

# Спектрально-фазовый интерференционный метод регистрации биохимических реакций на поверхности

П.И.Никитин\*, Б.Г.Горшков\*, М.В.Валейко\*, С.И.Рогов\*\*

*Предложен и успешно апробирован простой оптический метод прямой регистрации биохимических реакций на поверхности, нечувствительный к вариациям интенсивности излучения и показателя преломления раствора. Метод основан на регистрации спектра отраженного или прошедшего излучения, модулированного интерференцией в чувствительном слое большой толщины (десятки и сотни микрометров), в качестве которого может быть использовано микроскопное покровное стекло с нанесенным на него рецепторным слоем. Информационным сигналом об изменении толщины чувствительного слоя в результате биохимических реакций служит изменение фазы интерференционной картины в указанном спектре. Метод апробирован при исследовании реакций связывания и отделения белков в режиме реального времени. Среднеквадратичный шум метода в пересчете на толщину составил 3 нм.*

**Ключевые слова:** интерференция, фазовые измерения, регистрация биохимических реакций.

## Введение

Прямые оптические методы регистрации биологических и химических взаимодействий получили широкое распространение за последние годы. Они уже конкурируют по чувствительности с традиционными методиками, использующими радиоактивные, ферментные, флуоресцентные метки для детектирования участвующих в реакции молекул, и, вместе с тем, имеют целый ряд преимуществ, таких как возможность следить за протеканием реакций в реальном времени, а также большая надежность и достоверность результатов при меньшем числе операций. Эти преимущества связаны с тем, что прямые оптические методы регистрируют непосредственно изменение (увеличение) толщины биомолекулярного слоя на поверхности чувствительного элемента в результате реакции между тестируемым компонентом раствора и рецепторным слоем, иммобилизированным на поверхности.

Наиболее распространенными прямыми оптическими методами регистрации биохимических реакций являются поверхностно-плазмонный резонанс [1, 2], чувствительность которого может быть существенно увеличена при использовании фазовых методов регистрации [3–5], а также разнообразные волноводные методы («резонансное зеркало» [6], решеточные преобразователи [7], планарный интерферометр Маха – Цендера [8] и др.).

Все указанные методы регистрации основаны на использовании приповерхностной электромагнитной волны (экспоненциально ослабевающей по мере удаления от чувствительного элемента в глубь раствора), эффективный показатель преломления  $n$  которой зависит от тол-

щины биомолекулярного слоя. Однако этот показатель преломления сильно изменяется с температурой ( $10^{-4}$  на  $1^\circ\text{C}$ ), что затрудняет применение перечисленных методов и ограничивает достижение высокой разрешающей способности при работе с жидкостями, хотя пороговая чувствительность может быть очень высокой (при использовании фазовых методов измерений  $\Delta n/n \approx 10^{-8}$  [3, 4, 7, 8]).

Эта трудность в какой-то мере преодолевается в методе так называемой рефлектометрической интерференционной спектроскопии [9]. В нем используется тонкая (доли длины волны) прозрачная пленка с показателем преломления, близким к показателю преломления биомолекулярного слоя на ее поверхности, причем пленка и биомолекулярный слой рассматриваются как единый чувствительный слой. Этот слой освещают широкополосным излучением вольфрамовой лампы накаливания и регистрируют спектр отраженного света, который оказывается промодулированным в результате интерференции в указанном слое, а из спектра находят оптическую толщину чувствительного слоя и по изменению этой толщины судят об исследуемой реакции.

Однако из-за малой толщины чувствительного слоя метод [9] характеризуется медленно меняющимся распределением интенсивности в регистрируемом спектре, которое имеет форму синусоиды с менее чем одним периодом во всем видимом диапазоне. Вследствие этого информационный сигнал оказывается сильно зависящим от неконтролируемых вариаций интенсивности в различных частях спектра. Указанные вариации неизбежны из-за использования мощного широкополосного источника излучения (лампы накаливания) и связанных с этим температурных дрейфов: цветовой температуры и распределения интенсивности лампы, характеристик спектрометра, спектральной чувствительности фотоприемной линейки и т. д.

В настоящей работе предложен и успешно апробирован более простой и надежный метод прямой оптической регистрации реакций на поверхности, который на прак-

\*Институт общей физики РАН, Россия, 117769 Москва, ул. Вавилова, 38; тел./факс: 135-03-76, эл.почта: nikitin@kapella.gpi.ru

\*\*Институт биоорганической химии РАН, Россия, 117871 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

тике обеспечивает независимость информационного сигнала как от показателя преломления раствора и связанных с ним температурных дрейфов, так и от дрейфа центральной длины волны источника света.

## 1. Физические основы метода

Предлагаемый метод можно назвать спектрально-фазовым интерференционным (СФИ) методом. Он основан на том, что вторичные световые волны, возникающие на граничных поверхностях чувствительного слоя, формируют зависящее от их фаз модулированное распределение интенсивности в спектре отраженного или прошедшего света, а информационным сигналом является фаза этого спектрального распределения.

Чувствительным слоем служит достаточно толстая плоскопараллельная прозрачная пластинка толщиной порядка десятков или сотен микрометров вместе с иммобилизованным на ее поверхности биомолекулярным слоем, реакция которого с выбранным компонентом раствора является объектом исследования. Эти пластинка и биомолекулярный слой имеют близкие показатели преломления, так что в первом приближении можно пренебречь отражением на границе их раздела.

Схема интерференции световых волн, испытавших частичное отражение от различных граничных поверхностей чувствительного слоя, приведена на рис.1. Результат интерференции, естественно, зависит от фазовой толщины этого слоя.

В ходе исследуемой реакции происходит присоединение тех или иных компонентов раствора к биомолекулярному слою на поверхности либо, наоборот, отделение компонентов от биомолекулярного слоя. Вследствие этого изменяются фазовые (оптические) толщины биомолекулярного слоя и чувствительного слоя в целом, а значит, и разность фаз между интерферирующими волнами.

В предлагаемом методе при использовании широкополосного излучателя толщина чувствительного слоя много больше длины когерентности падающего излучения. Следовательно, наблюдение единой интерференционной картины невозможно. Однако при выделении из отраженного излучения достаточно узких спектральных интервалов можно обеспечить условия, при которых длина когерентности излучения в каждом интервале будет больше удвоенной оптической толщины чувствительного слоя. В этом случае в каждом таком интервале будет наблюдаться интерференция вторичных световых волн, возникающих на граничных поверхностях чувствительного слоя, а весь спектр отраженного света будет промодулирован.

Итак, пусть плоская световая волна падает по нормали на поверхность пластинки. Показатели преломления трех последовательно расположенных сред обозна-

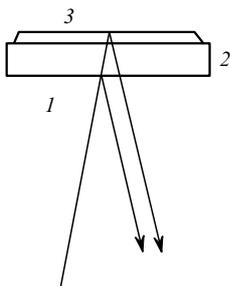


Рис.1. Схема формирования интерференционной картины:  
1 – воздушная среда; 2 – прозрачная пластинка и биомолекулярный слой; 3 – биологический раствор.

чим  $n_1$ ,  $n_2$  и  $n_3$  (в соответствии с рис.1). При регистрации биохимических реакций среда 1 – это воздух, среда 2 – чувствительный слой, состоящий из стекла и биомолекулярного слоя с близкими показателями преломления, среда 3 – тестируемая биологическая среда (обычно водный раствор). Дисперсией показателей преломления пренебрегаем. Как будет показано ниже, предлагаемый метод позволяет использовать источники излучения с малой шириной спектра, в пределах которой дисперсия незначительна.

Коэффициенты отражения от границ раздела сред 1–2 и 2–3 имеют вид [10]

$$r_{12} = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}, \quad (1)$$

$$r_{23} = \frac{n_2 - n_3}{n_2 + n_3}. \quad (2)$$

Согласно [10] энергетический коэффициент отражения чувствительного слоя

$$R = \frac{r_{12}^2 + r_{23}^2 + 2r_{12}r_{23} \cos 2\beta}{1 + r_{12}^2 r_{23}^2 + 2r_{12}r_{23} \cos 2\beta}, \quad (3)$$

где  $\beta = (2\pi/\lambda)dn_2 = (\omega/c)dn_2$  – фазовая толщина чувствительного слоя;  $d$  – его геометрическая толщина;  $\lambda$  и  $c$  – длина волны и скорость света в вакууме;  $\omega = 2\pi\nu$  – круговая частота света.

Из формулы (3) виден гармонический характер зависимости  $R$  от  $\beta$  с периодом  $\beta = \pi$ . Зависимость  $R$  от частоты  $\nu$  имеет экстремумы при  $\sin 2\beta = 0$ , т.е. при  $\beta = m(\pi/2)$  или при  $\nu$ , удовлетворяющем условию

$$\nu = \frac{mc}{4dn_2}, \quad (4)$$

где  $m = 0, 1, 2, \dots$ . Нетрудно убедиться, что функция  $R(\nu)$  имеет максимумы при нечетных  $m$  и минимумы при четных  $m$  в случае, если  $(n_1 - n_2)(n_2 - n_3) < 0$ , и наоборот, если  $(n_1 - n_2)(n_2 - n_3) > 0$ . В предлагаемом методе реализуется первый случай, когда среда 2 (прозрачная пластинка и биослой) является оптически более плотной, чем среды 1 и 3.

Таким образом, спектр отраженного света модулирован функцией (3) с максимумами и минимумами, равноотстоящими друг от друга по частоте. Частотный интервал между соседними максимумами (минимумами)

$$\Delta\nu = \frac{c}{2dn_2}. \quad (5)$$

Поскольку пропускание  $T$  непоглощающего чувствительного слоя связано с коэффициентом отражения  $R$  простым соотношением  $T = 1 - R$ , спектр пропускания аналогичен спектру отражения с той лишь разницей, что минимумы отражения соответствуют максимумам пропускания, и наоборот. Следовательно, можно использовать регистрацию спектра как отраженного, так и прошедшего света. Регистрация спектра отраженного света более предпочтительна, т.к. не налагает ограничений на поглощение или рассеяние света в растворе.

Очевидно, что максимальный контраст модуляции в спектре отраженного света достигается в случае  $r_{12} = -r_{21}$ , когда на частотах, удовлетворяющих условию  $\cos 2\beta = 1$  (т.е. при четных  $m$ ), волны, отраженные от

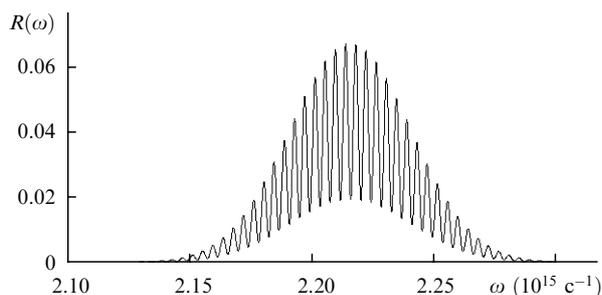


Рис.2. Расчетный спектр отражения излучения от плоскопараллельной стеклянной пластинки.

двух граничных поверхностей чувствительного слоя, полностью гасят друг друга. Выполнение этого условия можно обеспечить, используя в качестве среды 1 раствор с тем же, что и у раствора 3, показателем преломления либо, если средой 1 является воздух, применяя просветляющее покрытие на границе раздела сред 1 и 2. Однако вполне удовлетворительный контраст достигается и в обычном случае, когда среда 1 – это воздух ( $n_1 = 1.0$ ), среда 2 – стекло ( $n_2 = 1.5$ ), а среда 3 – вода ( $n_3 = 1.33$ ). Тогда  $r_{12} = -0.2$ ,  $r_{21} = 0.06$ ,  $R_{\min} = 0.020$ ,  $R_{\max} = 0.067$ , а контраст  $(R_{\max} - R_{\min}) / (R_{\max} + R_{\min}) = 0.54$ .

На рис.2 приведен расчетный спектр отражения  $R(\omega)$  плоскопараллельной пластинки толщиной 150 мкм при освещении ее источником излучения с центральной длиной волны  $\lambda = 0.85$  мкм и гауссовой формой спектра шириной 30 нм по полувысоте (что соответствует типичному суперлюминесцентному диоду). Ясно видны периодичность спектральной картины по частоте и высокий контраст.

При изменении толщины чувствительного слоя в ходе исследуемой реакции происходит сдвиг интерференционной картины в регистрируемом спектре и изменение ее периода в соответствии с формулами (4) и (5). При увеличении толщины за счет присоединения молекул из раствора к биослою интерференционные максимумы и минимумы смещаются в сторону меньших частот и уменьшается частотный интервал между ними, а при уменьшении толщины – наоборот.

В предлагаемом методе толщина пластинки и всего чувствительного слоя значительно (на порядок и более) превышает длины волн регистрируемого спектра. В связи с этим в спектре наблюдаются интерференционные максимумы и минимумы с высокими  $m$  (формула (4)), а сдвиг максимумов и минимумов в результате реакции выражен гораздо сильнее, чем изменение интервала между ними. Наиболее адекватным способом получения информационного сигнала о приращении толщины в ходе исследуемой реакции является регистрация сдвига «гребенки» интерференционных максимумов и минимумов, т. е. измерение фазы распределения  $R(\omega)$ , модулирующего спектр.

Очевидно, что для регистрации фазы распределения  $R(\omega)$  с хорошей точностью на ширину спектрального интервала должно приходиться достаточно много периодов этого распределения. Для немонахроматических источников данное требование выполняется при оптической толщине чувствительного слоя, много большей длины когерентности излучения источника. Таким образом, применение СФИ метода, в отличие от метода [9], позволяет использовать источники излучения с узким спектром (светодиоды, суперлюминесцентные диоды и т. п.).

Возможно также и применение перестраиваемых лазеров, в том числе полупроводниковых. Хотя их диапазон сканирования по спектру обычно весьма узок, тем не менее, благодаря большой толщине чувствительного слоя, можно обеспечить наличие в этом диапазоне достаточного числа интерференционных периодов. Модификация предлагаемого СФИ метода с монохроматическим источником, сканируемым по спектру, особенно перспективна для многоканальных схем регистрации биохимических реакций на единой стеклянной подложке – биочипе, т. к. не требует наличия спектрометра в каждом отдельном канале. Характерный размер одной чувствительной ячейки подобного биочипа может составлять единицы микрометров.

Поскольку в рассматриваемом методе информационный сигнал получают именно из фазы интерференционной картины, он не зависит от изменений мощности источника излучения и чувствительности приемника. В малой степени полученный результат зависит от спектральных характеристик источника и приемника. На него не влияют также вариации показателя преломления тестируемого раствора, потому что они изменяют лишь контраст интерференционной картины. Перечисленные особенности выгодно отличают предлагаемый СФИ метод от других, упоминавшихся выше.

СФИ метод был экспериментально реализован и успешно апробирован для регистрации различных биохимических реакций в режиме реального времени.

## 2. Эксперимент

Схема экспериментальной установки показана на рис.3. Излучение от лазерного диода 1, работающего в режиме суперлюминесценции (центральная длина волны  $\lambda = 0.85$  мкм, ширина спектра около 30 нм, мощность менее 100 мкВт), коллимировалось линзой 2 и поступало в светоделительный кубик 3. После этого часть излучения падала на плоскопараллельную стеклянную пластинку 4 толщиной 150 мкм, которая служила основой чувствительного слоя. Отраженное излучение вновь поступало в светоделительный кубик 3, и часть его посредством фокусирующей линзы 5 вводилась в многомодовый световод 6. Этот световод имел диаметр сердцевины 50 мкм, числовую апертуру 0.22 и длину 1.5–150 м. Назначение световода – гибкая связь между измерительным устройством и спектрометром. Кроме того, сердцевина световода выполняла функцию входной апертуры решетчатого спектрометра.

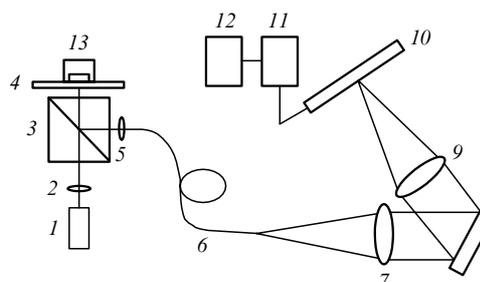


Рис.3. Схема эксперимента:

1 – лазерный диод; 2, 5 – линзы; 3 – светоделительный кубик; 4 – стеклянная пластинка; 6 – волоконный световод; 7, 9 – объективы; 8 – дифракционная решетка; 10 – фотоприемная ПЗС-линейка; 11 – АЦП; 12 – компьютер; 13 – кювета.

Спектрометр включал в себя первый объектив 7 с фокусным расстоянием 120 мм, дифракционную решетку 8, имеющую 600 штр./мм и размер 30 × 30 мм, второй объектив 9, аналогичный первому, а также фотоприемную ПЗС-линейку 10 с числом элементов 2048 размером 14 × 14 мкм каждый. Сигнал с линейки 10 оцифровывался 12-разрядным АЦП 11 и в параллельном коде поступал на вход персонального компьютера 12.

К верхней поверхности пластинки 4 была прикреплена кювета 13 с тестируемой жидкостью. Кювета 13 либо использовалась в проточном режиме, либо была приспособлена для работы с пипеткой. В первом случае непрерывный поток жидкости через кювету обеспечивался шприцевым насосом прибора «Милюхром» с приводом от шагового двигателя.

После ввода спектра в цифровой форме из АЦП в процессор выполнялись следующие операции: 1) быстрое фурье-преобразование с определением доминирующей гармоники; 2) синус- и косинус-преобразования (результаты этих преобразований обозначим соответственно  $S$  и  $C$ ); 3) определение фазы по формуле  $\varphi = -\arctan(S/C)$ ; 4) определение прироста толщины пластинки за счет биохимической реакции по формуле

$$\Delta d = \frac{(\varphi - \varphi_0)\lambda}{4\pi n_2}, \quad (6)$$

где  $\varphi_0$  – начальная фаза, фиксируемая в момент начала эксперимента. Используемый алгоритм справедлив при изменении фазы только в пределах одного периода арктангенса. Этого вполне достаточно для регистрации биохимических реакций, когда максимальный прирост толщины чувствительной пластинки не превышает 200 нм.

Вычисленные  $\Delta d$  служили выходным сигналом и записывались компьютером 12 в виде сенсограммы, т. е. зависимости выходного сигнала от текущего времени эксперимента. Частота выдачи информации составляла 1 раз в 5 с, что соответствовало усреднению по 23 циклам считывания информации с ПЗС-линейки.

Перед выполнением биохимического эксперимента проводилась модификация поверхности стеклянной пластинки 4, находящейся в кювете 13. Поверхность стекла подвергалась многократной химической очистке, затем аминировалась и биотинилировалась. Схема модификации поверхности и последующего биохимического связывания приведена на рис.4. В исходном состоянии до начала регистрации биохимических реакций стекло имело биотинильные группы на поверхности. Затем через кювету 13 пропускался раствор белка стрептавидина. Молекулы стрептавидина имеют четыре сайта, способных специфически связывать биотинильные группы. В результате молекулы стрептавидина присоединяются к

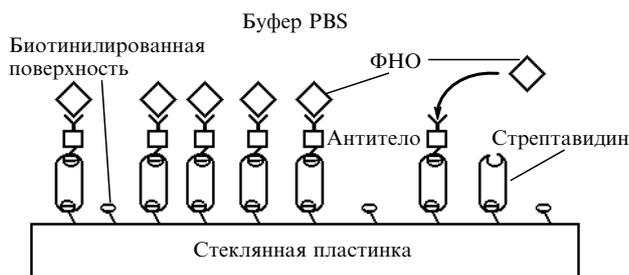


Рис.4. Схема биохимического связывания на поверхности.

поверхности биотинилированного стекла, образуя дополнительный слой. После реакции присоединения они имеют дополнительные сайты, способные специфически связывать биотинильные группы, поэтому последующее пропускание раствора биотинилированного белка через кювету приводит к связыванию этого белка на поверхности молекулами стрептавидина.

В первой серии экспериментов таким белком являлись антитела, специфичные к антигену – фактору некроза опухолей (ФНО, TNF). В результате присоединения указанных антител полученная поверхность приобретает способность избирательно связывать только молекулы ФНО. Подобные реакции представляют особый интерес в иммунодиагностике различных заболеваний. В нашем эксперименте регистрировалась как прямая реакция избирательного присоединения ФНО к антителам на поверхности, так и обратная реакция отделения ФНО при разрыве связи ФНО и антител в кислом буфере при pH 2.0.

В следующих сериях экспериментов после посадки на биотинилированную поверхность стекла молекул стрептавидина через кювету пропускался раствор биотинилированных козьих антител на иммуноглобулин человека hIgG. Затем в кювету поступал раствор иммуноглобулина hIgG с различной концентрацией. В экспериментах в режиме реального времени регистрировались все указанные реакции связывания, а также и регенерация поверхности, и десорбция молекул hIgG в буфере с pH 2.2.

### 3. Результаты эксперимента и обсуждение

Спектр отражения от пластинки 4, полученный экспериментально (рис.3), показан на рис.5. Он представляет собой периодическую функцию с огибающей, определяемой спектром источника излучения. Спектр отражения представлен в виде точек, соответствующих показаниям АЦП, его характер полностью соответствует расчетному спектру (рис.2).

Предварительные эксперименты подтвердили, что регистрируемый выходной сигнал  $\Delta d$  не зависит от показателя преломления жидкости в кювете. В частности, выходной сигнал не менялся при замене воды на фосфатно-солевой буфер PBS, стандартный для биохимических экспериментов. Кроме того, при проведении последовательных биохимических реакций, а также операций промывки в момент смены раствора в кювете никогда не наблюдалось скачков выходного сигнала из-за изменения показателя преломления раствора. Указанное обстоятельство подтверждает важное преимущество предлагаемого метода перед обсуждавшимися известными ме-

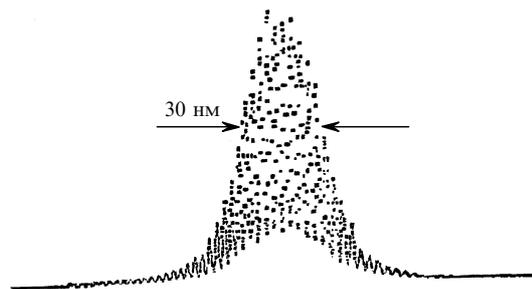


Рис.5. Экспериментальный спектр отражения от чувствительного слоя (центральная длина волны  $\lambda = 0.85$  мкм).

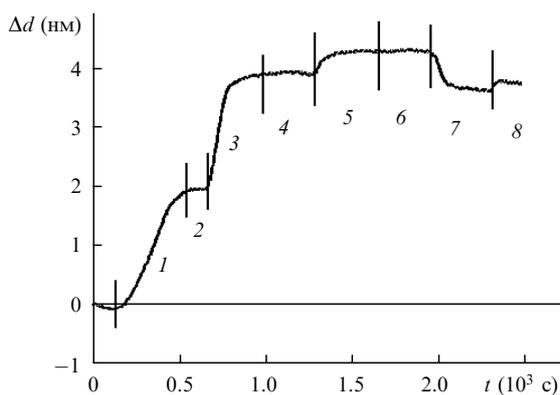


Рис.6. Сенсограмма хода последовательных биохимических реакций на поверхности чувствительного слоя:

1 – связывание стрептавидина на биотинилированной поверхности стекла; 2, 4, 6, 8 – промывка буфером PBS; 3 – связывание биотинилированных антител, специфичных к ФНО; 5 – связывание ФНО; 7 – смывка ФНО в глициновом кислом буфере с рН 2.0.

тодами, в которых скачки показателя преломления из-за смены раствора приводят к резким скачкам выходного сигнала и требуют специальной коррекции.

Пример записи протекания целого ряда последовательных биохимических реакций показан на рис.6. Первая из зарегистрированных реакций – связывание стрептавидина (участок 1) из его раствора в буфере PBS. Затем следовала промывка поверхности буфером PBS (участок 2). Объем кюветы в этом эксперименте равнялся 2.5 мкл, скорость прокачки растворов – 5 мкл/мин, концентрация стрептавидина в буфере PBS –  $10^{-6}$  моль/л. Прирост толщины биослоя на участке 1 составил 2.0 нм. При промывке буфером толщина слоя не менялась.

Следующая реакция (участок 3) состояла в избирательном присоединении биотинилированных антител, специфичных к ФНО. Концентрация антител равнялась  $10^{-7}$  моль/л. Далее следовала промывка буфером (участок 4). На этой стадии суммарная толщина присоединенного биослоя («сандвича») составила 4.0 нм. Третья реакция заключалась в специфическом присоединении к антителам молекул ФНО из раствора с концентрацией  $10^{-6}$  моль/л (участок 5). Затем поверхность снова промывалась буфером (участок 6). Изменение толщины биослоя, обусловленное связыванием ФНО, равнялось 0.6 нм, что хорошо согласуется с меньшим размером белковых молекул ФНО по сравнению с антителами.

На участке 7 происходила смывка ФНО с разрывом специфических связей антител и ФНО в глициновом растворе с концентрацией 0.1 моль/л при рН 2.0. На участке 8 в кювету вновь поступал буферный раствор PBS. Ход сенсограммы на двух последних участках демонстрирует, что антитела, в конечном счете, остались на поверхности, а молекулы ФНО были унесены раствором.

Возрастание сигнала в начале участка 8 регулярно воспроизводилось от эксперимента к эксперименту и может быть объяснено как чисто химическими, так и физическими причинами. Так, смена химического состава и кислотности (рН) раствора может приводить к изменению размера белковых молекул, неконтролируемому осаждению примесей и т. п. С другой стороны, как следует из более сложной теоретической модели, при большой (порядка длины волны) суммарной толщине присоединенных биослоев и существенном различии показателей преломления биослоев и подложки имеет место сла-

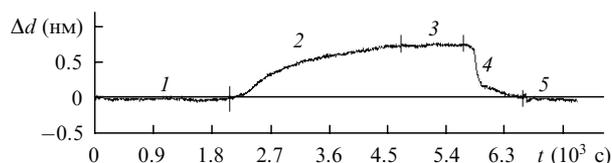


Рис.7. Сенсограмма хода адсорбции и десорбции иммуноглобулина человека hIgG на поверхности чувствительного слоя, содержащего биотинилированные козы антигена, специфичные к hIgG и иммобилизованные к стеклу через биотин – стрептавидиновую связку: 1, 3 и 5 – промывка буфером PBS, содержащим 0.05 % детергента Твин 20; 2 – прокачка раствора иммуноглобулина hIgG с концентрацией 1 мкг/мл в том же буфере со скоростью 15 мкл/мин; 4 – десорбция молекул hIgG при пропускании через кювету буферного раствора с рН 2.2.

бая зависимость выходного сигнала от показателя преломления раствора. Более детальное выяснение данного вопроса выходит за рамки настоящей работы.

Другая серия экспериментов, типичная сенсограмма которых показана на рис.7, проводилась по следующей схеме. Вначале стрептавидин также в потоке связывался с биотинилированной поверхностью стекла. После промывки буфером PBS через кювету пропускаться раствор биотинилированных козых антител, специфичных к иммуноглобулину человека hIgG. Таким образом, к моменту начала записи приведенной на рис.7 сенсограммы на поверхности чувствительного элемента были иммобилизованы антитела на hIgG.

На участках 1, 3 и 5 через кювету пропускаться буферный раствор PBS, содержащий 0.05 % детергента Твин 20. Прокачка раствора осуществлялась с постоянной скоростью 15 мкл/мин. На участке 2 в кювету поступал раствор иммуноглобулина hIgG с концентрацией 1 мкг/мл в том же буфере. Из сенсограммы видно, что при этом наблюдается прирост толщины адсорбированного слоя на 0.75 нм, что обусловлено специфической реакцией связывания hIgG с антителами на hIgG. При последующем пропускании через кювету буферного раствора (участок 3) уменьшения толщины адсорбированного слоя не происходило. Участок 4 соответствовал пропусканию кислого буферного раствора с рН 2.2. При этом наблюдалась десорбция молекул hIgG. Серия контрольных опытов с разными биокомпонентами показала отсутствие неспецифического связывания и отсутствие сигнала.

Таким образом, на рис.7 показан ход реакции белок – антитело и ее обратимость. Оцененный из сенсограммы уровень шума (среднеквадратичное отклонение) используемой экспериментальной схемы составлял примерно 3 пм, что определяет разрешающую способность метода. Дрейф показаний прибора в ходе проведения эксперимента не превысил 15 пм/ч. Указанный дрейф является медленным процессом, его можно скорректировать как программными средствами, так и при дальнейшей отладке экспериментальной схемы, в том числе и за счет использования двух- или многоканальной модификации прибора на основе СФИ метода.

## Заключение

Предложенный новый СФИ метод регистрации и исследования поверхностных биохимических реакций в режиме реального времени является более простым и надежным, чем его известные аналоги, одновременно обла-

дая высокими чувствительностью и разрешающей способностью (3 пм). Кроме того, СФИ метод позволяет избежать паразитной чувствительности к дрейфам внешних параметров (показателя преломления и температуры растворов, цветовой температуры источников излучения и т. д.). Это открывает широкие возможности его дальнейшего технического совершенствования в отличие от других «безметочных» методов (например, от метода, использующего поверхностный плазмонный резонанс), где предел увеличения чувствительности определяется в основном стабилизацией температуры растворов или созданием разностных двух- или многоканальных схем, учитывающих термодрейфы [5]. СФИ метод может с успехом применяться в медицине и экологии, например для исследования проб на наличие токсических или инфекционных агентов, регистрации гибридизации ДНК, тестирования фармацевтических препаратов и пр.

Авторы выражают благодарность А.А.Белоглазову, В.М.Небусову и С.А.Грачеву за помощь в работе. Настоящая работа выполнена при частичной поддержке INTAS и РФФИ.

1. Liedberg B., Nylander C., Lundström I. *Sensors and Actuators*, **4**, 299 (1983).
2. Schuck P. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structures*, **26**, 541 (1997).

3. Кабашин А.В., Никитин П.И. *Квантовая электроника*, **24**, 671 (1997).
4. Nikitin P.I., Beloglazov A.A., Kochergin V.E., Valeiko M.V., Ksenevich T.I. *Sensors and Actuators B*, **54**, 43 (1999).
5. Nikitin P.I., Grigorenko A.N., Beloglazov A.A et al. *Sensors and Actuators A*, **81**, 189 (2000).
6. Cush R., Cronin J.M., Stewart W.J., Maule C.H., Molloy J.O., Goddard N.J. *Biosensors and Bioelectronics*, **8**, 347 (1993).
7. Lukosz W., Stamm C. *Sensors and Actuators A*, **25**, 185 (1991).
8. Heideman R.G., Lambeck P.V. *Sensors and Actuators B*, **61**, 100 (1999).
9. Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W. *Sensors and Actuators B*, **11**, 21 (1993).
10. Борн М., Вольф Э. *Основы оптики* (М., Наука, 1970).

**P.I.Nikitin, B.G.Gorshkov, M.V.Valeiko, S.I.Rogov. Spectral phase interference method for detection of biochemical reactions on a surface.**

A simple optical method is proposed for the direct detection of biochemical reactions on a surface, which is insensitive to variations in the emission intensity and refractive index of a solution. The method is based on the detection of the spectrum of reflected or transmitted emission modulated by the interference in a sensitive layer of a large thickness (several tens and hundreds of microns), which can be a microscope cover glass with a deposited receptor layer. A change in the phase of the interference pattern in this spectrum is used as an information signal about a change in the thickness of the sensitive layer caused by a biochemical reaction. The method was tested in studies of the reactions of binding and detachment of proteins in real time. The root-mean-square noise of the method converted to the layer thickness is 3 pm.