

Биосенсор EVA 3.0 *(imaging)*

Биосенсор без меток с двумерной пространственной селективностью, основанный на поверхностных модах фотонных кристаллов

<http://pcbiosensors.com/>



Руководство по эксплуатации биосенсора **EVA 3.0 (*imaging*)**

Биосенсор EVA 3.0 на основе поверхностных мод фотонного кристалла (PC SM) — это биосенсор без меток с двумерной пространственной селективностью.

Перед началом работы с системой необходимо ознакомиться с руководством. Следуйте приведенным инструкциям, чтобы избежать травм и повреждения оборудования.

ВНИМАНИЕ!

Биосенсор EVA 3.0 питается от напряжения 15 В постоянного тока.

- Используйте только стабилизированный блок питания 15 В.
- Не открывайте крышку, не отсоединив шнур питания.
- Не вставляйте никаких предметов в оптический блок биосенсора.
- Ни в коем случае не подвергайте биосенсор EVA 3.0 воздействию воды или других жидкостей.
- Избегайте попадания прямых солнечных лучей.
- Не используйте вблизи открытого огня или источников тепла.
- Используйте только те соединительные кабели, которые поставляются в комплекте с биосенсором EVA 3.0.

1. Начало работы

Для чего используется биосенсор EVA 3.0?

Биосенсор EVA 3.0 — это система для анализа взаимодействия в реальном времени, основанная на поверхностных волнах фотонного кристалла. Биосенсор EVA 3.0 в режиме реального времени отслеживает как образование, так и распад биомолекулярных комплексов на поверхности фотонного кристалла (ФК) по мере возникновения и исчезновения взаимодействия и может делать это одновременно в нескольких пространственно-разделенных точках взаимодействия.

Исследуемые растворы подаются в проточную ячейку с помощью перистальтического насоса. Проточная ячейка формируется путем прижатия сенсорного чипа к проточной кювете, изготовленной из кварцевого стекла или пластика с двумя отверстиями.

Один сенсорный чип может многократно использоваться для огромного количества измерений, поскольку последний нанесенный слой фотонного кристалла сенсорного чипа состоит из SiO_2 , что позволяет легко очистить образец после предыдущего измерения.

Установка

Биосенсор EVA 3.0 состоит из оптического блока, перистальтического насоса и компьютера (**Рисунок 1**).



Рисунок 1. Биосенсор EVA 3.0 состоит из оптического блока, перистальтического насоса и компьютера.

Поместите биосенсор EVA 3.0 на стол, свободный от сильных электрических и магнитных полей. Не размещайте вибрирующее оборудование на том же столе. Перед устройством должно быть не менее 15 см свободного пространства (где можно разместить держатель для небольших резервуаров с реактивами) и 30 см над устройством (для циркуляции воздуха).

Подключите оптический блок биосенсора к компьютеру с помощью интернет-кабеля RJ-45 (Cat.6).

Включите оптический блок биосенсора (два тумблера на левой стороне устройства), компьютер и перистальтический насос.

ФК чип

ФК чип представляет собой стеклянную пластину ($22 \times 25 \text{ мм}^2$) с поверхностью из фотонного кристалла с одной стороны (**Рисунок 2**). На противоположной стороне вдоль длинных краев чипа имеются две белые полосы. Толщина этих полос составляет около 100 мкм. Для проверки этой стороны чипа можно использовать кончик иглы (в случае сомнений).

ВНИМАНИЕ!

Не путайте стороны чипа. Поверхность с фотонным кристаллом прижимается к проточной кювете, а противоположная сторона (с двумя белыми полосками и каплей иммерсионного масла между ними) прижимается к стеклянной призме в оптическом блоке биосенсора.

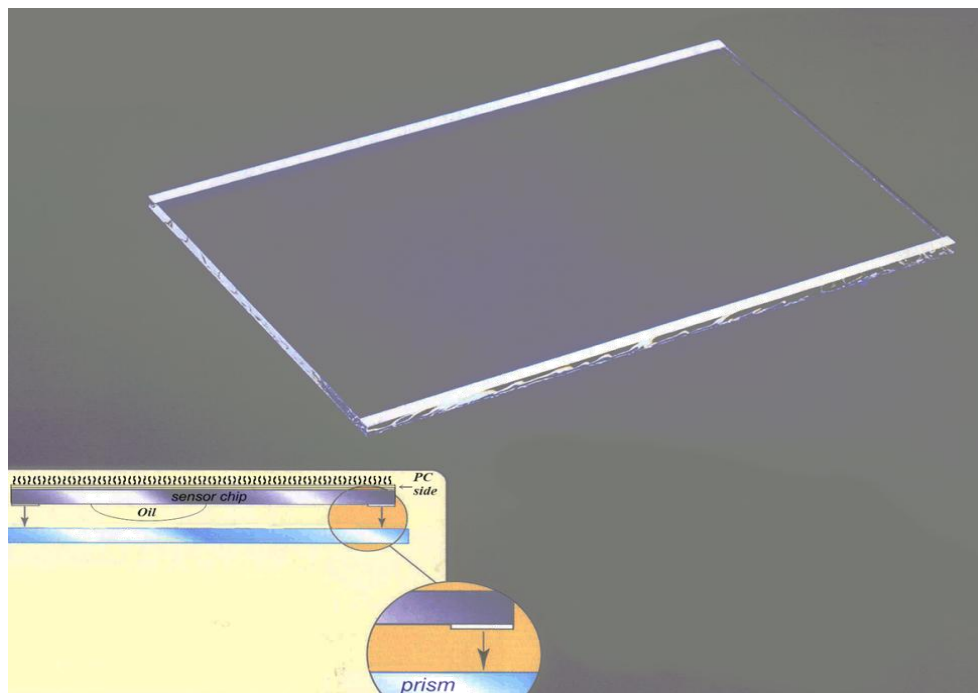


Рисунок 2. ФК чип представляет собой стеклянную пластину, покрытую, с одной стороны, пленкой фотонного кристалла. На другой стороне имеются две белые полосы.

2. Краткое описание инструкций по запуску

1. Очистите видимую часть стеклянной призмы в оптическом блоке биосенсора мягкой бумагой или салфетками, смоченными этанолом.

2. Очистите проточную кювету мягкой бумагой или салфетками, смоченными этанолом. Установите трубки на входе и выходе проточной кюветы. Закрепите проточную кювету с трубками в магнитном держателе (**Рисунок 3**).

3. Удалите пыль с ФК чипа (обе стороны чипа должны быть чистыми), нанесите одну маленькую каплю иммерсионного масла на противоположную сторону чипа (с двумя белыми полосками) и прижмите его к стеклянной призме в оптическом блоке биосенсора. Иммерсионное масло (index-matching oil) устраняет отражение оптического излучения на границе призма – чип.

4. Поместите магнитный держатель с проточной кюветой на призму с ФК-чипом и поверните рычаг на левой стороне оптического блока биосенсора против часовой стрелки. Под действием магнитных сил проточная кювета будет прижата к сенсорному чипу, образуя проточную ячейку с поверхностью сенсорного ФК чипа в качестве одной из стенок. При правильной установке, между полюсами магнитного держателя должна проходить полоска бумаги, т.е., все четыре угла магнитного держателя должны быть на одинаковом, порядка 100 мкм, расстоянии от магнита (а не смыкаться с ним).

5. Подсоедините выходную трубку проточной кюветы к входной трубке перистальтического насоса с помощью небольшого металлического соединителя (входит в комплект). Поместите входную и выходную трубки в емкости с жидкостью, наполненные водой или PBS. Исследуемые растворы подаются в проточную кювету с помощью перистальтического насоса.

6. Включите перистальтический насос на закачку раствора в проточную ячейку, установите скорость от 25 до 30. После заполнения ячейки (видно по монитору) и появления раствора на выходе из ячейки измените направление насоса на противоположное. Уменьшите скорость прокачки (рекомендуем от 5 до 10). Также рекомендуем заполнять ячейку через верхнюю трубку, а затем переключать направление и подавать реактивы через короткую нижнюю трубку. Это позволит уменьшить длину используемых трубок, ускорить подачу реактива в кювету и уменьшить вероятность образования пузырей воздуха в кювете.

7. Когда проточная кювета заполнится жидкостью, на мониторе появится изображение, аналогичное изображению, показанному на **Рисунке 4**.

8. Возникновения пузырей можно избежать, если удалить растворенный в растворах воздух (например, с помощью центрифуги).

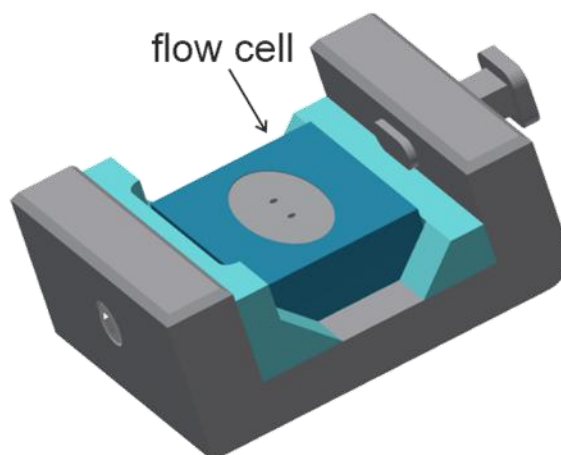


Рисунок 3. Магнитный держатель для проточной кюветы.

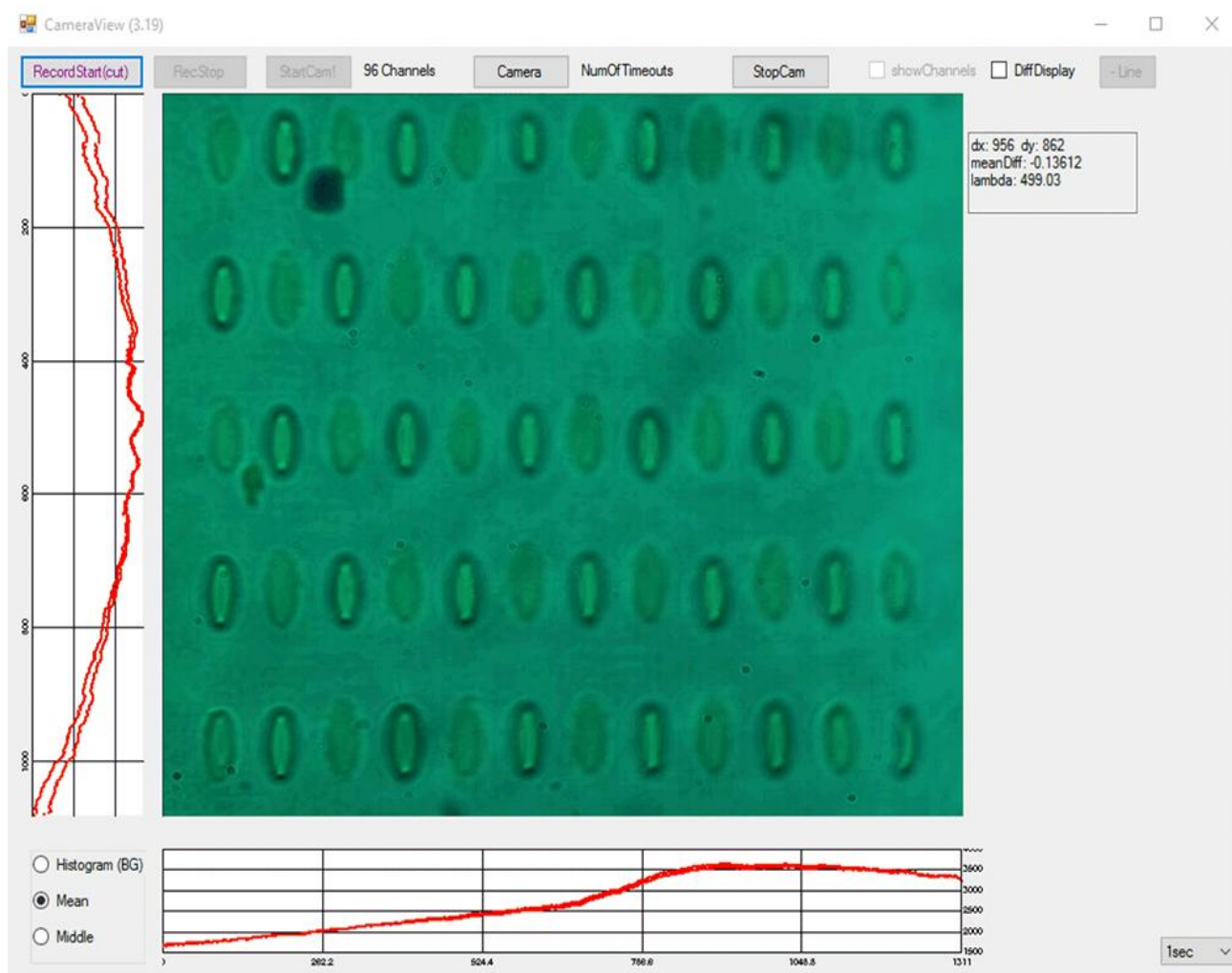


Рисунок 4. Типичное изображение с цветной камеры.

3. Подробное описание стандартных операций

Очистка ФК чипа

ФК чип представляет собой стеклянный слайд с фотонным кристаллическим покрытием на одной стороне. Поскольку последний нанесенный слой ФК чипа представляет собой SiO_2 , то образец легко очистить после предыдущего измерения. Один ФК чип может использоваться для нескольких измерений (сотни или тысячи, пока его завершающий слой не будет сильно утончен вследствие чрезмерно агрессивной очистки).

Очистите сенсорный чип мягкой бумагой или салфетками, смоченными этанолом или ацетоном, чтобы полностью удалить масло. После первоначальной очистки сенсорный чип и кювету следует один раз обработать ультразвуком в ацетоне или два раза в этаноле (по 20-30 минут каждый раз).

Для увеличения скорости и улучшения качества подготовки ФК чипа и кюветы можно использовать плазменный очиститель (например, Harrick Plasma PDC-32G) или УФ-очиститель (например, UV-185 от PCbiosensors — продается отдельно). Перед измерением ФК чип и проточную кювету можно обработать плазменным очистителем в течение 1 минуты на средней мощности при давлении воздуха 400 мТорр.

ВНИМАНИЕ!

Не используйте высокую мощность плазменного очистителя для очистки чипа и проточной кюветы. Это может привести к уменьшению толщины последнего слоя структуры ФК.

Если вместо этого используется УФ-очиститель, чип и кювету следует облучать в UV-185 в течение 15-20 минут или более (в этом случае нет риска уменьшения толщины последнего слоя).

После плазменной или УФ-обработки поверхность SiO_2 чипа становится гидрофильной с очень низким углом смачивания и готова к модификации поверхности.

Установка ФК чипа

Для хорошей оптической связи между призмой и сенсорным чипом следует использовать иммерсионное масло. Для нанесения иммерсионного масла рекомендуется следующий метод:

1) Удалите пыль с сенсорного чипа ПК (обе стороны чипа должны быть чистыми).

2) Нанесите одну *маленькую* каплю масла (диаметром 3-5мм) на противоположную сторону сенсорного чипа (с двумя белыми полосками) и прижмите его к стеклянной призме в оптическом блоке биосенсора (см. Рис. 5).

Примечание: белые полосы выровнять по горизонтали в соответствии с размером проточной кюветы. Для этой цели предпочтительно использовать масло с высокой вязкостью. Например, рекомендуется следующее масло:

Cargille laboratories, Cedar Grove, NJ 07009 (973)239-6633 cargille.com : **BK-7 matching liquid**, $n=1,5167(\lambda=5893 \text{ \AA})$, вязкость: 1450 cSt – 1916 cP (температура 25 °C).

3) Установите магнитный держатель с установленной проточной кюветой (как показано на **Рисунке 3**) на призму с прикрепленным сенсорным чипом (через масло вязкости) и поверните рычаг на левой стороне оптического блока биосенсора против часовой стрелки.

Примечание: убедитесь, что сенсорный чип полностью охватывает проточную кювету и не будет протекать. Благодаря магнитным силам проточная кювета будет прижата к ФК чипу, образуя проточную ячейку с поверхностью сенсорного ФК чипа в качестве одной из стенок.

Примечание 2: убедитесь, что магнитный держатель установлен параллельно полюсам магнита. Полоска из бумаги (100 мкм толщиной) должна проходить между магнитным держателем и полюсами магнита.

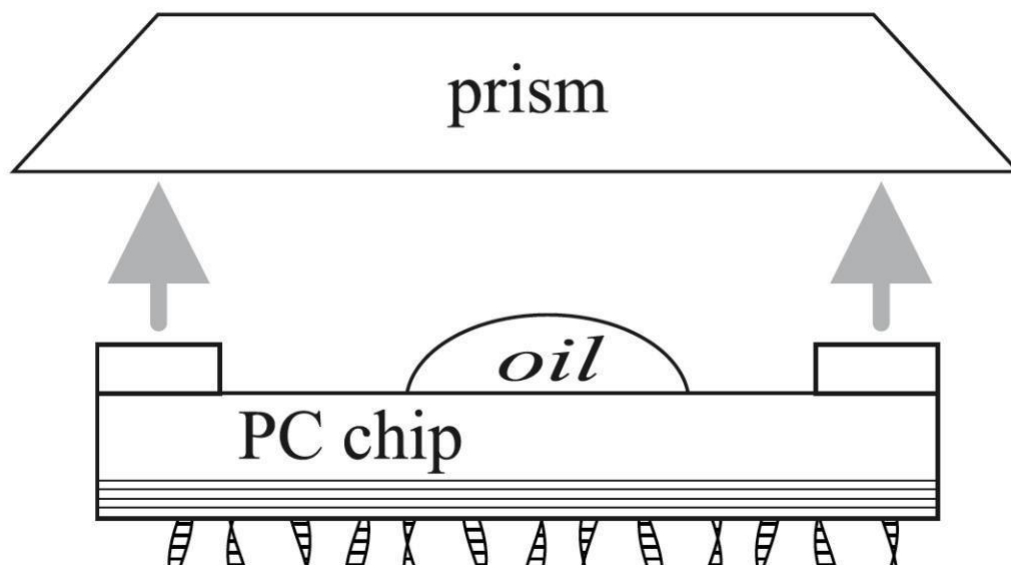


Рисунок 5. Прикрепление сенсорного чипа к призме (с каплей масла высокой вязкости).

Снятие сенсорного чипа

Поверните рычаг на левой стороне оптического блока биосенсора по часовой стрелке. Снимите магнитный держатель с проточной кюветой с призмы. Переместите сенсорный чип вертикально вдоль призмы и снимите его. Очистите сенсорный чип мягкой бумагой или тканевой салфеткой, смоченной этанолом или ацетоном, чтобы полностью удалить масло. После этого сенсорный чип следует один раз обработать ультразвуком в ацетоне или два раза в этаноле (по 20-30 минут каждый раз).

Очистите призму и проточную кювету мягкой бумажной или тканевой салфеткой, смоченной этанолом или ацетоном.

После измерения очистите или замените инъекционные трубки.

Для очистки трубки подсоедините ее к трубке перистальтического насоса с помощью стандартного металлического соединителя (входит в комплект). Поместите конец трубки в резервуар с этанолом. Используйте высокую скорость потока (40-60) перистальтического насоса в течение 3-5 минут. Перед повторным использованием тщательно просушите трубки, чтобы избежать появления пузырьков воздуха в системе.

Проточные кюветы

Проточные кюветы изготовлены из кварцевого стекла или пластиковой пластины с двумя отверстиями, через которые проходят металлические соединители трубок, служащие соответственно входом и выходом. Входная трубка опускается в небольшой резервуар, заполненный исследуемым раствором. Расход регулируется перистальтическим насосом (например, *Ismatec Reglo Digital*). Типичная глубина кюветы составляет от 20 мкм до 50 мкм, а соответствующий объем проточной кюветы — от 4 мкл до 10 мкл.

Система для жидкостей

Для перекачки жидкости из емкости в проточную кювету можно использовать перистальтический насос, например *Ismatec Reglo Digital*. Установите входные и выходные трубки в резервуары с жидкостью. Трубка из резервуара подсоединяется к входу проточной кюветы. Выход из проточной кюветы подсоединяется к входу насоса. Выход из насоса подсоединяется к тому же или другому резервуару.

Если (в самом начале работы) перистальтический насос не может подавать жидкость в систему в режиме откачки (когда насос находится за проточной кюветой), измените направление вращения насоса и заполните проточную кювету со стороны насоса. После заполнения системы жидкостью направление и скорость движения жидкости можно изменить по мере необходимости.

При использовании проточной кюветы глубиной 50 мкм и скорости потока перистальтического насоса, равной 10, жидкость в системе движется со скоростью ~ 250 мкл/мин. Этот объемный расход соответствует линейной скорости потока через проточную кювету ~ 1 мм/с.

Мертвый объем между резервуаром и проточной кюветой зависит от длины и диаметра трубки. Он равен 2 мкл на каждый 1 см длины трубки с внутренним диаметром 0,5 мм (используемой в данном биосенсоре). Это приводит к задержке данных примерно на 4 секунды при использовании трубки длиной 10 см (достаточной для подключения к стандартному резервуару). Мертвый объем между контейнером для жидкости и проточной кюветой должен быть уменьшен при использовании более коротких и тонких трубок.

Введение образца

Если необходимо измерить очень небольшие изменения биомолекулярных комплексов на поверхности фотонного кристалла, мы рекомендуем не изменять направление потока и вводить исследуемый образец во входной резервуар. В этом случае непрерывный поток через проточную кювету не будет прерываться или изменяться.

Если необходимо заменить входной резервуар, мы рекомендуем использовать следующую процедуру, чтобы избежать образования пузырьков воздуха в системе:

- (a) остановить поток с помощью выключения вращения перистальтического насоса;
- (b) извлеките входную трубку из старого резервуара и поместите ее в новый резервуар с новым исследуемым образцом;
- (c) снова включите поток с помощью перистальтического насоса.

Возможные артефакты прибора

Всплески

Всплески в данных могут быть вызваны:

- Небольшие пузырьки воздуха в проточной кювете.
- Изменением направления потока.

Промойте проточный насос с умеренной скоростью потока (не более 15). В случае проблем с пузырьками воздуха используйте высокую скорость потока (25-35) в течение нескольких секунд. Высокая скорость потока помогает удалить пузырьки воздуха, которые могут застрять в системе.

Если расположение чипа неудовлетворительно (между призмой и чипом или в проточной кювете видны пузырьки воздуха), снимите чип и тщательно промойте поверхность призмы, проточную кювету и чип. Очистите или замените инъекционную трубку.

Чтобы снизить вероятность появления пиков, используйте деионизированную воду и тщательно очистите сенсорный чип и систему потока.

Пузырьки воздуха на сенсорном чипе

Если проточная кювета заполнена жидкостью, но изображение на мониторе не соответствует тому, что показано на **Рисунке 4**, и на нем много темных пятен, это означает, что либо сенсорный чип не чист, либо в проточной кювете есть мелкие пузырьки воздуха. Наличие пузырьков воздуха на поверхности сенсорного чипа хорошо видно на изображении с цветной камеры в виде темных пятен. Если они искажают исследуемые области, удалите данные из этих областей или снимите сенсорный чип, промойте и тщательно высушите его. Также необходимо хорошо промыть проточную кювету от остатков предыдущих измерений. (Рекомендуем замачивать ее в спирте после измерений на пару часов). Необходимо промывать и просушивать (продувкой воздухом) соединительные трубочки после измерений, чтобы при следующем измерении не образовывались воздушные пузыри в кювете.

4. Работа

На **Рисунке 6** показан принцип работы биосенсора EVA 3.0 без меток.

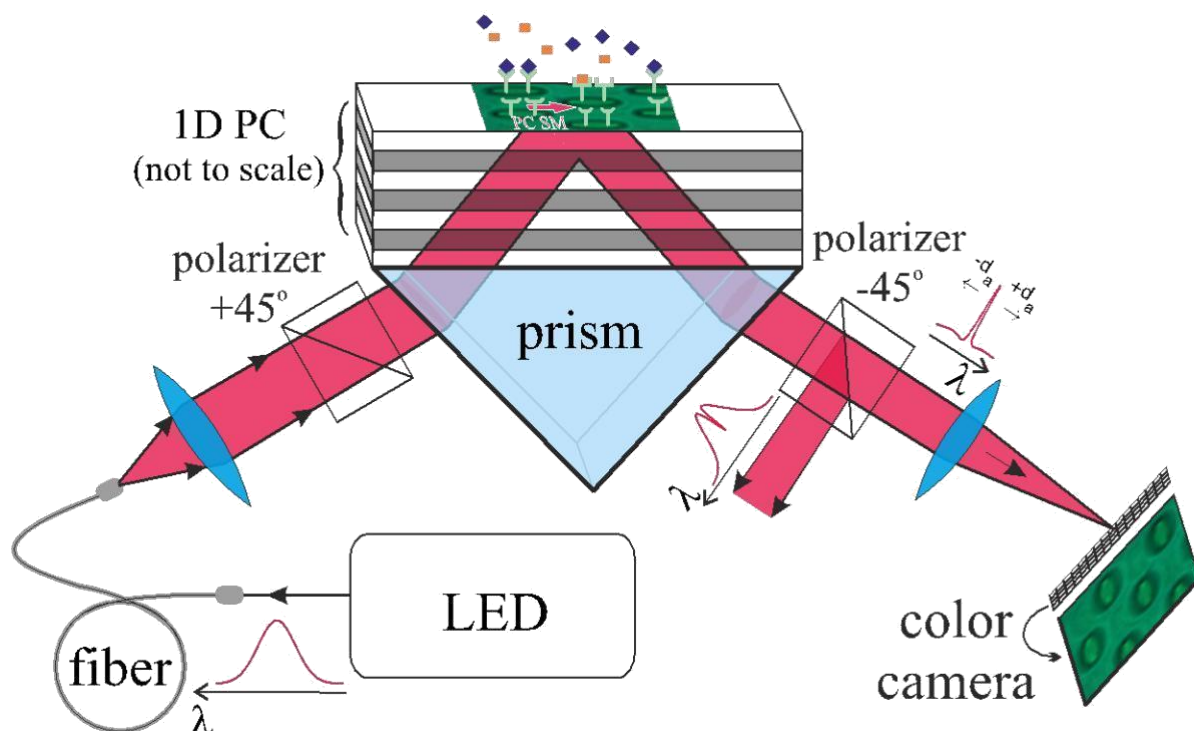


Рисунок 6. Схема биосенсора PC SMi. Показаны типичные спектры света, проходящего от светодиода к цветной камере.

Данные, полученные с помощью цветной камеры, были обработаны и представлены с помощью программного обеспечения EVA 3.0. Сдвиг резонансной длины волны PC SM был определен по следующему нормализованному дифференциальному значению:

$$z(x, y) = \frac{B(x, y) - G(x, y)}{B(x, y) + G(x, y)}, \quad (1)$$

где $B(x, y)$ и $G(x, y)$ — интенсивности синей и зеленой компонент в каждом цветном пикселе (x, y) камеры. Для преобразования $z(x, y)$ в $\lambda(x, y)$ были использованы чувствительности цветной камеры и процедура, описанная в [Sensors & Actuators B, (2018) v.276, 271–278]. Для управления и сбора данных с биосенсора EVA 3.0 используйте программу *PCbiosensors3.exe* (см. следующий раздел).

5. Обзор программного обеспечения

Программное обеспечение для EVA 3.0 включает две программы: первая предназначена для управления устройством и сбора данных (*PCbiosensors3.exe*), а вторая — для загрузки, анализа и подгонки данных (*PCbioViewer3.exe*).



Управление устройством

После включения светодиода и камеры устройства EVA 3.0 (с помощью двух соответствующих тумблеров) можно запустить программу *PCbiosensors3.exe*. Появятся три окна (А, В, С), как показано на

Рисунке 7

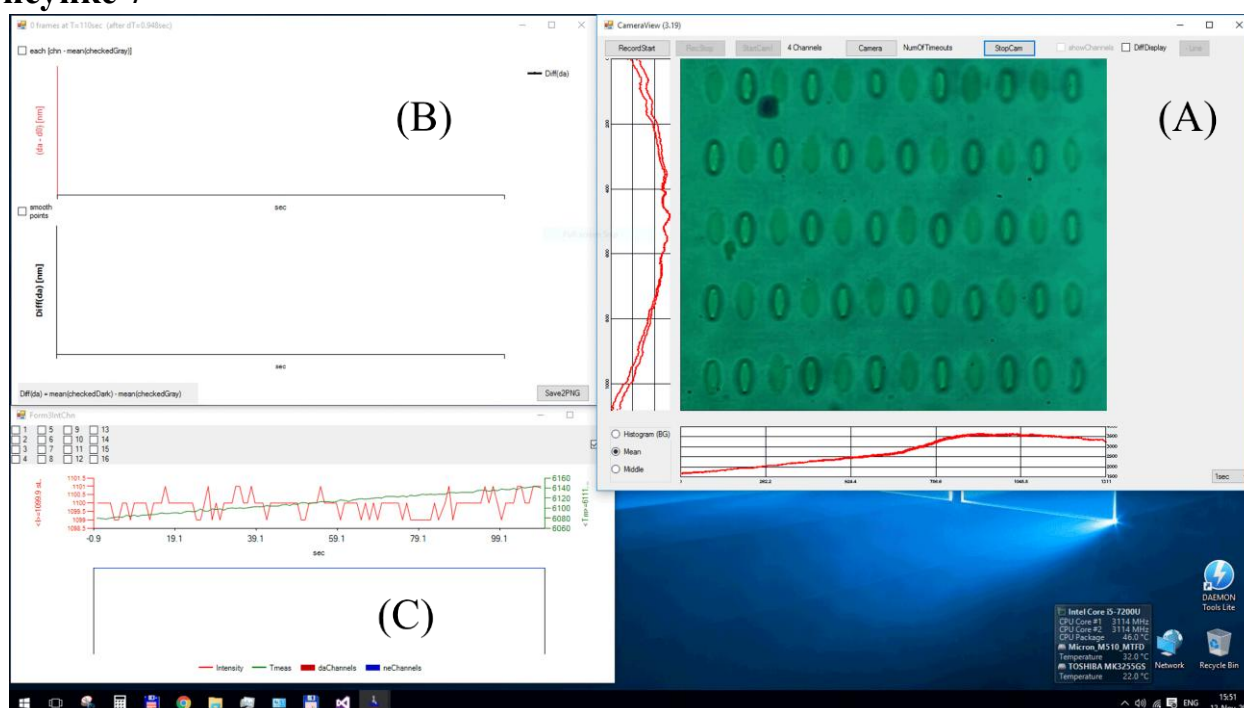


Рисунок 7. После запуска программы *PCbiosensors3* на экране появятся три окна.

Окно CameraView (А) содержит изображение с CMOS-камеры, его проекции по осям x и y , а также основные элементы управления. По этому изображению можно легко оценить качество образца.

Изображения с камеры на **Рисунке 7** (А) отображаются в естественных цветах. Биосенсор обнаруживает небольшое изменение цвета в каждой точке камеры с помощью нормализованной разницы (1) и пересчитывает его как сдвиг. Таким образом, устройство определяет для каждого пикселя камеры, чтобы получить пространственное распределение $\lambda(x,y)$ по камере, которое отражает пространственное распределение сдвигов резонанса волновода по образцу.

✓ Подсказка

В окне *CameraView* вы можете щелкнуть **правой кнопкой мыши** по изображению, чтобы получить значение $\lambda(x,y)$ в этой конкретной точке, и выбрать область записи (внутри изображения) с помощью **Shift + левой кнопки мыши и перетаскивания**. Другие параметры можно найти, нажав **F1** в этом окне (см. Рисунок 8).

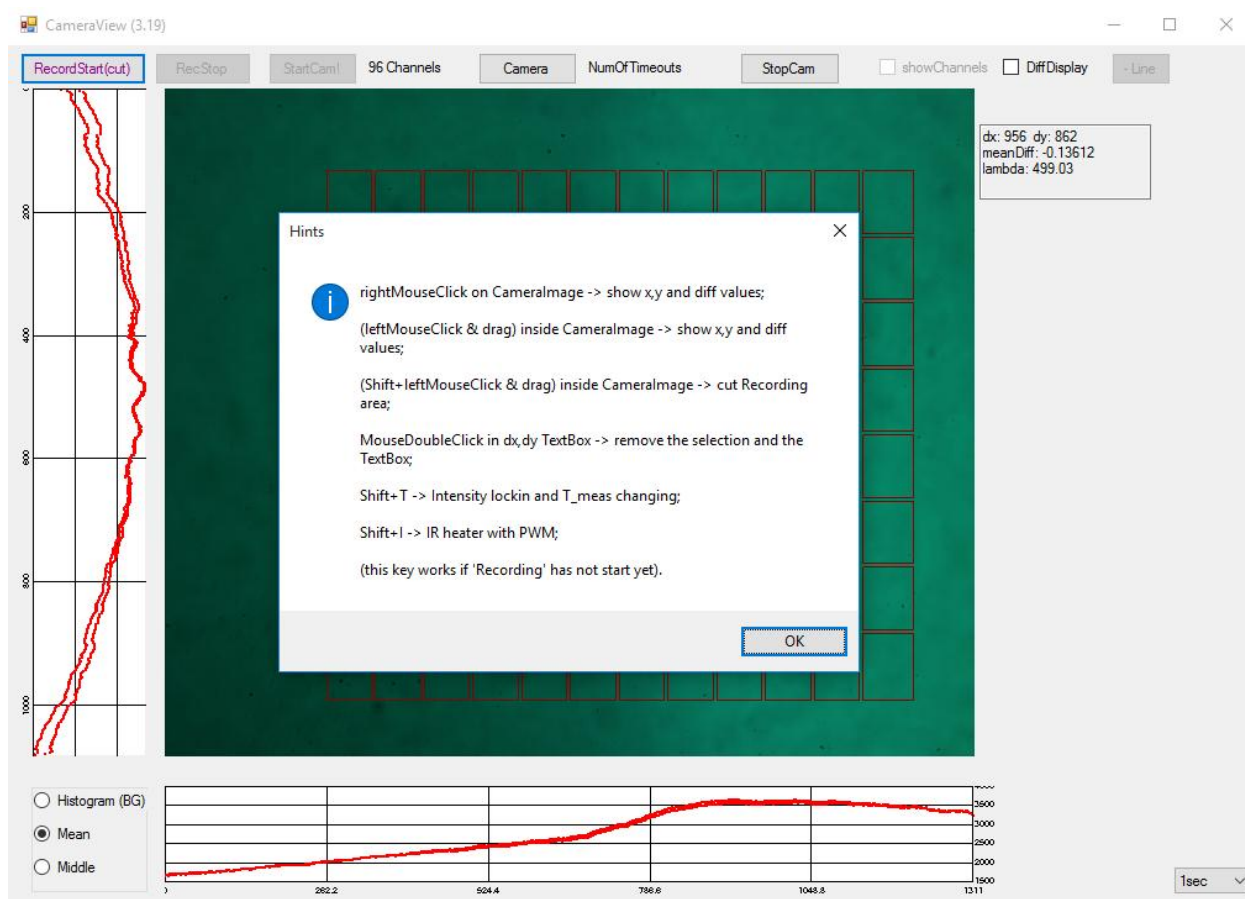


Рисунок 8. Подсказки по горячим клавишам (F1) в окне *CameraView*.

Чтобы увеличить видимый контраст изображений, можно использовать псевдоцвет (на основе уравнения (1)) вместо естественного цвета. Это не изменяет кинетические кривые и другие данные, регистрация которых в любом случае основана на уравнении (1), но делает любые пространственные изменения в изображениях более заметными невооруженным глазом и может помочь разделить поверхность образца на соответствующее количество точек регистрации. Флажок «DiffDisplay» используется для включения этого дифференциального отображения. Когда он установлен, обычные цветные изображения преобразуются в псевдо-цветные изображения с переменным коэффициентом усиления. Для положительного коэффициента усиления используется синусоидальное усиление без вычитания плоскости. Если установлен

отрицательный коэффициент усиления (или нажата кнопка «Line»), выполняется линейное усиление с вычитанием плоскостей нулевого, первого и второго порядка в выбранном квадрате (или по умолчанию во всех изображениях).

Увеличение контраста может быть полезно для выбора области записи на изображении (удерживая клавишу **Shift**, см. выше). После выбора нажмите кнопку «RecordStart(cut)», чтобы открыть подокно RecordStart. Это подокно необходимо для выбора количества и расположения каналов регистрации внутри области записи.

В появившемся подокне RecordStart (см. **Рисунок 9**) можно выбрать количество каналов и их пространственное расположение, а также имя каталога для сохранения данных. Если вы уже делали разделение чипа с тем же шаблоном пятен, вы можете выбрать этот шаблон в файле IniRef.dat из предыдущего каталога и загрузить старый шаблон, нажав «old channels from IniRef.dat».

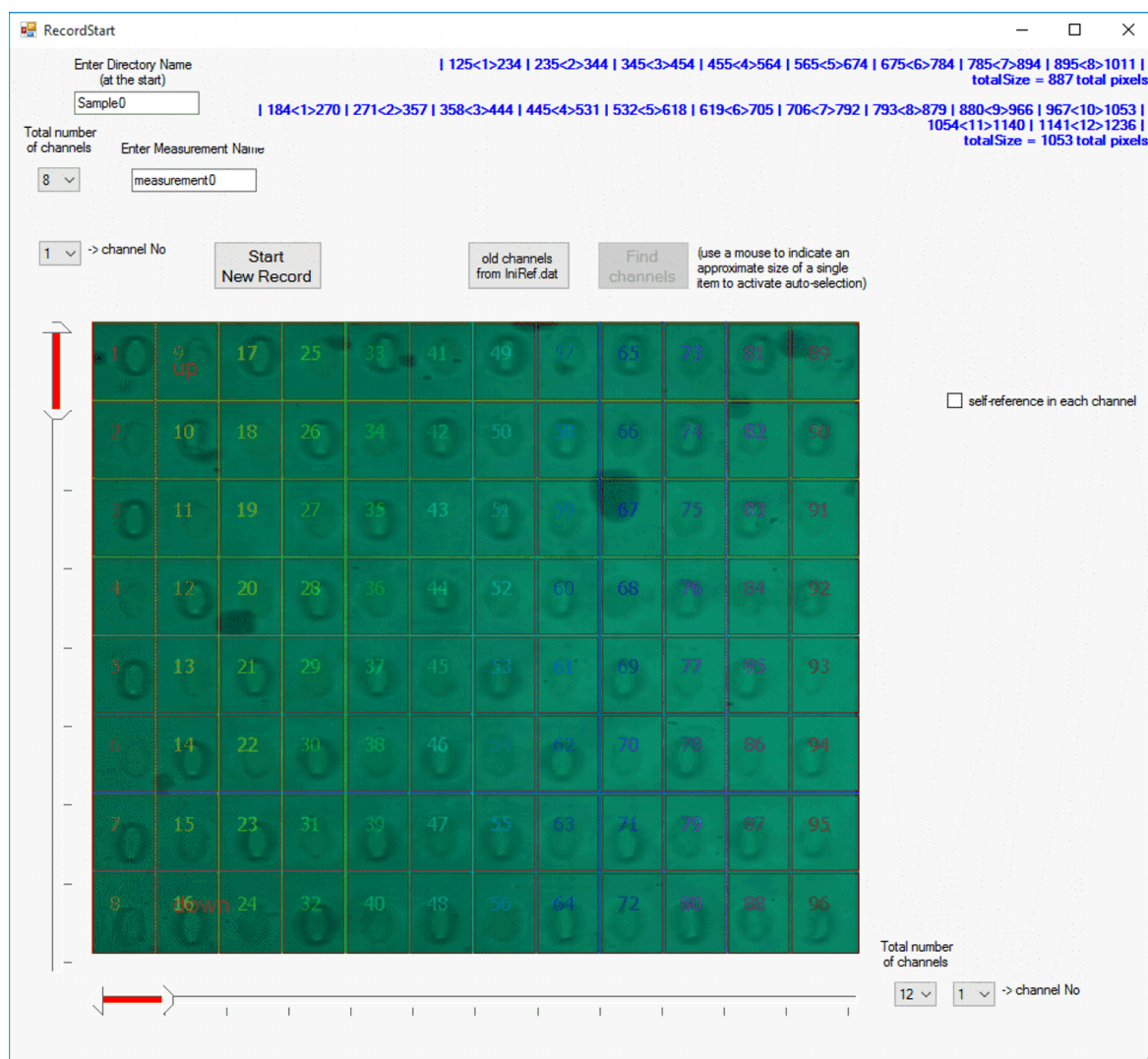


Рисунок 9. Окно RecordStart, в котором можно выбрать количество каналов, их пространственное расположение и имя каталога для сохранения данных.

✓ *Подсказка*

Вы можете настроить положение старого шаблона по осям X и Y с помощью **Ctrl + Shift + X**. Другие опции можно найти, нажав **F1** в этом окне (см. *Рисунок 10*).

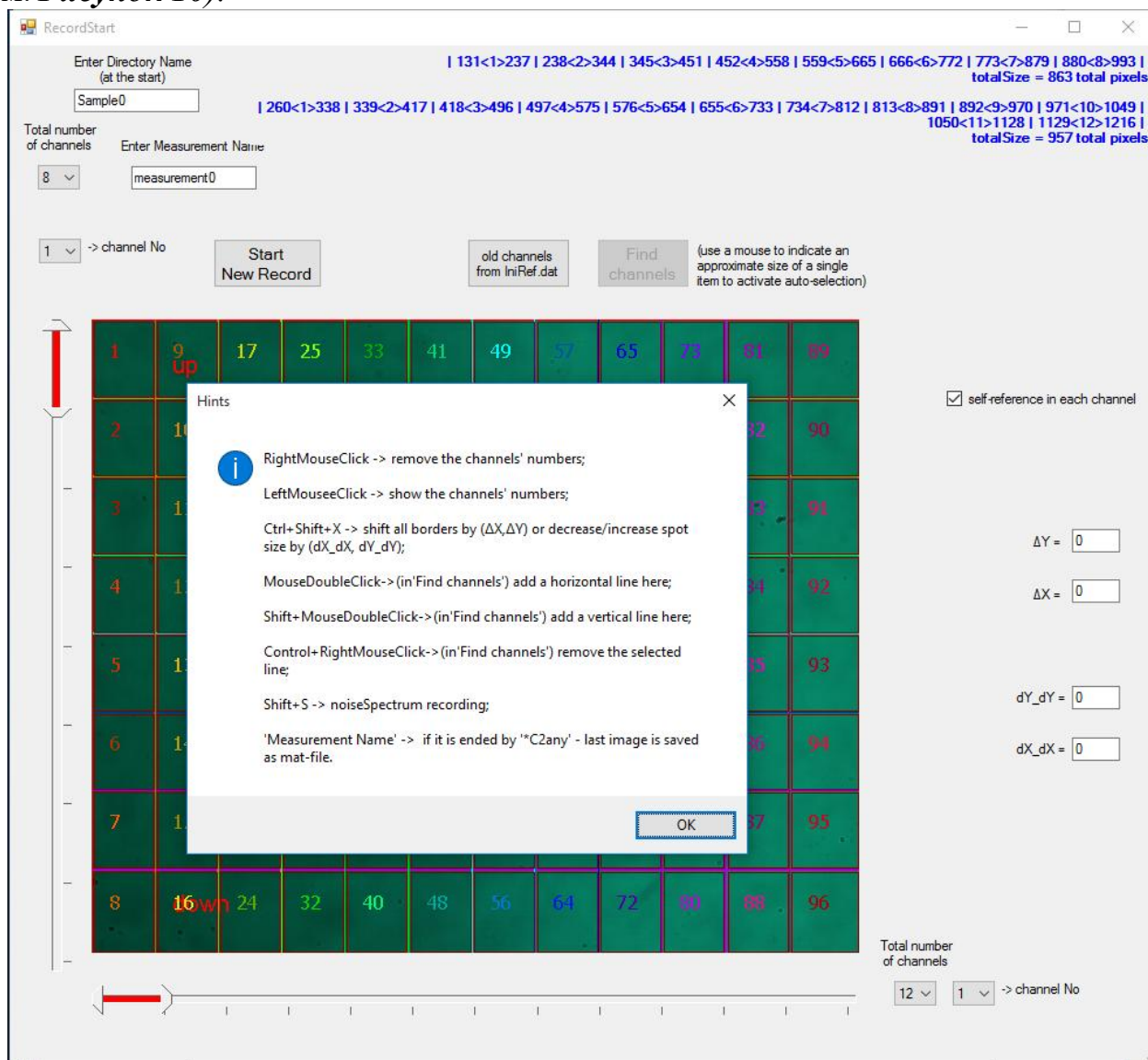


Рисунок 10. Подсказки по горячим клавишам (F1) в окне RecordStart.

Основной выбор, который необходимо сделать в подокне «RecordStart» перед началом регистрации, — это выбор типа опорных каналов в текущем образце:

1) «Self-reference в каждом канале» не отмечена:

Если (на текущем чипе) есть отдельные пустые места, которые позже будут служить в качестве опорных точек, необходимо запомнить нумерацию этих точек и вычесть данные из этих точек из данных регистрационных каналов. Если опорных точек нет вообще, и вы не планируете использовать опорные точки во время текущих измерений, также оставьте флажок «Self-reference в каждом канале» неотмеченным.

2) «Self-reference в каждом канале» отмечена:

Если на текущем чипе нет конкретных опорных точек, но вы хотите использовать свободное пространство вокруг каждого канала регистрации в качестве опорной области для этого конкретного канала, установите флажок «Self-reference в каждом канале».

Когда позиционирование точек регистрации завершено, вы можете начать запись, нажав кнопку «Начать новую запись». После нажатия кнопки «Начать новую запись» начинается новое измерение, и его результаты отображаются в окне данных (см. **рисунок 7**, пункт В).

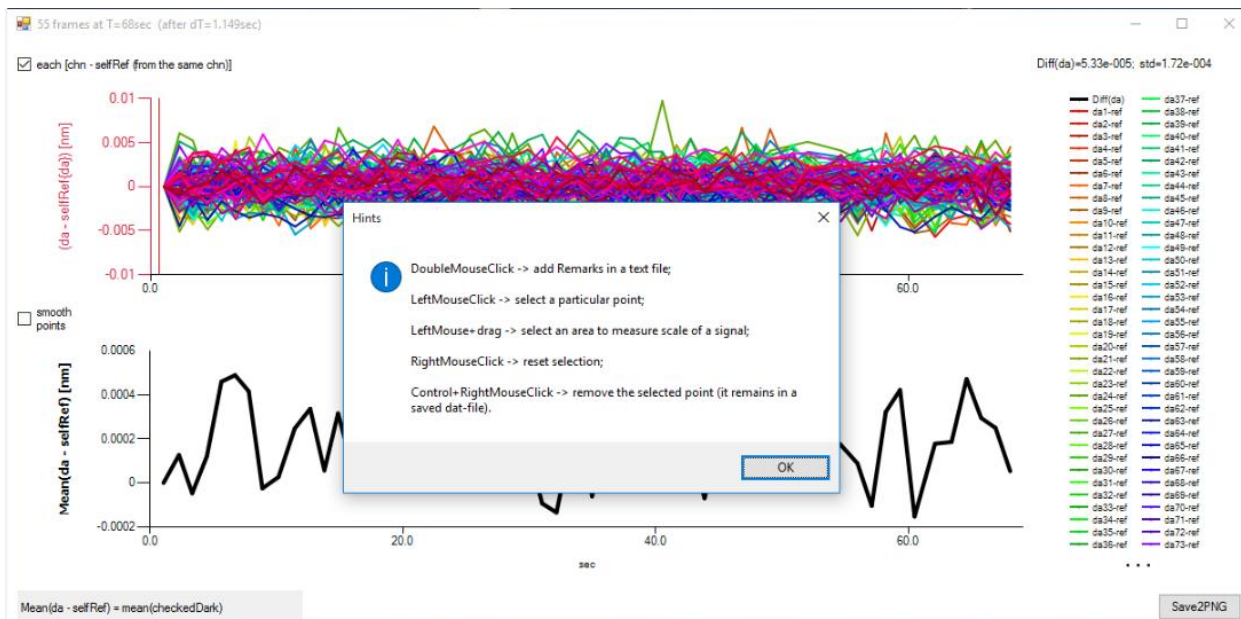


Рисунок 11. Подсказки по горячим клавишам (F1) в окне DataView.

Окно DataView (**рисунок 11**) содержит два графика. Один из них отображает изменения толщины слоя рекламы для каждого канала отдельно (разными цветами), а другой (черным цветом) отображает их комбинацию в соответствии с формулой:

«среднее значение (каналов Plus) – среднее значение (каналов Minus)». или «среднее (da – selfRef)=среднее(checkedDark)» (если в подокне «RecordStart» была отмечена опция «self-reference in each channel»). По умолчанию все каналы, помеченные как «Plus channels», и, следовательно, исходный черный график отображают среднее значение всех da[nm]. Отмеченные или неотмеченные каналы для визуализации можно выбрать в окне «Form3IntChn» (см. **Рисунок 7**, пункт С или **Рисунок 12**).

Все результаты измерений для всех каналов сохраняются в файле, независимо от того, отмечен канал или нет, поэтому эти флажки предназначены только для представления в окне DataView.

✓ **Подсказка**

Вы можете вести журналы регистрации данных и запоминать некоторые ключевые моменты, **дважды щелкнув левой кнопкой мыши** в определенной точке графика. На экране появится метка для аннотации, и запустится блокнот, чтобы вы могли записать свои замечания о текущем измерении. Сохраните и закройте окно блокнота после ввода замечаний и продолжите измерение.

Чтобы сохранить изображение экрана с некоторыми характерными кривыми данных, нажмите кнопку «save2PNG». Изображение будет сохранено в текущем каталоге данных.

✓ **Подсказка**

Иногда в данных могут возникать всплески (например, из-за небольших пузырьков воздуха в проточной кювете), и масштаб графика может измениться до неудобного значения. Вы можете либо дождаться обновления данных (это занимает менее 128 секунд), либо **удалить точку всплеска** с экрана вручную, указав на нее и нажав **Ctrl + правую кнопку мыши**.

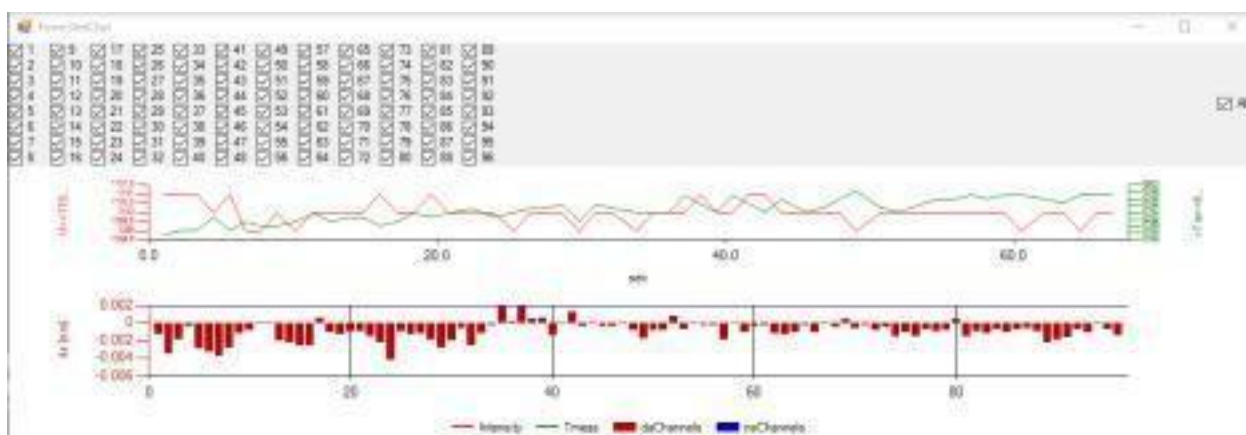


Рисунок 12. Вспомогательное окно Form3IntChn.

Графики в окне Form3IntChn (см. рисунок 12) являются вспомогательными и редко используются при маршрутизации измерений. Верхний график отображает среднюю интенсивность на CMOS-камере и время измерения, необходимое для сохранения этой средней интенсивности. Значение средней интенсивности (в данном случае $\langle I \rangle = 1100$) назначается в начале программы с помощью первого числа, следующего за именем ехе-файла (например, PCbiosensors3.exe 1100 32 0,5, где второе число — это количество интеграций в секунду, а третье число — масштабный коэффициент матрицы в CameraWindow).

✓ **Подсказка**

В окне *CameraView* **Рисунок (А)** можно нажать **Shift T**, чтобы управлять текущими значениями времени, включать и выключать фиксацию значения интенсивности и т. д.

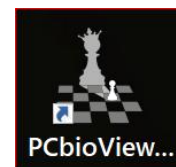
ВНИМАНИЕ!

Как правило, при обычных измерениях нет необходимости изменять настройки по умолчанию.

Чтобы прервать измерение, необходимо нажать кнопку «RecStop». Позже можно продолжить сбор данных с момента остановки в том же каталоге с другим именем измерения.

Чтобы полностью остановить текущий набор измерений, необходимо нажать кнопку «StopCam» и закрыть окно *CameraView*. Программа и все окна будут закрыты. Следующее измерение будет начато с начальных значений и сохранено в другом каталоге.

6. Загрузка и анализ данных



Для загрузки, анализа и подгонки ранее сохраненных данных необходимо запустить программу *PCbioViewer*. Появится окно, как показано на **рисунке 13**.

Первая кнопка («*Remarks and Curves Preview*») загружает все заметки (вставленные двойным щелчком мыши во время измерений) и все изображения (созданные кнопкой «save2PNG» во время измерений) из выбранного каталога данных. Это вспомогательная кнопка, которая служит для вызова каталога, в котором были сохранены определенные данные.



Рисунок 13. Окно загрузки данных.

Вторая кнопка («*Просмотр результатов d_a и RI и сохраненных изображений*») является основной кнопкой и загружает файл *daResults.dat* из выбранного подкаталога основного каталога данных *PCbiosensors_data*. Третья кнопка также является вспомогательной и служит для просмотра данных *mat*-файла.

Подгонка данных

Окно «ResultsData» (которое появляется после нажатия второй кнопки) позволяет выбрать и масштабировать нужный участок данных, просто нажав и удерживая левую кнопку мыши. Чтобы выбрать конкретный интервал данных для будущей подгонки, можно воспользоваться следующей подсказкой:

✓ Подсказка

В окне *ResultsData* можно выбрать участок данных для будущей подгонки на графике «*Diff(da) [nm]*», нажав **Shift + правую кнопку мыши** (см. иллюстрацию на рисунке 14). Тот же выбор на графике «*Diff(n) [RIU]*» можно сделать, нажав **Alt + правую кнопку мыши**.

Выбранная часть точек данных откроется в отдельном окне «FormFitResults» (см. рисунок 15), где можно выбрать метод подгонки. В программе есть несколько методов подгонки. Все они показаны на рисунке 16. Внутренние детали процесса подгонки можно найти в окне «FittingOutput», представленном на рисунке 17.



Рисунок 14. Выбор точек «Начало» и «Конец» в данных, загруженных из файла.

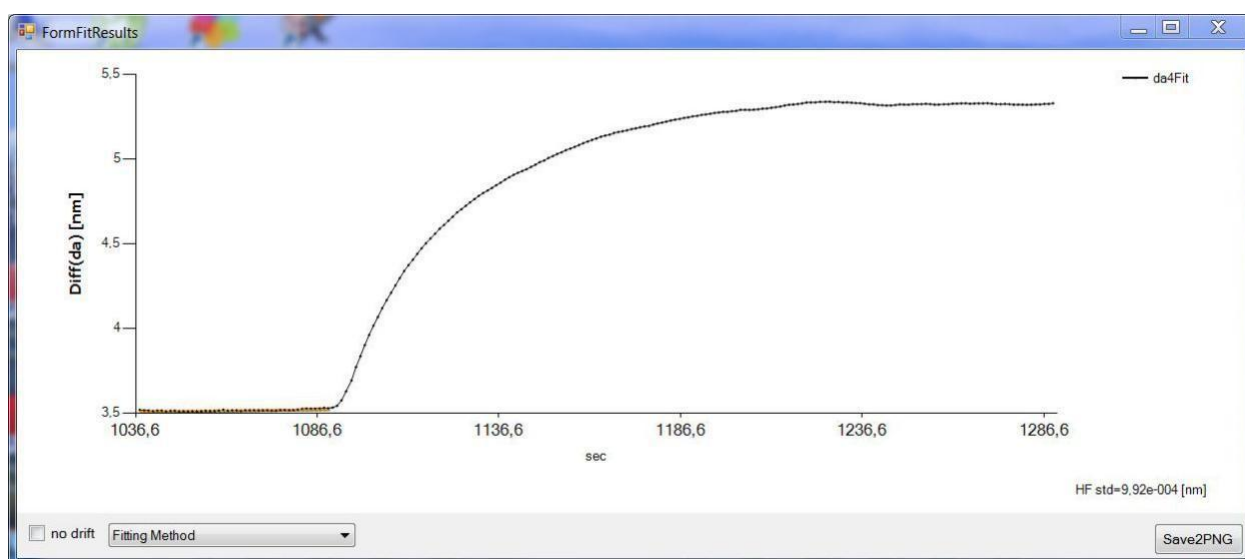


Рисунок 15. Форма для подгонки выбранной части данных.

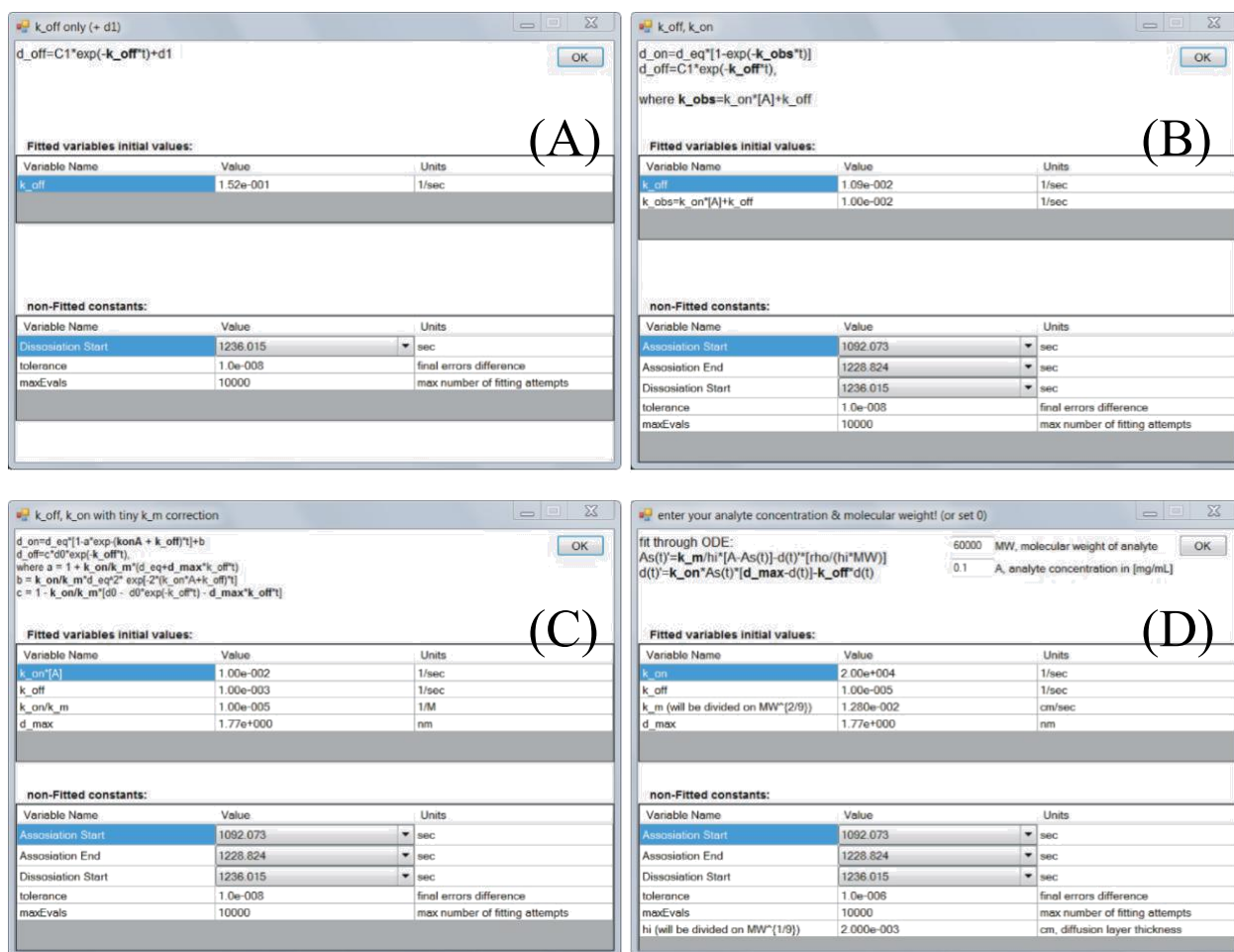


Рисунок 16. Методы подгонки данных.



Рисунок 17. Вспомогательное окно, иллюстрирующее процесс подгонки.

Кинетические модели

В окне «FormFitResults» **Рисунок 15**) можно выбрать несколько кинетических моделей для подгонки данных. На **Рисунке 16** показаны доступные модели (A-D) для подгонки. Основная модель — модель Ленгмюра (с дрейфом и без дрейфа — (B) на **рис. 16**). В этой модели (схематически изображенной на **рис. 18**):

$$\begin{aligned} d_{on} &= d_{eq} \cdot [1 - \exp(k_{obs} \cdot t)] \\ d_{off} &= C_1 \cdot \exp(k_{off} \cdot t) \end{aligned} ,$$

где

$$d_{eq} = \frac{k_{on} \cdot [A] \cdot d_{max}}{k_{on} \cdot [A] + k_{off}}$$

это толщина равновесного адсорбционного слоя при концентрации анализита $[A]$, а

$$k_{obs} = k_{on} \cdot [A] + k_{off}$$

наблюдаемая кинетическая скорость до равновесия.

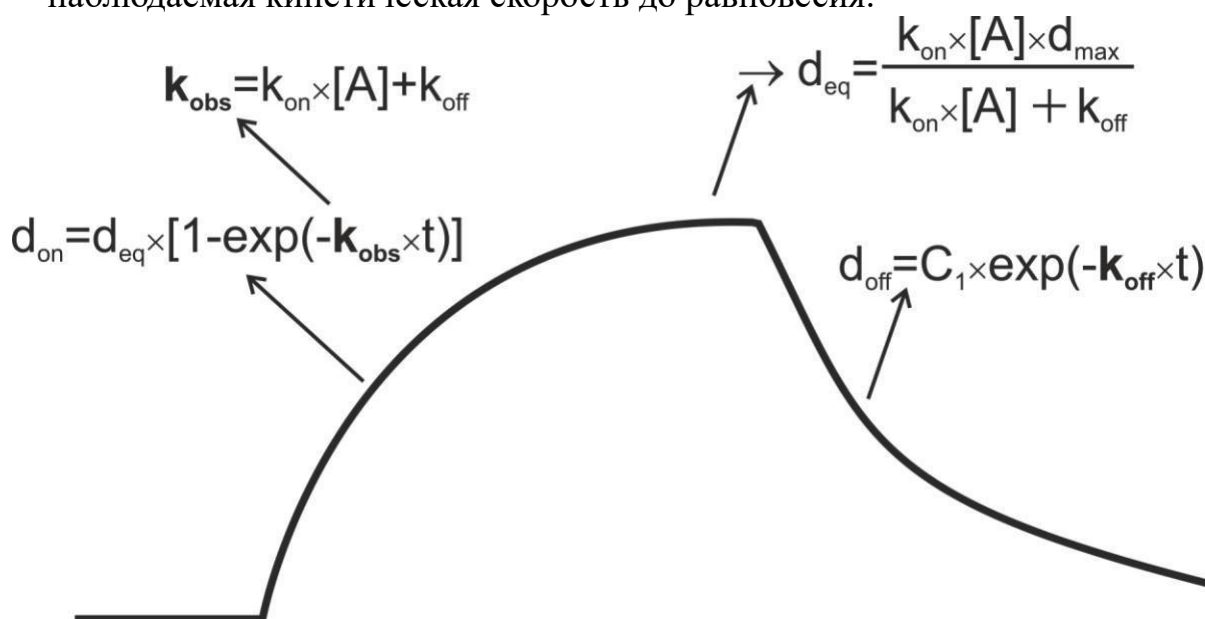


Рисунок 18. Схематическая кинетическая кривая, показывающая фазы ассоциации и диссоциации.

Кроме того, фазу диссоциации можно подобрать только при условии, что некоторая толщина адсорбционного слоя d_1 сохраняется в конце экспоненциальной диссоциации (модель (A) на **Рисунке 16**):

$$d_{off} = C_1 \cdot \exp(k_{off} \cdot t) + d_1 .$$

Две оставшиеся модели учитывают эффекты ограничения массопереноса. Модель (D) на **Рисунке 16** подгоняет экспериментальные

данные с помощью системы двух обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ)

$$\frac{\partial A_s(t)}{\partial t} = \frac{k_m}{h_i} \cdot [A - A_s(t)] - \frac{\partial d(t)}{\partial t} \cdot \frac{\rho}{h_i \cdot MW}$$

$$\frac{\partial d(t)}{\partial t} = k_{on} \cdot A_s(t) \cdot [d_{max} - d(t)] - k_{off} \cdot d(t)$$

Более подробную информацию об этом приведении можно найти в следующих источниках:

[1] “Extending the Range of Rate Constants Available from BIACORE: Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data,” by D.G. Myszka et al. (Biophysical Journal, 1998, v.75, p.583–594).

[2] “Kinetic and Thermodynamic Analysis of Ligand-Receptor Interactions: SPR Applications in Drug Development,” by N.J. De Mol and M.J.E. Fischer (Handbook of Surface Plasmon Resonance, Chapter 5, pp. 123-172, Eds.: R.B.M. Schasfoort and A.J. Tudos, Cambridge: RSC Publishing, 2008).

Модель (С) на **Рисунке 16** соответствует экспериментальным данным при допущении, что *ограничение массопереноса* слабое и может быть учтено как небольшое возмущение в стандартной модели Ленгмюра 1:1 – с (k_{on}/k_m) в качестве малого параметра:

$$d_{on} = d_{eq} \cdot [1 - a \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)] + b$$

$$d_{off} = c \cdot d_0 \cdot \exp(k_{off} \cdot t)$$

где

$$a = 1 + \frac{k_{on}}{k_m} \cdot (d_{eq} + d_{max} \cdot k_{off} \cdot t)$$

$$b = \frac{k_{on}}{k_m} \cdot d_{eq}^2 \cdot \exp(-2 \cdot k_{obs} \cdot t)$$

$$c = 1 - \frac{k_{on}}{k_m} \cdot [d_0 - d_0 \cdot \exp(-k_{off} \cdot t) - d_{max} \cdot k_{off} \cdot t].$$

Результаты различных моделей подгонки показаны на **Рисунке 19**.

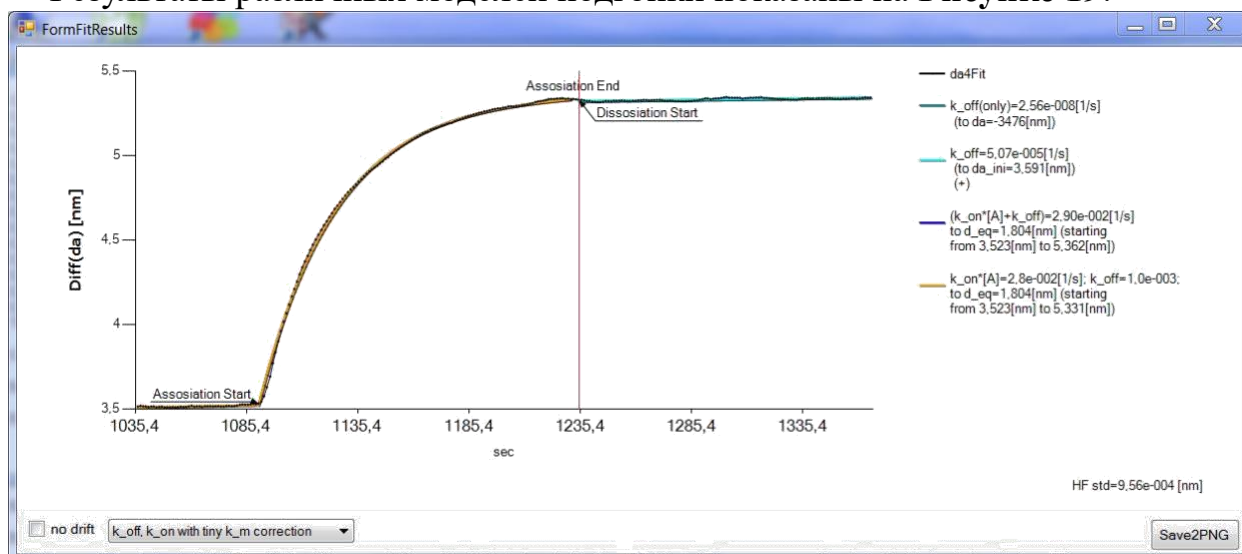


Рисунок 19. Исходные данные и результаты подгонки.