



Tudományos Diákköri Dolgozat

Fehérje adszorpció vizsgálata optikai és mechanikai elven működő jelölésmentes bioszenzorokkal

Prósz György Aurél
Lőrincz Attila Péter

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi kar

Témavezető: Dr. Horváth Róbert
Magyar Tudományos Akadémia
Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet



2014

Tartalomjegyzék

Kivonat.....	-2-
Célkitűzések	- 3 -
1. fejezet Irodalmi áttekintés.....	- 4 -
1.1 Bevezetés	- 4 -
1.2 Fehérjék adszorpciója	- 6 -
1.3 Kvarc kristály mikromérleg	- 9 -
1.3.1 A QCM 3000 műszer kísérleti összeállítása	- 13 -
1.3.2 Adatkiértékelő algoritmus a QCM 3000 műszerhez.....	- 14 -
1.4 Grating Coupled Interferometry (GCI – Rácscsatolt Interferometria).....	- 16 -
1.5 Borjúsérum albumin.....	- 23 -
1.6 Plazmatisztító működési elve.....	- 24 -
2. fejezet: Kalibrációs és fehérjeinjektálós kísérletek a QCM 3000 bioszenzorral	- 25 -
2.1 Három darab, arany bevonatú chip tesztelése levegő áramoltatásával	- 25 -
2.2 Glicerín viszkozitásának mérése.....	- 27 -
2.3 Fehérje adszorpció valós idejű mérése QCM 3000 bioszenzorral	- 28 -
3. fejezet: Kalibrációs és fehérjeinjektálós kísérletek a GCI műszerrel	- 30 -
3.1 Glicerín oldat törésmutatójának mérése.....	- 30 -
3.2 Kapcsolat a két csatorna között.....	- 31 -
3.3 BSA fehérjék adszorpciójának vizsgálata Ta ₂ O ₅ -al bevont felületű chippel	- 32 -
3.4 Fehérjeréteggel bevont chip felületének tisztítása a gyártók által ajánlott protokollal.....	- 35 -
3.5 Plazmatisztítással kiegészített tisztítási eljárás.....	- 37 -
4. fejezet: Hibaelhárítás a kísérletek során	- 39 -
5. fejezet: Párhuzamos mérés a GCI és a QCM 3000 műszerekkel	- 40 -
5.1 A mérés menete.....	- 40 -
5.2 Eredmények	- 40 -
Összefoglalás.....	- 42 -
Köszönetnyilvánítás	- 43 -
Irodalomjegyzék.....	- 44 -
Függelék	-47-

Kivonat

A bioszenzorok alkalmazása egyre fontosabb szerephez jut a gyógyszer- és anyagtudományokban, valamint az iparban is. A bonyolultabb problémák megoldásához folyamatosan megbízhatóbb és érzékenyebb eszközök kifejlesztésére van szükség. Tudományos diákköri munkánk során két, jelenleg fejlesztés alatt álló és különböző elven működő bioszenzor segítségével végeztünk méréseket. Feladatunk a két műszer tesztelése, érzékenységük megállapítása, valamint a kísérletek közben felmerülő problémák felderítése és megoldása volt. Kutatásunk során megismerkedtünk a berendezések alapvető elméleti és gyakorlati hátterével, valamint a kísérletekben használt anyagok tulajdonságaival, felhasználásával. Célunk eléréséhez külön-külön, illetve párhuzamosan is végeztünk méréseket a két eszközzel.

Az optikai elven működő bioszenzorikai méréseket a svájci Creoptix cég, GCI (ang. Grating Coupled Interferometry – Rácssatolt interferometria) nevű műszerével végeztük. Az eszköz egy ipari projekt keretében nemrég került telepítésre a laboratóriumunkban, a világon az elsők között tesztelhattük ezt az új technikát. Kalibrációs –és próbaméréseink megnyitották az utat a műszer jövőbeni legfontosabb alkalmazási területe, az élő sejtek kitapadásának vizsgálata felé.

A másik, mechanikai elven működő bioszenzort, a QCM3000-t (ang. Quartz Crystal Microbalance – Kvarc kristály mikromérleg) a Microvacuum cég forgalmazza. Előnye, hogy az általa vizsgált biológiai vékonyrétegekről (fehérjék, kitapadt sejtek) az optikai szenzorok adatait mintegy kiegészítve mechanikai információt is nyerhetünk. A kísérletek során nyert adatok feldolgozásához egy MATLAB algoritmust fejlesztettünk, valamint alapvető kalibrációs méréseket is végeztünk a műszeren.

Munkánkat a Központi Fizikai Kutatóintézet Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Nanobioszenzorikai Laboratóriumában végeztük. Kutatásunk hozzájárult a későbbi kísérletek megalapozásához, valamint értékes gyakorlati tapasztalatokat is szereztünk a laboratóriumi munkában.

Célkitűzések

Tudományos Diákköri munkánk során az általunk kitűzött, megvalósítandó célok a következők voltak:

- **A két, jelölésmentes bioszenzor elméleti hátterének megértése, a velük végezhető gyakorlati munka elsajátítása.**
- **Mindkét műszerhez egy adatkiértékelő algoritmus fejlesztése, mellyel a bejövő adatokból bővebb információ nyerhető ki.**
- **Az érzékelő chipekhez költséghatékony tisztítási eljárás kidolgozása, mellyel a későbbiekben a szenzorok újból felhasználhatóakká tehetők.**
- **Kalibrációs mérések végzése a műszerekkel, melyekkel megbizonyosodhatunk az érzékenységükről és alkalmazhatóságuk korlátairól.**
- **Próbamérések végzése BSA fehérjével, a kapott adatok kiértékelése, azokból következtetések levonása.**
- **A kísérletek során megfigyelt hibák felderítése, illetve adott esetben azok megoldása.**

1. fejezet

Irodalmi áttekintés

1.1 Bevezetés

Az emberiség az idők kezdete óta vágyakozik az ismeretlen felfedezése után. A tudomány a fejlődése során mind újabb és újabb eszközöket adott a kezünkbe, hogy megismerhessük a természetet. Ahhoz, hogy megfejthessük a körülöttünk zajló történések hátterét, mindinkább az egyre apróbb dolgok kutatása került az előtérbe. Ehhez hosszú időn keresztül például a különböző mikroszkópok voltak segítségünkre, ám ahogy a megismerésre váró jelenségek magyarázatát egyre kisebb mérettartományba kellett keresni, úgy vált szükségessé újabb műszerek kifejlesztése.

Napjaink tudományos kihívásaihoz az atomok, molekulák szintjén, valós időben szükséges megfigyelnünk a jelenségeket. A nanotechnológia biológiai alkalmazási területén az egyik legkecsegtetőbb érzékelő rendszerek a *bioszenzorok*.

Jelenleg a legtöbb műszerrel úgy végzik a kísérleteket, hogy közben a vizsgálandó molekulákat valamilyen jelölő anyaggal kezelik (radioaktív, fluoreszcens), és ennek az anyagnak a jelét keresik a vizsgált térfogatban vagy felületen. Sajnos ez a módszer rengeteg hátránnyal jár. A jelölő molekulák, valamint a vizsgálandó anyagok kezelése nagyon költségigényes, és a folyamat során maga a jelölés is befolyásolhatja a kísérlet kimenetelét. Ezen hátrányok kiküszöbölésére nyújthatnak alternatívát a jelölésmentes bioszenzorok.

Ezek segítségével gyorsan, és költséghatékony módon lehet molekulák, vagy akár egyes atomok különböző, akár specifikus felismerő elemekhez való kötődését kimutatni.

Az eredményeket többek között felhasználják a gyógyszerkutatásban, az igazságügyben (drog, dopping vizsgálatok), és az iparban is. [1][2][3][4]

Ezek közül az egyik legígéretesebb jelátalakítók közé tartoznak az úgynevezett optikai hullámvezető alapú érzékelők. Ezen eszközök működése kihasználja azt a jelenséget, mely során a fény bizonyos megvilágítási szög és törésmutató esetén a határfelületről teljesen visszaverődik. A terjedő módus úgynevezett evanescens mezejének segítségével letapogathatóvá válnak a hullámvezető réteg közvetlen közelében zajló folyamatok.

A folyamat során az oldatok törésmutatójában beálló parányi változásokból lehet következtetni az adott közeg fizikai tulajdonságaira, így például a letapadt fehérjeréteg vastagságára. [5]

Ezek után rögtön látszik, hogy célszerű felismerő molekulákat hullámvezető struktúrákra, chipekre rögzíteni, így nyitva meg az utat a célmolekulák kvantitatív analízise előtt. A szenzorchipet folyadékcellával felszerelt mérőkészülékbe helyezve valós időben mérhetjük a molekulák kötődését. Az általunk használt bioszenzor a GCI (angolul Grating Coupled Interferometry, Rácscsatolt Interferometria), melyet egy nemzetközi ipari projekt keretében volt alkalmunk tesztelni. [6]

Az előbbi jelátalakítóhoz hasonló módon alkalmazható, de teljesen más elven működő bioszenzorokhoz sorolhatóak a tömegérzékeny jelátalakítók. Ezek mindegyikében az a közös, hogy olyan fizikai mennyiséget mérnek, amely az eszköz mérőfelületére letapadt molekulák össztömegének a függvénye. A kísérlet során jellemzően a rezgésbe hozott rendszer sajátfrekvenciájának a megváltozását mérik különböző módszerekkel.

Az ilyen típusú eszközök közül kiemelendő a *kvarc-kristály mikromérleg* (angolul quartz crystal microbalance, QCM), amely kihasználja a kvarc kristály azon tulajdonságát, hogy bizonyos frekvenciájú váltófeszültségre kapcsolva rezonanciába hozhatók, amely függ a rátapadt tömeg nagyságától is, így szolgáltatva információt az érzékelő közvetlen közelében található biológiai vékonyrétegekről.[7]

A következőkben ismertetjük a fehérjék kitapadásának elméleti hátterét, majd a két bioszenzor kerül bemutatásra.

1.2 Fehérjék adszorpciója

A fehérjék az élő szervezetek egyik legfontosabb összetevői, rengeteg folyamatban részt vesznek, mint:

- Az anyagcsere folyamatokhoz elengedhetetlen reakciók katalizálása
- A sejtek mechanikai merevítése
- Sejtek közötti kommunikáció
- Sejtek kitapadása

A fehérjék felépítésüket tekintve hatalmas, több tízezer dalton tömegű szerves makromolekulák, melyek elemi összetevői a különböző aminosavak. Az élő szervezetek fehérjéit 20 féle aminosav építi fel, melyek peptidkötésekkel egymásba kapcsolódva határozzák meg a makromolekula elsődleges szerkezetét.

Az egymás után, sorban elhelyezkedő aminosavaknak geometriai okokból energetikailag célszerűbb különböző periodikus struktúrákba rendeződni, mint amilyen az alfa hélix és a béta redő. Ezt nevezzük a fehérje másodlagos szerkezetének.

Az egyes, egymástól távol elhelyezkedő aminosavak között felléphetnek másodlagos kémiai kötések, mint például a hidrogén híd, így a polipeptidlánc képes komplex, 3 dimenziós térformákat kialakítani, mely a fehérje harmadlagos szerkezete.

Abban az esetben, ha a fehérje úgy képes funkcióját betölteni, hogy másodlagos kötésekkel kapcsolódik egy másik polipeptidlánchoz, akkor a negyedleges szerkezetéről beszélünk. [8]

1.2.1 A fehérjék és felületek interakciója

Méréseink során a fehérjék és bizonyos felületek közötti kölcsönhatások kinetikáját vizsgáltuk. Az adatok kiértékelése szempontjából fontos lépés a fehérjék felületre való kitapadásának elméleti hátterének megértése. A spontán adszorpció létrejöttéhez elengedhetetlen, hogy a szabadenergia változás negatív legyen:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S < 0 \quad 1.$$

ahol H az entalpia, T a hőmérséklet és S az entrópia.

Az összes adszorpciós folyamat során lényegében a fehérje úgy kapcsolódik az egyes aminosav-oldalláncaival az adott tulajdonságokkal rendelkező felülethez, hogy eközben a teljes rendszer szabadenergiája minimális legyen. A folyamatban nagyrészt az óriásmolekula felszínén található, poláros és töltött részek vesznek részt a kölcsönhatásban a felülettel. Tekintettel arra, hogy az oldalláncok tulajdonságai nagyon sokfélék lehetnek, a fehérje kitapadása is egy bonyolult, dinamikus folyamat.

A szabadenergia-minimumra való törekvés során a protein szerkezete folyamatosan változik. Ez egy egyensúlyi folyamathoz vezet, mely során folyamatosan történik adszorpció és deszorpció. [9]

1.2.2 Az adszorpcióban résztvevő kölcsönhatások

A fehérjék kitapadásuk során az alábbi kölcsönhatásokkal léphetnek interakcióba a felülettel:

Coulomb-kölcsönhatás:

A fehérje izoelektromos pontja szerint vonzó, illetve taszító kölcsönhatás is lehet. Az izoelektromos pont azon a pH értéken van, melyen a protein nem rendelkezik töltött csoportokkal. Ettől eltérő pH értéken a felülettel az interakció ezeknél a csoportoknál valósulhat meg.

Hidrofób kölcsönhatás:

A hidrofób kölcsönhatás az apoláris komponensek spontán dehidratációját és azutáni aggregációját jelenti vizes közegben. A fehérjék belső része legfőképp apoláris aminosavakból épül fel. Ennek az oka a hidrofób kölcsönhatás, amely eltaszítja az apoláris csoportokat a vizes közegtől a fehérje belső része felé, ahol más oldalláncokkal tudnak kapcsolatot kialakítani. Ekkor, a fehérje molekula poláris oldallánca már megtalálható a felületen, melyek a szabad energiát csökkenteni tudják az őket körülvevő víz és ionok közti kölcsönhatásokkal a hidrogénkötések segítségével.

Van der Waals kölcsönhatás:

Kölcsönhatás dipólus és indukált dipólus molekulák között. A fehérjemolekulákban ezt befolyásolja a környező vizes közeg, amely tartalmazhat ionokat és dipólus molekulákat.

1.2.3 Fehérjekitapadás dinamikája

A fehérjekitapadást nem csak a fehérje és a felület közötti kölcsönhatások befolyásolják, a fehérjék kölcsönösen versenyeznek, hogy kitapadjanak más szabad felületeken. Kezdetben a felületen találhatók, más, kisebb molekulák. Így a kitapadt molekulák elmozdulhatnak más, erősebb molekulák által, vagyis a fehérjeréteg folyamatosan cserélődik.

A fehérjekitapadás egy komplex folyamat, melyet nem lehet megjósolni mindössze egy faktor által, hiszen ahogy láttuk, rengeteg tényezőtől függ egyszerre. [9]

1.2.4 Fehérje adszorpció kinetikája:

- I.) **Transzport a szorbens felület felé.** Először is a fehérje molekulák véletlenszerű irányokból megközelítik a felületet. A fehérje molekula szabálytalanságát és heterogenitását, valamint a felület polaritását és töltését figyelembe véve az eloszlás a különböző irányokban különböző erősséggel történhet.
- II.) **Kapcsolódás a határfelületen.** A kezdeti fehérje-felület kölcsönhatás, mely erősen meghatározza a kezdeti fehérje kapcsolódás idejét.
- III.) **A fehérjeszerkezet megváltozása a kitapadt állapotban.** Dinamikus folyamatok a felület közelében, valamint a fehérjemolekulák mozgása és konformáció változása.
- IV.) **Leválasztás és elszállítás a határfelülettől.** A deszorbeált fehérjék továbbszállítása, ha a kötés nem túl erős.

[9] [10][11][12]

1.3 Kvarc kristály mikromérleg

A kvarc kristály mikromérleg (QCM) működési elve az úgynevezett piezoelektromosság jelenségén alapszik. Ennek során bizonyos anyagok esetében (kvarc, kerámia) a deformálásukkor elektromos tér indukálódik az anyagon belül. A deformáció mértékének változtatásával befolyásolható az elektromos tér nagysága. A jelenség fordítva is megfigyelhető, elektromos tér hatására a piezoelektromos tulajdonsággal rendelkező anyag szerkezete megváltozik. Ezt kihasználva, a kristályra bizonyos frekvenciájú váltakozó elektromos feszültséget kapcsolva periodikusan rezgésbe hozható. Ennek frekvenciája függ az anyag tömegétől. Ha erre a rendszerre valamilyen forrásból többlet tömeg kerül, akkor megváltozik a rezgés frekvenciája. Ez képezi a QCM technológia alapját, mely során egy vékony kvarc lapkát hoznak rezgőmozgásba. [13]

A következő egyenlet megmutatja, hogyan változik a kristály frekvenciája a ráakódott tömeg hatására:

$$\Delta m = \frac{-C \cdot \Delta f}{n} \quad 2.$$

ahol n az n -edik felharmonikus száma, C pedig egy, a kristályra jellemző állandó.

Az előbbi összefüggés a híres Sauerbrey egyenlet, amely viszont csak korlátozott körülmények között, vákuumban és merev rétegekre érvényes. Látható, hogy biológiai alkalmazásokra nem használható fel, mert az előbbiekből egyik sem fordul elő a mérések során. [14] [15][16][17]

Újabb fejlesztésű mikromérleg műszerek esetén (QCM-D) lehetőség van az úgynevezett disszipáció mennyiségének a mérésére is. Ezt úgy valósítják meg, hogy frekvencia-mérések között rövid időre kikapcsolják a rezgőmozgást előidéző feszültséget, majd rezgés csillapodásának mértékét megfigyelik. Ha a felületre tapadt réteg merev, akkor a rendszer lecsengési ideje lassú, ellenben, ha a réteg puhább és kevésbé sűrű, akkor ez az idő gyors lesz.

A rezgőmozgás amplitúdója a következőképpen adható meg, miután megszüntetjük a rezgést létrehozó feszültséget:

$$A(t) = A_0 e^{\frac{-t}{\tau}} \sin(2\pi f t + \varphi) \quad 3.$$

ahol τ a csillapítási együttható, A_0 a rezgés maximális kitérése, és φ az oszcillátor fázisszöge.

A disszipáció tehát annak a mértéke, hogy milyen gyorsan cseng le az amplitúdó:

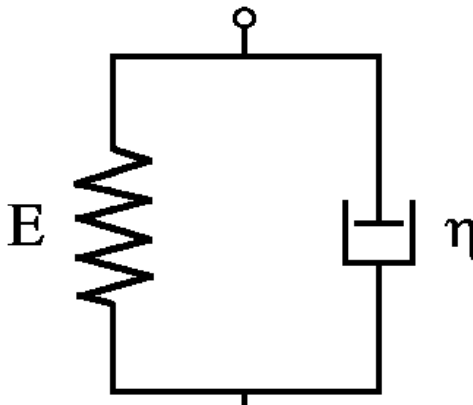
$$D = \frac{1}{\pi f \tau} \quad 4.$$

A Sauerbrey egyenlet segítségével, amennyiben a letapadt réteg merev és sűrű, az eddigi tapasztalatok alapján $5 \frac{ng}{cm^2}$ pontossággal megbecsülhető a felületi tömeg. Puhább, lazább szerkezet esetén viszont ez a számítási mód alulbecsüli a tömeget. [18]

Párhuzamosan mérve a disszipáció –és frekvenciaváltozást kvalitatív és kvantitatív adatokat nyerhetünk a letapadt réteg szerkezetéről. Grafikonon ábrázolva a disszipáció mennyiségét a frekvenciaváltozás függvényében, következtethetünk a réteg azon tulajdonságára, hogy milyen mértékben változik a „keménysége”. [19]

Lehetőség van a két mért adatból az adszorbalódott anyag egyéb tulajdonságainak mérésére is, úgymint a réteg vastagsága, nyírási viszkoelasztikus modulusa, valamint a viszkozitása.

Ezeknek a kiszámításához az úgynevezett Voigt model lesz segítségünkre. Ezt egy párhuzamosan kapcsolt ideális ellasztikus rugó és egy ideális viszkózus lengéscsillapító által lehet reprezentálni.



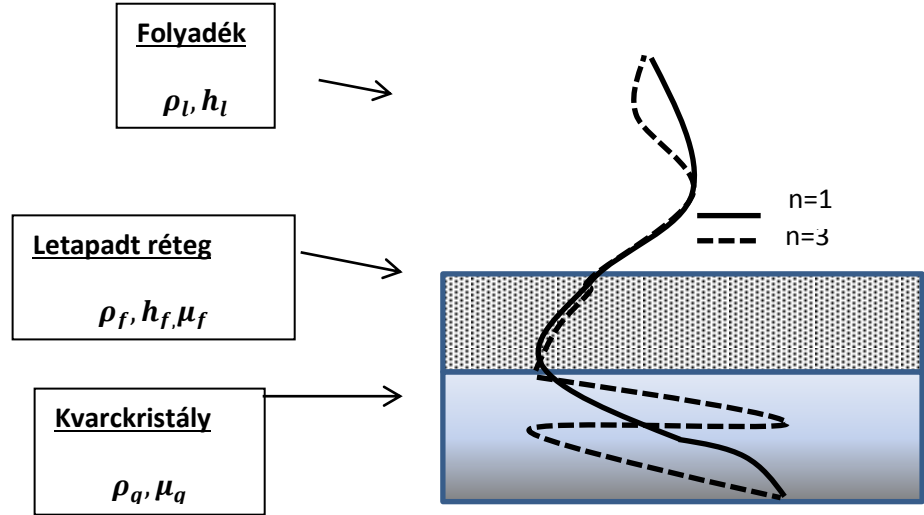
1. ÁBRA A VOIGT-FÉLE VISZKOELLASZTIKUS MODEL VÁZLATOS ÁBRÁZOLÁSA

A rendszer tulajdonságaiból levezethető az úgynevezett komplex viszkoelasztikus modulus:

$$G = G' + iG'' = \mu_f + i2\pi f\eta_f \quad 5.$$

ahol μ_f az ellasztikus nyírási modulus, η_f a nyírási viszkozitás, f a rezonanciafrekvencia.

Ezt a modellt felhasználva a lerakódott réteget 4 ismeretlennel jellemezzük, ezek a réteg vastagsága(d_f), sűrűsége(ρ_f), nyírási viszkozitása(η_f), és az elasztikus nyírási modulus-a(μ_f). [20]



2. ÁBRA A KÍSÉRLETEINK SORÁN HASZNÁLT MODEL VÁZLATOS RAJZA. AZ ÁBRÁN AZ ALAPMODUS ÉS A 3. FELHARMONIKUS TERJEDÉSE SZEMLÉLETESEN ÁBRÁZOLVA VAN. MEGFIGYELHETŐ, AZ EGYES MODUSOK VISELKEDÉSE A KÖZEGEKBEN

A kvarckristály tulajdonságait ismerjük, a folyadékot pedig ideális newtoni folyadéknak tekintjük. A letapadt réteg esetében az ismeretlen tulajdonságok kiszámításához szükségünk van az egyik együtttható becslésre, mely az esetek többségében a letapadt réteg sűrűsége.

Mérve a disszipáció –és a frekvenciaváltozást, az alábbi képletekkel kiszámolhatjuk a hiányzó paramétereket:

$$\Delta f \approx \frac{1}{2\rho_0 h_0} \left\{ \frac{\eta_3}{\rho_3} + h_1 \rho_1 \omega - 2h_1 \left(\frac{\eta_3}{\rho_3} \right)^2 \frac{\eta_1 \omega^2}{\mu_1^2 + \omega^2 \eta_1^2} \right\} \quad 6.$$

$$\Delta D \approx \frac{1}{\pi f \rho_0 h_0} \left\{ \frac{\eta_3}{\rho_3} + h_1 \rho_1 \omega - 2h_1 \left(\frac{\eta_3}{\rho_3} \right)^2 \frac{\eta_1 \omega^2}{\mu_1^2 + \omega^2 \eta_1^2} \right\} \quad 7.$$

ahol

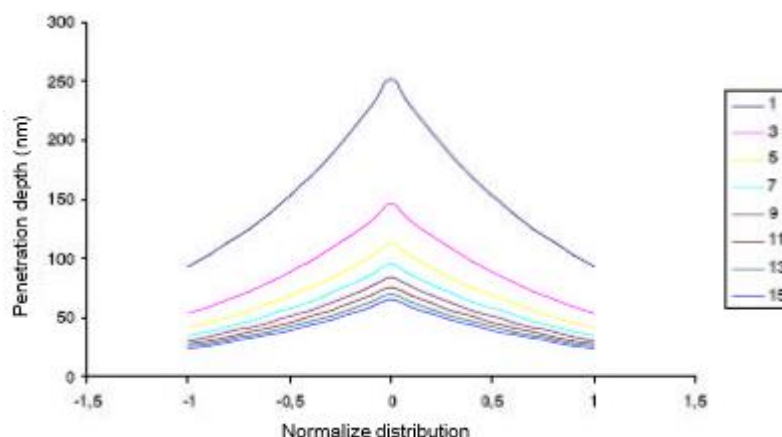
$$\delta_3 = \sqrt{\frac{2\eta_3}{\rho_3 \omega}} \quad 8.$$

ρ_0, h_0 a kvarckristály sűrűsége és vastagsága, $h_1, \rho_1, \eta_1, \mu_1$ a kitapadt réteg vastagsága, sűrűsége, viszkozitása, és elasztikus nyírási modulusa, η_3, ρ_3 a folyadékréteg viszkozitása és sűrűsége.

Az ismeretlen paraméterek meghatározásához érdemes az alap moduson túl több felharmonikuson is mérni a disszipáció –és frekvenciaváltozást, így elegendő egyenletünk lesz az ismeretlenek meghatározásához. [21][22]

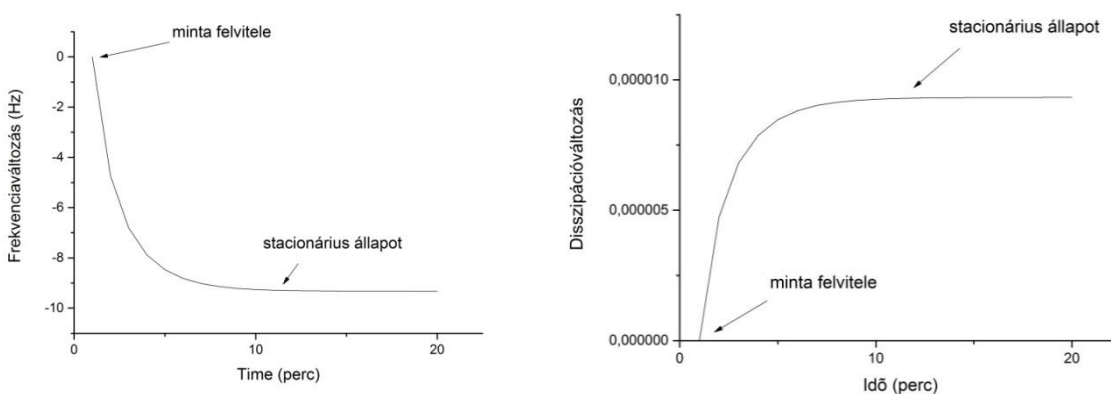
Az általunk használt QCM 3000 műszerrel lehetőség van az alapfrekvencián túl a 3. , 5. , 7., 9., 11., 13., 15. felharmonikus is mérni. Azt tapasztaltuk, hogy egyszerre mérve mindegyiket a műszer vezérlő szoftvere instabillá válhat, ezért a méréseink során csak a 3., 5. és a 7. felharmonikusot mértük.

A következő ábrán láthatóak a különböző felharmonikusok penetrációmélysége:



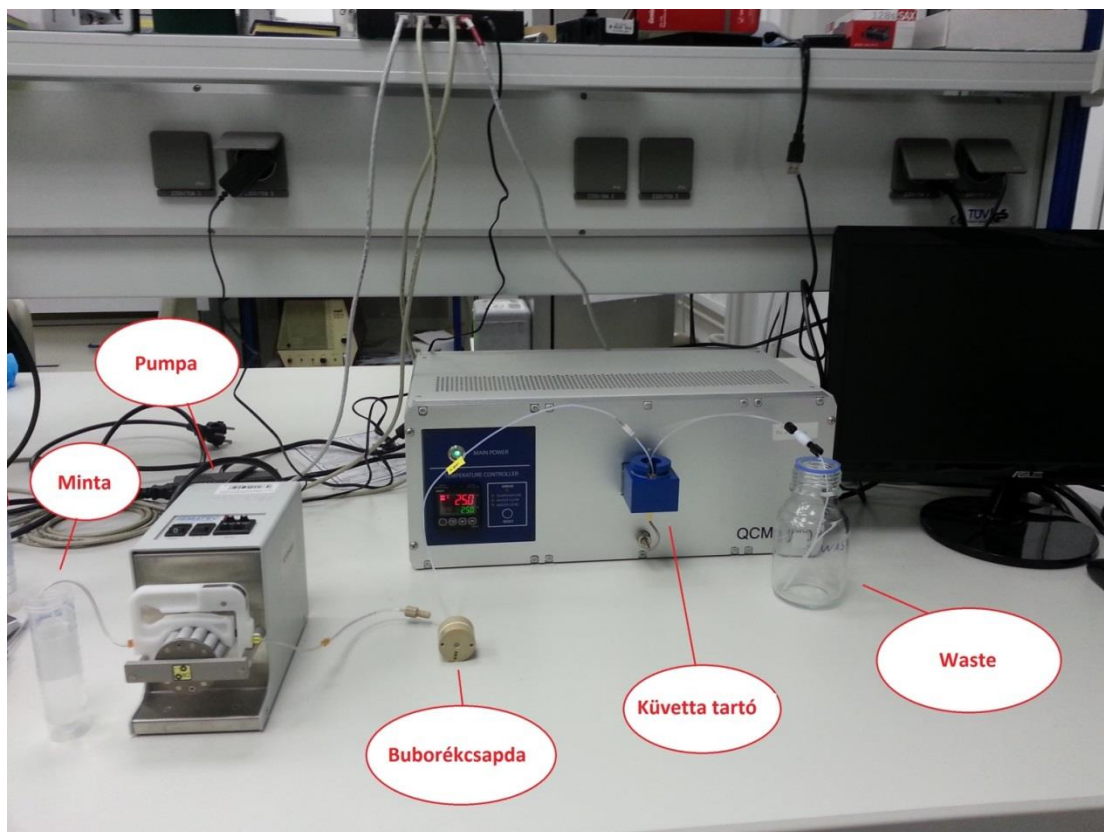
3. ÁBRA AZ ÁBRÁN LÁTHATÓ AZ EGYES FELHARMONIKUSOK PENETRÁCIÓMÉLYSÉGE A LETAPADT RÉTEGBE. BIOLÓGIAI MINTÁK ESETÉN KÖRÜLBELÜL ILYEN HATÁROKON BELÜL VIZSGÁLODUNK. FORRÁS: [9]

Látható, hogy minél nagyobb a felharmonikus száma, annál kevésbé hatol be a letapadt rétegbe. Párhuzamosan mérve 3 felharmonikusot és az alapfrekvenciát összesen 4-4 disszipáció –és frekvenciaváltozási értéket kapunk, melyekkel már könnyen kiszámolhatóak az ismeretlen paraméterei az adszorbeálódott anyagnak. [23]



4. ÁBRA AZ ELMÉLETI VÁRAKOZÁSAINK SZERINT TELÍTŐDÉSI GÖRBÉT KAPUNK, MELYNÉL A MINTA FELVITELE UTÁN ROHAMOSAN MEGNŐ A FELÜLETRE KITAPADT FEHÉRJÉK SZÁMA, MÍG EL NEM ÉR EGY EGYENSÚLYI ÁLLAPOTOT.

1.3.1 A QCM 3000 műszer kísérleti összeállítása



5. ÁBRA A KÉPEN A KÍSÉRLETEK SORÁN HASZNÁLT ÖSSZEÁLLÍTÁST MUTATJUK BE.

1.3.2 Adatkiértékelő algoritmus a QCM 3000 műszerhez

A méréseink során gyorsan kiderült, hogy a gyártók által a műszerhez mellékelt kiértékelő programok nem elégítik ki teljes körűen az igényeinket, így szükségessé vált új, a kimenő adatok kiértékelését végző algoritmus fejlesztése. Ehhez a legmegfelelőbb keretrendszernek a MATLAB nyilvánult. A következőkben röviden bemutatásra kerülnek az általunk fejlesztett algoritmusok.

Adatok kiértékelése a Voigt-féle viszkoelasztikus modell alapján

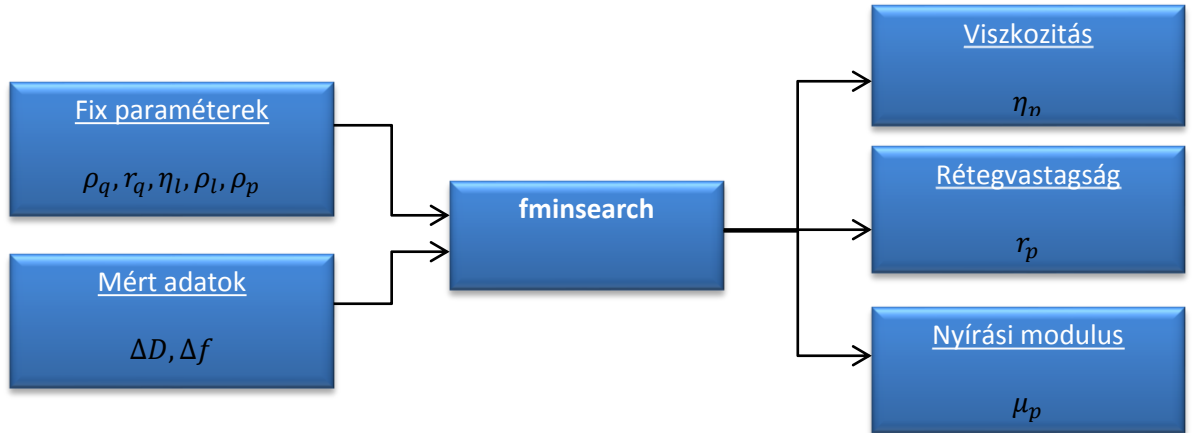
A QCM 3000 bioszenzorhoz mellékelt feldolgozó program csak a Sauerbrey-féle modell szerint számolja felületi tömegsűrűséget, így biológiai alkalmazásai nagyon szűkek. Az általunk fejlesztett algoritmus ellenben egyszerre tudja mérni az adszorbeálódott réteg tömegét, viszkozitását és a nyírási modulusát is.

Az algoritmus először bekéri a műszer által szolgáltatott frekvencia- és disszipáció változások értékeit, melyet a MATLAB két külön sorvektorként kezel. Ezután a QCM bevezetőjében tárgyalt két függvény összegén a program lefuttat egy minimumkereső függvényt (fminsearch), mellyel meghatározzuk, hogy a keresett paraméterek milyen értékeinél lesz minimális a modell által számolt, illetve a mért adat különbsége. Ezután ábrázolja a paraméterek értékét az idő függvényében.

A Voigt-féle viszkoelasztikus modell segítségével ugyan könnyen meghatározhatjuk a keresett paramétereket, de ehhez néhány feltevéssel kell élnünk a kezdeti értékeket illetően. A következő táblázatokban összefoglaltuk a programhoz használt értékeket.

Paraméter	Minimum becslés	Maximum becslés
Réteg viszkozitás (Pa · s)	0.001	0.01
Réteg nyírási modulus (Pa)	100000	1000000000
Réteg vastagság (m)	0.0000000001	0.000001

Fix paraméterek	Érték
Folyadék sűrűsége ($\frac{1}{m^3}$)	1000
Folyadék viszkozitása (Pa · s)	0.001
Réteg sűrűsége ($\frac{1}{m^3}$)	1200



6. ÁBRA AZ ALGORITMUS MŰKÖDÉSE

Itt $\rho_q, r_q, \eta_l, \rho_l, \rho_p$ rendre a kvarckristály sűrűsége és vastagsága, a szenzoron lévő folyadék viszkozitása és sűrűsége, valamint a vizsgált anyag sűrűsége. A legtöbb fehérjénél ez a paraméter $1200 \frac{kg}{m^3}$ -nek tekinthető, így mi is ezt az értéket használtuk. A mért adatok a disszipáció változás és a frekvenciaváltozás. A számolt mennyiségek pedig a vizsgált, letapadt réteg viszkozitása, vastagsága és nyírási modulusa.

Az `fminsearch` függvény a MATLAB programba be van építve, és egy függvényminimum-kereső algoritmust takar. A bejövő adatokat az alaphfrekvencián túl a 3. és az 5. felharmonikuson is vizsgálva megoldhatjuk az egyenletrendszert, megkapva a kérdéses paramétereket.

Az `fminsearch` parancs a következő függvényt minimalizálja:

$$Q(n, \mu, \eta, \rho, t) = \sum_n \left(\frac{\Delta f_n^{mért} - \Delta f_n^{számolt}}{\sigma_{\Delta f_n}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta D_n^{mért} - \Delta D_n^{számolt}}{\sigma_{\Delta D_n}} \right)^2 \quad 9.$$

1.4 Grating Coupled Interferometry (GCI – Rácscsatolt Interferometria)

A rácscsatolt interferometria elvén működő jelölésmentes bioszenzor kifejlesztése csupán pár éve valósult meg, így viszonylag újnak számít ez a technológia a területen. Legfőbb előnyük a többi bioszenzorhoz képest, hogy nagyon kis koncentrációjú mintát is képes kimutatni.

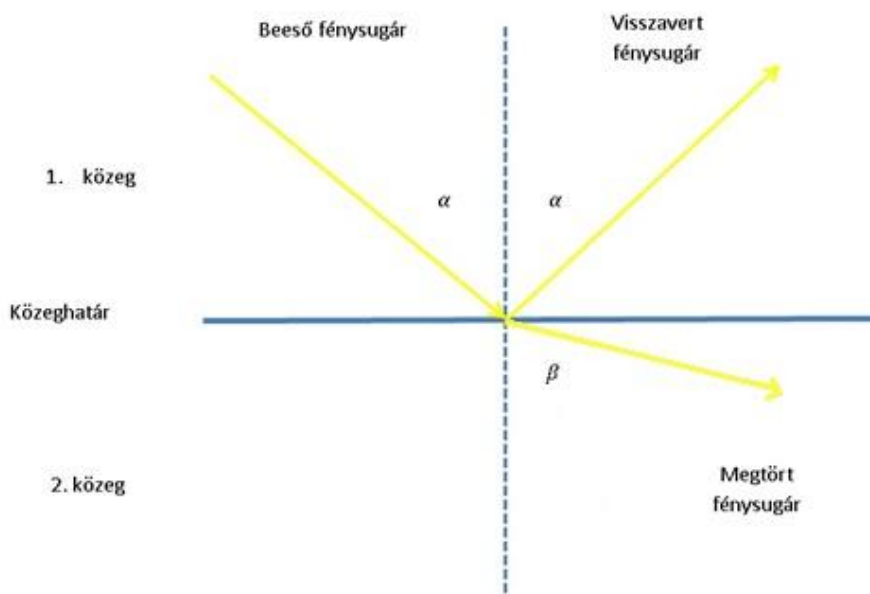
A Nanobioszenzorikai Laboratóriumba fél éve, egy nemzetközi ipari projekt keretében a Creoptix svájci székhelyű cégtől beszerzésre került egy automatikus mintaadagolóval ellátott, újfejlesztésű GCI bioszenzor. A később bemutatásra kerülő kísérleteinkben ezt a műszert használtuk.

1.4.1 A GCI működésének elméleti háttere

A fény homogén közegben két pont között egyenes vonalban terjed. Amennyiben közeghatárhoz érkezik, a fény egy része behatol a közegbe a beesési merőlegessel egy bizonyos szöget bezáróan, a másik pedig a beesési szöggel megegyező szöggel visszaverődik. A fény törésének leírása a **Snellius-Descartes** törvény alapján:

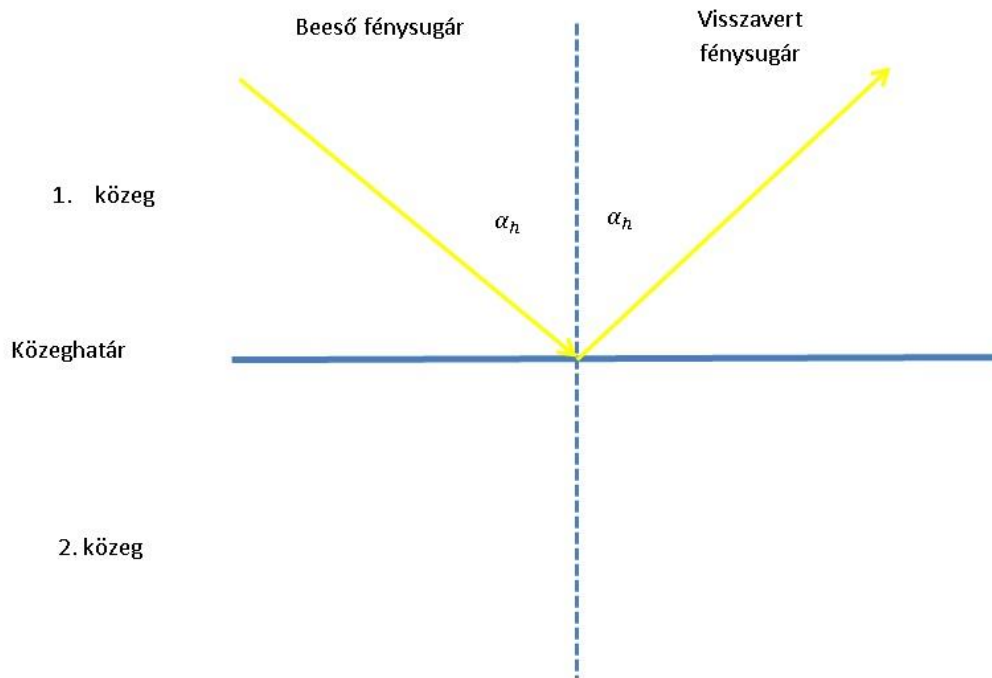
$$\sin \alpha n_1 = \sin \beta n_2 \quad 10.$$

ahol n_k -t ($k=1,2$) nevezzük az adott közeg vákuumra vonatkoztatott törésmutatójának, értéke megmutatja, hányad részére csökken a fény sebessége a vákuumbeli fény sebességéhez képest.



7. ÁBRA A FÉNY EGY RÉSE A SNELLIUS-DESCARTES ÖSSZEFÜGGÉS SZERINT β SZÖG ALATT BEHATOL A 2. KÖZEGBE, A MÁSIK RÉSE UGYANAKKORA α SZÖGBEN VISSZAZERŐDIK

Amennyiben $\sin \alpha \frac{n_1}{n_2} \leq 1$, a fény teljesen visszaverődik, az α szöget nevezzük határszögnek. Ez a jelenség csak optikailag sűrűbb közegből ritkábbba való terjedésénél figyelhető meg.



8. ÁBRA TELJES VISSZAVERŐDÉS ESETÉN A FÉNY TELJES MENNYISÉGE AZ 1. KÖZEGBEN MARAD.

Lehetséges az előbbi összefüggés felhasználásával úgynevezett *hullámvezetőt* létrehozni, melyben a fény sorozatosan teljes visszaverődéseket szenved, és így nem lép ki a közegből.[24]

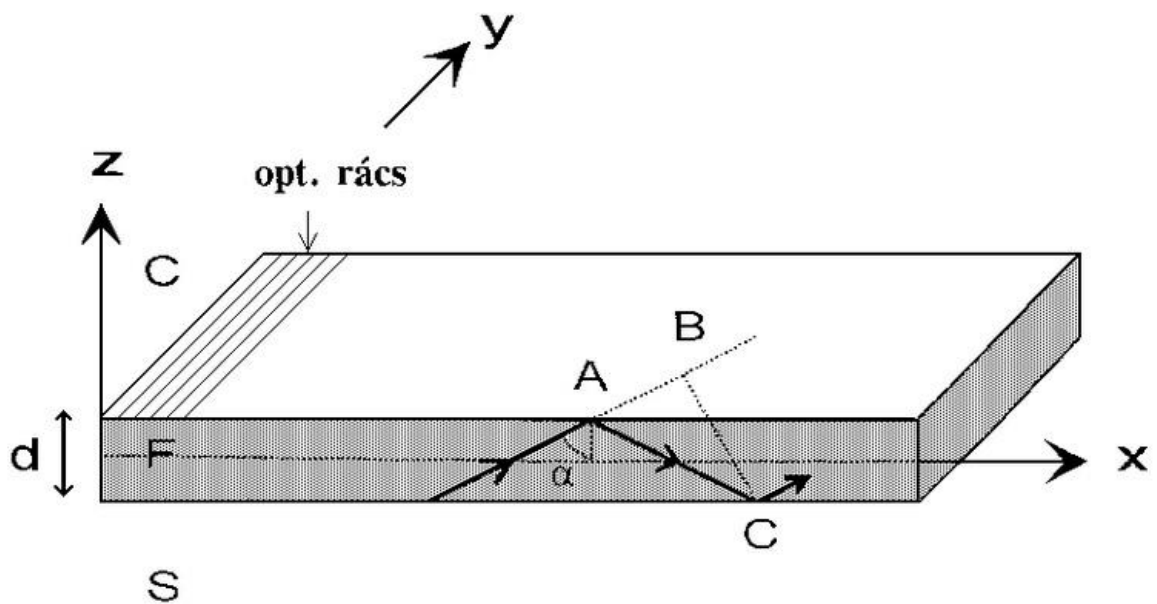
Már Newton is megfigyelte kísérletei során, hogy teljes visszaverődések esetén is a fénycsugár kis mértékben mégis behatol a ritkább közegbe. Ez a jelenség a Maxwell egyenletekből levezethető. Kiderült, hogy ez a kilépő, a két közeg határán létrejövő hullám exponenciálisan lecseng a határfelülelettől távolodva, ezért az elnevezése *evaneszcens hullám*. [25]

A GCI működésének elve azon alapszik, hogy a hullámvezető felületére kitapadt anyag lokálisan megváltoztatja a törésmutatót, amely a hullámvezetőben terjedő fénycsugár fázisát kismértékben eltolja ($\Delta\Phi$). A műszer a szenzor felszínétől számolva körülbelül 100-200 nm magasságig képes észlelni ezt a változást, ám a biológiai alkalmazásokhoz ez az érték kielégítőnek bizonyult.[26]

1.4.2 A hullámvezető réteg

A hullámvezető réteg egy olyan szerkezet, mely 3 rétegből áll. A középső réteget két – nála kisebb törésmutatójú réteg fogja közre. Alulról a hordozó (szubsztrát), felülről pedig a fedőréteg, amely kísérleteink során általában kitapadt fehérje.

A középső réteg törésmutatója úgy van megválasztva, hogy az nagyobb legyen, mint az őt közrefogó rétegek törésmutatója, hogy a teljes visszaverődés bekövetkezhessen. A filmben terjedő sugarak közül azok terjedhetnek, amelyek interferencia révén erősítik egymást.



9. ÁBRA A HULLÁMVEZETŐ RÉTEG METSZETE, BENNE A FÉNY TERJEDÉSÉNEK ÁBRÁZOLÁSA.

FORRÁS: [28]

Az ábrán látható, hogy a kétszeres visszaverődés után a (C) pontnál levő sugár $AC - AB = 2d \cdot \cos \alpha$ hosszal késik. Ezen felül fáziseltolás is történik a határfelületeknél. A fáziseltolásokat a **Fresnel-egyenletekkel** lehet kiszámolni. Ezek függnek a beesési szögtől és a közegek törésmutatóitól. Az erősítés feltétele az, hogy a két sugár közötti eltolás 2π -nek egész számú többszöröse legyen. ($m=0,1,2,3,\dots$) A 3 rétegű hullámvezető módusegyenlete a következő:

$$\frac{2\pi}{\lambda} 2d \cdot \cos \alpha - \varphi_1 - \varphi_2 = 2\pi m \quad 11.$$

ahol $\lambda = \frac{\lambda_0}{n_F}$ a hullámhossz a hullámvezető filmben és λ_0 pedig a vákuumban. Mint a 9. ábrán is látható, hogy a hullámvezetőn található egy optikai rács. Ennek segítségével csatolják be a fényt a hullámvezetőbe.

A becsatolás egy rezonanciajelenség, amely egy meghatározott szög alatt adott frekvencián létező modusnál lép fel. Ennek a becsatolási jelenségnek a feltételét írja le az alábbi egyenlet:

$$N = n_0 \cdot \sin \alpha + l \cdot \frac{\lambda_0}{\Lambda} \quad 12.$$

ahol N a hullámvezető effektív törésmutatója, n_0 a levegő törésmutatója és Λ pedig az optikai rács állandója, mely a kis osztások közötti távolság nm-ben mérve. A becsatolási szöget mérve tehát következtethetünk a közeg törésmutatójára.

A felületi tömegsűrűséget az előbbiekből levezetett, négyrétegű módusegyenletből származtatott **de-Feijter** egyenlet alapján számolhatjuk ki.

$$\Delta \Gamma = \Delta d_A \cdot \frac{n_A - n_c}{dn/dc} \quad 13.$$

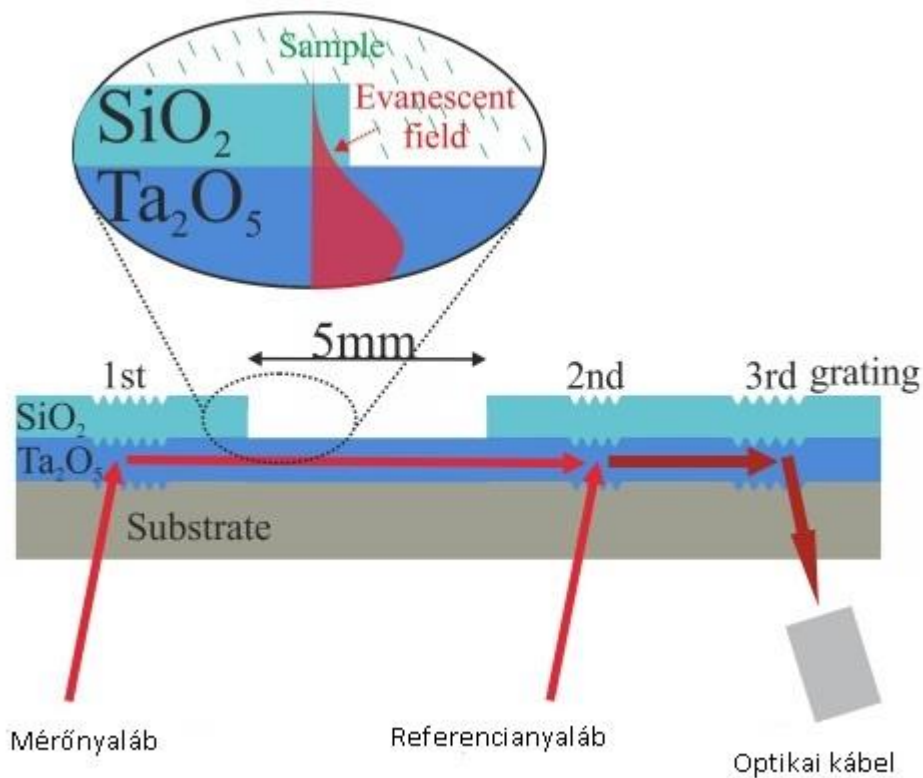
Ahol $\Delta \Gamma$ a felületi tömegsűrűség és mértékegysége a pg/mm^2 , n_A a kitapadt réteg fölötti folyadék, n_c a fehérje oldószerének törésmutatója. dn/dc az adott fedőrétegre jellemző állandó, fehérjékre ez univerzálisan $0.182 \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$. [27][28]

A GCI műszerrel mérve a fázis eltolódását a következő egyenletből meghatározhatjuk a felületre kitapadt réteg vastagságát:

$$\Delta \phi = kL \frac{\partial N}{\partial d_A} \Delta d_A \quad 14.$$

ahol $\Delta \phi$ a fáziseltolódás, k a hullámszám, L a szenzor hossza, $\frac{\partial N}{\partial d_A}$ a szenzor érzékenységet kifejező érték, Δd_A a kitapadt réteg vastagsága.

1.4.3 A szenzor felépítése:



10. ÁBRA A GCI MŰSZER SENZORÁNAK VÁZLATOS ÁBRÁZOLÁSA. FORRÁS: [26]

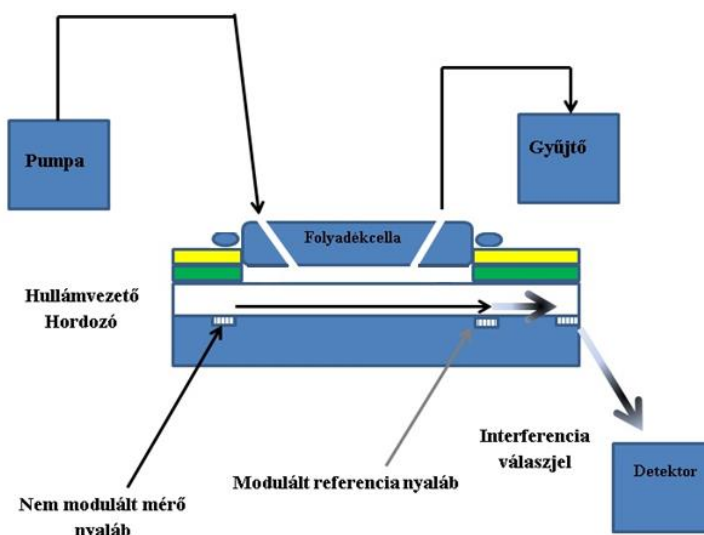
Az általunk használt chip 3 rácscsatolóból, egy szubsztrátból, egy Ta_2O_5 és SiO_2 rétegből épül fel. A mérés során két lézernyalábot használunk. Egy nem modulált mérő nyalábot és egy modulált referencianyalábot. A referencianyalábot folyadékkristály modulátor segítségével moduláljuk, vagyis a fázisát időben folytonosan változtatjuk. Az első és második rácscsatoló a két nyalábot a hullámvezetőbe csatolja és a 3. rácscsatoló pedig a detektorba. A mérés során a vizsgálandó anyag a hullámvezető két (1-2.) becsatolási pontja közötti (kb. 5mm-es) részén lép interakcióba. A hullámvezető felülete (a két becsatolási pont közötti felület kivételével) SiO_2 réteggel van borítva. A SiO_2 filmréteg vastagsága úgy lett megválasztva, hogy nagyobb legyen, mint a modulus behatolási mélysége a SiO_2 rétegbe. Így a becsatolási és kicsatolási szögeket nem befolyásolja a vizsgálandó anyag típusa.

A hullámvezető két (1-2.) becsatolási pont közötti részének evanescens tere interakcióba lép a vizsgálandó anyagunkkal és így megváltozó törésmutató érték a SiO₂ filmrétegben az első becsatolási pontba érkező nyaláb (mérőnyaláb) fázisát eltolja a referencia nyaláb fázisához képest.

Így a mérőnyaláb és a referencia nyaláb a második becsatolási pont után összetalálkoznak, és interferencia jelet hoznak létre. Ez az interferencia jel a 3. rácscsatoló segítségével egy optikai kábelon kivezetve egy detektor segítségével mérésre kerül. [29][30]

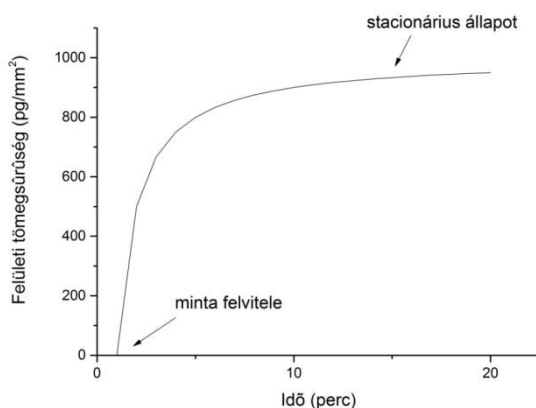
1.4.4 Alkalmazása a kísérleteink során:

Kísérleteinkben a két becsatolási (1-2.) pont közötti terület folyadékcellával letakarják, melynek két nyílása van, ezt nevezzük küvettának. Az egyik csatornán beáramlik a vizsgálandó anyag a mintát tartalmazó üvegből egy pumpa segítségével és a másik csatornán keresztül pedig távozik egy gyűjtő üvegbe. Az áramlás során folyamatosan interakcióba lép a hullámvezető chip felületére a vizsgált anyag.



11. ÁBRA A KÜVETTA ÉS A HULLÁMVEZETŐ CHIP FELÉPÍTÉSE. A ZÖLD RÉTEG A Ti₂O₅ RÉTEGET ÉS A SÁRGA RÉTEG PEDIG A SiO₂ RÉTEGET JELÖLI.

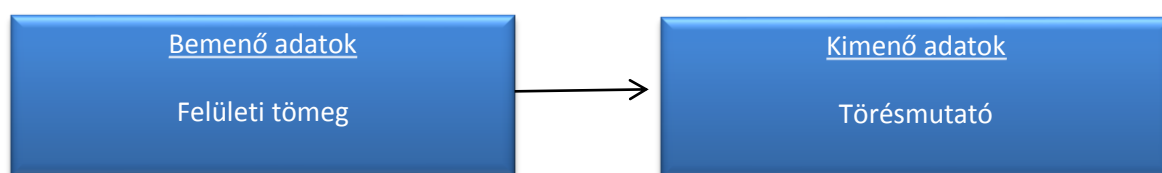
Elméleti várakozásaink a 12. ábra mutatja be.



12. ÁBRA AZ ELMÉLETI VÁRAKOZÁSAINK SZERINT A MINTA FELVITELE UTÁN RÖVID IDEIG NAGY MÉRTÉKŰ FEHÉRJEKITAPADÁST KELL TAPASZTALNUNK, MAJD EZUTÁN BEÁLL EGY EGYENSÚLYI ÁLLAPOT.

1.4.5 GCI bioszenzor által mért rétegek törésmutatójának meghatározása

A GCI bioszenzorhoz adott program automatikusan kiszámolja a fázistolásból a felületre kitapadt tömeget. Bizonyos méréseknél, mint például mikor meghatározott koncentrációjú glicerín oldatot áramoltattunk a chip felett, szükség van a közeg törésmutatójának meghatározására. Erre a programon belül nem volt lehetőség, így mi fejlesztettünk az előzőkhöz hasonlóan MATLAB keretrendszerben egy egyszerű tömeg-törésmutató átváltó algoritmust.



13. ÁBRA AZ ÁTVÁLTÓ ALGORITMUS MŰKÖDÉSE

A program által számított felületi tömeg, és a fázistolás közötti kapcsolat lineáris, az alábbi módon:

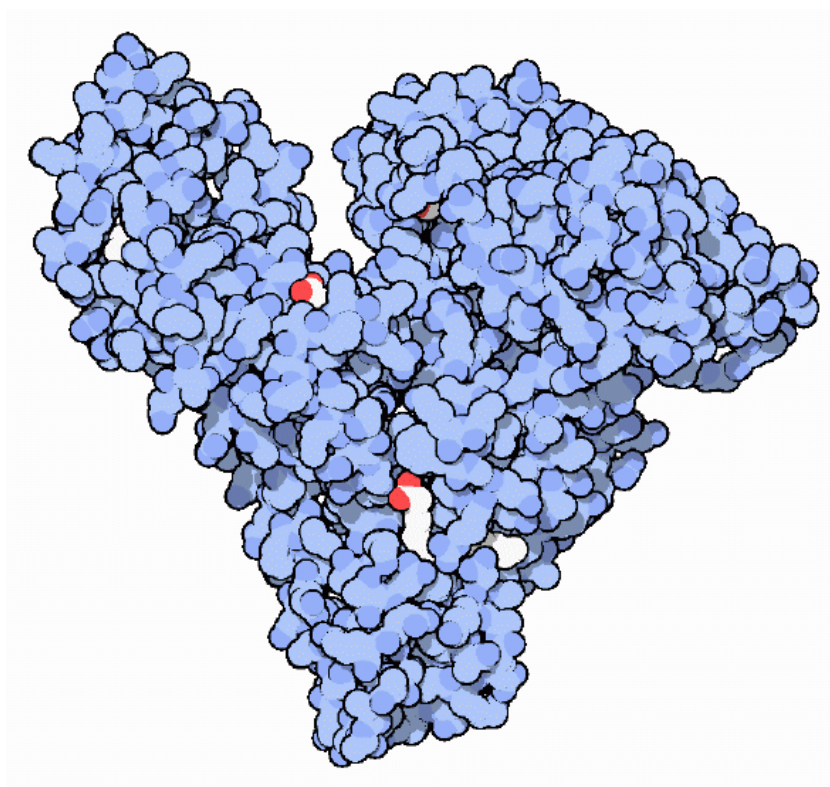
$$\Delta\phi = \frac{\vartheta}{2\pi} \cdot \Gamma \quad 15.$$

Ahol $\vartheta = 516.708 \frac{\text{pg}}{\text{mm}^2}$, Γ a felületi tömegsűrűség.

1.5 Borjúsérum albumin

Fehérjéssel végzett kísérleteink során elsőrendű szempont volt egy olcsón beszerezhető, kevés biokémiai reakcióban részt vevő, stabil proteinre. Fontos volt továbbá, hogy a kapott adatainkat ellenőrizni tudjuk, a szakirodalomban gyakran említett, ismert tulajdonságú legyen a fehérje. A választásunk e szempontok alapján a Borjúsérum albuminra esett (angolul Bovine serum albumin, röviden BSA).

A BSA fehérjét a marhák vérplazmájából nyerik ki, ipari mennyiségben is viszonylag olcsón, így a költséghatékonyságot szem előtt tartva megfelelő választás számunkra. Biokémiai kísérletek során nagyfokú stabilitását, és könnyű kezelhetőségét használják ki. Jelölésmentes bioszenzorokkal végzett irodalmi adatok is bőven rendelkezésre állnak róla.[31][12]



14. ÁBRA A BSA FEHÉRJE RAJZA SZEMLÉLTETÉSKÉPPEN. FORRÁS: [HTTP://WWW.RCSB.ORG/](http://www.rcsb.org/)

1.6 Plazmatisztító működési elve

Méréseink befejezése után szükség volt egy olyan eszközre, amellyel hatékonyan el tudtuk távolítani a mérés során használt chippek felületére kitapadt fehérjéket, szennyeződéseket. Ehhez az SPI Supplies nevű cég Plasma Prep™ II elnevezésű berendezés volt a segítségünkre.

Működése során a berendezés belsejében vákuum jön létre, majd ebbe egy tartályból oxigén molekulákat vezetünk be, majd ebből rádiófrekvenciás gerjesztés hatására plazma keletkezik, amely a behelyezett tárgyak, jelen esetben a chippek felszínéről a keletkező szabad gyökök segítségével mintegy lemarja a letapadt szennyeződéseket. A tipikus idő, amíg az eljárás tart, 2-3 perc, e fölött súlyosan rongálódhat a chippek felszíne. A módszert korábbi kísérletek során sikerrel alkalmazták, ám a tapasztalatok szerint ugyanazon a chipen maximum 4-5 alkalommal lehet elvégezni az eljárást, mert utána a keletkező sérülések befolyásolják az elvégzendő kísérletek hitelességét.



15. ÁBRA A MÉRÉSEINK SORÁN TISZTÍTÁSHOZ HASZNÁLT PLAZMATISZTÍTÓ FOTÓJA. FORRÁS:
[HTTP://WWW.2SPI.COM/CATALOG/INSTRUMENTS/ETCHERS1.PHP](http://www.2spi.com/catalog/instruments/etchers1.php)

2. fejezet

Kalibrációs és fehérjeinjektációs kísérletek a QCM 3000 bioszenzorral

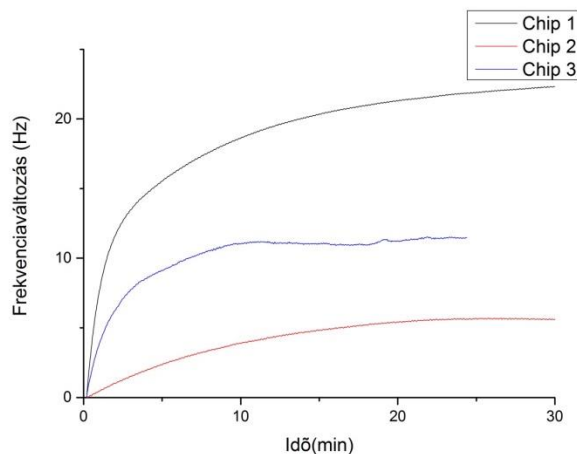
A QCM 3000-rel végzett kalibrációs mérések célja a műszer stabilitásának és érzékenységének megállapítása volt. A műszerhez korlátozott mennyiségű chipet kaptunk, így a mi feladatunk volt kidolgozni egy tisztítási eljárást, amely lehetővé tette a használt chipekkel való újbóli méréseket.

2.1 Három darab, arany bevonatú chip tesztelése levegő áramoltatásával

2.1.1 A mérés menete

A legtöbb jelölésmentes bioszenzor tulajdonsága, hogy a velük végzett kísérlet megkezdése előtt egy bizonyos ideig várni kell, hogy az általuk szolgáltatott jel beálljon egy nem ingadozó, konstansnak tekinthető értékre. Ez a műszertől függően akár 20-30 perc is lehet. A kísérletünk során azt vizsgáltuk, hogy a QCM 3000 esetében ez az idő milyen hosszú. A méréseket 3 különböző, Au bevonatú chippel végeztük, feltételezve, hogy a különálló chipek egyedileg rendelkezhetnek egymástól kis eltérésekkel, melyek a felületükön található apró hibáknak köszönhetőek. A kísérlet során levegőt áramoltattunk át a küvétán.

2.1.2 Eredmények



16. ÁBRA A HÁROM CHIPEN MÉRT FREKVENCIAVÁLTOZÁSOK AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN ÁBRÁZOLVA

A mérésünk során a három chipre más-más értéket kaptunk a frekvenciaváltozás nagyságára, ám ezek az értékek közelítőleg 20 perc alatt beálltak egy elfogadhatóan stabil értékre. A frekvenciaváltozásban tapasztalt eltérésekre több magyarázat is adódik. Az ok lehet a műszer kis mértékben megváltozott hőmérséklete, apró szennyeződések a küvettában, vagy a beáramoltatott levegőben, esetleg a szoftverben található hiba. Ennek kiderítéséhez további kísérletek szükségesek.

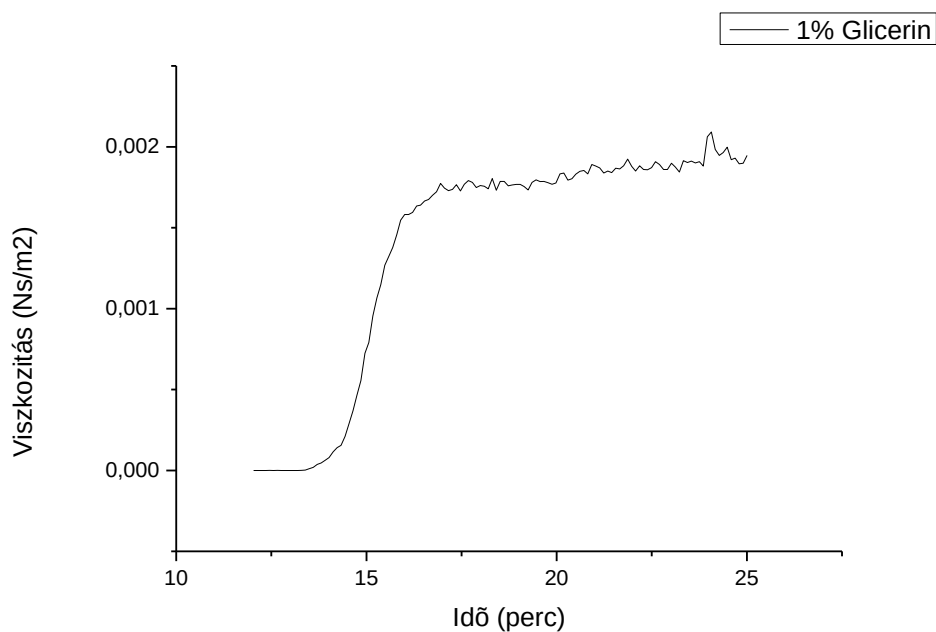
Az eredmények alapján levontuk a következtetést, hogy az egyes mérések megkezdése előtt legalább 20 percet érdemes várni.

2.2 Glicerín viszkozitásának mérése

A QCM elméleti háttérét tárgyaló részben látható, hogy a műszerrel lehetőségünk van mérni a chip felületére áramoltatott folyadékok viszkozitását. Az elmélet ellenőrzésére elvégeztünk összeállítottunk egy kísérletet, melynek során 1%(V/V)-os glicerín-víz oldatot áramoltattunk a chip felületére.

2.2.1 Eredmények

A műszer által szolgáltatott frekvenciaváltozás segítségével a Sauerbrey egyenlet folyadékokra is kiterjesztett képletének felhasználásával meghatározhattuk a vizsgált oldat viszkozitását.



17. ÁBRA A MATLAB ALGORITMUSUNK ÁLTAL SZÁMOLT VISZKOZITÁS AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN.

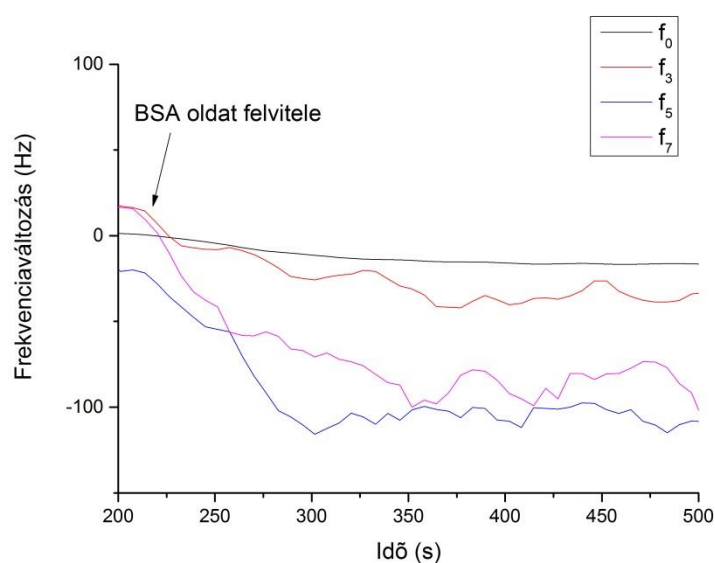
Az eredményeket összehasonlítottuk a szakirodalomban található értékekkel és meggyőződhattünk a QCM műszer pontosságáról. [32]

A mérés során a műszer érzékenysége $10 \frac{pg}{mm^2}$ felületi tömegsűrűség körül mozgott, mely vetekszik az optikai bioszenzorok teljesítményével.

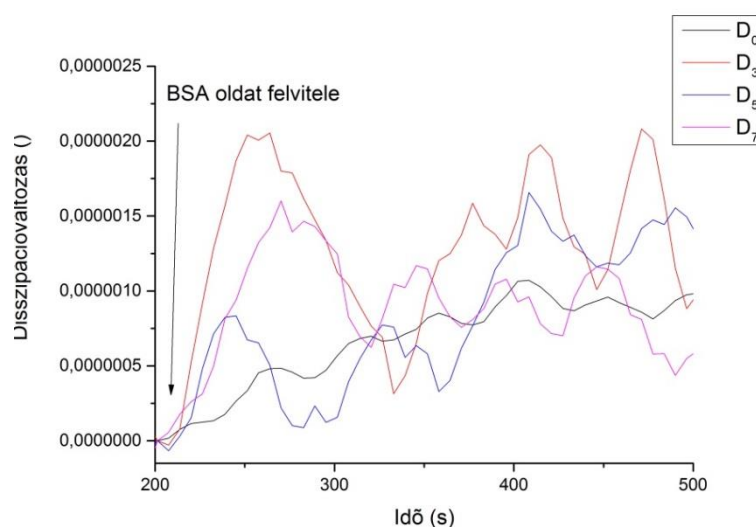
2.3 Fehérje adszorpció valós idejű mérése QCM 3000 bioszenzorral

A kalibrációs-és próbamérések megnyitották az utat a célunk, meghatározott típusú fehérje kitapadásának vizsgálata felé. A mérés során 0.5 mg/ml töménységű BSA fehérjeoldatot vizsgáltunk. Puffernek PBS oldatot használtunk. A chipet a mérés előtt az előzőekben említett, általunk kidolgozott tisztítási eljárásnak vetettük alá.

A kísérlet során a műszerrel egyszerre mértük az alapfrekvenciát és a 3., 5., és a 7. felharmonikust, valamint a hozzájuk tartozó ΔD disszipáció értékét is.



18. ÁBRA A FREKVENCIAVÁLTOZÁS AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN ÁBRÁZOLVA

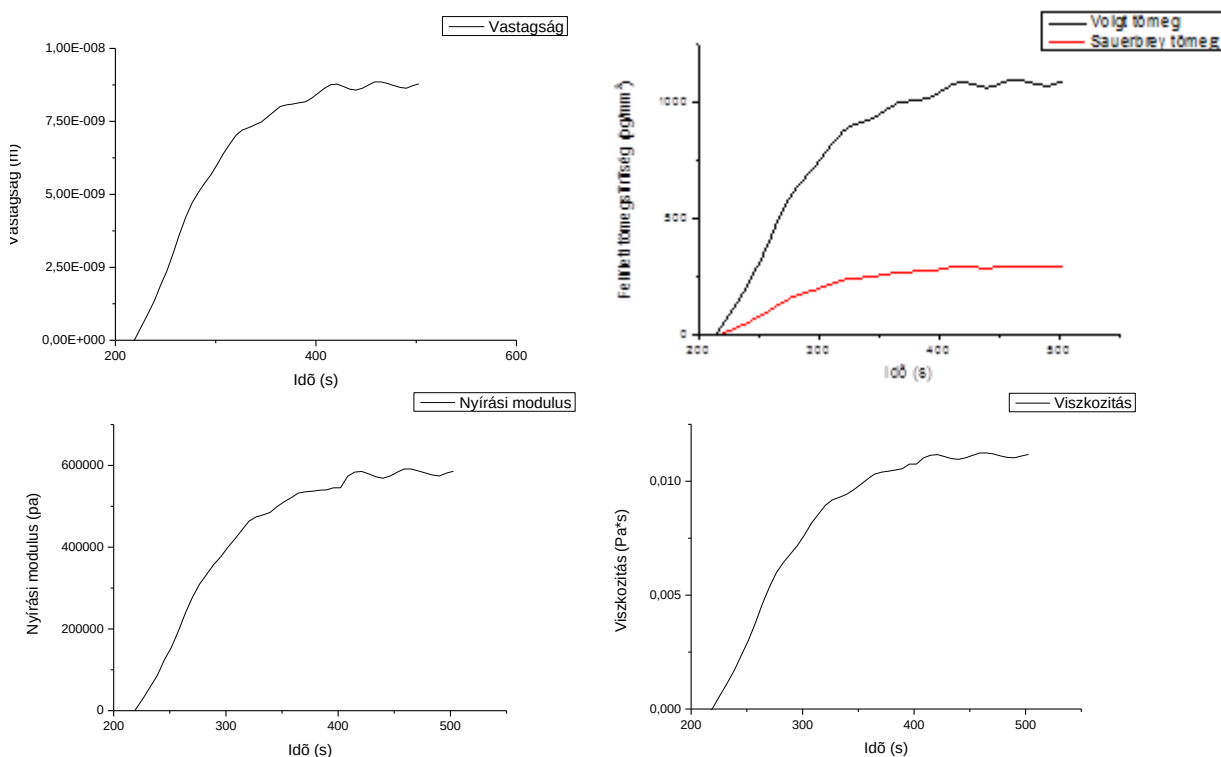


19. ÁBRA A DISSIPÁCIÓVÁLTOZÁS AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN ÁBRÁZOLVA

2.3.1 Eredmények

A mérés során a D_0 disszipáció értéke változott a legkisebb szórással, így a kiértékelés során is próbáltuk ezt figyelembe venni. A nagyobb modulusokon végzett mérések eredményei nagyon zajosnak adódtak, ennek a csökkentésére a jövőben új módszereket kívánunk alkalmazni.

A bejövő adatokat az általunk fejlesztett MATLAB algoritmussal értékeltük ki. Az egyes paraméterek időbeli változásai az alábbiakban láthatóak.



20. ábra Az egyes paraméterek értékei különböző grafikonokon ábrázolva. Jól megfigyelhető, hogy a várakozások szerint a Voigt modell által számolt felületi tömegsűrűség többszörösen meghaladja a Sauerbrey formula (piros színnel jelölve) által számoltat.

A kísérlet során kiértékelte paraméterek értékei a szakirodalommal, illetve más, hasonló kísérletek eredményeivel jó egyezést mutatnak. Megbizonyosodhattunk az algoritmusunk működőképességéről, illetve nyilvánvalóvá vált, hogy a későbbi mérések során a Sauerbrey formula nem alkalmazható megbízhatóan. [9]

3. fejezet

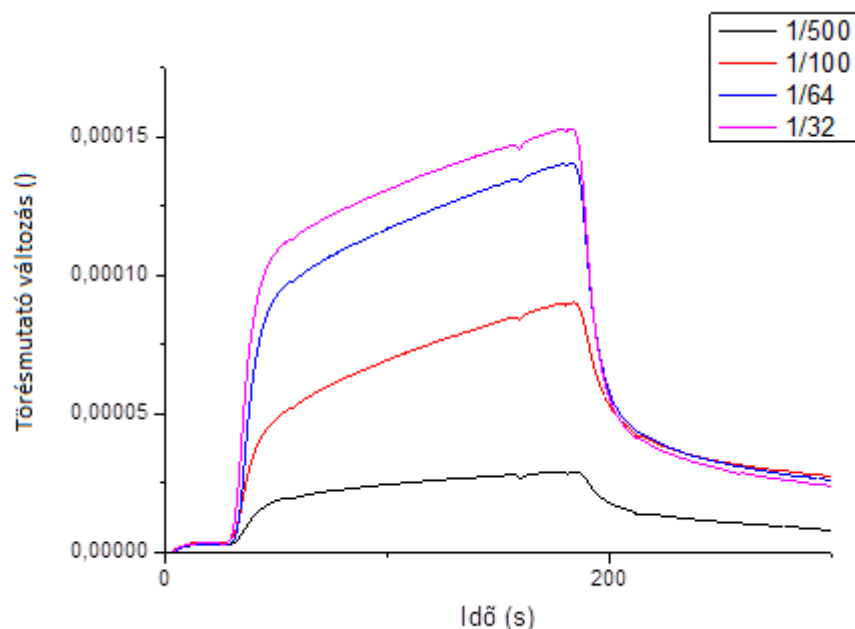
Kalibrációs és fehérjeinjektációs kísérletek a GCI műszerrel

Bevezető méréseink során egyszerű kísérleteket végeztünk a GCI műszerrel, pontosságának és hatékonyságának megállapítására. Az adatok kiértékeléséhez az általunk fejlesztett MATLAB átváltó-algoritmus volt a segítségünkre, mellyel a műszer által kiszámolt felületre letapadt tömeg mennyiségéből tudtuk visszaszámolni a törésmutatót.

3.1 Glicerín oldat törésmutatójának mérése

Bevezető kísérletünk során meg szerettünk volna győződni a műszer által szolgáltatott adatok hitelességéről. Más optikai elven működő jelölésmentes bioszenzorok esetében általános kalibrációs mérés egy ismert törésmutatójú és különböző koncentrációjú folyadékot áramoltatni a hullámvezető chip felszínére, majd az eredményeket összehasonlítani a szakirodalmi és a többi műszer által szolgáltatott adatokkal.

A mérésünk során 4 különböző koncentrációjú glicerín-víz oldat törésmutatóját mértük valós időben.



21. ÁBRA TÖRÉSMUTATÓ VÁLTOZÁS AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN. AZ ÁBRÁN MEGFIGYELHETŐ A GLICERIN OLDATOK BEJUTTATÁSA UTÁNI FOLYAMATOS JELERŐSÖDÉS, EZ VÉLEMÉNYÜNK SZERINT AZ OLDAT PÁROLGÁSA MIATT JÖN LÉTRE. A KONCENTRÁCIÓK %(V/V)-BEN ÉRTENDŐK.

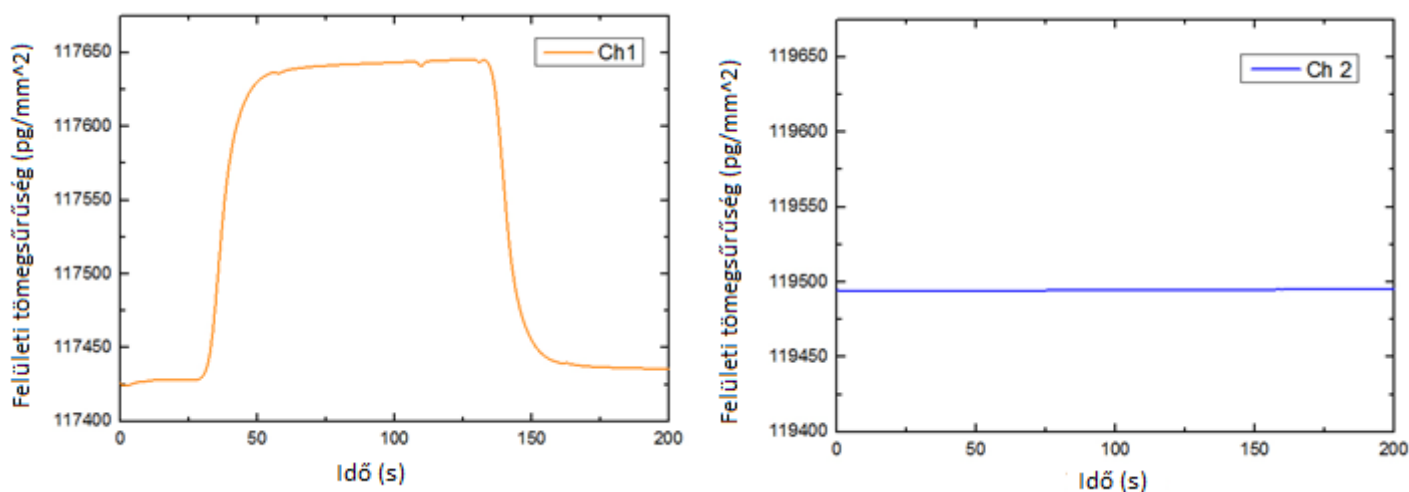
A kísérlet során a legkisebb, 1/500 %(V/V) koncentrációjú glicerín oldat törésmutató változását is sikeresen kimutattuk, amely újabb bizonyítékul szolgál a műszer rendkívüli pontosságára. A mérés közbeni párolgás orvoslására a jövőben zárható fedelű, 2000 μ l-es üvegcséket kívánunk beszerezni.

3.2 Kapcsolat a két csatorna között

A mérés során arra kerestük a választ, hogy megfelelően el vannak-e szigetelve egymástól a hullámvezetőben lévő csatornák. A további kísérletek szempontjából fontos erről meggyőződni, hiszen általában az egyik csatornát használjuk referenciaképpen.

A kísérletben 1 %(V/V) töménységű glicerín oldatot áramoltattunk keresztül az 1. csatornán.

3.2.1 Eredmények



22.ÁBRA A FELÜLETI TÖMEGSŰRŰSÉG AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN. A KÍSÉRLET SZORÁN PUSZTÁN KVALITATÍV MÓDON VIZSGÁLTUK A CSATORNÁK KÖZTI KAPCSOLATOT, ÍGY NEM TARTOTTUK FONTOSNAK ÁTVÁLTANI AZ ÉRTÉKEKET TÖRÉSMUTATÓRA.

A kísérlet során az 1. csatornával ellentétben a 2. csatornán nem észleltünk jelet, így megbizonyosodhattunk a kettő egymástól függetlenségéről.

3.3 BSA fehérjék adszorpciójának vizsgálata Ta₂O₅-al bevont felületű chippel

A kalibrációs mérések elvégzése után egy egyszerű fehérje adszorpciók kísérlet következett. Ennek során 1mg/ml-es koncentrációjú BSA fehérje oldatot vittünk fel Ta₂O₅ bevonatú chipre. A kísérlet során arról szeretnénk volna megbizonyosodni, hogy a GCI műszer alkalmas-e makromolekulák által létrehozott kölcsönhatások valós idejű megfigyelésére. A mérést referenciaképpen elvégeztük a QCM 3000 műszerrel is, ugyanilyen koncentrációjú BSA oldatot használva.

3.3.1 A mérés menete

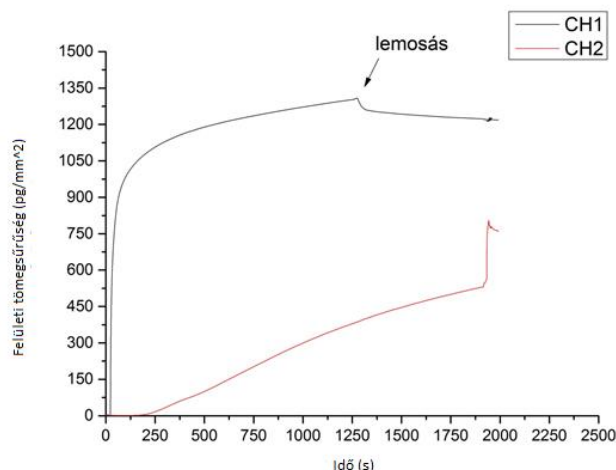
A kísérlet során a GCI szoftverében a következő beállításokkal indítottuk el a mérést:

Folyadék sebessége [μ L/perc]	Puffer időtartam [s]	Minta	Minta időtartam [s]	Puffer időtartam [s]
10	600	1mg/ml BSA	1200	600

A méréshez a chipen lévő 1-es csatornát használtuk, a másik csatorna referenciaként szolgált.

Puffernek PBS-t (Phosphate buffered saline) használtunk.

3.3.2 Eredmények

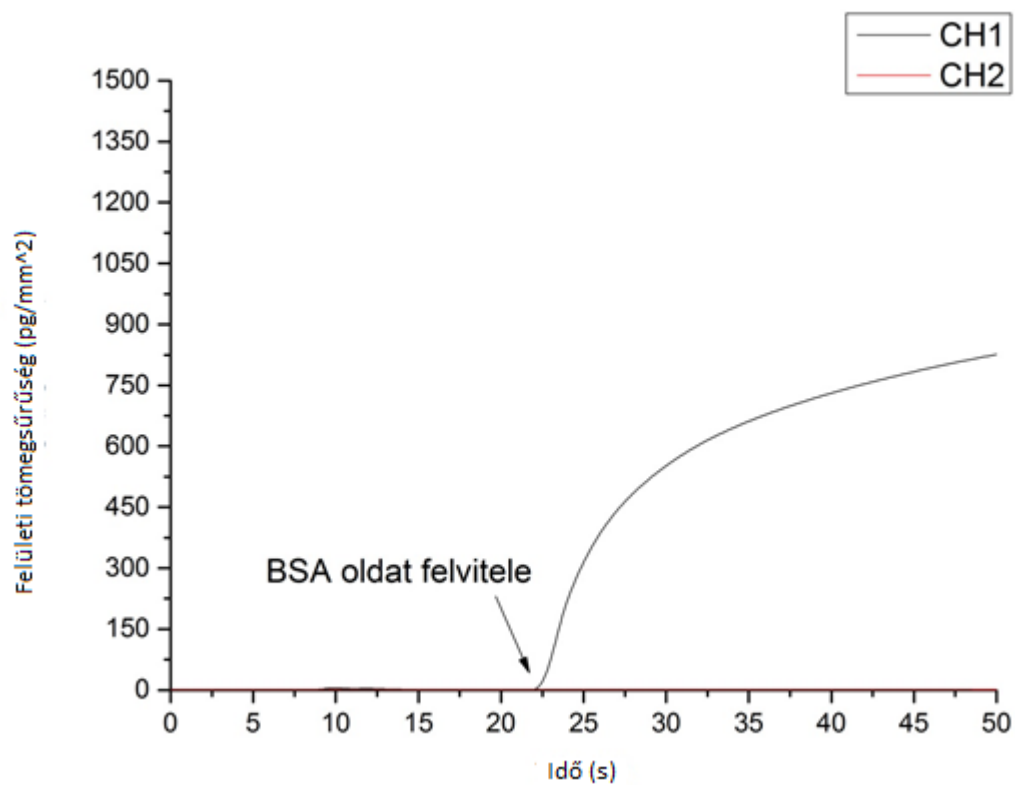


23. ÁBRA MEGFIGYELHETŐ A FEHÉRJE ADSZORPCIÓRA JELLEMZŐ TELÍTÉSI GÖRBE AZ 1-ES CSATORNÁN, ÁM A 2-ES CSATORNÁN A VÁRAKOZÁSOKKAL ELLENTÉTBEN ÚGYANÚGY JELENTŐS JELET FIGYELHETÜNK MEG

A mérés során sikeresen figyelhattuk meg a vizsgált fehérje valós időbeni kitapadását a célfelületre. A letapadt tömeg $\sim 1300 \frac{\text{pg}}{\text{mm}^2}$ -nek adódott. Ez az eredmény jó egyezést mutat más szakirodalmi adatokkal.

A 2-es csatornán is megfigyelhetünk egy nagyjából konstans emelkedő jelet, pedig a mérés során a BSA fehérjeoldatot csak az 1-es csatornára alkalmaztuk. Ennek oka egyelőre ismeretlen, és kiderítése további méréseket igényel. Különösen furcsának tapasztaltuk a jelet annak fényében, hogy előző kísérleteink során megbizonyosodhattunk a két csatorna egymástól való függetlenségéről.

További észrevételünk volt, hogy ugyan a szoftverben a mérés előtt 600 másodperces előmosást állítottunk be, ám ebből csak 23 másodperc valósult meg. Nagy valószínűséggel ennek az oka a GCI programjában keresendő, így a problémára felhívtuk a fejlesztők figyelmét. Úgy gondoljuk, hogy ez a probléma nem befolyásolta a kísérlet kimenetelét.



24. ÁBRA A BEÁLLÍTOTT 600 MÁSODPERCES ELŐMOSÁS ELLENÉRE A MÉRÉS SORÁN CSAK KÖRÜLBELÜL 23 MÁSODPERC VALÓSULT MEG.

A hiba korrigálása érdekében felvettük a műszer gyártójával a kapcsolatot.

3.4 Fehérjeréteggel bevont chip felületének tisztítása a gyártók által ajánlott protokollal

A fehérje adszorpció sikeres megfigyelése után a következő feladatunk egy chiptisztítási eljárás kidolgozása volt. A GCI-hez beszerezhető chipek újrafelhasználása a további méréseket költséghatékonyabbá teheti, így egy hatékony és gyors módszer a letapadt anyagok megszabadulásától kritikus a GCI jövőbeni felhasználását illetően.

A műszer gyártói mellékeltek egy ajánlott tisztítási protokollt a szennyező anyagok eltávolítására. Első feladatunk ennek tesztelése volt egy előzőleg, BSA adszorpció megfigyeléséhez használt chipen.

Célunk annak megállapítása volt, hogy a tisztítási protokoll le tudja-e szedni a letapadt BSA fehérjét a chip felületéről, illetve ezt mekkora hatásfokkal tudja megtenni.

3.4.1 A mérés menete

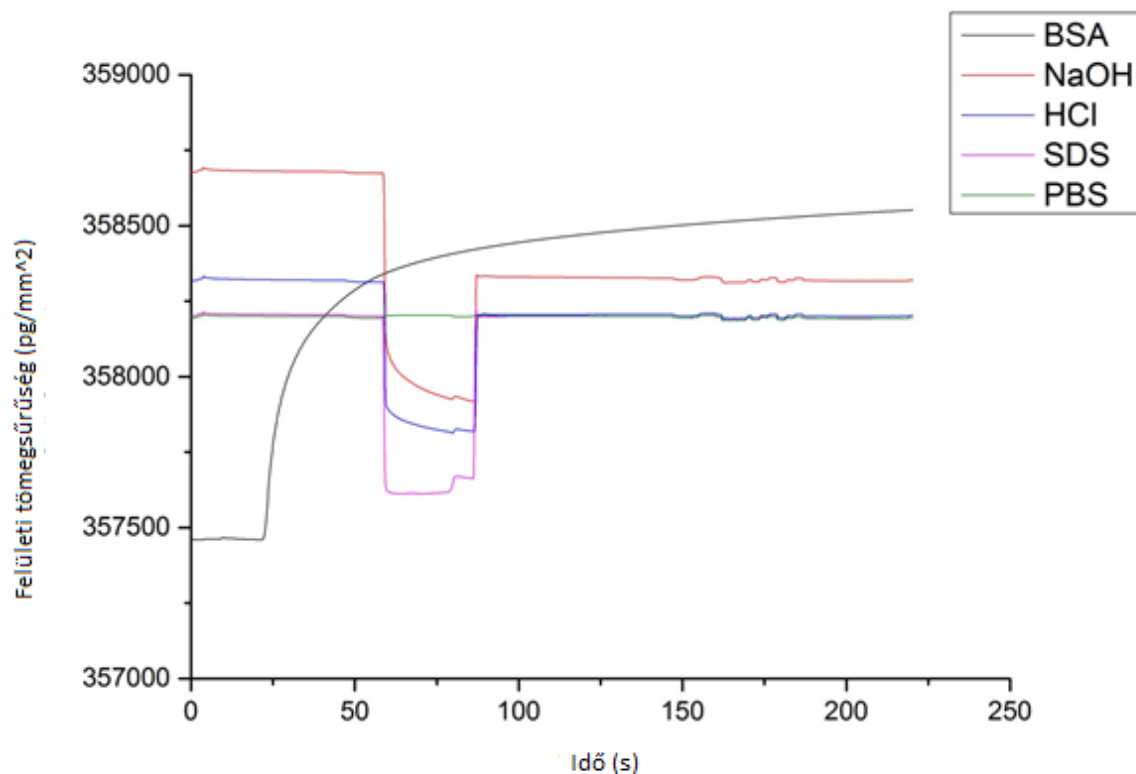
A kísérlet az alábbi ciklusokból tevődött össze:

Folyadék sebessége [$\mu\text{L}/\text{perc}$]	Puffer időtartam [s]	Minta	Minta időtartam [s]	Puffer időtartam [s]
100	45	NaOH	20	60
100	45	HCl	20	60
100	45	SDS	20	60
100	45	PBS	20	60

A minták koncentrációja:

- 50 mM NaOH
- 100 mM HCl
- 0.5 % (V/V) sodium dodecyl sulfate (SDS)
- phosphate buffered saline (PBS)

Látható, hogy itt a felület tisztítását a lúgos és savas pH-val rendelkező oldatok váltogatásával valósítják meg. A ciklusok végén pedig PBS-es mosás következik.



25. ÁBRA AZ ÖSSZES MÉRÉSI CIKLUS EGY GRAFIKONON ÁBRÁZOLVA. ATÖMEG EZÜTTAL NINCSEN NULLÁHOZ IGÁZÍTVA, ÍGY KÖNNYEBBEN MEGFIGYELHETŐ, HOGY AZ EGYES ANYAGOK MENNYIRE HATÉKONYAN TISZTÍTJÁK MEG A FELÜLETET. A BSA AZ ELŐZŐLEG FELVITT RÉTEG FEHÉRJÉT MUTATJA.

3.4.2 Eredmények

A mérés során az adatokat kiértékelve megállapítottuk, hogy a tisztítás során a letapadt fehérjeréteg körülbelül 40%-a került eltávolításra. Ez jóval elmarad a kitűzött célunktól, így szükségessé válik egy újfajta, bővített eljárás kidolgozása.

A 25. ábráról megállapítható továbbá az is, hogy a BSA esetében a NaOH oldat bizonyult a legeredményesebb tisztítószernek.

3.5 Plazmatisztítással kiegészített tisztítási eljárás

Az előző kísérletből kiderült, hogy a gyártó által ajánlott tisztítási protokoll nem távolítja el a letapadt fehérjeréteg jelentős részét, így ránk hárult a feladat egy hatékonyabb eljárás kidolgozására. A tervünk az volt, hogy kiegészítjük a már meglévő módszert a laboratóriumban megtalálható, más műszerekhez használt eljárásokkal. A következőkben a STANDARD tisztítás a gyártó által ajánlott, az előbbieken ismertetett protokollt jelenti.

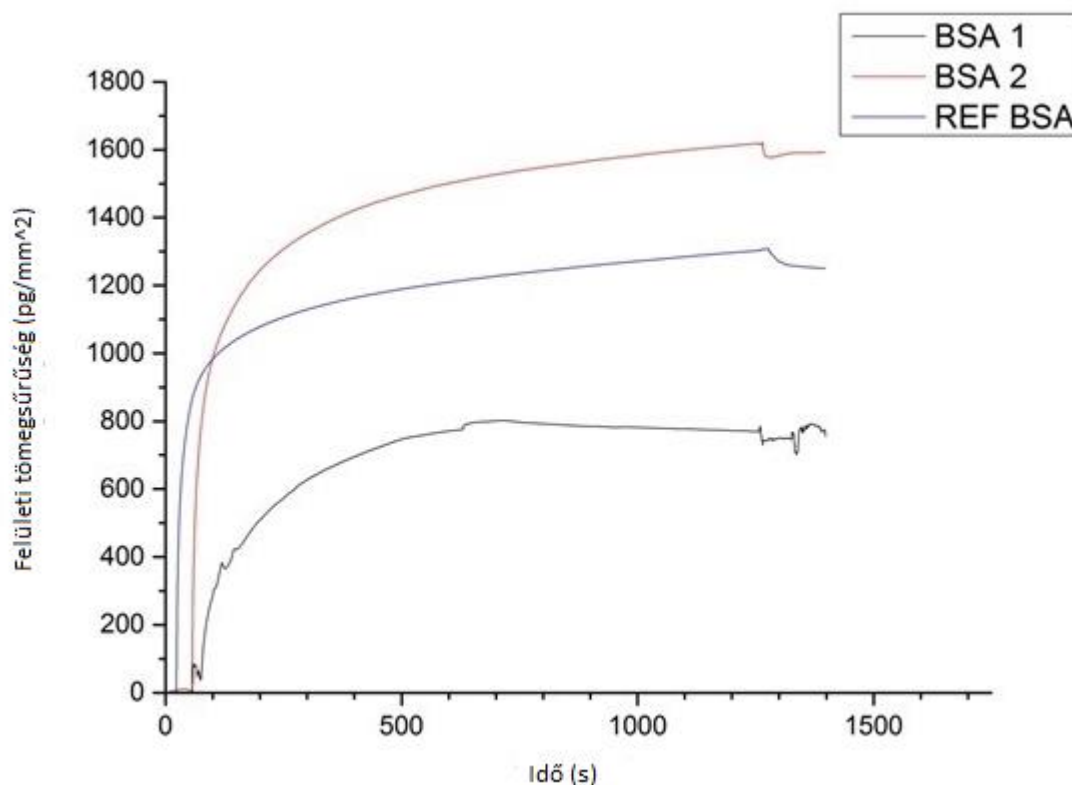
A chip tisztítása során a következők szerint jártunk el:

1. 10 perc MILLIQ ultra tiszta víz
2. STANDARD tisztítás
3. 10 perc Roche „COMPLETE HIS-TAG PURIFICATION RESIN” oldószer
4. 10 perc MILLIQ ultra tiszta víz
5. 3 perc plazmatisztítás a műszerből eltávolított és leszáritott chipen
6. STANDARD tisztítás
7. MILLIQ ultra tiszta víz

A Roche cég által gyártott felülettisztító oldatra azért esett a választásunk, mert rendkívül erős detergens, és a felületen megtapadt fehérjéket nagy hatékonysággal ki tudja szorítani. Hátránya, hogy utána sok ideig kell vízzel átmosni.

A kísérlet során az előző kísérletben használt chipet használtuk, ám a tisztítás tesztelése előtt lefuttattunk rajta egy BSA adszorpciós mérést, hogy tudjunk viszonyítani a tisztítás után. Ettől a méréstől azt vártuk, hogy szignifikánsan kevesebb felületi tömegértéket kapjunk, hiszen az előzőleg használt chip felületén már jelentős mennyiségű fehérje van letapadva.

3.5.1 Eredmények



26. ÁBRA A GRAFIKONON LÁTHATÓ, HOGY A MÉRÉS ELEJÉN (BSA1) ÉS A TISZTÍTÁS UTÁN (BSA2) VÉGZETT BSA KITAPADÁS KÖZÖTT JELENTŐS KÜLÖNBSEG TAPASZTALHATÓ, ILLETVE AZ ÚJONNAN HASZNÁLT CHIPEN VÉGZETT MÉRÉS (REF BSA) EREDMÉNYÉT IS FELÜLMÚLJA.

Az adatok kiértékelése után látszik, hogy az újonnan kidolgozott tisztítási eljárás sikeres volt. Szembetűnő viszont, hogy az újonnan használt, nem szennyezett chipen végzett kísérlet eredményénél is nagyobb tömeget észleltünk. Annak fényében, hogy az összes mérésnél ugyanazzal a fehérjekoncentrációval dolgoztunk, ez az eltérés csak azzal magyarázható, hogy a BSA oldat előállítása során pár mikroliterrel tévedtünk, és emiatt nagyobb koncentrációval dolgoztunk a harmadik mérésnél. Ettől az anomáliától eltekintve az általunk kidolgozott eljárás sikeresnek tekinthető, elértük vele a kitűzött célunkat. A további mérések során ezt a protokollt kívánjuk alkalmazni.

4. fejezet

Hibaelhárítás a kísérletek során

4.1 GCI bioszenzorral végzett kísérletek során észlelt problémák és megoldásaik

4.1.1 Pumpák leállása kísérlet közben

Különösen hosszú mérések alkalmával (egy- másfél óra) észleltük ezt a hibát. A kísérlet közben a GCI pumpáit vezérlő szoftver hibát észlelt és leállt. Emiatt a mérést idő előtt meg kellett szakítanunk.

A hibáról tájékoztattuk a műszer gyártóit, akik a jövőben kijavítják a problémát.

4.2 QCM 3000 bioszenzorral végzett kísérletek során észlelt problémák és megoldásaik

4.2.1 Légbuborék bejutása a küvettába

Az első kísérleteknél komoly problémát jelentettek az apró, gázzal töltött buborékok, melyek a mikrofluidikán keresztül be tudtak jutni a küvettába. Ezek a szenzorfelülettel kölcsön hatva teljesen tönkretették a mérési eredményeinket.

A problémát egy „buborékcsapda” nevezetű eszközzel oldottuk meg, mely a küvettába jutott oldatot először egy membránon ereszti át, amely légteleníti a folyadékot. A későbbi mérések során ez az eszköz megoldotta a problémát.

4.2.2 Küvettatartó beázása

Gyakori problémát jelentett méréseink során, hogy a küvettából a tartójába folyadék szivárgott. Ezután további méréseket csak a rendszer teljes tisztítása után tudtunk végezni, ami adott esetben idő- és anyagköltségesnek adódott.

Megfigyeléseink szerint a küvettatartó fedője ilyenkor nem fogja elég szorosan össze a szenzor chipet, így a keletkező résen szivárog ki a folyadék.

A problémát úgy sikerült elhárítanunk, hogy a kísérletek megkezdése előtt többször megbizonyosodtunk a küvetta megfelelő záródásáról, valamint minden kísérlet előtt a rendszerben nagy tisztaságú vizet (MilliQ) áramoltattunk, meggyőződve arról, hogy nem keletkezett rés a küvettában.

5. fejezet

Párhuzamos mérés a GCI és a QCM 3000 műszerekkel

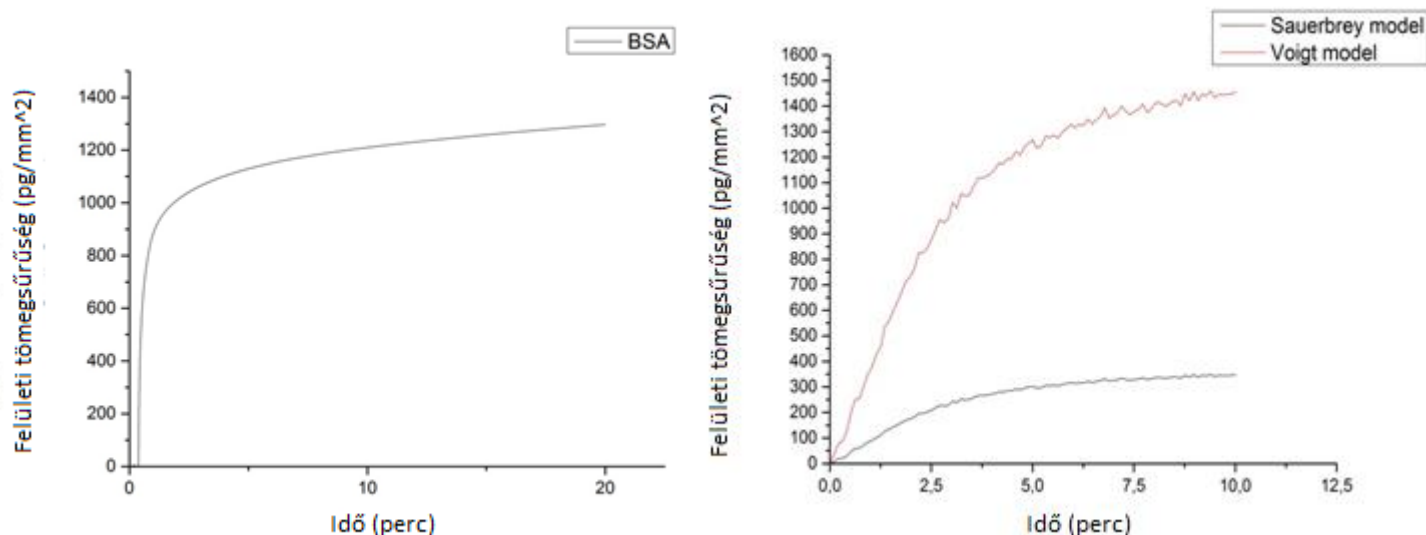
A következőkben a két, jelölésmentes bioszenzorral végzett párhuzamos mérés bemutatására kerül sor. A méréseket ugyanolyan koncentrációjú BSA oldattal, hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkező chipfelületeken végeztük. Az eljárás előnye, hogy a vizsgált fehérjéről többretegű adatokat tudhatunk meg, miközben egy nagy pontosságú műszer szolgáltat referencia értékeket.

5.1 A mérés menete

Mindkét bioszenzorral végzett mérést az alábbiak alapján állítottuk össze:

Folyadék sebessége [$\mu\text{L}/\text{perc}$]	Puffer időtartam [s]	Minta	Minta időtartam [s]	Puffer időtartam [s]
10	600	1mg/ml BSA	1200	600

5.2 Eredmények



27. ÁBRA A KÉT MÉRÉS ÁLTAL SZOLGÁLTATOTT FELÜLETI TÖMEGSŰRÜSÉGEK KÉT GRAFIKONON ÁBRÁZOLVA. A JOBB OLDALIN KÜLÖN FEL VAN TÜNTETVE A SAUERBREY MODELL ÁLTAL SZÁMOLT ÉRTÉK. AZ ELMÉLETI VÁRAKOZÁSOKNAK MEGFELELŐEN MINDKÉT MŰSZERREL SZATURÁCIÓS GÖRBÉT KAPTUNK.

Az eredményekből kitűnik, hogy a várakozásoknak megfelelően a GCI és a Voigt-model által kalkulált eredmények nagyjából megegyeznek, a jel alakjában és nagyságában érzékelhető kisebb eltérés a két chipfelület anyagi különbözőségének tudható be. Az is megfigyelhető, hogy a Sauerbrey-model szerint számolt tömeg a valós értékek mintegy negyede. Ezzel bizonyítást nyert a feltételezés, miszerint a Sauerbrey-model alulbecsüli a viszkoelasztikus tulajdonságokkal rendelkező vékonyrétegek tömegét. Emiatt a későbbi kísérletek során ragaszkodunk a Voigt-model használatához.

6. fejezet

Összefoglalás

- Tudományos Diákköri munkánkban sikeresen elsajátítottuk a két bioszenzor elméleti- és gyakorlati háttérét, a velük végzett kalibrációs- és próbamérések eredményei hozzájárulnak a jövőben tervezett, összetettebb kísérletekhez. A mérések során felmerült hibák egy részét sikerült megoldanunk, a műszerek működését mélyebben érintő problémákat pedig jeleztük a gyártók felé.
- Mindkét bioszenzorhoz kidolgoztunk egy chiptisztítási eljárást, amellyel a jövőbeni kísérletek költséghatékonyabbá tehetők.
- A kísérleteink során vizsgáltuk a BSA fehérjék adszorpcióját mindkét műszerrel. A párhuzamosan végzett, ugyanolyan koncentrációjú fehérjeoldattal végzett mérés során meggyőződhattünk a két bioszenzor pontosságáról.
- Az általunk fejlesztett MATLAB algoritmusok segíthetnek a jövőben a műszerek által szolgáltatott adatok könnyebb és gyorsabb kiértékelésében. Az elkövetkezőkben tervezzük mindkét szoftvert fejleszteni, felhasználóbaráttá tenni.
- A jövőben tervezünk nagyobb felkészültséget igénylő, bonyolultabb kísérleteket is végezni a két, jelölésmentes bioszenzorral. Célunk mindkét esetben élő, emlőssejtek vizsgálata, kölcsönhatásaik megfigyelése különböző anyagokkal. Tervezzük továbbá a fehérje adszorpció kvantitatív kinetikai elemzését is elvégezni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk megköszönni témavezetőnknek, Dr. Horváth Róbertnek, hogy dolgozat elkészítése során szakmai tudásával, útmutatásával, és kitartó bátorításával végig mellettünk állt.

Szeretnénk külön megköszönni Kovács Boglárkának és Patkó Dánielnek, hogy munkánk elejétől fogva segítettek szakmai tapasztalatukkal a kezdeti nehézségeken való átlendülést, valamint később a komplexebb kísérletek megtervezését.

Köszönetet szeretnénk mondani a Nanobioszenzorika laborban dolgozó Nádor Jutkának, Péter Beatrixnak, Farkas Enikőnek, Orgován Norbertnek, és Székács Innának, akik segítettek az eszközök megismerésében, használatában, az eredmények rögzítésében.

Külön köszönjük családunknak és barátainknak, hogy a kutatómunkám során végig türelmesen biztattak, s beszámolóinkat végighallgatták, dicséreteikkel erőt adtak.

Irodalomjegyzék

- [1] S. P. Mohanty and E. Kougiannos, "Biosensors: a tutorial review," *Potentials, IEEE*, vol. 25, no. 2, pp. 35–40, 2006.
- [2] E. C. Alocilja and S. M. Radke, "Market analysis of biosensors for food safety," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 5–6, pp. 841–846, May 2003.
- [3] M. a Cooper, "Optical biosensors in drug discovery.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 7, pp. 515–28, Jul. 2002.
- [4] Y. Fang, "Label-Free Receptor Assays.," *Drug Discov. Today. Technol.*, vol. 7, no. 1, pp. e5–e11, Jan. 2011.
- [5] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 620, no. 1–2, pp. 8–26, Jul. 2008.
- [6] H. Yu, C. M. Eggleston, J. Chen, W. Wang, Q. Dai, and J. Tang, "Optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) as a sensor for thin film and quantum dot corrosion.," *Sensors (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 17330–42, Jan. 2012.
- [7] K. A. Marx, "Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution - Surface Interface," vol. 4, no. 5, 2003.
- [8] L. Sarkadi, "Biokémia mérnök szemmel." Typotex, Budapest, p. 32, 2007.
- [9] M. P. Neyra, F. Javier, and G. Mur, "Interactions between titanium surfaces and biological components PhD thesis Dissertation 3 . Kinetics and two-step competitive protein adsorption characterization on TiO₂ crystals using QCM-D," no. July, 2009.
- [10] C. J. Beverung, C. J. Radke, and H. W. Blanch, "Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements," *Biophys. Chem.*, vol. 81, no. 1, pp. 59–80, Sep. 1999.
- [11] N. Orgovan, D. Patko, C. Hos, S. Kurunczi, B. Szabó, J. J. Ramsden, and R. Horvath, "Sample handling in surface sensitive chemical and biological sensing: a practical review of basic fluidics and analyte transport.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 211, pp. 1–16, Sep. 2014.
- [12] N. Aggarwal, K. Lawson, M. Kershaw, R. Horvath, and J. Ramsden, "Protein adsorption on heterogeneous surfaces," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, no. 8, p. 083110, 2009.
- [13] P. Kozma, "Kozma Péter Interferometrikus optikai hullámvezető bioszenzor jelölésmentes érzékeléshez," *Doktori értekezés*, pp. 1–130.
- [14] B. Kobzi, "Hordozóra felvitt lipid kettősréteg vizsgálata OWLS módszerrel," *TDK Dolg.*, pp. 6–7, 2011.

- [15] M. Rodahl, F. Höök, A. Krozer, P. Brzezinski, and B. Kasemo, "Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 66, no. 7, p. 3924, 1995.
- [16] V. M. Mecea, "Is quartz crystal microbalance really a mass sensor?," *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 128, no. 2, pp. 270–277, Apr. 2006.
- [17] M. V Voino, M. Jonson, and B. Kasemo, "'Missing mass' effect in biosensor's QCM applications," vol. 17, pp. 835–841, 2002.
- [18] M. C. Dixon, "Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring : Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions," pp. 151–158, 2008.
- [19] M. Rodahl and B. Kasemo, "A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 67, no. December 1995, pp. 3238–3241, 1996.
- [20] M. V Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, and B. Kasemo, "Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach," *Phys. Scr.*, vol. 59, no. 5, pp. 391–396, May 1999.
- [21] B. Kasemo, C. Fant, K. Sott, H. Elwing, and T. Qcm-d, "Variations in Coupled Water , Viscoelastic Properties , and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking : A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring , Ellipsometry , and Surface Plasmon," vol. 73, no. 24, pp. 5796–5804, 2001.
- [22] S. X. Liu and J.-T. Kim, "Application of Kevin–Voigt Model in Quantifying Whey Protein Adsorption on Polyethersulfone Using QCM-D," *J. Assoc. Lab. Autom.*, vol. 14, no. 4, pp. 213–220, Aug. 2009.
- [23] K. Laos, R. Parker, J. Moffat, N. Wellner, and S. G. Ring, "The adsorption of globular proteins, bovine serum albumin and [beta]-lactoglobulin, on poly-l-lysine-furcellaran multilayers," *Carbohydr. Polym.*, vol. 65, no. 3, pp. 235–242, Aug. 2006.
- [24] Á. Budó, "Kísérleti Fizika, 3. kötet, 4. kiadás." Tankönyvkiadó, Budapest, 1989, 525 p.
- [25] R. Horvath, "Evanescent optical waves for label-free monitoring of live cell status and behavior," in *Photonics Society Summer Topical Meeting Series, 2011 IEEE*, 2011, pp. 73–74.
- [26] N. Orgovan, B. Kovacs, E. Farkas, B. Szabó, N. Zaytseva, Y. Fang, and R. Horvath, "Bulk and surface sensitivity of a resonant waveguide grating imager," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 104, no. 8, p. 083506, Feb. 2014.
- [27] E. Papp, "Optikai hullámvezetők biológiai alkalmazásai." <http://virag.elte.hu/kurti/owgm1.html>.
- [28] J. Vörös, "Integrált optikai hullámvezető szenzor alkalmazása a bioanyagkutatásban," 1999, pp. 4–11.

- [29] D. Patko, B. Gyorgy, a. Nemeth, K. E. Szabó-Taylor, a. Kittel, E. I. Buzas, and R. Horvath, "Label-free optical monitoring of surface adhesion of extracellular vesicles by grating coupled interferometry," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 188, pp. 697–701, Nov. 2013.
- [30] P. Kozma, A. Hamori, K. Cottier, S. Kurunczi, and R. Horvath, "Grating coupled interferometry for optical sensing," *Appl. Phys. B*, vol. 97, no. 1, pp. 5–8, Aug. 2009.
- [31] B. X. Huang, H.-Y. Kim, and C. Dass, "Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry.," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, no. 8, pp. 1237–47, Aug. 2004.
- [32] N.-S. Cheng, "Formula for the Viscosity of a Glycerol–Water Mixture," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 47, no. 9, pp. 3285–3288, May 2008.

I. Függelék

Tudományos diákköri munkánk során a feladatunk a Nanobioszenzorikai Laboratóriumba frissen beszerzésre került, két, eltérő elven működő jelölésmentes bioszenzor tesztelése, próbamérések végzése, egyszerűbb fehérjeadszorpciós mérések megtervezése és kivitelezése volt.

Munkánk során elsajátítottuk a műszerek elméleti hátterét, majd a megszerzett tudást felhasználva olyan adatkiértékelő algoritmust fejlesztettünk, mellyel a mechanikai elven működő bioszenzor felhasználhatóságát bővíthettük.

Méréseink első felében a két, jelölésmentes bioszenzorral kalibrációs- és próbaméréseket végeztünk, ennek során megbizonyosodtunk a műszerek pontosságáról és hibáiról. A későbbi mérések eredményessége érdekében hatékony chiptisztítási eljárásokat dolgoztunk ki.

Kísérleteink második felében meghatározott felületen fehérjék adszorpcióját vizsgáltuk valós időben. Ennek során párhuzamos méréseket is végeztünk, mellyel a világon elsőként egyesítettük a két, különböző elven működő, jelölésmentes bioszenzor előnyeit, kihasználva az általunk fejlesztett adatkiértékelő algoritmus által szolgáltatott információkat.

A mérések előkészítése során mi készítettük elő a biológiai mintákat, valamint a bioszenzorok vezérlése is a mi feladatunk volt. Kutatásunk során így értékes gyakorlati tapasztalatot szereztünk a laboratóriumi munkában is.

Tudományos diákköri munkánk során elvégzett kísérleteinkkel és az adatkiértékelő algoritmusunkkal megnyitottuk az utat a később elvégzendő, komplexebb rendszerek (élő eukarióta sejtek, baktériumok) valós idejű vizsgálata felé.