

БИОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 53.082:612.017.1

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПОРТАТИВНЫХ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

*И. Д. Войтович¹, В. М. Корсунский¹, А. Н. Косогор³,
Н. Ф. Стародуб², И. А. Яворский¹*

¹Институт кибернетики им. В. М. Глушкова НАН Украины, просп. Академика Глушкова, 40, 03680, Киев, тел. 38-044 5260128, факс: 38-044 5261267, e-mail: d220@public.icyb.kiev.ua

²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, ул. Леонтовича, 9, 01030, Киев, тел. 38-044 2294743, факс: 38-044 2296365, e-mail: nstarodub@hotmail.com

³ОАО "Аналитприбор", ул. Шутова, 16, 03067, Киев, тел. 38-044 4583093, факс: 38-044 4583093

Аннотация

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПОРТАТИВНЫХ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

И. Д. Войтович, В. М. Корсунский, А. Н. Косогор, Н. Ф. Стародуб, И. А. Яворский

Проанализированы существующие типы биосенсоров на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Рассмотрены перспективы создания портативных ППР-сенсоров, пригодных для широкого использования в биологии, медицине, сельском хозяйстве и т.п., в том числе и в полевых условиях. Предложено два конструкторско-технологических варианта построения портативных ППР-сенсоров — с прямолинейным и с возвратным оптоэлектронными каналами. Рассмотрены элементная база и особенности работы указанных сенсоров. Для дальнейшего расширения технических и функциональных возможностей портативных ППР-сенсоров предлагается использовать электронные методы приема и обработки двумерных потоков информации.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, ППР-сенсор

Анотація

ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ПОРТАТИВНИХ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

І. Д. Войтович, В. М. Корсунський, О. М. Косогор, М. Ф. Стародуб, І. О. Яворський

Проаналізовані існуючі типи біосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Розглянуто перспективи створення портативних ППР-сенсорів, придатних для широкого використання в біології, медицині, сільському господарстві, тощо, в тому числі і в польових умовах. Запропоновано два конструкторсько-технологічних варіанти побудови портативних ППР-сенсорів — з прямолінійним і зі зворотним оптоелектронними каналами. Розглянуті елементна база та особливості роботи вказаних сенсорів. Для подальшого розширення технічних і функціональних можливостей портативних ППР-сенсорів передбачається використати електронні методи прийому й обробки двохвимірних потоків інформації.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, ППР-сенсор

Summary

PERSPECTIVES FOR DEVELOPMENT OF PORTABLE BIOSENSORS BASED ON SURFACE PLASMON RESONANCE

I. D. Voytovych, V. M. Korsunsky, A. N. Kosogor, M. F. Starodub, I. O. Javorskiy

Based on surface plasmon resonance (SPR), existing types of biosensors were analyzed. Portable SPR sensors suitable to be widely used in biology, medicine, agriculture, in field conditions and so forth, were studied. There were offered two design solutions of portable SPR sensors — with rectilinear and return optoelectronic channels. Elements and specifics of the sensors' operations were studied. To extend further technical and operational capacities of the portable SPR sensors it is proposed to use electronic techniques to receive and process two-dimensional information flows.

Keywords: Surface Plasmon Resonance, SPR-sensor

1. Введение

На сегодня существует неотложная потребность в практическом использовании инструментальных аналитических устройств, которые позволяли бы осуществлять специфический высокочувствительный контроль широкого круга веществ, имеющих чрезвычайно большое значение при выполнении биохимических анализов в биологии, медицине, экологии, сельском хозяйстве, биотехнологии и т. д. [1-3]. Сложность осуществления этой задачи определяется целым рядом требований, которых следует придерживаться при создании таких устройств. Прежде всего это касается конструкционной, технологической и эксплуатационной простоты, малогабаритности, надёжности, широкого спектра возможных применений, пригодности для работы в полевых условиях и относительной дешевизны.

Наибольшую перспективу в обсуждаемом аспекте представляют оптические устройства

и особенно те, которые базируются на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (далее “ППР”). Краткий анализ их технических и технологических характеристик приведен в ряде обзорных статей [4-7]. Эти аналитические устройства позволяют выявлять интересующие исследователя вещества, не применяя специальных реагентов, конъюгированных с какими-то метками, осуществлять даже неинвазивный анализ, а также использовать грубые, специально не подготовленные пробы. В общем виде такие устройства включают детектор, чувствительную поверхность и средства доставки образца, а коммерческие варианты укомплектованы еще и химическими реагентами для иммобилизации специфических лигандов. Ниже в табл. 1 приведены сведения, заимствованные из [6], о типах выпускаемых или находящихся на стадии внедрения ППР-биосенсорных устройств и фирмах, их предлагающих.

Выпускаемые и разрабатываемые оптические биосенсорные устройства на основе эффекта ППП

№ п/п	Фирма, страна	Устройство	Источник информации, www.сайт
1.	Biacore AB, Sweden	BIACORE 1000, 2000, 3000, X, J, Quant, 8 channel prototype, S51	biacore.com
2.	Affinity Sensors	IAsys, Iasys Plus, Iasys Auto+	affinity-sensors.com
3.	IBIS Technologies	IBIS I, IBIS II	ibis-spr.nl
4.	Nippon Laser Electronics	SPR670, SPR Cellia	nle-lab.co.jp/English/ZO-HOME.htm
5.	Texas Instruments	Spreeta	ti.com/sc/docs/products/msp/control/spreeta
6.	Analytical μ -Systems	BIO-SUPLAR 2	micro-systems.de
7.	AVIV Instruments	PWR Model 400	avivinst.com
8.	Farfield Sensors Ltd	AnaLight Bio250	farfield-sensors.co.uk
9.	Luna Innovations	Fober optic prototype	lunainnovations.com
10.	ThreeFold Sensors	Label-free prototype	ic.net/~tfs
11.	Graffinity	Plasmon Imager	graffinity.com
12.	Leica	Prototype	leica-ead.com
13.	Prolinx	OCTAVE	prolinxinc.com
14.	HTS Biosystems	SPR array	htsbiosystems.com
15.	Quantech Ltd	FasTraQ SPR array	quantechltd.com
16.	SRU biosystems	BIND	srbiosystems.com

Фирма Biacore AB является первой среди тех, кто коммерчески реализовал такой биосенсор. Это было сделано еще в 1990 году [8] после публикации Лидберга [9], описывающей принципы и пути создания подобных устройств. Сегодня промышленно выпускаются следующие устройства: BIACORE 1000, 2000, 3000, X, J, Quant, IAsys, Iasys Plus, Iasys Auto+, IBIS I, IBIS II, SPR670, SPR Cellia, Spreeta и BIO-SUPLAR 2. Как правило, все они требуют небольших объемов пробы, способны к воплощению различных аналитических методик. Их работа в значительной мере автоматизирована. Некоторые из них (в частности, BIACORE X) имеют несколько каналов для одновременного анализа ряда проб. Ряд из этих устройств являются высокоспециализированными (например, BIACORE Quant, предназначенный для определения содержания витаминов). Внешние размеры BIACORE 3000 составляют приблизительно $0,3 \times 0,6 \times 0,8$ м³. Следует заметить, что около 90% всех исследований с применением ППП-биосенсоров на сегодня выполнено с помощью устройств фирмы Biacore AB.

Среди промышленно выпускаемых устройств наименьшими размерами обладают Spreeta и BIO-SUPLAR 2, но и они не приспособлены для использования в полевых условиях. Что касается сенсора BIO-SUPLAR 2, то, несмотря на то, что он продается фирмой Analytical μ -Systems, его разработчиком явля-

ется Институт физики полупроводников НАН Украины, который уже предложил новую серию приборов BIO-SUPLAR 5. Но и эти последние представляют собой стационарные устройства, предназначенные для исследований биоаналитического, химического и чисто физического характера. Чувствительность данных устройств имеет ограничения в силу особенностей их конструкции. В этом отношении устройство Spreeta фирмы Texas Instruments рекламируется как характеризующееся чувствительностью на уровне наномолярных концентраций анализируемых веществ.

Решение проблемы широкого и эффективного применения ППП-сенсоров сдерживается тем, что их работа основывается на использовании достаточно тонкого и чувствительного к внешним воздействиям физического явления, каким является эффект ППП. Для его выявления и практического использования необходимы прецизионные оптические и оптоэлектронные элементы и высококачественные материалы. Но в большей мере это связано с созданием эффективных конструкций, наиболее полно отвечающих требованиям практики, т.е. обладающих достаточной чувствительностью, портативностью, простотой и дешевизной выполнения анализов.

Для достижения указанных целей нами разработаны и предлагаются два варианта построения малогабаритных ППП-сенсоров для

экспресс-анализов — с прямолинейным и возвратным оптоэлектронными каналами. Ниже мы рассмотрим эти варианты.

2. Описание конструкции и способа действия сенсоров

На рис. 1 представлена конструкция ППР-сенсора с прямолинейным оптоэлектронным каналом. В его состав входит осветительная система (лазер 1, поляризатор 2, диафрагма 3, защитное стекло 4), которая формирует параллельный монохроматический р-поляризованный световой поток, оптическая призма 5, на которую устанавливают сменный рецепторный чип 6, и фотоприёмник 7. Оптическая призма 5 жестко укреплена на зеркальной опорной пластине 8. Элементы осветительной системы находятся внутри подвижной цилиндрической обоймы 9, соединённой с шаровой поворотной системой 10 и системой юстировки 11. Вся конструкция сенсора размещается на базовой плоскопараллельной платформе 12.

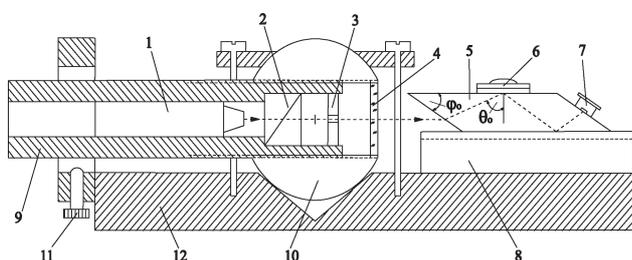


Рис.1. ППР-сенсор с прямолинейным оптоэлектронным каналом: 1 — лазер; 2 — поляризатор; 3 — диафрагма; 4 — защитное стекло; 5 — оптическая призма; 6 — чувствительный металлоплёночный элемент; 7 — фотоприёмник; 8 — зеркальная опорная пластина; 9 — цилиндрическая обойма; 10 — шаровая поворотная система; 11 — система юстировки; 12 — базовая платформа.

Оптическая призма 5 имеет входной угол среза φ_0 , определяемый формулой

$$\varphi_0 = \arctg \frac{n \sin \theta_0 - 1}{n \cos \theta_0} \quad (1)$$

(где n — показатель преломления материала призмы, θ_0 — резонансный угол ППР) и обеспечивающий попадание светового потока на рецепторный чип под углом θ_0 с точностью $\sim 0,01^\circ$.

Главное преимущество приведенной выше

конструкции — её технологическая точность, достигаемая за счёт использования шаровой поворотной системы 10 и микрометрической системы юстировки 11.

Напомним, что сменный рецепторный чип (биочип) представляет собой тонкую плоскопараллельную пластинку из оптического стекла с высоким показателем преломления, на которую нанесена тончайшая плёнка золота (серебра либо другого металла или полупроводника, либо их композиции, в которой могут возбуждаться поверхностные плазмоны). На поверхность этой плёнки биохимическими методами осаждают мономолекулярный слой лиганда, например, специфических антител, к которому может избирательно химически присоединяться только аналит — молекулы определенного вещества или определенные микроорганизмы. И только после нанесения лиганда чип становится “рецепторным”, т.е. избирательно чувствительным к наперед заданному аналиту.

На рис.2 изображена конструкция ППР-сенсора с возвратным оптоэлектронным каналом, в котором световой луч на пути от источника света к фотоприёмнику изменяет своё направление распространения на 180° . В состав сенсора входит осветительная система (лазер 1, поляризатор 2, диафрагма 3), оптическая ретропризма 4, сменный рецепторный чип 5, зеркало 6 и фотоприёмная система с линзой 7 и фотодиодом 8. Детали осветительной и фотоприёмной систем смонтированы внутри подвижных поворотных цилиндров 9 и 10, размещённых в параллельных цилиндрических каналах, сформированных в металлическом корпусе 11. Он конструктивно объединяет осветительную и фотоприёмную системы сенсора в единый узел, отделённый от ретропризмы рабочим промежутком 12 шириной ~ 2 мм с регулируемой (при помощи микровинта 13 и упругой перемычки 14) клиновидностью $\sim 2,5-3^\circ$.

Наличие подвижных элементов в осветительной и фотоприёмной системах, а также рабочего промежутка с регулируемой клиновидностью позволяют осуществлять оптическую настройку сенсора на нужный рабочий режим ППР. Благодаря параллельности оптических осей осветительной и фотоприёмной систем и наличию у ретропризмы угла 90° , входящий в ретропризму и выходящий из неё

световые лучи при регулировке рабочего промежутка 12 остаются параллельными, что принципиально важно для стабильной работы фотоприёмника и сенсора в целом. Для защиты сенсора от внешних паразитных оптических засветок, механических повреждений и загрязнения используется съёмный металлический кожух 15.

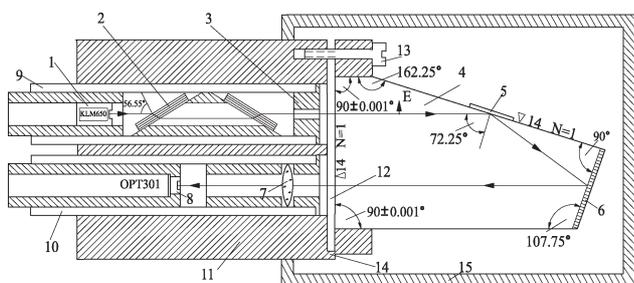


Рис.2. ППР-сенсор с возвратным оптоэлектронным каналом: 1 — лазер; 2 — поляризатор; 3 — диафрагма; 4 — ретропризма; 5 — чувствительный металлоплёночный элемент; 6 — зеркало; 7 — линза; 8 — фотодиод; 9,10 — подвижные поворотные цилиндры осветительной и фотоприёмной систем; 11 — металлический корпус; 12 — рабочий промежуток; 13 — микровинт; 14 — упругая перемычка; 15 — защитный кожух.

Преимуществами этой конструкции ППР-сенсора являются её малые габариты (за счет объединения осветительной и фотоприёмной систем в единый узел), возможность регулировки и угловой настройки сенсора на различные режимы ППР, а также возможность использования рецепторных чипов с разными лигандами для обнаружения различных аналитов.

Работа описанных сенсоров базируется на известных принципах ППР-биосенсорике [4–9] и поверхностного плазмонного резонанса [10,11]. Перед измерением на рецепторный чип пипеткой наносят каплю исследуемой жидкости (например, молока, воды, ...) и выдерживают некоторое время, необходимое для связывания аналита с лигандом (например, для захвата ретровирусов лейкоза специфическими антителами). Этот подготовительный этап делается вне ППР-сенсора. Требуемая длительность выдержки зависит от вида и состояния активности лиганда и может зависеть от температуры. Обычно это от 5 до 60 минут. Когда рецепторный чип с пробой “созрел” для измерения, его устанавливают в ППР-сенсор на соответствующее место, смо-

ченное имерсионной жидкостью, и проводят измерение. На это требуются секунды. Затем в сенсор устанавливают следующий чип с пробой и проводят его измерение. Использование сменных съёмных рецепторных чипов существенно ускоряет и удешевляет процедуру выполнения анализов. Можно обеспечить производительность порядка 500 анализов/час.

Обычно в ППР-сенсорах снимается кривая ППР, т.е. зависимость интенсивности отраженного света от угла падения или от длины его волны. В наших сенсорах угол падения и длина волны света остаются постоянными, а интенсивность отраженного света измеряется только в фиксированном заданном направлении. Для пояснения на рис.3 показана кривая ППР 1, которую можно получить при нанесении на рецепторный чип капли “чистой” пробы, не содержащей аналита. При угле падения θ_0 , на который настроен сенсор, интенсивность отраженного света I_0 , измеряемая фотодетектором, минимальна. Если же в пробе, нанесенной на рецепторный чип, имеется аналит, то после того, как он свяжется с лигандом, кривая ППР смещается, например, так, как показано штриховой линией (кривая 2). Минимум кривой теперь находится при угле θ_1 . А при угле падения θ_0 , зафиксированном в сенсоре, интенсивность отраженного света I_1 уже значительно больше. И чем больше концентрация аналита в пробе, тем больше сигнал от фотодетектора. Делая измерения “эталонных” растворов с известными концентрациями аналита, сенсор калибруют, запоминают калибровку в микропроцессоре и с его помощью выдают на индикатор уже обработанные результаты анализа.

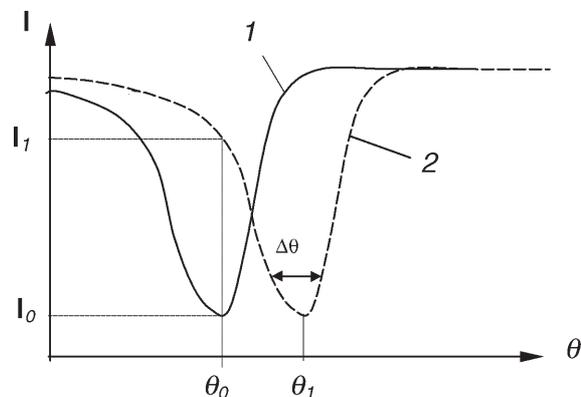


Рис.3. Объяснение способа действия: 1 — кривая ППР для “чистой” пробы; 2 — кривая ППР при наличии аналита в пробе.

Ошибка определения концентрации таким образом в простейшем варианте ППР-сенсора составит ~30% от верхней границы диапазона. Таким путём достаточно просто реализуется портативный ППР-биосенсор — индикатор присутствия аналита с возможностью различения нескольких степеней заражения.

3. Основные факторы, определяющие параметры сенсора

Осветительная система ППР-сенсора характеризуется геометрическими размерами излучающей области, диаграммой направленности, спектральным составом излучения, его мощностью и стабильностью. В наших сенсорах требуется параллельный световой пучок с угловой расходимостью порядка $\sim 0,05^\circ$ (поскольку угловая ширина резонансного минимума ППР составляет $\sim 0,5^\circ$). Столь малую угловую расходимость удаётся получить при использовании полоскового полупроводникового лазера [12] с излучающей областью размером в несколько $\mu\text{м}^2$ (т.е. почти точечного источника излучения) и линзового коллиматора.

Требуемая мощность источника излучения определяется потерями на поглощение и рассеяние света в оптоэлектронном канале сенсора и чувствительностью фотоприёмника. Уже в поляризаторе теряется 50-60% падающего излучения. Около 4% отражается на каждой границе раздела оптических сред (поверхности линз, диафрагм, грани призмы, ...). Мы используем фотоприёмник ОРТ301 с чувствительностью $0,47 \text{ А} \cdot \text{Вт}^{-1}$ ($\lambda = 650 \text{ нм}$), и с учётом всех потерь вполне достаточной оказывается мощность $\sim 1-3 \text{ мВт}$. Всем вышеуказанным требованиям соответствует полосковый полупроводниковый лазер KLM-650/3 с трёхлинзовым коллиматором, углом расходимости светового пучка $\sim 0,04^\circ$, мощностью $\sim 3 \text{ мВт}$, длиной волны $\lambda = 650 \text{ нм}$ и монохроматичностью $\Delta\lambda = 0,5 \text{ нм}$ [13]. При использовании специальной схемы питания его световой поток достаточно стабилен во времени и мало изменяется в рабочем диапазоне температур.

В качестве поляризатора нами использована многопластинчатая конструкция, изображённая на рис.4 [14]. Она содержит две идентичных стопы 1 и 2 по восемь стеклянных пла-

стин 3 толщиной $0,2 \text{ мм}$, разделённых воздушными промежутками 4 такой же толщины. Стеклянные блоки закреплены в оправе 5 эпоксидным соединением 6 и размещены в оптоэлектронном канале сенсора таким образом, чтобы угол падения светового луча на стопу соответствовал углу Брюстера

$$\varphi_{\text{Бр}} = \arctg \frac{1}{n}. \text{ При } n=1,514 \text{ (стекло К8 [15])}$$

имеем $\varphi_{\text{Бр}} = 56, 55^\circ$. Достигнутая степень поляризации составляет 99%. Почти полностью устранены паразитные многократно отражённые световые лучи (рефлексы), которые могли бы помешать работе оптоэлектронного канала ППР-сенсора. Заметим, что такой поляризатор имеет широкую спектральную полосу пропускания и не очень критичен к углам падения световых лучей [14].

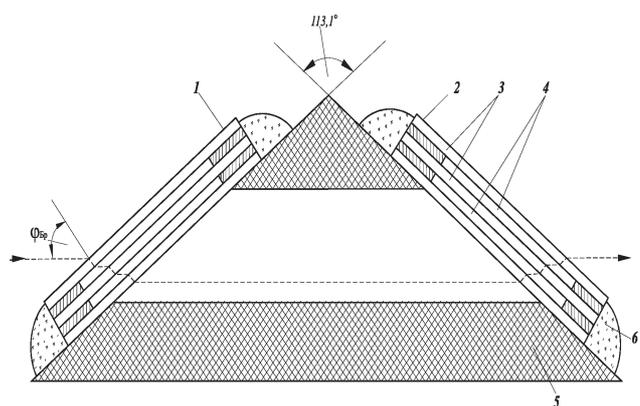


Рис.4. Многопластинчатый поляризатор: 1, 2 — пластинчатые стопы; 3 — стеклянные пластины; 4 — воздушные промежутки; 5 — оправа; 6 — эпоксидное соединение.

Наиболее важными требованиями к оптической ретропризме в ППР-сенсоре с возвратным оптоэлектронным каналом являются обязательное наличие у неё угла 90° и обеспечение точного резонансного угла θ_0 , под которым свет должен падать на чувствительную поверхность сенсора. Этот угол находится из условия существования ППР

$$\frac{2\pi}{\lambda} n \sin \theta_0 = \text{const} . \quad (3)$$

В Институте биохимии НАНУ экспериментально установлено, например, что для анализа молока на лейкоз на рецепторных чипах с золотой пленкой и лигандом из антител, специфических к ретровирусам лейкоза коров,

константа в выражении (3) $\text{const} = 0,01482$. Отсюда следует, что в наших сенсорах с $\lambda = 650$ нм, $n = 1,61110$, для работы с такими рецепторными чипами резонансный угол θ_0 составляет $72,25^\circ$.

С учётом перспективы при изготовлении ретропризмы мы старались придерживаться точности углов $\Delta\theta \sim 0,001^\circ$, хотя пока достаточно и $0,01^\circ$. Особенно строго должна выдерживаться плоскостность рабочих граней призмы, показателем которой является число N интерференционных колец, возникающих при наложении на грань призмы эталонного плоского стекла:

$$N = \frac{\Delta\theta a}{800\lambda}, \quad (4)$$

где $\Delta\theta$ — в радианах, a — размер грани призмы (в мм), λ — в мкм [16]. На рис.2 указаны расчётные углы, плоскостность и класс обработки соответствующих граней оптической ретропризмы.

Что касается выбора показателя преломления материала призмных структур, то тут необходимо учитывать использование съёмных рецепторных чипов и особенности прохождения света через границы раздела различных оптических сред. На рис.5 показана типичная при работе со сменными рецепторными чипами плоскопараллельная структура, состоящая из последовательно расположенных одна над другой трёх оптических сред с показателями преломления n_1 (ретропризма), n_2 (иммерсионная жидкость), n_3 (стеклянная основа рецепторного чипа), через которую проходит р-поляризованное световое излучение. В соответствии с [17] коэффициент отражения света, например, от границы “ $n_1 - n_2$ ” (а это может быть и граница “ $n_2 - n_3$ ”) определяется как

$$R = \frac{\text{tg}^2(\varphi_1 - \varphi_2)}{\text{tg}^2(\varphi_1 + \varphi_2)}, \quad (5)$$

где φ_1 и φ_2 — соответственно углы падения и преломления света на границе. Это выражение после соответствующих преобразований с

учётом закона преломления $\frac{\sin \varphi_2}{\sin \varphi_1} = \frac{n_1}{n_2}$ приводится к выражению

$$R = \left\{ \frac{\cos \varphi_1 - \frac{n_1}{n_2} \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2 \varphi_1}}{\cos \varphi_1 + \frac{n_1}{n_2} \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \sin^2 \varphi_1}} \right\}^2. \quad (6)$$

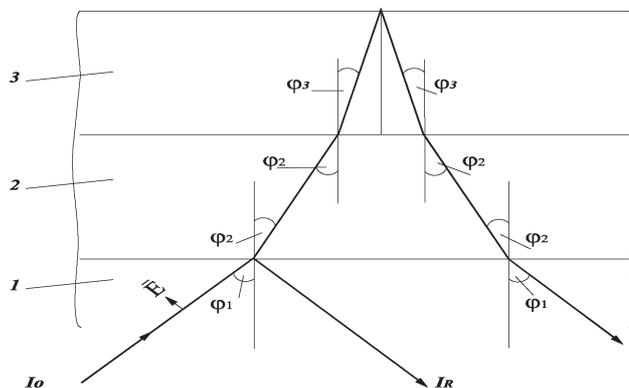


Рис.5. Схема прохождения света в системе “ретропризма — иммерсионная жидкость — чувствительный металлоплёночный элемент”: 1 — ретропризма; 2 — иммерсионная жидкость; 3 — чувствительный элемент; I_0 , I_R — интенсивности падающего и отражённого света; φ_1 , φ_2 — углы падения и преломления света.

Специфика зависимости $R = f\left(\frac{n_1}{n_2}, \varphi_1\right)$ демонстрируется графиками, приведенными на рис.6. Отражения света (рефлексы) от границ “ $n_1 - n_2$ ” и “ $n_2 - n_3$ ” в сенсоре должны быть минимизированы, чтобы паразитные сигналы не искажали ППР-сигнал. Для этого необходимо, как видно из рис.6, при выборе оптических материалов придерживаться соотношения $\frac{n_1}{n_2} \leq 1$ ($\frac{n_2}{n_3} \leq 1$). Область $\frac{n_1}{n_2} \geq 1$ ($\frac{n_2}{n_3} \geq 1$) уже является областью неустойчивости и риска, поскольку даже при незначительном превышении n_1 над n_2 или n_2 над n_3 (например, за счёт локальных оптических неоднородностей или некорректного подбора материалов) может резко возрасти вероятность возникновения явления полного внутреннего отражения, особенно при типичных для ППР больших значениях угла падения φ_1 .

В этой связи высоки требования к подбору оптических материалов, их качеству и характеристикам. Желательно, чтобы ретропризма, иммерсионная жидкость и стеклянная основа чувствительного металлоплёночного элемен-

та имели одинаковые показатели преломления с точностью до 2 ÷ 3-го знака после запятой, или же выполнялось соотношение $n_1 \leq n_2 \leq n_3$ с минимальными отличиями. Таким требованиям отвечают, например, марки стекла ТК4 ($n=1,61110$), ТК8 ($n=1,61400$), ТК14 ($n=1,61300$), ТК16 ($n=1,61260$) [15].

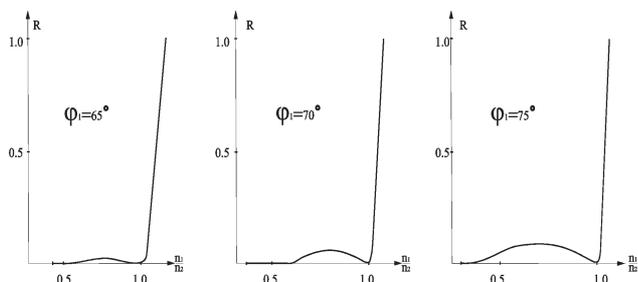


Рис.6. Зависимости коэффициента отражения света R от соотношения показателей преломления $\frac{n_1}{n_2}$ при разных углах падения ϕ_1 .

В состав фотоприёмной системы ППР-сенсора входит фокусирующая линза 1 и фотодиод 2 (рис.7). С учётом того, что на линзу падает параллельный световой поток сечением $d \sim 4$ мм, для исключения влияния сферической aberrации диаметр линзы D выбран в 4-5 раз большим ($D \sim 16-20$ мм). Для того, чтобы облучался весь входной зрачок фотодиода размером S , его необходимо расположить или до фокуса, или после фокуса линзы f на расстоянии l . Из соотношения

$$\frac{d}{f} = \frac{S}{l} \quad (7)$$

вытекает, что, например, при $d = 4$ мм, $f = 50$ мм, $S = 2,9$ мм (фотодиод ОРТ301) величина $l = 36$ мм.

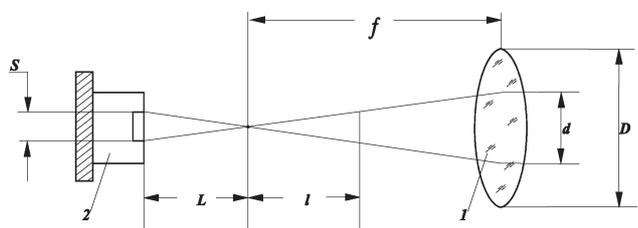


Рис.7. Фотоприёмная система ППР-сенсора: 1 — фокусирующая линза; 2 — фотодиод.

Что касается электронной схемы приёма оптического сигнала, то она должна быть такой, чтобы влияние электромагнитных и оптических помех на её работу было минималь-

ным. Схема должна быть малогабаритной и потреблять мало энергии. К её быстродействию особых требований не выдвигается. Упомянутая ранее микросхема ОРТ301, в которой в одном корпусе объединены фотодиод и операционный усилитель [18], удовлетворяет всем этим требованиям.

Для уменьшения оптических помех в сенсоре использовано анодирование и чернение элементов конструкции.

Физическое угловое разрешение нашего ППР-сенсора определяется расходимостью светового луча ($\Delta\theta_1 = 0,04^\circ$), монохроматичностью излучения (вклад этого фактора

$$\Delta\theta_2 = \text{tg}\theta_0 \frac{\Delta\lambda}{\lambda} = 0,138^\circ$$

и угловыми погрешностями оптики и её юстировки ($\Delta\theta_3 = 0,001^\circ - 0,01^\circ$). В целом у нашего сенсора $\Delta\theta \sim 0,19^\circ$. В ППР-рефрактометрах это, по данным [19], соответствует изменению показателя преломления измеряемого вещества $\Delta n \sim 1,9 \cdot 10^{-3}$.

Для сравнения в сенсоре VIACORE 2000 чувствительность по показателю преломления составляет $\sim 1 \cdot 10^{-6}$. Но наш малогабаритный ППР-сенсор предназначен для выполнения простых экспресс-анализов (получения быстрых ответов “да — нет”) в полевых условиях, и стоимость его анализов в сотни раз меньше.

В сенсорах Spreeta [20] физическая угловая разрешающая способность $\Delta\theta \sim 2,3^\circ$ (в нашем сенсоре $0,19^\circ$). Но благодаря специальной компьютерной обработке данных при использовании внешнего компьютера и специального программного обеспечения там удаётся достигнуть расчётной разрешающей способности $\Delta\theta \sim 0,03^\circ$, то есть возрастания почти на два порядка.

Чувствительность ППР-сенсора к конкретному анализу определяют как минимальное количество анализа, которое должно присоединиться к лиганду на рецепторном чипе, чтобы прибор надёжно зафиксировал отклонение. Она определяется не только физической угловой разрешающей способностью, но и концентрацией анализа в пробе, временем биохимического взаимодействия пробы с лигандом (при значительном времени начинает играть роль объём нанесенной жидкой пробы), текущим состоянием активности лиганда, температурой и другими факторами химичес-

кой и биохимической кинетики. Поэтому чувствительность ППР-биосенсора безотносительно к лиганду, аналиту и перечисленным выше условиям указать нельзя. Это требует специальных биохимических исследований и будет темой отдельных публикаций. Укажем только, что, например, при обнаружении ретровирусов лейкоза в молоке коров чувствительность ожидается на уровне наномолярных концентраций.

4. Перспективы совершенствования

Наиболее перспективным путём повышения чувствительности и точности при дальнейшем совершенствовании наших ППР-сенсоров является применение электронных методов борьбы с помехами. В сенсоре Spreeta [20], например, с этой целью используются расходящийся световой пучок (угол расходимости $\sim 4^\circ$) и фотодетекторная линейка из 128 пикселей, с помощью которой одновременно регистрируются интенсивности отражения под сотней разных углов (практически вся кривая ППР). Шумовые выбросы на кривой ППР интегрируются путем многократного повторения измерения, и кривая сглаживается программными методами. Поскольку при наличии аналита кривая ППР, целиком сдвигаясь по углу, существенно не искажается по форме, для уточнения величины углового сдвига используются отсчеты от всех точек. Благодаря этому, как мы упоминали ранее, при физической угловой разрешающей способности $\Delta\theta \sim 2,3^\circ$ удаётся достигнуть расчётной разрешающей способности $\Delta\theta \sim 0,03^\circ$.

В перспективе и в наших ППР-сенсорах существенно более весомых результатов можно достичь, используя расходящийся световой пучок и матричный фотодетектор. Он будет соединён с микропроцессором, в память которого заложена программа обработки двумерных изображений, позволяющая значительно точнее определять координаты угловых сдвигов двумерной резонансной характеристики ППР и динамику их изменения. Конструктивно сенсор будет аналогичен изображённому на рис.2 с той разницей, что коллимационная оптика будет заменена на оптику, формирующую расходящийся световой пучок, а вместо фотодиода помещена светочувствительная

ПЗС-структура. Функциональная схема такого перспективного портативного ППР-сенсора изображена на рис.8. Ожидаемое повышение чувствительности и точности — не менее двух порядков.



Рис.8. Функциональная схема ППР-сенсора со встроенным микропроцессором.

Заключение

Проведенный анализ литературных данных свидетельствует об отсутствии в настоящее время приемлемых для широкого практического использования портативных ППР-сенсоров. Проблема построения подобных сенсоров в основном заключается в принятии оптимальных конструкторско-технологических решений на основе точных расчетов, в применении высококачественных материалов и оптоэлектронных элементов. В предложенном нами портативном ППР-сенсоре предусмотрены наличие съёмных биочипов, заранее подготавливаемых к работе вне пределов сенсора, а также электронная обработка информации на встроенном микропроцессоре и отображение полученных результатов в удобной форме на табло. Объём сенсора около 0,5 л, масса — до 0,6 кг. Физическая угловая разрешающая способность составляет около $0,2^\circ$, что достаточно, например, для того, чтобы оперативно выявить на месте наличие в капле молока коровы ретровирусов лейкоза и различить 3-5 степеней заражения. Производительность порядка 500 анализов/час. Диапазон перестройки угла ППР-резонанса составляет около 3° , что обеспечивает возможность использования рецепторных чипов с разными лигандами для исследова-

дования десятков различных аналитов. Конструкция сенсора допускает дальнейшее совершенствование с повышением чувствительности и точности анализов.

Список литературы

1. *Rand A.G., Ye J., Brown C.W., Letcher S.V.* Optical Biosensors for Food Pathogen Detection // *Foodtechnology*. — 2002. — v.56. — N.3. — p.32-38.
2. *Starodub N.F., Starodub V.M., Katzev A.M., Levkovetz I.A., Dibrova T.L., Krivenchuk V.E., Schapovalenko V.F.* Optical and electrochemical biosensors for express environmental monitoring // In: *Proceeding of NATO ASI "Molecular electronics: Bio-sensors and Bio-computers"*, Ed.: *Barzanti L. et al.*, Kluwer Academic Publ., 2003, p. 355-372.
3. *Стародуб Н.Ф. Стародуб В.Н.* Экспрессный контроль токсичных веществ и патогенных микроорганизмов. Иммуный анализ и иммунные сенсоры // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — т. 74. — № 4. — с.5-23.
4. *Myszka D.G.* Survey of the 1998 optical biosensor literature // *J. Mol. Recognit.* — 1999. — v. 12. — p. 279-284.
5. *Rich R., Myszka D.G.* Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature // *J. Mol. Recognit.* — 2000. — v. 13. — p. 1-20.
6. *Baird Ch. I., Myszka D.G.* Current and emerging commercial optical biosensors // *J. Mol. Recognit.* — 2001. — v. 14. — p. 261-268.
7. *Rich R., Myszka D.G.* Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2000. — v. 11. — p. 54-61.
8. *Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., et al.* Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology // *Biotechniques*. — 1991. — v.11. — p. 620-627.
9. *Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I.* // *Sensors & Actuators B*. — 1983. — N4. — p. 299-304.
10. *Weber W.H., McCarthy S.L.* Surface-plasmon resonance as a sensitive optical probe of metal-film properties // *Physical Review B*. — 1975. — v.12. N.12. — p.5643-5650.
11. *Homola J., Yee S.S., Gauglitz G.* Surface plasmon resonance sensors: Review // *Sensors and Actuators*. — B.54. — 1999. — p.3-15.
12. *Скворцов Б.В., Иванов В.И. и др.* Оптические системы передачи (под ред. В.И. Иванова). — М.: Радио и связь, 1994, — с.66-67.
13. www.lasertools.ru
14. *Шерклифф У.* Поляризованный свет. — М.: Мир, 1965. — с.109-111.
15. *Стекло оптическое бесцветное. Физико-химические характеристики. Основные параметры. ГОСТ 13659-78.* — М.: Госкомитет СССР по стандартам, 1985. — с. 3, 6.
16. *Погарев Г.В.* Краткие сведения из теории точных измерений. — Л.: 1962. — с.10.
17. *Калитеевский Н.И.* Волновая оптика. — М.: Наука, 1971. — с.68-82.
18. www.burr-brown.com/
19. *Stemmler I., Brecht A., Gauglitz G.* Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications // *Sensors and Actuators*. — B.54. — 1999. — p.98-105.
20. www.ti.com/spreeta