



Обзорная статья / Review article

Многократное использование биослоя QCM: подходы к регенерации в пьезокварцевых иммunoсенсорах. Применение биосенсоров для обнаружения иммунохимических реакций (обзор)

С. С. Гогина[✉], Е. А. Смирнова, Я. М. Станишевский, А. М. Стойнова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патрика Лумумбы» (РУДН). Институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2

[✉] Контактное лицо: Гогина Софья Сергеевна. E-mail: fominasofya@yandex.ru

ORCID: С. С. Гогина – <https://orcid.org/0009-0009-2889-9680>; Е. А. Смирнова – <https://orcid.org/0009-0002-9160-8259>;
Я. М. Станишевский – <https://orcid.org/0000-0002-4248-2453>; А. М. Стойнова – <https://orcid.org/0000-0002-2498-5313>.

Статья поступила: 12.07.2023

Статья принята в печать: 26.01.2024

Статья опубликована: 26.01.2024

Резюме

Введение. Одним из наиболее перспективных типов иммунодатчиков являются пьезокварцевые иммunoсенсоры. Единоразовое использование биосенсоров является финансово затратным, что делает регенерацию поверхности биосенсора пьезокварцевых иммunoсенсоров актуальной задачей. Регенерация имеет решающее значение для поддержания работоспособности датчика и возможности повторного использования. В данной статье понятия «иммunoсенсор» и «иммunoбиосенсор» являются взаимозаменяемыми и используются для обозначения одного и того же типа биосенсоров, работающих на основе иммунохимических взаимодействий «антитело – антиген».

Текст. В обзоре обсуждаются особенности, принципы работы и применение пьезокварцевых иммunoсенсоров QCM. Особое внимание уделяется проблеме регенерации поверхности биосенсоров как ключевому аспекту обеспечения их эффективной работы и возможности многократного использования. Рассматриваются различные методы регенерации и их преимущества. Повторная активация биослоя на электроде QCM обеспечивает его стабильность и работоспособность в течение продолжительного времени. Это особенно ценно в клинических и научных исследованиях. Возможность многократного использования биосенсора позволяет снизить затраты на материалы и сократить производство отходов, что актуально с экологической и экономической точек зрения. Также воспроизведение анализа различных анализаторов на одной и той же поверхности обеспечивает гибкость в многопараметрических исследованиях. Важно подчеркнуть, что удаление остаточных анализируемых веществ и процесс регенерации биослоя способствуют надежности, селективности, повышенной чувствительности и возможности проведения воспроизводимых измерений.

Заключение. Авторами был проведен анализ научной литературы, в результате чего установлено, что регенерация биослоя имеет решающее значение для поддержания работоспособности датчика и возможности повторного использования, которую определяет сила взаимодействия «антитело – антиген», поэтому условия должны быть подобраны индивидуально для каждой пары «антитело – антиген». В обзоре подробно рассмотрены три основных подхода к регенерации пьезоэлектрических преобразователей: с использованием химического метода, кислородно-плазменного метода, при помощи раствора «пираны».

Ключевые слова: пьезокварцевые иммunoсенсоры (QCM), регенерация биослоя электрода, антиген, антитело, иммунохимические реакции

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. С. С. Гогина, Е. А. Смирнова придумали и разработали концепцию обзорной статьи, совместно произвели поиск, сбор и анализ научной литературы, участвовали в написании обзора. Я. М. Станишевский и А. М. Стойнова проверили статью. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Гогина С. С., Смирнова Е. А., Станишевский Я. М., Стойнова А. М. Многократное использование биослоя QCM: подходы к регенерации в пьезокварцевых иммunoсенсорах. Применение биосенсоров для обнаружения иммунохимических реакций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):128–138. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1519>

Detection of Immunochemical Reactions Using Piezoquartz Immunosensor. Regeneration of the Electrode Bio-layer (Review)

Sofia S. Gogina[✉], Ekaterina A. Smirnova, Yaroslav M. Stanishevskii, Anastasia M. Stoinova

Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology. 10/2, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

[✉] Corresponding author: Sofia S. Gogina. E-mail: fominasofya@yandex.ru

ORCID: Sofia S. Gogina – <https://orcid.org/0009-0009-2889-9680>; Ekaterina A. Smirnova – <https://orcid.org/0009-0002-9160-8259>;
Yaroslav M. Stanishevskii – <https://orcid.org/0000-0002-4248-2453>; Anastasia M. Stoinova – <https://orcid.org/0000-0002-2498-5313>.

Received: 12.07.2023

Revised: 26.01.2024

Published: 26.01.2024

© Гогина С. С., Смирнова Е. А., Станишевский Я. М., Стойнова А. М., 2024
© Gogina S. S., Smirnova E. A., Stanishevskii Ya. M., Stoinov A. M., 2024

Abstract

Introduction. One of the most promising types of immunosensors is quartz crystal microbalance immunosensors (QCM immunosensors). Single-use biosensors are financially demanding, thus rendering the regeneration of the biosensor surface a pertinent issue for QCM immunosensors. Regeneration plays a pivotal role in sustaining the functionality of the sensor and enabling its reusability. In this article, "immunosensor" and "immunobiosensor" are interchangeable terms and are used to denote the same type of biosensors operating based on immunochemical interactions between antigens and antibodies.

Text. This review discusses the features, operational principles, and applications of QCM immunosensors. Particular attention is directed toward the challenge of regenerating the biosensor surface as a key aspect ensuring their effective operation and the potential for multiple uses. Various regeneration methods and their advantages are examined. The reactivation of the biosensing layer on the QCM electrode secures its stability and functionality over extended periods, which is especially valuable in clinical and scientific research. The possibility of reusing the biosensor reduces material costs and waste production, aligning with ecological and economic concerns. Furthermore, the ability to analyze different analytes on the same surface fosters versatility in multiparametric investigations. It is essential to emphasize that the removal of residual analytes and the biosensor's regeneration process enhance reliability, selectivity, heightened sensitivity, and the potential for reproducible measurements.

Conclusion. An analysis of scientific literature underscores the pivotal role of biosensor regeneration in maintaining functionality and reusability. The strength of the antigen-antibody interaction determines the conditions, which must be tailored individually for each antigen-antibody pair. The review thoroughly explores three primary approaches to the regeneration of piezoelectric transducers, including the use of a chemical method, oxygen plasma-based techniques, and the application of Piranha solution.

Keywords: piezo quartz immunosensors (QCM), regeneration of the electrode bio-layer, antigen, antibody, immunochemical reactions

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Sofia S. Gogina, Ekaterina A. Smirnova came up with and developed the concept of a review article, jointly searched, collected and analyzed scientific literature, participated in writing the review. Yaroslav M. Stanishevskii and Anastasia M. Stoyanova checked the article. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Gogina S. S., Smirnova E. A., Stanishevskii Ya. M., Stoynov A. M. Detection of immunochemical reactions using piezoquartz immunosensor. Regeneration of the electrode bio-layer. *Drug development & registration.* 2024;13(1):128–138. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1519>

ВВЕДЕНИЕ

Развивающаяся область исследований с применением иммуносенсоров (иммунобиосенсоров) сочетает в себе высокую специфичность иммунологического распознавания с чувствительностью современных сенсорных технологий. Они, как правило, специфичны для биомолекул, которые имеют иммунологические характеристики, связанные с жизненными процессами. QCM обычно не предназначены для обнаружения объектов без биогенеза или неорганических соединений. Данные биосенсоры обладают способностью обнаруживать и количественно определять широкий спектр биомолекул, включая белки, вирусы, бактерии и их комплексы [1–3]. Специфичность иммунологического распознавания делает их мощными инструментами в области диагностики и медицинских исследований, обеспечивая быстрый, надежный и неинвазивный метод выявления целого ряда заболеваний.

В последние годы одним из наиболее перспективных типов иммунодатчиков являются пьезокварцевые иммуносенсоры, в которых в качестве чувствительного элемента используется пьезоэлектрический кристалл кварца [1, 4]. Эти датчики обладают высокой чувствительностью и способностью обнаруживать не-

значительные изменения массы или вязкости на поверхности кристалла, что делает их идеальными для использования в иммунологических анализах. Пьезокварцевые иммуносенсоры нашли широкое применение в ряде областей, включая медицинскую диагностику, безопасность пищевых продуктов и мониторинг окружающей среды. Кроме того, регенерация электродного слоя биосенсора является критически важным процессом, который необходим для обеспечения точности и чувствительности датчика при многократном использовании.

В данном обзоре обсуждаются особенности пьезокварцевых иммуносенсоров и их применение для обнаружения иммунохимических реакций, а также рассматривается важнейший процесс для поддержания точности и чувствительности датчика при многократном использовании – регенерация электродного слоя биосенсора.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Пьезокварцевые иммуносенсоры

Пьезокварцевые иммуносенсоры – это класс биосенсоров, в которых в качестве чувствительного элемента используется пьезоэлектрический кристалл

кварца. Принцип действия основан на обнаружении изменений резонансной частоты кристалла вследствие связывания анализируемых веществ с иммобилизованными антителами (АТ) или антигенами (АГ) на поверхности кристалла [5, 6]. Иммобилизованные АТ или АГ обычно используются в качестве элементов биоопределения благодаря их высокой специфичности, они позволяют избирательно захватывать и детектировать целевые анализируемые вещества [7]. В иммуносенсоре АТ иммобилизуются на поверхности кварцевого кристалла с помощью различных методов, таких как ковалентное связывание или физическая адсорбция [8–11]. Когда образец, содержащий целевой АГ, вводится в иммуносенсор, АГ связывается с иммобилизованным АТ, вызывая изменение резонансной частоты кристалла, которое можно измерить и определить количественно. С другой стороны, могут быть иммобилизованы АГ, которые будут использоваться для избирательного захвата АТ, присутствующих в образце. Этот процесс известен как обратный анализ, где анализируемым веществом-мишенью является АТ, а не АГ.

Пьезокварцевые иммуносенсоры включают в себя кварцевый кристалл, электрод и тонкий слой, на который иммобилизован биораспознавающий элемент (рисунок 1). Кварцевый кристалл имеет размеры от 5 до 16 мм и способен генерировать электрический потенциал при механическом сжатии или деформации на его поверхности [12, 13]. Электрод, как правило, изготавливается из тонкой пленки, которая может быть выполнена из золота, серебра, а также в редких случаях из алюминия, никеля или хрома [14] в силу высокой электропроводности данных металлов и

стабильности в различных условиях эксплуатации, особенно часто применяется золото благодаря своей химической инертности, биосовместимости и легкости функционализации биомолекулами. Однако стоит учитывать, что серебро более подвержено окислению и коррозии, чем золото, что может повлиять на стабильность и работоспособность иммуносенсора. Электрод размещается на одной стороне кристалла, чтобы можно было измерить резонансную частоту кристалла. Например, золотые электроды могут быть легко модифицированы самосборными монослоями (англ. self-assembled monolayers, SAMs) тиолированных молекул, которые могут обеспечить стабильную и селективную платформу для иммобилизации биомолекул [8, 15–18]. Тиолированные молекулы, как правило, имеют терминальные группы с тиольными ($-SH$) группами, которые способны образовывать ковалентные связи с поверхностью золотого электрода [19]. Тонкий слой иммобилизованного элемента биоопределения наносится на электрод и служит чувствительным элементом, который избирательно улавливает целевые анализируемые вещества.

Существуют различные типы пьезокварцевых иммуносенсоров, включая биосенсоры объемных акустических волн (англ. bulk acoustic wave, BAW) [20–22], поверхностных акустических волн (англ. surface acoustic wave, SAW) [23–25], иммуносенсоры с кварцевыми микровесами (англ. quartz crystal microbalance, QCM) [1, 9, 26] и иммуносенсоры с пленочным объемным акустическим резонатором (англ. film bulk acoustic resonator, FBAR) [20, 27, 28]. В датчиках BAW используется кварцевый кристалл, который намного толще, чем в датчиках SAW. Это приводит к

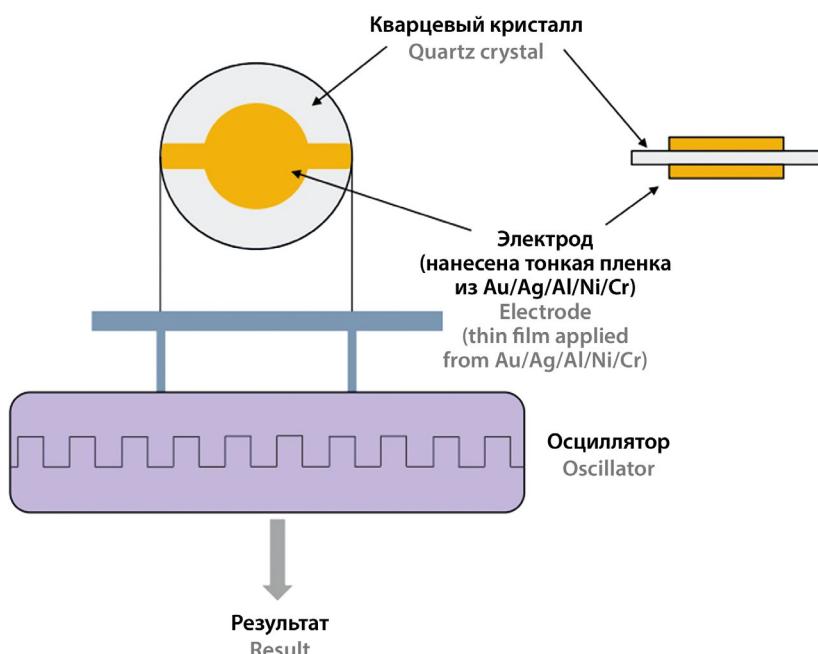


Рисунок 1. Пьезокварцевый иммуносенсор QCM

Figure 1. Piezoquartz QCM immunosensor

увеличенному времени отклика и к более низкой частоте резонанса, что делает иммуносенсоры BAW менее чувствительными в отличие от других типов. Датчики на базе BAW регистрируют изменения в резонансной частоте, которые возникают в результате взаимодействия между аналитическим агентом (АГ) и целевым анализатором (АТ). Их высокая чувствительность позволяет обнаруживать низкие концентрации целевых анализаторов, что делает их ценными инструментами для обнаружения разнообразных молекул, включая белки, нуклеиновые кислоты, а также малые молекулы, такие как антибиотики, гормоны, пестициды, токсины и тяжелые металлы [29–31]. Датчики BAW находят применение в различных сферах, включая мониторинг окружающей среды, обеспечение безопасности продуктов питания, клиническую диагностику и биологическую защиту. В случае иммуносенсоров SAW, они используют тонкий слой материала с пьезоэлектрическими свойствами, который наносится на поверхность кварцевого кристалла. Этот слой помогает обнаруживать изменения в поверхностной волне. При контроле окружающей среды датчики на базе SAW используются для выявления разнообразных загрязняющих веществ в воде и воздухе, таких как тяжелые металлы, органические соединения и пестициды [32]; в области безопасности пищевых продуктов – для обнаружения патогенов пищевого происхождения, аллергенов и токсинов [33]; в клинической диагностике – для выявления биомаркеров заболеваний, таких как онкомаркеры, сердечно-сосудистые маркеры и маркеры инфекционных заболеваний [20]. Датчики QCM используют кварцевые микровесы для мониторинга изменений массы. Эти иммуносенсоры обладают высокой чувствительностью и могут использоваться для оценки биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени. В датчиках FBAR также используется тонкий слой материала и регистрируются изменения резонансной частоты. Эти иммуносенсоры обладают высокой чувствительностью и могут быть интегрированы в портативные устройства. Датчики QCM и FBAR также способны детектировать низкие концентрации анализаторов. В целом для каждого из типов пьезокварцевых иммуносенсоров область применения одинакова.

Одной из недавних разработок в области пьезокварцевых иммуносенсоров является использование двумерных материалов (2D), таких как графен, для повышения чувствительности и селективности иммуносенсоров [9, 34]. Графен обладает уникальными электрическими и механическими свойствами, в силу чего является подходящим материалом для биосенсоров. Разработаны пьезокварцевые иммуносенсоры на основе графена, которые обладают высокой чувствительностью и селективностью для обнаружения широкого спектра биомолекул, включая белки, нуклеиновые кислоты и малые молекулы [9, 35].

Еще одним недавним достижением в области пьезокварцевых иммунодатчиков является интеграция микрофлюидных устройств и технология «лаборатория на чипе» (англ. lab-on-a-chip, LOC) [21, 36, 37]. Микрофлюидные устройства могут обеспечивать точный контроль за потоком жидкости и перемешиванием, обеспечивая быстрый и эффективный анализ биологических образцов. Разработаны интегрированные пьезокварцевые иммуносенсоры, которые могут быть использованы для высокопроизводительного скрининга биомолекул в микрофлюидных устройствах [37]. Устройства LOC объединяют множество лабораторных функций, таких как подготовка образцов, смешивание, реакция, разделение, детектирование и анализ на одном чипе или небольшой платформе, что позволяет проводить быстрый и портативный анализ биологических образцов [36]. Интеграция иммуносенсоров с устройствами LOC может привести к разработке недорогих, портативных и удобных в использовании диагностических инструментов. Эти устройства также находят применение в различных областях, включая медицинскую диагностику, мониторинг окружающей среды и тестирование безопасности пищевых продуктов.

В целом пьезокварцевые иммуносенсоры обладают многими преимуществами при обнаружении иммунохимических реакций: высокой чувствительностью, селективностью и точностью. Различные типы пьезокварцевых иммуносенсоров в сочетании с их способностью обнаруживать мельчайшие изменения резонансной частоты делают их мощным инструментом для обнаружения биомолекул в различных областях применения.

Обнаружение иммунохимических реакций с использованием пьезокварцевого иммуносенсора

Пьезокварцевые иммуносенсоры стали перспективным методом обнаружения иммунохимических реакций благодаря их высокой чувствительности, селективности и быстрому времени отклика. *Иммунохимические реакции* – это взаимодействие между АТ и АГ, приводящее к образованию комплекса. Это взаимодействие является высокоспецифичным, что позволяет обнаруживать целевые анализаторы с высокой селективностью [38].

Датчики QCM работают по принципу микровесов кварцевого кристалла, где связывание целевых анализируемых веществ с иммобилизованными элементами биопознавания на поверхности электрода приводит к изменениям резонансной частоты пьезокварцевого кристалла [39]. Принципы, лежащие в основе работы QCM, заключаются в следующем:

- 1) иммобилизация: АТ или АГ иммобилизуются на поверхности пьезокварцевого электрода, создавая слой биоопределения, который обеспечивает избирательный захват целевых анализаторов;

- 2) образование комплекса: целевой анализит, содержащийся в образце, связывается с иммобилизованным элементом биопознавания на поверхности кристалла, образуя комплекс АГ – АТ, что приводит к изменению массы или вязкоупругих свойств поверхности электрода [40];
- 3) детектирование сигнала: для измерения изменений свойств, которые вызывают сдвиг резонансной частоты пьезокварцевого кристалла, датчик QCM подключают к измерительной системе, которая включает в себя электронную схему для управления кристаллом и контроля резонансной частоты и рассеяния. Калибровочные кривые или эталонные образцы могут быть использованы для установления взаимосвязи между реакцией датчика и целевой концентрацией анализируемого вещества. Величина сдвига частоты прямо пропорциональна концентрации целевого анализируемого вещества, что позволяет проводить количественное определение. Датчик QCM может также измерить рассеяние, которое связано с вязкоупругими свойствами адсорбированного слоя на поверхности кристалла, что позволяет определить природу связывания, включая силу взаимодействия, конформационные изменения в адсорбированном слое и динамику процесса связывания [9, 41]. Коэффициент рассеяния отражает потерю энергии при вибрации кристалла. Принципы детектирования, основанные на измерении резонансной частоты и рассеяния, позволяют проводить количественный анализ целевых анализитов.

Обнаружение иммунохимических реакций с использованием пьезокварцевых иммуносенсоров имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами, такими как иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, иммуногистохимические методы. Эти датчики обеспечивают обнаружение в режиме реального времени [42, 43] и без использования биологических меток [44], что позволяет проводить быстрый, точный и менее затратный анализ. QCM обладают высокой селективностью и чувствительностью, обеспечивая специфический захват и позволяя обнаруживать низкие концентрации целевых анализитов в сложных матрицах образцов. Диапазон концентраций может варьироваться в зависимости от многих факторов, включая размер и форму биораспознавательного слоя, взаимодействие анализита с элементом биопознавания, методы предварительной обработки образца и технические характеристики самого датчика. Кроме того, пьезокварцевые иммуносенсоры просты в использовании, экономичны и имеют широкий спектр применения в различных областях.

Технология использования датчиков QCM наряду с их отличительными особенностями и преимуществами является перспективной и обладает широким спектром применения в различных научных, клинических и других исследованиях.

Регенерация биослоя электрода пьезокварцевого иммуносенсора

В отличие от классических аналитических методов, которые требуют одноразового использования химических компонентов и зависят от иммунохимических взаимодействий, иммуносенсоры обладают возможностью многократного использования после регенерации биослоя на электроде [45].

Для повторного/многократного использования иммуносенсора требуется очистить его активную рабочую поверхность от анализированных веществ, которые были адсорбированы в процессе анализа [45], и восстановить функциональность биослоя. Очистка кварцевых микровесов играет решающую роль в регенерации биосенсоров для повторного использования. Неаккуратное удаление рецепторного слоя с поверхности может стать причиной получения некорректных результатов измерения [46].

Регенерация и повторное использование поверхности биосенсора имеет два преимущества. Во-первых, поверхности биосенсоров стоят дорого, и их однократное использование, а затем утилизация, делает эксперимент финансово затратным. Во-вторых, повторное использование поверхности биосенсора позволяет сохранить одинаковую плотность поверхностных лигандов для каждого образца, что, в свою очередь, обеспечивает большую воспроизводимость эксперимента [47].

Можно выделить три основных подхода к регенерации пьезоэлектрических преобразователей: с использованием химического и кислородно-плазменного метода, а также при помощи раствора «пираны».

Для некоторых типов иммуносенсоров до сих пор не найдено оптимальных условий регенерации, не снижающих их чувствительность. В этих случаях используют сменные одноразовые мембранные элементы [48].

Химический метод

Главным образом, характер взаимодействия антигена и антитела существенно влияет на процесс регенерации и возможность повторного использования поверхности датчика в исследованиях иммунобиосенсоров. В связи с этим условия регенерации следует определять и оптимизировать индивидуально для каждой пары «антigen – антитело», чтобы обеспечить эффективное и точное функционирование системы [49]. Для этого обычно проводят сравнение качества очистки электродов, а в качестве параметра химической чистоты поверхности электрода используется разность потенциалов между анодным и катодным пиками [46].

Этот метод заключается в извлечении датчика и погружении его в регенерирующий буфер [50], что делает его наиболее используемым и простым подходом к регенерации биосенсоров. В качестве регенерирующего агента могут служить также детергенты

[Triton X-100, Tween 20, додецилсульфат натрия (англ. sodium dodecyl sulfate, SDS)], органические растворители (этанол, метанол, ацетон) или растворы ферментов (протеиназа K, липаза).

Электрохимический способ

Электрохимическая очистка состоит из нескольких циклов окисления/восстановления. Очистку и регенерацию микровесов проводят по методике, основанной на изменении потенциала. Электроды QCM подвергают очистке с использованием потенциостата-гальваностата в трехэлектродной системе, где Au выполняет функцию рабочего электрода, Pt – противоэлектрода и Ag/AgCl служит электродом сравнения. Этот процесс обеспечивает эффективную очистку и поддержание электродов в оптимальном состоянии для дальнейшей работы. Для этого существует несколько электрохимических обработок: циклическое изменение потенциала 50 мМ раствора HCl, 100 мМ раствора HNO₃, 50 мМ раствора H₂SO₄ и 50 мМ раствора KOH, 0,5 М раствора NaOH [46, 51–54].

Реже при проведении электрохимической регенерации применяют и другие растворы: 6 М гидрохлорида гуанидина, 50 % метанола, 100 мМ NaOH и 70 мМ этилендиаминететрауксусной кислоты (ЭДТА), 50 мМ NaOH и 35 мМ ЭДТА, 0,1 М NaOH и 0,5 М NaCl, 50 мМ NaOH, 0,1 М глицина при pH = 2,7, 50 мМ NaOH и 1 % SDS, 0,1 М HCl [49, 55]. Также сообщалось о проведении очистки с использованием одиночного импульса при -1,4 В и +1,4 В (импульс постоянного тока) продолжительностью 30 с в фосфатно-солевом буфере (англ. phosphate-buffered saline, PBS) [53].

Кислотно-щелочная регенерация

Во многих исследованиях регенерация была достигнута за счет использования в системе буферов с высоким или низким pH. Обычно необходимо поддерживать низкий pH буфера, не ниже значения pH = 2, чтобы избежать необратимого повреждения биосенсора; напротив, высокий pH буфера часто ограничивается значением pH = 11 по той же причине [50]. Начало формы

При переходе значений pH изменяется энタルпийное состояние системы путем перераспределения относительных зарядов между анализируемым веществом и биорецептором. По мере ионизации боковых групп изменяется и распределение зарядов, которые поддерживают третичную структуру биорецептора. Эта структурная денатурация способствует отделению анализируемого вещества от биорецептора. Также смена pH способствует изменению ионной силы окружающей среды и скринингу взаимодействий реагент/аналит [50].

Основным преимуществом использования данной регенерации является низкая стоимость. Однако следует отметить, что ее можно использовать только в системах, где измененный pH не будет влиять на сиг-

нал датчика. Еще одним ограничением применения кислотно-щелочного метода являются хрупкие белки-биорецепторы. Если они легко денатурируются, то следствием проведения регенерации будет безвозвратное повреждение биорецептора [50].

Другим способом изменения ионной силы является использование сильных электролитов, таких как Ca²⁺ и NaCl. Если система особенно чувствительна к изменению pH, то это может стать предпочтительной альтернативой для предотвращения необратимой денатурации компонентов датчика [50].

Детергенты

При регенерации биослоя QCM часто используют детергенты в низких концентрациях [50]. Структурно детергенты обычно представлены гетеробифункциональными молекулами, содержащими два различных участка: полярную головку, которая хорошо растворима благодаря своему заряду, и алифатический неполярный хвост [50].

Поскольку хвостовые области являются гидрофобными, они координируются с аналогичными областями биорецептора или анализируемого вещества. Затем полярная группа проникает в водную fazу, сводя к минимуму отталкивание и тем самым способствуя растворимости анализируемого вещества. В определенных системах биосенсоров гидрофобность может быть ключевой силой во взаимодействии биорецептора с анализируемым веществом, например, при обнаружении гидрофобных анализаторов. Следовательно, детергенты могут быть ключевым компонентом буфера для регенерации. Как правило, для этого используются мягкие моющие средства, такие как Tween, также возможно применение и более жестких моющих средств, например SDS в присутствии 50 мМ NaOH [49, 50].

Глицин

Глицин является доступным недорогим восстановителем, широко используемым в качестве регенерирующего агента. Благодаря диапазону буферизации pH = 2 ÷ 7,54 он является хорошим компонентом для приготовления кислого буферного раствора 10 мМ раствор глицина – HCl (pH = 1,5), что, в свою очередь, позволяет избежать локальных экстремумов pH [48, 50, 56–58].

В растворе глицина является цвиттер-ионом и действует как мягкий экранирующий агент для зарядов на границе раздела фаз, что помогает снизить энталпийное взаимодействие между биорецептором и анализируемым веществом. Глицин связывается и с поверхностью биорецептора, и с анализируемым веществом. Таким образом, во время воздействия регенерирующего буфера биорецептор частично защищен от повреждений, вызванных изменением pH среды. Несмотря на то, что глицин полезен для оптических и механических сенсорных систем, он может

иметь ограниченное применение в электрохимических сенсорных системах, поскольку использование низкого pH может необратимо повлиять на сигнал датчика [50].

Хаотропные агенты

Для регенерации биосенсоров применяют и хаотропные агенты: мочевину, которая часто используется для поддержания нейтрального pH в растворе, диметилсульфоксид (ДМСО), формидамид, Tris-ЭДТА, Tris-HCl [59–63].

Многократное использование одного и того же рецепторного слоя может быть достигнуто и путем разрушения иммунокомплекса, образовавшегося в ходе анализа, с помощью растворов тиоцианата калия различных концентраций (0,4 mM, 0,04 M, 0,4 M). Нанесение 0,4 mM раствора тиоцианата калия обеспечивает полное и быстрое разрушение иммунокомплекса без воздействия на иммобилизованный слой, сохраняя целостность биорецепторного слоя при достаточно быстром разрушении иммунного комплекса. Использование растворов других концентраций может либо повредить рецепторный слой, либо частично разрушить комплекс «антитело – антиген» [64–66].

Для проведения полной очистки металлической поверхности биосенсорного электрода часто используют более высококонцентрированные растворы щелочей и кислот, например 0,5–1,2 M NaOH (с pH = 11 ÷ 13) и 0,5–1,2 M HCl (с pH = 1 ÷ 2). После тщательной очистки и высушивания на устройстве QCM можно приступить к созданию нового биочувствительного слоя [67, 68]. Этот процесс обеспечивает эффективную регенерацию поверхности и поддержание ее в рабочем состоянии.

Кислородно-плазменная очистка

Кислородно-плазменная очистка микровесов кварцевого кристалла является простым, быстрым и безопасным методом. Кислородная плазма может быть использована для быстрого удаления загрязнений как с металлических, так и с неметаллических поверхностей. Так как реакции взаимодействия кислорода и диоксида кремния не происходит, свойства кристалла кварца не меняются при очистке микровесов. При кислородно-плазменной обработке на поверхности микровесов кварцевого кристалла образуются различные кислородные функциональные группы, такие как C—O, C=O, O—C=O и C—O—O. Травление полимера происходит в результате взаимодействия атомарного кислорода с атомами углерода на поверхности, что приводит к образованию летучего продукта (например, угарный газ CO). Принцип функционирования заключается в пропускании электрического тока через плазму, которая генерирует высокоэнергетические электроны. Эти электроны взаимодействуют с молекулами газа в реакторе,

что приводит к разрыву химических связей. Кроме того, кислородная плазма вызывает окисление поверхности, образуя оксид золота (Au_2O_3). Этот процесс обеспечивает эффективное травление и подготовку поверхности для дальнейшей работы. Кислородно-плазменную очистку проводят с использованием генератора плазмы в течение 85 с при давлении 0,5 мба и мощности 22 Вт. После очистки QCM помещают в химический стакан с дезионизированной водой, затем переносят в метanol с последующей сушкой в экскаторе [46].

Раствор «пираньи»

Использование электродов QCM требует точной очистки для получения воспроизводимых результатов. Одним из методов регенерации является применение раствора «пираньи». Его готовят путем смешивания концентрированной H_2SO_4 и 30%-го раствора H_2O_2 в соотношении 3:1. После обработки раствором «пираньи» QCM подвергают промывке деминерализованной водой и этанолом, а затем сушат в потоке воздуха. В некоторых источниках указывается на возможность дополнительного подогрева раствора (40–60 °C). Важно отметить, что раствор «пираньи» самопроизвольно нагревается до указанных температур, так как смешивание его компонентов вызывает экзотермическую реакцию. Этот процесс способствует эффективной очистке поверхности [46, 69–70].

Благодаря эффективной регенерации биослоя QCM можно использовать для многократных циклов обнаружения, что повышает его практичность и экономическую эффективность. Благодаря удалению остаточных анализируемых веществ повышается точность последующих измерений, кроме того, процесс регенерации обеспечивает надежность, селективность, чувствительность и воспроизводимость измерений иммunoсенсором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пьезокварцевые иммunoсенсоры нашли широкое применение в области лабораторной диагностики, проведения научных исследований, сертификации пищевых продуктов. Их способность обнаруживать низкие концентрации целевых анализандов является ключевой в клинической практике.

Единоразовое использование биосенсоров в связи с большой стоимостью является финансово затратным, что делает регенерацию поверхности биосенсора пьезокварцевых иммunoсенсоров актуальной задачей. Регенерация имеет решающее значение для поддержания работоспособности датчика и возможности повторного использования.

В обзоре были изучены принципы работы иммunoсенсоров и их способность обнаруживать иммunoхимические реакции с высокой чувствительностью и селективностью, а также рассмотрены основные спо-

собы регенерации биослоя QCM: химический метод – с использованием детергентов, хаотропных агентов, глицина, кислотно-щелочной и электрохимической обработки; кислородно-плазменный метод и метод с использованием раствора «пираньи».

При выборе способа проведения регенерации необходимо помнить, что возможность повторного использования сенсорной поверхности определяет сила взаимодействия «антigen – антитело», поэтому условия должны быть подобраны индивидуально для каждой пары «антigen – антитело» [49]. Для этого проводят сравнение качества очистки электродов, а в качестве параметра химической чистоты поверхности электрода используется разность потенциалов между анодным и катодным пиками.

ЛИТЕРАТУРА

- Lim H.J., Saha T., Tey B.T., Tan W.S., Ooi C.W. Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases. *Biosensors & bioelectronics*. 2020;168:112513. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112513.
- Azam T., Bukhari S.H., Liaqat U., Miran W. Emerging Methods in Biosensing of Immunoglobin G-A Review. *Sensors (Basel)*. 2023;23(2):676. DOI: 10.3390/s23020676.
- Zida S.I., Lin Y.D., Khung Y.L. Current trends on surface acoustic wave biosensors. *Advanced Materials Technologies*. 2021;6(2):2001018. DOI: 10.1002/admt.202001018.
- Kuchmenko T.A., Lvova L.B. A perspective on recent advances in piezoelectric chemical sensors for environmental monitoring and foodstuffs analysis. *Chemosensors*. 2019;7(3):39. DOI: 10.3390/chemosensors7030039.
- Alnazi N., Almutairi M., Alodhayb A.N. A Review of Quartz Crystal Microbalance for Chemical and Biological Sensing Applications. *Sensing and Imaging*. 2023;24(1):10. DOI: 10.1007/s11220-023-00413-w.
- Na Songkhla S., Nakamoto T. Overview of quartz crystal microbalance behavior analysis and measurement. *Chemosensors*. 2021;9(12):350. DOI: 10.3390/chemosensors9120350.
- Pohanka M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials (Basel)*. 2018;11(3):448. DOI: 10.3390/ma11030448.
- Gao S., Guisán J.M., Rocha-Martin J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms – A critical review. *Analytica chimica acta*. 2022;1189: 338907. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338907.
- Hampitak P., Jowitt T.A., Melendrez D., Fresquet M., Hamilton P., Iliut M., Nie K., Spencer B., Lennon R., Vijayaraghavan A. A Point-of-Care Immunosensor Based on a Quartz Crystal Microbalance with Graphene Biointerface for Antibody Assay. *ACS Sensors*. 2020;5(11):3520–3532. DOI: 10.1021/acssensors.0c01641.
- Saffari Z., Ghavidel A., Ahangari-Cohan R., Hamidi-Fard M., Khoubi M., Aghasadeghi M., Norouzian D. Label-Free Real-Time Detection of HBsAg Using a QCM Immunosensor. *Clinical Laboratory*. 2022;68(4). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2021.210537.
- Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance Biosensors Based on the Molecular Imprinting Technique for Disease-Related Biomarkers. *Chemosensors*. 2022;10(3):106. DOI: 10.3390/chemosensors10030106.
- Kwak J., Lee S.S. Highly sensitive piezoelectric immuno-sensors employing signal amplification with gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2019;30(44):445502. DOI: 10.1088/1361-6528/ab36c9.
- Li W., Li J., Wu Y., Zhou T.A. A Novel Method in Identifying Pyroptosis and Apoptosis Based on the Double Resonator Piezoelectric Cytometry Technology. *Biosensors*. 2023;13(3):356. DOI: 10.3390/bios13030356.
- Kirali K., Brimo N., Serdaroglu D.Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immunosensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry*. 2022;18(5):529–545. DOI: 10.2174/1573411016999201120090551.
- Singh M., Kaur N., Comini E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. *Journal of Materials Chemistry C*. 2020;8(12):3938–3955. DOI: 10.1039/D0TC00388C.
- Sharma P., Chauhan R., Pande V., Basu T., Kumar A. Rapid sensing of *Tilletia indica*-Teliospore in wheat extract by a piezoelectric label free immunosensor. *Bioelectrochemistry*. 2022;147:108175. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108175.
- Xu Z., Luo Y. Immunoglobulin-Immobilized Quartz Crystal Microbalance for *Staphylococcus Aureus* Real-Time Detection. *IEEE Sensors Journal*. 2022;22(12):11594–11601. DOI: 10.1109/JSEN.2022.3174161.
- Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Quartz crystal microbalance-based aptasensors for medical diagnosis. *Micromachines*. 2022;13(9):1441. DOI: 10.3390/mi13091441.
- Zhang L., Shalaby A., Su C., Cui X., Sweedan A., Zhang K., Harijal S., Sadhujan S., Bashouti M.Y. Dynamic molecular tunnel junctions based on self-assembled monolayers for high tunnelling current triboelectricity generation. *Journal of Materials Chemistry A*. 2023;11(10):4946–4956. DOI: 10.1039/D2TA10048G.
- Zhang J., Zhang X., Wei X., Xue Y., Wan H., Wang P. Recent advances in acoustic wave biosensors for the detection of disease-related biomarkers: A review. *Analytica chimica acta*. 2021;1164:338321. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338321.
- Nair M.P., Teo A.J.T., Li K.H.H. Acoustic Biosensors and Microfluidic Devices in the Decennium: Principles and Applications. *Micromachines*. 2021;13(1):24. DOI: 10.3390/mi13010024.
- Naresh V., Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel)*. 2021;21(4):1109. DOI: 10.3390/s21041109.
- Zhao C., Li C., Li M., Qian L., Wang L., Li H. Surface acoustic wave immuno-sensor based on Au-nanoparticles-decorated graphene fluidic channel for CA125 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2022;367:132063. DOI: 10.1016/j.snb.2022.132063.
- Rauf S., Qazi H.I.A., Luo J., Fu C., Tao R., Rauf S., Yang L., Li H., Fu Y. Ultrasensitive Leaky Surface Acoustic Wave Immuno-sensor for Real-Time Detection of Alpha-Fetoprotein in Biological Fluids. *Chemosensors*. 2021;9(11):311. DOI: 10.3390/chemosensors9110311.
- Toma K., Arakawa T., Mitsubayashi K. Reusable Surface Acoustic Wave Immuno-sensor for Enhanced Monitoring of Airborne House Dust Mite Allergens. New York: Jenny Stanford Publishing; 2021. P. 91–102.
- Jandas P.J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
- Länge K. Bulk and Surface Acoustic Wave Biosensors for Milk Analysis. *Biosensors*. 2022;12(8):602. DOI: 10.3390/bios12080602.
- Kirali K., Brimo N., Serdaroglu D.Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immuno-sensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry*. 2022;18(5):529–545.
- Xu H., Gao M., Tang X., Zhang W., Luo D., Chen M. Micro/Nano Technology for Next-Generation Diagnostics. *Small Methods*. 2020;4(4):1900506. DOI: 10.1002/smtd.201900506.
- Gulyi O.I., Zaitsev B.D., Smirnov A.V., Karavaeva O.A., Borodina I.A. Prospects of acoustic sensor systems for antibiotic detection. *Biosensors and Bioelectronics*: X. 2022;12:100274. DOI: 10.1016/j.biosx.2022.100274.
- Brimo N., Serdaroglu D.Ç. Molecular Imprinted Polymers for Mass Sensitive Sensors: Comparison of Performance Toward Immuno-Sensing Strategies. *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications*. 2021;335–365. DOI: 10.1016/B978-0-12-822117-4.00013-7.
- Rizzato S., Leo A., Monteduro A.G., Chiriacò M.S., Primiceri E., Sirsi F., Milone A., Maruccio G. Advances in the Development of Innovative Sensor Platforms for Field Analysis. *Micromachines*. 2020;11(5):491. DOI: 10.3390/mi11050491.
- Liang S., Sutham P., Wu K., Mallikarjunan K., Wang J.P. Giant Magnetoresistance Biosensors for Food Safety Applications. *Sensors (Basel)*. 2022;22(15):5663. DOI: 10.3390/s22155663.

34. Li Z., Zhang J., Huang Y., Zhai J., Liao G., Wang Z., Ning C. Development of electroactive materials-based immunosensor towards early-stage cancer detection. *Coordination Chemistry Reviews*. 2022;471:214723. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214723.
35. Srivastava A. K., Dwivedi N., Dhand C., Khan R., Sathish N., Gupta M. K., Kumar R., Kumar S. Potential of graphene-based materials to combat COVID-19: properties, perspectives, and prospects. *Materials today*. 2020;18:100385. DOI: 10.1016/j.mtchem.2020.100385.
36. Khan N. I., Song E. Lab-on-a-Chip Systems for Aptamer-Based Bio-sensing. *Micromachines*. 2020;11(2):220. DOI: 10.3390/mi11020220.
37. Farré M., Barceló D. Microfluidic devices: biosensors. *Chemical analysis of food*. 2020;287–351. DOI: 10.1016/B978-0-12-813266-1.00006-1.
38. Lakard B. Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Applied Sciences*. 2020;10(18):6614. DOI: 10.3390/app10186614.
39. Shaukat H., Ali A., Bibi S., Altabey W. A., Noori M., Kouritem S. A. A Review of the Recent Advances in Piezoelectric Materials, Energy Harvester Structures, and Their Applications in Analytical Chemistry. *Applied Sciences*. 2023;13(3):1300. DOI: 10.3390/app13031300.
40. Naal Z., Naal R. M. Z. G. Quartz Crystal Microbalance in Bioanalysis. In: Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry. New York: Springer; 2021. P. 313–330. DOI: 10.1007/978-3-030-82381-8_17.
41. Wei Z., Rolle M. W., Camesano T. A. LL37 and collagen-binding domain-mediated LL37 binding with type I collagen: Quantification via QCM-D. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022;220:112852. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112852.
42. Bonyadi F., Kavrak M., Ucak S., Cetin B., Bayramoglu G., Durusun A. D., Arica Y., Ozalp V. C. Real-Time Biosensing Bacteria and Virus with Quartz Crystal Microbalance: Recent Advances, Opportunities, and Challenges. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2023;1–12. DOI: 10.1080/10408347.2023.2211164.
43. Jandas P. J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
44. Andryukov B. G., Besednova N. N., Romashko R. V., Zaporozhets T. S., Efimov T. A. Label-free biosensors for laboratory-based diagnostics of infections: Current achievements and new trends. *Biosensors*. 2020;10(2):11. DOI: 10.3390/bios10020011.
45. Ермолова Т. Н., Калмыкова Е. Н., Шашкакова О. Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики. *Российский химический журнал*. 2008;LII(2):17–29.
46. Wasilewski T., Szulczyński B., Dobrzyniewski D., Jakubaszek W., Gębicki J., Kamysz W. Development and Assessment of Regeneration Methods for Peptide-Based QCM Biosensors in VOCs Analysis Applications. *Biosensors*. 2022;12(5):309. DOI: 10.3390/bios12050309.
47. Dubiel A. E., Fülop T., Vigier S., Vermette P. Quartz crystal microbalance as an assay to detect anti-drug antibodies for the immunogenicity assessment of therapeutic biologics. *Analytical and biological chemistry*. 2017;409(30):7153–7167. DOI: 10.1007/s00216-017-0674-2.
48. Гаврилов В. А., Тихонов И. В., Смирнова Е. А., Заболоцкая Т. В. Технология изготовления и применения современных методов иммунодиагностики. М.: МГАВМиБ им. К. И. Скрябина; 2013. 42 с.
49. Pirincci S., Ertekin Ö., Laguna D., Özgen F., Öztürk Z., Öztürk S. Label-Free QCM Immunosensor for the Detection of Ochratoxin A. *Sensors (Basel)*. 2018;18(4):1161. DOI: 10.3390/s18041161.
50. Goode J. A., Rushworth J. V. H., Millner P. A. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*. 2015;31(23):6267–6276. DOI: 10.1021/la503533g.
51. Jin Y., Huang Y., Liu G., Zhao R. Gold nanoparticle-sensitized quartz crystal microbalance sensor for rapid and highly selective determination of Cu(II) ions. *The Analyst*. 2013;138(18):5479–5485. DOI: 10.1039/c3an00948c.
52. Bereli N., Çimen D., Hüseyenli S., Denizli A. Detection of amoxicillin residues in egg extract with a molecularly imprinted polymer on gold microchip using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance methods. *Journal of food science*. 2020;85(12):4152–4160. DOI: 10.1111/1750-3841.15529.
53. Pei Y., McEleney K., Payne S. J., She Z. Incorporating quartz crystal microbalance with chronoamperometry to enhance manganese detection stability in drinking water. *Electrochimica Acta*. 2023;447:142156. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142156.
54. Saffari Z., Sepahi M., Ahangari-Cohan R., Khoobi M., Hamidi-Fard M., Ghavidel A., Aghasadeghi M. R., Norouzian D. A quartz crystal microbalance biosensor based on polyethylenimine-modified gold electrode to detect hepatitis B biomarker. *Analytical Biochemistry*. 2023;661:114981. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114981.
55. Wang L., Wu C., Hu Z., Zhang Y., Li R., Wang P. Sensing Escherichia coli O157:H7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based QCM immunosensor. *Journal of Zhejiang University – Science B*. 2008;9:121–131. DOI: 10.1631/jzus.B0710307.
56. Salmain M., Ghasemi M., Boujday S., Pradier C.-M. Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012;173:148–156. DOI: 10.1016/j.snb.2012.06.052.
57. Hong S., Jeong H., Hong S. QCM DNA biosensor for the diagnosis of a fish pathogenic virus VHSV. *Talanta*. 2010;82:899–903. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.04.065.
58. Park I.-S., Kim W.-Y., Kim N. Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000;15:167–172. DOI: 10.1016/s0956-5663(00)00053-1.
59. Li F., Dong Y., Zhang Z., Lv M., Wang Z., Ruan X., Yang D. A recyclable biointerface based on cross-linked branched DNA nanostructures for ultrasensitive nucleic acid detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;117:562–566. DOI: 10.1016/j.bios.2018.06.053.
60. Yao C., Qi Y., Zhao Y., Xiang Y., Chen Q., Fu W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(8):2499–2503. DOI: 10.1016/j.bios.2008.12.036.
61. Lino C., Barrias S., Chaves R., Adega F., Fernandes J., Martins-Lopes P. Development of a QCM-based biosensor for the detection of non-small cell lung cancer biomarkers in liquid biopsies. *Talanta*. 2023;260:124624. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124624.
62. Naberezhnykh G. A., Gorbach V. I., Kalmykova E. N., Solov'eva T. F. Determination of the parameters of binding between lipopolysaccharide and chitosan and its N-acetylated derivative using a gravimetric piezocrystal biosensor. *Biophysical Chemistry*. 2015;198:9–13. DOI: 10.1016/j.bpc.2015.01.003.
63. Wang D., Chen G., Wang H., Tang W., Pan W., Li N., Liu F. A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;48:276–280. DOI: 10.1016/j.bios.2013.04.035.
64. Karaseva N., Ermolaeva T. A regenerable piezoelectric immunosensor on the basis of electropolymerized polypyrrole for highly selective detection of Staphylococcal Enterotoxin A in foodstuffs. *Microchimica Acta*. 2015;182:1329–1335. DOI: 10.1007/s00604-015-1456-1.
65. Васильев С. В., Попова М. В., Фарафонова О. В., Карасева Н. А., Ермолова Т. Н. Формирование рецепторного слоя пьезокварцевого иммуносенсора для определения следовых концентраций рактопамина. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;1.
66. Ye J., Zhang Y., Meng J. Protein–Ligand interactions for hydrophobic charge-induction chromatography: A QCM-D study. *Applied Surface Science*. 2022;572:151420. DOI: 10.1016/j.apsusc.2021.151420.
67. Калмыкова Е. Н., Гарбузова А. В., Ермолова Т. Н., Зубова Н. Ю. Применение сульфатированных полисахаридов для активации электродов пьезокварцевового иммуносенсора. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2007;1:43–48.
68. Cervera-Chiner L., Juan-Borrás M., March C., Arnau A., Escrivé I., Montoya A., Jiménez Y. High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey. *Food Control*. 2018;92:1–6. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.04.026.
69. Bhalla V., Carrara S., Stagni C., Samori B. Chip cleaning and regeneration for electrochemical sensor arrays. *Thin Solid Films*. 2010;518(12):3360–3366. DOI: 10.1016/j.tsf.2009.10.022.

70. Han J., Zhang J., Xia Y., Li S., Jiang L. An immunoassay in which magnetic beads act both as collectors and sensitive amplifiers for detecting antigens in a microfluidic chip (MFC)-quartz crystal microbalance (QCM) system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2011;1–3:2–9. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.11.066.
71. Lim H. J., Saha T., Tey B. T., Tan W. S., Ooi C. W. Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases. *Biosensors & bioelectronics.* 2020;168:112513. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112513.
72. Azam T., Bukhari S. H., Liaqat U., Miran W. Emerging Methods in Biosensing of Immunoglobulin G-A Review. *Sensors (Basel).* 2023;23(2):676. DOI: 10.3390/s23020676.
73. Zida S. I., Lin Y. D., Khung Y. L. Current trends on surface acoustic wave biosensors. *Advanced Materials Technologies.* 2021;6(6):2001018. DOI: 10.1002/admt.202001018.
74. Kuchmenko T. A., Lvova L. B. A perspective on recent advances in piezoelectric chemical sensors for environmental monitoring and foodstuffs analysis. *Chemosensors.* 2019;7(3):39. DOI: 10.3390/chemosensors7030039.
75. Alanazi N., Almutairi M., Alodhayb A. N. A Review of Quartz Crystal Microbalance for Chemical and Biological Sensing Applications. *Sensing and Imaging.* 2023;24(1):10. DOI: 10.1007/s11220-023-00413-w.
76. Na Songkhla S., Nakamoto T. Overview of quartz crystal microbalance behavior analysis and measurement. *Chemosensors.* 2021;9(12):350. DOI: 10.3390/chemosensors9120350.
77. Pohanka M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials (Basel).* 2018;11(3):448. DOI: 10.3390/ma11030448.
78. Gao S., Guisán J. M., Rocha-Martin J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms – A critical review. *Analytica chimica acta.* 2022;1189: 338907. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338907.
79. Hampitak P., Jowitt T. A., Melendrez D., Fresquet M., Hamilton P., Iliut M., Nie K., Spencer B., Lennon R., Vijayaraghavan A. A Point-of-Care Immunosensor Based on a Quartz Crystal Microbalance with Graphene Biointerface for Antibody Assay. *ACS Sensors.* 2020;5(11):3520–3532. DOI: 10.1021/acssensors.0c01641.
80. Saffari Z., Ghavidel A., Ahangari-Cohan R., Hamidi-Fard M., Khoubi M., Aghasadeghi M., Norouzian D. Label-Free Real-Time Detection of HBsAg Using a QCM Immunosensor. *Clinical Laboratory.* 2022;68(4). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2021.210537.
81. Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance Biosensors Based on the Molecular Imprinting Technique for Disease-Related Biomarkers. *Chemosensors.* 2022;10(3):106. DOI: 10.3390/chemosensors10030106.
82. Kwak J., Lee S. S. Highly sensitive piezoelectric immunosensors employing signal amplification with gold nanoparticles. *Nanotechnology.* 2019;30(44):445502. DOI: 10.1088/1361-6528/ab36c9.
83. Li W., Li J., Wu Y., Zhou T. A. A Novel Method in Identifying Pyroptosis and Apoptosis Based on the Double Resonator Piezoelectric Cytometry Technology. *Biosensors.* 2023;13(3):356. DOI: 10.3390/bios13030356.
84. Kirali K., Brimo N., Serdaröglü D. Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immunosensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry.* 2022;18(5):529–545. DOI: 10.2174/1573411016999201120090551.
85. Singh M., Kaur N., Comini E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. *Journal of Materials Chemistry C.* 2020;8(12):3938–3955. DOI: 10.1039/D0TC00388C.
86. Sharma P., Chauhan R., Pande V., Basu T., Kumar A. Rapid sensing of *Tilletia indica*-Teliospore in wheat extract by a piezoelectric label free immunosensor. *Bioelectrochemistry.* 2022;147:108175. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108175.
87. Xu Z., Luo Y. Immunoglobulin-Immobilized Quartz Crystal Microbalance for *Staphylococcus Aureus* Real-Time Detection. *IEEE Sensors Journal.* 2022;22(12):11594–11601. DOI: 10.1109/JSEN.2022.3174161.
88. Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Quartz crystal microbalance-based aptasensors for medical diagnosis. *Micromachines.* 2022;13(9):1441. DOI: 10.3390/mi13091441.
89. Zhang L., Shalabny A., Su C., Cui X., Sweedan A., Zhang K., Hari-lal S., Sadhujan S., Bashouti M. Y. Dynamic molecular tunnel junctions based on self-assembled monolayers for high tunnelling current triboelectricity generation. *Journal of Materials Chemistry A.* 2023;11(10):4946–4956. DOI: 10.1039/D2TA10048G.
90. Zhang J., Zhang X., Wei X., Xue Y., Wan H., Wang P. Recent advances in acoustic wave biosensors for the detection of disease-related biomarkers: A review. *Analytica chimica acta.* 2021;1164:338321. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338321.
91. Nair M. P., Teo A. J. T., Li K. H. H. Acoustic Biosensors and Microfluidic Devices in the Decennium: Principles and Applications. *Micromachines.* 2021;13(1):24. DOI: 10.3390/mi13010024.
92. Naresh V., Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel).* 2021;21(4):1109. DOI: 10.3390/s21041109.
93. Zhao C., Li C., Li M., Qian L., Wang L., Li H. Surface acoustic wave immunosensor based on Au-nanoparticles-decorated graphene fluidic channel for CA125 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2022;367:132063. DOI: 10.1016/j.snb.2022.132063.
94. Rauf S., Qazi H. I. A., Luo J., Fu C., Tao R., Rauf S., Yang L., Li H., Fu Y. Ultrasensitive Leaky Surface Acoustic Wave Immunosensor for Real-Time Detection of Alpha-Fetoprotein in Biological Fluids. *Chemosensors.* 2021;9(11):311. DOI: 10.3390/chemosensors9110311.
95. Toma K., Arakawa T., Mitsubayashi K. Reusable Surface Acoustic Wave Immunosensor for Enhanced Monitoring of Airborne House Dust Mite Allergens. New York: Jenny Stanford Publishing; 2021. P. 91–102.
96. Jandas P. J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical.* 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
97. Länge K. Bulk and Surface Acoustic Wave Biosensors for Milk Analysis. *Biosensors.* 2022;12(8):602. DOI: 10.3390/bios12080602.
98. Kirali K., Brimo N., Serdaröglü D. Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immunosensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry.* 2022;18(5):529–545.
99. Xu H., Gao M., Tang X., Zhang W., Luo D., Chen M. Micro/Nano Technology for Next-Generation Diagnostics. *Small Methods.* 2020;4(4):1900506. DOI: 10.1002/smtd.201900506.
100. Guliy O. I., Zaitsev B. D., Smirnov A. V., Karavaeva O. A., Borodina I. A. Prospects of acoustic sensor systems for antibiotic detection. *Biosensors and Bioelectronics: X.* 2022;12:100274. DOI: 10.1016/j.biosx.2022.100274.
101. Brimo N., Serdaröglü D. Ç. Molecular Imprinted Polymers for Mass Sensitive Sensors: Comparation of Performance Toward Immuno-Sensing Strategies. *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications.* 2021;335–365. DOI: 10.1016/B978-0-12-822117-4.00013-7.
102. Rizzato S., Leo A., Monteduro A. G., Chiriaco M. S., Primiceri E., Sirsi F., Milone A., Maruccio G. Advances in the Development of Innovative Sensor Platforms for Field Analysis. *Micromachines.* 2020;11(5):491. DOI: 10.3390/mi11050491.
103. Liang S., Sutham P., Wu K., Mallikarjunan K., Wang J. P. Giant Magnetoresistance Biosensors for Food Safety Applications. *Sensors (Basel).* 2022;22(15):5663. DOI: 10.3390/s22155663.
104. Li Z., Zhang J., Huang Y., Zhai J., Liao G., Wang Z., Ning C. Development of electroactive materials-based immunosensor towards early-stage cancer detection. *Coordination Chemistry Reviews.* 2022;471:214723. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214723.
105. Srivastava A. K., Dwivedi N., Dhand C., Khan R., Sathish N., Gupta M. K., Kumar R., Kumar S. Potential of graphene-based materials to combat COVID-19: properties, perspectives, and prospects. *Materials today.* 2020;18:100385. DOI: 10.1016/j.mtchem.2020.100385.
106. Khan N. I., Song E. Lab-on-a-Chip Systems for Aptamer-Based Biosensing. *Micromachines.* 2020;11(2):220. DOI: 10.3390/mi11020220.
107. Farré M., Barceló D. Microfluidic devices: biosensors. *Chemical analysis of food.* 2020;287–351. DOI: 10.1016/B978-0-12-813266-1.00006-1.

38. Lakard B. Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Applied Sciences*. 2020;10(18):6614. DOI: 10.3390/app10186614.
39. Shaukat H., Ali A., Bibi S., Altabey W. A., Noori M., Kouritem S. A. A Review of the Recent Advances in Piezoelectric Materials, Energy Harvester Structures, and Their Applications in Analytical Chemistry. *Applied Sciences*. 2023;13(3):1300. DOI: 10.3390/app13031300.
40. Naal Z., Naal R. M. Z. G. Quartz Crystal Microbalance in Bioanalysis. In: Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry. New York: Springer; 2021. P. 313–330. DOI: 10.1007/978-3-030-82381-8_17.
41. Wei Z., Rolle M. W., Camesano T. A. LL37 and collagen-binding domain-mediated LL37 binding with type I collagen: Quantification via QCM-D. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022;220:112852. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112852.
42. Bonyadi F., Kavruk M., Ucak S., Cetin B., Bayramoglu G., Durusun A. D., Arica Y., Ozalp V. C. Real-Time Biosensing Bacteria and Virus with Quartz Crystal Microbalance: Recent Advances, Opportunities, and Challenges. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2023;1–12. DOI: 10.1080/10408347.2023.2211164.
43. Jandas P. J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
44. Andryukov B. G., Besednova N. N., Romashko R. V., Zaporozhets T. S., Efimov T. A. Label-free biosensors for laboratory-based diagnostics of infections: Current achievements and new trends. *Biosensors*. 2020;10(2):11. DOI: 10.3390/bios10020011.
45. Ermolaeva T. N., Kalmykova E. N., Shashkanova O. Yu. Piezoquartz biosensors for the analysis of environmental objects, food products and for clinical diagnostics. *Rossijskij himicheskij zhurnal*. 2008;LII(2):17–29. (In Russ.)
46. Wasilewski T., Szulczyński B., Dobrzyniewski D., Jakubaszek W., Gębicki J., Kamysz W. Development and Assessment of Regeneration Methods for Peptide-Based QCM Biosensors in VOCs Analysis Applications. *Biosensors*. 2022;12(5):309. DOI: 10.3390/bios12050309.
47. Dubiel A. E., Fülop T., Vigier S., Vermette P. Quartz crystal microbalance as an assay to detect anti-drug antibodies for the immunogenicity assessment of therapeutic biologics. *Analytical and biological chemistry*. 2017;409(30):7153–7167. DOI: 10.1007/s00216-017-0674-2.
48. Gavrilov V. A., Tikhonov I. V., Smirnova E. A., Zabolotskaya T. V. Manufacturing technology and application of modern immuno-diagnostic methods. Moscow: MGAVMiB im. K. I. Scriabin; 2013. 42 p. (In Russ.)
49. Pirinçci S., Ertekin Ö., Laguna D., Özgen F., Öztürk Z., Öztürk S. Label-Free QCM Immunosensor for the Detection of Ochratoxin A. *Sensors (Basel)*. 2018;18(4):1161. DOI: 10.3390/s18041161.
50. Goode J. A., Rushworth J. V. H., Millner P. A. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*. 2015;31(23):6267–6276. DOI: 10.1021/la503533g.
51. Jin Y., Huang Y., Liu G., Zhao R. Gold nanoparticle-sensitized quartz crystal microbalance sensor for rapid and highly selective determination of Cu(II) ions. *The Analyst*. 2013;138(18):5479–5485. DOI: 10.1039/c3an00948c.
52. Bereli N., Çimen D., Hüseyinli S., Denizli A. Detection of amoxicillin residues in egg extract with a molecularly imprinted polymer on gold microchip using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance methods. *Journal of food science*. 2020;85(12):4152–4160. DOI: 10.1111/1750-3841.15529.
53. Pei Y., McEleney K., Payne S. J., She Z. Incorporating quartz crystal microbalance with chronoamperometry to enhance manganese detection stability in drinking water. *Electrochimica Acta*. 2023;447:142156. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142156.
54. Saffari Z., Sepahi M., Ahangari-Cohan R., Khoobi M., Hamidi-Fard M., Ghavidel A., Aghasadeghi M. R., Norouzian D. A quartz crystal microbalance biosensor based on polyethylenimine-modified gold electrode to detect hepatitis B biomarker. *Analytical Biochemistry*. 2023;661:114981. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114981.
55. Wang L., Wu C., Hu Z., Zhang Y., Li R., Wang P. Sensing Escherichia coli O157:H7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based QCM immunosensor. *Journal of Zhejiang University – Science B*. 2008;9:121–131. DOI: 10.1631/jzus.B0710307.
56. Salmain M., Ghasemi M., Boujday S., Pradier C.-M. Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012;173:148–156. DOI: 10.1016/j.snb.2012.06.052.
57. Hong S., Jeong H., Hong S. QCM DNA biosensor for the diagnosis of a fish pathogenic virus VHSV. *Talanta*. 2010;82:899–903. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.04.065.
58. Park I.-S., Kim W.-Y., Kim N. Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000;15:167–172. DOI: 10.1016/s0956-5663(00)00053-1.
59. Li F., Dong Y., Zhang Z., Lv M., Wang Z., Ruan X., Yang D. A recyclable biointerface based on cross-linked branched DNA nanostructures for ultrasensitive nucleic acid detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;117:562–566. DOI: 10.1016/j.bios.2018.06.053.
60. Yao C., Qi Y., Zhao Y., Xiang Y., Chen Q., Fu W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(8):2499–2503. DOI: 10.1016/j.bios.2008.12.036.
61. Lino C., Barrias S., Chaves R., Adega F., Fernandes J., Martins-Lopes P. Development of a QCM-based biosensor for the detection of non-small cell lung cancer biomarkers in liquid biopsies. *Talanta*. 2023;260:124624. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124624.
62. Naberezhnykh G. A., Gorbach V. I., Kalmykova E. N., Solov'eva T. F. Determination of the parameters of binding between lipopolysaccharide and chitosan and its N-acetylated derivative using a gravimetric piezoquartz biosensor. *Biophysical Chemistry*. 2015;198:9–13. DOI: 10.1016/j.bpc.2015.01.003.
63. Wang D., Chen G., Wang H., Tang W., Pan W., Li N., Liu F. A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;48:276–280. DOI: 10.1016/j.bios.2013.04.035.
64. Karaseva N., Ermolaeva T. A regenerable piezoelectric immunosensor on the basis of electropolymerized polypyrrole for highly selective detection of Staphylococcal Enterotoxin A in foodstuffs. *Microchimica Acta*. 2015;182:1329–1335. DOI: 10.1007/s00604-015-1456-1.
65. Vasilev S. V., Popova M. V., Farafonova O. V., Karaseva N. A., Ermolaeva T. N. The formation of the piezoelectric immunosensor's receptor layer for the detection of trace concentrations of ractopamine. *Modern problems of science and education*. 2014;1. (In Russ.)
66. Ye J., Zhang Y., Meng J. Protein–Ligand interactions for hydrophobic charge-induction chromatography: A QCM-D study. *Applied Surface Science*. 2022;572:151420. DOI: 10.1016/j.apsusc.2021.151420.
67. Kalmykova E. N., Garbuzova A. V., Ermolaeva T. N., Zubova N. Yu. Application of sulfated polysaccharides to activate electrodes of a piezoquartz immunosensor. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2007;1:43–48. (In Russ.)
68. Cervera-Chiner L., Juan-Borrás M., March C., Arnau A., Escrivé I., Montoya A., Jiménez Y. High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey. *Food Control*. 2018;92:1–6. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.04.026.
69. Bhalla V., Carrara S., Stagni C., Samori B. Chip cleaning and regeneration for electrochemical sensor arrays. *Thin Solid Films*. 2010;518(12):3360–3366. DOI: 10.1016/j.tsf.2009.10.022.
70. Han J., Zhang J., Xia Y., Li S., Jiang L. An immunoassay in which magnetic beads act both as collectors and sensitive amplifiers for detecting antigens in a microfluidic chip (MFC)-quartz crystal microbalance (QCM) system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;1–3:2–9. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.11.066.