



F10000985708



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 07 1997

98570

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

G 01N 33/533, 33/52, 33/53

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	905701
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	19.11.90
(24) Alkupäivä - Löpdag	19.11.90
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	22.05.91
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	27.03.97
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
21.11.89 DE 3938598 P	28.04.90 DE 4013713 P

(71) Hakija - Sökande

1. Bayer Aktiengesellschaft, 5090 Leverkusen, Bayerwerk, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Hugl, Herbert, Gemarkenweg 9, 5060 Bergisch Gladbach 2, Germany, (DE)
2. Kuckert, Eberhard, c/o Molecular Diagnostics Inc., 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, USA, (US)
3. Möbius, Dietmar, Kampenweg 4, 3401 Waake, Germany, (DE)
4. Ohst, Holger, Im Wiesengrund 10, 5068 Odenthal-Steinhaus, Germany, (DE)
5. Rolf, Meinhard, c/o Mobay Corporation, Rushpark, Charlston, SC, USA, (US)
6. Rosenkranz, Hans Jürgen, Heinrich-Kauert-Weg 9, 4150 Krefeld 1, Germany, (DE)
7. Schopper, Heinrich Christian, Glindholzstrasse 95a, 4150 Krefeld 1, Germany, (DE)
8. Siegmund, Hans-Ulrich, Roonstrasse 100, 4150 Krefeld 1, Germany, (DE)
9. Sommer, Klaus, Morgengraben 3, 5000 Köln 80, Germany, (DE)
10. Wehrmann, Rolf, Buschstrasse 163, 4150 Krefeld 1, Germany, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Fluoresenssienergiansiirtoon perustuva biosensori ja menetelmä analyyttimolekyylien havaitsemiseksi sen avulla
Biosensor baserad på fluorescensenergiöverföring och förfarande för detektering av analytmolekyler med detta

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Chemical Abstracts vol. 112 29895n

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena uusi fluoresenssi-energiansiirtoon perustuva optinen biosensori, joka koostuu seuraavista: a) kiinteä kantaja, b) a):lle valmistettu yksi- tai useampikerroksinen Langmuir-Blodgett(LB)-kerros, c) ainakin yksi fluoresenssiväri F_1 , joka sisältyy vähintään yhteen 4:stä ylimmästä LB-kerroksesta, d) spesifiseen vuorovaikutukseen kykenevä molekyyli (reseptori), joka on sidottu LB-kerroksen ylimpään kerrokseen tai sovitettu sille, ja e) liikkuva fluoresenssiväriaine F_2 ,

jonka herätejuovaspektri peittyy F_2 :n emissiojuovaspektrillä energiansiirtoon riittävästi ja joka e1) on kovalenttisesti sidottu ligandiin, joka pystyy sitoutumaan reseptoriin, tai e2) on kovalenttisesti sidottu toiseen reseptoriin, joka pystyy sitoutumaan ensimmäisen reseptorin ja ligandin muodostamaan kompleksiin, jolloin ligandi tai vastaavasti ligandi ja toinen reseptori eivät aluksi ole sidottuja LB-kerrokseen.

Uppfinningen avser en ny optisk biosensor på basis av fluorescens-energiöverföring, varvid den består av (a) en fast bärare, (b) ett på (a) anbringat Langmuir-Blodgett(LB)-skikt i ett eller flera lager, (c) åtminstone ett fluorescensfärgämne F_1 , vilket anordnats i åtminstone ett av de 4 översta lagren av LB-skiktet, (d) en för specifik växelverkan kapabel molekyl (receptor), vilken bundits i eller anordnats på det översta lagret av LB-skiktet, och (e) ett mobilt fluorescensfärgämne F_2 , vars exciteringslag för en energiöverföring i tillräcklig grad överlappar emissionslaget hos F_1 och vilket (e1) kovalent bundits vid en ligand, vilken förmår binda sig vid receptorn, eller vilket (e2) kovalent bundits vid en annan receptor, vilken förmår binda sig vid komplexet av den första receptorn och liganden, varvid liganden eller liganden och den andra receptorn till en början ej är bunden vid LB-skiktet.

Fluoresenssienergiansiirtoon perustuva biosensori ja menetelmä analyyttimolekyylien havaitsemiseksi sen avulla

Esillä olevan keksinnön kohteena on rakenteeltaan uudenlainen optinen biosensori käytettäväksi fluoresenssivärillä merkittyjen molekyylien havaitsemismenetelmässä sellaisten liuenneiden aineiden tai liuenneiden analyyttien tunnistamiseen, jotka käyttäytyvät esimerkiksi siten kuin antigeeni ja vasta-aine. Kyseessä on kiintofaasisensori, jonka fluoresenssiväriaine mahdollistaa energiansiirtoprosessin toiselle, havaittavalle fluoresenssiväriellä merkitylle molekyylille.

On olemassa erilaisia menetelmiä analyyttien, kuten hormonien, entsyymien, muiden proteiinien, hiilihydraattien, nukleiinihappojen, farmakologisten vaikuttavien aineiden, toksiinien ym. osoittamiseksi nestemäisissä, biologista alkuperää olevissa näytteissä. Tunnetuista menetelmistä on erityisesti huomattava pienten orgaanisten ainemäärien osoittamiseen ja määrittämiseen käytetyt herkäät immunoanalyysimenetelmät. Immunoanalyysimenetelmät perustuvat yleisesti reseptorimolekyylin, esimerkiksi vasta-aineen, kykyyn spesifisesti tunnistaa ligandimolekyylin rakenne ja molekyyliorganisaatio ja täysin spesifisesti sitoa tämä molekyyli riippumatta siitä, onko kysessä pooliton ja/tai polaarinen vuorovaikutus.

Immunoanalyysejä suoritetaan eri menetelmin. Tällaisia ovat erilaisia merkitsemistapoja käyttävät, luonteeltaan tavallisesti radioaktiivisuuteen, entsyymien sitomiseen ja myös fluoresenssiin perustuvat menetelmät (Methods in Enzymology, 74 (1981), 28 - 60).

Joihinkin näistä tunnetuista immunoanalyysimenetelmistä sisältyy sellaisten fluoresenssiväriainemolekyylien F_1 käyttö, jotka pystyvät absorboimaan valoa, jonka aallonpituus on λ_1 , ja emittoimaan toista suuremman aallonpituuden λ_2 omaavaa valoa. Toisen fluoresenssiväriainemolekyylin

F_2 läsnäollessa tietyissä olosuhteissa aallonpituuden λ_1 omaavalla valolla suoritettun herätteen jälkeen tapahtuu säteilyvapaa energiansiirto F_2 :lle, joka silloin puolestaan emittoi valoa, jonka aallonpituus λ_3 on vielä edellisistä suurempi.

Tämän energiansiirron periaatteen teorian on kuvannut Förster (Annual Reviews in Biochemistry 47 (1978), 819 - 846), ja se on ollut herätteenä monenlaisille käyttömahdollisuuksille. Tämän energiansiirron eräs tärkeä ominaisuus on sen riippumattomuus etäisyydestä. Försterin mukaan energiansiirron vaikutusta kuvaa kriittinen säde R_0 , nimittäin se donorin ja akseptorin välinen etäisyys, jolla molekyylien välinen energiansiirto on todennäköisesti sama kuin donorin kaikkien muiden desaktivoimisprosessien summa. Tämä etäisyys on noin 50 - 100 Å.

Aikaisemmin on jo kuvattu immunoanalyysyjä, jotka perustuvat etäisyydestä riippuvaisen energiansiirron hyväksikäyttöön. Niinpä EP-patenttijulkaisussa 150 905 on kuvattu homogeenisessa liuoksessa toimiva immunokoe, jossa analyytti tai vastaavasti antigeeni on merkitty fluorensenssiväriaineella F_1 ja sitä spesifisesti sitova vastaaine varustettu fluorensenssiväriaineella F_2 . Spesifisen sidonnan osoittamiseen ja siten analyyttisenä menetelmänä käytetään sitä tosiasiaa, että säteilytettäessä valolla, jonka aallonpituus on λ_1 , aallonpituudeltaan λ_3 oleva emissio voidaan havaita vain silloin, kun analyytti ja vastaaine ovat riittävinä konsentraatioina energiansiirrolle Försterin mukaan riittävän lähellä toisiaan. Tämä toteutuu vain siinä tapauksessa, että analyytti ja vastaaine ovat muodostaneet spesifisen sidoksen.

Eräässä toisessa esimerkissä toinen merkityistä sidontaosapuolista viedään kiintoainepinnalle ja vastaava spesifisesti sitova osapuoli sidotaan homogeenisesta liuoksesta. Jälleen spesifisen sidonnan osoittaminen tapahtuu, kuten edellä selvitettiin, vastaavalla energian-

siirrolla evanescent-wave-teknologiaa soveltaen (Nature 320 (1986), 179 - 181).

5 Sekä tässä mainitulla energiansiirrolla homogeeni-
sessä liuoksessa että kuvatulla energiansiirtoa käyttäväl-
lä kiintofaasi-immunoanalyysillä on periaatteessa epäkoh-
tana se, että spesifisesti toistensa kanssa sidottavat
molekyylit on kulloinkin merkittävä yhdellä välttämättö-
mistä fluoresenssiväriaineista F_1 ja vastaavasti F_2 ja että
suhde $F_1:F_2$ voi olla korkeintaan 2:1 (Nature 320 (1986),
10 179 - 181).

 On myös jo kuvattu menetelmiä, joiden avulla molem-
pien fluoresenssiväriaineiden F_1 ja F_2 suhteen rajoittamaa
fluoresenssispektroskooppisen menetelmän herkkyyttä voi-
daan parantaa. Niinpä EP-patenttijulkaisussa 174 744 ehdo-
15 tetaan useamman orgaanisen väriainemolekyylin kovalenttis-
ta sitomista "valoa keräävään" proteiiniin, so. tällöin
tapahtuu useamman orgaanisen väriainemolekyylin energian-
siirto vain yhteen akseptorimolekyyliin, nimittäin EP-pa-
tenttijulkaisun 174 744 mukaan fykobiliproteiiniin (allo-
20 fykosyaniini). Tätä molekyyliysteemiä ehdotetaan sitten
jälleen käytettäväksi "markkerina" muille biologisille mo-
lekyyleille. Menetelmää rajoittaa väriaine:proteiini-kyt-
kentäsuhde.

 Esitettyjen systeemien haittana on edelleen se,
25 että niissä komplementaariset systeemit on kulloinkin spe-
sifisesti merkittävä, jolloin niitä ei voida käyttää moni-
puolisesti. Edelleen näiden heterogeenisista faaseista
koottujen systeemien haittana on niissä käytetty erityinen
evanescent-wave-tekniikka. Lisäksi spesifisesti sitovien
30 molekyylien kiinnittäminen kiintoainepinnalle kytkentäkom-
ponentti/vasta-aine/antigeeni/vasta-aine-systeemin väli-
tyksellä on preparatiivisesti sangen hankala. Tämän kiin-
tofaasitekniikan periaatteellisena haittana immuno-
analyysien suorituksessa on edelleen päällysteiden toisin-
35 nettava valmistus immunoreaktion reaktanteista koematrii-

sille. Analyttisissä menetelmissä on kuitenkin sekä herkkyys ja selektiivisyys kohteena olevan aineen suhteen että myös analyysimenetelmän toisinnettavuus olennainen laadun tunnusmerkki.

5 Esillä olevan keksinnön kohteena on uudella tavalla koottu sensori käytettäväksi fluoresenssiväriaineella merkittyjen molekyylien havaitsemismenetelmässä näiden liuenneiden aineiden tai analyttien toteamiseksi energiansiirron avulla yksinkertaisella fluoresenssitekniikalla, jolloin toteamisherakkyys on aikaisempaa parempi, käyttömahdollisuudet erilaisiin tarkoituksiin ovat monipuoliset ja jolloin on mahdollista valmistaa toisinnettavasti kiinto-

10 ainepintoihin sidottuja kerroksia. Selvästi parantuneen herakkyuden ohella vältetään samalla kaikki edellä esitetyt epäkohdat.

15 Keksinnön kohteena on fluoresenssi-energiansiirtoon perustuva optinen biosensori, joka koostuu seuraavista:

- a) kiinteä kantaja,
- b) kantajalle a) valmistettu yksi- tai useampikerroksinen Langmuir-Blodgett (LB)-kalvo,
- c) ainakin yksi fluoresenssiväri F_1 , joka sisältyy vähintään yhteen LB-kalvon neljästä ylimmästä kerroksesta,
- d) ligandimolekyylin kanssa spesifiseen vuorovaikutukseen kykenevä reseptorimolekyyli, joka on sidottu LB-
- 20 kalvon ylimpään kerrokseen tai sovitettu sille, ja
- e) liikkuva fluoresenssiväriaine F_2 , jonka herätejuovaspektri peittyy F_1 :n emissiojuovaspektrillä energiansiirtoon riittävästi ja joka
- e1) on kovalenttisesti sidottu ligandiin, joka pys-
- 30 tyy sitoutumaan reseptorimolekyyliin, tai
- e2) on kovalenttisesti sidottu toiseen reseptorimolekyyliin, joka pystyy sitoutumaan ensimmäisen reseptorimolekyylin ja ligandin muodostamaan kompleksiin,
- jolloin ligandi tai vastaavasti ligandi ja toinen
- 35 reseptorimolekyyli eivät aluksi ole sidottuja LB-kerrokseen.

Keksinnön kohteena on myös edellä kuvatun biosensorin käyttöön perustuva menetelmä analyyttimolekyylien havaitsemiseksi näytteestä, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että käytetään sensoria, joka koostuu

- 5 a) kiinteästä kantajasta,
 b) yksi- tai useampikerroksisesta Langmuir-Blodgett(LB)-kalvosta, joka on kiinnitetty kantajan a) pintaan,

- c) ainakin yhdestä fluoresenssiväristä F_1 , joka sisältyy LB-kalvon ylimpään kerrokseen tai useampikerroksisen LB-kalvon ollessa kysymyksessä vähintään yhteen LB-kalvon neljästä ylimmästä kerroksesta,

- d) ensimmäisestä reseptorimolekyylistä, joka kykenee spesifisesti sitoutumaan analyyttimolekyylin kanssa ja
15 joka on sidottu kovalenttisesti tai adsorboimalla LB-kalvon ylimpään kerrokseen tai ylimmälle kerrokselle, ja

- e) altistetaan sensori näytteelle ja liikkuvalla fluoresenssiväriaineelle F_2 , jonka herätejuovaspektri peit-
20 tyy F_1 :n emissiojuovaspektrillä energiansiirtoon riittävästi ja joka

 e1) on kovalenttisesti sidottu toiseen reseptorimolekyyliin, joka analyyttimolekyylien kanssa kilpailevasti sitoutuu ensimmäiseen reseptorimolekyyliin d) tai joka

- e2) on kovalenttisesti sidottu kolmanteen reseptorimolekyyliin, joka pystyy sitoutumaan ensimmäisen reseptorimolekyylin d) ja analyyttimolekyylin muodostamaan kompleksiin,

 jolloin toinen molekyyli tai analyyttimolekyylin ja kolmannen reseptorimolekyylin kompleksi eivät aluksi ole
30 sidottuja LB-kalvoon,
ja havaitaan fluoresenssienergiasiirron tason muutos, joka saadaan vasteena altistusvaiheessa e).

 Kantajina tulevat kysymykseen kaikki alan ammattimiehen tuntemat LB-tekniikkaan sopivat kantajat, kuten lasi,
35 kvartsilasi, muut lasit, kuten Li-niobaatti, sinkki-

selenidi, posliini, puolijohdemateriaalit, kuten germanium, GaAs tai pii, sekä metallit.

Edelleen sopivia ovat muovit, kuten polymetyylimetakrylaatti, polykarbonaatti, polystyreeni ym. sekä metalloidut muovit. Kiinteiden kantaja-aineiden pinta voidaan ennen päällystystä myös modifioida, esimerkiksi lasi tai pii esikäsittelemällä trikloorimetyylisilaanilla, diklooridimetyylisilaanilla, trikloorioktadekyylisilaanilla, heksametyylidisilatsaanilla tai plasmasyövyttämällä tai plasmapolymeroimalla. Edullisesti kantajana käytetään mahdollisesti pintamodifioitua lasia, kvartsilasia, piitä, muovia tai metalloitua muovia. Lisäksi kantajat ovat edullisesti optisesti läpinäkyviä. Kaikille kantaja-aineille on lisäksi tunnusomaista, että niiden pinta on tasalaatuinen, edullisesti tasainen.

Tällaisille kantajille muodostetaan LB-tekniikalla yksi tai useampi yksimolekyylikerros. LB-tekniikalla tarkoitetaan seuraavassa menetelmää yksimolekyylisten kerrosten siirtämiseksi nesteen (veden) pinnalta kiinteälle kantajalle Langmuir-Blodgett-menetelmällä. Tämän suorittamiseksi olennaisesti sileäpintainen kiinteä kantaja kastetaan sinänsä tunnetulla tavalla nesteen pinnalla olevan tiivistä yhteenpuristuneen yksimolekyylikerroksen lävitse, jolloin tämä kerros siirtyy kantajalle.

Viemällä kantaja nesteeseen ja poistamalla se nesteestä useita kertoja voidaan näin valmistaa useampikerroksisia systeemejä. Nesteen pinnalla oleva kerros voidaan jokaisen kastamisen jälkeen vaihtaa, joten kantajalle voidaan näin valmistaa erilaisia kerrosjaksoja.

Kantaja voidaan viedä nesteeseen ja poistaa siitä nestepinnan suhteen pystysuorassa tai vinossa asennossa. Lisäksi Langmuir-Schäfer-tekniikan mukaisesti kantaja voidaan saattaa kosketuksiin nestepinnan kanssa myös yhdessä kohdassa tai reunaltaan ja sitten laskea nesteen pinnalle. Lopuksi on myös mahdollista laskea kantaja nesteen pinnan kanssa samansuuntaisesti ("horizontal dipping").

Siirto suoritetaan lämpötilassa 5 - 40 °C, edullisesti huoneenlämpötilassa. Nämä järjestyt LB-kalvot voivat koostua pienimolekyyllisistä ja/tai polymeerisistä amfifiileista, edullisesti polymeerisistä amfifiileista, ja ne
5 voivat sisältää kovalenttisesti sidottuja fluoresenssikromoforeja/väriaineita ja/tai amfifiilisiä fluoresenssikromoforeja/väriaineita, joista seuraavassa käytetään merkin-
tää F_1 .

Edelleen nämä LB-kalvot sisältävät tai niihin on
10 kovalenttisesti sitoutunut reseptoreiksi funktionaalisia molekyyliä, esimerkiksi glykolipidejä, poly- ja oligonukleotideja, proteiineja tai niiden fragmentteja, hapteneja ym. Näihin reseptorimolekyyliin voi sitten tapahtua sellaisen niille komplementaarisen molekyylin eli ligandin,
15 kuten lektiinin, antigeenin, vasta-aineen jne. spesifinen sitoutuminen, joka ligandi on värjätty toisella fluoresenssiväriaineella F_2 , joka sopii energiansiirtoon F_1 :een. Siinä tapauksessa, että reseptorimolekyyli ja li-
gandi sitoutuvat keskenään, F_1 :n ja F_2 :n välillä tulee olla
20 ns. Förster-etäisyys, jollainen on tarpeen edellä kuvatussa energiansiirrossa. Tämä edellytys toteutetaan käyttämällä LB-tekniikkaa, jonka avulla voidaan toteuttaa pää-
määränä oleva molekyyliarkkitehtuuri, erityisesti tässä kiinnostavalla dimensioalueella noin 10 - 100 Å. Jos edel-
25 lä kuvattua systeemiä nyt säteilytetään herätevalolla, jonka aallonpituus on λ_1 , niin voidaan havaita fluoresenssiväriaineen F_2 emittoima valo, jonka aallonpituus on λ_3 , mikä osoittaa, että F_2 :lla merkitty molekyyli on sitoutunut F_1 :llä varustetun sensorin pintaan. Aallonpituuden λ_1 omaa-
30 valla valolla herättäminen voi tapahtua siten, että LB-kalvossa oleva F_1 herätetään transmissiolla optisesti läpinäkyvän kantajan lävitse tai evanescent-wave-tekniikalla, kun optisesti läpinäkyvä kantaja toimii valonjohtime-
na, tai säteilyttämällä päältäpäin.

Kahden toisilleen komplementaarisen molekyylin välinen spesifinen vuorovaikutus on alalla tunnettu edellä mainitun laatuisten biologisesti, biokemiallisesti ja erityisesti lääketieteellisesti (fysiologisesti) merkittävien molekyylien yhteydessä. Tällaiset vuorovaikutukset perustuvat viimekädessä ionisidoksiin, vetysiltojen muodostumiseen ja van der Waalsin voimiin, jotka kuitenkin edellä mainittujen molekyylien tapauksessa vaikuttavat vain erityisissä kolmiulotteisissa (steerisissä) olosuhteissa (avain-lukko-teoria). Keksinnön mukaista optista biosensoria voidaan tietenkin käyttää myös sellaisten spesifisten vuorovaikutusten toteamiseen, joissa ei ole näitä erityisiä kolmiulotteisia olosuhteita; tällainen käyttö on tärkeää varsinkin keksinnön mukaisen optisen biosensorin toimintakykyä, mittaustarkkuutta ja muita ominaisuuksia testattaessa.

Näin kuvattu sensorirakenne ei tällöin ainoastaan pysty osoittamaan liuoksessa olevaa analyyttiä, joka on merkitty fluoresenssiväriaineella F_2 , vaan sensorirakennetta voidaan myös käyttää kilpailevalla toimintatavalla osoittamaan analyyttiä, jota ei ole merkitty fluoresenssiväriaineella. Tällöin sensoria valmistettaessa LB-kalvossa olevien funktionaalisten molekyylien spesifisesti sitovat kohdat kyllästetään fluoresenssimerkityillä, komplementaarisesti sitoutuvilla molekyyleillä. Kun herätys tällöin suoritetaan valolla, jonka aallonpituus on λ_1 , havaitaan maksimaalinen fluoresenssiemissio, jonka aallonpituus on λ_3 ja jonka voidaan tietyn ajan kuluessa havaita heikkenevän, kun sensorin ollessa kosketuksissa tutkittavan liuoksen kanssa fluoresenssimerkittömät komplementaarisesti sitovat molekyylit tasapainoreaktiossa syrjäyttävät samaa tyyppiä olevat F_2 :lla fluoresenssimerkityt, komplementaarisesti sitoutuvat molekyylit.

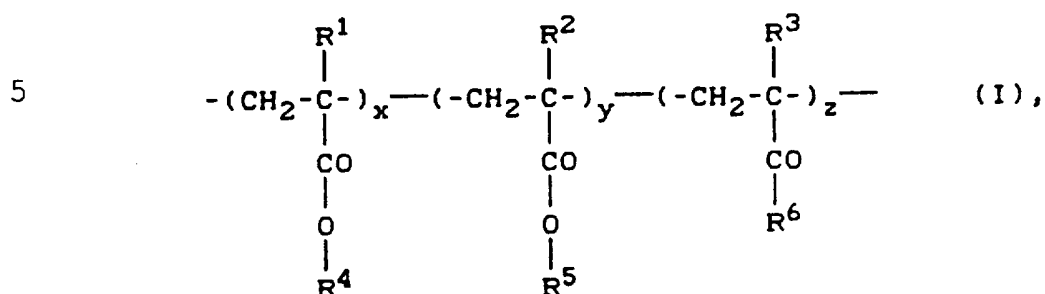
LB-kalvojen valmistamiseen käytetään amfifiilisiä molekyylejä, so. molekyylejä, joissa on hydrofiilinen pää

("pää") ja hydrofobinen pää ("häntä"). Tällaiset amfifiiliset molekyylit voivat olla pienimolekyyllisiä yhdisteitä, joiden molekyylipaino on jopa noin 2 000 g/mol. Toisessa vaihtoehdossa nämä pienimolekyylliset amfifiilit voivat sisälttää polymeroitumiskykyisiä tai polykondensaatioon tai polyadditioon pystyviä funktionaalisia ryhmiä, jolloin nämä amfifiilit voivat LB-kalvossa tapahtuvassa jälki-reaktiossa liittyä yhteen suurimolekyylliseksi yhdisteiksi sen jälkeen, kun LB-kalvo on muodostettu pienimolekyyllisistä amfifiileista. Tämä jälkireaktio suurimolekyylliseksi yhdisteiksi on edullinen, koska polymeerisistä amfifiileista koostuvilla LB-kalvot ovat paremmin lämpöä ja mekaanista kulutusta kestäviä.

Erityisen edullisesti LB-kalvoja voidaan valmistaa amfifiilisistä polymeereista siten, että amfifiiliset yksiköt liitetään yhteen ennen kuin nämä tunnetulla tavalla levitetään yksimolekyylikerroksiksi nesteen pinnalle. Käyttämällä tällaisia esipolymeroituja amfifiilisiä polymeereja vältetään LB-kalvossa jälkikäteen tapahtuvan polymeroitumisen aiheuttama jo valmistetun järjestystilan mahdollinen vaurio.

Keksinnön mukaiseen optiseen biosensoriin sopivista polymeerisistä amfifiileista esimerkkejä ovat α -olefiini-maleiinihappoanhydridi-kopolymeerit (British Polymer Journal 17 (1985), alkaen s. 368; J. Macromol. Sci. Phys. B 23 (1985), 549 - 573), polyoktadekyylietakrylaatti, polyvinyylistearaatti (J. Coll. Interface Sci. 86 (1982), 485), polyvinyylifosfolipidit (Angew. Chem. 100 (1988), 117 - 162), selluloosatristearaatti, amfifiiliset polyamidit (DE-hakemusjulkaisu 3 830 325) ja akryyliamidikopolymeerit. Stabiilien LB-kerrosten valmistukseen sopivat edullisesti DE-hakemusjulkaisun 3 827 438 mukaiset polyuretaanit ja DE-hakemusjulkaisun 3 830 862 mukaiset polyesterit. Polymeerisistä amfifiileista voidaan edelleen aivan erityisesti mainita seuraavaa tyyppiä olevat tilastolliset

poly(alkyylimetakrylaatti)-kopolymeerit, joiden koostumus voi vaihdella laajoissa rajoissa:



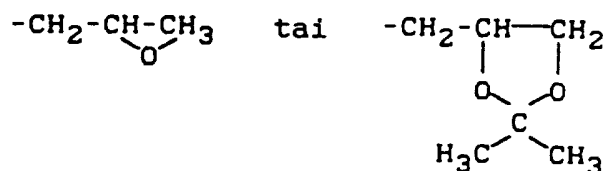
jossa

R^1 , R^2 ja R^3 tarkoittavat toisistaan riippumatta vetyä tai metyyliä,

R^4 on suoraketjuinen C_{14-22} -alkyyli,

R^5 on vety-, natrium- tai kaliumioni tai jokin ryhmistä

$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-tert.-butyyli}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$, $\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OH}$,



R^6 on jäljempänä esitetty alan ammattilaiselle tunnettu fluoresenssikromofori, ja

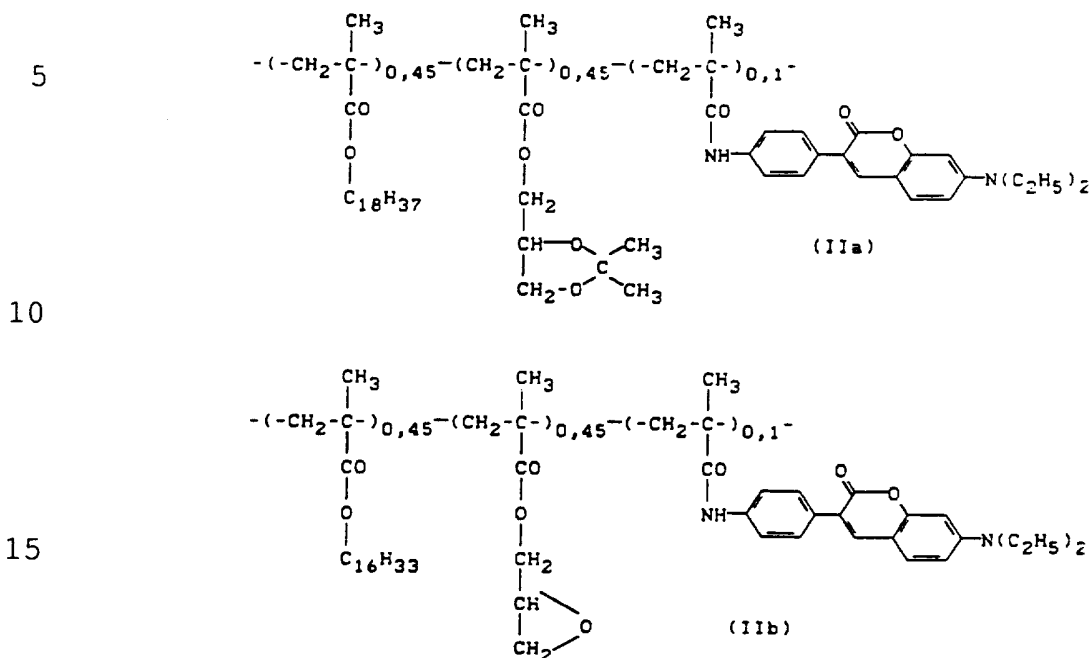
$x:n$ arvo on 0,2 - 1,

$y:n$ arvo on 0 - 0,8 ja

$z:n$ arvo 0 - 0,2, jolloin summa $x + y + z = 1$.

Edullisesti x ja y ovat suunnilleen samat.

Esimerkkejä kaavan (I) mukaisista polymeereista ovat seuraavat:



20 Tässä esimerkkeinä mainituissa yksi- ja monikerrok-

sisiin LB-kalvoihin käytetyissä aineissa on fluoresenssi-

kromofori liittynyt kovalenttisesti amfiifiiliseen polyme-

riin. Vaikka tämän järjestelyn ansiosta saadaankin F_1 :n

sisältäville LB-kerroksille mahdollisimman hyvä stabiili-

25 lisuus, niin on kuitenkin myös mahdollista muodostaa F_1 -pi-

toisia LB-kalvon kerroksia levittämällä samanaikaisesti

amfiifiilistä polymeeriä ja amfiifiilistä väriainetta veden

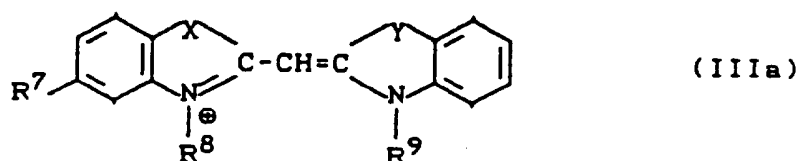
pinnalle ennen päällystystapahtumaa. Esimerkkejä tällai-

sista amfiifiilisista fluoresenssiväriaineista, joita voi-

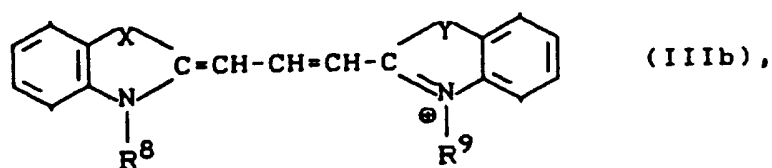
30 daan käyttää yhdessä sellaisten polymeerien kanssa, jotka

eivät sisällä kromoforeja, ovat seuraavia tyyppejä olevat

syaniiniväriaineet:



ja



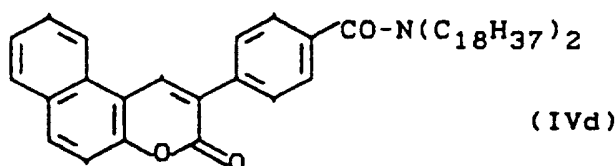
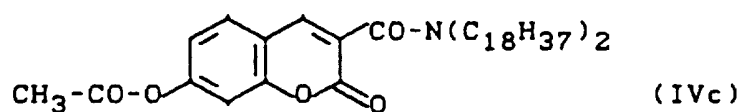
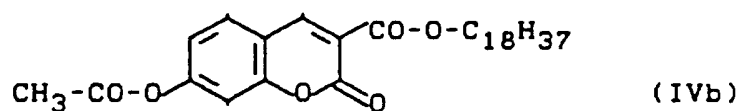
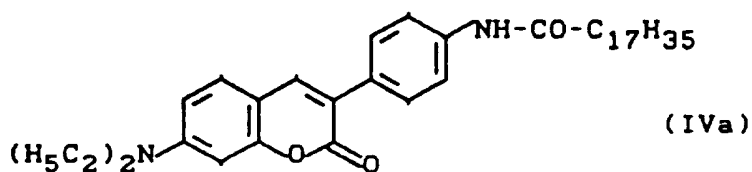
joissa

X ja Y tarkoittavat toisistaan riippumatta happea, rikkiä tai seleeniä tai ryhmää $C(CH_3)_2$,

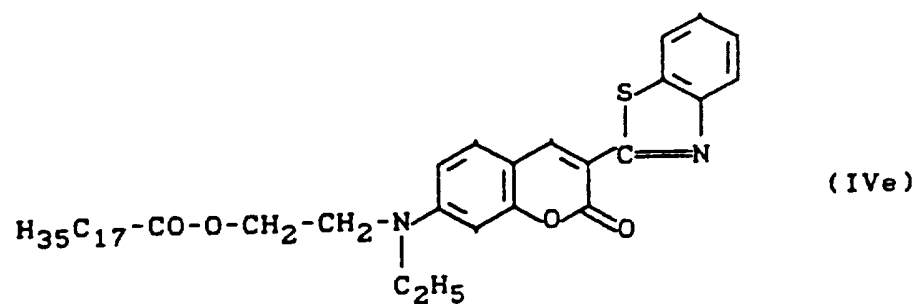
R^7 on vety tai metyyli ja

R^8 ja R^9 ovat toisistaan riippumatta suoraketjuisia C_{1-22} -alkyylejä.

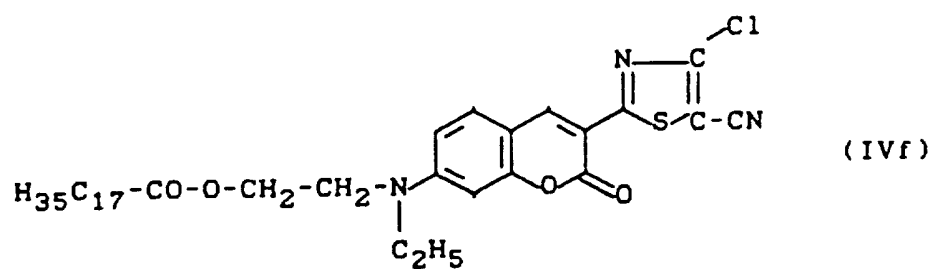
Muita esimerkkejä alalla hyvin tunnetuista keksinnön mukaiseen käyttöön soveltuvista fluoresenssiväriaineista ovat seuraavia tyyppejä olevat väriaineet:



5

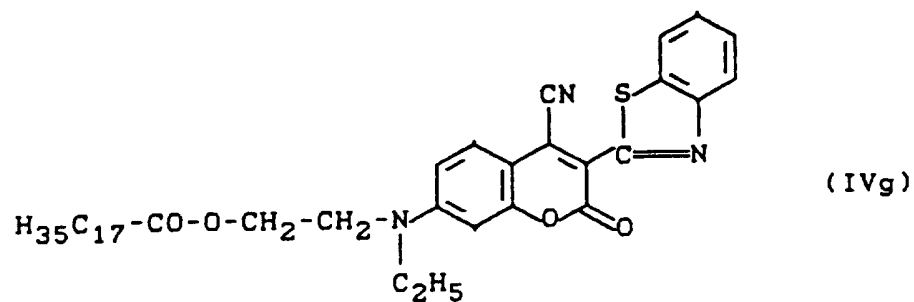


10

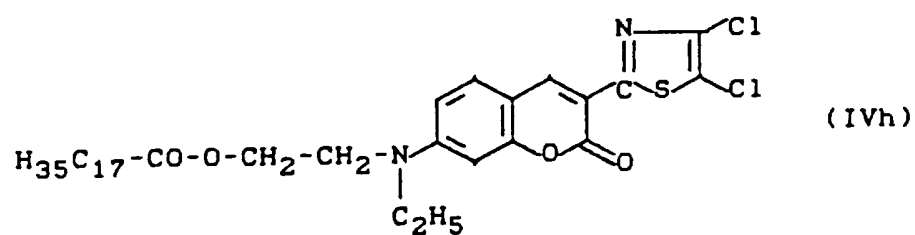


15

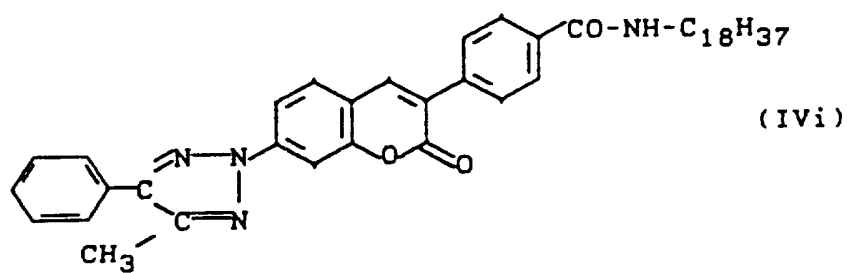
20



25

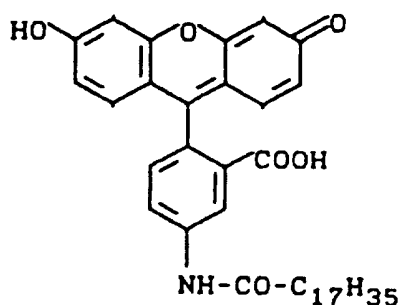


30



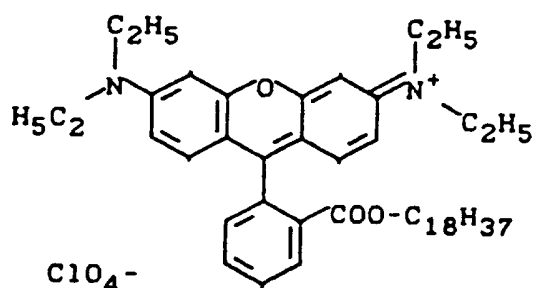
35

5



(IVj)

10

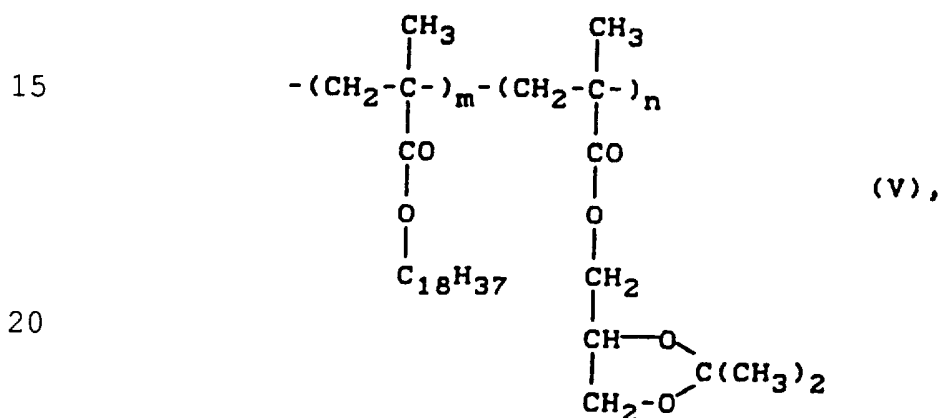


(IVk)

15

Tämä luettelo on esitetty vain esimerkkinä. Lisää amfifiilisiä fluoresenssiväriaineita on kuvattu monografiassa Physical Methods of Chemistry, vol. 1, osa 3B, alkaen s. 577; John Wiley, New York 1972. Kun tällaisia amfifiilisiä fluoresenssiväriaineita sisällytetään LB-kerrokseen, on huolehdittava siitä, että väriaine leviää tasaisesti koko kerrokseen. Siten on vältettävä yksittäisten kerrosten siirtämistä lämpötilasta riippuen (tyypillisesti 5 - 40 °C, edullisesti noin 20 °C) puristusolosuhteissa, joissa kalvot kulkevat alueen lävitse, jossa on samanaikaisesti kiinteäänaloginen ja nesteanaloginen faasi. Tämä on tärkeätä, koska amfifiilisen fluoresenssiväriaineen liukoisuus ei molempiin faaseihin tavallisesti ole sama ja siten muodostuu epähomogeenisia, sensorikäyttöön vähemmän sopivia kerroksia. Tämä ilmiö tunnetaan pienimolekyylisistä aineista valmistetuissa LB-kerroksissa (Angew. Chem. 100 (1988), 750); ja tämän ilmiön on havaittu esiintyvän myös polymeroiduilla fosfolipideillä (Polymer Sci. 267 (1989), 97 - 197).

Keksinnön mukaisten optisten biosensorien valmistuksessa havaittiin yllättäen, että kaavan (II) mukaisista polymeereista valmistetut LB-kerrokset puristettuina LB-kerroksen hajoamiseen asti (>45 mN/m), eivät ole taipuvaisia muodostamaan faasien erottumisalueita. Tämä pätee kaavan (II) mukaisten polymeerien ohella myös seokseen, joka sisältää kaavan (V) tyyppistä polymeeria ja väriainetta, esimerkiksi kaavan (IVa) mukaista väriainetta, jolloin kaavan (V) mukaista polymeerityyppiä voidaan pitää "matriisina", joka pystyy pitämään itsessään 0,1 - 25 mooli-% amfifiilistä väriainetta, jolloin mooliprosentin laskemisessa on otettu huomioon polymeerin toistuvat yksiköt:



jossa

m:n arvo on 0,25 - 1 ja

n:n arvo on 1 - m.

Edullisesti m on 0,4 - 0,6.

Näin valmistetut LB-kerrokset ovat sekä veden päällä olevana faasina että siirrettyinä kiinteälle kantajalle valomikroskooppisesti homogeenisia kerroksia ilman virheitä ja sopivat erityisen hyvin keksinnön mukaisiin biosensoreihin.

Kuitenkin myös systeemeillä, joissa on erottuneet faasialueet, voidaan saavuttaa keksinnön mukaisen optisen biosensorin suuri herkkyys, kun donorina LB-kerroksissa käytetään fluoresenssiväriaineita F_1 , jotka erityisten

ominaisuuksiensa ansiosta muodostavat aggregaatteja, joilla on fluoresenssispektroskooppisia ominaisuuksia, jotka eroavat huomattavasti monomeerisen väriaineen ominaisuuksista ja joille ovat yleensä ominaisia vastaavasti terävämmät ja voimakkaammat absorptiojuovat ja vastaavasti terävämmät ja voimakkaammat fluoresenssi-emissiojuovat. Tällaiset aggregaatit ovat alalla tunnettuja J-aggregaateina tai levyaggregaateina (Physical Methods of Chemistry, vol. 1, os 3B, s. 579, John Wiley, New York 1972). Eriyisten ominaisuuksiensa ansiosta tällaisilla J-aggregaateilla voidaan saada toisaalta erittäin korkea väriaineen tiheys LB-kalvoissa ja toisaalta aallonpituudeltaan λ_1 :n valon vahvan absorption ansiosta suuri energiatiheys, joka Försterin teorian mukaan voidaan siirtää vastaaville molekyyleille F_2 . Emissiojuovien vähäisen puoliarvoleveys merkitsee sekä mittasignaalin vahvistumista että häirintäsäteily vähentymistä, koska emissioiden F_1 ja F_2 päällekkäisyys on pienempi.

Fluoresenssiväriaineita, jotka pystyvät muodostamaan J-aggregaatteja LB-kalvoissa, on kuvattu edellä mainitussa kirjallisuudessa. Esimerkkeinä mainittakoon syaaniväriaineet ja merosyaniinit.

Funktionaalisten molekyylien liittäminen fluoresenssiväriainetta sisältävään LB-kalvoon, voidaan suorittaa erilaisin menetelmin:

- Funktionaalinen molekyyli voi olla kovalenttisesti, mahdollisesti spacer-molekyylien avulla, liittynyt LB-kalvoon, jolloin se voi olla liittynyt jo alussa levitetäessä kerros veden pinnalle tai se voidaan liittää jälkikäteen kytkentäreaktiolla LB-kerrokseen joko subfaasiin tai sitten, kun LB-kerros on viety kiinteälle kantajalle.
- Funktionaalinen molekyyli voidaan amfifiilina levittää samanaikaisesti ja siten fysikaalisesti "ankkurin" avulla sitoa LB-kerrokseen.

Molemmat liittämistavat ovat kirjallisuudesta tunnettuja menetelmiä. Biologisesti funktionaalisten ryhmien liittäminen kiinteällä kantajalla oleviin LB-kerrokseen voi tapahtua analogisesti biokemiasta tunnettujen immobilisointimenetelmien kanssa (Methods in Enzymology, vol. 135 ja vol. 136 (1987)). DE-hakemusjulkaisussa 3 546 150 on mainittu laaja valikoima pitkiä alkyyliketjuja sisältäviä molekyylejä membraaniansinkuri-tehoainekonjugaatteina, ja niitä voidaan sisällyttää LB-kalvoon yhteislevityksellä subfaasille. Esimerkkeinä tällaisista amfifiilisistä funktionaalisista molekyyleistä voidaan mainita glykolipidit, esimerkiksi keramidi. Muita esimerkkejä ovat vasta-aine/antigeenisysteemit sekä komplementaariset nukleotidisekvenssit. Tällaisia esimerkkejä tunnetaan alalla runsaasti (Angew. Chem. 100 (1988), 117 - 162).

Ratkaisevaa sensorisysteemin herkkyyden parantamisen kannalta on mahdollisimman korkea suhde $F_1:F_2$ "Förster-säteen" sisäpuolella ja siten vastaavasti vahvistunut F_2 :lla merkityn molekyylin fluoresenssisignaali, kun sitoutuminen F_1 :llä varustettuun pintaan on tapahtunut. Siten on edullista viedä mahdollisimman paljon F_1 -kromoforeja ylempiin LB-kalvon kerrokseen, varsinkin neljään ylimpään kerrokseen. Erityisen edullisesti väriaine F_1 sisältyy ainakin toiseen kahdesta ylimmästä kerroksesta.

Vaikka fluoresenssispektroskopiassa tavallisesti käytetään fluoresenssiväriaineen alle 1 %:n konsentraatioita, jotta vältettäisiin yksittäisten väriainemolekyylien vuorovaikutus ja sen aiheuttamat muutokset fluoresenssikäyttäytymisessä, niin keksinnön mukaisessa optisessa biosensorissa on kuitenkin edullista käyttää fluoresenssiväriainetta F_1 suurena konsentraationa LB-kerroksissa. Varsinkin polymeeristen amfifiilisten fluoresenssiväriaineiden taipumus itsesammumiseen ja eksimeerien muodostukseen on pienempi, kun väriainekonsentraatio on 0,1 - 25 mooli-%. Sama konsentraatioalue on myös osoittautunut

edulliseksi tapauksessa, jossa eristettyjen kromoforien tulee olla tasaisesti jakautuneina LB-kerroksessa. Varsinkin levy-aggregaattien tapauksessa kromoforien assosioituminen on sen sijaan toivottua. Assosioituminen tapahtuu edullisesti väriainekonsentraatioissa yli 25 mooli-%, aina 100 mooli-%:iin asti (ilman polymeerimatriisia).

Keksinnön mukaisella optisella biosensorilla on edelleen etuna, että kiinteän faasin kerrokseen viedyistä funktionaalisista molekyyleistä riippumatta energiansiirron periaatteen vaatima väriaine F_1 valittuna vapaasti laajoilta spektrialueilta voidaan viedä LB-kerrokseen. Tämä tarkoittaa toisaalta, ettei funktionaalisen molekyylin tarvitse olla spesifisesti merkitty F_1 :llä ja toisaalta että F_1 :n spektrialue voidaan valita siten, että se on optimaalinen energiansiirrolle merkitsemiseen käytetylle väriaineelle F_2 . Esimerkkejä pareista ovat:

	F_1	F_2
	a) Polymeeri (IIa)	TRITC
20	b) Syaniini (IIIb), jossa $X = Y = O$, $R^7 = H$, $R^8 = R^9 = C_{18}H_{37}$	TRITC tai FITC
	c) Syaniini (IIIa), jossa $X = Se$, $Y = S$, 25 $R^7 = CH_3$, $R^8 = R^9 = C_{18}H_{37}$	FITC tai TRITC

TRITC = tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti

FITC = fluoreseiini-isotiosyanaatti.

30 Keksinnön mukaisessa optisessa biosensorissa saadaan fluoresenssispektroskooppisen analyysin herkkyys paraneamaan, kuten edellä kuvattiin, viemällä LB-kerrokseen väriainetta F_1 mahdollisimman suurena konsentraationa, jolloin useampia molekyylejä F_1 joutuu energiansiirron kannalta alustalle sidotulle molekyylille F_2 välttämättömän

"Förster-säteen" alueelle. Tämä rakenne, jossa LB-kerrossysteemissä on mahdollisimman suuri väriaineen F_1 tiheys reseptorimolekyylin vieressä, tekee mahdolliseksi tähän asti tunnetuista energiansiirtoon perustuvista määritysmenetelmistä poiketen käyttää paljon edullisemmin hyödyksi tätä mittaustapaa ja saavuttaa siten selvästi suurempi herkkyys, koska reseptorimolekyyliä kohti voi olla läsnä paljon suurempi lukumäärä väriainemolekyyliä kuin reseptorimolekyylin suorassa fluoresenssimerkitsemisessä.

10 Kaikkien F_2 :n Förster-säteen alueella olevien väriainemolekyylien F_1 hyväksikäytöstä seuraa, että ratkaisevaa merkitystä ei ole ainoastaan F_1 :n lateraalisella jakautumisella ylimmissä LB-kerroksissa, vaan myös F_1 :n konsentraatiolla niiden alapuolella olevissa kerroksissa. Tästä
15 syystä kerrosten mittauspaksuus rajoittuu periaatteessa noin 100 Å:n vaikuttavaan kerrospaksuuteen, sillä tämän alapuolella olevat molekyylit F_1 eivät herätevalon vaikutuksesta enää voi siirtää energiaansa riittävässä määrin tällöin liian etäällä olevaan väriaineeseen F_2 , ja niiden
20 oma fluoresenssi (aallonpituus λ_2) häiritsisi huomattavasti havaittavaa signaalia, nimittäin energiansiirron aiheuttamaa väriaineen F_2 valoemissiota (aallonpituus λ_3) ja alentaishi tarpeettomasti määritysherkkyyttä.

Tästä syystä F_1 :tä sisältävien ohuiden kerrosten
25 (100 Å tai vähemmän) valmistukseen sopii pelkästään LB-kerrosteknologia ja kemisorptio. Ohutkerrosteknologiassa laajalti käytetty spin-coating-menetelmä aiheuttaa nimittäin erittäin ohuita kerrospaksuuksia (200 - 500 Å) valmistettaessa ongelmia. Verrattuna ohuiden kerrosten muo-
30 dostamiseen kemisorption avulla LB-tekniikan etuna on se, että kerrosten koostumus voidaan määrätä erittäin tarkasti, millä on ratkaiseva merkitys sensorien toisinnettavien pintojen valmistuksen kannalta.

Donoriväriaine F_1 ja jo mainitut biomolekyylin si-
35 tomiseen tarkoitettut aktiiviset kohdat voivat tällöin olla

toistensa päällä olevissa LB-kalvon eri kerroksissa. Sensoriperiaatteen kannalta vaikuttavien LB-kalvon kerrosten kokonaisluku on alueella 1 - 10.

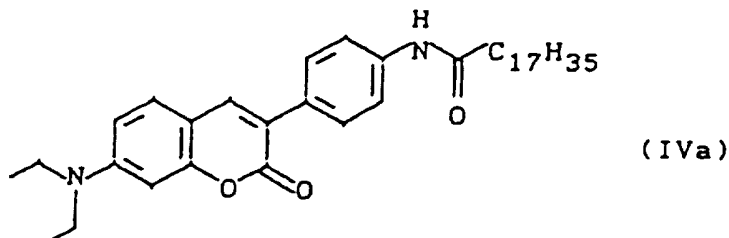
Keksinnön mukaiseen optiseen biosensoriin kuuluu lisäksi liikkuvia, fluoresoivia molekyylejä, jotka sisältävät väriainekomponentin F_2 ja jotka sitoutuvat reversiibelisti reseptorimolekyyleihin, jotka on ankkuroitu kiinteästi LB-kerrokseen. Ainoastaan yksinkertaisimmassa tapauksessa, nimittäin itsessään fluoresoivan ja siten F_2 :na vaikuttavan analyytin määrittämisessä, tämä komponentti ei ole tarpeen, koska F_2 ja ligandi ovat identtiset ja muodostavat analyytin. Toisaalta LB-kerroksella olevien reseptorimolekyylien sidontakohdat voivat olla kyllästettyjä analyyttimolekyylin fluoresenssimerkityillä johdannaisilla tai analogeilla, jotka sitten kosketuksissa näyteliuoksen kanssa voivat syrjäytyä analyytin kilpailevan vaikutuksen johdosta. Toisaalta mahdollinen on kuitenkin myös sandwich-immunoanalyysi, jossa toista laatua olevat reseptorimolekyylit, esimerkiksi vasta-aineet, jotka eivät ole osallisina ensimmäisen reseptorimolekyylin sidonnassa, sitoutuvat joko ensimmäisen reseptorimolekyylin ja analyytin muodostamaan kompleksiin tai analyytin molekyylialueeseen. Nämä kiintofaasi-immunoanalyysit kuuluvat periaatteessa tunnettuun tekniikan tasoon ja ne on esitetty esimerkiksi monografiassa: P. Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (R.H. Burdon, Ph.H. van Knippenberg, julkaisija) Elsevier, Amsterdam 1985.

Esimerkki 1

Amfifiilisen fluoresenssiväriaineen valmistus

7-dietyyliamino-3-(p-aminofenyyli)kumariinin (1,53 g, 5 mmol) ja trietyyliamiinin (0,61 g, 5 mmol) jäähauteessa jäähdytettävään seokseen 10 ml:ssa vedetöntä kloroformia tiputettiin 1,51 g (5 mmol) oktadekaanihappokloridia 5 ml:ssa vedetöntä kloroformia. Sekoittamista jatkettiin tunnin ajan 0 - 5 °C:ssa ja sitten 5 tuntia huo-

neenlämpötilassa. Reaktioseos pestiin ensin laimealla natriumhydroksidiliuoksella ja lopuksi vedellä. Raakatuote saostettiin kaksi kertaa kloroformista petrolieetterillä 60 - 70 °C.



Saatiin 64 %:n saannolla teoreettisesta yllä olevan kaavan mukaista tuotetta, sp. 159 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, int. TMS): δ = 7,66 - 6,52 (multipletti, aromaattiset protonit); 3,42 (-CH₂CH₃); 2,35 (-COCH₂C₁₆H₃₃) 1,22 (-CH₂CH₃); 1,7 - 0,8 (-COCH₂C₁₆H₃₃).

Analogisesti valmistettiin myös seuraavassa esitetyt kaavojen IVb - IVi mukaiset yhdisteet. Taulukkoon 1 on koottu joitakin spektroskooppisia tietoja.

Taulukko 1

Amfifiilisten väriaineiden spektroskooppisia tietoja

Kaava	Spektroskooppiset tiedot CH ₂ Cl ₂ :ssa		
IVa	406	476	70
IVe	528	549	21
IVf	475	511	36
IVg	531	585	54
IVh	460	495	35
IVi	368	452	84

Esimerkki 2**Polymeroituvan fluoresenssiväriaineen valmistus**

7-dietyyliamino-3-(p-aminofenyyl)kumariinin (1,53 g, 5 mmol) ja trietyyliamiinin (0,61 g, 5 mmol) jäähauteessa jäähdytettyyn seokseen 10 ml:ssa vedetöntä kloroformia tiputettiin 0,52 g (5 mmol) metyyliakryylihappokloridia 5 ml:ssa vedetöntä kloroformia. Reaktioseosta sekoitettiin tunnin ajan 0 - 5 °C:ssa ja sitten 5 tuntia huoneenlämpötilassa. Seos pestiin aluksi natriumhydroksidiliuoksella ja sitten suolavapaaksi vedellä ja haihdutettiin kuiviin.

Saanto: 1,6 g mikä vastaa jäljempänä esitetyn kaavan VIa mukaisen tuotteen teoreettista saantoa 86 %. Sp. 193 - 195 °C.

¹H-NMR (CDCl₃, int. TMS): δ = 9,43 (NH), 7,77 - 6,49 (multipletti, arom. protonit); 5,86 ja 5,47 (H₂C=); 3,44 (-CH₂CH₃); 2,04 (=C-CH₃); 1,22 (-CH₂CH₃).

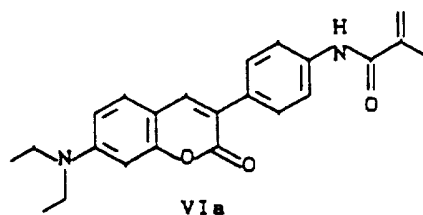
Analogisesti valmistettiin myös taulukossa 2 esitetyt yhdisteet VIb - VI f. Taulukkoon 2 on koottu joitakin spektroskooppisia tietoja.

Taulukko 2**Polymeroituvien fluoresenssiväriaineiden spektroskooppisia tietoja**

25

Kaava**Spektroskooppiset tiedot CH₂Cl₂:ssa**

30



Exc. max λ (nm)	Em. max λ (nm)	ΔStokes (nm)
--------------------	-------------------	-----------------

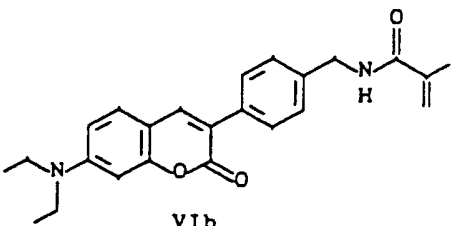
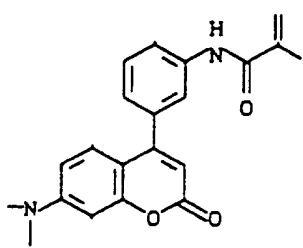
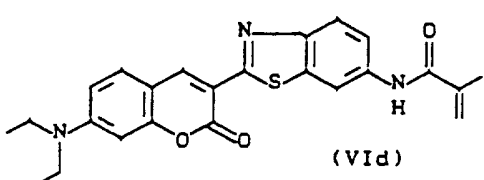
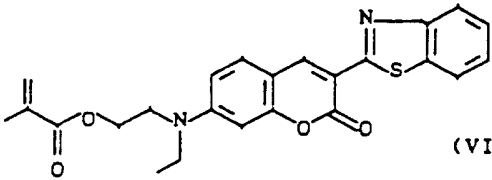
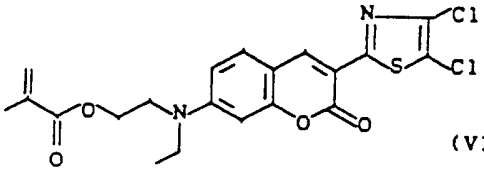
395

475

80

Taulukko 2 (jatkuu)

Polymeroituvien fluoresenssiväriaineiden spektroskooppisia tietoja

5	Kaava	Spektroskooppiset tiedot CH ₂ Cl ₂ :ssa		
		Exc. max λ (nm)	Em. max λ (nm)	ΔStokes (nm)
10	 VIb	401	475	74
15	 (VIc)		382	491 110
20				
25	 (VIId)	456	507	51
30	 (VIe)	528	546	17
35	 (VIf)	450	496	46

Esimerkki 3**Fluoresenssiväriainetta sisältävän polymeerin valmistus**

5 6,77 g (20 mmol) oktadekyylietakrylaattia, 4,00 g
(20 mmol) (2,2-dimetyyli-1,3-dioksolan-4-yyli)metyleenime-
takrylaattia ja 1,51 g (4 mmol) esimerkin 2 väriainemo-
nomeeria liuotettiin 90 ml:aan vedetöntä dioksaania,
liuokseen lisättiin 1,44 g (0,2 mol-%) atsobis(isobutyro-
10 nitriiliä) ja seos kuumennettiin sekoittaen 65 - 70
°C:seen, jossa lämpötilassa sitä pidettiin 16 tuntia.
Jäähtyneestä reaktioliuoksesta saostettiin polymeeri kaa-
tamalla liuos veteen. Polymeeri puhdistettiin liuottamalla
kloroformiin ja saostamalla metanolilla ja toistamalla
sama.

15 Saatiin 3,93 g kellanvihreätä polymeeria, joka ka-
rakterisoitiin geelisuodatukselle CH_2Cl_2 :ssa. Samanaikai-
sesti mitatut taitekerroin ja UV-spektri antoivat identti-
set molekyylipainojakaumakäyrät, joten fluoresenssiväri-
aineen jakautuminen tasaisesti polymeeriin oli taattu.
20 Polystyreenikalibroinnin suhteen saatiin laskennalliset
moolimassa-arvot $M_n = 64\ 000$ ja $M_w = 1\ 290\ 000$, mikä vastaa
epäyhtenäisyyttä 18,1.

Tämän yleisen valmistusreseptin mukaisesti valmis-
tettiin kaikki metakrylaattikopolymeerit.

25 Esimerkki 4**Fluoresenssiväriainetta sisältävän kerroselementin valmistus****a) Polymeeriväriaine**

30 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ -käsittelyllä puhdistettu, float-lasista
valmistettu aluslasi upotettiin 20 °C:ssa 30 mm:n syvyy-
teen Langmuir-kalvovaa'an (KSV 2 200) vesi-subfaasiin.
Veden pinnalle levitettiin 150 μl kaavan (IIa) mukaisen
yhdisteen liuosta kloroformissa (1 mg/ml). Kerrosta puris-
tettiin yhteen kunnes pintapaine oli 25 mN/m ja tämän jäl-
35 keen aluslasi päällystettiin perättäisillä kastamis- ja

nostotoimilla (kastamisnopeus 10 mm/min) polymeerin kolmella yksimolekyylikerroksella. Viimeinen kerros saatiin tällöin viimeisellä nostolla. Sitten aluslasi (kantaja) ilmakeivattiin. Kantajan toiselta puolelta puhdistettiin
5 väriainekerros pois kloroformilla.

b) Dispergoitua monomeerista väriainetta sisältävä polymeeri

Kaavan (IIa) mukaista väriainetta sisältävän polymeerin liuoksen sijasta käytettiin seosta, joka sisälsi
10 kaavan (V) mukaista polymeeria 1 mg/ml ja kaavan (IIIb, $X = Y = 0$, $n = 18$, $R^7 = H$, $R^8 = R^9 = C_{18}H_{37}$) mukaista amfifii-
listä väriainetta, 1 mg/ml, suhteessa 19:1.

c) Polymeeri, joka sisältää dispergoituna levyaggregaattia muodostavaa väriainetta

15 Päälystys suoritettiin seoksella, joka sisälsi kaavan (V) mukaista polymeeria ja kaavan (IIIb, $X = Se$, $Y = S$, $R^8 = R^9 = C_{18}H_{37}$, $R^2 = CH_3$) mukaista väriainetta 1 mg/ml, painosuhteessa 1:1.

Esimerkki 5a

20 **Fluoresenssiväriaineiden adsorptio kerroselementille ja fluoresenssi-energiansiirron havaitseminen**

Esimerkin 4 mukaisesti valmistettu kerroselementti kastettiin 5 minuutin ajaksi fluoreseiiniliuokseen (10^{-7} mol/l) fosfaattipuskuriin, pH 7,0. Fluoresenssispektri
25 otettiin ennen koetta ja sen jälkeen. Emissiospektri siirtyi fluoreseiinin maksimiin.

Esimerkki 5b

Fluoresenssiväriainetta sisältävän kerroselementin valmistus

30 Lasikantaja puhdistettiin ultraäänikäsittelyllä pesuaineen vesiliuoksessa ja sitten ultraäänikäsittelyllä puhtaassa vedessä ja edelleen ultraäänikäsittelyllä (5 min) noin $5 \cdot 10^{-2}$ N NaOH-liuoksessa ja sen jälkeen suihkut-
tamalla 5 atm:n paineella puhdasta vettä, kuivattiin ja
35 hydrofoboitiin sitten eksikkaattorissa antamalla heksame-

tyylisilatsaanin vaikuttaa 30 minuuttia 60 °C:ssa vesi-suihkupumppuvakuuissa. Tämän käsittelyn jälkeen lasikantaja kastettiin lyhyesti veteen ja imettiin vedestä ottamisen jälkeen huolellisesti kuivaksi. Tälle kantajalle muodostettiin LB-tekniikalla kastamalla ja ylösottamalla 5 kaksi kadmiumarakidaattikerrosta.

Tämän jälkeen muodostettu fluoresenssiväriaineen (VII = IIIa, jossa $X = Y = 0$, $R^7 = H$, $R^8 = R^9 = C_{18}H_{37}$) kerros valmistettiin ja levitettiin erilaisin järjestelmin: 10 i) väriaineen monomeereina ja ii) väriaineen levyaggregaattina (J-aggregaatti).

i) Väriaineen (VII) monomeerit

Valmistettiin yksimolekyylikerros levittämällä veden pinnalle liuos, joka sisälsi väriainetta (VII), metyyliarakidaattia, arakiinihappoa ja heksadekaania moolisuhteessa 1:2:18:20 kloroformissa. 15

ii) Väriaineen (VII) levyaggregaatti

Valmistettiin yksimolekyylikerros levittämällä veden pinnalle liuos, joka sisälsi väriainetta (VII) ja heksadekaania moolisuhteessa 1:1 kloroformissa. 20

Seuraava valmistus on identtinen monomeereille ja levyaggregaatille. Kerros puristettiin puristusarvoon 20 mN/m ja pidettiin tässä puristuksessa 10 minuuttia, sitten kantajalle siirrettiin kerros saattamalla kantaja lähes vaakatasossa kosketuksiin yksimolekyylikerroksen kanssa. 25 Kantaja upotettiin sitten kokonaan veteen, jäljellä oleva väriainekalvo poistettiin ja sitten muodostettiin steariinihapon yksimolekyylikerros levittämällä steariinihapon 10^{-3} N kloroformiliuos veden pinnalle ja puristamalla arvoon 20 mN/m. Kantaja päällystettiin sitten steariinihappokerroksella nostamalla se pystysuorassa asennossa vedestä. Lopuksi kantaja päällystettiin sekakerroksella, joka sisälsi dioktadekyyliidimetyyliammoniumbromidia ja metyylistearaattia moolisuhteessa 1:1, saattamalla kantaja lähes vaakasuorassa asennossa kosketuksiin tämän sekakerrok- 35

sen kanssa ja kastamalla sitten täydellisesti ja valmistamalla veden alla alalla tunnetulla tavalla (katso P. Fromherz, Biochim. Biophys. Acta. 323 (1973) 326 - 334) kyvetirungon kanssa fluoresenssikyvetti.

5

Esimerkki 5c

Vaihtamalla vesiväliaine ilman kerroselementin pinnan puhaltamista saatettiin esimerkin 5b mukaisesti valmistettu kerroselementti kosketuksiin analyytin (VIII) (kaava esitetty esimerkin lopussa) vesipitoisen liuoksen kanssa 10^{-4} N fosfaattipuskurissa, pH = 7,0. Väriaineen sitoutumisen johdosta kerroselementin pintaan levyaggregaatin tapauksessa (VII):n fluoresenssi-intensiteetti alenee riippuen analyytin konsentraatiosta läheisessä liuoksessa ja ajasta, joka on kulunut kosketuksen alun jälkeen. Kun (VIII):n liuos on 10^{-7} N, emission intensiteetti 404 nm aallonpituudessa herätteellä 366 nm on 90 minuutin kuluttua 33 % intensiteetistä ilman (VIII):aa, ja 10^{-10} N liuoksen tapauksessa se on 85 %.

Odotusten mukaisesti havaitaan tämän heikkenemisvaikutuksen selvä etäisyysriippuvuus, kun muodostamalla kadmiumstearaattikaksoiskerros steariinihappokerroksen väliin, joka on kosketuksissa väriainekerroksen kanssa, suurennetaan etäisyyttä kerroselementin pinnasta. Levyaggregaatin emission intensiteetti aallonpituudella 404 nm on (VIII):n 10^{-7} N liuoksella silloin 90 % ilman (VIII):a saadusta intensiteetin arvosta.

Analyytin (VIII) sitoutuminen kerroselementin pintaan voidaan myös osoittaa mittaamalla fluoresenssi aallonpituudella 510 nm. Suora heräte (analyytin emissio) on mahdollinen aallonpituudella 470 nm, kun sen sijaan (VII):n heräte ja sitä seuraava energiansiirto johtaa analyytin maksimaaliseen emissioon, jos se tapahtuu aallonpituudella 366 nm (monomeerit) tai vastaavasti 402 nm (levyaggregaatti). Fluoresenssi-intensiteettien suhde aallonpituudella 510 nm epäsuoran herätteen ja energiansiirron

(I_{VIII}) jälkeen ja sidotun analyytin suoran herätesäteilytyksen (I_A) jälkeen on vahvistustekijä ja se voidaan määrittää emission herätespektristä aallonpituudella 510 nm. Tulokseksi saadaan

5 a) monomeereille:

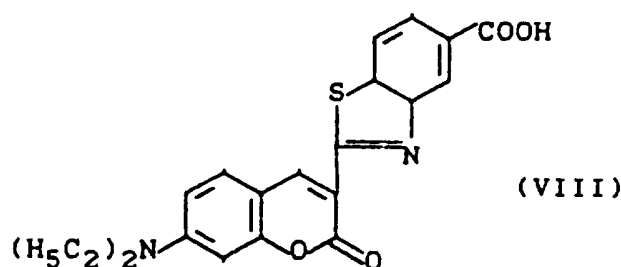
$$I_{VII}/I_A = (VIII):n \cdot 10^{-7} \text{ M liuoksella}$$

$$I_{VII}/I_A = 35 (VIII):n \cdot 10^{-8} \text{ M liuoksella}$$

b) levyaggregaatille:

$$I_{VII}/I_A = 380 (VIII):n \cdot 10^{-8} \text{ M liuoksella}$$

10



15

Esimerkki 6

Fluoresenssimerkityn proteiinin adsorptio kerrosolementtiin ja fluoresenssienergiansiirron havaitseminen

20

Esimerkissä 4 valmistetulle kerrosolementille tiputettiin 50 µl tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatilla (TRITC) merkityn lektiini-konkanavaliini A:n liuosta (1 mg/ml) ja päälle painettiin toinen käsittelemätön samankokoinen aluslasi siten, että neste jakautui tasaisesti ja ilman ilmakuplia Langmuir-Blodgett (LB)-kerrokselle. Tunnin vaikutusajan jälkeen molemmat lasit erotettiin ja päällystetty lasi pestiin 3 kertaa vesipitoisella fosfaattipuskurilla (10 mmol/l) pH 6,8. Tämän jälkeen mitattiin fluoresenssispektri ja sitä verrattiin proteiinilla käsittelemättömän kerrosolementin fluoresenssispektriin. Voitiin havaita lisänä TRITC-emission herätejuovaspektri. Kun väriainetta sisältävälle LB-kerrokselle muodostettiin 2 - 6 väriainetta sisältämätöntä kerrosta, niin tämän herätejuovaspektrin intensiteetti aleni kerrospaksuudesta riippuen

35 aina nolnaan asti.

Esimerkki 7 (vertailuesimerkki)

Kerroselementtien valmistus vaihtoehtoisella tekniikalla

a) Sivelytekniikka

5 50 µl polymeerin (IIa) liuosta (1 mg/ml) kloroformissa pantiin aluslasille. Toisen aluslasin avulla väriaineliuos levitettiin mahdollisimman tasaisesti ensimmäiselle aluslasille. Tälle väriainekerrokselle adsorboitiin
10 esimerkissä 6 kuvatulla tavalla 50 µl TRITC-ConA-liuosta ja fluoresenssi mitattiin. Erittäin intensiivisen (IIa):n herätejuovaspektrin ohella TRITC:in fluoresenssia ei voitu yksiselitteisesti osoittaa.

b) Lakanlinkoamistekniikka (spin-coating)

 0,0193 - 0,244mg polymeeria (IIa) liuotettiin
15 0,25 - 1,5 ml:aan kloroformia tai dimetyyliformamidia ja levitettiin spin-coaterin avulla puhdistetulle 10 cm:n läpimittaiselle lasikantajalle. Saatujen lasilevyjen fluoresenssimittaukset osoittivat väriainetiheyden olevan erittäin epätasaisesti jakautuneena, joten minkäänlaiset
20 energiansiirtomittaukset eivät olleet mahdollisia.

Esimerkki 8

Förster-energiansiirtosysteemin rajaherkkyuden mitaus

 Esimerkin 4 mukaisesti valmistettu kerroselementti
25 (donori-väriaine) päällystettiin lisäksi ensin 2 kerroksella polymeeria (V), sitten yhdellä kerroksella polymeeria (V), johon oli sekoitettu määritelty määrä amfifiilistä väriainetta. Tällä kerroselementillä mitattiin fluoresenssi. Vaihtelemalla akseptoriväriaineen määrää voitiin
30 määrittää se rajakonsentraatio, jolla tämän substanssin fluoresenssi oli juuri vielä havaittavissa. Seuraavassa taulukossa on esitetty nämä erilaisilla systeemeillä saadut arvot:

	Donoriväriaine	Akseptoriväriaine	Rajakonsentraatio
			[10^{-15} mol/mm ²]
	kaavan 4a mukainen	(C ₁₈ -rodamiini)	3
	kaavan 4b mukainen		0,3
5	kaavan 4c mukainen		0,3
	kaavan 4c mukainen	(C ₁₈ -aminofluoreseiini)	3

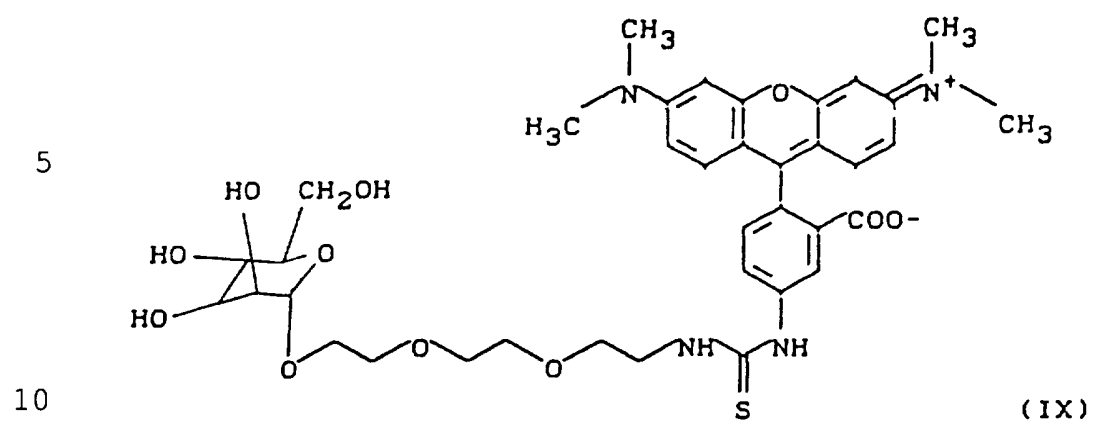
Esimerkki 9

Mannosidin spesifinen sitoutuminen konkanavaliini

10 A:han (Con A)

Analogisesti esimerkin 4 kanssa valmistettiin kerroselementti siirtämällä seos-yksimolekyylikerros, joka koostui kaavan (IIa) mukaisesta yhdisteestä ja sukkinimidyylistearaatista painosuhteessa 95:5. Tämän jälkeen merkitsemättömän konkanavaliini A:n liuokseen (1 mg/ml liuotettuna 0,01 mol/l fosfaattipuskuriin pH 6,8 yhdessä 1 mmol/l CaCl₂:n, 1 mmol/l MnCl₂:n ja 0,01 % Triton X-100:n kanssa) annettiin vaikuttaa tunnin ajan huoneenlämpötilassa (vrt. esimerkki 6). Elementti pestiin 0,5 ml:lla samaa puskuria. Sitten kerroselementille vietiin 50 µl TRITC-mannosidin (IX) liuosta (0,1 mg/ml liuotettuna samaan puskuriin) ja kerroselementti paljastettiin jälleen. Kontrollikokeessa käytettiin Con A:n sijasta yhtä suurta määrää naudan seerumialbumiinia.

25 Molempien kerroselementtien fluoresenssispektrien vertailu osoitti, että käyttämällä Con A:ta rodamiiniemissio aallonpituudella 580 nm (IX:stä) oli noin 5 kertaa vahvempi kuin kumariinin spektri aallonpituudella 495 (IIa:sta). Käytettäessä naudan seerumialbumiinia rodamiiniemissiota voitiin havaita tuskin lainkaan (alle 1/20), verrattuna tässä tapauksessa vahvaan kumariiniemissioon.



Patenttivaatimukset

1. Fluoresenssienergiansiirtoon perustuva biosensori, joka koostuu seuraavista:

- 5 a) kiinteä kantaja,
 b) kantajalle a) valmistettu yksi- tai useampikerroksinen Langmuir-Blodgett (LB)-kalvo,

 c) ainakin yksi fluoresenssiväri F_1 , joka sisältyy vähintään yhteen LB-kalvon neljästä ylimmästä kerroksesta,

- 10 d) ligandimolekyylin kanssa spesifiseen vuorovaikutukseen kykenevä reseptorimolekyyli, joka on sidottu LB-kalvon ylimpään kerrokseen tai sovitettu sille, ja

- e) liikkuva fluoresenssiväriaine F_2 , jonka herätejuovaspektri peittyy F_1 :n emissiojuovaspektrillä energiansiirtoon riittävästi ja joka

- 15 e1) on kovalenttisesti sidottu ligandiin, joka pysyy sitoutumaan reseptorimolekyyliin, tai

- e2) on kovalenttisesti sidottu toiseen reseptorimolekyyliin, joka pystyy sitoutumaan ensimmäisen reseptorimolekyylin ja ligandin muodostamaan kompleksiin,

- 20 jolloin ligandi tai vastaavasti ligandi ja toinen reseptorimolekyyli eivät aluksi ole sidottuja LB-kerrokseen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
25 t u n n e t t u siitä, että käytetty kiinteä kantaja koostuu lasista, kvartsilasista, Li-niobaatista, sinkkiseleenidistä, posliinista, puolijohteista, kuten germaniumista, GaAs:sta tai piistä, metallista, muovista tai metallidusta muovista, jolloin kiinteä kantaja voi olla pintamodifioitu.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
 t u n n e t t u siitä, että LB-kalvon matriisina on polymeeri.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
35 t u n n e t t u siitä, että F_1 on kovalenttisesti sidottu matriisiin.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
t u n n e t t u siitä, että väriaine F_1 , edullisesti levy-
aggregaattia (J-aggregaatti) muodostava väriaine F_1 , levi-
tetään yhdessä amfifiilisen matriisin kanssa.

5 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
t u n n e t t u siitä, että väriaine F_1 on sovitettu aina-
kin toiseen LB-kalvon kahdesta ylimmästä kerroksesta.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
t u n n e t t u siitä, että reseptorimolekyyli on kova-
10 lenttisesti sidottu, edullisesti spacer-molekyylin väli-
tyksellä LB-kalvon ylimpään kerrokseen.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
t u n n e t t u siitä, että reseptorimolekyyli on sovi-
tettu ylimpään kerrokseen hydrofobisen membraaniankkurin
15 välityksellä.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
t u n n e t t u siitä, että reseptorimolekyylien sidonta-
kohdat sitovat fluoresenssivärillä merkityn tai itsessään
fluoresoivan ligandin tai että fluoresenssivärillä merkit-
20 semätön analyytti kompetitiivisesti syrjäyttää reseptori-
molekyylien sidontakohtiin aluksi sidotut fluoresenssimer-
kityt ligandit.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biosensori,
t u n n e t t u siitä, että analyyttiliuokseen lisätään
25 toinen, fluoresenssivärillä F_2 merkitty reseptorimolekyyli,
joka sitoutuu sandwich-määrittelyn tavalla joko spesifi-
sesti reseptorimolekyylin ja analyytin muodostamaan kom-
pleksiin tai analyytin muuhun, reseptorina olevaan mole-
kyylialueeseen.

30 11. Menetelmä näytteessä olevien analyyttimolekyy-
lien havaitsemiseksi, t u n n e t t u siitä, että käyte-
tään sensoria, joka koostuu

a) kiinteästä kantajasta,

35 b) yksi- tai useampikerroksisesta Langmuir-Blod-
gett(LB)-kalvosta, joka on kiinnitetty kantajan a) pin-
taan,

c) ainakin yhdestä fluoresenssiväristä F_1 , joka sisältyy LB-kalvon ylimpään kerrokseen tai useampikerroksisen LB-kalvon ollessa kysymyksessä vähintään yhteen LB-kalvon neljästä ylimmästä kerroksesta,

5 d) ensimmäisestä reseptorimolekyylistä, joka kykenee spesifisesti sitoutumaan analyyttimolekyylin kanssa ja joka on sidottu kovalenttisesti tai adsorboimalla LB-kalvon ylimpään kerrokseen tai ylimmälle kerrokselle, ja

10 e) altistetaan sensori näytteelle ja liikkuvalle fluoresenssiväriaineelle F_2 , jonka herätejuovaspektri peittyy F_1 :n emissiojuovaspektrillä energiansiirtoon riittävästi ja joka

15 e1) on kovalenttisesti sidottu toiseen reseptorimolekyyliin, joka analyyttimolekyylien kanssa kilpailevasti sitoutuu ensimmäiseen reseptorimolekyyliin d) tai joka

e2) on kovalenttisesti sidottu kolmanteen reseptorimolekyyliin, joka pystyy sitoutumaan ensimmäisen reseptorimolekyylin d) ja analyyttimolekyylin muodostamaan kompleksiin,

20 jolloin toinen molekyyli tai analyyttimolekyylin ja kolmannen reseptorimolekyylin kompleksi eivät aluksi ole sidottuja LB-kalvoon,
ja havaitaan fluoresenssienergiasiirron tason muutos, joka saadaan vasteena altistusvaiheessa e).

Patentkrav

1. Biosensor baserad på fluorescensenergiöverföring bestående av:

5 a) en fast bärare,
b) en på bäraren a) anbringad en- eller flerskikts Langmuir-Blodgett(LB)-film,

c) åtminstone en fluorescensfärg F_1 som ingår i åtminstone ett av LB-filmens fyra översta skikt,

10 d) en med en ligandmolekyl till specifik växelverkan kapabel receptormolekyl som är bunden till LB-filmens översta skikt eller anbragd därpå, och

e) ett mobilt fluorescensfärgämne F_2 vars excitationbandspektrum överlappar med emissionsbandspektret för F_1 i tillräckligt hög grad för energiöverföring och som

15 e1) är kovalent bundet till en ligand som förmår binda till receptormolekylen, eller

e2) är kovalent bundet till en annan receptormolekyl som kan binda till ett komplex bildat av den första receptormolekylen och liganden,

20 varvid liganden eller på motsvarande sätt liganden och den andra receptormolekylen till en början ej är bundna till LB-skiktet.

2. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
25 t e c k n a d därav, att den använda fasta bäraren består av glas, kvartsglas, Li-niobat, zinkselenid, porslin, halvledare såsom germanium, GaAs eller silicium, metall, plast eller metallerad plast, varvid den fasta bäraren kan vara ytmodifierad.

30 3. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att LB-filmens matris är en polymer.

4. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att F_1 är kovalent bundet till matrisen.

5. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att färgämnet F_1 , företrädesvis skiv-
aggregat (J-aggregat) bildande färgämne F_1 , utbredas till-
sammans med en amfifil matris.

5 6. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att färgämnet F_1 är anbragt på åt-
minstone ett av LB-filmens båda översta skikt.

7. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att receptormolekylen är kovalent
10 bunden, företrädesvis medelst en spacer-molekyl, till LB-
filmens översta skikt.

8. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att receptormolekylen är anbragd på
det översta skiktet medelst ett hydrofobt membranankare.

15 9. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att receptormolekylens bindnings-
ställen binder en med fluorescensfärg märkt eller själv
fluorescerande ligand eller att en ej med fluorescensfärg
märkt analyt kompetitivt förtränger de till receptormole-
20 kylernas bindningsställen till en början bundna fluore -
scensmärkta liganderna.

10. Biosensor enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att till analytlösningen sättes en
annan, med fluorescensfärg F_2 märkt receptormolekyl, som
25 bindes medelst sandwich-bestämning antingen specifikt till
ett komplex bildat av receptormolekylen och analyten eller
till ett annat molekylområde hos analyten, vilket fungerar
som receptor.

11. Förfarande för detektering av analytmolekyler i
30 ett prov, k ä n n e t e c k n a t därav, att man använ-
der en sensor bestående av:

a) en fast bärare,

b) en en- eller flerskikts Langmuir-Blodgett (LB)-
film, som är anbringad på ytan av bäraren a),

c) åtminstone en fluorescensfärg F_1 , som ingår i LB-filmens översta skikt eller i fråga om en flerskikts LB-film, åtminstone i ett av LB-filmens fyra översta skikt,

5 d) en första receptormolekyl som specifikt kan bindas till analytmolekylen och som är bunden kovalent eller medelst adsorption till eller på LB-filmens översta skikt, och

10 e) man exponerar sensorn för provet och ett mobilt fluorescensfärgämne F_2 , vars excitationsbandspektrum överlappar med emissionsbandspektret för F_1 i tillräckligt hög grad för energiverföring, och som

e1) är kovalent bundet till en andra receptormolekyl som kompetitivt med analytmolekylerna kan bindas till den första receptormolekylen d) eller som

15 e2) är kovalent bundet till en tredje receptormolekyl som kan bindas till ett komplex bildat av den första receptormolekylen d) och analytmolekylen,

20 varvid den andra molekylen och komplexet bildat av analytmolekylen och den tredje receptormolekylen till en början ej är bundna till LB-filmen,

och man observerar ändringen i nivå hos fluorescensenergiöverföringen som erhålles som respons i exponeringsskedet e).