

07; 11; 12

© 1991

ИССЛЕДОВАНИЕ АДсорбЦИИ БЕЛКОВ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ НА ПОЛИСТИРОЛЕ ПО ЗАТУХАНИЮ МОД ПЛАНАРНОГО ОПТИЧЕСКОГО ВОЛНОВОДА

Г.А. Б а л ь ч и т и с, А.Н. М а р ч у к,
А.К. Н и к и т и н, В.И. С и л и н,
А.А. Т и ш е н к о

Планарные оптические волноводы широко используются в сенсорных устройствах [1-3], в том числе в устройствах для исследования адсорбционных процессов как из газовой [4, 5], так и из жидкой фазы [6, 7]. В [8] выполнен теоретический анализ чувствительности волноводных мод (ВМ) планарных волноводов к адсорбированным на несущем слое белковым молекулам. В большинстве известных работ измеряемой величиной является угол возбуждения ВМ, что объясняется технологичностью изготовления и надежностью работы устройств с одним элементом преобразования объемной электромагнитной волны в ВМ. Устройства, основанные на двухпризменной методике измерения коэффициента затухания ВМ, менее надежны, но обладают более высокой чувствительностью к поглощающим адслоям [9].

Целью данной работы являлось исследование адсорбции белковых молекул из водного раствора (тридистиллят) на поверхность полистироловых волноводов с использованием двухпризменной методики. В эксперименте определяли изменение во времени эффективной толщины адсорбированного слоя белка $d(t)$ по изменению интенсивности $I(t)$ ТЕ₀ волноводной моды путем решения известного дисперсионного уравнения четырехслойного волновода с поглощающим адслоем [10] при известных оптических постоянных адслоя. Зависимость концентрации белка, адсорбированного на поверхности полистирола, от времени $\Gamma(t)$ рассчитывали по формуле [11]

$$\Gamma(t) = q \delta d(t), \quad (1)$$

где q - фактор заполнения поверхности адсорбатом, δ - плотность белкового слоя.

Полистироловые волноводы изготавливались путем вытягивания пленок из 10 % раствора гранулированного полистирола в спектроскопически чистом толуоле. Скорость вытягивания составляла примерно 1 см/мин. В качестве подложки использовались плоско-параллельные пластинки из плавленного кварца с показателем преломления $n = 1.46$ размером 50x30x1 мм³. С целью снижения оптических потерь на рассеяние волноводы отжигались в сушильном

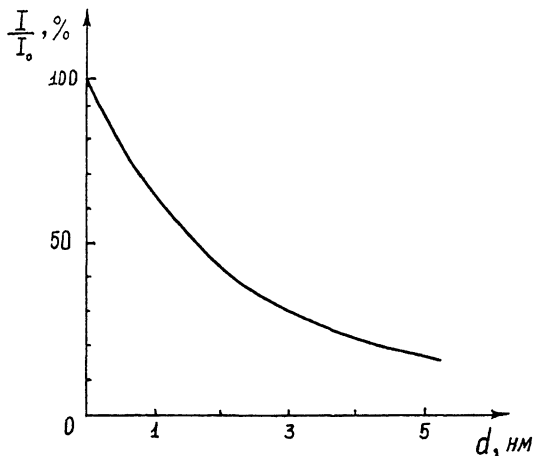


Рис. 1. Расчетная зависимость изменения относительной интенсивности (I/I_0) выводимого из полистиролового волновода излучения TE_0 моды от толщины d адслоя пероксидазы $I=I_0$ при $d=0$.

шкафу при температуре $80^\circ C$ в течение 12 часов. Толщина полистироловой пленки $n=0.17$ мкм была выбрана близкой к критической для TE_0 моды, что обеспечивало максимум переносимой в содержащей адслои среде доли энергии поля ВМ, а следовательно, максимальную чувствительность поля ВМ к адслоям [4]. Контроль величины h осуществлялся с помощью спектрометра „СРЕ-CORD - М40“, погрешность измерений не превышала 20 нм. Расстояние между призмными элементами связи, преобразующими объемную волну в ВМ и ВМ в объемную волну, было выбрано равным 1 см.

Экспериментальная установка состояла из аргонового лазера ЛГН-503 ($\lambda=488$ нм), оптического столика с кюветой, заполненной исследуемым раствором, в который помещался волновод с призмными элементами связи, системы регистрации интенсивности излучения, выходящего из призмы, преобразующей ВМ в объемную волну. Использовался белок - фермент пероксидазы К.Ф. 1.1.1.7. производства Олайнингского НПО „Биолар“ с молекулярным весом около 40000. Комплексный показатель преломления белка, полученный нами из спектроскопических данных на длине волны $\lambda=488$ нм, был равен $1.52 + j \cdot 0.001$.

На рис. 1 приведена расчетная зависимость изменения интенсивности I , выводимой из волновода TE_0 моды от эффективной толщины d слоя белка, адсорбированного на поверхности полистирола. Из рис. 1 видно, что при $d=5.0$ нм (толщина монослоя молекул пероксидазы) интенсивность ВМ уменьшается на 90%. Причем, при точности измерения I , равной 1% [9], точность определения d составляет величину $\sim 5 \cdot 10^{-2}$ нм.

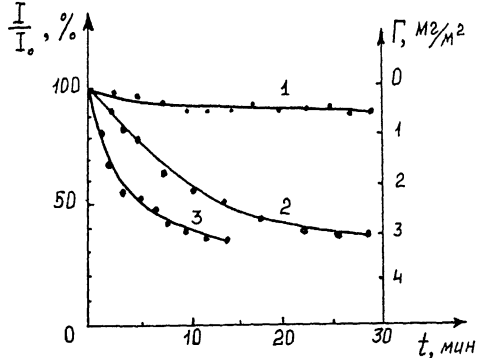


Рис. 2. Расчетная зависимость поверхностной концентрации Γ молекул пероксидазы на полистироле (сплошные линии) и экспериментально измеренные зависимости относительного изменения интенсивности TE_0 -моды I/I_0 от времени t контакта поверхности полистирола с водными растворами пероксидазы различной концентрации: 1 - $C=10^{-6}$ мг/мл, 2 - $C=10^{-4}$ мг/мл, 3 - $C=10^{-2}$ мг/мл

На рис. 2 приведены экспериментальные зависимости $I(t)/I_0$ (черные точки) и кривые $\Gamma(t)$, рассчитанные по формуле (1) в предположении, что для водных растворов пероксидазы различной концентрации $q=1$ и $S=1.09$ мг/мл. Из рисунка видно, что со временем наступает насыщение кинетических кривых адсорбции. Это явление обусловлено тем, что скорость адсорбции со временем уменьшается (из-за увеличения занятости активных центров на поверхности), а скорость десорбции увеличивается, так как она пропорциональна концентрации белка на поверхности. Увеличение толщины адслоя продолжается до выравнивания этих скоростей. Скорость увеличения концентрации адсорбата определяется соотношением

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \left(\frac{d\Gamma}{dt}\right)_{agc} - \left(\frac{d\Gamma}{dt}\right)_{gec}, \quad (2)$$

где

$$\left(\frac{d\Gamma}{dt}\right)_{agc} = k_1 C \left(1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_{max}}\right), \quad (3)$$

$$\left(\frac{d\Gamma}{dt}\right)_{gec} = k_2 \frac{\Gamma}{\Gamma_{max}}, \quad (4)$$

C - концентрация белка в растворе, t - время взаимодействия раствора белка с адсорбентом, Γ_{max} - максимальная поверхностная концентрация белка при плотноупакованном мономолекулярном слое, k_1, k_2 - константы адсорбции и десорбции.

Из данных рис. 2 установлено, что в области насыщения кинетических кривых адсорбции для растворов с возрастающей концентрацией эффективная толщина слоя белка составила 0.5, 0.7 и 2.4 нм. Учитывая, что размер молекулы пероксидазы ~ 5.0 нм, можно сделать вывод, что адсорбция пероксидазы на полистироле является субмолекулярными. Этот вывод подтверждается результатами изучения адсорбции белков методом эллипсометрии [11].

В принципе, из экспериментальных данных можно получить значения констант k_1 и k_2 . Для этого, подставив в (2) выражения (3), (4) и выполнив интегрирование, получают формулу для расчета поверхностной концентрации адсорбированного белка [12],

$$\Gamma(t) = \frac{k_1 \cdot C \cdot \Gamma_{max}}{k_1 \cdot t + k_2} \cdot \left\{ 1 - \exp \left[t \cdot (k_2 - k_1 C) / \Gamma_{max} \right] \right\}, \quad (5)$$

из которой, используя программу оптимизации, и определяют k_1 и k_2 .

В модели (5) не учитывается эффект уменьшения скорости адсорбции из-за диффузионных процессов. Численное моделирование показывает, что такое упрощение допустимо при концентрациях $10^{-3} \div 10^{-4}$ мг/мл и выше. При более низких концентрациях следует использовать более сложные модели, учитывающие как диффузионные эффекты, так и общее уменьшение концентрации в кювете из-за адсорбции белка не только на рабочей поверхности волновода, но и на стенках самой кюветы. В рамках применимости модели (5) при $\Gamma_{max} = 3.9$ мг/м² для раствора с концентрацией 10^{-2} мг/мл было получено

$$k_1 = 1.92 \cdot 10^{-4} \text{ см/с}, \quad k_2 = 0.36 \cdot 10^{-9} \text{ мол/см}^2 \cdot \text{с}.$$

Таким образом, в работе показано, что с помощью двухпризменной методики волноводных оптических измерений можно не только наблюдать сверхмалые количества адсорбированного белка, но и получать информацию о кинетических параметрах сорбции-десорбции белка, что важно при создании новых диагностических средств для целей медицины и биотехнологии.

С п и с о к л и т е р а т у р ы

- [1] Н и к и т и н А.К., Т и ш е н к о А.А., Ч е р - н ы й А.И. // Зарубежная радиоэлектроника. 1990. № 10 С. 14-30.
- [2] F l u i t m a n J., P o r p m a T.J.A. // Sensors and Actuators. 1986. V. 10. No. 1/2. P. 25-46.
- [3] T i e f e n t h a l e r K., L u k o s z W. // Thin Solid Films. 1985. V. 126. No. 3/4. P. 205-211.

- [4] Ведерников В.И., Грязнов В.М., Гульянова С.Г., Дерюгин Л.Н., Тищенко А.А., Черная А.И. // Журнал физической химии. 1982. Т. 56. № 2. С. 481-483.
- [5] Swalen J.D. // J. Phys. Chemistry. 1979. V. 83. No. 11. P. 1438-1445.
- [6] Possner T., Karthe W., Müller R. // Exp. Techn. Phys. 1985. V. 33. No. 3. P. 241-250.
- [7] Kiminori I., Akira F. // J. Phys. Chem. 1988. V. 92. No. 25. P. 7043-7045.
- [8] Lukosz W., Tiefenthaler K. // Sensors and Actuators. 1988. V. 15. No. 3. P. 273-284.
- [9] Яковлев В.А., Сычугов В.А., Тищенко А.В. // Письма в ЖТФ. 1982. Т. 8. В. 11. С. 665-669.
- [10] Rashleigh S.C. // Opt. and Quant. Electron. 1976. V. 8. No. 1. P. 49-60.
- [11] Cuypers P.A., Corsel J.W., Janssen M.P. et al. // J. Biological Chem. 1983. V. 358. No. 4. P. 2426-2431.
- [12] Nordé W. // Advances in Colloid and Interface Science. 1986. V. 25. P. 267-340.

Университет дружбы
народов
им. Патриса Лумумбы

Поступило в Редакцию
4 октября 1991 г.