



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 46018

(13) C2

(51) 6 G01N21/55

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**(54) СПОСІБ ДЕТЕКТУВАННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІОМОЛЕКУЛ ТА МОЛЕКУЛЯРНИХ КОМПЛЕКСІВ ТА ПРИСТРІЙ ДЛЯ ЙОГО ЗДІЙСНЕННЯ**

1

(21) 97105153

(22) 22 10 1997

(24) 15 05 2002

(46) 15 05 2002, Бюл. № 5, 2002 р

(72) Ширшов Юрій Михайлович, Венгер Євген Федорович, Прохорович Анатолій Вікторович, Ушенін Юрій Валентинович, Мацас Євген Петрович, Чегель Володимир Іванович, Самойлов Антон Володимирович

(73) Ширшов Юрій Михайлович

(56) GB 2247749, 10 06 1993

WO 93/06463, 12 01 1994

AN 92 51 0239, 12 01 1994

(57) 1 Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів, що включає опромінення межі поділу оптично більш щільного середовища, що має показник заломлення n_1 , з оптично менш щільним середовищем, що має показник заломлення n_2 , які задовольняють умові n_1 більше n_2 , р-поляризованою електромагнітною хвилею, переважно видимого діапазону хвиль, з боку оптично більш щільного середовища, реєстрацію відбитого від межі поділу випромінювання та його аналіз, який відрізняється тим, що опромінення межі поділу проводять, використовуючи набір кутів падіння р-поляризованої електромагнітної хвилі, реєструють

2

інтенсивність відбитої від межі поділу електромагнітної хвилі для всього набору кутів падіння і проводять детектування, визначення концентрації біомолекул, молекулярних комплексів та визначення маси шару біомолекул та молекулярних комплексів, адсорбованого на вказаній межі шляхом математичної обробки даних вимірів за спеціально розробленим алгоритмом

2 Пристрій для детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів, який містить прозорий оптичний елемент з оптично більш щільної речовини, межу поділу з оптично менш щільною речовиною, електропровідну або напівпровідникову плівку на вказаній межі, джерело випромінювання, розташоване з боку більш щільного середовища, блок керування призмою та фоточутливий елемент, який відрізняється тим, що прозорий оптичний елемент виконаний у вигляді призми, кут біля основи якої дорівнює 90°

3 Пристрій по п. 2, який відрізняється тим, що другий кут біля основи призми вибирається рівним куту поверхневого плазмонного резонансу даного показника заломлення призми, речовини електропровідної плівки і даного показника заломлення зовнішнього середовища, плюс-мінус 5 %

Технічне рішення, що заявляється, відноситься до області аналітичної техніки для хімічного та біохімічного аналізу і може бути використане для експресного та високочутливого детектування і визначення концентрації різних речовин в газообразному та рідкому середовищі, проведення біохімічних, аналізів та імунологічних тестів в клінічній практиці та з метою досліджень, в біотехнології, для контролю якості їстівних продуктів, сільськогосподарської сировини та питної води, в тому числі для визначення рівня змісту шкідливих речовин (пестицидів, гербіцидів, інсектицидів, фунгіцидів, дефоліантів, сивушних масел і т.п.), а також для екологічного моніторингу навколишнього се-

редовища

Відомі спосіб та пристрій для детектування та визначення концентрації біомолекул і молекулярних комплексів в рідкій речовині, що аналізується, по заявці PN GB2247749 МКИ G01N-021-75, від 10 06 1993р, які базуються на явищі поверхневого плазмонного резонансу (див L C Laycock, S C Webster Bio sensor utilizing surface plasmon resonance PN GB2247749, IP G01N-021-75, UPAB 10 06 1993, PA Gec-Marconi Ltd)

Спосіб включає опромінення межі поділу між скляною призмою (оптично більш щільне середовище) і досліджуванним розчином (оптично менш щільне середовище) з боку більш щільного сере-

(13) C2

(11) 46018

(19) UA

довища, вимір вихідного сигналу детектору як функції часу, яка однозначно зв'язана з кутовим положенням скануючого променя, реєстрацію інтенсивності відбитого від межі поділу випромінювання в залежності від кута падіння електромагнітної хвилі на поверхню скляної призми

Форма кривої плазмонного резонансу, і зокрема, положення мінімуму, залежить від показника заломлення призми, оптичних констант та товщини шару, в якому збуджується поверхневий плазмонний резонанс по відношенню до падаючого та відбитого випромінювання та від оптичних параметрів і товщини шару молекул, які знаходяться на або поблизу зовнішньої поверхні плівки. Про наявність біомолекул та молекулярних комплексів судять за величиною зміщення кута поверхневого плазмонного резонансу в присутності речовини, що аналізується

Пристрій для здійснення цього способу містить шар речовини, в якому збуджується поверхневий плазмонний резонанс, межу поділу між оптично більш щільним середовищем та оптично менш щільним середовищем, джерело світла необхідної довжини хвилі, пристрій сканування, який сканує промінь світла поблизу вибраного кута падіння, систему лінз, яка направляє промінь на вибране місце поверхні, детектор, який вимірює інтенсивність світла, відбитого від цього місця. Пристрій сканування може являти собою голографічний елемент, що обертається, багатогранну дзеркальну призму або кубічний дефлектор, що обертається, причому в кінці кожного циклу сканування генерується імпульс за допомогою пристрою, що кодує положення валу

Відомі спосіб та пристрій для детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів в рідкій речовині, що аналізується по заявці PN WQ93-06463 МКИ G01N021-55, від 12 01 1994г, публікація Optical Sensor, S J Peacock, H C Jagers, J S Shaw

Спосіб включає опромінення межі поділу між скляною призмою (оптично більш щільне середовище) і досліджуваним розчином (оптично менш щільне середовище) з боку більш щільного середовища, вимірювання випромінювання, відбитого від шару, в якому збуджується поверхневий плазмонний резонанс, детектування та визначення концентрації речовини, що аналізується, по зміні інтенсивності відбитого світла при фіксованому куті падіння

Пристрій для здійснення цього способу містить шар речовини, в якій збуджується поверхневий плазмонний резонанс, межу поділу між оптично більш щільним середовищем та оптично менш щільним середовищем, джерело світла необхідної довжини хвилі, пристрій сканування, який сканує промінь світла поблизу вибраного кута падіння, систему лінз, яка направляє промінь на вибране місце поверхні, детектор, який вимірює інтенсивність світла, відбитого від цього місця

Вищезгадані відомі технічні рішення для детектування та визначення концентрацій біомолекул та молекулярних комплексів використовують обмежену кількість експериментальних даних - зміну кута поверхневого плазмонного резонансу або інтенсивності відбитого світла при постійному куті

падіння. При цьому можливі помилки, обумовлені впливом різних перешкоджаючих факторів, наприклад, зміною показника заломлення середовища, що аналізується. Ці помилки важко виявити на стадії вимірювань, що знижує надійність та достовірність одержаної інформації

В якості прототипу був вибраний спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення, описаний в заявці AM Z 92510239, МКИ G01N021-55, від 12 01 1994р, які базуються на явищі поверхневого плазмонного резонансу

Вони використовувались для детектування та визначення концентрації молекул дезоксирибонуклеїнової кислоти, які прямо чи опосередковано адсорбуються, осаджуються або зв'язуються за рахунок фізичних чи хімічних взаємодій з поверхнею поділу між оптично більш щільним середовищем та оптично менш щільним середовищем. Поверхня поділу містить тонку електропровідну або напівпровідникову плівку, переважно металеву

Спосіб включає опромінення межі поділу оптично більш щільного середовища та оптично менш щільного середовища електромагнітною хвилею переважно видимого діапазону під кутом падіння, що відповідає поверхневому плазмонному резонансу (поверхнева плазмонна хвиля змушує молекули дезоксирибонуклеїнової кислоти відбивати або генерувати світло в відповідь на неї), вимірювання інтенсивності електромагнітної хвилі, відбитої від межі поділу

При цьому інтенсивність відбитої хвилі весь час утримується в мінімумі, що відповідає куту плазмонного резонансу

Пристрій для здійснення цього способу містить межу поділу між оптично більш щільним середовищем (скляна призма) і оптично менш щільним (досліджуваний розчин), оснащений електропровідною або напівпровідниковою плівкою, переважно металеву, джерело р-поляризованого електромагнітного випромінювання переважно видимого діапазону хвилі, розташоване так, щоб випромінювання падало на межу поділу з боку оптично більш щільного середовища, приймач випромінювання пристрій повороту призми відносно джерела випромінювання для постійного підтримання інтенсивності відбитого світла

Недоліком способу-прототипу є те, що детектування та визначення концентрації речовини, що аналізується, проводиться непрямим методом і не дає безпосередньої кількісної міри цієї речовини, адсорбованої на поверхні чутливого елемента. Крім цього, мінімум резонансної кривої має деяку ширину (порядку ($2^\circ - 3^\circ$)). В зв'язку з цим, якщо адсорбція на поверхню чутливого елемента речовини, що аналізується, приведе до зміщення мінімуму резонансної кривої на величину менше приведеної ($\Delta\theta$), присутність в пробі речовини, що аналізується, може бути не виявлена (фіг. 1). Тому цей спосіб містить помилки, обумовлені різними перешкоджаючими факторами, наприклад, зміною показника заломлення розчину

Таким чином, аналіз відомих способів детектування та визначення концентрації біомолекул показує, що вони всі не забезпечували необхідну достовірність одержуваної інформації

Заявлені об'єкти вирішують задачу зростання достовірності детектування та кількісного визначення концентрації речовини, що аналізується.

Поставлена задача вирішується тим, що в відомому способі детектування та визначення концентрації біомолекул, що включає опромінення межі поділу оптично більш щільного середовища, що має показник заломлення n_1 , з оптично менш щільним середовищем, що має показник заломлення n_2 , які задовольняють умові $n_1 > n_2$, р-поляризованою електромагнітною хвилею переважно видимого діапазону, з боку оптично більш щільного середовища, реєстрацію відбитого від межі поділу випромінювання та його аналіз, опромінення межі поділу проводять, використовуючи набір кутів падіння р-поляризованої електромагнітної хвилі для всього набору кутів падіння і визначають кількість біомолекул і молекулярних комплексів шляхом математичної обробки даних вимірів по спеціально розробленому алгоритму.

Для здійснення способу використовують пристрій, який включає прозорий оптичний елемент з оптично більш щільної речовини, межу поділу з оптично менш щільною речовиною, електропровідну або напівпровідникову плівку на цій межі, блок керування призмю та фоточутливий елемент. Прозорий оптичний елемент цього пристрою виконаний в вигляді призми, один з кутів біля основи якої дорівнює 90° , а другий кут біля основи вибирається рівним куту поверхневого плазмонного резонансу для даного показника заломлення призми, речовини електропровідної плівки і даного показника заломлення зовнішнього середовища плюс-мінус 5%.

На фіг. 1 - показано зміщення кривої плазмонного резонансу.

На фіг. 2- показаний пристрій для збудження поверхневого плазмонного резонансу зі скляною призмю і нанесеною на її основу електропровідною або напівпровідниковою плівкою, де 1 - падаюче р-поляризоване світло, 2 - скляна призма, 3 - відбите світло, 4 - металічна або напівпровідникова плівка, 5 - поверхнева плазмонна хвиля.

На фіг. 3 - схематично показана крива поверхневого плазмонного резонансу.

На фіг. 4 показана блок-схема пристрою для детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів, де 6 - He-Ne лазер, 7 - падаюче р-поляризоване світло, 8 - детекторний блок зі скляною призмю та нанесеною на її основу електропровідною або напівпровідниковою плівкою, робочою кюветою та пристроєм повороту призми, 9 - відбите світло, 10 - блок обробки сигналу з фотодетектором, аналого-цифровим перетворювачем та комп'ютером.

На фіг. 5 - показаний пристрій для збудження поверхневого плазмонного резонансу з робочою кюветою, скляною призмю, один із кутів якої дорівнює 90° і нанесеною на її основу електропровідною або напівпровідниковою плівкою, де 11 - падаюче р-поляризоване світло, 12 - вихідний отвір, 15 - металічна або напівпровідникова плівка, 16 - скляна призма, 17 - відбите світло.

На фіг. 6 показані експериментальні залежності кінетики кута поверхневого плазмонного резонансу, які відповідають висадженню білка на чут-

ливу поверхню сенсора та детектуванню пестициду в досліджуваному розчині.

Запропонований спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів на основі поверхневого плазмонного резонансу, забезпечує кількісне вимірювання маси речовини, що аналізується, присутньої на чутливій площадці пристрою. Чутлива площадка виконана в виді електропровідної плівки визначеної товщини, яка знаходиться на межі поділу двох середовищ з показниками заломлення n_1 та n_2 , причому $n_1 > n_2$. Визначення маси речовини, що аналізується, виконується шляхом опромінення вказаної межі поділу р-поляризованою електромагнітною хвилею зі сторони оптично більш щільного середовища (n_1), вимірювання інтенсивності відбитої хвилі при декількох різних кутах падіння та математичної обробки даних вимірів для всіх кутів падіння по спеціально розробленому алгоритму.

Принципи детектування та визначення концентрації адсорбованих молекул на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР), тобто збудження коливань електронів провідності (поверхневих плазмонів, поверхневих поляритонів чи поверхневих плазмон-поляритонів) в тонкій електропровідній плівці за допомогою електромагнітної (світлової) хвилі розглядаються в статті С Ніландера, Б Лідберга і Т Лінда "Виявлення газу за допомогою поверхневого плазмонного резонансу" (див. Nylander, C., Liedberg, B., Lind, T. Gas detection by means of surface plasmon resonance /Sensors and Actuators, 3 - P 79 - 88 - 1982/83) (Фіг. 2).

Для збудження поверхневих плазмонів авторами цієї роботи в якості оптично більш щільного середовища використовувалось скляна призма повного внутрішнього відбивання (2) з нанесеною на її основу металічною плівкою визначеної товщини (4) (в випадку золотої, срібної або мідної плівки ця товщина повинна бути порядку 40нм). Поверхня плівки знаходилася в контакті з менш щільним зовнішнім середовищем (повітря, вода), що містить в собі домішки речовини, що визначається. В результаті цього контакту речовина, що визначається, адсорбувалась на поверхні металічної плівки, створюючи молекулярний шар. Збудження поверхневих плазмонів здійснювалось променем світла (1), падаючим зі сторони призми на поверхню металічної плівки. Кут падіння світла міг змінюватись шляхом повороту призми. Експериментально вимірювалось зменшення інтенсивності відбитого випромінювання за рахунок поглинання падаючого випромінювання як наслідок перетворення енергії електромагнітної хвилі в енергію поверхневих плазмонів.

Залежність інтенсивності відбитого випромінювання (3) від кута падіння електромагнітної хвилі на поверхню плівки (крива плазмонного резонансу), має мінімум при визначеному куті падіння (кут плазмонного резонансу) (ϕ_{spr}) (Фіг. 3). Форма кривої плазмонного резонансу і, зокрема, положення мінімуму, залежать від показника заломлення призми, оптичних постійних та товщини електропровідної плівки, оптичних постійних зовнішнього середовища, яке знаходиться з протилежного боку по відношенню до падаючого та відби-

того випромінювання, та від оптичних параметрів і товщини шару молекул, які знаходяться на або поблизу зовнішньої поверхні плівки

Роздивимось сказане більш докладно. Експериментально вимірювана крива поверхневого плазмонного резонансу залежить від оптичних постійних (показників заломлення та поглинання) всіх фаз, з якими взаємодіє електромагнітна хвиля (матеріалу призми, матеріалу електропровідного шару, речовини, що визначається, адсорбованої на поверхні цього шару, зовнішнього середовища та інших фаз, що можуть, в залежності від умов вимірів, входити в систему, що досліджується), а також геометричної товщини всіх шарів, в тому числі золотої плівки та визначаємого адсорбованого шару. Ця залежність може бути представлена в наступному виді (див кн "Основы эллипсометрии" // А В Ржанов, К К Свиташев, А И Семенов, Л В Семенов, В К Соколов / Под ред А В Ржанова - Новосибирск, "Наука" (Сиб отд.) - 1978 - 424 с)

$$R_p(\varphi) = -(\mu_{0p} - Y_p)(\mu_{0p} + Y_p) \quad (1)$$

де $R_p(\varphi)$ означає коефіцієнт відбиття р-поляризованої електромагнітної хвилі, падаючої на межу поділу під кутом φ , а Y_p - узагальнений адмітанс сукупності відбиваючих шарів для вказаної хвилі, який може бути розрахований за допомогою наступного виразу

$$\left(\frac{1}{Y_p} \right) = \left(\prod_{j=1}^K \frac{\cos \delta_j}{\mu_{jp}} \right) \left(\frac{1}{\mu_{Kp}} \right) \quad (2)$$

Тут K означає повну кількість шарів, включаючи зовнішнє середовище, j - номер шару, що розглядається, δ_j - фазова товщина шару з номером j

$$\delta_j = 2\pi N_j \frac{d_j}{\lambda} \cos \phi_j \quad (3)$$

а μ_{jp} - адмітанс j -го шару

$$\mu_{jp} = N_j / \cos \phi_j = N_j^2 / \sqrt{N_j^2 - N_0^2 \sin^2 \phi_0} \quad (4)$$

де $N_j = n_j - ik_j$ означає комплексний показник заломлення шару, що розглядається, ϕ_j - кут падіння j -го шару, λ - довжина хвилі, d_j - товщина шару, а ϕ_0 - зовнішній кут падіння. Адмітанси μ_{0p} і μ_{Kp} відносяться до призми повного внутрішнього відбиття та зовнішнього середовища відповідно

Тому, маючи експериментальну криву ППР, можна, в принципі, розрахувати невідомі параметри досліджуваної системи, наприклад, товщину та показник заломлення визначаємого шару, шляхом підгонки цих параметрів так, щоб розрахована за ними теоретична крива ППР якнайкраще співпадала з експериментальною (тобто вирішуючи обернену задачу з використанням т.н. методу підгонки). Для цього можна скористатися методом оптимізації (див кн А Г Сухарев, А В Тимофеев, В В Федоров, "Курс методов оптимизации" - М, Наука, Главная редакция физико-математической литературы, 1986 - 328 с). Позначивши буквою x вектор, компоненти якого є наборами параметрів шарів відбиваючої системи (показник заломлення n , показник поглинання k , товщина d), можна побудувати цільову функцію $F(x)$ наступного виду

$$F(x) = \sum_i [R_i(x) - R_i^0]^2 \quad (5)$$

де $R_i(x)$ означає розраховану величину коефіцієнту відбиття, а R_i^0 - відповідне експериментальне значення. Мінімізація цієї функції за допомогою якого-небудь з відомих алгоритмів, наприклад, симплексним методом (див там же) дозволяє, в принципі, визначити невідомі параметри адсорбованого шару, зокрема, його товщину та показник заломлення

За допомогою знайдених таким шляхом величин можна потім визначити масу адсорбованої речовини за формулами, одержаними з виразу для молекулярної рефракції речовини, що визначається

$$\tilde{A} = d(n - n_0) / (dn/dc) \quad (6)$$

Тут \tilde{A} - величина поверхневого надлишку, g/cm^2 , d - товщина шару, cm , n_0 - показник заломлення зовнішнього середовища, n - показник заломлення визначаємої речовини. Типові значення dn/dc для різних білків дорівнює $0,188 cm^3/g$ (див M Malmstein, Ellipsometry studies of protein layers adsorbed at hydrophilic surfaces J Colloid and Interface Science, 166, 333 - 342 (1994))

Однак здійснення цієї ідеї нашою хватується на те ускладнення, що для тонких (менше 3 - 5 нм) шарів рішення оберненої задачі виявляється неоднозначним. Це означає, що для одної і той же експериментальної кривої можуть відповідати з високим ступенем точності теоретичні криві, розраховані для різних, не співпадаючих одна з одною пар значень n , d визначаємої речовини (див K A Peterlinz, R Georgiadis, "In situ kinetics of self-assembly by surface plasmon resonance spectroscopy" - Langmuir - v 12, № 20 - P 4731 - 4740 - 1996). Технічне рішення, що заявляється, суттєво опирається на установлені авторами раніше невідомий факт, що кількість адсорбованої речовини в шарі, розрахована за величиною молекулярної рефракції з використанням формули (6), виявляється інваріантним відносно неоднозначності в визначенні оптичних параметрів цього шару з кривих поверхневого плазмонного резонансу шляхом вирішення оберненої задачі

Іншими словами, всі пари значень n , d , які належать множині рішень оберненої задачі, приводять до однакового з високим ступенем точності значення кількості адсорбованої речовини, розрахованої за формулою (6). Вказана інваріантність не є математично суворою і в силу цього не може бути доказаною аналітично, але виявляється шляхом числового моделювання. Виходячи з цього факту, детектування біомолекул та молекулярних комплексів за допомогою пристрою на основі поверхневого плазмонного резонансу з кількісним визначенням маси речовини, що аналізується, присутньої на чутливій площадці пристрою, здійснюється наступним чином

- чутлива площадка пристрою приводиться в контакт з середовищем з відомих показником заломлення наприклад, повітрям ($n = 1$) або водою ($n = 1,3328$ при $t = 20^\circ C$),

вимірюється кутова залежність інтенсивності відбитого світла в інтервалі кутів падіння $\phi_{min} < \phi < \phi_{max}$, де максимальний та мінімальний кути, ϕ_{min} і ϕ_{max} , вибрані таким чином, щоб вказаний інтервал включав кут плазмонного резонансу $\phi_{min} < \phi_{SPR} < \phi_{max}$. Кількість різних кутів падіння, для яких вимі-

рюється інтенсивність відбитого випромінювання, може бути різною, але не менше трьох. Збільшення цієї кількості до певної межі підвищує точність кінцевого результату вимірювання. Оптимальна кількість кутів залежить від якості виготовлення та точності вимірювальної установки в цілому. Авторами були одержані прийнятні результати, які забезпечують достатню достовірність при зніманні кутової залежності через 20° (кутових хвилин).

- за даними вимірів з допомогою описаної вище методики рішення оберненої задачі визначаються оптичні параметри пристрою при відсутності речовини, що аналізується: показник заломлення k і товщина d електропровідної плівки, а також показник заломлення n_1 і товщина d_1 допоміжного шару на поверхні електропровідної плівки, якщо такий є в наявності уданого пристрою.

- пристрій приводиться в контакт з пробой речовини, що аналізується так, щоб речовина, що аналізується, могла адсорбуватися або зв'язатися іншим способом з поверхнею його чутливої площадки.

- вимірюється кутова залежність інтенсивності відбитого світла в інтервалі кутів падіння $\varphi_{\min} < \varphi < \varphi_{\max}$, де максимальний та мінімальний кути вибираються з тих же міркувань, що і в попередньому випадку.

- задається показник заломлення адсорбованої речовини n_x . Вибір цього значення може здійснюватися різним чином, але так, щоб виконувалась умова $n_x > n_0$, де n_0 - показник заломлення зовнішнього середовища. Оптимальним значенням для n_x являється значення, близьке до значення показника заломлення речовини, що визначається. Наприклад, якщо визначаємою речовиною є білкові молекули, а визначення їх проводиться в водному розчині, можна прийняти $n_x = 1,45$.

- за даними вимірів з допомогою описаної вище методики рішення оберненої задачі і з використанням заданого показника заломлення знаходиться товщина шару речовини, що аналізується d_x .

- Використовуючи визначені описаним способом значення n_x та d_x , знаходять кількість аналізованої речовини Γ на одиницю площі чутливої поверхні пристрою за формулою (6). Необхідно брати до уваги, що тільки значення Γ являється істинною фізичною величиною, характеризуючою реальну кількість адсорбованої речовини, в той час як n_x та d_x при даному способі вимірів не мають фізичного сенсу.

Пристрій для практичної реалізації даного методу (Фіг. 4) включає наступні елементи:

- джерело випромінювання, наприклад, гелій-неоновий лазер (6),

- детекторний блок (8), включаючий

- описану вище призму повного внутрішнього відбивання з нанесеною на її основу провідниковою плівкою, яка також може бути споряджена додатково допоміжним шаром, сприяючим зв'язуванню речовини, що аналізується, на чутливій поверхні сенсора.

- пристрій повороту призми, керований зовнішнім контролером,

блок обробки сигналу (10), включаючий

- фоточутливий пристрій для вимірювання інтенсивності відбитого світла,

- аналогово-цифровий перетворювач для перетворення вихідного сигналу фоточутливого пристрою в цифрову форму,

- обчислювально-керуючий пристрій для управління поворотом призми та виконання вимірів, запам'ятовування результатів вимірів та їх математичної обробки, в якості якого використовувався персональний комп'ютер,

- програмне забезпечення, реалізуюче алгоритми вимірювань, збору даних та їх обробки,

- Особливістю заявляемого способу детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів являється необхідність дотримання лінійності каналу вимірювання кутової залежності інтенсивності відбитого променя, оскільки експериментально вимірюючи крива зрівнюється з розрахунковою. Тому в пристрої для здійснення даного способу використовуються спеціальні технічні рішення, які знижують вплив ефектів, що можуть погіршити лінійність каналу вимірювання та призвести до викривлення форми кривої поверхневого плазмонного резонансу.

Викривлення форми кривої поверхневого плазмонного резонансу може бути викликане неоднорідністю вольт-ваттної чутливості елемента, реєструючого інтенсивність відбитого випромінювання (наприклад, фотодіода чи фотопомножувача) по площі, якщо відбитий промінь переміщується по поверхні цього елемента в процесі вимірювань. Другою можливою причиною викривлення може бути зміна коефіцієнта відбивання від поверхні цього елемента або його частин (наприклад, вхідного вікна) при вимірюванні кута падіння світла на цей елемент. Усунення викривлень цього типу досягається тим, що прозорий оптичний елемент, виконаний в вигляді призми повного внутрішнього відбивання, один з кутів якої дорівнює 90° (Фіг. 5). Для цієї призми пояснюється наступним. Вхідний промінь (11) входить в призму (16) через передню грань, падає на основу призми з нанесеним на неї електропровідним шаром (15), збуджуючи поверхневі плазмони. Відбитий промінь зазнає додаткове відбиття від задньої грані призми і виходить назад через передню грань паралельно променю (11). При цьому напрямком розповсюдження відбитого променя (17), що вийшов з призми, не залежить від кута повороту призми.

Другою причиною викривлення форми резонансної кривої являється зміна коефіцієнта відбиття світла від передньої грані призми при зміні кута падіння. Це викривлення проявляється тим значніше, чим більше кут падіння променя на передню грань відрізняється від 90°. Для зменшення цього викривлення переполюючи кут призми біля передньої грані вибирається поблизу кута плазмонного резонансу для даного показника заломлення призми, матеріалу електропровідної плівки та даного показника заломлення зовнішнього середовища. Для призми з скла з показником заломлення 1,51, призначеної для аналізу проб в вигляді водних розчинів з показником заломлення порядку 1,33, заломлюючий кут біля основи передньої грані вибирається поблизу 67°. Для розширення кутів

падіння, доступних до вимірювання, є сенс зменшити цей кут. Для цього призма виконується з речовини з максимально можливим показником заломлення, оскільки кут плазмонного резонансу зменшується з зростанням показника заломлення призми (для скла це відповідає показнику заломлення біля 1,7). В цьому випадку кут біля основи передньої грані призми вибирається поблизу 37° для газообразної проби, що аналізується, з показником заломлення 1 і поблизу 57° для проби, що аналізується, в вигляді водного розчину. Заявляемий спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення завдяки своїй високій чутливості можуть успішно застосовуватися в різних областях промисловості в системах високоточного контролю продукції, що випускається, особливо там, де потрібне особливо точне виконання заданих стандартів, наприклад, при виробництві фармацевтичних препаратів (Київський пеніцилиновий завод, Україна), (Pharmacia Biosensors, Upsala, Sweden)). В подібних пристроях мають потребу біотехнологічні підприємства для контролю технологічних процесів та операцій (інститут біохімії ім. Баха (Москва, Росія), НІІ Біохімпроцесів (Пушино, Росія), ВО "Біохім" (Красноярськ, Росія)). Вони також необхідні при діагностиці імунних та алергічних реакцій організму (Інститут педіатрії, акушерства і гінекології Мінздрав'я України, госпіталі). Об'єкти, що заявляються, можуть використовуватися також при митному контролі тварин та продуктів споживання, що ввозяться (Українська митниця, Інститут м'ясо-молочної промисловості). Оснащений біологічними чутливими шарами, прилад може використовуватися для контролю специфічних (високоспецифічних) взаємодій біологічних молекул в імуноаналізі та ферментативному аналізі (Artifical sensors Instruments (Munich, FRG)). З його допомогою можуть вирішуватися питання виявлення в біологічних рідинах специфічних антитіл-імуноглобулінів, які виробляються живим організмом в відповідь на проникнення антигена-вірусу, бактерії, сторонньої клітини. Він також може бути використаний для безперервного контролю якості питної води в міському комунальному господарстві.

Приклад. Використовувались спосіб та пристрій, що заявляються, по блок-схемі на фіг. 4. Прилад складається з He-Ne лазера, скляної призми, проточної кювети (8мм в діаметрі та 1мм висотою) і реєструючого фотодіоду. Призма та протічна кювета розташовані на платформі, що обертається (з роздільною здатністю $0,01^\circ$).

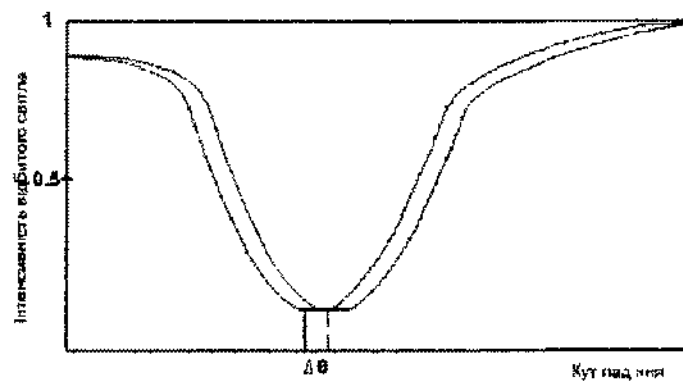
Шар золота товщиною 45нм напильовався на попередньо оброблену поверхню призми (термічне напильнення, вакуум 10^{-3} Pa). Для одержання гідрофобної поверхні, а також для вилучення нестабільності в водному середовищі золото модифікувалось шляхом ковалентної пришивки шару тиолів $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$. Для цього призма з свіженим шаром золота занурювалась на 24 години в спиртовий розчин тиолів з послідовним промиванням в дистильованій воді.

Спосіб детектування та визначення концент-

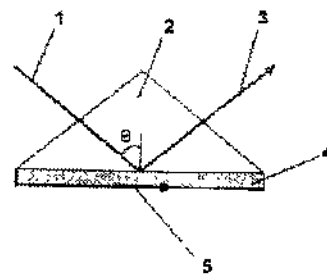
рації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення використовувались для детектування наявності молекул з використанням специфічних реакцій, в яких молекула з меншою молекулярною масою заміщує в первинно сорбованому молекулярному шарі молекулу з більшою молекулярною масою, тобто витискує її в силу свого більшого споріднення до строго визначених структур первинно сорбованого шару молекул. Прикладом подібної реакції може служити реакція заміщення різними гербіцидами пластохінону в рослинних білках, яка звичайно використовується для інгібування електронно-протонного транспорту через мембранні комплекси при необхідності подавлення росту рослини в цілому. В нашому випадку заміщення гербіцидом атразин з молекулярною масою 300Da пластохінону з молекулярною масою 1000Da в його сайті приводить до зменшення оптичної товщини шару рослинного білку D1 і зменшенню його маси, що фіксується пристроєм для детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів. При цьому спостерігається зміщення резонансних кривих в сторону менших кутів.

Неекстрагований (з пластохіноном) білок D1, виділений з мембранного комплексу PS2, попередньо на протязі двох годин розчинявся в фосфатному буферному розчині (25ммоль KH_2PO_4 , 25ммоль NaCl , pH = 7,4) і доводився до концентрації 5мг/мл. Проба білку ємністю 100мкл з допомогою самплера розміщувалась в кюветі і в процесі сорбції проводилось спостереження кінетики сорбції до досягнення насичення (приблизно 0,5 години). Маса білку, сорбованого на чутливій поверхні сенсора, визначена згідно способу, що заявляється, склапає $1,24 \cdot 10^{-7}$ г/см², що відповідає субмоношаровому покриттю з коефіцієнтом заміщення приблизно 56%. Після п'ятикратної промивки кювети розчином PBS в інтервалі 0,5 години фіксувався реальний дрейф системи по нахилу сенсограми. Потім, після встановлення в системі рівноваги, проводилась інжекція гербіциду відповідної концентрації з послідовним спостереженням та записом кінетики реакції заміщення (Фіг. 6b). Зменшення маси білкового шару, викликане заміщенням пластохінону атразином, склапає $0,95 \cdot 10^{-8}$ г/см², що знаходиться в задовільній відповідності з передбаченим значенням $1,3 \cdot 10^{-8}$ г/см² для випадку повного заміщення пластохінону атразином. Наявне розходження може бути зв'язане з неповним проходженням реакції заміщення. Для порівняння такий же досвід був проведений з екстрагованим (без пластохінону) білком D1. Реакція специфічного зв'язування між екстрагованим білком D1 і гербіцидом практично не спостерігалась (Фіг. 6a).

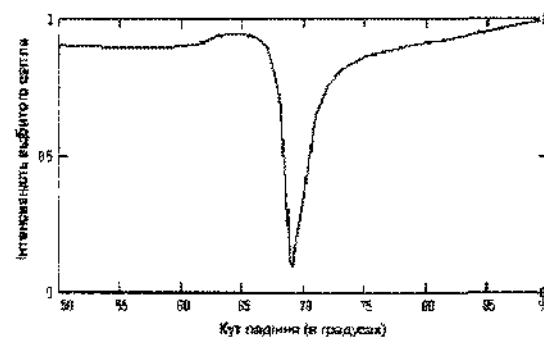
Проведені експерименти підтверджують широкі можливості використання способу детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрою для його здійснення для дослідження міжмолекулярних взаємодій, для моніторингу різних біологічних реакцій та детектування біомолекул і молекулярних комплексів.



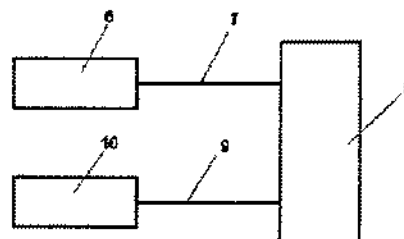
Фіг. 1



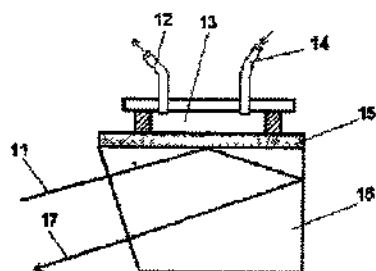
Фіг. 2



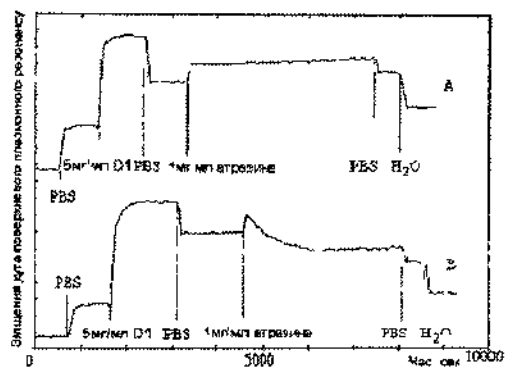
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71