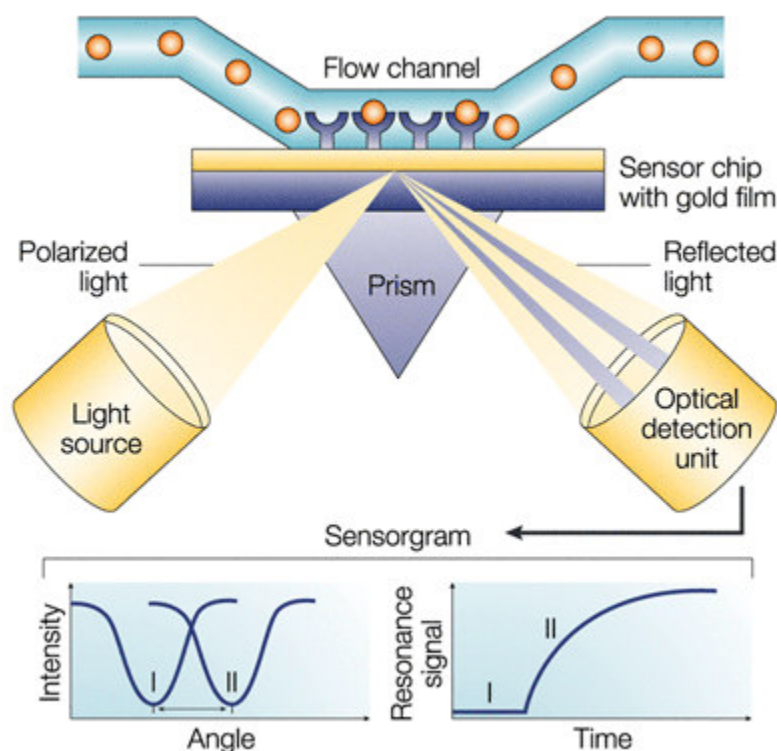


Úvod do SPR a popis přístroje

Co je SPR?

Povrchová plazmonová rezonance (surface plasmon resonance, SPR), či správněji rezonance povrchového plazmonu, se řadí mezi jednu z nejrozvinutějších optických detekčních technik. Označujeme tak děj, při kterém dochází ke změně úhlu odrazu záření od tenkých vrstev (typicky cca 50 nm) zlata, stříbra a dalších kovů. Záření je navíc polarizováno, neboť pouze vlny kolmé na rovinu povrchu (tzv. *p*-polarizace) mohou vyvolat SPR. Tento jev je důsledkem vzniku rezonance mezi zářením a povrchovými elektrony kovu (vznik tzv. povrchových plazmonů na rozhraní hranol (sklo) / kov (Au) / dielektrikum (voda, pufr) za podmínek úplného odrazu světla.

Povrchové plazmony jsou v podstatě hromadné excitace elektronů vázaných na rozhraní mezi vodičem a izolantem. Při dopadu lineárně *p*-polarizovaného paprsku na rozhraní dvou prostředí s rozdílnými indexy lomu vzniká povrchová (evanescentní) vlna. Je nutné, aby úhel dopadu paprsku na rozhraní mezi optickým hranolem a přímo kovem nebo ultratenkou dielektrickou vrstvou byl větší než tzv. mezní úhel dopadu, pak dochází k totálnímu odrazu a vzniku evanescentní vlny. Evanescentní vlna, nazývána též tlumená či zhášivá, interaguje s povrchovými plazmony kovové vrstvy a vzniká povrchová plazmonová vlna, což způsobuje pokles intenzity odraženého světla. Rezonance povrchových plazmonů tedy závisí na vlnové délce (energii), polarizaci a úhlu dopadu paprsku na rozhraní. Úhel dopadu, při kterém je intenzita odraženého světla nejmenší (rezonanční úhel), závisí na indexu lomu v blízkosti povrchu senzoru. Jestliže je na povrch senzoru navázána biomolekula, dojde ke změně indexu lomu tohoto prostředí a měřením změny úhlu, při němž dochází ke vzniku SPR, lze vazbu této látky detekovat. Při SPR experimentu je vždy jeden z vazebných partnerů imobilizován na povrchu optického senzoru (ligand) a druhý protéká okolo rozpuštěný v pufru (analyt). Tvorba jejich komplexu, stejně jako jeho disociace, je doprovázena změnou indexu lomu, resp. změnou rezonančního úhlu, která je přímo úměrná množství vázaného analytu (obr. 1). Celý proces lze snadno pochopit s pomocí názorných videí (např. [zde](#) a [zde](#)).

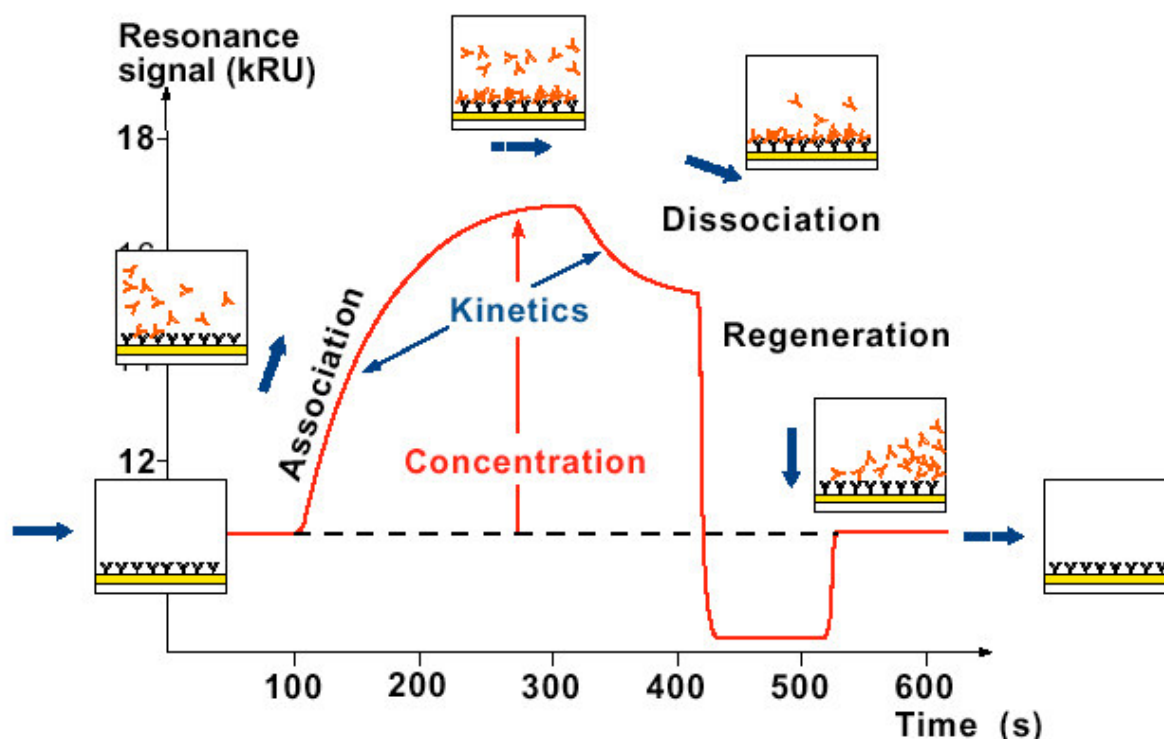


Obr. 1: Princip SPR.

Polarizované světlo dopadá skrze optický hranol a skleněnou podložku na tenkou zlatou vrstvu, dochází k rezonanci povrchového plazmonu a odražené světlo dopadající na detektor má v určitém úhlu sníženou intenzitu. Na opačné straně zlaté vrstvy je imobilizován ligand a proudí přes něj roztok pufru (stav I) či analytu (stav II). Pokud se analyt začne vázat na ligand, změní se tím index lomu v blízkosti zlaté vrstvy, posune se rezonanční úhel odraženého světla a tento posun je v časové závislosti vyjádřen jako nárůst SPR signálu, odpovídající množství vázaného analytu.

Měření se nejčastěji provádí sledováním závislosti intenzity odraženého monochromatického záření na úhlu odrazu nebo sledováním závislosti intenzity odraženého polychromatického záření při konstantním úhlu v závislosti na vlnové délce (energii) záření. Přístroj PLASMON-4, který budeme používat v této práci, využívá tento druhý způsob měření. Vazebné interakce jsou monitorovány v reálném čase a zaznamenávány v arbitrárních jednotkách (r.u. - resonance units) jako změny intenzity resp. posuny vlnové délky rezonančního maxima a sledováním těchto změn v čase vzniká tzv. senzogram (obr. 2; jak má vypadat správný senzogram viz např. [zde](#)). Z takto vzniklé kinetické křivky (či spíše souboru křivek pro různé koncentrace analytu) je následně možné získat informaci o množství stanovované látky ve směsi, rychlostní konstanty asociační a disociační fáze (tzv. k_{on} a k_{off}) a vypočítat rovnovážnou konstantu reakce, která je měřítkem afinity dané interakce.

Pro analýzy s využitím těchto biosenzorů lze např. využít interakcí protilátky s antigenem, nukleové kyseliny s vazebnou bílkovinou, enzymu se svým substrátem, kofaktorem, inhibítorem nebo receptoru s mikroorganismem, buňkou, dále reakcí hormonu s receptorem, léčiva s receptorem nebo také hybridizaci komplementárních řetězců nukleové kyseliny. Nejčastěji jsou pro SPR jsou využívány senzory s deponovanou nanovrstvou zlata. Povrch senzoru je vhodné před navázáním požadované biomolekuly vhodně aktivovat. Pro aktivaci povrchu čipu se využívají nejrozličnější organické sloučeniny a je nutné, aby aktivace povrchu čipu i pozdější imobilizace biomolekul byla dlouhodobě stabilní. Tuto podmínku lze nejlépe zajistit vytvořením kovalentní vazby mezi biomolekulou a reaktivní skupinou organické sloučeniny aktivovaného povrchu. Velmi pevná vazba existuje mezi zlatem a sírou, proto se nejčastěji zlaté povrchy aktivují adsorpcí thiosloučenin, které na svém druhém konci obsahují reaktivní skupinu využitelnou pro další imobilizační krok, tedy navázání biomolekuly, která bude sloužit jako ligand pro zachycení stanovovaného analytu.



Obr. 2: Senzorgram. Typický SPR experiment zahrnuje modifikaci zlatého povrchu reaktivním činidlem, na nějž je v dalším kroku kovalentně navázán ligand (zde nezobrazeno). Poté následuje vlastní kinetické měření vazby analytu, rozlišitelné na fázi asociace (k_{on}), která může dosáhnout rovnováhy (pro přímé určení K_D); při omývání pufrům dochází opět k disociaci (k_{off}), po níž zpravidla následuje regenerace povrchu čipu (je-li vazba analytu vratná) a jeho reekvilibrace - v ideálním případě je čip nezměněn (r.u. stejné jako na počátku) a lze opakovat měření s jinou koncentrací analytu.

Jak pracuje PLASMON-4?

PLASMON-4 je optický senzor založený na metodě rezonance povrchových plasmonů (surface plasmon resonance - SPR). Senzor PLASMON-4 je vhodný pro řadu výzkumných aplikací, především pro pozorování a kvantifikaci (bio)molekulárních interakcí a charakterizaci tenkých vrstev.

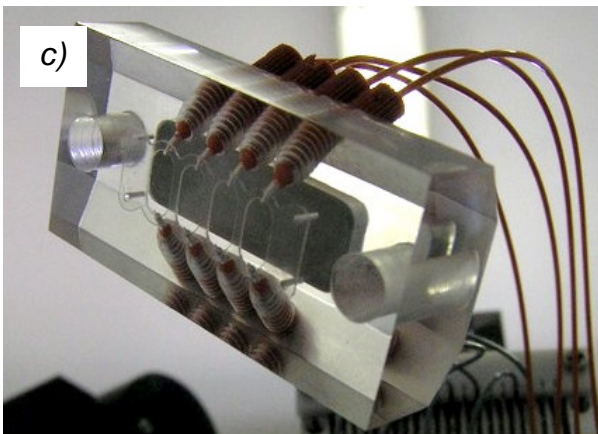
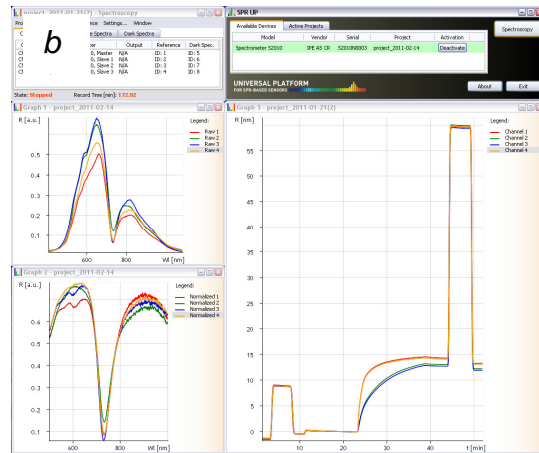
Plasmon-4 se skládá z optického systému pro excitaci povrchových plasmonů, fluidického systému s průtokovou komorou a jednotky teplotní stabilizace. Pro měření se používají vyměnitelné SPR čipy obsahující tenkou vrstvu zlata. Excitace povrchových plasmonů je prováděna optickou vlnou metodou totálního tlumeného odrazu v tzv. Kretschmannově geometrii. Změny konstanty šíření povrchových plasmonů v důsledku změn indexu lomu při povrchu tenké vrstvy zlata jsou určovány ze změn ve spektru optické vlny (obr. 3 na další straně).

PLASMON-4: hlavní charakteristiky

- Čtyři nezávislé (paralelní) měřicí kanály.
- Optimalizovaný laditelný optický systém umožňující měření v prostředích s širokým rozsahem indexu lomu.
- Polychromatický zdroj světla s vysokým výkonem a zobrazovací spektrometr využívající maticový detektor pro vysoké rozlišení změn indexu lomu.
- Uživatelsky přívětivý software pro prostředí Windows provádí čtení a zpracování vstupních dat a nastavení hlavních parametrů měření. Výsledná data lze exportovat do textového souboru pro následnou analýzu pomocí uživatelem preferovaných softwarových nástrojů.
- Fluidický systém pro distribuci kapalných vzorků skládající se z mikrofluidní průtokové komory a 4-kanálové peristaltické pumpy s nastavitelnou rychlostí.
- Teplotní stabilizace umožňující nastavení pracovní teploty a její udržování s vysokou přesností.

PLASMON-4: specifikace

Počet měřících kanálů	4
Pracovní rozsah indexu lomu (v jednotkách indexu lomu)	1,2 - 1,4
Rozlišení (v jednotkách indexu lomu)	$3 \cdot 10^{-7}$
Přesnost teplotní stabilizace (v °C)	0,02
Pracovní rozsah teplotní stabilizace (v °C)	10 – 50
Operační systém	Windows



Obr. 3: PLASMON-4.

a) PLASMON-4 - celkový pohled (v popředí peristaltická pumpa a teplotní kontroler).

b) Software pro zpracování dat.

c) Mikrofluidická průtoková komora.

d) Pohled pod kryt průtokové komory.

e) Schéma principu přístroje.

