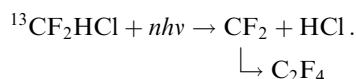


также найденные технические и конструктивные решения были широко использованы при разработке промышленного процесса ЛРИ углерода.

4. Лазерное разделение изотопов углерода

В природе существует два стабильных изотопа углерода ^{13}C и ^{12}C с естественным содержанием $\approx 1,1\%$ и $\approx 98,9\%$, соответственно. Изотоп ^{13}C широко применяется в медицине для диагностики ряда заболеваний и в биологических исследованиях. Частота колебания С–F связи попадает в область перестройки CO_2 -лазера, что предопределило поиск рабочей молекулы среди фторорганических соединений. Наиболее подходящей молекулой для крупномасштабного ЛРИ изотопов углерода оказалась молекула CF_2HCl (фреон-22). Величина изотопного сдвига в колебании ν_3 ($1107,6\text{ см}^{-1}$) и ν_8 ($1127,5\text{ см}^{-1}$) относительно изотопов углерода составляет $\Delta\nu_{\text{is}} \approx 20\text{ см}^{-1}$. Это позволяет легко настраиваться на полосу поглощения молекулы $^{13}\text{CF}_2\text{HCl}$ и селективно ее диссоциировать излучением CO_2 -лазера. При ИК МФД CF_2HCl образуются радикалы CF_2 , которые затем рекомбинируют в C_2F_4 :



Эта молекула обеспечивает высокие значения ПЭАР при умеренных значениях плотности потока лазерного излучения $\Phi = 5\text{--}10\text{ Дж см}^{-2}$. Выход ИК МФД целевого изотопа составляет $(1\text{--}10)\%$. Селективность в зависимости от условий облучения может достигать значений $\alpha(13/12) = 10^2\text{--}10^3$. Существенно, что при этом рабочее давление CF_2HCl может составлять несколько десятков торр. Еще одно важное обстоятельство — фреон-22 является достаточно дешевым продуктом массового производства. После извлечения углерода ^{13}C он возвращается изготовителю, что решает проблему утилизации рабочего вещества и существенно улучшает экономические показатели процесса ЛРИ.

На основе ИК МФД CF_2HCl в России (Институт спектроскопии РАН, РНЦ "Курчатовский институт", ГНЦ ТРИНИТИ, НИИ электрофизической аппаратуры им. Д.В. Ефремова) была разработана промышленная технология ЛРИ углерода. В этой технологии разделительный реактор размещается внутри резонатора импульсно-периодического ТЕА (transversely excited atmospheric) CO_2 -лазера (лазер с поперечным разрядом). Такое размещение эквивалентно многопроходной кювете и обеспечивает высокий коэффициент использования излучения. Согласующая линза обеспечивает необходимое значение Φ в реакторе. Быстрая прокачка газа предотвращает нагрев рабочего вещества и, следовательно, ухудшение ПЭАР. Рабочим веществом является смесь CF_2HCl и N_2 . Последний используется для защиты оптических элементов и в качестве буферного газа — для повышения селективности. На основе этого подхода в компании "Газ-Ойл" (Калининград, Россия) был создан опытный завод по производству углерода ^{13}C [15].

В состав лазерного разделительного блока входит импульсно-периодический ТЕА CO_2 -лазер и разделительный реактор, где облучается рабочая смесь. Параметры этого CO_2 -лазера: частота повторения импульсов до 600 Гц ; энергия в импульсе до 3 Дж ; средняя мощность

до $1,8\text{ кВт}$. Облученная смесь подается в блок ректификации, где происходит выделение обогащенного тетрафторэтилена. В блоке конверсии этот C_2F_4 преобразуется в CO_2 , который отправляется потребителю. Созданный завод состоит из трех модулей с суммарной производительностью до $3\text{ г ч}^{-1}\text{ }^{13}\text{C}$ с содержанием до 40% . При необходимости дальнейшее обогащение до 99% производится традиционными методами. Разрабатывается чисто лазерный способ дообогащения.

5. Заключение

В результате выполненных исследований созданы физико-технические основы лазерного метода разделения изотопов на основе ИК МФД молекул. Разработана технология разделения изотопов углерода на основе ИК МФД молекул фреона-22 излучением импульсного CO_2 -лазера и создано промышленное производство обогащенного углерода ^{13}C . Успешная реализация процесса для изотопов углерода показывает возможность разработки промышленной технологии разделения изотопов и других элементов.

Список литературы

1. Летохов В С *Нелинейные селективные фотопроцессы в атомах и молекулах* (М.: Наука, 1983)
2. Bagratashvili V N, Letokhov V S, Makarov A A, Ryabov E A *Multiple Photon Infrared Laser Photophysics and Photochemistry* (Chur—London—Paris—New York: Harwood Academic Publ., 1985)
3. Летохов В С и др. *Лазерная спектроскопия колебательно-возбужденных молекул* (Отв. ред. В С Летохов) (М.: Наука, 1990)
4. Амбарцумян Р В и др. *Письма в ЖЭТФ* **20** 597 (1974)
5. Амбарцумян Р В и др. *Письма в ЖЭТФ* **21** 375 (1975)
6. Летохов В С, Рябов Е А, в *Изотопы: свойства, получение, применение* (Под ред. В Ю Баранова) (М.: ИздАТ, 2000) Разд. 7.4
7. Амбарцумян Р В и др. *Письма в ЖЭТФ* **23** 217 (1976)
8. Evseev A V, Letokhov V S, Puztetskii A A *Appl. Phys. B* **36** 93 (1985)
9. Лаптев В Б, Рябов Е А, Фурзиков Н П *ЖЭТФ* **89** 1534 (1985)
10. Амбарцумян Р В и др. *ЖЭТФ* **69** 1956 (1975)
11. Bagratashvili V N et al. *Appl. Phys.* **20** 231 (1979)
12. Doljnikov V S, Kolomisky Yu R, Ryabov E A *Chem. Phys. Lett.* **80** 433 (1981)
13. Лаптев В Б и др. *Хим. физ.* **4** 1626 (1985)
14. Велихов Е П и др. *Импульсные CO_2 -лазеры и их применение для разделения изотопов* (М.: Наука, 1983)
15. Baranov V Yu et al. *Proc SPIE* **4165** 314 (2000)

PACS numbers: 07.07.Df, 33.55.Ad, 87.14.Gg

Портативные оптические биосенсоры для определения биологически активных и токсичных соединений

О.Н. Компанец

1. Введение

Работа инициирована Ю.М. Евдокимовым из Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН) и выполнена совместно ИМБ РАН, Институтом спектроскопии РАН, Институтом биохимии Университета г. Мюнстер (ФРГ) и при поддержке со стороны ООО "Биоаналитические технологии" (БАТ) (на заключительной стадии разработки).

В 2003 г. научная общественность отметила 50-летие исключительно важного для науки события — раскрытия структуры ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком. Этим сообщением хотелось бы показать на примере описываемой разработки, как результаты фундаментальной науки трансформируются в новые технологии и приборы.

Основная направленность представляемой работы — охрана здоровья человека, конкретная цель — высокочувствительное (на генетически значимых уровнях) определение в жидкостях биологически активных и токсичных соединений — генотоксикантов. *Биологически активные и токсичные соединения* (БАТС) — это антибиотики, противоопухолевые и другие лекарственные препараты, тяжелые металлы, белки, биологически активные добавки, диоксины, пестициды, отравляющие вещества, депрессанты, наркотики и т.д. Исследуемые жидкости — кровь, плазма крови, моча, вода, различные физиологические и технологические растворы и т.п.

Оперативное определение наличия и концентрации в жидкости биологически активных веществ, являющихся своего рода *маркерами*, характеризующими состояние организма или технологического процесса, качество сырья и готовой продукции, качество пищевых продуктов, загрязнение окружающей среды генотоксикантами и т.д., необходимо для постановки точного диагноза и/или своевременного принятия управленческого решения. Поэтому основные области возможного применения оптических биосенсоров — медицинская клиническая диагностика, биохимический анализ, фармакология, биотехнологическая и пищевая промышленность, экологический контроль, научные исследования, учебные лаборатории.

Вообще говоря, для определения практически любых БАТС могут использоваться такие традиционные технологии, как химический анализ, биохимические анализаторы, разного рода спектрометры, хроматографы. Проблема заключается в том, что определение наличия и концентрации многих БАТС-маркеров этими методами требует большого времени (до нескольких суток), является процедурой дорогостоящей (до сотен долларов), а чувствительность и избирательность определения оказываются не всегда достаточными, в связи с чем возникает потребность в использовании других подходов, в частности, *биосенсоров*.

2. Что такое биосенсор

Сущность любого биосенсора [1, 2] составляют два основных элемента: это *биочувствительный элемент* (биодатчик), на котором протекает специфическая реакция "узнавания", когда только определенные соединения исследуемой смеси взаимодействуют с определенными характерными элементами биоспецифической поверхности биодатчика (например, встраиваются в них), и *преобразователь* генерируемого в этой реакции сигнала, функционально связанного с концентрацией определяемого соединения. Можно сказать и так: биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей — биохимического и физического, находящихся в тесном контакте.

В настоящее время в литературе встречается большое количество описаний устройств, использующих энзимы, нуклеиновые кислоты, клеточные рецепторы, антитела и целые клетки в комбинации с электрохимическими, оптическими, пьезоэлектрическими и термометриче-

скими преобразователями. Преимущества такого рода биосенсоров — высокая чувствительность, селективность определения, отсутствие пробоподготовки и особых требований к рабочим площадям, квалификации персонала, а также возможность быстрого получения результата анализа на месте; недостаток — указанные типы биодатчиков *не являются универсальными*.

3. Биодатчики на основе жидких кристаллов молекул ДНК

Чтобы преодолеть названный выше недостаток, Ю.М. Евдокимов с сотрудниками из ИМБ РАН предложили создать биодатчик на основе двухцепочечных нуклеиновых кислот [3, 4]. Почему?

1. Двухцепочечная ДНК (дцДНК) имеет уникальную особенность: различные группы веществ реагируют с ней по-разному, вызывая неодинаковую реакцию. Например, они могут встраиваться между азотистыми основаниями (интеркалировать в ДНК); встраиваться в бороздки между цепочками; расщеплять цепь; делать сшивки цепочек под разными углами, с разной жесткостью связей; пришиваться к ДНК, без отрыва или с отрывом ее азотистых оснований и т.д. Таким образом, двухцепочечная ДНК имеет исключительно развитую биоповерхность с разносторонней биоспецифичностью и потенциально является одним из самых универсальных биодатчиков.

2. Проведенные в ИМБ РАН фундаментальные исследования физико-химических и биологических свойств состояния ДНК, характерного для головок некоторых вирусных частиц, спермиев и хромосом простейших, показали, что это состояние молекул ДНК является *жидкокристаллическим* (подвижность молекул сочетается с пространственной упорядоченностью), причем могут существовать как макроскопические жидкокристаллические фазы ДНК, так и микроскопические частицы этих фаз.

Были обнаружены и получены методом "фазового исключения" разные пространственные формы фаз, в том числе холестерические жидкие кристаллы ДНК (жкДНК), образующиеся, например, при добавлении в водно-солевой раствор ДНК полиэтиленгликоля: энергетически свободным молекулам дцДНК становится более выгодным образовывать анизотропные фазы, чем изолированно существовать в растворе (рис. 1).

Каждый слой формируемой таким образом жидкокристаллической фазы ДНК состоит из ориентированных в одном направлении молекул с фиксированным расстоянием между ними, а направление ориентирования в слоях изменяется по спирали. Плотность упаковки молекул в такой жидкокристаллической капле размером 0,5 мкм весьма высока — более 10^4 молекул ДНК. Благодаря этим свойствам холестерической жидкокристаллической фазы ДНК ее оптическая активность оказывается аномально большой — в десятки и сотни раз превышающей оптическую активность изолированных молекул ДНК. Ее проявлением служит *аномальный сигнал оптического кругового дихроизма* (КД), определяемый как разность поглощения поляризованного по кругу излучения с противоположными направлениями вращения вектора поляризации, который регистрируется в УФ полосе поглощения составных элементов ДНК — азотистых оснований (хромофоров) на длине волны 270 нм.

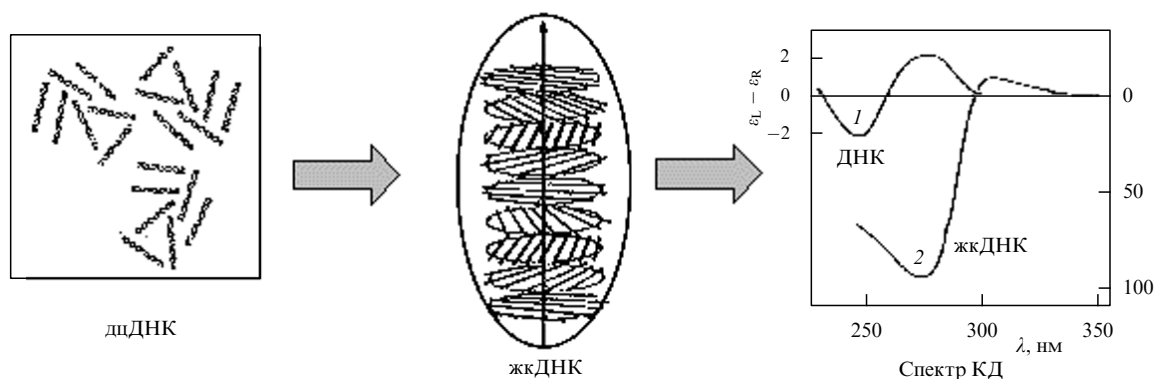


Рис. 1. Схема образования холестерической жидкокристаллической фазы ДНК и появления аномального сигнала КД.

3. Было доказано, что переход в жидкокристаллическое состояние не нарушает способности составных структурных элементов ДНК к "узнаванию" химических или биологически активных соединений, т.е. к образованию комплексов ДНК + БАТС, имеющих специфические свойства. Например, взаимодействие окрашенных антибиотиков или противоопухолевых соединений с азотистыми основаниями ДНК сопровождается появлением дополнительного аномального оптического кругового дихроизма в полосе поглощения этих соединений, что доказывает, что азотистые основания ДНК можно рассматривать как чувствительные элементы — *биодатчики*.

4. Было показано, что молекулы ДНК, "зажатые" в пространственной структуре частиц жидкокристаллической фазы, представляют собой строительные блоки, между которыми можно встраивать дополнительные чувствительные элементы, также меняющие свои свойства в ответ на присутствие в среде разных соединений (по технологии "молекулярного дизайна").

5. Характер спектра КД дает важный для практики *аналитический критерий*: а) если молекулы ДНК не повреждены и свободны от примесей, то для их жидких кристаллов всегда характерен показанный на рис. 1 спектр; б) сигнал КД комплекса ДНК + БАТС пропорционален концентрации взаимодействующих с жидкими кристаллами ДНК биологически активных и токсичных соединений.

Таким образом, было показано, что частицы жидкокристаллической холестерической фазы ДНК представляют собой миниатюрные (размером 0,5 мкм) оптические биодатчики, меняющие свои характеристики в ответ на действие БАТС, причем "различать" это действие можно при помощи достаточно простого критерия: величины, знака и спектрального максимума генерируемого при таком взаимодействии аномального кругового дихроизма.

4. Состав и принцип работы оптического биосенсора

В состав биосенсора [5] входят биодатчики на основе жкДНК, портативный дихрометр и методики определения различных БАТС, поддержанные программным обеспечением.

Биодатчик представляет собой молекулярную конструкцию на основе жидкокристаллической дисперсии нуклеиновых кислот или их комплексов, находящуюся в жидкой форме или включенную в структуру полимерного (гелевого или пленочного) носителя [6]. Молекуляр-

ная конструкция каждого вида рассчитана на определение некоторого класса БАТС. В пределах этого класса используется биодатчик одного типа в совокупности с методиками определения того или иного вещества. В настоящее время по технологии молекулярного конструирования синтезированы биодатчики для определения более 15 классов соединений (всего более 50 БАТС).

Приготовление пробы. Предварительно производят смешение анализируемой жидкости, содержащей БАТС, с нейтральным по отношению к ДНК полимером. Одновременно формируют жидкие кристаллы ДНК из линейных двухцепочечных молекул низкой молекулярной массы в водно-солевом растворе того же полимера. Смешивая раствор анализируемой жидкости в полимере с раствором ДНК в полимере, т.е. с жидкокристаллической дисперсией ДНК, получают исследуемую пробу.

Разработаны варианты биодатчика, в которых жкДНК иммобилизованы в специальных гидрогелях или в пленках с нанотвердотелами, обладающих абсолютной оптической нейтральностью и обеспечивающих сохранение работоспособности жидких кристаллов ДНК в течение длительного времени.

Определение БАТС. Для получения сигнала КД кювету, гидрогель или пленку с исследуемой пробой помещают в дихрометр и через них пропускают циркулярно поляризованное излучение с противоположно направленными векторами поляризации. Регистрируется оптический сигнал поглощения A на двух длинах волн, одна из которых находится в полосе поглощения жкДНК на длине волны 270 нм (реперный сигнал), а другая — в области поглощения БАТС.

О концентрации БАТС судят по величине отношения полученных сигналов, предварительно прокалибровывая дихрометр и выстроив с его помощью аналитическую кривую зависимости сигнала КД от концентрации БАТС.

5. Состав и особенности конструкции полифункционального дихрометра

В состав дихрометра [5, 7] входят источник широкополосного светового излучения (Хе-лампа), монохроматор, вырезающий узкополосный световой поток с заданной длиной волны, поляризатор (призма Глана), модулятор поляризации, пройдя который линейно поляризованное излучение становится циркулярно поляризованным с периодически изменяющимся направлением



Рис. 2. Высокочувствительный портативный дихрометр СКД-2 с расширенным спектральным диапазоном (200 – 750 нм).

вращения вектора поляризации, кювета с исследуемым образцом, фотоумножитель и персональный компьютер (рис. 2).

Проходя через исследуемый образец, обладающий свойством аномального кругового дихроизма, световой поток становится модулированным по интенсивности, благодаря чему на выходе ФЭУ возникает электрический сигнал, переменная составляющая которого ΔA на частоте модуляции поляризации излучения пропорциональна величине сигнала КД. С выхода ФЭУ сигнал поступает на вход цифровой системы регистрации и после усиления, фильтрации и преобразования в цифровой код передается в компьютер. Интерфейсная плата на основе микроконтроллера осуществляет необходимое взаимодействие всех узлов прибора, сбор и предварительную обработку сигнала КД, передачу данных в компьютер, а также тестирование параметров всех систем дихрометра.

Управление работой прибора осуществляется с помощью программного пакета, осуществляющего различные режимы работы биосенсора и поддерживающего библиотеку методик для определения различных БАТС, благодаря чему пользователь имеет возможность выбрать из меню то вещество, определение концентрации которого требуется в данный момент, после чего программа в режиме диалога "ведет" исследователя через все действия, предписанные методикой, и выдает результат в виде значения концентрации в исследуемом образце выбранного соединения.

Использование методики двух длин волн подразумевает возможность их быстрого переключения. Для реализации такого режима в монохроматоре дихрометра используется оригинальный гальванометрический сканатор-позиционер, обеспечивающий возможность поворота и установки дифракционной решетки в широком спектральном диапазоне с высокими точностью ($\sim 10^{-4}$) и быстродействием (0,2 с).

С целью разработки портативного устройства спектральное разрешение монохроматора было оптимизировано, а число его оптических элементов для увеличения пропускания было сведено к минимуму, что привело к упрощению конструкции дихрометра в целом, его компактности, мобильности и простоте обслуживания. В частности, удалось обеспечить максимальный световой поток, используя источник света относительно небольшой мощности, благодаря чему исчезла необходимость в охлаждении устройства водой или газообразным азотом. Несмотря на то, что габариты дихрометра в 3 раза

меньше габаритов коммерческих дихрометров известных фирм, а вес в 5–7 раз меньше, детектирующая способность портативного дихрометра $\Delta A/A$ оказалась лучше в 2–3 раза.

6. Характеристики дихрометра и оптического биосенсора

Ниже приводятся различные характеристики описанного устройства. В таблицах 1, 2 в скобках в правом столбце приведена величина улучшения в разы аналогичных характеристик прототипа — спектрополяриметра J-810 японской фирмы Jasco.

Таблица 1. Характеристики дихрометра

Спектральная область	250 (200)–750 нм	
Спектральное разрешение	3 нм	
Время перестройки длины волны между крайними точками спектрального диапазона	0,5 с	(6)
Диапазон регулирования температуры образца	12–80 °C	(+)
Размеры спектрального блока	500 × 330 × 170 мм	(2)
Масса спектрального блока	14 кг	(6)
Минимальный детектируемый сигнал КД ($\Delta A/A$)	3×10^{-7}	(3)

Таблица 2. Характеристики оптического биосенсора

Пределы обнаружения БАТС	$10^{-7} - 10^{-14}$ моль л ⁻¹	(> 100)
Время одного пробоопределения	10–20 мин	(> 100)
Эксплуатационные затраты	1,5 долл./ч	(~ 5)
Себестоимость одного пробоопределения	0,4 долл.	(> 10)

Проверка работы дихрометра на примере определения в ИМБ РАН разных соединений (от солей тяжелых металлов до антибиотиков и белков одного из противоопухолевых соединений) в плазме крови показала высокую эффективность оптического биосенсора "жидкокристаллический биодатчик – портативный дихрометр".

Преимущества разработанного оптического биосенсора — возможность непосредственного определения наличия и концентрации практически любого БАТС, определение большого числа различных соединений с помощью однотипных биодатчиков, высокая чувствительность и избирательность, малое время и низкая стоимость анализа, компактность, мобильность, отсутствие необходимости в воде и газообразном азоте, возможность работы персонала, не имеющего высокой квалификации.

Созданный оптический биосенсор не имеет аналогов по принципу действия. Новизна совместной разработки ИМБ РАН и ИСАН подтверждена патентами РФ, США, ЕС, Германии, золотыми медалями международной выставки инноваций "Эврика – Брюссель-2001" и Президиума РАН (2002 г.), гран-при Конкурса русских инноваций (2003 г.).

7. Текущее состояние разработки и направления исследований

Использование биодатчиков разных типов (для определения соответствующих классов БАТС) и портативного дихрометра осуществляется в соответствии со специально разработанными методиками, содержащими после-

довательность действий, гарантирующую получение качественного результата измерения. В настоящее время в ИМБ РАН разработаны или находятся в состоянии разработки методики определения следующих БАТС: окрашенных антрациклиновых и антрахиновых противоопухолевых соединений; гепарина в крови; общего белка; аминокислот, метаболитов физиологически важных аминокислот; аскорбиновой кислоты; соединений, расщепляющих хитозан, а также методика определения "вода не пригодна для питья".

Разработанные методики формируют библиотеку определяемых соединений и соответствующих им биодатчиков.

Четыре портативных дихрометра, изготовленных в ИСАН, используются в лабораториях РАН и РАМН для разработки новых типов биодатчиков и методик определения БАТС с целью расширения областей применения биосенсора. Первая опытная партия из 10 приборов, изготовленных на экспериментальном заводе научного приборостроения РАН (Черноголовка, Московская обл.), также предназначена для исследовательских целей.

В настоящее время ИМБ РАН, ИСАН и ООО "БАТ" реализуют следующие направления исследований и разработок в области создания оптических биосенсоров:

— разработка новых типов биодатчиков на основе жидких кристаллов ДНК, методик определения разнообразных БАТС, в том числе при анализе многокомпонентных соединений;

— совершенствование полифункционального дихрометра, его автоматизация и миниатюризация на основе

МЕОМ-технологий (от англ. Micro-Electro-Opto-Mechanical);

— разработка компактных специализированных версий дихрометра;

— разработка новых комбинированных приборов дихрометр + фурье-спектрометр, дихрометр + флуориметр, хроматограф + дихрометр и др.

Список литературы

1. Будников Г К *Соросовский образовательный журн.* (12) 26 (1996)
2. Варфоломеев С Д *Соросовский образовательный журн.* (1) 45 (1997)
3. Евдокимов Ю М и др. *Биофизика* **35** 731 (1990)
4. Евдокимов Ю М, Скуридин С Г, Чернуха Б А *Биотехнология* (5) 103 (1992)
5. Евдокимов Ю М, Скуридин С Г, Чернуха Б А, Михайлов Е Л, Компанец О Н, Романов С Н, Колосов В В "Способ определения в анализируемой жидкости биологически активного вещества и устройство для его осуществления", Патент РФ № 2107280 (1998), Приоритет от 15.11.1996; Патент США US 6,246, 470 B1 (2001), Приоритет от 14.11.1997
6. Евдокимов Ю М, Скуридин С Г "Молекулярная конструкция на основе жидкокристаллической дисперсии нуклеиновой кислоты как интегральный биодатчик и способ ее создания", Патент РФ № 2139933, Приоритет от 26.11.1998
7. Компанец О Н, Евдокимов Ю М, Шпенер Ф "Устройство и методика оценки и определения биологически активных веществ", Патент ФРГ № 100 35 79 C2 на полезную модель (2002), Приоритет от 21.07.2000