

Запропонований винахід відноситься до засобів інфрачервоної (14) спектроскопії поглинання і може бути застосований у методах дослідження нуклеїнових кислот, а також для вивчення механізмів перебігу різноманітних біохімічних процесів за їхньою участю.

Відомий спосіб одержання 14 спектрів поглинання шляхом вимірювання пропускання світла, що проходить через зразок за умов порушеного повного відбиття світла [Харрик Н. Спектроскопия внутреннего отражения. - М.: Мир -1970.- 335с].

Суть згаданого способу полягає в тому, що при повному внутрішньому відбитті промінь світла проникає з оптично прозорого середовища більшої густини (показник заломлення n_1) у середовище меншої густини (n_2) на глибину порядку довжини хвилі λ . Порушення повного внутрішнього відбиття (ППВВ, англійською мовою ATR - attenuated total reflection) спостерігається тоді, коли коефіцієнт відбиття світла від поверхні розділу середовищ R стає меншим за одиницю внаслідок поглинання у шарі товщиною порядку λ середовища меншої густини. Реєстрація залежності коефіцієнта відбиття $R=I/I_0$ (I_0 – інтенсивність падаючого світла, I – інтенсивність відбитого світла) за допомогою спектральних приладів дає 14 спектр ППВВ речовини меншої густини, який характеризує її абсорбційні властивості.

Недолік описаного способу полягає в тому, що деякі класи полімерів, наприклад ДНК та РНК, за рахунок адгезії утворюють з поверхнею напівпровідникової підкладки дуже міцно зв'язані плівки, які неможливо видалити за рахунок звичайних розчинників. Це, в свою чергу, унеможливує отримання 14 спектру наступного зразка, використовуючи одну і ту ж призму, і потребує кожен раз приймати до уваги власне поглинання нової призми.

При потребі підвищити інтенсивність спектра ППВВ (при слабкому поглинанні або малій кількості речовини, за наявності дуже тонких плівок і т.п.) застосовують метод багаторазово порушеного повного внутрішнього відбиття (БППВВ) світла, який забезпечує більшу чутливість, а в деяких випадках і вищу точність порівняно з традиційною 14 спектроскопією пропускання [Якушин В.И., Струков О.Г. Спектроскопия внутреннего отражения. Применение в химии и промышленности // Успехи химии. - 1972. -41, №8. - С.1504-1535]. В цьому разі збільшення числа відбиттів еквівалентне збільшенню товщини зразка в 14 спектроскопії пропускання. Техніка ППВВ має також переваги при дослідженні речовин з високою абсорбційною здатністю за рахунок можливості реалізувати тонкий шар, який поглинає світло. Цю методику використовують, зокрема, при дослідженні поверхневого стану речовин, адсорбованих на поверхні, і в аналітичній практиці [Якутин В.И., Струков О.Г. Спектроскопия внутреннего отражения. Применение в химии и промышленности // Успехи химии. - 1972. -41, №8.-С.1504-1535].

Оснащення серійних ІЧ спектрометрів приставками БППВВ дозволяє безпосередньо вивчати хімічні, фізико-хімічні та біохімічні процеси, які відбуваються в середовищах, недоступних для дослідження традиційними методами. З часом техніка БППВВ набула широкого застосування в молекулярній біології і біохімії [Vigano C, Manciu L, Duyse F., Goormaghtigh E., Ruyschaert M. Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the structure orientation and tertiary structure changes in peptides and membrane proteins // Biopolymers. - 2000. - 55, №5.- P.373-380; Rothschild K.J. FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model // J. Bioenerg. Biomembr. -1992.-24, №2.-P.147-167.]. Серед численних молекулярних та надмолекулярних об'єктів дослідження слід назвати пептиди та білки різної природи (мембрани, вірусні, плазми крові та ін.), ліпіди, фосфоліпіди, гормони, рецептори, бактеріородопсин, комплекси антиген-антитіло, шкіру, оболонку зерна і т.п.

Найбільш близьким до запропонованого винаходу за технічною суттю є спосіб одержання ІЧ спектра поглинання полімеру, що включає операції формування зразка у вигляді плівки полімеру на робочій поверхні призми з напівпровідникового матеріалу та реєстрації параметрів світла, яке проходить через зразок у режимі багаторазового порушеного повного внутрішнього відбиття світла, та зняття плівки з поверхні призми [Якутин В.И., Струков О.Г. Спектроскопия внутреннего отражения. Применение в химии и промышленности //Успехихимии.-1972.-41, №8.-С.1504-1535].

Недоліком описаного способу є те що його не можна застосувати для дослідження нуклеїнових кислот (НК). Причину цього обмеження ми вбачаємо у неможливості безруйнівного зняття плівки НК з поверхні призми за допомогою різноманітних розчинників, які зазвичай використовуються у спектроскопії. Фактично це означає, що для отримання ІЧ спектра плівки НК ми кожен раз повинні застосовувати нову призму, що робить цей процес нерентабельним, особливо в умовах експрес-аналізу великої кількості зразків НК, вилучених з різних типів біологічних об'єктів.

В основу запропонованого винаходу поставлено задачу створення такого способу одержання ІЧ спектрів поглинання біополімерів, який би дозволив зменшити витрати матеріалу та часу на приготування зразків таких біологічних об'єктів як НК. Поставлена задача вирішується за рахунок процедури ефективного видалення зразків НК з поверхні робочої призми без пошкодження останньої.

Поставлена задача вирішується у запропонованому винаході, який, як і відомий спосіб одержання ІЧ спектра поглинання полімеру, включає операції формування зразка у вигляді плівки полімеру на робочій поверхні призми з напівпровідникового матеріалу та реєстрації параметрів світла, яке проходить через плівку у режимі багаторазового порушеного повного внутрішнього відбиття світла та зняття плівки з поверхні призми, а, відповідно до винаходу, на робочій поверхні призми формують плівку нуклеїнової кислоти - ДНК або РНК , а її зняття з поверхні призми виконують при температурі +36...+80°C буфером такого складу: 10мМ трис-НСl, $pH \leq 8$, 5мМ NaCl, 1мМ EDTA.

Як призму з напівпровідникового матеріалу зазвичай використовують германієві призми.

Запропонований спосіб дозволив долучити НК до переліку біоб'єктів, 14 спектри поглинання яких можна досліджувати за допомогою БППВВ світла, багаторазово використовуючи при цьому одну і ту ж робочу призму і рекордно малу кількість ПК.

Приклад. У прикладі використано ДНК фага λ ("Биопол", Російська Федерація) та сумарний препарат РНК з листя *Kalanchoe daigremontiana*, виділеної за методикою [Raha S., Merante F., Protean G., Reed J.K. Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride //

Gen. Anal. - 1990. - 7, №7.-P.173-177.]. 14 спектри БППВВ реєстрували ІЧ спектрофотометром "Specord M-80" ("Carl Zeiss", Німеччина) за допомогою стандартної приставки до спектрофотометрів "UR-10" та "UR-20" з германієвою призмою розміром 49мм x 25мм x 2мм. Кут між її гранями та кут внутрішнього відбиття дорівнюють 45°. Коефіцієнт відбиття призми - 24, область пропускання 800-5500см⁻¹.

Плівки ДНК та РНК формували на робочій поверхні призми кристалічного германію випаровуванням водного розчину, прискореним потоком теплого повітря. Потрібну площу плівок отримували за допомогою спеціально виготовленого з тефлону набору шаблонів. З наведених на рисунку спектрів вираховували спектральний внесок робочої поверхні германієвої призми. При цьому за основу брали відомий спосіб [див.Физико-химические методы обработки поверхности полупроводников. Под ред. Луфт Б.Д. - М.: Радио и связь. - 1982. -С.119-121).

Таким чином, в області 4000-900см⁻¹ зареєстровано досить інтенсивні ІЧ спектри поглинання ДНК фага λ та сумарної РНК, виділеної з листя *Kalanchoe daigremontiana* (рисунок), які за своєю якістю не поступаються аналогічним спектрам, отримано традиційною ІЧ спектроскопією пропускання в стані плівки [Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. Физические свойства системы ДНК -вода// Биофизика. - 1993. - 38, №5. - С.768 -790; Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я., Шабарчина Л.И. Исследование температурной аномалии воды сорбированной на ДНК, методом ИК спектроскопии// Биофизика. - 1979. - 24, №2. - С.210-216]. Наголошуємо, що каменем спотикання при застосуванні техніки БППВВ світла для отримання ІЧ спектрів поглинання виявився етап ефективного, неруйнівного зняття плівки НК з германієвої призми. Ми гадаємо, що саме це є причиною відсутності в літературі даних щодо ІЧ спектрів БППВВ нуклеїнових кислот. Ефективно змити зразки без деструкції поверхні германієвої призми вдалося лише за допомогою експериментально винайденого авторами буферу такого складу: 10мМ трис-НСІ, рН≤8, 5мМ NaCl, 1мМ ЕДТА і за температури 36....40°C. Тому германієву призму як робочий елемент можна використовувати багато разів.

Отже, запропонований спосіб дозволив долучити НК до переліку біоб'єктів, ІЧ спектри поглинання яких можна досліджувати за допомогою БППВВ світла, зокрема, для потреб медико-біологічної та фармацевтичної промисловості. Запропоновану процедуру видалення плівок НК з поверхні напівпровідника може бути також використано при виробництві біочіпів.