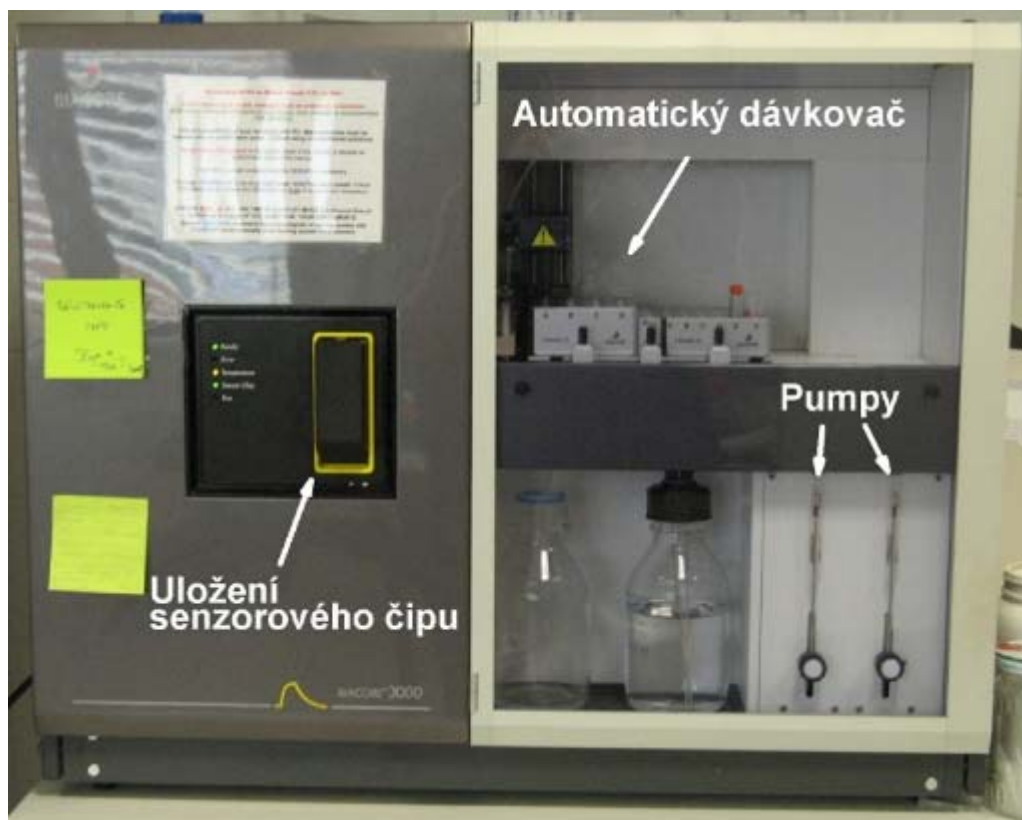


1 Úvod

BIACORE 3000 od Biacore AB je zařízení pro sledování biomolekulárních interakcí v reálném čase. BIACORE 3000 využívá technologie rezonance povrchových plazmonů (Surface Plasmon Resonance - SPR). Metoda povrchových plazmonů umožňuje monitorovat vznik komplexu bez značení interagujících molekul.



Obr. 1: Přístroj BIACORE 3000 a kontrolní PC.

1.1 Real-time BIA

Real-time biomolecular interaction analysis (real time BIA) slouží k monitorování asociace a disociace biomolekulárních komplexů. Při experimentu je jedna část komplexu imobilizována na povrchu senzoru, zatímco druhá interagující molekula je volně v roztoku nad povrchem. Real-time BIA může být použita pro studium interakcí proteinů, proteinových konjugátů, nukleových kyselin, liposomů i celých buněk.

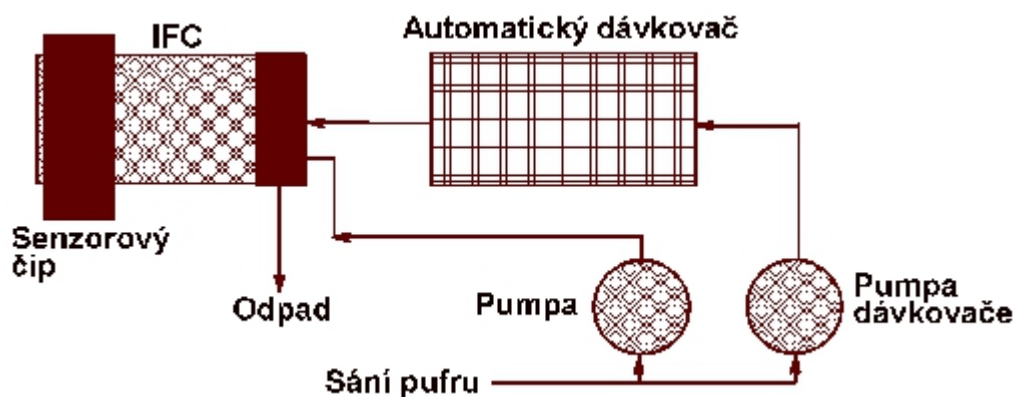
1.2 Real-time BIA vybavení

BIACORE 3000 je pokročilý SPR systém, který má integrovaný automatický dávkovač pro až 2 x 96 vzorků a čtyřkanalovou průtočnou celu. Řídící software umožňuje interaktivní i dávkové zadání ovládacích příkazů.

2 Popis

BIACORE 3000 se skládá z průtočného a optického systému, ovládacího softwaru, průtočné cely, senzorového čipu a sady chemikálií navržených pro výzkum biomolekulárních interakcí.

2.1 Průtočný systém



Obr. 2: Průtočný systém

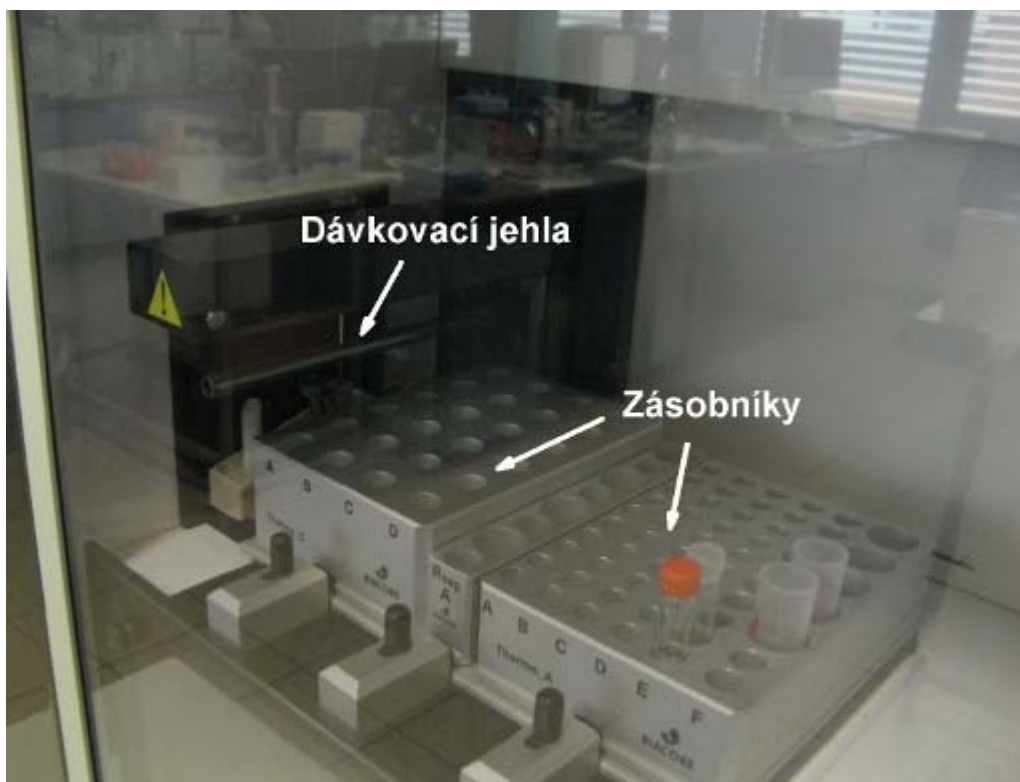
Průtočný systém BIACORE 3000 je tvořený dvěma pumpami, které nasávají pufr ze zásobní nádoby a pohánějí kapalinu systémem. Dávkování a nanášení vzorků zajišťuje automatický dávkovač. Měřící ceta je vytvořena přitisknutím senzorového čipu na povrch mikrofluidní kartridže (IFC).

2.1.1 Pumpy

BIACORE 3000 využívá dvě válcové pumpy o objemu 500 μ l, které mohou vytvářet plynulý proud kapaliny i při nízkém průtoku 1 μ l za minutu. Přitom nedochází k pulzování kapaliny. Jedna pumpa slouží k pohánění kapaliny měřící celou, druhá pak k přípravě a nanášení vzorku. Systém dále obsahuje dva držáky na dvě 500 ml nádoby. Jedna nádoba slouží jako zásoba pufru a druhá slouží ke shromažďování odpadu.

2.1.2 Automatický dávkovač vzorku

Automatický dávkovač se používá k přenosu, ředění, míchání a nástřiku vzorku. Je umístěný přímo nad zásobníkem pufru. Vzorky jsou v dávkovači umístěny ve dvou zásobnících. Jako zásobník může sloužit mikrotitrační destička, případně speciální hliníkový zásobník s vysokou tepelnou vodivostí. Přenášení, míchání a dávkování vzorku zajišťuje dávkovací jehla, která je umístěna na pohyblivém rameni. Pohyb ramene, nasávání a vypouštění je řízeno programově (BIACORE 3000 Control Software) příkazy TRANSFER, MIX a INJECT.



Obr. 3: Automatický dávkovac vzorku se dvema zásobníky a dávkovací jehlou.

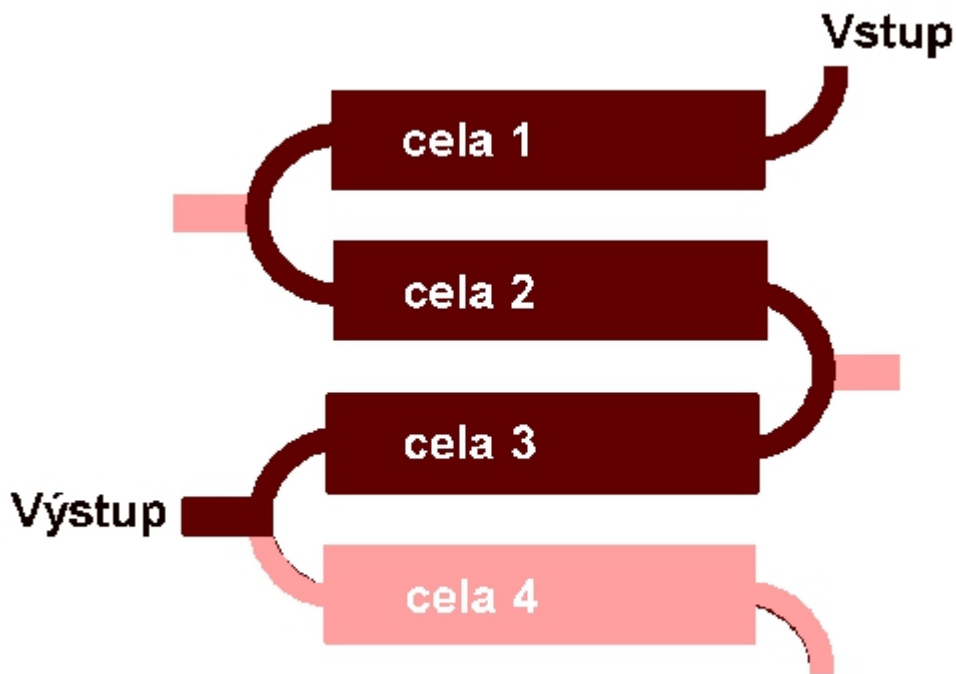
2.1.3 Integrovaná mikrofluidní kartridž (Integrated μ -Fluidic Cartridge IFC)

IFC je tvořená trubičkami a ventily, které jsou chráněny plastovým pouzdem. IFC slouží k dopravě vzorku z dávkovače do prostoru měřicí cely.

Vzorky jsou ze zásobních nádobek přenášeny do této kartridže pomocí dávkovací jehly. Pro nástřik vzorku je možné použít dva módy. První je přímé nanesení roztoku z dávkovací jehly do IFC. Tento mód se používá běžně a slouží k nanášení vzorků do objemu 325 μ l. Pro větší objemy je možné použít nanášení vnitřní smyčkou, které umožňuje nanášet vzorky o objemu až 750 μ l.

Pro kinetická stanovení je důležité nízké rozmytí nanášeného vzorku. Toho je v IFC dosahováno maximálním snížením mrtvých objemů a použitím pneumatických ventilů. Pro zamezení mísení v dávkovači jsou objemy vzorku a pufru odděleny vzduchovými bublinami. Vzduchové bubliny jsou odděleny pomocí ventilu před zavedením do měřicí cely.

Vlastní měřicí ceta je vytvořena přitisknutím sensorového čipu na prohloubeniny povrchu IFC. Tímto způsobem se vytvoří čtyři prutocné cely. Jedna stena cel je tvorena povrchem senzoru.



Obr. 4: Schématické znázornění měřící cely. Měřící cely jsou sestaveny sériově, kapalina protéká z jedné cely do druhé. Znázorněn je průtok třemi celami

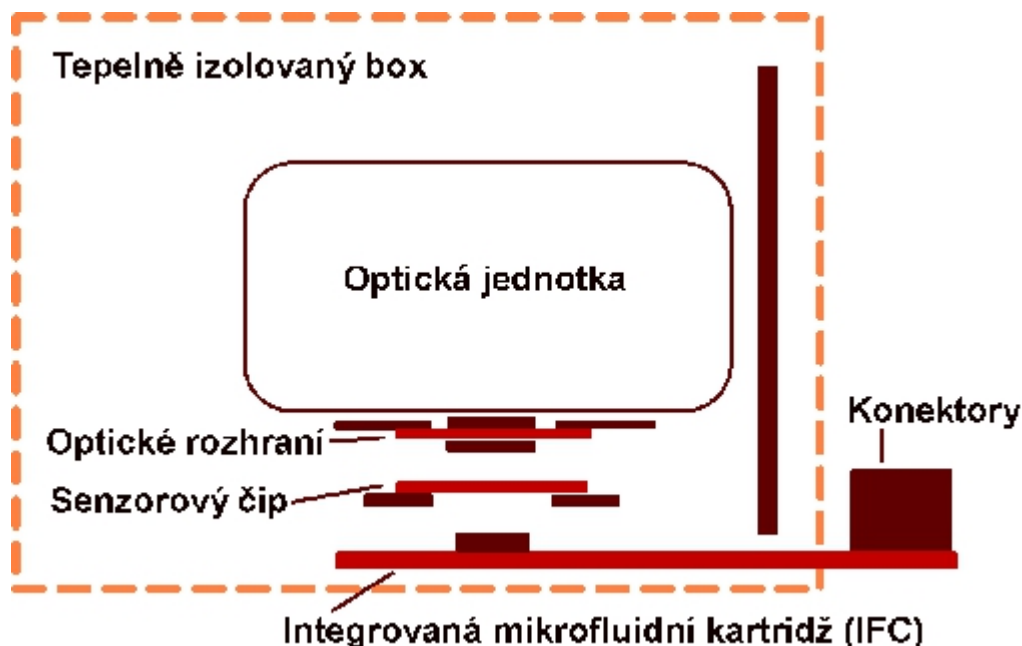
2.1.4 Senzorový čip

Bežně používaný CM5 čip je carboxy-methylovaný čip umožňující vazbu biomolekul. Pro speciální účely je možné použít čip SA5 potažený streptavidinem. Na čip SA5 je možné imobilizovat biotinylované ligandy. Senzorový čip je připevněn na plastovém nosiči. Plastový nosič je po vložení do přístroje automaticky oddělen vnitřním mechanismem a senzor je automaticky usazen na svoje místo. Proces usazení čipu je indikován prostřednictvím zelené LED (nesvítí = čip není vložen, blikající LED = čip se usazuje, LED svítí stabilně = čip je usazen).

Jeden čip může být použit pro 50 až 100 opakovaných měření (podle typu imobilizace) a v přístroji může být vložen po dobu jednoho týdne. Čip také může být opakovaně vyjmut a skladován.

2.1.5 Optický systém

Skleněná strana senzorového čipu je v kontaktu se skleněným hranolem optické jednotky. Kontakt mezi hranolem a čipem zajišťuje silikonové optické rozhraní. Přes hranol dopadá na povrch čipu infračervené záření emitované LED. Odraz tohoto záření od povrchu čipu je monitorován pomocí pole fotodiod. Hustota diod v poli umožňuje dosáhnout rozlišení 0,1°. Úhel minimální reflexe je s použitím interpolačních algoritmů určen s vysokou přesností.



Obr. 5: Detekční jednotka

Detekční jednotka je tvořena optickou jednotkou, která obsahuje světelný zdroj a detektor, optické rozhraní se senzorovým čipem. Povrch senzorového čipu je k průtočnému systému připojen prostřednictvím IFC. Celý systém je uzavřen v tepelně izolovaném bloku.

2.1.6 Regulace teploty

SPR experimenty jsou citlivé na změny teploty, proto je důležité regulovat teplotu měřící cely. Pro regulaci teploty jsou použity Peltierovy články. Jestliže dojde k teplotní nestabilitě větší než $0,003^{\circ}\text{C}$, rozbliká se žlutá kontrolní LED. Teplotu je možné nastavit v rozsahu 4 až 40°C , teplotu však lze snížit oproti okolní teplotě maximálně o 20°C . Teplota měřícího čipu je automaticky zaznamenávána měřícím software na začátku a na konci měření.

2.1.7 LED kontrolky

Na kontrolním panelu je umístěno 5 kontrolních LED.

Připraven (zelená): Svítí stabilně, když je přístroj zapnutý a připravený k měření. Bliká, jestliže je přerušeno spojení s PC.

- Chyba (červená): Indikuje závažnou chybu přístroje. Tato LED kontrolka se rozsvítí po zapnutí přístroje asi na 30 s. Jestliže se rozsvítí při jiné situaci, je nutné zavolat servisního technika Biacore.
- Teplota(žlutá): Svítí stabilně, je-li teplota měřící cely stabilní a rovna nastavené teplotě. Blikání žluté led oznamuje nestabilitu teploty.
- Senzorový čip (zelená): Svítí, jestliže senzorový čip je uložen ve správné pozici. Nesvítí, jestliže čip není v přístroji uložen. Blikání indikuje ukládání čipu do pracovní pozice.
- Bežící experiment (zelená): Indikuje probíhající měření.

2.2 Řídící systém BIACORE 3000

Přístroj je řízený vnitřním mikropočítačem, který odpovídá za nahrávání a předzpracování dat získaných detektorem. Práce tohoto mikropočítače je řízena ze samostatně stojícího PC. Všechny funkce BIACORE 3000 jsou řízeny pomocí BIACORE 3000 Control Software, který běží na IBM kompatibilním PC s operačním systémem Microsoft Windows. Spojení měřícího přístroje a PC zajišťuje standardní sériová linka. Během experimentu jsou data předzpracována mikropočítačem přístroje a následně odeslána na PC, kde jsou zobrazovány jako senzorgram a ukládány na disk počítače.

2.3 BIACORE 3000 Control Software

BIACORE 3000 Control Software poskytuje uživateli přístroje následující prostředky:

- K ovládání přístroje poskytuje grafické uživatelské rozhraní využívající menu a toolbary.
- Nabízí editor pro zadávání experimentálních parametrů měřících metod.
- V reálném čase zobrazuje senzorgram a parametry metody.
- Zobrazuje čas a skutečnou odezvu bodu senzorgramu.
- Zaznamenává všechny události spojené s experimentem.
- Vypisuje data vztahující se k předem definovaným bodům zadaným na senzorgramu.
- Nabízí poznámkový blok pro detailní popis průběhu experimentu.

2.4 BIAevaluation software

BIACORE 3000 Control Software nabízí rozhraní pro vyhodnocení senzorgramu.

- Společné vynesení dat z více experimentu.
- Nástroj pro vyhodnocení kinetiky vazebné interakce.
- Urcení kinetických konstant ze senzorgramu asociacních a disociacních experimentu.
- Vyhodnocení koncentracních měření.

BIAevaluation software je popsán v samostatné knize.

2.5 BIAsimulation software

Jedná se o program pro simulaci odezvy senzoru na plánovaný experiment. Popis tohoto programu je v samostatné knize.

3 Použití

Tato kapitola obsahuje:

- Použití řídicího software.
- Příprava měřícího systému.
- Manuální řízení.
- Řízení pomocí metod.
- Vyhodnocení výsledku.

3.1 Použití programu

3.1.1 Obecný princip

BIACORE 3000 Control Software pracuje v grafickém prostředí tak, jak je běžné u jiných grafických aplikací v prostředí MS Windows.

3.1.2 Spuštění programu

Program se spouští z nabídky Start jako jiné programy. Při spuštění nezáleží na pořadí spuštění měřicího přístroje nebo programu. Jestliže byl dříve spuštěn program, potom zapnutí přístroje bude automaticky detekováno. Po spuštění programu může být uživatel vyzván k některé akci jako je například vložení senzorového čipu.

3.1.3 Popis okna programu

Okno ovládacího programu je rozděleno na šest oddílů.

- Menubar
- Toolbar
- Sensorgram window zobrazující měrené hodnoty v grafické podobě
- Report point table (tabulka reportních bodů) zobrazuje naměřené hodnoty v předem definovaných reportních bodech
- Event log window (tabulka událostí) zaznamenává parametry jednotlivých událostí (např. nástřik vzorku)
- Status window zobrazující aktuální hodnoty měřených velicin (odpověď senzoru, aktuální průtok a teplotu)

3.2 Příprava měřicího systému

Je vhodné zkontrolovat, zda pod přístrojem může volně proudit vzduch, tak aby bylo umožněno chlazení přístroje. Pod přístroj nekládejte listy papíru, které by se mohl přimknout k sání chladice.

3.2.1 Příprava roztoku v automatickém dávkovači

Biacore AB dodává sterilní a odplyněný HBS pufr, který je připraven k přímému použití. Jedná se o HEPES/NaCl pufr vhodný pro většinu experimentu. Je nevhodný pro měření vyžadující přítomnost Ca^{2+} iontu, protože obsahuje EDTA (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005% surfaktant P20).

Ostatní roztoky používané pro měření by měli být odplyněny a prefiltrovány přes 0,22 μm filtr. Roztoky by měly obsahovat 0,005% surfaktantu P20, který minimalizuje nespecifickou adsorpci proteinu na trubicky dávkovace a IFC. Jestliže měření vyžaduje roztoky bez surfaktantu, potom je nutné po skončení experimentu provést speciální čistící proceduru.

3.2.2 Usazení senzorového čipu

Před vložení čipu je nutné odklopit senzorový kryt. Do přístroje se čip vkládá v ochranném pouzdře. Správná orientace nosice čipu je popisem vzhůru a šipkou směřující do přístroje. Čip nevyjímejte z ochranného obalu a při vkládání do přístroje nepoužívejte násilí. Po vložení čipu se priklopí senzorový kryt. Potom je v ovládacím programu zvolen

příkaz Dock a cip je automaticky usazen na svoji pozici.



Obr. 6: Panel s kontrolními LED a senzorovým krytem

3.2.3 Zavedení kapaliny do systému

Po usazení cipu v přístroji je nutné do systému zavést používané roztoky. K tomu slouží položka Prime v dialogovém okně working tools, které se automaticky otevře po zavedení cipu. Do držáku na pufr se umístí zásobní (vpravo) a odpadní nádoba (vlevo). Do nádob se vloží sací a odpadní trubicka přístroje. V okně working tools zvolte položku Prime a kliknete na tlačítko Start.

3.2.4 Nastavení automatického dávkovace a typu zásobníku vzorku

Do dávkovace lze uložit dva zásobníky vzorku. Tyto zásobníky jsou buď mikrotitrací destičky nebo jeden ze tří typů tepelně vodivých hliníkových zásobníků. Při umísťování zásobníku vzorku do přístroje odklopte pojistku a zásobník uložte popisem směrem k sobě. Definice typu zásobníku se provede příkazem Define Rack Base.

3.2.5 Normalizace měřeného signálu

Hodnota měřeného signálu ze čtyř různých kanálů se může odlišovat. Proto je nutné tyto

hodnoty normalizovat. Serízení se provede normalizační procedurou, při které se využívá standardní roztok glycerolu. Normalizační procedura se provádí, jestliže byla změněna detekční teplota nebo došlo k výměně měřicího cípu.

BIAnormalizing solution (40% w/w glycerol in water) je součástí BIAmaintenance Kit. 0,5 ml tohoto roztoku se odměří do 9 mm vialky, která se uloží do druhého zásobníku na pozici r2f2 (r2 = druhý zásobník, f2 = pozice f2, je nutné používat typ zásobníku A nebo B).

Po uzavření dvírek dávkovace vzorku se navolí položka Normalize v okně Working Tool a klikne se na tlačítko Start. Poté se uživatel řídí pokyny zobrazenými na monitoru.

3.3 Rucní řízení

Tato sekce popisuje rucní ovládání BIACORE 3000 řídicím programem. Přístroj je možné ovládat jen tehdy, jsou-li zavřena dvířka automatického dávkovace. Proto se před začátkem práce přesvědčte, zda jsou všechny roztoky umístěny v dávkovací.

3.3.1 Nastavení teploty

Vyberte příkaz Set Temperature a v dialogovém okně zvolte požadovanou teplotu. Ustalování teploty je indikováno na přístroji blikáním žluté LED. Po ustálení teploty LED svítí stabilně. Změna teploty o 5°C trvá asi 60 min.

Nastavená teplota odpovídá teplotě uvnitř měřicí cely. Roztoky zavážené do cely jsou temperovány průchodem IFC. Zásobní roztoky v automatickém dávkovací je proto možné uchovávat při jiné teplotě, případně je chladit kapalinou dodávanou externí pumpou.

3.3.2 Prenášení, míchání a redení vzorku

Vzorky je možné přenášet mezi vialkami, míchat je a redit pomocí automatické dávkovací jehly. Pokud je současně zaznamenáván senzogram, pak jsou všechny operace se vzorky zaznamenány.

Dialogové okno pro nastavení manipulace se vzorky zobrazuje možné platné pozice pro aktuálně vložený zásobník a pozice BUFFER (používaný pufr), REC (obnovení) a WASTE (odpad).

Je možné navolit nastavení Predip Needle, které umožňuje vybrat pozici roztoku, do kterého bude jehla ponorena před vlastním přenosem vzorku. Tímto způsobem se zabrání přenosu roztoku mezi vialkami. Tato volba také zajistí nadávkování 10 ul roztoku do IFC mezi zónu vzorku a pufru, čímž zabrání jejich míšení.

Prenos vzorku: příkaz Transfer, nastaví se zdrojová a cílová pozice a přenášený objem, případně nastavíme možnost Predip Needle.

Míchání vzorku: příkaz Mix, nastaví se pozice roztoku, který se má míchat a míchací objem. Tento objem by měl být 75% objemu vzorku. Během míchání se manipulační jehlou trikrát nasaje a vypustí zadaný objem vzorku.

Redení vzorku: příkaz Dilute. Zadávají se pozice reděného a redicího roztoku a pozice pro míchání nového roztoku. Konečný objem je vždy 200 ul. Dále je zadáváno % redení. Tato hodnota musí být mezi 5% až 95%, pro dosažení vysoké přesnosti je nutné použít redení 10% až 90%. Po odměření a přenesení automaticky vypočtených objemu následuje míchání připraveného roztoku.

3.3.3 Rychlost ukládání dat (data collection rate)

Rychlost ukládání dat určuje počet bodu senzogramu uložených za jednotku času. Nastavení se provádí v Run>Data Collection Rate a jsou možné tři hodnoty. Low 0,1 bodu/s, Medium 1,0 bodu/s, High 10,0 bodu/s (2.0 bodu/s při vícekanálových měřeních).

Prednastavená hodnota odpovídá Medium. Jestliže senzogram obsahuje více než 12 000 bodu, potom dojde k automatické redukci bodu.

3.3.4 Rucní spuštění senzogramu

Jestliže je cip v přístroji správně uložený, potom je možné příkazem Run:Run Senzorgram spustit záznam senzogramu. Po zadání příkazu ke spuštění záznamu se objeví dialogové okno dotazující se na detekční mód, použitou celu a rychlost toku. Jestliže je aktivní volba Autosave, potom je nutné zadat jméno cílového souboru.

Záznam se spustí několik vterin po opuštění posledního dialogového okna. Behem této doby dojde k aktivaci pump a k propláchnutí dávkovací jehly.

Záznam trvá do zadání příkazu Run:Stop Sensorgram. Behem doby záznamu jsou ukládány i informace o událostech, napr. nástrik vzorku. Behem měření je možné senzogram libovolně ukládat pomocí File:Save a File:Save As.

3.3.5 Nastavení průtoku

Nastavení průtoku se provádí příkazem 'Command:Flow'. Nová hodnota je nastavena po kliknutí na tlačítko OK.

Pro zastavení toku slouží příkaz 'Command:Stop Flow' nebo nastavení průtoku na nulu. Nástřik vzorku může být proveden jen tehdy, když průtok má nenulovou hodnotu.

Pumpy pracují s objemem 500 µl a po jeho vyčerpání musí být znovu naplněny, což trvá asi 7 s. Abychom se vyhnuli rušení během měření, je možné pumpy přímo plnit pomocí volby 'Refil' příkazu 'Command:Flow'. Pumpa bude znovu naplněna po kliknutí na tlačítko 'OK', přitom není nutné měnit průtok.

Jestliže dochází k plnění pumpy během měření, potom je tato událost uložena a může být použita pro identifikaci případné poruchy měřeného signálu.

3.3.6 Nastavení detekčního módu a výber mericí cely

Nastavení se provede v dialogovém okne Flowcell. Detekční mód nemůže být během záznamu senzogramu zmenen. Jsou dva druhy detekčních módu. Single Channel mód zaznamenáváající senzogram jedné mericí cely, kterou během záznamu není možné menit. Druhý mód Multichannel umožňuje nastavit prutok dvema, tremi nebo ctýrmi mericími celami, přitom je možné prutok celami menit kdykoli během záznamu senzogramu (ne však během nástřiku vzorku). Senzorgram zaznamenává data ze všech ctýr prutocných cel a zobrazuje je v barevne je odlišené.

Ke zmene prutocné cely během záznamu senzogramu je možné použít příkaz Command:Flowcell.

Mezi signály zaznamenanými z různých cel dochází ke zpoždění. Tento fakt je způsoben sériovým razením cel. Dochází tedy ke zpoždění signálu, které je dané mrtvým objemem

(0,3 ul) mezi dvema celami a rychlostí prutoku. Zpoždění při prutoku 20 ul/min činí asi 1 s.

3.3.7 Nástriik vzorku

Command:Inject slouží k nástriku vzorku, je možné ho vyvolat po zapnutí záznamu senzogramu. Podle velikosti nastrikovaného objemu a podle přesnosti lze navolit několik typu nástriku (INJECT,KINJECT,QUICKINJECT,COINJECT,BIGINJECT,MANUALINJECT). Pro většinu použití vyhovuje položka INJECT. Pro nástriik je nutné zadat pozici vzorku v zásobníku a číslo zásobníku a objem nastrikovaného vzorku. Další možnosti nástriku jsou zobrazeny kliknutím na tlačítko More>>. Zde můžete navolit pozici vzorku pro Predip Needle. Tato položka také slouží k zavedení 10 ul objemu, který oddeluje roztok vzorku a pufru. Položku Extra Cleanup je možné zvolit pro další promytí jehly a IFC po nástriku vzorku. Tato možnost se volí, jestliže nanášené roztoky mají výrazně odlišné složení, jinak je promývací proces součástí běžné nanášecí procedury. Nástriik se zahájí tlačítkem Start Injection. Nástriik může trvat několik minut. Záleží na zvolených podmínkách nástriku. Systém automaticky zaznamenává čas zadání nástriku i čas skutečného nástriknutí vzorku.

3.3.8 Zastavení nástriku

Command:Stop Inject nebo toolbar Stop Inject zastaví aktuální nástriik. Zastavené nástriknutí nelze obnovit. V otevřeném dialogovém okně lze nastavit, kam má být dopraven zbývající nastrikovaný roztok. Je možné zadat do odpadní nádoby nebo do některé vialky v zásobníku vzorku. Po odstranění zbylého roztoku proběhne promytí stejným způsobem, jako by byl nástriik dokončen.

3.3.9 Rucní nástriik

> Položka MANUAL INJECT umožňuje kompletní kontrolu nástriku.

3.3.10 Uschování analyzovaného vzorku

Tato volba slouží k uschování vzorku, napr. pro další analýzu. Před zahájením nástriku vzorku, který má být znovu uložen je nutné navolit Wash with Recovery, jinak by došlo ke zředění shromažďovaného vzorku puftrem. Vycházející vzorek je pak uložen do nastavené pozice v zásobníku vzorku. Nastavení uschování vzorku se provádí v dialogovém okně Injection kliknutím na tlačítko More>>. V zobrazeném okně zatrhneme možnost Recovery, nastavíme objem a cílovou pozici vzorku v zásobníku vzorku. Dovolенý rozsah je 5 až 350 ul, s vysokou přesností 25 až 350 ul.

3.3.11 Shromažďování frakcí

Frakce roztoku vycházejícího z IFC mohou být shromažďovány okamžitě po nástriku vzorku. Před zahájením nástriku vzorku, který má být následován sberem frakcí je nutné navolit Wash with Recovery, aby nedocházelo ke zředění shromažďovaného vzorku puftrem. Sber frakcí je možné nastavit v okně Injection kliknutím na tlačítko More>>. V okně se zadává objem jedné frakce, počet frakcí a pozice první frakce v zásobníku vzorku. Další frakce jsou ukládány po rádcích do dalších pozic v zásobníku. Když další pozice není k dispozici, potom jsou další frakce svedeny do odpadu. Casové informace o sberu frakcí jsou ukládány včetně korekce, která uvažuje nenulový objem trubicek odvádějících roztok z mericí cely.

3.3.12 Promytí kapalinového systému

Systém dopravující kapaliny v přístroji je běžně automaticky čištěn podle potřeby v následujících situacích:

- Po skončení nakládání se vzorky (Inject, Transfer, Mix, Dilute)
- Trubicky IFC jsou promyty po každém nástriku
- Výstup pro sber frakcí se promyje po každém sberu frakcí (Recovery)

Príkaz Wash slouží k dodatečnému promytí jehly a výstupu pro sber frakcí (Recovery), jak lze nastavit v dialogovém okně Wash. K promytí se používá pufr nebo promývací roztok uložený na zadané pozici v zásobníku frakcí. Rucní promytí trubicek IFC se provádí příkazem Working Tools:Flush.

3.3.13 Uložení senzogramu

K uložení senzogramu jako soubor BIACORE 3000 slouží příkazy File:Save nebo File:Save As. Defaultní přípona souboru je BLR. V případě, že je zvolena funkce Autosave v Tools:Preferences, potom je soubor ukládán průběžně v pravidelných intervalech. K zadání názvu vytvářeného souboru je uživatel vyzván po spuštění záznamu senzogramu. Příkaz File:Export slouží k uložení dat senzogramu a ostatních informací souvisejících s měřením do formátu citelného jinými programy. Vytvořený soubor ukládá data ve formátu s tabulátorovými oddelovací, který lze otevřít tabulkovým procesorem. Defaultní přípona tohoto typu souboru je TXT. Ukládání a exportování souboru lze provést kdykoli v průběhu záznamu senzogramu bez přerušení experimentu.

3.3.14 Zastavení senzogramu

Záznam senzogramu je možné zastavit příkazem Sensorgram:Stop Sensorgram nebo kliknutím na toolbar tlačítko Stop Sensorgram. Trubicky IFC jsou automaticky propláchnuty, jestliže došlo k nástriku vzorku nebo zastavení toku. Po zastavení senzogramu již nelze znovu obnovit jeho nahrávání a další záznam je uložen jako nový senzogram. Dva senzogramy mohou být spojeny s použitím BIAevaluation software.

3.3.15 Pohotovostní zastavení

Pro zastavení měřicí procedury v libovolném case je možné použít klávesovou kombinaci Ctrl-Break nebo Ctrl-Pause. Dojde k okamžitému zastavení probíhajících procesu, včetně průtoku kapaliny měřicí celou a záznamu senzogramu. Po zastavení tímto způsobem je vhodné provést promytí systému. Je-li to možné, je vhodné se zastavení Ctrl-Break vyhnout a raději používat příkazy Stop Injection a Stop Sensorgram.

3.3.16 Vyjmutí senzorového cipu

Senzor může být v přístroji uložen několik dní, je však nutné, aby po jeho povrchu proudila kapalina. Pro vyjmutí cipu se používá příkaz Command:Undock. Nepokoušejte se cip vyjmout jiným způsobem. V běžných případech zaškrtnete položku Empty flow cells, která před vyjmutím cipu vyprázdní měřicí cely. Položku ponechte neproškrtnutou jen v případě, že je nutné povrch senzorového cipu ponechat vlhký z důvodu specifických vlastností ligandu. Znečištění optického systému kapalinou však nehrozí ani v tomto případě. Jestliže zelená LED

kontrolního cipu začne preblikávat, je možné odklopit senzorový kryt na přístroji a vyjmout cip uložený v plastovém pouzdře.

3.4 Ovládání přístroje pomocí metod

Přístroj BIACORE 3000 může být ovládán pomocí uživatelem naprogramovaných metod. Metoda může obsahovat až 150 mericích cyklu. Každý cyklus zahrnuje záznam senzogramu a jeho uložení. Postup řízení BIACORE 3000 je popsán v této kapitole. Behem vykonávání metody jsou dvířka automatického dávkovace uzavřena. Jestliže je behem vykonávání metody potřeba dvířka otevírat, potom jsou příslušné instrukce metody uzavřeny v bloku DEFINE ALERT.

3.4.1 Vytvoření metody

Pro vytvoření nové metody se používá příkaz File:New Method. Níže je uveden příklad základní metody. Editor metod nemůže být otevřen, když probíhá záznam senzogramu. define aprog practice flow 30 dilute r1a1 r1a2 r1a3 50 inject r1a3 25 end main flowcell 1 aprog practice end Tato metoda připraví na pozici r1a3 200 ul směsi vzorku z r1a1 a r1a2 v poměru 1:1 a 25 ul této směsi nastríká do IFC (r1a3 = zásobník 1 pozice a3). Vzorek proudí přes mericí celu 1 (flow cell 1). Rychlost toku kapaliny je 30 ul/min. Pro automatickou úpravu metody slouží Edit:Adjust Method:Minutes. Tato volba upraví podobu zápisu metody. Klíčová slova jsou zapsána velkými písmeny, jména parametru jsou malými písmeny a bloky jsou naznačeny odsazením řádku.

```
DEFINE APROG practice
FLOW 30
DILUTE r1a1 r1a2 r1a3 50
INJECT r1a3 25
END
MAIN
FLOWCELL 1
APROG practice
END
```

Volba Minutes dodá do metody časové hodnoty uvážené v minutách. Tato volba v uvedeném případě nemá smysl, protože metoda neobsahuje žádné časové informace.

3.4.2 Kontrola a uložení metody

Správné zapsání metody je nutné. Syntaktická korektnost zápisu metody je kontrolována před behem metody. Chybně zapsaná metoda může být uložena, ale nebude vykonána. Před behem metody je kontrolována jen syntaxe zápisu, nikoli jeho význam. Je tedy nutné kontrolovat, zda v uvedených pozicích zásobníku vzorku jsou vzorky skutečně umístěny a podobně. Kontrolu syntaxe lze vyvolat příkazem Run:Prerun Method. Pro uložení metody slouží příkaz File:Save As. Defaultní přípona souboru je BLM.

3.4.3 Vykonání metody

Metoda se spustí příkazem Run:Run Method. Jestliže je aktivní okno editoru metod, potom je vykonána metoda zapsaná v tomto okně. Jestliže editovaná metoda není uložena, potom je uživatel po zadání příkazu Run:Run Method vyzván k jejímu uložení. Před spuštěním metody je vhodné se přesvědčit, zda vzorky v zásobníku odpovídají pozicím zadaným v metodě a typ zásobníku odpovídá zadanému typu (sekce 3.2.4). Po startu metody je okno editoru metod skryto. Znovu je obnoveno po dobehnutí metody. Jestliže není okno editoru aktivní při zadání příkazu Run:Run Method, potom je zobrazeno dialogové okno pro výběr předem uložené metody. Po zadání metody a jejím spuštění je provedena syntaktická kontrola. Případné nalezené chyby jsou zobrazeny v okně editoru metod. Po jejich opravě je nutné znovu zadat Run:Run Method pro spuštění metody. Je-li aktivní funkce Autosave (Tools:Preferences), pak je uživatel před každým spuštěním metody dotazován na název souboru, do kterého jsou po dobehnutí metody uložena namerená data. Jestliže v metodě v bloku MAIN není specifikovaný detekční mód a mericí cely, potom je k jejich zadání uživatel vyzván před začátkem vykonávání metody. Na konci každého APROG dojde k vymytí jehly a prtok je nastaven na 10 ul/min. Mericí cely je nastavena stejně jako při spuštění cyklu APROG. Na konci každé metody jsou vymyty trubicky IFC a potom je prtok nastaven na hodnotu 0. Konec metody je oznámen zprávou Method Ready. Příkazem File:Save As se uloží zaznamenaná data.

3.4.4 Zastavení metody

Vykonávání metody může zastavit příkaz Run:Stop Method. K zastavení dojde po vykonání právě vykonávaného příkazu, obvykle se jedná o dokončení aktuálně prováděného APROG. Po zastavení metody je prtocný systém automaticky promyt. Okamžité zastavení lze vyvolat příkazem Ctrl-Break (Ctrl-Pause).

3.5 Odstavení mericího systému

3.5.1 Odstavení přístroje

Pres noc: Přístroj může být zapnutý pres noc s cipem uloženým vevnitř a IFC naplněným pufrem. Je doporučeno nastavit prtok na 5 ul/min. To zajišťuje procedura Continue. Ujistete se, že v zásobníku je dostatek pufru. Jestliže se po delší době stání může pufr zacít srážet, potom je nutné ho nahradit vodou. K tomu použijte nástroj Rinse, který v IFC vymění používaný pufr za vodu a potom navolte Continue. Continue může být připojeno na konec metody, takže ke spuštění této metody dojde automaticky na konci metody. Až na pet dní: Pro vypnutí přístroje až na pet dní slouží příkaz Working Tools:Close. Dojde k promytí přístroje roztokem umístěným v definované pozici v zásobníku vzorku. Doporučená je voda. Více než pet dní: Používá se příkaz Working:Shutdown. Pro proceduru je potřeba voda a 70% etanol. Behem procesu sledujte pokyny na monitoru.

3.5.2 Vypnutí BIACORE 3000 Control Software

Pro vypnutí programu zvolte File:Exit nebo zavrete okno programu. Jestliže nebyl uložen aktuální senzogram, potom je uživatel k jeho uložení vyzván. Program nelze ukončit, jestliže probíhá záznam senzogramu. Jestliže vypínáte program, když je v přístroji vložen senzorový cip, potom se objeví okno dotazující se na Shutdown přístroje. Volte yes pro Shutdown, no pro ukončení přístroje bez Shutdown přístroje nebo cancel pro návrat do programu.

3.6 Práce se senzorgramem

Okno senzorgramu zobrazuje aktuálně zaznamenávaný senzorgram nebo senzorgram z uloženého souboru. Pro nactení senzorgramu ze souboru volte File:Open a vyberte si soubor.

3.6.1 Výber senzorgramu

Cycle (cyklus) je definovaný jako výsledek jednoho behu ručně řízeného nebo zadaného v APROG metody. Manuální spuštění vytváří jen jeden cyklus, spuštěním pomocí metody lze generovat více cyklu. Každý cyklus může obsahovat jeden až čtyři senzorgramy. Dále může obsahovat další krivky, například krivku teploty, jejíž záznam lze zadat v metodě. Výber cyklu a krivky provedeme nástroji Cycle a Curve v toolbar. Jestliže v okně senzorgramu je zobrazeno více křivek, potom je možné přepnout mezi zobrazením všech křivek a zobrazením jen aktivních pomocí příkazu View:Overlay.

3.6.2 Zoomování

Pro zvětšení části senzorgramu používejte myš. Držte levé tlačítko myši stisknuté a tahem myši vyznačte zvětšovanou oblast. Pro návrat do původní velikosti volte příkaz View:Unzoom nebo na okno dvakrát poklepejte levým tlačítkem myši. Příkaz View:Zoom zobrazuje dialogový box pro fixní nastavení měřítka osy x a y. Volba Auto nastaví měřítko tak, aby byla využita celá plocha senzorgramu. Volba Method nastavuje měřítko podle zadání v prováděné metodě (klíčové slovo SCALE). Volba Manual umožní nastavit měřítko os ručně. Dále je možné aktivovat logaritmické měřítko os. Příkaz View:Adjust Scale nastaví měřítko os tak, aby senzorgram pokryl celou plochu okna bez ohledu na aktuální nastavení.

3.6.3 Čtení souřadnic

Pro čtení souřadnic slouží příkazy View:Reference Line a View:Baseline. Příkaz View:Reference Line zobrazí vertikální čáru. Ve zvláštním okně se zobrazují hodnoty průsecíku této čáry s křivkou senzorgramu. Jestliže po výberu polohy vertikální čáry zvolíme View:Baseline, potom se zobrazí základová čára. Její výška je daná průsecíkem vertikální čáry a křivky senzorgramu. Hodnoty souřadnice průsecíku vertikální čáry a křivky senzorgramu se vztahují k této základní čáře. Zobrazované souřadnice jsou hodnoty v daném bodu senzorgramu. Pro zobrazení průměrné hodnoty z více bodů používejte report points (reportní body).

3.6.4 Nastavení report points (reportních bodů)

Reportní body nahrávají hodnoty času, odpovědi senzoru a další parametry v určeném místě senzorgramu. Při vícekanálovém měření může být reportní bod nastaven pro každý kanál zvlášť nebo pro všechny dohromady. Reportní body jsou zobrazovány ve zvláštním okně. Reportní body se přidávají příkazem Edit:Add Report Point nebo pomocí tlačítka Report point na toolbar. Nastavení reportního bodu se potom provede v otevřeném dialogovém okně. V okně se nastavuje čas reportního bodu (Time), časový interval, přes který se průměruje (Window), až třicet jedná písmenný identifikátor (Id). Volba Baseline zajistí, aby se senzorová odpověď měřená v dalších reportních bodech vztahovala k tomuto bodu. Volba Apply to all curves in window nastaví reportní bod pro všechny senzorgramy zaznamenávané při vícekanálovém měření. Pro změnu nastavení reportních bodů dvakrát poklepejte na rádek tabulky zobrazující reportní body. Zobrazí se příslušné dialogové okno.

3.6.5 Reportní body (report points) a značky událostí (event log markers)

Reportní body jsou značeny jako x na křivce senzorgramu. Události zaznamenávané v okně událostí (event log), např. nástrik vzorku, jsou vyneseny na ose x jako trojúhelníček. Zobrazení těchto bodů se zapíná a vypíná příkazem View:Markers. Pro identifikaci zobrazených značek zobrazte vertikální referenční čáru (View:Reference Line) a kliknete na příslušný řádek v tabulce referenčních bodů nebo tabulce událostí (report point table or event log). Vertikální čára se nastaví na příslušnou značku.

3.6.6 Okno událostí (event log)

Okno událostí zaznamenává všechny události, které proběhly během experimentu.

3.6.7 Tisk senzorgramu

Pro tisk senzorgramu a připojených dat zadejte File:Print a v dialogovém okně zvolte položky pro tisk. Volba Fit To Page zajistí tisk každé položky na samostatnou stranu papíru. Křivky senzorgramu jsou vytisknuty tak jak jsou zobrazeny včetně měřítek a výberu aktivních křivek. Zobrazení křivek může být přeneseno do jiných programů pomocí Edit:Copy Graph, který zobrazení uloží do schránky Windows. Uložené zobrazení je pak možné vložit do jiných aplikací.

3.6.8 Vyhodnocení naměřených dat

Volbou Tools:Evaluation získáme přístup do nástroje BIAevaluation and BIAconcentration, které slouží k vyhodnocení měření. Tyto nástroje jsou popsány ve zvláštní knize BIAevaluation Software Handbook. Pro vyhodnocení dat lze použít i radu jiných programů prostřednictvím exportu dat do textového souboru (File:Export).

4 Metody BIACORE 3000

BIACORE 3000 může být řízen z PC pomocí metod zapsaných v jazyce MDL (Method Definition Language). Metody jsou zapisovány jako textové soubory. Pro jejich zaznamenání lze použít libovolný textový editor, např. Windows Notepad. Speciální editor pro psaní metod je součástí BIACORE 3000 Control Software. Pro správné provedení metody je nutné použít korektní syntaxi, proto je před každým spuštěním metody automaticky provedena syntaktická kontrola. Postup psaní metod je popsán v této kapitole.

4.1 Základy programování metod

4.1.1 Syntaxe jazyka MDL

Příkazy v jazyce MDL se skládají z klíčových slov a parametru. Klíčová slova, např. FLOW, lze zapisovat malými i velkými písmeny. Parametry přiřazují hodnotu ke klíčovému slovu. Například zápis FLOW 30 znamená nastavení prouku 30 ul/min. K některým parametrum lze přiřadit další volbu, např. FLOW 30 -f. Každý příkaz, tj. klíčové slovo a parametr je nutné zapsat na nový řádek. Klíčové slovo lze oddělit libovolným počtem bílých znaků, např. mezer.

4.1.2 Konstanty a promenné

Parametry je možné uvádět přímo jako konstanty, napr. jako číselné hodnoty (FLOW 30). Pro vyšší flexibilitu zápisu je možné používat kromě konstant také promenné, jejichž hodnota se může během vykonávání metody měnit.

4.1.3 Komentáře

K popisu zapsaného kódu slouží takzvané komentáře. Komentár je text, který začíná znakem !. Text vpravo od vykřičníku se při vykonávání metody ignoruje. !Toto je komentár.

4.2 Bloky metod

Metody zapsané v jazyce MDL se skládají z tzv. bloku. V MDL existuje pět typu bloku (DEFINE ALERT, DEFINE APROG, DEFINE LOOP, DEFINE MESSAGE, MAIN). Každý blok je zakončen klíčovým slovem END. Všechny příkazy musí být zapsány v nějakém bloku. Blok MAIN je obsažen v každé metodě právě jednou. Ostatních bloků může být zapsán libovolný počet. Různé bloky stejného typu jsou identifikovány podle jejich jména. Na pořadí definice bloku nezáleží.

4.3 Sestavení metody

V této části je popsáno sestavení jednoduchých metod v jazyce MDL.

4.3.1 Blok MAIN

Blok MAIN obsahuje sekvenci příkazů, které budou vykonány při provádění metody. Konec bloku MAIN identifikuje slovo END. V bloku MAIN jsou nejčastěji volány APROG (viz níže). Dále lze napr. nastavit měřicí celou příkazem FLOWCELL pro následující APROG.

MAIN

FLOWCELL 2

APROG immob

END

4.3.2 Blok DEFINE APROG

Blok DEFINE APROG obsahuje definici jednoho cyklu. Metoda může obsahovat mnoho těchto bloků. Bloky se odlišují pojmenováním.

Jednoduchý příklad bloku definujícího nastavení průtoku na 20 ul/min a nastríknutí 20 ul roztoku z pozice r2a1 (Každý blok DEFINE APROG musí začínat nastavením průtoku).

DEFINE APROG injection

FLOW 20

INJECT r2a1

END

APROG není celá metoda. Pro vykonání musí být v bloku MAIN uveden příkaz APROG následovaný jménem bloku DEFINE APROG.

```
MAIN  
FLOWCELL 1  
APROG injection  
END
```

Celá metoda tedy vypadá následovně:

```
DEFINE APROG injection  
FLOW 20  
INJECT r2a1  
END
```

```
MAIN  
FLOWCELL 1  
APROG injection  
END
```

Každý APROG zahajuje automatickou iniciální sekvenci, která zahrnuje naplnění pumpy pufru a zahájí nahrávání senzogramu. Metoda je automaticky zakončena promytím dávkovací jehly, trubicek IFC a provede se znovunastavení IFC ventilu.

Blok MAIN může spouštět více bloku APROG a zaznamenat více senzogramu. Každý blok APROG reprezentuje provedený cyklus a podle zvoleného detekčního módu obsahuje jeden až čtyři senzogramy.

V definici bloku DEFINE APROG je možné definovat promenné. Definice se provádí příkazem PARAM, který následuje ihned za klíčovým slovem DEFINE APROG. Při vykonávání metody jsou promenné nahrazeny aktuálními hodnotami, které jsou zadány v bloku MAIN, poradí uvádění hodnot promenných v bloku MAIN u jednotlivých příkazů APROG odpovídá poradí uvedenému v bloku DEFINE APROG. Jména promenných jsou uváděna znakem %.

Například níže uvedená metoda nastríká 20 ul vzorku z pozice r1a1 a potom 35 ul z pozice r2a5.

```
DEFINE APROG injection  
PARAM %position %volume  
FLOW 20
```

```
INJECT %position %volume
```

```
END
```

```
MAIN
```

```
FLOWCELL 1
```

```
APROG injection r1a1 20
```

```
APROG injection r2a5 35
```

```
END
```

V bloku DEFINE APROG je možné uvádět čas vykonávání příkazu. Je také možné nastavit čas, ve kterém mají být zaznamenávány reportní body (RPOINT). Casové údaje se vztahují k počátku bloku DEFINE APROG nebo k nějakému příkazu uvnitř bloku, který je označený znakem *.

```
DEFINE APROG report
```

```
FLOW 20
```

```
* INJECT r1a1 10 ! místo, ke kterému se vztahují casové údaje
```

```
30 RPOINT zaznam ! vytvoří reportní bod 30 s po zahájení nástriku
```

```
END
```

4.3.3 Blok DEFINE LOOP

Blok DEFINE LOOP složí k definici opakovaného provádění bloku APROG. Blok obsahuje Klíčové slovo LPARAM, které je následováno názvy promenných. Další klíčové slovo je TIMES, které má jako parametr počet provedení. Pod rádkem TIMES následuje seznam hodnot promenných definovaných za slovem LPARAM. Příslušný blok APROG se provede tolikrát, kolik sad hodnot promenných je v bloku definováno krát počet opakování určených klíčovým slovem TIMES. Následující metoda provede celkem čtyři nástriky vzorku.

```
DEFINE LOOP cycle
```

```
LPARAM %position %volume
```

```
TIMES 2
```

```
> r1a1 20
```

```
r2a5 35
```

```
END
```

```
DEFINE APROG injection
```

```
PARAM %position %volume
```

```
FLOW 20
```

INJECT %position %volume

END

MAIN

FLOWCELL 1

LOOP cycle STEP

APROG injection %position %volume

ENDLOOP

END