Využití metody Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi) v praxi

R. Šigutová, M. Lesňák,
P. Kušnierová, Z. Švagera,
K. Šafarčík

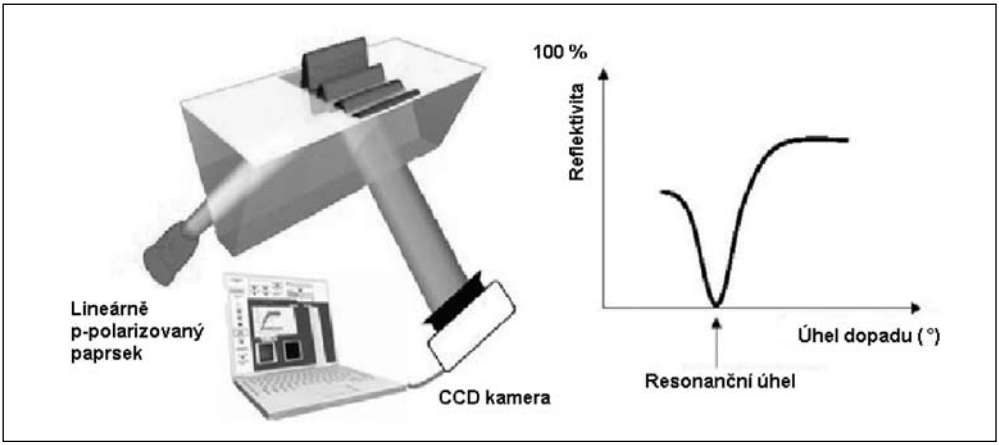
Úvod

Surface Plasmon Resonance (SPR), tedy rezonanční excitace povrchových plazmonů, se řadí mezi jednu z nejrozvinutějších optických detekčních technik. Tato metoda se nejčastěji využívá v oblasti biosenzorů. Umožňuje monitorovat interakce biomolekul v reálném čase. Při stanovení se měří změna indexu lomu, která je vyvolaná interakcí biomolekul. Lze tak detekovat látky bez nutnosti značení jednoho z reaktantů. Jedná se o citlivé optické biosenzory, které jsou schopné detekovat biomolekuly i ve velmi nízkých koncentracích. V současnosti je již vyvinuta řada biosenzorů, které lze uplatnit v lékařské diagnostice, ochraně životního prostředí či při kontrole kvality a bezpečnosti potravin. V případě, že k biosenzorům využívající techniku SPR je přidán snímací prvek, lze hovořit o Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi). V reálném čase lze sledovat přímo zobrazení povrchu biočipu při interakcích biomolekul. Lze paralelně měřit několik desítek různých interakcí ve stejném čase.

Fyzikální princip metody

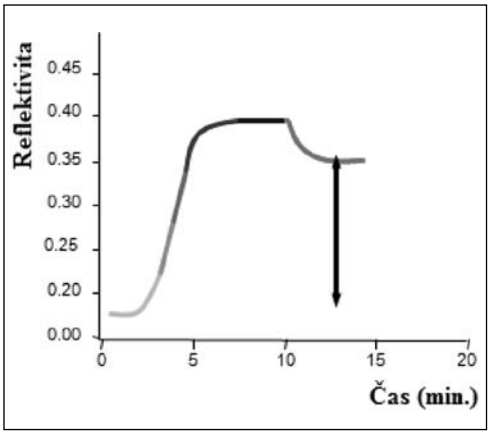
Povrchové plazmony jsou v podstatě hromadné excitace elektronů vázaných na rozhraní mezi vodičem a izolantem. Vybuzení povrchových plazmonů lze uskutečnit v planární multivrstvě či na periodickém rozhraní, tedy mřížce. Při dopadu lineárně p-polarizovaného paprsku na rozhraní dvou prostředí s rozdílnými 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. Rezonance povrchových plazmonů závisí na vlnové délce, polarizaci a úhlu dopadu paprsku na rozhraní. Důležitou roli zastávají také vlastnosti kovové vrstvy deponované na optickém hranolu a vlastnosti imobilizovaného analytu. Vrstvu kovu, která je tenká cca 50 nm, nejčastěji tvoří stříbro či zlato. Stříbrný materiál je vhodnější pro větší rozlišení, nicméně zlato se vyznačuje lepší stabilitou a adhezí k povrchu hranolu. Intenzita exponenciální vlny klesá se vzdáleností od rozhraní.

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 tuto látku detekovat. Změna intenzity odraženého paprsku je v případě SPRi zaznamenávána detektorem CCD kamerou.



Obr. č. 1: Vlevo je schéma vzniku jevu SPR, kdy na rozhraní optický hranol-kovová vrstva dopadá paprsek lineárně p-polarizovaného světla a pod určitým úhlem dochází ke vzniku evanescentní vlny interagující s povrchovou elektronovou plazmou, dochází k rezonanci a vzniku plazmonové vlny. CCD kamera zaznamenává pokles intenzity světla v důsledku vzniku rezonančního jevu. Vpravo je graf znázorňující závislost intenzity odraženého paprsku světla na úhlu dopadu. Rezonanční úhel odpovídá minimu intenzity odraženého paprsku.

Při měření kinetiky sledované interakce dvou biomolekul lze vyhodnotit množství stanovované látky ve směsi. Jestliže jsou na čip imobilizovány biomolekuly a je přidán stanovovaný analyt, je možné sledovat intenzitu dopadajícího paprsku na detektor v čase. Při zvoleném úhlu dopadu paprsku na hranol lze pozorovat nárůst signálu v čase, ten se po zhruba 15 minutách ustálí a z rozdílu záznamu před reakcí a po ní lze určit množství dané látky ve směsi. Z kinetické křivky je tedy možné získat informaci o množství stanovované látky ve směsi, dále rychlostní konstanty asociační a disociační fáze a vypočíst rovnovážnou konstantu reakce, která je měřítkem afinity určité interakce. V reálném čase lze sledovat velké množství zcela různých interakcí. Po ukončeném stanovení lze čip znovu regenerovat použitím vymývacího pufru, např. glycinu. Celá fáze měření i s regenerací netrvá déle než 25 minut.

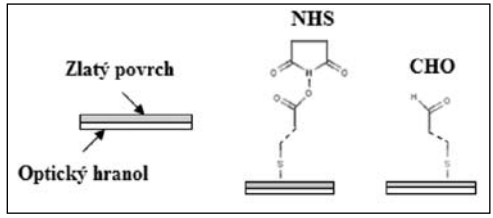


Obr. č. 2: Kinetická křivka. Závislost intenzity dopadajícího paprsku na detektor na čase. Z rozdílu signálu před reakcí a po ní (viz černá šipka), lze vyhodnotit množství stanovované látky.

Biosenzory s povrchovými plazmony

Biosenzory s povrchovými plazmony jsou v podstatě senzory využívající optický fyzikálně chemický převodník spojený s biorekogniční vrstvou, tedy citlivým prvkem biologického původu. Při měření s těmito biosenzory se nejčastěji uplatňuje afinitní interakce mezi biomolekulami, kdy prvek biorekogniční vrstvy specificky váže stanovovaný analyt. Vznik biokomplexu je možné zachytit v reálném čase, tedy bez nutnosti značení jedné z reagujících komponent. Pro analýzy s využitím těchto biosenzorů lze např. využít interakcí protilátky s antigenem, nukleové kyseliny s vazebnou bílkovinou, enzymu se svým substrátem, kofaktorem, inhibitorem nebo receptoru s mikroorganismem, buňkou, dále reakcí hormonu s receptorem, léčiva s receptorem nebo také hybridizaci komplementárních řetězců nukleové kyseliny.

Nejčastěji 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 nejrůznější 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 pro zachycení stanovovaného analytu.



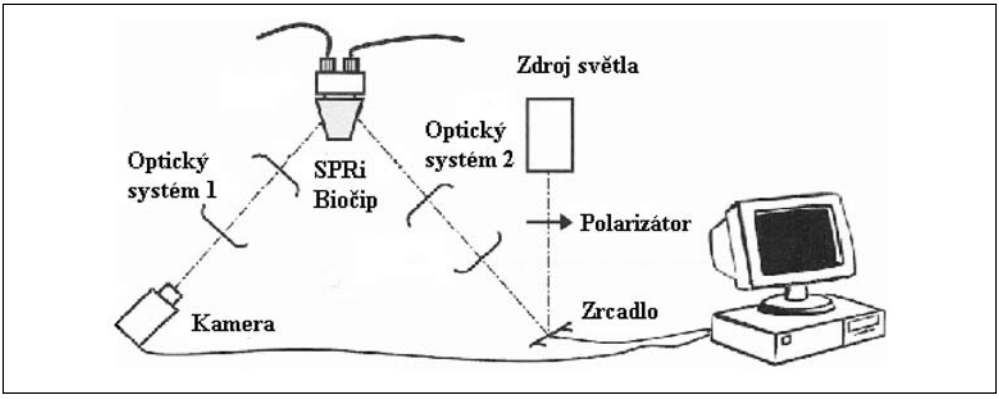
Obr. č. 3: Příklady komerčně dostupných aktivovaných čipů organickými sloučeninami. Na takto upravené povrchy lze imobilizovat např. nukleové kyseliny, proteiny, peptidy, kde jejich aminoskupiny se chovají jako nukleofilní činidla a dochází k jejich kovalentní vazbě na povrch čipu.

Přístrojová technika

Pro měření SPRi lze využít přístroj SPRi-Lab+ firmy Horiba.

Obr. č. 4: Přístroj SPRi-Lab+.

Umožňuje jak detekci neznámé látky ve vzorku, tak sledování kinetiky interakce biomolekul v reálném čase. Skládá se z optomechanické a fluidické části a vyhodnocovacího zařízení (počítač), viz Obr. č. 5.



Obr. č. 5: Uspořádání měřícího systému přístroje SPRi-Lab+, součástí je i vyhodnocovací zařízení, tedy počítač. Ze zdroje světelného záření vychází paprsek, který prochází přes polarizátor a stává se polarizovaným. Dopadá na zrcadlo, které je automaticky řízeno a volí jednotlivé úhly dopadu paprsku na biočip. Odražené záření je detekováno CCD kamerou a výsledný signál je zpracován počítačovým softwarem SPRi-View.

Pro imobilizaci biomolekul na povrch čipu, tedy vytvoření tzv. spotů, je využíváno zařízení SPRi-Arrayer. Tento spotovací přístroj umožňuje nanést biomolekuly na povrch čipu s téměř nulovou kontaminací pomocí nerezové či metal-keramické kapilární jehly. Je spojen se softwarem umožňujícím zobrazení navržených spotů a nakonec i celého povrchu připraveného biočipu. Je možné volit různý počet a velikost spotu. Na čip lze nanést až 500 různých analytů v duplikátu a velikost spotu je možná od 140 – 500 μm.

Shrnutí

Biosenzory s povrchovými plazmony, tedy i metodu SPRi, lze využít pro klinickou oblast, pro stanovení biochemických markerů, léčiv či drog. V životním prostředí pro měření pesticidů a toxických látek, v potravinářství pro stanovení bakterií a kontaminantů a nakonec i ve vojenství pro detekci bakterií, virů a toxinů. Jedná se o velmi citlivou metodu vyznačující se rychlou detekcí a kvantifikací. Navíc odpadá nutnost značení jednoho z reakčních členů a stanovení probíhá v reálném čase. Lze studovat vlastnosti biomolekul a vztahy mezi těmito biomolekulami. Metoda umožňuje stanovit několik různých analytů najednou, čipy si lze předpřipravit, znovu je regenerovat a opět použít. Vzhledem k poměrně vysoké citlivosti metody a multikomponentovému využití se SPRi analýza jeví pro klinickou biochemii velmi atraktivní metodou.

Literatura

1. Kretschmann E., Raether H., Plasma resonance emissions in solids, Z. Naturforsch. A23, 2135-2138, 1968.
2. Raether H., Surface Plasmons in Smooth and Rough Surfaces and Gratings. Springer Tracts in Modern Physics 111, Springer Verlag, Berlin, 1976.
3. Iwata T., Komoda G., Measurements of komplex refractive indices of metals at several wavelenghts by frustrated total internal reflection due to surface plasmon resonance, Appl. Opt. 47, 2386-2391, 2008.
4. Bass M., Handbook of Optics II, New York: McGraw-Hill, 1955.
5. Li L., Use of Fourier series in the analysis of discontinuous periodic structures, J. Opt. Soc. Am. A 13, 1870-1876, 1996.
6. Schasfoort R., B., M., Tudos A., J., Handbook of Surface Plasmon Resonance, 2008.
7. Hermanson G., T., Bioconjugate Techniques, 2008.
8. Cass T., Ligler F., S., Immobilized biomolecules in Analysis, 1998.
9. Goodrich J., A., Kugel J., F., Binding and Kinetics for Molecular Biologists, 2006.