

BIOSENSORY

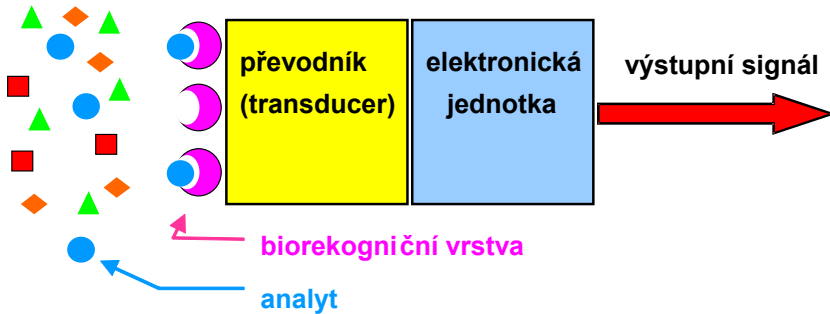
- Co to je biosensor?
- Přehled témat přednášky
- Zlepšení očekávaná od biosensorů
- Historická východiska
- Informace o biosensorech
- Vlastnosti ideálních biosensorů

Sylabus

- 1. Definice biosensoru. Historický přehled. Charakteristiky ideálního biosensoru. Základní měřicí přístupy.
- 2. Elektrochemické biosensory, enzymové elektrody. Potenciometrické systémy a ISFETy. Referenční elektrody. 3. Amperometrické měření kyslíku, peroxidu vodíku a NADH, biosensory s oxidázami a dehydrogenázami. 4. Přenos elektronů z enzymů na elektrodu pomocí mediátorů. Kompozitní a organokovové molekuly. 5. Měření impedance a konduktometrické biosensory. Voltametrické techniky.
- 6. Spektrofotometrické, fluorimetrické a chemiluminiscenční sensory, optická vlákna. Optické biokatalytické sensory. Bioluminiscence.
- 7. Biosensory pro detekci inhibitorů. Recyklační enzymové systémy. Mikrobiální, tkáňové a receptorové sensory.
- 8. Afinitní biosensory s nepřímou detekcí pomocí značek. Imunosensory. 9. Hybridizační biosensory pro stanovení nukleových kyselin a detekci sekvencí oligonukleotidů. 10. Přímé optické afinitní sensory. Využití exponenciální vlny a resonance povrchových plasmonů ke sledování bioafinitních interakcí v reálné čase. Integrované optické systémy, interferometry a podobné techniky.
- 11. Imobilizace biomolekul při konstrukci biosensorů. Membránové techniky. Elektropolymerace. 12. Aktivace povrchu sensorů. Kovalentní vazba biomolekul. 13. Miniaturizace a masová produkce biosensorů. Sitotisk, litografie, biosensory jako součást integrovaných analytických systémů, biočipy.
- 14. Komerční biosensory. Perspektivy biosensorů, oblasti uplatnění v medicíně, potravinářství, ochraně životního prostředí, vojenství.

Biosensor je analytický přístroj

obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupiny) chemických látek ve vzorku .



Biorekogniční složka

rozpoznává stanovovanou látku, kterou buď:

- specificky přeměňuje = biokatalytická reakce:
enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus
- nebo specificky váže = bioafinitní reakce:
vazba protilátek s antigeny (hapteny)
hybridizace nukleových kyselin
vazba ligandů na receptory
interakce sacharidů s lektiny

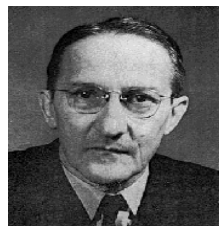
Fyzikálně-chemický převodník

převádí biorekogniční reakci na signál vhodný pro další zpracování, lze je rozdělit do následujících skupin:

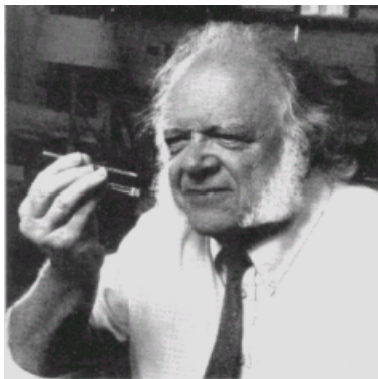
- elektrochemické (potenciometrie, amperometrie, konduktometrie, voltametrie)
- optické (fotometrie, fluorimetrie, luminometrie, nelineární optika)
- piezoelektrické a akustické
- elektromagnetické
- kalorimetrické
- nanomechanické

Historická východiska

- počátek 20. století: formulace koncepce redoxního potenciálu a první měření pH.
- 1922: Heyrovského objev polarografie - zlom na poli elektrochemie
- 1935: pokusy měřit koncentrace kyslíku v biologických tekutinách pomocí rtuťové kapkové elektrody (Müller a Bamberger)
- 1938: měření spotřeby kyslíku živými organismy - sinice, kvasinky a krevní buňky, Petering a Daniels); tyto pokusy vyžadovaly práci se rtuťí a poměrně komplikovanou polarografickou aparaturu.
- 40. léta: využití katodické redukce kyslíku na ušlechtilých kovech (Au, Pt); holé elektrody však v biologickém materiálu postupně ztrácely citlivost.

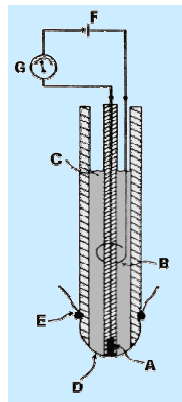


Spolehlivé měření koncentrace O_2



Leland C. Clark, Jr.
s první enzymovou elektrodou

- 1956: revoluční změnu provedl Clark: předřadil elektrodovému systému membránu propustnou pro plyny, a tak elektrody (pracovní Au nebo Pt katoda zatavená ve skle a Ag/AgCl referentní) fyzikálně izoloval od měřeného prostředí.



- 1962: na sympoziu New York Academy of Sciences Clark popsal jak „udělat elektrochemické sensory (pH, polarografické, potenciometrické nebo konduktometrické) inteligentnějšími přidáním enzymových převodníků uzavřených jako sendvič v membránách“
- tento koncept ilustroval experimentem s glukosa oxidasou zachycenou na povrchu kyslíkové elektrody pomocí dialyzační membrány - měřený pokles koncentrace kyslíku byl úměrný koncentraci glukózy
- Clark s Lyonsem v publikaci poprvé uvedli termín enzymová elektroda (často nesprávně přepisovaný Updikovi a Hicksovi , kteří pracovali experimentální detaily potřebné k získání funkční enzymové elektrody pro glukosu)

- 50.-60. léta: první enzymové elektrody
- 1969: potenciometrická enzymová elektroda (Guilbault)
- 1974: enzymový termistor (Mosbach)
- 1975: komerční biosensor pro glukosu (fa. YSI, Ohio)
- 70. léta: objevuje se pojem „biosensor“ (byla snaha použít "bioprobe", tento název však byl chráněn).
- zavádí se pojem „optoda“ pro sensory na bázi optických vláken (Lubbers a Opitz)
- 1976: na trhu umělý pankreas Biostator (fa. Miles), biosensor pro laktát (fa. La Roche)
- 1982: popsán implantovatelný glukosový biosensor – jehlová enzymová elektroda (Schichiri)
- výzkum imunochemických biosensorů (imunosenzory)
- 1990: na trh uveden BIAcore (fa. Pharmacia)
- ~2000: nástup DNA biočipů

Biosensor pro glukosu



- dosud nejúspěšnější biosensor je založen na ferrocenu - přenašeči elektronů z oxidoreduktas na elektrodu (fa. Medisense).
- Levný osobní biosensor pro domácí měření krevní glukosy diabetiky.

Biosensory v Brně

- 1950 - založena Katedra biochemie na PŘF MU
- 1970 - Prof. Lumír Macholán - enzymové elektrody (inhibice tyrosinasy, konduktometrické měření močoviny, diaminoxidasa)
- 1990 – inhibice cholinesterasy pro detekci organofosfátů - spolupráce s armádou (VTUO Brno)
- 1993 – piezoelektrické sensory (první experimenty s Prof. Marco Mascinim) a studie afinitních interakcí pomocí biosensorů
- 1995 – používání síťotiskových sensorů (Krejčí Engineering, dnes BVT Technologies)
- 1999 – mikroraménka jako afinitní sensory (University v Mainzu a Janově, Dr. Roberto Raiteri)
- ~2002 – aktivity na poli elektrochemických imunosensorů pro biologická agens (*F. tularensis*)

Biosensory v Brně

- 2005 – přesun do nového kampusu v Brně - Bohunicích zpočátku v rámci ILBIT (integrated laboratories of biomedical technologies)
- 2006 – iniciován výzkum nanobiotechnologií - pod Národním centrem pro výzkum biomolekul
- v současnosti aktivity realizovány v:

- **A5 / Ústav biochemie - přednášky a výuka zaměřená na biosensory, „tradiční“ oblasti výzkumu (elektrochemické, piezoelektrické, optické, ...)**

- **A4 / Národní centrum pro výzkum biomolekul - nanobiotechnologie – AFM Ntegra Vita a Solaris, biointerakce – Biacore 3000)**

Biosensory v Brně příští rok

- European Structural Funds - regionální podpora
 - Central European Technological Institute (CEITEC)
 - hlavní partneři MU a VUT a řada dalších brněnských institucí
 - naše skupina součástí programu 4
- Strukturní biologie**
- Nanobiotechnologie a biointerakce



Výzkumná skupina

- **odborní pracovníci:**
- Jan Příbyl, Jiří Žeravík
- **doktorandi: 10**
Zdenka Fohlerová, Milan Jílek, Zuzana Svozilová, Antonín Hlaváček, Karel Lacina, Kateřina Frnková, Šárka Novotná, Martin Kříž, David Kovář, Eva Kupská
- **magisterští studenti: 4** (další přijdou v říjnu)
- **bakalářští students: 10** (2010 končilo)
- **zahraniční studenti: 4** (letos)

Dostupné vybavení ...

- surface plasmon resonance - Biacore 2000 and 3000, Spreeta
- SPM - AFM Ntegra Vita, SNOM Ntegra Solaris
- optical - DAD spectrophotometer SCINCO, fiber optics spectrophotometer Ocean Optics, fluorimetric detector Avantes, var. light sources, multipurpose plate reader Synergy2 (abs / fluo / lumi), Multiscan RC
- electrochemistry – 2 PalmSens, 4 EmStats, EIS techniques, many single / multi-channel amperometric detectors
- flow-through techniques – FIALab 3000, 2 autoinjectors , 5 MP3 pumps, >15 miniperistaltic pumps, 4 electronic valves, ...
- piezosensors - 5 piezodetectors, hi-freq. impedance analyzer
- microbial and mammalian cell cultures
- fluorescence microscopy

- **in-house facilities:** NMR 600 MHz, MALDI TOF, ES MS, LC/MS, CE, CE/MS, CE on chip, HPLCs, FPLCs, crystalization, proteomics, biomolecular modelling, recombinant proteins, microcalorimetry, RT-PCR,, ...

Výzkumné projekty

- electrochemical immunosensors for rapid detection of bioagents (*Francisella*) biosensor, detector, software – **Min. of Defense / MTIP**
- piezoelectric biosensors – applications – bacteria, pesticides, clinical markers, glycated hemoglobin, boronate complexes
- detection of DNA adducts with benzo[a]pyrene (SPR, AFM, nanoparticles) – **NPVII**
- bioelectronic tongue for wine quality control – **NPVII**
- biosensors with mammalian cell cultures – adhesion, apoptosis, effect of immunomodulators (PZ, EIS)
- combined studies of affinity and function of biomolecules – simultaneous information on binding and enzyme activity of bioconjugates (PZ-elchem., PZ-optical) – **Research Center (local)**
- biosensors for mycotoxins – feasibility study – **Min. of Industry**
- nanomechanical biosensors – microcantilevers as transducers, effect of porous Si, model study (*E. coli*, albumin) – **NATO SfPP**
- biosensors for pesticides – **EU FP6 SSA BioDet**
- biomimetic sensors – **EU FP7 IRSES BIOMIMIC**

Časopisy o biosensorech

- **Biosensors and Bioelectronics** – všechny aspekty oboru, nové trendy
- **Sensors and Actuators B Chemical** - zejména fyzikálně-chemické převodníky
- **Electroanalysis / Journal of Electroanalytical Chemistry / Bioelectrochemistry and Bioenergetics** - elektrochemické biosensory
- **Analytical Chemistry / Analytica Chimica Acta / Analytical Biochemistry / Analytical Letters / Analyst / Trends in Analytical Chemistry** - čistě analytické, mnoho článků o biosensorech a jejich aplikacích
- **Enzyme and Microbial Technology** - mikrobiální sensory
- **Journal of Biotechnology** - aplikace při biotechnologických procesech
- **Journal of Immunological Methods** – imunochemické sensory
- **Langmuir / Thin Solid Films** - některé aspekty imobilizačních postupů.

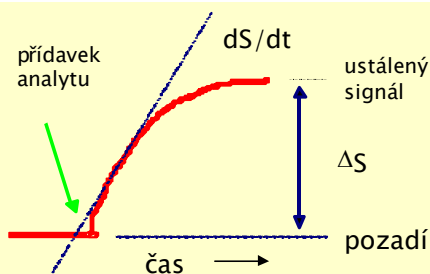
Knihy o biosensorech

- Mosbach K. **Immobilized Enzymes and Cells, Methods in Enzymology, Vol. 137**, Academic Press, San Diego, 1988.
- Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S. **Biosensors: Fundamentals and Applications**, Oxford University Press, Oxford, 1987.
- Cass A. E. G. **Biosensors: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford, 1990.
- Scheller F., Schubert F. **Biosensors**, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- Buerk D. G. **Biosensors, Theory and Applications, Technomic, Lancaster, 1993**.
- Buck R. P., Hatfield W. E., Umana M., Bowden E. F. **Biosensor Technology, Fundamentals and Applications**, M. Dekker, New York, 1990.
- Wise D. L. **Bioinstrumentation: Research, Development and Applications**, Butterworth, Boston, 1990.
- Wise D. L. **Bioinstrumentation and Biosensors**, M. Dekker, New York, 1991.
- Blum L. J., Coulet P. R. **Biosensors: Principles and Applications**, M. Dekker, New York, 1991.
- Turner A. P. F. **Advances in Biosensors**, JAI Press, London, Vol. 1, 1991; Vol. 2, 1992; Vol. 3, 1994.
- Scheller F., Schmid R. D. **Biosensors: Fundamentals, Technologies and Applications**, GBF Monographs 17, VCH, Weinheim, 1992.
- Wise D. L., Lemuel B. **Biosensors and Fiberoptics**, Humana, Clifton, 1991.
- Alcock S. J., Turner A. P. F. **In Vivo Chemical Sensors, Recent Developments**, Cranfield Press, Bedford, 1993.
- Wagner G., Guilbault G.G. **Food Biosensor Analysis**, M. Dekker, New York, 1993.
- Scott D. A. **Biosensors for Food Analysis**, Royal Society of Chemistry, London, 1996.

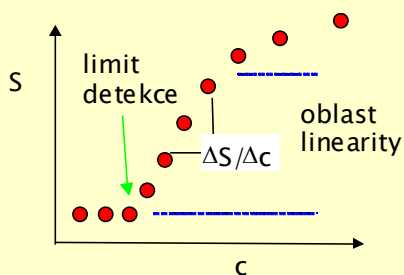
Biosensory na internetu

- Hypertextový učební text (HTML Help):
<http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.chm>
- Elektronický text – Acrobat PDF:
<http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>

Základní pojmy

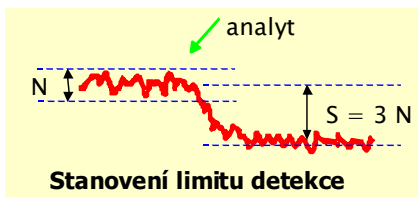


Průběh měření s biosensory.



Kalibrační závislost

- **Citlivost** je konečná ustálená změna výstupního signálu biosensory (S) v důsledku změny koncentrace analytu (c), tj. $\Delta S/\Delta c$, nebo dS/dc . Při provádění kinetických měření (sleduje se časová změna signálu dS/dt) se citlivost vypočítá jako $\Delta(dS/dt)/\Delta c$.
- **Kalibrace** spočívá ve vystavení biosensory různým standardním roztokům o známé koncentraci analytu. Kalibrační body by měly uzavírat pracovní oblast biosensory, aby nebylo třeba provádět nespolehlivé extrapolace.



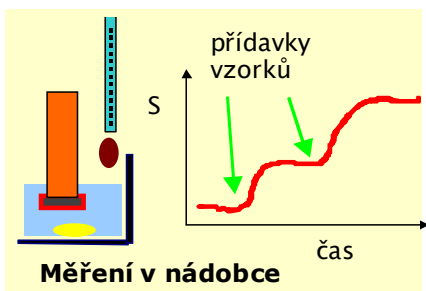
- **Limit detekce (LOD)** biosensuru je **nejnižší stanovitelná koncentrace analytu**. Ideálně je dán rozlišením měřicího přístroje, obvykle je však zhoršován vedlejšími procesy. Pro definici se používá velikost šumu (N , noise) signálu a limit detekce se bere pro poměr $S/N = 3$.

- **Signál pozadí** (background) je signál v nepřítomnosti analytu, obvykle se odečítá od měřeného signálu: $S = S(\text{měřený}) - S(\text{pozadí})$. Někdy je výhodnější použít referentní koncentraci analytu a vůči ní vztáhnout měřený signál. Pro semilogaritmický případ dostaneme $S/S(\text{ref}) = (\text{měření-pozadí})/(\text{reference-pozadí})$.
- **Dlouhodobá stabilita** (drift) je podmíněna změnami citlivosti biosensuru v čase. Citlivost obvykle klesá, ale může i přechodně vzrůst (změna biovrstvy - ztenčení, nabobtnání). Postupný pokles citlivosti může být vyvolán oxidací povrchu kovových elektrod, usazováním vrstev proteinů či jiných biomolekul (měření in vivo), otrava biovrstvy těžkými kovy. Skokové změny jsou vyvolány mechanickými vli-vy, mohou často uniknout pozornosti.
- **Selektivita** (vliv interferencí). Odezva biosensuru by měla být vyvolána pouze přítomností stanovované látky. Prakticky je často nutné rušivé látky eliminovat (zře-dění, konverse na nerušící sloučeniny, předřazení selektivní bariéry) nebo jejich příspěvek na měřený signál paralelně určit jiným senzorem (**diferenciální uspořádání**).
- **Rychlost odezvy** je určována zejména fyzikálními vlastnostmi biosensuru (velikost). Závisí na rychlosti difúze analytu z okolního prostředí k povrchu biosensuru a dále pak vnitřní difúzi uvnitř systému biosensuru.
- **Doba odezvy** se obvykle určuje jako čas potřebný k dosažení určité velikosti signálu v konečném ustáleném stavu ($t \rightarrow \infty$), např. τ_{95} pro dosažení 95%.
- **Teplotní závislost** při měřeních s biosensory působí jednak na difúzní jevy, jednak na probíhající chemické reakce. Proto se obvykle pracuje za isotermických podmínek, používá se vodní cirkulující termostát nebo vyhříváný kovový blok.
- **Životnost biosensuru** je obvykle limitována neslabším prvkem, což je biorekogniční část. Přitom je třeba odlišit stabilitu při skladování (shelf life) od operační stability, která může být závislá na počtu a druhu analyzovaných vzorků. Pro dlouhodobé uložení biosensuru je obecně vhodná nižší teplota (chladnička, mraznička), z praktického hlediska je pohodlnější skladování v suchém stavu.

Podmínky měření s biosensory

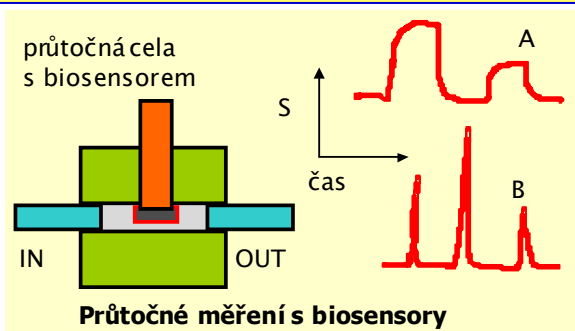


- Biosensor se nachází přímo ve sledovaném prostředí (řeka, tkáň, krevní řečiště, fermentor, ...). Jeho činnost by neměla okolní prostředí ovlivnit - vyčerpávání analytu důsledkem měření, ovlivnění toku jiných látek, ...



- Biosensor je umístěn ve vhodné nádobce (často opatřená vodním pláštěm pro temperaci a magne-tickým míchadlem). Nejprve se vyčká ustavení pozadí signálu v přítomnosti pracovního roztoku (pufr obsahující dle potřeby další pomocné reagenty). Přidá se vzorek a po ustálení se odečte signál. Přidávky vzorku lze často několikrát opakovat.

Podmínky měření s biosensory



- Biosensor je umístěn ve vhodné průtočné cele. Jsou možné dva způsoby činnosti. Systémem se nechá střídavě protékat zóna základního roztoku a zóny vzorku (A). Měřený signál je tedy vyvolán přímo neředěným vzorkem.
- Při druhém způsobu systémem neustále protéká pracovní roztok, do kterého se nastříkují vzorky (FIA, flow injection analysis). Přitom vždy dojde k definovanému naředění vzorku a signál má charakteristický tvar píků (B); vyhodnocuje se buď jejich výška nebo plocha. Průtočná uspořádání umožňují automatizovat měření.