

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192229** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.20

(51) Int. Cl. *G01N 33/542* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.20

**(54) СЕЛЕКТИВНОЕ ОПТИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ
АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ В ЖИДКОСТЯХ**

(31) U201900011

(32) 2019.02.11

(33) EE

(86) PCT/EP2020/051268

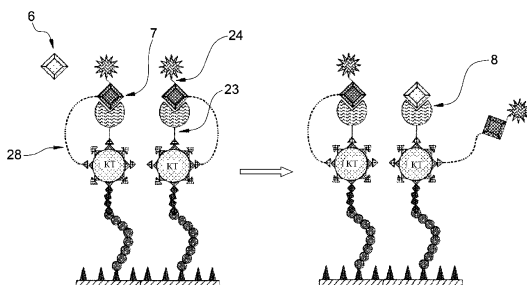
(87) WO 2020/164863 2020.08.20

(71) Заявитель:
КУАНИКДИКС ОЮ (EE)

(72) Изобретатель:
Бабиченко Сергей, Ярв Яак, Кузнецов
Алексей, Мاستитски Антон (EE)

(74) Представитель:
Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков
К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В.,
Стукалова В.В., Ясинский С.Я. (RU)

(57) Изобретение относится к способу и устройству для обнаружения и количественного определения разнообразных анализируемых органических веществ в жидком образце, а также к аналитической подложке для обеспечения измерений анализируемых веществ. Указанный способ осуществлен посредством применения специфического взаимодействия органических анализируемых веществ с селективными связывающими центрами, иммобилизованными на многослойной аналитической подложке, с дальнейшим обнаружением такого взаимодействия посредством применения устройства на основе индуцирования и регистрации флуоресценции такой подложки для биохимических, генетических и экологических анализов.



A1

202192229

202192229

A1

СЕЛЕКТИВНОЕ ОПТИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ В ЖИДКОСТЯХ

ОПИСАНИЕ

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к способу, системе и/или устройству для обнаружения органического анализируемого вещества в жидкости и, более конкретно, к способу, системе и/или устройству для обнаружения органического анализируемого вещества в жидкости с применением флуоресценции в целях обнаружения взаимодействия с соответствующим иммобилизованным связывающим центром.

Уровень техники настоящего изобретения

Определение низкомолекулярных органических веществ в разнообразных природных жидких средах представляет собой одну из наиболее важных и требующих усилий задач в биохимических, генетических и экологических анализах, и при этом для осуществления указанных приложений используются различные классические аналитические методы.

Спектрометрические экспресс-методы находят широкое применение в экологическом мониторинге загрязнения воды, в научных исследованиях и медицинской диагностике. Были разработаны разнообразные типы оборудования, в том числе портативные устройства для анализа в полевых условиях (Long и др., 2013 г.). В указанных устройствах на основе флуоресцентной спектроскопии образец известного объема обрабатывают и помещают в пробирку, и флуоресценцию этого образца измеряют при специфической длине волны возбуждения. Это простой и быстрый метод анализа, если образец характеризуют различающиеся в достаточной степени спектральные полосы возбуждения и испускания. Некоторые осложнения могут быть связаны с необходимостью калибровки устройства для каждого типа образца в целях учета воздействия дополнительных устройств для испускания или гашения сигнала флуоресценции, а также воздействия опалесценции, которую вызывают твердые частицы, присутствующие в анализируемых образцах. Указанные факторы осложняют аналитическую процедуру и могут вызывать ошибки измерения.

Такие осложнения могут быть предотвращены, если анализируемое вещество выделено из жидкого образца методом капиллярного электрофореза и после этого обнаружено с применением соответствующей детекторной системы посредством измерения, например, ультрафиолетового спектра или с применением какого-либо другого аналитического метода. Такой подход, обеспечивает высокую чувствительность обнаружения в случае применения портативных устройств (Lara и др., 2016 г.). С другой стороны, для этого метода требуется точное определение электрофоретической подвижности анализируемого вещества в образцах различных типов, поскольку этот параметр может оказаться зависимым от типа образца. Кроме того, свойства капилляра, используемого для электрофореза, также могут зависеть от свойств образца и их изменчивости с течением времени. Таким образом, требуется осуществление замены капилляра и повторной калибровки устройства на регулярной основе. Наконец, для этого способа требуется дополнительная проверка того, что выходящий сигнал вызван только анализируемым веществом, и отсутствует сигнал, генерированный другими компонентами, имеющими близкую подвижность. Подтверждение полученных результатов может быть осуществлено с применением других аналитических методов, в которых отсутствуют указанные осложнения.

Среди указанных способов центральное положение занимают комбинированные технологии, в которых сочетаются газовая хроматография и масс-спектрометрия, жидкостная хроматография высокого разрешения масс-спектрометрия или жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрия (Buchberger, 2010 г.; Farre и др., 2007 г.; Petrović и др., 2010 г.). Хотя были разработаны различные пригодные для применения устройства, указанные способы не могут быть осуществлены без подготовки образцов, а также для их осуществления требуется квалифицированный персонал. Наиболее важно, что указанные устройства оказываются дорогостоящими, в частности, если аналитические процедуры осуществляются в режиме реального времени (Staples и др., 2001 г.).

Электрохимические датчики находят широкое применение в портативных устройствах, с помощью которых измеряют электропроводность образца в процессе некоторых специфических реакций, происходящих в присутствии анализируемого вещества. Указанные измерения могут быть осуществлены с высокой точностью, и размеры устройств могут быть значительно сокращены вследствие возможности применения миниатюрных микросхем с печатными электродами (Couto и др., 2015 г.). Недостаток указанных датчиков связан с процедурой обнаружения, в которой образование или исчезновение ионных соединений измеряют в некоторой серии последовательных реакций, которые происходят в присутствии анализируемого вещества, поскольку на

каждую стадию этого каскада реакций могут воздействовать присутствующие примеси, свойства реакционной среды или температура. Все указанные факторы вносят свой вклад в неопределенность измерения, особенно в полевых условиях, и, таким образом, указанные устройства находят наибольшее применение для целей качественного анализа.

В последнее время синтетические олигонуклеотиды, так называемые аптамеры, были предложены для связывания молекул анализируемых веществ. Аптамеры образуют объемные молекулярные структуры, которые специфически распознают всю молекулу анализируемого вещества или некоторую часть ее структуры. Хотя открытие аптамеров в значительной степени расширило аналитические возможности, на основании создания аналитических микросхем с покрытиями, которые проявляют чувствительность к конкретному анализируемому веществу, все же отсутствие эффективных и надежных способов обнаружения задержало разработку дешевых и эффективных аналитических и диагностических устройств.

Аптамеры находят широкое применение в сочетании с технологией поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (Kodoyianni, 2011 г.). В этом случае аптамеры иммобилизованы на поверхности микросхемы, и процесс комплексообразования регистрируется посредством наблюдения изменения молекулярной массы соответствующего комплекса. Хотя этот подход кажется достаточно обычным, у него существуют несколько значительных недостатков. Во-первых, чувствительность датчика зависит от присутствия в образце других соединений, содержащих аналогичные связывающие группы. Во-вторых, он зависит от молекулярной массы анализируемого вещества, и низкомолекулярные соединения изменяют молекулярную массу комплекса в недостаточной степени для надежного обнаружения (Nguyen и др., 2007 г.). Таким образом, указанные измерения могут оказаться весьма проблематичными для анализируемых веществ, имеющих низкую молекулярную массу. Кроме того, указанные датчики могут иметь высокий фоновый сигнал вследствие неспецифического связывания других компонентов, которые присутствуют в образце. Этот высокий фоновый сигнал уменьшает чувствительность данного способа. Наконец, процесс комплексообразования может быть чрезмерно медленным для быстрых и эффективных измерений с применением технологии ППР. Указанные факторы ограничивают сферу приложений на основе аптамеров.

Аптамеры, маркированные флуоресцентным красителем, также были внедрены в целях определения анализируемых веществ в жидких средах. Согласно этому способу молекулы анализируемого вещества иммобилизованы на поверхности микросхемы, и после этого маркированный красителем аптамер образует связи с указанными

молекулами. Если в растворе появляются дополнительные молекулы анализируемого вещества, они конкурируют с иммобилизованными молекулами за связывающий центр аптамера и вызывают диссоциацию иммобилизованного комплекса (Хи и др., 2010 г.). В результате этого молекулы маркированного аптамера уходят с поверхности микросхемы, и при этом изменяется флуоресценция связанных с поверхностью молекул (Alsager и др., 2014 г.). Недостаток этого способа заключается в том, что молекулы аптамера остаются в анализируемой среде даже после их вытеснения, и оказывается затруднительным разделение вкладов в флуоресценцию, которые производят связанные с поверхностью молекулы и вытесненные молекулы.

Эффект сочетания квантовых точек с резонансным переносом энергии флуоресценции (далее сокращенно называется «РПЭФ», также иногда называется «ферстеровский резонансный перенос энергии») рассматривался для применения в многочисленных аналитических приложениях, в которых обнаружение осуществляется в объеме массивного образца, и квантовые точки или их химически модифицированные аналоги растворены или суспендированы в этом объеме. Однако в этом случае сигнал в значительной степени зависит от числа излучающих центров в аналитической системе, что определяется объемом образца, который должен быть измерен с высокой точностью (Zhou и др., 2008 г.). Это задерживает измерения и усложняет калибровку в процессе обнаружения. Кроме того, гетерогенность и прозрачность образца вследствие присутствия твердых частиц или других причин может препятствовать непосредственному измерению флуоресценции в образце без его предварительной обработки и очистки. Это усложняет широкое применение измерения флуоресценции в объеме массивного образца.

Соответственно, в целях обнаружения органического анализируемого вещества в жидкости существует постоянная потребность в альтернативных способах, системах и/или устройствах, которые преодолевают один или несколько из недостатков, указанных выше. Может оказаться преимущественным предложение способа, системы и/или устройства, которые упрощают оптическое обнаружение органических анализируемых веществ в различных образцах разнообразных типов без необходимости выделения анализируемого вещества из образца.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы обеспечить высокую селективность и специфичность в целях обнаружения разнообразных анализируемых органических веществ в различных жидкостях посредством применения портативного

оптического устройства, оборудованного набором аналитических подложек, химический состав которых определяется типом анализируемого вещества.

Другими словами, задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить средство (способ, устройство) для определения абсолютного или относительного содержания (часто выраженного в форме концентрации) одного, нескольких или всех конкретных органических анализируемых веществ, которые присутствуют в жидком образце.

В целях решения задач, которые указаны выше, предложена система для непосредственного определения анализируемых веществ в жидком образце, имеющем небольшой объем. Эту систему составляют способ обнаружения, аналитическая подложка и оптическое устройство для обнаружения анализируемых веществ в водных растворах. Обнаружение осуществляется на основании специфического взаимодействия молекулы анализируемого вещества со специфическим связывающим центром сенсорной молекулы, с которой связана слоистая наноструктура, иммобилизованная на поверхности аналитической подложки. Аналитическая подложка структурирована таким образом, чтобы обеспечить РПЭФ между квантовыми точками и флуоресцентным маркером молекулы анализируемого вещества, связанной со специфическим связывающим центром в сенсорной молекуле. Поверхность подложки построена как слоистая структура, где различные слои химических компонентов нанесены друг на друга, начиная с поверхности подложки. Аналитическую подложку анализируют, используя оптическое устройство, которое обеспечивает возбуждение флуоресценции и регистрацию индуцированного потока флуоресценции вследствие эффекта РПЭФ для вычисления концентрации анализируемого вещества.

Селективность способа обусловлена взаимодействием молекулы анализируемого вещества с соответствующим специфическим связывающим центром сенсорной молекулы, с которой связана слоистая наноструктура, иммобилизованная на поверхности аналитической подложки. Это специфическое взаимодействие вызывает изменение потока флуоресценции от указанной подложки, и такое изменение регистрируют и используют для определения концентрации анализируемого вещества. Отличительный признак способа представляет собой регистрацию специфической флуоресценции от взаимодействующего поверхностного слоя аналитической подложки без значительного воздействия оптических свойств жидкого образца и гашения излучения матрицей образца.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен способ обнаружения и количественного определения по меньшей мере одного органического анализируемого вещества в жидком образце с применением специфического

взаимодействия указанного органического анализируемого вещества с селективными связывающими центрами сенсорных молекул на основе эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции (РПЭФ).

Указанное обнаружение и количественное определение осуществляют посредством измерения такого взаимодействия на основании эффекта РПЭФ.

Указанный способ отличается тем, что:

получают аналитическую подложку, имеющую поверхность аналитической подложки, содержащую первый компонент и второй компонент;

первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, иммобилизованную на поверхности аналитической подложки первым линкером, причем первый линкер представляет собой биполярный линкер, содержащий первую связывающую группу для специфического связывания первого флуоресцентного маркера и вторую связывающую группу для специфического связывания поверхности аналитической подложки, причем сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для органического анализируемого вещества, и при этом сенсорная молекула маркирована первым флуоресцентным маркером в положении, которое не производит воздействия на органическое анализируемое вещество, связывающее специфический связывающий центр;

второй компонент содержит химический аналог органического анализируемого вещества, причем химический аналог маркирован вторым флуоресцентным маркером, химический аналог связан с первым флуоресцентным маркером вторым линкером, имеющим длину, которая превышает ферстеровский радиус, и при этом химический аналог обратимо связывает специфический связывающий центр сенсорной молекулы первого компонента;

первый и второй компоненты взаимодействуют, и при этом первый флуоресцентный маркер оказывается вблизи второго флуоресцентного маркера на расстоянии, которое составляет менее чем ферстеровский радиус, что обеспечивает эффект РПЭФ между первым и вторым флуоресцентными маркерами;

жидкий образец наносят на аналитическую подложку;

аналитическую подложку облучают светом, спектрально соответствующим спектру возбуждения первого флуоресцентного маркера;

обнаруживают флуоресценцию второго флуоресцентного маркера;

обнаруживают органическое анализируемое вещество посредством определения уменьшения флуоресценции второго флуоресцентного маркера вследствие вытеснения

органическим анализируемым веществом химического аналога из специфического связывающего центра и ослабления эффекта РПЭФ.

Согласно следующему аспекту предложено устройство для обнаружения органического анализируемого вещества в жидком образце, причем в данном устройстве:

аналитическая подложка имеет поверхность аналитической подложки, содержащую первый компонент и второй компонент;

первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, иммобилизованную на поверхности аналитической подложки первым линкером, причем первый линкер представляет собой биполярный линкер, содержащий первую связывающую группу для специфического связывания первого флуоресцентного маркера и вторую связывающую группу для специфического связывания поверхности аналитической подложки, причем сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для органического анализируемого вещества, и при этом сенсорная молекула маркирована первым флуоресцентным маркером в положении, которое не производит воздействия на органическое анализируемое вещество, связывающее специфический связывающий центр;

второй компонент содержит химический аналог органического анализируемого вещества, причем химический аналог маркирован вторым флуоресцентным маркером, химический аналог связан с первым флуоресцентным маркером вторым линкером, имеющим длину, которая превышает ферстеровский радиус, и при этом химический аналог обратимо связывает специфический связывающий центр сенсорной молекулы первого компонента;

аналитическая подложка определяет отсек аналитической подложки для нанесения жидкого образца на поверхность аналитической подложки;

источник света выполнен с возможностью испускания специфического спектра, чтобы индуцировать флуоресценцию первого флуоресцентного маркера;

оптоэлектронный детектор выполнен с возможностью обнаружения флуоресценции второго флуоресцентного маркера и генерации сигнала, соответствующего интенсивности флуоресценции;

контроллер выполнен с возможностью регистрации сигнала от оптоэлектронного детектора и определения присутствия органического анализируемого вещества на основании уменьшения обнаруженной флуоресценции.

Согласно некоторым вариантам осуществления сенсорная молекула выбрана из встречающихся в природе или синтезированных молекул, включая, но не ограничиваясь этим, белки и олигонуклеотиды.

Согласно некоторым вариантам осуществления первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ) с подходящим спектром испускания флуоресценции для возбуждения флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанные измерения осуществляются в тонком слое жидкого образца, причем толщина взаимодействующего поверхностного слоя указанного жидкого образца на аналитической подложке ограничена (в соответствии с) физическим ограничением ферстеровского радиуса.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанные измерения жидкого образца осуществляют без какой-либо подготовки и/или предварительной обработки указанного используемого образца.

Согласно некоторым вариантам осуществления поверхность подложки является твердой и химически инертной.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанные слои подложки содержат по меньшей мере один химически связанный первый флуоресцентный маркер с сенсорной молекулой и молекулой аналога анализируемого вещества, с которой связан второй флуоресцентный маркер.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанный первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ) с подходящим спектром испускания флуоресценции для возбуждения флуоресценции второго флуоресцентного маркера.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный краситель с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный белок с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

Согласно некоторым вариантам осуществления подложка содержит специфически определяемую аналитическую композицию для измерений единственного анализируемого вещества.

Согласно некоторым вариантам осуществления подложка содержит множество аналитических композиций для одновременных измерений множества анализируемых веществ.

Согласно некоторым вариантам осуществления подложка изготовлена как микропроцессор однократного применения.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная аналитическая подложка выполнена с возможностью приема для измерений не более чем микролитрового объема образца.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная оптическая схема устройства выполнена с возможностью измерения флуоресценции от единственной аналитической композиции на аналитической подложке.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанная оптическая схема выполнена с возможностью измерения флуоресценции от множества аналитических композиций на аналитической подложке.

Согласно некоторым вариантам осуществления указанные средства управления и обработки данных выполнены с возможностью вычисления концентрации анализируемого вещества по относительному уменьшению зарегистрированной флуоресценции с течением времени от ее начального значения.

Согласно некоторым вариантам осуществления толщина взаимодействующего поверхностного слоя указанного жидкого образца, нанесенного на аналитическую подложку, ограничена в соответствии с физическим ограничением ферстеровского радиуса.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно включает определение количества органического анализируемого вещества в жидком образце посредством измерения уменьшения флуоресценции первого флуоресцентного маркера, причем степень измеряемого уменьшения соответствует количеству органического анализируемого вещества в жидком образце.

Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкер выполнен с возможностью предотвращения связывания химического аналога со специфическим связывающим центром расположенного рядом первого компонента, не связанного с химическим аналогом.

Согласно некоторым вариантам осуществления аналитическая подложка выполнена с возможностью связывания органических анализируемых веществ множества типов, причем сенсорные молекулы множества типов, соответственно, маркированы первыми флуоресцентными маркерами множества типов, которые иммобилизованы на одной и той же поверхности аналитической подложки, и при этом обнаруженная флуоресценция имеет многоспектральные характеристики.

Согласно некоторым вариантам осуществления обнаружение органического анализируемого вещества происходит в тонком слое жидкого образца, причем толщина взаимодействующего поверхностного слоя жидкого образца на аналитической подложке ограничена согласно ферстеровскому радиусу.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложен способ обнаружения и количественного определения по меньшей мере одного органического анализируемого вещества в жидком образце с применением специфического взаимодействия указанного органического анализируемого вещества с селективными связывающими центрами сенсорных молекул на основе эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции (РПЭФ), причем указанный способ включает следующие стадии:

на стадии 1 на начальном этапе указанный жидкий образец, содержащий органические анализируемые вещества, наносят на аналитическую подложку, содержащую по меньшей мере один набор из двух взаимодействующих компонентов, которые составляют сенсорную систему:

указанный первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, и указанный маркер иммобилизован на поверхности аналитической подложки посредством специфического биполярного линкера;

причем указанная сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для анализируемого вещества, подлежащего исследованию;

причем указанная сенсорная молекула маркирована первым флуоресцентным маркером в положении связывания, причем соединение указанного выбранного первого маркирующего флуоресцентного маркера не производит воздействия на связывающий анализируемое вещество центр;

причем указанный биполярный линкер содержит на одной стороне специфическую связывающую группу для специфического первого флуоресцентного маркера и на противоположной стороне содержит специфическую связывающую группу для обработанной поверхности подложки;

причем выбор набора указанных линкерных молекул разнообразных типов обеспечивает одновременную иммобилизацию разнообразных первых флуоресцентных маркеров, связанных с разнообразными сенсорными молекулами на одной и той же поверхности подложки;

причем указанный второй компонент содержит химический аналог анализируемого вещества, связанный со вторым флуоресцентным маркером, при этом указанный химический аналог анализируемого вещества обратимо связан с указанной сенсорной молекулой;

причем указанный химический аналог анализируемого вещества связанный с первым флуоресцентным маркером линкером, имеющим длину, которая превышает ферстеровский радиус (иногда также называется термином «радиус РПЭФ»);

причем набор указанных химических аналогов разнообразных анализируемых веществ связан со специфическими сенсорными молекулами, содержащими соответствующие связывающие центры;

причем указанный набор флуоресцентных маркеров имеет отличительные спектральные характеристики; при этом композиция первого и второго компонентов выбрана, чтобы помещать первый флуоресцентный маркер вблизи второго флуоресцентного маркера, таким образом, что расстояние между указанными флуоресцентными маркерами составляет менее чем ферстеровский радиус, чтобы обеспечивать возникновение эффекта РПЭФ между ними, при этом указанная композиция соответствует начальному этапу аналитической подложки.

На стадии 2 на начальном этапе немедленно после стадии нанесения органических анализируемых веществ на аналитическую подложку указанную аналитическую подложку облучают (возбуждают), используя свет, спектрально соответствующий спектру возбуждения первого флуоресцентного маркера, и происходит перенос энергии во второй флуоресцентный маркер вследствие эффекта РПЭФ, индуцируя флуоресценцию второго маркера, указанную флуоресценцию обнаруживают и ее интенсивность регистрируют, при этом указанная обнаруженная флуоресценция аналитической подложки на начальном этапе соответствует спектральным характеристикам второго флуоресцентного маркера;

причем указанная обнаруженная флуоресценция имеет многоспектральные характеристики согласно выбранному набору сенсорных систем на поверхности подложки.

На стадии 3 на следующем этапе в течение заданного периода времени указанное возбуждение и обнаружение повторяют с заданными временными интервалами и каждый раз обнаруженную интенсивность флуоресценции регистрируют, обеспечивая, что в течение указанного заданного периода времени в присутствии анализируемого вещества в жидком образце, нанесенном на аналитическую подложку, молекулы аналога указанного анализируемого вещества на связывающих центрах сенсорных молекул замещаются молекулами анализируемого вещества, и в результате такого замещения указанное расстояние между двумя флуоресцентными маркерами увеличивается и становится более чем ферстеровский радиус, вызывая ослабление эффекта РПЭФ с течением времени.

На стадии 4 количество анализируемого вещества в жидком образце вычисляют/определяют как уменьшение интенсивности флуоресценции второго

флуоресцентного маркера, зарегистрированное с указанными заданными временными интервалами, причем указанное уменьшение флуоресценции с течением времени второго флуоресцентного маркера происходит вследствие ослабления эффекта РПЭФ, и степень такого уменьшения соответствует количеству анализируемого вещества в жидком образце.

Согласно следующему аспекту предложена аналитическая подложка для обнаружения и количественного определения разнообразных анализируемых органических веществ в жидком образце, причем указанная аналитическая подложка состоит из слоистых наноструктур, нанесенных на поверхность подложки.

Согласно следующему аспекту предложено устройство для обеспечения измерений анализируемых веществ в жидком образце, содержащее источник света, отсек для образца, оптоэлектронный детектор, контроллер, блок управления и линию связи, причем:

указанный отсек для измеряемого образца выполнен с возможностью приема аналитической подложки, содержащей микролитровый объем жидкого образца, нанесенного на указанную аналитическую подложку;

спектр испускания указанного источника света выбран таким образом, чтобы индуцировать флуоресценцию квантовых точек на указанном отсеке для образца;

указанный оптоэлектронный детектор установлен таким образом, чтобы обнаруживать флуоресценцию второго флуоресцентного маркера, индуцированную посредством переноса энергии от квантовой точки к указанному маркеру;

указанный электронный детектор установлен таким образом, чтобы селективно обнаруживать флуоресценцию набора разнообразных сенсорных систем, иммобилизованных на аналитической подложке;

указанные средства управления и обработки данных установлены таким образом, чтобы регистрировать кривую зависимости от времени указанной обнаруженной флуоресценции каждой сенсорной системы с течением времени для вычисления концентрации анализируемых веществ;

указанные средства связи установлены таким образом, чтобы передавать результаты измерений.

Согласно некоторым вариантам осуществления контроллер устройства выполнен с возможностью регистрации сигнала, генерированного оптоэлектронным детектором с течением времени, чтобы определять концентрацию органического анализируемого вещества.

Согласно некоторым вариантам осуществления контроллер выполнен с возможностью вычисления концентрации анализируемого вещества по относительному

уменьшению зарегистрированной флуоресценции с течением времени от ее начального значения.

Согласно некоторым вариантам осуществления второй линкер выполнен с возможностью предотвращения связывания химического аналога со специфическим связывающим центром расположенного рядом первого компонента, не связанного с химическим аналогом.

Согласно некоторым вариантам осуществления аналитическая подложка выполнена с возможностью связывания органических анализируемых веществ множества типов, причем сенсорные молекулы множества типов, соответственно, маркированы первыми флуоресцентными маркерами множества типов, которые иммобилизованы на одной и той же поверхности аналитической подложки, и контроллер выполнен с возможностью обработки, и при этом обнаруженная флуоресценция имеет многоспектральные характеристики.

Краткое описание фигур

Далее настоящее изобретение будет описано с помощью иллюстраций, которые перечислены ниже.

На фиг. 1 представлены схема и фотографии этапов реакций в процессе подготовки поверхности подложки; (а) структура активированной поверхности и образование активных центров; (б) структура поверхности с иммобилизованной КТ (зеленый цвет диска демонстрирует присутствие КТ на поверхности); (с) структура образования иммобилизованного комплекса КТ с анализируемым веществом; 1 – поверхность подложки; 2 – квантовая точка (КТ); 3 – подобная датчику молекула; 19 – реакционноспособная группа на поверхности подложки; 20 – полимерный линкер; 21 – биполярный химический линкер; 22 – реакционноспособные группы КТ для различных линкеров; 23 – функциональный линкер для связывания сенсорной молекулы с КТ.

На фиг. 2 представлена схема флуоресценции аналитической подложки; (а) поверхность подложки с иммобилизованной КТ (система, не представляющая собой РПЭФ); (б) аналитическая подложка с системой РПЭФ; 4 – линкер для флуоресцентного красителя; 5 – флуоресцентный краситель; 19 – реакционноспособная группа на поверхности подложки; 20 – полимерный линкер; 21 – биполярный химический линкер.

На фиг. 3 представлен спектр испускания модельной подложки при отсутствии (а) и в присутствии (б) маркированным красителем агентом при длине волны возбуждения 320 нм.

На фиг. 4 представлено взаимодействие анализируемого вещества с аналитической подложкой; способ вытеснения; 6 – природное анализируемое вещество; 7 – маркированный красителем аналог анализируемого вещества; 8 – сенсорная молекула, обратимо связанная с аналогом анализируемого вещества, маркированным флуоресцентным красителем; 23 – функциональный линкер для ковалентного связывания сенсорной молекулы (8) на КТ; 24 – линкер для второго флуоресцентного маркера; 28 – линкер, соединяющий маркированный красителем аналог анализируемого вещества с КТ (2).

На фиг. 5 представлена аналитическая подложка с многосенсорными системами, иммобилизованными на поверхности с композиционными линкерами; 2 и 29 – различные типы КТ; 5 и 33 – различные типы флуоресцентного красителя; 7 и 32 – различные типы аналога анализируемого вещества; 8 и 31 – различные типы сенсорной молекулы; 20 – полимерный линкер; 21 и 30 – различные типы биполярного линкера.

На фиг. 6 представлена аналитическая подложка с многосенсорными системами, связанными с КТ (2): 5, 33, 36 – различные типы флуоресцентного красителя; 7, 32, 35 – различные типы аналога анализируемого вещества; 8, 31, 34 – различные типы сенсорной молекулы; 20 – полимерный линкер; 21 – биполярный линкер.

На фиг. 7 представлена схема регистрации сигналов способа вытеснения на различных этапах реакции, которые определяются концентрации анализируемого вещества в образцах: (а) очень низкая или близкая к нулю концентрация; (б) достаточная концентрация для вытеснения половины маркированных красителем аналогов анализируемого вещества из связывающих центров; (с) этап насыщения, который определяется полным вытеснением из связывающих центров.

На фиг. 8 представлены (а) блок-схема устройства; (б) оптические схемы отсеков аналитической подложки: 9 – источник света, 10 – излучение источника света, 11 – аналитическая подложка, 12 – отсек аналитической подложки, 13 – поток флуоресценции, 14 – оптоэлектронный детектор, 15 – контроллер; 16 – блок управления, 17 – линия связи.

На фиг. 9 представлен пример, иллюстрирующий принципы способа вытеснения: 7 – маркированный красителем аналог анализируемого вещества; 8 – сенсорная молекула, обратимо связанная с аналогом анализируемого вещества, маркированным флуоресцентным красителем; 25 – возбуждающий свет; 26 – начальный спектр испускания подложки с эффектом РПЭФ; 27 – спектр испускания после вытеснения аналога анализируемого вещества.

На фиг. 10 представлен пример, иллюстрирующий зависимость затухания интенсивности испускания от времени: (а) полный график реакции; (б) начальная часть реакции.

Подробное раскрытие предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения

В настоящем документе описаны способ обнаружения, система и/или устройство, структура аналитической подложки и оптическое устройство для обнаружения анализируемых веществ в водных растворах.

В предложенной аналитической системе обнаружение анализируемого вещества осуществляется с применением эффекта РПЭФ, вызываемого переносом энергии между квантовыми точками и флуоресцентным маркером молекулы анализируемого вещества, с которой связан специфический связывающий анализируемое вещество центр. Высокая селективность этого способа достигается в результате взаимодействия молекулы анализируемого вещества со специфическим связывающим центром сенсорной молекулы, с которой связаны слоистые наноструктуры на поверхности аналитической подложки. В качестве такой подложки может присутствовать пластинка, микросхема, сфера или любая другая объемная структура, имеющая твердую поверхность, на которую нанесено многослойное покрытие, предназначенное для взаимодействия с жидким образцом. Состав материалов аналитической подложки и соответствующее специфическое взаимодействие с молекулой анализируемого вещества определяют оптический сигнал от аналитической подложки в форме испускания характеристической флуоресценции. Это испускание регистрируется и используется для определения концентрации анализируемого вещества.

В состав измерительной системы входят специфическая для анализируемого вещества аналитическая подложка и устройство для индуцирования и обнаружения соответствующей специфической флуоресценции. Специфичность системы в отношении целевого типа анализируемого вещества определяет многослойная композиция подложки, в то время как устройство для обнаружения остается одинаковым. Важный признак системы представляет собой регистрация сигнала флуоресценции от фиксированного поверхностного слоя, осуществляющего взаимодействие на аналитической подложке, без значительного влияния оптических свойств жидкого образца и гашения излучения матрицей образца. Для достижения указанных условий и обеспечения фиксированной толщины измеряемого поверхностного слоя используется эффект РПЭФ с участием

квантовых точек, поскольку этот эффект является чувствительным к межмолекулярному расстоянию и может быть измерен только в пределах диапазона ферстеровского радиуса (Lakowicz, 2006 г.).

Аналитическая подложка измерительной системы содержит следующие два взаимодействующих компонента. Первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, и при этом указанный маркер иммобилизован на поверхности подложки посредством композиционного линкера. Такая сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для анализируемого вещества, подлежащего исследованию, и, таким образом, селективно связывает молекулу анализируемого вещества. Характерный признак предложенной системы представляет собой возможность применения разнообразных сенсорных молекул со специфическими связывающими центрами для анализируемого вещества. Варианты осуществления таких сенсорных молекул могут представлять собой белки, олигонуклеотиды или синтетические молекулы, которые селективно взаимодействуют с молекулой анализируемого вещества. Сенсорные молекулы маркированы первым флуоресцентным маркером, представляющим собой, например, квантовую точку (КТ), в положении, в котором этот маркер не производит воздействия на связывающий анализируемое вещество центр. Это представляет собой первое функциональное требование к структуре аналитической подложки. При этом такой первый компонент также связан со вторым взаимодействующим компонентом.

Второй компонент содержит химический аналог анализируемого вещества, связанный со вторым флуоресцентным маркером. Второй маркер может представлять собой флуоресцентный органический краситель или флуоресцентный белок, связанный посредством подходящего линкера с химическим аналогом анализируемого вещества, который должен быть способен взаимодействовать со связывающим центром природной или синтетической сенсорной молекулы.

Важно, что спектр испускания характеристической флуоресценции первого флуоресцентного маркера отличается от спектра флуоресценции второго флуоресцентного маркера и является подходящим для возбуждения флуоресценции второго флуоресцентного маркера.

Преимущество такой системы представляет собой обеспечение количественных результатов анализа в случае жидкого образца, нанесенного на аналитическую подложку, без подготовки и предварительной обработки образца, что, таким образом, упрощает аналитическую процедуру. Другое преимущество заключается в том, что анализ осуществляется в малом объеме жидкого образца, что имеет значение для применения

способа в приложениях с ограниченным объемом образцов. Кроме того, дополнительное преимущество, которое обеспечивает такая система, представляет собой надежное обнаружение анализируемого вещества вне зависимости от оптических свойств образцов и применимость в равной степени для прозрачных и непрозрачных жидкостей, а также для образцов, содержащих твердые частицы, на поверхности аналитической подложки.

Для достижения указанных условий и обеспечения фиксированной толщины взаимодействующего поверхностного слоя используется эффект РПЭФ с участием квантовых точек. Этот эффект происходит только в пределах диапазона ферстеровского радиуса (типичный размер составляет вплоть до 10 нм), и такой размер определяет толщину измеряемого слоя на аналитической подложке. Слоистые наноструктуры, состоящие из квантовых точек, которые фиксированы на инертной твердой поверхности аналитической подложки посредством композиционного линкера и химически связаны с макромолекулярным датчиком, содержащим специфический связывающий центр для анализируемого вещества, то есть обратимо соединены с молекулой аналога анализируемого вещества, с которой связан маркирующий краситель, обеспечивают расстояние между квантовой точкой и маркирующим красителем в пределах ферстеровского радиуса.

Способ обнаружения согласно предпочтительным вариантам осуществления работает следующим образом. Аналитическая подложка на начальном этапе обеспечивает поток флуоресценции согласно эффекту РПЭФ. Когда исследуемая жидкость, содержащая молекулы анализируемого вещества, наносится на аналитическую подложку, молекула аналога анализируемого вещества вытесняется из слоистой наноструктуры молекулой анализируемого вещества. Такое вытеснение прекращает эффект РПЭФ. Изменение потока флуоресценции регистрируется с применением оптического устройства и используется для определения концентрации анализируемого вещества.

Функционально активная аналитическая подложка образована в результате сочетания двух указанных компонентов, и эти два компонента образуют комплекс на поверхности подложки. Такой комплекс приближает первый флуоресцентный маркер ко второму флуоресцентному маркеру, и в результате этого расстояние между указанными флуоресцентными маркерами становится короче, чем ферстеровский радиус, что обеспечивает эффект РПЭФ между ними в характеристическом спектральном диапазоне. Такая композиция называется сенсорной системой на начальном этапе аналитической подложки. Эта близость КТ и флуоресцентного красителя представляет собой второе функциональное требование при расположении молекулы аналога анализируемого вещества, маркированной молекулой красителя в сенсорной молекуле.

Когда аналитическая подложка на начальном этапе с нанесенным жидким образцом облучается (возбуждается) светом, спектрально соответствующим спектру возбуждения первого флуоресцентного маркера, происходит перенос энергии во второй флуоресцентный маркер вследствие эффекта РПЭФ, который индуцирует флуоресценцию второго маркера, и наблюдаемая флуоресценция аналитической подложки соответствует спектральным характеристикам второго флуоресцентного маркера. Это называется начальной точкой анализа.

Если молекулы анализируемого вещества присутствуют в исследуемом образце, указанные молекулы конкурируют с обратимо связанными молекулами аналога анализируемого вещества (второй компонент аналитической подложки) за селективные связывающие центры в сенсорной молекуле (первый компонент аналитической подложки) и замещают с течением времени молекулы аналога анализируемого вещества на связывающих центрах сенсорных молекул, и, таким образом, с течением времени происходит вытеснение молекул аналога анализируемого вещества с поверхности подложки. В результате этого расстояние между двумя флуоресцентными маркерами, например, между связанной с поверхностью КТ и флуоресцентным маркером, связанным с аналогом анализируемого вещества, увеличивается и превышает ферстеровский радиус, и при этом прекращается эффект РПЭФ. Тогда наблюдаемая флуоресценция аналитической подложки с жидким образцом соответствует уменьшению с течением времени флуоресценции второго флуоресцентного маркера вследствие ослабления эффекта РПЭФ. Степень уменьшения сигнала РПЭФ определяется концентрацией анализируемого вещества в образце, и это уменьшение используется для вычисления концентрации анализируемого вещества в исследуемом образце. Поскольку концентрация анализируемого вещества вычисляется по относительному уменьшению зарегистрированной флуоресценции с течением времени от ее начального значения, для данного устройства не требуются какие-либо изменения.

Согласно предпочтительному варианту осуществления предложен способ обнаружения и количественного определения по меньшей мере одного органического анализируемого вещества в жидком образце с применением его специфического взаимодействия с селективными связывающими центрами сенсорных молекул и последующим измерением такого взаимодействия на основании эффекта РПЭФ. Указанный способ включает стадии, которые представлены ниже.

На стадии 1 указанный жидкий образец, содержащий органические анализируемые вещества, наносят на аналитическую подложку, содержащую по меньшей мере один набор из двух взаимодействующих компонентов:

указанный первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, и указанный маркер иммобилизован на поверхности аналитической подложки посредством композиционного линкера, причем указанная сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для анализируемого вещества, подлежащего исследованию;

при этом указанная сенсорная молекула маркирована первым флуоресцентным маркером в положении связывания, при этом указанный выбранный первый маркирующий флуоресцентный маркер не производит никакого воздействия на связывание анализируемого вещества с соответствующим связывающим центром;

указанный второй компонент содержит химический аналог анализируемого вещества, связанный со вторым флуоресцентным маркером и связанный с указанным первым компонентом;

при этом композиция первого и второго компонентов выбрана, чтобы помещать первый флуоресцентный маркер вблизи второго флуоресцентного маркера, таким образом, что расстояние между указанными флуоресцентными маркерами составляет менее чем ферстеровский радиус, чтобы обеспечивать возникновение эффекта РПЭФ между ними, причем указанная композиция соответствует начальному этапу аналитической подложки.

На стадии 2 на начальном этапе немедленно после стадии нанесения органических анализируемых веществ на аналитическую подложку указанная аналитическая подложка облучается (возбуждается) светом, спектрально соответствующим спектру возбуждения первого флуоресцентного маркера, обнаруживается перенос энергии во второй флуоресцентный маркер вследствие эффекта РПЭФ, индуцирующего флуоресценцию второго маркера, и регистрируется интенсивность флуоресценции, причем указанная обнаруженная флуоресценция аналитической подложки на начальном этапе соответствует спектральным характеристикам второго флуоресцентного маркера.

На стадии 3 на следующем этапе в течение заданного периода времени указанное возбуждение и обнаружение повторяют с заданными временными интервалами и каждый раз обнаруженную интенсивность флуоресценции регистрируют, обеспечивая, что в течение указанного заданного периода времени в присутствии анализируемого вещества в жидком образце, нанесенном на аналитическую подложку, молекулы аналога указанного анализируемого вещества на связывающих центрах сенсорных молекул замещаются молекулами анализируемого вещества. В результате такого замещения указанное расстояние между двумя флуоресцентными маркерами увеличивается и составляет более чем ферстеровский радиус, что вызывает ослабление эффекта РПЭФ с течением времени.

На стадии 4 количество анализируемого вещества в жидком образце вычисляют/определяют как уменьшение интенсивности флуоресценции второго флуоресцентного маркера, зарегистрированное с указанными заданными временными интервалами, причем указанное уменьшение флуоресценции с течением времени второго флуоресцентного маркера происходит вследствие ослабления эффекта РПЭФ, и при этом степень такого уменьшения соответствует количеству анализируемого вещества в жидком образце.

Предпочтительно указанная сенсорная молекула выбрана из встречающихся в природе или синтезированных молекул, включая, но не ограничиваясь этим, белки и олигонуклеотиды.

Предпочтительно указанный первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ) с подходящим спектром испускания флуоресценции для возбуждения флуоресценции второго флуоресцентного маркера.

Предпочтительно указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный краситель с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

Предпочтительно все измерения осуществляются в тонком слое жидкого образца, причем толщина взаимодействующего поверхностного слоя указанного жидкого образца на аналитической подложке ограничена (в соответствии с) физическим ограничением ферстеровского радиуса.

Предпочтительно указанные измерения жидкого образца осуществляются без какой-либо подготовки и/или предварительной обработки указанного используемого образца.

Согласно предпочтительному варианту осуществления также предложена аналитическая подложка для обнаружения и количественного определения разнообразных анализируемых органических веществ в жидком образце, причем указанная аналитическая подложка состоит из слоистых наноструктур, нанесенных на поверхность подложки.

Указанная поверхность подложки является твердой и химически инертной.

Указанные слои слоистых наноструктуры содержат по меньшей мере один химически связанный первый флуоресцентный маркер с сенсорной молекулой и молекулой аналога анализируемого вещества, с которой связан второй флуоресцентный маркер.

Предпочтительно указанный первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ) с подходящим спектром испускания флуоресценции для возбуждения флуоресценции второго флуоресцентного маркера.

Предпочтительно указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный краситель с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

Предпочтительно указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный белок с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

Согласно первому предпочтительному варианту осуществления указанная аналитическая подложка содержит специфически определяемую аналитическую композицию, которая представляет собой сенсорную систему для измерений единственного анализируемого вещества.

Согласно второму предпочтительному варианту осуществления указанная аналитическая подложка содержит множество аналитических композиций для одновременных измерений множества анализируемых веществ.

Согласно третьему предпочтительному варианту осуществления указанная аналитическая подложка изготовлена как микропроцессор однократного применения.

Согласно четвертому предпочтительному варианту осуществления указанная аналитическая подложка выполнена с возможностью приема для измерений не более чем микролитрового объема образца.

Согласно предпочтительному варианту осуществления также предложено устройство для измерения анализируемого вещества в жидком образце.

Помимо аналитической подложки, устройство для измерения анализируемого вещества также содержит следующие составные части:

- источник света, производящий световой пучок с заданной длиной волны излучения для индуцирования флуоресценции аналитической подложки;
- отсек аналитической подложки для помещения и измерения жидкого образца;
- оптоэлектронный детектор для регистрации флуоресценции, вызванной эффектом РПЭФ;
- средства управления, обработки данных и связи для управления измерениями, определения концентрации анализируемого вещества и передачи результатов.

В целях осуществления способа согласно настоящему изобретению предложено устройство для обнаружения и количественного определения по меньшей мере одного органического анализируемого вещества в жидком образце с применением специфического взаимодействия указанного органического анализируемого вещества с селективными связывающими центрами сенсорных молекул на основе эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции.

Указанное устройство для обеспечения измерений анализируемых веществ в жидком образце согласно предпочтительному варианту осуществления содержит источник света, отсек для образца, оптоэлектронный детектор, контроллер, блок управления и линию связи.

Указанный отсек для измеряемого образца выполнен с возможностью приема аналитической подложки, содержащей микролитровый объем жидкого образца, нанесенного на указанную аналитическую подложку.

Спектр испускания указанного источника света выбирают таким образом, чтобы индуцировать флуоресценция квантовых точек на указанном отсеке для образца.

Указанный оптоэлектронный детектор установлен таким образом, чтобы обнаруживать флуоресценцию флуоресцентного маркера сенсорной молекулы, индуцированную посредством переноса энергии от квантовой точки к указанному маркеру.

Указанные средства управления и обработки данных установлены таким образом, чтобы регистрировать кривую зависимости от времени указанной обнаруженной флуоресценции с течением времени для вычисления концентрации анализируемого вещества.

Указанная линия связи установлена таким образом, чтобы передавать результаты измерений.

Согласно первому предпочтительному варианту осуществления устройства указанная оптическая схема указанного устройства обеспечивает измерение флуоресценции от единственной композиции на аналитической подложке.

Согласно второму предпочтительному варианту осуществления устройства указанная оптическая схема указанного устройства обеспечивает измерение флуоресценции от множества аналитических композиций на аналитической подложке.

Согласно предпочтительному варианту осуществления устройства контроллер обеспечивает управление работой и обработку сигналов для вычисления концентрации анализируемого вещества по относительному уменьшению зарегистрированной флуоресценции с течением времени от ее начального значения.

Согласно предпочтительному варианту осуществления устройства толщина взаимодействующего поверхностного слоя указанного жидкого образца, нанесенного на аналитическую подложку, ограничена (в соответствии с) физическим ограничением ферстеровского радиуса.

Наконец, описанный способ для определения целевого вещества в жидком образце имеет следующие отличительные признаки:

1. Селективность и чувствительность процедуры обнаружения определяются специфическим связывающим центром сенсорной молекулы, и если встречающиеся в природе сенсорные молекулы, а именно, белки и олигонуклеотиды, используются в аналитической подложке, она приобретает селективность и чувствительность, которые соответствуют фактическому (значимому) содержанию анализируемого вещества в соответствующих образцах.

2. Обнаруживаемый сигнал флуоресценции, которую вызывает эффект РПЭФ, имеет специфический спектр испускания, может быть легко отделен от испускания флуоресценции КТ и полностью гасится в результате вытеснения маркированной красителем молекулы аналога анализируемого вещества из соответствующего комплекса с сенсорной макромолекулой.

3. Строгая локализация излучения РПЭФ на поверхности аналитической подложки уменьшает затруднения, вызываемые оптическими свойствами жидкого образца, делает обнаружение независимым от объема образца и устраняет необходимость обработки образца.

4. Измерение относительной флуоресценции делает указанное устройство нечувствительным к неспецифической адсорбции любых примесей на аналитической подложке.

5. Для анализа требуется лишь микролитровый объем образца.

6. Толщина слоя обнаружения жидкого образца физически ограничена ферстеровским радиусом и не зависит от оптических свойств среды образца.

7. Оказывается возможным обеспечение обнаружения одного или множества анализируемых веществ с применением аналитической подложки, содержащей одну или множество аналитических композиций.

8. Аналитическая подложка взаимодействует с жидким образцом и, таким образом, предназначена для однократного применения.

9. Анализ осуществляется в течение одной стадии без необходимости подготовки образца и контроля свойств жидкого образца.

10. Обнаружение не является чувствительным к примесям, суспендированным твердым веществам, вязкости или непрозрачности образца.

11. Для системы не требуется регулировка и калибровка с применением эталонных растворов образца.

12. Обнаружение не является чувствительным к неспецифической адсорбции каких-либо примесей на поверхности подложки.

Аналитическая подложка построена как слоистая структура, в которой различные слои химических компонентов нанесены друг на друга, начиная с поверхности подложки (фиг. 1). Материал поверхности должен быть легко подвергаться обработке для обеспечения придания желательной формы и толщины, должен обеспечивать прикрепление к телу подложки и должен содержать химически активные группы для образования ковалентных связей с анализируемыми компонентами. Такой материал может представлять собой тонкую пластинку слюды, которая может легко подвергаться обработке для изготовления тонких пластинок, имеющих гладкую поверхность, является оптически проницаемой в ближнем ультрафиолетовом диапазоне, и ее поверхность может быть химически модифицирована. Слоистая структура слюды имеет большое значение для изготовления подложек, имеющих идентичные свойства.

Кварцевое стекло также может быть применено для изготовления аналитической подложки; кроме того, оно содержит на поверхности гидроксильные группы, которые могут быть использованы для химической модификации этого материала, и его оптическая прозрачность является почти полной. Поскольку этот материал отличается механической хрупкостью, требуются сложные способы для механической обработки этого материала, что делает его применение более дорогостоящим и сложным по сравнению со слюдой.

Применение пластических материалов представляет собой универсальное решение для данного приложения. Указанные материалы могут быть легко подвергнуты обработке для придания необходимой формы с регулируемой толщиной, и их поверхностные группы могут служить в качестве линкеров для последующей химической модификации, а также существует широкое разнообразие пластических материалов, имеющих различные композиции поверхностных групп. Оптические свойства пластических материалов в значительной степени связаны с их химическим составом, поскольку ароматические кольца и большие сопряженные структуры могут проявлять сильное поглощение ультрафиолетового излучения. Но все же существуют немногочисленные материалы, которые могут быть использованы в изготовлении аналитических подложек для данного приложения, такие как полиметилметакрилат (PMMA) и его производные.

После выбора материала подложки должна быть осуществлена химическая обработка поверхности вместе с активацией функциональных групп. Поскольку поверхность выбранного материала может содержать загрязняющие вещества и примеси, процесс очистки этого материала должен быть осуществлен с применением эффективных механических или электрических способов и/или посредством промывания растворителями.

Для активации поверхностных групп слюды или кварцевого стекла указанные материалы обрабатывают одномолярным раствором хлористоводородной кислоты в течение одного часа при повышенной температуре, составляющей приблизительно 50°C. После промывания дважды дистиллированной водой материал высушивают в течение 12 часов при температуре 110-120°C в целях удаления влаги из пор материала. Пластические материалы, которые не являются устойчивыми при высокой температуре, высушивают в вакууме.

Активированную и очищенную поверхность подложки обрабатывают раствором 20% (3-аминопропил)триметоксисилана (APTMS) в 20% толуоле в течение 12 часов при комнатной температуре. Такая продолжительность реакции является достаточной для образования слоя, содержащего высокореакционноспособные группы (19, фиг. 1) на поверхности подложки, которые служат в качестве реакционных центров для линкера, соединяющего следующий слой слоистой структуры аналитической подложки.

Поверхностные неоднородности могут вызывать точечное распределение реакционноспособных групп, и, таким образом, влиять на объемные характеристики следующего слоя, потенциально ограничивая плотность и концентрацию сенсорных систем, расположенных на этой поверхности. Чтобы устранить такое влияние поверхностной неоднородности на иммобилизацию сенсорных систем, на поверхность подложки (1) наносят полимерный слой, содержащий полимерный линкер (20), например, полиэтиленгликоль (PEG), который отличается высокой химической устойчивостью и содержит реакционноспособные группы для связывания биполярного линкера (21) следующего слоя. Химический состав линкерных молекул (21) зависит от химической природы следующего структурного слоя. Однако, как правило, этот биполярный линкер должен содержать две реакционноспособные группы. Одна группа требуется для образования ковалентных связей линкера с силанизированной поверхностью подложечного материала через полимерный слой (20). Вторая группа требуется для образования связей с функциональными группами (22), прикрепленными к квантовым точкам (2). Для предотвращения побочных реакций вторая линкерная группа может быть обеспечена защитной группой, которая может быть удалена после реакции первой линкерной группы с поверхностью подложки.

Следующий структурный слой состоит из иммобилизованных квантовых точек (2). Соответствующая реакция иммобилизации зависит от природы химических групп (22), расположенных на поверхности квантовых точек и проводится, в целях сокращения до минимума возможности агрегации указанных частиц в растворе. Такие функциональные группы служат для связывания квантовых точек с разнообразными сенсорными

молекулами (8), и химическая структура указанных функциональных групп определяет стратегию синтеза сенсорной системы.

В некоторых случаях оказывается возможной замена квантовых точек органическим флуорофором или флуоресцентными белками, и при этом все же достигается сопоставимый квантовый выход флуоресценции. Однако эта замена квантовых точек сопровождается следующими ограничениями. Во-первых, оказывается невозможным создание многовалентного флуорофора, который способен одновременно связывать несколько сенсорных молекул. Второе затруднение связано с частичным перекрыванием спектров возбуждения и испускания органических флуоресцентных красителей или белков. Таким образом, эта замена флуорофора может сочетаться с требованием очень узкой полосы возбуждения и с необходимостью применения в импульсном режиме. Указанные недостатки предотвращаются спектральными характеристиками квантовых точек.

В качестве следующего примера рассмотрим применение квантовых точек, содержащих карбоксильные группы на своей поверхности, причем иммобилизация указанных частиц на поверхности подложки осуществляется посредством амидной связи. Таким образом, вторая функциональная группа линкерной молекулы представляет собой аминокгруппу. Как обычно происходит в реакциях образования амидов, карбоксильные группы активируются посредством введения 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимид (NSH), которые способствуют завершению реакции сочетания в течение одного часа при комнатной температуре. Квантовые точки, используемые в примере, отличаются испусканием флуоресценции при 540 нм (зеленый свет).

Для создания следующего структурного слоя на аналитической подложке квантовые точки были дополнительно модифицированы функциональным линкером (23). Поскольку карбоксильные группы квантовых точек, которые остаются на наружной поверхности структурного слоя, были использованы для сочетания со вторым линкером посредством образования амидных связей, первая функциональная группа функционального линкера и в этом случае представляет собой аминокгруппу.

Для уменьшения разложения иммобилизованных квантовых точек в течение реакции с функциональным линкером, эта реакция сочетания была осуществлена в неводной реакционной среде, например, в диметилформамиде (DMF). Для этой реакции подложку, содержащую иммобилизованные квантовые точки, обрабатывают активатором и после этого вводят в реакцию с линкером. Эта реакция сочетания завершается в течение

30 минут при комнатной температуре, и избыток реагентов может быть удален посредством промывания подложки.

Однако вторая функциональная группа функционального линкера зависит от структуры функциональной группы сенсорной молекулы (8) аналитической подложки. Эта сенсорная молекула связана с наружным слоем слоистой структуры подложки, и она изменяет спектр подложки вследствие своего специфического взаимодействия с анализируемым веществом. Это изменение наблюдают с помощью соответствующего устройства и используют для вычисления концентрации анализируемого вещества на аналитической подложке. Поскольку для различных анализируемых веществ требуются различные сенсорные молекулы, функциональный линкер, используемый в реакциях сочетания указанных молекул, должен допускать широкое структурное разнообразие для второй функциональной группы.

Хотя для этой аналитической подложки могут быть использованы различные сенсорные молекулы, в том числе полимерные структуры или биополимеры, все указанные сенсорные молекулы должны иметь несколько общих характеристик: они должны специфически взаимодействовать с анализируемым веществом, и это взаимодействие должно изменять спектр флуоресценции аналитической подложки.

Схематическая иллюстрация всех стадий изготовления аналитической подложки представлена на фиг. 1 вместе с фотографиями полученной в результате подложки, облученной ультрафиолетовым светом при длине волны 312 нм. Исходный подложечный материал на фотографии (а) является полностью прозрачным и не обеспечивает никакое излучение света при ультрафиолетовом возбуждении, в то время как видимая флуоресценция (зеленый свет) вследствие иммобилизованной КТ на подложке на фотографиях (b) и (c) подтверждает, что многослойная структура, получаемая в результате описанной процедуры, имеет требуемые спектральные и химические характеристики.

Для исследования эффекта РПЭФ на такой же аналитической подложке изготовлена модельная система, которая проиллюстрирована на фиг. 2, где флуоресцентный краситель 5(6)-карбокситетраметилродамин (TAMRA) (5) связан с олигопептидом и после этого соединен с иммобилизованными квантовыми точками посредством линкера (4). Поскольку длина волны возбуждения этого красителя является такой же, как длина волны излучения используемых квантовых точек (530-540 нм), в этой модельной системе может наблюдаться эффект РПЭФ.

На фиг. 3 сопоставлены спектры флуоресценции для аналитической подложки согласно фиг. 2 с иммобилизованным TAMRA и без этого красителя. Здесь четко видно,

что подложка с иммобилизованными квантовыми точками испускает видимый зеленый свет (максимальная спектральная интенсивность при 540 нм), в то время как подложка, дополнительно содержащая иммобилизованную молекулу красителя, испускает оранжевый свет, который соответствует длине волны излучения 580 нм для TAMRA.

Это изменение спектра флуоресценции подробно исследовано с применением описанного устройства согласно предпочтительному варианту осуществления. В обоих случаях было использовано возбуждение при 360 нм. В случае подложек, содержащих иммобилизованные квантовые точки, пик излучения наблюдается при 540 нм, и при длине волны 580 нм интенсивность этого излучения уменьшается более чем в 10 раз, т. е. соответствует 10% максимальной интенсивности излучения (фиг. 3а).

Максимальная интенсивность флуоресценции подложки с иммобилизованным TAMRA представлена на фиг. 3b. Максимальная интенсивность флуоресценции этого сочетания наблюдается при длине волны 580 нм, в то время как интенсивность излучения при 540 нм является в 5 раз меньше, чем максимальное значение. Следовательно, вклад излучения квантовой точки в главный пик излучения TAMRA составляет приблизительно 2%. Этот незначительный вклад исключает возможность накопления ошибки и может быть легко учтен в вычислениях.

Может быть использован способ определения флуоресцентной концентрации анализируемого вещества посредством вытеснения аналога анализируемого вещества, маркированного флуоресцентным красителем, из связывающего центра. Для этого способа связывающие центры сенсорной молекулы предварительно насыщают флуоресцентный репортерный лиганд, и в присутствии анализируемого вещества этот флуоресцентный лиганд вытесняется из комплекса, что уменьшает наблюдаемый эффект РПЭФ.

Эта схема вытеснения проиллюстрирована на фиг. 4, и зависимость сигнала от концентрации анализируемого вещества может быть охарактеризована известной математической функцией. Обнаружение основано на том, что перенос молекулы анализируемого вещества (6) из объема раствора в связывающий центр, иммобилизованный на подложке, прекращает эффект РПЭФ, за которым наблюдает данное устройство. Для этой цели линкер (28), который связывает аналог (7) анализируемого вещества с КТ, имеет длину, превышающую ферстеровский радиус. Этот линкер предотвращает конкуренцию вытесненного аналога анализируемого вещества с природным анализируемым веществом за селективные связывающие центры на другой сенсорной молекуле (8). При этом сокращается до минимума эффект вытеснения, и, таким

образом, определяется кинетика и обеспечивается предсказуемый результат в способе вытеснения.

Длина линкера (28) может варьироваться при том условии, что его минимальная длина составляет более чем ферстеровский радиус для выбранной пары РПЭФ. Максимальная длина линкера (28) может варьироваться согласно желательному варианту осуществления. Согласно некоторым вариантам осуществления максимальная длина будет достаточно короткой, чтобы уменьшать связывание аналога анализируемого вещества с расположенной рядом несвязанной сенсорной молекулой, таким образом, что скорость связывания аналога анализируемого вещества со своей соответствующей связанной сенсорной молекулой составляет более чем скорость связывания аналога анализируемого вещества с расположенной рядом сенсорной молекулой, которая не связана с аналогом анализируемого вещества. Согласно некоторым вариантам осуществления максимальная длина линкера (28) является достаточно короткой, чтобы предотвращать связывание аналога анализируемого вещества с расположенной рядом несвязанной сенсорной молекулой.

Первая возможная сенсорная система согласно варианту осуществления для обнаружения множества анализируемых веществ представлена на фиг. 5. Применение композиционного линкера, состоящего из полимерного линкера (20) и биполярных линкеров (21, 30), делает возможной иммобилизацию квантовых точек (2, 29) с различными функциональными группами (22) на одной и той же поверхности подложки. В свою очередь, это допускает связывание различных сенсорных молекул (8, 31) с обратимо связанными различными аналогами (7, 32) анализируемого вещества, которые маркированы различными флуоресцентными маркерами (5, 33). В результате этого создается многосенсорная система на поверхности подложки для одновременного обнаружения разнообразных анализируемых веществ в образце.

Другая возможная сенсорная система согласно варианту осуществления для обнаружения множества анализируемых веществ представлена на фиг. 6. Здесь присутствуют признаки химических групп (22), расположенных на поверхности КТ (2). Согласно этому варианту осуществления разнообразные сенсорные молекулы (8, 31, 34) связаны с КТ с последующим обратимым связыванием с разнообразными аналогами (7, 32, 35) анализируемого вещества. Иммобилизация такой сенсорной системы на поверхности подложки посредством линкера (20, 21) делает возможным применение разнообразных КТ, в результате чего признаки системы согласно первому варианту осуществления интегрируются в систему согласно второму варианту осуществления, и,

таким образом, обеспечивается расширенная многосенсорная система для одновременного обнаружения множества анализируемых веществ.

Многоспектральное обнаружение флуоресценции сенсорной системы согласно обоим вариантам осуществления позволяет различать разнообразные анализируемые вещества с помощью единственной аналитической подложки.

На фиг. 7 проиллюстрированы процесс связывания и генерация сигнала. При отсутствии анализируемого вещества в среде жидкого образца детектор наблюдает только фоновый сигнал (фиг. 7a). Если анализируемое вещество занимает половину связывающих центров, то обнаруженный сигнал составляет половину максимального сигнала (фиг. 7b), в то время как максимальный сигнал соответствует насыщению связывающих центров (фиг. 7c), и дополнительное увеличение концентрации анализируемого вещества не может быть обнаружено. Абсолютное значение максимального сигнала зависит от числа связывающих центров. График зависимости сигнала для находящейся в равновесии системы от концентрации анализируемого вещества также имеет некоторую линейную часть, в то время как при повышенных концентрациях анализируемого вещества для описания графика должна быть использована более сложная функция.

Применение способа вытеснения значительно расширяет список анализируемых веществ, которые могут быть обнаружены с применением описанной аналитической подложки, потому что молекулы аналогов анализируемого вещества также могут вытеснять комплекс. Однако это вытеснение происходит в другом диапазоне концентраций, и это может быть использовано в целях отличия аналога анализируемого вещества от действительного анализируемого вещества.

Измерительная система содержит специфическую для вещества аналитическую подложку и устройство для индуцирования и обнаружение специфической флуоресценции подложки. Многослойная композиция подложки определяет специфичность системы в отношении целевого анализируемого вещества. Изменение многослойной композиции подложки допускает обнаружение разнообразных анализируемых веществ. Кроме того, конфигурация, которую составляют единственная аналитическая подложка и разнообразные многослойные композиции, обеспечивает возможность одновременного обнаружения различных анализируемых веществ в образце.

На фиг. 8a представлена бок-схема устройства для обнаружения анализируемого вещества с применением аналитической подложки. Это устройство составляют источник (9) света, обеспечивающий характеристическое световое излучением (10) при заданной длине волны для индуцирования флуоресценции аналитической подложки (11), отсек (12)

аналитической подложки для помещения и измерения аналитической подложки с жидким образцом, оптоэлектронный детектор (14) для регистрации флуоресценции (13), вызываемой эффектом РПЭФ, контроллер (15) для управления измерениями, блок (16) управления для определения концентрации анализируемого вещества и линия (17) связи для передачи результатов.

Спектральные характеристики производимого источником светового излучения (10) соответствуют спектру возбуждения КТ или первого флуоресцентного маркера другого типа для последующей передачи энергии во второй флуоресцентный маркер на аналитической подложке (11) вследствие эффекта РПЭФ. На фиг. 8b проиллюстрированы некоторые варианты осуществления оптических схем отсека (12) подложки. Испускание флуоресценции (13) второго флуоресцентного маркера на аналитической подложке (11) обнаруживается посредством оптоэлектронного детектора (14). Этот детектор может иметь одноканальную или многоканальную схему. Если аналитическая подложка содержит несколько многослойных структур, предназначенных для одновременного обнаружения нескольких анализируемых веществ, то может быть использован многоканальный детектор. Согласно такому варианту осуществления каждый канал служит для обнаружения специфического анализируемого вещества. Контроллер (15) служит для управления устройством и измерения уменьшение интенсивности флуоресценции аналитической подложки с течением времени согласно схемам на фиг. 7. Линия (17) связи обеспечивает проводную или беспроводную передачу команд устройству и передачу результатов измерений в наружный блок (16) управления для вычисления концентрации анализируемого вещества по измеренной кривой зависимости от времени указанной флуоресценции и для дополнительной визуализации, хранения и передачи по линии (18) связи результатов внешнему получателю. Блок (16) управления может представлять собой, но не ограничивается этим, компьютер, панельный компьютер, планшет, смартфон и т. д., и в качестве внешнего получателя может присутствовать удаленный сервер, облачная база данных и т. д.

Пример

В следующем примере проиллюстрирована применимость способов, описанных в настоящем документе, без ограничения его объема, а также рассмотрено определение концентрации анализируемого вещества, которое представляет собой водорастворимую биоактивную молекулу, с применением способа вытеснения, как проиллюстрировано на фиг. 9.

Изготовление аналитической подложки

Была получена реакционная смесь, состоящая из следующих компонентов:

400 мкл солевого буферного раствора 10 мМ борной кислоты, содержащего 50 мМ NaCl, pH 7,5,

25 мкл суспензии КТ (1 мг/мл) в воде,

90 мкл (3 мМ) 1,6-диаминогексана,

7 мкл 10 мМ аптамера, который содержит карбоксильные группы,

15 мкл смеси EDC (20 мг/мл) и NHS (1 мг/мл).

Полученную смесь помещали на диски из слюды, предварительно модифицированной с применением $(\text{EtO})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$. Диски инкубировали с реакционной смесью в течение одного часа, а затем промывали водой и высушивали в вакууме. Для завершения изготовления подложки диски из модифицированной слюды замачивали в 10 мМ фосфатном буферном растворе, содержащем 150 мМ NaCl, и специфический маркированный TAMRA аналог анализируемого вещества добавляли в концентрации 4 мкМ. В течение 30 минут инкубации при комнатной температуре маркированный TAMRA аналог анализируемого вещества образовывал связи с аптамером, и этот процесс завершалось образованием слоистой структуры аналитической подложки, которая содержала слои ковалентно связанной КТ и аптамера, обратимо связанного с комплексом аналога анализируемого вещества и TAMRA. Когда КТ и TAMRA находились на коротком расстоянии друг от друга на поверхности данной подложки, наблюдался интенсивный эффект РПЭФ в спектре испускания в диапазоне 500-600 нм при длине волны возбуждения 320 нм. Этот спектр испускания соответствовал флуоресценции TAMRA с максимальной интенсивностью при 580 нм.

Процедура анализа

Был получен раствор анализируемого вещества, содержащий компоненты, которые имитируют физиологические условия крови. Значение pH раствора было стабилизировано в диапазоне от 7,0 до 7,5 с применением фосфатно-солевого буферного раствора. Для имитации воздействия белковых компонентов бычий сывороточный альбумин был использован в конечном растворе в концентрации 6 г/дл. Для исследования анализируемого вещества растворы с концентрацией 100 нМ и 200 нМ были помещены на диски из слюды, и были обнаружены изменения в спектре флуоресценции. Указанные изменения отражают вытеснение маркированного TAMRA аналога анализируемого вещества из соответствующего комплекса с иммобилизованным аптамером анализируемым веществом в анализируемой смеси. Это вытеснение сопровождается

удалением маркера TAMRA с поверхности аналитической подложки, что прекращает эффект РПЭФ между флуорофором и КТ.

Исследование было осуществлено в двух режимах. Во-первых, регистрировали уменьшение эффекта РПЭФ с течением времени и наблюдали начальную скорость этого процесса. Во-вторых, систему инкубировали до тех пор, пока не было достигнуто равновесное состояние, а затем значение эффекта РПЭФ было измерено и использовано для характеристики аналитической системы.

Изменение эффекта РПЭФ было проиллюстрировано посредством сравнения интенсивности излучения КТ при 540 нм и излучения TAMRA при 580 нм. Вытеснение маркированного TAMRA аналога анализируемого вещества из комплекса с иммобилизованным аптамером, инициированное в присутствии молекул анализируемого вещества в образце сопровождалось исчезновением эффекта РПЭФ. В результате этого флуоресценция TAMRA при 580 нм уменьшалась, а флуоресценция КТ при 540 нм увеличивалась (26,27). Краткие результаты анализа указанных спектральных данных представлены в таблице 1.

Таблица 1. Соотношения интенсивностей флуоресценции донора (КТ, максимальное излучение при 540 нм) и акцептора (TAMRA, максимальное излучение при 580 нм) при соответствующих значениях длины волны (540 нм и 580 нм) в процентах от максимальных уровней.

Время, минут	100 нМ	200 нМ
0	15,0%	17,4%
0,5	43,1%	68,5%
1,5	75,4%	91,7%
2	85,7%	92,8%
3	92,5%	92,0%
5	89,2%	97,2%

Вытеснение иммобилизованного аналога анализируемого вещества, маркированного TAMRA, из комплекса с иммобилизованным аптамером также было обнаружено посредством измерения уровня излучения TAMRA. Изменения соответствующей интенсивности флуоресценции с течением времени в экспериментах представлены в таблице 2. Интенсивности, нормированные по отношению к начальному значению, продемонстрировали четкое уменьшение с течением времени. Плато выходного сигнала было определено через 5 минут при концентрации анализируемого вещества 200 нМ и через 15 минут для раствора 100 нМ анализируемого вещества.

Таблица 2. Интенсивность испускания флуоресценции TAMRA при 580 нм. ППР

Время, минут	100 нМ	200 нМ
0	100,0%	100,0%
0,5	95,7%	72,3%
1,5	92,7%	52,8%
2	91,5%	42,9%
3	73,9%	31,4%
5	60,6%	13,2%

Начальная скорость диссоциации комплекса, инициированной анализируемым веществом в среде образца, была вычислена по углу наклона начальной линейной части графика спектральных изменений с течением времени. Указанные графики представлены на фиг. 10. Углы наклона начальных частей измеренных кинетических кривых различались в присутствии растворов лиганда в концентрациях 100 нМ и 200 нМ. Значения начальных скоростей представлены в таблице 3. В результате обнаружено, что кинетические исследования зависят от временного интервала, требуемого для достижения равновесного состояния системы, что может представлять собой значительный источник неопределенности анализа, причем результаты кинетических исследований являются более надежными. Кроме того, указанные результаты могут быть получены в течение нескольких минут, что сокращает продолжительность исследования. Этот аспект оказывается весьма важным, если должны быть исследованы очень активные анализируемые вещества, поскольку в большинстве случаев сильные взаимодействия между подложкой и анализируемым веществом являются медленными.

Таблица 3. Начальная скорость реакции для определения различных концентраций конкурирующего анализируемого вещества.

Концентрация анализируемого вещества, нМ	Скорость реакции, мин ⁻¹
100	9,8±0,6
200	29,8±1,0

Настоящее изобретение, которое описано выше, не ограничивается вариантами осуществления, представленными выше и продемонстрированными в иллюстрациях, но настоящее изобретение может содержать и другие варианты осуществления в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Список литературы

Alsager O.A., Kumar S., Willmott G.R., McNatty K.P., Hodgkiss J.M. Обнаружение низкомолекулярных соединений в растворе посредством отклика на сокращение размера функционализированных аптамером наночастиц. *Biosens. Bioelectron.* 15 июля 2014 г.; 57:262-8. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.004.

Buchberger W.W. Современные подходы к анализу следов фармацевтических препаратов и изделий для личной гигиены в окружающей среде. *J. Chromatogr. A.* 28 января 2011 г.; 1218(4):603-18. doi: 10.1016/j.chroma.2010.10.040.

Couto R.A., Lima J.L., Quinaz M.B. Современные разработки, исследования и потенциальные приложения изготовленных методом трафаретной печати электродов в фармацевтическом и биологическом анализе. *Talanta.* 01 января 2016 г.; 146:801-14. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.011.

Farré M., Petrovic M., Barceló D. Современные разработанные методы газовой хроматомасс-спектрометрии и жидкостной хроматомасс-спектрометрии для определения нестероидных противовоспалительных средств в образцах воды. *Anal. Bioanal. Chem.* Февраль 2007 г.; 387(4):1203-14.

Kodoyianni V. Безмаркерный анализ биомолекулярных взаимодействий с применением изображений, полученных методов поверхностного плазмонного резонанса. *Biotechniques.* Январь 2011 г.; 50(1):32-40. doi: 10.2144/000113569.

Lakowicz J.R. Основы флуоресцентной спектроскопии, третье издание. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, издательство Springer, 2006 г. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4

Lara F.J., Airado-Rodríguez D., Moreno-González D., Huertas-Pérez J.F., García-Campana A.M. Применения капиллярного электрофореза с хемилюминесцентным обнаружением в клиническом, экологическом и пищевом анализе. Обзор. *Anal. Chim. Acta.* 24 марта 2016 г.; 913:22-40. doi: 10.1016/j.aca.2016.01.046.

Long F., Zhu A., Shi H. Современные достижения в области оптических биосенсоров для экологического мониторинга и раннего предупреждения. *Sensors* (Базель). 15 октября 2013 г.; 13(10):13928-48. doi: 10.3390/s131013928.

Nguyen B., Tanious F.A., Wilson W.D. Биосенсорный поверхностный плазмонный резонанс: количественный анализ взаимодействий низкомолекулярных соединений и нуклеиновых кислот. *Methods.* Июнь 2007 г.; 42(2):150-61.

Petrovic M., Farré M., de Alda M.L., Perez S., Postigo C., Köck M., Radjenovic J., Gros M., Barcelo D. Современные тенденции в жидкостном хроматомасс-спектрометрическом

анализе органических примесей в образцах окружающей среды. *J. Chromatogr. A*. 18 июня 2010 г.; 1217(25):4004-17. doi: 10.1016/j.chroma.2010.02.059.

Staples C.A., Naylor C.G., Williams J.B., Gledhill W.E. Конечное биоразложение алкилфенолэтоксилатных поверхностно-активных веществ и промежуточные продукты их биоразложения. *Environ. Toxicol. Chem.* Ноябрь 2001 г.; 20(11):2450-5.

Xu Y., Yang X., Wang E. Обзор: аптамеры в жидкостных микросхемах. *Anal. Chim. Acta*. 17 декабря 2010 г.; 683(1):12-20. doi: 10.1016/j.aca.2010.10.007.

Zhou D., Ying L., Hong X., Hall E.A., Abell C., Klenerman D. Компактный функциональный конъюгат квантовых точек и ДНК: получение, гибридизация и специфическое безмаркерное обнаружение ДНК. *Langmuir*. 04 марта 2008 г.; 24(5):1659-64. doi: 10.1021/la703583u.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения и количественного определения по меньшей мере одного органического анализируемого вещества в жидком образце с применением специфического взаимодействия указанного органического анализируемого вещества с селективными связывающими центрами сенсорных молекул на основе эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции, причем указанный способ включает стадии, отличающиеся тем, что:

получают аналитическую подложку, имеющую поверхность аналитической подложки, содержащую первый компонент и второй компонент;

первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, иммобилизованную на поверхности аналитической подложки первым линкером, причем первый линкер представляет собой биполярный линкер, содержащий первую связывающую группу для специфического связывания первого флуоресцентного маркера и вторую связывающую группу для специфического связывания поверхности аналитической подложки, причем сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для органического анализируемого вещества, и при этом сенсорная молекула маркирована первым флуоресцентным маркером в положении, которое не производит воздействия на органическое анализируемое вещество, связывающее специфический связывающий центр;

второй компонент содержит химический аналог органического анализируемого вещества, причем химический аналог маркирован вторым флуоресцентным маркером, химический аналог связан с первым флуоресцентным маркером вторым линкером, имеющим длину, которая превышает ферстеровский радиус, и при этом химический аналог обратимо связывает специфический связывающий центр сенсорной молекулы первого компонента;

первый и второй компоненты взаимодействуют, и при этом первый флуоресцентный маркер оказывается вблизи второго флуоресцентного маркера на расстоянии, которое составляет менее чем ферстеровский радиус, что обеспечивает эффект резонансного переноса энергии флуоресценции между первым и вторым флуоресцентными маркерами;

жидкий образец наносят на аналитическую подложку;

аналитическую подложку облучают светом, спектрально соответствующим спектру возбуждения первого флуоресцентного маркера;

обнаруживают флуоресценцию второго флуоресцентного маркера;

обнаруживают органическое анализируемое вещество посредством определения уменьшения флуоресценции второго флуоресцентного маркера вследствие вытеснения органическим анализируемым веществом химического аналога из специфического связывающего центра и ослабления эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что он дополнительно включает определение количества органического анализируемого вещества в жидком образце посредством измерения уменьшения флуоресценции первого флуоресцентного маркера, причем степень измеряемого уменьшения соответствует количеству органического анализируемого вещества в жидком образце.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второй линкер выполнен с возможностью предотвращения связывания химического аналога со специфическим связывающим центром расположенного рядом первого компонента, не связанного с химическим аналогом.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что аналитическая подложка выполнена с возможностью связывания органических анализируемых веществ множества типов, причем сенсорные молекулы множества типов, соответственно, маркированы первыми флуоресцентными маркерами множества типов, которые иммобилизованы на одной и той же поверхности аналитической подложки, и при этом обнаруженная флуоресценция имеет многоспектральные характеристики.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ).

6. Способ по п. 3, отличающийся тем, что второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный краситель, у которого спектр испускания флуоресценции отличается от спектра испускания флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что обнаружение органического анализируемого вещества происходит в тонком слое жидкого образца, причем толщина взаимодействующего поверхностного слоя жидкого образца на аналитической подложке ограничена согласно ферстеровскому радиусу.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что жидкий образец наносят без какой-либо подготовки и/или предварительной обработки.

9. Способ по п. 1, причем указанный способ отличается тем, что:

на стадии 1 на начальном этапе указанный жидкий образец, содержащий органические анализируемые вещества, наносят на аналитическую подложку,

содержащую по меньшей мере один набор из двух взаимодействующих компонентов, которые составляют сенсорную систему:

указанный первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, и указанный маркер иммобилизован на поверхности аналитической подложки посредством специфического биполярного линкера;

причем указанная сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для анализируемого вещества, подлежащего исследованию;

причем указанная сенсорная молекула маркирована первым флуоресцентным маркером в положении связывания,

причем соединение указанного выбранного первого маркирующего флуоресцентного маркера не производит воздействия на связывающий анализируемое вещество центр;

причем указанный биполярный линкер содержит на одной стороне специфическую связывающую группу для специфического первого флуоресцентного маркера и на противоположной стороне содержит специфическую связывающую группу для обработанной поверхности подложки;

причем выбор набора указанных линкерных молекул разнообразных типов обеспечивает одновременную иммобилизацию разнообразных первых флуоресцентных маркеров, связанных с разнообразными сенсорными молекулами на одной и той же поверхности подложки;

причем указанный второй компонент содержит химический аналог анализируемого вещества, связанный со вторым флуоресцентным маркером, при этом указанный химический аналог анализируемого вещества обратимо связан с указанной сенсорной молекулой;

причем указанный химический аналог анализируемого вещества связанный с первым флуоресцентным маркером линкером, имеющим длину, которая превышает ферстеровский радиус;

причем набор указанных химических аналогов разнообразных анализируемых веществ связан со специфическими сенсорными молекулами, содержащими соответствующие связывающие центры;

причем указанный набор флуоресцентных маркеров имеет отличительные спектральные характеристики;

причем композиция первого и второго компонентов выбрана, чтобы помещать первый флуоресцентный маркер вблизи второго флуоресцентного маркера, таким образом, что расстояние между указанными флуоресцентными маркерами составляет

менее чем ферстеровский радиус, чтобы обеспечивать возникновение эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции между ними, при этом указанная композиция соответствует начальному этапу аналитической подложки;

на стадии 2 на начальном этапе немедленно после стадии нанесения органических анализируемых веществ на аналитическую подложку указанную аналитическую подложку облучают светом, который спектрально соответствует спектру возбуждения первого флуоресцентного маркера, и происходит перенос энергии во второй флуоресцентный маркер вследствие эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции, индуцируя флуоресценцию второго маркера, указанную флуоресценцию обнаруживают и ее интенсивность регистрируют, при этом указанная обнаруженная флуоресценция аналитической подложки на начальном этапе соответствует спектральным характеристикам второго флуоресцентного маркера;

причем указанная обнаруженная флуоресценция имеет многоспектральные характеристики согласно выбранному набору сенсорных систем на поверхности подложки;

на стадии 3 на следующем этапе в течение заданного периода времени указанное возбуждение и обнаружение повторяют с заданными временными интервалами и каждый раз обнаруженную интенсивность флуоресценции регистрируют, обеспечивая, что в течение указанного заданного периода времени в присутствии анализируемого вещества в жидком образце, нанесенном на аналитическую подложку, молекулы аналога указанного анализируемого вещества на связывающих центрах сенсорных молекул замещаются молекулами анализируемого вещества, и в результате такого замещения указанное расстояние между двумя флуоресцентными маркерами увеличивается и становится более чем ферстеровский радиус, вызывая ослабление эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции с течением времени;

на стадии 4 количество анализируемого вещества в жидком образце вычисляют/определяют как уменьшение интенсивности флуоресценции второго флуоресцентного маркера, зарегистрированное с указанными заданными временными интервалами, причем указанное уменьшение флуоресценции с течением времени второго флуоресцентного маркера происходит вследствие ослабления эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции, и степень такого уменьшения соответствует количеству анализируемого вещества в жидком образце.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанная сенсорная молекула выбрана из встречающихся в природе или синтезированных молекул, включая, но не ограничиваясь этим, белки и олигонуклеотиды.

11. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ) с подходящим спектром испускания флуоресценции для возбуждения флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

12. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный краситель с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

13. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанные измерения осуществляются в тонком слое жидкого образца, причем толщина взаимодействующего поверхностного слоя указанного жидкого образца на аналитической подложке ограничена (в соответствии с) физическим ограничением радиуса резонансного переноса энергии флуоресценции.

14. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанные измерения жидкого образца осуществляются без какой-либо подготовки и/или предварительной обработки указанного используемого образца.

15. Способ по любому из предшествующих пп. 9-14, отличающийся тем, что указанная аналитическая подложка состоит из слоистых наноструктур, нанесенных на поверхность подложки.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что поверхность подложки является твердой и химически инертной.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанные слои содержат по меньшей мере один химически связанный первый флуоресцентный маркер с сенсорной молекулой и молекулой аналога анализируемого вещества, с которой связан второй флуоресцентный маркер.

18. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ) с подходящим спектром испускания флуоресценции для возбуждения флуоресценции второго флуоресцентного маркера.

19. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный краситель с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

20. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный белок с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

21. Способ по п. 15, отличающийся тем, что в нем присутствует специфически определенная аналитическая композиция для измерений единственного анализируемого вещества.

22. Способ по п. 15, отличающийся тем, что в нем присутствует множество аналитических композиций для одновременных измерений множества анализируемых веществ.

23. Способ по п. 15, отличающийся тем, что он построен как микропроцессор однократного применения.

24. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанная аналитическая подложка выполнена с возможностью приема для измерений не более чем микролитрового объема образца.

25. Аналитическая подложка для обнаружения и количественного определения разнообразных анализируемых органических веществ в жидком образце, отличающаяся тем, что указанная аналитическая подложка состоит из слоистых наноструктур, нанесенных на поверхность подложки.

26. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что поверхность подложки является твердой и химически инертной.

27. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что указанные слои содержат по меньшей мере один химически связанный первый флуоресцентный маркер с сенсорной молекулой и молекулой аналога анализируемого вещества, с которой связан второй флуоресцентный маркер.

28. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что указанный первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ) с подходящим спектром испускания флуоресценции для возбуждения флуоресценции второго флуоресцентного маркера.

29. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный краситель с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

30. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что указанный второй флуоресцентный маркер представляет собой флуоресцентный белок с характеристическим спектром испускания флуоресценции, который отличается от спектра флуоресценции первого флуоресцентного маркера.

31. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что в ней присутствует специфически определенная аналитическая композиция для измерений единственного анализируемого вещества.

32. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что в ней присутствует множество аналитических композиций для одновременных измерений множества анализируемых веществ.

33. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что она построена как микропроцессор однократного применения.

34. Аналитическая подложка по п. 25, отличающаяся тем, что указанная аналитическая подложка выполнена с возможностью приема для измерений не более чем микролитрового объема образца.

35. Устройство для обнаружения и количественного определения по меньшей мере одного органического анализируемого вещества в жидком образце с применением специфического взаимодействия указанного органического анализируемого вещества с селективными связывающими центрами сенсорных молекул на основе эффекта резонансного переноса энергии флуоресценции, причем указанное устройство содержит источник света, отсек для образца, оптоэлектронный детектор, контроллер, блок управления и линию связи и отличается тем, что

указанный отсек для измеряемого образца выполнен с возможностью приема аналитической подложки, содержащей микролитровый объем жидкого образца, нанесенного на указанную аналитическую подложку;

спектр испускания указанного источника света выбран таким образом, чтобы индуцировать флуоресценцию квантовых точек на указанном отсеке для образца;

указанный оптоэлектронный детектор установлен таким образом, чтобы обнаруживать флуоресценцию второго флуоресцентного маркера, индуцированную посредством переноса энергии от квантовой точки к указанному маркеру;

указанный электронный детектор установлен таким образом, чтобы селективно обнаруживать флуоресценцию набора разнообразных сенсорных систем, иммобилизованных на аналитической подложке;

указанные средства управления и обработки данных установлены таким образом, чтобы регистрировать кривую зависимости от времени указанной обнаруженной флуоресценции каждой сенсорной системы с течением времени для вычисления концентрации анализируемых веществ;

указанные средства связи установлены таким образом, чтобы передавать результаты измерений.

36. Устройство по п. 35, отличающееся тем, что указанная оптическая схема выполнена с возможностью измерения флуоресценции от единственной аналитической композиции на аналитической подложке.

37. Устройство по п. 35, отличающееся тем, что указанная оптическая схема выполнена с возможностью измерения флуоресценции от множества аналитических композиций на аналитической подложке.

38. Устройство по п. 35, отличающееся тем, что указанные средства управления и обработки данных выполнены с возможностью вычисления концентрации анализируемого вещества по относительному уменьшению зарегистрированной флуоресценции с течением времени от ее начального значения.

39. Устройство по п. 35, отличающееся тем, что толщина взаимодействующего поверхностного слоя указанного жидкого образца, нанесенного на аналитическую подложку, ограничена в соответствии с физическим ограничением радиуса резонансного переноса энергии флуоресценции.

40. Устройство по п. 35, отличающееся тем, что:

аналитическая подложка имеет поверхность аналитической подложки, содержащую первый компонент и второй компонент;

первый компонент содержит сенсорную молекулу, маркированную первым флуоресцентным маркером, иммобилизованную на поверхности аналитической подложки первым линкером, причем первый линкер представляет собой биполярный линкер, содержащий первую связывающую группу для специфического связывания первого флуоресцентного маркера и вторую связывающую группу для специфического связывания поверхности аналитической подложки, причем сенсорная молекула содержит специфический связывающий центр для органического анализируемого вещества, и при этом сенсорная молекула маркирована первым флуоресцентным маркером в положении, которое не производит воздействия на органическое анализируемое вещество, связывающее специфический связывающий центр;

второй компонент содержит химический аналог органического анализируемого вещества, причем химический аналог маркирован вторым флуоресцентным маркером, химический аналог связан с первым флуоресцентным маркером вторым линкером, имеющим длину, которая превышает ферстеровский радиус, и при этом химический аналог обратимо связывает специфический связывающий центр сенсорной молекулы первого компонента;

аналитическая подложка определяет отсек аналитической подложки для нанесения жидкого образца на поверхность аналитической подложки;

источник света выполнен с возможностью испускания специфического спектра, чтобы индуцировать флуоресценцию первого флуоресцентного маркера;

оптоэлектронный детектор выполнен с возможностью обнаружения флуоресценции второго флуоресцентного маркера и генерации сигнала, соответствующего интенсивности флуоресценции;

контроллер выполнен с возможностью регистрации сигнала от оптоэлектронного детектора и определения присутствия органического анализируемого вещества на основании уменьшения обнаруженной флуоресценции.

41. Устройство по п. 40, отличающееся тем, что контроллер выполнен с возможностью регистрации сигнала, генерированного оптоэлектронным детектором с течением времени, чтобы определять концентрация органического анализируемого вещества.

42. Устройство по п. 41, отличающееся тем, что контроллер выполнен с возможностью для вычисления концентрации анализируемого вещества по относительному уменьшению зарегистрированной флуоресценции с течением времени от ее начального значения.

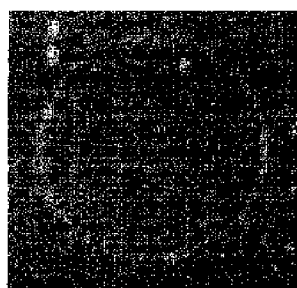
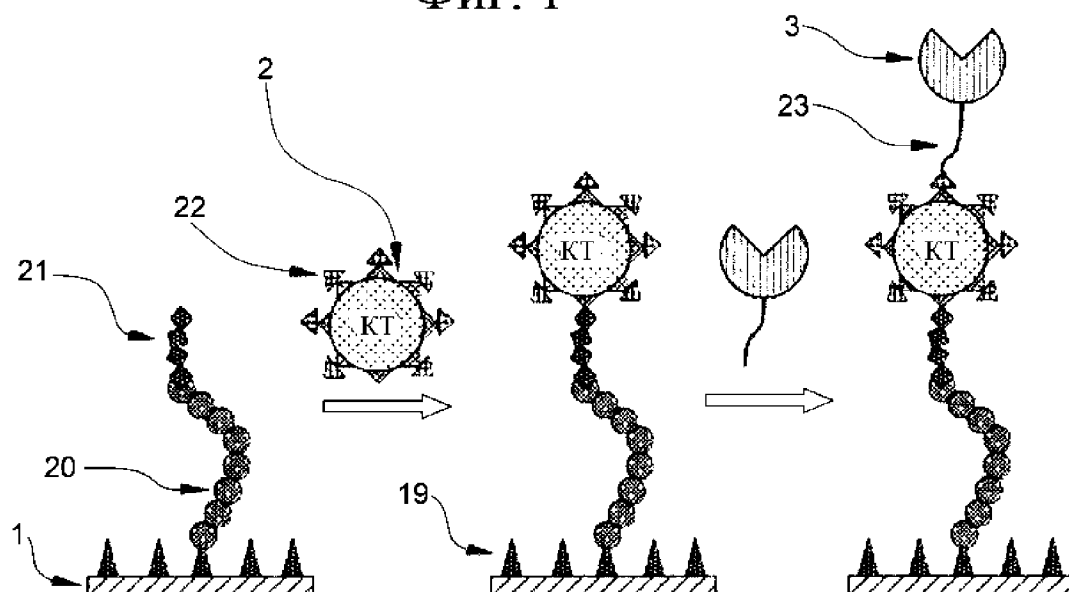
43. Устройство по п. 40, отличающееся тем, что второй линкер выполнен с возможностью предотвращения связывания химического аналога со специфическим связывающим центром расположенного рядом первого компонента, не связанного с химическим аналогом.

44. Устройство по п. 40, отличающееся тем, что аналитическая подложка выполнена с возможностью связывания органических анализируемых веществ множества типов, причем сенсорные молекулы множества типов, соответственно, маркированы первыми флуоресцентными маркерами множества типов, которые иммобилизованы на одной и той же поверхности аналитической подложки, и контроллер выполнен с возможностью обработки обнаруженной флуоресценции, которая имеет многоспектральные характеристики.

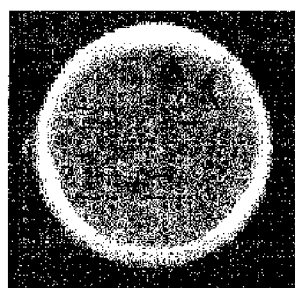
45. Устройство по п. 40, отличающееся тем, что первый флуоресцентный маркер представляет собой квантовую точку (КТ).

46. Устройство по п. 40, отличающееся тем, что толщина взаимодействующего поверхностного слоя жидкого образца, нанесенного на аналитическую подложку, ограничена согласно ферстеровскому радиусу.

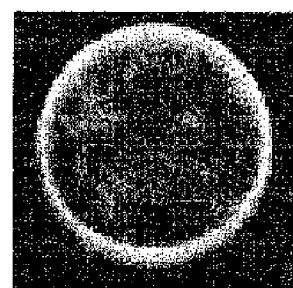
Фиг. 1



a)

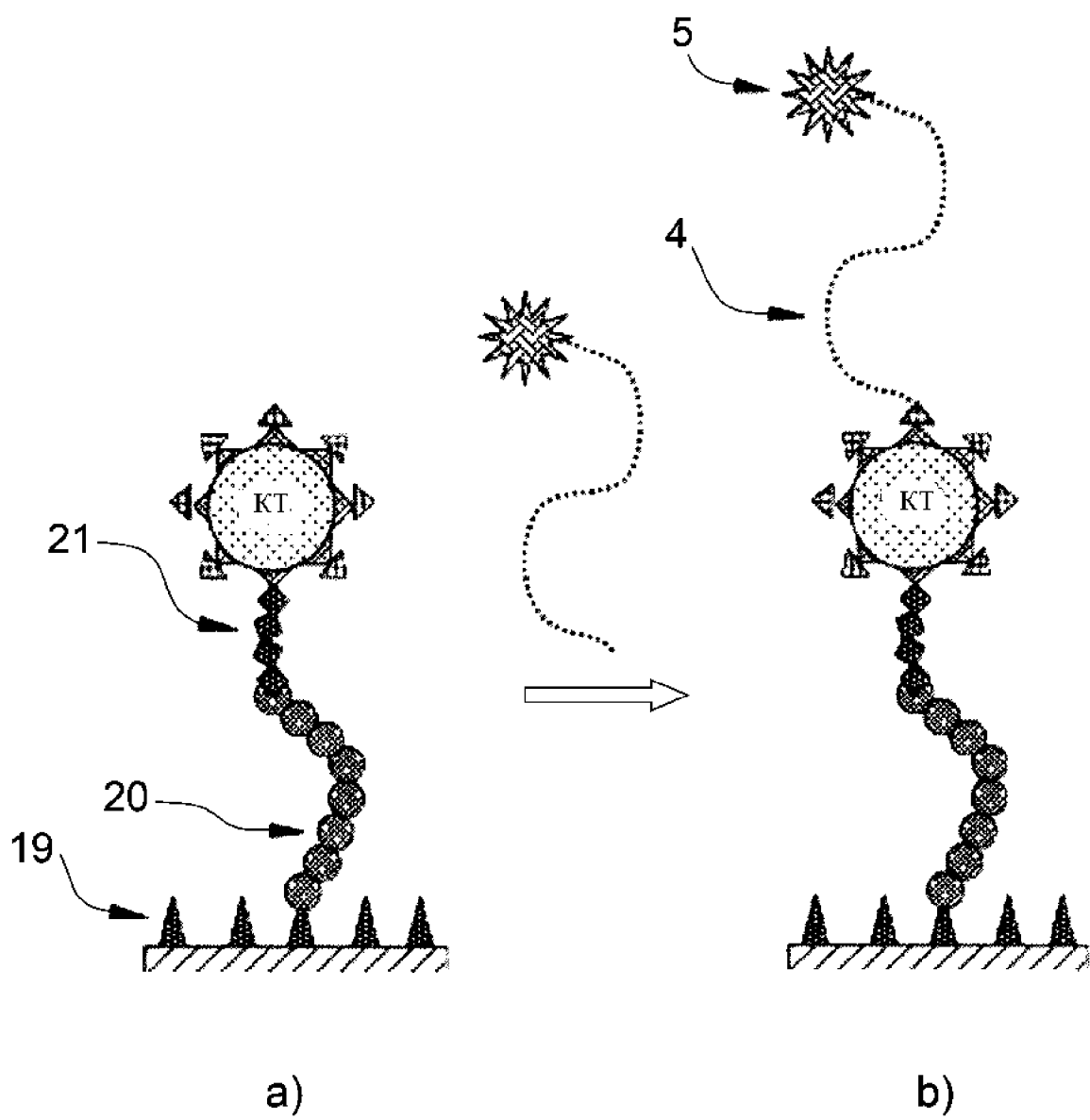


b)

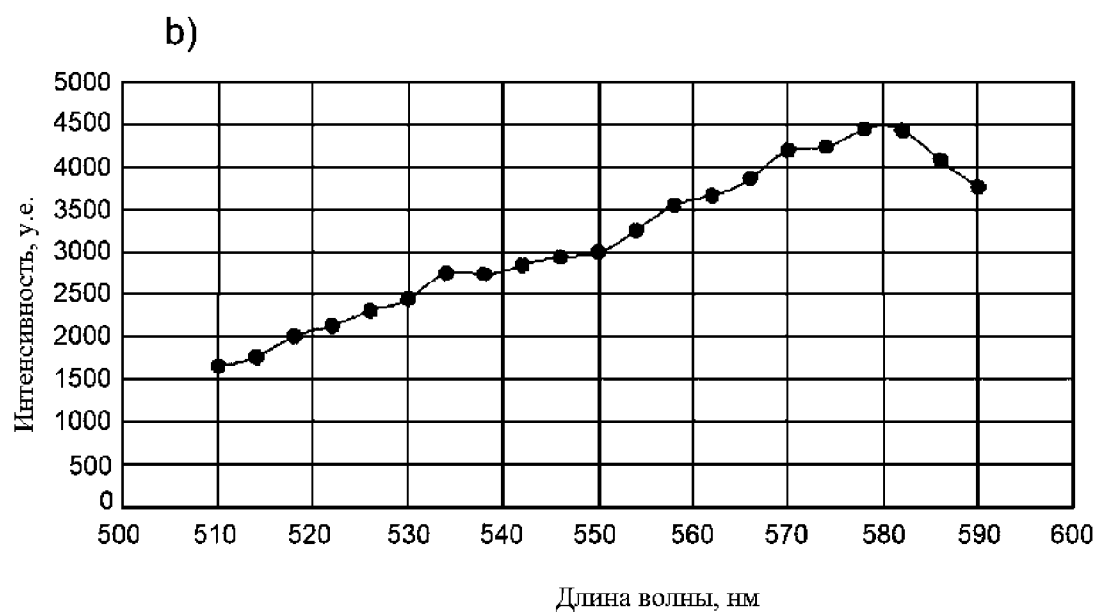
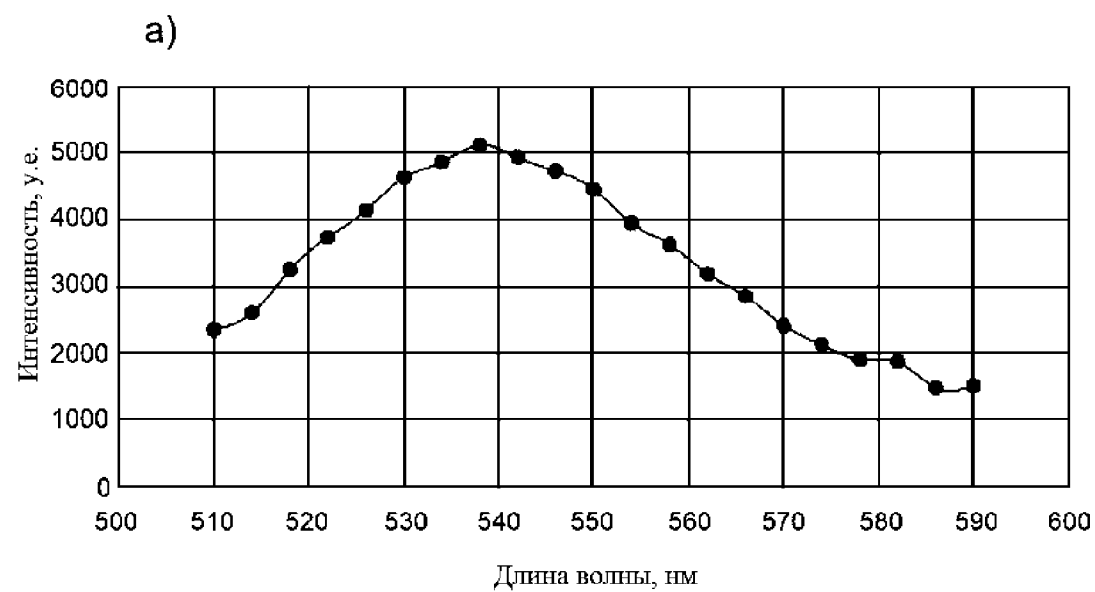


c)

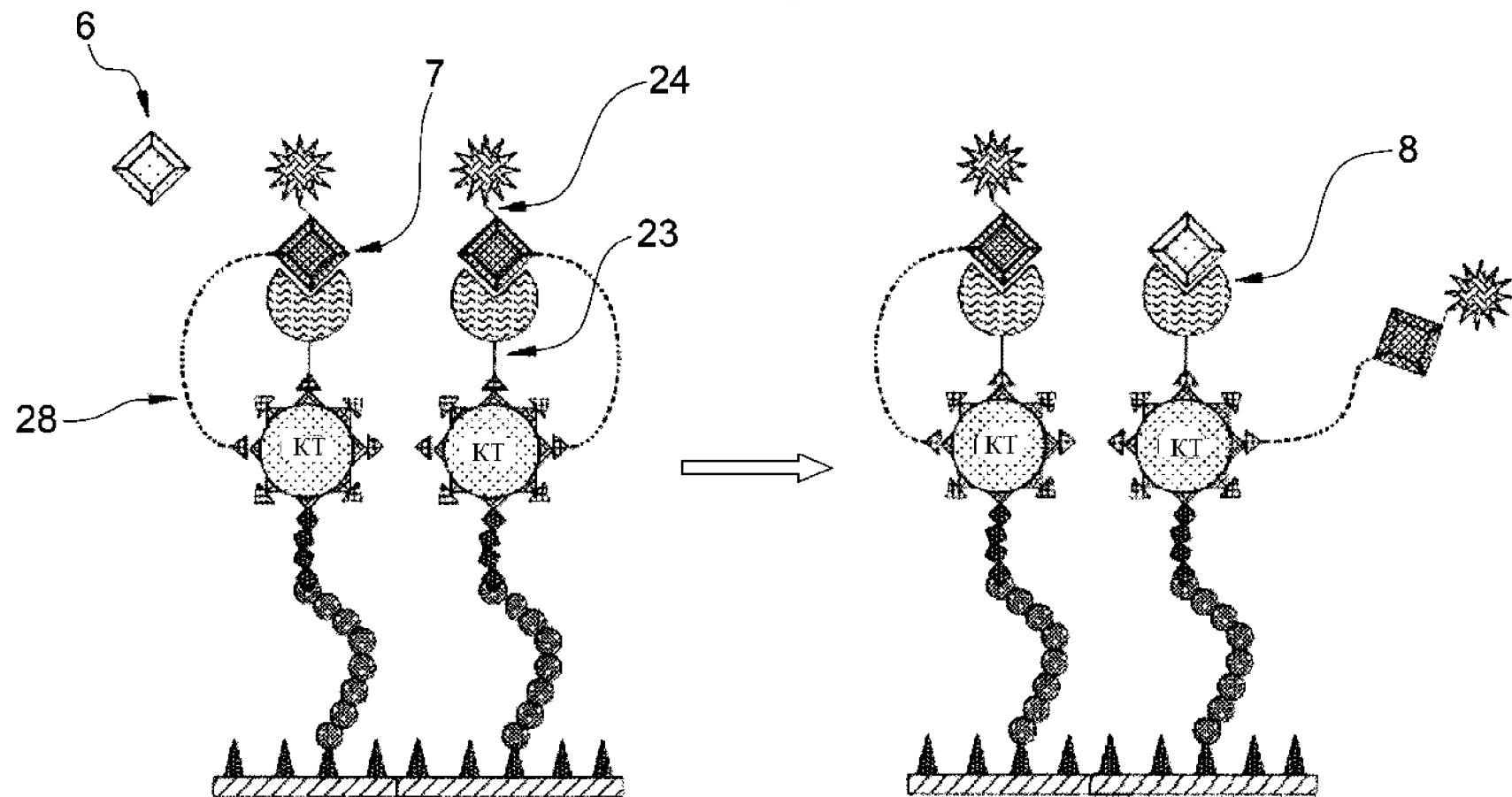
Фиг. 2



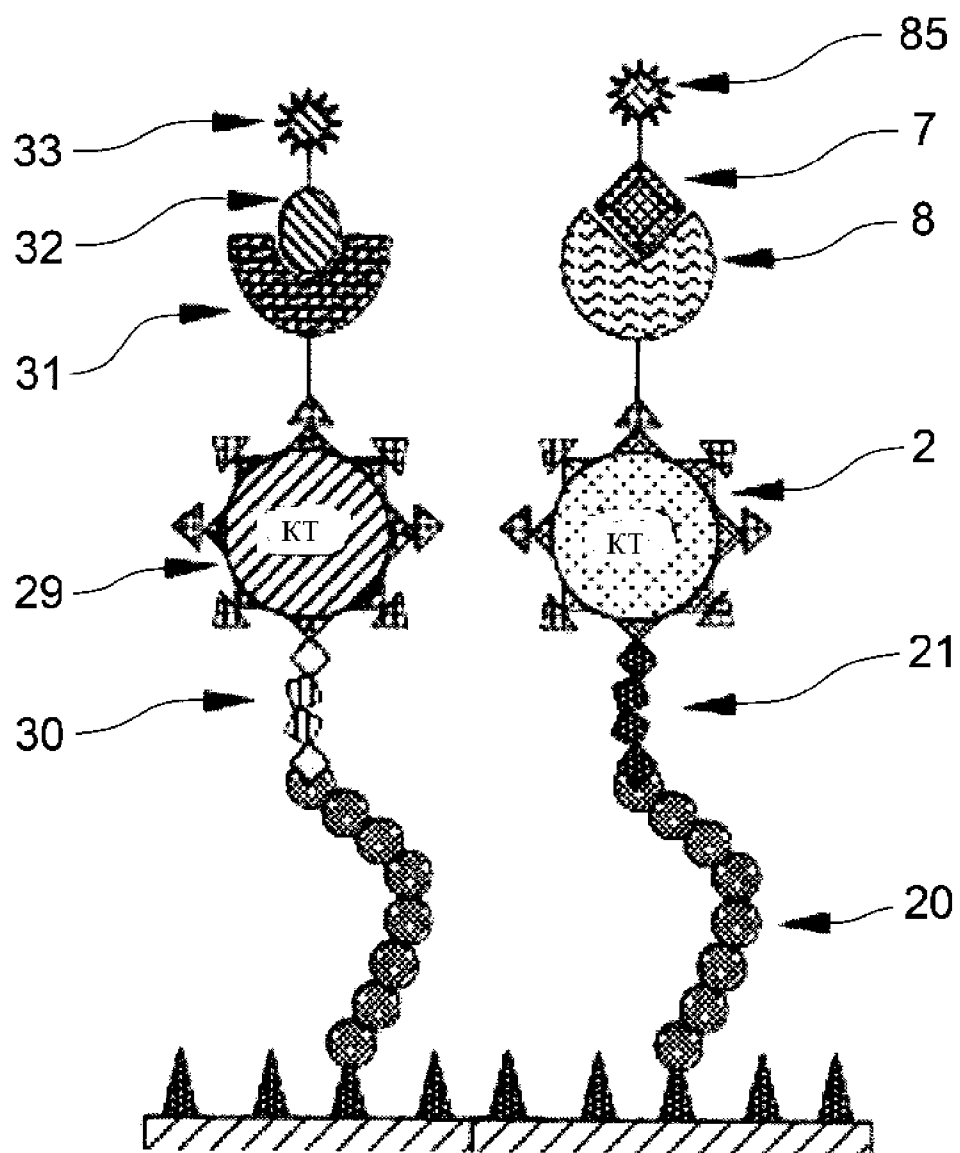
Фиг. 3



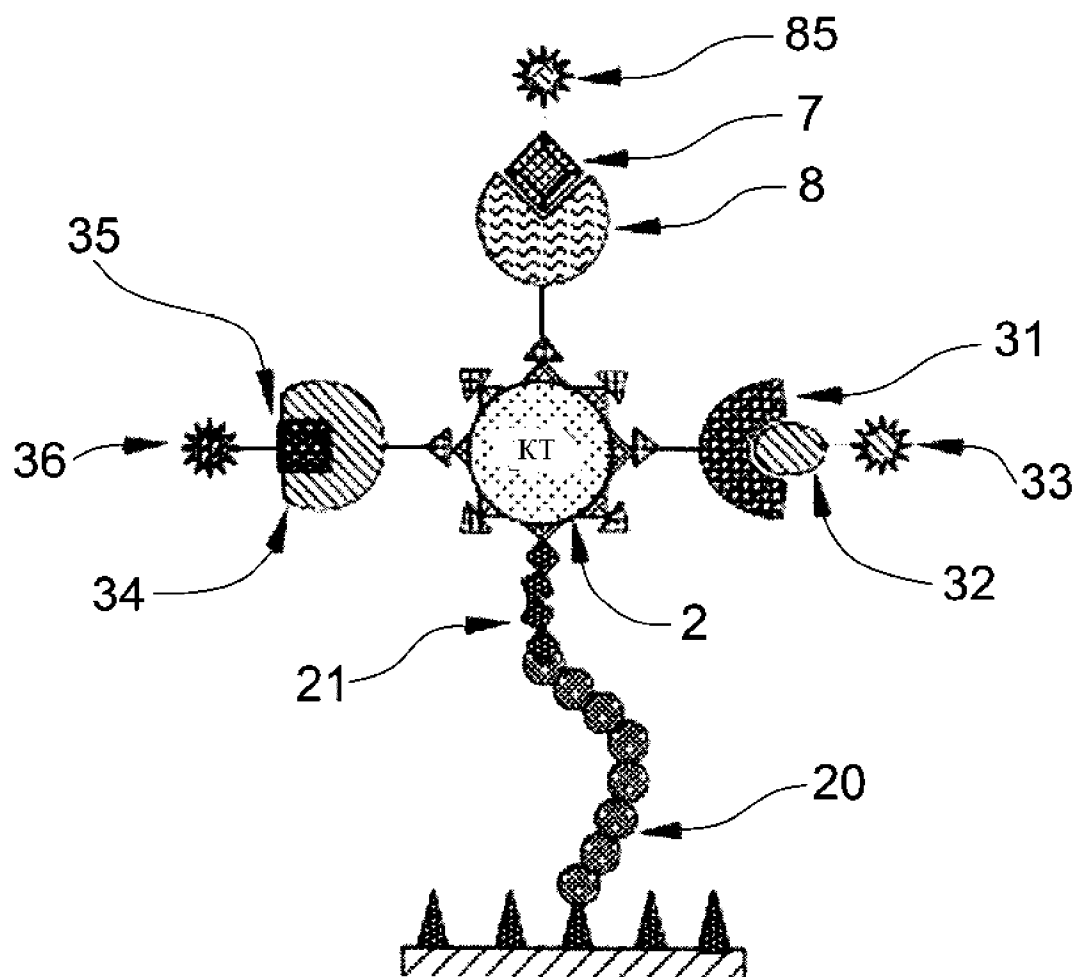
Фиг. 4



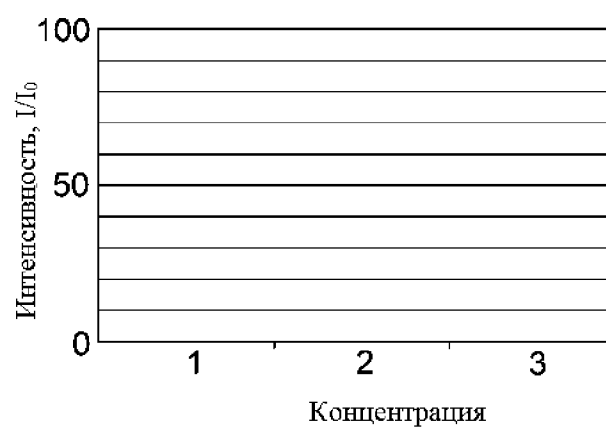
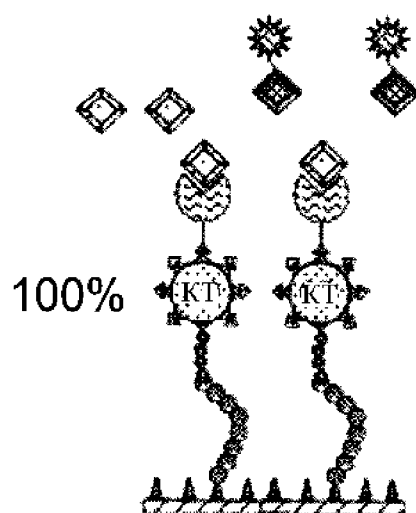
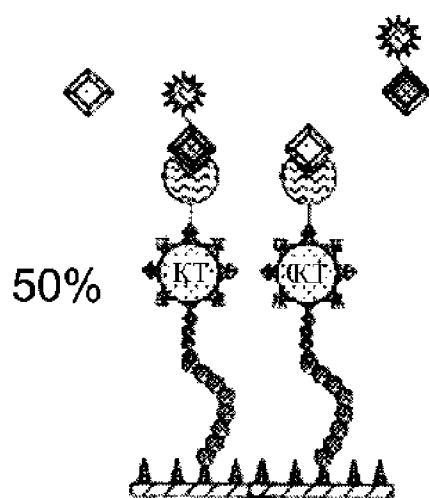
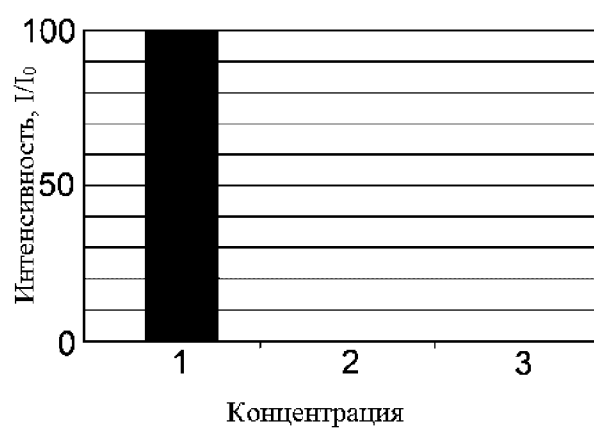
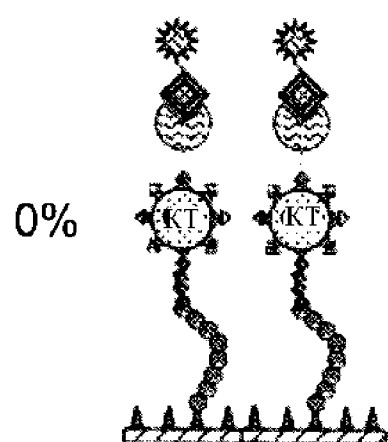
Фиг. 5



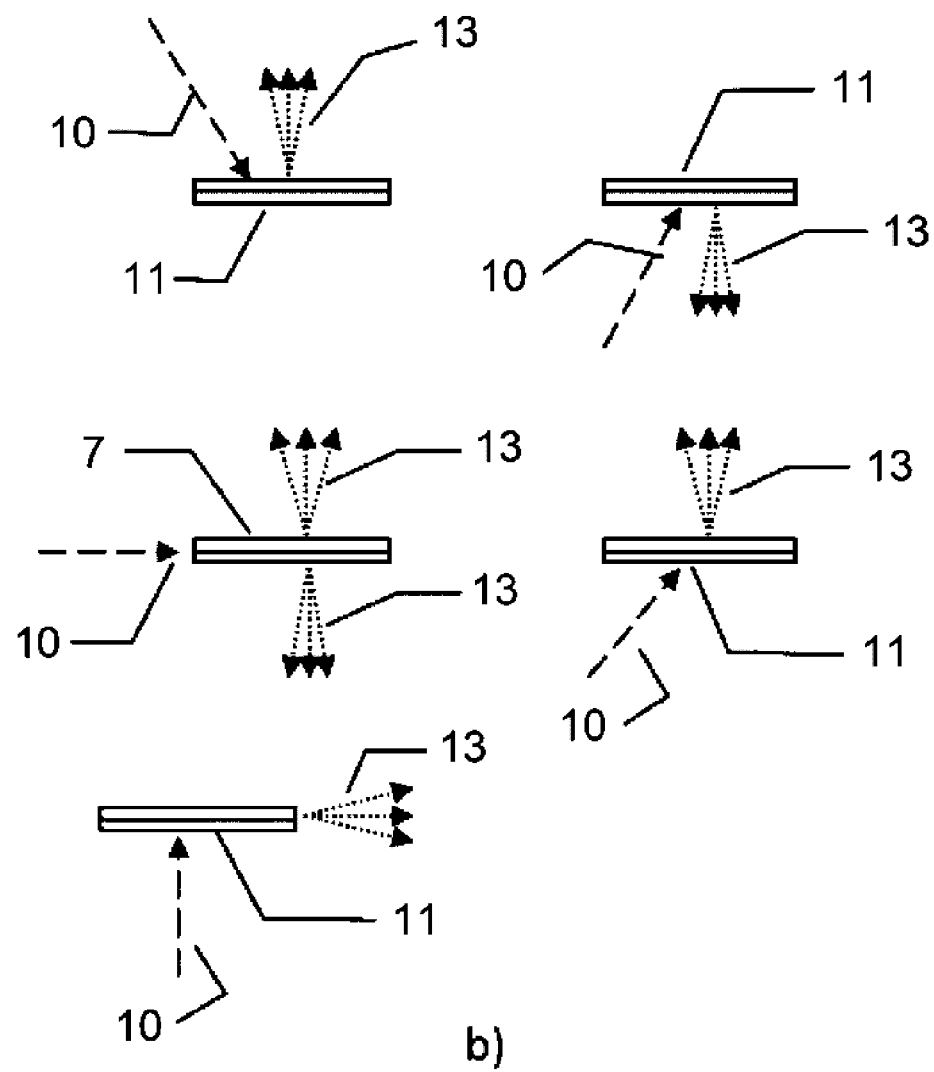
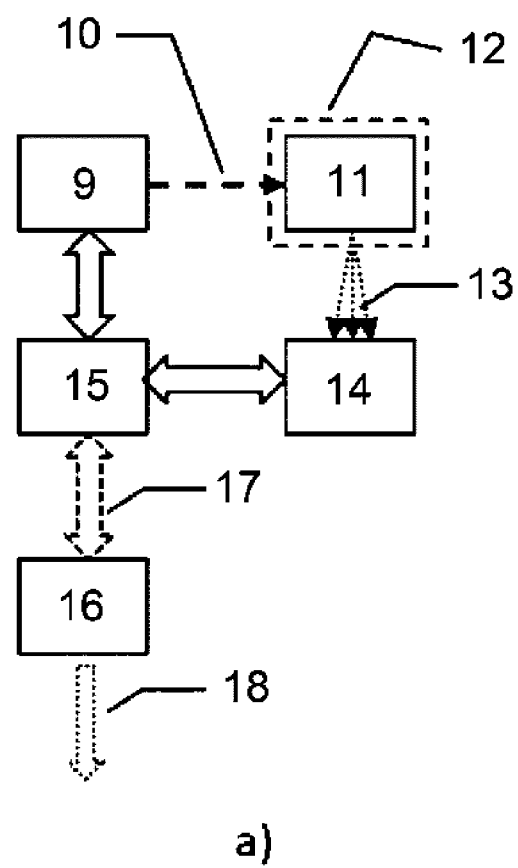
Фиг. 6



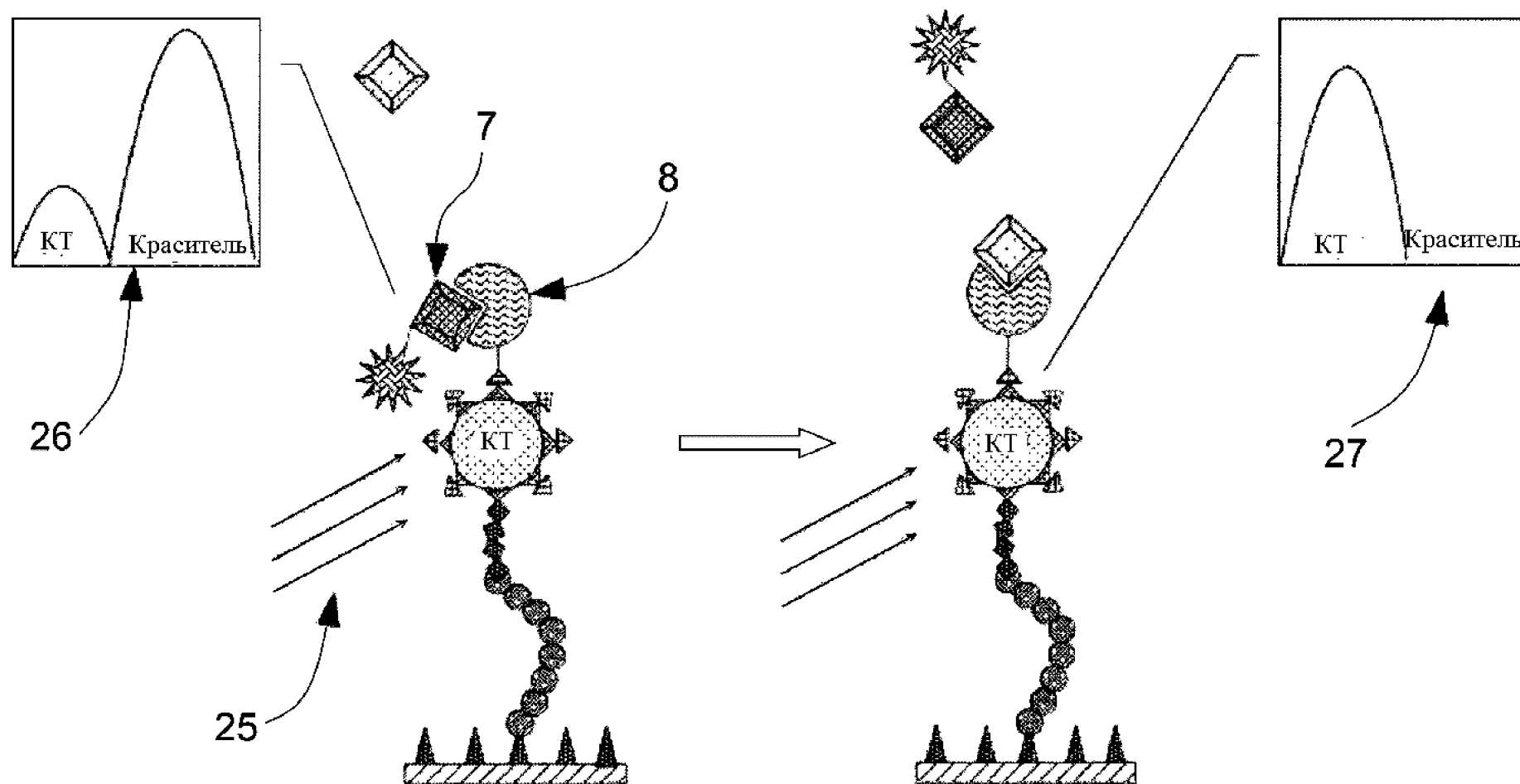
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

