

# ЭФФЕКТ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО УСИЛЕНИЯ АМПЛИТУДЫ ГКР СПЕКТРОВ МИОГЛОБИНА, ОСАЖДЕННОГО ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА НА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО НАНОСТРУКТУРИРОВАННУЮ ПОВЕРХНОСТЬ ПЛЕНОК АГ

Афанасьев К.Н.<sup>1</sup>, Богинская И.А.<sup>1</sup>, Седова М.В.<sup>1</sup>, Слипченко Е.А. \*<sup>1</sup>,  
Аверьянова А.Д.<sup>2</sup>, Рыжиков И.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Россия

Статья поступила в редакцию 16.01.2023

Одобрена после рецензирования 24.01.2023

Принята к публикации 14.03.2023

## Аннотация

Исследовано явление дополнительного усиления амплитуды спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) миоглобина, осажденного из раствора под воздействием ультразвука (УЗ). Исследование проведено в широком диапазоне частот УЗ на серебряных подложках с различными параметрами морфологии. Морфология поверхности ГКР-активных подложек на наноразмерном уровне формировалась условиями травления поверхности стекла (концентрации плавиковой кислоты и времени травления) перед осаждением пленок серебра с помощью электронно-лучевого испарения в вакууме. Показано, что ГКР спектры миоглобина после УЗ воздействия в процессе высушивания пробы характеризуются изменением как положений полос колебаний, так и амплитудами этих полос по сравнению с ГКР спектром белка, высушенного на воздухе без УЗ воздействия. В частности, получено значительное по сравнению с контролем (высушивание без УЗ на подложках без травления стекла) усиление ГКР спектров миоглобина при определенной частоте УЗ и параметрах морфологии поверхности. Продемонстрирована возможность уменьшения времени подготовки пробы для анализа по сравнению с контролем, и исследована зависимость этого времени от частоты ультразвука и времени травления стекла.

**Ключевые слова:** эффект гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), ГКР активные подложки, регистрация белков, пробоподготовка, ультразвук, миоглобин

EDN ВПВСК

## 1. Введение

Одна из актуальных задач для медицинских приложений – быстрая регистрация белков, находящихся в плазме крови при низких концентрациях и являющихся маркерами различных заболеваний. В частности, миоглобин – один из маркеров инфаркта миокарда [1].

На сегодняшний день общеприменимыми являются такие методы идентификации белков, как масс-спектрометрия, ИК-спектрометрия, колориметрические методы, флуоресцентная спектроскопия, электрофорез [2]. Эти методы определяют белки только в достаточно больших концентрациях и при больших объемах проб. В настоящее время перспективным для регистрации белков плазмы крови в низких концентрациях считается метод детектирования с использованием эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Это обусловлено несколькими преимуществами метода, такими как небольшое время анализа, точность, большая чувствительность, малое количество материала, необходимое для анализа.

Для получения высокоамплитудных ГКР спектров с высоким соотношением сигнал/шум для аналитов с низкой концентрацией (менее 1 мкг/мл) необходимо принимать специальные меры: ис-

\* Автор, ответственный за переписку: Екатерина Александровна Слипченко, slipchenko-katya@mail.ru

пользовать специальным образом изготовленные подложки с наноструктурированной поверхностью, а также методы подготовки пробы, включающие в себя нанесение раствора аналита на подложку с последующим высушиванием. Высушивание может происходить под действием лазерного излучения, электрического поля, нагрева [3] или под действием ультразвука, что исследовалось в настоящей работе. Целью подготовки пробы является такое обеспечение физико-химического взаимодействия белка с поверхностью, при котором достигается необходимая концентрация аналита в зоне анализа, а спектр ГКР имеет максимальную амплитуду.

Согласно [4] ультразвук в растворе создает кавитационные пузырьки, характеризующиеся высоким мгновенным давлением и температурой, которые, согласно [5], в зависимости от условий функционируют определенное время или схлопываются. Предполагают [4], что в пузырьках, где снижается критическая энергия для образования кристаллов, создаются условия для возникновения центров зародышеобразования. В то же время [4] акустические волны могут увеличить как вероятность удара между молекулами, так и скорость массопереноса, тем самым увеличивая частоту нуклеации.

В ранее проведенной нами работе [6] о применении УЗ воздействия с частотой 1.4 МГц для пробоподготовки раствора миоглобина с концентрацией 1 мкг/мл, осажденного на планарных наноструктурированных серебряных подложках, было показано формирование отдельных кристаллоподобных объектов кубической формы, характеризующихся измененным усиленным в  $\sim 10$  раз ГКР спектром по сравнению с контрольным образцом без дополнительной обработки. В продолжение этой работы является актуальным многофакторное исследование возможности использования метода УЗ пробоподготовки на наноструктурированных серебряных ГКР подложках различного типа, отличающихся параметрами шероховатости, для расширения представлений о повышении эффективности ГКР метода.

В представленной работе различные параметры морфологии ГКР подложек были реализованы за счет использования предварительного травления стекла в плавиковой кислоте перед напылением серебра методом электронно-лучевого осаждения. На полученных таким образом подложках был проведен эксперимент по УЗ пробоподготовке раствора миоглобина с концентрацией 1 мкг/мл, проанализированы полученные ГКР спектры, определены условия, приводящие к дополнительному усилению ГКР спектров миоглобина по сравнению с контрольным образцом.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Изготовление ГКР активных подложек

#### 2.1.1. Формирование основы из стекла

Предметные стекла (Deltalab, Испания) были отполированы абразивом Крокус технический ТУ 6-36-5800167-483-90, затем промыты изопропиловым спиртом (Sigma-Aldrich, США). Очищенные стеклянные пластины травили в течение разного времени от 1 до 5 секунд с шагом 1 с в водном растворе плавиковой кислоты (HF) с массовыми концентрациями 18 % и 36 %, после чего отмывали дистиллированной водой от остатков HF и затем промывали стекла изопропиловым спиртом для подготовки поверхности к нанесению серебра.

#### 2.1.2. Напыление покрытия на основе Ag на стеклянные основы

Серебряное покрытие для ГКР активных подложек на подготовленных стеклянных пластинах было сформировано методом электронно-лучевого испарения в вакууме в установке электронно-лучевого испарения УРМ 3-279.072 (ООО «Кварц», Россия). Подготовленные стекла размещали в вакуумной камере в подложкодержателе, находящемся на расстоянии 380 мм от источника металла. Дополнительно стекла были очищены плазмой на остаточной атмосфере при давлении в камере  $10^{-3}$  торр. Для формирования серебряных покрытий использовали следующие параметры напыления: давление в камере  $10^{-4}$  торр, напряжение на катоде 12 В, ток пучка 30 мА, температура в камере составляла 30 °С, скорость напыления 20 нм/мин. В качестве источника серебра использовали высокочистое гранулированное серебро 99,99 % чистоты (АО МЗСС, Россия). Контроль толщины осуществляли в процессе напыления по пропусканию на образце свидетеле на длине волны 650 нм. Толщина полученных пленок составляет 100 нм.

### 2.2. Исследование морфологии поверхности

Морфологию образцов исследовали с помощью интерферометра NewView 7200 (Zygo, США) с использованием объектива Mirau 50X/0.55. Встроенную программу расчета параметров шероховатости использовали для вычисления параметров морфологии поверхности по формулам, описанным в руководстве пользователя интерферометра NewView 7200 [7]. Вычисления проводили для 10 случайных

профилей скана поверхности после программного вычитания плоскости первого порядка, определенной методом наименьших квадратов. Полученные значения параметров шероховатости затем усредняли для 10 профилей.

### 2.2.1. Среднеквадратичная шероховатость ( $rms$ )

Характеризует среднее квадратическое отклонение от центральной линии профиля и вычисляется по формуле 1:

$$rms = \left( \frac{y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (1)$$

где  $y_n$  – высота точки профиля относительно центральной линии в каждой точке профиля,  $N$  – количество точек профиля.

Центральная линия профиля – это пересечение профиля плоскостью, определенной методом наименьших квадратов и вычитенной после. Значение  $rms$  характеризует однородность морфологии поверхности подложек на макромасштабе.

### 2.2.2. Коэффициент эксцесса ( $R_{ku}$ )

Коэффициент эксцесса отражает остроту формы распределения высот профиля поверхности и вычисляется по формуле 2:

$$R_{ku} = \frac{1}{n(rms)^4} \sum_{i=1}^{i=n} (y_i)^4, \quad (2)$$

где  $n$  – номер точки профиля,  $y_i$  – значение высоты профиля. Значения  $R_{ku}$  могут находиться в интервале от 0 до 8 [7]. Значение 3 соответствует нормальному распределению высот профиля и наиболее случайному распределению значений высот профиля поверхности. Согласно [8], чем больше значение  $R_{ku}$  отличается от 3, тем больше повторяющихся элементов образуют поверхность, а также чем значение  $R_{ku}$  больше 3, тем больше острота каждого элемента поверхности.

### 2.2.3. Средняя максимальная высота профиля $R_{tm}$

Средний перепад высот между наибольшим пиком и наибольшей впадиной для каждого из равных по величине девяти или пяти последовательных отрезков, на которые делят профиль.  $R_{tm}$  вычисляется по формуле 3:

$$R_{tm} = \frac{Z_1 + Z_2 + \dots + Z_n}{n}, \quad (3)$$

где  $Z_n$  - перепад высот между наибольшим пиком и наибольшей впадиной для отрезка  $n$ ,  $n$  – число отрезков (5 или 9). В статье использовали разбиение на 5 отрезков. Значение  $R_{tm}$  отражает усредненную глубину локальных неоднородностей на поверхности ГКР подложек.

### 2.2.4. Средний шаг неровности $S_m$

Среднее расстояние между тремя последовательными точками пересечения профиля поверхности с центральной линией, определяющими неровность на длине профиля. Таким образом неровность представляет собой элемент профиля поверхности, содержащий соседние пик и впадину.  $S_m$  вычисляется по формуле 4:

$$S_m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} S_{m_i}, \quad (4)$$

где  $n$  – число неровностей на профиле;  $S_{m_i}$  – значение  $i$ -го шага неровности. Величина  $S_m$  отражает эффективный размер неоднородностей поверхности в плоскости XY.

## 2.3. Подготовка пробы раствора миоглобина

### 2.3.1. Приготовление раствора миоглобина

Для приготовления водного раствора белка использовали лиофилизированный миоглобин человека (Sigma-Aldrich, Германия) и деионизованную воду с сопротивлением 18 МОм (Milli-Q, Германия). В эксперименте использовали только свежеприготовленные растворы.

### 2.3.2. Высушивание капли раствора миоглобина

Аликвоты раствора миоглобина с концентрацией 1 мкг/мл и объемом 3 мкл наносили на ГКР подложки с помощью дозатора переменного объема (Eppendorf, Германия). Затем сразу после нанесения с использованием ультразвукового стенда (рис. 1) производили сушку до полного испарения жидкости из капли на предварительно подобранных для подложек резонансных частотах: 90 кГц, 690 кГц, 880 кГц, 1700 кГц. Высушивание в УЗ проводили для каждой частоте при постоянном напряжении, подаваемом на генератор сигналов, на всех типах ГКР подложек, отличающихся морфологией поверхности. В качестве контрольного образца использовали капли, высушенные на воздухе без применения ультразвука на ГКР подложках без предварительного травления стекла.



Рисунок 1 – Ультразвуковая установка, состоящая из генератора (а), осциллографа (б), пьезо-элемента с воздушным охлаждением (в), на котором располагалась подложка с аналитом

Стенд оснащен системой воздушного охлаждения для предотвращения денатурации белка вследствие перегрева. Температура подложки не превышала 27 °С. При каждом из выбранных условий эксперимент проводили 5 раз.

### 2.4. Измерение спектров

После высушивания были измерены ГКР спектры миоглобина в случайных точках его осадка в количестве 20 штук с помощью спектрометра комбинационного рассеяния Alpha 300R+ (WITek, Германия) на длине волны излучения 785 нм и мощности 54 мВт. Время накопления одного спектра составляло 30 секунд.

## 2.5. Обработка спектров

Обработку спектров проводили с помощью программы OPUS 7.0 (Bruker, Германия). Полученные спектры были обрезаны в спектральном диапазоне  $300-1800 \text{ см}^{-1}$ . Затем из них была вычтена базовая линия с помощью встроенного в программу OPUS алгоритма «скорректированной эластичной ленты» [9].

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Анализ морфологии поверхности

В результате исследования было зафиксировано значительное визуальное отличие поверхности подложек, обработанных травителем HF при различных концентрациях (рис. 2).

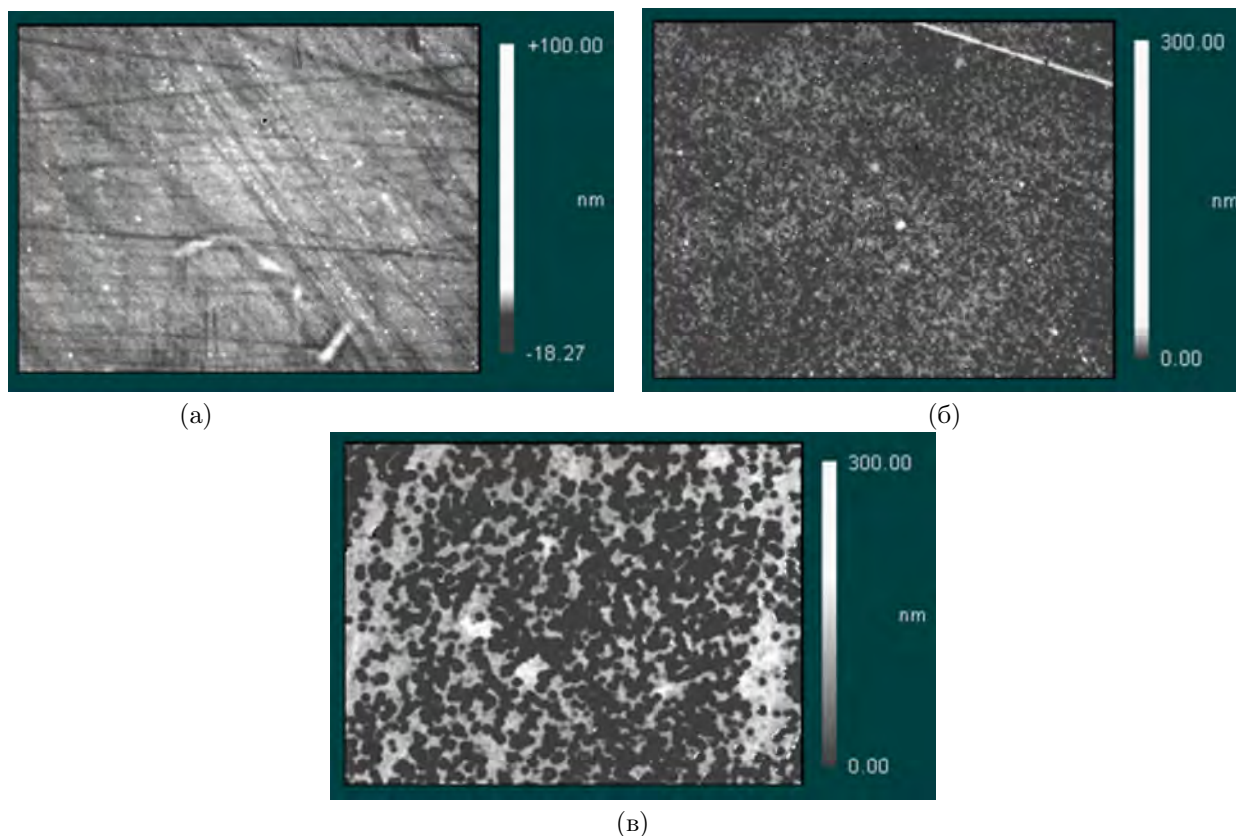


Рисунок 2 – Изображение поверхности размером  $700 \text{ мкм} \times 530 \text{ мкм}$  при различных концентрациях травителя HF: 0 % (а), 18 % (б), 36 % (в)

Визуально травление привело к формированию массива неоднородностей поверхностей, напоминающих лунки. Их количество и размер визуально оцениваются как возрастающие при увеличении концентрации травителя. Параметры шероховатости могут быть использованы для количественного описания преобразования поверхности при травлении и отражают ее шероховатость на макроуровне через показатель  $rms$ , локальную глубину лунок через параметр  $R_{tm}$  и эффективный размер лунок через параметр  $S_m$ .

Для более точной оценки результатов исследования морфологии полученных подложек построены графики зависимости вышеописанных параметров шероховатости поверхности от времени травления для концентраций травителя HF 18 % и 36 % (рис. 3).

Для концентрации кислоты 18 % (рис. 3а) среднеквадратичная шероховатость, коэффициент эксцесса и средняя максимальная высота профиля линейно растут до времени травления 2 секунды, а затем выходят на плато. При этом средний шаг неровности остается константой, то есть ширина “лунок” не меняется с увеличением времени травления. Т.е. до 2 секунд травления размеры лунок растут, а затем остаются постоянными. Для концентрации 36 % (рис. 3б) средний шаг неровности и средняя максимальная высота профиля имеют тенденцию к росту во всем диапазоне времен травления. А среднеквадратичное отклонение и эксцесс остаются константами после 1 секунды (от 0 до 1 секунды  $rms$  растет,  $R_{ku}$  убывает). Т.е. размеры лунок в целом растут постоянно.

Таким образом травление стекла приводит к значительному изменению морфологии получаемых

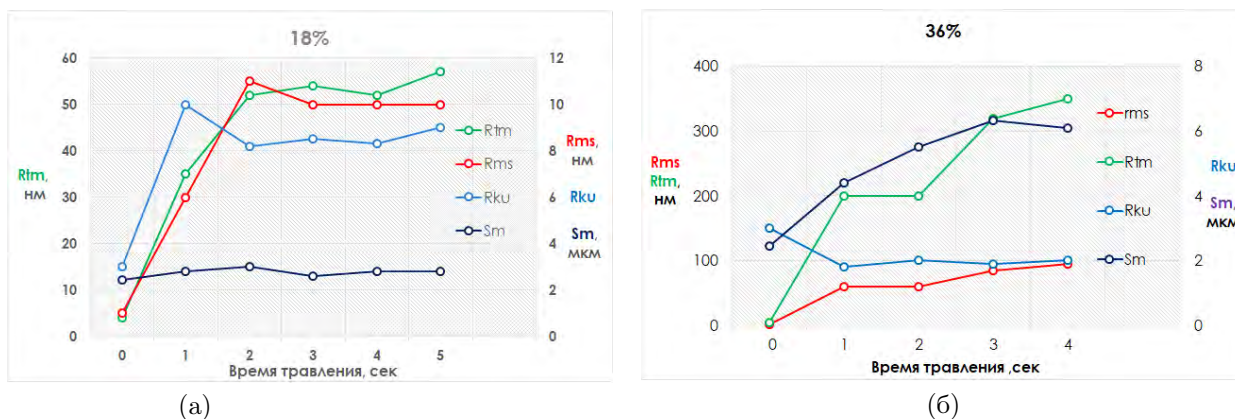


Рисунок 3 – Графики зависимостей параметров шероховатостей от времени травления 18 % HF (а), 36 % HF (б)

подложек, описываемой рядом параметров, характеризующихся немонотонной зависимостью от времени травления и концентрации плавиковой кислоты.

### 3.2. Оценка времени высушивания раствора аналита

Было измерено время сушки от начала воздействия ультразвуком до испарения всей жидкости с поверхности подложки (рис. 4). В сравнении с образцом, высушенным на воздухе без воздействия ультразвука, можно сделать вывод, что ультразвук существенно сокращает время пробоподготовки, так как сушка на воздухе занимает порядка 30 минут. Из четырех выбранных частот наименьшее время высушивания наблюдали при 1700 кГц, а наибольшее время высушивания было отмечено для частот 690 и 880 кГц. Также было обнаружено, что продолжительность высушивания почти не зависит от времени травления при концентрации кислоты 36 %.

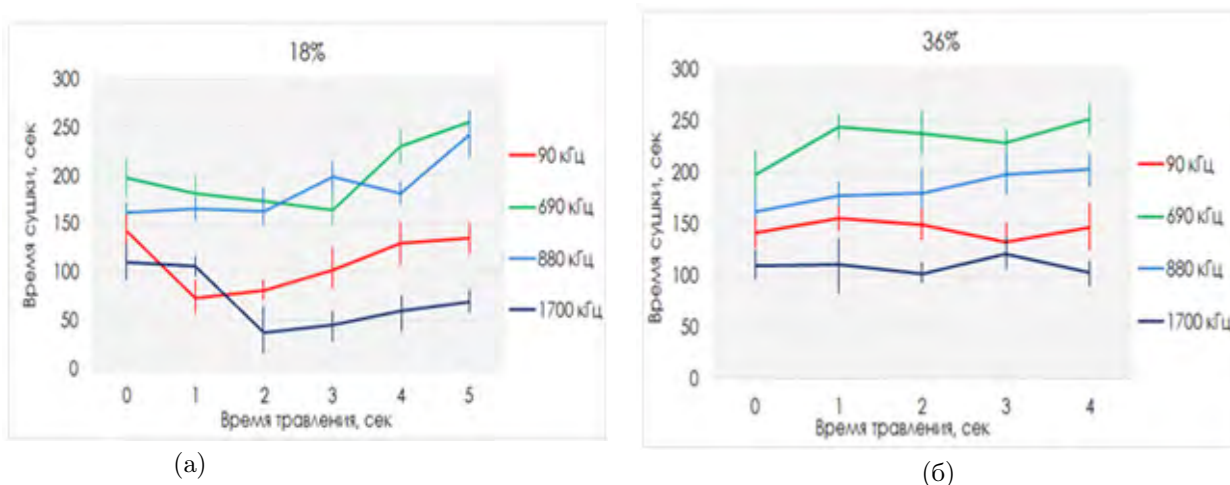


Рисунок 4 – Зависимость времени сушки от времени травления образцов 18 % HF (а), 36 % HF (б)

### 3.3. Анализ ГКР спектров

#### 3.3.1. Анализ конформационных изменений ГКР спектров

В результате измерений миоглобина на подложках, сформированных с использованием травления, с высушиванием в УЗ были получены ГКР спектры двух типов (рис. 5 а, б), спектры первого типа (а) встречались, как правило, реже. При сравнении со спектрами контрольного образца (рис. 5 в) можно сделать вывод, что происходит смещение полос колебаний и изменение их амплитуды при применении ультразвука, что свидетельствует о наличии конформации (изменении пространственного расположения) белка относительно поверхности подложки. Типы спектров на рисунке 5 а и б встречались для всех параметров травления подложек.

Сравнивая спектр первого типа (рис. 5 а) и спектр контрольного образца (рис. 5 в), можно заметить, что полоса колебаний при  $1060 \text{ см}^{-1}$  смещается на  $1000 \text{ см}^{-1}$ , меняется по амплитуде полоса при  $1474 \text{ см}^{-1}$  и смещается на  $1458 \text{ см}^{-1}$ , значительно падает амплитуда полосы при  $778 \text{ см}^{-1}$ .

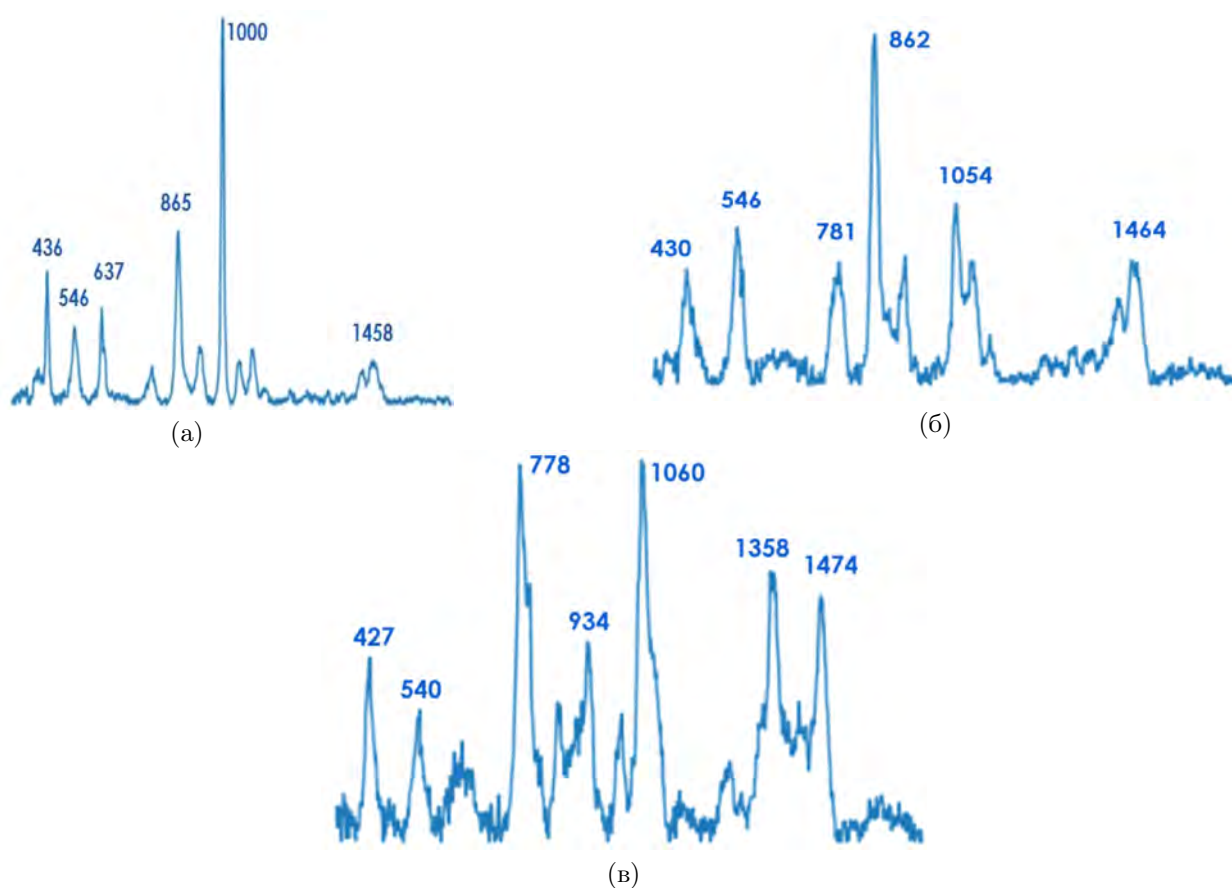


Рисунок 5 – Типичные спектры первого (а), второго (б) типа, спектр контрольного образца (в)

При сравнении спектра второго типа (рис. 5 б) со спектром контрольного образца (рис. 5 в) видно, что пик при  $1060\text{ см}^{-1}$  уменьшается по амплитуде, пик при  $934\text{ см}^{-1}$  смещается на  $862\text{ см}^{-1}$ . Сильно уменьшается амплитуда пика при  $1358\text{ см}^{-1}$ .

В целом высушивание в УЗ ни при каких модификациях морфологии поверхности, несмотря на очевидные конформационные изменения в спектрах по сравнению со спектром контрольного образца, не привело к образованию кристаллоподобных структур, которые наблюдали в работе [6].

Поскольку образование кристаллов может сопровождаться изменением колебательных спектров, что мы и наблюдаем в нашем эксперименте, можно предположить, что, несмотря на отсутствие значительных кристаллических объектов, заметные конформационные изменения структуры молекулы при образовании осадка имеют место.

### 3.3.2. Оценка амплитуды ГКР спектров

Была проведена оценка эффективности возбуждения ГКР спектров в зависимости от условий подготовки пробы и параметров морфологии подложек, выраженных через время травления стекла. Графики зависимости амплитуды спектров от времени травления стекла, рассчитанные как среднее арифметическое по трем максимальным пикам в каждом спектре и усредненные по всем спектрам для образца независимо от типа спектра, представлены на рисунке 6.

Из графиков видно, что при меньшей концентрации плавиковой кислоты амплитуда в среднем растет с 0 до 1 секунды, затем выходит на плато и спадает для времени травления от 4 до 5 секунд. При этом выделяется точка 2 секунды травления и  $1700\text{ кГц}$ , она имеет наибольшее усиление. А для большей концентрации травителя амплитуда в среднем растет с ростом времени травления. Также видно, что, по сравнению с контрольным образцом ( $0\text{ кГц}$ , желтая кривая), применение ультразвука приводит к усилению сигнала.

Примечательно, что максимальную амплитуду спектров (2 сек травления  $18\%$  масс. HF,  $1700\text{ кГц}$ ) наблюдали для морфологии не с максимально протравленной поверхностью, а для некоторого оптимального набора параметров шероховатости (ниже максимального). И при этом формирование осадка белка должно было сопровождаться максимальной частотой УЗ.

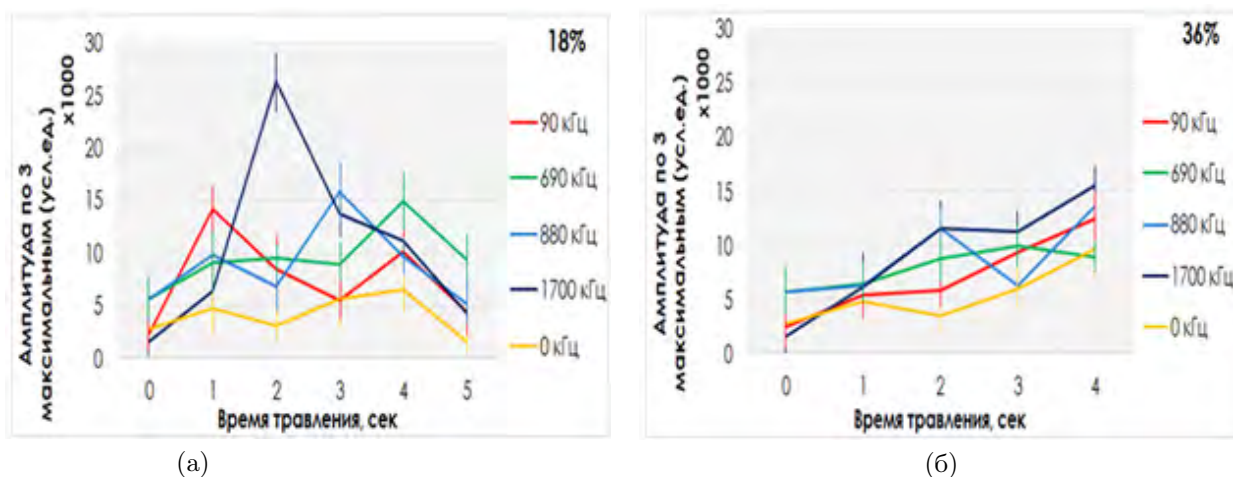


Рисунок 6 – График зависимости амплитуды, рассчитанной как усреднение по 3 максимальным пикам спектра 18 % HF (а), 36 % HF (б)

Таким образом, конформационные изменения при использовании УЗ высушивания раствора миоглобина на наноструктурированной травлением в плавиковой кислоте поверхности приводит к заметному усилению ГКР спектров (до 9 раз) по сравнению с контролем, несмотря на отсутствие выраженных кристаллоподобных объектов.

## Заключение

В представленной работе была исследована возможность использования УЗ в широком диапазоне частот для подготовки пробы раствора миоглобина на серебряных подложках различного типа, отличающихся параметрами морфологии, для повышения эффективности регистрации ГКР спектров. Формирование поверхностей с различными параметрами шероховатости было реализовано путем предварительного травления стекла в плавиковой кислоте перед нанесением серебра, что привело к реализации эффекта дополнительного усиления ГКР спектров миоглобина в областях формирования концентрированного осадка. Была определена зависимость морфологии поверхности от параметров изготовления подложек, таких как концентрация плавиковой кислоты и время травления. При измерениях были получены ГКР спектры двух типов, что свидетельствует о наличии конформации белка. Было обнаружено, что при концентрации 36% масс. плавиковой кислоты средняя амплитуда сигнала имеет тенденцию к росту с увеличением времени травления. При 18% масс. HF зависимость сложная, но амплитуда убывает при увеличении времени травления. Определено, что при времени травления 2 секунды в 18% масс. плавиковой кислоте и ультразвуковой подготовке пробы при 1700 кГц достигается увеличение амплитуды ГКР спектров до 9 раз по сравнению с контрольными ГКР спектрами миоглобина.

Также была исследована зависимость времени высушивания от УЗ частоты и морфологии ГКР-активной подложки. Наименьшее время сушки наблюдали на частотах 1700 кГц (50 сек) и 90 кГц (100 сек), при этом время сушки не зависит от морфологии подложки. Использование УЗ в целом приводит к уменьшению времени пробоподготовки с 30 до 1 - 5 минут.

## Список литературы

- [1] Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Валидные кардиоспецифические биохимические маркеры. Часть I. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. –2020. – № 19(4). – С. 123-134.
- [2] Merrill, Carl. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, Third ed. Edited by B. D. Hames//Analytical Biochemistry - ANAL BIOCHEM. –2000.–№ 280(2). – P. 333-333.
- [3] Yen, Tony & Fu, Xin & Wei, Tao & Nayak, Roshan & Shi, Yuesong & Lo, Yu-Hwa. Reversing Coffee-Ring Effect by Laser-Induced Differential Evaporation // Scientific Reports. – 2018. – №8. – P.1-11.
- [4] Crespo R., Martins P.M., Gales L., Rochac F., Damasa A.M. Potential use of ultrasound to promote protein crystallization // Journal of Applied Crystallography. –2010. – № 43(6). – P. 1419–1425.
- [5] Neppiras E.A. // Acoustic cavitation. Physics Reports. – 1980. – V. 61. - № 3. P. - 159-251. ISSN 0370-1573.



- [6] Бабурин А.С., Богинская И.А., Курочкин И.Н., Родионов И.А., Рыжиков И.А., Седова М.В., Тонанайский Б.Д., Ушаков Н.Д. Исследование влияния ультразвука при осаждении миоглобина из растворов на активные ГКР-подложки. // Вестник МГТУ им Н.Э. Баумана. – 2018. – № 4. – С. 97-111.
- [7] MetroPro Reference Guide // Zygo Corporation. Laurel Brook Road P.O. Box 448 Middlefield, Connecticut 06455-0448.
- [8] Leach R. Fundamental Principles of Engineering Nanometrology (Second Edition). Chapter 8. Surface Topography Characterisation In Micro and Nano Technologies. Ed.: Richard Leach. William Andrew Publishing. - 2014. P. -241-294. ISBN 9781455777532
- [9] OPUS Spectroscopy Software. User manual. BRUKER OPTIK GmbH, Rudolf-Plank-Straße 27, D-76275 Ettlingen. - 2006.

---

## THE EFFECT OF ADDITIONAL ENHANCEMENT OF THE SERS SPECTRA AMPLITUDE OF MYOGLOBIN DEPOSITED UNDER THE ULTRASOUND ON THE PRELIMINARY NANOSTRUCTURED SURFACE OF AG FILMS

Afanasev K.N.<sup>1</sup>, Boginskaya I.A.<sup>1</sup>, Sedova M.V.<sup>1</sup>, Slipchenko E.A.<sup>1\*</sup>, Averianova A.D.<sup>2</sup>, Ryzhikov I.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Theoretical and Applied Electromagnetics of RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow institutes of physics and technology, Moscow region, Russia

\* slipchenko-katya@mail.ru

### Abstract

The phenomenon of additional enhancement of the amplitude of the surface enhanced Raman spectra (SERS) of myoglobin precipitated from solution under the action of ultrasonic (US) has been studied. The study was carried out in a wide range of US frequencies, on silver substrates with different morphology parameters. The surface morphology of SERS-active substrates at the nanoscale level was formed by the conditions of glass surface etching (hydrofluoric acid concentration and etching time) before the deposition of silver films using electron beam evaporation in vacuum. It was shown that the SERS spectra of myoglobin after ultrasonic exposure during the drying of the sample are characterized by a change in both the positions of the vibration bands and the amplitudes of these bands compared to the SERS spectrum of the protein dried in air without US exposure. In particular, a significant enhancement of the SERS spectra of myoglobin was obtained compared to the control (drying without ultrasonication on substrates without glass etching) at a certain ultrasonic frequency and surface morphology parameters. The possibility of reducing the sample preparation time for analysis compared to the control was demonstrated, and the dependence of this time on the ultrasound frequency and glass etching time was studied.

**Key words:** surface-enhanced Raman scattering, SERS substrate, protein registration, sample preparation, ultrasound, myoglobin

---