

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037886**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.01

(51) Int. Cl. **G01N 21/65** (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Номер заявки
201592123

(22) Дата подачи заявки
2014.05.08

(54) **СПОСОБ ИЗМЕРЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С РАКОМ ВЕЩЕСТВ ПОСРЕДСТВОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА И БИОЧИП, ПРИМЕНЯЕМЫЙ В УКАЗАННОМ СПОСОБЕ**

(31) **2013-098608**

(56) WO-A1-2013065747
JP-A-2013133475
WO-A1-2012033097
WO-A1-2010101209
JP-A-2007525662
JP-A-200914491

(32) **2013.05.08**

(33) **JP**

(43) **2016.06.30**

(86) **PCT/JP2014/062318**

(87) **WO 2014/181816 2014.11.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МИТЕК КО., ЛТД. (JP)

(72) Изобретатель:
**Ито Хироаки, Хасегава Юки,
Хасегава Кацуюки (JP)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к способу измерения связанных с раком веществ, включая свободную ДНК, происходящую от раковых клеток, посредством спектроскопии комбинационного рассеяния света. Для этого способа измерений характерно включение этапов обеспечения биочипа с мезокристаллической областью из оксидов серебра, содержащей перекись серебра, добавления по каплям сыворотки крови или раствора биологического образца к мезокристаллической области упомянутого биочипа, избирательного захвата связанных с раком веществ, имеющих положительный заряд в образце, облучения возбуждающим лазерным светом захваченных связанных с раком веществ и последующего определения комбинационного рассеяния света, при этом дают оценку раковым заболеваниям на основе интенсивности усиленного поверхностью комбинационного рассеяния света. В спектре комбинационного рассеяния, кроме свойственной для углерода D-полосы и G-полосы, можно определить характерный пик для спектра связанного с раком вещества вблизи 2900 см^{-1} , волнового числа, характерного для метиловой группы. Кроме того, в изобретении раскрыт биочип, применяемый в указанном способе.

037886 B1

037886 B1

Область техники

Изобретение относится к способу измерения связанных с раком веществ, концентрация которых повышается в крови по мере прогрессирования рака, что включает главным образом свободную ДНК (ДНК, намотанную на гистоны) в качестве цели измерений посредством спектроскопии комбинационного рассеяния света, а также к биочипу, применяемому в указанном способе.

Уровень техники

Способ измерения связанного с раком вещества, концентрация которого повышается в крови по мере прогрессирования рака, до сих пор используют как один из методов диагностики рака. Связанные с раком вещества, относящиеся к белкам и подобным веществам, которые являются специфическими для рака веществами, выделяемыми из биологической жидкости раковых больных, и которые, как правило, выделяются в кровь при разрушении раковых клеток. Согласно предыдущим методам диагностики рака, возможность того, что испытуемый или больной страдает от рака, определяют, когда обнаруживаемая в крови концентрация связанного с раком вещества больше заданной величины.

Таким образом, так как связанное с раком вещество выделяется в кровь посредством разрушения раковых клеток, известно, что не только белки, но также ДНК может быть выделена в кровь. И при сравнении здоровых пациентов и раковых больных отмечали, что количество свободной ДНК (циркулирующей опухолевой ДНК), попавшей в кровь из раковых клеток, значительно выше у раковых больных, чем у здоровых индивидуумов. Таким образом, считают, что, определяя количество свободной ДНК от раковых клеток в биологической жидкости, такой как кровь, можно диагностировать наличие рака. В качестве такого способа диагностики рака предложены, например: 1) способ, при котором диагностируют рак в случае обнаружения ДНК в 200 пар оснований и более, амплифицируемой с помощью полимеразной цепной реакции (ПНР) и подобными методами, в биологической жидкости или кале, выделенных из организма, и при необходимости проводят дополнительный анализ мутации в ДНК (Патентный документ 1 и 2); и 2) способ количественного определения геномной ДНК, содержащейся в биологической жидкости, и дополнительного проведения анализа ДНК в случае, если количество геномной ДНК превысит заранее заданную величину (Патентный документ 3). Кроме того, даже если у пациента диагностирован рак, простой количественный анализ ДНК в биологических жидкостях не способен идентифицировать страдающий от рака орган. Известно, что при возникновении рака и его прогрессировании происходит специфическая мутация в ДНК в зависимости от первоначальной локализации рака. Следовательно, выяснив тип мутации в ДНК, станет возможным идентифицировать орган или место развития рака. В настоящей заявке в качестве "мутаций ДНК" перечислены точечные мутации ДНК, а также структурные нарушения, такие как приобретение или утрата хромосом. Например, известно, что примерно в 70% случаев рака предстательной железы точечная мутация возникает в гене K-ras. Также в ходе изучения потери гетерозиготности сообщалось, что потеря специфических хромосомных плеч зависит от типа рака, например известно, что область потери гетерозиготности сконцентрирована на коротком плече хромосомы 3 в случае рака легких. Также известно об амплификации длинного плеча хромосомы 8 и амплификации гена RB2 при раке груди. Таким образом, чтобы предоставить улучшенный способ диагностики рака с высокой точностью количественного определения ДНК из раковых клеток, был предложен способ диагностирования рака, который включает этап экстрагирования свободной ДНК из плазмы, собранной у пациента; этап расчета количества свободной ДНК на единицу объема экстрагированной плазмы путем количественного определения свободной ДНК; этап сравнения расчетного количества свободной ДНК больше со второй пороговой величиной, чем с первой пороговой величиной; этап постановки диагноза, заключающийся в следующем: пациент имеет высокую вероятность наличия рака, когда расчетное значение ниже, чем первая пороговая величина, тогда как если предыдущий предел больше чем вторая пороговая величина, то некоторое количество ДНК из нормальных клеток попало и смешалось в плазме (Патентный документ 4).

Уровень техники

Патентная литература.

Патентный документ 1: патент США № 6143529.

Патентный документ 2: патент США № 2004/0259101 A1.

Патентный документ 3: WO 2008/090930.

Патентный документ 4: патентная публикация № 2011-81001.

Однако, например, даже если бы авторы настоящего изобретения попытались количественно определить свободную ДНК, происходящую от раковых клеток, в цельной крови, принимая во внимание следовые количества содержащейся в ней свободной ДНК, большое количество ДНК поступает от лимфоцитов, принадлежащих к нормальным клеткам. Соответственно, даже если можно напрямую экстрагировать ДНК из цельной крови, то сложно количественно определить свободную ДНК, происходящую конкретно от раковых клеток. Таким образом, например, считают, что при использовании плазмы, которая была отделена от цельной крови, обеспечивают способ количественного определения свободной ДНК, происходящей от раковых клеток, в плазме, но в зависимости от способа экстрагирования ДНК, ДНК от нормальных клеток, таких как лимфоциты, может быть включена в состав свободной ДНК от раковых клеток, так что определяют совместно количество не только свободной ДНК из раковых клеток, но также

ДНК из нормальных клеток, в результате чего ставят ошибочный диагноз о наличии рака. Следовательно, в процессе постановки точного диагноза в отношении рака важно точно определить количество свободной ДНК (далее называемой ДНК, намотанной на гистоны, согласно настоящему изобретению), происходящей от раковых клеток, поэтому необходимо предложить руководство для простой и быстрой экстракции свободной ДНК и руководство для удаления ДНК, происходящей от нормальных клеток, чтобы улучшить точность обнаружения свободной ДНК от раковых клеток, а также руководство для определения следовых количеств ДНК точно для соответствующего диагноза в отношении рака.

Кроме того, спектроскопию комбинационного рассеяния света применяют для анализа следовых количеств ДНК в крови, и она является перспективным средством для качественного и количественного определения, но для эффекта усиленного поверхностью комбинационного рассеяния света (SERS) характерно не только это, 1) его механизм полностью не выяснен, а также 2) это однозначно сложно синтезировать и контролировать наноматериалы с заданной структурой для SERS, 3) существует множество нерешенных проблем касательно воспроизводимости и надежности способа из-за изменения эффективности усиления посредством направления поляризации и длины волны возбуждающего света, используемой во время измерения спектра, что остается большой проблемой для практического применения эффекта SERS, включая разработку и промышленный выпуск биосенсора. Таким образом, была предложена гибридная структура из нанопроводов и наночастиц для усиления сигналов SERS биологических экстрактов, белков и биомолекул, таких как ДНК, и для улучшения воспроизводимости, чувствительности и надежности измерения сигналов SERS (Патентный документ 4). Однако гибридную структуру из нанопроводов и наночастиц используют для захвата измеряемого объекта с помощью неких рецепторов, так что это все же не подходит в качестве способа определения следовых количеств свободной ДНК от раковых клеток.

Краткое описание изобретения

Техническая задача.

После досконального изучения упомянутых выше проблем авторы настоящего изобретения обнаружили, что требуемой целью для прямого определения должны быть связанные с раком вещества, такие как свободная ДНК, происходящая от раковых клеток, количество которых возрастает в крови по мере прогрессирования рака, когда опухоль чувствительна, и считают, что лучше всего определять свободную ДНК напрямую, не используя рецепторы.

В настоящей заявке определяемая свободная ДНК является ДНК, намотанной на белки, называемые гистонами, у которой 1 намотанная структурная единица называется нуклеосомой, и структура, представляющая нить собранных нуклеосом, называется хроматином (волокна). И когда клетки переродились в злокачественные и постоянно делились, ДНК переходит в состояние, облегчающее намотку вокруг гистонов, так чтобы не были доступны гены (ген-супрессор опухолевого роста), неприемлемые для роста опухоли, и намотка ДНК на гистон становится более плотной посредством метилирования, так чтобы усложнить размотку ДНК с гистона. Как правило, гистоны заряжены положительно (+), тогда как ДНК заряжена отрицательно (-), так что они держатся как магниты, и метилирование способствует тому, что их нелегко разъединить, где метилированная ДНК, намотанная вокруг гистонов, становится положительно (+) заряженной (см. фиг. 11 (a)). С другой стороны, ацетилирование изменяет заряд гистонов на отрицательный (-), так что ДНК с отрицательным (-) зарядом начинает отталкиваться от гистонов, заряд которых стал отрицательным (-) посредством ацетилирования, в результате чего происходит экспрессия генов из-за механизма разматывания "нити" ДНК с гистонов (см. фиг. 11(b)). Таким образом, предполагается, что субстрат, который адсорбирует или захватывает связанные с раком вещества с положительным (+) зарядом в образце, предпочтительно имеет отрицательный (-) заряд в образце для анализа для того, чтобы селективно адсорбировать или захватывать свободную ДНК, происходящую от раковых клеток, в виде намотанной вокруг гистонов ДНК.

Решение проблемы.

В то же время авторы настоящего изобретения обнаружили, что на металлическом субстрате, имеющем менее положительный электрохимический потенциал (большую склонность к ионизации), чем у металла, образующего металлокомплекс в водном растворе металлокомплекса, происходит электрохимическое восстановление из-за разницы в электрохимических потенциалах между металлическим субстратом и металлокомплексом с осаждением и агрегацией металлокомплекса из водного раствора на металлический субстрат с образованием квантовых кристаллов (наноразмерных кристаллов металлокомплекса). В случае комплекса серебра квантовые кристаллы комплекса серебра могут быть образованы в результате электрохимического восстановления на меди или медном сплаве с менее положительным электрохимическим потенциалом (большой склонностью к ионизации), чем у серебра в водном растворе тиосульфата серебра. В частности, концентрацию металлокомплекса в водном растворе должны определять главным образом с учетом размера образуемых квантовых кристаллов и, в случае применения диспергирующей добавки, с учетом концентрации добавки. Тогда как применяемая концентрация комплекса, как правило, может быть от 100 до 5000 мг/дм³, предпочтительно использовать концентрацию 500-2000 мг/дм³ для приготовления наноразмерных кристаллов, называемых нанокластерами, в зависимости от функциональных свойств лиганда. Металлокомплекс, образуемый в виде квантового кристалла, мож-

но выбрать с константой стабильности комплекса ($\log\beta$) по формуле (I), коррелирующей с электрохимическим потенциалом E металлического субстрата.

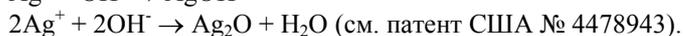
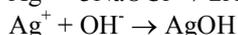
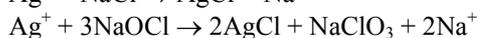
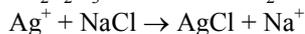
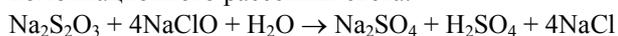
Формула (I):

$$E^{\circ} = (RT / |Z| F) \ln (\beta_i),$$

где E° - стандартный электрохимический потенциал; R - газовая постоянная; T - абсолютная температура; Z - заряд иона; F - постоянная Фарадея.

Если металлокомплекс выбирают из группы, состоящей из плазмонных металлов, таких как Au, Ag, Pt и Pd, плазмонные металлы обладают свойством эффекта усиления локализованного поверхностного плазмонного резонанса для комбинационного рассеяния света. В частности, когда металлокомплекс представлен комплексом серебра, он может быть образован в ходе реакции комплексообразователя серебра с константой стабильности (константой образования) ($\log \beta_i$) в 8 или более с галогенидом серебра, где галогенидом серебра может быть выбран предпочтительно галогенид, а комплексообразователь может быть выбран предпочтительно из группы, состоящей из соли тиосульфата, соли тиоцианата, соли сульфита, соли тиомочевины, соли иодида калия, соли тиосалициловой кислоты и соли тиоциануровой кислоты. В случае комплекса серебра получающийся квантовый кристалл имеет квантовые точки, образованные нанокластерами, со средним диаметром 5-20 нм, так что размер квантового кристалла будет в пределах 100-200 нм.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что подобный комплекс серебра при помощи щелочной обработки в присутствии галогеновых ионов (например, обработки гипохлоритом натрия) можно превратить в соответствии со следующей реакцией в нанокристаллы композита из оксидов серебра, содержащего перекись серебра и галогенид серебра в качестве ядер (см. фиг. 9), который показывает отрицательный (-) заряд в воде, тогда как ДНК, намотанная вокруг гистонов, показывает положительный (+) заряд (фиг. 11 (а)), так что связанное с раком вещество, представленное свободной ДНК с положительным зарядом, оказывается селективно адсорбированным. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что игольчатые нанокристаллы композита из оксидов серебра, содержащего перекись серебра, могут быть восстановлены с помощью облучения возбуждающим лазерным лучом до металлического серебра, в результате чего металлическое серебро проявляет эффект поверхностного плазмонного усиления при облучении лазерным лучом и, таким образом, связанные с раком вещества, представленные захваченной свободной ДНК, становятся доступными для обнаружения посредством усиленного поверхностно-комбинационного рассеяния света.



В основе настоящего изобретения лежат упомянутые выше полученные данные, и согласно настоящему изобретению предложен биочип для измерения связанных с раком веществ, данный биочип имеет область, содержащую композит из игольчатых нанокристаллов оксида серебра, содержащих галогенид серебра или галоген, который способен показывать отрицательный (-) заряд в воде, чтобы адсорбировать связанные с раком вещества, имеющие положительный (+) заряд, и образовывать после этого комплекс с переносом заряда. С другой стороны, композит из игольчатых нанокристаллов оксида серебра может быть превращен в наночастицы металлического серебра посредством облучения лазерным лучом с получением области, где лазерным облучением достигают эффекта поверхностного плазмонного усиления.

Преимущества изобретения.

Композит из игольчатых нанокристаллов оксида серебра согласно настоящему изобретению, в котором оксид серебра содержит перекись серебра, самособирающихся в нейроноподобную трехмерную суперструктуру (далее называемую мезокристаллом согласно настоящему изобретению) (фиг. 12 и 13), хотя Ag/AgCl-электрод подвергают электролизу при контролируемом потенциале в водном растворе ионов серебра, чтобы получить мезокристалл оксида серебра, содержащего перекиси серебра. Квантовые кристаллы комплекса серебра, например квантовые кристаллы тиосульфата серебра, подвергают щелочной обработке растворами гипохлорита натрия в присутствии галогеновых ионов для получения мезокристаллов оксида серебра.

Согласно настоящему изобретению, применение биочипа согласно настоящему изобретению обеспечивает такое преимущество, как анализ комбинационного рассеяния света биологическими образцами, содержащими кровь, что делает возможным количественное определение связанных с раком веществ, например, свободной ДНК. В частности, при применении игольчатых нанокристаллов композита из оксида серебра, содержащего галогенид серебра или галоген, то есть биочипа с мезокристаллической областью оксида серебра, содержащего перекись серебра (фиг. 12 и 13), сыворотку или образец биологической жидкости капают на биочип, так что связанные с раком вещества в сыворотке могут быть избирательно захвачены, потому что связанные с раком вещества имеют положительный заряд в образце. Ком-

бинационное рассеяние света от связанных с раком веществ далее увеличивают при помощи эффекта SERS и определяют. Таким образом, возможно определение ракового заболевания по интенсивности усиленного поверхностью комбинационного рассеяния света.

Связанные с раком вещества в сыворотке включают ДНК, происходящую от раковых клеток и нмотанную вокруг гистона (называемая свободной ДНК согласно настоящему изобретению), нуклеосому (1 структурная единица) и хроматин (волокна), которые представляют собой нитевидную структуру из нуклеосом. Несмотря на то что сыворотка включает глобулин, имеющий положительный заряд, увеличение концентрации глобулина составляет максимум два раза или менее и, так как прогрессирование рака может привести к повышению концентрации связанных с раком веществ, определяемых биочипом согласно настоящему изобретению, в 100 раз или более, это свидетельствует об определении увеличения концентрации связанного с раком вещества (свободной ДНК из раковых клеток). Более того, ДНК, покидающая нормальные клетки, ДНК, отсоединяющаяся от гистонов из-за ацетилирования, и альбумин составляют все вместе приблизительно 60% сыворотки, однако, их функция переносить отрицательный заряд, они не будут захвачены при практическом применении настоящего изобретения. Таким образом, это служит преимуществом для количественного исследования связанных с раком веществ.

Более того, игольчатые нанокристаллы, применяемые при практическом применении настоящего изобретения (мезокристаллы оксида серебра, содержащие перекись серебра), имеют склонность к быстрому приобретению отрицательного заряда в водных растворах, и, следовательно, получаем, что мезокристаллы согласно настоящему изобретению могут образовывать комплекс с переносом заряда при контакте с молекулами-мишенями, такими как связанные с раком вещества. Более того, оксид серебра при получении световой энергии восстанавливается и превращается в результате в металлическое серебро, и, таким образом, на мезокристаллах можно наблюдать эффект усиления поверхностного плазмонного резонанса, характерный для регулярно упорядоченных металлических наночастиц. Таким образом, мезокристалл (игольчатые нанокристаллы) согласно настоящему изобретению, несмотря на то что является неметаллическим соединением, наделен одновременно металлическими свойствами и ионизирующими способностями, и, таким образом, согласно настоящему изобретению предложены подходящие биочипы для измерения усиленного поверхностью комбинационного рассеяния света.

Металлокомплекс, образующий квантовый кристалл, выбирают с константой стабильности комплекса ($\log \beta$) по формуле (I), коррелирующей с электрохимическим потенциалом E нанесенного металла. Формула (I):

$$E^{\circ} = (RT / |Z| F) \ln (\beta_i),$$

где E° - стандартный электрохимический потенциал; R - газовая постоянная; T - абсолютная температура; Z - заряд иона; F - постоянная Фарадея.

В случае если металлокомплекс выбирают из группы, состоящей из плазмонных металлов, таких как Au , Ag , Pt и Pd , плазмонные металлы обладают свойством эффекта усиления локализованного поверхностного плазмонного резонанса для комбинационного рассеяния света. В частности, когда металлокомплекс представлен комплексом серебра, он может быть образован в ходе реакции комплексообразователя серебра с константой стабильности (константой образования) ($\log \beta_i$) в 8 или более с галогенидом серебра, где галогенидом серебра может быть выбран предпочтительно галогенид, а комплексообразователь может быть выбран предпочтительно из группы, состоящей из соли тиосульфата, соли тиоцианата, соли сульфита, соли тиомочевины, соли иодида калия, соли тиосалициловой кислоты и соли тиоциануровой кислоты. В случае комплекса серебра получающийся квантовый кристалл имеет квантовые точки, образованные нанокластерами, со средним диаметром 5-20 нм, так что размер квантового кристалла будет в пределах 100-200 нм.

Концентрация металлокомплекса в водном растворе должны определять с учетом главным образом размера квантовых кристаллов и, в случае применения диспергирующей добавки, с учетом соответственно концентрации добавки. Как правило, хотя применяемая концентрация металлокомплекса может быть от 100 до 5000 мг/дм³, предпочтительно использовать концентрацию 500-2000 мг/дм³, когда желательно приготовить наноразмерные частицы, называемые нанокластерами, в зависимости от функциональных свойств лиганда.

Предполагается, что квантовые кристаллы, образующиеся на металлическом субстрате или металлических частицах, вероятно имеют положительную полярность в водных растворах как кристаллы металлокомплекса, и, чтобы поспособствовать адсорбции белка в биологическом образце, полярность регулируют предпочтительно посредством щелочной обработки в присутствии ионов галогенидов, например, путем нанесения по каплям раствора гипохлорита натрия с рН 11 или выше. Тем самым квантовые кристаллы перекристаллизовывают, чтобы они имели не только отрицательную полярность в водном растворе, но также чтобы образовывали композит с игольчатой нанокристаллической структурой, содержащий оксид серебра, включая перекиси, на котором возможно облегчить иммобилизацию свободной ДНК в образце связанных с раком веществ, происходящих от раковых клеток и имеющих положительный заряд.

Общую концентрацию белка в биологическом образце можно измерить посредством получения спектра комбинационного рассеяния света биологическим образом в результате облучения лазерным

лучом со специфической длиной волны. На фиг. 3 показан спектр комбинационного рассеяния света, где образец сыворотки от больных колоректальным раком разбавлен в 10, 100, 500, 1000 и 10000 раз чистой водой и измерен с помощью лазера с длиной волны 633 нм (30мВ) с получением величины роста пика и значения площади пика, которые меняются в зависимости от концентрации. Таким образом, нетрудно понять, что можно провести количественный анализ общего белка в сыворотке. В спектре комбинационного рассеяния света наблюдают характерные пики в углерод-специфичной G-полосе (вблизи 1300-1400 см^{-1}) и D-полосе (вблизи 1550-1600 см^{-1}), а также можно наблюдать пик вблизи 2900 см^{-1} , волновое число, специфичное для метиловой группы. Выявление рассмотренных выше пиков в спектре комбинационного рассеяния предполагает, что возможно определять ДНК в метилированном состоянии, намотанную вокруг гистонов, как связанное с раком вещество.

Таким образом, можно провести анализ типа рака и степени его прогрессирования, исходя из информации, такой как высота пика, значения площади пика и времени появления пика согласно полученному спектру комбинационного рассеяния света. На фиг. 1 показан метод расчета пика по форме кривой комбинационного рассеяния света, где согласно спектру комбинационного рассеяния света при облучении образцов человеческой сыворотки лазером с длиной волны 633 нм подтверждают образование пика с интенсивностью рассеянного света вблизи 1350 см^{-1} и 1550 см^{-1} . Таким образом, на основе среднего значения интенсивности рассеяния (m) между 800 см^{-1} (a) и 2000 см^{-1} (b) величину роста пика (p-m) определяли как величину пика смещения (ВПС). Площадь всего пика составляла значение площади пика. Данные величина роста пика и значение площади пика являются важными показателями в отношении определения связанных с раком веществ в человеческой сыворотке, возможно, они указывают на тип рака и на степень его прогресса наряду со временем появления пика.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан метод расчета пиков на кривой комбинационного рассеяния света, в котором на спектре комбинационного рассеяния, полученном при облучении образцов человеческой сыворотки лазером с длиной волны 633 нм, показано образование пика комбинационного рассеяния света вблизи 1350 см^{-1} и около 1550 см^{-1} ;

на фиг. 2А - спектрограмма комбинационного рассеяния света, где выровнены результаты анализов образцов сывороток, полученных от 12 пациентов с раком желудка-кишечного тракта;

на фиг. 2В - спектрограмма комбинационного рассеяния света, где выровнены результаты анализов образцов сывороток, полученных от 12 пациентов с колоректальным раком;

на фиг. 2С - спектрограмма комбинационного рассеяния света, где выровнены результаты анализов образцов сывороток, полученных от 12 пациентов с доброкачественным новообразованием;

на фиг. 2D - график сравнения величины роста пика комбинационного рассеяния света в образцах рака желудка, колоректального рака и доброкачественного новообразования;

на фиг. 3 - спектр комбинационного рассеяния света, показывающий связь между разбавленными образцами и интенсивностью комбинационного рассеяния, где разбавленные образцы получены от 12 пациентов с колоректальным раком, и на спектре видна корреляция между величиной роста пика интенсивности рассеяния и концентрация образца;

на фиг. 4 - пояснительная схема процедуры получения согласно настоящему изобретению нового субстрата для SERS, указанного в примере 1, где на верхней левой фотографии показан субстрат фирмы "Mytec Co. Ltd." с изображением, полученным сканирующей электронной микроскопией (СЭМ);

на фиг. 5 - фотография различных СЭМ-изображений агрегата наночастиц (квантового кристалла), приготовленного в примере 1;

на фиг. 6 - фотография увеличенного СЭМ-изображения наночастицы;

на фиг. 7 - фотография, показывающая отношение между размерами квантового кристалла и временем простоя после нанесения раствора на субстрат из фосфористой бронзы;

на фиг. 8 - график результатов анализа спектров квантовых кристаллов, полученных энергодисперсионной рентгеновской спектрометрией (ЭДРС) (элементный анализ);

на фиг. 9 - фотография СЭМ-изображения квантовых кристаллов, подвергнутых щелочной обработке в присутствии галогенового иона (обработка гипохлоритом натрия);

на фиг. 10А - фотография игольчатых кристаллов обработанных щелочью квантовых кристаллов;

на фиг. 10В - фотография массы в форме регбийного мяча среди игольчатых кристаллов;

на рис. 10С - график результатов анализа спектров ЭДРС большой массы (элементный анализ);

на фиг. 11 - схематические иллюстрации состояния метилированной свободной ДНК (а) и состояние ацетилированной ДНК (b);

на фиг. 12 - СЭМ-изображение перекристаллизованного субстрата, который является субстратом из квантовых кристаллов, обработанным щелочью в присутствии галогенового иона (обработка гипохлоритом натрия) (верхнее изображение) и график (внизу) результатов анализа (элементного анализа) спектров ЭДРС перекристаллизованного субстрата;

на фиг. 13 - график результатов измерения рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией (РФЭС) обработанного щелочью перекристаллизованного субстрата;

на фиг. 14 - график результатов измерения РФЭС после травления поверхности перекристаллизо-

ванного субстрата.

Описание примеров осуществления изобретения

Далее изобретение продемонстрировано при помощи примеров, которые, следует понимать, приведены только для наглядности и не ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1.

Как показано на фиг. 4, готовили водный раствор, содержащий 1000 мг/дм^3 тиосульфата натрия, и капали 1 каплю на пластину из фосфористой бронзы. После того как пластину из фосфористой бронзы с каплей водного раствора оставляли постоять 3 мин, раствор на пластине сдували. На пластине получали квантовые кристаллы, как показано на СЭМ-изображении с правой стороны на фиг. 4.

На фиг. 5 показана фотография различных СЭМ-изображений агрегата наночастиц (квантового кристалла), приготовленного в примере 1, и на фиг. 6 показано увеличенное СЭМ-изображение наночастиц, где присутствовали тонкие гексагональные столбчатые кристаллы размером примерно 100 нм и имеющие неравномерную поверхность порядком в несколько нанометров. Авторы настоящего изобретения не смогли обнаружить специфические фасеточные грани металлических нанокристаллов в квантовых кристаллах.

На фиг. 7 показана микрофотография, показывающая отношение между размером квантового кристалла и временем простоя после нанесения раствора на субстрат из фосфористой бронзы, где видно, что сначала образуется гексагональный квантовый кристалл, а затем он растет, при этом сохраняя кристаллическую форму.

На фиг. 8 показан график результатов анализа спектров ЭДРС (элементный анализ) квантовых кристаллов, где можно определить не только серебро, но также элементы, принадлежащие комплексообразующим лигандам, при анализе квантового кристалла на субстрате из фосфористой бронзы, тогда как только серебро можно определить при анализе квантовых кристаллов, образующихся на медной пластинке при применении водного раствора тиосульфата натрия с концентрацией 1000 мг/дм^3 и выдерживании его в течение 3 мин после нанесения раствора на медный субстрат.

Обсуждение образования квантового кристалла.

При использовании комплекса тиосульфата натрия в водном растворе с концентрацией 1000 мг/дм^3 происходит образование гексагональных столбчатых кристаллов размером приблизительно 100 нм за время простоя в 3 мин после нанесения по каплям этого раствора на пластинку из фосфористой бронзы, где подтверждено, согласно СЭМ-изображениям (фиг. 4-6), обнаружение неровностей порядком в несколько нанометров на гексагональных столбчатых кристаллах, а специфические фасеточные грани, принадлежащие металлическим нанокристаллам, не обнаружены, тогда как элементный анализ ЭДРС показывает наличие серебра и элементов, принадлежащих комплексообразующему лиганду. Соответственно, по результатам упомянутого выше анализа можно установить, что все частицы представлены нанокристаллами комплекса серебра, а также неравномерный вид поверхности может быть вызван образованием протяженных квантовых точек из кластеров серебра в комплексах. С точки зрения явления, что согласно настоящему изобретению квантовые кристаллы комплекса серебра можно получать на пластинке из фосфористой бронзы, тогда как наночастицы серебра в одиночку можно осадить на медном субстрате, установлено, что, так как равновесный электродный потенциал комплексов тиосульфата серебра составляет 0,33, что эквивалентно электрохимическому потенциалу меди 0,34, на медном субстрате осаждают только серебро с потенциалом 0,80. С другой стороны, в случае пластинки из фосфористой бронзы, ее электрохимический потенциал составляет 0,22, он немного менее положительный, чем у меди, так что есть вероятность осаждения кристаллов комплекса серебра. Концентрация комплекса серебра в водном растворе должна быть в области $500\text{-}2000 \text{ мг/дм}^3$, 2) электрохимический потенциал металлического субстрата по отношению к равновесному потенциалу раствора металлокомплекса является немного менее положительным, 3) металлокомплекс должен быть осажден посредством различия в электрохимических потенциалах между металлическим субстратом и металлокомплексом. Более того, в случае комплекса тиосульфата серебра в водном растворе с концентрацией 1000 мг/дм^3 может наблюдаться та же закономерность.

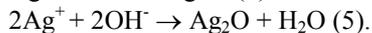
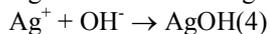
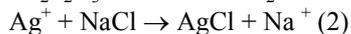
Пример 2.

Готовили субстрат из квантового кристалла тиосульфата серебра, полученного на пластинке из фосфористой бронзы в примере 1, и на этот субстрат капали водный раствор гипохлорита натрия с pH 11. После нанесения по каплям водного раствора оставляли его на субстрате в течение 3 мин, после этого раствор сдували, чтобы приготовить биочип для SERS. С другой стороны, все сыворотки, полученные от 12 пациентов с раком желудочно-кишечного тракта, сыворотки, полученные от 12 пациентов с колоректальной карциномой и сыворотки, полученные от 12 пациентов с доброкачественной опухолью, разводят в 10 раз, чтобы приготовить тестовые образцы, которые подвергают измерению спектра комбинационного рассеяния света с облучением лазерным светом с длиной волны 633 нм. При этом наблюдают хорошую корреляцию между степенью прогрессирования болезни и величинами роста пика совместно со значением площади пика в случае рака желудочно-кишечного тракта и колоректального рака. Дополнительно, в случае рака желудочно-кишечного тракта пик начинает проявляться в спектре комбинационного рассеяния света спустя 1 мин после лазерного облучения, в случае колоректального рака пик начинает

проявляться в спектре комбинационного рассеяния света спустя 2-3 мин после лазерного облучения. Также на графике на фиг. 2D показано сравнение величин роста пика комбинационного рассеяния света при раке желудка-кишечного тракта, колоректальном раке и доброкачественной опухоли. Пик в образцах рака желудка-кишечного тракта и в образцах колоректального рака оказывается значительно выше, чем пик в образцах доброкачественной опухоли. Несмотря на то что сложно найти различия по величине роста пика между образцами рака желудка-кишечного тракта и образцами колоректального рака, можно идентифицировать оба типа рака, учитывая время экспрессии пика и значение площади пика.

Обсуждение мезокристалла соединения из оксида серебра: часть 1.

Субстрат из квантового кристалла подвергают обработке, капая 5% раствор гипохлорита натрия, и нанесенный раствор удаляют спустя 2 мин с получением кристаллов со структурой, показанной на фиг. 12, где видны игольчатые кристаллы и большие кластеры, такие как масса в форме регбийного мяча, и соответствующие соединения подвергают анализу ЭДРС (элементному анализу). Исходя из результатов анализа, полагают, что игольчатые кристаллы состоят из сложного кристалла из оксида серебра и хлорида серебра согласно следующим формулам реакции, а по результату на фиг. 12 хлор не обнаружен, но показано преобладание серебра и кислорода.



Таким образом, хотя полагают, что ионы серебра и ионы тиосульфата играют важную роль в образовании мезокристалла согласно настоящему изобретению путем щелочной окислительной реакции в присутствии хлорид-ионов, и хотя оксид серебра образовывается в ходе традиционной реакции, удивительно, что преимущественно образовывается перекись серебра согласно последующему измерению РФЭС.

Обсуждение мезокристалла соединения из оксида серебра: часть 2.

Измерение РФЭС.

Водный раствор гипохлорита натрия добавляли по каплям к субстрату из квантового кристалла, приготовленного как упомянуто выше, в течение 2 мин, чтобы получить перекристаллизованный субстрат, который подвергали анализу РФЭС (используя модель РНИ 5000 VersaProbe II фирмы "ULVAC-RNI (Ltd.)" (сканирующая рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия) без травления для Ag и O при измерении РФЭС. Дополнительно для сравнения измеряли Ag в порошке хлорида серебра и порошок оксида серебра. С другой стороны, перекристаллизованный субстрат подвергали измерению Ag и O методом РФЭС после травления в течение 5 мин с помощью ионной пушки, бомбардирующей кластерными ионами газа аргона. Если совместить результаты измерений РФЭС на фиг. 13 и 14 с результатами ЭДРС на фиг. 12, то пик вблизи 529 эВ представляет собой пик перекиси серебра (AgO), тогда как пик вблизи 530 эВ представляет собой пик оксида серебра (Ag₂O). Более того, если произошло травление, то содержание кислорода уменьшается, тогда как пик O, принадлежащий перекиси серебра (AgO) вблизи 529 эВ все равно выше, чем пик, принадлежащий оксиду серебра, вблизи 530 эВ в случае травления, так что доказано, что перекись серебра образовывалась вблизи субстрата. Предполагают, что образование мезокристалла влияет на электрохимический потенциал субстрата и на каталитическое действие.

Измерение ЭДРС проводили на упомянутом выше перекристаллизованном субстрате с помощью прибора JSM-7001F фирмы "JEOL Ltd." (анализ полевым эмиссионным сканирующим электронным микроскопом).

Кроме того, даже при применении водного раствора, выбранного из группы, состоящей из хлорноватистой кислоты, 0,01н. гидроксида натрия, 0,01н. соляной кислоты и 0,1 молярного карбоната натрия, не получили результата, схожего с полученным при обработке гипохлоритом натрия. Таким образом, полагают, что образование игольчатых кристаллов вызвано упомянутой выше реакцией в присутствии ионов серебра и ионов тиосульфата. Тогда как оксид серебра приобретает отрицательный заряд в водных растворах, его восстанавливают светом, чтобы осадить металлическое серебро. Поскольку перекись водорода показывает более явное проявление упомянутых выше качеств, чем оксид серебра, то существует возможность адсорбировать связанные с раком вещества с положительным зарядом, в результате чего проявляется эффект поверхностного плазмонного усиления между захваченными связанными с раком веществами и частицами серебра.

Промышленная применимость

Таким образом, согласно изобретению возможно избирательно определять связанные с раком вещества в крови и биологических образцах, так что можно выявлять рак на ранних стадиях и судить о его прогрессе посредством измерения спектров комбинационного рассеяния света.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биочип, применяемый в способе измерения количества связанных с раком веществ, содержащий мезокристаллическую область из оксидов серебра, содержащих перекись серебра, способных показывать отрицательный заряд в образце для селективного захвата связанных с раком веществ, имеющих положительный заряд в образце, а также демонстрировать эффект усиления поверхностного резонанса при облучении их возбуждающим светом, причем указанная мезокристаллическая область из оксидов серебра, содержащих перекись серебра, может быть получена путем перекристаллизации квантового кристалла комплекса серебра на носителе из меди или медного сплава путем щелочной обработки.

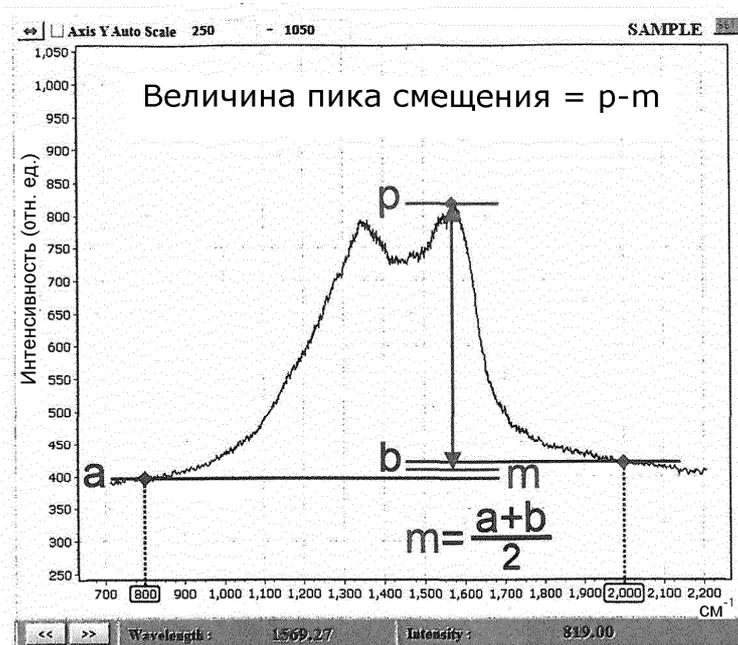
2. Биочип по п.1, в котором квантовый кристалл комплекса серебра может быть получен в ходе реакции галогенида серебра и комплексообразующего агента с константой стабильности комплекса ($\log \beta_i$) в 8 или более по формуле (I)

$$E^\circ = (RT / |Z| F) \ln (\beta_i),$$

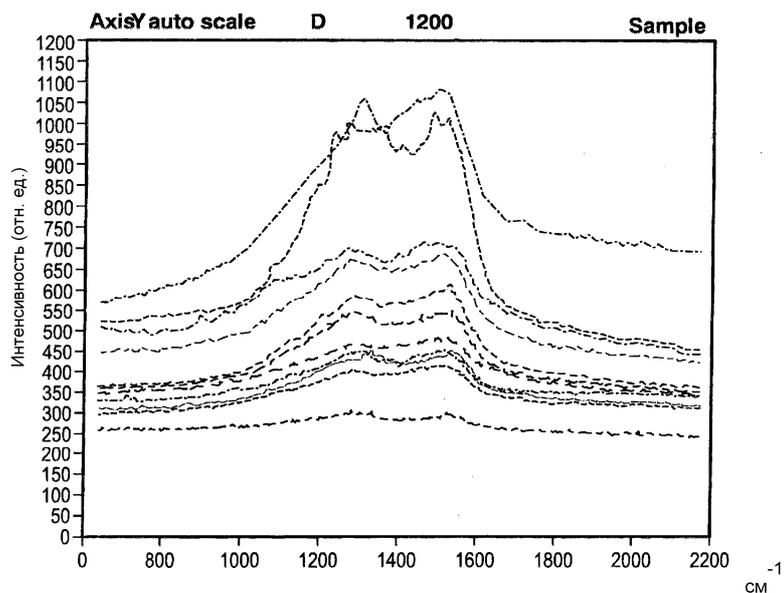
где E° - стандартный электрохимический потенциал; R - газовая постоянная; T - абсолютная температура; Z - валентность иона; F - постоянная Фарадея, причем комплексообразующий агент выбирают из группы, состоящей из соли тиосульфата, соли тиоцианата, соли сульфита, соли тиомочевины, соли иодида калия, соли тиосалициловой кислоты, соли тиоциануровой кислоты или их комбинации.

3. Способ измерения количества связанных с раком веществ посредством усиленного поверхностно комбинационного рассеяния света (SERS), который включает этапы обеспечения биочипа по любому из пп. 1, 2, добавления по каплям сыворотки или образца биологической жидкости к мезокристаллической области биочипа, избирательного захвата связанного с раком вещества, имеющего положительный заряд в образце, облучения возбуждающим светом захваченных связанных с раком веществ и определения усиленного поверхностно комбинационного рассеяния света.

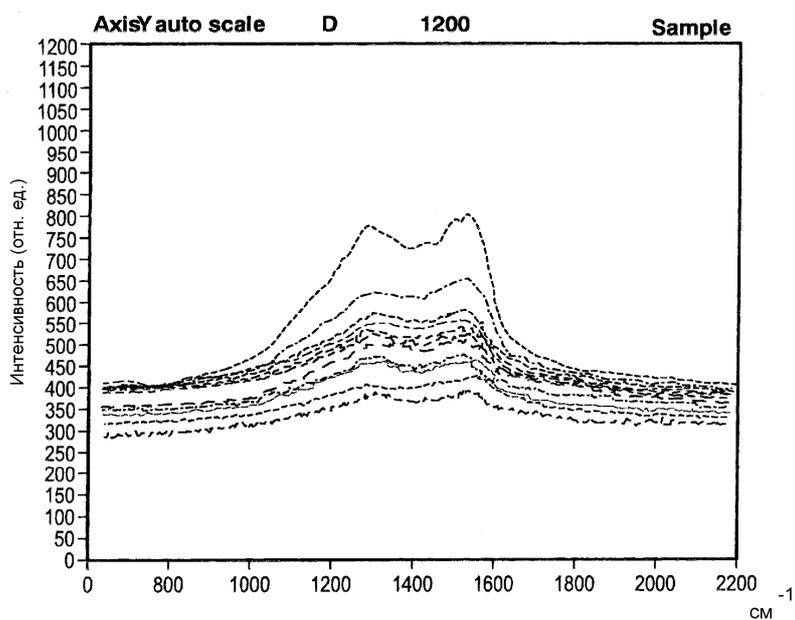
4. Способ измерения количества связанных с раком веществ посредством усиленного поверхностно комбинационного рассеяния света (SERS) по п.3, отличающийся тем, что связанное с раком вещество содержит высвобожденную ДНК (ДНК, намотанную на гистоны:нуклеосомы) и соответствующий хроматин (хромосома).



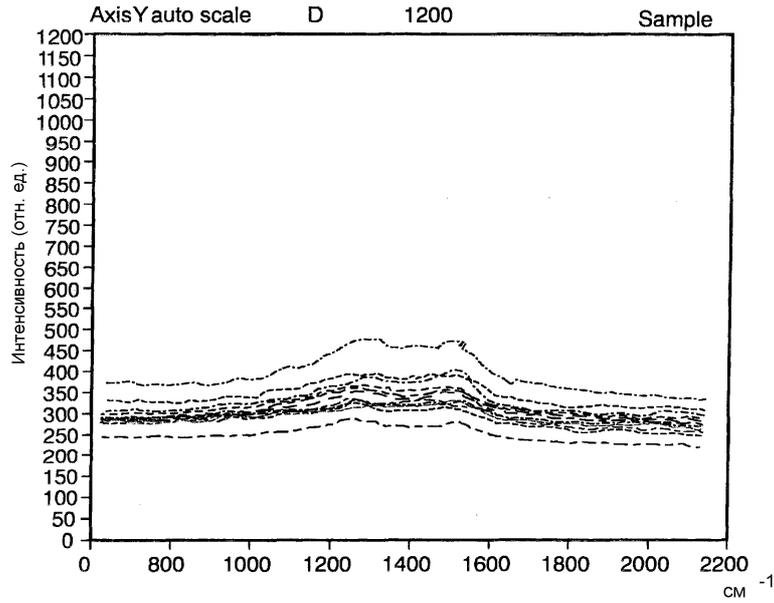
Фиг. 1



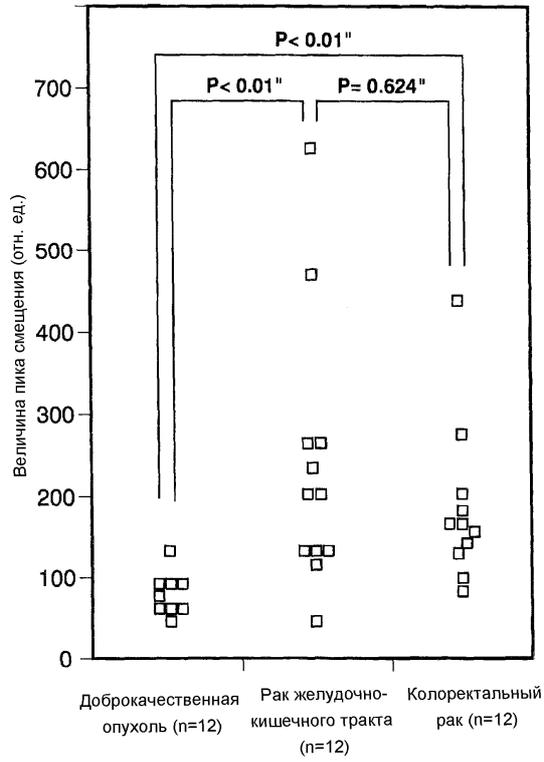
Фиг. 2А



Фиг. 2В

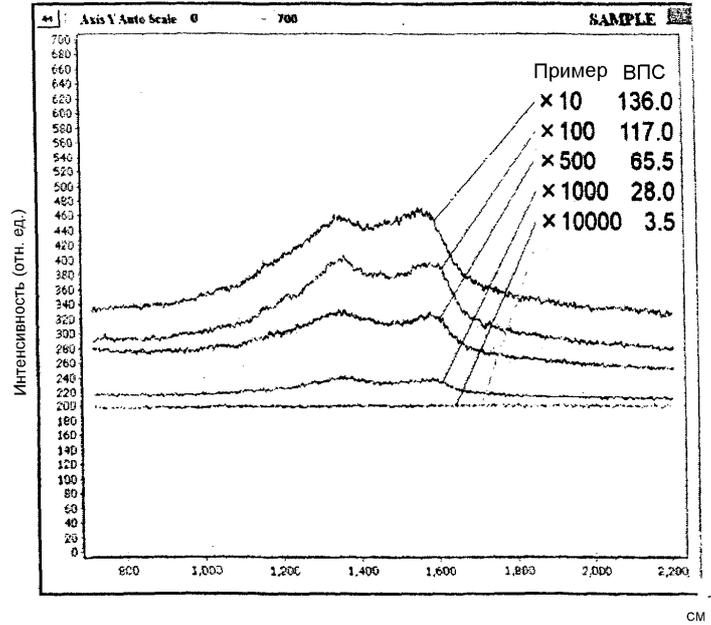


Фиг. 2С

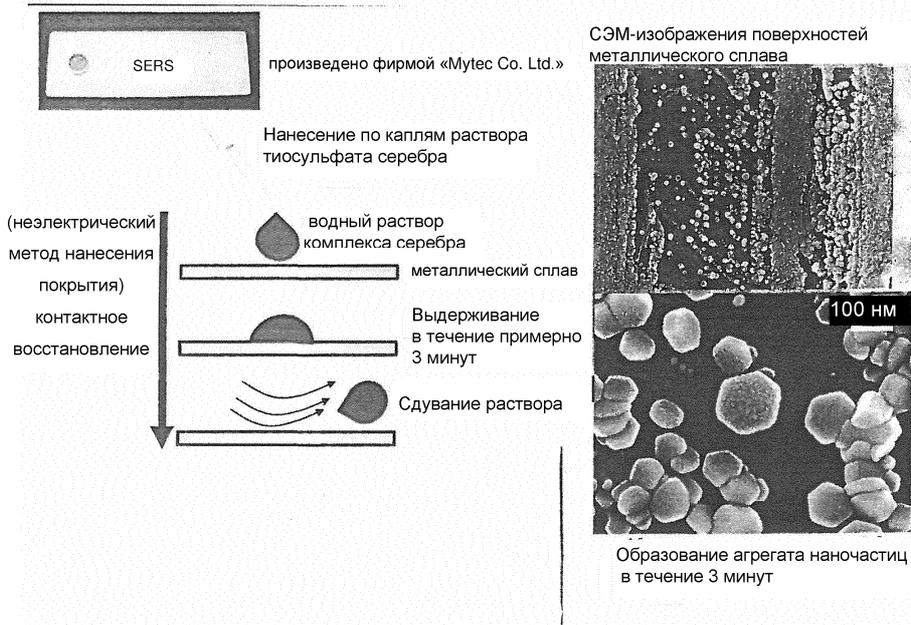


Фиг. 2D

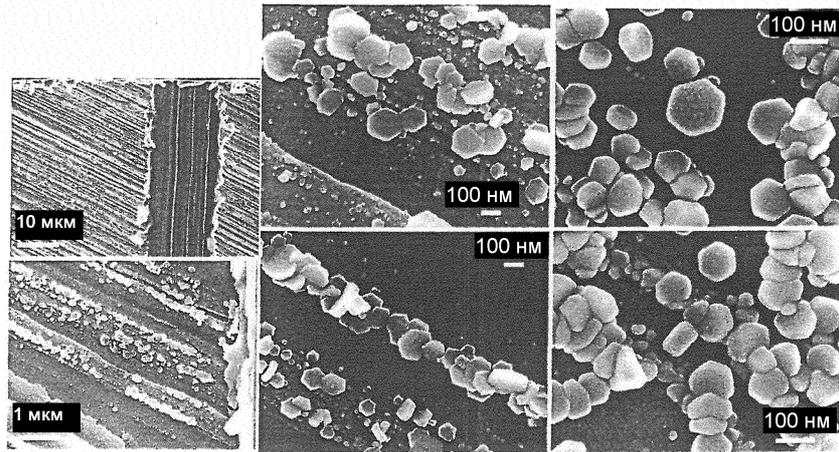
Разбавленные образцы и интенсивность спектров комбинационного света



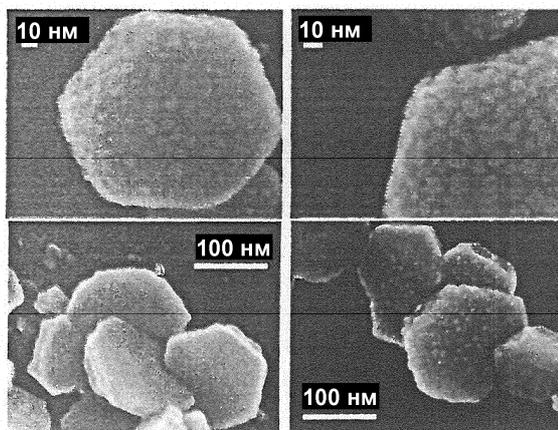
Фиг. 3



Фиг. 4

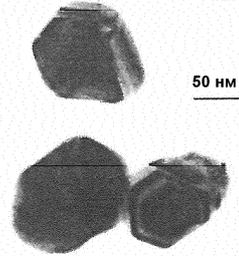


Фиг. 5



Квантовый кристалл представлен в виде тонких гексагональных столбчатых форм. Не наблюдается явной фасеточной грани металлического нанокристалла.

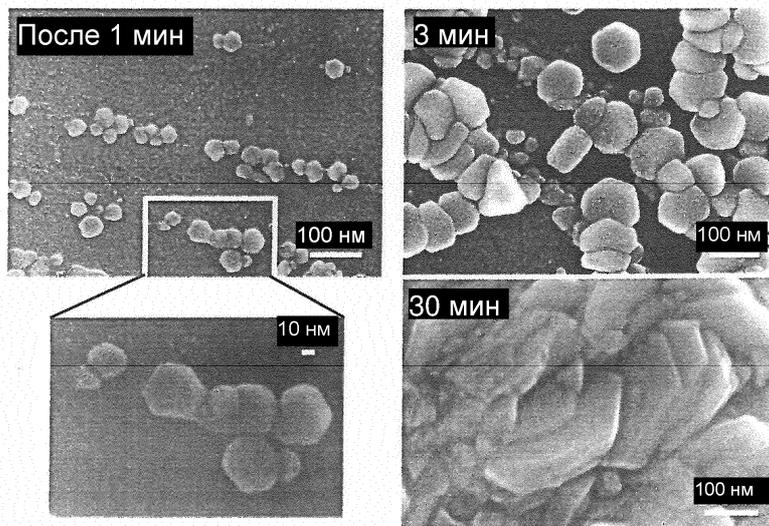
Частицы серебра, полученные традиционным способом
Изображения (просвечивающая электронная микроскопия) наночастиц серебра, полученных восстановлением лимонной кислотой нитрата серебра



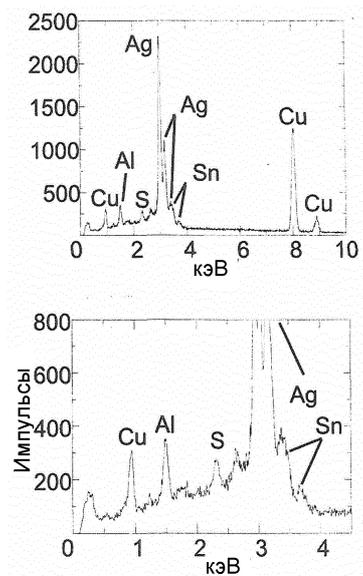
Наличие фасеточных граней указывает на образование металлических нанокристаллов серебра

Представленная выше наноструктура отличается от таковой для частиц серебра, полученных традиционным способом

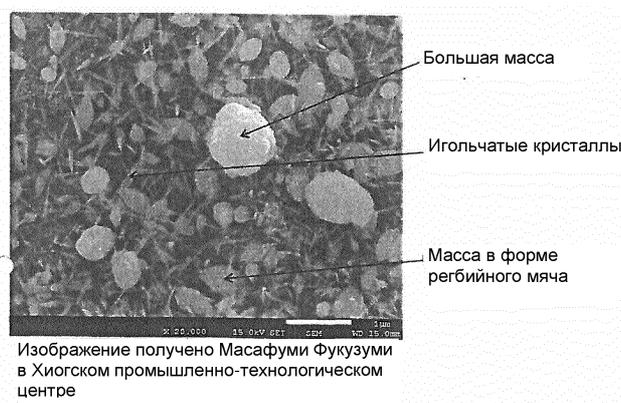
Фиг. 6



Фиг. 7

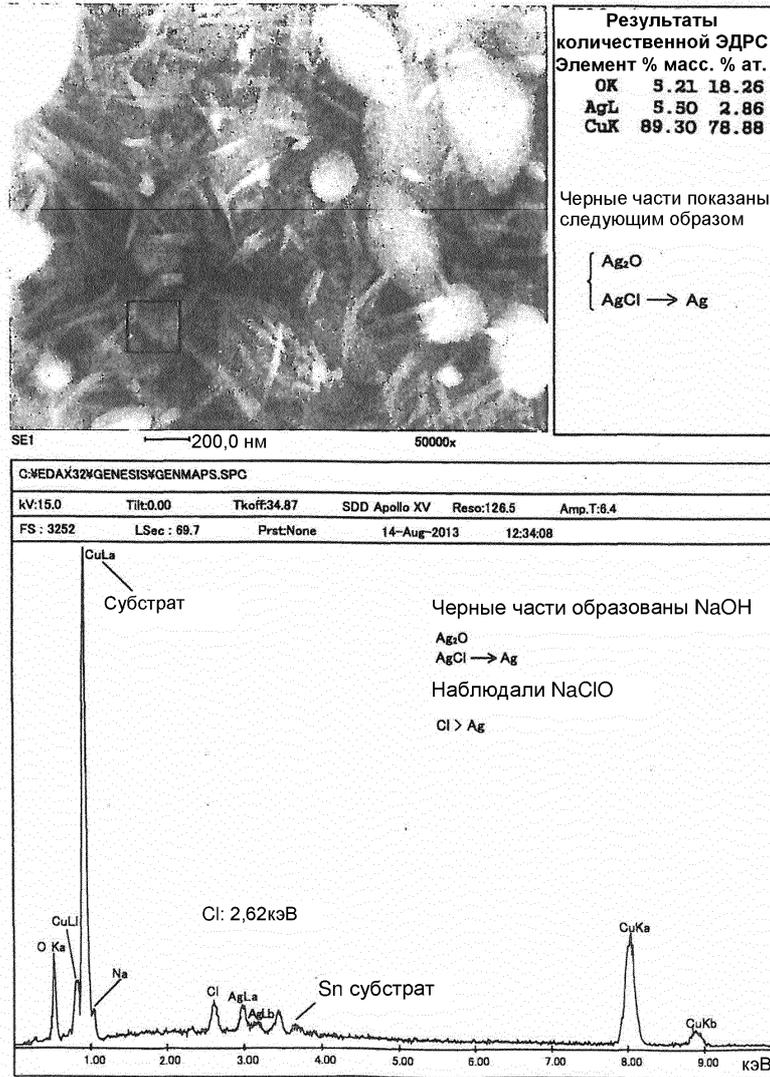


Фиг. 8

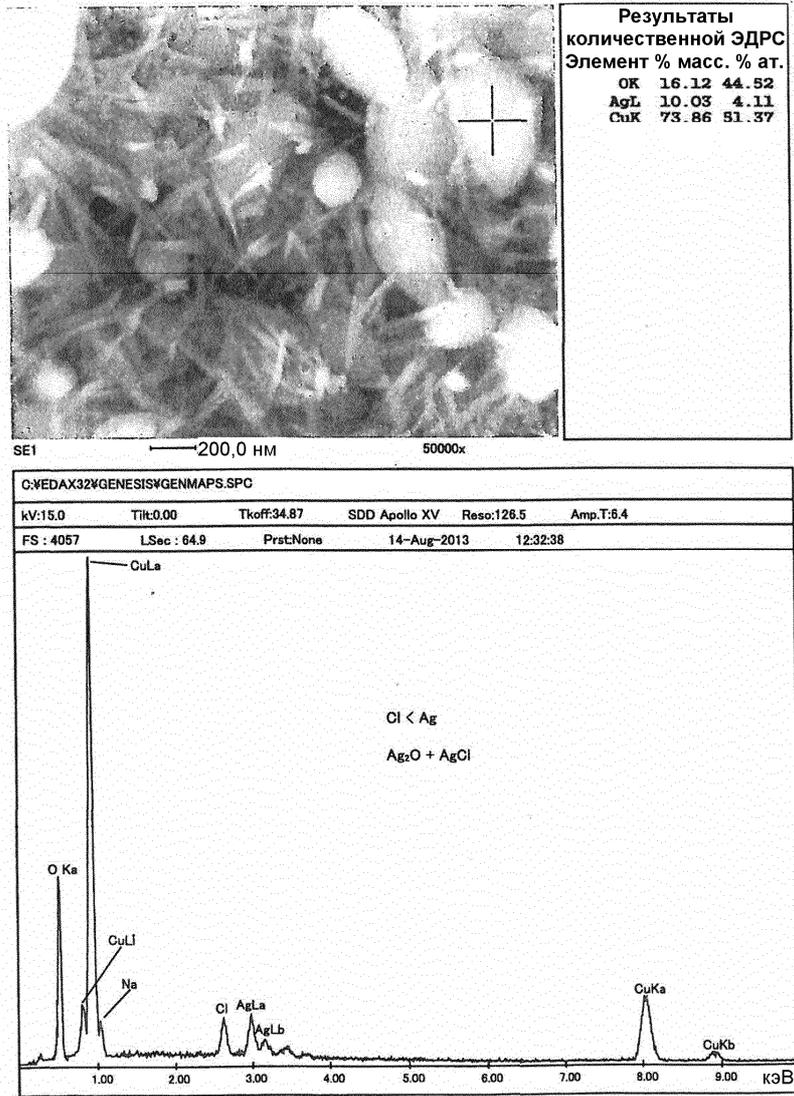


Изображение получено Масафуми Фукузumi
в Хиогском промышленно-технологическом
центре

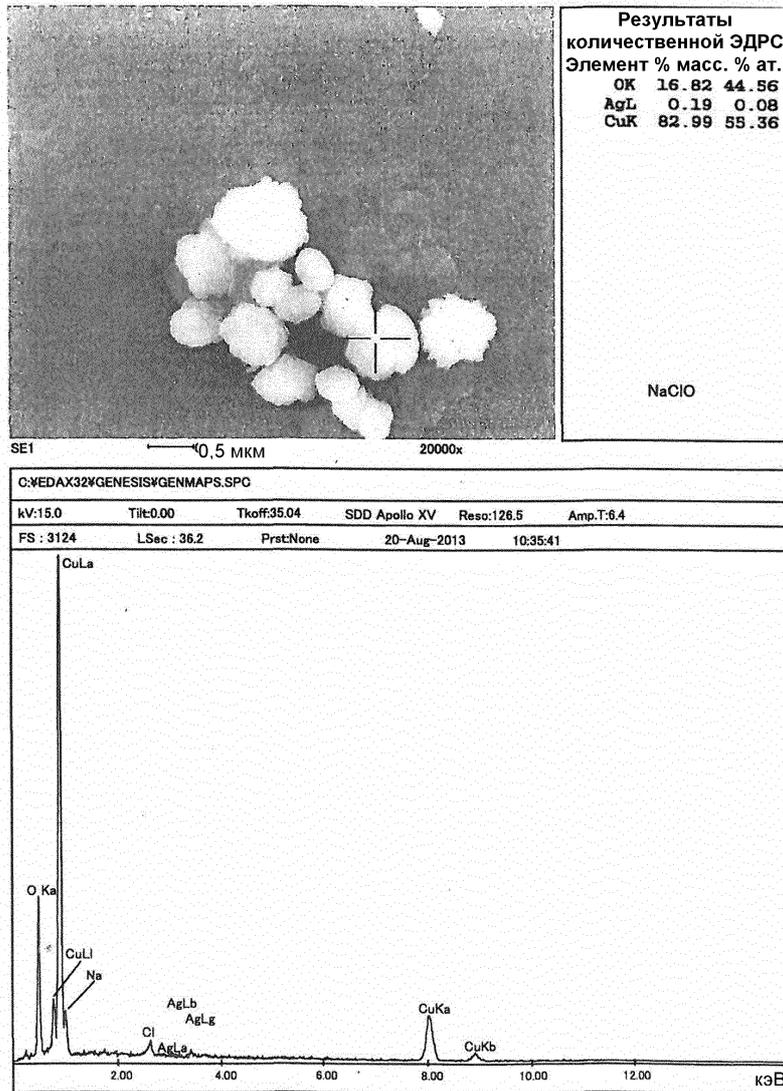
Фиг. 9



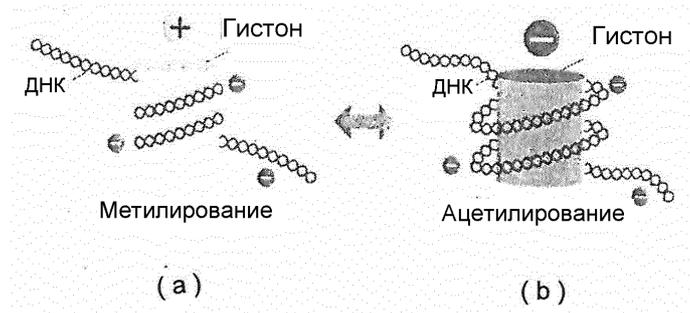
Фиг. 10А



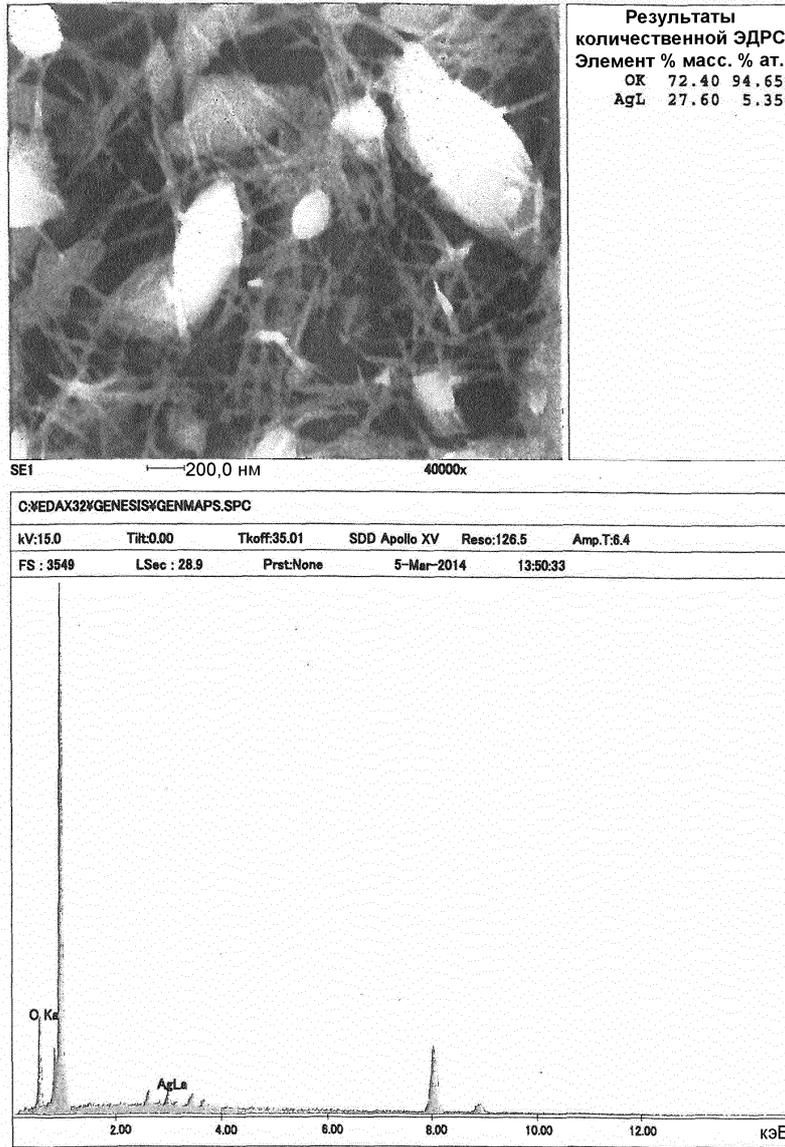
Фиг. 10В



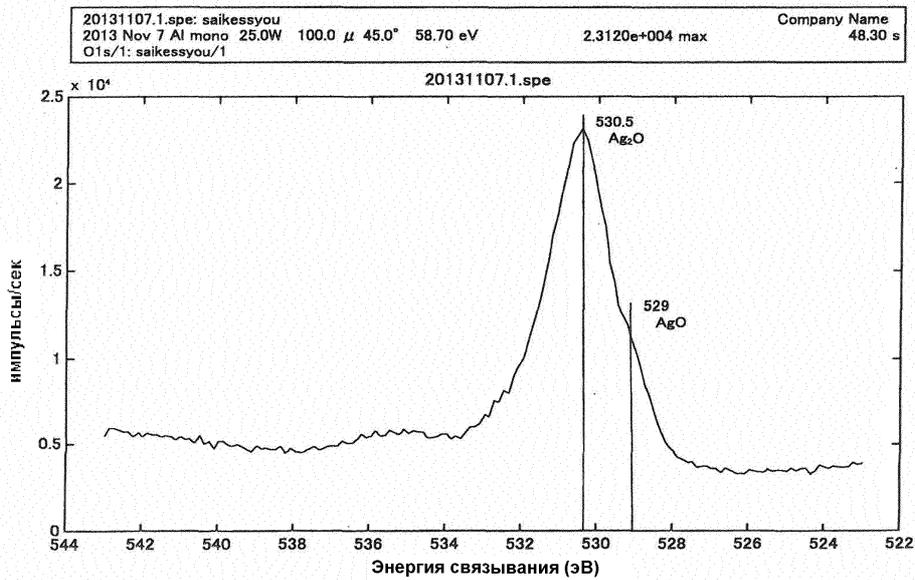
Фиг. 10С



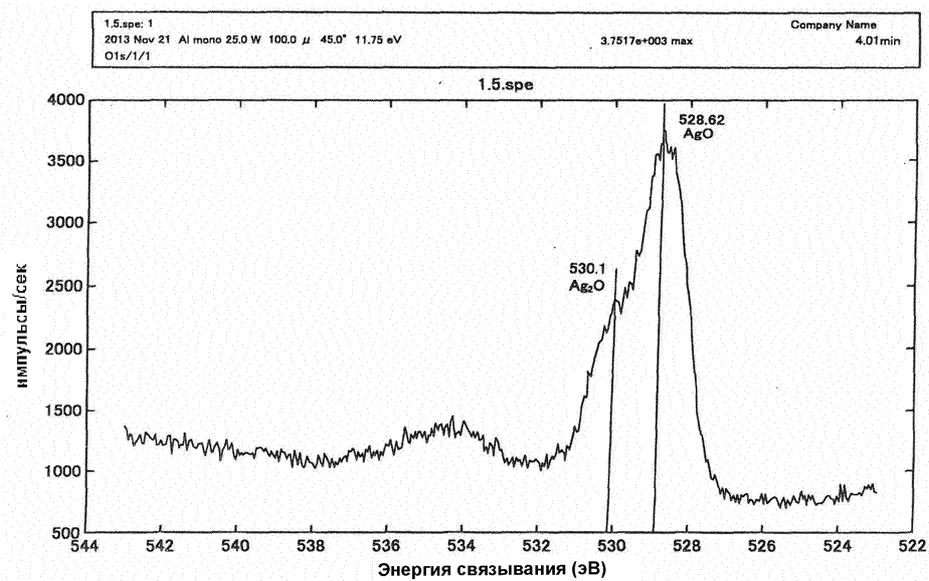
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

