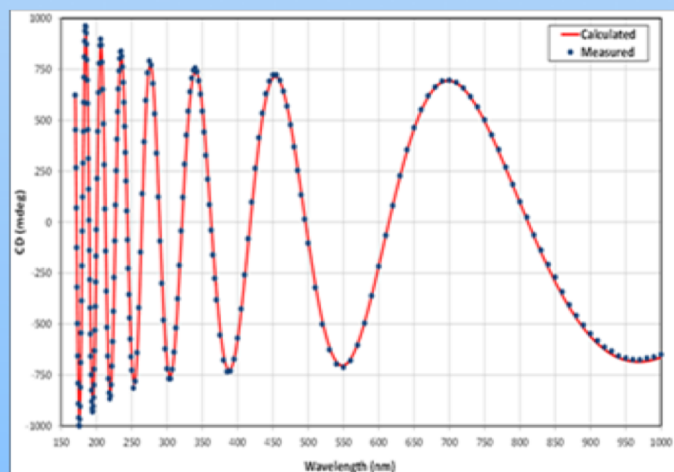




Количественный круговой дихроизм

Chirascan *q*CD

Chirascan-plus *q*CD

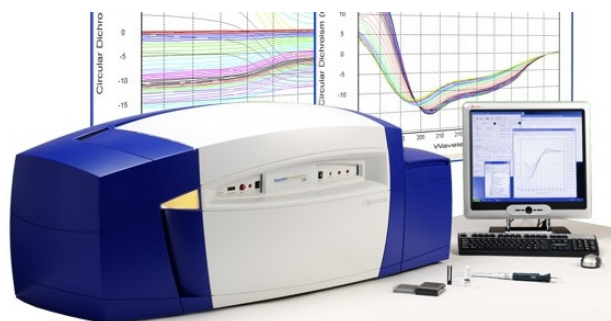


Обзор прибора

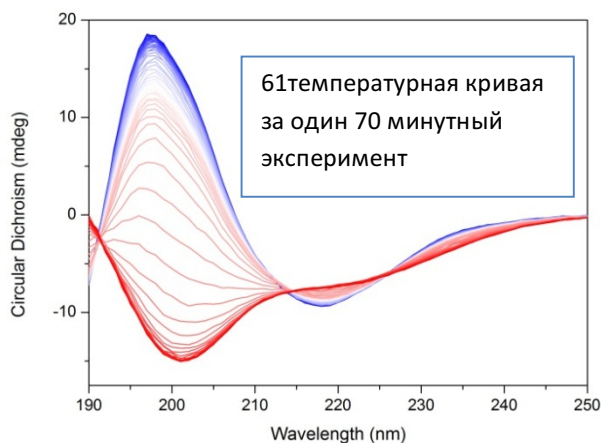
Новая серия **qCD** представляет целый ряд особенностей, которые повышают качество и производительность, как результат сделал КД-спектроскопию действительно количественным методом.

Семейство спектрометров Chirascan на протяжении многих лет остаются наиболее чувствительными и совершенными приборами. Мы предлагаем вам взглянуть, как новая серия **qCD** сможет помочь вам в фундаментальных и фармацевтических исследованиях.

CHIRASCAN **qCD**

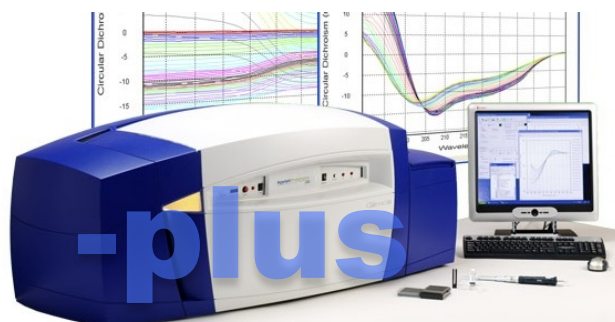


- Количественные измерения КД. Абсолютная калибровка по массиву точек с помощью оптического стандарта **DichOS**
- Великолепная стабильность – однозначно определяется как функция температуры
- Высочайшая чувствительность. Эквивалентна синхротронному излучению в диапазоне 170-260 нм
- Возможно получение множества температурных кривых в одном эксперименте, что экономит время и образец



- ПО ProData для съемки и анализа (неограниченное количество лицензий)
- Большой список уникальных опций

CHIRASCAN-PLUS **qCD**



- Все возможности Chirascan **qCD** с еще большей чувствительностью
- Твердотельный детектор с автоматической подстройкой гейна для максимальной производительности на каждой длине волны



- Стандартный диапазон детекции 163-1200 нм (можно расширить до 1700 нм)
- Одновременная съемка абсорбции и КД
- Простой апгрейд с Chirascan **qCD**
- Возможен апгрейд до **Chirascan-auto qCD**

Что такое q CD?

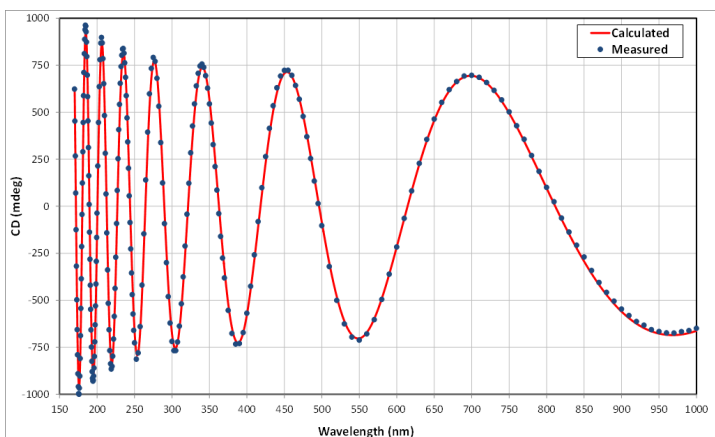
q CD заново определяет приложения спектроскопии кругового дихроизма, представляя новые элементы, которые делают КД действительно количественным методом, и показывая простые для понимания количественные результаты.

Впервые КД спектрометр можно откалибровать с использованием абсолютного стандарта на множестве длин волн во всем диапазоне.

Количественная калибровка позволяет иначе взглянуть на результаты измерений КД. Необходимость такой методики была продемонстрирована Knight et al¹ (National Physical Laboratory, UK). В результате исследования была показана «...невысокая достоверность метода КД вследствие большой разницы в результатах, полученных разными лабораториями и даже разными операторами», и авторы пришли к выводу, что «отсутствие абсолютного стандарта и возможностей контроля качества в КД-измерениях приводит к невысокой достоверности результатов и метода в целом».

Возможности КД ограничены, если исследователи не уверены в точности своих данных. Измерения на Chirascan q CD точны, а значит несут в себе гораздо больше информации, поскольку пользователь может ставить вопрос уже таким образом: велика ли разница в КД спектре по сравнению с моими более ранними результатами или с результатами моих коллег-лабораторов? То же самое и в фармацевтической промышленности, КД используется для сравнения больших количеств образцов, с течением времени и на разных производственных площадках – и количественные данные здесь просто необходимы. Неточные измерения при скрининге могут вылиться в большие расходы. Службы контроля и регулирующие органы все чаще требуют статистически значимые данные. А для этого необходимо иметь данные, точность которых известна.

DichOS (Dichroism Optical Standard) это новый нехимический, мультиреференсный стандарт калибровки КД, который исключает неточности, возможные с использованием традиционного стандарта с одним референсным пиком. DichOS открывает путь к получению абсолютных значений КД, и сравнение КД-спектров, измеренных на разных приборах или в разное время становится обычной процедурой. DichOS изготовлен из оптических компонентов с известными физическими характеристиками. Это позволяет сгенерировать референсный спектр, который и используется для калибровки спектра, снятого с DichOS. Получается калибровочная кривая с множеством точек, и ее точность составляет $\pm 1\%$ на всех длинах волн.



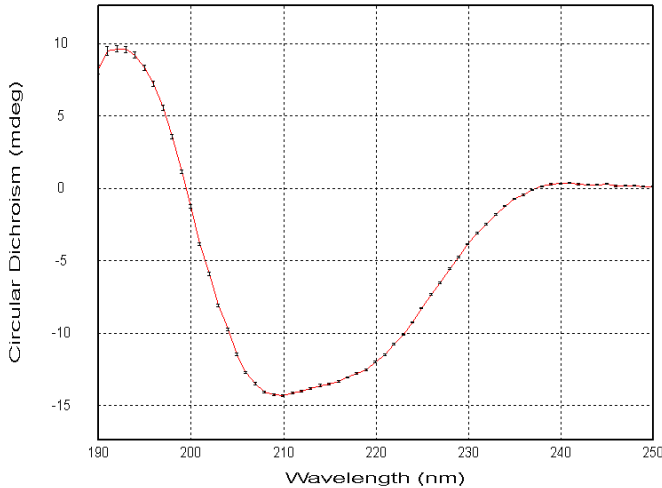
DichOS позволяет получить спектр, содержащий множество пиков от УФ до ИК областей спектра. (см. на рис. слева). Референсный спектр (красный) можно рассчитать очень точно, и его сравнивают с измеренным спектром (синий).

¹ Knight et al *International comparability in spectroscopic measurements of protein structure by circular dichroism: CCQM-P59*. Metrologia, 2010, 47, (1A), 08022

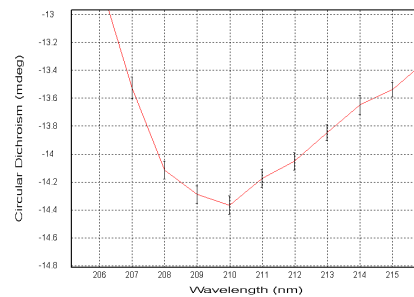
Что такое qCD?

Точность: погрешности рассчитываются и отображаются для каждого измерения

Chirascan qCD всегда производит дискретные измерения КД. Сглаженные или полученные методом rolling average измерения не используются, поскольку это по сути результат наложения сигналов, полученных на разных длинах волн. В каждой точке спектра КД рассчитывается стандартная ошибка (исходя из множества измерений, сделанных на каждой длине волны).



Ошибку можно отобразить в стандартной форме (см. рисунок). Погрешности, которые добавляются в результате вычислений в ПО ProData, например, коррекции базовой линии и усреднения по нескольким спектрам также рассчитываются и эти данные добавляются в файл.



Стабильность: улучшенная стабильность КД

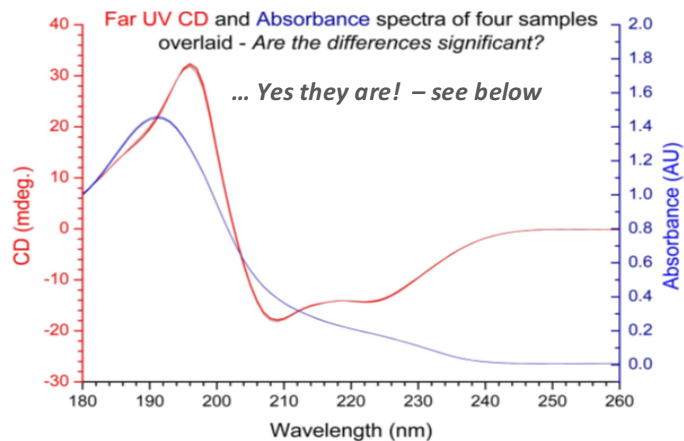
Важным параметром для КД-спектрометра является стабильность сигнала КД как функции температуры. Спектрометры qCD обладают отличной стабильностью, особенно если речь идет о колебаниях температуры. Только Applied Photophysics предоставляют такие данные в спецификации (≤ 0.01 mdeg/ $^{\circ}$ C в диапазоне от 170 до 650 nm).

Анализ: статистическое (количественное) сравнение структур высокого порядка

ПО qBiC. Сравнение и расчет различий в КД спектре требует измерений, точность которых известна. Это стало возможно с qCD. qBiC – это программный компонент, который позволяет производить количественное сравнение спектроскопических данных путем установления, являются ли различия в спектрах статистически значимыми. qBiC задействует множество подходов для вычисления сходства спектров.

В приведенном примере наложены 4 КД-спектра инсулина и инсулина, связанного с 2.5%, 5% и 10% lispro. На первый взгляд спектры выглядят одинаковыми.

Однако статистический анализ с использованием qBiC показывает, что они отличаются и эти различия можно вычислить. В представленном исследовании использовались два статистических метода. Результаты приведены в представленной ниже таблице:

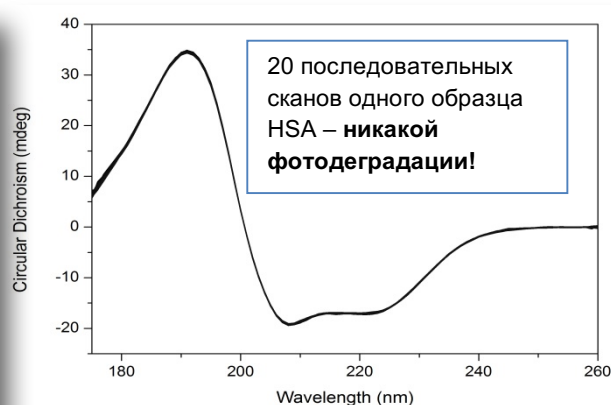
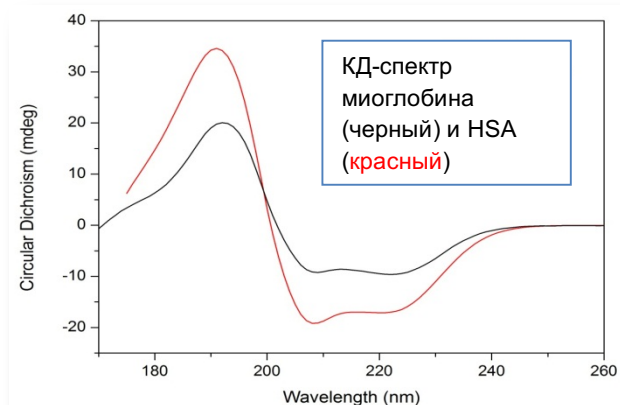


Human Insulin with % Lispro	P value	Z-score
0%	0.464	0.051
2.5%	0.0382	2.892
5%	0.0000428	7.694
10%	2.57E-08	21.04

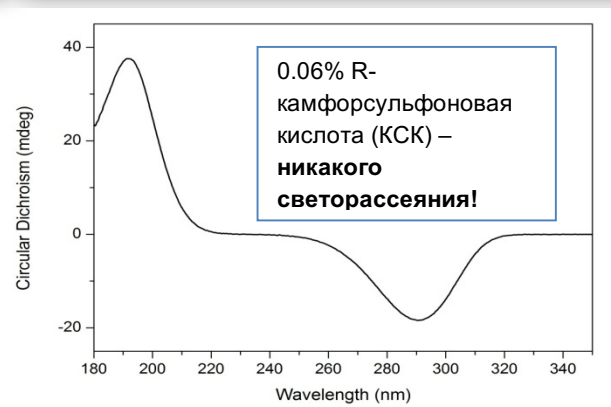
Если $p < 0.05$ = отличия значительны с уровнем достоверности 2-sigma (95%) или более.

Если $Z > 2$ = отличия значительны с уровнем достоверности 2-sigma (95%) или более.

Спектральные характеристики

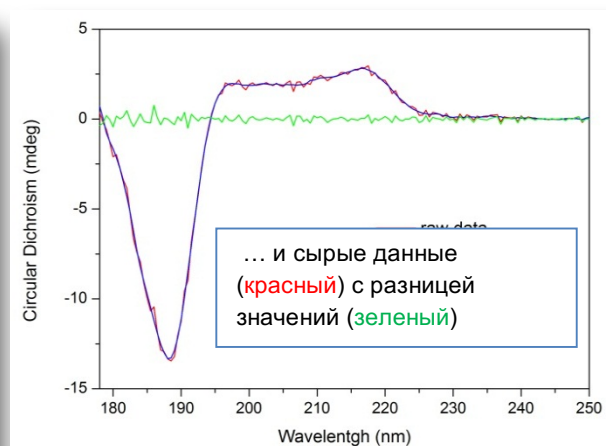
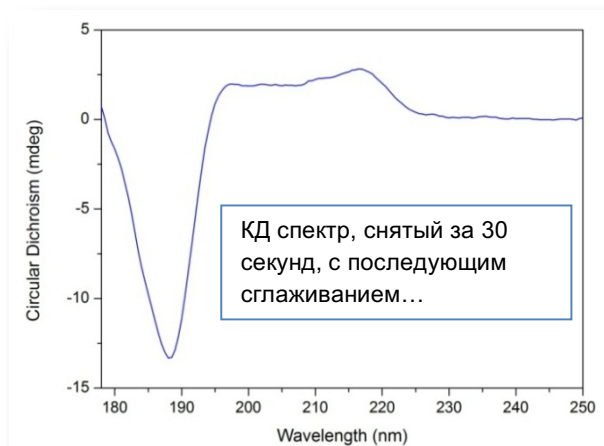


Уникальная конструкция Chirascan q CD с двойной поляризующей призмой существенно увеличивает светопропускание по сравнению с любым другим КД-спектрометром, особенно в дальнем УФ. КД-спектры в диапазоне 170-260 нм эквивалентны тем, что можно получить с использованием синхротронного излучения. Примеры спектров белков, записанные до 170 и 175 нм, показаны вверху слева. Спектры вверху справа демонстрируют непревзойденную эффективность в дальнем УФ, что позволяет избежать фотодегградации образца. Точность спектра КСК (справа) говорит об отсутствии влияния эффекта светорассеяния.



Никакого сглаживания!

Каждая точка на спектре КД, записанная Chirascan q CD является именно измерением КД на данной длине волны. При необходимости можно получить сглаженную версию спектра методом Савичкого-Голея, как показано ниже (слева) для очень быстрого сканирования. Это может быть полезно при демонстрации данных, не стоит их путать с реальным спектром КД, и конечно эти данные нельзя использовать для статистического сопоставления спектров. Рисунок ниже (справа) показывает сглаженный спектр, наложенный на реальный.

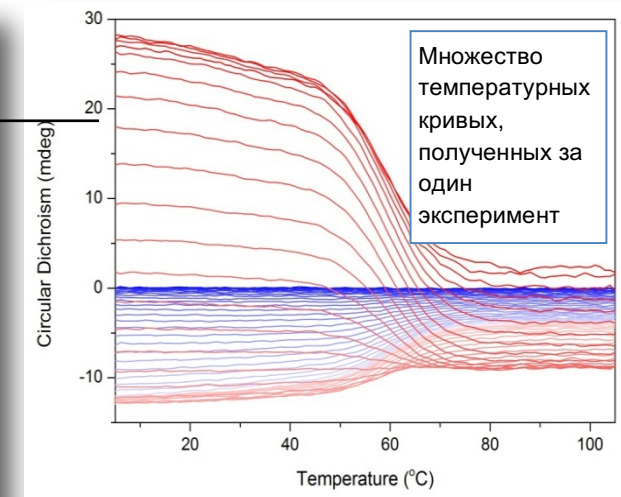
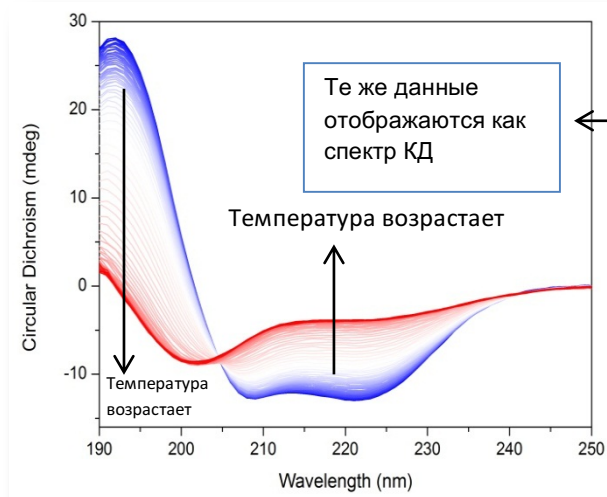
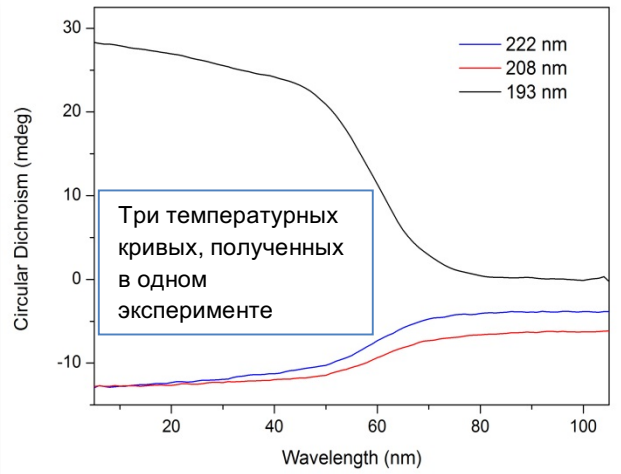


Однако некоторые производители рекомендуют метод сканирования, при котором сразу записывается сглаженный спектр. При этом не разъясняется, что полученные данные сглажены с использованием метода rolling average и что записанные значения не соответствуют дискретным измерениям КД на каждой длине волны. Качество такого измерения сложно оценить и пользователю остается лишь догадываться, не было ли сглаживание слишком сильным. Нет никаких оснований записывать спектры таким образом кроме как с целью скрыть реальное качество измерения. Как показано выше, КД-спектр всегда можно сгладить обратимым способом, при котором пользователь может контролировать процесс сглаживания и его влияние на спектр.

Уникальные возможности температурного рампинга

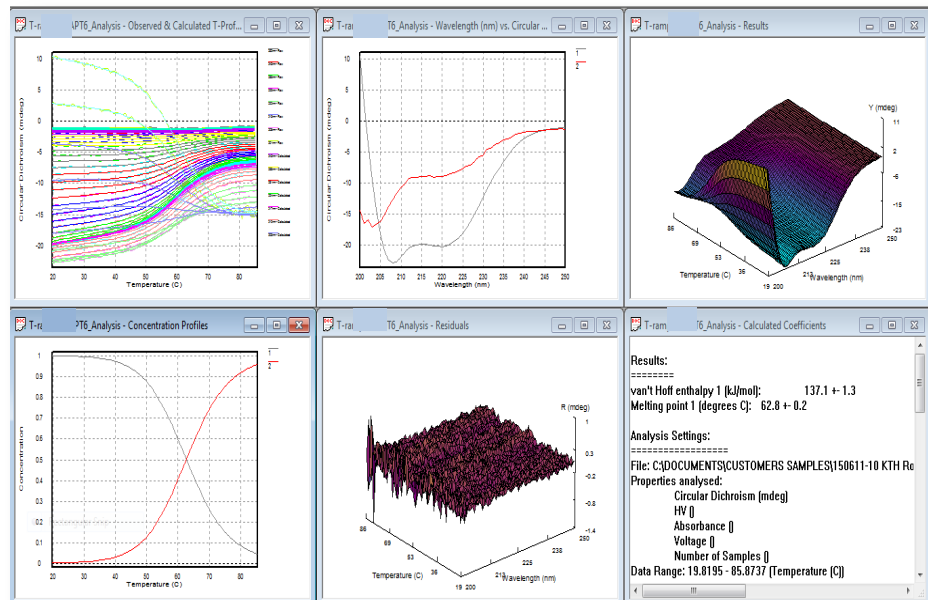
За один эксперимент можно получить неограниченное количество температурных кривых. Образец нагревается непрерывно (обычно со скоростью 1°C/мин.) и температура образца автоматически записывается в каждой точке (обычно каждый 1°C) на каждой длине волны с использованием зонда, который находится непосредственно в кювете.

На графике слева внизу показана серия кривых, полученных в одном эксперименте. Эти данные можно также вывести как функцию КД от температуры (справа внизу). Таким образом, за один эксперимент можно получить как информацию о структуре, так и термодинамические данные. Одновременно с КД записываются данные зависимости абсорбции от температуры, что также дает информацию о начале агрегации. С использованием CCD детектора возможно также записать спектры эмиссии в том же эксперименте (см. Аксессуары).



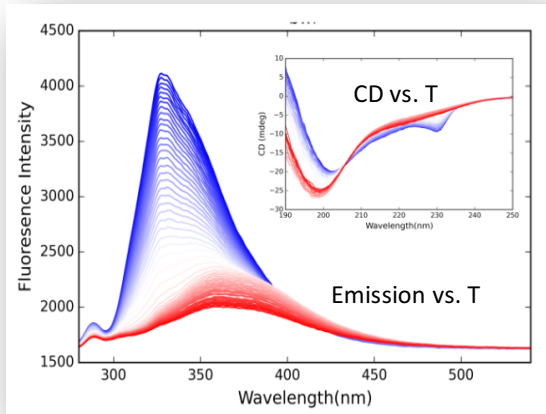
ПО для глобального анализа термодинамических данных

ПО для глобального анализа термодинамических данных **Global 3** разработано специально для обсчета спектров, полученных на разных длинах волн как функции температуры. **Global 3** определяет средние точки температурных переходов, энтальпию Ван Гоффа, а также КД-спектры короткоживущих интермедиатов и профили зависимости концентрации от времени всех состояний.

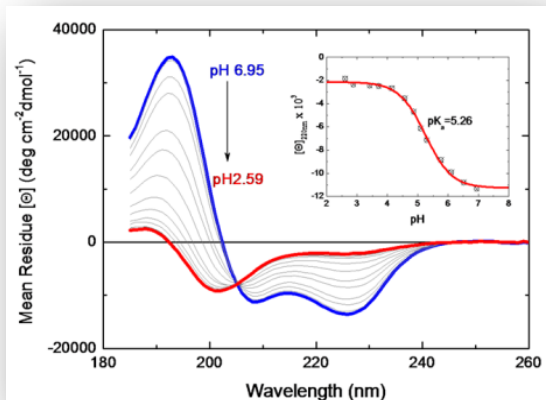


Дополнительные модули и аксессуары

- **Новый эмиссионный детектор CCD.** С его помощью КД, абсорбцию и эмиссию можно записать в одном 70-минутном эксперименте по термической денатурации (стабильность вторичной и третичной структуры отслеживаются в одном эксперименте).



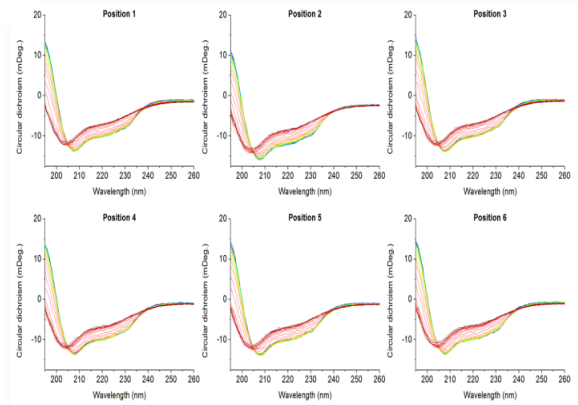
- **Авто-титратор и pH-метр.** Автоматический титратор можно также использовать вместе с in-situ pH-метром.



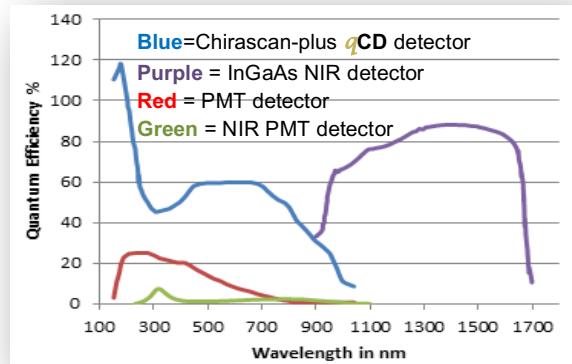
- **Ячейка Куэрт для линейного дихроизма.** Максимальный градиент скорости сдвига и гомогенность (дисперсия всего 11% поперек зазора) Держатель образца можно настроить для быстрого переключения между КД и ЛД.
- **Chirascan-auto qCD.** Апгрейд до полностью автоматизированной системы с интегрированным XYZ роботом. Повышает производительность и исключает человеческую ошибку.



- **6-позиционный держатель.** Графики ниже показывают 6 серий данных по термической денатурации, полученные в одном эксперименте с использованием 6-позиционного держателя. В этом эксперименте в каждой кювете использовался один и тот же образец. Измеренная T_m составила $72.7^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$.



- **ИК-детектор до 1700 нм.** Для покрытия диапазона 165-1700 нм необходимо два детектора – оба используют автоматическую подстройку гейна для оптимизации чувствительности на каждой длине волны.



- **Stopped-flow.** Сочетает высочайшую чувствительность с минимальным мертвым временем. Модуль stopped flow разработан специально для использования с Chirascan qCD и вся система находится на одной рабочей поверхности. Также опционально модуль stopped flow можно использовать как отдельный прибор. Applied Photophysics – мировой лидер в области stopped-flow.



- **Другие аксессуары** включают интеграционную сферу, держатель для тонких пленок и диск KBr, детектор для флуоресценции/анизотропии, сканирующий эмиссионный монохроматор, магнитный КД, низкотемпературный криостат, кастомизированные держатели, **21CFR Part II compliance software, IQQPQ Validation Service.**

Спецификация

	Chirascan <i>q</i> CD	Chirascan-plus <i>q</i> CD
Калибровка КД и точность	Мультиреференсная калибровка (DichOS) – точность до ±1%	
Источник света	150W ксеноновая дуговая лампа с воздушным охлаждением	
Монохроматор	С двумя призмами, ОБЕ призмы поляризующие	
Диапазон длин волн	163 – 950 нм (+ опциональный ИК-детектор)	163 – 1200 нм (можно расширить до 1700 нм)
Стандартный детектор	Фотоумножитель	Фотодиод (с автоматически подстраиваемым гейном)
Стандартные режимы детекции	КД, абсорбция. Также подходит для флуоресценции, анизотропии, линейного дихроизма, FDCD	
Каналы детекции	Стандартно 5: КД, абсорбция, detector HT, напряжение постоянного тока, температура	
Чувствительность. <i>Стандартные значения RMS-шума без образца с шириной полосы 1 нм, временем накопления 2 сек. (без сглаживания и использования rolling averaging).</i>	0.07mdeg @ 175нм 0.03mdeg @ 180нм 0.03mdeg @ 185нм 0.03mdeg @ 200нм 0.03mdeg @ 250нм 0.04mdeg @ 500нм 0.09mdeg @ 750нм -	0.04mdeg @ 175нм 0.02mdeg @ 180нм 0.015mdeg @ 185нм 0.02mdeg @ 200нм 0.02mdeg @ 250нм 0.02mdeg @ 500нм 0.03mdeg @ 750нм 0.05mdeg @ 1000нм
Погрешность измерений	На каждой длине волны рассчитывается погрешность измерения	
Паразитная засветка	< 3ppm на 200 нм	
Стабильность базовой линии	≤ 0.01 mdeg/°C (170 – 650 нм)	
Температурный рампинг	Возможна съемка температурных кривых на множестве длин волн в одном непрерывном эксперименте по термической денатурации	
Расход азота на 170 нм	5 литров/мин.	
Продувка азотом и контроль включения лампы	Контроль продувки азотом и включения лампы через ПО Предустановка и автоматическое включение подачи азота и лампы Предустановка выключения подачи азота и лампы Автоматическое выключение лампы при недостатке азота	

Другие стандартные возможности: Пельтье-контроль температуры, внешний температурный зонд, продвинутое сканирование и кинетических экспериментов, ПО ProData Viewer для просмотра и анализа данных, включая фиттинг температурных кривых, анализ кинетики, вторичной структуры, количество компьютеров, на которых может быть установлено ПО, неограничено, USB-интерфейс.

Доступен широкий круг аксессуаров и дополнительных модулей, включая глобальный термодинамический анализ, CCD детектор эмиссии, ячейка Куэтт для ЛД, 6-позиционный держатель, титрационный модуль, рН-метр, модуль stopped flow, интеграционную сферу, держатель для тонких пленок и диск KBr, специальные детекторы для флуоресценции/анизотропии, сканирующий эмиссионный монохроматор, криостат, детекцию ORD, магнитный КД, кастомизированные держатели, 21CFR Part II compliance software и IQOQPQ Validation Service.

Бесплатные измерения – опробуйте *q*CD на своих образцах!

Мы приглашаем исследователей посетить наши демонстрационные лаборатории или выслать свои образцы для измерений Chirascan или Chirascan-plus *q*CD. У нас есть демонстрационные лаборатории в Лондоне (UK) и Бостоне (USA).

Техноинфо Лтд.

Официальный представитель
Applied Photophysics в России
Телефон/факс: +7 (499) 243 66 26



www.technoinfo.ru