

Био-инженерчлэл

# ХЕПАТИТИЙН ДЕЛЬТА ВИРҮСИЙН ХАЛДВАРЫГ ИЛРҮҮЛЭХ ГАДАРГУУГИЙН ПЛАЗМОН РЕЗОНАНС ДЭЭР ҮНДЭСЛЭСЭН ОНОШЛУУРЫГ ЗОХИОН БҮТЭЭХ

А. Номин<sup>1,\*</sup>, Э. Номин-Эрдэнэ<sup>2</sup>, М. Бадмаараг<sup>1</sup>, Н. Хулан<sup>1</sup>, Н. Эрдэнэ<sup>3</sup>, О. Одгэрэл<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Генийн инженерчлэлийн лаборатори

<sup>2</sup>МУИС, ШУС, БУС, Физикийн тэнхим, Лазерын судалгааны төв

<sup>3</sup>МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Нанотехнологийн төв

<sup>4</sup>Элэгний төв

Received on 2021.04.14; Revised on 2021.06.24; Accepted on 2021.07.01

\*Холбоо баригч зохиогч: anomin0110@gmail.com

## Хураангуй

Монгол улс хепатит вирусийн халдварын тархалт болон элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан нас баралтын тоогоороо дэлхийд нэгдүгээрт, элэгний өвчлөлөөрөө найм дугаарт эрэмбэлэгдэж байна. Элэгний өвчлөл их байгаагийн нэг том шалтгаан нь хепатит дельта вирусийн (ХДВ) халдвар юм. Гадаргуугийн плазмон резонансын (ГПР) оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийг оношлох шинжилгээг хийвэл бодит хугацааны анализ явуулан шинжилгээний хариу хурдан гарах ба мэдрэг чадвар харьцангуй өндөр, нэмэлт молекул ашиглахгүй, дахин хэрэглэж болох зэрэг олон давуу талтай. ГПР-ын оношлуурыг угсрахдаа алтны нано бөөм болон балк (bulk) бүтэцтэй алт ашиглан хоёр төрлийн оношлуур бэлтгэн тус тус харьцуулан судалсан. Алтны нано бөөмийг сонгодог Туркевичийн аргаар  $32 \pm 19$  нм болон  $60 \pm 8$  нм хэмжээтэй синтезлэн гаргаж, меркаптоандеканы хүчлийн (MUA) холбогчийг фосфатын буфер орчинд Tween 20 - ыг физисорбцилож тогтворжуулан холбосон. Урвалын дараа алтны нано бөөмийн гадаргуу дээр карбоксил функционал бүлэг суусан. Гадаргуу дээрх функционал бүлгийг 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид/Н-Гидроксисукуцинимид (EDC/NHS) биохолбогчдын тусламжтай урвалын идэвхтэй завсрын бүтээгдэхүүн рүү шилжүүлж ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч уурагтай ковалент холбоогоор холбосон. Ийнхүү амин бүлэг суулган идэвхжүүлсэн шилэн дээр ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч бүхий алтны нано бөөмийг холбон эхний оношлуур бэлэн болсон. Балк (bulk) бүтэцтэй алт ашигласан оношлуурыг угсрахдаа плазма спуттер багажаар 50 нм орчим зузаантай алтны нимгэн үе суулгасан ба пирана уусмалаар алтны гадаргууг идэвхжүүлж гидроксил бүлэг суулгасан. Үүний дараа MUA холбогчоор карбоксил функционал бүлэгтэй болгон өмнөх туршилтын адил EDC/NHS биохолбогчдыг ашиглан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч уургийг алтны нимгэн үетэй холбосон. оношлуурын холболтууд бүрэн явагдаж, угсралт амжилттай болсныг фотоны хөндлөн корреляцын спектроскоп, хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр, нил улаан туяаны спектрометр, энергийн дисперсийн рентген спектрийн багажит анализар баталсан. Угсарсан оношлуурын ажиллагааг баталгаажуулахын тулд ELISA арга зүйг ашиглан өнгөний хувирал болон шингээлтийн эрчмийг хэмжин тодорхойлсон. ГПР-ын багажийг Лазерын судалгааны төвд шинээр угсран, эерэг болон сөрөг дээж дээр харьцуулан хэмжилт явуулахад шингээлтийн эрчим болон өнцгийн шилжилтийн ялгаатай үр дүн гарсан. Энэ нь оношлуур дээр холбосон ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчтэй дээж буюу ийлдэс дэх ХДВ-ийн эсрэгбие холбогдож бидний оношлуур ажиллаж байгааг баталсан. Бид судалгааны ажлаараа ХДВ-ийг оношлох ГПР-ын технологид суурилсан оношлуурын хоёр төрлийн загварыг бүтээсэн ба ХДВ-ийн халдварыг оношлож эрт илрүүлснээр элэгний хатуурал, элэгний дутагдал, элэгний хавдраар нас баралтыг бууруулах боломжтой юм.

**Түлхүүр үг:** алтны нано бөөм, алтны нимгэн үе, эсрэгтөрөгч, эсрэгбие

## 1 Удиртгал

Хепатит дельта вирус (ХДВ) нь элэгний өвчлөл үүсгэдэг шалтгаануудын нэг бөгөөд хепатит В вирусийн (ХБВ) гадаргуугийн эсрэгтөрөчийг ашиглах замаар ХБВ-тэй давхар халдварлагддаг. [1, 2]. 2010-аас 2019 оны хооронд хийгдсэн судалгааны нэгтгэлээр дэлхийн хэмжээн дэх ХБВ-ийн гадаргуугийн эсрэгтөрөч (HBsAg) эерэг хүн амын 4.5 хувь нь ХДВ халдвартай байгаа нь тогтоогдсон бөгөөд дэлхийн нийт хүн амын 0.16 хувь буюу 12 сая хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон [3]. Харин Монгол улсын хүн амын 8.03 (5.26- 12.08) хувь нь ХДВ-ийн халдвартай буюу 239 (157-360) мянган хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон байна [4–6].

Сүүлийн жилүүдэд ГПР дээр үндэслэсэн оношлуурын хөгжүүлэлт, судалгаа эрчимтэй явагдаж байна. Энэхүү оношлуурын хувьд металлын гадаргуу дээр лиганд холбосон байх ба лазер гэрлийн үүсгүүрээс гарч буй гэрэл нь сенсорын гадаргуугаас дотоод бүрэн ойлтоор ойж детекторт очиж бүртгэгдэнэ. Гэрэл тусах өнцгийг өөрчилснөөр резонансын өнцгөөр тусах үед дотоод бүрэн ойлтоор ойхоо больж, ГПР-ын үзэгдлийн улмаас металлын гадаргуугаар долгион болгон тархана. Энэ үед детекторт гэрлийн эрчим бүртгэгдэхээ болино. Гэрлийн тусаж буй өнцөг дахин өөрчлөгдөхөд гэрэл эргэн дотоод бүрэн ойлтоор ойж эхэлнэ. Хэрэв оношлуурын гадаргуу дээр зорилтот аналит ирж суувал ГПР үүсч буй өнцөг нь өөрчлөгддөг. Гадаргуугийн плазмоныг өдөөхөд хэрэглэгддэг сараалжит конфигураци, Оттогын конфигурациуд байдаг ба хамгийн өргөн хэрэглэгддэг геометр бол Кречманы конфигураци юм [7]. Энэхүү судалгаанд бид Кречманы конфигураци дээр суурилсан ГПР-ын багаж угсран хэмжилт явуулсан.

ГПР-ын оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэн оношлох нь бодит хугацааны анализ хийн шинжилгээний хариу хурдан гарах, мэдрэг чадвар харьцангуй өндөр, нэмэлт молекул ашиглахгүй, дахин хэрэглэж болох зэрэг олон давуу талтай [8].

## 2 Материал, арга зүй

### 2.1 Алтны nano бөөм синтезлэх

Алтны хлоридын 0.25 mM 50 мл уусмал болон 1% 5 мл натрийн цитратын уусмал бэлтгэнэ. Алтны хлоридын уусмалыг соронзон хутгуур дээр 80°C болон 95°C хүртэл халааж температур тогтворжих үед натрийн цитратын уусмалыг хийж хутгуурыг ажиллуулж уусмал өнгөгүйгээс хөх, нил ягаан, хэсэг хугацааны дараа улаан өнгөтэй болон хувирмагц nano бөөм үүссэн гэж үзэн урвалыг зогсооно [9].

### 2.2 Алтны nano бөөмийг MUA холбогчоор бүрэх

10 mM pH=6.8 фосфатын буфер - Tween 20 уусмал бэлгэж 5 мл синтезлэсэн алтны nano бөөм дээр 5 мл уусмалыг нэмж 20 минут зөөлөн хутгана. Нийт 10 мл Tween 20 физисорбцилсон алтны nano бөөмийн уусмал дээр 0.5 mM MUA (этанол:ус 1:3) уусмал нэмнэ. MUA-аар химисорбцилож бүрэхийн тулд 11 цагийн турш тасралтгүй зөөлөн хутгана [10].

### 2.3 MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны nano бөөмийг эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоогоор холбох

MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны nano бөөмийг 3 удаа угааж фосфатын буфер - Tween 20 pH=6.8-д уусгана. Бүрхэгдсэн алтны nano бөөм дээр 10 мг/мл 1 мкл EDC нэмж, 15 минутын турш идэвхжүүлнэ. 10 мг/мл 2 мкл NHS нэмж 10 минут идэвхжүүлнэ. 8400 эрг/мин хурдаар 15 минут центрифуг ашиглан фосфатын буфер - Tween 20 pH = 6.8 уусмалаар илүүдэл EDC, NHS-ийг угаана. Идэвхжсэн алтны nano бөөм дээр 197.53 мкг/мл концентрацтай 50 мкл эсрэгтөрөгч нэмж 2 цагийн турш инкубацлана. Улмаар алтны nano бөөм эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоо үүсгэнэ. 6000 эрг/мин хурдаар 15 минут центрифуг ашиглан алтны nano бөөмтэй урвалд ороогүй илүүдэл эсрэгтөрөгч, бусад бодисыг фосфатын буфер - Tween 20 pH = 6.8 ашиглан угаана. Илүүдэл урвалд ороогүй уургаас салгасны дараа тунаж үлдсэн эсрэгтөрөгчтэй холбогдсон алтны nano бөөм дээр 200 мкл фосфатын буфер pH = 5.8 нэмж уусгана [11].

### 2.4 Эсрэгтөрөгчтэй холбосон алтны nano бөөмийг шилэн дээр суулгах

Цэвэрлэж бэлтгэсэн шилэн дээр 100 мкл пирана уусмал дусааж 20 минут инкубацлана. Идэвхжүүлсэн шилний гадаргууг нэрмэл усаар 3 удаа цэвэрлэж илүүдэл урвалд ороогүй пиранаг цэвэрлэнэ. Идэвхжүүлсэн шилний гадаргууд 100 мкл бэлтгэсэн 5 % APTES дусаан 90 минут чийгтэй орчинд 4°C-т инкубацлана. Энэ үед идэвхжсэн гадаргуу дээр APTES-ийн молекулууд өөрөө эрэмбэлэгдэн сууна. APTES-ийн өөрөө эрэмбэлэгдэх үе суусан шилийг этанолоор 3 удаа цэвэрлэн урвалд ороогүй илүүдэл бодисыг цэвэрлэнэ. APTES-ийн өөрөө эрэмбэлэгдэх нимгэн үе суулгасан шилэн дээрээ эсрэгтөрөгч буюу уурагтай холбогдсон алтны nano бөөмийн уусмалаас 100 мкл хийж 60 минут инкубацлана. Бэлэн болсон шилийг 3 удаа шүршин цэвэрлэж илүүдэл холбогдоогүй уургийг сайтар цэвэрлэнэ.

### 2.5 Алтны нимгэн үе суулгах

Алтны нимгэн үе суулгах ВК 7 шилийг ГИБ болон органик уусгагчдаар сайтар цэвэрлэн, гүйцэд хатаана. Плазма спуттер багажид цэвэрлэсэн шилийг голлуулан байрлуулна. Багажийг битүүмжлэн

тагласны дараа асаан минутын заалтыг 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 минутаар тус тус тохируулан найман өөр алтны нимгэн үеийн дээж бэлтгэнэ. Алтны нимгэн үе суулгасан шилийг петрийн тавганд дээш харуулан хийж битүүмжилнэ.

## 2.6 Алтны нимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлж эсрэгтөрөгчтэй холбох

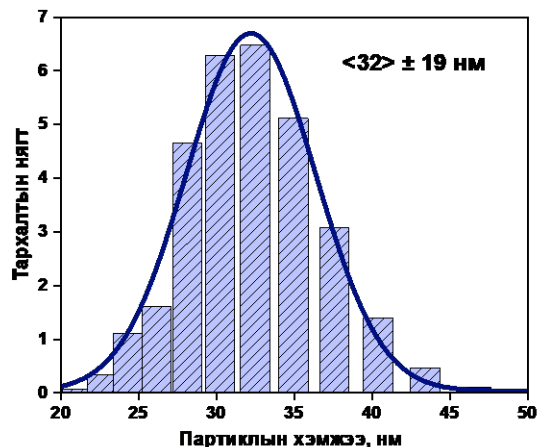
Нимгэн үе суулгасны дараа шилэн дээр маск тавьж зай гаргахгүй байхаар сайтар битүүмжилнэ. Цэвэрлэж бэлтгэсэн шилэн дээр 100 мкл пирана ( $H_2SO_4 : H_2O_2 ; 2:1$ )  $60^\circ C$  хүртэл хөргөн хийж 1 минут идэвхжүүлнэ. Пиранагаар идэвхжүүлсэн шилэн дээр этанолд уусгасан 10 мМ MUA –аас тус бүр маскны нүхэнд 100 мкл хийж 24 цагийн турш  $4^\circ C$ -т чийгтэй орчинд сайтар битүүмжлэн инкубацлана. MUA-ийг шавхан цэвэрлэж, гадаргууг 5 удаа нэрмэл усаар угаана. Гадаргууг нь идэвхжүүлсэн алтны нимгэн үе дээр 75 мМ EDC, 15 мМ NHS-ын PBS-д уусгаж бэлтгэн, нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. EDC/NHS бүхий уусмалыг шавхан гадаргууг PBS-р 5 удаа угааж хатаана [12]. Карбоксил бүлэг суулгасан алтны нимгэн үе дээр ХДВ-ийн гадаргуугийн уургаас (эсрэгтөрөгч) нүх тус бүрийг бүрхэж байхаар 120 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. Уураг холбосон алтны сенсороо PBS-ээр 5 удаа угаана. 5 % Skim milk PBS-д бэлтгэж нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг блокинг хийнэ. Блокинг хийсний дараа сенсороо 5 удаа PBST 0.1 % ашиглан угаана [13].

## 3 Үр дүн

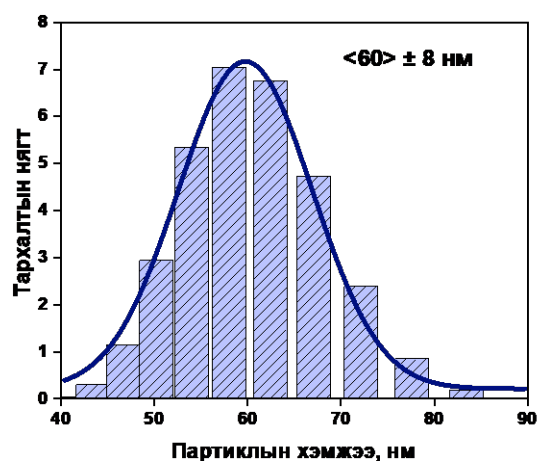
### 3.1 Туркевичийн аргаар синтезлэсэн алтны nano бөөмийн үр дүн

Алтны nano бөөмийг синтезлэхдээ урвалын температур их ба урвалын температур бага үед, харгалзан натрийн цитратын агууламж их ба бага үед туршилт явуулсан. *Зураг 1, 2*-д фотон кросс корреляцын спектрометрийн үр дүнгээр алтны nano бөөмийн хэмжээний тархалтыг харуулав. Урвалын температур буурахад nano бөөм үүсгэдэг атомын зөөлт, хөдөлгөөн уусмалд удааширна. Уусмалд прекурсор үүсч дуусаагүй байхад түрүүлж үүссэн алтны цөм дараагийн шатны ургах процессоо эхлүүлснээр том алтны nano бөөм үүсдэг. Эсрэгээрээ температур их, урвал хурдан явагдах үед бүх прекурсор нь цөм үүсэх процессод нэгэн зэрэг ашиглагдаж дараагийн шатны ургах процессод цөөн хэдэн мономер л үлдсэн байдаг учраас бага хэмжээтэй алтны nano бөөм үүсдэг. Иймд урвалын температур харьцангуй өндөр буюу  $95^\circ C$  байхад  $32 \pm 19$  нм хэмжээтэй,  $80^\circ C$  байхад түүнээс том  $60 \pm 8$  нм хэмжээтэй байгаа нь судалгааны үр дүнтэй давхцаж байна. [14].

Үзэгдэх гэрлийн мужид спектр өгдөг бодисууд өнгөтэй байдаг ба синтезлэсэн алтны nano бөөм хэмжээнээс хамааран улаанаас нил ягаан өнгөтэй байх ба 500-600 нм-ын долгионы уртад шингээлт өгдөг.



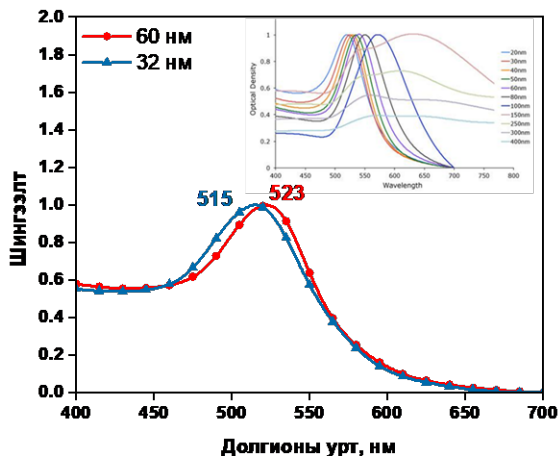
Зураг 1: Урвалын температур  $95^\circ C$  үеийн фотон кросс корреляцийн спектр



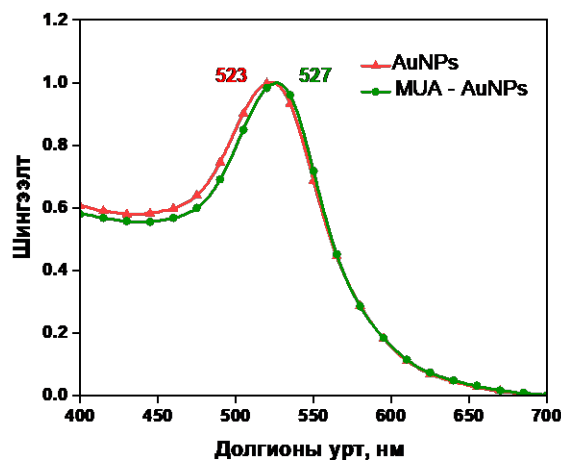
Зураг 2: Урвалын температур  $80^\circ C$  үеийн фотон кросс корреляцийн спектр

Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрээс харахад 60 нм алтны nano бөөм нь 515 нм-т шингээлт өгсөн бол 32 нм хэмжээтэй nano бөөм 523 нм-т шингээлтийн утга өгсөн байна. Үүнээс харахад nano бөөмийн хэмжээ томрох тусам долгионы урт ихтэй мужруу пикийн шилжилт өгдөг. *Зураг 3*-ын [15] утгатай тохирч байна. Алтны nano бөөмийг ГПР-ын сенсорт ашиглахад 50 нм хэмжээ хамгийн тохиромжтой оптимал тул цаашдын судалгаанд 60 нм хэмжээтэй синтезлэсэн алтны nano бөөмийг хэрэглэв [16].

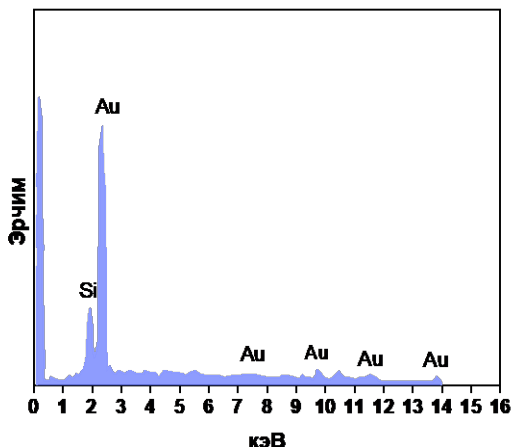
Хүснэгт 1-с харахад синтезлэсэн nano бөөмийн элементийн анализ хийхэд алтны эзлэх хувь 95 %, цахиур 5 % байсан. Шилэн дээр суулгасан алтны nano бөөмийн өөрөө угсрагдах моноүе бэлтгэсэн дээжийг энергийн дисперсийн рентген спектроскопоор хэмжүүлсэн ба шилэн дэх цахиур илэрсэн гэж дүгнэж байна.



Зураг 3: Хоёр өөр аргаар синтезлэсэн алтны nano бөөмийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба алтны nano бөөмийн хэмжээнээс хамаарсан хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [15]



Зураг 5: Синтезлэсэн алтны nano бөөм болон MUA холбогчоор бүрсэн алтны nano бөөмийг харьцуулсан хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр



Зураг 4: Алтны nano бөөмийн энергийн дисперсийн рентген спектр

Хүснэгт 1: Алтны nano бөөмийн энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал

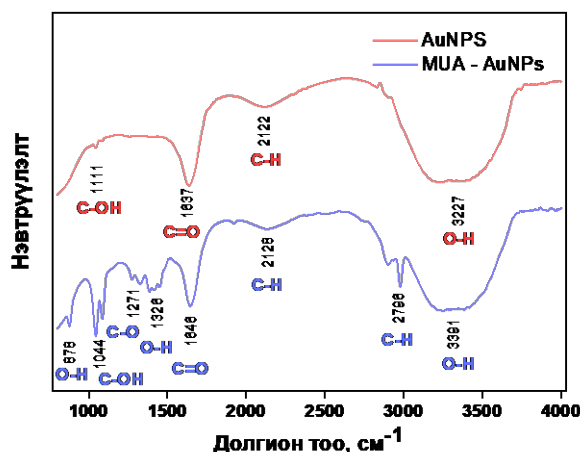
№	Элемент	Масс, %
1	Алт	95
2	Цахиур	5

### 3.2 Алтны nano бөөмийг MUA холбогчоор бүрсэн үр дүн

Алтны nano бөөмийг синтезлэсний дараа MUA (меркаптоандеканы хүчил) холбогчоор бүрсэн. MUA линкер нь нэгдүгээрт алтны nano бөөмийн гадаргууг карбоксил бүлгээрээ функционалжуулах, хоёрдугаарт бүрэн бүрсний дараа агрегацад орохоос сэргийлэх тогтворжуулагчийн үүрэгтэй ба тол-

гой бүлэг (тиол бүлэг,  $-SH$ ), гинжин хэлхээ (10 нүүрстөрөгчийн алкан), сүүл хэсэг (карбоксил бүлэг,  $-COOH$ )-ээс тогтоно.

Шинжилж буй нэгдлийн функционал бүлэг болон зарим халагчийг солих, гинжин хэлхээг өөрчлөх, янз бүрийн уусгагчаар үйлчлэх мөн түүнчлэн гадаад хэлхээг өөрчлөх үед шингээлтийн спектрийн пик шилждэг [17]. Зураг 5-с харахад 60 nm алтны nano бөөм дээр алкантиол MUA линкерийг химисорбцолсны дараа пикийн шингээлтийн долгионы урт 523 nm-ээс 527 nm-ийн муж хүртэл шилжсэн, энэ нь металл nano бөөмийн гадуур зузаан давхарга үүссэнийг илтгэнэ. Харин шингээлтийн спектр өргөсөөгүй нь бөөм агрегацад ороогүйг илтгэсэн.



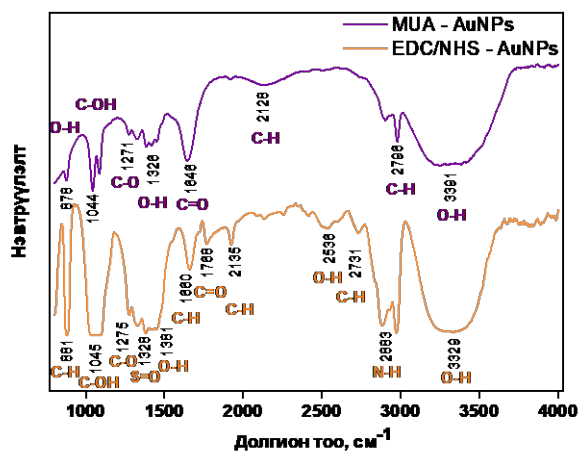
Зураг 6: Алтны nano бөөмд MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектр

Зураг 6-с MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектрийг харахад алтны nano бөөмөөс ялгарах найман пикүүд ажиглагдаж байна.  $878\text{ cm}^{-1}$ ,  $946$

см<sup>-1</sup>, 1044 см<sup>-1</sup>, 1085 см<sup>-1</sup>, 1326 см<sup>-1</sup>, 1420 см<sup>-1</sup>, 1451 см<sup>-1</sup>, 2796 см<sup>-1</sup> долгион тоон дээр пикууд өгсөн бөгөөд эдгээр нь С-Н деформац, О-Н гидроксил, С-ОН спирт болон эфир, О-Н карбоксил бүлгийн гидроксил, С-Н алкан, С-Н алдегид бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна. Үүнээс харахад карбоксил бүлгийн гидроксил болон алдегид бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж MUA линкер алтны nano бөөмийн гадаргуу дээр амжилттай холбогдсоныг харуулж байна. Мөн S-H тиол бүлгийн хэлбэлзэл 2500-2600 см<sup>-1</sup> долгион тоон дээр илрээгүй нь илүүдэл урвалд ороогүй MUA линкер центрифугдэн угагдсаны улмаас бүрэн арилсан болох нь батлагдаж байна.

### 3.3 MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны nano бөөмийг эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоогоор холбосон үр дүн

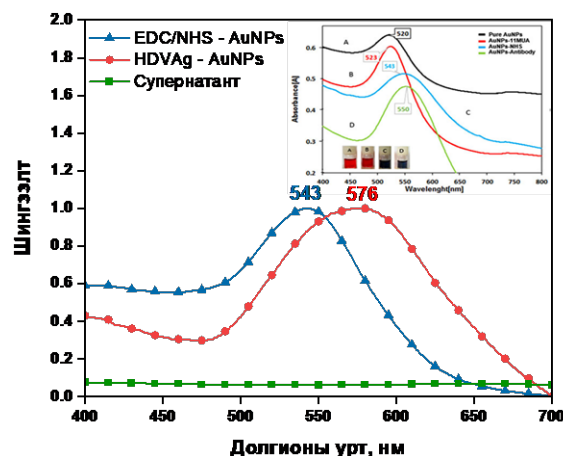
Карбоксил бүлэг -COOH нь амин бүлэгтэй -NH<sub>2</sub> бат бөх амидын холбоо үүсгэдэг. Иймд алтны nano бөөмийн карбоксил бүлэг, эсрэгтөрөгчийн гадаргуу дээрх амин бүлэгтэй ковалент холбоо үүсгэх ба энэ холбоог EDC/NHS биохолбогчдын тусламжтай бий болгодог.



Зураг 7: Алтны nano бөөмд EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектр

Зураг 7-с EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектрийг харахад MUA холбогчоор бүрсэн алтны nano бөөмөөс ялгарах долоон пикууд ажиглагдаж байна. 800 см<sup>-1</sup>, 1328 см<sup>-1</sup>, 1660 см<sup>-1</sup>, 1768 см<sup>-1</sup>, 2536 см<sup>-1</sup>, 2883 см<sup>-1</sup>, 2973 см<sup>-1</sup> долгион тоон дээр пикууд өгсөн бөгөөд эдгээр нь С-Н деформац, S=O сульфонат, С-Н алкан, С=О хүчлийн халид, О-Н карбоксил бүлгийн гидроксил, N-Н амин давсны бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна. Үүнээс харахад сульфонат болон амин бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй

шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж EDC халагдан NHS холбогдон алтны nano бөөмд карбоксил бүлэг амжилттай суусныг харуулж байна.



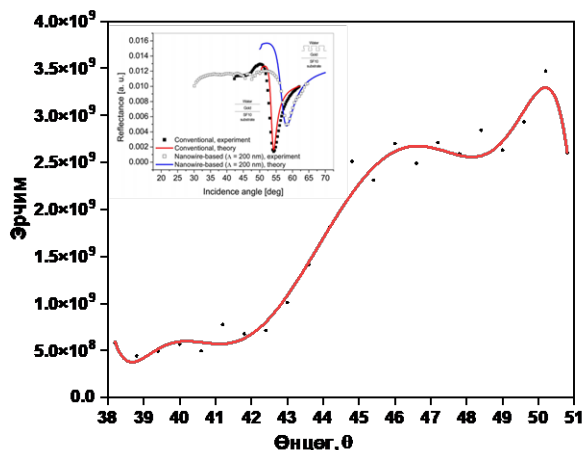
Зураг 8: Алтны nano бөөмд функционал бүлгүүд суулгахаас эсрэгтөрөгч холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба эрдэм шинжилгээний өгүүлэлд алтны nano бөөмийг модификаци хийсэн шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [18]

Зураг 8-д алтны nano бөөмд функционал бүлгүүд суулгахаас эсрэгтөрөгч холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн хэмжилтийг харуулсан. Шат бүрт пикийн хэмжээ өргөсөж, шингээж буй долгионы урт ихэссэн нь nano бөөмийн үе улам зузаарч функционал бүлгүүд нэмэгдэж, эсрэгтөрөгч сууснаар хэмжээ нь томорч буйг харуулж байна. Эрдэм шинжилгээний өгүүлэлд [18] ижил РВТ (фосфатын буфер 10 mM pH 7.0.2 мг/мл Tween 20) орчинд алтны nano бөөмийг антободитой ковалент холбоогоор холбох урвалыг явуулсан байна. Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн үр дүнг харьцуулахад цэвэр алтны nano бөөм 520 нм-т, MUA холбогчоор бүрсэн үед 523 нм-т, EDC/NHS биохолбогчид суулгасан үед 543 нм-т мөн эсрэгбие холбосны дараа 550 нм-т шингээлтийн пик өгсөн байна. Үүнээс харахад модификацийн шат бүрт шингээлт өгч буй долгионы урт ихэссэн мөн харгалзах пикийн долгионы урт нь бидний судалгааны ажилтай тохирч байна.

### 3.4 Алтны nano бөөмд суурилсан оношлуурын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн

Идэвхжүүлсэн шилэн дээр эсрэгтөрөгч холбосон алтны nano бөөмийг суулгасан. Шилийг пирана уусмал (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3:1) ашиглан гидроксил бүлэг суулган дараа нь APTEC-ын 5 % этанолон уусмалаар амин бүлэг суулгасан. Алтны nano бөөмийн гадаргуу дээрх эсрэгтөрөгчийн карбоксил бүлэг шилэн дээрх амин бүлэгтэй бат бөх амидын холбоо үүс-

гэн, урвал дууссаны дүнд шил нил ягаан өнгөтэй болсон.



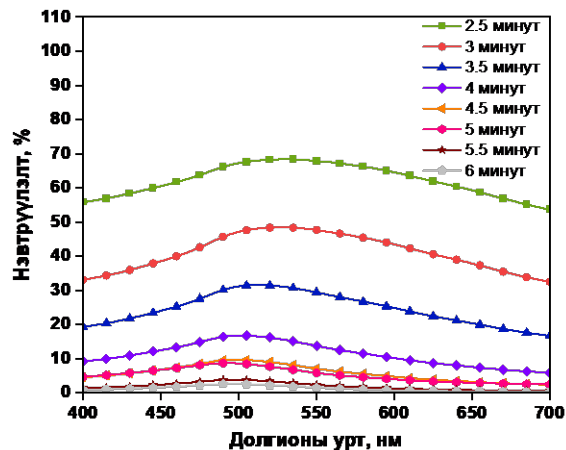
Зураг 9: Алтны нано бөөмд суурилсан оношлуурын БГПР-ын хэмжилтийн үр дүн болон эрдэм шинжилгээний өгүүллийн БГПР-ын үр дүн [19]

Угсарсан оношлуурын БГПР-ын хэмжилтийг Лазерын судалгааны төвд шинээр угсарсан багаж дээр гүйцэтгэсэн боловч ГПР-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй ба гэрлийн эрчим буурч резонансын үзэгдэл явагдалгүй эрчим улам ихэссэн Зураг 9. Эрдэм шинжилгээний өгүүлэл [19]-д БГПР-ын ойлт болон өнцгөөс хамаарсан графикийг цэнхэр өнгөөр дүрсэлсэн ба ойролцоогоор 57°C-ын өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад гадаргуугийн плазмон ажиглагдсан байна. Дээжээс хамааран тохирох тодорхой нэг өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад ойлтын эрчим буурч, детекторт лазер гэрэл бүртгэгдэхгүй болно. Энэ нь гадаргуугийн плазмон ашиглагдаж Х тэнхлэг дагуу плазмон резонанс үүсэж байгаа үзэгдэл юм. Харин бидний угсарсан оношлуурт ойлтын эрчим буурах үзэгдэл явагдахгүй, улам ихсэж байгаа учир гадаргуугийн плазмон ажиглагдахгүй байна гэж дүгнэж байна. Мөн дахин багажны нөхцөл бололцоог сайжруулан лазерын ондоо эх үүсгэвэр ашиглах, долгионы урт болон шингээлтээс хамаарсан туршилт гүйцэтгэхийг төлөвлөж байна.

### 3.5 Алтны нимгэн үе суулгасан үр дүн

Алтны нимгэн үеийн зузааныг тодорхойлох чухал шаардлагатай ба нимгэн үеийн зузааныг хэмжихийн тулд эрдэм шинжилгээний өгүүлэлээс [20] иш татан суулгасан шилний нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон.

Тус бүр дээжийг бэлтгэсний дараа хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр ашиглан нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон туршилтын графикийг Зураг 10-т харуулав. Энэхүү графикаас харахад хугацаа ихсэх тусам илүү зузаан алтны үе



Зураг 10: Найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн нэвтрүүлэлтийн хувь

сууж нэвтрүүлэлтийн хувь багасаж байгаа ба Хүснэгт 2-т найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувийг харуулав.

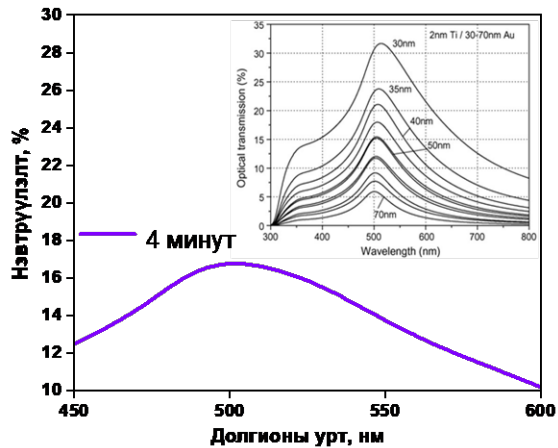
Хүснэгт 2: Тодорхой хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувь

№	Хугацаа, минут	Долгионы урт, нм	Нэвтрүүлэлт, %
1	2.5	531	68.372
2	3	527	48.425
3	3.5	513	31.531
4	4	502	16.785
5	4.5	500	9.717
6	5	493	8.740
7	5.5	500	3.809
8	6	498	2.576

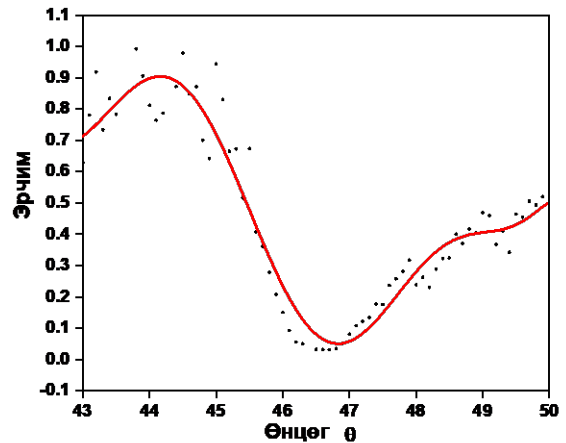
Эрдэм шинжилгээний өгүүлэлтэй [20] харьцуулахад 50 нм зузаан алтны нимгэн үе 500 нм орчим долгионы уртад нэвтрүүлэлт 15.2 % байсан. Найман өөр хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеэс 4 минут үргэлжилсэн нимгэн үе нь 502 нм-т 16.7 % байгаа нь өмнөх өгүүлэлтэй харьцуулахад хамгийн ойролцоо үр дүн болсон. Иймээс 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийг 50 нм-тэй хамгийн ойролцоо гэж дүгнэсэн. Цаашдын оношлуурын угсралт болон туршилтад алтны нимгэн үеийг 4 минут суулган ашиглахаар шийдсэн.

50 нм алтны нимгэн үе суулгасан шилийг гадаргуугийн плазмон үүсэж буй эсэхийг шалгах зорилгоор Лазерын судалгааны төвд угсарсан ГПР-ын багажийг ашиглан хэмжилт явуулсан бөгөөд Зураг 12-т харагдаж буй үр дүн гарсан. Энэхүү графикаас харахад гадаргуугийн плазмон үүсэж байгаа бөгөөд





Зураг 11: 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь Эрдэм шинжилгээний өгүүмлийн хэмжээний хувьд ялгаатай алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь [20]



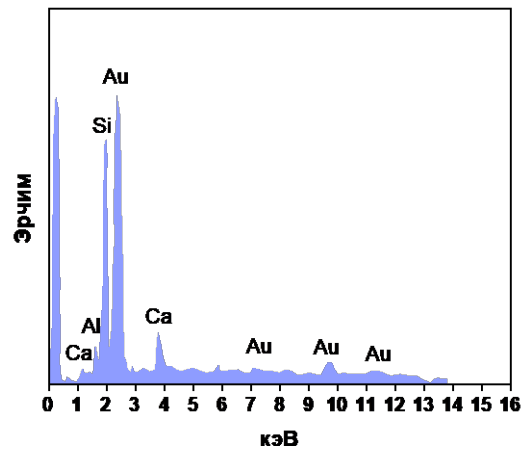
Зураг 12: 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан шилний ГПП-ын хэмжилт

47° орчим өнцгөөр дээжрүү лазер гэрэл тусгахад тохиромжтой гэж дүгнэсэн.

Хүснэгт 3: Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал

№	Элемент	Масс, %
1	Алт	75.8
2	Цахиур	17.4
3	Кальци	4.8
4	Хөнгөнцагаан	2

Энергийн дисперсийн рентген спектроскопоор шилэн дээр суулгасан алтны нимгэн үед элементийн анализ хийсэн. Хүснэгт 3-с харахад алт 75.8 %, цахиур 17.4 % илэрсэн нь шилэн дэхь цахиур илэрсэн байж болзошгүй ба кальци, хөнгөн цагааны элемент илэрсэн нь бохирдол байж болзошгүй гэж дүгнэсэн.



Зураг 13: Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектр

### 3.6 ELISA оношлуур угсарч, хэмжилт хийсэн үр дүн

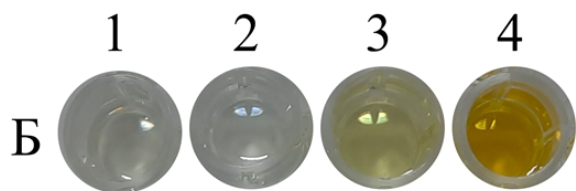
Фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (enzyme linked immunosorbent assay буюу ELISA) нь эсрэг биеийг түргэн хугацаанд шинжлэх, хэмжихэд ашиглах ба судлагдаж буй дээжид сонирхсон тодорхой уураг байгаа эсэх, хэрэв байвал хэр хэмжээтэй байгааг тодорхойлох явдал юм [21]. ELISA-ын бичил үүрт орох дугуй хэмжээтэй шилэн дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулган бичил үүрэнд гадаргууг дээш харуулан хийсэн. MUA линкер болон EDC/NHS биохолбогчдыг ашиглан өмнөх ГПП-ын оношлуур угсрах аргатай ижил үйл явцаар алтны гадаргууд эсрэгтөрөгчийг холбосны дараагаар Wantai biotech HDV-IgG ELISA цомог ашиглан оношлогоо хийсэн. Оношлогоо хийж дуусмагц өнгөний хувирал явагдсан уусмалыг хоосон бичил үүрлүү шилжүүлэн 450

нм долгионы уртад гэрлийн шингээлтийг хэмжсэн.

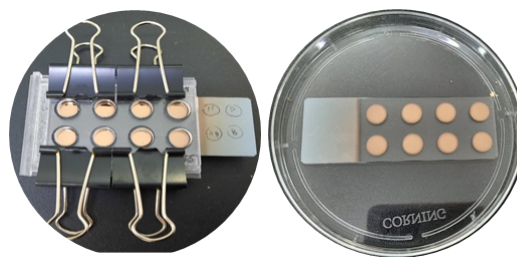


Зураг 14: Өнгө үзүүлэгч хромоген хийсний дараах ELISA оношлуурын үр дүн

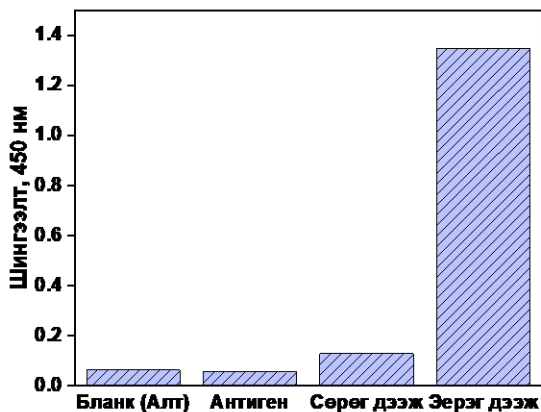
- A1, B1 – Бланк алтны нимгэн үеийн контрол
- A2, B2 – Эсрэгтөрөгч суулган блокинг хийсэн контрол
- A3, B3 – Халдваргүй, сөрөг контрол
- A4, B4 – Халдвартай, эерэг контрол



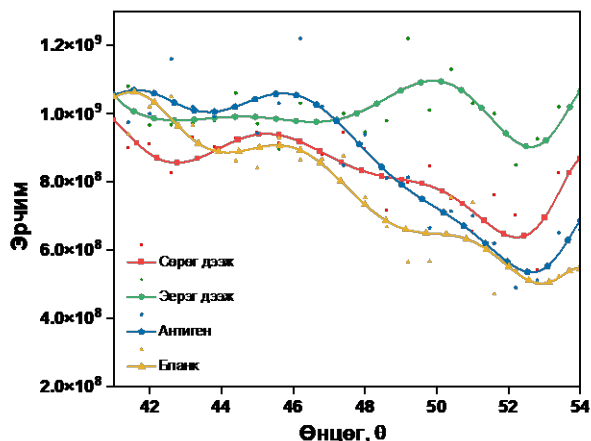
Зураг 15: Урвал зогсоох уусмал хийж, хоосон бичил үүрлүү шилжүүлсний дараах ELISA оношлуурын үр дүн



Зураг 17: Алтны нимгэн үе дээр суурилсан ГПР-ын оношлуурын холболт, угсралт явагдаж буй болон шинжлэхэд бэлэн болсон оношлуур



Зураг 16: ELISA оношлуурын шингээлтийг 450 нм долгионы уртад хэмжсэн үр дүн



Зураг 18: ХДВ-ийн халдвартай болон эрүүл хүний цусны ийлдэс дээр хэмжсэн ГПР-ын үр дүн

Зураг 16-с харахад бланк алтны нимгэн үе нь эсрэгтөрөгч суулган блокинг хийсэн контролоос илүү өндөр шингээлт өгсөн нь алтны гадаргуу дээр HRP агуулсан эсрэгбие бага хэмжээгэр холбогдсон байх боломжтой. Мөн халдваргүй сөрөг дээж эсрэгтөрөгч контролоос харьцангуй өндөр шингээлт өгсөн нь хүний цусанд агуулагдаж буй уураг, бусад эсрэгбие нь оношлуурын гадаргуу дээр харилцан үйлчлэл үзүүлж сонгомол биш шинж чанараар холбогдсон байна гэж дүгнэж байна. Харин халдвартай цусны ийлдэс буюу эерэг дээжний өнгө тодоор хувирч 1.348 шингээлтийн өндөр утга өгсөн. Энэ нь алтны нимгэн үеийн гадаргуу дээр угсарч буй бидний оношлуур хүний цусан дахь хепатит дельта вирусийн эсрэгбиеийг сонгомолоор мэдрэг чанар сайтай танин холбогдож байгааг харуулж байна.

### 3.7 Алтны нимгэн үет оношлуур угсарсан үр дүн

Алтны нимгэн үе дээр суурилсан оношлуурын ГПР-ын хэмжилтийг балк (bulk) буюу алтны нимгэн үе, эсрэгтөрөгч суулгасан буюу оношлуур, сөрөг буюу эрүүл хүний ийлдэсээр үйлчилсэн, эерэг буюу халдвартай хүний ийлдэсээр үйлчилсэн үед явуулсан.

Зураг 18-с харахад бланк, эсрэгтөрөгч, сөрөг дээж бага эрчимтэй харин эерэг дээжийн шингээлт

тийн эрчим өндөр, эрс ялгаатай байна. Иймд алтны нимгэн үе дээр ковалентаар холбосон ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч цусны ийлдэс дэх ХДВ-ийн эсрэгбие-тэй сонгомолор холбогдож, угсарсан оношлуур амжилттай ажиллаж энэхүү арга зүйгээр ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх боломжтой хэмээн дүгнэж байна.

## 4 Хэлэлцүүлэг

ГПР-ын технологид үндэслэсэн оношлуур сүүлийн жилүүдэд эрчимтэй хөгжин, дэлхий дахинд олон төрлийн судалгаа хийгдэж байна. Гэвч ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх ГПР-д тулгуурласан оношлуурын хөгжүүлэлт, судалгаа огт хийгдээгүй байна. Монгол улсад ХДВ-ийн тархалт өндөр байгаагаас шалтгаалан бид ХДВ-ийг илрүүлэх оношлуур бүтээх нь нийгмийн эрүүл мэндийг хамгаалахад томоохон хувь нэмэр болж чадна гэж үзэж байна. Энэхүү оношлуурыг угсрахад алтны нано бөөм болон балк (bulk) алтны нимгэн үеийг ашигласан. Алтны нано бөөмийг Туркевичийн натрийн цитратыг ангижруулах аргаар хоёр өөр урвалын температурт синтезлэсэн. Урвалын температур  $95^{\circ}\text{C}$  үед  $32 \pm 19$



нм, урвалын температур  $80^{\circ}\text{C}$  үед  $60 \pm 8$  нм орчим хэмжээтэй нано бөөм үүссэн *Зураг 1*, *Зураг 2*. 60 нм хэмжээтэй синтезлэсэн алтны нано бөөмийг сонгон авч цаашдын судалгаанд ашигласан. Алтны нано бөөмийг MUA холбогчоор (тиол болон карбоксил бүлэгтэй) бүрсэн ба этанолон орчинд тогтворгүй агрегацаад орж байсан тул Tween 20 болон фосфатын буфер орчинд урвалыг явуулсан. Карбоксил бүлэг суусан алтны нано бөөмийг ХДВ-ийн гадаргуугийн эсрэгтөрөгч уурагтай ковалент холбоогоор холбохын тулд EDC/NHS тэг урттай биохолбогчдыг ашигласан. Учир нь EDC нано бөөмийн гадаргуугийн карбоксил бүлэгтэй холбогдож O-acylisourea гэх тогтворгүй эфир үүсгэх ба дараа нь NHS холбогдон хагас тогтвортой амин бүлэгт идэвхтэй завсрын бүтээгдэхүүн үүсгэдэг. Карбонат-бикарбонатын буферт уусгасан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг уусмалд нэмснээр амин бүлэгт идэвхтэй NHS эфиртэй уургийн амин бүлэг холбогдон амидын холбоо үүсгэсэн. Алтны нано бөөмийн гадаргууг модификацлаж функционал бүлгүүд суусныг *Зураг 5*, *Зураг 6*, *Зураг 7* ба ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчтэй амжилттай холбогдсоныг *Зураг 8*-д нил улаан туяаны спектроскоп, хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрометрээр баталгаажуулсан. Харин амин функционал бүлэг суулгасан шилэн дээр алтны нано бөөмтэй холбогдсон эсрэгтөрөгчийг суулган сенсоорыг угсарч ГПП-ын багажаар хэмжилт явуулахад *Зураг 9* дэх график гарсан ба гадаргуун плазмон үзэгдэл ажиглагдаагүй учир бид багажны угсралтыг улам сайжруулан, лазер гэрлийн үүсгэвэрийг өөрчлөн дахин туршилт явуулан учир шалтгааныг нарийвчлан тодорхойлох хэрэгтэй байна. Балк (bulk) алтны нимгэн үе ашигласан оношлуурын хувьд нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолох аргаар шилэн дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан *Зураг 10*, *Зураг 11*. Пирана ( $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2; 2:1$ ) уусмалаар алтны нимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлэн гидроксил бүлэг суулган дараа нь өмнөх арга зүйтэй ижил биохолбогчууд ашиглан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг ковалент холбоогоор холбосон. Угсарсан оношлуурын ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх оношлогооны ажиллагааг давхар баталгаажуулахын тулд ELISA арга зүйгээр давхар судалгаа гүйцэтгэн баталсан *Зураг 14*, *Зураг 15*, *Зураг 16*. Бэлэн болсон оношлуурыг халдвартай болон эрүүл хүний цуснаас ялгаж авсан ийлдсээр үйлчлэн ГПП-ын багажаар хэмжилт явуулахад эерэг болон сөрөг дээж дээр ялгагдахуйц график үүсэж эрчмийн болон өнцгийн шилжилт ажиглагдаж байсан нь оношлуур болон ГПП-ын багаж амжилттай ажиллаж, ХДВ-ийн халдварыг оношлож байсан *Зураг 18*. Цаашид бид алтны нимгэн үе дээр морфологи болон химийн холбоог тодорхойлох олон талт судалгаа явуулах, олон дээж дээр судалгаа хийж оношлуурын баталгаажуулалт хийх, мөн оношлуур болон түүнийг хэрэглэх арга зүйн нэгэн жигд байдлыг хангасан стандарт протокол боловсруулахыг зорьж байна.

## 5 Дүгнэлт

Бид энэхүү судалгаагаар балк (bulk) бүтэцтэй алт болон алтны нано бөөм ашиглан ковалент холбоогоор ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг холбож амжилттай хоёр төрлийн ГПП-ын оношлуур угсарлаа. Энэхүү оношлуурын прототип загварыг зохион бүтээж ХДВ-ийн халдвартай хүний ийлдсэнээс ХДВ эсрэгбиеийг амжилттай илрүүлсэн. Цаашид судалгааны ажлын үр дүнг улам бататгаж, оношлуурын баталгаажуулалт хийх мөн оношлуур болон түүнийг хэрэглэх арга зүйн нэгэн жигд байдлыг хангахад чиглэсэн стандарт протокол боловсруулахад анхаарч ажиллах шаардлагатай байна. Судалгааны ажлын үр дүнгээс доорх дүгнэлтэд хүрсэн. Үүнд:

- (1) Алтны нано бөөмийг синтезлэн гадаргууд нь амжилттай функционал бүлгүүд суулган эсрэгтөрөгчтэй холбосон болохыг баталсан.
- (2) Алтны нано бөөмийн оношлуурыг амжилттай угсран анализ хийсэн боловч шинээр угсарсан багаж дээр ГПП-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй тул лазер гэрлийн эх үүсвэрийг өөрчлөх шаардлагатай гэж дүгнэсэн.
- (3) Харин алтны нимгэн үе дээр ХДВ эсрэгтөрөгч суулгах замаар гаргаж авсан оношлуурыг ашиглан ГПП-ын арга зүйгээр ХДВ-ийг оношлох боломжтой болох нь харагдаж байна.

## Ашиг сонирхлын зөрчилгүйн баталгаа

Зохиогчид ашиг сонирхолын зөрчилгүй гэдгээ баталж байна.

## Талархал

Энэхүү судалгааны турш оношлуур бүтээхэд лабораторийн орчин, туршилтын дээжээр хангаж, онолын тооцоолол хийн шинээр багаж угсарсан Генийн инженерчлэлийн лаборатори, Наноматериалын лаборатори, Элэгний төв, Лазерын судалгааны лабораторийн хамт олонд гүн талархал илэрхийлье. Судалгааны ажлыг минь ойлгож үргэлж түшиж тулж байдаг гэр бүлдээ баярлалаа.

## Зохиогчийн оролцоо

А. Номин нь алтны нано бөөм, алтны нимгэн үе дээр суурилсан оношлуурын угсралт болон багажит анализын хэмжилт хийн, үр дүнг боловсруулсан. Э. Номин-Эрдэнэ нь ГПП-ын багаж угсран, онолын тооцоолол боловсруулан, оношлуурын хэмжилт хийсэн. М. Бадмаараг болон Н. Хулан нар нь ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч уургийг гарган авч цэвэршүүлэн, ялгасан. Н. Эрдэнэ болон О. Одгэрэл нар нь судалгааны удирдагчид ба онол болон практикийн

олон талт туслалцаа, бодис урвалж лабораторийн орчноор хангаж энэхүү судалгааг гүйцэтгэсэн.

## Санхүүжилт

Энэхүү судалгааны ажлыг санхүүжүүлж дэмжлэг үзүүлсэн Дөрвөн уул биотек ХХК-д гүн талархал илэрхийлье.

## Ашиг сонирхолгүйн баталгаа

Ашиг сонирхолын зөрчилгүй болохыг үүгээр баталж байна.

## Ашигласан ном

- [1] Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV. New epidemiology of hepatitis delta. *Liver international*. 2020;40:48–53.
- [2] Oyusuren T, F Kurbanov YT, Elkady A. High frequency of hepatocellular carcinoma in Mongolia; association with mono-, or co-infection with hepatitis C, B, and delta viruses. *Journal of medical virology*. 2006;78:1688–1694.
- [3] Stockdale AJ, Kreuels B, Henrion MY. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*. 2020;73:523–532.
- [4] Dashtseren B, Bungert A, Bat-Ulzii P, Enkhbat M, Oidovsambuu O. Endemic prevalence of hepatitis B and C in Mongolia: A nationwide survey amongst Mongolian adults. *Journal of viral hepatitis*. 2017;24:759–767.
- [5] Chen X, Oidovsambuu O, Liu P, Grosely R, Elazar M. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected Mongolians. *Hepatology*. 2016;66:1739–1949.
- [6] Chen HY, Shen DT, Ji DZ, Han PC, Zhang WM, Ma JF. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2018;68:381–382.
- [7] Scashfoort RBM. Handbook of surface Plasmon resonance. Royal society of chemistry. 2017:27–103.
- [8] Homola J, Dostalek J, S Jiang JL, Lofas S. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. 2006:45–67.
- [9] Bastus NG, Comenge J, Puntès V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir*. 2011;27:11098–11105.
- [10] Li D, He Q, Cui Y, Duan L, Li J. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;355:488–493.
- [11] Lelievre HY, Bukar N, McKeating KS, Arnaud M, Cosin P. Plasmonic sensors for the competitive detection of testosterone. *Analyst*. 2015;140:5105–5111.
- [12] Jeong EJ, Jeong YS, Park K, Yi SY. Directed immobilization of DNA-binding proteins on a cognate DNA-modified chip surface. *Journal of Biotechnology*. 2008;135:16–21.
- [13] Vashist SK. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics*. 2012;2:23–33.
- [14] Huang CC, Liu TM. Controlled Au–Polymer Nanostructures for Multiphoton Imaging, Prodrug Delivery, and Chemo–Photothermal Therapy Platforms. *ACS Applied materials and interfaces*. 2015;7:25259–25269.
- [15] <https://www.cytodiagnosics.com/pages/introduction-to-gold-nanoparticle-characterization>.
- [16] Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Marago OM. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of physics: Condensed matter*. 2017;29.
- [17] Sukhdorj G. Optical methods of analysis. 2007:7–23.
- [18] Jonoush JA, Yazdian F, Mansori R, Omidi M. Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor for Detection of Serum Prostate Specific Antigen in Prostate Cancer Patients. *Biosensing Biotechnology Research Asia*. 2016;13:2273–2279.
- [19] Yoon SJ, Kim D. Target dependence of the sensitivity in periodic nanowire-based localized surface plasmon resonance biosensors. *Journal of the Optical Society of America A*. 2008;25:725–735.
- [20] Sexton BA, Feltis BN, Davis TJ. Characterisation of gold surface plasmon resonance sensor substrates. *Sensors and Actuators A*. 2008;141:471–475.
- [21] Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical chemistry*. 2005;51:2415–2418.