

URZĄDZENIE DO OZNACZEŃ METODĄ POWIERZCHNIOWEGO REZONANSU PLAZMONÓW ORAZ SPOSÓB WYKONYWANIA OZNACZENIA TĄ METODĄ

DZIEDZINA TECHNIKI

- 5 Przedmiotem wynalazku jest urządzenie do oznaczeń metodą powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej. Urządzenie to umożliwia przeprowadzanie pomiarów jakościowych i ilościowych związków chemicznych w próbkach. Wynalazek dotyczy również sposobu wykonywania oznaczenia metodą powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej.

10 STAN TECHNIKI

W dziedzinie pomiarów ilościowych i jakościowych związków chemicznych znana jest metoda detekcji wykorzystująca Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji obrazowej - SPRI (z ang. Surface Plasmon Resonance Imaging). Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (ang. Surface Plasmon Resonance Imaging) jest niezwykle skutecznym

15 narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków. Została przedstawiona m.in. w pracach Lee H.J., et al., J. Physiol., 2005: 563, 61-71; Lee H.J., et al., Anal. Chem. 2006: 78, 6504-10; Fang S., et al., J. Am. Chem. Soc., 2006: 128, 14044-46; Gorodkiewicz E., Protein Pept. Lett., 2009: 16, 1379-85; Gorodkiewicz E., et al., Protein Pept. Lett., 2010: 17, 1148-54; Gorodkiewicz E., et al., Microchim. Acta, 2011: 175, 177-184; Gorodkiewicz E., et al.,

20 Microchim. Acta, 2012: 176, 337-43; Gorodkiewicz E., et al., Cent. Eur. J. Chem., 2014: 12, 557-67, Sankiewicz A., et al., Analyt. Biochem., 2015: 469, 4-11, Grzywa R., et al., Eur. J. Ob. Gyn. Rep. Biol., 2014: 182, 38-42, Laudański P., et al., Eur. J. Ob. Gyn. Rep. Biol., 2013: 169, 80-83 oraz wielu innych. W pomiarach wykonywanych znanymi urządzeniami wykorzystywany jest element, w skład którego wchodzi zwykle pryzmat lub płytka szklana, pokryty cienką

25 warstwą metalu (np. złota), tak że metal jest w kontakcie z roztworem zawierającym badane cząsteczki ulegające adsorpcji. Analizowany roztwór stanowi ośrodek o mniejszej gęstości optycznej od pryzmatu lub płytki szklanej. Technika ta wykorzystuje fakt, że metale (takie jak złoto) charakteryzują się tym, że występuje w nich tzw. gaz elektronowy, czyli swobodne

elektrony krążące pomiędzy węzłami sieci krystalicznej. Swobodne elektrony oscylują i zachowują się jak powierzchniowe fale elektromagnetyczne (plazmony). Plazmony mogą rezonować z promieniami świetlnymi padającymi pod odpowiednim kątem na powierzchnię sensora. W warunkach rezonansu ściśle określona ilość energii padającej fali świetlnej jest pochłaniana przez plazmony, co skutkuje spadkiem energii fali odbitej, obserwowanym jako tłumienie odbitego sygnału. Nawet bardzo niewielkie zmiany na powierzchni metalu, takie jak np. adsorpcja pojedynczych cząsteczek, powodują zmianę warunków rezonansu co przejawia się przesunięciem kąta odbicia, dla którego rejestrowane jest tłumienie.

Technika ta nie wymaga znakowania cząsteczek i jest bardzo czuła. Jest ona często wykorzystywana w analizie oddziaływań międzycząsteczkowych (np. wiązania się antygenów z przeciwciałem).

Znane w stanie techniki sposoby pomiaru wykorzystują zwykle analizę w przepływie ciągłym, w układzie przepływowym, np. mikroprzepływowym. Zaletą jest możliwość rejestracji zmian sygnału w czasie, co pozwala np. na analizę parametrów kinetycznych oddziaływania. Układy przepływowe stosowane w urządzeniach znanych w stanie techniki pozwalają też często na pomiar wieloparametryczny pojedynczej substancji. W typowej konstrukcji jest to pojedyncza komora pomiarowa przez którą przepływa mierzona substancja i obserwowana jest zmiana sygnału SPR w jednym lub różnych punktach pomiarowych – czułych na różne grupy cząsteczek. Wadą tych metod jest konieczność dokładnego czyszczenia i możliwość zanieczyszczeń, szczególnie przy niewielkich stężeniach. Wiele znanych rozwiązań obejmuje złożone sposoby wzmacniania sygnału w celu podniesienia ich użyteczności analitycznej.

W dokumencie US20010026943 opisano stacjonarny układ pomiarowy do zastosowania w metodach SPR, jednakże pomiar wykonywany jest w obecności roztworu. Podobnie, dokument WO1995022754 ujawniał układ pomiarowy nie będący układem przepływowym, w którym pomiar prowadzony jest w studzienkach, w obecności roztworu.

Twórcy niniejszego wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, że obecność roztworu podczas pomiaru osłabia sygnał analityczny, a pomiar bez roztworu umożliwia czulsze pomiary w zakresie niskich stężeń, przykładowo odpowiednim dla oznaczania wielu biomarkerów. Nie ma wówczas konieczności dodatkowego zateżenia próbki. Twórcy opracowali więc urządzenie do wykonywania pomiarów w układzie stacjonarnym przystosowane do usuwania cieczy przed pomiarem SPRi. Pomiar obejmuje immobilizację czynników wiążących (np. przeciwciał, receptorów, inhibitorów, aptamerów i in.) na powierzchni sensora, odczyt sygnału przed nałożeniem analitu, po czym nałożenie próbki analitu w roztworze. Czynniki wiążące wyłapują analit z analizowanego roztworu. W następnym etapie następuje przepłukanie i usunięcie

cieczy, po czym dokonany zostaje pomiar SPRi przy nieobecności roztworu. Taka procedura pomiarowa zapewnia pomiar ilościowy cząsteczek analitu przyłączonych do powierzchni czulej (z czynnikiem wiążącym). Wszystkie niezwiązane cząsteczki analitu są usuwane z powierzchni czulej w procesie płukania. Sam pomiar następuje po usunięciu/odparowaniu 5 substancji użytej do płukania w otoczeniu powietrza.

Opracowane przez Twórców urządzenie obejmuje więc sensor o geometrii umożliwiającej usunięcie cieczy po wyłapaniu analitu z próbki. Pomiar wykonywany w otoczeniu powietrza możliwy jest dzięki poziomej pozycji płytki sensora w urządzeniu. Dla zapewnienia jednolitego ośrodka optycznego stosowany może być olejek immersyjny pomiędzy płytką sensora a 10 powierzchnią pryzmatu, przy czym olejek immersyjny ma taki sam współczynnik załamania światła jak materiał pryzmatu. Dodatkowe cechy ułatwiające pomiar to:

1. Zastosowanie mocowania pryzmatu i płytki sensora wraz z uchwytem utrzymującym pozycję sensora (zastosowanie olejku immersyjnego powoduje bowiem samoczynne przesuwanie się płytki sensora na powierzchni pryzmatu) (Fig. 1)
- 15 2. Korzystnie, konstrukcja płytki sensora, w którym kropla analitu i środka wykorzystywanego do płukania utrzymywana jest w miejscu pomiaru, oprócz sił napięcia powierzchniowego dodatkowo poprzez warstwę polimeru o właściwościach hydrofobowych (Fig. 2). Korzystnie, sensor obejmuje pewną liczbę cel/komór pomiarowych na powierzchni. Wytworzone w ten sposób cele/komory pomiarowe umożliwiają wykonanie pomiaru kilku 20 substancji (lub kilku stężeń jednej substancji) w trakcie jednej procedury pomiarowej i są zabezpieczone przed mieszaniem się próbek.

Przedmiotem wynalazku jest więc urządzenie do oznaczeń metodą powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej, które obejmuje układ oświetlacza, obejmujący 25 źródło światła i pierwszy polaryzator, pryzmat i płytkę sensora pokrytą warstwą metalu oraz układ kamery,

przy czym płytkę sensora umieszczana jest na powierzchni pryzmatu od strony przeciwległej niż jej strona pokryta warstwą metalu, a na powierzchni warstwy metalu immobilizowany może być czynnik wiążący analit,

przy czym na powierzchni płytki sensora pokrytej warstwą metalu tworzona jest komora 30 pomiarowa, w której umieszczany jest analit,

przy czym

układ oświetlacza obejmuje oświetlacz i pierwszy polaryzator, a układ kamery obejmuje drugi polaryzator, obiektyw i kamerę, przy czym pierwszy polaryzator i drugi polaryzator są

zamontowane w sposób ruchomy tak że możliwe jest odczytywanie sygnału dla różnych polaryzacji oraz

pryzmat i płytka sensora są mocowane w pozycji poziomej,

5 i przy czym urządzenie jest dostosowane do usuwania cieczy z komory pomiarowej płytki sensora przed odczytem sygnału po związaniu analitu w komorze pomiarowej.

Usuwanie cieczy z komory pomiarowej może być realizowane dowolnym odpowiednim, znanym w stanie techniki sposobem, przykładowo poprzez pipetowanie, odparowywanie i in. W przykładzie wykonania, usuwanie cieczy realizowane jest z pomocą pipetowania, po którym następuje proces płukania poprzez kilkukrotne naniesienie i usunięcie substancji płuczającej, 10 np. buforu. Nakładanie substancji płuczającej może być wykonywane z pomocą pipetowania, a usuwanie np. z pomocą pompki ssącej. Korzystnie, po usunięciu umożliwia się odparowanie resztek cieczy, co zwykle następuje w ciągu kilku sekund.

W korzystnym przykładzie wykonania urządzenia, na płaskiej powierzchni pryzmatu nakładana jest warstwa olejku immersyjnego, na którą nakładana jest płytka sensora, przy 15 czym płytka sensora jest zabezpieczona przed przesuwaniem się po powierzchni pryzmatu z pomocą uchwytu.

Korzystnie, oświetlacz i kamera umieszczone są na ruchomych ramionach, tak aby możliwe było ich przemieszczenie względem siebie nawzajem i względem pryzmatu.

Korzystnie, urządzenie według wynalazku jest dodatkowo wyposażone w urządzenie 20 odsysające ciecz przeznaczone do usuwania roztworu z komory pomiarowej po nałożeniu analitu i po płukaniu płytki sensora.

Korzystnie, oświetlacz obejmuje źródło promieniowania monochromatycznego, korzystnie półprzewodnikową diodę laserową.

Szczególnie korzystnie, oświetlacz obejmuje półprzewodnikową diodę laserową z wyjściem 25 światłowodowym jednomodowym.

Korzystnie, układ oświetlacza obejmuje ponadto kolimator, lunetę optyczną i przysłonę irysową.

Korzystnie, obiektywem jest obiektyw telecentryczny.

Korzystnie, płytka sensora obejmuje pewną liczbę cel/komór pomiarowych na swojej 30 powierzchni, korzystnie rozdzielonych od siebie warstwą polimeru o właściwościach hydrofobowych.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wykonywania oznaczenia metodą powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej, obejmujący etapy:

- a) odbijania promieni świetlnych od elementu sensora, przy czym promień świetlny, który propaguje się w płytce sensora ulega odbiciu od granicy płytka sensora – powietrze, przy czym
5 powierzchnia płytki sensora pokryta jest warstwą metalu i czynnikiem wiążącym analit;
 - b) odczytu sygnału rezonansu,
 - c) umieszczania analitu w komorze pomiarowej na powierzchni elementu sensora z immobilizowanym czynnikiem wiążącym analit,
 - d) odbijania promieni świetlnych od elementu sensora,
10 e) odczytu sygnału rezonansu,
- przy czym etap e) odczytu sygnału z analitu wykonywany jest przy nieobecności cieczy w komorze pomiarowej.

W korzystnym przykładzie wykonania, przed etapem e) odczytu sygnału z analitu, wykonywany jest etap usuwania cieczy z komory pomiarowej, w której znajduje się analit.

- 15 W korzystnym przykładzie wykonania, w etapie b) i e) sygnał odczytywany jest każdorazowo dwukrotnie w każdym punkcie pomiarowym dla pierwszej polaryzacji i drugiej polaryzacji promieni świetlnych odbijanych od powierzchni elementu sensora, przy czym pierwsza polaryzacja i druga polaryzacja to liniowe polaryzacje światła prostopadłe względem siebie i przy czym dla pierwszej polaryzacji zachodzi zjawisko rezonansu i wnikania pola
20 elektrycznego poza obszar warstwy metalu elementu sensora.

OPIS FIGUR

Fig. 1 przedstawia mocowanie układu sensora, obejmującego pryzmat i płytkę sensora.

Fig. 2 przedstawia bardziej szczegółowy widok układu sensora.

- 25 Fig. 3 przedstawia schematycznie układ pomiarowy według wynalazku.

Fig. 4 przedstawia wyniki pomiarów SPRI krzywych kalibracyjnych z wzorcami stężeń białka MMP-2 dla urządzenia wg stanu techniki z pomiarem w roztworze (Fig. 4A) i dla urządzenia według wynalazku z pomiarem w otoczeniu powietrza (Fig. 4B).

Przykładowe urządzenie obejmuje szklany pryzmat 1 oraz płytkę sensora 2. Pryzmat 1 mocowany jest na stanowisku pomiarowym w poziomym uchwycie 3 pryzmatu, a płytkę sensora 2 umieszczana jest na poziomo na pryzmacie 1 w uchwycie 4 płytki pomiarowej, co przedstawiono na Fig. 1.

5 Płytkę sensora 2 mocowana jest w pozycji poziomej i jest zabezpieczona przez przesuwaniem za pomocą uchwytu 4, na przykład przez odchylany uchwyt magnetyczny zabezpieczający płytkę 2 przed przesuwaniem się. W celu minimalizacji odbić na granicy pryzmatu 1 i płytki sensora 2 przestrzeń pomiędzy nimi wypełnia się olejkim immersyjnym 21 o współczynniku załamania światła równym współczynnikowi materiału użytego do wykonania pryzmatu 1 i
10 płytki sensora 2.

Pryzmat 1 może być wykonany z odpowiedniego szkła, przykładowo ze szkła typu BK7.

Pryzmat 1 z płytką sensora 2 przedstawiono w większych szczegółach na Fig. 2. Na płaską powierzchnię pryzmatu nakładana jest warstwa olejku immersyjnego 21, na którą nakładana jest szklana płytkę sensora 2. Płytkę sensora 2 pokryta jest warstwą chromu 22, a następnie
15 warstwą metalu 23. Na warstwę metalu 23 nakładane są z kolei pasma hydrofobowego polimeru 24, które wyznaczają granice jednej lub, korzystnie, większej liczby komór pomiarowych 25. Na dnie komory pomiarowej 25 umieszczana może być warstwa tiolu 26, na której immobilizowane są czynniki wiążące 27.

Specjalista w dziedzinie zauważy, że możliwe są różne sposoby immobilizacji czynników
20 wiążących. Przykładowo, możliwe jest stosowanie immobilizacji kowalencyjnej, poprzez aktywowanie związków z grupami karboksylowymi i tworzenie wiązania kowalencyjnego z grupami aminowymi z analitu. Innym przykładem jest immobilizacja hydrofobowa, która polega na wykorzystaniu oddziaływań hydrofobowych pomiędzy czynnikiem wiążącym a analitem bez uprzedniego aktywowania. Specjalista w dziedzinie z łatwością wybierze sposób immobilizacji
25 spośród znanych w stanie techniki, tak aby był odpowiedni do stosowanych czynników wiążących i analitów. Przykładowo, stosowana może być następująca technika immobilizacji czynników wiążących: płytkę sensora zostaje uprzednio zanurzona w roztworze tiolu na co najmniej 24 lub 12 godzin (w zależności od stosowanego tiolu). W dziedzinie znane są różne typy tiolu stosowanego do immobilizacji, przykładowo aminotiole krótkie, takie jak cysteamina,
30 lub alkilotiole, np. alkilotiol ODM. Przykładowe stężenie tiolu to 20 mM. Następnie płytkę sensora jest przemywana w etanolu i w wodzie. Na tak przygotowaną płytkę nakładana jest kropla roztworu zawierającego czynnik wiążący (np. przeciwciało, receptor, aptamer itp.) np. na godzinę w temperaturze 37°C, a następnie płytkę jest przemywana wodą oczyszczoną, np. miliQ.

Warstwą metalu 23 może być korzystnie warstwa złota. Może mieć ona różną grubość, ale korzystnie jest to warstwa o grubości ok. 50 nm.

5 Pryzmat 1 z płytką sensora 2 umieszczane są w układzie pomiarowym jak przedstawiony na Fig. 3. Oświetlacz 5, korzystnie światłowodowy z układem optycznym kształtowania wiązki świetlnej, stanowi źródło światła. Promienie świetlne z oświetlacza 5 trafiają przez ruchomy pierwszy polaryzator 6 do pryzmatu 1 i ulegają odbiciu od płytki sensora 2, po czym przez ruchomy drugi polaryzator 7 trafiają do obiektywu 8, korzystnie telecentrycznego, stanowiącego część kamery 9.

Procedura pomiarowa polega na wykonaniu kolejno kroków:

- 10 a) Przygotowanie płytki sensora 2 (np. w celu immobilizacji czynnika wiążącego wykonywane jest nałożenie warstwy tiolu 26 i czynnika wiążącego 27)
- b) Umieszczenie płytki sensora 2 na powierzchni pryzmatu 1 z wykorzystaniem olejku immersyjnego 21.
- c) Ustawienie położenia kąтового w kącie SPR (pierwsza polaryzacja P w torze 15 oświetlacza 5) rejestrowanym dla otoczenia powietrza lub w jego pobliżu (praca na zboczu charakterystyki sensora).
- d) Odczyt sygnału przed nałożeniem analitu dla pierwszej polaryzacji P
- e) Ustawienie drugiej polaryzacji S (prostopadłej względem pierwszej polaryzacji P) w torze oświetlacza 5. Odczyt sygnału.
- 20 f) Naniesienie analitu do komory pomiarowej 25.
- g) Usuwanie nadmiaru niezwiązanego analitu, płukanie i usuwanie środka płuczącego (np. przez odsysanie z pomocą pompki ssącej lub pipety, odparowanie).
- h) Odczyt sygnału po nałożeniu analitu dla pierwszej polaryzacji P
- g) Ustawienie drugiej polaryzacji S w torze oświetlacza 5. Odczyt sygnału.

25 Taka procedura pomiarowa zapewnia pomiar ilościowy cząsteczek analitu przyłączonych do powierzchni czulej (do czynnika wiążącego 27). Wszystkie niezwiązane cząsteczki analitu są usuwane z powierzchni czulej w procesie płukania. Sam pomiar następuje po usunięciu/odparowaniu substancji użytej do płukania, w otoczeniu powietrza. Rozkład intensywności zarejestrowany w obrazie dla drugiej polaryzacji S wykorzystywany jest jako
30 obraz referencyjny, dla którego nie zachodzi zjawisko rezonansu plazmonowego. Pierwsza polaryzacja P i druga polaryzacja S to liniowe polaryzacje światła prostopadłe względem siebie. Dla pierwszej polaryzacji P wektora pola elektrycznego, zjawisko rezonansu i wnikania

- poła elektrycznego poza obszar warstwy metalicznej zachodzi, a dla drugiej polaryzacji S zjawisko to nie występuje (fala świetlna oscyluje tylko w płaszczyźnie na której leży normalna do powierzchni warstwy metalicznej). Dlatego możliwe jest wykorzystanie obrazu zarejestrowanego dla drugiej polaryzacji S (po odpowiednim przeliczeniu intensywności) jako
- 5 rozkładu intensywności w punktach pomiarowych, co jest niemożliwe przy wykorzystaniu tylko jednej polaryzacji ze względu na występujący w tych miejscach efekt zmiany współczynnika odbicia. W innych układach (znanych w stanie techniki) często jako parametr intensywności dla tła przyjmuje się obszar w pobliżu punktu pomiarowego, co jednak z konieczności stanowi jedynie przybliżenie.
- 10 Innymi słowy, obraz referencyjny w urządzeniach znanych ze stanu techniki jest uzyskiwany z obszaru znajdującego się obok próbki z obrazu dla którego mierzy się efekt SPR (pierwsza polaryzacja P). Zakłada się przy tym, że różnica intensywności jest zbliżona. Pomiar referencyjny dokładnie w miejscu pomiaru, jak w rozwiązaniu według wynalazku, jest natomiast możliwy tylko poprzez obrót do drugiej polaryzacji S (prostopadłej do pierwszej polaryzacji P), dla której nieobserwowany jest efekt SPR. Należy jednak przeliczyć uzyskany
- 15 wynik przez mnożnik (pierwsza polaryzacja P i druga polaryzacja S przechodzą przez układ optyczny z różną sprawnością). Wartość tego mnożnika (w funkcji kąta pochylenia ramienia) jest opisana teoretyczną zależnością lub może być wyznaczona w procedurze kalibracji.

Przykład wyznaczania mnożnika (x) i kalibracji z polaryzacji P i S :

20
$$\frac{\text{polaryzacja}_p^{\text{receptor}} + \text{polaryzacja}_p^{\text{analit}}}{\text{polaryzacja}_s^{\text{receptor}} + \text{polaryzacja}_s^{\text{analit}}} = x$$

$$x = \frac{29414,608 + 29837,505}{9122,045 + 9668,743} = 3,15$$

$$S = 671,66 \text{ [A.U.]}$$

S – średnia z różnicy różnic

$$R = S \cdot x$$

25
$$R = 671,66 \cdot 3,15 = 2155,72 \text{ [A.U.]}$$

R - sygnał analityczny dla próbki o stężeniu 5 ng/ml

Celem jest przeliczenie uzyskiwanych natężeń, tak aby były one zgodne dla pierwszej polaryzacji P i drugiej polaryzacji S dla miejsc w obrazie, dla których nie występuje SPR.

Pomiar wykonywany w otoczeniu powietrza, po usunięciu roztworu możliwy jest dla znacząco mniejszej ilości mierzonej substancji. Taki pomiar możliwy jest dzięki poziomej pozycji płytki sensora 2 w urządzeniu. Jest to korzystnie ułatwiane poprzez:

1. Zastosowanie mocowania pryzmatu i płytki sensora wraz z uchwytem utrzymującym pozycję sensora (zastosowanie olejku immersyjnego powoduje samoczynne przesuwanie się płytki sensora na powierzchni pryzmatu) (Fig. 1)
 2. Konstrukcję płytki sensora, w którym kropla analitu i środka wykorzystywanego do płukania utrzymywana jest w miejscu pomiaru (wiele cel/komór pomiarowych na powierzchni jednego sensora) oprócz sił napięcia powierzchniowego dodatkowo poprzez warstwę polimeru o właściwościach hydrofobowych (Fig. 2). Wytworzone w ten sposób cele/komory pomiarowe umożliwiają wykonanie pomiaru kilku substancji (lub kilku stężeń jednej substancji) w trakcie jednej procedury pomiarowej. Możliwe jest również dogodne wykonywanie pomiarów w wielu powtórzeniach co daje możliwość uśredniania wyników i minimalizację błędów pomiarowych.
- Funkcje oświetlacza 5 może pełnić źródło promieniowania monochromatycznego, korzystnie półprzewodnikowa dioda laserowa, korzystnie z wyjściem światłowodowym jednomodowym. Pomiar wykonywany technologią detekcji powierzchniowego rezonansu plazmonowego w wersji obrazowej wykorzystują zmianę reflektancji pól pomiarowych na które nanosi się badaną substancję. Zjawisko to zależne jest od kąta pobudzania (oświetlenia) oraz długości fali promieniowania oświetlającego. Funkcja zmian zależna od kąta oświetlenia daje większą czułość (większe nachylenie charakterystyki). Wykorzystując zależność kątową i pomiar dla różnych kątów możliwe jest równoczesne wyznaczenie krzywej pomiarowej (tradycyjna metoda SPR) oraz pomiar przy odpowiednio dobranym stałym kącie na podstawie zmian reflektancji (przed i po nałożeniu analitu). Zwiększenie czułości (odseparowanie się od zależności widmowej) możliwe jest zatem poprzez zastosowanie źródła światła monochromatycznego (np. laser) lub wąskopasmowego (np. dioda LED). Do dokładnego wykonania pomiarów konieczne jest zapewnienie liniowo spolaryzowanej, równoległej wiązki oświetlającej o wysokiej równomierności oświetlenia na całej powierzchni pomiarowej. Stosowanie źródeł laserowych wielomodowych powoduje trudności z uzyskaniem wysokiej równomierności oświetlenia, z drugiej strony wiązka diody LED nie pozwala na uzyskanie takiej zbieżności kątowej (równoległości wiązki) jaką oferują laserowe źródła promieniowania. Z uwagi na to, w urządzeniu korzystnie zastosowana może być półprzewodnikowa dioda laserowa, np. o długości fali 635 nm z wyjściem światłowodowym jednomodowym. Jednomodowy charakter promieniowania pozwala na uzyskanie wysokiej jakości wiązki oświetlającej i równomierności oświetlenia. Wiązka opuszczającą światłowód może być

przekształcana w wiązkę równoległą za pomocą kolimatora i następnie poszerzana za pomocą lunety. Przykładowo, stosowana może być dioda laserowa o długości fali świetlnej 635 nm, np. typu Laser Pigtail, 635nm, DL5038-021, 8mW. Jej parametry pracy (natężenie prądu, temperatura) mogą być kontrolowane przez zastosowany sterownik diody laserowej, przykładowo CLD1010.

W układzie optycznym oświetlacza 5 może być również zastosowany filtr apodyzacyjny (np. pomiędzy kolimatorem wiązki świetlnej a lunetą optyczną). Filtr ten zmniejsza różnicę intensywności pomiędzy osią wiązki oświetlającej (największe natężenie oświetlenia) a brzegiem wiązki oświetlającej (mniejsze natężenie oświetlenia). Zastosowanie filtra apodyzacyjnego powoduje zmniejszenie różnic w oświetleniu środka i brzegów sensora co zbliża warunki pomiaru (natężenie oświetlenia) we wszystkich obszarach pomiarowych.

Korzystnie, oświetlacz 5 i kamera 9 umieszczone są na ruchomych ramionach, tak aby możliwe było ich przemieszczenie względem siebie nawzajem i względem pryzmatu 1. W skład układu (ramienia) oświetlacza 5 korzystnie wchodzi światłowodowy kolimator wiązki świetlnej, luneta optyczna, przysłona irysowa. Kamerę 9 korzystnie stanowi kamera CCD z obiektywem korzystnie telecentrycznym np. typu 0.243X Bi-Telecentric C-Mount Camera Lens. Obraz powstający na podstawie promieniowania odbitego od powierzchni płytki sensora 2 może być rejestrowany przy wykorzystaniu kamery 9 i przetwarzany np. za pomocą sprzężonego z urządzeniem komputera, np. klasy PC.

Polaryzatory 6, 7 są ruchome, umożliwiając ustawienie pozycji każdego z nich w zakresie dowolnego kąta. Korzystnie są to obrotowe polaryzatory liniowe. Pozwala to na prowadzenie pomiarów przy dowolnym kącie polaryzacji liniowej promieniowania oświetlającego oraz obserwację przy użyciu kamery 9 dowolnej polaryzacji liniowej promieniowania odbitego od powierzchni płytki sensora 2. Wyznaczenie reflektancji wykorzystuje promieniowanie tła (poza obszarami pomiarowymi lub korzystnie, przy wykorzystaniu pierwszej polaryzacji P i drugiej polaryzacji S jak opisano powyżej, możliwe jest wykorzystanie tła dokładnie w miejscu punktów pomiarowych) do wyznaczenia natężenia (intensywności) wiązki padającej na płytkę sensora 2. Zjawisko rezonansu plazmonowego zachodzi dla konkretnej polaryzacji (dla polaryzacji prostopadłej efekt ten nie jest obserwowany). Zastosowanie automatycznie obracanego polaryzatora 6 oświetlacza 5 umożliwia zatem rejestrację powierzchni sensora bez obserwowanego efektu absorpcji. Możliwe jest zatem wykorzystanie pomiaru do rejestracji obrazu referencyjnego.

Polaryzatory określają polaryzację światła wykorzystanego w pomiarze. Polaryzator 7 z układu (ramienia) kamery 9 może być również wykorzystany do regulacji intensywności promieniowania rejestrowanego przez kamerę CCD. Promieniowanie laserowe padające na

detektor kamery 9 powoduje przy większych mocach promieniowania padającego na płytkę sensora 2 efekt olśnienia i powstawanie nieczytelnego obrazu. Ponieważ wiązka oświetlająca jest spolaryzowana liniowo i ulega niewielkim zmianom na powierzchni granic optycznych układu optycznego zastosowanie obrotowego liniowego polaryzatora 7 ramienia kamery 9 umożliwia zmianę intensywności oświetlenia kamery 9. Układy mechaniczne ramion oraz kątów polaryzatora mogą być ustawiane w sposób automatyczny zgodnie z zaprogramowanymi danymi wprowadzonymi do sterownika urządzenia. Dodatkowo, polaryzator 7 ramienia kamery 9 może być dodatkowo wykorzystywany do sprawdzania poprawności pozycjonowania polaryzatora 6 oświetlacza 5. Ustawiając jednakowy kąt polaryzatora 6 oświetlacza 5 i kamery 9 uzyskiwane być powinno maksymalne natężenie oświetlenia w obrazie. Przy ustawieniu różnicy kątowej 90° pomiędzy polaryzatorem 7 kamery i polaryzatorem 6 oświetlacza powinno nastąpić całkowite wygaszenie obrazu.

Obiektyw 8 kamery 9 korzystnie jest telecentryczny. Rejestracja obrazu tradycyjnym obiektywem o krótkiej ogniskowej powoduje powstawanie zniekształceń obrazu oraz różną intensywność oświetlenia matrycy kamery (zaciemnianie obrazu na obrzeżach obrazu). W celu uzyskania równej czułości pomiaru w całym polu sensora 2 zastosowany może być obiektyw 8 telecentryczny, który oświetla matrycę kamery 9 wiązką równoległą. W ten sposób minimalizuje się dystorsje obrazu oraz zapewnia równomierną jasność obrazu (czułość pomiarową) w pełnym rejestrowanym obszarze.

W korzystnym przykładzie wykonania, luneta zapewnia poszerzenie jednomodowej wiązki optycznej, co pozwala na uzyskanie wysokiej jakości (równomierność, zniekształcenia, rozbieżność) wiązki oświetlającej układ sensora (pryzmat 1 z płytką sensora 2).

Oprócz podstawowych elementów konstrukcyjnych urządzenie może korzystnie obejmować dodatkowe elementy składowe takie jak: spoter do nakładania próbek, celkę przepływową wraz z pompą perystaltyczną z odpowiednimi przewodami umożliwiającymi przeprowadzanie pomiarów jakościowych oraz inne elementy użyteczne do przeprowadzania pomiarów SPRI, takie jak statyw na próbki. Urządzenie może też zostać zintegrowane z innymi urządzeniami służącymi np. do pomiarów MALDI-TOF.

Wykonano krzywe kalibracyjne dla białka MMP-2, korzystając z urządzenia wg stanu techniki (stanowisko laboratoryjne do pomiarów, zbudowane na ławie optycznej z laserem He-Ne i ręcznym ustawianiem kąta promieniowania oświetlającego i pozycji kamery) oraz urządzenia według wynalazku, jak opisane powyżej, a więc obejmujące pryzmat 1 ze szkła ze szklaną płytką sensora 2, umieszczone w układzie pomiarowym jak przedstawiono na Fig. 3. Pryzmat 1 mocowany jest na stanowisku pomiarowym w poziomym uchwycie 3 pryzmatu, a płytką

5 sensora 2 umieszczana jest na poziomo na pryzmacie 1 w uchwycie 4 płytki pomiarowej, co przedstawiono na Fig. 1. W celu minimalizacji odbić na granicy pryzmatu 1 i płytki sensora 2 przestrzeń pomiędzy nimi wypełniona jest olejkim immersyjnym 21 o współczynniku załamania światła równym współczynnikowi materiału użytego do wykonania pryzmatu 1 i

10 płytki sensora 2. Płytki sensora 2 pokryta jest warstwą chromu 22, a następnie warstwą złota 23 o grubości ok. 50 nm. Na warstwę złota 23 nakładane są z kolei pasma hydrofobowego polimeru 24, które wyznaczają granice komórek pomiarowych 25. W układzie pomiarowym, oświetlacz 5 światłowodowy z układem optycznym kształtowania wiązki świetlnej (diody laserowa o długości fali świetlnej 635 nm, typu Laser Pigtail, 635nm, DL5038-021, 8mW),

15 stanowi źródło światła. Promienie świetlne z oświetlacza 5 trafiają przez ruchomy pierwszy polaryzator 6 do pryzmatu 1 i ulegają odbiciu od płytki sensora 2, po czym przez ruchomy drugi polaryzator 7 trafiają do obiektywu 8 telecentrycznego, stanowiącego część kamery 9 (CCD z obiektywem telecentrycznym np. typu 0.243X Bi-Telecentric C-Mount Camera Lens).

Białko MMP-2 przygotowano w buforze PBS, a jako czynnik wiążący zastosowano inhibitor

20 ARP-101, immobilizowano go hydrofobowo na płycie sensora na linkerze tiolu ODM.

Do badań użyto jako standard rekombinowaną metaloproteinazę-2 (Sigma Steinheim, Niemcy), ARP 101 - selektywny inhibitor MMP-2 ((2R)-2-[[[1,1'-Bifenilo-4-ylosulfonylo] (1-metyloetoksy) amino] -N-hydroksy-3-metylobutanamid, M = 405,50 kDa, 1-oktadekanotiol (ODM) (SIGMA, Steinheim, Niemcy), fotopolimer ELPEMER SD 2054, hydrofobową farbę

25 ochronną SD 2368 UV SG-DG (PETERS, Kempen, Niemcy), jak również absolutny etanol, kwas octowy, chlorek sodu, octan sodu (POCH, Gliwice, Polska), pH buforu HBS-ES = 7,4 (0,01 M HEPES, 0,15 M chlorek sodu, 0,005% Tween 20, 3 mM EDTA), bufor PBS o pH = 7,4, (wszystkie BIOMED, Lublin, Polska). Wodne roztwory przygotowano z wodą miliQ (Simplicity® MILLIPORE). Zastosowano argon N 5,0 o wysokiej czystości (99,999%) (AIR LIQUIDE Polska sp. z o.o., Polska).

Do wykonania krzywych kalibracyjnych zastosowano standardowy roztwór rekombinowanego białka MMP-2. Najpierw powierzchnię chipa pokryto monowarstwą tiolu ODM i warstwą

30 inhibitora ARP 101 (2,0 µg / ml). Próbkę standardowego MMP-2 o stężeniu w zakresie 1,0 - 20,0 ng/ml, przy pH = 7,4 naniesiono na chip. Czas interakcji wynosił 10 min. Odpowiedź analitycznego sygnału SPRI zmierzono w dwunastu powtórzeniach. – krzywe Fig.4A i 4B

Wynik pomiarów przedstawiono na Fig. 4a i 4B, a także w Tabelach 1 i 2 poniżej.

Tabela 1. Wartości sygnału SPRI uzyskane z pomocą urządzenia ze stanu techniki.

C (stężenie białka MMP-2) [ng/mL]	sygnał SPRI	SD
1	1364,65	230,146
5	1420,78	380,18
7	1420,88	260,599
10	1456,43	275,192
20	1600,56	480,24

Tabela 2. Wartości sygnału SPRI uzyskane z pomocą urządzenia wg wynalazku

C (stężenie białka MMP-2) [ng/mL]	sygnał SPRI	SD
1	1055,22	537,01
5	2115,72	683,37
7	2621,07	123,89
10	3505,96	638,33
20	5862,56	650,53