas stiklas, lyginamasis – Ag/AgCl 3 mol L⁻¹ KCl, pagalbinis – Pt elektrodas. Sąlygos: potencialas skleidžiamas -0,4 – +0,8 V intervale, potencialo skleidimo greitis 50 mV s⁻¹. Tirpalas: 5 mmol L⁻¹ kalio heksacianoferato (III), 5 mmol L⁻¹ kalio heksacianoferato (II) ir 0,1 mmol L⁻¹ kalio chlorido.

Rezultatai parodė, kad intervale nuo 2,5 iki 10 μg mL⁻¹ galioja tiesinė priklausomybė tarp srovės stiprio pokyčio smailės maksimumo vietoje ir naudojamos Anti-JSA tirpalo koncentracijos. JSA baltymo imobilizavimas ant polidopamino sluoksnio, naudojant 25 % glutaro aldehido tirpalą, gali būti taikomas, konstruojant elektrocheminį imuninį jutiklį ITO/ZnO mėginių pagrindu.

IŠVADOS

1. Sėkmingai atlikta ZnO nanostrypų sintezė ITO dengto stiklo paviršiuje. Sintezės pabaigoje paviršius buvo padengtas netvarkingai išsidėsčiusiais ZnO nanostrypais, kurių storis yra 13 nm.
2. Nustatyta, kad dėl PDA sluoksnio užnešimo padidėja paviršiaus hidrofiliškumas ir sumažėja kalio heksacianoferato difuzijos koeficientas nuo $1,88 \times 10^{-6}$ iki $5,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.
3. Nustatyta, kad $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ JSA baltymo koncentracija, kai isimobilizuoja 2,43 μg baltymo, yra optimali, atliekant imobilizaciją 2 val. 4 °C ITO/PDA mėginio paviršiuje. Srovės stiprio pokytis, registruotas DIV metodu, tiesiškai priklauso nuo imobilizuojamo JSA baltymo koncentracijos tirpalo intervale nuo 5 iki $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.
4. Elektrocheminiai jutikliai paruošti imobilizuojant JSA baltymą 2 val. 4 °C arba panaudojus kovalentinį modifikavimą, netinka specifinių Anti-JSA antikūnų nustatymui. Tuo metu imobilizuojant JSA baltymą PDA sluoksnyje glutaro aldehido garais DIV metodu registruojamas ties smailės maksimumo vieta srovės stiprio pokytis tiesiškai priklauso nuo Anti-JSA antikūnų koncentracijos intervale nuo 2,5 iki $15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Polidopaminas gali būti taikomas, kuriant imuninius jutiklius ZnO nanostruktūrų pagrindu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. J. H. Ryu, P. B. Messersmith, H. Lee, Polydopamine surface chemistry: a decade of discovery, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10 (2018) 7523–7540.
2. H. Q. Tran, R. Batul, M. Bhave, A. Yu, Current advances in the utilization of polydopamine nanostructures in biomedical therapy, *Biotechnology Journal*, 14 (2019).
3. Y. Wan, D. Zhang, Y. Wang, P. Qi, B. Hou, Direct immobilization of antibodies on a bioinspired architecture as a sensing platform, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 2595–2600.
4. A. Ali, A. R. Phull, M. Zia, Elemental zinc to zinc nanoparticles: is ZnO NPs crucial for life? Synthesis, toxicological, and environmental concerns, *Nanotechnology Reviews*, 7(5) (2018) 413–441.
5. A. Kołodziejczak-Radzimska, T. Jesionowski, Zinc oxide – from synthesis to application: a review, *Materials*, 7 (2014) 2833–2881.
6. S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosensors and Bioelectronics*, 70 (2015) 498–503.
7. L. Yanlan, A. Kelong, L. Lehui, Polydopamine and its derivative materials: synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 5057–5115.
8. P. Palladino, F. Bettazzi, S. Scarano, Polydopamine: surface coating, molecular imprinting, and electrochemistry — successful applications and future perspectives in (bio)analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (2019) 4327–4338.
9. K. Patel et.al., Polydopamine films change their physicochemical and antimicrobial properties with a change in reaction conditions, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20 (2018) 5744–5755.
10. N. Singh et.al., Electrochemical impedance spectroscopy reveals a new mechanism based on competitive binding between Tris and protein on a conductive biomimetic polydopamine surface, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20 (2018) 25812–25821.
11. Z. Xia et.al., Facile synthesis of polydopamine - coated molecularly imprinted silica nanoparticles for protein recognition and separation, *Biosensors and Bioelectronics*, 47 (2013) 120–126.
12. M. T. Cortes et.al., Bioinspired polydopamine synthesis and its electrochemical characterization, *Journal of Chemical Education*, 96(6) (2019) 1250–1255.
13. H. Coskun et.al., Chemical vapor deposition - based synthesis of conductive polydopamine thin - films, *Thin solid films*, 645 (2018) 320–325.
14. L. C. Almeida et.al., Electrosynthesis of polydopamine films - tailored matrices for laccase - based biosensors, *Applied Surface Science*, 480 (2019) 979–989.
15. H. Lee, J. Rho, P. B. Messersmith, Facile conjugation of biomolecules onto surfaces via mussel adhesive protein inspired coatings, *Advanced Materials*, 21 (2009) 431–434.
16. Q. Wei et.al., Improving the blood compatibility of material surfaces via biomolecule - immobilized mussel - inspired coatings, *J. Biomed. Mater. Res.*, 96A (2010) 38–45.
17. L. Zhou et.al., Immobilization of glucose oxidase on polydopamine – functionalized graphene oxide, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175 (2014) 1007–1017.

18. D. Chen, L. Zhao, W. Hu, Protein immobilization and fluorescence quenching on polydopamine thin films, *Journal of Colloid and Interface Science*, 477 (2016) 123–130.
19. P. Zhang, M. He, Y. Zeng, Ultrasensitive microfluidic analysis of circulating exosomes using nanostructured graphene oxide/polydopamine coating, *Lab Chip*, 16 (2016) 3033–3042.
20. G. Wang et.al., Dual amplification strategy for the fabrication of highly sensitive interleukin - 6 amperometric immunosensor based on poly - dopamine, *Langmuir*, 27(3) (2011) 1224–1231.
21. C. Wu et.al., QCM biosensor based on polydopamine surface for real - time analysis of the binding kinetics of protein - protein interactions, *Polymers*, 9 (2017) 482.
22. W. Chen, M. Fu, X. Zhu, Q. Liu, Protein recognition by polydopamine - based molecularly imprinted hollow spheres, *Biosensors and Bioelectronics*, 142 (2019) 111492.
23. W. H. Zhou et. al., Mussel - inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition, *Journal of Material Chemistry*, 20 (2010) 880–883.
24. S. Chen et. al., Electrochemiluminescence detection of Escherichia coli O157:H7 based on a novel polydopamine surface imprinted polymer biosensor, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9(6) (2017) 5430–5436.
25. S. Li, Y. Liu, Q. Ma, A novel polydopamine electrochemiluminescence organic nanoparticle based biosensor for parathyroid hormone detection, *Talanta*, 202 (2019) 540–545.
26. P. Xu, G. Liao, A novel fluorescent biosensor for adenosine triphosphate detection based on a metal - organic framework coating polydopamine layer, *Materials*, 11 (2018) 1616.
27. C. Liang et. al., Nanopolydopamine coupled fluorescent nanozinc oxide reinforced epoxy nanocomposites, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 102 (2017) 126–136.
28. J. Ran et.al., Growing ZnO nanoparticles on polydopamine - templated cotton fabrics for durable antimicrobial activity and UV protection, *Polymers*, 10(5) (2018) 495.
29. Y. Yang, W. Hu, Bifunctional polydopamine thin film coated zinc oxide nanorods for label - free photoelectrochemical immunoassay, *Talanta*, 166 (2017) 141–147.
30. K. Alfaramawi, Electric field dependence of the electron mobility in bulk wurtzite ZnO, *Bulletin of Materials Science*, 37(7) (2014) 1603–1606.
31. R. M. Hewlett, M. A. McLachlan, Surface structure modification of ZnO and the impact on electronic properties, *Advanced Materials*, 28 (2016) 3893–3921.
32. M. V. Gallegos et. al., Structural and optical properties of ZnO and manganese - doped ZnO, *Journal of Alloys and Compounds*, 689 (2016) 416–424.
33. R. Triboulet, Growth of ZnO bulk crystals: a review, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 60 (2014) 1–14.
34. Edgar Alves Araujo Junior et. al., Synthesis, growth mechanism, optical properties and catalytic activity of ZnO microcrystals obtained via hydrothermal processing, *RSC Advances*, 7 (2017) 24263–24281.
35. E. B. Magnusson et. al., Surface acoustic wave devices on bulk ZnO crystals at low temperature, *Applied Physics Letters*, 106 (2015) 063509.
36. M. J. F. Empizo et. al., Photoluminescence investigations of bulk and microstructured ZnO crystals for scintillator applications, *Journal of Ceramic Processing Research*, 16(1) (2015) 98–101.
37. A. Rahmati, M. Yousefi, Well oriented ZnO nanorods array: negative resistance and optical switching, *Journal of Inorganic and General Chemistrys ZAAC*, 643 (2017) 870–876.

38. S. Alfarisa et. al., Morphological and structural studies of ZnO micro - nanorod structures synthesized using a low - cost hydrothermal method, *Makara Journal of Science*, 22/2 (2018) 59–66.
39. W. Li et. al., Electronic properties of ZnO nanorod MIS structure, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 24 (2013) 3788–3792.
40. T. Jansson et. al., Antibacterial effects of zinc oxide nanorod surfaces, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12 (2012) 7132–7138.
41. E. Karakose, H. Colak, Effect of substrate temperature on the structural properties of ZnO nanorods, *Energy*, 141 (2017) 50–55.
42. L. V. Podrezova et. al., Properties of ZnO nanorods grown by hydrothermal synthesis on conductive layers, *Crystal Research & Technology*, 8 (2014) 599–605.
43. E. Koenig, A. Jacobs, G. Lisensky, Properties of semiconductors: synthesis of oriented ZnO for photoelectrochemistry and photoremediation, *Journal of Chemical Education*, 94 (2017) 738–742.
44. X. Zhang, Y. Xia, T. He, Tuning photoluminescence properties of ZnO nanorods via surface modification, *Materials Chemistry and Physics*, 137 (2012) 622–627.
45. B. Yang. et. al., Photoluminescence properties of ZnO thin films prepared by DC magnetron sputtering, *Journal of Central South University of Technology*, 15(4) (2008) 449–453.
46. S. L. Walden et. al., Nonlinear absorption and fluorescence in ZnO and ZnO – Au nanostructures, *Advanced Optical Materials*, 4 (2016) 2133–2138.
47. R. Jetson, K. Yin, K. Donovan, Z. Zhu, Effects of surface modification on the fluorescence properties of conjugated polymer/ZnO nanocomposites, *Materials Chemistry and Physics*, 124 (2010) 417–421.
48. C. Satriano, M. E. Fragala, Y. Aleeva, Ultrathin and nanostructured ZnO - based films for fluorescence biosensing applications, *Journal of Colloid and Interface Science*, 365 (2012) 90–96.
49. Ch – H. Sang et. al., Fluorescence enhancement and multiple protein detection in ZnO nanostructure microfluidic devices, *Biosensors and Bioelectronics*, 75 (2015) 285–292.
50. J – I. Hahm, Zinc oxide nanomaterials for biomedical fluorescence detectio, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14 (2014) 475–486.
51. J. Truong et. al., Polarization - resolved mechanistic investigation of fluorescence signal intensification on zinc oxide nanorod ends, *Nanoscale*, 9 (2017) 8164–8175.
52. T. Feng et. al., Structure transformation of hydrothermally treated ZnO nanorod array, *Materials Letters*, 163 (2016) 102–105.
53. P. Dash, A. Manna, N. C. Mishra, S. Varma, Synthesis and characterization of aligned ZnO nanorods for visible light photocatalysis, *Physica E: Low - dimensional Systems and Nanostructures*, 107 (2018) 38–46.
54. B. O. Adetoye et. al., Crystal growth of nanostructured zinc oxide nanorods from the seed layer, *Materials Science - Poland*, 36(3) (2018) 477–482.
55. Y. Li et. al., Fabrication of ZnO nanorod array - based photodetector with high sensitivity to ultraviolet, *Physica B*, 404 (2009) 4282–4285.
56. H. Ghannam et. al., Control of the growth of electrodeposited zinc oxide on FTO glass, *CrystEngComm*, 20 (2018) 6618–6628.
57. R. Yakimova et. al., ZnO materials and surface tailoring for biosensing, *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 4 (2012) 254–278.

58. F. Ahmed et. al., Low temperature growth of ZnO nanotubes for fluorescence quenching detection of DNA, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27 (2016) 189.
59. W. Hu et. al., ZnO nanorods - enhanced fluorescence for sensitive microarray detection of cancers in serum without additional reporter – amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3683–3687.
60. S. N. Sarangi, S. Nozaki, S. N. Sahu, ZnO nanorod - based non - enzymatic optical glucose biosensor, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11 (2015) 988–996.
61. H. H. Mai et. al., Non - enzymatic fluorescent biosensor for glucose sensing based on ZnO nanorods, *Journal of Electronic Materials*, 46 (2017) 3714–3719.
62. X. Zong, R. Zhu, ZnO nanorod - based FET biosensor for continuous glucose monitoring, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255 (2017) 2448–2453.
63. Y. Cheng et. al., Highly sensitive luminol electrochemiluminescence immunosensor based on ZnO nanoparticles and glucose oxidase decorated graphene for cancer biomarker detection, *Analytica Chimica Acta*, 745 (2012) 137–142.
64. R. Viter et. al., Photoelectrochemical bisphenol S sensor based on ZnO - nanorods modified by molecularly imprinted polypyrrole, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 221 (2020) 1900232.
65. Bradford assay protein quantification with one phase association. Prieiga per internetą: <https://github.com/harleyk/Bradford-Assay-Protein-Quant-with-One-Phase-Assoc>
66. Ch. Georgiou, K. Grintzalis, G. Zervoudakis, I. Papapostolou, Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(1) (2008) 391 – 403.
67. Barry Arkles, Hydrophobicity, hydrophilicity and silanes, *Paint and Coatings Industry*, 22(10) (2006) 114.
68. Cyclic voltammetric study of ferrocyanide/ferricyanide redox couple. Prieiga per internetą: http://web.mnstate.edu/marasing/CHEM480/labs/LABS/CV/Cyclic%20voltammetric%20study%20of%20ferrocyanide_ferricyanide%20redox%20couple.pdf
69. N. Elgrishi et. al., A practical beginner's guide to cyclic voltammetry, *Journal of Chemical Education*, 95 (2018) 197 – 206.
70. B. Kruczek, Diffusion coefficient, Iš: Drioli E., Giorno L. (eds) *Encyclopedia of Membranes* (2015), Springer, Berlin, Heidelberg.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

ANŽELIKA DAMAŠKAITĖ

Polidopamino taikymas biologiniuose jutikliuose

Darbe nagrinėjamas polidopamino (PDA) tinkamumas konstruojant elektrocheminį imuninį jutiklį antikūnų prieš jaučio serumo albuminą (JSA) nustatymui. Mėginio hidrofiliškumas padidėja dėl PDA sluoksnio užnešimo ant ITO dengto stiklo, be to, mėginiai, padengti iš $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentracijos dopamino tirpalo pasižymėjo labiau hidrofilišėmis savybėmis, negu mėginiai, kurių padengimui buvo naudojamas $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ koncentracijos dopamino tirpalas. Ciklinės voltamperometrijos metodu buvo nustatyta, kad dėl PDA sluoksnio užnešimo ant ITO dengto stiklo sumažėja kalio heksacianoferato difuzijos koeficiento reikšmė. Diferencinės impulsinės voltamperometrijos metodu buvo registruojamas srovės stiprio pokytis po biomolekulių imobilizacijos ir nustatyta, kad srovės stiprio pokytis tiesiškai priklauso nuo imobilizuojamo JSA baltymo tirpalo koncentracijos intervale nuo 5 iki $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, o JSA imobilizavimui optimali baltymo tirpalo koncentracija yra $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lyginant skirtingus JSA imobilizavimo variantus nustatyta, kad specifiniam Anti-JSA antikūnų nustatymui tinkamiausias yra JSA imobilizavimas glutaro aldehido garais. Naudojant minėtą imobilizacijos metodą srovės stiprio pokytis tiesiškai priklauso nuo naudojamų Anti-JSA antikūnų tirpalų koncentracijos intervale nuo 2,5 iki $15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Modifikavus PDA sluoksniu ZnO nanostrypus, susintetintus ant ITO dengto stiklo, bei JSA baltymu, surišus mėginio paviršiuje glutaro aldehido garais, galioja tiesinė srovės stiprio pokyčio priklausomybė nuo Anti-JSA antikūnų koncentracijos intervale nuo 2,5 iki $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

ANŽELIKA DAMAŠKAITĖ

Application of polydopamine in biological sensors

The suitability of polydopamine (PDA) for design of electrochemical immune sensor for the detection of antibodies against bovine serum albumin (BSA) was investigated. The hydrophilicity of the sample increases due to PDA layer deposition on the ITO coated glass surface. In addition, the samples surface with PDA layer synthesized from 0,5 mg mL⁻¹ dopamine solution was more hydrophilic than samples surface with PDA layer deposited from 0,1 mg mL⁻¹ dopamine solution. Cyclic voltammetry measurements showed that the diffusion coefficient of potassium hexacyanoferrate decreases after deposition of PDA layer on ITO coated glass. Differential pulse voltammetry measurements showed that current intensity at the peak decreases after immobilization of biomolecules on the samples surface. Changes in current intensity at the peak depends on the concentration of BSA protein solution. The linear dependence was observed in range from 5 to 100 µg mL⁻¹. The optimal BSA protein solution concentration for immobilization is 100 µg mL⁻¹. Comparing the BSA immobilization methods, it was found that immobilization of BSA using crosslinking with glutaraldehyde vapor is the most suitable method for fabrication of immunosensor for the specific detection of Anti-BSA antibodies. It was observed that changes in current intensity at peak linearly depends on the concentration of Anti-BSA solution concentration in range from 2,5 to 15 µg mL⁻¹ using glutaraldehyde vapor for BSA immobilization. After modification of ZnO nanorods with PDA layer and immobilization of BSA protein using glutaraldehyde changes of current intensity at the peak were linearly dependent on the concentration of Anti-BSA antibodies concentration in range from 2,5 to 10 µg mL⁻¹.