

# AFINITNÍ BIOSENSORY

## Afinitní biosensory

biorekogniční vrstva = biomolekuly,  
které vytvářejí bioafinitní komplex s analytem

# Typy afinitních interakcí

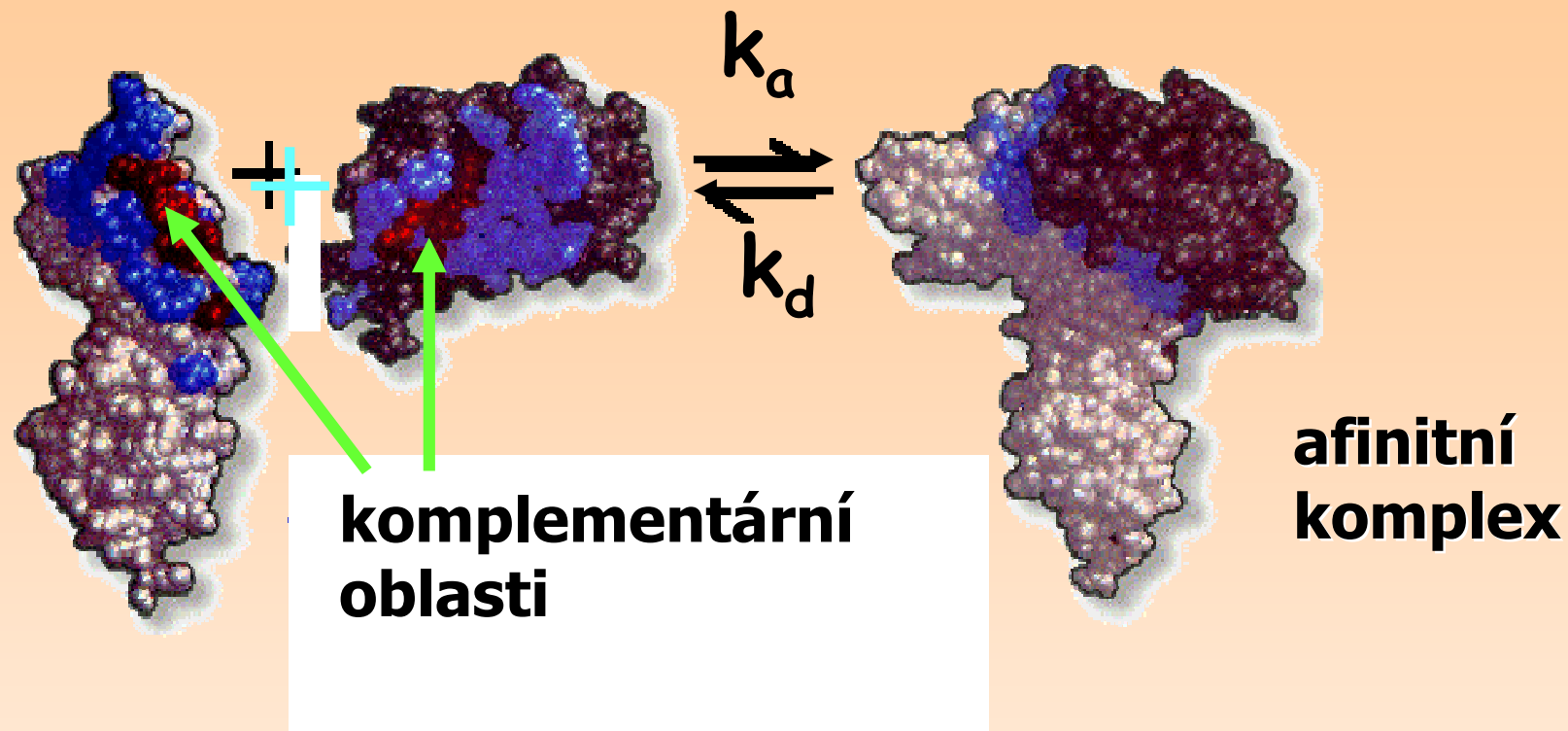
Molekulární reakce mezi:

ANTIGEN  
HORMON  
LÉČIVO  
ENZYM

RECEPTOR  
NUKLEOVÁ KYSELINA  
NUKLEOVÁ KYSELINA

PROTILÁTKA  
RECEPTOR  
RECEPTOR  
KOFAKTOR  
(SUBSTRÁT,  
INHIBITOR)  
MIKROORGANISMUS  
VAZEBNÁ BÍLKOVINA  
KOMPLEMENTÁRNÍ  
ŘETĚZEC

## Afinitní interakce



### **Kinetické konstanty:**

$k_a$  ... asociační rychlostní konstanta

$k_d$  ... disociační rychlostní konstanta

$K_A = k_a/k_d$  asociační rovnovážná konstanta

## Rozdělení afinitních biosensorů

jeden afinitní partner imobilizován na povrchu převodníku

### ❖ **přímé** afinitní biosensory

- vznik biokomplexu je možné sledovat přímo v průběhu afinitní interakce (v reálném čase)

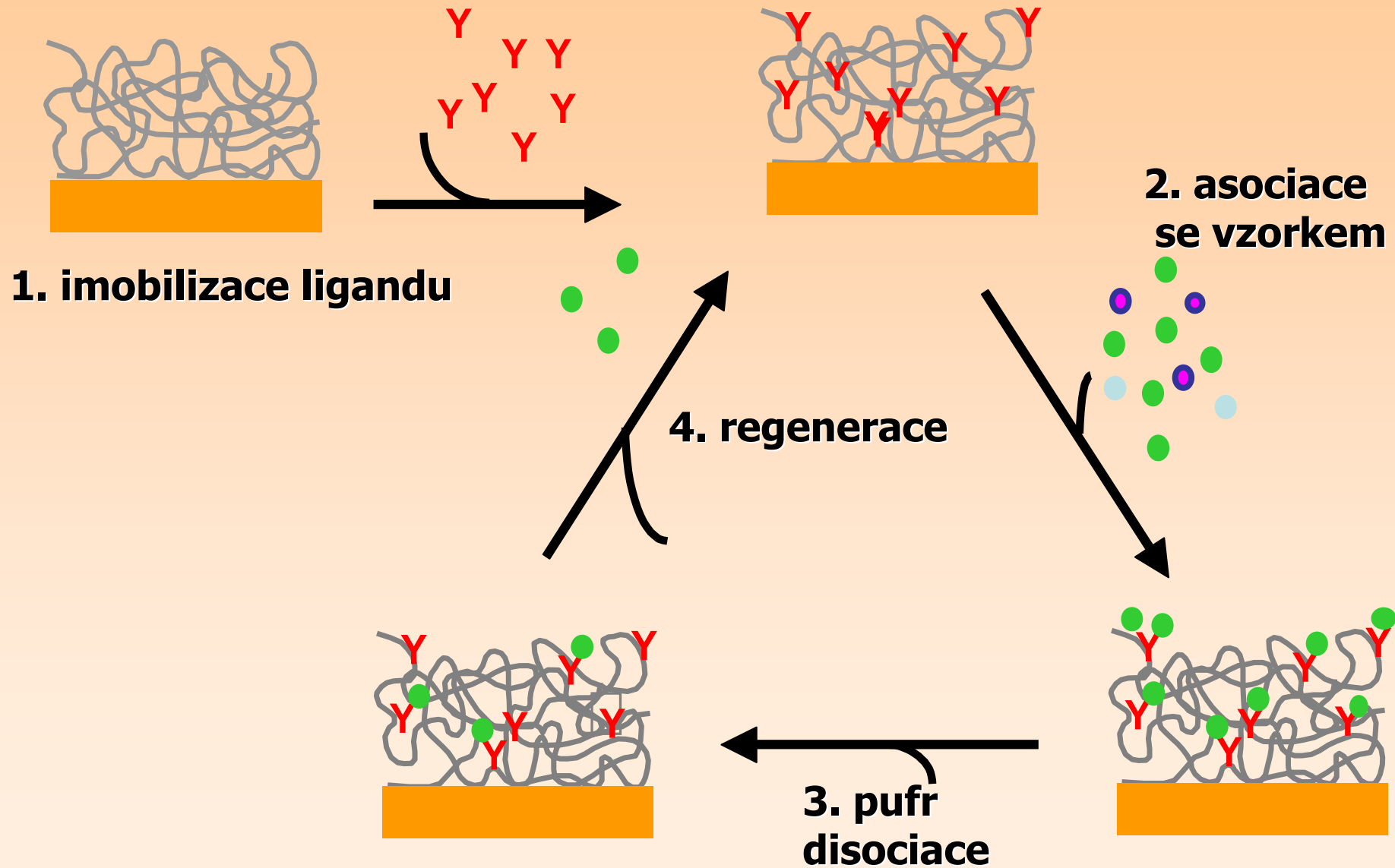
- **převodníky** = speciální **optické světlovodné systémy**, **piezosensory** nebo **impedimetrická zařízení**

### ❖ **nepřímé** afinitní biosensory

- jeden z afinitních partnerů je **označen**, na konci interakce se pak stanoví množství značky navázané na povrchu sensoru

- podle typu značky (enzym nebo fluorofor) se použije **převodník** pro měření **enzymové aktivity** nebo **fluorescence**

# Schéma měření



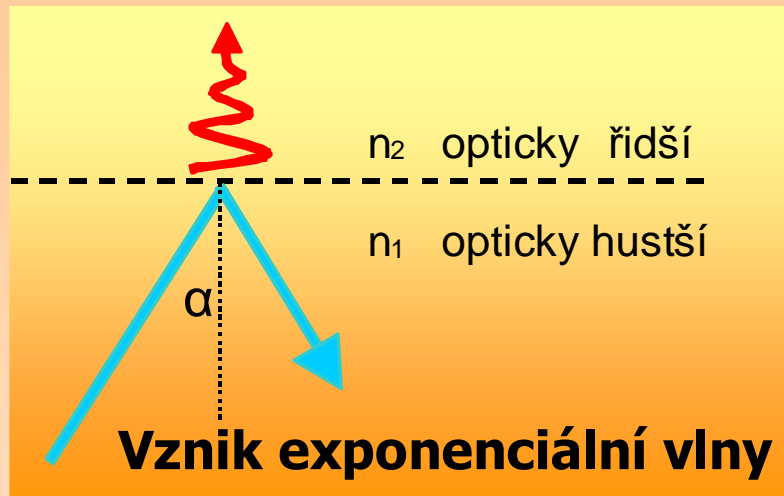
## Přímá metoda

- ✓ Sledování vzniku biokomplexu průběžně.
- ✓ Studium afinitních interakcí bez pomoci značek začíná až koncem 80.let.
- ✓ Souvisí s rozvojem telekomunikačních technologií na bázi světlovodu (nelineární optika).
  
- ✓ probíhá v reálném čase
- ✓ bez značení a separačních kroků

Jeden reakční partner je **imobilizován** na povrchu převodníku, druhý je volně v roztoku, průběžně se sleduje vazba na citlivém povrchu.

Měřený signál odráží pouze **změny na povrchu sensoru** a v jeho těsné blízkosti.

## Optické převodníky



Základem interakce je interakce exponenciální vlny s okolím sensoru. Při dopadu paprsku šířeného v opticky hustším prostředí na rozhraní s řidším prostředí

pod úhlem větším než kritický ( $\sin\alpha > n_2/n_1$ ), dochází k totálnímu vnitřnímu odrazu světla.

přítom vzniká v opticky řidším prostředí elektromagnetická vlna vyvolaná interakcí dopadajícího a odraženého světla, jejíž intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od povrchu.



## Dva typy optických systémů

- ✓ Planární světlovod
- ✓ Rozhraní kov/dielektrikum

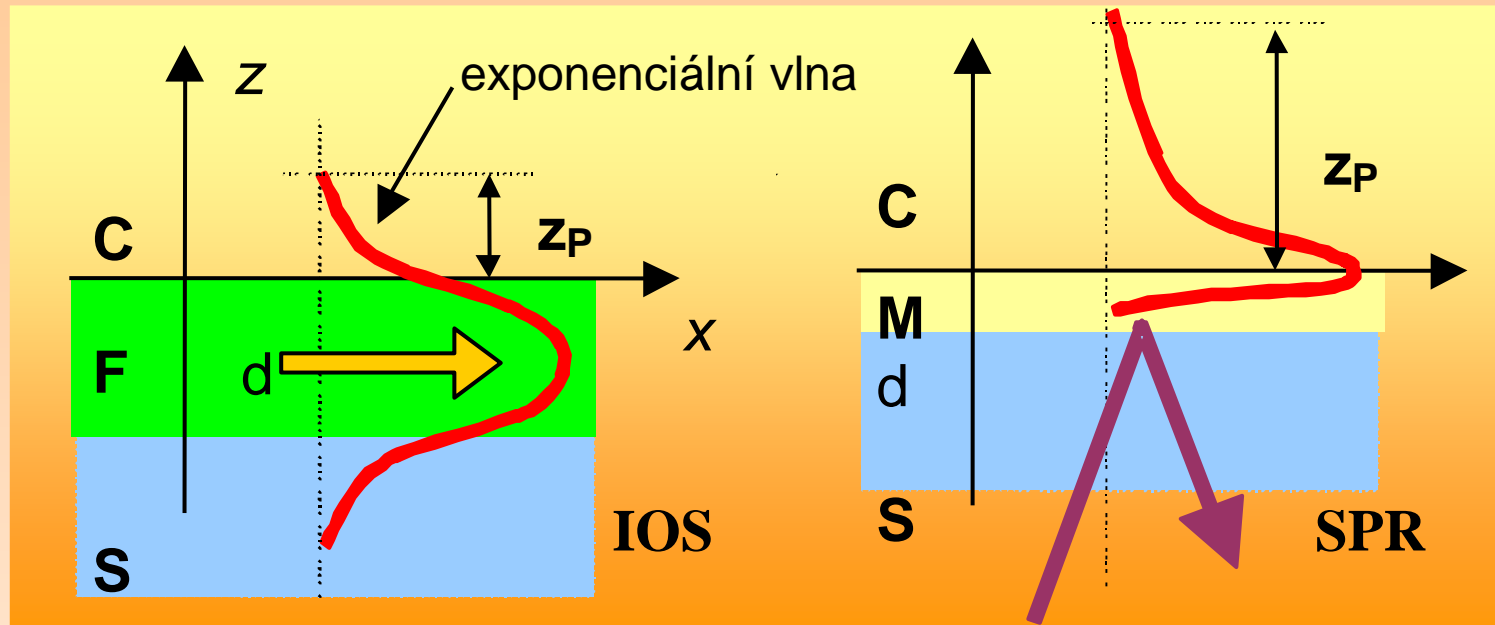
Interakcí exponenciální vlny s blízkým okolím sensoru, dochází ke změně podmínek pro šíření světla v optickém systému, které se kvantifikují podle **změn intenzity** nebo **fázového posuvu** vedeného světla.

Podle konfigurace optického systému rozlišujeme dva systémy:

**IOS** - planární vodič světla (integrated optical sensor)

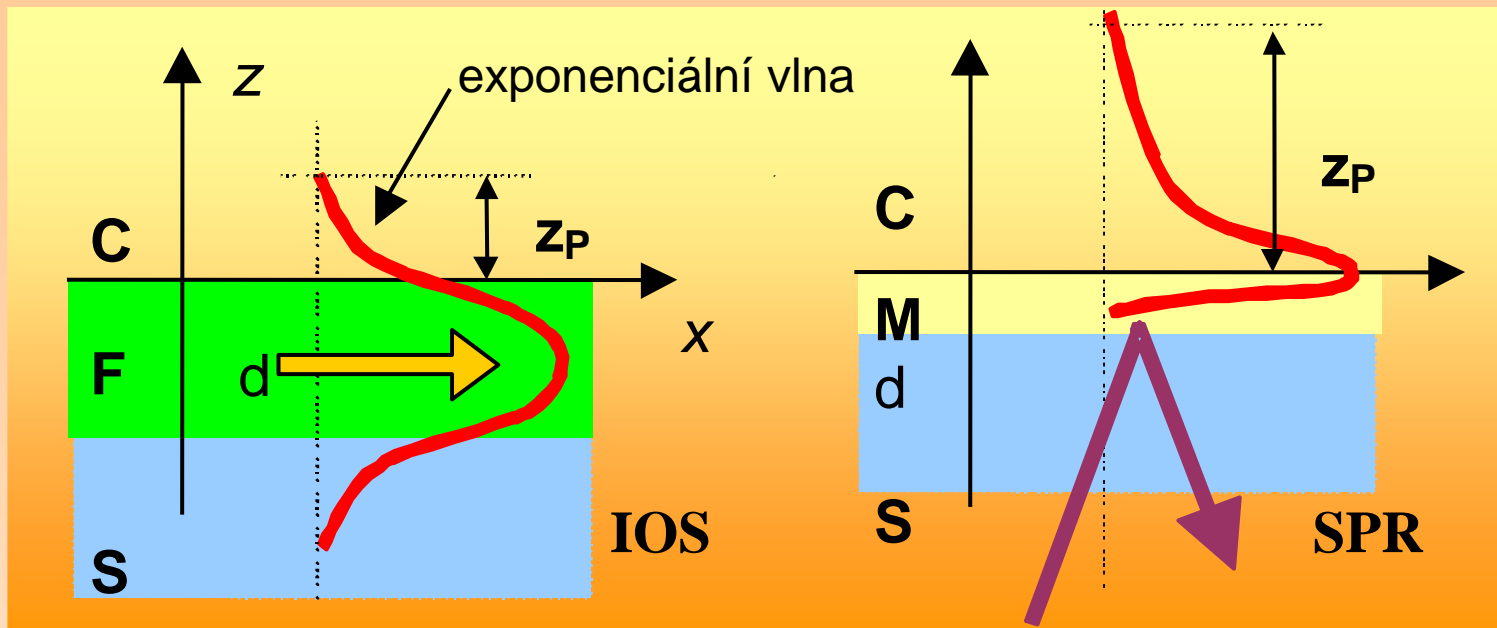
**SPR** - rezonance elektromagnetické vlny šířené povrchovou vrstvou kovu (surface plasmon resonance), vzniká interakcí exponenciální vlny s volnými elektrony v kovu.

## IOS A SPR



Oba typy vychází ze změn efektivního indexu lomu  $N$  pro šíření vedené vlny uvnitř optického systému. Šíří se jeden definovaný mod, který má u:

- ✓ IOS složku magnetickou  $TM_0$  a elektrickou  $TE_0$
- ✓ SPR pouze složku magnetickou  $TM_0$ .



Změny v poli exponenciální vlny jsou vyvolané navázáním biomolekul na citlivý povrch (změny indexu lomu  $n_C$  v oblasti vzorku C)

Penetrační hloubka exponenciální vlny v prostoru vzorku  $Z_p$

S je podkladový substrát (obvykle sklo,  $n_S = 1,46$ )

F je planární světlovod ( $n_F$ , tloušťka  $d$ ,  $n_F$  asi 2,0,  $d = 80$  až  $120$  nm, materiály  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  nebo  $\text{Si}_3\text{N}_4$ )

M tenká vrstvička kovu (Au, Ag, tloušťky 20 až 60 nm)

Pro **SPR**:

komplexní dielektrické permitivita kovu

$$\epsilon_M (\epsilon_M = \epsilon_{M'} + j\epsilon_{M''})$$

reálná složka  $\epsilon_{M'}$  záporná a  $-\epsilon_{M''} > n_c^2$

Např.  $\epsilon_{Ag} = -18 + 1,2j$ ,  $\epsilon_{Au} = -12 + 0,52j$

platí pro vlnovou délku  $\lambda = 632,8$

helium-neonového laseru

Pro efektivní indexy lomu  $N$  vedených vln a jejich

penetrační hloubky platí vztahy:

**IOS**  $N = k_x \lambda / 2\pi$

$$Z_p = \lambda / (2\pi) [N^2 - n_c^2]^{-1/2}$$

**SPR**  $N = [n_c^{-2} + 1/\epsilon_M]^{-1/2}$

$$Z_p = [\lambda / (2\pi n_c N)] (-\epsilon_{M''})^{1/2}$$

V důsledku absorpce světla v kovu je SPR navíc jen úzce vymezen ve směru osy x na oblast o efektivní délce  $L_\alpha$  propagační délka:

$$L_\alpha = \lambda(\epsilon_{M'})^2 / (2\pi N^3 \epsilon_{M''})$$

IOS a SPR jsou do jisté míry analogické systémy, které využívají vedení definovaného modu vlnění

- ✓ totálním vnitřním odrazem ve světlovodu
- ✓ podél rozhraní kov/dielektrikum

a generování exponenciální vlny v oblasti vzorku.

## IOS

TE<sub>0</sub> (s-polarizace)

TM<sub>0</sub>(p-polarizace)

## SPR

jen TM složka (méně informací)

## Vedení světla

u **IOS** je možné až na vzdálenost několika cm

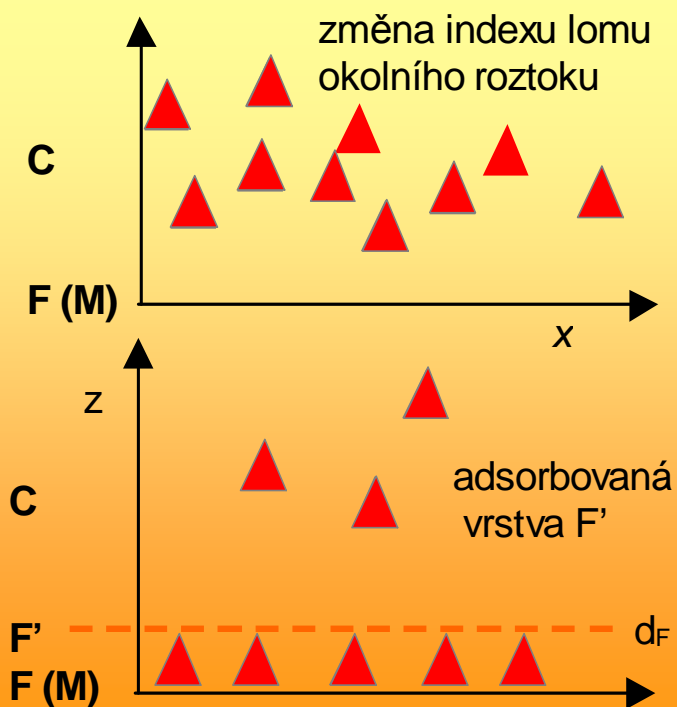
u **SPR** jen na  $L_{\alpha}$ , přičemž citlivost je úměrná délce dráhy interakce se vzorkem.

# FYZIKÁLNÍ CHARAKTERISTIKY IOS A SPR SYSTÉMŮ

System		N	$z_p$	$L_\alpha$	$\delta N/\delta n_c$	$\delta N/\delta d_F$
			(nm)	( $\mu\text{m}$ )		( $10^{-4} \text{ nm}^{-1}$ )
IOS	TE <sub>0</sub>	1.68	98	–	0.12	3.1
	TM <sub>0</sub>	1.55	126	–	0.26	4.8
SPR (TM <sub>0</sub> )	Au	1.44	180	4	1.27	15.3
	Ag	1.40	230	24	1.16	10.9

V tabulce udává  $\delta N/\delta n_c$  citlivost na změnu indexu lomu okolního prostředí (vzorek)  
a  $\delta N/\delta d_F$  citlivost na změnu tloušťky absorbované vrstvy.

## Změna efektivního indexu lomu



- ❖ homogenní změna indexu lomu  $\Delta n_c$  celého okolního prostředí C (roztoky pufrů  $n_c = 1,33$ ), systém tedy funguje jako refraktometr to je z hlediska sensoru nežádoucí.
- ❖ tvorba homogenní adsorbované vrstvy F' je vlastní děj, má index lomu  $n_{F'}$  a tloušťku  $d_{F'}$  např. pro vrstvu bílkovin je index lomu  $n_{F'}$  1,45 - 1,55 a tloušťka vrstvy  $d_{F'}$  4 - 10 nm



pokud se oba jevy současně:

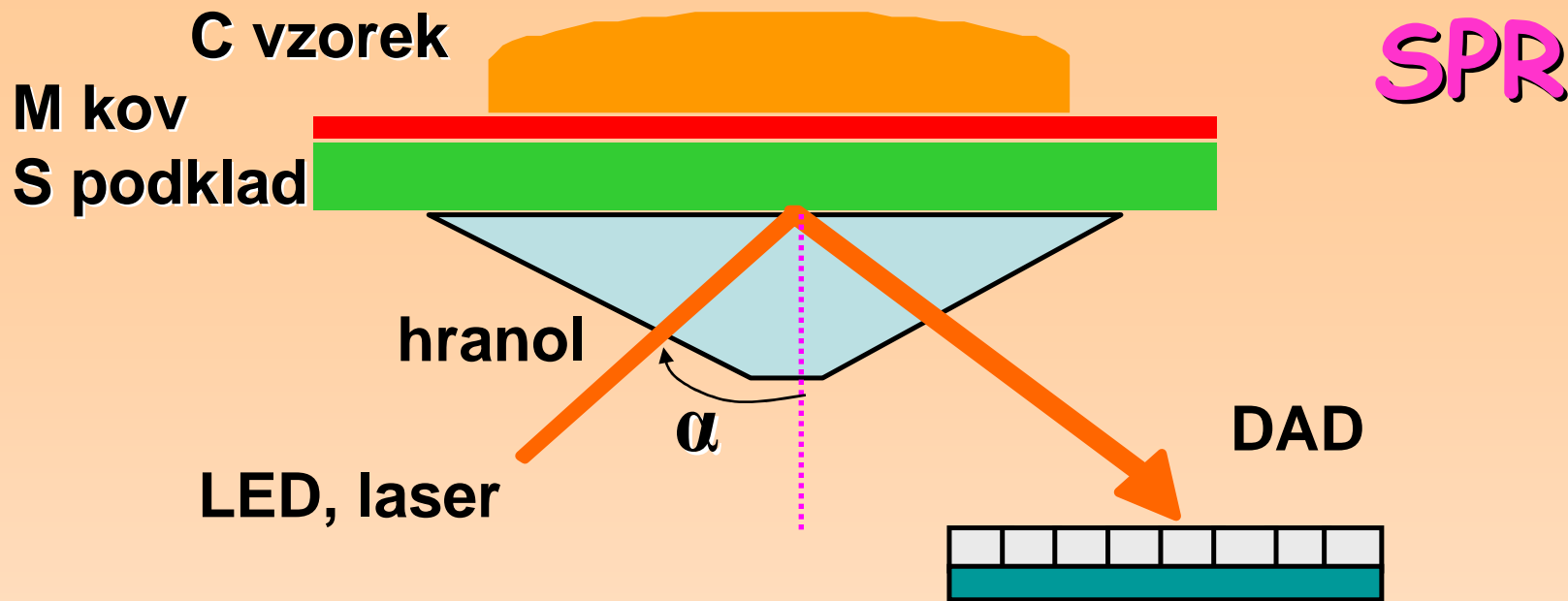
celková změna indexu lomu:

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

citlivost na změnu tloušťky adsorbované vrstvy

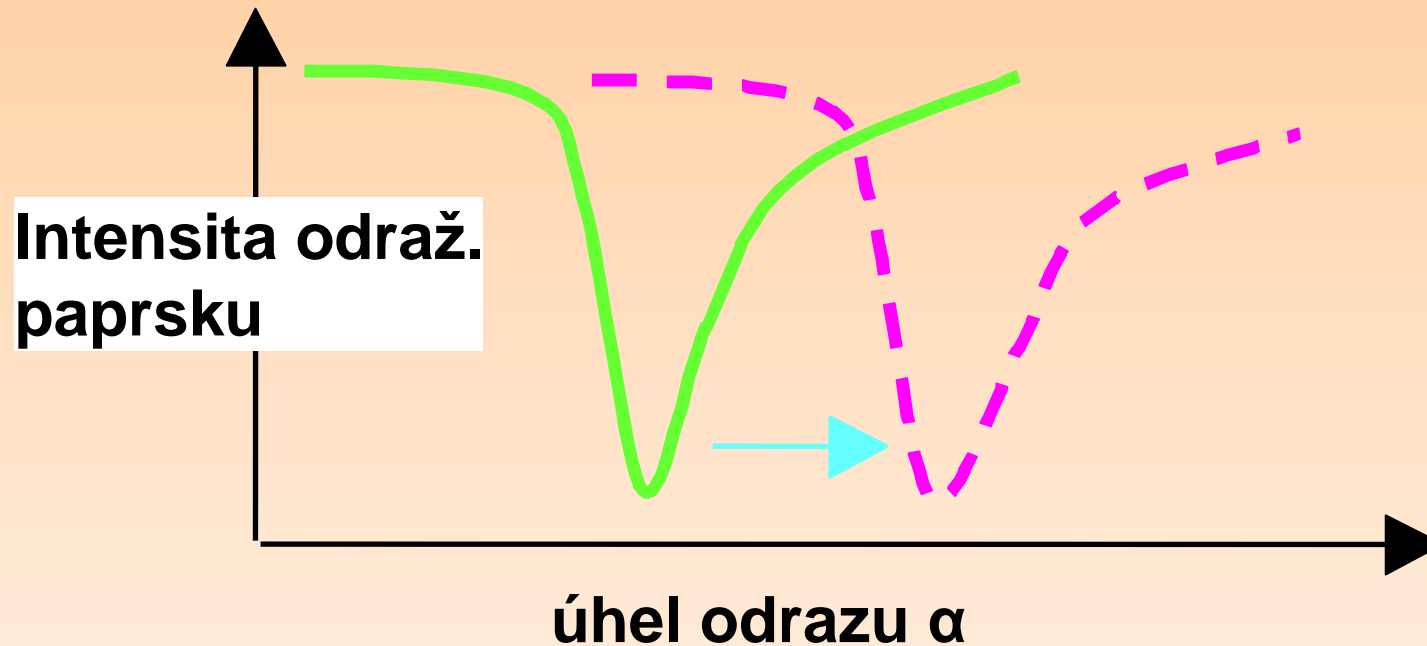
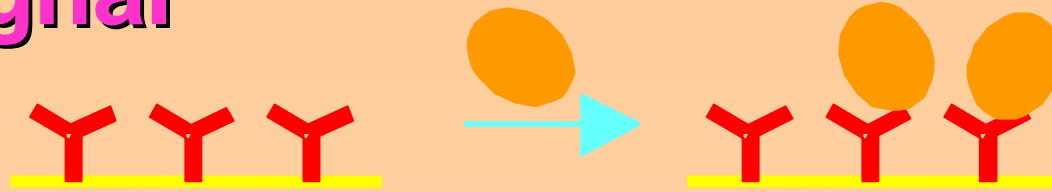
je nepřímo úměrná penetrační hloubce:

$$(\delta N / \delta d_{F'}) \approx (1/z_p) (\delta N / \delta n_c)$$



- ❑ Pro zavedení světla se používá vstupní hranol, povrchová vlna se excituje na rozhraní mezi kovem M a dielektrickou vrstvou C (vzorek).
- ❑ Místo hranolu lze použít i vstupní mřížku
- ❑ Jako detektor slouží řada fotodiod (DAD, diode array detector), což umožňuje určit závislost intenzity a úhlu odrazu

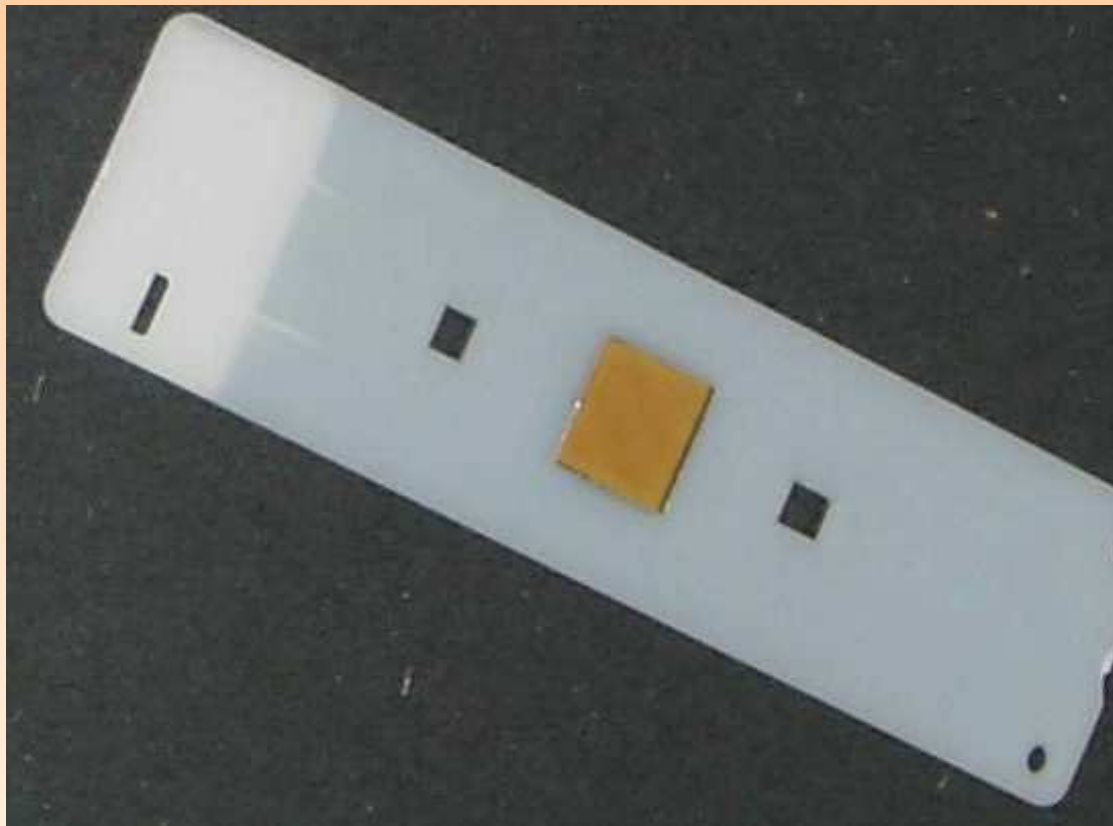
# SPR signál



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

# SPR BIOSENSOR

čip systému  
BIACORE



Rozměry:  
9 x 2,5 x 0,1 cm

citlivá vrstva:  
napařené zlato

Modifikace povrchu:  
CM5 karboxymethyl-dextran, HPA hydrofobní,  
SA streptavidinový, NTA komplexace kovů

Výměnný integrovaný čip: 140 x 30 mm  
čtyřkanálové měření  
každý kanál: miniaturní průtočný systém  
s pneumatickými ventily  
průtoky: 10  $\mu$ l/min

### Ceny

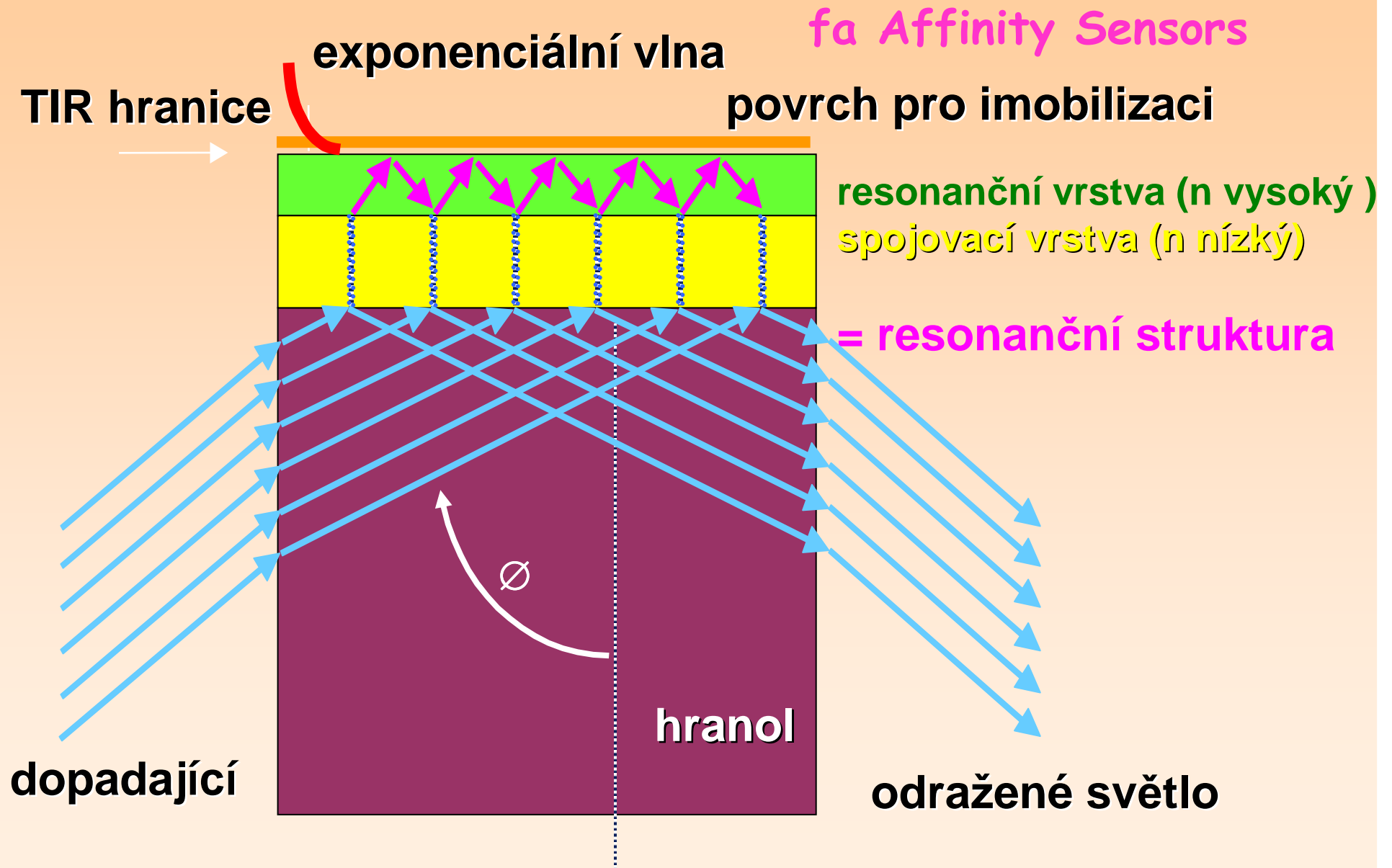
cena sensoru: 100 USD

celý systém BIACore: 250 tisíc USD

firma Pharmacia



# Rezonanční zrcadlo IASys

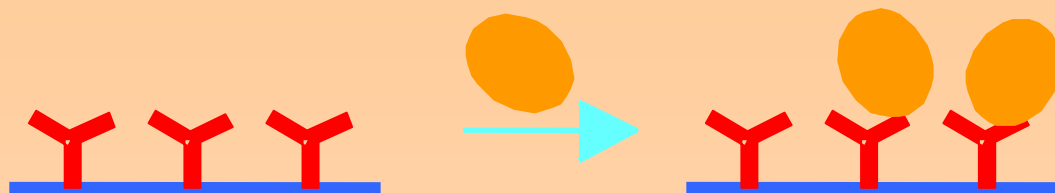


**PRINCIP:** Světlo dopadající hranolem se při určitém úhlu váže přes spojovací vrstvu (sklo, tloušťka asi 1  $\mu\text{m}$ ) do světlovodu - dielektrické rezonanční vrstvy (materiál  $\text{TiO}_2$ , tloušťka kolem 100 nm). Poté se světlo šíří podél jeho povrchu a odráží se zpět do spojovací vrstvy.

- ✓ Rezonance vnáší **fázový posun** světelného paprsku, který je přesně  $\pi$  při existenci rezonance.
- ✓ Rezonance pro složku elektrickou TE a magnetickou (TM) (slouží jako **reference**).
- ✓ Mimo oblast rezonance je signál téměř nulový.
- ✓ Lepší citlivost než SPR



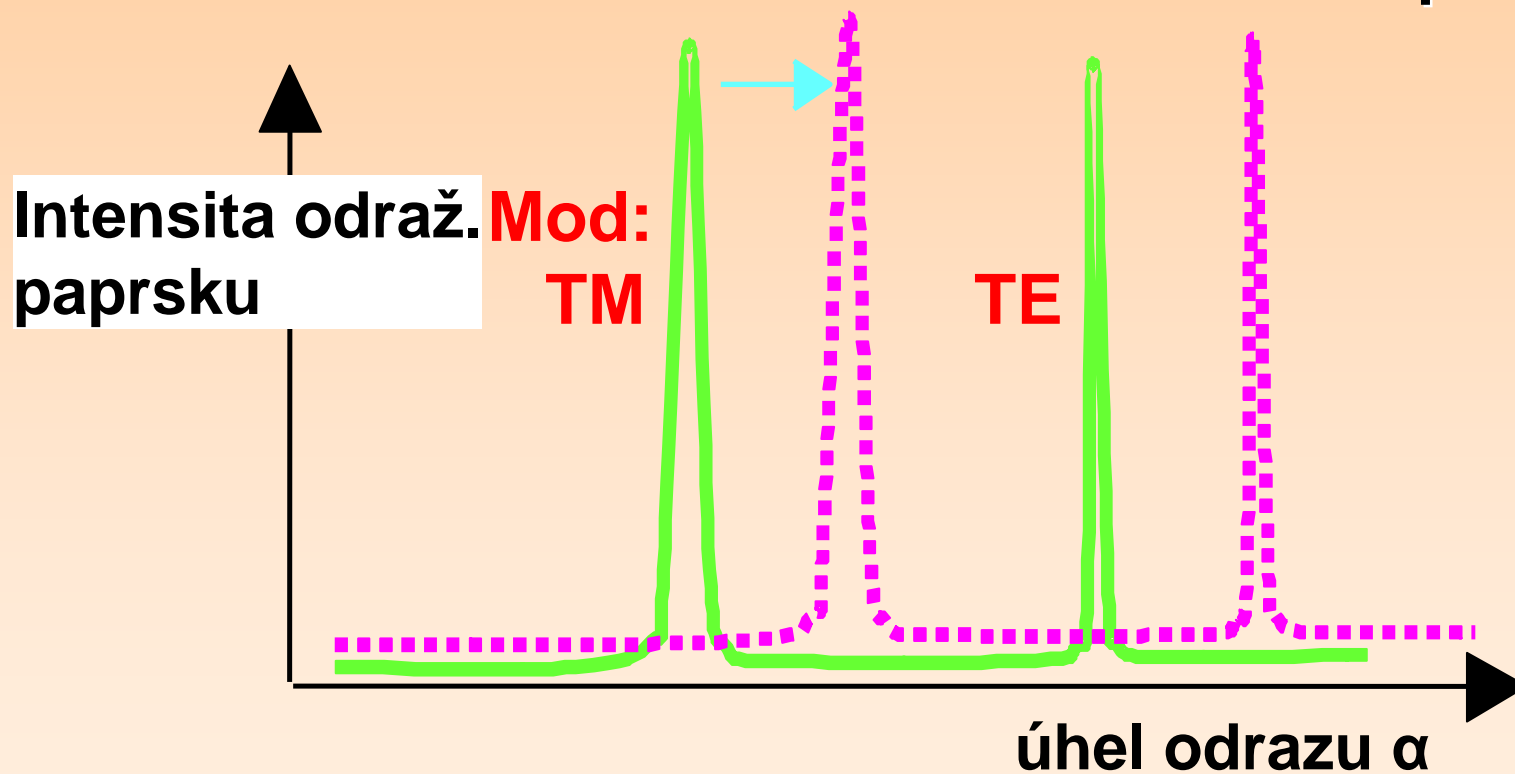
# REZONANČNÍ ZRCÁTKO - SIGNÁL



Vazebná reakce

=>

změna rezonančních podmínek



# Rezonanční zrcátko -sensor

Výměnná měřicí kyveta systému IASys



Rozměry:  
5 x 2 x 3

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

## Další parametry

- ✓ rozlišení tloušťky navázané biovrstvy je 10 pm
- ✓  $10^{-4}$  změna indexu lomu v okolí
- ✓ pracuje se v míchaném uspořádání,
- ✓ objem reakční komůrky je 200  $\mu$ l
- ✓ cena zařízení je 85 až 200 tisíc USD (podle míry automatizace)

# Komerční optické systémy

**Biacore 2000 (Biacore)**  
[www.biocore.com](http://www.biocore.com)



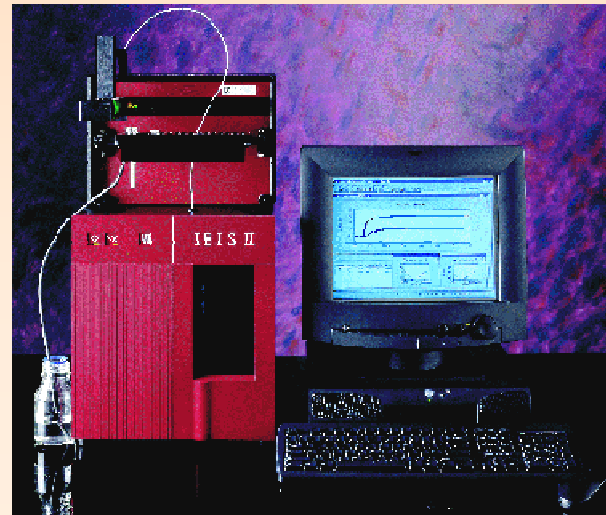
**KI 1 (BioTuL)**  
[www.biotul.com](http://www.biotul.com)



**IASys (Affinity Sensors)**  
[www.affinity-sensors.com](http://www.affinity-sensors.com)



**IBIS II (XanTec)**  
[www.xantec.com](http://www.xantec.com)

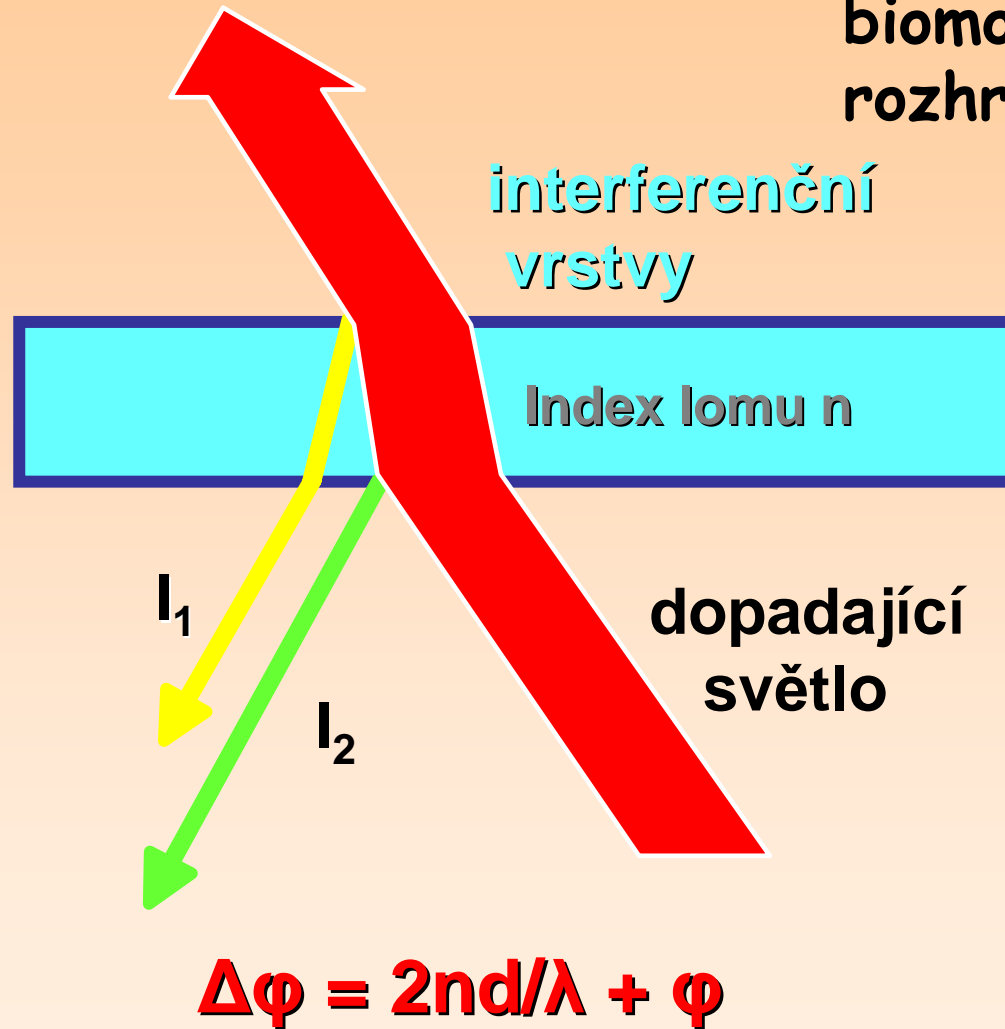


# RIFS - reflektometrická interferenční spektroskopie

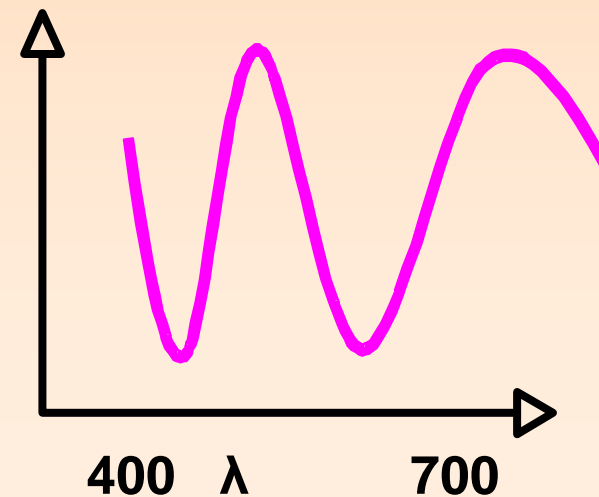
Nejcitlivější metodika přímého optického sledování bioafinitních interakcí.

- ✓ Základem je interference na tenkých průhledných filmech.
- ✓ Světelný paprsek procházející slabě odráživým tenkým filmem bude částečně odrážen na každém rozhraní.
- ✓ Různě odražené paprsky prochází různými optickými dráhami, vzniká u nich **fázový posuv**.
- ✓ Pro tenké filmy je interference pozorována i pro bílé světlo.
- ✓ To vede k modulaci intenzity odraženého světla v důsledku destruktivní interference.

Výsledkem je charakteristické spektrum reflektance, jehož tvar se mění po navázání biomolekul na citlivou plochu rozhraní. Detektor je DAD



Rozlišení tloušťky biovrstvy je asi 1 pm.



## Použití bioafinitních sensorů

- ✓ Pomocí imobilizovaného ligandu lze stanovit odpovídající analyt.
- ✓ V séru je možné stanovit 1 až 100  $\mu\text{g/l}$  pro proteiny při délce analýzy 10 minut.
- ✓ Studium bioafinitních interakcí (charakterizace protilátek, mapování vazebných míst).
- ✓ Kinetické studie (určování asociačních, disociačních a rovnovážných vazebných konstant).

## VÝHODY

- ✓ práce bez nutnosti značení, přímé sledování interakcí „v reálném čase“
- ✓ rychlost měření
- ✓ značný stupeň automatizace

## NEVÝHODY

- ✓ nižší citlivost oproti technikám využívajícím citlivé značky
- ✓ opakované použití biosensoru je podmíněno regenerací citlivého povrchu (zředěný NaOH, HCl, HCOOH, glycin o nízkém pH, organickými rozpouštědly s vodou, rozštěpit proteiny pomocí proteinas
- ✓ vysoká cena zařízení



# Piezoelektrické sensory

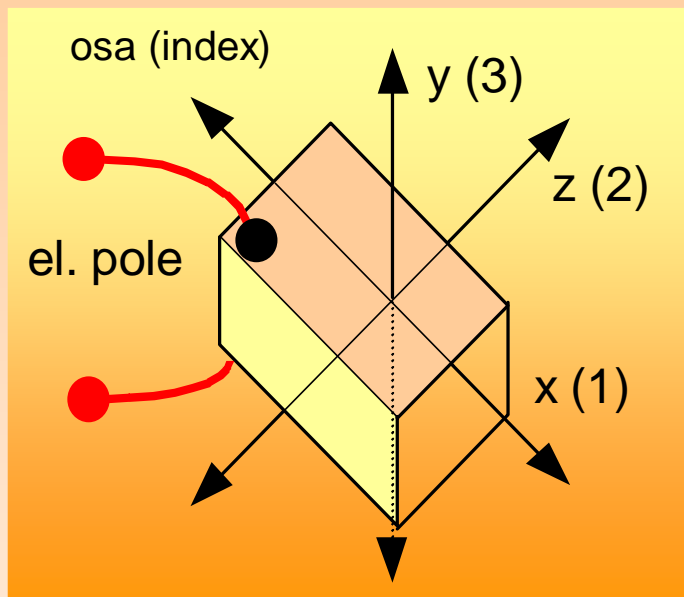
## Objev piezoeletrického efektu bratři Curieové (1890)

V některých anizotropních krystalech (křemen, turmalín, Rochellova sůl) se při mechanickém namáhání generují orientované dipóly a vznik elektrické napětí.

Tento efekt se uplatňuje i v obráceném smyslu:

Pokud se na krystal přivede střídavé napětí o vhodné rezonanční frekvenci, začne krystal se stejnou frekvencí vibrovat, přitom se převážná část energie ( $10^5 : 1$ ) uchová v oscilujícím systému a nerozptyluje se do okolí.

# ORIENTACE PIEZOELEKTRICKÉ DESTIČKY



Orientace krystalografických os:  
tenký řez krystalu jsou podle  
tvaru krystalu možné vibrace:

Mechanické deformace

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

Předpokládá se, že elektrické pole ve směru osy y ( $d_3$ )

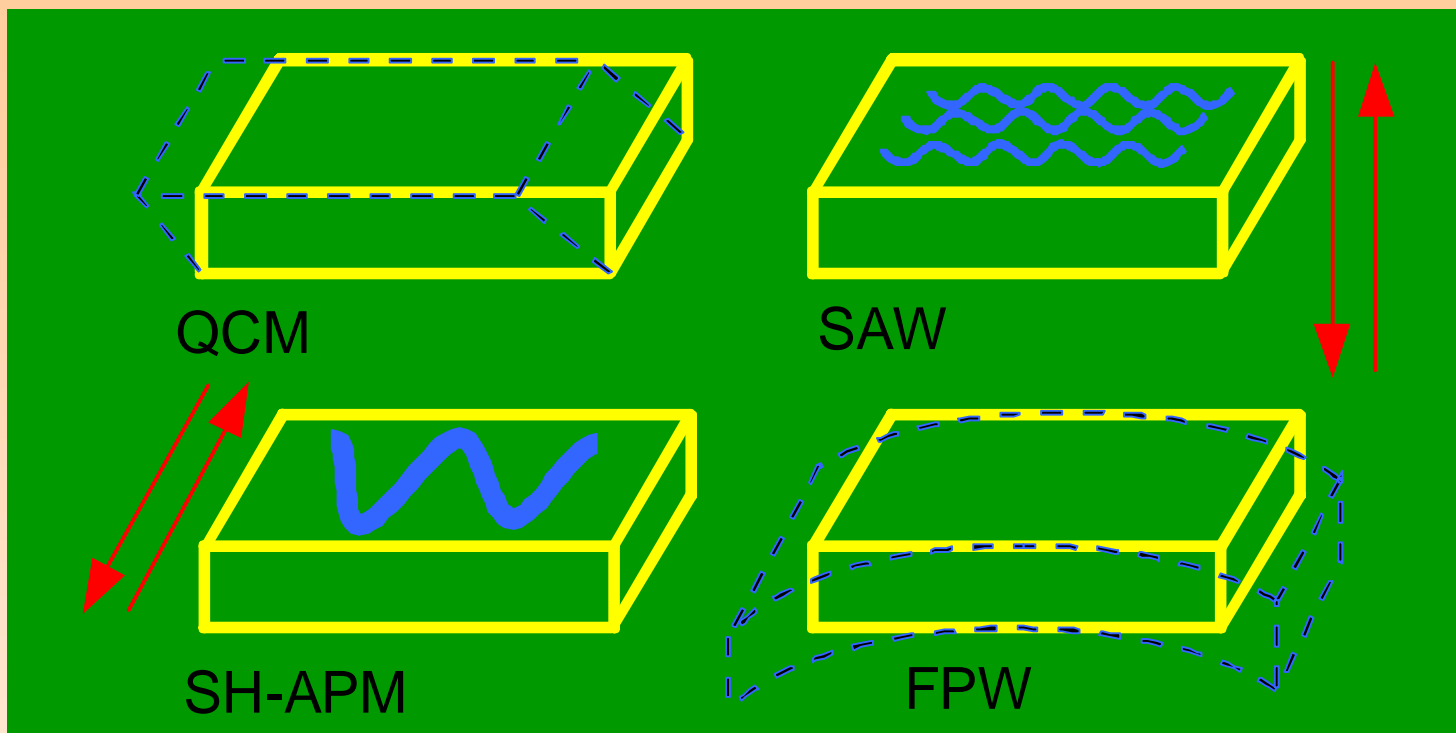
# Materiály pro piezoelektrické krystaly

**PŘÍRODNÍ** monokrystaly křemene, sensor se připraví vyřezáním destičky pod přesnými úhly (řezy AT, BT, ST...)

**UMĚLÉ** materiály (dnes i křemen), různé druhy keramiky: polykrystalické, ale uniaxiální (orientované), příprava se provádí sintrováním (ZnO, LiNbO<sub>3</sub>, LiTaO<sub>3</sub>, Bi<sub>12</sub>GeO<sub>20</sub>)  
Výhoda: snadné tvarování a nanášení tenkých vrstev.

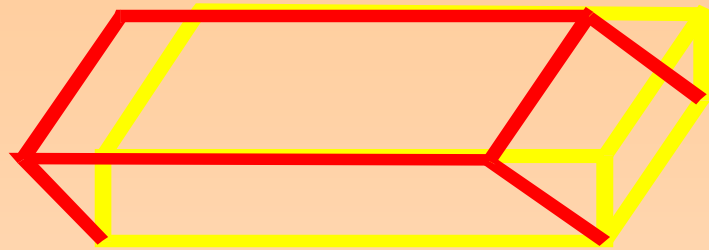
**PLASTY** polyvinylidenfluorid PVDF (-CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>  
směs amorfní a polykrystalická forma (1:1)  
sestává se z nepolární náhodně orientované a polární orientované složky

# VIBRACE PIEZOSENSORŮ



V piezoelektrických systémech může oscilace probíhat v celém objemu materiálu nebo pouze v povrchové vrstvě. Někdy se uplatňuje několik oscilací současně. QCM quartz crystal microbalance, SAW surface acoustic wave, SH-APM shear horizontal acoustic plate mode, FPW flexural plate wave (Lambova vlna)

# Piezosensory - chemické mikrováčky

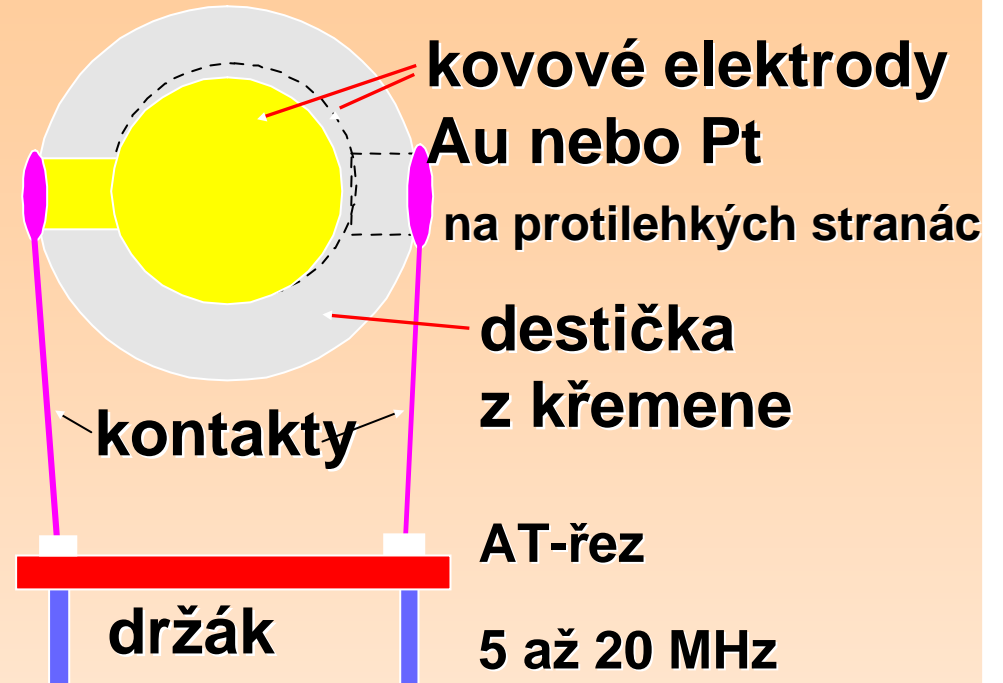


objemová akustická vlna -  
schéma tloušťkové  
střihové vibrace

základní stav / amplituda

Hmotnostní citlivost:

**QCM** - quartz crystal  
microbalance



Piezoelektrický krystal

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

Rezonanční frekvenci  $f_0$  určují fyzikální vlastnosti křemene a tloušťka destičky (čím je tenčí, tím rychlejší vibrace a vyšší  $f_0$ )

U typu QCM bývá  $f_0$  od 5 do 20 MHz, pokud by krystal byl ještě tenčí, lámal by se.

Když dojde k navázání látky na povrch elektrod, dojde ke změně rezonanční frekvence  $f_0$ .

Změní se hmotnost celého systému a vibrace se zpomalí - frekvence poklesne.

Pokud krystal osciluje **v přítomnosti kapaliny**, dojde k dalším změnám  $f_0$  v důsledku tlumení oscilací (viskozita prostředí)

## Dva způsoby měření z piezoelektrickými krystaly

### Aktivní metoda

PZ krystal je součástí širokopásmového oscilačního obvodu, jehož frekvence se řídí vlastnostmi krystalu aktuální frekvence se stanoví pomocí čítače, rozlišení je 0,1 až 1 Hz při základní frekvenci 10 až 20 MHz citlivost kolem 3 ng/Hz a mez detekce 10 ng/cm<sup>2</sup>

### Pasivní metoda

Na PZ krystal se zvenčí přivádí střídavé napětí o známé proměnné frekvenci a v okolí rezonance se proměří impedanční charakteristika, závislost velikosti  $|Z|$  a fázového úhlu  $\phi$  na frekvenci. Nákladná aparatura, impedanční analyzátor několik milionů korun, ale **odliší hmotnostní a viskózní změny**.

# Oscilační obvod

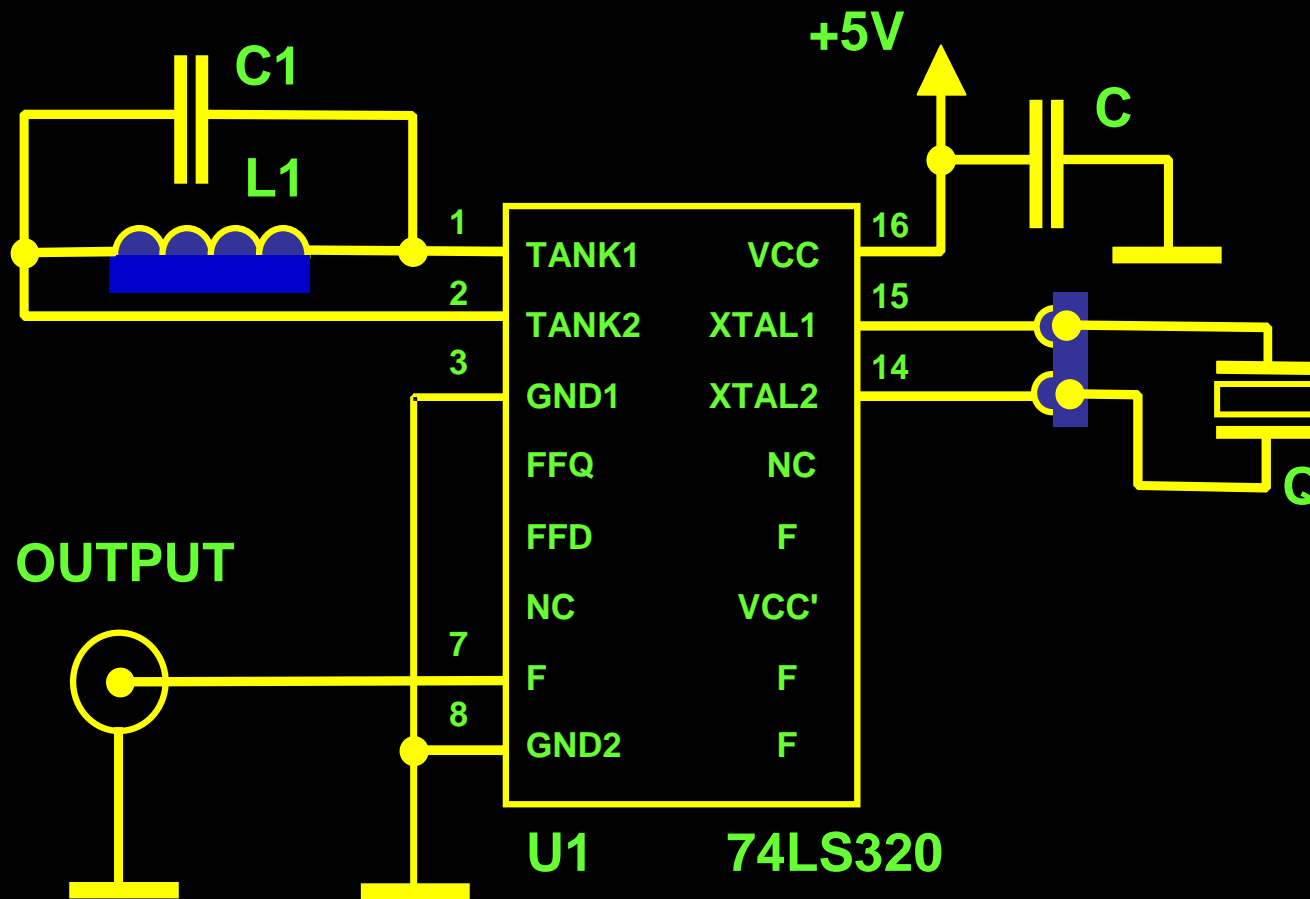


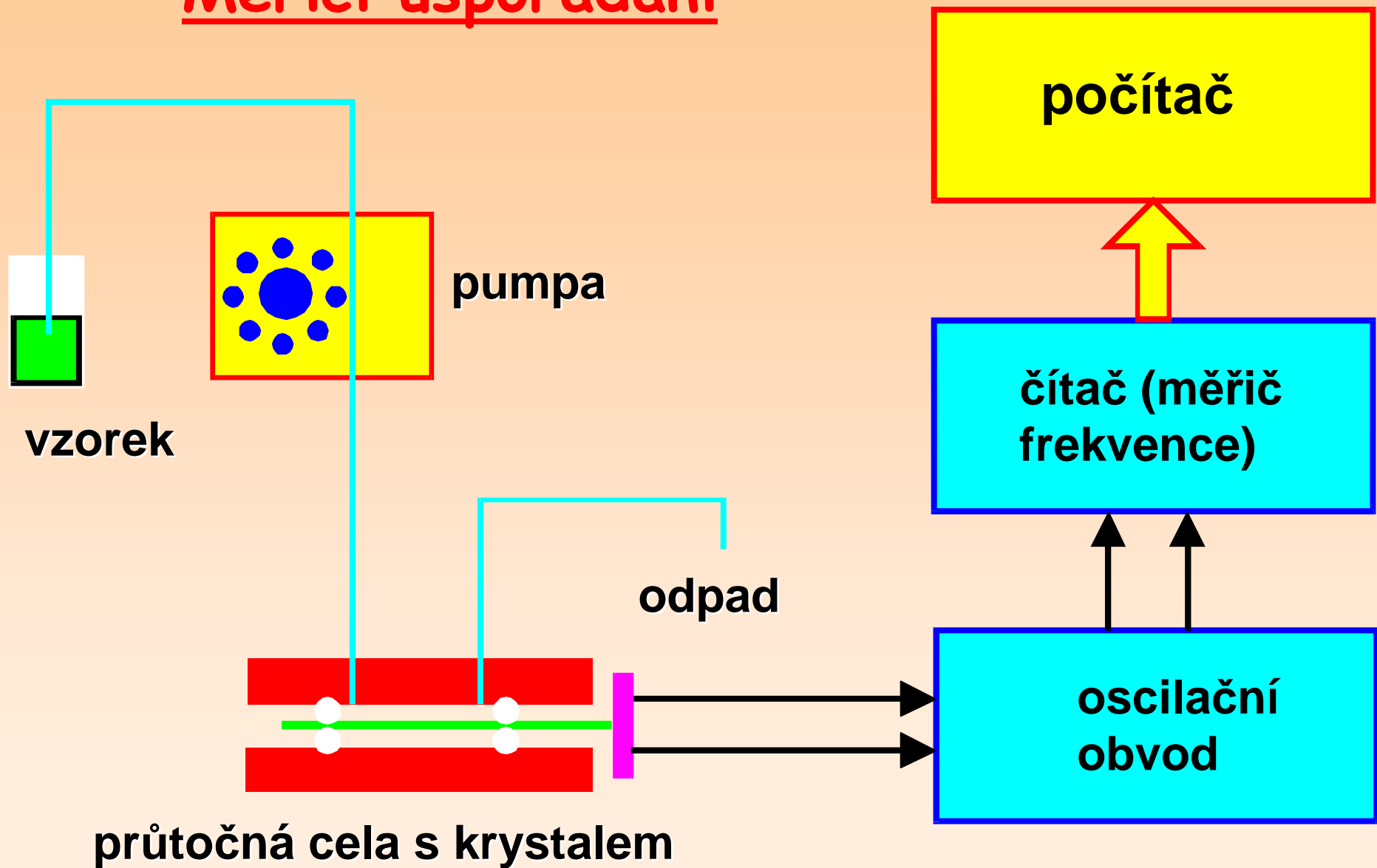
schéma hradlového oscilátoru



Nejjednodušší oscilační obvody využívají logická hradla, jiné operační zesilovače.

Hmotnostní sensory jsou jednoduché levné, ale principiálně nelze odlišit hmotnostní změny od viskózních.

# Měřicí uspořádání



Piezoelektrický biosensor se získá immobilizací ligandu na povrch elektrod krystalu a umístěním krystalu v průtočné komůrce. Potom je systém vhodný pro přímé sledování afinitních interakcí v reálném čase podobně jako optické systémy.

# UKÁZKA MĚŘICÍHO ZAŘÍZENÍ



Biochemická laboratoř MU Brno, PřF, katedra biochemie

## PIEZOSENSORY V KAPALINÁCH

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

hmotnost

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

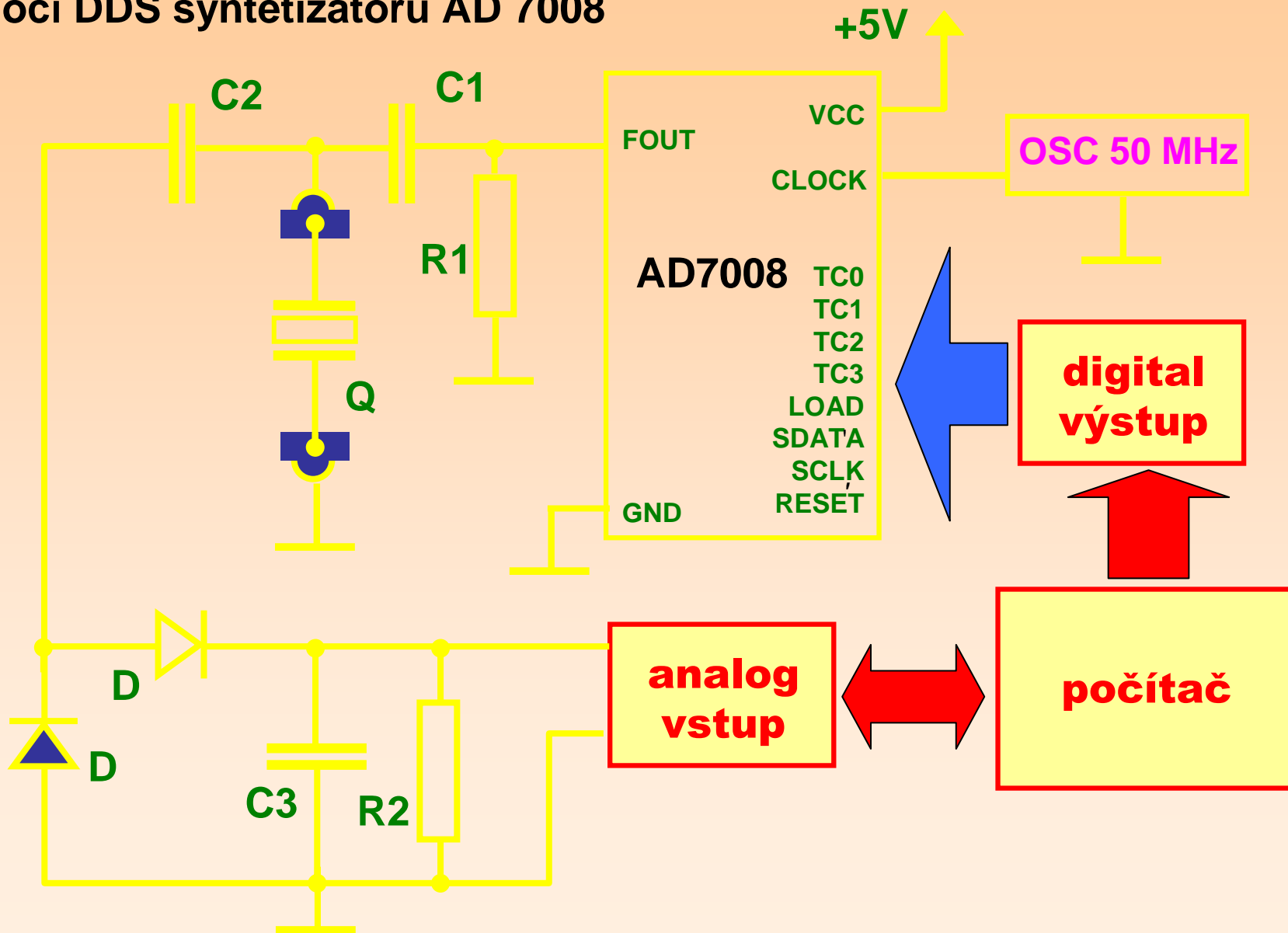
viskozita

Po dosažení příslušných konstant dostáváme pro hmotnostní změny ( $\Delta m$  v g,  $f_0$  v MHz,  $\Delta f$  v Hz,  $A$  v  $\text{cm}^2$  upravený vztah (Sauerbreyova rovnice):

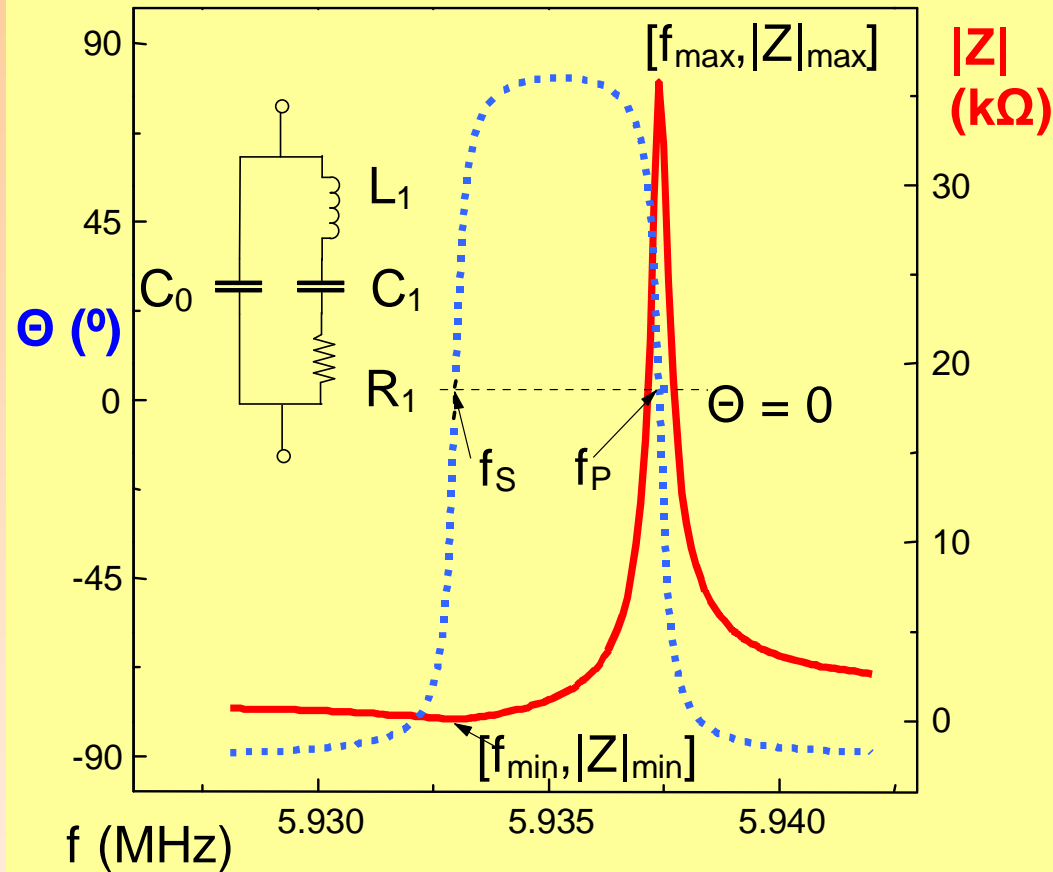
$$\Delta f = -2,26 \cdot 10^6 f_0^2 \text{ —}$$

# Impedanční měření

pomocí DDS syntetizátoru AD 7008



# IMPEDANČNÍ CHARAKTERISTIKA



## PASIVNÍ METODA

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

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

## Aplikace pizelektrických krystalů

**Pro plynou fázi:** základem je imobilizovaný afinitní ligand (např. formaldehyddehydrogenasa pro formaldehyd, cholinesterasa pro sarin, soman) nebo méně selektivní lipidické vrstvy pro charakterizaci vůní.

- ✓ reakce se vzorkem v roztoku, následovalo
- ✓ promytí, vysušení
- ✓ nová rezonanční frekvence opět v suchém stavu

**Výhoda:** snadná interpretace, naměřená data reprezentují změnu hmotnosti.

**Nevýhoda:** těžkopádné provedení



**Měření přímo v roztoku** umožňuje sledovat afinitní interakce v reálném čase. Třeba rozlišit změny hmotnosti a viskozity, i když u běžně používaných koncentrací biomolekul je viskozita jejich roztoků málo odlišná od základního pufru.

Piezoelektrická metoda je rychlejší a citlivější než klasické postupy.