

УДК 532.6:544.023.022

# ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ 2D–НАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ОПТОЭЛЕКТРОННОЙ ТЕХНИКИ НА ОСНОВЕ ЛЕНГМЮРОВСКИХ ПЛЕНОК БАКТЕРИОРОДОПСИНА

© 2016 г. С. И. Валянский<sup>1</sup>, Е. К. Наими<sup>2</sup>, Л. В. Кожитов<sup>2</sup><sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук «Институт общей физики им. А. М. Прохорова»,  
ул. Вавилова, д. 38, Москва, 119991, Россия<sup>2</sup>Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»  
Ленинский просп., д. 4, Москва, 119049, Россия

Протестированы возможности создания на основе мономолекулярных слоев бактериородопсина (БР) высокочувствительных и высокоселективных биосенсоров, основанных на генерации второй гармоники и возбуждении поверхностных плазмон–поляритонных волн. Для этой цели использованы различные оптические и нелинейно–оптические методы исследования пленок Ленгмюра–Блоджетт с тем, чтобы сохранить все специфические свойства, присущие молекулам БР, при переносе их с водной поверхности на твердую подложку. Показано, что метод генерации второй гармоники может быть эффективно использован для анализа ориентации молекул БР и качества пленок Ленгмюра–Блоджетт. Измеренное значение нелинейной оптической восприимчивости второго порядка молекул БР составило  $3,4 \cdot 10^{-11}$  м/В. Относительное изменение резонансного значения волнового вектора —  $(3,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$  при длине волны возбуждающего света 630 нм. Получен спектр БР, вызванный возбуждением поверхностных плазмон–поляритонных волн падающим излучением. По результатам проведенных исследований предложены оригинальные схемы биосенсоров, использующих генерацию второй гармоники и поверхностно–плазмонный резонанс при отражении сигнала основной частоты от монослоев БР. Схема апробирована на макете прибора. Показана возможность получения чувствительности порядка  $10^{11}$  мол/см<sup>3</sup>.

**Ключевые слова:**

2D–наноматериалы, пленки Ленгмюра–Блоджетт, бактериородопсин, поверхностные плазмон–поляритонные волны, генерация второй гармоники, биосенсоры

**Введение**

В последнее время все более актуальными становятся проблемы экологии среды обитания и безопасности жизнедеятельности человека. Эти проблемы трудно решить без создания системы надежных датчиков, контролирующих качество внешней среды и биологических объектов. Природные датчики, появившиеся в процессе эволюции живой материи, представляют собой одну или несколько молекул, в структуре которых имеются участки, называемые рецепторами, с которыми взаимодействуют молекулы окружающей среды. Эти чувствительные участки, как правило, ориентированы и имеют двухмерную структуру. Такие датчики функционально селективны, так как их рецепторы могут взаимодействовать с ограниченным классом внешних объектов. Сегодня мы имеем возможность моделировать чувствительную часть биологического датчика (биосенсора). Это оказалось возможным благодаря достигнутому в последнее время успехам в развитии техники нанесения ориентированных мономо-

лекулярных слоев (ленгмюровских пленок) на твердую подложку.

Ленгмюровские пленки или пленки Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) представляют собой стопки мономолекулярных слоев поверхностно–активных веществ, перенесенных с водной поверхности на твердую подложку. Эти пленки являются квазидвухмерными, частично упорядоченными структурами и обладают уникальным набором электрических, магнитных, оптических и других свойств [1]. Молекулярный состав различных монослоев можно варьировать и таким образом создавать сложные молекулярные ансамбли, где каждая молекула имеет свое функциональное назначение. Такая техника позволяет относительно просто создавать устройства для определения различных примесей на молекулярном уровне. Биологическую основу созданных по ленгмюровской технологии биосенсоров составляют иммунохимические реакции, происходящие в органеллах, клетках и тканях живых организмов.

Создание ориентированных слоев–рецепторов является только одной частью задачи. Другая,

**Валянский Сергей Иванович**<sup>1</sup> — кандидат физико–математических наук, старший научный сотрудник, e–mail: sergv3@yandex.ru; **Наими Евгений Кадырович**<sup>2</sup> — доктор физико–математических наук, профессор, e–mail: e.naimi@mail.ru; **Кожитов Лев Васильевич**<sup>2</sup> — доктор технических наук, профессор, e–mail: kozitov@misiss.ru

не менее важная, ее часть — это поиск физических методов, которые сделали бы доступной информацию о том, произошла или нет реакция связывания рецепторов с комплементарными к ним молекулами, т. е. определение изменений в состоянии молекул ЛБ пленки до реакции и после нее. К решению этой части задачи можно подойти несколькими путями. Например, исследуя изменения электрических свойств системы. Одна из простейших реализаций этой идеи — нанесение ЛБ-пленок на затвор полевого транзистора. При этом ток, протекающий через транзистор, будет зависеть от свойств молекул, наносимых на затвор. Другим решением может стать использование механических параметров системы. На пьезоэлектрическую пластину наносится ЛБ-пленка. При этом собственная частота колебаний пластины будет зависеть от количества молекул, которые могут осесть на рецепторы пленки. Наконец, решение можно найти, наблюдая за изменением оптических свойств ЛБ-пленок, которые могут существенно меняться в зависимости от того, свободны их рецепторы или заняты молекулами из внешней среды. Оптические методы имеют ряд преимуществ по сравнению с прочими методами. Среди них можно отметить высокую чувствительность и селективность, возможность дополнительной идентификации тестируемых молекул, относительную простоту, дистанционность снятия информации с ЛБ-пленок.

Ниже рассмотрен круг вопросов, относящихся к новому направлению в применении функциональных 2D-наноматериалов на основе ЛБ-пленок бактериородопсина, создания биосенсоров и тестирования их свойств оптическими методами.

### Методика проведения исследований

Среди многообразных оптических свойств, которые можно использовать для создания биосенсоров, рассмотрим два:

- генерацию второй гармоники (**ГВГ**);
- генерацию поверхностных плазмон-поляритонных волн (**ППВ**) как наиболее перспективных с точки зрения их практического применения [2].

В качестве модельной молекулы рассмотрим молекулу бактериородопсина (**БР**) мембранного белка микроорганизмов класса *Halobacterium halobium*, живущих в соленых озерах и солончаках. Молекулярный вес БР ~26000, он состоит из 248 аминокислотных остатков. Небелковая часть молекулы (простетическая группа) соединена с лизином. Она может быть представлена одним из двух изомеров ретиналя: у одного все двойные связи имеют транс-конфигурацию, у другого 13-цис-конфигурацию. В бактериях соотношение молекул с разными простетическими группами составляет 1 : 1. Молекула БР выполняет функцию светочувствительного протонного «насоса». Поглощение кванта света ре-

тиналем приводит к структурным изменениям в молекуле. Конечный результат — перенос протона из цитоплазмы в окружающую среду, после чего молекула БР возвращается в исходное состояние. Электрохимический потенциал, обусловленный возникшим протонным градиентом и трансмембранным электрическим потенциалом, используется клеткой для синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (**АТФ**), а также транспорта аминокислот и метаболитов.

Молекула БР является наиболее простой из всех изученных систем аккумуляции световой энергии в форме разности протонных электрохимических потенциалов  $\Delta\mu_{H^+}$ . Каждая молекула БР содержит один хромофор-ретинол в комплексе с белком-опсином. Это единственный белок, который содержится в пурпурной мембране. Опсин использует энергию света для активного перемещения протона через мембрану, в результате чего происходит синтез АТФ. В основе этого биоэнергетического процесса лежит фотохимический цикл превращения БР [3]. Для бактерий  $\Delta\mu_{H^+}$  — это свободная энергия ионов  $H^+$ , перенесенных из клетки во внешнюю среду. При этом ионы  $H^+$  стремятся вернуться в клетку, где возник недостаток положительных электрических зарядов из-за действия  $H^+$ -насоса. Энергия света, запасенная таким образом в виде разности  $\Delta\mu_{H^+}$ , освободится, если позволить ионам  $H^+$  войти обратно в клетку. У микробов, имеющих БР, ионы  $H^+$  входят через комплекс факторов  $F_0$  и  $F_1$  таким образом, что освобождающаяся энергия используется для синтеза АТФ (рис. 1).

Белковая часть БР представляет собой одну полипептидную цепь средней длины, которая не содержит других коферментов и простетических групп, кроме ретиналя. Надо отметить, что БР чрезвычайно устойчив. Без потери активности его можно кипятить в автоклаве при температуре 130 °С, изменять содержание NaCl в омывающем мембрану растворе от нуля до насыщения, в широких пределах менять рН этого раствора. Более того, можно удалить выступающие из мембраны концевые участки поли-

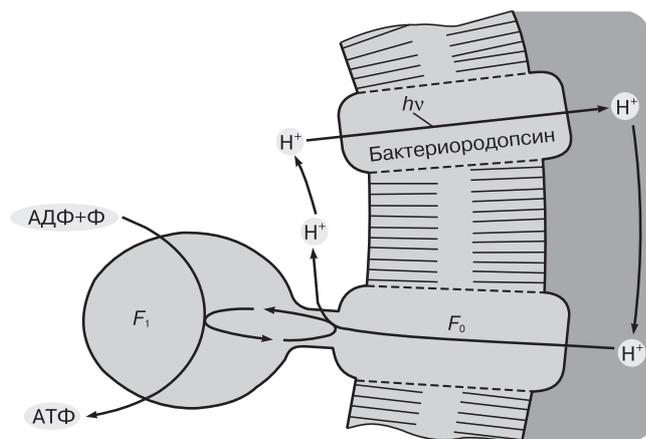


Рис. 1. Бактериородопсиновый фотосинтез  
Fig. 1. Bacteriorhodopsin photo-synthesis

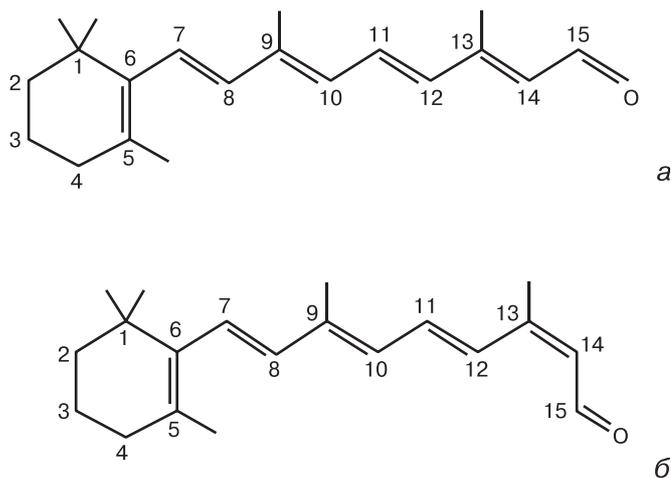


Рис. 2. Структурные формулы полностью транс-ретиная (а) и 13-цис-ретиная (б)

Fig. 2. Structural formulas of (a) full trans-retinal and (b) 13-cis retinal

пептидной цепи и даже расщепить эту цепь в одном месте посередине без ущерба для активного действия  $H^+$ -насоса. В то же время эффективность БР как преобразователя энергии сравнительно низка: всего 20 % энергии светового кванта превращается в  $\Delta\mu_H^+$ . При этом на один поглощенный фотон через мембрану переносится один протон — ион  $H^+$ .

Трансмембранная часть БР сложена из 7 регулярных  $\alpha$ -спиралей, идущих от одного края мембраны до другого, а одинокая  $\beta$ -шпилька и все нерегулярные участки цепи (соединяющие спирали-петли) выходят из мембраны. Протонная проводимость осуществляется при содействии прикрепленной внутри пучка спиралей молекулы кофактора — ретиная. Он перекрывает центральный канал БР. Поглотив фотон, ретиналь переходит из полностью транс- в 13-цис-форму (рис. 2). При этом он изгибается и переносит протон с одного конца семиспирального пучка на другой. Затем ретиналь разгибается и возвращается назад, но уже без протона.

Первые результаты по созданию ЛБ-пленок пурпурных мембран с добавлением различных количеств соевого липида и по исследованию их оптических характеристик были получены авторами работы [4]. Применяя эту методику, в нашем случае большее внимание было уделено свойствам одного монослоя, так как при увеличении числа слоев поведение толстых пленок БР становится похожим на поведение растворов. Для создания мономолекулярных ЛБ-пленок БР использовали установку KSV-2200 (Финляндия). Измерения поверхностного давления проводили с помощью весов Вильгельми с платиновой пластинкой. Воду в ванне Ленгмюра, на поверхности которой создавали монослой, подвергали специальной очистке. Сопротивление воды составляло 10 МОм. В качестве подложек, на которые переносили монослой, применяли пластины из оптического стекла, кварца или монокристаллического кремния. Все подложки перед нанесением монослоев

подвергали технологической очистке. Последней ступенью была плазменная очистка в атмосфере азота в течение 10—15 мин.

Использовали следующую технологию получения монослоев. Суспензию фрагментов пурпурных мембран помещали в раствор DOLPC (аналог соевого липида в гексане). Затем в течение не слишком продолжительного времени он подвергался действию ультразвука с тем, чтобы не возникло дробления пурпурных мембран на мелкие фрагменты. В таких фрагментах свойства белка из-за денатурации необратимо изменяются. Полученный в результате такой обработки раствор маленькими каплями наносили на поверхность субфазы. После испарения гексана с поверхности воды слой молекул БР сжимался подвижным барьером. Программа установки KSV-2200 позволяла контролировать все параметры создания ЛБ-пленки: поверхностное давление, площадь на одну молекулу, коэффициент переноса монослоя на поверхность. Исходя из этих данных, можно задавать скорости движения барьера и подложки относительно поверхности воды. Температуру субфазы постоянно контролировали и поддерживали на уровне 21 °С.

В экспериментах по созданию монослоя молекул БР коллапс наступал при поверхностном давлении  $\pi \approx 45$  Н/м, поэтому пленку переносили на твердую подложку при значениях  $\pi = 30+35$  Н/м. Скорость опускания и поднятия подложки составляла 9 мм/мин. После переноса ЛБ-пленки ее высушивали в течение 25—30 мин. Коэффициент переноса составлял  $1,00 \pm 0,02$ . Для оценки толщины монослоя использовали метод эллипсометрии [5]. Пленку БР наносили на полированную химико-динамическим способом пластину монокристаллического кремния с ориентацией [111]. На поверхности пластинки термическим способом выращивали пленку диоксида кремния толщиной 1,2 мкм. Измерения проводили на отечественном эллипсометре ЛЭФ-ЗМ с длиной волны излучения He—Ne-лазера 632,8 нм. Для расчета толщины пленок БР использовали трехслойную модель: «поглощающая подложка кремния — прозрачный слой диоксида кремния — поглощающий слой ЛБ-пленки БР». Расчетное значение толщины пленки составило  $4,9 \pm 0,2$  нм, что совпадает с известными литературными данными [6]. Измерения, проведенные в разных точках подложки, дали одинаковый результат. Это позволяет сделать заключение о достаточно хорошей однородности нанесенной мономолекулярной пленки БР на твердую подложку.

В работе [4] было показано, что спектры поглощения фрагментов пурпурных мембран в суспензиях и многослойных (40—120 монослоев) ЛБ-пленках в целом идентичны. Максимум поглощения при комнатной температуре лежит в области 570 нм. Спектры поглощения свободного ретиная и белка без ретиная имеют максимум при 380 и 280 нм со-

ответственно. При образовании комплекса белка с ретиналом максимум поглощения наблюдается при 570 нм. Следовательно, изучая спектр поглощения, можно оценить состояние молекул БР в исследуемом образце. Для получения спектра на тонкую кварцевую подложку с двух сторон наносили монослой БР, которые, не взаимодействуя друг с другом, увеличивали сигнал. Измерения проводили на спектрофотометре Hitachi U-3200. Чтобы исключить влияние подложки на спектр БР и липида, отдельно был снят спектр подложки с нанесенным на нее монослоем липида. Полученный сигнал оставался на уровне шума при всех значениях частот зондирующего луча. Значение поглощения в максимуме существенным образом зависело от весового соотношения БР/липид (использовали синтетический фосфолипид DOLPC) в исходном растворе. При соотношении БР/липид 5 : 1 оптическая плотность ЛБ пленки составила  $D \approx 2 \cdot 10^{-3}$  в области 570 нм. С увеличением числа слоев значение поглощения в максимуме линейно росло, что свидетельствует о достаточной однородности каждого слоя. Положение максимума в спектре поглощения монослоев БР зависит от степени влажности пленки. Чем меньше в пленке содержится молекул воды, тем больше сдвинут в синюю область спектра максимум поглощения. По-видимому, такой сдвиг происходит из-за удаления молекул воды из области между подложкой и ЛБ-пленкой БР, вследствие чего более существенным становится влияние электрического поля подложки на монослой. Наличие полярных молекул воды ослабляет этот эффект.

Фотопотенциал упорядоченных методом ЛБ-молекул БР впервые был измерен в 1978 г. авторами работы [7] в следующем эксперименте. На диэлектрическую подложку наносили тонкий слой палладия, который служил одним из электродов. Затем формировали несколько слоев ЛБ-пленки, на которой, в свою очередь, методом термического напыления создавали тонкий слой металла, выполнявшего роль второго электрода. В нашем случае на

диэлектрическую подложку методом термического распыления в вакууме наносили золотую полоску толщиной 0,1 мкм, длиной 20 мм и шириной 4 мм, а затем ЛБ-пленку, состоящую только из одного монослоя и частично закрывающую нижний электрод. В качестве второго электрода использовали каплю индий-галиевой эвтектики, которая при комнатной температуре находится в жидком состоянии. Свет для возбуждения молекул БР проходил через стеклянную подложку и нижний золотой электрод. В качестве источника возбуждения применяли вторую гармонику лазера на основе YAG-кристалла с ионами неодима, работающего в режиме модулированной добротности с длительностью импульса ~10 нс и энергией второй гармоники 10 мДж. Длина волны возбуждения 530 нм была близка к максимуму поглощения пленки БР.

### Полученные результаты и их обсуждение

Были получены следующие результаты. Под действием импульса света происходил заряд конденсатора, образуемого металлическими электродами, между которыми находится ЛБ-пленка, и последующий его разряд через входное сопротивление измерительной цепи после прекращения действия света. Естественно, в экспериментах не ожидалось переноса протона через монослой молекул БР, так как пленка была высушена. Наличие сигнала фотопотенциала должно было показать, что преобразование фрагментов пурпурных мембран в мономолекулярный слой не изменяет функций ретиналя в молекуле БР. Фотоотклик монослоя бактериородопсина представлен на рис. 3.

На рис. 3 хорошо видна кривая разряда конденсатора, происходящего с постоянной времени измерительной цепи  $RC = 100$  мкс. Амплитуда фотоцикла увеличивалась пропорционально интенсивности возбуждающего импульса света.

Исследование процессов ГВГ в средах с большим коэффициентом поглощения излучения на основной частоте и/или на частоте второй гармоники затруднительно. Поэтому был предложен метод изучения процессов ГВГ при отражении, оказавшийся полезным при изучении свойств ЛБ-пленок. Одной из первых работ с применением методики ГВГ при изучении свойств ЛБ-пленок была работа [8], положившая начало новому направлению — исследованию нелинейно-оптических свойств моно- и мультислойных ЛБ-пленок [9—11].

Схема наших экспериментов была следующей [12]. Лазерное излучение падало на поверхность изучаемого образца под углом 45°. Отраженный свет и генерируемую вторую гармонику направляли через фильтр, отсекающий излучение на основной частоте и пропускающий удвоенную частоту. Затем прошедшее излучение попадало на систему регистрации. Использовали фильтры с узкой полосой пропускания

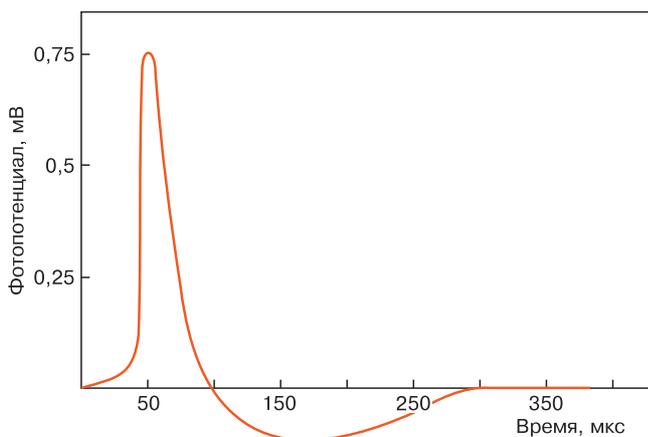


Рис. 3. Фотоотклик монослоя бактериородопсина  
Fig. 3. Photo response of bacteriorhodopsin molecule

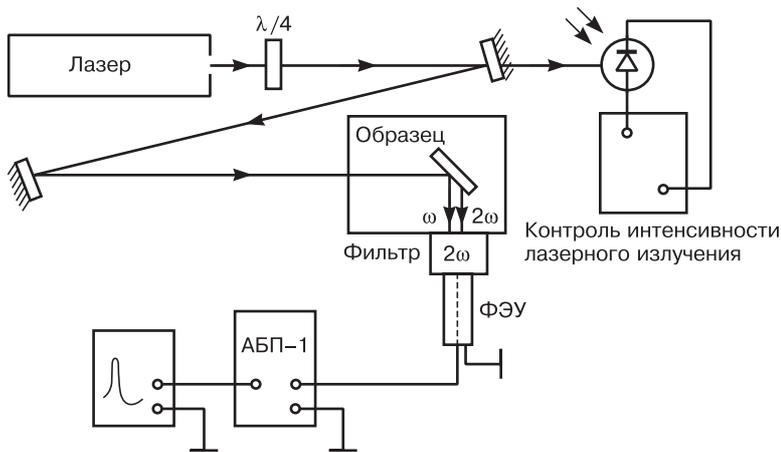


Рис. 4. Схема установки для наблюдения ГВГ  
Fig. 4. Second harmonic generation observation setup

или монохроматор. Схема установки представлена на рис. 4.

Излучение импульсного YAG : Nd-лазера с модулированной добротностью, длиной волны излучения 1060 нм, длительностью импульса 10 нс, энергией в импульсе 0,5 мДж и частотой повторения 10 Гц пропускали через пластинку  $\lambda/4$ . В результате линейно-поляризованный свет преобразовывался в циркулярно-поляризованный. С помощью линзы диаметр пятна на образце меняли от 0,1 до 0,5 см. Размер пятна выбирали таким, чтобы, с одной стороны, падающее на образец излучение не разрушало ЛБ-пленку, а с другой — поступающий на ФЭУ сигнал был достаточно интенсивным для регистрации. В экспериментах лучевая прочность достигала 5 МВт/см<sup>2</sup>. При больших значениях падающей на образец мощности сигнал от излучения второй гармоники резко уменьшался после первых же возбуждающих импульсов. Ограничения на лучевую прочность пленки и чувствительность регистрации не позволяли исследовать пленки в пятне диаметром менее 1 мм, поэтому регистрируемый сигнал является усредненным от всех молекул БР в этой области. Отраженный от образца свет проходил через фильтр СЗС-21 или монохроматор МДР-24. Применение монохроматора позволяет хорошо отделять излучение на частоте второй гармоники от основной частоты. После фильтрации луч попадал на фотоумножитель ФЭУ-29, где световой сигнал преобразовывался в электрический, а затем поступал на усилитель-накопитель АБП-1 и самописец. Лазерное излучение контролировали с помощью фотодиода в отраженном луче после одного из поворотных зеркал. Наличие призмы Глана между четвертьволновой пластинкой и образцом позволяло получать излучение с s- или p-поляризацией.

Образцы представляли собой плоскопараллельные пластинки из стекла, кварца или монокристаллического кремния, на которые наносили моно- или мультислой БР. Образец крепился в держателе под углом 45° к падающему на него излучению. Держатель

позволял вращать пластинку вокруг оси перпендикулярно к ее плоскости. Установку калибровали по стандартной методике по сигналу второй гармоники от подложки монокристаллического кварца, помещаемой вместо образца. Измерения с кварцевой пластинкой проводили при диаметре лазерного пучка 1 мм. Максимум интенсивности наблюдался при повороте пластинки на 9° (при развороте до 20°). Точность определения максимума составляла 1°. Значение коэффициента нелинейной восприимчивости для БР оказалось на два порядка выше, чем у кварца, и составило  $3,4 \cdot 10^{-11}$  м/В.

Главный вклад в погрешность вносят измерения мощности на основной частоте и на частоте второй гармоники, что в сумме дает относительную погрешность ~60%. Эта оценка верна, если верно выбрана модель зависимости ГВГ от толщины пленки. Авторам не известна адекватная теория, позволяющая корректно вычислять нелинейную восприимчивость слоев, толщина которых много меньше длины волны, но для поиска перспективных, с высокими коэффициентами нелинейностей ЛБ-пленок таких простых оценок, по-видимому, вполне достаточно.

Для работы с монослоями необходимо знать значения показателя преломления на частотах основной и второй гармоник. С этой целью из-за отсутствия в литературе таких данных были проведены специальные измерения. Способ основывался на измерении угла полного внутреннего отражения при нанесении на одну из граней призмы с известным показателем преломления раствора молекул БР и его последующим высушиванием. В результате на длинах волн 1060 и 531 нм были получены значения показателя преломления для БР  $1,21 \pm 0,03$  и  $1,27 \pm 0,03$  соответственно.

Высокое значение нелинейной восприимчивости молекул БР позволяет применить их для создания на оптическом волокне высокоэффективного преобразователя излучения во вторую гармонику. Для реализации этой идеи на оптическое волокно, с которого были сняты защитные оболочки и оставлена лишь одна центральная кварцевая жила, был нанесен монослой из молекул БР. При каждом отражении света внутрь от поверхности волокна с монослоем БР генерируется излучение второй гармоники. Для того, чтобы при каждом отражении сигналы второй гармоники суммировались, необходимо совпадение их фаз. Иными словами, требуется подобрать условия распространения сигналов второй гармоники внутри волокна для реализации максимальной длины фазового синхронизма. Оценки набегания фазы волны в 180° между излучением на основной частоте и частоте второй гармоники для волокна диаметром 100 мкм дают оптимальную величину максимального числа отражений, равную 100. Поэтому длина

$l$  отрезка волокна, на которую необходимо наносить ЛБ–монослой, определяется формулой

$$l = 100d \cdot \text{ctg } \alpha,$$

где  $d$  — диаметр волокна;  $\alpha$  — угол ввода излучения в волокно.

Оптимальная длина для волокна диаметром 100 мкм составляет 1 см. В проведенном эксперименте при мощности падающего излучения 0,5 мВт преобразованный сигнал имел мощность 1 мкВт, что в несколько раз меньше ожидаемого значения. По–видимому, это связано с отсутствием оболочки волокна, что привело к большим потерям ввода и распространения излучения по волокну. Нами предлагается в качестве нелинейной среды использовать мультислойную пленку из молекул БР. Применение такой пленки эффективно для субпикосекундных импульсов с длиной волны порядка 1 мкм, так как максимум поглощения БР лежит в видимой области, благодаря чему в этом диапазоне коэффициент преобразования во вторую гармонику заметно выше.

Другой метод, основанный на оптическом возбуждении поверхностных ППВ [13], использующий резонансные эффекты, оказался гораздо чувствительней к свойствам поверхности и границ раздела по сравнению с методами, основанными на эффектах отражения света. Метод широко стал использоваться после работ А. Отто [14] и Э. Кречмана [15]. Разработанные ими схемы основаны на явлении нарушенного полного внутреннего отражения (**НПВО**). В схеме Отто свет проходит через три среды с диэлектрическими проницаемостями  $\epsilon_1, \epsilon_0, \epsilon_2$ . Среда с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon_1$  представляет треугольную призму. Если угол падения на границу раздела сред с  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_0$  больше, чем угол полного внутреннего отражения, равный  $\arcsin \sqrt{\epsilon_1 / \epsilon_0}$ , то тангенциальная составляющая волнового вектора  $k_x$  сохраняется при переходе через границу раздела, в то время как его нормальная составляющая  $k_z$  становится величиной мнимой, что соответствует процессу затухания электромагнитной волны в среде с  $\epsilon_0$  при распространении ее в направлении ОЗ. Поскольку  $k_x > (\omega / c) \sqrt{\epsilon_0}$ , то возможно резонансное возбуждение ППВ на границе раздела сред с  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_0$ , что приводит к уменьшению интенсивности отраженного света от границы раздела (нарушаются условия полного внутреннего отражения). Оптимальные условия соблюдаются при толщине зазора, сравнимой с длиной волны падающего излучения. В схеме Кречмана для возбуждения ППВ на границе раздела сред с  $\epsilon_2$  и  $\epsilon_0$  и получения резонанса необходима призма с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon_1$ , а толщина слоя выбирается из тех же соображений, что и в схеме Отто.

Наблюдать ППВ можно двумя способами. Первый заключается в определении интенсив-

ности света, отраженного от границы раздела сред с  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_0$  (или  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_2$ ), в зависимости от угла его падения. При возбуждении ППВ интенсивность отраженного света будет ослабляться, т. е. происходит изменение коэффициента отражения  $p$ –поляризованной волны. Во втором способе за счет шероховатостей на границе раздела сред с  $\epsilon_2$  и  $\epsilon_0$  или неоднородностей диэлектрической проницаемости в промежуточном слое происходит рассеяние ППВ и, следовательно, рассеяние света при радиационном распаде. Зарегистрировать ППВ можно, снимая зависимость интенсивности рассеянного света от угла падения  $p$ –поляризованной волны. В упомянутых выше схемах процесс возникновения ППВ является резонансным, сильно зависящим от дисперсионных свойств ППВ, которые, в свою очередь, сильно зависят от свойств материала и прилегающего к поверхности слоя. В экспериментах по НПВО действительная часть ответственна за сдвиг положения резонансной кривой по углу, а мнимая — за уширение резонансной кривой [16]. Измерения, проводимые по схеме НПВО, могут дать представление о полосе поглощения промежуточного слоя, если снимать резонансные кривые при разной частоте падающего света.

Эксперимент с НПВО по схеме Кречмана проводили с применением стеклянной ( $n = 1,5163$ ) призмы, на основании которой наносили золотую пленку толщиной 48 нм. Схема эксперимента представлена на рис. 5 [17].

Свет от He–Ne–лазера мощностью излучения 60 мВт и длиной волны 630 нм через призму попадал на золотую пленку. Интенсивность отраженного света регистрировали приемником. Угол полного внутреннего отражения составлял  $41,8^\circ$ . Резонанс наблюдался при угле  $43,12 \pm 0,05^\circ$ . Полуширина резонансной кривой составляла  $0,67 \pm 0,1^\circ$ . После измерений параметров золотой пленки на половину ее поверхности наносили монослой молекул БР, затем снова измеряли параметры ППВ. На открытой части золотой пленки резонанс по–прежнему наблюдался

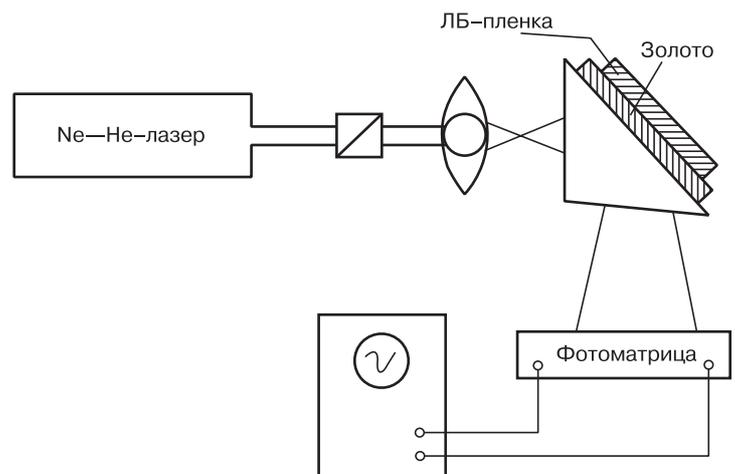


Рис. 5. Оптическая схема наблюдения НПВО по схеме Кречмана  
Fig. 5. Kretschmann FTIR observation optical setup

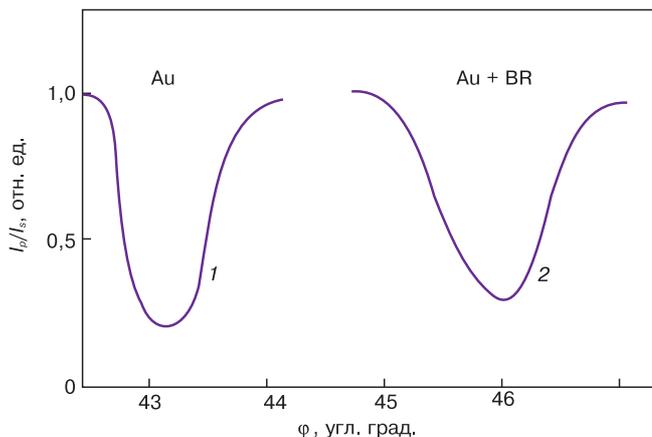


Рис. 6. Угловая зависимость интенсивности отраженного света  $I_p/I_s$  для золотой пленки без покрытия (1) и покрытой монослоем БР (2)

Fig. 6. Angular dependence of reflected light intensity  $I_p/I_s$  for (1) uncovered gold film and (2) gold film covered with bacteriorhodopsin monolayer

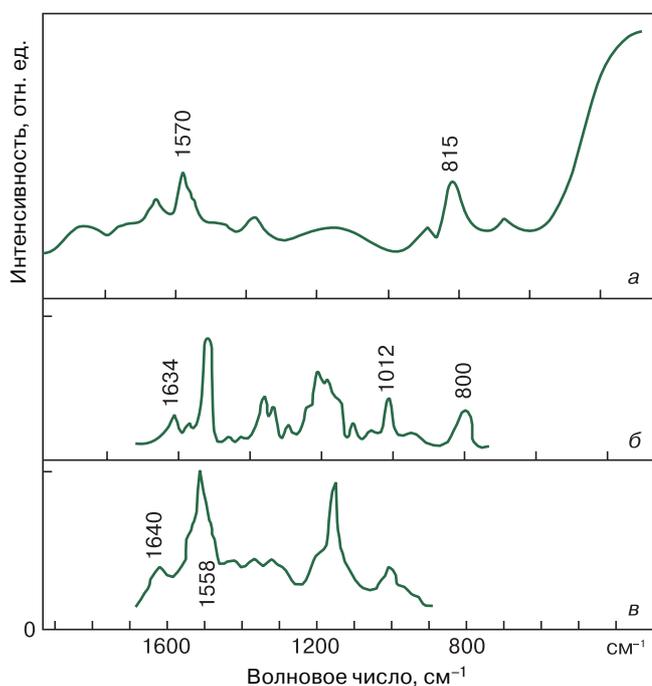


Рис. 7. Спектры ГРКС монослоя БР с возбуждением ППВ (а), КРС суспензии БР (б) и ГРКС пурпурных мембран, адсорбированных на серебряном гидрозоле (в)

Fig. 7. Giant Raman scattering spectra of bacteriorhodopsin: (a) Monolayer with excitation of surface plasma waves, (б) bacteriorhodopsin suspension and (v) purple membranes adsorbed on silver hydrosol

при угле  $43,12^\circ$ , а на покрытой монослоем БР — при угле  $46,00 \pm 0,05^\circ$ . Полуширина резонансной кривой золотой пленки с монослоем БР составляла  $0,78 \pm 0,1^\circ$ . Разность углов между наблюдаемыми резонансами —  $2,9 \pm 0,1^\circ$ . Полученные зависимости представлены на рис. 6.

Наиболее информативными методами исследования поверхности являются спектроскопические методы. Особенно перспективен метод гигантского комбинационного рассеяния света (ГКРС). Если наблюдать комбинационное рассеяние света (КРС)

в схеме Кречмана, то при падении света под резонансным для возбуждения ППВ углом можно эффективно увеличить сечение КРС. В описанном ниже эксперименте использовали схему, аналогичную рассмотренной в работе [18]. Только вместо электролита применяли золотую пленку с нанесенным на нее ЛБ-слоем молекул БР. Возбуждение ППВ осуществляли излучением He—Ne-лазера мощностью 50 мВт. Угол падения света на золотую пленку соответствовал резонансному возбуждению ППВ. Из-за наличия неоднородностей (шероховатостей) на поверхности золотой пленки на призме происходит рассеяние света. Свет фокусируется линзой на входную щель монохроматора и проходит далее на фотоумножитель. Наличие металлической пленки приводит к увеличению сечения КРС молекул БР. Полученные спектры регистрировали самописцем. На рис. 7, а представлен спектр ГРКС монослоя БР с возбуждением ППВ. На рис. 7, б показан спектр КРС суспензии молекул БР, взятый из работы [19]. Для сравнения на рис. 7, в дан спектр ГРКС пурпурных мембран, адсорбированных на серебряном гидрозоле [20].

В нашем случае благодаря эффективному возбуждению ППВ происходит более сильное увеличение сечения КРС различных переходов, отвечающих за КРС. Поэтому слабые линии увеличивают свою интенсивность, создавая довольно сильный фон, который искажает полученный спектр.

## Заключение

Экспериментально доказана возможность создания высокочувствительных и высокоселективных биосенсоров, основанных на использовании второй гармоники при отражении излучения основной частоты от ЛБ-пленок, а также генерации поверхностных ППВ. Показано, что ГВГ может быть эффективно использована для анализа ориентации молекул и качества ЛБ-пленок. Измеренное значение нелинейной оптической восприимчивости второго порядка молекул БР составило  $3,4 \cdot 10^{-11}$  м/В. С помощью нарушенного полного внутреннего отражения и ГРКС проведены экспериментальные исследования свойств моно- и мультислоев БР. Относительное изменение резонансного значения волнового вектора составило  $(3,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$  при длине волны возбуждающего света 630 нм. На основании проведенных исследований предложена оригинальная схема биологического сенсора, в котором для усиления сигнала второй гармоники ЛБ-пленка БР наносится на кварцевый световод. Значение преобразования во вторую гармонику на длине 1 см составило  $P_{2\omega}/P_\omega = 10^{-11}$ , где  $P_\omega$  и  $P_{2\omega}$  мощность на основной и удвоенной частоте излучения соответственно. Предложена схема биологического сенсора, работающего на основе возбуждения ППВ. Схема была апробирована на макете прибора и показала возможность получения чувствительности порядка  $10^{11}$  мол/см<sup>3</sup>.

Библиографический список

1. **Валянский, С. И.** Наноматериалы. Ленгмюровские пленки / С. И. Валянский, Е. К. Наими. – М.: Изд. Дом МИСиС, 2014. – 188 с.
2. **Валянский, С. И.** Введение в физику поверхностных электромагнитных волн: Получение, регистрация и применение / С. И. Валянский, Е. К. Наими. – Saarbrücken: Международный Издательский Дом LAP LAMBERT Academic Publishing: AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG, 2013. – 180 с.
3. **Балашев, С. П.** Фотохимические превращения бактериородопсина / С. П. Балашев, Ф. Ф. Литвин. – М.: Изд-во МГУ, 1985. – С. 164.
4. **Hwang, S. B.** Structural and spectroscopic characteristics of bacteriorhodopsin in air–water interface films / S. B. Hwang, J. I. Korenbrot, W. Stoeckenius // J. Membran. Biol. – 1977. – V. 36, N 1. – P. 115–135. DOI: 10.1007/BF01868147
5. **Горшков, М. М.** Эллипсометрия / М. М. Горшков. – М.: Сов. радио, 1974. – 200 с.
6. **Скулачев, В. П.** Энергетика биологических мембран / В. П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
7. **Hwang, S. B.** Transient photovoltages in purple membrane multilayers. Charge displacement in bacteriorhodopsin and its photointermediates / S. B. Hwang, J. I. Korenbrot, W. Stoeckenius // Biochim. et Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes. – 1978. – V. 509, N 2. – P. 300–317. DOI: 10.1016/0005-2736(78)90049-4
8. **Акципетров, О. А.** Генерация второй гармоники при отражении от мономолекулярного ленгмюровского слоя / О. А. Акципетров, Н. Н. Ахмедиев, Е. Д. Мишина, В. Р. Новак // Письма в ЖЭТФ. – 1983. – Т. 37. – С. 175–176.
9. **Акципетров, О. А.** Исследование структуры ленгмюровских пленок методом генерации отраженной второй гармоники / О. А. Акципетров, Н. Н. Ахмедиев, И. М. Баранова, Е. Д. Мишина, В. Р. Новак // ЖЭТФ. – 1985. – Т. 89. – С. 911–921.
10. **Кирьянов, А. В.** Нелинейно–оптические свойства бактериородопсина в многослойных пленках Ленгмюра–Блуджетт / А. В. Кирьянов, И. А. Масляницин, В. В. Савранский, В. Д. Шигорин, Х. Лемметийнен // Квантовая электроника. – 1997. – Т. 26, № 1. – С. 85–88.
11. **Алексеев, А. С.** Нелинейно–оптические свойства Ленгмюра–Блуджетт монослоев бактериородопсина / А. С. Алексеев, С. И. Валянский, В. В. Савранский // Тр. ин-та общей физики. – 1992. – Т. 38. – С. 131–148.
12. **Алексеев, А. С.** Исследование ленгмюровских пленок бактериородопсина методом генерации второй гармоники / А. С. Алексеев, С. И. Валянский, В. В. Савранский // Краткие сообщения по физике. – 1989. – № 2. – С. 35–36.
13. **Валянский, С. И.** Современные методы исследования наноструктур. Метод оптической поверхностно–плазмонной микроскопии / С. И. Валянский, Е. К. Наими. – М.: Изд. Дом МИСиС, 2011. – 173 с.
14. **Otto, A.** Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflexion / A. Otto // Zeitschrift für Physik. – 1968. – Bd. 216, N 4. – S. 398–410. DOI: 10.1007/BF01391532
15. **Kretschmann, E.** Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen / E. Kretschmann // Zeitschrift für Physik A. Hadrons and nuclei. – 1971. – Bd. 241, N 4. – S. 313–324. DOI: 10.1007/BF0139542
16. **Абельс, Ф.** Поверхностные поляритоны на металлических поверхностях и границах раздела / Ф. Абельс, Т. Лопес–Риос // Поверхностные поляритоны. – М.: Наука, 1985. – С. 167–189.
17. **Алексеев, А. С.** Рассеяние света на поверхностных плазмонах и гигантское комбинационное рассеяние монослоев бактериородопсина / А. С. Алексеев, С. И. Валянский, Х. Лемметийнен, А. М. Прохоров, В. В. Савранский // Краткие сообщения по физике. – 1989. – № 9. – С. 53–55.
18. **Чен, И. Дж.** Трехволновые нелинейные взаимодействия с участием поверхностных поляритонов: Комбинационное рассеяние, дифракция и параметрическое смешение света / И. Дж. Чен, Е. Бурштейн // Поверхностные поляритоны. – М.: Наука, 1985. – С. 410–439.
19. **Smith, S. O.** Determination of retinal chromophore structure in bacteriorhodopsin with resonance Raman spectroscopy / S. O. Smith., J. Lugttnburg, R. A. Mathies // J. Membran. Biol. – 1985. – V. 85, N 2. – P. 95–109. DOI: 10.1007/BF01871263
20. **Набиев, И. Р.** Гигантское комбинационное рассеяние и его применение к излучению биологических молекул / И. Р. Набиев, Р. Г. Ефремов, Г. Д. Чуманов // УФН. – 1988. – Т. 154. – С. 459–496. DOI: 10.3367/UFNr.0154.198803d.0459

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Развитие научного потенциала высшей школы» Министерства образования и науки РФ (грант РПН.2.1./1552).*

ISSN 1609–3577 Izvestiya vuzov. Materialy elektronnoi tekhniki = Materials of Electronic Technics. 2016, vol. 19, no. 2, pp. 124–132.

**Functional 2D nanomaterials for optoelectronic equipment on the basis of langmuir–blodgett bacteriorhodopsin films**

**S. I. Valyanskii<sup>1</sup>, E. K. Naimi<sup>2\*</sup>, L. V. Kozhitov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, 38 Vavilov Str., Moscow 119991, Russia*

<sup>2</sup>*National University of Science and Technology «MISIS», 4 Leninskiy Prospekt, Moscow 119049, Russia*

**Abstract.** We have tested the possibility of using monomolecular layers of bacteriorhodopsin (BR) for the synthesis of highly sensitive and highly selective sensors based on second harmonic generation and surface plasma waves. We have used various methods to study the optical and nonlinear optical properties of Langmuir–Blodgett films of BR in order to clarify the extent to which specific properties of BR molecules are retained during their transfer from the surface of water to a solid substrate. We show that the second harmonic generation method is efficient for analyzing the molecular orientation and quality of Langmuir–Blodgett films. The experimental nonlinear optical susceptibility of second order BR molecules is  $3.4 \cdot 10^{-11}$  m/V. The relative change in the resonant wave vector is  $(3.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$  at an excitation

light wavelength of 630 nm. We have obtained a BR spectrum with the effective excitation by incident radiation of surface plasma waves. On the basis of these studies, we have proposed new schemes of biosensors operating on the basis of second harmonic generation and surface plasma resonance caused by fundamental frequency reflection from BR monomolecular layers. This scheme was tested for a model device and demonstrated the possibility of obtaining sensitivities of the order of  $10^{11}$  molecules/cm<sup>3</sup>.

**Keywords:** 2D–nanomaterials, Langmuir–Blodgett films, bacteriorhodopsin, surface plasma waves, second harmonic generation, biosensors.

**Information about authors:**

**Sergei I. Valyanskii<sup>1</sup>** — Cand. Sci (Phys.–Math.), Senior Researcher (sergv3@yandex.ru); **Eugene K. Naimi<sup>2\*</sup>** — Dr. Sci (Phys.–Math.), Professor (e.naimi@mail.ru); **Lev V. Kozhitov<sup>2</sup>** — Dr. Sci (Eng.), Professor (kozhitov@misiss.ru).

\*) Corresponding author

**References**

1. Valyanskii S. I., Naimi E. K. Nanomaterialy. *Langmuirovskie plenki* [Nanomaterials. langmuir films]. Moscow: Izd. dom MISiS, 2014. 188 p. (In Russ.)
2. Valyanskii S. I., Naimi E. K. *Vvedenie v fiziku poverhnostnykh elektromagnitnykh voln: Poluchenie, registraciya i primenenie*

[Introduction into the physics of surface electromagnetic waves. Generation, registration and applications]. Saarbrücken: LAMBERT Academic Publishing: AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG, 2013. 180 p. (In Russ.)

3. Balashev S. P., Litvin F. F. *Fotohimicheskie prevrasheniya bakteriorodopsina* [Photochemical transformations of bacteriorhodopsin]. Moscow: Izd-vo MGU, 1985. 164 p. (In Russ.)

4. Hwang S. B., Korenbrot J. I., Stoeckenius W. Structural and spectroscopic characteristics of bacteriorhodopsin in air–water interface films. *J. Membrane Biol.* 1977, vol. 36, no. 1, pp. 115–135. DOI: 10.1007/BF01868147

5. Gorshkov M. M. *Ellipsometriya* [Ellipsometry]. Moscow: Sovetskoe radio, 1974. 200 p. (In Russ.)

6. Skulachev V. P. *Energetika biologicheskikh membran* [Power engineering of the biological membranes]. Moscow: Nauka, 1989. 564 p. (In Russ.)

7. Hwang S. B., Korenbrot J. I., Stoeckenius W. Transient photovoltages in purple membrane multilayers. Charge displacement in bacteriorhodopsin and its photointermediates. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1978, vol. 509, no. 2, pp. 300–317. DOI: 10.1016/0005-2736(78)90049-4

8. Akcipetrov O. A., Ahmediev N. N., Mishina E. D., Novak V. R. Second harmonic generation for monomolecular langmuir layer reflection. *Pis'ma v zhurnal eksperimental'noi i teoreticheskoi fiziki = JETP Lett.* 1983, vol. 37, pp. 175–176. (In Russ.)

9. Akcipetrov O. A., Ahmediev N. N., Baranova I. M., Mishina E. D., Novak V. R. Study of langmuir films by second harmonic generation reflection. *Zhurnal eksperimental'noi i teoreticheskoi fiziki = J. Exp. Theor. Phys. (JETP).* 1985, vol. 89, pp. 911–921. (In Russ.)

10. Kir'yanov A. V., Maslyanin I. A., Savranskii V. V., Shigorin V. D., Lemmetiinen H. Nonlinear optical properties in multilayered Langmuir–Blodgett films. *Kvantovaya elektronika.* 1997, vol. 26, no. 1, pp. 85–88. (In Russ.)

11. Alekseev A. S., Valyanskii S. I., Savranskii V. V. Nonlinear optical properties of bacteriorhodopsin Langmuir–Blodgett monolayers. *Trudy instituta obshei fiziki.* 1992, vol. 38, pp. 131–148. (In Russ.)

12. Alekseev A. S., Valyanskii S. I., Savranskii V. V. Study of Langmuir bacteriorhodopsin monolayers by second harmonic generation. *Kratkie soobsheniya po fizike.* 1989, no. 2, pp. 35–36. (In Russ.)

13. Valyanskii S. I., Naimi E. K. *Sovremennye metody issledovaniya nanostruktur. Metod opticheskoi poverhnostno-plazmon-*

*noi mikroskopii* [Advanced nanostructure study methods. Optical surface plasma microscopy]. Moscow: Izd. dom MISiS, 2011. 173 p. (In Russ.)

14. Otto A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Ztschr. Physik.* 1968, bd. 216, no. 4, pp. 398–410. DOI: 10.1007/BF01391532

15. Kretschmann E. Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. [Determination of optical constants of Metals by activation of surface plasmons] *Ztschr. Physik.* 1971, bd. 241, no. 4, pp. 313–324. (In Ger.) DOI: 10.1007/BF0139542

16. Abel's F., Lopes-Rios T. Poverhnostnye polyaritonny na metallicheskih poverhnostyakh i granichah razdela [Surface polaritons on metallic surfaces and interfaces]. V kn.: *Poverhnostnye polyaritonny* [Surface polaritons]. Moscow: Nauka, 1985. Pp. 167–189. (In Russ.)

17. Alekseev A. S., Valyanskii S. I., Lemetyuinen X., Prohorov A. M., Savranskii V. V. Light scattering on surface plasmons and giant Raman scattering of bacteriorhodopsin monolayers. *Kratkie soobsheniya po fizike.* 1989, no. 9, pp. 53–55. (In Russ.)

18. Chen I. Dzh., Burshtein E. Trehvolnovye nelineinye vzaimodeistviya s uchastiem poverhnostnykh polyaritonov: Kombinatsionnoe rasseyaniye, difraktsiya i parametricheskoe smesheniye sveta [Triple-wave nonlinear interactions of surface polaritons: Raman scattering, diffraction and parametrical light shift]. V kn.: *Poverhnostnye polyaritonny* [Surface polaritons]. Moscow: Nauka, 1985. Pp. 410–439. (In Russ.)

19. Smith S. O., Lugttnburg J., Mathies R. A. Determination of retinal chromophore structure in bacteriorhodopsin with resonance Raman spectroscopy. *J. Membran. Biol.* 1985, vol. 85, no. 2, pp. 95–109. DOI: 10.1007/BF01871263

20. Nabiev I. R., Efremov R. G., Chumanov G. D. Surface-enhanced Raman scattering and its application to the study of biological molecules. *Sov. Phys. Usp.* 1988, vol. 31, pp. 241–262. DOI: 10.1070/PU1988v031n03ABEH005720

**Acknowledgements.** *The work was accomplished with financial support from the Program for the Development of Higher School Scientific Potential of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant No. RPN.2.1./1552).*