

Biosensory oraz urządzenia typu „lab-on-a-chip” z optycznym systemem detekcji umożliwiają bezznacznikową i bardzo czułą detekcję wielu różnych molekuł w czasie rzeczywistym. Bardzo często bazują one na wiązaniu wykrywanej substancji na powierzchni krzemowego przetwornika wykorzystując test immunochemiczny oparty na specyficznej reakcji pomiędzy antygenem a przeciwciałem. Jednak taki sposób detekcji analitów wymaga wielokrokowej funkcjonalizacji powierzchni krzemu za pomocą wielu różnych molekuł. Taka funkcjonalizacja obejmuje najczęściej modyfikację za pomocą samoorganizujących się molekuł, immobilizację molekuł detekcyjnych oraz blokowanie wolnych miejsc powierzchni. Najczęściej stosowanym i najprostszym sposobem immobilizacji białek na takich powierzchniach jest adsorpcja fizyczna.

Zastosowanie wielokrokowej procedury funkcjonalizacji powierzchni biosensora poprzedzającej detekcję analitu wymaga kontroli składu molekularnego powierzchni po każdym kolejnym kroku. Dotychczas jednak taka analiza była zaniechywana, a sygnałem otrzymywanym w biosensorach optycznych jest przyrost całkowitej gęstości powierzchniowej nieuwzględniający możliwej desorpcji białka detekcyjnego podczas kolejnych kroków testu immunochemicznego. Takie podejście może prowadzić do nieprecyzyjnego wyznaczenia ilości związanego antygeny i niewiarygodnych wyników otrzymanych za pomocą biosensora. Innym ważnym problemem jest orientacja przeciwciał immobilizowanych na powierzchni mająca kluczowy wpływ na możliwość wiązania antygeny. Pomimo mnogości prac naukowych dotyczących tego zagadnienia dotychczas jedynie nieliczne z nich badają relację pomiędzy efektywnością testów biosensorycznych a orientacją przeciwciał. Dodatkowo w badaniach tych zarówno orientacja przeciwciał jak i ilość związanego antygeny jest wyznaczana zasadniczo pośrednio na podstawie przyrostu całkowitej gęstości powierzchniowej biomolekuł w czasie kolejnych kroków funkcjonalizacji i detekcji. Takie podejście jest nieprecyzyjne biorąc pod uwagę wielomolekularność układu i desorpcję molekuł obserwowaną podczas tych kroków oraz niejednoznaczność orientacji przeciwciał wnioskowanej dla niektórych zakresów gęstości powierzchniowej.

Celem proponowanego projektu jest analiza wielomolekularnych warstw na powierzchni krzemu za pomocą spektrometrii masowej jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu (TOF-SIMS), a także modelowego biosensora optycznego. Technika TOF-SIMS charakteryzuje się unikalną czułością powierzchniową, ograniczoną do zewnętrznych regionów immobilizowanych białek, oraz doskonałą rozdzielczością masową umożliwiającą wyróżnienie sygnałów pochodzących od różnych aminokwasów. Te cechy spektrometrii TOF-SIMS umożliwią bezpośrednią analizę składu molekularnego powierzchni po kolejnych krokach funkcjonalizacji i detekcji oraz bezpośrednie wyznaczenie orientacji przeciwciał w takim wielomolekularnym układzie. Proponowane podejście zostanie zademonstrowane dla podstawowych zagadnień dotyczących testów immunochemicznych na powierzchniach biosensorycznych.

W ramach wnioskowanego projektu zostanie określona orientacja przeciwciał immobilizowanych poprzez adsorpcję fizyczną i wiązanie kowalencyjne na modyfikowanej powierzchni krzemu oraz jej zależność od gęstości powierzchniowej przeciwciał. Kolejnym zdaniem będzie porównanie funkcjonalizacji powierzchni biosensorycznej obejmującej immobilizację antygenów i blokowanie wolnych miejsc powierzchni dla adsorpcji fizycznej i wiązania kowalencyjnego białek. Zbadany zostanie również wpływ gęstości powierzchniowej antygenów na wielomolekularny skład powierzchni. Finalnym etapem proponowanego projektu będzie analiza modelowego testu immunochemicznego. W szczególności porównane zostanie zastosowanie immobilizacji poprzez adsorpcję fizyczną i wiązanie kowalencyjne oraz zbadany zostanie wpływ orientacji przeciwciał na efektywność wiązania antygenów.