

Biointerakce v reálném čase?

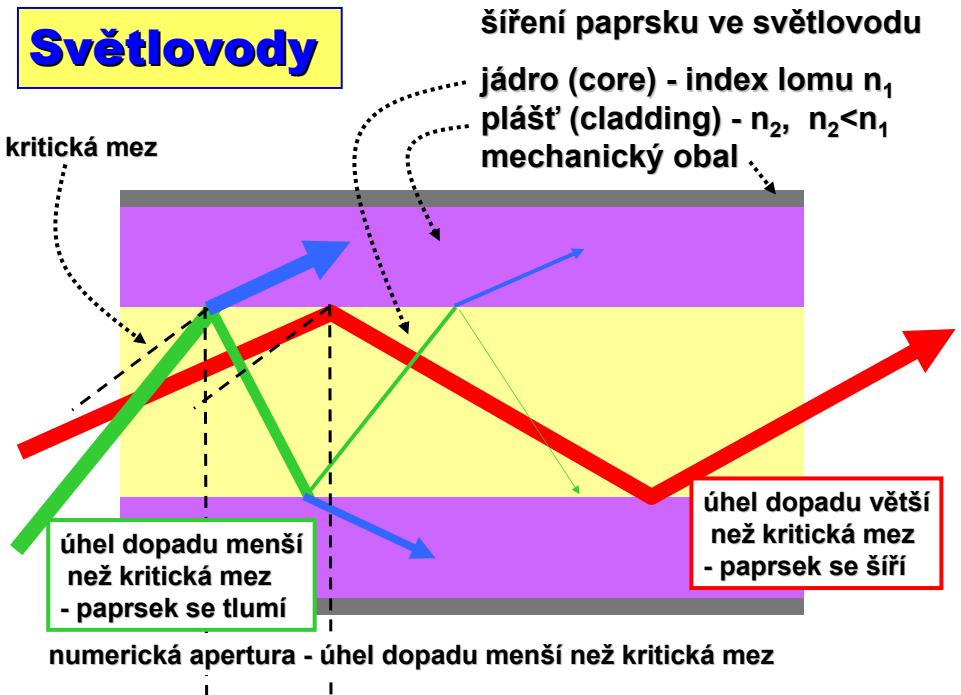
- **klasické metody** studia vzniku afinitních komplexů využívají značení jednoho z partnerů
 - radioaktivita, fluorescence, enzymy, ...
- po smíšení interagujících biomolekul se nechá ustavit rovnováha a stanoví se množství volné a vázané značky
 - celý pokus tedy poskytne na konci pouze jeden údaj
- lze tak určit kinetické rovnovážné konstanty
- **použití biosenzorů** vychází z toho, že jeden z partnerů je imobilizován v citlivé oblasti a měřený signál odpovídá množství vzniklého afinitního komplexu - není třeba značení
- měření probíhá průběžně v reálném čase
- lze určit kinetické rychlostní konstanty
- převodníkem jsou nejčastěji nelineární optické systémy

Historie SPR biosenzorů

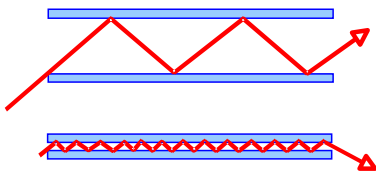
- konec 60. let: Kretchman a Otto ukázali optickou excitaci povrchových plazmonů prostřednictvím zeslabeného totálního odrazu světla ATR, attenuated total reflection
 - druhou možností excitace plazmonů je použití difrakční mřížky
- 1983: Nylander a Liedberg ukázali využití SPR pro konstrukci biosenzorů
- 1984: založena společnost Pharmacia Biosensor AB - cílem vývoj a komercializace funkčního SPR systému
- 1990: prodán první Biacore systém*
- 1994: uvedena na trh zjednodušená verze BIAlite
- následovaly Biacore X, 2000, 3000, a Q
- 2005: Biacore A100 s dynamickou adresací toku reagensů
- www.sprpages.nl

* Liedberg, B. et al. Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosens.Bioelectron.* 10: i-ix (1995)

Světlovody



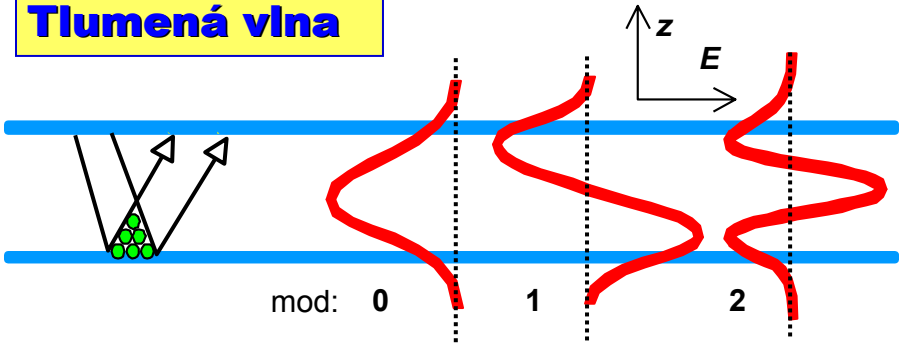
Odrazy ve světlovodu



při vedení světla uvnitř světlovodu dochází k interferenci mezi dopadajícím a odraženým světelným paprskem a tím vzniká elektromagnetické stojaté vlnění kolmé k odrážejícímu povrchu - tlumená vlna, evanescent wave

- v tenkém světlovodu je na jednotku délky mnohem více odrazů
- světlo se začíná šířit pouze v určitých diskrétních modech, daných pouze určitými úhly dopadu
- mody lze určit na základě průměru světlovodu, indexů lomu a vlnové délky světla
- zachovává se fázová koherence laserového paprsku.

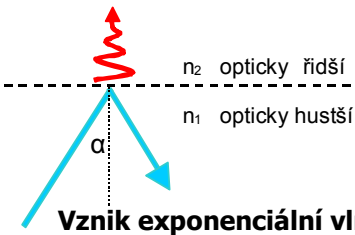
Tlumená vlna



- elektromagnetická vlna se šíří do okolí mimo světlovod, přitom její intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní („exponenciální vlna“)
- na vnějším povrchu světlovodu může docházet k interakcím s přítomnými látkami
- energetické profily exponenciální vlny jsou pro tři základní módy ukázány na obrázku
- pro vyšší módy narůstá podíl „vnější energie“ a zvětšuje se penetrační hloubka

Nelineární optické převodníky

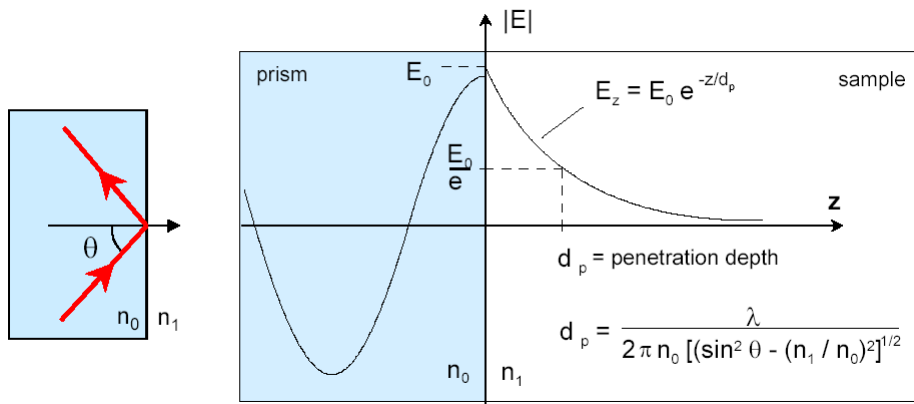
- základem interakce exponenciální vlny (tlumená, zhášivá) s okolím sensoru



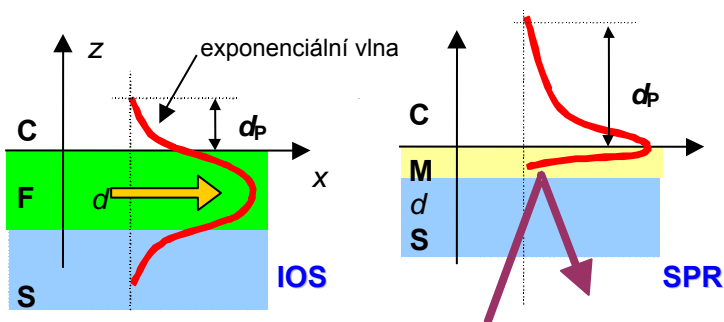
- dopad světelného paprsku šířícího se v opticky hustším prostředí na rozhraní s řidším pod větším úhlem než kritický ($\sin \alpha > n_2/n_1$) - totální vnitřní odraz světla (TIR, total internal reflection)
 - v opticky řidším prostředí vzniká superpozicí dopadajícího a odraženého světla elektromagnetická vlna
- pro biosensory se uplatňují dva systémy - planární světlovod a rozhraní kov / dielektrikum
 - interakce exponenciální vlny s blízkým okolím sensoru mění podmínky pro šíření světla v optickém systému
 - kvantifikuje se dle změn intenzity nebo fázového posunu světla
 - IOS planární vodiče světla (integrated optical sensor)
 - SPR rezonance elmg. vlny šířené povrchovou vrstvou kovu (surface plasmon resonance, interakce s volnými elektrony v kovu)

Exponenciální vlna

- základem biosensorů je interakce **exponenciální vlny** s okolím
- energie vlny se v prostředí velmi rychle utlumí (zhášivá vlna)



IOS SPR



- efektivní index lomu N pro šíření vedené vlny uvnitř opt. systému
 - šíří se jeden definovaný mod, který má u IOS magnetickou TM_0 a elektrickou TE_0 složku, u SPR existuje pouze TM_0
- změny v poli exp. vlny jsou vyvolané navázáním biomolekul na citlivý povrch (změny indexu lomu n_C v oblasti vzorku C)
- penetrační hloubka exp. vlny v prostoru vzorku je d_p
 - další součásti systému jsou S podkladový substrát (obvykle sklo, $n_s = 1.46$), F je planární světlovod (n_F , tloušťka d ; $n_F \approx 2.0$, $d = 80 - 120$ nm, materiály SiO_2/TiO_2 nebo Si_3N_4)
- u SPR je M tenká vrstvička kovu (Au, Ag, tl. 20 - 60 nm)
 - pro vznik SPR je nutné, aby u komplexní dielektrické permitivity kovu ϵ_M ($\epsilon_M = \epsilon_M' + j\epsilon_M''$) byla reálná složka ϵ_M' záporná a $-\epsilon_M' > n_C^2$

IOS / SPR

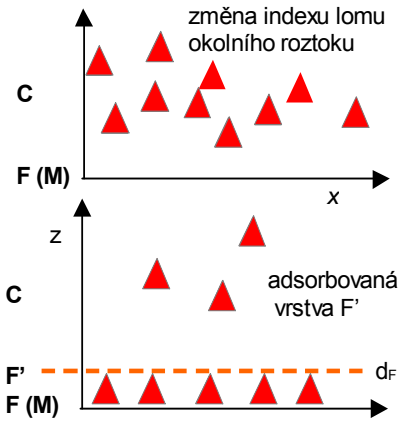
- pro efektivní indexy lomu N vedených vln a penetrační hloubky platí:
 - IOS:** $N = k_x \lambda / (2\pi)$ $d_p = \lambda / (2\pi) [N^2 - n_c^2]^{-1/2}$
 - SPR:** $N = [n_c^{-2} + 1/\epsilon_M]^{-1/2}$ $d_p = [\lambda / (2\pi n_c N)] (-\epsilon_M')^{1/2}$
- v důsledku absorpce světla v kovu je navíc SPR jev velmi úzce vymezen ve směru osy x na oblast efektivní délky L_α (propagační):

$$L_\alpha = \lambda (\epsilon_M'')^2 / (2\pi N^3 \epsilon_M'')$$
- IOS a SPR jsou do značné míry analogické systémy, oba využívají vedení definovaného modu vlnění (buď totálním vnitřním odrazem ve světlovodu nebo podél rozhraní kov / dielektrikum) a generování exponenciální vlny v oblasti vzorku.
- u IOS jsou vedeny jak TE_0 (s-polarizace), tak TM_0 (p-polarizace)
- u SPR existuje pouze TM složka (menší množství informace !)
- vedení světla u IOS je možné až na vzdálenost několika cm, u SPR jen na L_α , přitom citlivost je úměrná právě délce dráhy interakce se vzorkem.

Fyzikální charakteristiky IOS / SPR

Systém		N	d_p (nm)	L_α (μm)	$\delta N / \delta n_c$	$\delta N / \delta d_F$ (10^{-4} nm^{-1})
IOS	TE_0	1.68	98	–	0.12	3.1
	TM_0	1.55	126	–	0.26	4.8
SPR (TM_0)	Au	1.44	180	4	1.27	15.3
	Ag	1.40	230	24	1.16	10.9

Měřený signál



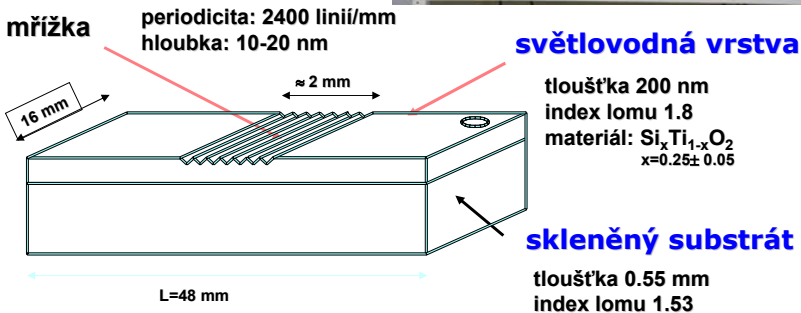
- homogenní změna indexu lomu celého prostředí C Δn_C (pro pufrý je $n_C = 1.33$) - jako refraktometr
 - z hlediska sensoru nežádoucí
- tvorba adsorbované vrstvy F', je homogenní, index lomu $n_{F'}$, tloušťka $d_{F'}$ (pro bílkoviny je $n_{F'}$ 1.45 – 1.55 a $d_{F'}$ bývá 4 – 10 nm)
- pokud se oba jevy uplatní současně, lze celkovou změnu vyjádřit jako:

$$\Delta N = (\delta N / \delta n_C) \Delta n_C + (\delta N / \delta d_{F'}) \Delta d_{F'}$$

přítom citlivost na změnu tloušťky adsorbované vrstvy je nepřímo úměrná penetrační hloubce: $(\delta N / \delta d_{F'}) \approx (1/d_p) (\delta N / \delta n_C)$

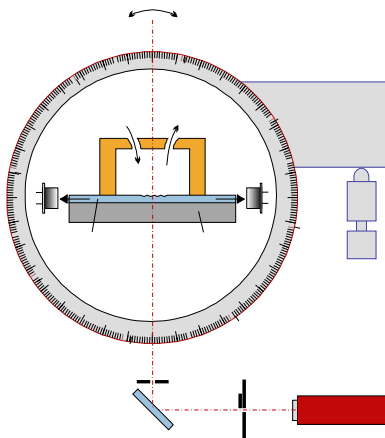
IOS

OW 2400 optical grating coupler waveguide sensor

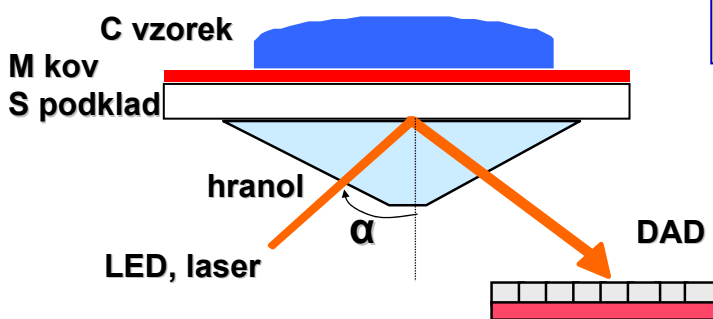


- v současnosti vyrábí MicroVacuum v Maďarsku (OWLS)

OWLS

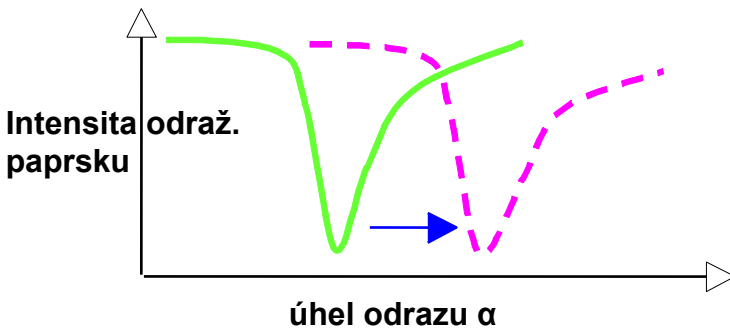


otočný stolek pro nalezení optimálního pracovního úhlu



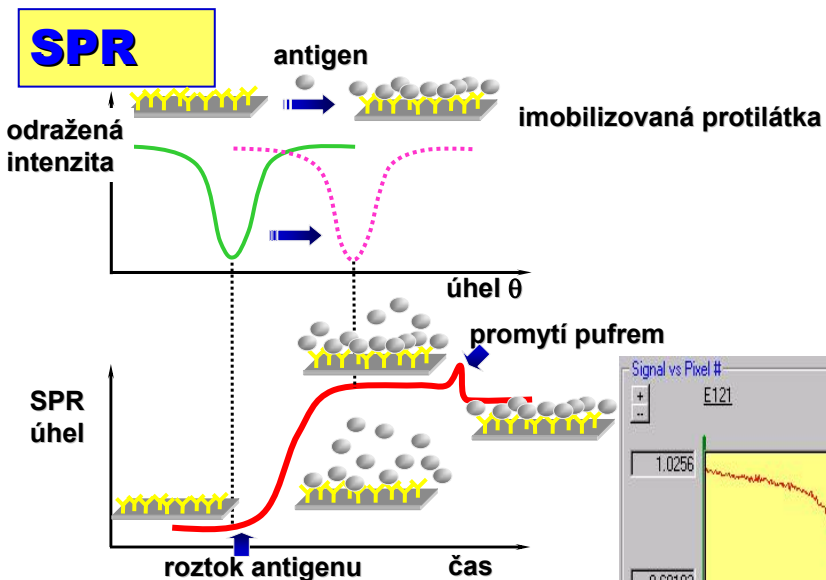
- pro zavedení světla se používá vstupní hranol, povrchová vlna se excituje na rozhraní mezi kovem M a dielektrickou vrstvou C (vzorek)
- místo hranolu lze principiálně použít i vstupní mřížku, vzhledem k rychlému utlumení SPR jevu nelze užít výstupní uspořádání
- změna rezonance se zaznamená jako posun minima intenzity pomocí detektoru diodové pole („diode array“)

SPR signál



- rezonanční úhel odpovídající minimu intenzity odraženého paprsku je kontinuálně vyhodnocován,
- jeho poloha je úměrná změnám povrchové hmotnosti vyvolaným adsorpcí biomolekul

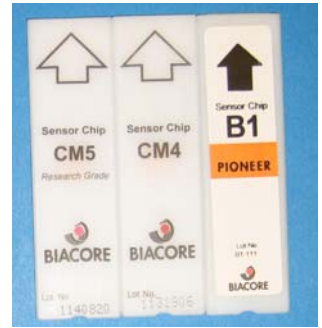
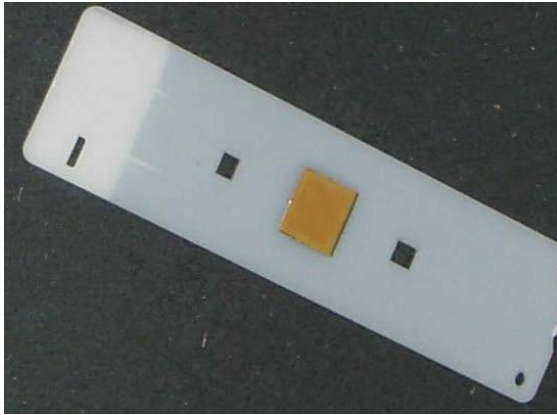
SPR



- schéma záznamu signálu

SPR biosensor

výměnný biosensor - „čip“ systému BIACORE



Rozměry

9 x 2.5 x 0.1 cm

modifikace povrchu:

CM5 karboxymethyl-dextran, HPA hydrofobní,
SA streptavidinový, NTA komplexace kovů, ...

BIACore



3000

2000

počátkem 90. let minulého století uvedla na trh švédská firma Pharmacia (později Biacore, ..., nyní součást GE Healthcare)

SPR-4 systém z Kijeva

pozlacené
sklíčko

průtočná
cela

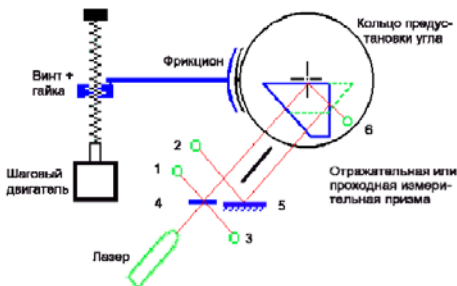
rotující
stolek



hranol

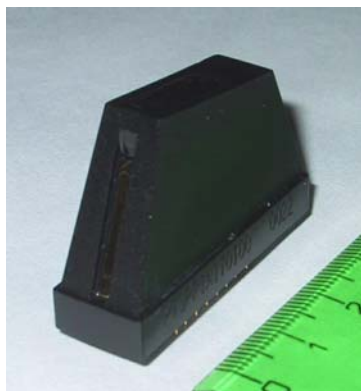
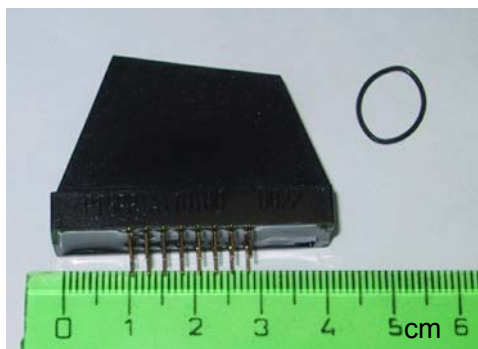
detektor

Mechanical Arrangement

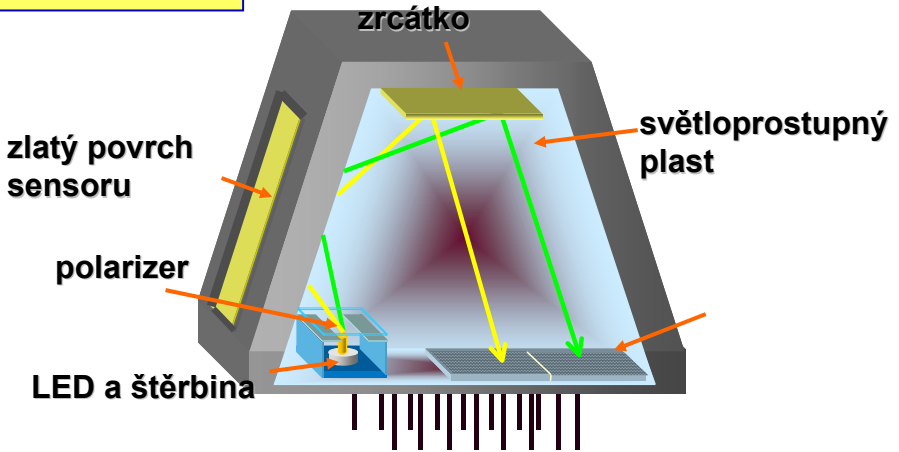


Spreeta

- koncem 90. let min. století Texas Instruments
- integrace optické měřicí a elektronické vyhodnocovací části do jediné součástky



Spreeta



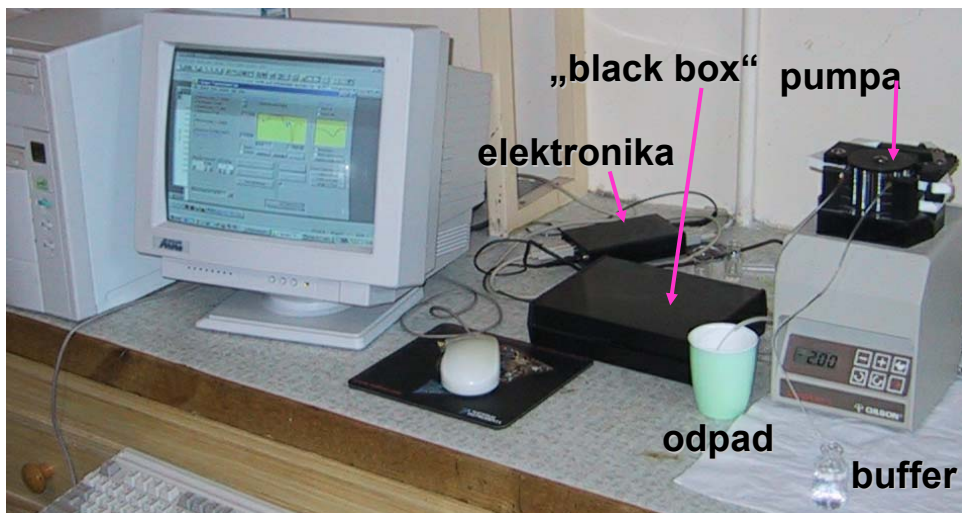
- schéma uspořádání (původní verze)



- měřicí uspořádání

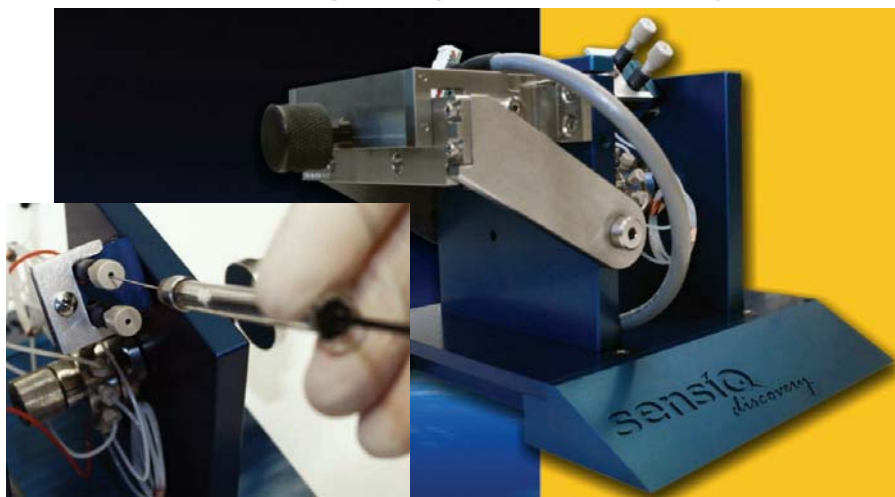


Spreeta



SensiQ: Discovery

- manuální 2-kan. systém, rel. vysoký šum < 1 RU
- www.discoverensiq.com (dodává Nomadics)



SensiQ

sensor
Spreeta 2000



- 2-kan. mikrofluidní cela
- šum 0.25 RU



SensiQ



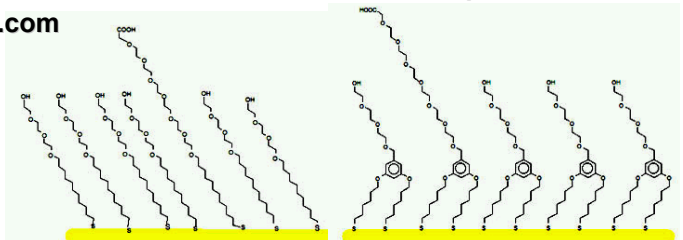
SensiQ Pioneer

- automatizovaná verze
- 3-kan. cela
- možnost gradientového a duálního nástřiku
- šum 0.1 RU



Reichert: SR7000 a SR700DC

- ruční jednokanálový a automatizovaný 2-kanálový SPR
- modulární design, průtočná a statická cela
 - možnost recirkulace vzorku - nástřikne se do cely a pak se rel. velkou rychlostí (500 ul/min) pohybuje
 - čipy - smíšené PEG/PEG-COOH SAM s nízkou nespec. vazbou
- www.reichertspr.com



Reichert: SR700DC



Sierra Sensors: SPR2

- senzorem je přímo zlatem potažený hranol
- prostor celý lze sledovat minikamerou (bubliny...)
- www.sierrasensors.com

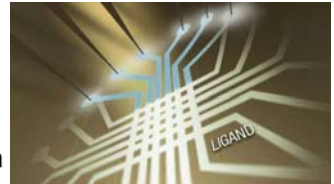


Sensia: betaSPR

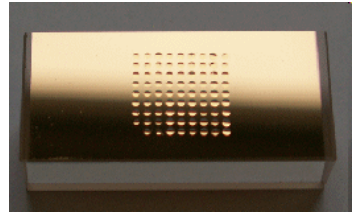
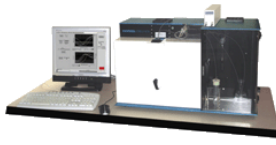


BioRad: ProteOn XPR 36

- 36 interakčních zón
 - 6 ligandů x 6 vzorků, 42 referenčních zón
 - překlopitelná průtočná cela, CCD kamera
- marketingová strategie - proteomika
- www.bio-rad.com



Horiba: SPRi (imaging)



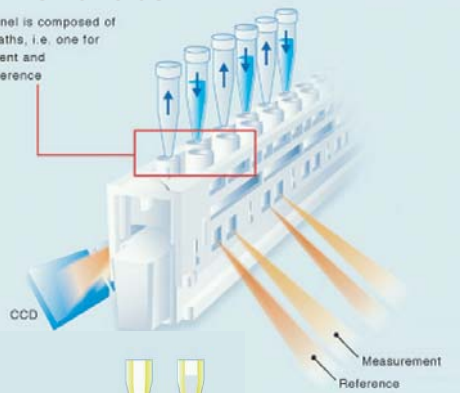
- SPRi-Lab+ a SPRi-Plex
- 64 (500 μm) až 400 (200 μm) měř. bodů (spots) na 1 cm^2 plochy čipu - hranol s pozlaceným povrchem, aktivovaný
- nižší citlivost doporučené koncentrace vzorků 150 ng/ml (100-1000 kDa) až 5 $\mu\text{g/ml}$ (4-20 kDa)

- výhoda: vysoce paralelní měření
- nutnost zvládnout cílenou imobilizaci bioligandů

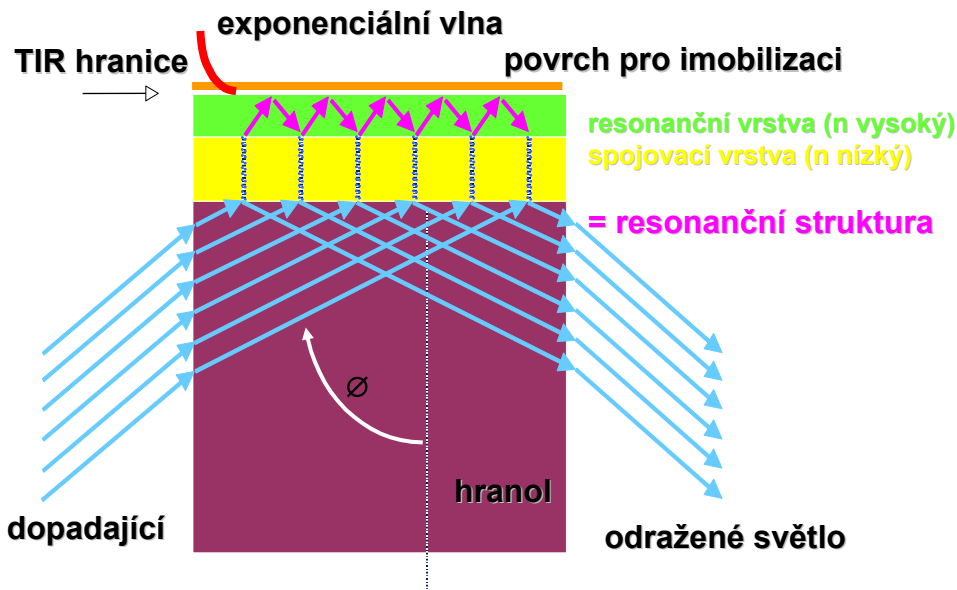
FujiFilm: AP-3000

- unikátní sensor ve formě tyčinky (SPR stick)
- „nejrychlejší“, screening až 3840 vzorků za den
- měření při zastaveném toku
- lokalizované SPR
- mikroporézní struktura

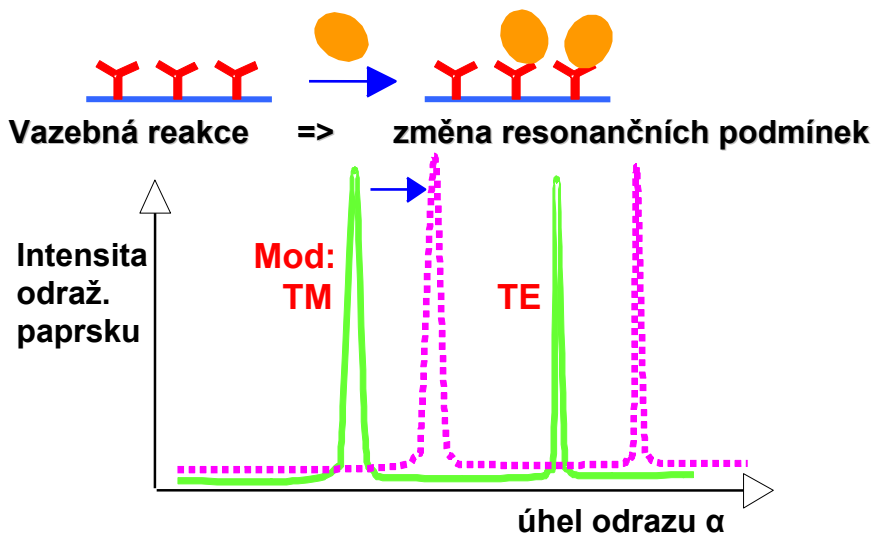
Each channel is composed of two flow paths, i.e. one for measurement and one for reference



Resonanční zrcátko - IAsys



Resonanční zrcátko - signál



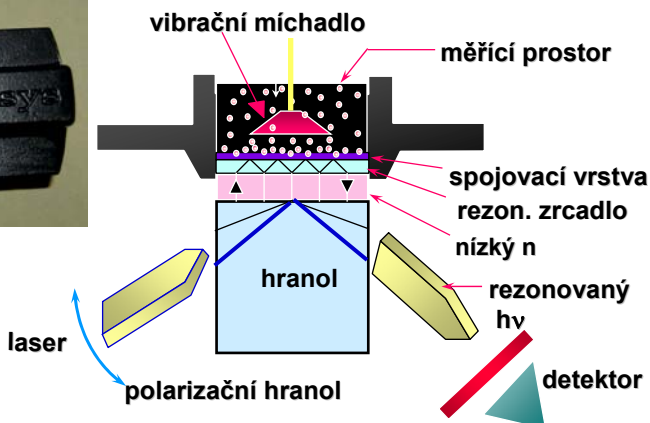
- rezonanční úhel odpovídající maximu intenzity odraženého paprsku (el. a magn. složky) je průběžně sledován, jeho poloha je úměrná změnám povrchové hmotnosti

Resonanční zrcátko - sensor

výměnná měřicí kyveta systému IAsys



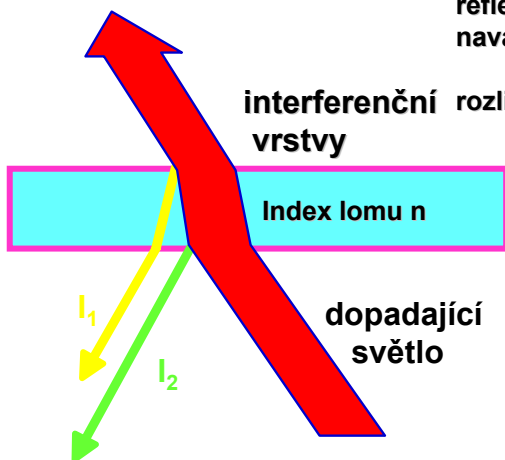
Rozměry
5 x 2 x 3 cm



Citlivé povrchy:
aminosilanizovaný, karboxylovaný, karboxymethyl-dextranový,
hydrofobní, biotinylovaný

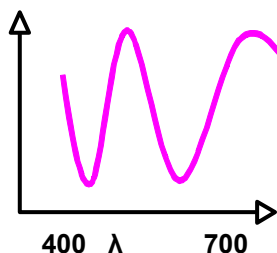
RIFS - reflektometrická interferenční spektroskopie

reflektivní spektrum mění tvar po
navázání biomolekul



$$\Delta\phi = 2nd/\lambda + \phi$$

odražené paprsky interferují



Biacore varianty

nyní (2010) dostupné:

- **4000 (A100)** - nejvyšší produktivita, až 4800 interakcí/den
- **T100** - nejvyšší citlivost
- **X100** - osobní systém
- **C** - měření koncentrací, certifikovaný provoz
- **3000** - univerzální, citlivý, lze eluovat pro MALDI/MS
- **Q** - kvalita / kvantita v analýze potravin
- **J** - nejjednodušší jednokanálový systém

Porovnání systémů

Application/performance and technical specifications	Biacore T100 - Unmatched performance	Biacore A100 - Unmatched productivity	Biacore Flexip - Array-based parallel kinetic profiling	Biacore X100 - Ready-to-run research system	Biacore 3000 - Interaction analysis with SP8-MALDI interface	Biacore C - Rapid and reliable protein quantification
						
Application						
Kinetic/affinity characterization	●●●	●●●	●	●●●	●●	-
Kinetic/affinity screening and profiling	●●	●●●	●●●	●	●●	-
Single cycle kinetics	Yes	-	Yes	Plus Package	-	-
Concentration measurement	●●	●●	-	●● Plus Package	●	●●●
Calibration-free concentration analysis	Yes	-	-	-	-	-
UMI Interaction analysis	●●●	●●●	-	●	●	-
Thermodynamic characterization	●●●	●	-	● Plus Package	●●	-
Sample recovery for MS	●●	-	-	-	●●●	-
Performance and technical specifications						
Detection spots/sensor surface	4	20	400	2	4	4
Throughput	●●	●●●	●●●	●	●●●	●
Unattended run capacity	●●	●●●	●	●	●●	●●
Automated data evaluation	●●	●●●	●●	●●	●	●●●
User guidance	●●	●●	●●	●●●	●●	●●
Cooled sample storage	●●●	●●●	-	-	●●	●●
Analyte temperature (°C)	4-45 (in-line degasser)	4-40 (in-line degasser)	20-37 (in-line degasser)	25 4-40 with Plus Package, including in-line degasser	4-40	25
CEP compliance support	CEP Package	CEP Package	-	-	CEP Package	Yes

T100



4000



BIACore

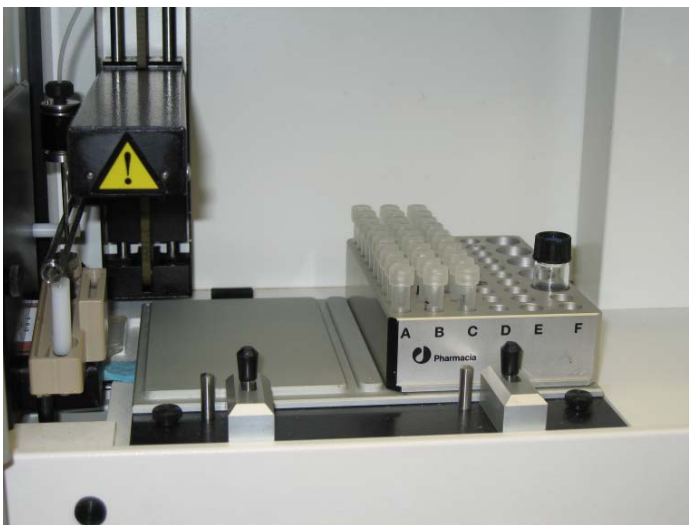


3000

2000

počátkem 90. let minulého století uvedla na trh švédská firma Pharmacia (později Biacore, ..., nyní součást GE Healthcare)

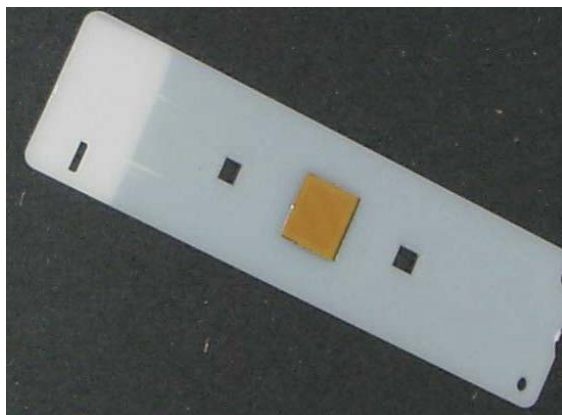
BIACore - automatizace



- dávkovač vzorků s pozicemi pro zásobníky

SPR biosensor

výměnný biosensor - „čip“ systému BIACORE



Rozměry

9 x 2.5 x 0.1 cm

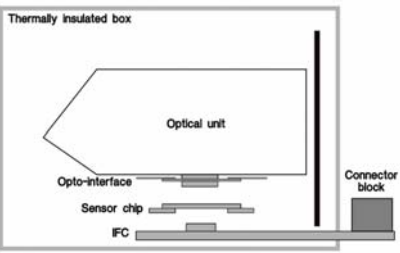
modifikace povrchu:

CM5 karboxymethyl-dextran, HPA hydrofobní,
SA streptavidinový, NTA komplexace kovů, ...

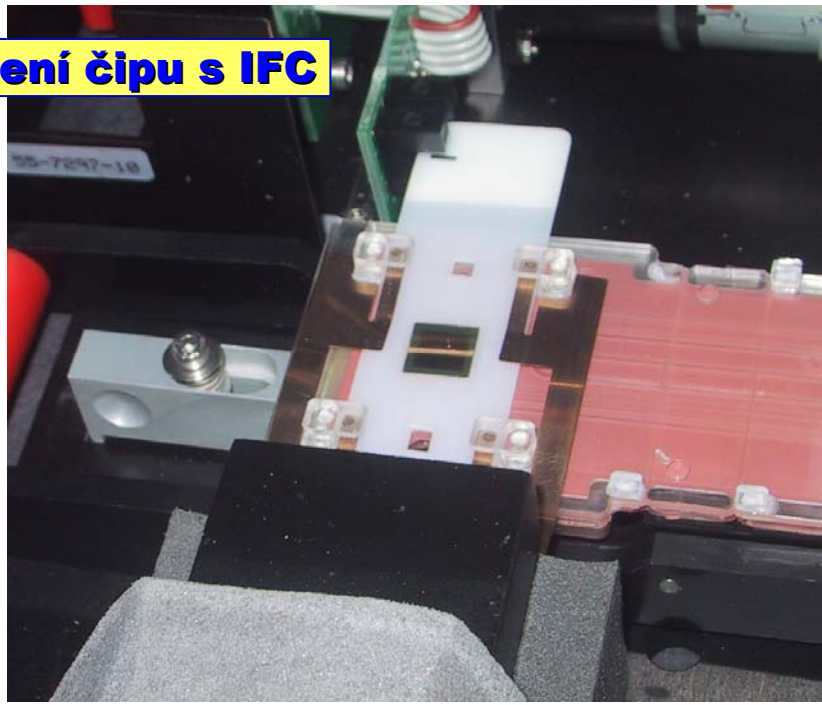
Zasunutí čipu



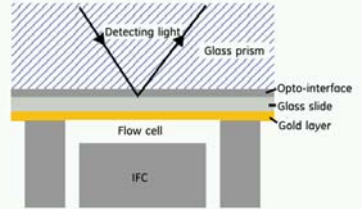
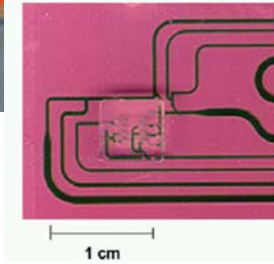
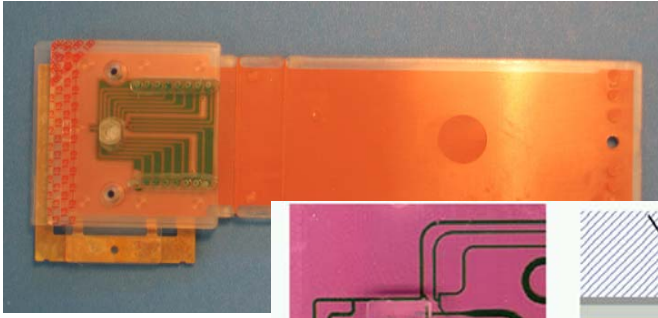
Pohled dovnitř



Spojení čipu s IFC



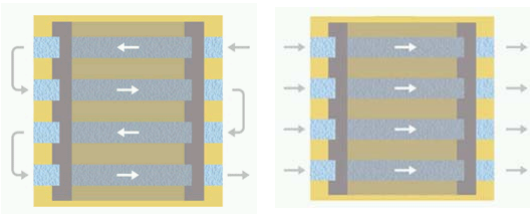
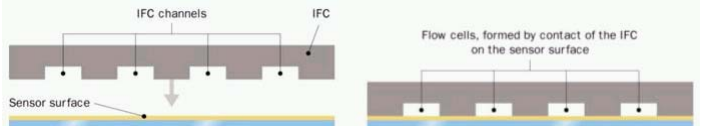
BIAcore - průtočný systém



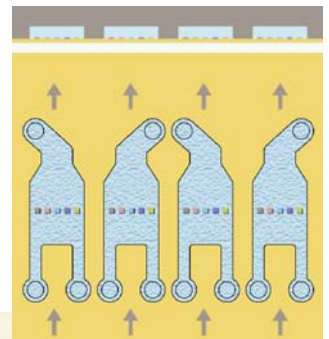
- **microfluidics system IFC** - miniaturní výměnný modul s pneumaticky ovládanými mikroventily, dávkovacími smyčkami a dráhami
- **přívod pracovního pufru, reagentů a vzorků k jednotlivým kanálům**
- **variabilní nastavení měřicí konfigurace průtočné cely - 1 až 4 kanálové měření**

Průtočné cely

- **klasický (2000, 3000)**



sekvenční / paralelní



- **hydrodynamická adresace (A100)**

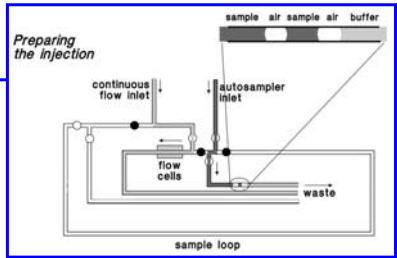
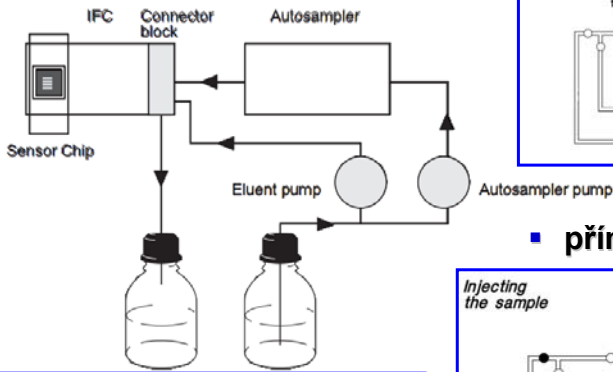
Optimized for sample throughput



Optimized for information per sample

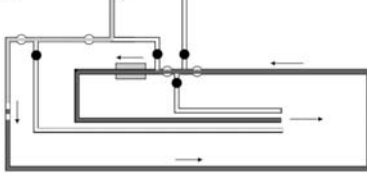


Průtočný systém

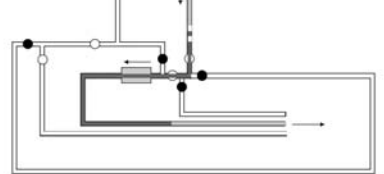


▪ **přímý nástřik do cely**

Injecting the sample



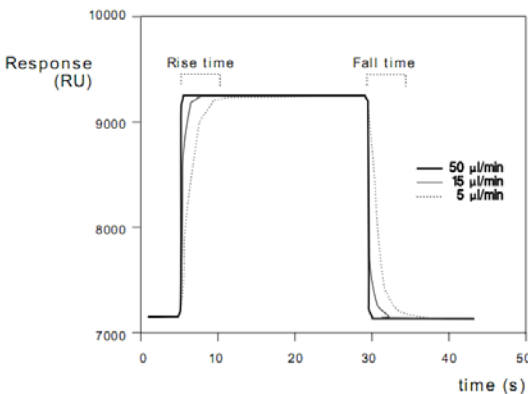
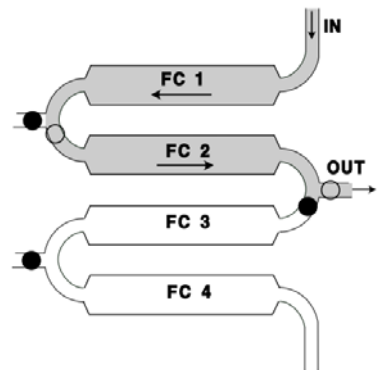
Injecting the sample



▪ **nástřik přes smyčku**

Detail toku v cele

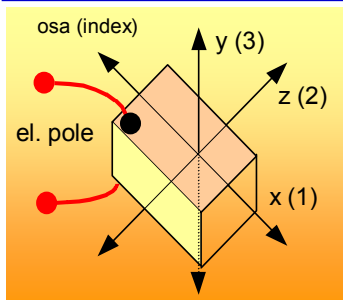
- způsoby průtoku:
 - individuálním kanálem (FCi)
 - dvěma (FC1,2 nebo FC3,4)
 - třemi (FC1,2,3) nebo všemi
- vliv průtočné rychlosti na výměnu obsahu cely



Piezelektrické biosensory

- piezelektrický efekt - v některých anisotropních krystalech (křemen, turmalín, Rochellova sůl) se při mechanickém namáhání generují orientované dipóly a vzniká elektrické napětí
- naopak, pokud se na krystal přivede střídavé elektrické napětí o vhodné (**rezonanční**) frekvenci, začne krystal se stejnou frekvencí vibrovat, přitom se převážná část energie (105:1) uchová v oscilujícím systému a nerozptyluje se do okolí

Piezelektrické materiály



- orientace piezelektrické destičky **anisotropních materiálů** jsou **elektrické, mechanické a magnetické vlastnosti** různé vzhledem k různým osám
- mechanické deformace:

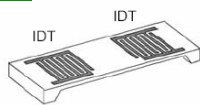
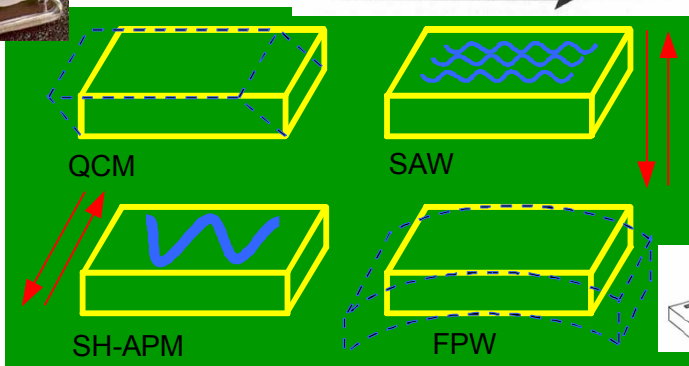
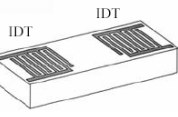
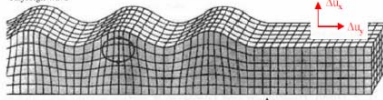
	destička	disk
d_{31}	délková	radiální
d_{32}	šířková	
d_{33}	tloušťková	tloušťková

- **přírodní:** monokrystaly křemene, z nich se připraví vlastní sensory jako destičky vyřezané pod přesným úhlem (řezy AT, BT, ST, ...)
- **umělé:** (dnes i křemen) keramika: polykrystalická, ale uniaxiální (orientované), příprava sintrováním (ZnO , $LiNbO_3$, $LiTaO_3$, $Bi_{12}GeO_{20}$), snadné tvarování a nanášení
- **plasty:** polyvinylidenfluorid PVDF $(-CH_2CF_2-)_n$ - směs (asi 1:1) amorfni a polykrystalické formy, z nepolární náhodně orientované a polární orientované složky)

Vibrace piezosensorů

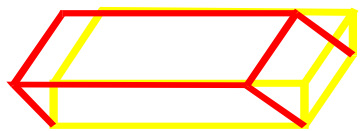


Rayleigh wave



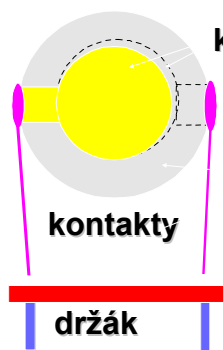
- QCM quartz crystal microbalance; SAW surface acoustic wave; SH-APM shear horizontal acoustic plate mode FPW flexural plate (Lamb) wave.
- oscilace může probíhat v celém objemu materiálu, nebo pouze v povrchové vrstvě. Konkrétní systémy jsou uvedeny na obrázku; často se uplatňuje několik druhů oscilací současně.

Piezosensory - chemické mikrováčky



objemová akustická vlna - schéma tloušťkové střižové vibrace

základní stav / amplituda



kovové elektrody

destička z křemene

AT-řez

5 až 20 MHz

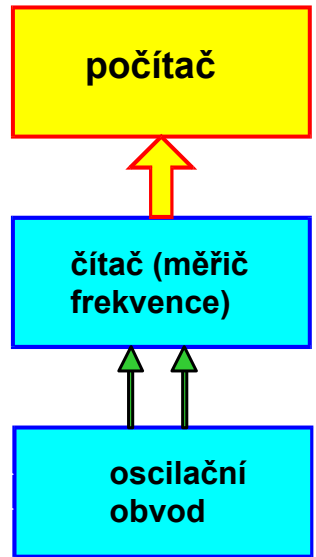
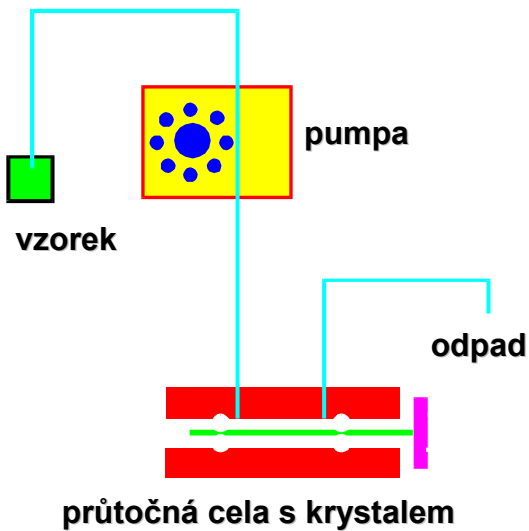
Piezoelektrický krystal

Hmotnostní citlivost:

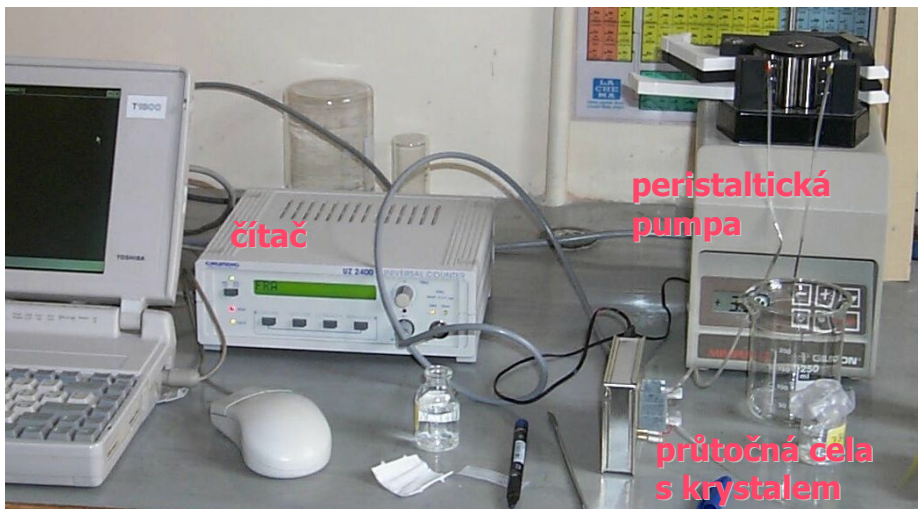
QCM - quartz crystal microbalance

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

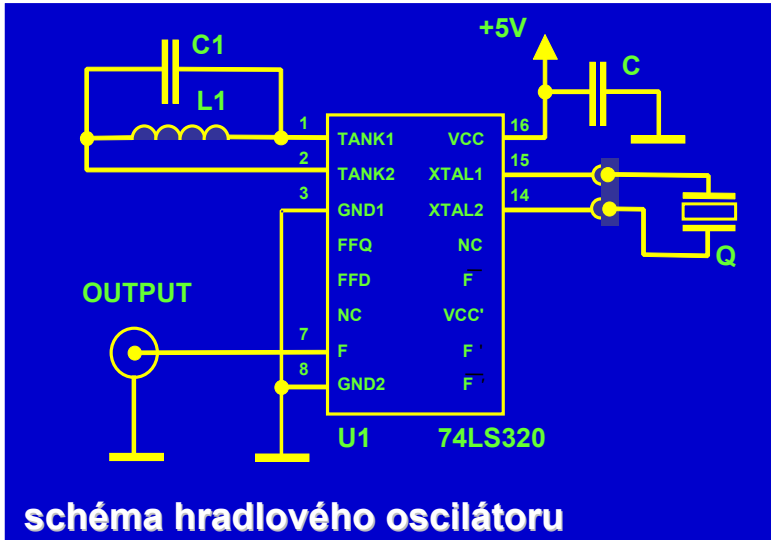
Měřicí uspořádání



Ukázka měřicí aparatury



Oscilační obvod



Piezosensory v kapalinách

$$\Delta f = \frac{2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

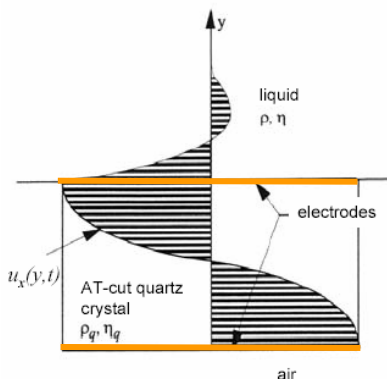
hmotnost

$$\Delta f = \sqrt{f_0^3 \frac{\eta_L \rho_L}{\pi \rho_q \mu_q}}$$

viskozita

- při navázání látky na aktivní povrch elektrod dojde ke změně rezonanční frekvence f_0
- změní se **hmotnost** celého systému a vibrace se zpomalí - frekvence poklesne
- pokud krystal osciluje navíc vpřítomnosti kapaliny, dochází k dalším změnám f_0 v důsledku tlumení oscilací (**viskozita** prostředí).

Tlumení v kapalinách



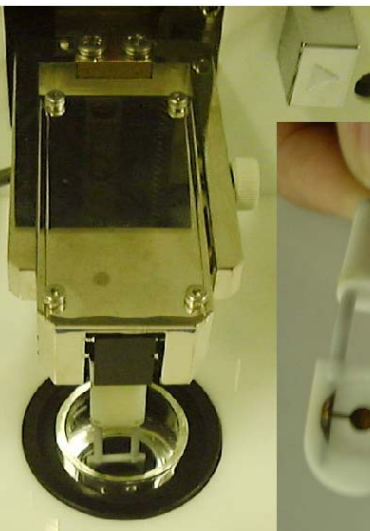
- **prostup vlny v kapalině - penetrační hloubka δ**
- **cca 180 nm pro vodu a 10 MHz frekvenci**

$$\delta = \sqrt{\frac{2\eta}{\omega\rho}} = \sqrt{\frac{\eta}{f\pi\rho}}$$

Komerční systémy

Firma / kontakt	Produkt / popis
Akubio , Cambridge, GB (http://www.akubio.com)	Resonant Acoustic Profiling – technologie založená na piezokrystalech, plánován měřicí systém vhodný pro studium biointerakcí a aplikace ve farmaceutickém průmyslu, ve vývoji
Elchema , Potsdam, NY, USA (http://www.elchema.com)	řada modelů, 10 MHz krystaly, převodník frekvence-napětí a analogový výstup, elektrochemická měření základní EQCN 420 – rozlišení 0.1 ng (cca 0.1 Hz) 5000 USD, nejvyšší EQCN 900 – včetně impedančního měření, 24000 USD
Elbatech , Marciana, Itálie (http://www.elbatech.com)	QCMagic , krystaly 10 MHz, čítačem je PCI karta, rozlišení 1 Hz, až 4-kanalový
CH Instruments , Austin, TX, USA (http://www.maxtekinc.com)	Model 400 , Time-Resolved Electrochemical Quartz Crystal Microbalance, specializované pro elektrochemické experimenty, 8 MHz krystaly, rozlišení lepší než 0.1 Hz
Initium , Tokio, Japonsko (http://www.initium2000.com)	Affnix Q , 27 MHz krystaly, míchaná komůrka, spec. na biointerakce, také 4-kanalová varianta
Maxtek , Santa Fe Springs, CA (http://www.maxtekinc.com)	Research Quartz Crystal Microbalance , zaměřeno na elektrochemické pokovování, velké krystaly 4 až 10 MHz, rozlišení 0.03 Hz, až tříkanalový
Princeton Applied Research / AMETEK , Oak Ridge, TN, USA (www.princetonappliedresearch.com)	QCM 922 – 9 MHz krystaly, rozlišení 0.1 Hz, současně měří i resistanci krystalu, vyvinuto spolu s firmou Seiko
QCM lab , Järfälla, Švédsko (http://www.qcmlab.com)	QCM 3 – rozlišení 1 Hz (klasický čítač), současně měří i proud tekoucí krystalem (resistance), duální oscilátor, široký rozsah teplot (-200 až 500 °C)
Q-Sense , Västra Frölunda, Švédsko (http://www.q-sense.com)	D-300 - krystaly 5 MHz, rozlišení 0.01 Hz, současně měří i disipační faktor – tlumení oscilací krystalu, stacionární uspořádání, temperace, vhodné i pro mikroskopická pozorování; E4 – čtyřkanalová průtočná varianta, obdobné parametry
Stanford Research Systems , Sunnyvale, CA, USA (http://www.thinksrs.com)	QCM100 – krystaly 5 MHz, výstup resistance, vyžaduje externí čítač
Universal Sensors , Kinsale, Ireland (http://intel.ucc.ie/sensors/universal)	PZ-105 , krystaly 10 MHz, rozlišení 1 Hz, zastaralý model

Affinix Q

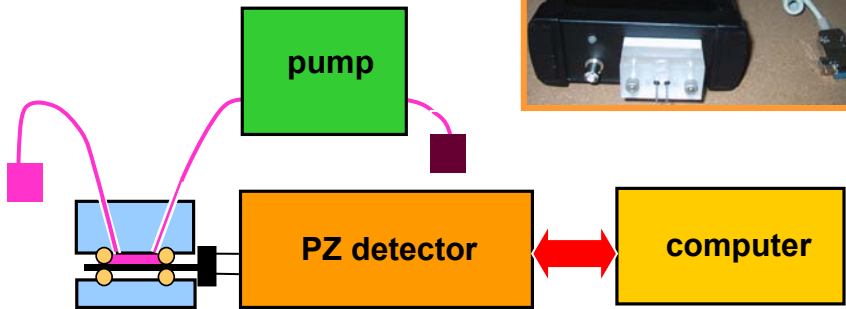


Affinix Q4



- vícekanálové měření

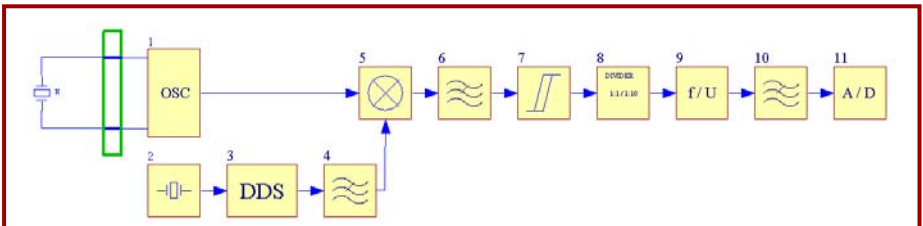
MU Brno



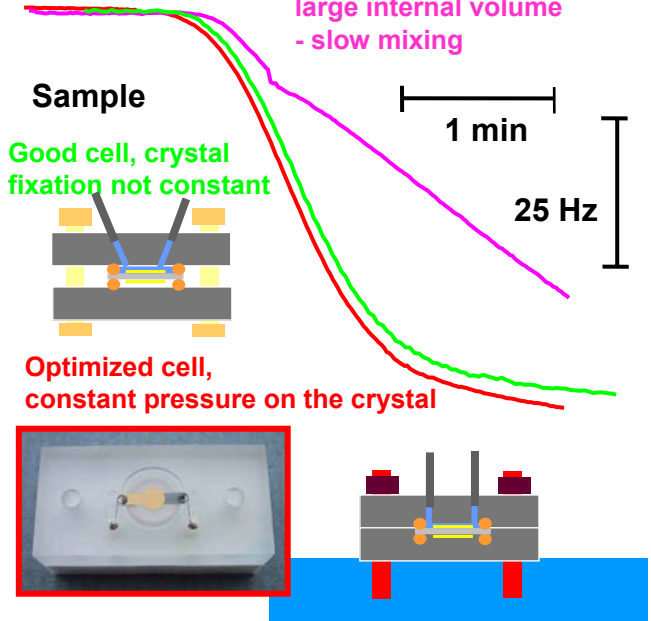
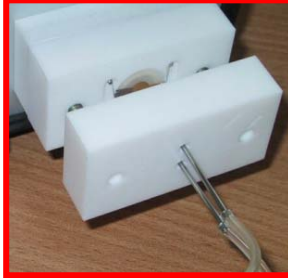
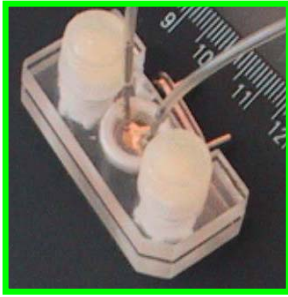
$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

Detektor MultiLab

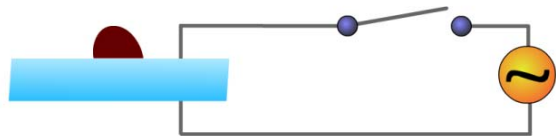
- portable piezoelectric detector, computer-controlled
- highly sensitive and rapid measurements
- principle: output frequency from the oscillator(1) is subtracted(5) from a similar stable reference frequency generated by DDS(2)
- thus obtained low frequency is filtrated(6), converted to voltage(9), filtrated(10) and finally converted to digital signal using A/D(11)
- the resolution is 0.05 Hz / 20 ms



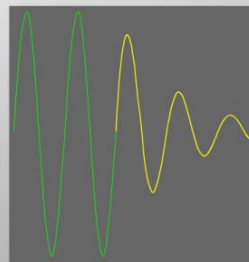
Flow-cell design



QCM-D

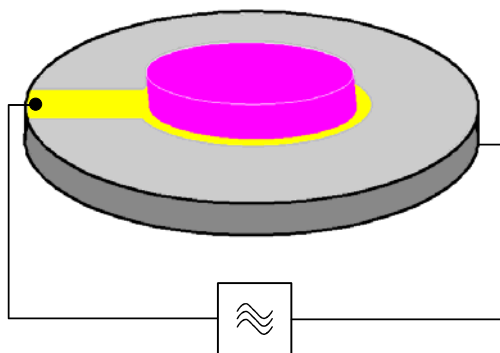


Viscoelastic substance - High dissipation
The quartz crystal with its coating substance is oscillating at constant frequency. The power source is then disconnected and the amplitude of the oscillation rapidly decreases, due to the high energy loss in the viscoelastic film.



- měří současně změnu rezonanční frekvence a tzv. disipační faktor D - závisí na tlumení oscilací

Rigidní a viscoelastické vrstvy

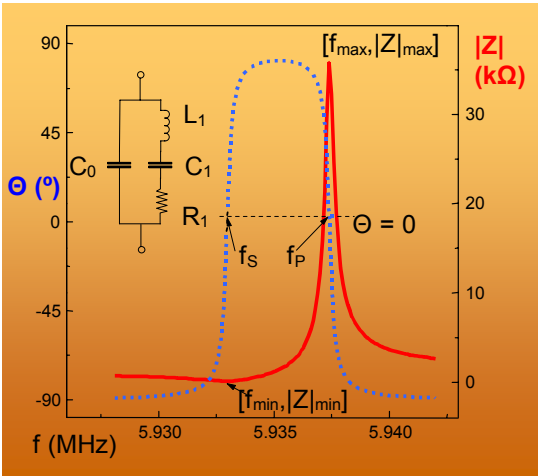


tenký rigidní film: horní i dolní povrch vibrují synchronně
viskoelastický film: horní i dolní povrch vibrují s fázovým posunem - větší tlumení, „větší“ odezvy

Více informací z piezosensorů?

- měřené změny frekvence neodráží pouze změny hmotnosti, ale i struktury adhezující vrstvy
- potřeba měřit další parametry, úměrné viskoelastickým změnám (tlumení)
- disipační faktor D (Q-Sens)
- resistance R (Seiko / PAR)
- energie dodávaná krystalu z oscilačního obvodu (AGC, auto gain control)
- impedanční měření

Impedanční charakteristika



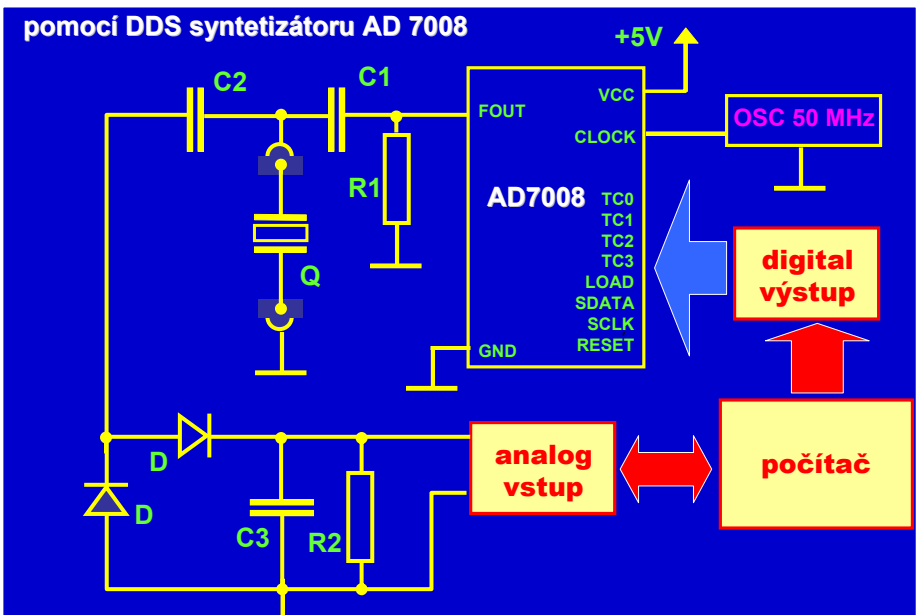
pasivní měřicí metoda

na krystal se přivádí proměnná frekvence a sleduje se změna velikosti impedance $|Z|$ a fázový posun Θ

- výsledkem je větší množství informací o dějích na povrchu krystalu a vyšší spolehlivost měření - odlišení hmotnostních a viskozitních změn

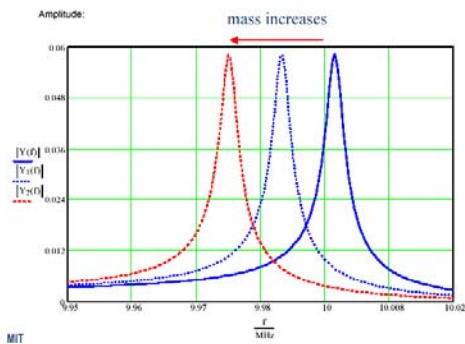
Impedanční měření

pomocí DDS syntetizátoru AD 7008

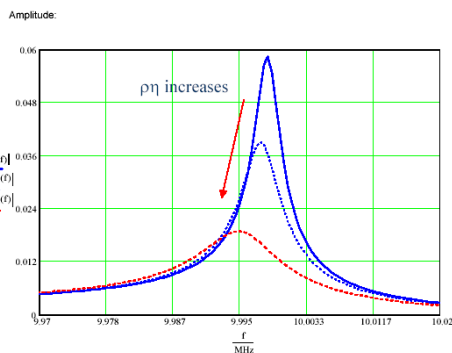


Impedanční měření

Effect of mass loading



Effect of (density x viscosity)



Současné trendy afinitních biosensorů

- SPR systémy jsou směřovány do farmaceutické oblasti
- screening nových látek s potenciálně využitelnými fyziologickými vlastnostmi
- cílové biomolekuly se imobilizují na povrch sensoru a sleduje se jejich interakce s vazebnými kandidáty
- buď hotové molekuly (náročné - mnoho možností)
- nebo „knihovny“ stavebních fragmentů (pár set), z těch reagujících se pak následně vytváří kompletní molekuly