


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 biosensorů** 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 biosensorů

- 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 biosensorů
- 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)

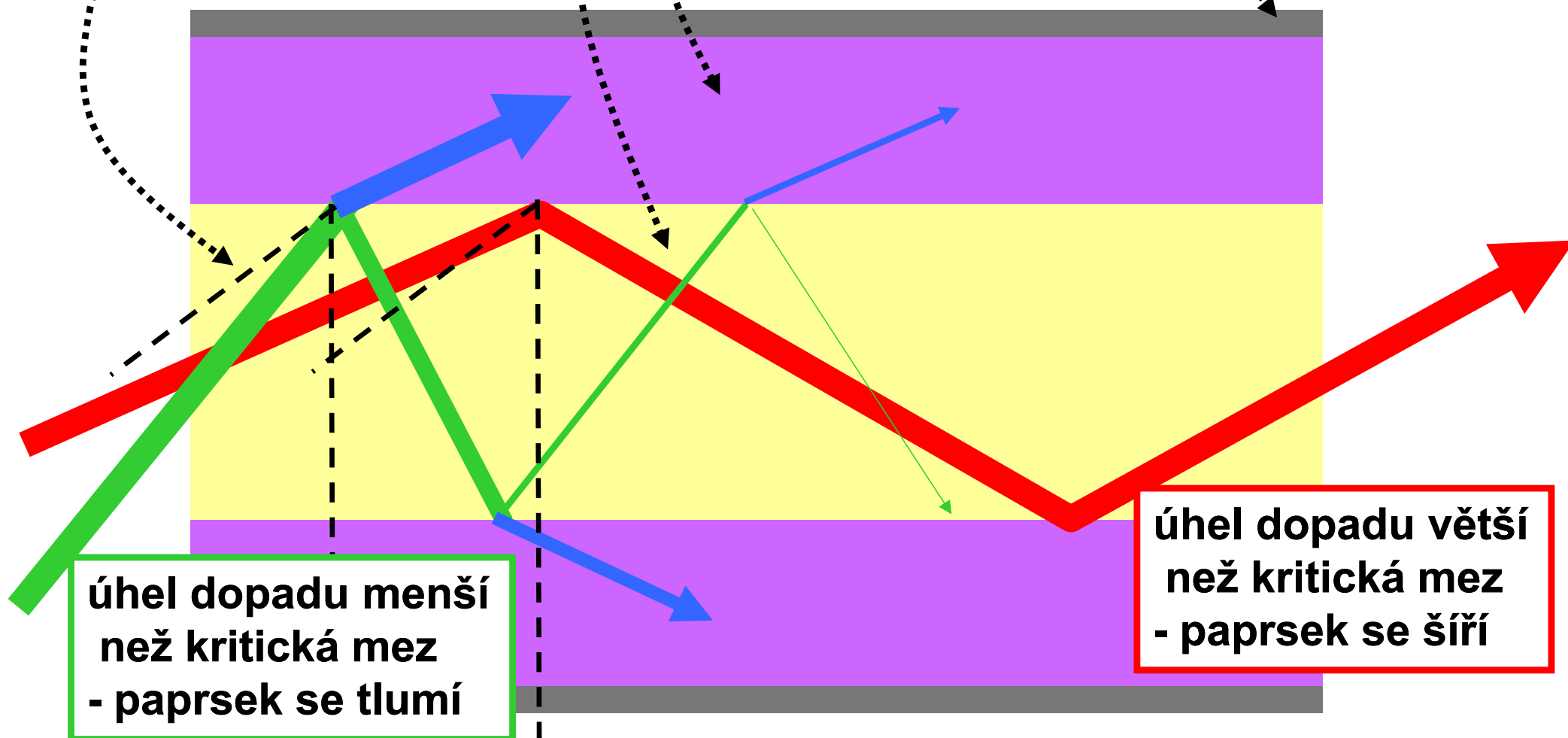


Světlovody

šíření paprsku ve světlovodu

jádro (core) - index lomu n_1
plášť (cladding) - n_2 , $n_2 < n_1$
mechanický obal

kritická mez



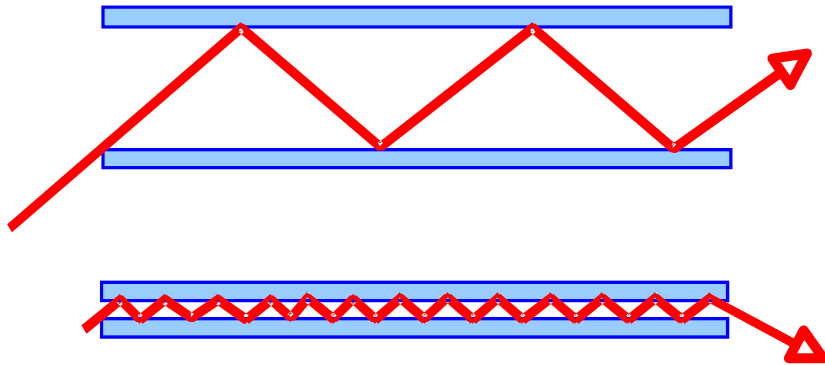
úhel dopadu menší
než kritická mez
- paprsek se tlumí

úhel dopadu větší
než kritická mez
- paprsek se šíří

numerická apertura - úhel dopadu menší než kritická mez



Odrazy ve světlovodu

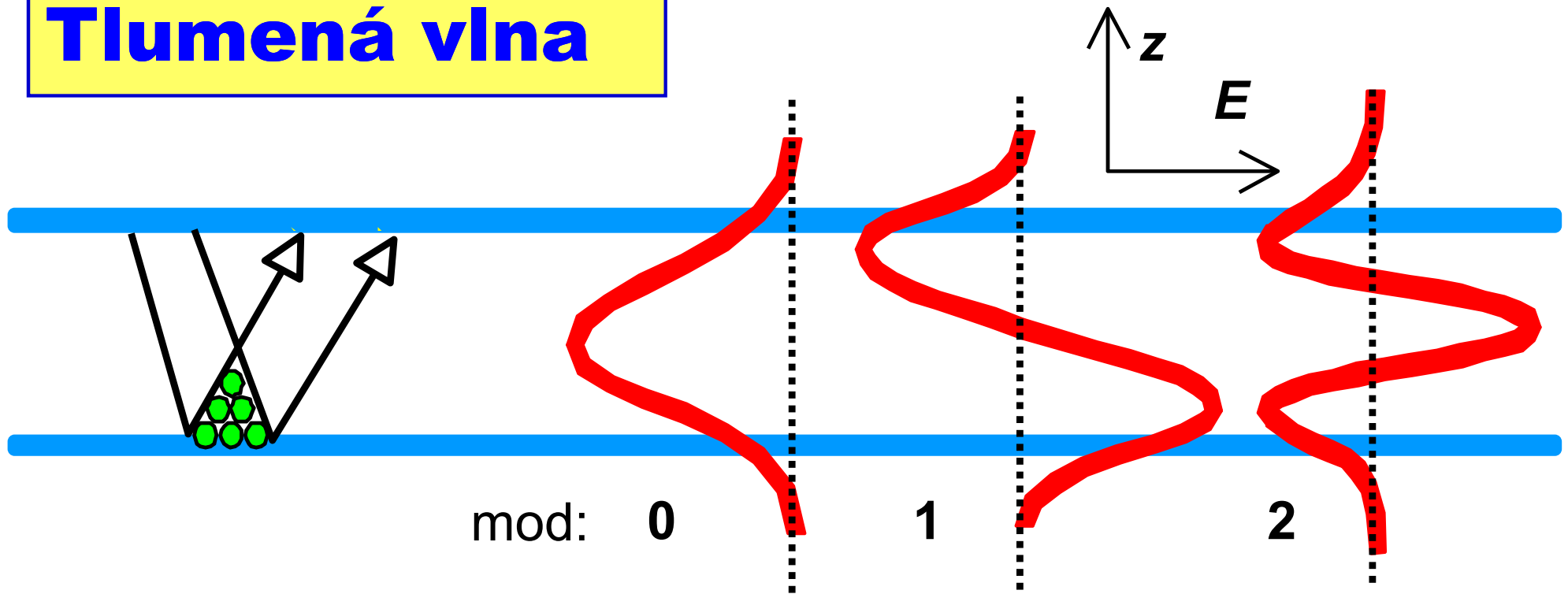


při vedení světla uvnitř světlovodu dochází k interferenci mezi dopadajícím a odraženým světelným paprskem a tím vzniká elektromagnetické stojaté vlnění kolmé k odrážejícímu povrchu - tlumená vlna, evanescent wave

- 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

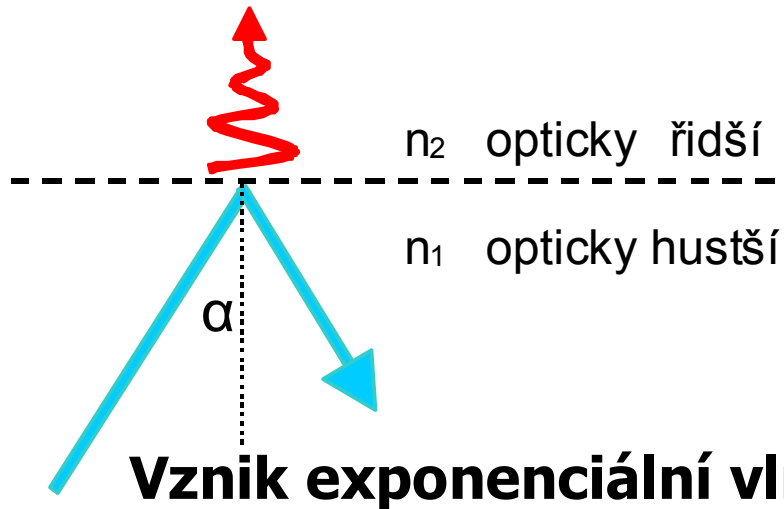


- elektromagnetická vlna se šíří do okolí mimo světlovod, přitom její intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní („exponenciální vlna“)
- na vnějším povrchu světlovodu může docházet k interakcím s přítomnými látkami
- energetické profily exponenciální vlny jsou pro tři základní mody ukázány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



Nelineární optické převodníky

- základem interakce exponenciální vlny (tlumená, zhasívá) 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)

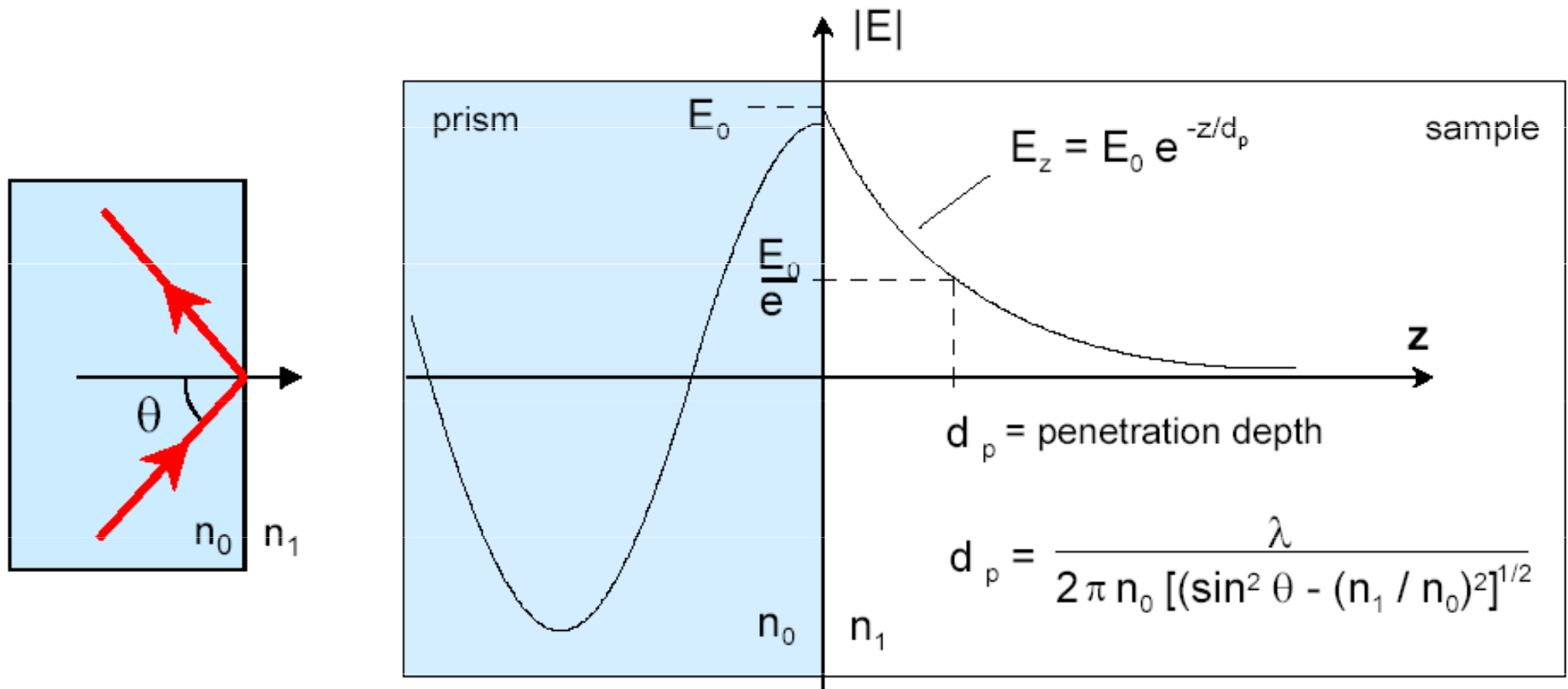
- v opticky řidším prostředí vzniká superpozicí dopadajícího a odráženého světla elektromagnetická vlna

- 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)

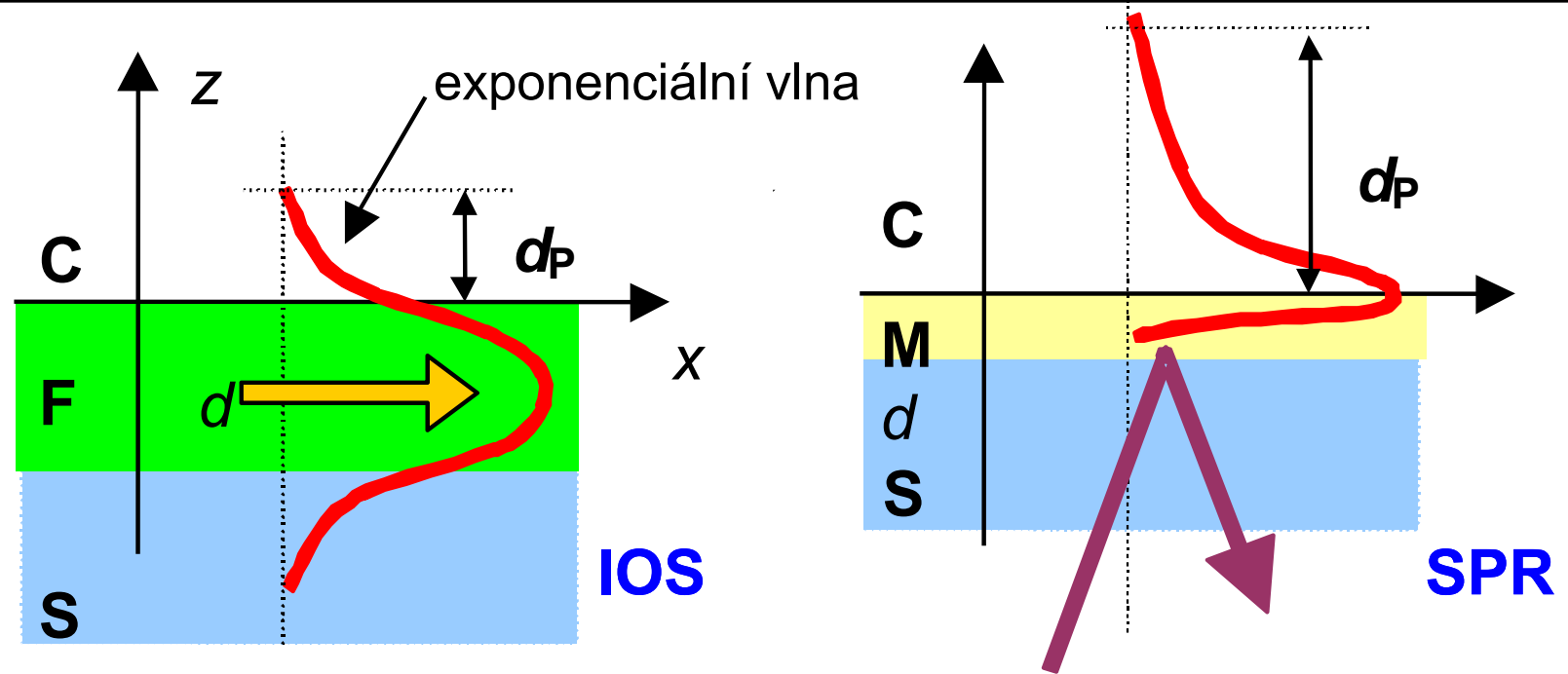


Exponenciální vlna

- 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.

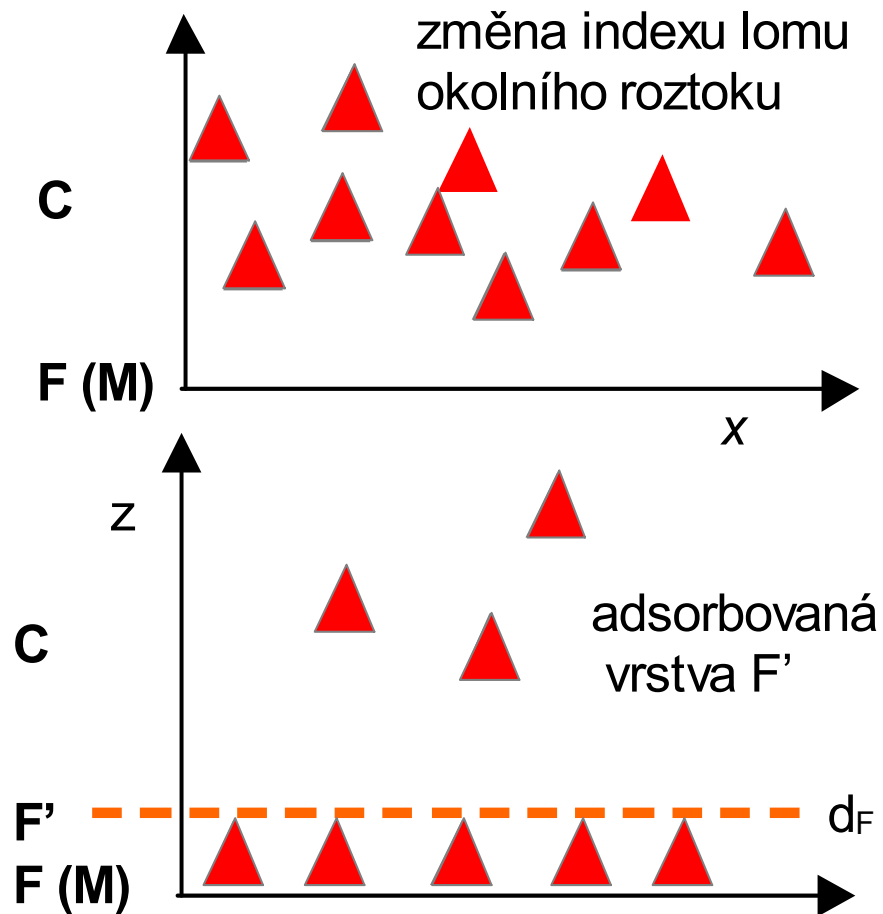


Fyzikální charakteristiky IOS / SPR

System		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 $C \Delta n_C$ (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:

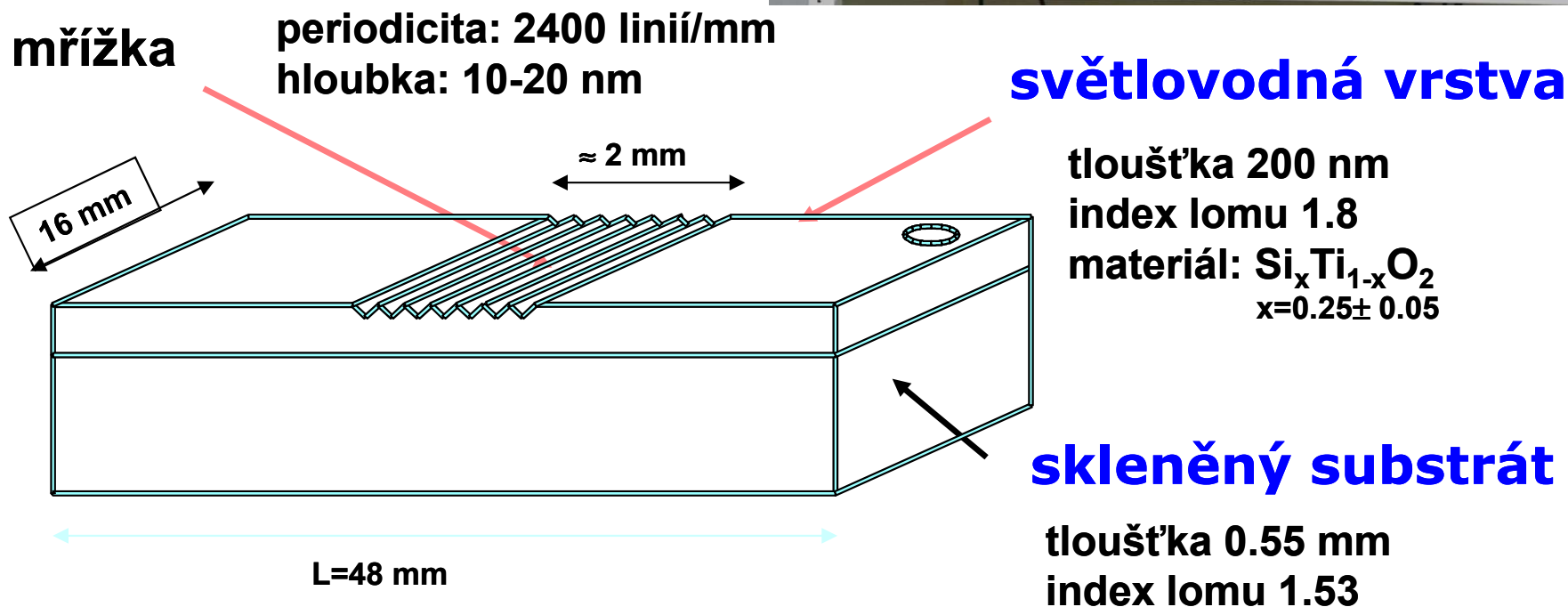
$$\Delta N = (\delta N / \delta n_C) \Delta n_C + (\delta N / \delta d_{F'}) \Delta d_{F'}$$

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





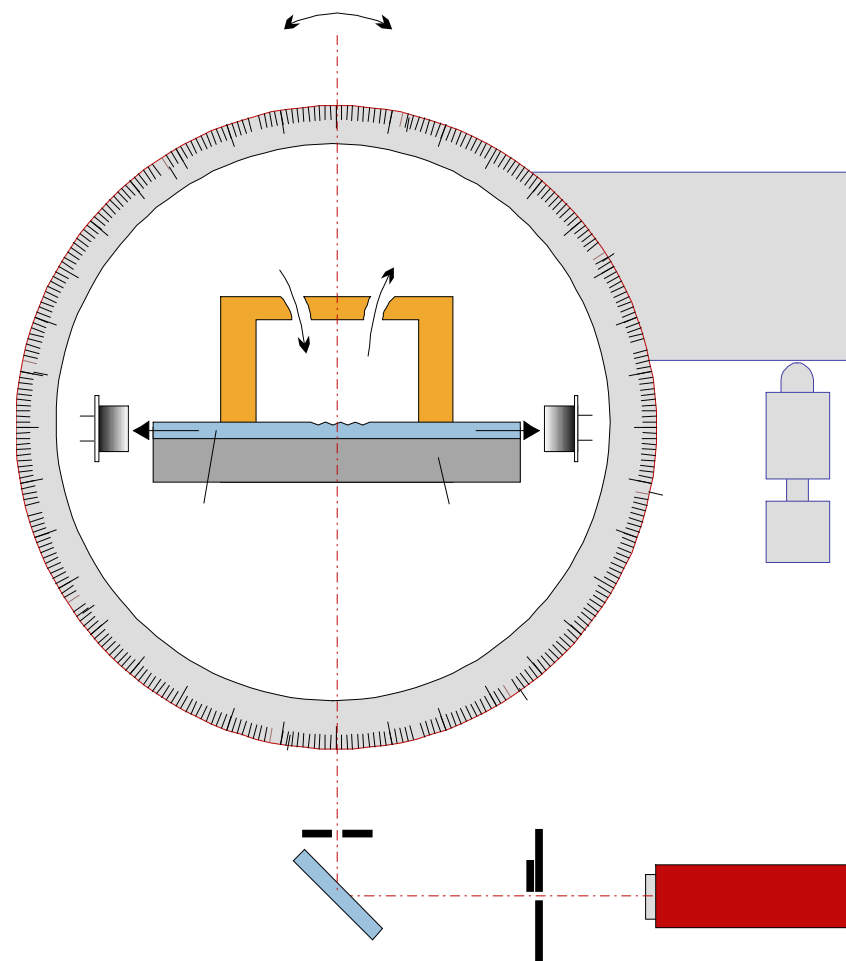
OW 2400 optical grating coupler waveguide sensor



- v současnosti vyrábí MicroVacuum v Maďarsku (OWLS)



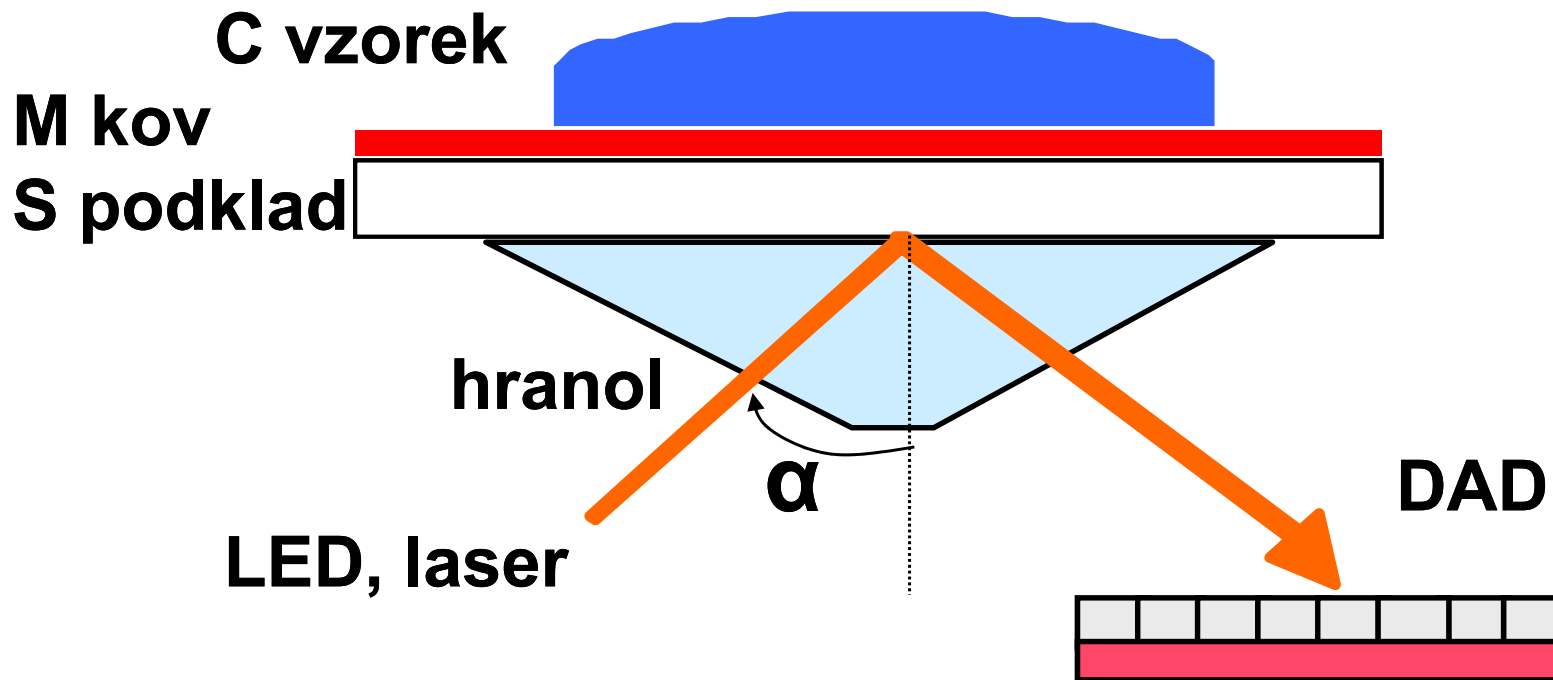
OWLS



**otočný stolec pro nalezení
optimálního pracovního úhlu**



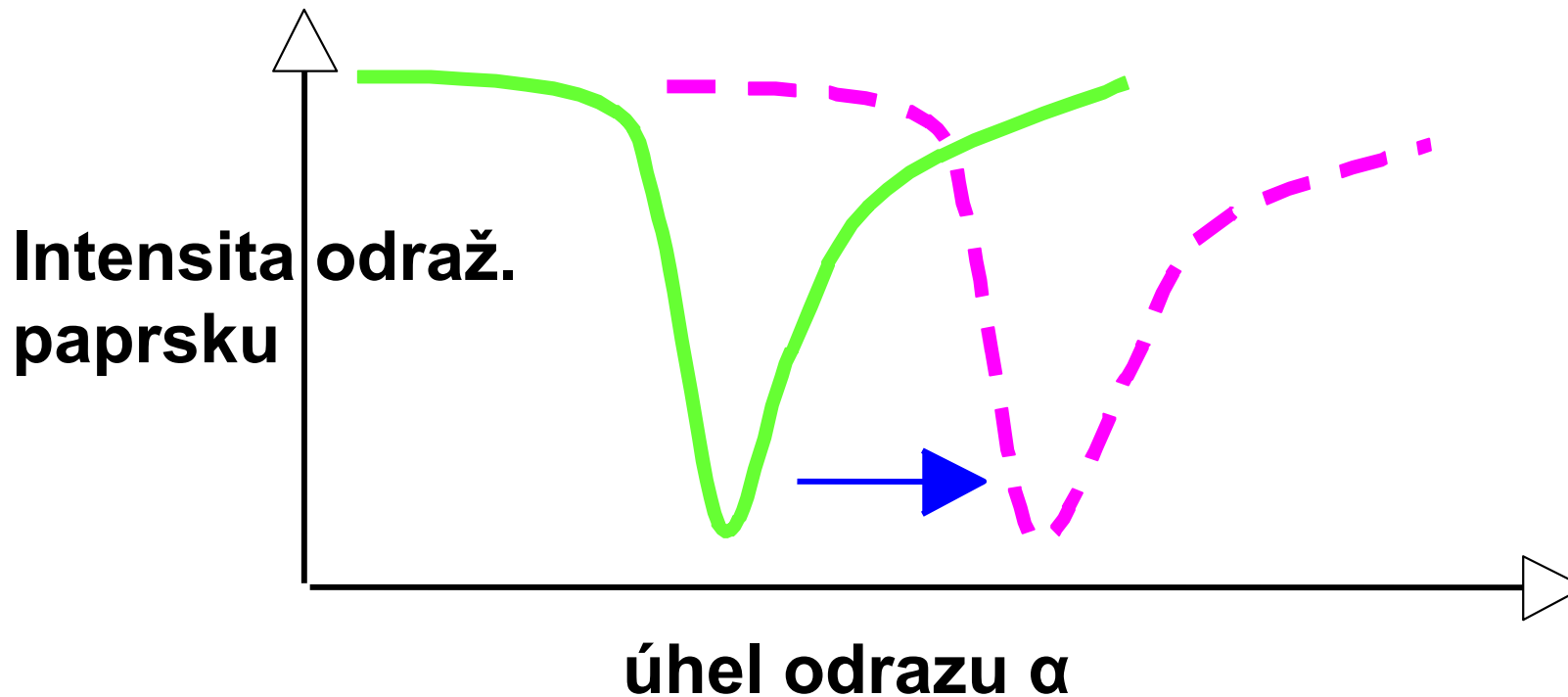
SPR



- 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 intensity pomocí detektoru diodové pole („diode array“)



SPR signál



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

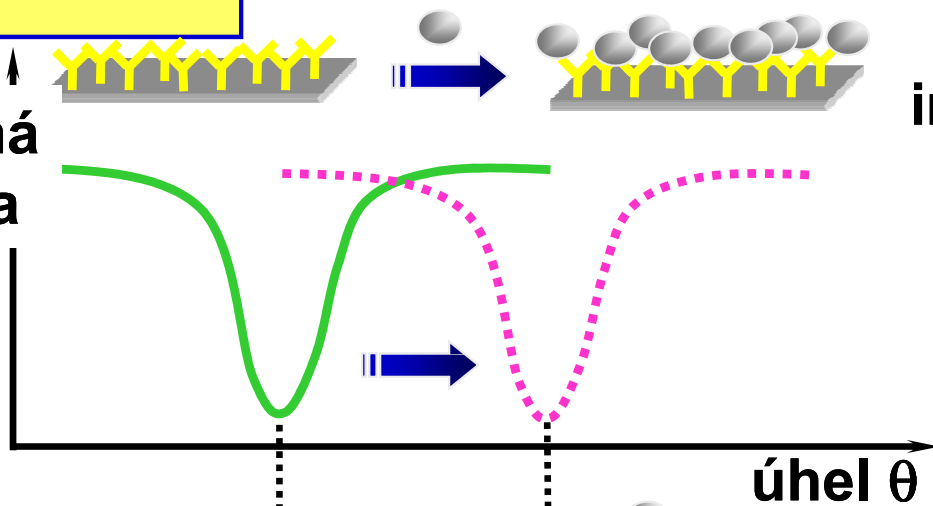


SPR

odražená
intenzita

antigen

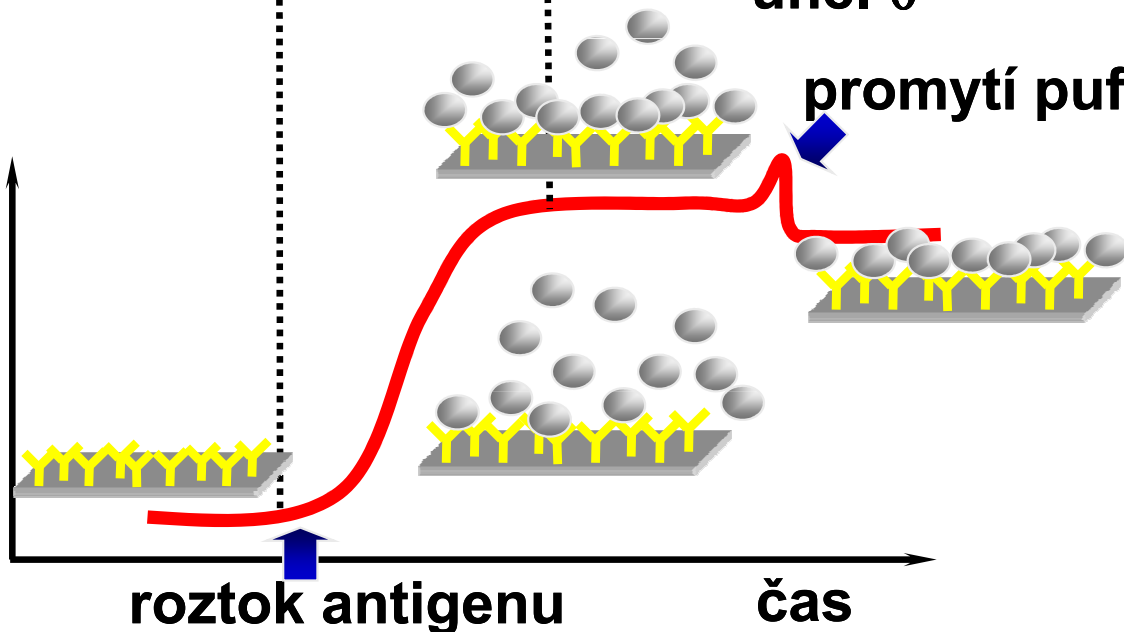
imobilizovaná protilátka



úhel θ

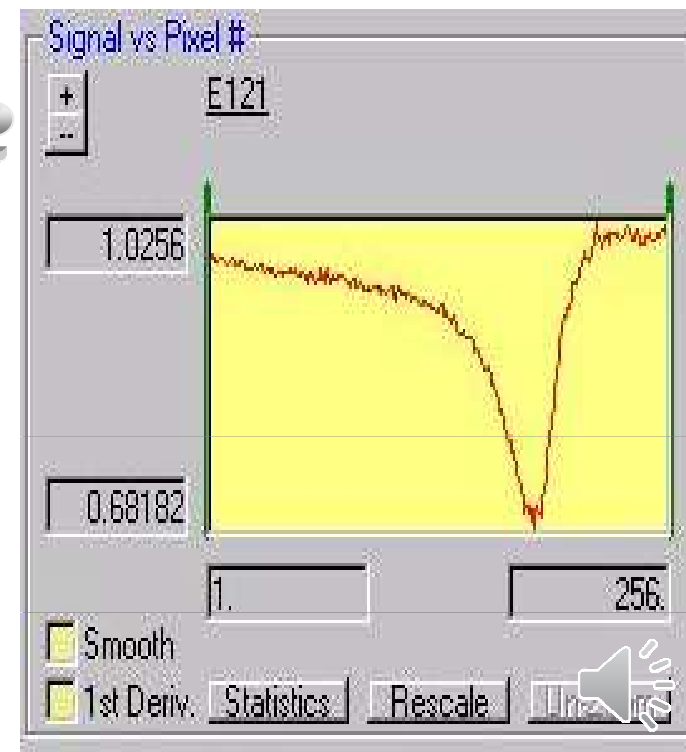
SPR
úhel

promytí pufrům



roztok antigenu

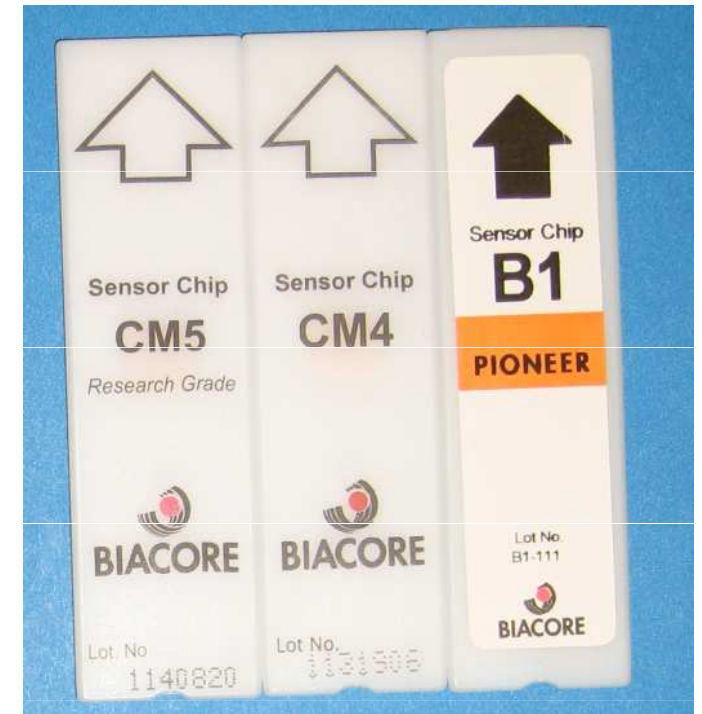
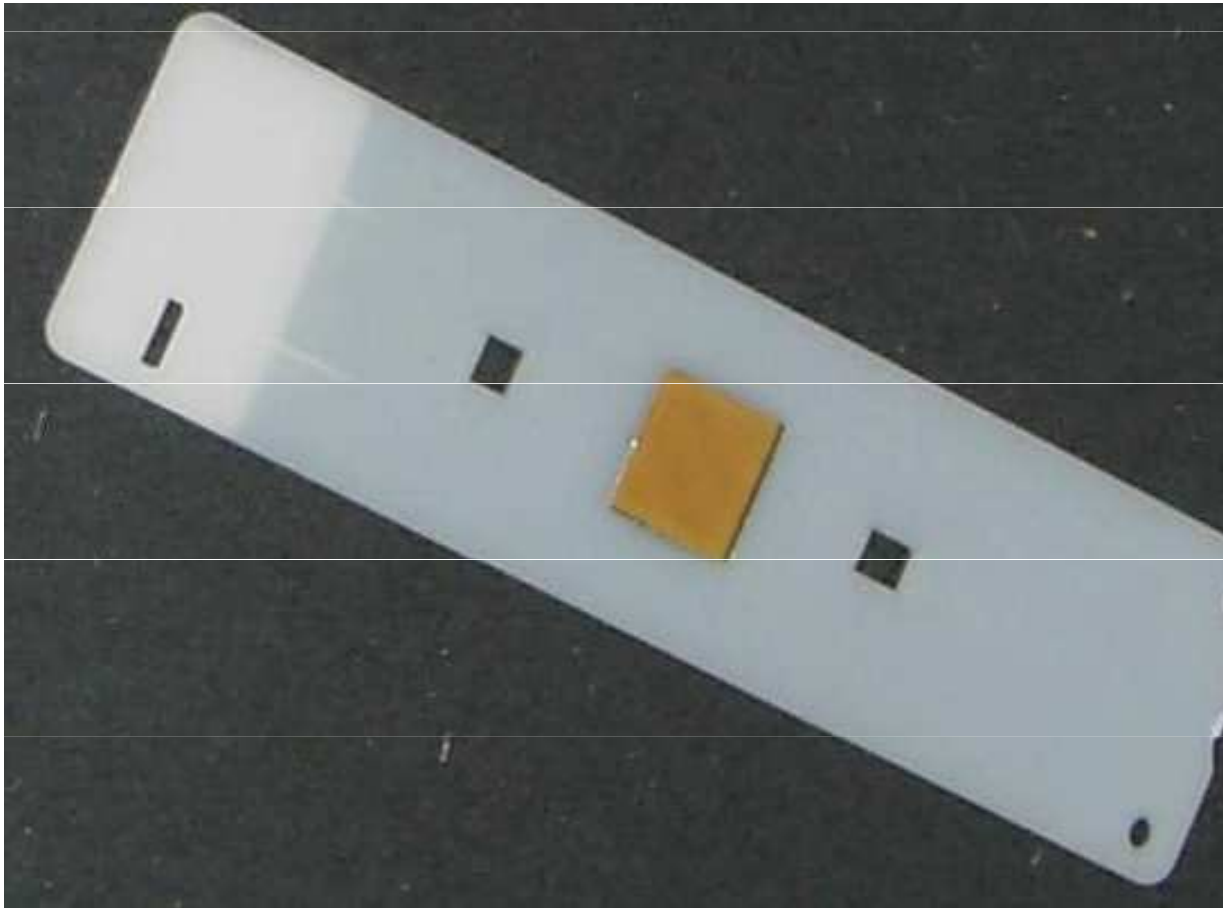
čas



- 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



2000



3000

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

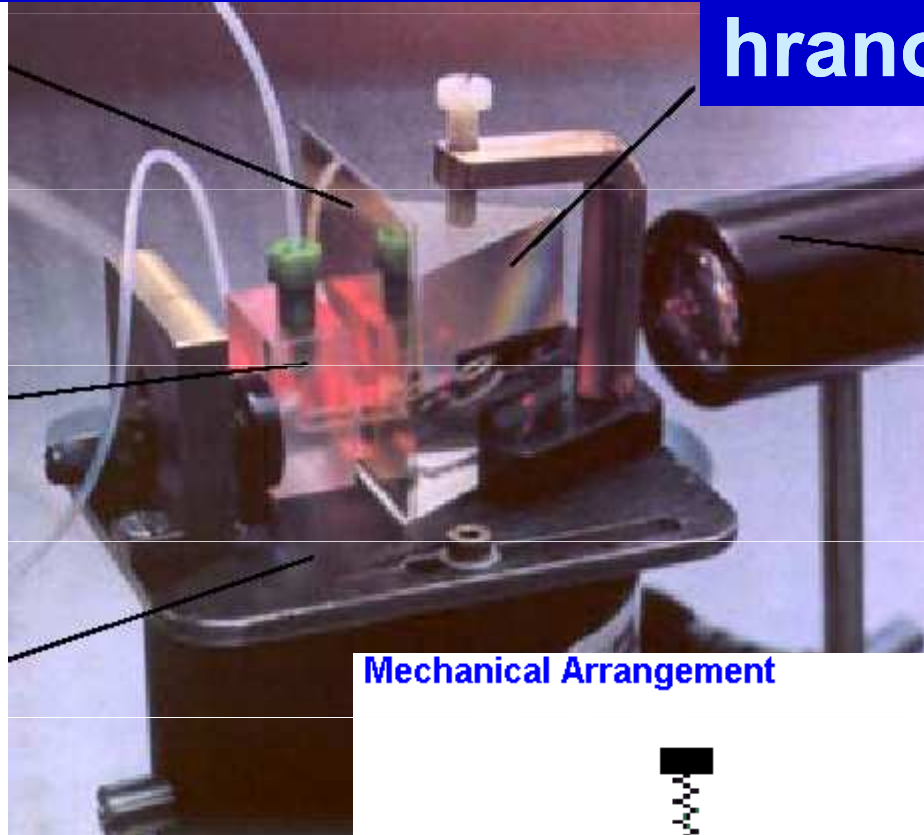


SPR-4 systém z Kijeve

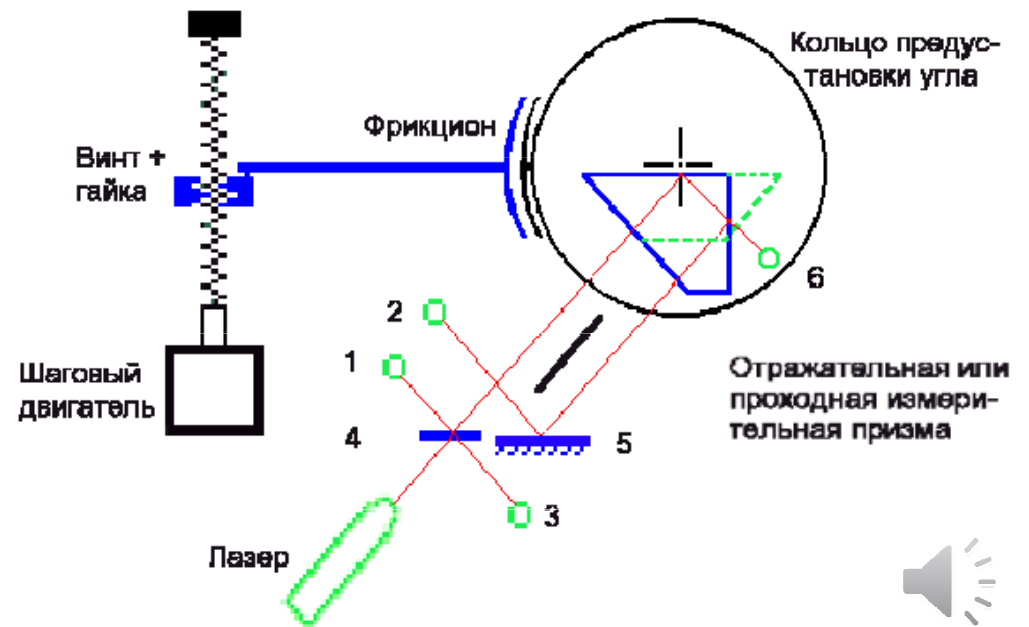
pozlacené
sklíčko

průtočná
cela

rotující
stolek

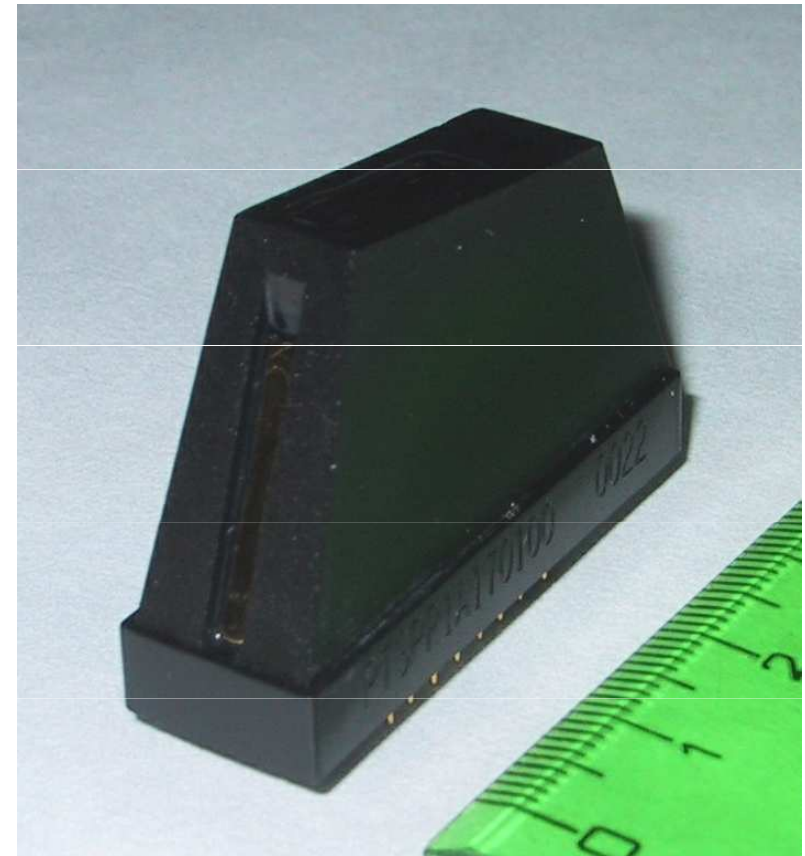
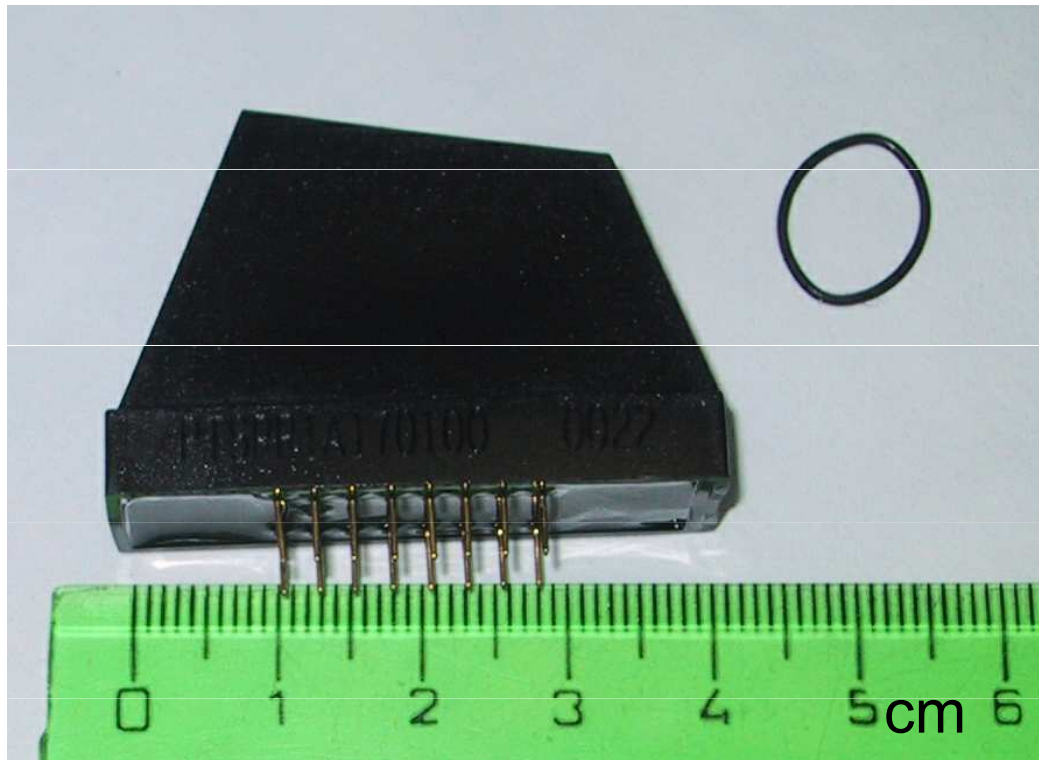


Mechanical Arrangement

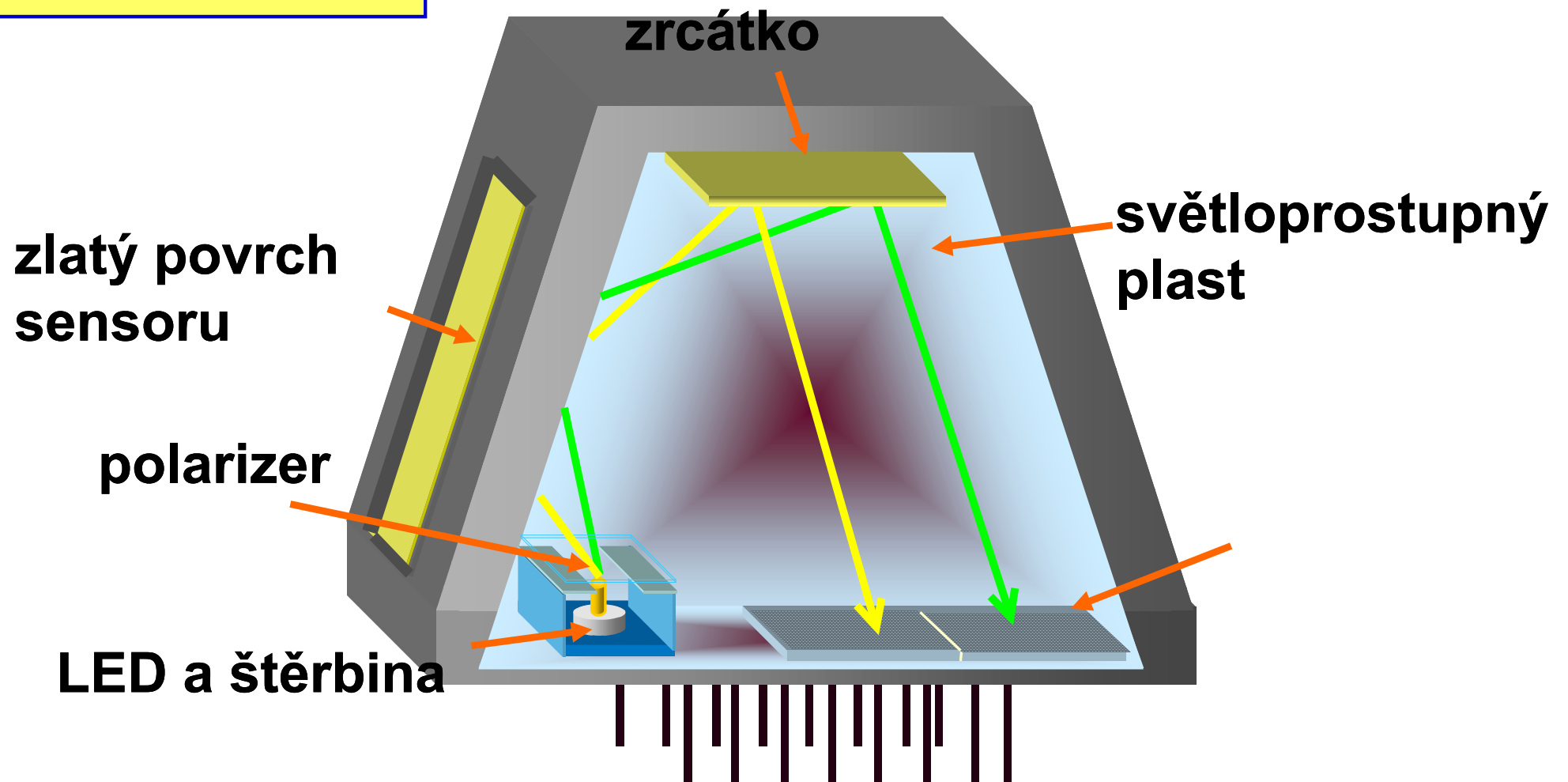


Spreeta

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



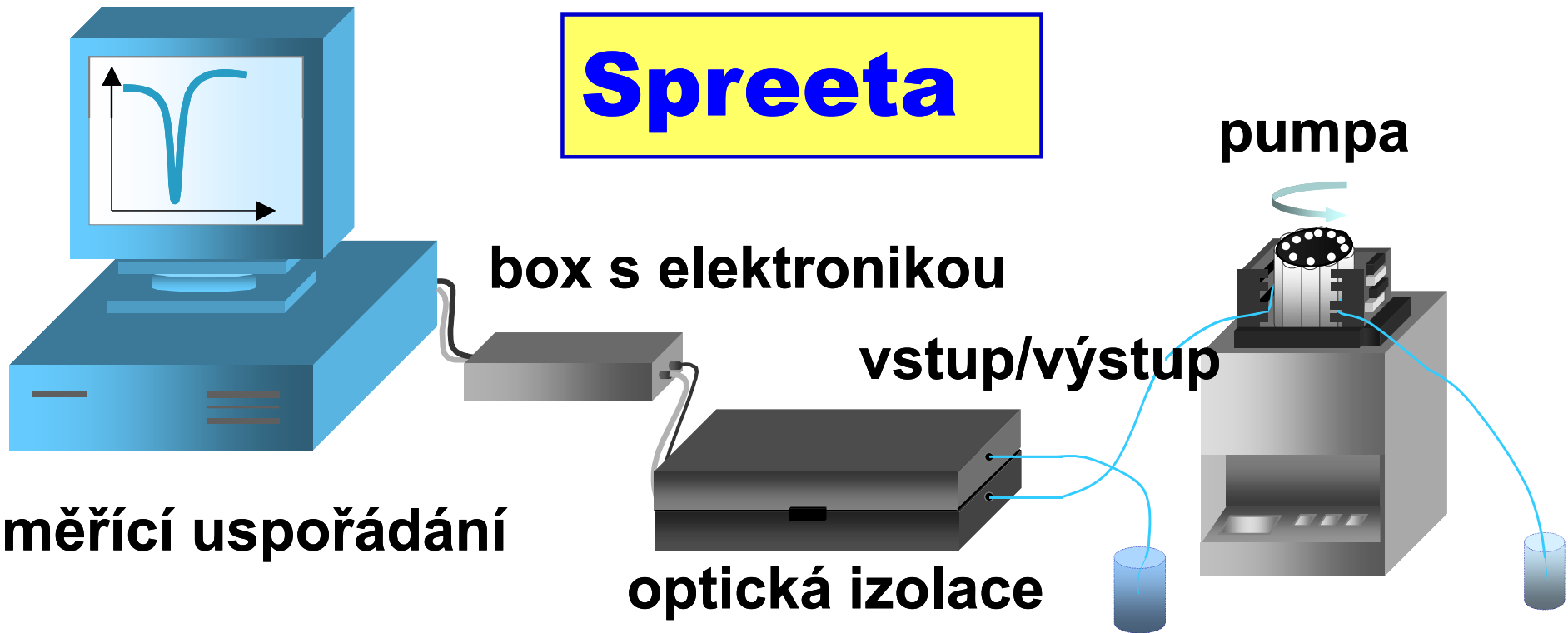
Spreeta



- schéma uspořádání (původní verze)



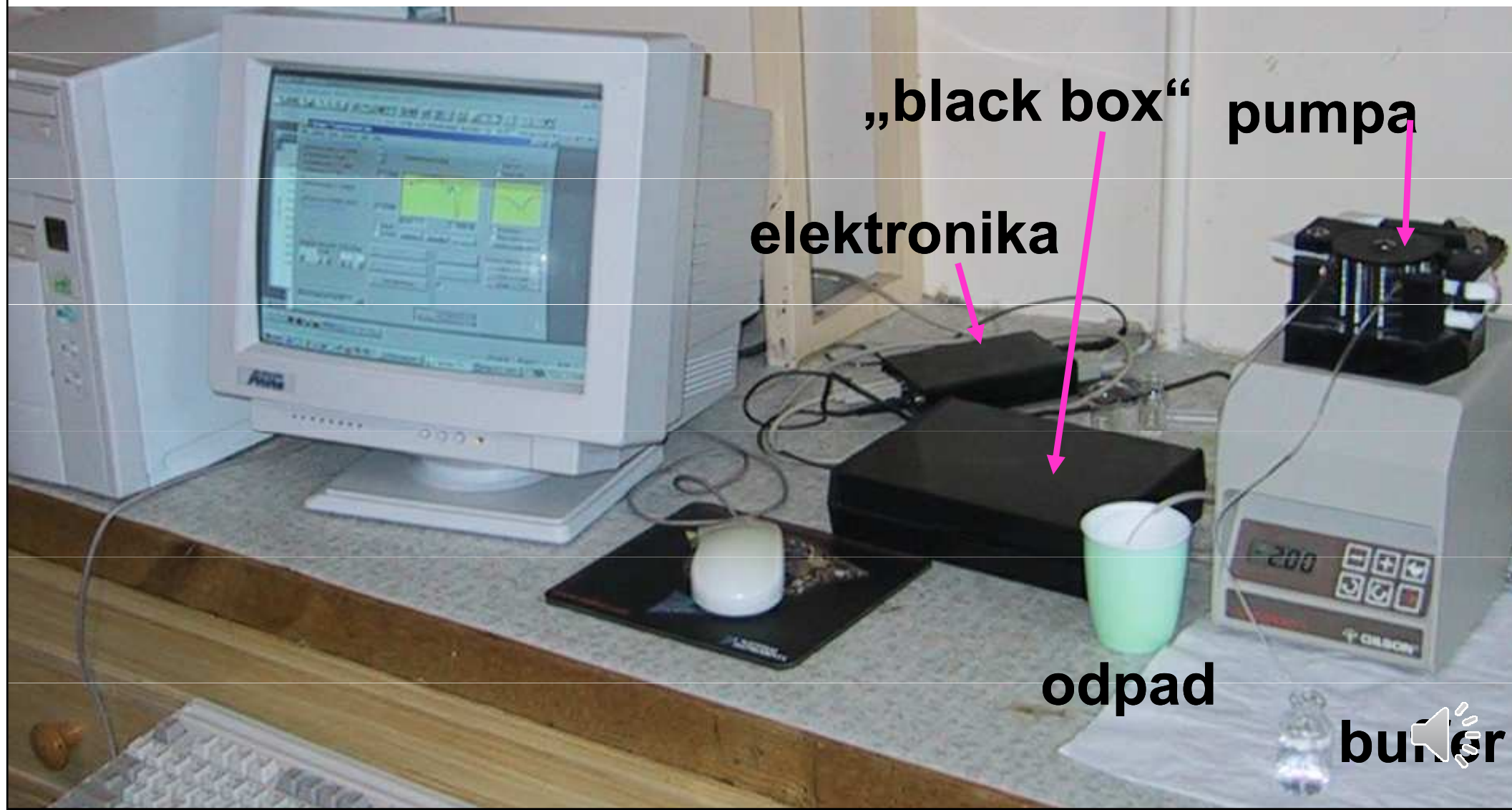
Spreeta



- měřící uspořádání

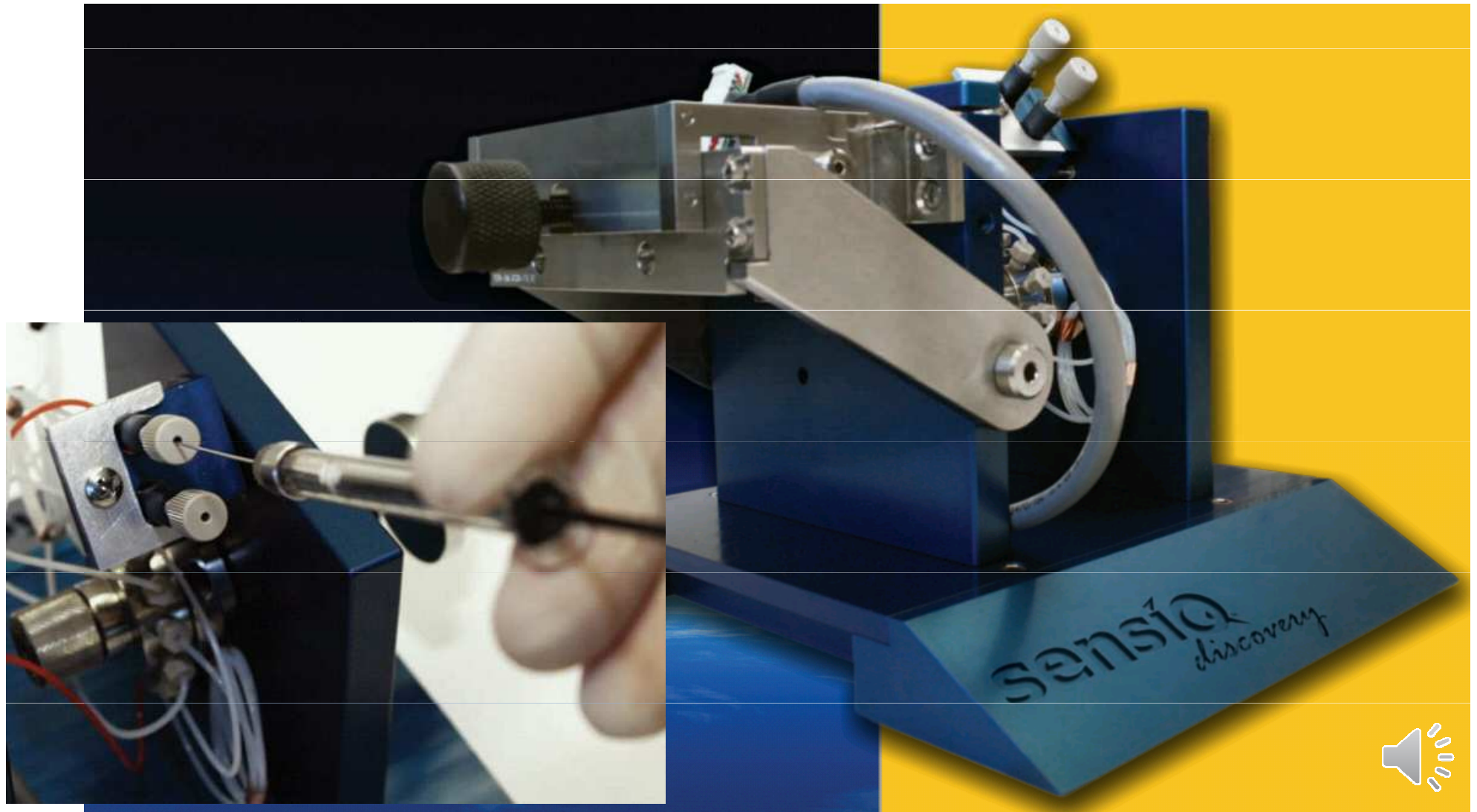


Spreeta



SensiQ: Discovery

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

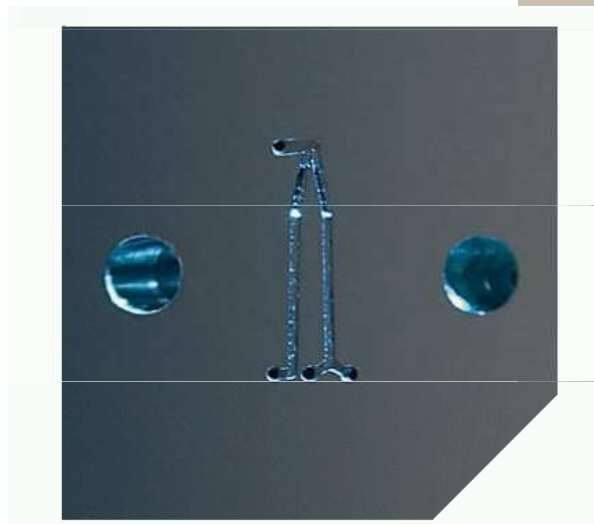


SensiQ

sensor
Spreeta 2000



- 2-kan. mikrofluidní cela
- šum 0.25 RU



SensiQ



SensiQ Pioneer

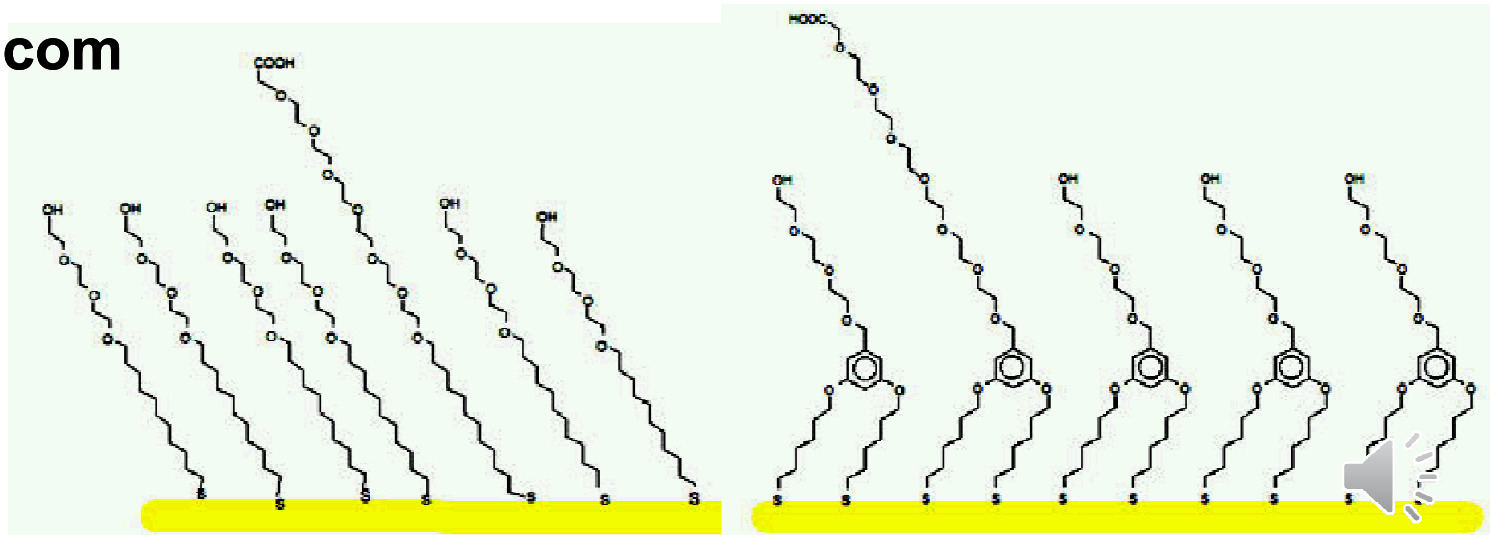
- automatizovaná verze
- 3-kan. cela
- možnost gradientového a duálního nástřiku
- šum 0.1 RU



Reichert: SR7000 a SR700DC



- ruční jednokanálový a automatizovaný 2-kanálový SPR
- modulární design, průtočná a statická cela
 - možnost recirkulace vzorku - nastříkne 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

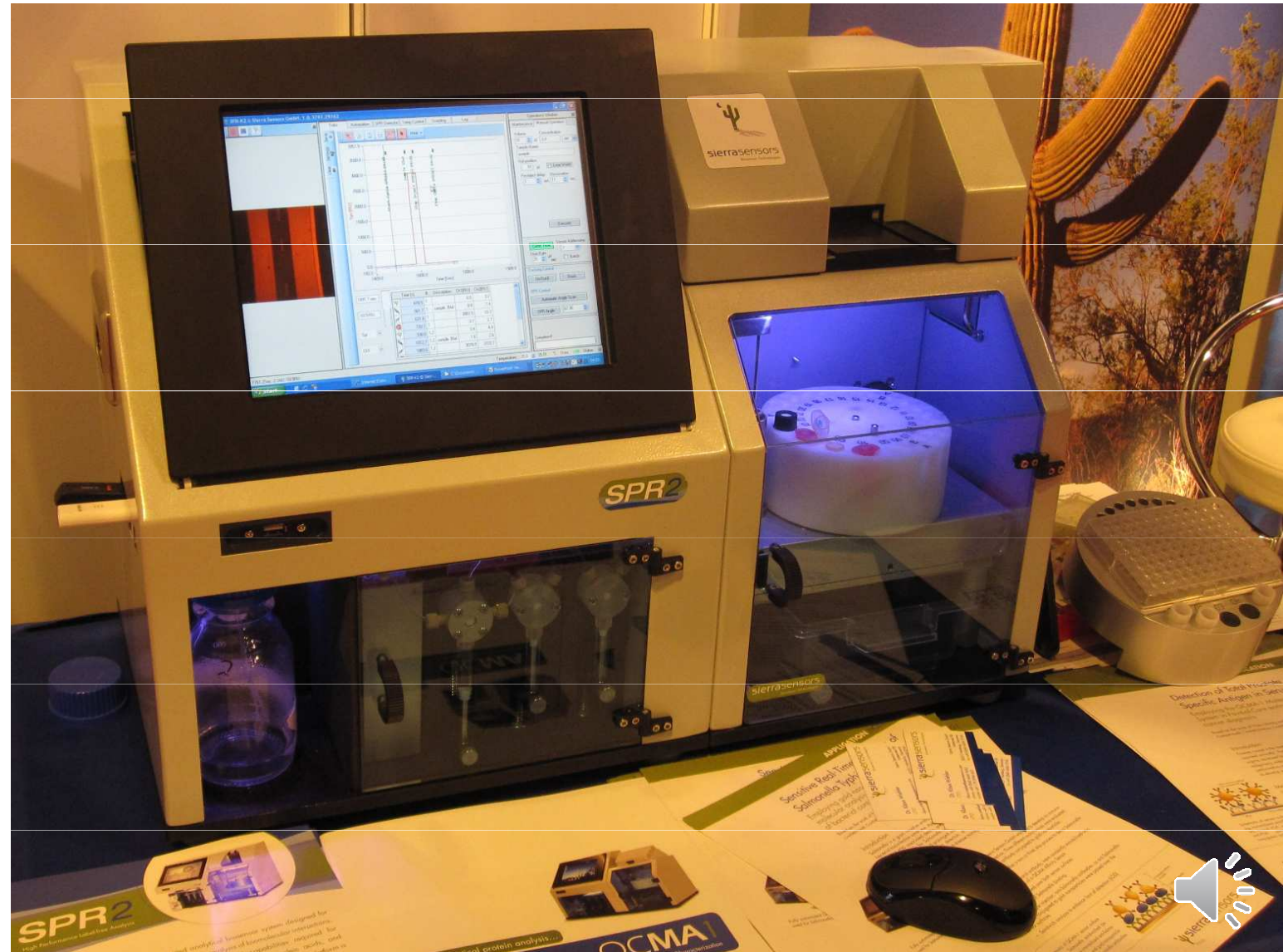


Reichert: SR700DC



Sierra Sensors: SPR2

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



Sensia: betaSPR

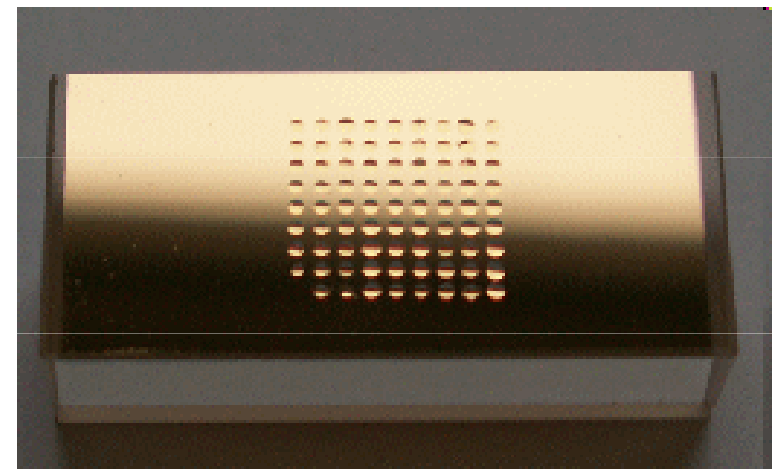
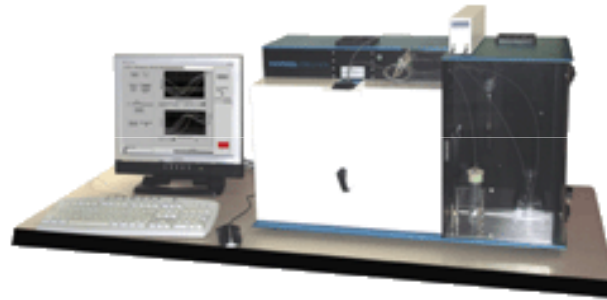


BioRad: ProteOn XPR 36

- 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) měr. 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)**

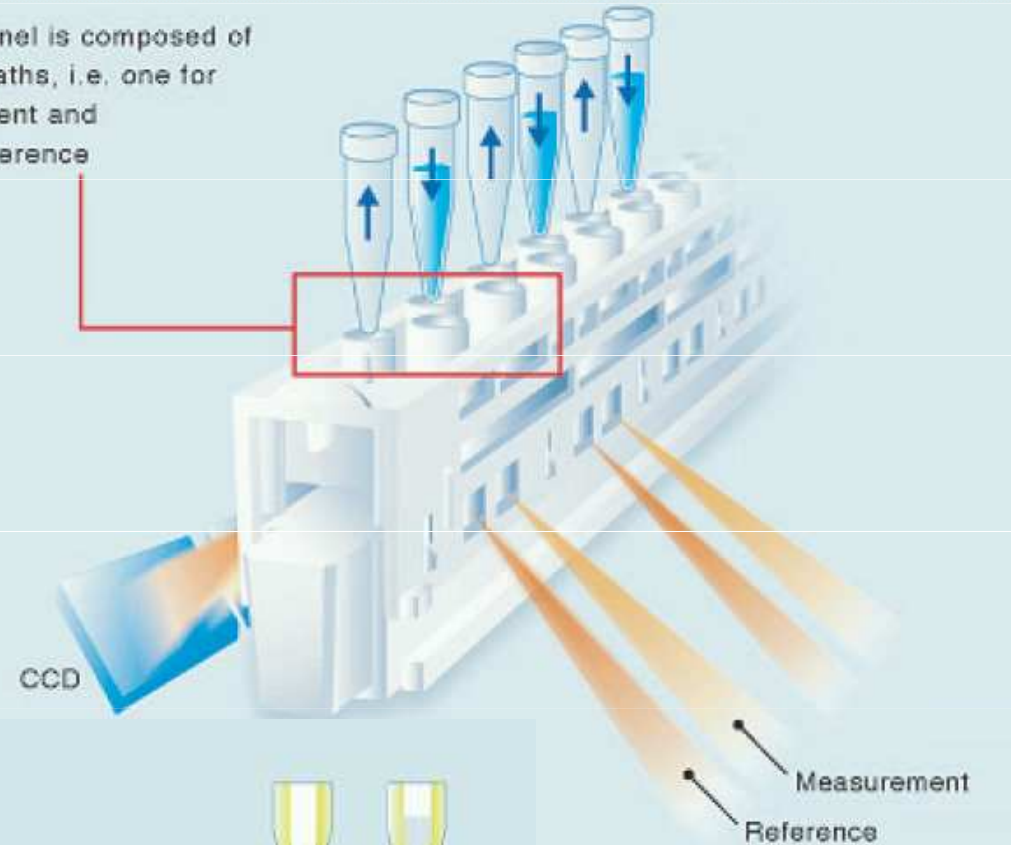
- **výhoda: vysoce paralelní měření**
- **nutnost zvládnout cílenou imobilizaci bioligandů**



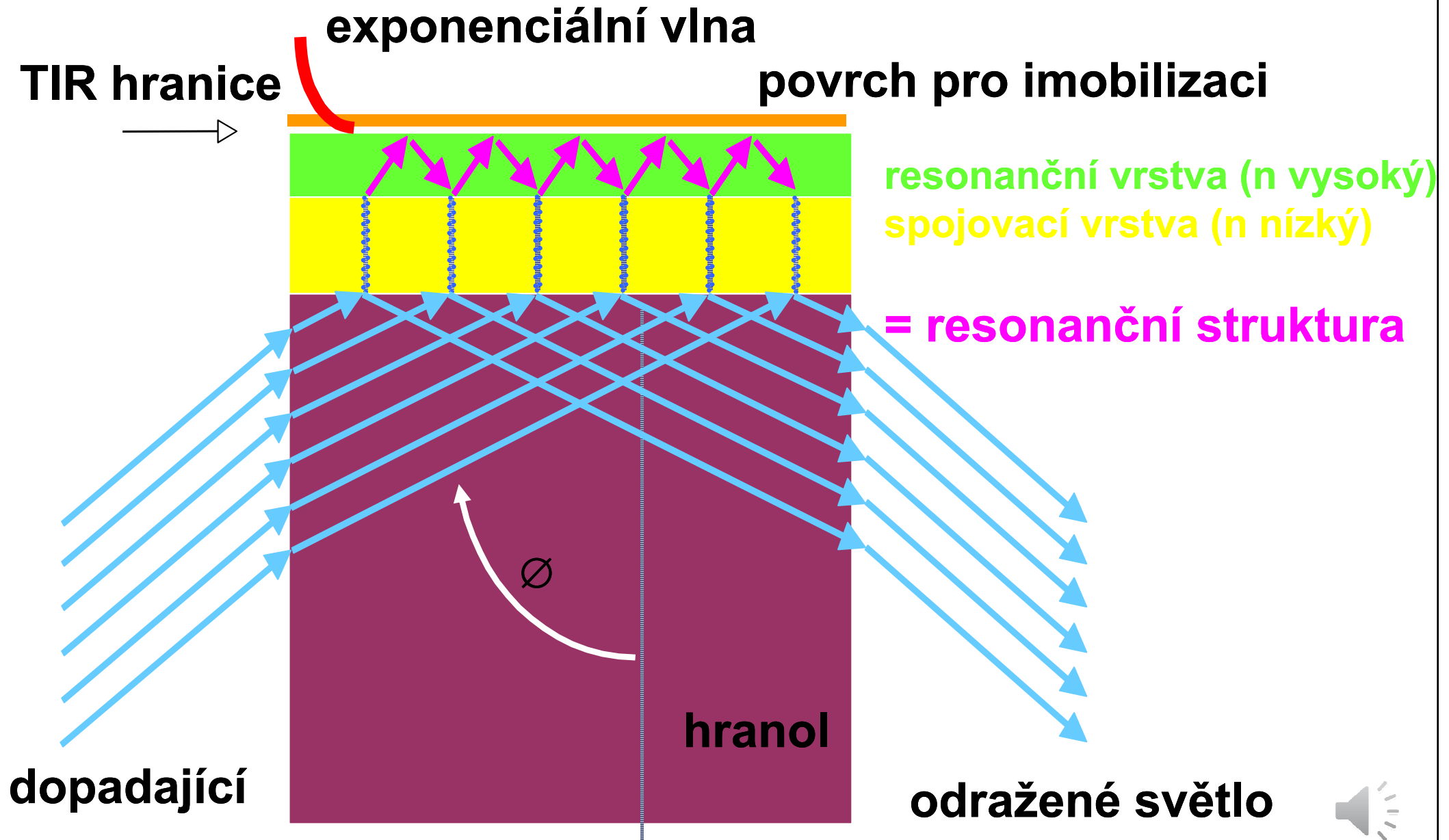
FujiFilm: AP-3000

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

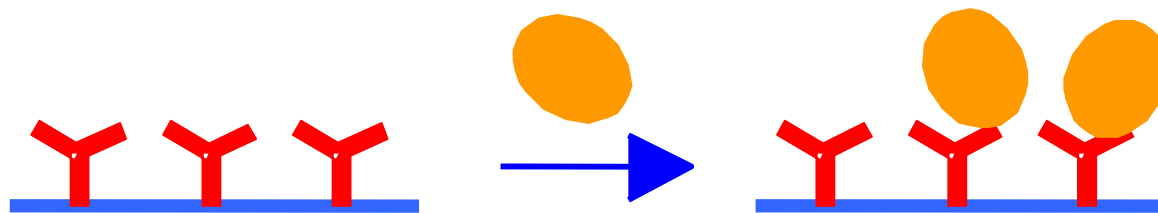
Each channel is composed of two flow paths, i.e. one for measurement and one for reference



Resonanční zrcátko - IAsys



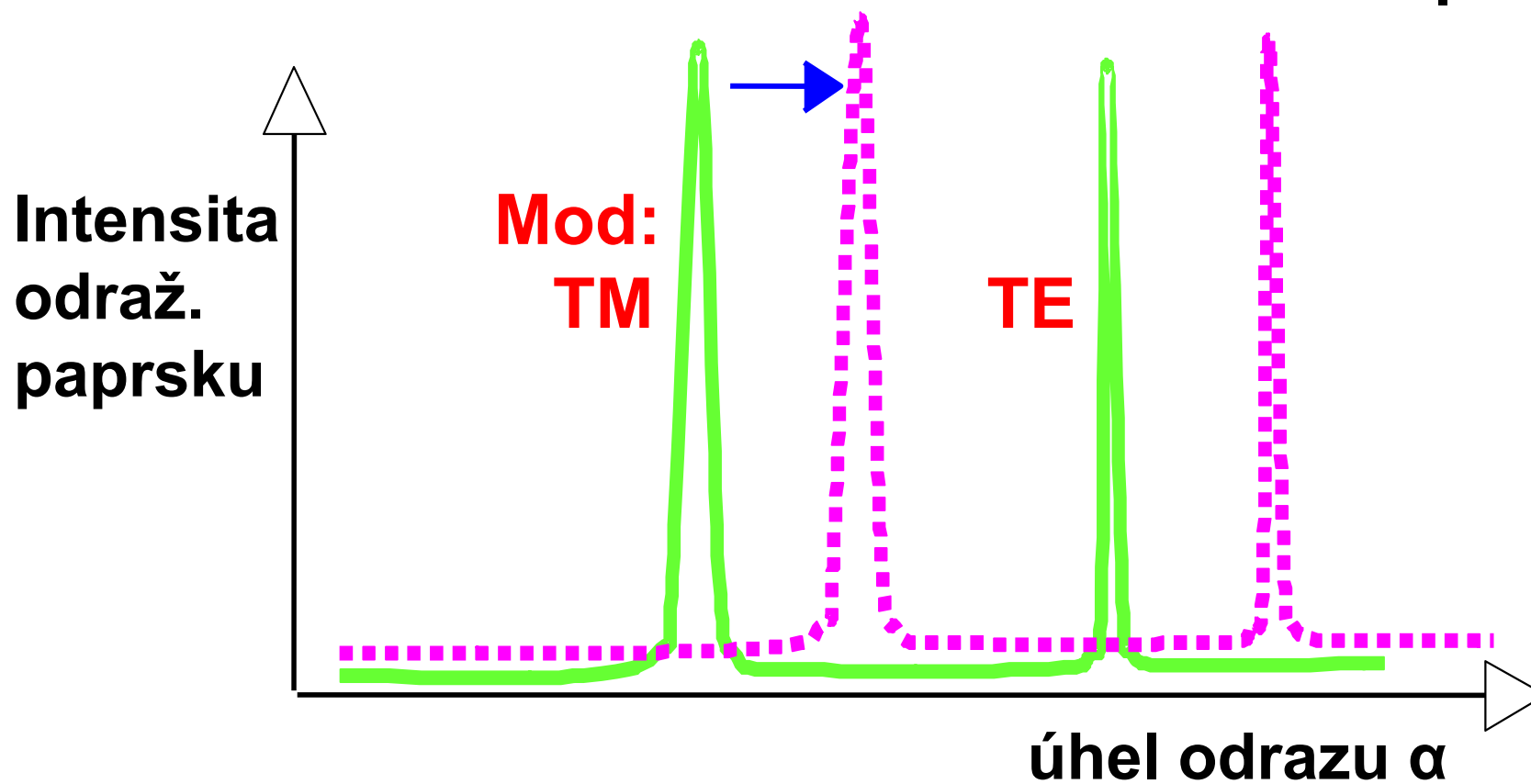
Resonanční zrcátko - signál



Vazebná reakce

=>

změna rezonančních podmínek

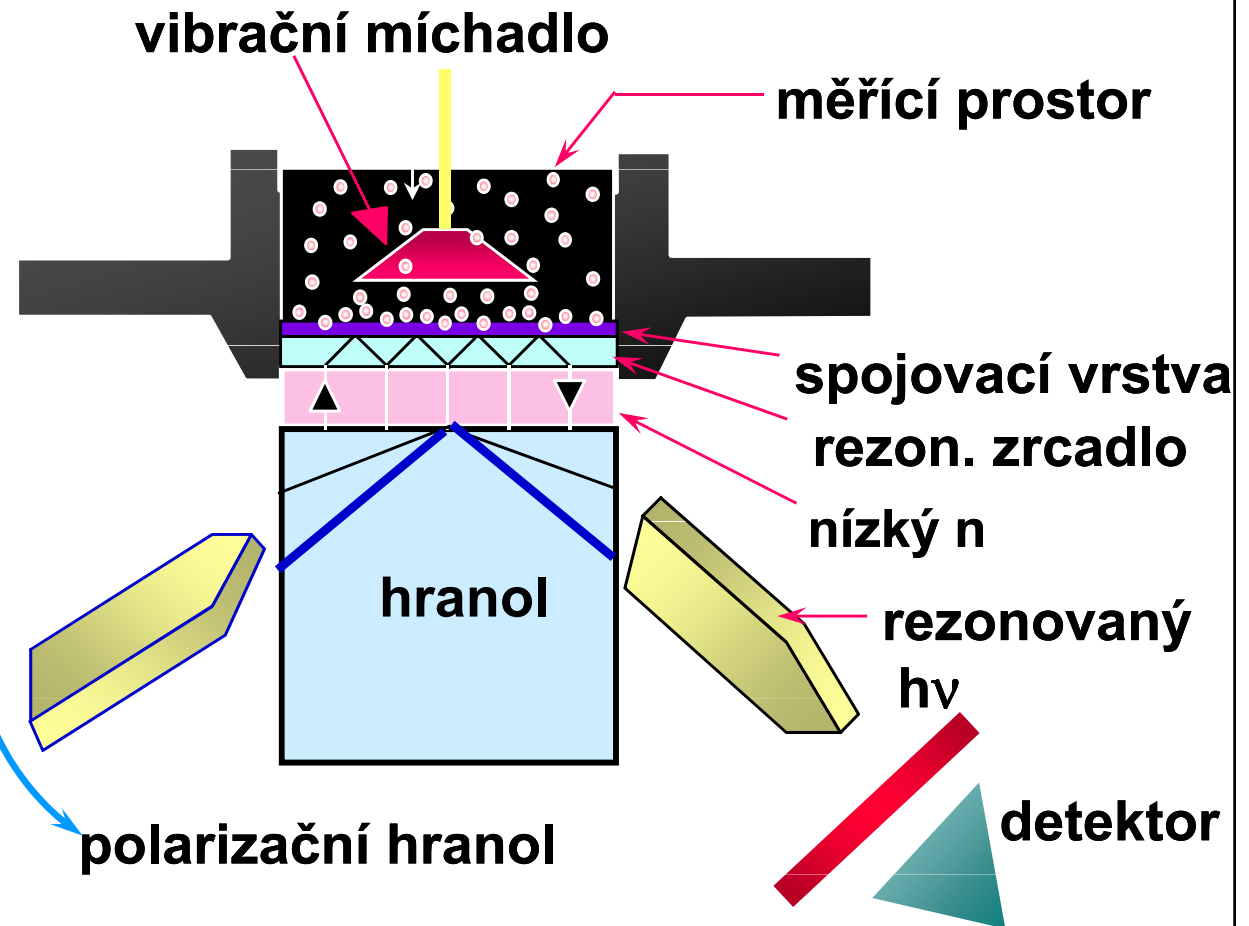


- rezonanční úhel odpovídající maximu intensity odraženého paprsku (el. a magn. složky) je průběžně sledován, jeho poloha je úměrná změnám povrchové hmotnosti



Resonanční zrcátko - sensor

výměnná měřicí kyveta systému IAsys



Rozměry
5 x 2 x 3 cm

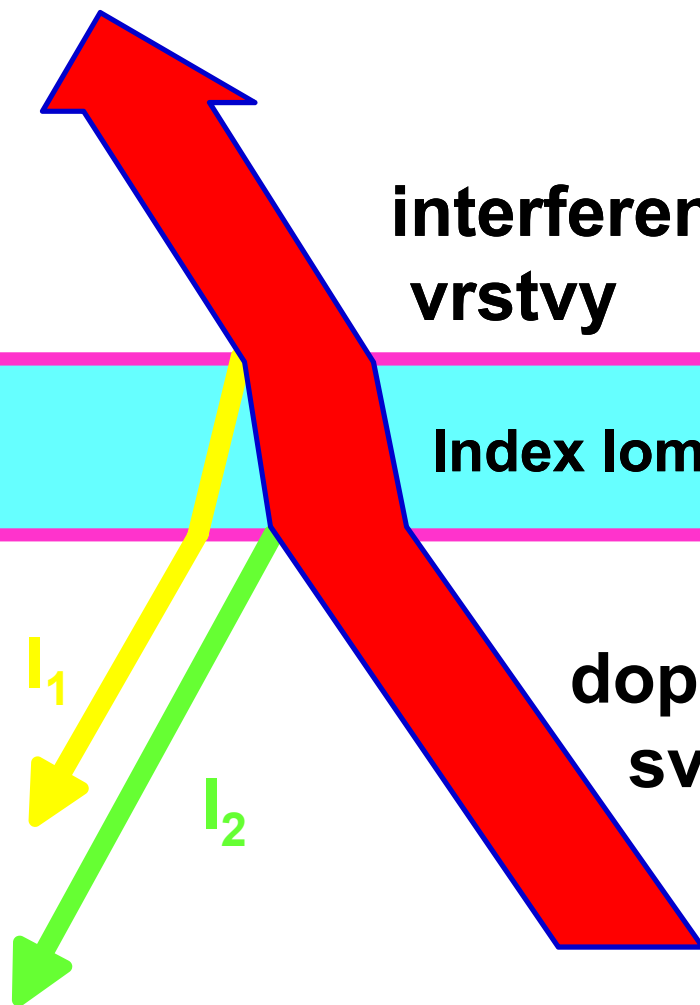
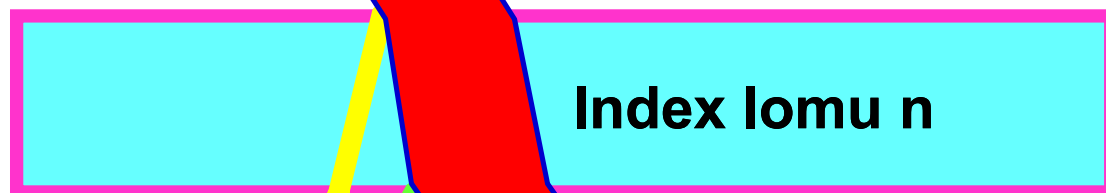
Citlivé povrchy:
aminosilanizovaný, karboxylovaný, karboxymethyl-dextranový,
hydrofobní, biotinylovaný



RIFS - reflektometrická interferenční spektroskopie

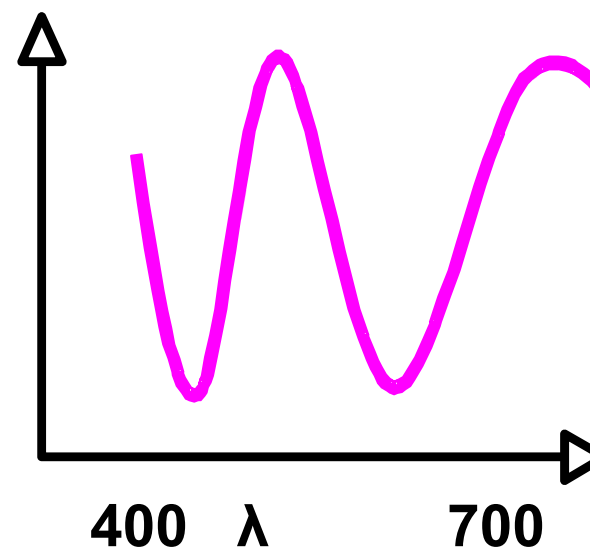
reflekční spektrum mění tvar po navázání biomolekul

interferenční vrstvy rozlišení změny tloušťky 1 pm



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

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 Flexchip – Array-based parallel kinetic profiling	Biacore X100 – Ready-to-run research system	Biacore 3000 – Interaction analysis with SPR-MALDI interface	Biacore C – Rapid and reliable protein quantification
						

Application

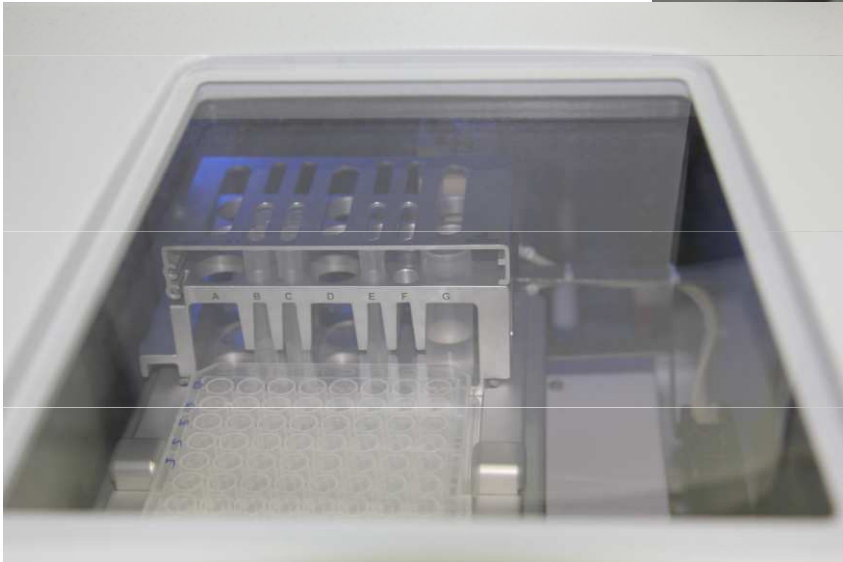
Kinetic/affinity characterization	● ● ●	● ● ●	●	● ● ●	● ●	-
Kinetic/affinity screening and profiling	● ●	● ● ●	● ● ●	●	● ●	-
Single cycle kinetics	Yes	-	Yes	Plus Package	-	-
Concentration measurement	● ●	● ●	-	● ● Plus Package	●	● ● ●
Calibration-free concentration analysis	Yes	-	-	-	-	-
LMW interaction analysis	● ● ●	● ● ●	-	●	●	-
Thermodynamic characterization	● ● ●	●	-	● Plus Package	●	-
Sample recovery for MS	● ●	-	-	-	● ● ●	-

Performance and technical specifications

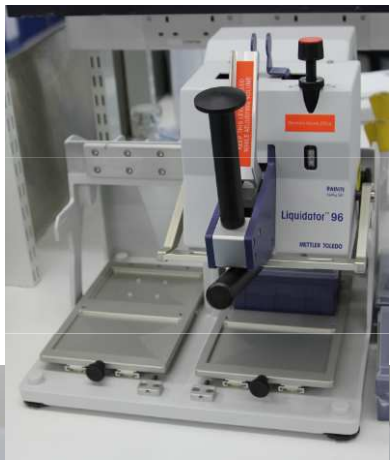
Detection spots/sensor surface	4	20	400	2	4	4
Throughput	● ●	● ● ●	● ● ●	●	● ● ●	●
Unattended run capacity	● ●	● ● ●	●	●	● ●	● ●
Automated data evaluation	● ●	● ● ●	● ●	● ●	●	● ● ●
User guidance	● ●	● ●	● ●	● ● ●	● ●	● ●
Cooled sample storage	● ● ●	● ● ●	-	-	● ●	● ●
Analysis temperature (°C)	4-45 (In-line degasser)	4-40 (In-line degasser)	20-37 (In-line degasser)	25 4-40 with Plus Package, (Including In-line degasser)	4-40	25
GxP compliance support	GxP Package	GxP Package	-	-	GxP Package	Yes



T100



4000



BIACORE



2000



3000

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



BIAcCore - automatizace

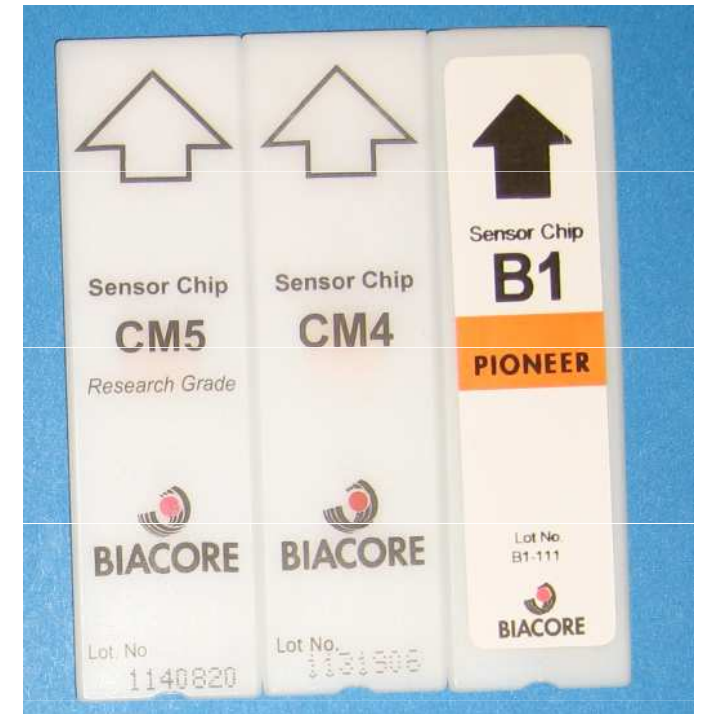
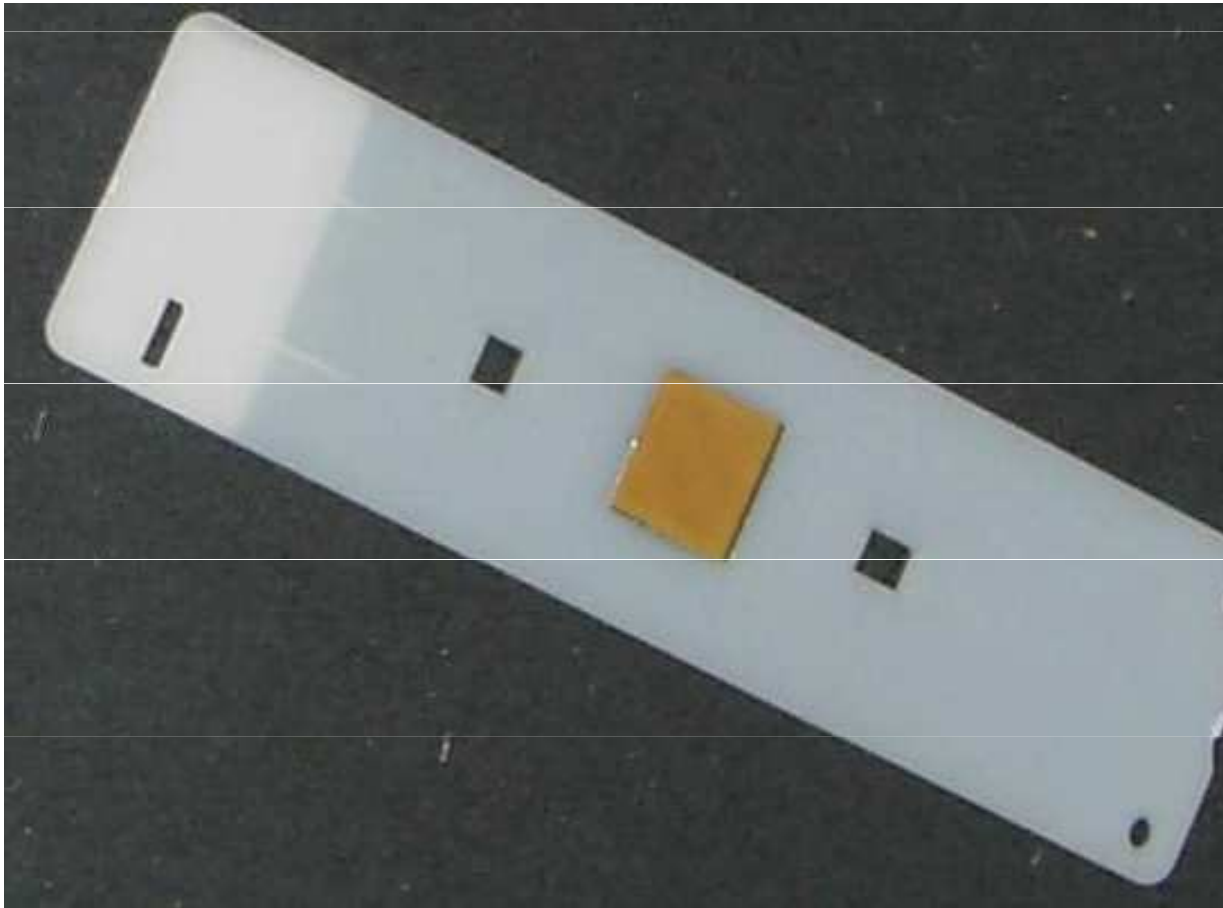


- dávkovač vzorků s pozicemi pro zásobníky



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, ...**



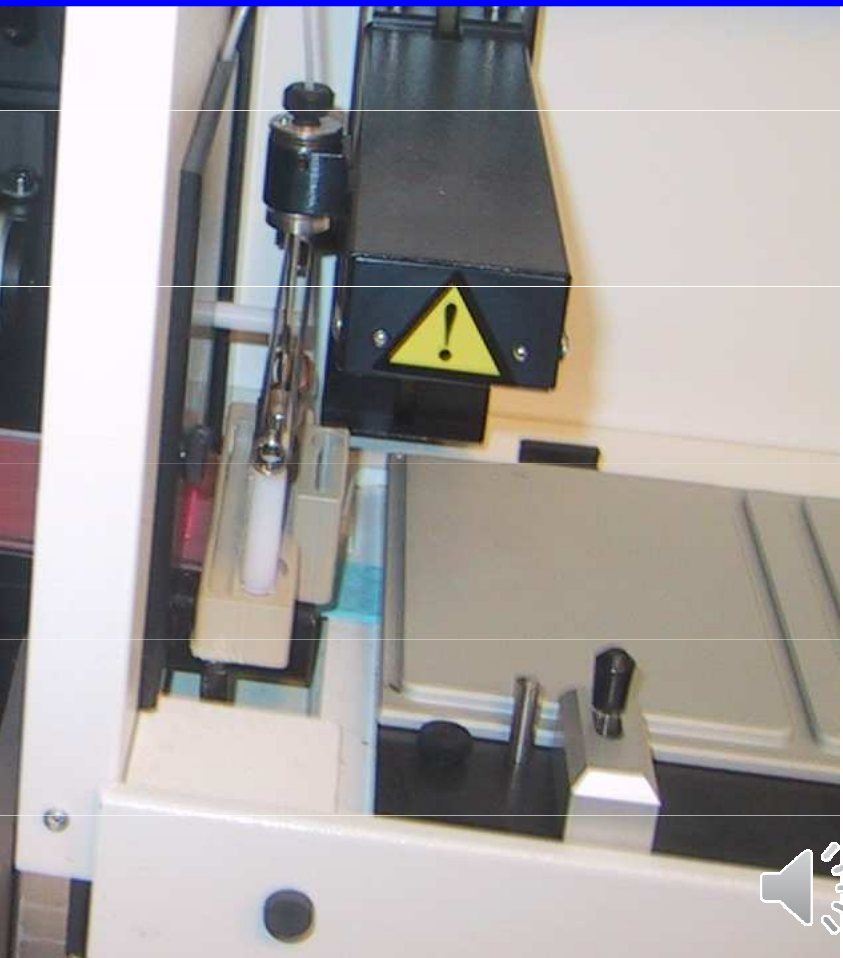
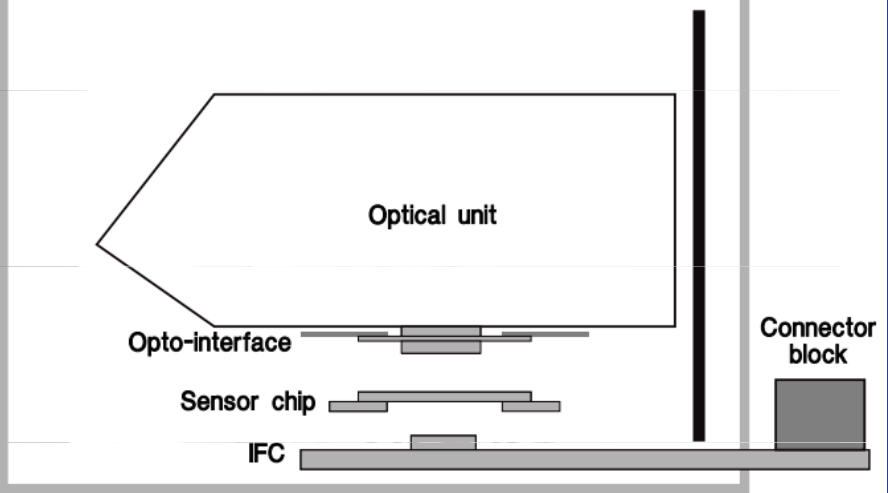
Zasunutí čipu



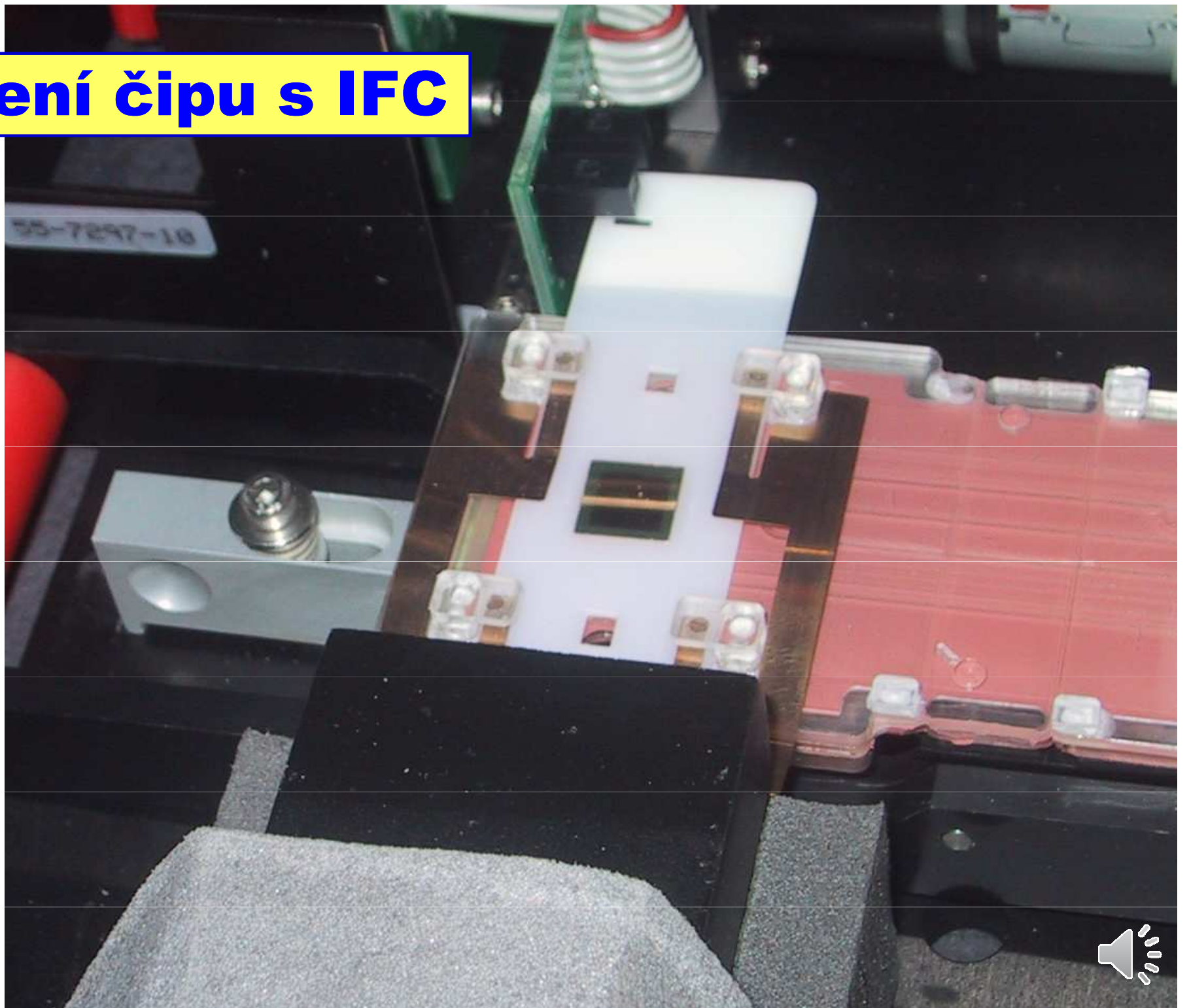
Pohled dovnitř



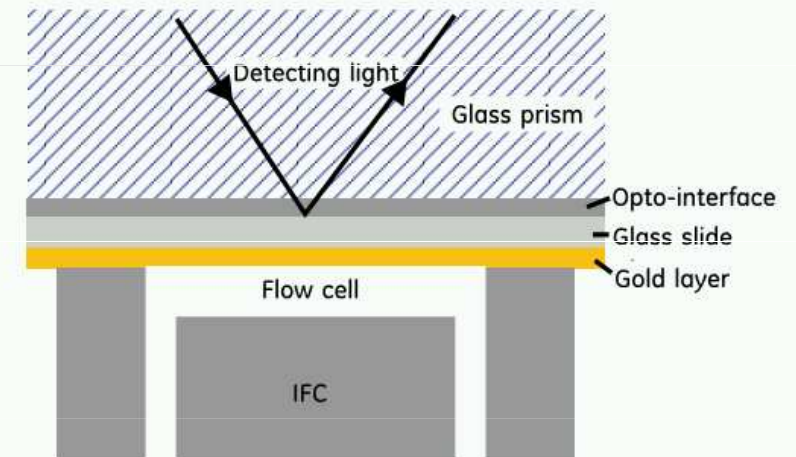
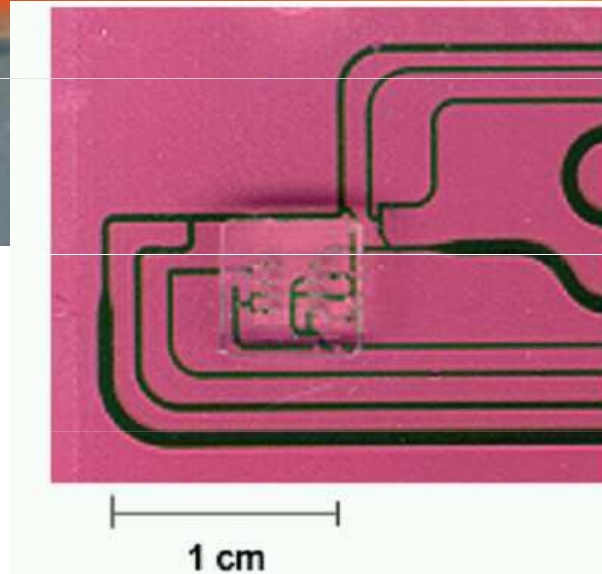
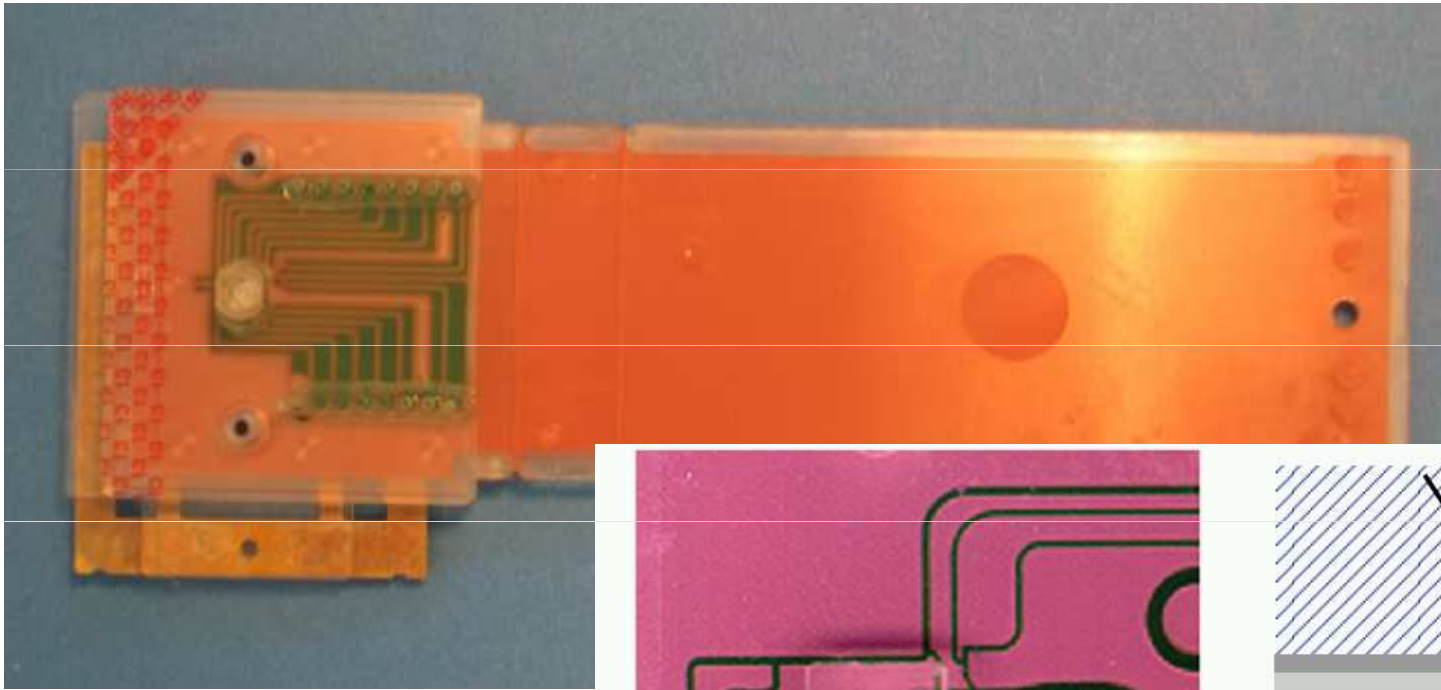
Thermally insulated box



Spojení čipu s IFC



BIACore - průtočný systém

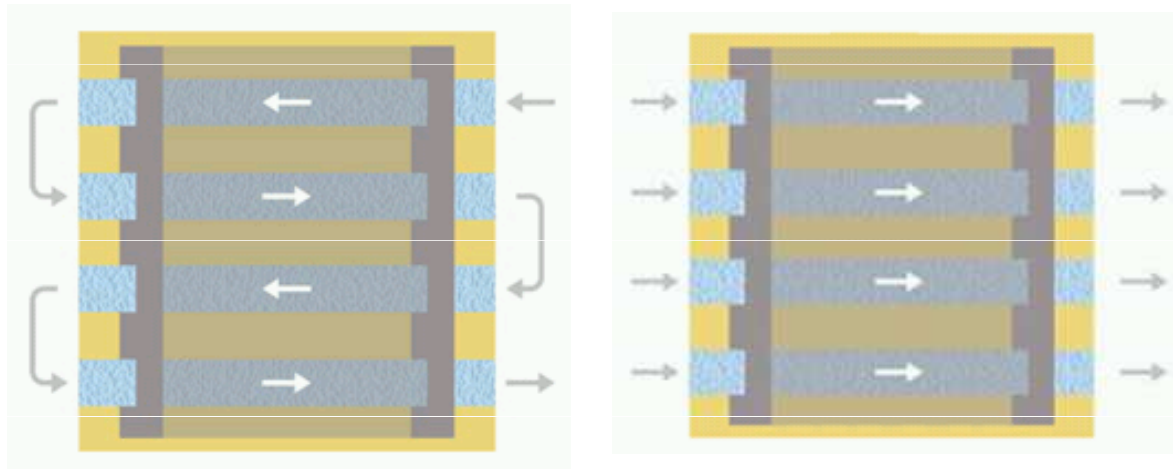
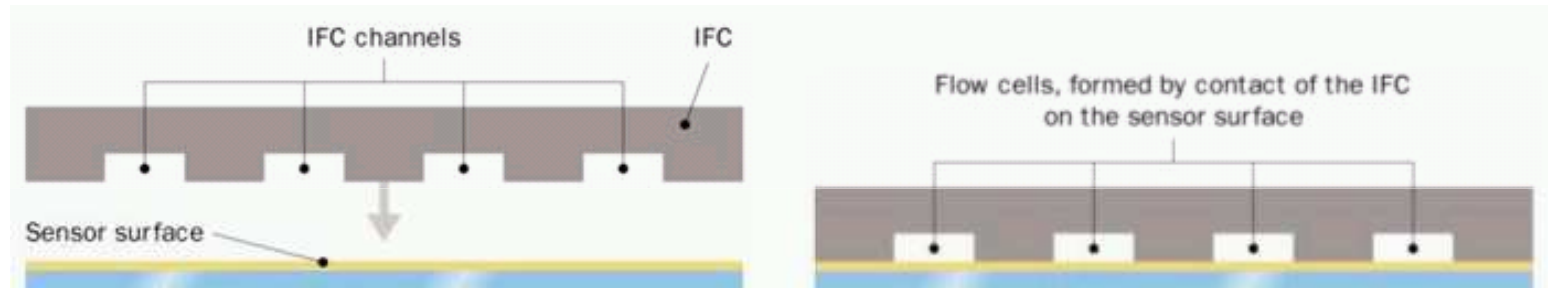


- [microfluidics system IFC](#) - miniaturní výměnný modul s pneumaticky ovládanými mikroventily, dávkovacími smyčkami a dráhami
- přívod pracovního pufru, reagensů a vzorků k jednotlivým kanálům
- variabilní nastavení měřící konfigurace průtočné cely - 1 až 4 kanálové měření

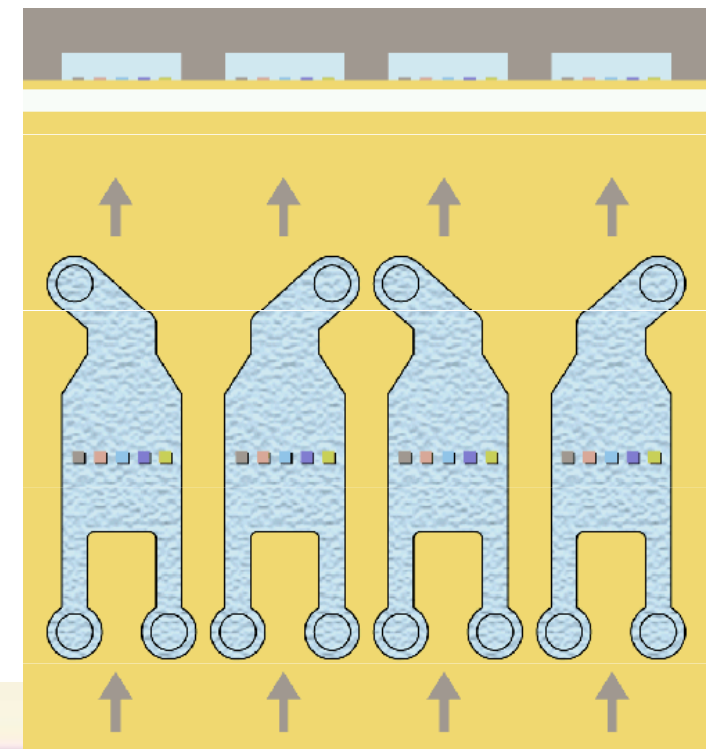


Průtočné cely

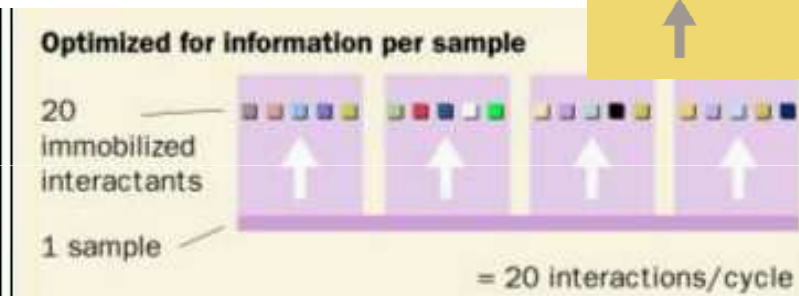
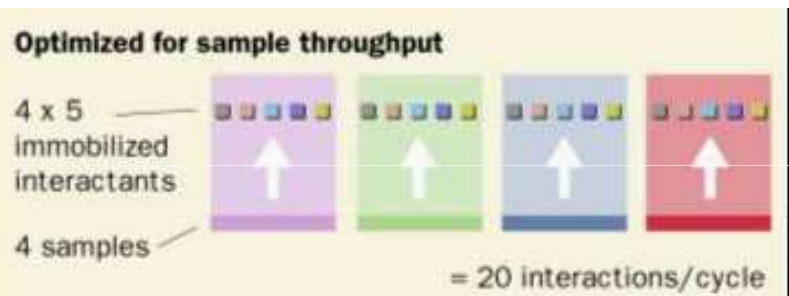
- klasický (2000, 3000)



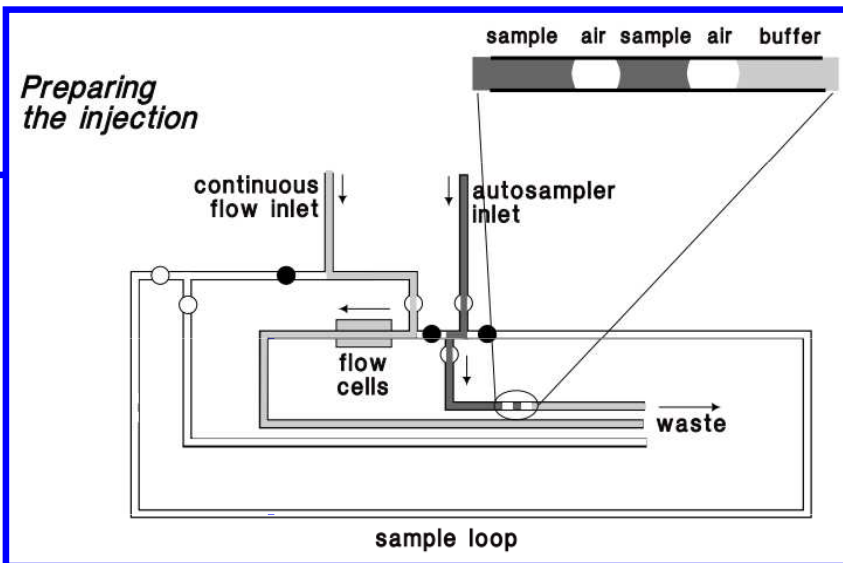
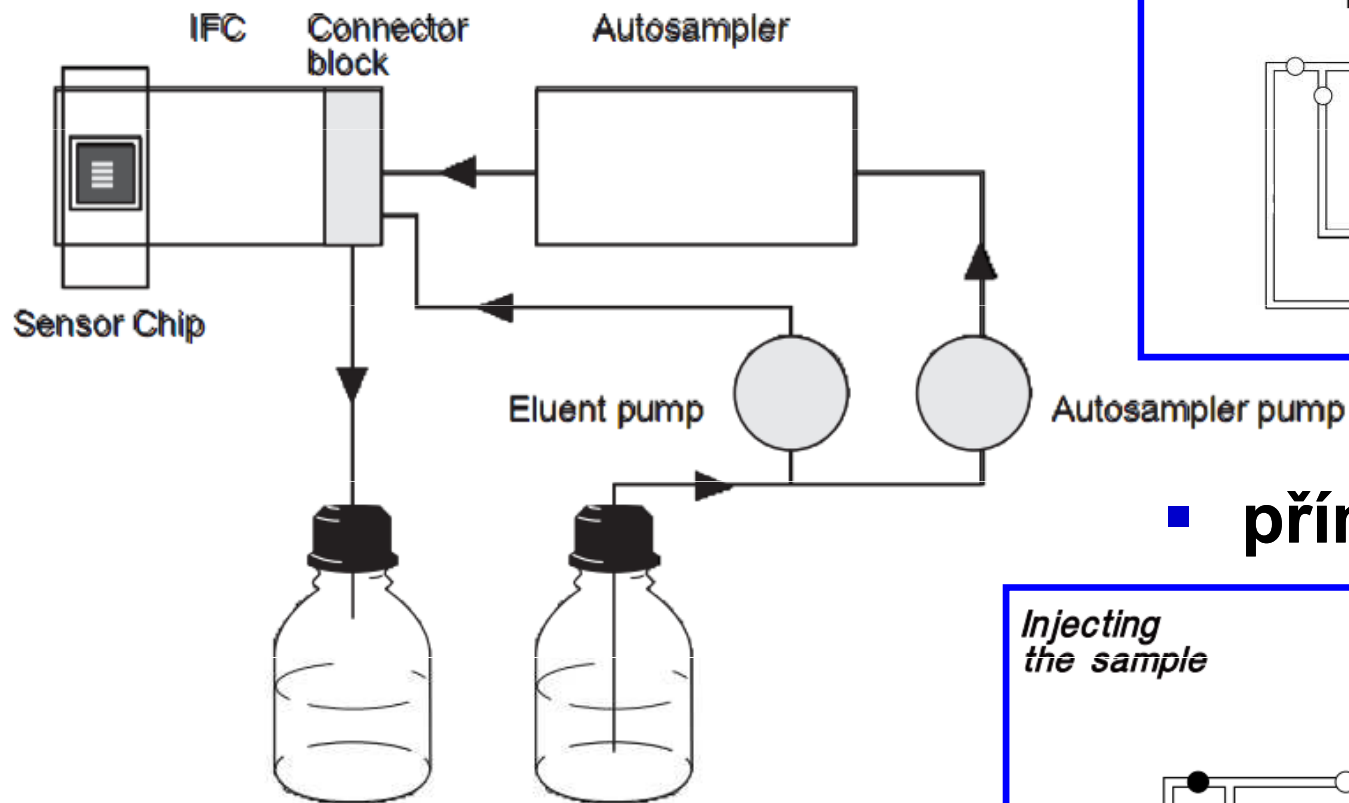
sekvenční / paralelní



- hydrodynamická adresace (A100)

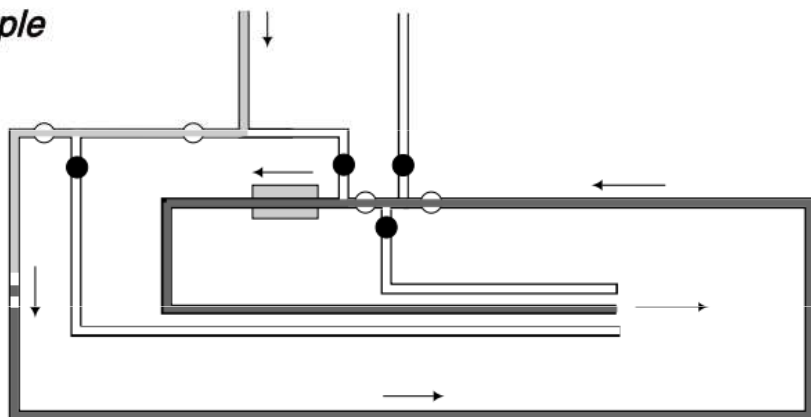


Průtočný systém

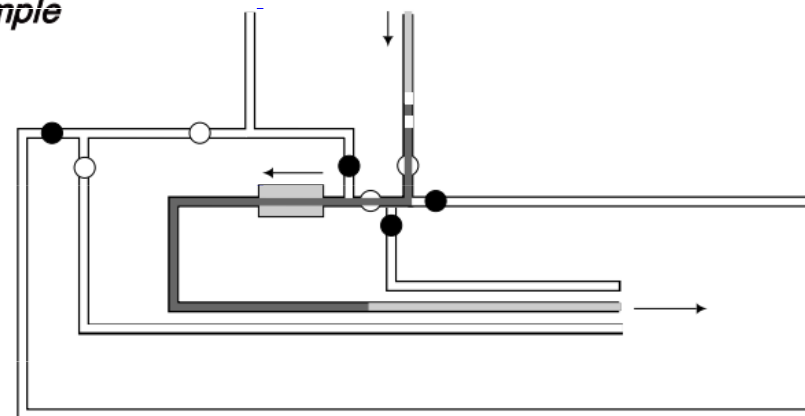


- **přímý nástřik do cely**

Injecting the sample



Injecting the sample

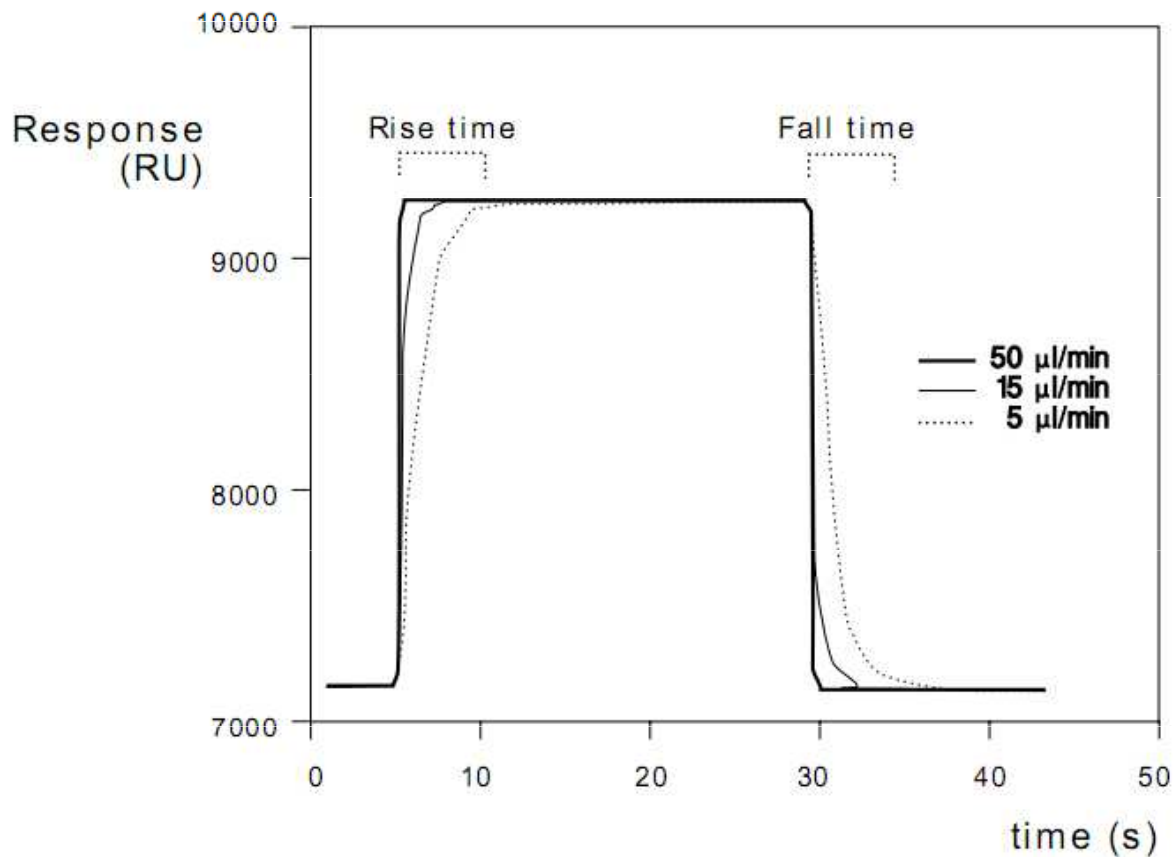
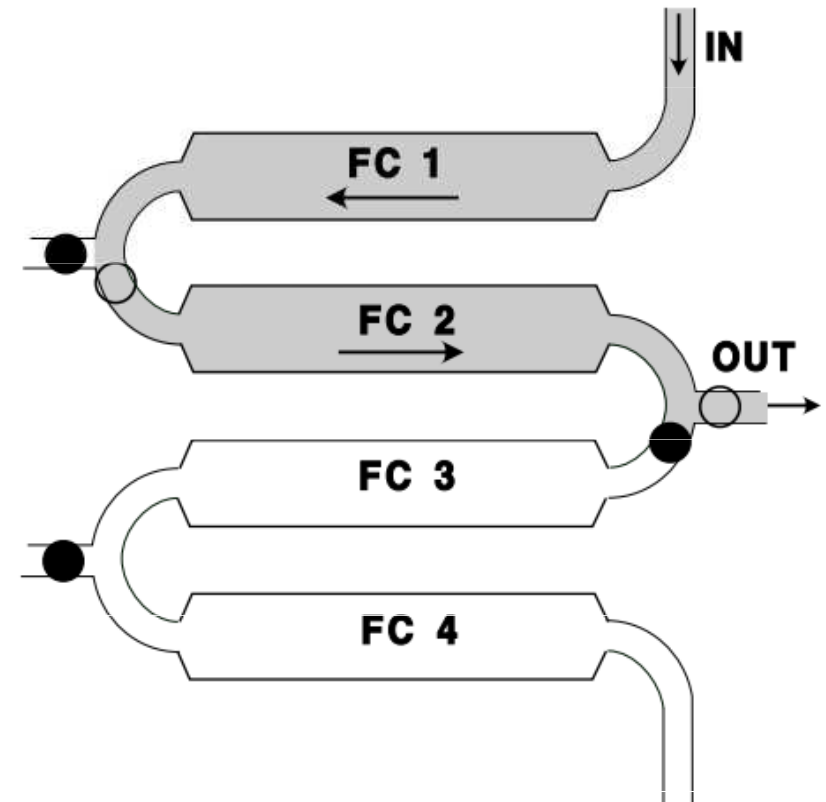


- **nástřik přes smyčku**



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

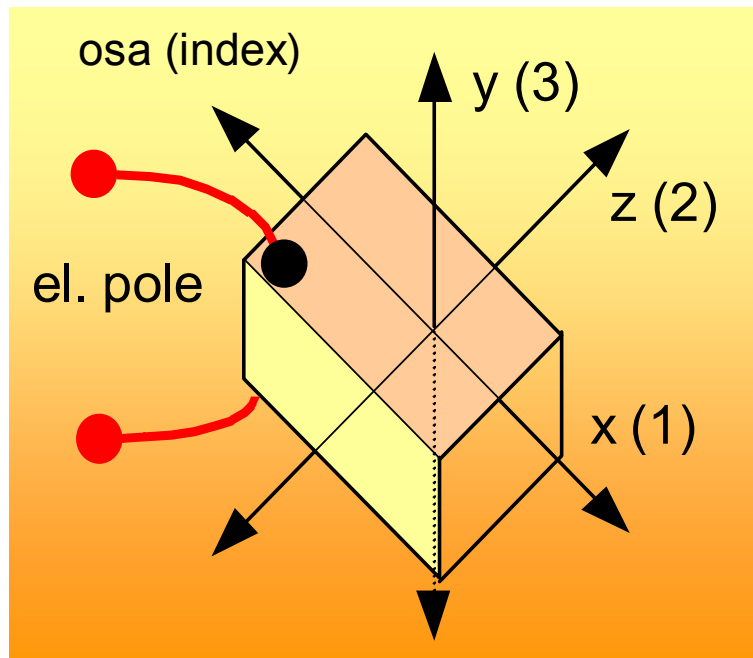


Piezoelektrické biosensory

- piezoelektrický 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

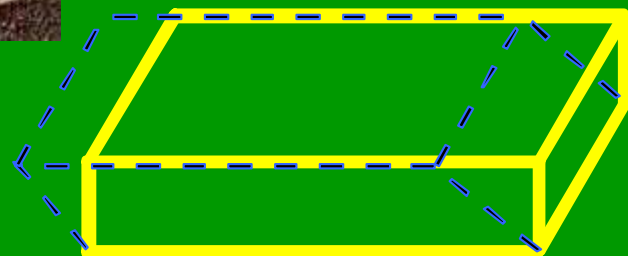
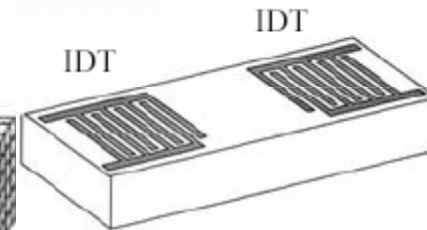
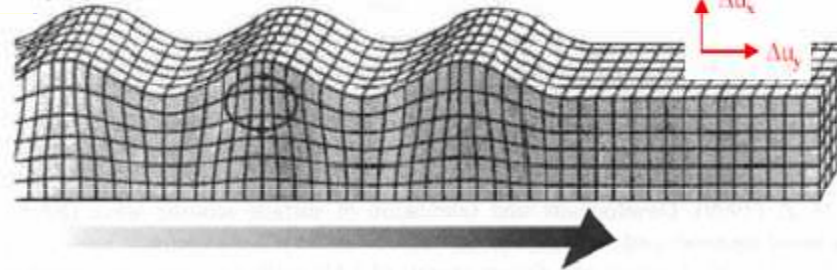
- **přírodní:** monokrystaly křemene, z nich se připraví vlastní sensory jako destičky vyřezané pod přesným úhlem (řezy AT, BT, ST, ...)
- **umělé:** (dnes i křemen) keramika: polykrystalická, ale uniaxiální (orientované), příprava sinterováním (ZnO, LiNbO₃, LiTaO₃, Bi₁₂GeO₂₀), snadné tvarování a nanášení
- **plasty:** polyvinylidenfluorid PVDF (-CH₂CF₂-)_n - směs (asi 1:1) amorfní a polykrystalické formy, z nepolární náhodně orientované a polární orientované složky)



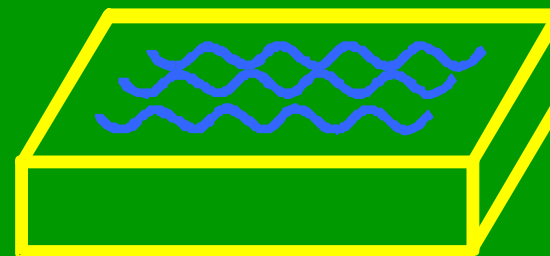
Vibrace piezosensorů



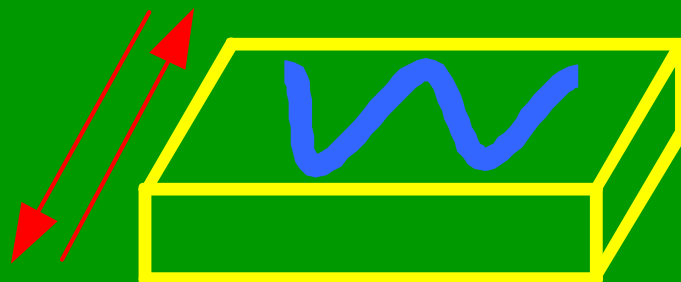
Rayleigh wave



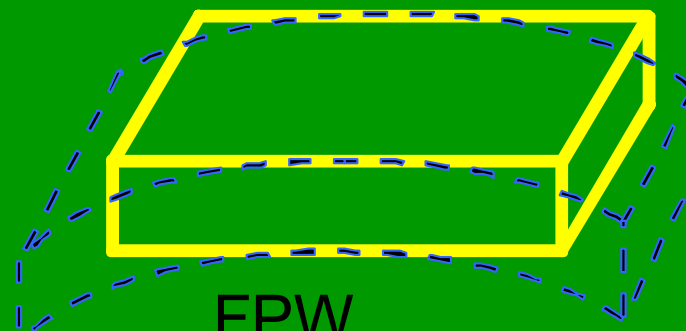
QCM



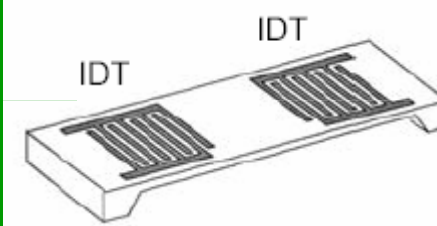
SAW



SH-APM



FPW



- 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

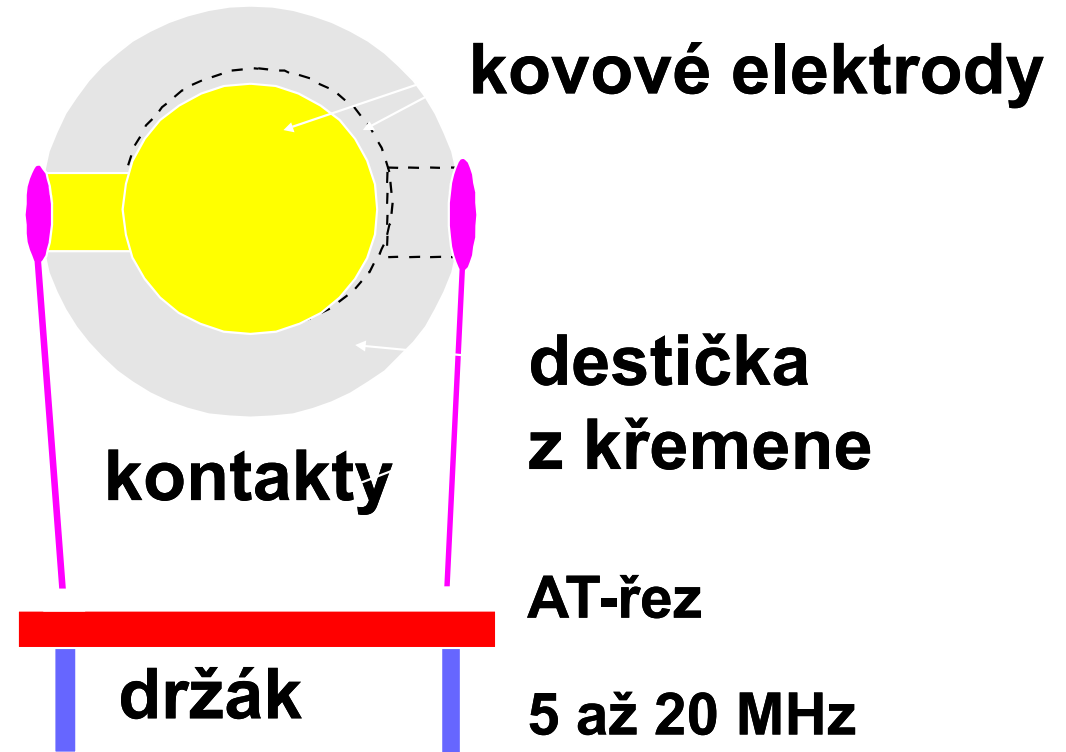


objemová akustická vlna -
schéma tloušťkové
střihové vibrace

základní stav / amplituda

Hmotnostní citlivost:

QCM - quartz crystal
microbalance

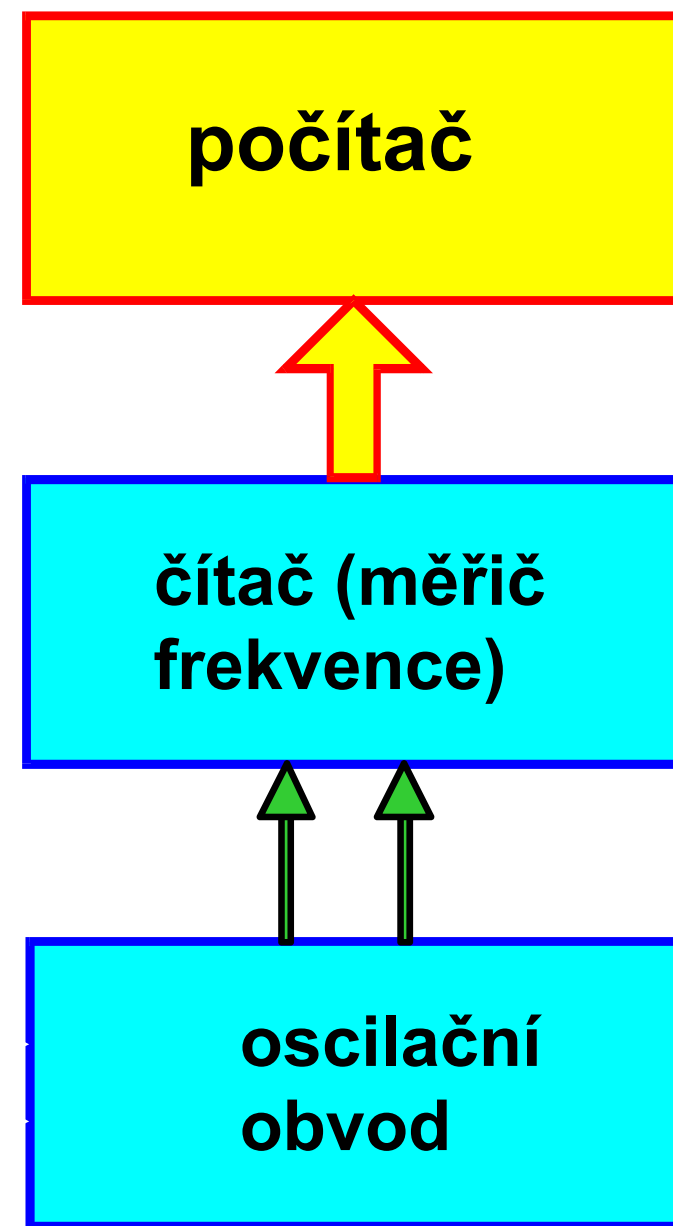
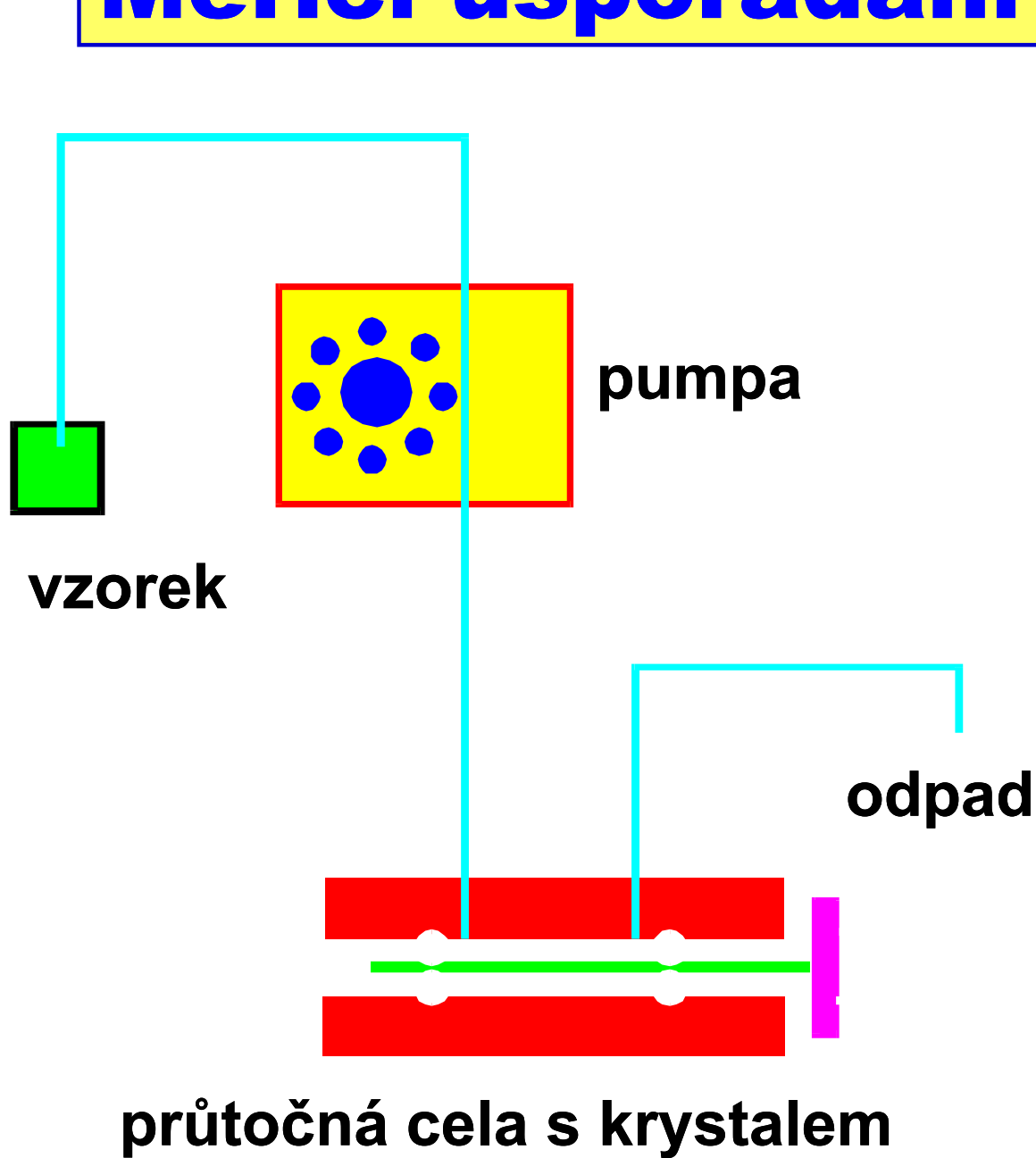


Piezoelektrický krystal

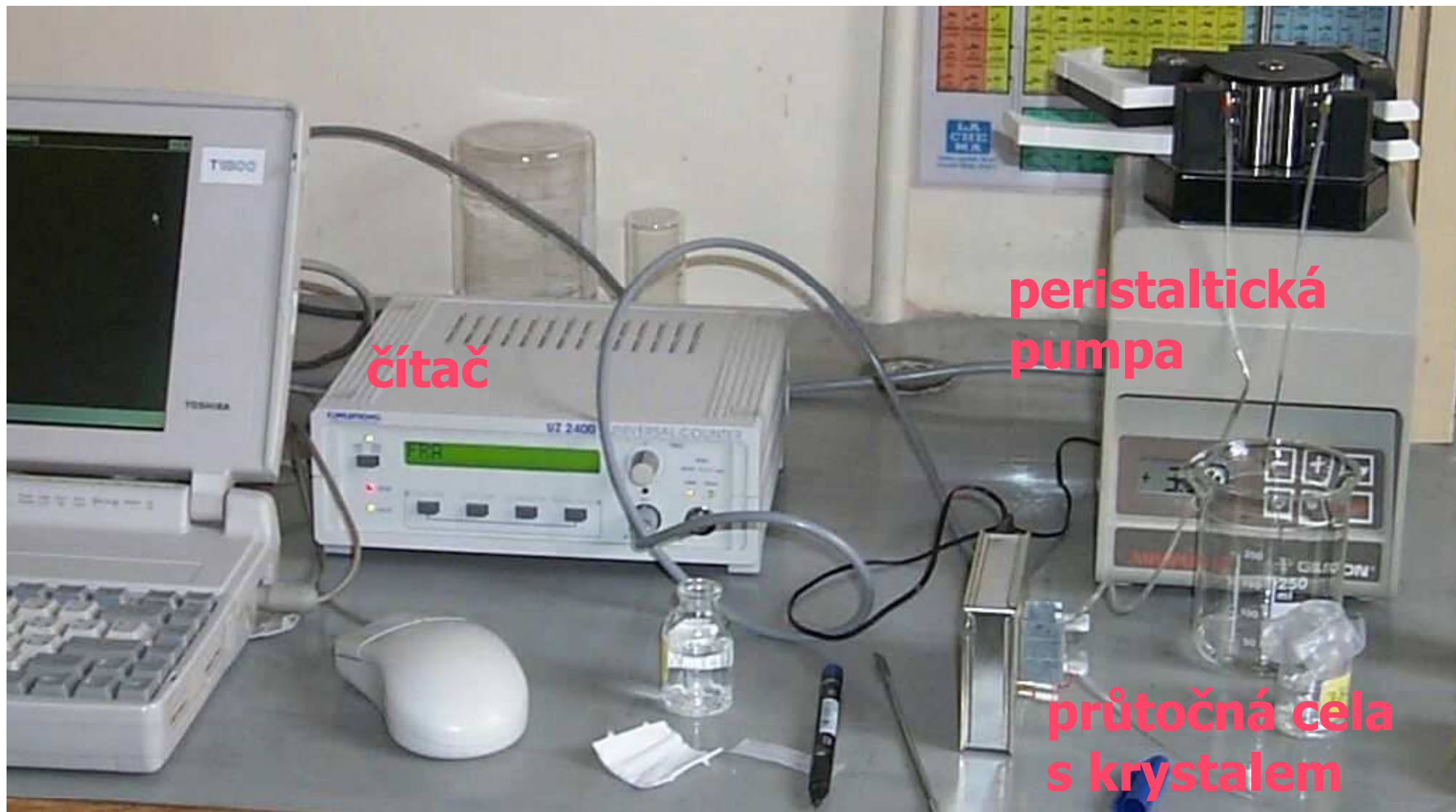
$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu}}$$



Měřicí uspořádání



Ukázka měřicí aparatury



čítač

peristaltická
pumpa

průtočná cela
s krystalem



Oscilační obvod

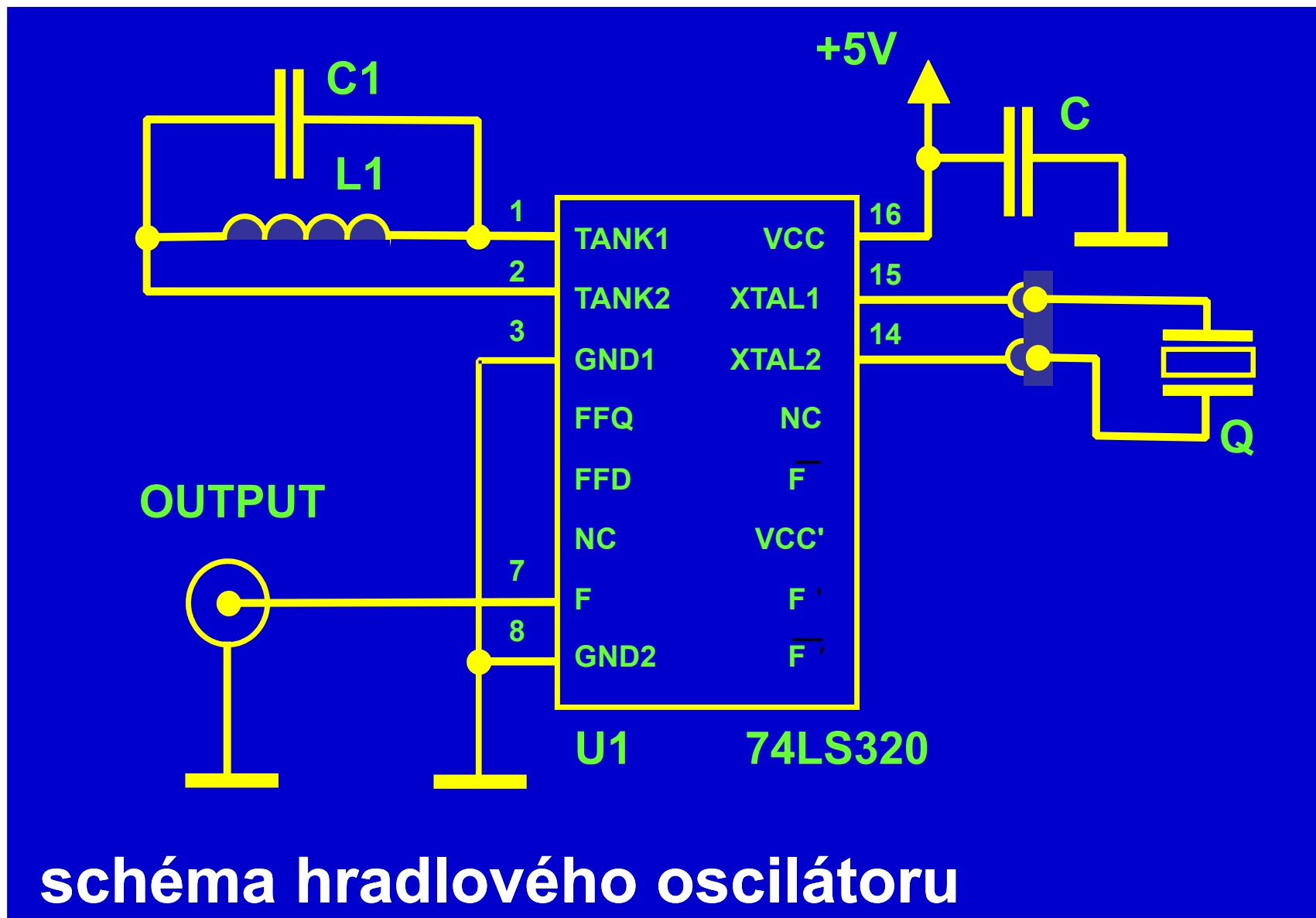


schéma hradlového oscilátoru



Piezosensory v kapalinách

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

hmotnost

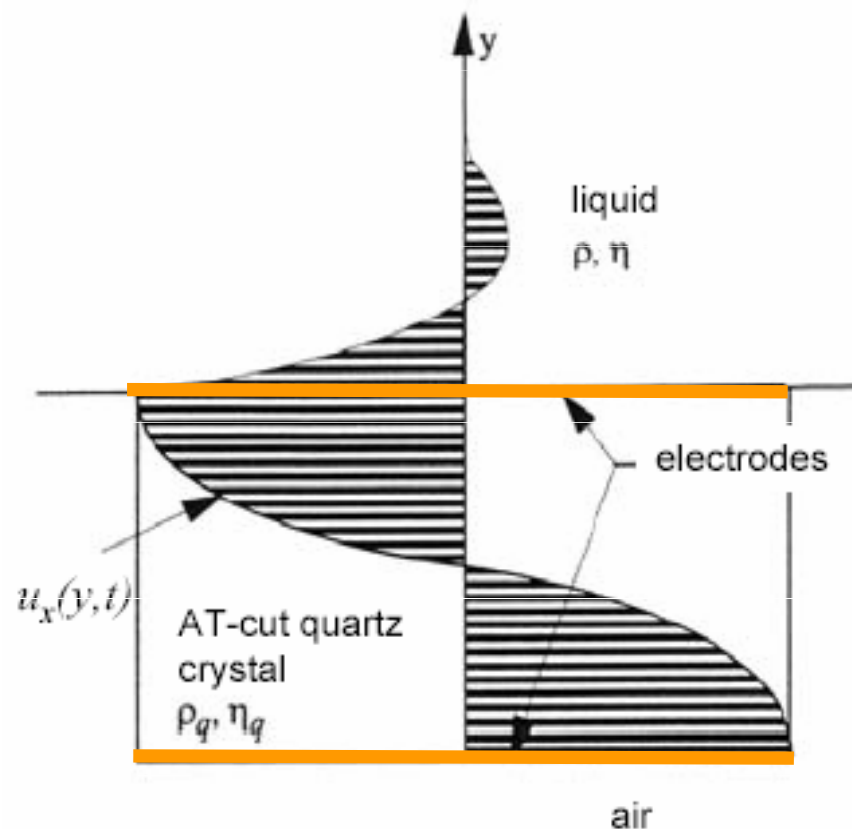
$$\Delta f = \sqrt{f_0^3 \frac{\eta_L \rho_L}{\pi \rho_q \mu_q}}$$

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

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

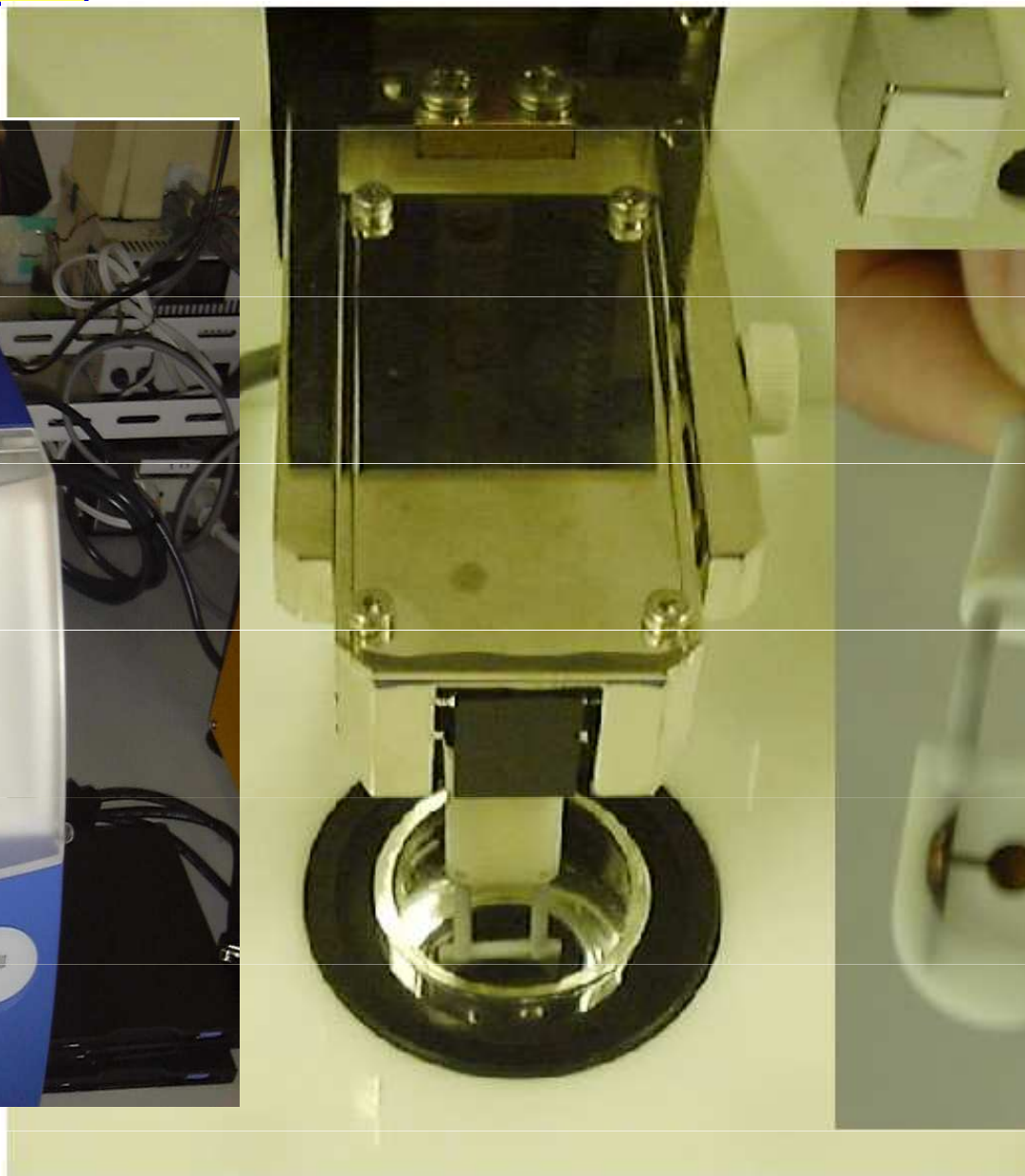


Komerční systémy

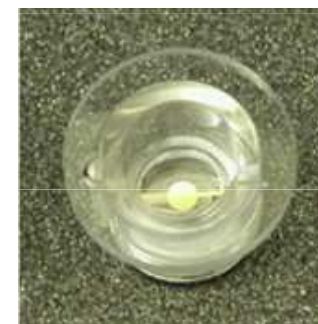
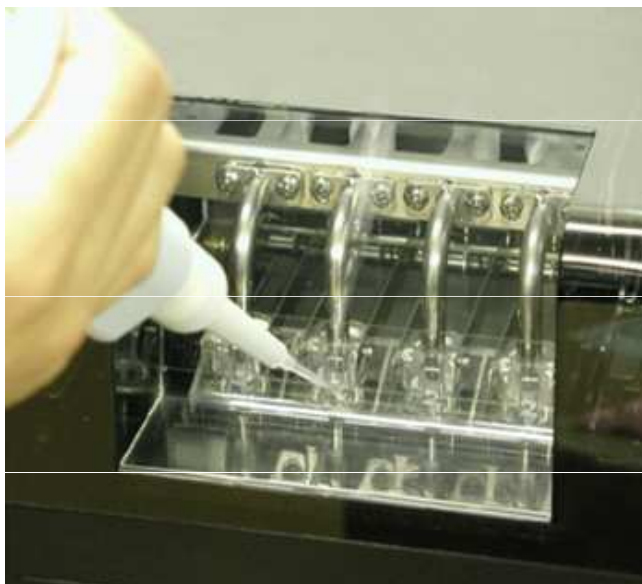
Firma / kontakt	Produkt / popis
Akubio , Cambridge, GB (http://www.akubio.com)	Resonant Acoustic Profiling – technologie založená na piezokrystalech, plánován měřicí systém vhodný pro studium biointerakcí a aplikace ve farmaceutickém průmyslu, ve vývoji
Elchema , Potsdam, NY, USA (http://www.elchema.com)	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-kanálový
CH Instruments , Austin, TX, USA (http://chinstruments.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)	Affinix Q , 27 MHz krystaly, míchaná komůrka, spec. na biointerakce, také 4-kanálová 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 tříkanálový
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 – čtyřkanálová 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



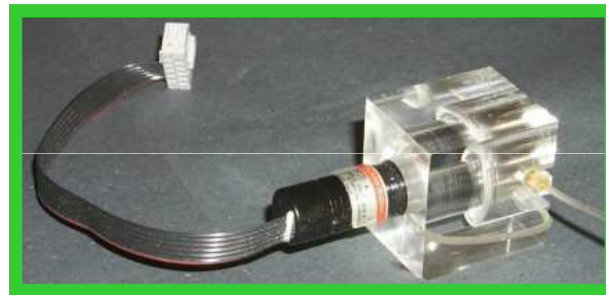
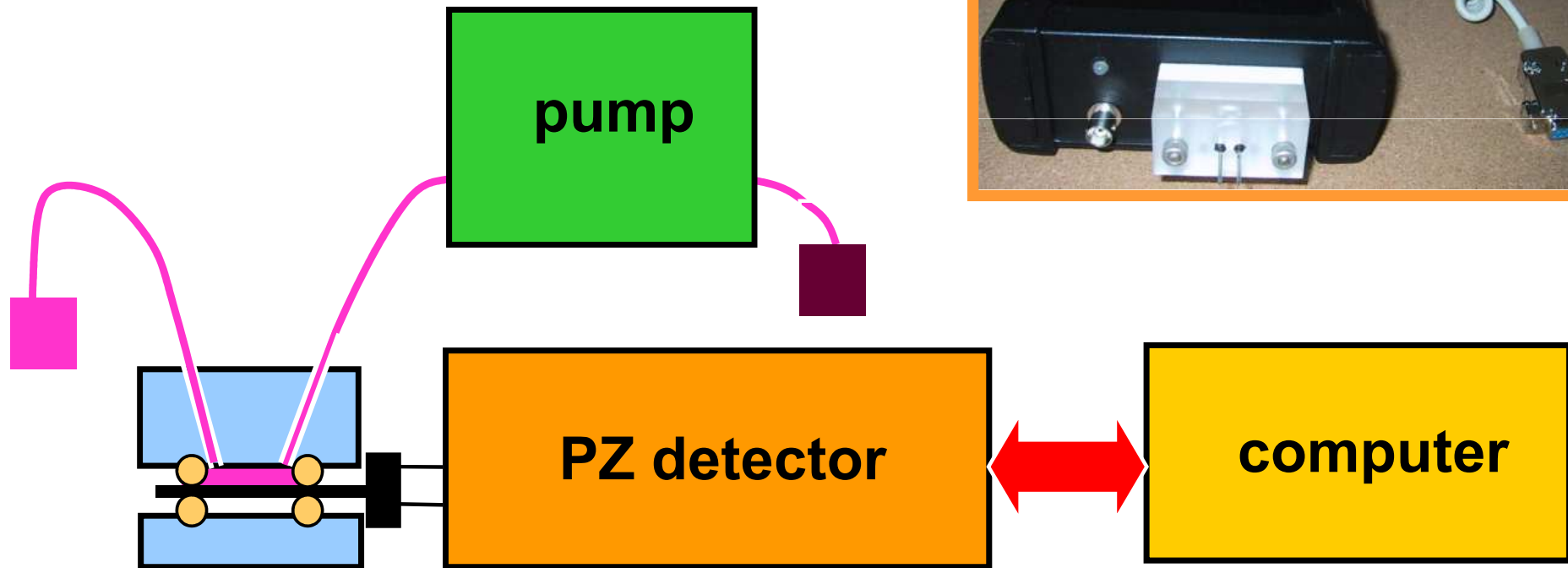
Affinix Q4



- vícekanálové měření



MU Brno

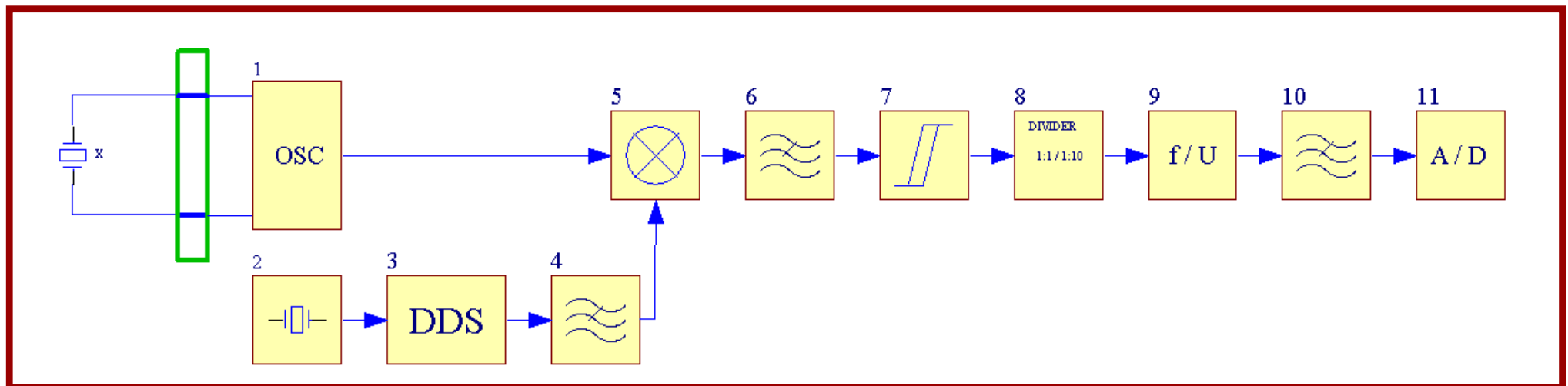


$$\Delta f = - \frac{2 f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}}$$

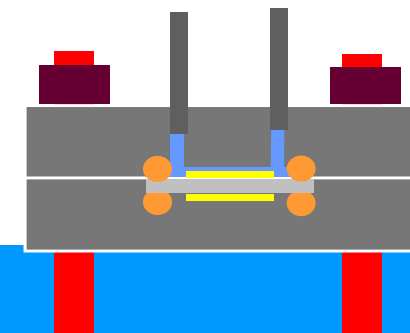
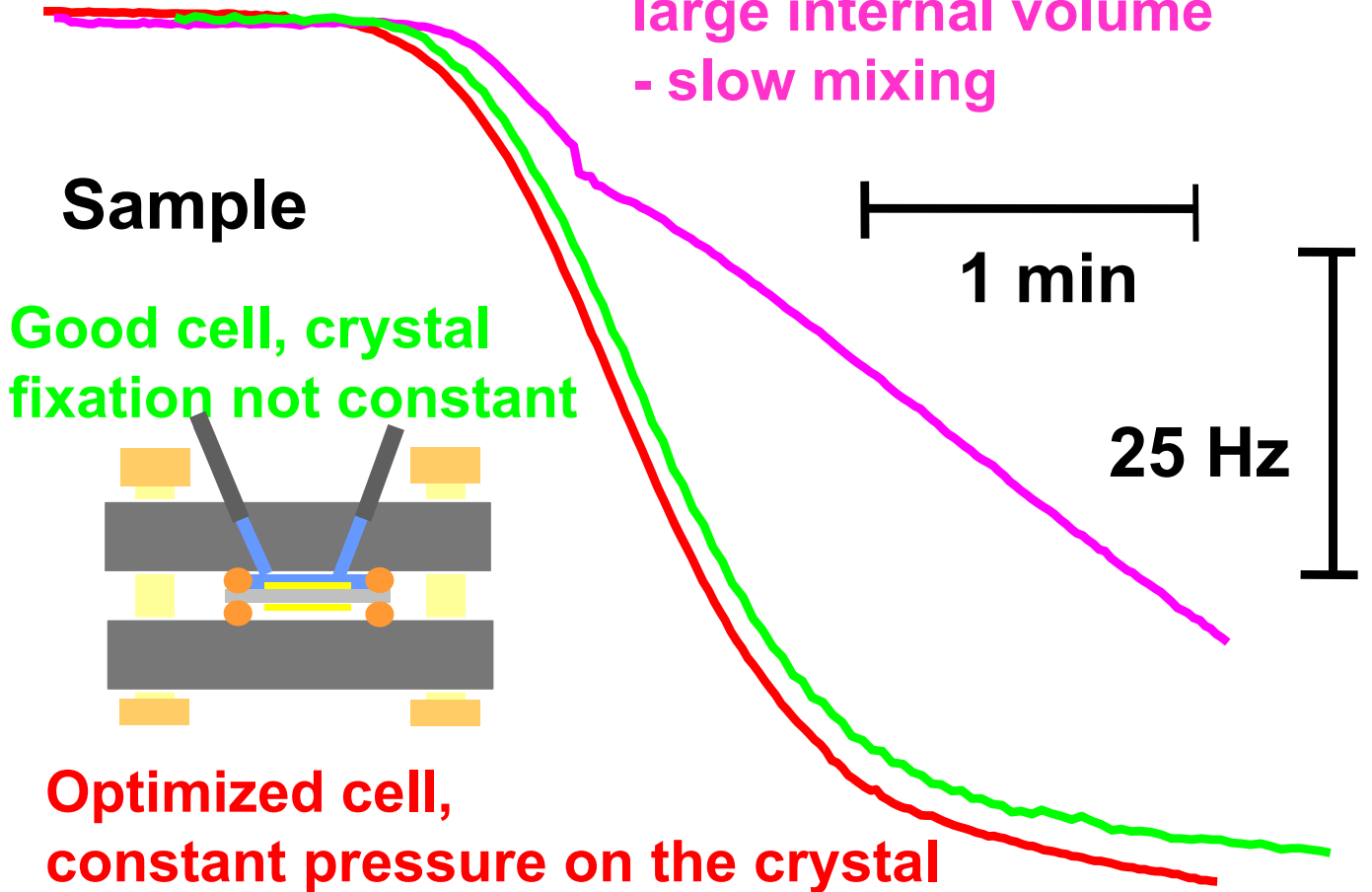
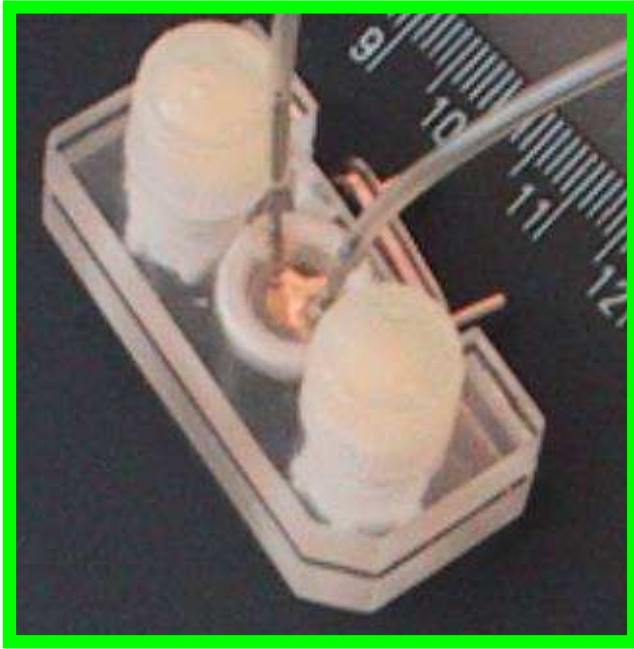


Detektor MultiLab

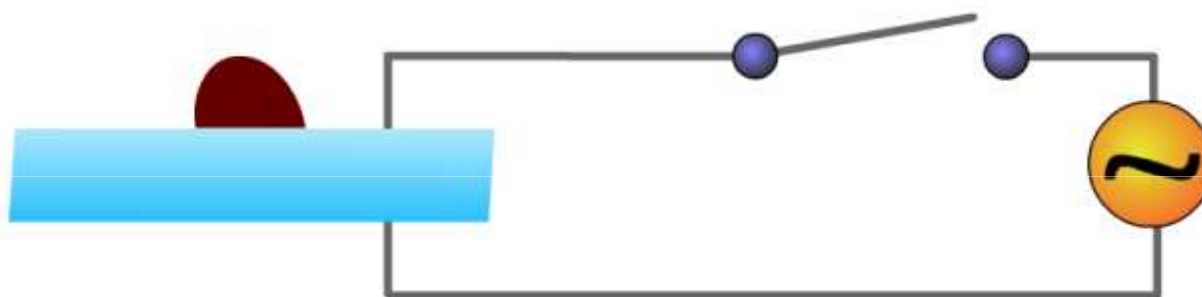
- portable piezoelectric detector, computer-controlled
- highly sensitive and rapid measurements
- principle: output frequency from the oscillator(1) is subtracted(5) from a similar stable reference frequency generated by DDS(2)
- thus obtained low frequency is filtered(6), converted to voltage(9), filtered(10)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



Flow-cell design

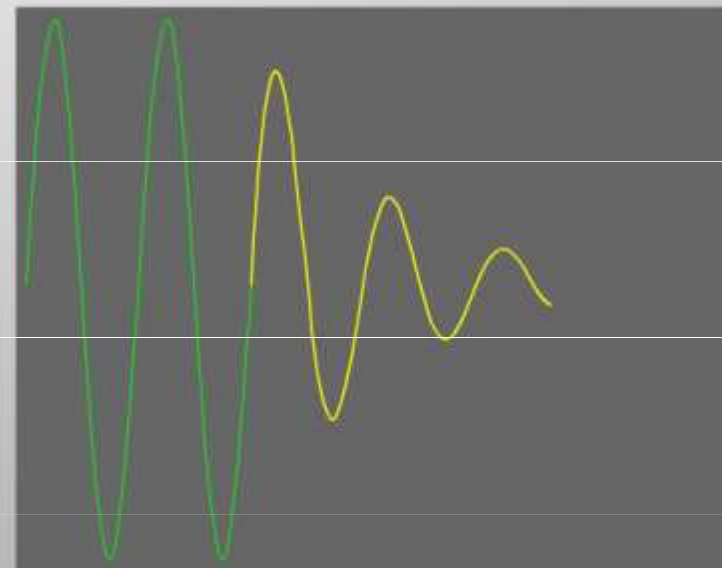


QCM-D



Viscoelastic substance - High dissipation

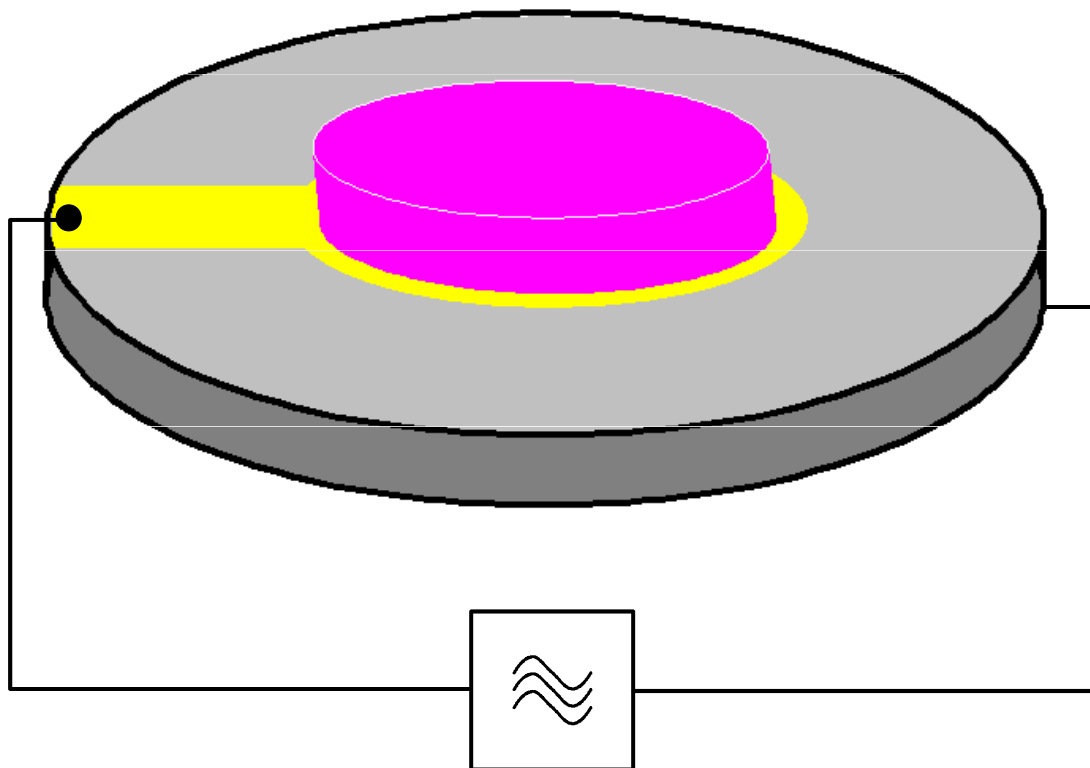
The quartz crystal with its coating substance is oscillating at constant frequency. The power source is then disconnected and the amplitude of the oscillation *rapidly* decreases, due to the high energy loss in the viscoelastic film.



- 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

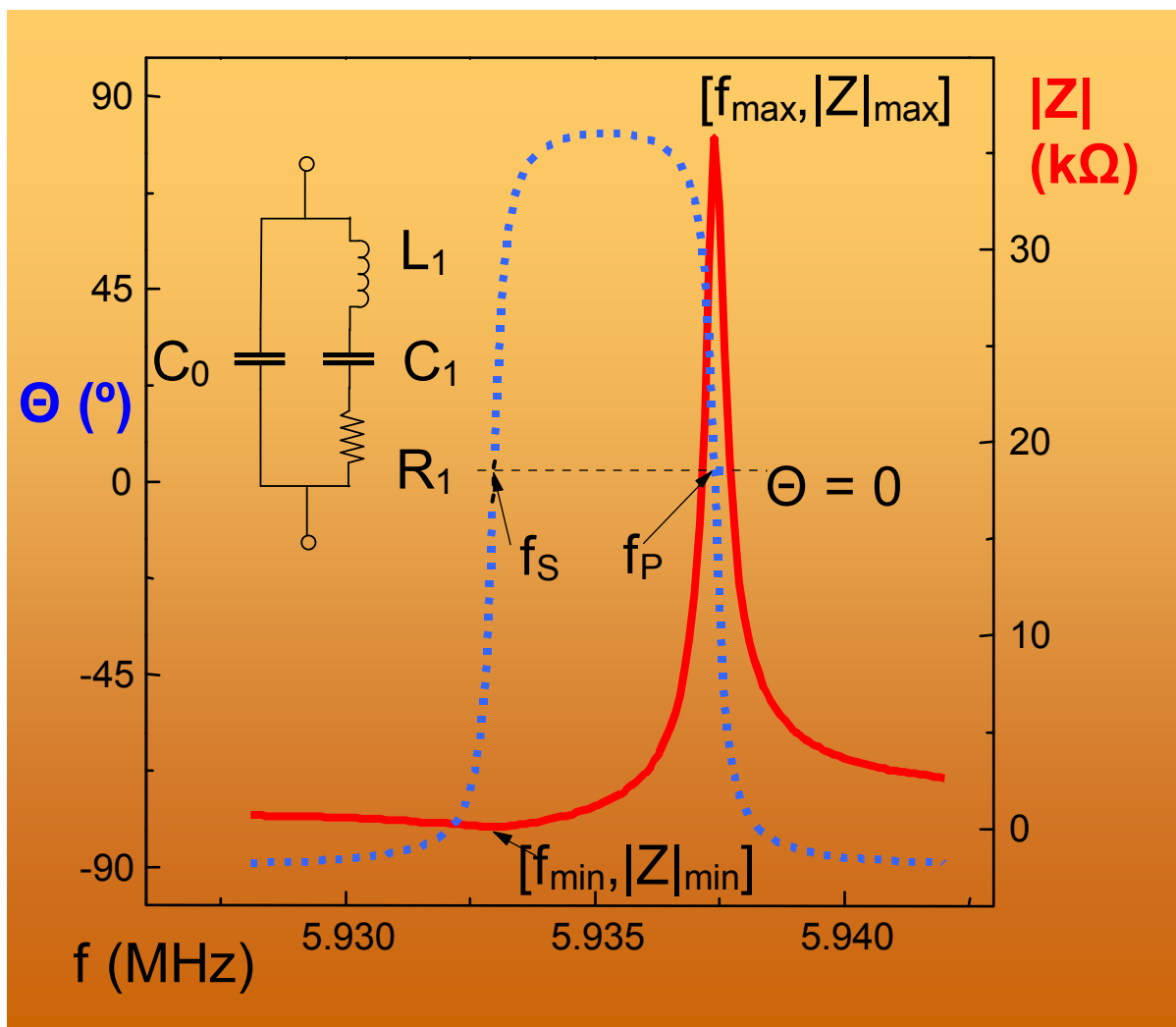


Více informací z piezosensorů?

- 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



pasívní měřící metoda

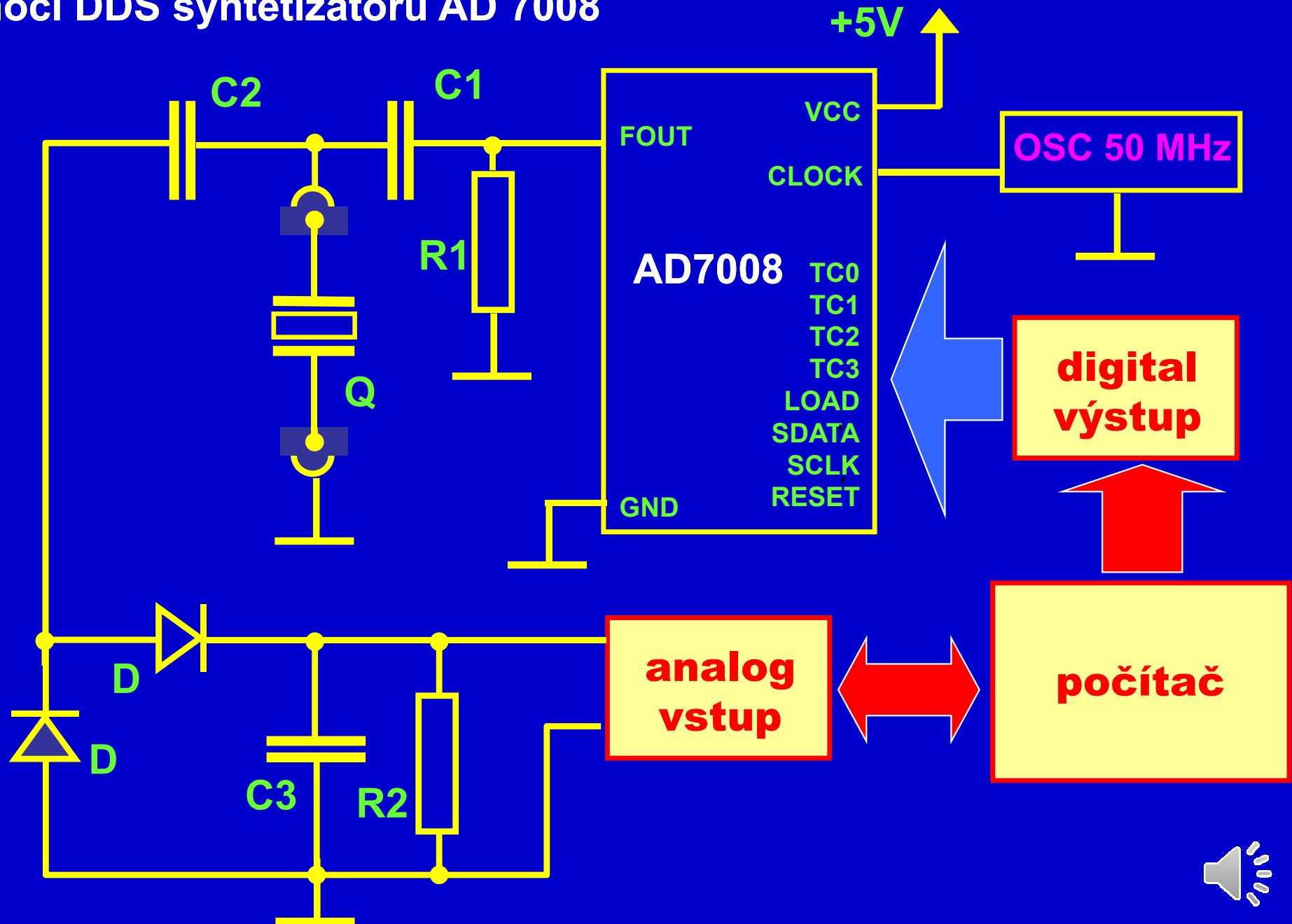
na krystal se přivádí proměnná frekvence a sleduje se změna velikosti impedance $|Z|$ a fázový posun Θ

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



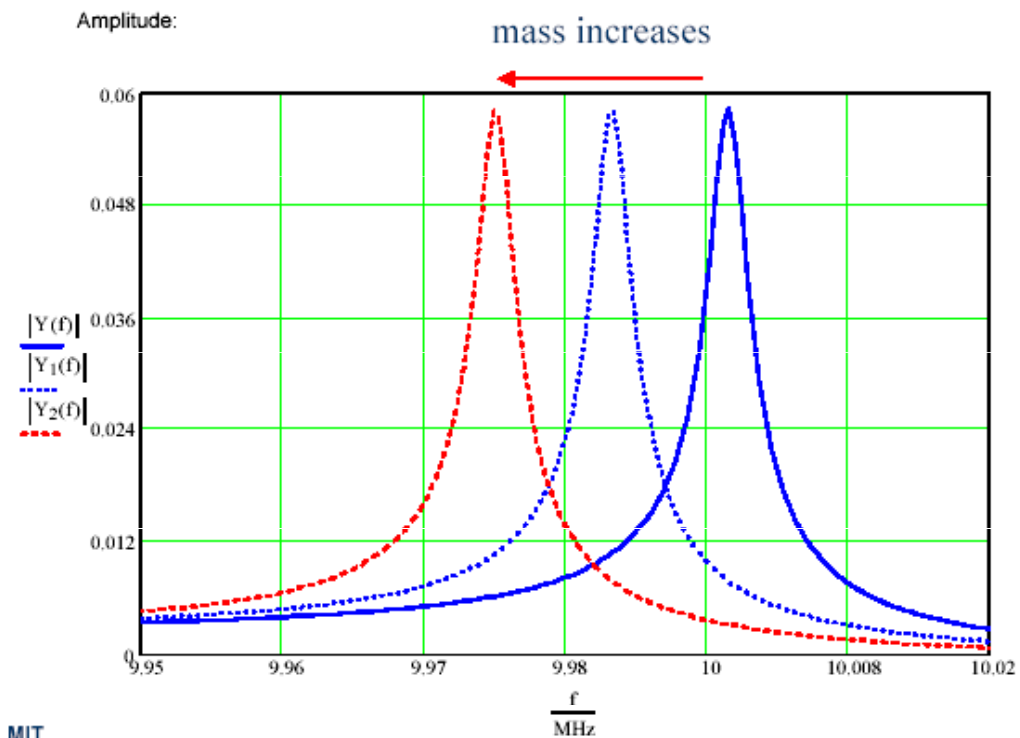
Impedanční měření

pomocí DDS syntetizátoru AD 7008



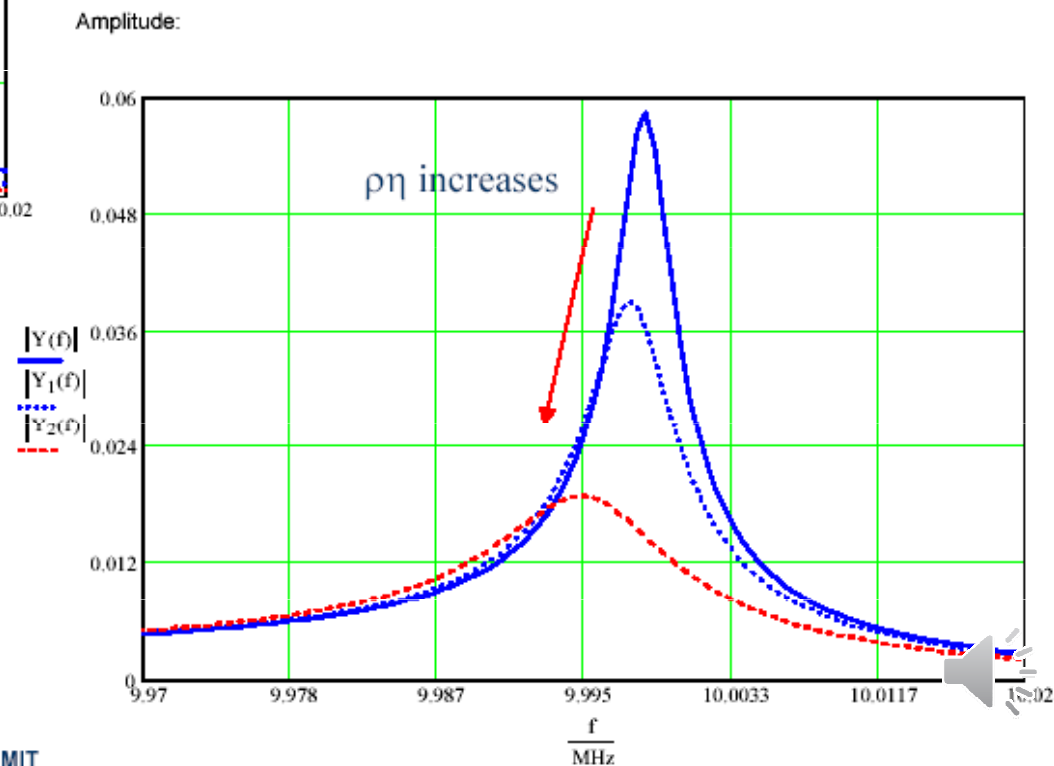
Impedanční měření

Effect of mass loading



MIT

Effect of (density x viscosity)



MIT

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

