



(19) **UA** (11) **46 018** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **G 01N 21/55 A**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97105153, 22.10.1997

(24) Дата начала действия патента: 15.05.2002

(46) Дата публикации: 15.05.2002

(72) Изобретатель:

Ширшов Юрий Михайлович, UA,
Венгер Евгений Федорович, UA,
Прохорович Анатолий Викторович, UA,
Ушенин Юрий Валентинович, UA,
Мацас Евгений Петрович, UA,
Чегель Владимир Иванович, UA,
Самойлов Антон Владимирович, UA

(73) Патентовладелец:

Ширшов Юрий Михайлович, UA

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ И
УСТРОЙСТВО ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ СПОСОБА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области аналитических средств для химического и биохимического анализа.

Предлагаемый способ обнаружения и определения концентрации биологических молекул заключается в том, что зону раздела среды с большей оптической плотностью и среды с меньшей оптической плотностью облучают лучом р-поляризованного электромагнитного излучения при различных углах падения луча, определяют, регистрируют и анализируют параметры отраженного излучения для всех углов падения луча, определяют углы падения луча и осуществляют математическую обработку результатов измерений, используя специальный алгоритм.

Предлагаемое устройство для обнаружения и определения концентрации биологических молекул содержит: прозрачный оптический

элемент (стеклянную призму, один из углов которой равен 90 градусов), содержащий слой материала с большей оптической плотностью, граничащий со слоем материала с меньшей оптической плотностью, и металлическую или полупроводниковую пленку на границе раздела указанных слоев; источник оптического излучения, расположенный со стороны среды с большей оптической плотностью; устройство управления с исполнительным шаговым электродвигателем, предназначенное для управления положением призмы; вычислительное устройство.

Официальный бюлетьень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 5, 15.05.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **46 018** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **G 01N 21/55 A**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 97105153, 22.10.1997

(24) Effective date for property rights: 15.05.2002

(46) Publication date: 15.05.2002

(72) Inventor:

Shyrshov Yuriy Mykhailovych, UA,
Venger Yevgen Fedorovych, UA,
Prokhorovych Anatolii Viktorovych, UA,
Ushenin Yuriy Valentynovych, UA,
Matsas Yevgen Petrovych, UA,
Chegel Volodymyr Ivanovych, UA,
Samoilov Anton Volodymyrovych, UA

(73) Proprietor:

Shyrshov Yuriy Mykhailovych, UA

(54) **METHOD FOR DETECTING AND MEASURING CONCENTRATION OF BIOLOGICAL MOLECULES AND MOLECULAR COMPOUNDS AND A DEVICE FOR REALIZATION OF THE METHOD**

(57) Abstract:

The present invention relates to the means for chemical and biological analysis. The proposed method for detecting and measuring concentration of biological molecules and molecular compounds involves irradiating the boundary area between an optically most dense medium and an optically less dense medium by p-polarized electromagnetic radiation at different angles of incidence, recording and analyzing the reflected radiation parameters for all the angles of incidence, and mathematical processing of the measurement data according to a specified algorithm.

The proposed device for detecting and measuring concentration of biological molecules

and molecular compounds contains a transparent optical element (a glass prism with one of the angles equal to 90 degrees) coated with a material that is contiguous to the optically less dense medium, a metallic or semiconductor film on the boundary, a radiation source installed on the side of the most dense medium, a control device with a step motor for controlling the prism position, and a computer.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 5, 15.05.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **46 018** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **G 01N 21/55 A**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
97105153, 22.10.1997

(24) Дата набуття чинності: 15.05.2002

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.05.2002

(72) Винахідник(и):

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

(73) Власник(и):

Ширшов Юрій Михайлович, UA

(54) СПОСІБ ДЕТЕКТУВАННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІОМОЛЕКУЛ ТА МОЛЕКУЛЯРНИХ КОМПЛЕКСІВ ТА ПРИСТРІЙ ДЛЯ ЙОГО ЗДІЙСНЕННЯ

(57) Реферат:

Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрій для його здійснення відносяться до галузі аналітичної техніки для хімічного та біохімічного аналізу.

Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів включає опромінення межі поділу оптично більш щільного середовища та оптично менш щільного середовища р-поляризованою електромагнітною хвилею під різними кутами падіння, реєстрацію відбитого від межі поділу випромінювання та його аналіз для всього набору

кутів падіння, визначення абсолютних значень кутів падіння і математичну обробку даних вимірів за спеціально розробленим алгоритмом.

Пристрій для здійснення способу детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів містить прозорий оптичний елемент з оптично більш щільної речовини (скляну призму, один з кутів якої дорівнює 90°), що межує з оптично менш щільною речовиною, металеву або напівпровідникову плівку на вказаній межі, джерело випромінювання, яке розташовано з боку більш щільного середовища, блок керування призмою з кроковим двигуном, комп'ютер.

Опис винаходу

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 середовища.

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 середовища; 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.Jaggers, J.S.Shaw.

Спосіб включає: опромінення межі поділу між скляною призмою (оптично більш щільне середовище) і досліджуванним 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 заставляє 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 (досліджуваній розчин), оснащений електропровідною або напівпровідниковою плівкою, переважно металевою, джерело р-поляризованого електромагнітного випромінювання переважно видимого діапазону хвиль, 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 непрямым методом і не дає безпосередньої кількісної міри цієї речовини, адсорбованої на поверхні чутливого елементу. Крім цього, мінімум резонансної кривої має деяку ширину (порядку (2° - 3°)). В зв'язку з цим, якщо адсорбція на поверхню чутливого елементу 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 призмою 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 призмою 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 призмою 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 призмою, 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 чутливу 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 площа 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 статі 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 контакт з менш щільним зовнішнім середовищем (повітря, вода), що містить в собі домішки речовини, що визначається. В результаті цього контакту речовина, що визначається, адсорбувалася 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 відбитого 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.Семененко, Л.В.Семененко, В.К.Соколов. / Под ред. А.В.Ржанова. - Новосибирск, "Наука" (Сиб. отд.). - 1978. - 424 с.):

$$R_p(\varphi) = -(\eta_p - Y_p)(\eta_p + Y_p) \quad (1)$$

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:

$$\left(\frac{1}{Y_p} \right) = \left(\prod_{j=1}^K \left| \frac{\cos \delta_j}{i \eta_{jp}} \right| \frac{(1/\eta_{jp}) \sin \delta_j}{\cos \delta_j} \right) \left(\frac{1}{\eta_{Kp}} \right) \quad (2)$$

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

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

а η_{jp} - адмітанс j -го шару:

$$\eta_{jp} = N_j / \cos \varphi_j = N_j^2 / \sqrt{N_j^2 - N_0^2 \sin^2 \varphi_0} \quad (4)$$

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 η_{p0} і η_{pN} відносяться до призми повного внутрішнього відбивання 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 скористатись 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 відбивання, а R_i° - 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 найдених таким шляхом величин можна потім визначити масу адсорбованої речовини за формулами, одержаними з виразу для молекулярної рефракції речовини, що визначається.

$$\Gamma = d(n - n_0) / (dn/dc) \quad (6)$$

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

Однак здійснення цієї ідеї нашоветується на те ускладнення, що для тонких (менше 3 - 5нм) шарів рішення оберненої задачі виявляється неоднозначним. Це означає, що для одної і тої ж 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 відомим 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 $\varphi_{min} < \varphi < \varphi_{max}$, де максимальний та мінімальний кути, φ_{min} і φ_{max} , вибрані таким чином, щоб вказаний інтервал включав кут плазмонного резонансу: $\varphi_{min} < \varphi_{spr} < \varphi_{max}$. Кількість різних кутів падіння, для яких вимірюється 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 пробєю 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 аналізуємої 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 контроллером;

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 виміряна крива зрівнюється з розрахунковою. Тому в пристрої для здійснення даного способу використовуються спеціальні технічні рішення, які понижують вплив ефектів, що можуть погіршити лінійність каналу вимірювання та визвати 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). Дія цієї призми пояснюється слідуючим. 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 напрямок 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 переломляючий 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, заломляючий 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. Заявляемый 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 пеніциліновий 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 Мінздор'я України, госпіталі). Об'єкти, що заявляються, можуть використовуватись також при митному контролі тварин та продуктів споживання, що ввозяться (Українська митниця, Інститут м'ясо-молочної промисловості). Оснащений біологічними чутливими шарами, прилад може використовуватись для контролю специфічних (високоселективних) 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, протічної кювети (8мм в діаметрі та 1мм висотою) і реєструючого фотодіода. Призма та протічна кювета розташовані на платформі, що обертається (з роздільною здатністю $0,01^\circ$).

Шар золота товщиною 45nm 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 тіолів $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$. Для цього призма з свіженапильним шаром золота занурювалась на 24 години в спиртовий розчин тіолів з послідовним промиванням в дистильованій воді.

Спосіб детектування та визначення концентрації 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 атразін 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 , $\text{pH} = 7,4$) і доводився до концентрації 5мг/мл. Проба білку ємністю 100мкл з допомогою сэмплера 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, склала $1,24 \cdot 10^{-7} \text{ г/см}^2$, 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 атразіном, склало $0,95 \cdot 10^{-8} \text{ г/см}^2$, що знаходиться в задовільній відповідності з передбаченим значенням $1,3 \cdot 10^{-8} \text{ г/см}^2$ для випадку повного заміщення пластохінону атразіном. Наявне розходження може бути зв'язане з неповним проходженням реакції заміщення. Для порівняння такий же дослід був проведений з екстрагованим (без пластохінону) білком D1. Реакція специфічного зв'язування між екстрагованим білком D1 і гербіцидом практично не спостерігалась (Фіг. 6a).

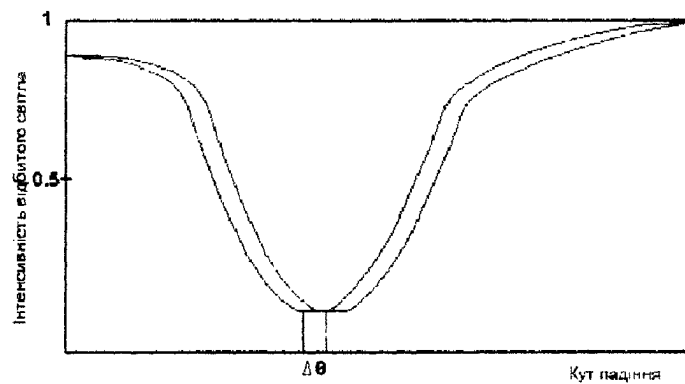
Проведені експерименти підтверджують широкі можливості використання способу детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів та пристрою для його здійснення для дослідження міжмолекулярних взаємодій, для моніторингу різних біологічних реакцій та детектування біомолекул і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

Формула винаходу

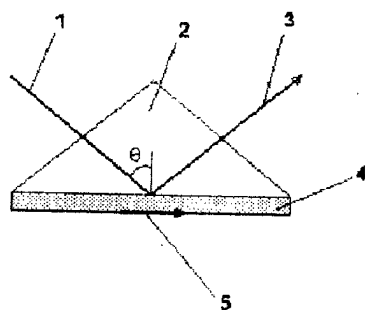
1. Спосіб детектування та визначення концентрації біомолекул та молекулярних комплексів, що включає опромінення межі поділу оптично більш щільного середовища, що має показник заломлення n_1 , з оптично менш щільним середовищем, що має показник заломлення n_2 , які задовольняють умові n_1 більше n_2 , 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 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 в вигляді призми, кут біля основи якої дорівнює 90° .

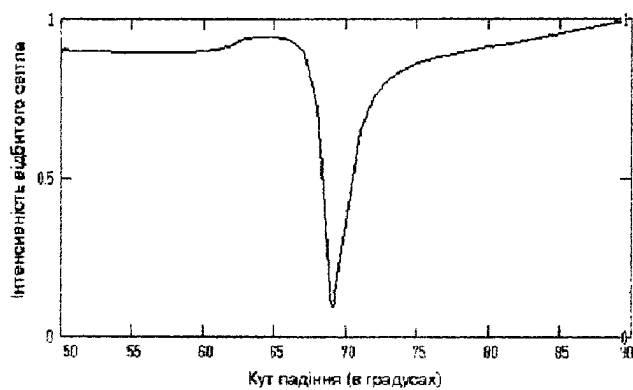
3. Пристрій по п. 2, який відрізняється тим, що другий кут біля основи призми вибирається рівним куту поверхневого плазмонного резонансу для даного показника заломлення призми, речовини електропровідної плівки і даного показника заломлення зовнішнього середовища, плюс-мінус 5 %.



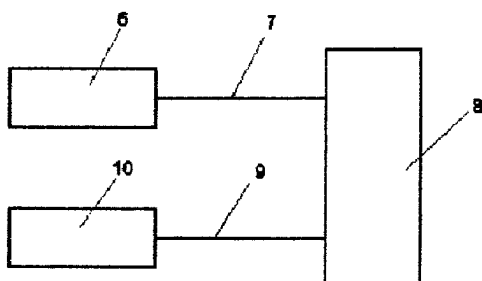
Фіг.1



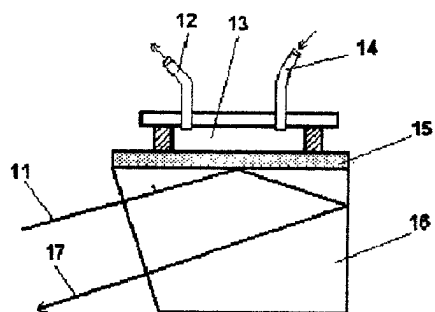
Фіг.2



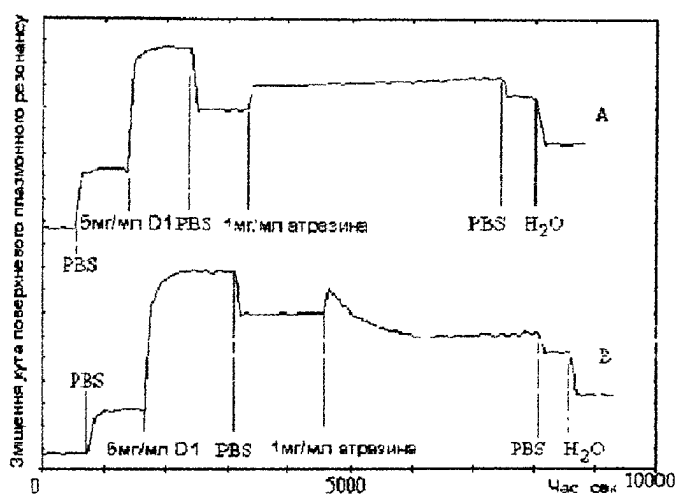
Фіг.3



Фіг.4



Фиг.5



Фиг.6

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 5, 15.05.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.