



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97792** (13) **C2**
(51) МПК**G01N 21/77** (2006.01)**G01N 33/543** (2006.01)**G01N 33/569** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2008 09665**
(22) Дата подання заявки: **13.12.2006**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **26.03.2012**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10 2005 062 377.8**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **23.12.2005**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **DE**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.10.2008, Бюл.№ 19**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.03.2012, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2006/012000, 13.12.2006**

(72) Винахідник(и):
**Бурмайстер Енс (DE),
Дорн Інгмар (DE),
Рабе Уве (DE/JP),
Хойзер-Хан Ізольде (DE)**
(73) Власник(и):
БАЕР КРОПСАЄНС АГ,
Alfred-Nobel-Strasse 50, 40789 Monheim,
Germany (DE)
(74) Представник:
**Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр.
№4**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 5 959 292, A, 28.09.1999
WO 03020488, A, 13.03.2003
WO 0192870, A, 06.12.2001
WO 0220873, A, 14.03.2002
WO 0043552, A, 27.07.2000
LIGLER FRANCES S. et al. Array biosensor for detection of toxins// ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY OCT 2003, Vol. 377, No. 3, October 2003, pp. 469-477
NGUNDI MIRIAM M. et al. Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages// ANALYTICAL CHEMISTRY, 1 JAN 2005, Vol. 77, No. 1, 1 January 2005, pp. 148-154

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ, ПРИСТРІЙ ДЛЯ ЗДІЙСНЕННЯ СПОСОБУ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ ТА НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ МІКОТОКСИНІВ**(57) Реферат:**

Спосіб визначення мікотоксинів, що вибирають з групи, яка включає токсини роду *Fusarium*, охратоксини та афлатоксини, що включає такі стадії: а) виготовлення тонкошарового хвилеводу, що містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення, ніж (а), на якому просторово окремо іммобілізовані специфічні та/або афінні партнери зв'язування як хімічний або біохімічний елемент розпізнавання мікотоксинів, та/або партнер зв'язування, б) нанесення зразку, що містить мікотоксин(и), та партнерів зв'язування на тонкошаровий хвилевід з іммобілізованими партнерами зв'язування, с) детектування сигналу у миттєвому полі на основі взаємодії партнерів зв'язування, іммобілізованих на тонкошаровому хвилеводі, із мікотоксинами

UA 97792 C2

зразку та/або партнерами зв'язування, Пристрій для визначення мікотоксинів, а також набір, придатний для здійснення способу.

Даний винахід стосується пристрою і способу виявлення мікотоксинів, а також наборів, придатних для здійснення способу.

Проблема виявлення мікотоксинів охоплює велику область застосувань, наприклад, харчову промисловість та галузь виготовлення кормів, аналіз навколишнього середовища, захист рослин, а також біохімічні дослідження.

Мікотоксини являють собою отруйні речовини, утворені пліснявою, з дуже різноманітною хімічною структурою. Мікотоксини зустрічаються у продуктах врожаю, таких як зернові, олійне насіння та фрукти, та можуть ставати причиною отруєння людей та тварин. Зокрема, існує понад 300 різних мікотоксинів, які поділяються на, приблизно, 25 структурних типів та проявляють різну токсичну дію. Залежно від виду токсину мікотоксини можуть спричиняти гострі або хронічні отруєння. До груп мікотоксинів, що зустрічаються найчастіше, належать афлатоксини, охратоксини, алкалоїди маткових ріжок, патулін, та токсин *Fusarium*. Серед токсинів *Fusarium* особливо важливими є деоксиніваленол, зеараленон, ніваленол, Т-2-/HT2-токсин та фумонізін, оскільки вони часто зустрічаються у хлібобулочних виробках. Відповідно, для забезпечення якості продуктів харчування, необхідно мати тест для виявлення мікотоксинів, наприклад, токсинів плісняви на полях, наприклад, токсину *Fusarium*, або плісняви на складах на місцях зберігання зернових культур, торговцями зернових культур, наприклад на млинах, на солодовнях, виробниками харчових продуктів, фермерами, консультаціями, університетами або міністерствами, наприклад, міністерством захисту споживачів.

Сучасній технології відомий ряд способів виявлення мікотоксинів. Виявлення мікотоксинів проводять шляхом, наприклад, хроматографічного розділення, таким як ВЕРХ, яке може бути поєднане із флуоресцентним, абсорбційним або мас-спектрометричним детектуванням. Перед проведенням аналізу методом ВЕРХ, наприклад, аналізу зразку зернових, як правило, проводять, збагачення та очищення аналіту за допомогою імуноафінних колонок. Недоліком всіх способів, що основані на ВЕРХ, є значні інвестиційні витрати, відносно складне маніпулювання з зразками, а також довгий час аналізу. На основі названих недоліків, способи виявлення на основі ВЕРХ непридатні для швидких, дешевих, та простих аналізів зразків злакових у, наприклад, місцях виробництва, зберігання, продажу або переробки. Замість цього аналізу, що основані на ВЕРХ, проводять у спеціалізованих аналітичних лабораторіях. На практиці, відповідний результат стає доступним тільки після декількох днів.

Альтернативним методом виявлення мікотоксинів є імуноферментний твердофазний аналіз (ELISA). Для проведення ELISA-тесту виготовляють пластини з мікротитрами, заглиблення яких вкривають, наприклад, антитілами, що специфічно зв'язують мікотоксини. Недоліком ELISA-тесту є використання великої кількості стадій відбирання за допомогою піпеток, промивання та інкубації, які можуть призвести до довгого часу аналізу, що перевищує 30 хвилин. Це заважає швидкому проведенню тесту в польових умовах, зовні аналітичної лабораторії. До того ж, тест не дозволяє одночасного виявленню декількох аналітів, оскільки, як правило, кожна пластинка з мікротитрами вкрита тільки одним типом антитіл.

Наступним методом виявлення мікотоксинів є латерально-потоківий аналіз (LFA). Для виявлення мікотоксинів шляхом LFA, наприклад, може бути проведений, прямий конкурентний імунологічний аналіз на пластинках нітроцелюлози, причому зразок, що його аналізують, просочується та рухається вздовж цілої пластини за рахунок капілярних сил. Недоліком є те, що спосіб дозволяє тільки якісне виявлення мікотоксину. Крім того, недоліком є те, що для проведення такого тесту необхідні окремі пластини для кожного мікотоксину.

Наразі, також відомі роботи, спрямовані на розробку нових способів виявлення мікотоксинів, наприклад, описані М. М. Ngundi et al., Anal. Chem. 2005, 77, 148-154. У цьому способі проводять непрямий конкурентний імунологічний аналіз для виявлення охратоксину А, при тому що охратоксин А іммобілізують на скляному носії. Суміш антитіла до охратоксину А, що модифіковано флуоресцентним маркером, та визначуваного зразку наносять на скляну поверхню, і, після видалення антитіл, що не зв'язались, шляхом промивання поверхню аналізують. Недоліком цього способу є необхідність довгих стадій промивання та інкубації, що тривають від 10 до 20 хвилин, а для зчитування результатів необхідна трудомістка та дорога система формування флуоресцентного зображення. Це робить неможливим розробку польового тесту для проведення аналізу поза лабораторії на основі запропонованого способу.

Сучасні технології для виявлення мікотоксинів потребують високих інвестиційних витрат, оскільки потребують складних приладів зчитування, містять багато ручних стадій, або не можуть бути застосовані поза аналітичної лабораторії.

Тому, завданням представленого винаходу було розробити спосіб, який здолає, щонайменше, один із перерахованих недоліків сучасних способів, зокрема, такий спосіб, що дозволить швидке, просте у маніпулюванні та недороге виявлення мікотоксинів у зразку.

Це завдання вирішується шляхом розробки такого способу швидкого виявлення мікотоксинів, що включає такі стадії:

а) Виготовлення тонкошарового хвилеводу, який включає перший оптично прозорий шар, що проводить хвилі (a) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення ніж (a), на якому просторово окремо іммобілізовані специфічний та/або афінний партнер зв'язування у якості хімічного або біохімічного елементу розпізнавання мікотоксинів, та/або партнер зв'язування,

б) Нанесення зразку, що містить мікотоксин(и), та партнерів зв'язування на тонкошаровий хвилевід з іммобілізованими партнерами зв'язування,

с) Детектування сигналу у миттєвому полі на основі взаємодії партнеру зв'язування, іммобілізованого на тонкошаровому хвилеводі, із мікотоксинами зразку та/або партнерами зв'язування,

д) Визначення кількості вмісту мікотоксинів у зразку.

Наступним предметом представленого винаходу є пристрій для виконання способу виявлення мікотоксинів.

Наступним предметом представленого винаходу є набір, придатний для проведення способу виявлення мікотоксинів.

Наступні переважні розробки та досягнення винаходу описані у формулах.

Несподівано було знайдено, що спосіб виявлення мікотоксинів згідно із винаходом, може бути виконаний просто та поза спеціалізованої аналітичної лабораторії. Це робить можливим проведення способу згідно із винаходом у формі швидкого тесту, без обов'язкового аналізу зразків у лабораторії. Надалі, переважним є те, що, виявлення мікотоксинів за способом згідно із винаходом потребує мало або не потребує жодних стадій промивання. Перед усім, саме це є перевагою, оскільки проведення стадій промивання потребує багато часу, що уповільнює отримання результату аналізу, а, особливо при недостатньо ретельному або недбайливому проведенні, може спотворювати результати аналізу, або взагалі унеможливлювати виявлення.

Комбінація корисних властивостей способу згідно із винаходом робить можливим виявлення мікотоксинів у харчових продуктах, наприклад, на місцях зберігання зернових, на місцях торгівлі або переробки. Особливим чином, простим та швидким виконання способу робить саме те, що спосіб може бути виконаний особами, які не мають спеціалізованої аналітичної підготовки.

У переважній формі виконання способу у якості тонкошарового хвилеводу використовують біочіп миттєвого поля, який оснований на тонкошаровому хвилеводі, переважним чином, планарний оптичний біочіп-хвилевід, який оснований на тонкошаровому хвилеводі.

Оптичні хвилеводи є класом перетворювачів сигналів, за допомогою яких можна детектувати зміну оптичних властивостей середовища, яке межує із хвилевідним шаром, типовим чином, із діелектриком. Якщо приведенне світло транспортується у хвилевідному шарі, на межі поділу фаз середовище/хвилевод світлове поле не спадає різко, а поступово затухає у так-званому середовищі детектування, що межує із хвилеводом. Це світлове поле, що спадає експоненціально, називають миттєвим полем. Якщо оптичні властивості середовища, що межує із хвилеводом, змінюються всередині миттєвого поля, це може бути детектовано із використанням відповідної придатної конструкції.

При використанні хвилеводів у якості перетворювачів сигналів корисним є те, що якщо елементи розпізнавання іммобілізовані на поверхні розділу фаз, можна проводити як детектування зв'язування до цього елементу, так і реакції цього елементу, якщо оптичні властивості середовища детектування на поверхні поділу фаз між середовищем та хвилеводом при цьому змінюються.

Відповідно, стає можливим економія часу при проведенні виявлень, а також спрощення процесу.

Детектування сигналу, та, відповідно маркованого елементу, може при цьому проводитись за зміною оптичних властивостей середовища, наприклад зразку, що його аналізують, прямо на поверхні перетворювача сигналу, відповідно, тонкошарового хвилеводу, наприклад, по зміні поглинання, флуоресценції, люмінесценції, або подібного.

Переважним чином, у миттєвому полі детектують сигнал флуоресценції. Згідно із винаходом, придатними елементами маркування для маркування партнеру зв'язування, наприклад, мікотоксину, кон'югату мікотоксину, кон'югату антитіла або антитіла є, переважним чином, органічні флюорофори, наночасточки, флуоресцентні наночасточки, гранули, флуоресцентні гранули, флуоресцентні протеїни або інші молекули та одиниці, що можуть генерувати сигнал, або будь-які комбінації різних елементів маркування. Переважним чином використовують здатні до люмінесценції марковані партнери зв'язування. Переважними елементами маркування є органічні люмінофори та/або флуоресцентні протеїни.

Відповідно до способу згідно із винаходом, флуоресцентним чином маркований партнер зв'язування може, переважним чином, бути збуджений за допомогою миттєвого поля. У переважній формі виконання миттєве поле генерують за допомогою планарного оптичного хвилеводу, як описано у US 5,959,292, Duveneck et al. Ізотропно емітована флуоресценція може

бути детектована за допомогою придатної конструкції. У інших формах виконання введене у хвилевід флуоресцентне випромінювання можна вивести з хвилеводу за допомогою придатного оптичного елементу та детектувати за допомогою придатної оптичної конструкції.

Особливою перевагою є те що, можна обмежено або навіть повністю знехтувати відмивкою, переважним чином, флуоресцентно маркованого партнера зв'язування або зразку, що містить марковані партнери зв'язування, відповідно розчину перед детектуванням сигналу. Це робить можливою економію часу при виявленні мікотоксинів, а також і спрощення проведення способу, оскільки можна знехтувати також приготуванням різних буферних розчинів, які звичайно використовують.

Тонкошарові хвилеводи, що використовують, охоплюють переважним чином, оптично прозорий хвилевідний шар (а), що містить оксид, який вибирають із групи, до якої входять TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 та/або ZrO_2 , а переважним чином, що вибирають із групи, до якої входять TiO_2 , Ta_2O_5 та/або Nb_2O_5 . Переважним чином, оптично прозорий хвилевідний шар (а) побудовано із TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 або ZrO_2 , переважним чином, TiO_2 , Ta_2O_5 або Nb_2O_5 . Зокрема, виявилось корисним використання пентоксиду танталу, особливо, при детектуванні сигналу флуоресценції.

У переважній формі виконання на тонкошаровий хвилевід, зокрема, на оптично прозорий хвилевідний шар (а), що містить оксид, який вибирають із групи TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 та/або ZrO_2 , наносять один або кілька шарів органофосфорних кислот формули (I)



та/або органофосфонових кислот формули (II)



та/або їх солі, причому R означає C_{10} - C_{24} -алкіл.

Переважним чином, використовують органофосфорні кислоти та/або органофосфонові кислоти, переважним чином, органофосфати та/або органофосфонати, із R, що вибирають із групи, до якої входять нерозгалужений алкіл із C_{10} до C_{20} , переважним чином, що вибирають із групи, до якої входять нерозгалужений алкіл із C_{12} до C_{18} , переважним чином, додецилфосфорна кислота, додецилфосфат, октадецилфосфонат та/або октадецилфосфонова кислота.

Переважним чином, використовують органофосфорні кислоти, відповідно, фосфати, які можуть бути нанесені на тонкошаровий хвилевід у формі водорозчинних солей із водних розчинів.

У переважних формах виконання органофосфорні кислоти та/або органофосфонові кислоти, переважним чином, органофосфати, наносять на тонкошаровий хвилевід, особливо, на біочіп миттєвого поля, переважним чином, на планарний оптичний біочіп-хвилевід, у формі моношару. Нанесення можна проводити у формі занурювання.

Моношар може бути нанесений на оптично прозорий шар, побудований з оксидів, у якості проміжного адгезійного шару. Переважним чином, органофосфорні кислоти та/або органофосфонові кислоти можуть взаємодіяти із елементами розпізнавання, особливо, із протеїнами або із закріпленими на протеїнах елементами розпізнавання, та підсилювати зв'язування елементів розпізнавання із біочіпом.

Використовують партнери зв'язування, що, переважним чином, обирають із групи, до якої входять анти-мікотоксин-антитіло, анти-мікотоксин-антитіло-кон'югати, мікотоксин, мікотоксин-кон'югати, фрагменти анти-мікотоксин-антитіла, мікотоксин-зв'язуючі пептиди, мікотоксин-зв'язуючі антикаліни, мікотоксин- зв'язуючі аптамери, мікотоксин-зв'язуючі шпигельмери та/або мікотоксин-зв'язуючі імпринтинг-полімери, переважним чином, що вибирають із групи, що містить анти-мікотоксин-антитіло, анти-мікотоксин-антитіло-кон'югати, мікотоксин та/або мікотоксин-кон'югати.

Партнери зв'язування взаємодіють, відповідно, специфічно та/або афінно із іншим відповідним партнером зв'язування. Наприклад, анти-мікотоксин-антитіло, що нанесено на тонкошаровий хвилевід, афінно зв'язується із іммобілізованим на цьому тонкошаровому хвилеводі мікотоксином. Так само афінно зв'язуються іммобілізовані на тонкошаровий хвилевід

анти-мікотоксин-антитіла із мікотоксинами або мікотоксин-кон'югатами, що нанесені на тонкошаровий хвилевід. Специфічність зв'язування при цьому залежить від використаного афінного партнера. Таким чином використовувані кросс-реактивні анти-мікотоксин-антитіла афінно зв'язуються до відповідних мікотоксинів, наприклад, з групи фукозидів, але менш специфічно ніж, наприклад, специфічне антитіло проти фукозину В1. Партнери зв'язування, які іммобілізовані, також позначають як елемент розпізнавання або "молекули-акцептори".

Кон'югати анти-мікотоксин-антитіла та мікотоксин-кон'югати, можуть бути побудовані із, наприклад, протеїну та анти-мікотоксин-антитіла або мікотоксину.

У переважній формі виконання, наприклад, при непрямому конкурентному аналізі, іммобілізованими партнерами зв'язування є мікотоксин-кон'югати. Мікотоксин-кон'югати, переважним чином, будують з мікотоксину, пов'язаного до протеїну, наприклад, до яловичого сироваткового альбуміну (BSA, Bovine Serum Albumine). Особливою перевагою при використанні такого кон'югату мікотоксин-BSA є те, що може бути досягнуто покращання зв'язування мікотоксину до тонкошарового хвилеводу за рахунок взаємодії між протеїном та органофосфорними кислотами та/або органофосфоновими кислотами. Це може забезпечувати покращання адгезії елементів розпізнавання до тонкошарового хвилеводу.

Елемент маркування, наприклад, флуоресцентний барвник або люмінофор, може бути зв'язаний із партнером зв'язування, наприклад, із анти-мікотоксин-антитілом, або із мікотоксином, прямо або опосередковано, через спейсер (просторову зв'язку), наприклад, протеїн, або алкіл- або поліетиленглікольний ланцюжок. Елемент маркування, наприклад, флуоресцентний барвник або люмінофор, переважним чином, зв'язаний із мікотоксином через протеїн. Придатним протеїном є, наприклад, BSA. Зв'язування люмінофору із мікотоксином через BSA може значно покращувати зв'язування елементу маркування із партнером зв'язування, наприклад, антитілом. Наступна перевага виражається у тому, що можна уникнути дорогого і складного способу прямого зв'язування, наприклад, люмінофору із мікотоксином. Переважним чином, у якості партнера зв'язування для іммобілізованого анти-мікотоксин-антитіла використовують флуоресцентно марковані кон'югати мікотоксин-BSA, наприклад, у прямому конкурентному аналізі.

Принциповим чином, виявлення мікотоксинів може бути проведено у таких зразках, розчинах або інших середовищах, які можуть бути нанесені на тонкошаровий хвилевід. У переважних формах виконання зразками є продукти харчування людей або тварин. Переважним чином, виявлення мікотоксинів відповідно до способу, згідно із винаходом, проводять у зернових культурах, продуктах з зернових культур, вині, соках, або фруктах, та/або у продуктах, що містять зернові культури, вино, соки, та/або фрукти. При цьому зразок, що аналізують, наприклад, продукт харчування або продукт, може бути нанесений на тонкошаровий хвилевід, або спочатку екстрагований розчинником або сумішшю розчинників, і надалі, наносять вже екстрагований екстракт. Екстракт може бути використаний розведений або концентрований.

Мікотоксини можуть бути вилучені із зразку, що його аналізують, наприклад, зернових культур або інших продуктів харчування, шляхом обробки розчинником або сумішшю розчинників. Наприклад, мікотоксини можуть бути вилучені із зразків зернових культур шляхом розмелювання та наступної екстракції водою або органічним розчинником або сумішами розчинників, наприклад, сумішами з води, що, можуть бути змішані, при необхідності, із буферними добавками, солями, кислотами або основами та іншими добавками, та органічними розчинниками, наприклад, сумішами з води та метанолу або етанолу, або води та ацетонітрилу. Інші способи, які призводять до екстракції мікотоксинів, відомі спеціалістам. Отримані розчинені мікотоксини надалі можуть бути прямо або після розведення або збагачення проаналізовані на тонкошаровому хвилеводу або чіпі.

Використовують такі елементи розпізнавання, які також позначають як "молекули-акцептори", які, переважним чином, вибирають із групи, до якої входять анти-мікотоксин-антитіло, кон'югати анти-мікотоксин-антитіла, мікотоксини та/або мікотоксин-кон'югати, переважним чином, два або декілька різних, що можуть бути іммобілізовані на тонкошаровий хвилевід або поверхню чіпу із використанням ковалентного або не ковалентного закріплення, наприклад, шляхом гідрофобної адсорбції. Іммобілізацію можна проводити, наприклад, шляхом нанесення, так-названого спотінгу, елементів розпізнавання у формі полів для вимірювання, так названих спотів, на тонкошаровий хвилевід або поверхню чіпів. Переважним чином, спотінг розчину, переважно, буферних розчинів, що містять партнер зв'язування у якості елементу розпізнавання, проводять за допомогою пристрою для автоматичного нанесення, так-званого спотера. Переважним чином, тонкошаровий хвилевід або чіпи після спотінгу, інкубують,

щонайменше, протягом години, переважним чином, декількох годин, таким чином щоб елементи розпізнавання мали змогу прилипнути до тонкошаровий хвилевід або чіпу.

Корисним є такий спосіб, при якому біочіпи після спотінгу, протягом, щонайменше, одної години, переважним чином, від 2 годин до 6 годин, особливо переважним чином, від 3 годин до 4 годин, обробляють розчином протеїну, переважним чином, розчином придатного блок-протеїну, наприклад, BSA. Після видалення розчину тонкошаровий хвилевід або біочіпи можуть бути висушені та збережені.

Нанесення зразку та, переважним чином, флуоресцентно маркованого партнера зв'язування до іммобілізованих елементів розпізнавання на тонкошаровий хвилевід, переважним чином, на біочіп миттєвого поля, переважним чином, на планарний біочіп хвилевод, може бути проведено одночасно, або один за одним. Таким чином, додавання, переважним чином, флуоресцентно маркованих партнерів зв'язування, наприклад, одного або декількох, переважно, флуоресцентно маркованих мікотоксинів, мікотоксин-кон'югатів або антитіл проти одного або декількох мікотоксинів, проводять перед або під час інкубації зразку, наприклад, екстракту на чіп. Також, наприклад, екстракт зразку, що його аналізують, може бути нанесений на чіп у суміші із, переважним чином, маркованим, переважним чином, флуоресцентно маркованим мікотоксином, мікотоксин-кон'югатом або антитілом на один або декілька мікотоксинів.

Особливою перевагою є те, що зразок, відповідно до способу згідно із винаходом за менше ніж 15 хвилин, переважним чином, менше ніж 10 хвилин, особливо переважним чином, менше ніж 5 хвилин, до детектування сигналу, може бути інкубований із іммобілізованими партнерами зв'язування у якості хімічного або біохімічного елементу розпізнавання на тонкошаровий хвилевід та/або із партнерами зв'язування.

Це уможливорює велику перевагу способу у порівнянні із відомими способами, за якими інкубація нанесеного мікотоксин-кон'югату із розчином маркованого мікотоксин-антитіла потребує, частково, до двох годин, або у порівнянні із способами, які вимагають попередньої інкубації зразків із маркованими анти-мікотоксин-антитілами. Це уможливорює те, що визначення мікотоксинів відповідно до способу згідно із винаходом, у порівнянні із відомими способами, може бути проведене значно швидше. Зокрема, час інкубації може бути значно скорочений. У особливо переважних формах виконання час інкубації може складати до 10 хвилин, або навіть тільки 5 хвилин. Зокрема, у комбінації із наступними перевагами, такими як те, що можна знехтувати стадією промивання, це робить можливим отримання результату шляхом способу згідно із винаходом за менше ніж за 20 хвилин, переважним чином, менше ніж за 15, особливо переважним чином, менше ніж за 10 хвилин.

При використанні способу згідно із винаходом мікотоксини можуть бути визначені кількісно, та, переважним чином, із малою варіацією. Наприклад, так-званий міжлабораторний варіаційний коефіцієнт, який є мірою порівняння точності аналізу, складає менше ніж 50%, переважним чином, менше ніж 40%. Надалі, так-званий внутрішньолaborаторний варіаційний коефіцієнт, що є мірою відтворюваності аналізу, може складати менше ніж 20%. Це робить можливим використання способу згідно із винаходом у рамках стандартизованого та простого способу визначення мікотоксинів в продуктах харчування, наприклад, в зернових культурах, в продуктах зернових культур, або у вині.

Мікотоксини, що виявляють, вибирають із групи, яка містить афлатоксин, охратоксини, алкалоїди маткових ріжок, патулін та/або токсини *Fusarium*, наприклад, що вибирають із групи, в яку входять деоксиніваленол, ніваленол, зеараленон, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, охратоксин А та/або фумонізін. Фумонізін, переважним чином, вибирають із групи, що містить фумонізін В1, фумонізін В2 та/або фумонізін В3.

Відповідно, використовують партнери зв'язування, які, переважним чином, вибирають із групи мікотоксинів, до якої входять афлатоксини, охратоксини, алкалоїди маткових ріжок, патулін та/або токсини *Fusarium*, наприклад, що вибирають із групи, в яку входять деоксиніваленол, ніваленол, зеараленон, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, охратоксин А та/або фумонізін та антитіла проти мікотоксинів, що вибирають із групи, до якої входять афлатоксини, охратоксини, алкалоїди маткових ріжок, патулін та/або токсини *Fusarium*, наприклад, що вибирають із групи, в яку входять деоксиніваленол, ніваленол, зеараленон, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, та/або фумонізін.

В залежності від типу використовуваного імунологічного аналізу, наприклад, у випадку непрямого конкурентного імунологічного аналізу одного або декількох мікотоксинів, один з партнерів зв'язування іммобілізують на тонкошаровий хвилевід, у якості елементу розпізнавання, тоді як інший партнер зв'язування, наприклад, у випадку непрямого конкурентного імунологічного аналізу одного або декількох анти-мікотоксин-антитіл, перед або одночасно із зразком, додають на тонкошаровий хвилевід, при цьому доданий партнер

зв'язування, переважним чином, є маркованим люмінесцентно, переважним чином, за допомогою люмінофору.

Переважним чином, використовують партнери зв'язування, що вибирають із групи, до якої входять деоксиніваленол, ніваленол, зеараленон, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, охратоксин А та/або фумонізін В1, фумонізін В2 та/або фумонізін В3 та антитіло проти мікотоксинів, що вибирають із групи, до якої входять деоксиніваленол, ніваленол, зеараленон, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, охратоксин А та/або фумонізін В1, фумонізін В2 та/або фумонізін В3.

При цьому використовують, переважним чином, моноклональні антитіла проти мікотоксину, наприклад, анти-фумозін В1, анти-фумозін В2 або анти-фумозін В3. Також, використовують антитіла, які діють на групу фумозинів. Використовувані партнери зв'язування, переважним чином, антитіла проти мікотоксинів, можуть бути використані поодиночі або у суміші, крім того, також можна використовувати перехресно-реактивні антитіла.

Особлива перевага способу згідно із винаходом випливає із того, що мікотоксини виявляються у спосіб згідно із винаходом із підвищеною чутливістю. Наприклад, мікотоксини можуть бути виявлені, особливо, у продуктах харчування тварин або людей, наприклад, зернових культурах, вині, соках, фруктах та/або продуктах, що з них виготовлені, або у екстрактах продуктів харчування або продуктах навіть в області наномолярних або пікомолярних концентрацій мікотоксинів. Наприклад, мікотоксини можуть бути виявлені в екстракті зернових культур навіть в області концентрацій мікотоксину від 0,1 пМ до 100 нМ мікотоксину, переважним чином, в області концентрацій мікотоксину від 1 пМ до 1 нМ, особливо, можуть бути виявлені концентрації менші ніж 1 нМ, переважним чином, менші ніж 100 пМ мікотоксину, і, переважним чином, менші ніж 10 пМ мікотоксину, а особливо переважним чином, менші ніж 1 пМ мікотоксину.

Надалі, мікотоксини можуть бути виявлені в екстракті зернових культур в області від 10^{-4} мкг/кг до 10000 мкг/кг мікотоксину, в зернових культурах в області від 10^{-2} мкг/кг до 10000 мкг/кг мікотоксину. Переважним чином, мікотоксини можуть бути виявлені в екстракті зернових культур в області концентрацій $<0,1$ мкг/кг мікотоксину, переважним чином, в області $<0,01$ мкг/кг мікотоксину, а особливо переважним чином, в області концентрацій $<10^{-4}$ мкг/кг мікотоксину, в зернових культурах в області від $<0,1$ мкг/кг мікотоксину, переважним чином, в області від $<0,01$ мкг/кг мікотоксину, а особливо переважним чином, в області від $<10^{-4}$ мкг/кг мікотоксину.

Це уможливорює точне визначення мікотоксинів, що містяться у продуктах харчування, поза аналітичної лабораторії.

Спосіб згідно із винаходом уможливорює виявлення, переважним чином, щонайменше, від 2 до 1000 мікотоксинів, переважно, від 5 до 100 мікотоксинів. Зокрема, мікотоксини можуть бути визначені одночасно. Це означає велику перевагу у порівнянні із відомими способами, які, у більшості випадків, дозволяють одночасне виявлення тільки одного мікотоксину.

Переважна форма виконання способу для виявлення мікотоксинів передбачає, що на поверхню тонкошарового хвилеводу, що містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення ніж (а), просторово відокремлено іммобілізують специфічний та/або афінний партнер зв'язування у якості хімічного або біохімічного елементу розпізнавання мікотоксинів та/або партнеру зв'язування. Потім можуть бути, одночасно або один за одним, додані зразок та, переважним чином, партнер зв'язування, маркований люмінофором. Специфічна та/або афінна взаємодія між партнером зв'язування, іммобілізованим на тонкошаровий хвилевід, мікотоксином(ами) зразку та/або переважним чином, маркованим люмінофором партнером зв'язування може бути детектована як зміна сигналу у миттєвому полі. Наявність мікотоксину у зразку при цьому призводить до зміни сигналу у миттєвому полі.

Згідно з винаходом, виявлення мікотоксинів може бути здійснено шляхом аналізу, наприклад, імунологічного аналізу на чіпі. Виявлення мікотоксинів проводять переважним чином, у формі імунологічного аналізу, переважним чином, конкурентного імунологічного аналізу, наприклад, прямого або непрямого конкурентного імунологічного аналізу, особливо переважним чином, у формі непрямого конкурентного імунологічного аналізу.

Переважна форма виконання способу для виявлення мікотоксинів у формі прямого конкурентного імунологічного аналізу може передбачати, що на поверхню тонкошарового хвилеводу, який містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорий шар (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення ніж (а), просторово відокремлено іммобілізують анти-мікотоксин-антитіло у якості хімічного або біохімічного елементу розпізнавання мікотоксинів. Потім, одночасно, або перед зразком, що його аналізують, можуть бути додані, переважним чином, мікотоксини, марковані люмінофором або,

переважним чином, кон'югати мікотоксин-BSA, марковані люмінофором. Взаємодія між іммобілізованим на тонкошаровий хвилевід анти-мікотоксин-антитілом, мікотоксином(ами) зразку та/або, переважним чином, мікотоксином або мікотоксин-B8A-кон'югатом, маркованим люмінофором, може бути детектована як зміна сигналу у миттєвому полі.

5 У випадку прямого конкурентного імунологічного аналізу на поверхню чіпу можуть бути іммобілізовані, переважним чином, два або декілька різних, анти-мікотоксин-антитіла, шляхом ковалентного або нековалентного закріплення, наприклад, шляхом спотінгу. Якщо, наприклад, екстракт зразку, що досліджується, наносять на чіп у суміші із переважним чином, флуоресцентно маркованим мікотоксином або мікотоксин-кон'югатами, відбувається конкуренція між маркованим та немаркованим мікотоксином, відповідно, мікотоксин-кон'югатом, за доступні на поверхні чіпу центри зв'язування на антитілі. Флуоресцентно маркований мікотоксин можна додавати перед або під час інкубації екстракту на чіпі. Кількість маркованого мікотоксину, зв'язаного до іммобілізованого антитіла, обернено пропорційна кількості мікотоксинів, що знаходиться в екстракті.

15 Виявлення може бути проведене також у формі сендвіч-аналізу. В цьому випадку замість маркованих мікотоксинів або мікотоксин-кон'югатів використовують марковані антитіла детектування, які зв'язуються із іммобілізованим комплексом, утвореним іммобілізованими на чіпі антитілом та мікотоксином. При такому сендвіч-аналізі кількість зв'язаного із антитілом люмінофору пропорційна концентрації мікотоксинів в екстракті.

20 Наступна переважна форма виконання способу для виявлення мікотоксинів у формі непрямого конкурентного імунологічного аналізу може передбачати, що на поверхню тонкошарового хвилеводу, що складається із першого оптично прозорого хвилевідного шару (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення ніж (а), просторово відокремлено іммобілізують мікотоксини або переважним чином, марковані люмінофором мікотоксин-BSA-кон'югати у якості хімічного або біохімічного елементу розпізнавання. Потім, можуть бути додані, переважним чином, марковані люмінофором анти-мікотоксин-антитіла, одночасно із або перед зразком, що його аналізують. Взаємодія між іммобілізованим на тонкошаровий хвилевід мікотоксином або, переважним чином, із маркованим люмінофором мікотоксин-BSA-кон'югатом, із мікотоксином(ами) зразку та/або із, переважним чином, маркованим люмінофором анти-мікотоксин-антитілом може детектуватись як зміна сигналу у миттєвому полі.

Згідно із винаходом, виявлення мікотоксинів також може бути проведене шляхом непрямого конкурентного імунологічного аналізу. В цьому випадку мікотоксини або мікотоксин-кон'югати, наприклад, мікотоксин-протеїн-кон'югати, переважним чином, мікотоксин-BSA-кон'югати, можуть бути іммобілізовані на чіпі. Якщо екстракт зразку, що його аналізують, наносять на чіп у суміші із переважно, флуоресцентно маркованим анти-мікотоксин-антитілом, відбувається конкуренція між іммобілізованим та тим, що знаходиться у розчині, мікотоксином, за доступні центри зв'язування на флуоресцентно маркованому антитілі. Флуоресцентно марковане анти-мікотоксин-антитіло може бути нанесене до або під час інкубації екстракту на чіпі. Кількість зв'язаного маркованого антитіла в цьому випадку обернено пропорційна кількості мікотоксинів, що знаходиться в екстракті.

Подальшою перевагою є те, що детектування сигналу у миттєвому полі може бути проведено за допомогою пристрою для зчитування. У якості пристрою для зчитування може бути використаний, наприклад, міцний та дешевий пристрій для зчитування.

45 Визначення інтенсивності сигналу, наприклад, інтенсивності флуоресценції, може бути проведене за допомогою придатного програмного забезпечення, так як і розрахунок кількості мікотоксинів, що знаходяться в зразку.

Переваги, що надає спосіб згідно із винаходом, особливо, комбінація способів, що можуть бути легко проведені, та можливість одночасного кількісного виявлення декількох мікотоксинів за допомогою міцного та дешевого пристрою для зчитування, уможливають просте та швидке виявлення мікотоксинів поза аналітичної лабораторії.

Наступний предмет винаходу стосується пристрою для проведення способу для виявлення мікотоксинів.

55 Пристрій для проведення способу для виявлення мікотоксинів містить тонкошаровий хвилевід, переважним чином, планарний оптичний біочіп-хвилевід, який базується на тонкошаровому хвилеводі, що містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення, ніж (а). Переважним чином, елементи розпізнавання іммобілізовані на шарі (а).

60 Придатні планарні оптичні хвилеводи описані, наприклад, у WO 01/92870 або у US 5,959,292.

У переважних формах виконання пристрою, оптично прозорий шар (b) тонкошарового хвилеводу, переважним чином, планарного оптично прозорого біочіпу-хвилеводу, може бути побудований із силкатів, таких як скло або кварц, або з прозорого полімеру, що, переважним чином, вибирають із групи, до якої входять полікарбонат, поліімід, поліметакрилат, полістирол, циклічні поліолефіни, та/або співполімери циклічних поліолефінів, переважним чином, з циклічних поліолефінів або співполімерів циклічних поліолефінів. Придатні полімери для одержання оптично прозорого шару (b) описані, наприклад, у WO 03/020488.

Переважним чином, використовують прозорі термопластичні або придатні до розпилення полімери, що вибирають, наприклад, із групи, що містить полікарбонат, поліімід, акрилат, та, особливо, поліметилметакрилат, або полістирол.

У переважних формах виконання пристрою оптично прозорий хвилевідний шар (a) може містити оксиди, що вибирають із групи, до якої входять TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 та/або ZrO_2 , та, переважно, вибирають із групи, до якої входять TiO_2 , Ta_2O_5 та/або Nb_2O_5 . Також, подібні оксиди можуть бути використані у комбінації один з одним. Переважним чином, оптично прозорий хвилевідний шар (a) побудований з TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 або ZrO_2 , переважним чином, з TiO_2 , Ta_2O_5 або Nb_2O_5 . Зокрема, корисним виявилось використання пентоксиду танталу.

У переважних формах виконання тонкошаровий хвилевід, особливо, на оптично прозорому шарі, що містить оксид, який вибирають із групи TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 та/або ZrO_2 , також містить один або кілька шарів органофосфорних кислот формули (I)



та/або органофосфонових кислот формули (II)



та/або їх солі, причому R означає алкіл із C_{10} до C_{24} .

Переважно використовуваними є органофосфорні кислоти та/або органофосфонові кислоти, переважним чином, органофосфати та/або органофосфонати, причому R вибирають із групи, до якої входять нерозгалужений алкіл із C_{10} до C_{20} , переважним чином, що вибирають із групи, до якої входять нерозгалужений алкіл із C_{12} до C_{18} , переважним чином, додецилфосфорна кислота, додецилфосфат, октадецилфосфонат та/або октадецилфосфонова кислота.

Переважним чином, використовуваними є органофосфорні кислоти, відповідно, органофосфати, які можуть бути нанесені на тонкошаровий хвилевід у формі водорозчинних солей із водних розчинів.

У переважних формах виконання органофосфорні кислоти та/або органофосфонові кислоти, переважним чином, органофосфати, наносять на тонкошаровий хвилевід, особливо, на біочіп миттєвого поля, переважним чином, на планарний оптичний біочіп-хвилевід, у формі моношару.

Моношар може нанесений у якості проміжного адгезійного шару на оптично прозорий шар, побудований з оксидів. Переважним чином, органофосфорні кислоти та/або органофосфонові кислоти можуть взаємодіяти із елементами розпізнавання, особливо, із протеїнами або із закріпленими на протеїнах елементами розпізнавання, та підсилювати зв'язування елементів розпізнавання із біочіпом.

У переважній формі виконання пристрою, органофосфорні кислоти та/або органофосфонові кислоти, переважним чином, фосфати, наносять на тонкошаровий хвилевід, переважним чином, на оптично прозорий шар, побудований з оксидів, у формі проміжного адгезійного шару. Проміжний адгезійний шар може забезпечувати підсилення зв'язування елементів розпізнавання до тонкошарового хвилеводу або до біочіпу.

Переважним чином, проміжний адгезійний шар має товщину менше ніж 200 нм, переважним чином, менше ніж 20 нм.

Переважним чином, введення світла збудження у оптично прозорий хвилевідний шар (a) проводять із використанням одної або декількох кристалічних решіток.

Переважним чином, кристалічна решітка являє собою рельєфну решітку із будь-яким профілем (перерізом), наприклад, прямокутним, трикутним або напівкруглим перерізом, або фазову чи об'ємну решітку із періодичною модуляцією коефіцієнту заломлення у суттєво планарному оптично прозорому шарі (a). Кристалічна решітка може також являти собою дифракційну решітку із єдиним періодом, або мультидифракційну решітку. Кристалічна решітка може мати змінну у просторі періодичність, перпендикулярно або паралельно до напрямку розповсюдження світла збудження, яке вводять у оптично прозорий хвилевідний шар (a).

Переважним чином, для введення збуджуючого світла можуть бути використані кристалічні решітки із періодом в області від 200 до 1000 нм, переважно в області від 200 до 400 нм. Надалі, глибина модуляції решітки знаходиться переважно в області від 3 до 60 нм, зокрема від 10 до 40 нм. Переважним чином, співвідношення глибини модуляції до товщини першого оптично прозорого хвилевідного шару (а) дорівнює або менше за 0,4. Також, переважним чином, ярко виражена модуляція коефіцієнту заломлення як на межі поділу між шарами а та b так і на межі поділу шару а із середовищем, що його аналізують.

Переважним чином, оптично прозорий хвилевідний шар (а) має товщину в області від 40 нм до 1000 нм, переважним чином, в області від 40 нм до 300 нм, а переважно, в області від 80 нм до 200 нм.

Різниця коефіцієнтів заломлення між шарами (а) та (b) складає, переважним чином, $>0,2$, переважно 0,5, та знаходиться при, переважно, 0,56.

Довжина хвилі світла збудження знаходиться, переважним чином, в області від 300 нм до 1100 нм, переважним чином, в області від 300 нм до 800 нм, а переважно, в області від 500 нм до 700 нм.

Придатне світло збудження може бути підведеним крізь кристалічну решітку, до якої, у напрямку розповсюдження підведеного та у шар проведеного (а) світла, приєднується немодульована область шару (а) із великою кількістю областей вимірювання, на яких проводять виявлення різноманітних мікотоксинів, що знаходяться на ньому у масиві. Туди, у напрямку розповсюдження підведеного світла, може бути підключена, переважним чином, одна або декілька інших кристалічних решіток, із масивом областей вимірювання позаду. Альтернативно, області вимірювання масиву або набору масивів можуть знаходитись на модульованій області шару (а).

Переважним чином, до кожного масиву областей вимірювання, що слідує у напрямку розповсюдження підведеного світла збудження, приєднують специфічну для цього масиву кристалічну решітку для виводу цього світла збудження, причому кристалічні решітки, специфічні для окремого масиву, можуть бути вбудовані перпендикулярно до напрямку розповсюдження підведеного світла збудження, або вони також можуть бути розповсюджені на всьому тонкошаровий хвилевід у цьому напрямку.

Пристрій може містити дуже велику кількість окремих полів вимірювання. У переважній формі виконання пристрою, наносять специфічні та/або афінні партнери зв'язування у якості хімічних або біохімічних елементів розпізнавання у вигляді до 100.000 полів вимірювання, або "Spots", із двовимірним розміщенням, причому одне поле вимірювання або спот має, переважним чином, поверхню розміром від $0,001 \text{ мм}^2$ до 6 мм^2 , переважним чином, від $0,1 \text{ мм}^2$ до 1 мм^2 . Переважним чином, на поверхню тонкошаровий хвилевід або біочіпу наносять більше ніж 10, переважним чином, більше ніж 50 полів вимірювання на квадратний сантиметр.

Наступним предметом винаходу є набір для виявлення мікотоксинів. Набір містить, щонайменше, тонкошаровий хвилевід, який містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення, ніж (а), на якому просторово відокремлено іммобілізують специфічний та/або афінний партнер зв'язування у якості хімічного або біохімічного елементу розпізнавання мікотоксинів та/або партнер зв'язування.

Набір може надалі містити, щонайменше, один реагент, що містить, переважним чином, маркований партнер зв'язування. Набір також може містити декілька реагентів, що містять, переважним чином, маркований партнер зв'язування або один реагент, що містить суміш різних маркованих партнерів зв'язування. Надалі, набір може також містити буфер та/або розчинник, що потрібен для проведення виявлення згідно одної з попередніх формул винаходу. Також може бути передбачено, що набір містить елемент детектування.

Набори можуть бути використані для швидкого виявлення мікотоксинів.

Приклад, що слугує для наочного пояснення представленого винаходу, приведений далі.

Приклад 1

Знаходження градувального графіку для вимірювання зеараленону (ZEA) при непрямому конкурентному імунологічному аналізі на біочіпі миттєвого поля.

Сім біочіпів (виробник Unaxis, Liechtenstein) із зовнішніми розмірами 1 см x 2 см зі скла, в якому вигравіювано оптичну решітку із глибиною 18 нм, оснащених шаром пентоксиду танталу товщиною 155 нм, занурюють у 0,5 mM розчин октадецилфосфонової кислоти в суміші н-гептану/ізопропанолу (у співвідношенні 9:1), та вкривають октадецилфосфоновою кислотою. За допомогою спотеру типу "BiochipArrayer" (Perkin Elmer, Deutschland) на чіп наносять кон'югати зеараленону та бичачого сироваткового альбуміну (ZEA-BSA, співвідношення ZEA:BSA = 50:1, виготовлені виробником Biopure, Tulln, Osterreich), а також молекули бичачого сироваткового

альбуміну (BSA) (DyLight 647-BSA), марковані барвником DyLight 647 (Pierce, Deutschland). Розчини для спотінгу містили DyLight 647-BSA у концентрації 5×10^{-4} мг/мл у фосфатному буферному розчині (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) із 0,1% BSA та 0,1% Tween 20, кон'югат BSA-ZEA у концентрації 0,5 мг/мл у фосфатному буферному розчині із 0,1% BSA та 0,1% Tween 20. Споти наносять на чіп у формі дев'яти рядів, що перемежуються, відповідно, по 10 спотів DyLight 647-BSA та спотів кон'югату BSA-ZEA, у вигляді двох полів (масиву).

Споти інкубують протягом ночі при високій вологості повітря (40%), потім на протязі 4 годин біочіпи обробляють 3% розчином BSA у фосфатному буферному розчині. На чіпи наносять вимірювальні камери таким чином, щоб на кожному чіпі збудувати два масиви із розділеними реакційними камерами. Готують водні розчини зеараленону із різними концентраціями в області від 0 мкг/л до 31 мкг/л, які змішують із моноклональним анти-зеараленон-антитілом (Biotez, Berlin), яке марковано за допомогою DyLight 647, таким чином, що відповідно отримують 1 нМ розчин антитіла.

Суміші різних концентрацій додають у кожную вимірювальну камеру та проводять вимірювання біочіпів без подальшої обробки на протязі, максимально, 10 хвилин, на пристрою для зчитування флуоресценції для "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Deutschland). Усереднені значення інтенсивності флуоресценції для кожного споту зеараленону отримують шляхом розділення інтенсивності флуоресценції над та під відповідним спотом нанесеного DyLight 647-BSA. Вимірюють середні значення інтенсивності флуоресценції кожних 40 спотів масиву. Будують отримані залежності інтенсивності флуоресценції від концентрацій за допомогою комп'ютерної програми Origin 7G (Origin Lab Corporation, USA), причому використовують сигмоїдальне узгодження.

Може бути відмічено, що у області від 0,4 мкг/кг до 4 мкг/кг зеараленону, що відповідає 80%, відповідно, 20% максимальної інтенсивності флуоресценції на отриманій узгодженій кривій, що відповідає області концентрацій від 1 нМ до 10 нМ введеного ZEA у розчині, можливе кількісне визначення концентрації ZEA шляхом визначення інтенсивності флуоресценції зразку.

Приклад 2

Знаходження градуального графіку для вимірювання деоксиніваленолу (DON) та вимірювання зараженого зразку кормових зернових культур.

15 біочіпів (виробник Firma Unaxis, Liechtenstein) із зовнішніми розмірами 1 см x 2 см з скла, в якому вигравіювано оптичну решітку із глибиною 18 нм, оснащених шаром пентоксиду танталу товщиною 155 нм, занурюють у 0.5 мМ розчин октадецилфосфонової кислоти в суміші н-гептану/ізопропанолу у співвідношенні 9:1, та вкривають октадецилфосфоновою кислотою. За допомогою спотеру типу Nanoplotter (GeSiM, Deutschland) на чіп наносять кон'югати деоксиніваленолу та бичачого сироваткового альбуміну (DON-BSA, співвідношення DON:BSA = 100:1, виготовлено фірмою Biopure, Tulln, Österreich), а також молекули собачого імунoglobуліну IgG (dog-IgG, Rockland, USA). Розчини для спотінгу містили собачий імунoglobулін у концентрації 0,2 мг/мл у фосфатному буферному розчині (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) із тригалозою ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) а також кон'югат BSA-DON із концентрацією 1 мг/мл у фосфатному буферному розчині із тригалозою. Споти наносять на чіп у формі двох рядів, кожні 12 спотів ряд собачого-IgG та поміж них, рядів 12 спотів з кон'югатів BSA-DON у формі двох полів (масив).

Споти інкубують протягом 1 години при 37°C, потім, на протязі до 4 годин, біочіпи обробляють розчином BSA у фосфатному буферному розчині. На чіпи наносять вимірювальні камери таким чином, щоб на кожному чіпі збудувати два масиви із розділеними реакційними камерами. Екстрагують 5 г незараженої пшеничної муки 70% розчином метанолу у воді (об'ємне співвідношення) шляхом струшування протягом 5 хв. Екстракт центрифугують та надалі розводять цитратним буферним розчином (pH 7,4), що містить BSA, казеїн, сухий порошок знежиреного молока, Tween 20, поліетиленгліколь та цукрозу, у співвідношенні 1:4 (об'ємне співвідношення екстракт:буфер). Готують розчини деоксиніваленолу із різними концентраціями (від 15 до 150 мкг/л) які змішують із моноклональним антитілом анти-деоксиніваленол, яке марковане за допомогою DyLight 647, а також із козиним анти-собачим-IgG антитілом, яке також марковано за допомогою DyLight 647, таким чином, що, відповідно, отримують 1 нМ розчин антитіла.

Розчини різних концентрацій додають у кожную вимірювальну камеру та проводять вимірювання біочіпів без подальшої обробки на протязі, максимально, 10 хвилин на пристрою для зчитування флуоресценції для "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Deutschland). Усереднені інтенсивності флуоресценції для кожного споту деоксиніваленолу отримують! шляхом розділення інтенсивності флуоресценції над та під відповідним спотом нанесеного

собачого-IgG. Вимірюють нормовані середні значення інтенсивності флуоресценції кожних 12 DON-спотів масиву. Будують отримані залежності нормованих значень інтенсивності флуоресценції від концентрації за допомогою комп'ютерної програми, причому використовують потенціальне узгодження.

Аналогічно до вищеописаного способу екстракції екстрагують 5 г зразку зараженої DON пшеничної муки (Fa Coring, Deutschland, сертифіковане значення 526 мкг/кг DON) та розводять отриманий екстракт. 0,300 мл розбавленого екстракту змішують із моноклональним анти-деоксиніваленол-антитілом, яке марковане за допомогою DyLight 647, а також із козиним анти-собачим-IgG антитілом, яке також марковане за допомогою DyLight 647, таким чином, що, відповідно, отримують 1 нМ розчин антитіла. Відповідно, 0,100 мл розчину додають у кожную вимірювальну камеру та проводять вимірювання біочіпів без подальшої обробки на протязі максимально 10 хвилин на пристрою для зчитування флуоресценції для "Minifluo IV" (Bayer Technology Services, Deutschland). Усереднені інтенсивності флуоресценції для кожного споту деоксиніваленолу отримують шляхом розділення інтенсивності флуоресценції над та під відповідним спотом нанесеного собачого-IgG. Вимірюють нормовані середні значення інтенсивності флуоресценції кожних 12 DON-спотів масиву. Із отриманих значень інтенсивності флуоресценції за допомогою вищеописаного градувального графіку розраховують концентрацію DON у зразку пшеничної муки, причому отримують середнє значення трьох вимірів 590 мкг/кг.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення мікотоксинів, що вибирають з групи, яка включає токсини роду *Fusarium*, охратоксини та афлатоксини, що включає такі стадії:

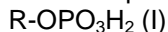
а) виготовлення тонкошарового хвилеводу, що містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (a) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення, ніж (a), на якому просторово окремо іммобілізовані специфічні та/або афінні партнери зв'язування як хімічний або біохімічний елемент розпізнавання мікотоксинів, та/або партнер зв'язування,

б) нанесення зразку, що містить мікотоксин(и), та партнерів зв'язування на тонкошаровий хвилевід з іммобілізованими партнерами зв'язування,

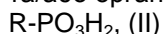
с) детектування сигналу у миттєвому полі на основі взаємодії партнерів зв'язування, іммобілізованих на тонкошаровому хвилеводі, із мікотоксинами зразку та/або партнерами зв'язування,

д) визначення кількості вмісту мікотоксину(ів) у зразку.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на тонкошаровий хвилевід наносять один або кілька шарів органофосфорних кислот формули (I)



та/або органофосфонових кислот формули (II)



та/або їх солі, причому

R означає C_{10} - C_{24} -алкіл.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що використовують органофосфорні кислоти, органофосфонові кислоти, органофосфати та/або органофосфонати, причому R вибирають із групи, що включає нерозгалужений C_{10} - C_{20} -алкіл, переважно із групи, що включає нерозгалужений C_{12} - C_{18} -алкіл, переважно органофосфорні кислоти, органофосфонові кислоти, органофосфати та/або органофосфонати, вибрані із групи, що включає додецилфосфорну кислоту, додецилфосфат, октадецилфосфонат та/або октадецилфосфонову кислоту.

4. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що використовують тонкошаровий хвилевід, що містить оптично прозорий хвилевідний шар (a), який включає оксиди, вибрані з групи, що включає TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 та/або ZrO_2 , переважно з групи, що включає TiO_2 , Ta_2O_5 та/або Nb_2O_5 .

5. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що партнери зв'язування вибирають із групи, що включає анти-мікотоксин-антитіла, анти-мікотоксин-антитіло-кон'югати, мікотоксини, мікотоксин-кон'югати, фрагменти анти-мікотоксин-антитіл, мікотоксин-зв'язуючі пептиди, мікотоксин-зв'язуючі антикаліни, мікотоксин-зв'язуючі аптамери, мікотоксин-зв'язуючі шпигельмери та/або мікотоксин-зв'язуючі імпринтид-полімери, переважно вибрані із групи, що містить анти-мікотоксин-антитіла, анти-мікотоксин-антитіло-кон'югати, мікотоксини та/або мікотоксин-кон'югати.

6. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що елемент маркування, переважним чином, флуорофор, зв'язують із мікотоксином за допомогою протеїну, переважним чином за допомогою бичачого сироваткового альбуміну.
- 5 7. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що зразками є продукти харчування для людей або тварин, переважним чином вибрані з групи, до якої входять зернові культури, вино, соки, фрукти та/або продукти, що містять зернові культури, вино, соки та/або фрукти, або екстрагований розчинником або сумішшю розчинників екстракт продуктів харчування або продуктів.
- 10 8. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що зразок за менше ніж 15 хвилин, переважним чином менше ніж за 10 хвилин, перед детектуванням сигналу інкубують з іммобілізованими партнерами зв'язування як хімічним або біохімічним елементом розпізнавання та/або партнером зв'язування.
- 15 9. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що мікотоксини вибирають з групи, до якої входять охратоксин А, деоксиніваленон, ніваленон, зеараленон, Т-2 токсин, НТ-2 токсин та/або фумонізину, причому фумонізину переважно вибирають із групи, до якої входять фумонізін В1, фумонізін В2 та/або фумонізін В3.
- 20 10. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що мікотоксини в екстракті зернових культур можуть бути виявлені в області концентрацій мікотоксину від 0,1 пМ до 100 нМ, переважно в області концентрацій мікотоксину від 1 пМ до 1 нМ.
- 25 11. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що виявлення здійснюють у формі імунологічного аналізу, переважно конкурентного імунологічного аналізу, особливо переважно непрямого конкурентного імунологічного аналізу.
- 30 12. Пристрій для здійснення способу визначення мікотоксинів, що вибирають з групи, яка включає токсини роду *Fusarium*, охратоксини та афлатоксини, який **відрізняється** тим, що пристрій є тонкошаровим хвилеводом, що містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення, ніж (а), причому на хвилевідному шарі (а) просторово відокремлено іммобілізовано мікотоксин-кон'югати як хімічний або біохімічний елемент розпізнавання мікотоксин-зв'язуючих партнерів зв'язування.
- 35 13. Пристрій за п. 12, який **відрізняється** тим, що оптично прозорий шар (b) тонкошарового хвилеводу, який містить перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення, ніж (а), утворений із силікатів, таких як скло або кварц, або з прозорої пластмаси, переважно вибраної з групи, що включає полікарбонати, полііміди, поліметакрилати, полістироли, циклічні поліолефіни та/або співополімери циклічних поліолефінів, переважно з циклічних поліолефінів.
- 40 14. Пристрій за п. 12 або 13, який **відрізняється** тим, що оптично прозорий хвилевідний шар (а) має товщину в області від 40 нм до 1000 нм, переважним чином в області від 40 нм до 300 нм, а особливо переважно, в області від 80 нм до 200 нм.
- 45 15. Пристрій за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що передбачено одну або кілька решітчастих структур для введення світла збудження у оптично прозорий хвилевідний шар (а).
- 50 16. Пристрій за п. 15, який **відрізняється** тим, що решітчасті структури мають період в області від 200 нм до 1000 нм, переважно в області від 200 нм до 400 нм.
- 55 17. Пристрій за одним із пп. 15 або 16, який **відрізняється** тим, що решітчасті структури мають глибину модуляції в області від 3 нм до 60 нм, переважно в області від 10 нм до 40 нм.
18. Пристрій за одним із пп. 15-17, який **відрізняється** тим, що передбачено решітчасті структури для введення світла збудження з довжиною хвилі світла в області від 300 нм до 1100 нм, переважно в області від 300 нм до 800 нм, особливо переважно в області від 500 нм до 700 нм.
19. Пристрій за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що на тонкошаровому хвилеводі нанесено один або кілька шарів органофосфорних кислот формули (I)
 $R-OPO_3H_2$ (I)
та/або органофосфонових кислот формули (II)
 $R-PO_3H_2$, (II)
та/або їх солі, причому R означає $C_{10}-C_{24}$ -алкіл.
20. Пристрій за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що елементи розпізнавання нанесено у двовимірному розташуванні у формі до 100 000 вимірювальних полів, причому, одне вимірювальне поле переважним чином має площу від 0,001 мм² до 6 мм², зокрема від 0,1 мм² до 1 мм².

21. Пристрій за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що на тонкошаровому хвилеводі нанесено понад 10, переважно понад 50, вимірювальних полів на квадратний сантиметр.
- 5 22. Набір для визначення мікотоксинів, що вибирають з групи, яка включає токсини роду *Fusarium*, охратоксини та афлатоксини, який **відрізняється** тим, що набір містить щонайменше один тонкошаровий хвилевід, який включає перший оптично прозорий хвилевідний шар (а) на другому оптично прозорому шарі (b), причому (b) має нижчий коефіцієнт заломлення, ніж (а), на якому просторово відокремлено іммобілізують специфічні та/або афінні партнери зв'язування як хімічний або біохімічний елемент розпізнавання мікотоксинів та/або партнер зв'язування.
- 10 23. Набір за п. 22, який **відрізняється** тим, що набір додатково містить реагент, який включає переважно флуоресцентно маркований партнер зв'язування.

Комп'ютерна верстка О. Гапоненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601