

**FAKULTA MATEMATIKY FYZIKY A INFORMATIKY  
UK BRATISLAVA**

**KATEDRA BIOFYZIKY A CHEMICKEJ FYZIKY**



**Štúdium hybridizácie DNA na pevnom povrchu  
pomocou akustických metód**

Rigorózna práca

2001

**Mgr. Viktor Gajdoš**

**Ďakujem Prof. RNDr. Tiborovi Hianikovi, DrSc. za odborné vedenie a rady.**

## Obsah

Úvod	1
1 Biosenzory	3
2 Biosenzory založené na akustických kmitoch	6
2.1 Technológia a vlastnosti akustických senzorov	6
2.2 Typy a. w. senzorov	7
2.2.1 TSM rezonátor	8
2.2.2 SH-APM senzor	9
2.2.3 SAW senzory	9
2.2.4 Flexural-Plate Wave senzor	10
3 TSM rezonátor	12
3.1 Princíp práce TSM rezonátora	12
3.2 Elektrický a mechanický model TSM rezonátora	13
3.3 TSM rezonátor ako biosenzor	15
3.3.1 Spôsoby modifikácie povrchu TSM rezonátora pre biosenzorické aplikácie	17
4 Študium hybridizácie DNA na pevnom povrchu pomocou TSM rezonátora	19
Literatúra	23

## Úvod

Prudký rozvoj gentechnológií, požiadavka po vývoji metód na rýchlu analýzu génových mutácií v medicíne, potreba kontroly bakteriologických kontaminácií v potravinárstve, ako aj štúdium hybridizácie DNA na pevnom povrchu samotné, to sú len niektoré z dôvodov stále rastúceho záujmu a snáh o vývoj biosenzora na detekciu špecifických sekvencií DNA. V súčasnosti používané biochemické metódy sekvenovania na analýzu postupnosti nukleotidov v molekulách DNA, sú časovo, technicky a finančne vysoko náročné. Preto je jedným zo súčasných trendov výskumu v biofyzike a biochémií vývoj metódy a zariadenia, pomocou ktorého by bola možná analýza DNA "na počkanie" a bez veľkých technických a finančných nárokov.

Perspektívne sa v tejto oblasti ukazujú byť biosenzory na detekciu špecifických sekvencií DNA, založené na hybridizácii jednonit'ových vlákien DNA, využívajúce na detekciu elektrochemické, optické, alebo akustické ( nanogravimetrické ) metódy. Týmito metódami sa už v súčasnosti darí detekovať  $\mu\text{M}$  koncentrácie umelo nasyntetizovaných krátkych ( s dĺžkou niekoľko desiatok nukleotidov ) jednonit'ových vlákien DNA v súvislosti s ich zložením – postupnosťou nukleotidov. Zatiaľ však ide len o výsledky získané v umelých a ideálnych laboratórnych podmienkach a testovanie rôznych možností. Hudbou budúcnosti by malo byť biosenzorické, tzv. "lab on the chip" zariadenie, v ktorom by v reálnom čase prebiehala po dodaní fyziologickej vzorky jej úprava a následná analýza, schopné pracovať v bežných laboratórnych a klinických podmienkach.

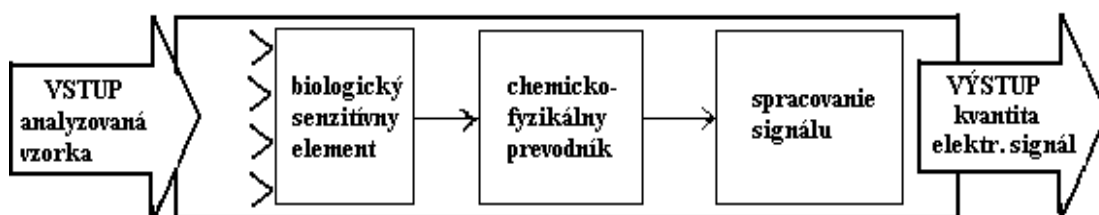
Senzory založené na akustických kmitoch ( piezoelektrické senzory ) sú vďaka svojej extrémnej citlivosti na povrchové interakcie ideálnym kandidátom na konštrukciu DNA biosenzorov. Zvlášť najjednoduchší z nich – TSM rezonátor sa v súčasnosti stále častejšie používa pri študovaní hybridizácie DNA na pevnom povrchu v mnohých biofyzikálnych a biochemických laboratóriách na celom svete.

Cieľom tejto práce je podať stručný prehľad o piezoelektrických senzoroch a ich možnostiach pre konštrukciu biosenzorov. Druhá časť je zameraná na TSM

rezonátor, jeho použitie ako biosenzora a stručný prehľad možností jeho využitia na štúdium hybridizácie DNA na pevnom povrchu.

# 1. Biosenzory

Biosenzory sú citlivé snímače, navrhované na detekciu fyzikálno – chemických veličín a látok v biologických prostrediach. Sú to zariadenia využívajúce biochemické a biologické deje prebiehajúce na molekulárnej úrovni, ako základ na detekciu a kvantitatívne stanovenie chemických a biologických látok. Biosenzor sa skladá z biologického rozpoznávacieho elementu (receptora), ktorý je napojený na chemicko – fyzikálny prevodník – signálový menič (obr. 1.1) Po špecifickej interakcii medzi rozpoznávacím elementom a analyzovanou látkou (analyt), sa v chemicko – fyzikálnom prevodníku generuje fyzikálny signál, ďalej spracovávaný elektronickými obvodmi. Celý systém je spracovaný tak, aby bol použiteľný bez ďalších elementov a špecifický k cieľovej látke.

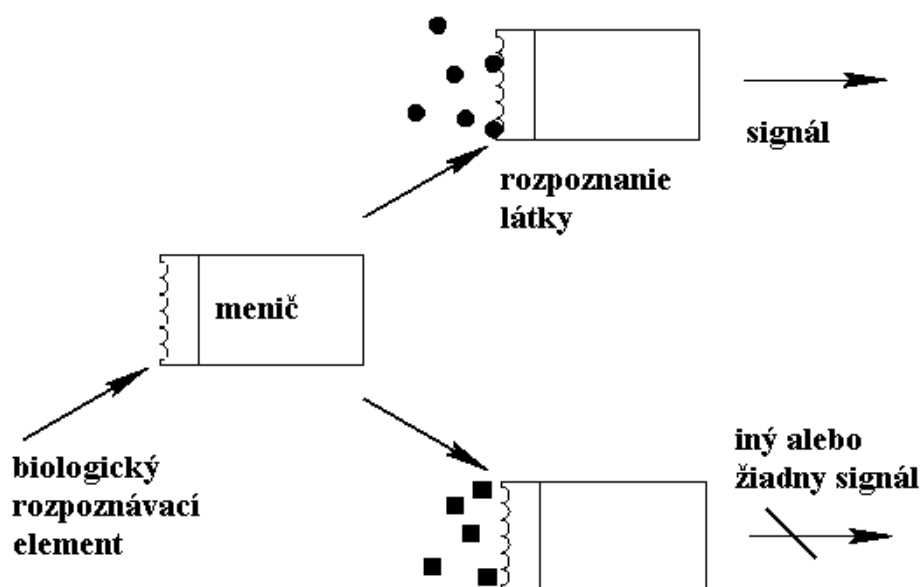


Obr. 1.1 Princíp a zloženie biosenzora.

Proces merania – sledovanie požadovanej reakcie biosenzora na prítomnosť analyzovanej látky, možno na molekulárnej úrovni porovnať s princípom zámok – kľúč (obr. 1.2). Zabudovaná molekula receptora – “zámok” vytvára s molekulou detekovanej látky – “kľúčom” komplex, na vznik ktorého reaguje chemicko – fyzikálny prevodník generovaním fyzikálne merateľného signálu (elektrický, mechanický, tepelný, optický alebo magnetický), ktorý je ďalej zosilnený a prevedený do formy ktorá môže byť zobrazená a uložená. S inými molekulami receptor neinteraguje, alebo výstupný signál má iný charakter

Biologické rozpoznávacie elementy možno rozdeliť do dvoch skupín: katalytické, ktoré zahŕňajú enzýmy, mikroorganizmy a rastlinné alebo živočíšne tkanivá, a nekatalytické (afinitné), medzi ktoré patria protilátky, receptory

a nukleové kyseliny. Rozpoznávacím elementom môže byť aj syntetická molekula, avšak, vo veľa prípadoch chemická zložitosť analytu, osobitne ak ide o proteín, to nedovoľuje a veľká seletivita je dosiahnutá iba biologickými molekulami.



Obr. 1.2 Základná schéma práce biosenzora, princíp zámku a kľúča.

Výber molekuly receptora a jeho napojenie na vhodný fyzikálno –chemický prevodník súvisí s dosiahnutím požadovaných analytických charakteristík biosenzora, ako špecifickosť, citlivosť, detečný limit, merací rozsah, lineárnosť, čas odozvy, teplotná stabilita, reverzibilita a pod. Medzi týmito parametrami existujú často obmedzujúce vzťahy. Napr. potreba vysokej reverzibility obmedzuje citlivosť a zvýšenie citlivosti zas môže znížiť špecifickosť a presnosť prístroja. Najpretrvávajúcejším problémom biosenzorov je ich časová a mechanická stabilita, ktorá je tiež podmienená biomolekulou receptora a spôsobom jej spojenia s biosenzorom. Základné rozdelenie biosenzorov je v tabuľke 1.1.

Výhodou biosenzorov je schopnosť špecificky a veľmi citlivo určiť spektrum látok v procesoch analýzy v klinických laboratórnych podmienkach, ale aj pri kvasných procesoch, kontrole znečistenia životného prostredia a pod.. In vivo a in line meracie možnosti biosenzorov sú stredobodom záujmu súčasného výskumu

v tejto oblasti. Ďalšou výhodou biosenzorov je, že málo ovplyvňujú biologické prostredie, v ktorom pracujú. V porovnaní s konvenčnými metódami na detekciu niektorých veličín, môže byť ich použitie aj menej časovo a finančne náročné. Ich nevýhodou je ale menšia časová a mechanická stabilita a náročná príprava.

<b>princíp</b>	<b>meraná výstupná veličina</b>	<b>príklad</b>
<b>ELEKTROCHEMICKÉ ZMENY</b> potenciometrické ampérometrické	zmena napätia zmena prúdu	enzýmové elektródy, protilátkové a bunkové elektródy
<b>OPTICKÉ ZMENY</b> absorpcia a rozptyl svetla, refrakčný index, fluorescencia, polarizácia, interferencia	zmeny intenzity, farby, emisie svetla,	elipsometria, rozptyl svetla, vnútorná refraktometria, fluorescenčná polarizácia
<b>TEPLONÉ ZMENY</b> enzýmové termistory	zmeny teploty	enzýmové, imunoenzýmové reaktory
<b>MECHANICKÉ A AKUSTICKÉ ZMENY</b> hmotnosť, hustota, viskozita	zmeny hmotnosti, amplitúdy, fázy, alebo frekvencie akustickej vlny	piezoelektrické zariadenia (SAW, APM, FPM, TSM)

Tabuľka 1.1 Základné rozdelenie biosenzorov podľa meranej výstupnej fyzikálnej veličiny.



## 2. Biosenzory založené na akustických kmitoch

Pri senzoroch založených na akustických kmitoch ( acoustic wave sensors, ďalej skratka a.w. senzory ) je meranou výstupnou veličinou mechanická, akustická vlna. Pri šírení sa akustickej vlny cez objem, alebo po povrchu materiálu, vyvoláva každá zmena v ceste šírenia sa vlny, zmenu v jej rýchlosti, amplitúde, alebo fáze. Zmeny na aktívnom povrchu senzora pri kontakte s analyzovanou látkou, sú v tomto prípade sledované meraním zmien vlastností akustickej vlny, šíriacej sa cez objem alebo po povrchu senzora. Pomocou a.w. sensorov je tak možné merať v plynnom alebo kvapalnom prostredí zmenu povrchovej hmotnosti, spôsobenú adsorpciou molekúl na povrch senzora a viskoelastických vlastností tenkých filmov a tekutín. Vysoká citlivosť a.w. sensorov, schopnosť práce v roztokoch a možnosť sledovať tieto zmeny priebežne, z nich robí vhodný nástroj na konštrukciu biosenzorov a štúdium afinitných interakcií.

### 2.1 Technológia a vlastnosti akustických sensorov

Na výrobu a.w. sensorov sa používajú piezoelektrické materiály. Piezoelektrický jav bol objavený v roku 1880 bratmi Pierrom a Paulom-Jacques Curie. Dochádza pri ňom k tvorbe elektrického náboja pri aplikovanom mechanickom strese a naopak, privedenie vhodného elektrického poľa na materiál v ňom spôsobuje mechanický stres.

V piezoelektrických a.w. senzoroch sa na povrch senzora privádza vhodné striedavé napätie, ktoré v piezoelektrickom materiále generuje mechanickú ( akustickú ) vlnu, ktorá po prechode materiálom zas spätne vytvára merané elektrické napätie.

Medzi najviac používané materiály na výrobu piezoelektrických sensorov a zariadení patrí: kremenný krištál ( quartz crystal,  $\text{SiO}_2$  ), litium tantalát (  $\text{LiTaO}_3$  ) a litium niobát (  $\text{LiNbO}_3$  ). Každý ma výhody a nevýhody, napr. teplotnú závislosť,

útlm, rýchlosť šírenia sa vlny a cenu. Výhodnou vlastnosťou kremenného křišťálu je možnosť zníženia teplotnej závislosti pri vhodnom uhle výrezu vzhľadom na křišťalickú mriežku.

Elektrické napätie sa na piezoelektrický substrát privádza a je spätne snímané pomocou elektród vhodného tvaru, ktoré sa na povrchu substrátu vytvárajú väčšinou naprášením kovu cez masku, alebo fotolitografickými technikami. Tvar a materiál elektród závisí od použitia senzora.

## 2.2 Typy a.w. senzorov

A.w. zariadenia sa rozdeľujú podľa spôsobu ( módu ) šírenia sa vlny v piezoelektrickom substráte. Mechanická vlna sa môže šíriť cez objem piezoelektrického substrátu ( bulk wave ), alebo po jeho povrchu ( surface wave ) a v oboch prípadoch môže byť smer kmitania častíc prostredia kolmý ( shear mode ) alebo rovnobežný so smerom jej šírenia. Spôsob šírenia sa vlny obmedzuje možnosťami použitia senzora. Pri senzoroch s kmitaním v kolmom smere na povrch senzora ( pri SAW senzoroch ) dochádza vo vodnom prostredí k silnému útlmu vlnenia, preto sa tieto používajú iba na merania vo vákuu alebo v plynnom prostredí, zatiaľ čo senzory využívajúce kmity v rovnobežnom smere s povrchom ( TSM, SH-APM a SH-SAW senzory ) tento problém nemajú a efektívne pracujú v tekutinách aj v plynnom prostredí.

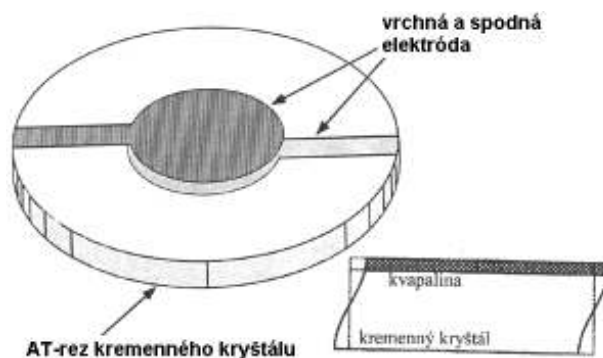
Ako jedna z charakteristík a.w. senzorov sa ďalej uvádza gravimetrická citlivosť  $S_m$ , ktorá je definovaná:

$$S_m = \frac{1}{\Delta m_s} \left( \frac{\Delta f}{f} \right) \quad (2.1)$$

Kde  $\Delta f$  je zmena frekvencie v Hz, ktorú vyvolá deponácia tenkého filmu s povrchovou hustotou  $m_s$  ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) na povrch senzora s pracovnou frekvenciou  $f$ . Čím je hodnota  $S_m$  vyššia, tým je senzor citlivejší.

### 2.2.1 TSM rezonátor

TSM rezonátor, tiež označovaný ako QCM ( quartz crystal microbalance ) alebo kremenné mikrováhy, je najstaršie, najznámejšie a najjednoduchšie a. w. zariadenie. Je tvorené z tenkého disku AT–rezu kremenného kryštálu, ktorý má na oboch stranách tenké paralelné kruhové elektródy ( obr. 2.1 ). AT– rez ( uhol výrezu z kryštálu vzhľadom na kryštalickú mriežku  $\varphi = -35^{\circ}05'$  až  $-35^{\circ}25'$  ) je volený pre jeho minimálny frekvenčný teplotný koeficient ( závislosť frekvencie kmitania od teploty ). Pri vzniku elektrického napätia medzi elektródami dochádza k šmykovej ( shear ) deformácii kryštálu. Aktívny povrch senzora je povrch jednej z elektród.



Obr. 2.1 Shéma TSM rezonátora a znázornenie deformácie pri kmitaní.

TSM rezonátor sa v elektrickom obvode chová ako RLC oscilátor. Pri použití striedavého napätia s frekvenciou zodpovedajúcou rezonančnej frekvencii kryštálu, v ňom dochádza k vytvoreniu stojatej mechanickej objemovej vlny, s maximálnou výchylkou kmitania na povrchu kryštálu, čo z neho robí citlivý senzor na povrchové interakcie – zmenu hmotnosti na povrchu, alebo viskoelastických vlastností rozhrania povrch / tekutina. Pri aktívnom zapojení TSM rezonátora, sleduje budiaci obvod rezonančnú frekvenciu kryštálu, čo je vhodné pri kontinuálnom sledovaní rýchlych procesov. Pri pasívnom zapojení sa pomocou skenovania meria impedančná charakteristika kryštálu. Zvýšenie hmotnosti na povrchu kryštálu spôsobuje zníženie rezonančnej frekvencie, posun pík a zmenu tvaru impedančnej krivky. Výhodnou vlastnosťou TSM senzora je možnosť používať popri gravimetrickej detekcii v tekutom prostredí zároveň detekciu elektrochemickú. Keďže aktívnym povrchom TSM senzora je kovová elektróda, môže sa použiť ako pracovná elektróda pre elektrochemické merania. TSM senzory využívajúce túto možnosť sa označujú ako EQCM ( ETSM ) Typické TSM rezonátory pracujú pri frekvenciách 5 až 30 MHz,

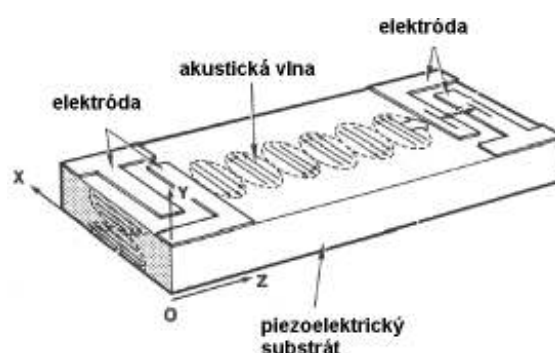
pričom vyššia pracovná frekvencia umožňuje vyššiu citlivosť senzora. Pracovná frekvencia TSM rezonátora je nepriamo úmerná jeho hrúbke, ktorá je obmedzená technickými možnosťami pri jeho výrobe a manipulácii s ním. Príklad: TSM rezonátor s rezonančnou frekvenciou 6MHz má gravimetrickú citlivosť na zmenu povrchovej hmotnosti  $S_m = -14 \text{ cm}^2/\text{g}$ .

Viac informácií o TSM rezonátoroch a ich využití je v častiach 3 a 4.

### 2.2.2 SH – APM senzory

SH-APM (Shear Horizontal Acoustic Plate Mode) senzor tvorí tenký plátok piezoelektrického materiálu, ktorý má na jednej strane elektródy – vstupný a výstupný menič (vytvorené fotolitografickými technikami).

V senzore sa generuje objemová vlna so smerom kmitania častíc rovnobežným s povrchom (obr. 2.2). Na meranie



Obr. 2.2 Schéma SH-APM senzora.

možno použiť obe strany. Absencia normálovej zložky kmitania umožňuje použitie senzora na meranie v tekutom prostredí, pričom však elektródy musia byť od roztoku izolované.

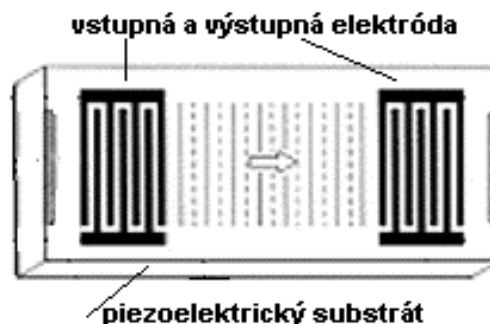
Pracovná frekvencia SH-APM senzora rastie so znižujúcou sa hrúbkou piezoelektrického substrátu. Oproti TSM senzorum majú SH-APM senzory vyššiu citlivosť a pracujú pri vyšších frekvenciách. Príklad: SH-APM senzor s pracovnou frekvenciou 97MHz má gravimetrickú citlivosť  $S_m = -19,4 \text{ cm}^2/\text{g}$ .

### 2.2.3 SAW senzory

Anglickým názvom Surface Acoustic Wave – SAW sensors, sa označujú piezoelektrické senzory využívajúce akustické vlnenie šíriace sa po povrchu senzora. Tento spôsob šírenia sa mechanickej vlny – po pevnom povrchu bol objavený v roku

1887 Lordom Raleighom, podľa ktorého sa tieto vlny nazývajú Raleighove.

V piezoelektrickom substráte senzora je pomocou elektród generovaná a detekovaná stojatá vlna, pri ktorej je výchylka kmitania častíc kolmá na povrch senzora ( obr. 2.3 ), čo z neho robí extrémne citlivé zariadenie na detekciu zmien povrchovej hmotnosti a meranie viskoelastických vlastností tenkých filmov. Nevýhodou tohto typu senzora je však obmedzenie na merania len vo



Obr. 2.3 Schéma SAW senzora.

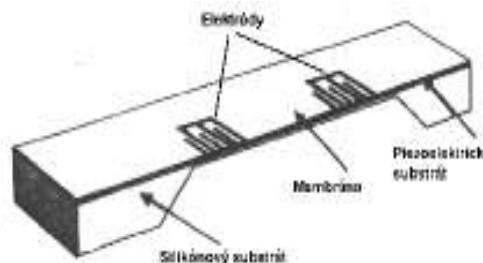
vákuu alebo plynnom prostredí, pretože v tekutine dochádza pri kolmom kmitaní častíc vzhľadom na povrch k silnému útlmu. Tento problém riešia SH-SAW ( Shear Horizontal SAW ) senzory. Vhodným výberom rezu z piezoelektrického krištálu sa dá zmeniť mód povrchovej vlny. V SH-SAW senzorch vzniká povrchová vlna so smerom kmitania častíc rovnobežným s povrchom senzora, čo výrazne znižuje útlm v tekutom prostredí a umožňuje tak používať toto zariadenie ako biosenzor.

Typické SAW senzory majú amplitúdu výchylky povrchovej vlny približne 10Å, vlnové dĺžky 1 až 100 μm a pracovné frekvencie 25 až 500MHz. Príklad: SAW senzor pracujúci s frekvenciou 97MHz má gravimetrickú citlivosť  $S_m = -130 \text{ cm}^2/\text{g}$ . Spomedzi piezoelektrických senzorov sú SAW senzory najcitlivejšie.

#### 2.2.4 Flexural – Plate Wave ( FPW ) senzor

V tomto type senzora sa generuje akustická vlna s normálovou výchylkou kmitov v tenkej membráne. V tenkej membráne z vhodného materiálu ( napr. dusičnan kremičitý,  $\text{Si}_3\text{N}_4$  ) sa generuje vlnenie pomocou kontaktu s tenkou piezoelektrickou vrstvou, na ktorej membrána leží ( obr 2.4 ) Výnimočnou vlastnosťou FPW senzora je, že v použitej membráne je fázová rýchlosť vlnenia nižšia ako vo väčšine tekutín a preto v tekutom prostredí nedochádza k vyžarovaniu tlakových vln a k výraznému útlmu. Keďže hrúbka membrány býva zvyčajne veľmi

malá – niekoľko  $\mu\text{m}$  a výchylka jej kmitov relatívne veľká – až do 100nm, má toto zariadenie vysokú citlivosť na zmeny povrchovej hmotnosti a viskoelastických vlastností prostredia. Bežné FPM senzory pracujú pri frekvenciách 1 až 10 MHz. Príklad: FPM senzor s hrúbkou membrány  $3\mu\text{m}$  a pracovnou frekvenciou 5MHz, má gravimetrickú citlivosť na povrchovú zmenu hmotnosti  $S_m = -424\text{cm}^2/\text{g}$ . Vďaka pomerne veľkej amplitúde kmitov membrány je možné použiť toto zariadenie aj ako mikropumpu. Výhodné vlastnosti FPM senzora môžu byť využité najmä pre biosenzorické merania v roztokoch.



Obr. 2.4 Schéma-rez FPW senzora.

Pozn.: väčšina informácií v tejto časti je z knihy *Acoustic wave sensors theory, design, and physico – chemical applications*.

### 3. TSM rezonátor

TSM rezonátor ( tiež známy ako QCM, alebo kremenné mikrováhy ) je vďaka svojim výhodným vlastnostiam – jednoduchosti, dostatočnej citlivosti a relatívne nízkej cene rozšíreným nástrojom na štúdium afinitných interakcií v mnohých biochemických a biofyzikálnych laboratóriách.

#### 3.1 Princíp práce TSM rezonátora

TSM rezonátor využíva strižný ( shear ) mód kmitov, s maximálnou výchylkou na povrchu kremenného krištálu, ktoré sa v ňom generujú v súlade s piezoelektrickým efektom, privádzaním striedavého napätia na povrch krištálu prostredníctvom elektród. Pri frekvencii striedavého napätia zhodnej s rezonančnou frekvenciou krištálu  $f_0$ , sa v krištále tvorí stojatá vlna s frekvenciou  $f_0$ . Veľkosť  $f_0$  závisí od hrúbky krištálu  $t_q$ :

$$f_0 = \frac{v}{2t_q} \quad v = \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \quad (3.1)$$

kde  $v$  je rýchlosť šírenia zvuku v kremeni,  $\mu_q = 2.95 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$  modul pružnosti kremeňa a  $\rho_q = 2.65 \text{ g cm}^{-3}$  hustota kremeňa. Ak je na povrchu krištálu tuhý film s hmotnosťou  $\Delta m$ , spôsobí pokles rezonančnej frekvencie krištálu o  $\Delta f_s$ . Pre malé  $\Delta m$  je závislosť  $\Delta f_s$  od  $\Delta m$  lineárna ( *Sauerbrey 1959* ):

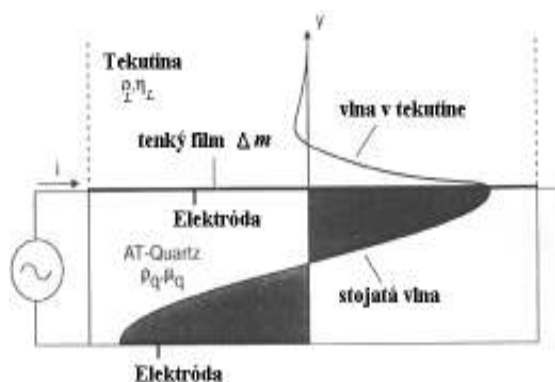
$$\frac{\Delta f_s}{f} = -\frac{\Delta m}{m} \quad (3.2)$$

kde  $m$  je hmotnosť samotného krištálu. Využitím rovníc 3.1, 3.2 a  $m = \rho_q A t_q$  dostaneme:

$$\Delta f_s = -f_0^2 \frac{2}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}} \Delta m \quad (3.3)$$

kde  $A$  je plocha aktívnej elektródy (na ktorej je film  $\Delta m$ ) krištálu. Tieto vzťahy však predpokladajú kmitanie krištálu vo vákuu alebo vo vzduchu pri konštantných podmienkach.

V prípade, že je aktívny povrch krištálu v tekutom prostredí, dochádza k zviazaniu elastických priečných vln v krištále s viskóznymi priečnymi vlnami v tekutine, čo vedie k tlmeniu kmitov a k poklesu rezonančnej frekvencie krištálu o  $\Delta f_v$  (Kanazawa 1985):



Obr. 3.1 Rez TSM rezonátorom s adsorbovaným tenkým filmom v tekutine.

$$\Delta f_v = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (3)$$

kde  $\eta_L$  je dynamická viskozita tekutiny a  $\rho_L$  hustota tekutiny. Výsledný pokles rezonančnej frekvencie  $\Delta f$  TSM rezonátora s povrchom pokrytým tenkým filmom s hmotnosťou  $\Delta m$  a v tekutom prostredí je teda:

$$\Delta f = -f_0^2 \frac{2}{A \sqrt{\mu_q \rho_q}} \Delta m - f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (3.4)$$

a rezonančná frekvencia  $f_r$  pokrytého krištálu je:

$$f_r = f_0 - \Delta f \quad (3.5)$$

### 3.2 Elektrický a mechanický model TSM rezonátora

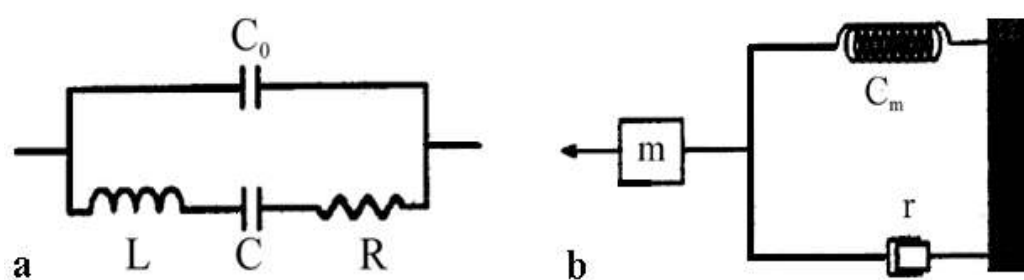
Elektrické vlastnosti piezoelektrického krištálu možno vyjadriť náhradným obvodom, zloženým z odporu  $R$ , indukčnosti  $L$  a kapacít  $C$  a  $C_0$  (obr. 3.2a) (Maramatsu 1988). Sériová RLC vetva modelu popisuje dynamické správanie TSM



rezonátora v okolí základnej frekvencie  $f_0$ , vetva s ňou paralelná s kapacitou  $C_0$  predstavuje kapacitu tvorenú elektródami křišťálu a dielektrikom medzi nimi. Sériovú RLC vetvu popisuje rovnica:

$$L \frac{d^2 q}{dt^2} + R \frac{dq}{dt} + \frac{1}{C} q = U \quad (3.6)$$

kde  $q$  je elektrický náboj a  $U$  napätie.



Obr. 3.2 Elektrický a) a mechanický b) model TSM rezonátora.

Mechanický model TSM rezonátora je znázornený na obrázku 2b ( *Maramatsu 1988* ) a rovnica ktorá ho popisuje má tvar:

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} + r \frac{dx}{dt} + \frac{1}{C_m} x = F \quad (3.7)$$

kde  $x$  je posunutie,  $m$  hmotnosť,  $r$  koeficient trenia a  $C_m$  koeficient pružnosti.

Porovnaním rovníc 3.6 a 3.7 a zavedením koeficientu elektromechanického zviazania  $k$  vedie k vzťahom medzi elektrickými a mechanickými veličinami:

$$L = \frac{m}{k^2} \quad (3.8)$$

$$C = C_m k^2 \quad (3.9)$$

$$R = \frac{r}{k^2} \quad (3.10)$$

Rovnice 3.8 až 3.10 ukazujú vzťahy indukčnosť – hmotnosť, kapacitancia – pružnosť a elektrický odpor – trenie. Indukčnosť súvisí so zotrvačnosťou kmitajúceho krištálu, kapacita s elastickými vlastnosťami krištálu a odpor s rôznymi disipatívnymi procesmi. Ako ukázal *Hayward (1992)*, pre TSM rezonátor s jednou stranou v kontakte s tekutinou je impedancia  $Z$  (tzv. viskózna impedancia) priamo úmerná  $(\eta_L \rho_L)^{1/2}$ :

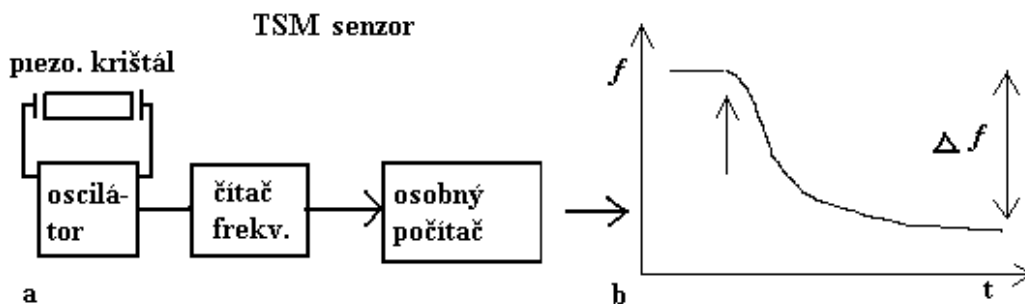
$$Z = 2\pi k \sqrt{f_0 \eta_L \rho_L} (1+i) \quad (3.11)$$

kde  $i$  je druhá odmocnina z  $-1$ . Z rovnice (3.11) je zrejmé, že meraním impedancie TSM rezonátora je možné určiť viskozitu kvapaliny a jej príspevok k celkovej zmene základnej frekvencie TSM rezonátora.

### 3.3 TSM rezonátor ako biosenzor

TSM rezonátor môže pracovať vo vákuu, v plynnom aj v tekutom prostredí. Pôvodne bol TSM rezonátor používaný na meranie hmotnosti povrchových sedimentov vo vákuu (*Sauerbrey 1959*). V súčasnosti sa okrem využitia v elektrotechnike stále viac používa TSM rezonátor ako biosenzor na študovanie afinitných interakcií biomolekúl.

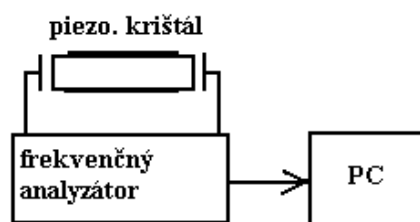
Pri meraní môže byť TSM rezonátor buď v aktívnom alebo pasívnom zapojení. Aktívna metóda je vhodná na sledovanie časového priebehu afinitných interakcií. Piezokrištál tvorí v tomto prípade aktívny prvok oscilačného obvodu, ktorý sleduje jeho rezonančnú frekvenciu (obr. 3.3a). Výsledkom merania je závislosť rezonančnej frekvencie krištálu od času (obr. 3.3b). Zmena frekvencie pred a po interakcii s analyzovanou vzorkou súvisí so zmenou hmotnosti na povrchu senzora podľa vzťahu 3.3. Bežná časová rozlíšiteľnosť merania je približne 1s. Vzťah 3.3 však predpokladá vytvorenie tuhého a súvislého filmu na povrchu krištálu. Pri meraní v tekutine sa medzi naviazané molekuly na povrchu krištálu môžu dostávať



Obr. 3.3 Aktívna metóda : a) schéma zapojenia TSM rezonátora, b) výstupný signál – zmena rezonančnej frekvencie po dodaní analytu ( znázornené šípkou ) do roztoku.

molekuly roztoku a môže sa meniť viskozita prostredia na rozhraní povrch senzora/tekutina. Výsledná zmena frekvencie po naviazaní analytu meraná v tekutine preto nemusí presne zodpovedať hmotnosti samotných molekúl analytu naviazaných na povrch senzora.

Pasívna metóda merania poskytuje väčšiu informáciu o zmenách na rozhraní povrch senzora/tekutina, ale za cenu väčšej komplikovanosti a bez možnosti priebežného sledovania zmien. Je založená na frekvenčnej analýze ( network analysis ) – počas merania sa na piezokrištál privádza striedavé napätie s plynule sa meniacou frekvenciou v okolí rezonančnej frekvencie piezokrištálu a meria sa impedancia  $Z$  a fázový posun  $\phi$  ( obr. 3.4 ). Následným spracovaním ( fitovaním, hľadaním lokálnych extrémov a pod. ) sa určí  $(\eta_L \rho_L)^{1/2}$  a  $\Delta m$ . Potrebný čas na zosnímanie frekvenčného spektra sa podľa požadovanej presnosti a kvality použitého prístroja ( frekvenčný analyzátor ) pohybuje od niekoľkých sekún po niekoľko minút.



Obr.3.4: Schéma zapojenia TSM rezonátora pri meraní pasívnou metódou.

### 3.3.1 Spôsoby modifikácie povrchu TSM rezonátora pre biosenzorické aplikácie

Aktívny povrch TSM senzora je tvorený tenkými kovovými elektródami z ušľachtilých kovov, ako napr. zlato, platina alebo paládium. Väčšina procesov využívaných v biosenzoroch je založená na reakciách prebiehajúcich na rozhraní pevný povrch senzora/tekutina a ich priebeh je teda výrazne ovplyvnený chemickou modifikáciou tohto rozhrania. Pokrytie kovového povrchu senzora tenkým filmom, tvoreným jednomolekulovou vrstvou vhodnej látky má veľký vplyv na zmáčacie, trecie a adsorpčné vlastnosti povrchu senzora.

V biosenzoroch sú využívané detekčné mechanizmy založené na princípe zámku ( molekula receptora ) a kľúča ( molekula analytu ). Tieto vyžadujú vhodné troj–dimenzionálne usporiadanie molekúl receptora na rozhraní povrch senzora/tekutina, tak, aby ku komplementárnym skupinám umiestneným v 3–D štruktúre molekuly receptora, mali molekuly analytu ľahký prístup a mohli s nimi vytvárať komplexy. Molekula receptora ( proteín, enzým, protilátka... ) môže byť imobilizovaná priamo na povrch senzora, alebo môže byť ukotvená do, alebo naviazaná na vhodný film alebo membránu.

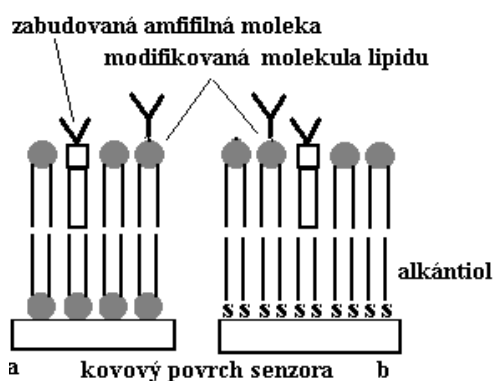
Najjednoduchší spôsob imobilizácie biomolekuly receptora je imobilizácia priamo na kovový povrch senzora. Molekulu receptora je možné chemicky upraviť – napr. naviazaním SH skupiny, ktorá vytvára s kovmi kovalentnú väzbu. Priame naviazanie na kovový povrch má aj nevýhody. Nie je tak možné imobilizovať proteíny, ktoré pri styku s kovom denaturujú, alebo nevytvárajú definované a stabilné adsorpčné vrstvy. Na odstránenie tejto nevýhody a tiež na zabránenie nešpecifických interakcií je možné kovový povrch modifikovať filmom napr. z dlhých reťazcov alkántiolu, alebo merkpto–alkanolu. Takéto vrstvy zabraňujú kontaktu proteínov a iných ligandov s kovom a slúžia ako štruktúra pre ďalšiu modifikáciu povrchu.

Pri imobilizovaní biomolekúl na upravnený povrch senzora pomocou polymérových filmov, sa využívajú prírodné polyméry ako agaróza a celulóza, syntetické polyméry ako polyakrylamid, acetát celulózy, polyvinylalkohol, polyuretán a ďalšie. Biomolekula receptora môže byť asociovaná s týmito

polymérmí pomocou adsorpcie, enkapsulácie alebo zosieťovaná bifunkčnými činidlami ( napr. glutaraldehyd ).

Jednou z možností je aj imobilizovanie molekuly receptora pomocou lipidickej vrstvy alebo membrány ( BLMs ). Zabudovanie rôznych funkčných komplexov do lipidickej vrstvy umožňuje amfifilná povaha molekúl lipidov. Rôzne iné amfifilné molekuly sa do BLM ukotvujú na základe hydrofilných a hydrofóbných interakcií, svojimi nepolárnymi časťami penikajú do vnútra a polárnymi do povrchu BLM.( obr. 3.5 ) Proces imobilizácie býva väčšinou samovolný a prebieha pri normálnych podmienkach.

Pri vytváraní jednomolekulových vrstiev na pevnom povrchu, sa často používa Langmuir–Blodgettova metóda. Spočíva v ponáraní povrchu senzora do kvapaliny, na hladine ktorej je jednomolekulová vrstva amfifilných molekúl, ktoré sa pri ponáraní adsorbujú na povrch senzora. Táto metóda umožňuje vytvoriť uniformnú, presne definovanú a usporiadanú monovrstvu ( tzv. Langmuir–Blodgettov film ). Molekuly receptora interagujú s molekulami LB filmu a môžu sa doň ukotviť alebo adsorbovať na jeho povrch.



Obr.3.5 Modifikácia kovových elektród senzora pomocou a) lipidickej dvojvrstvy, b) alkántiolového filmu a lipidovej vrstvy.

Ďalšou metódou aktivácie povrchu je silanizácia. Anorganická matrica je potiahnutá organosilanom, ktorý má na jednom konci organickú funkčnú skupinu a na ďalších alkoxy–silylovú skupinu.

Pre imobilizáciu jedného typu receptora je možné niekedy použiť viac metód: konečným kritériom ich úspešnosti je miera zachovania bioaktivity molekuly po imobilizácii, detekčné vlastnosti a reverzibilita takto pripraveného biosenzora.

## 4. Štúdium hybridizácie DNA na pevnom povrchu pomocou TSM rezonátora

### ***Metódy sledovania hybridizácie DNA na pevnom povrchu***

Prudký rozvoj gentechnológií, požiadavka po vývoji metód na rýchlu génovú analýzu v medicíne, potreba kontroly bakteriologických kontaminácií v potravinárstve ako aj štúdium hybridizácie DNA na pevnom povrchu samotné, to sú len niektoré z dôvodov stále rastúceho záujmu a snáh o vývoj biosenzora na detekciu špecifických sekvencií DNA. Biosenzorické metódy na detekciu konkrétnych sekvencií DNA sú založené na schopnosti hybridizácie navzájom komplementárnych jednonit'ových vlákien DNA – ssDNA ( single stranded DNA ). Vlákna ssDNA tvoria rozpoznávací element biosenzora, pričom sa využíva princíp zámok – kľúč. Ak sa v skúmanej vzorke nachádzajú k nim vlákna komplementárne, dochádza k afinitnej interakcii – hybridizácii DNA. Tento proces je možné sledovať viacerými metódami, ktoré sa dajú rozdeliť na dve skupiny:

- metódy využívajúce značky – rádioaktívne, fluorescenčné či enzýmové
- metódy bez použitia značiek.

Pri použití metód využívajúcich značky, sa značkou označia ssDNA vlákna v skúmanej vzorke a po interakcii senzora so vzorkou sa sleduje prítomnosť značky na jeho povrchu. Tieto metódy sú pomerne presné a spoľahlivé, ich nevýhodou je však časová a technická náročnosť súvisiaca s úpravou vzorky.

Pri vývoji metód bez použitia značiek je cieľom jednoduchosť, efektívnosť a zároveň dostatočná citlivosť. Patria sem hlavne metódy založené na elektrochemických, optických a nanogravimetrických technikách na sledovanie hybridizácie ssDNA na pevnom povrchu.

Bez ohľadu na použitú metódu, je hlavným cieľom pri vývoji biosenzora na detekciu špecifických sekvencií DNA hlavne spoľahlivosť, rýchlosť procesu detekcie, a schopnosť rozpoznávať čo najdlhšie sekvencie DNA.

### **Štúdium hybridizácie DNA pomocou TSM rezonátora**

Štúdium hybridizácie DNA na pevnom povrchu pomocou TSM rezonátora patrí v súčasnosti medzi najviac používané metódy na riešenie problému detekcie špecifických sekvencií DNA. Bežné TSM rezonátory majú dostatočnú citlivosť na zmenu povrchovej hmotnosti spôsobenú naviazaním ssDNA s dĺžkou od niekoľkých nukleotidov, môžu pracovať v tekutom aj plynnom prostredí a sú pomerne lacné, s možnosťou recyklácie. Tvorba DNA senzora pomocou TSM rezonátora spočíva vo vhodnom spôsobe imobilizácie ssDNA vlákien ( s dĺžkou od ~10 do niekoľko tisíc nukleotidov ) na povrch elektródy piezoelektrického krištálu, tak, aby v roztoku s komplementárnymi ssDNA vláknami dochádzalo ku špecifickej interakcii – ich hybridizácii a zároveň sa obmedzila nešpecifická interakcia s nekomplementárnymi vláknami ssDNA, či inými molekulami. Pri hybridizácii DNA vlákien na povrchu krištálu, dochádza k zmene povrchovej hmotnosti a viskoelastických vlastností povrchovej vrstvy, čo sa prejavuje zmenou ( poklesom ) rezonančnej frekvencie a frekvenčného spektra krištálu.

Spôsob imobilizácie ssDNA a modifikácia povrchu krištálu hrá kľúčovú úlohu pre úspešnosť hybridizácie. Väčšinou sa používajú piezoelektrické krištály s elektródami zo zlata. Na zlatý povrch je možné imobilizovať ssDNA viacerými spôsobmi.

Medzi najjednoduchšie patrí imobilizácia ssDNA priamo na zlatý povrch, pomocou modifikácie ssDNA tiolovou skupinou ( SH ), kde pri kontakte so zlatým povrchom dochádza k vytvoreniu pevnej kovalentnej väzby medzi sírou a zlatom. Vlákna ssDNA modifikované na jednom konci SH skupinou vytvárajú samovolne na zlatom povrchu kompaktnú vrstvu. Schopnosť takéhoto pomerne jednoduchého systému špecificky reagovať na prítomnosť komplementárných ssDNA vlákien v roztoku bola preukázaná vo viacerých prácach. V práci *Ketterera 1999* bol 10MHz TSM rezonátor so zlatým povrchom pokrytý ssDNA s dĺžkou 20 nukleotidov pomocou ich modifikácie SH skupinou na jednom konci. Pri prietokovom meraní v roztoku reagoval tento systém po dodaní komplementárneho reťazca ssDNA

s koncentráciou  $10\mu\text{M}$  poklesom rezonančnej frekvencie o  $85\text{Hz}$  (pri elektróde s priemerom  $5,5\text{mm}$ ). Meraná bola tiež odozva na dodanie čiastočne komplementárneho reťazca (s jedným zameneným nukleotidom), kde bola pri rovnakej koncentrácii odozva nižšia:  $-51\text{Hz}$  a odozva na nekomplementárny reťazec:  $-33\text{Hz}$ . Tiež bola sledovaná odozva v závislosti od koncentrácie komplementárnej ssDNA. V porovnaní s odozvou pri koncentrácii komplementárneho reťazca  $10\mu\text{M}$  bola zmena frekvencie pri  $50\mu\text{M}$  približne o 60% vyššia. Vo všetkých prípadoch dochádzalo k ustáleniu odozvy behom 10–15 minút. Pre zvýšenie schopnosti hybridizácie takto imobilizovaných vlákien ssDNA a na zamedzenie nežiadúcich interakcií s nepokrytým zlatým povrchom sa priestor medzi ssDNA vláknami vyplňa väčšinou molekulami merkpto–alkanolu s dlhými reťazcami, ktoré tiež tvoria na zlatom povrchu kompaktnú vrstvu a svojím pôsobením vystierajú vlákna ssDNA kolmo na povrch (Steel 2000).

Ďalším, pomerne často používaným spôsobom imobilizácie ssDNA vlákien na povrch TSM rezonátora, je imobilizácia pomocou afinitnej interakcie medzi biomolekulami avidínom a biotínom. Na povrch krištálu sa naviažu molekuly avidínu a vlákna ssDNA sa na konci modifikujú biotínom. Takto upravené ssDNA vlákna sa v roztoku pomocou afinitnej interakcie medzi avidínom a biotínom imobilizujú na povrch senzora. Príkladom tohto postupu je práca Carusa 1997, v ktorej bol pomocou  $9\text{MHz}$  TSM rezonátora (priemer elektródy  $4,5\text{mm}$ ) študovaný systém s takto imobilizovanými ssDNA vláknami dĺžky 30 nukleotidov. Na dodanie komplementárneho ssDNA vlákna do roztoku pri koncentrácii  $0,5\mu\text{g/ml}$  tento systém reagoval poklesom frekvencie o  $19\text{Hz}$  s časom ustálenia 5 minút, zatiaľ čo pri interakcii s nekomplementárnou ssDNA dochádzalo len k nepatrným zmenám rezonančnej frekvencie TSM rezonátora.

Pomocou TSM rezonátora boli študované aj možnosti imobilizácie a následnej hybridizácie ssDNA vrstvy vytvorenej na pevnom povrchu pomocou Langmuir–Blodgettovej techniky. Vďaka faktu, že pri neutrálnom pH je DNA nabitá záporne, ju je možné pomocou elektrostatických interakcií imobilizovať na povrch kladne nabitej vrstvy. Použitie tejto metódy na študovanie hybridizácie dlhých ssDNA vlákien pri rôznych teplotách bolo opísané v práci Nicoliniho, 1997, v ktorej bola na



povrchu TSM rezonátora pomocou LB techniky vytvorená najprv monovrstva z kladne nabitého oktadecylamínu, na nej bola ďalej pomocou elektrostatických interakcií vytvorená vrstva z ssDNA vlákien dĺžky 3650 nukleotidov a tá zas opäť prekrytá oktadecylamínovou vrstvou. Takto pripravený senzor bol ponorený do roztoku komplementárnej resp. nekomplementárnej ssDNA pri teplote 60°C resp. 22°C. Pobyt senzora v roztoku komplementárnej ssDNA pri 60°C bol nasledovaný výraznou zmenou frekvencie křišťálu ( ozn. ako 100% ), zatiaľ čo pri rovnakej teplote bola odozva na nekomplementárnu ssDNA 32%. Nízka úroveň hybridizácie s komplementárnou ssDNA bola pozorovaná pri teplote 22°C, kedy odozva bola len 9% v porovnaní s odozvou pri 60°C.

Pomocou TSM rezonátora je tiež možné súvisle sledovať viac za sebou nasledujúcich procesov, ako imobilizáciu ssDNA, následnú hybridizáciu a ďalej enzymatické rozštiepenie vzniknutej DNA na povrchu senzora ( *Wang, 1999* ). Pre zosilnenie odozvy pri hybridizácii ssDNA na pevnom povrchu sa môže komplementárne ssDNA vlákno označiť značkou – ťažkou molekulou, napr. funkcionalizovaným lipozómom ( *Patolsky, 2000* ).

Z uvedených prác v oblasti problematiky štúdia hybridizácie DNA na pevnom povrchu vyplýva, že TSM rezonátor je vhodný nástroj na sledovanie hybridizácie DNA. Pomocou upraveného TSM rezonátora – DNA biosenzora je možné detekovať prítomnosť špecifických sekvencií DNA v tekutom prostredí a pri kratších ssDNA vláknach ( do ~20 nukleotidov ) s možnosťou detekcie už od jednej zmeny v poradí nukleotidov.

## Literatúra

- Acoustic Wave Sensors Theory, Design, and Physico – Chemical Applications. Academic Press, Inc., 1997, San Diego.
- Caruso F., Rodda E., Furlong N. D. ( 1997 ): Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development. *Anal. Chem.* 69, 2043–2049.
- Hayward G. (1992): Viscous interaction with oscillating piezoelectric quartz crystal. *Anal. Chim. Acta.* 264, 23–30.
- Kanazawa K. K & Gordon J.G (1985): Frequency of Quartz Microbalance in Contact with Liquid. *Anal. Chem.* 57, 1770–1771
- Ketterer T., Stadler H., Rickert J., Bayer E., Gopel W. ( 1999 ): Detection of oligonucleotide sequences with quartz crystal oscillators. *Sensors and Actuators B* 65, 73–75.
- Krivánek Roland: Štúdium afinitných interakcií pomocou QCM. FMFI UK Bratislava, 2000.
- Maramatsu H., Tamiya E., Karube I. (1988): Computation of Equivalent Circuit Parameters of Quartz Crystal in Contact with Liquid. *Anal. Chem.* 60, 2142–2146.
- Nicolini C., Erokhin V., Facci P., Guerzoni S., Ross A., Paschkevitch P. ( 1997 ): Quartz balance DNA sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 12, No. 7, 613–618.
- Patolsky F., Lichtenstein A., Willner I. ( 2000 ): Amplified Microgravimetric Quartz Crystal Microbalance Assay of DNA Using Oligonucleotide–Functionalized Liposomes or Biotinylated Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 418–419.
- Sauerbrey G. (1959): The use of oscillators for weighing thin layers and for microweighing. *Z. Phys.* 155, 206–210
- Steel A. B, Levicky R. L., Herne T. M., Tarlov M. J. ( 2000 ): Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophysical Journal* 79, 975–981.
- Wang J., Jiang M., Palecek E. ( 1999 ) Real-time monitoring of enzymatic cleavage of nucleic acids using a quartz crystal microbalance. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 48, 477–480.

## Práca autora

T. Hianik, V. Gajdoš, R. Krivánek, T. Oretskaja, V. Metelev, E. Volkov, P. Vadgama: Amperometric detection of DNA hybridization on a gold surface depends on the orientation of oligonucleotide chains. *Bioelectrochemistry* 53 (2001), 199–204.