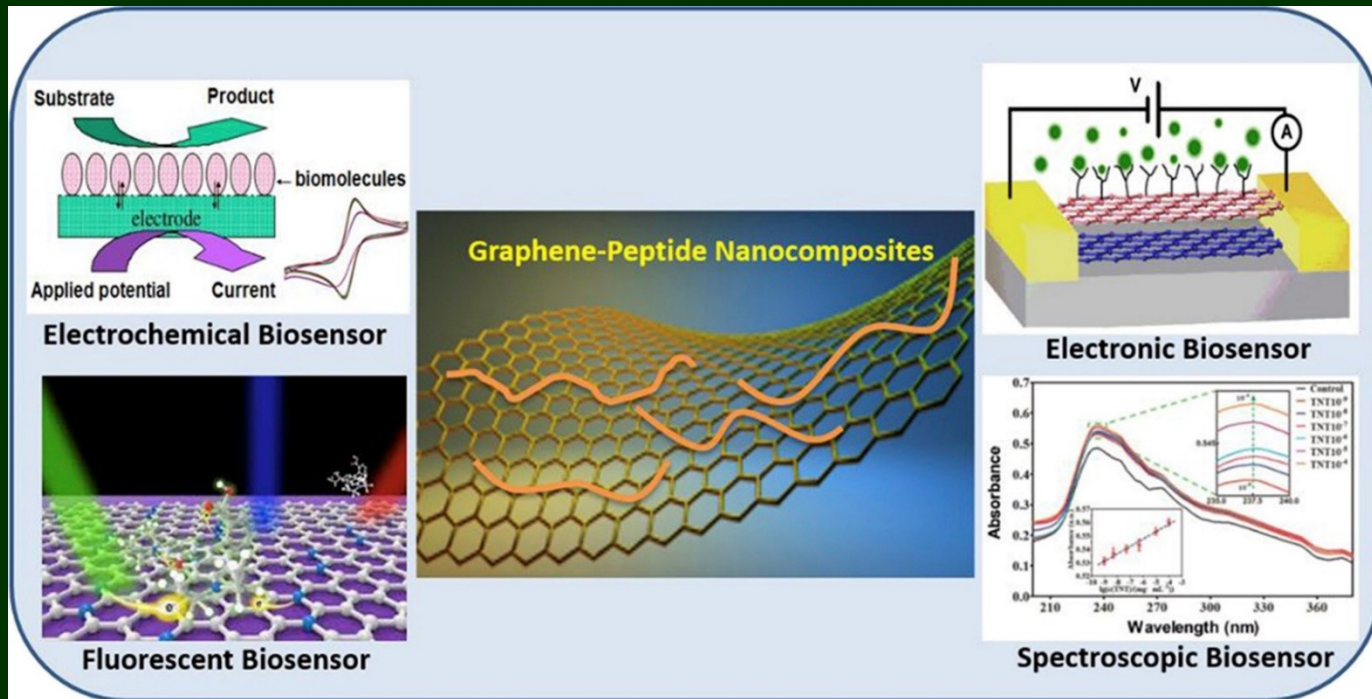


Téma 06_ Diagnostické metody založené na biosenzorech



Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU

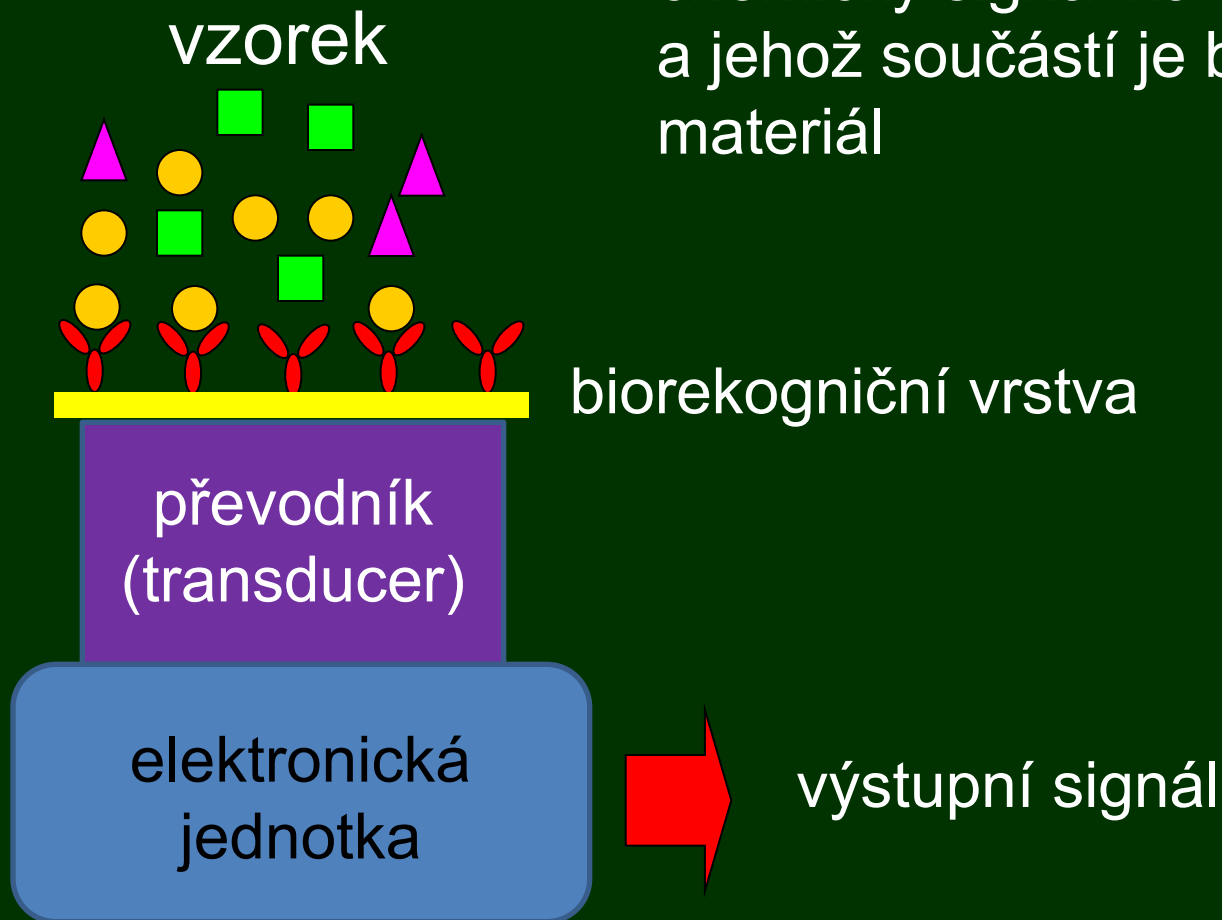


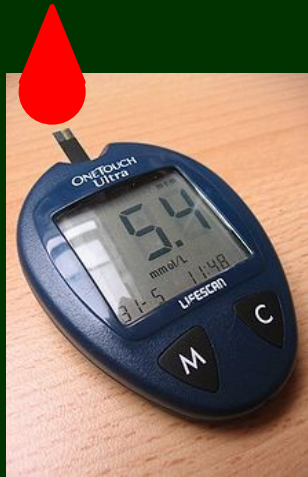
NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY

MS
MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

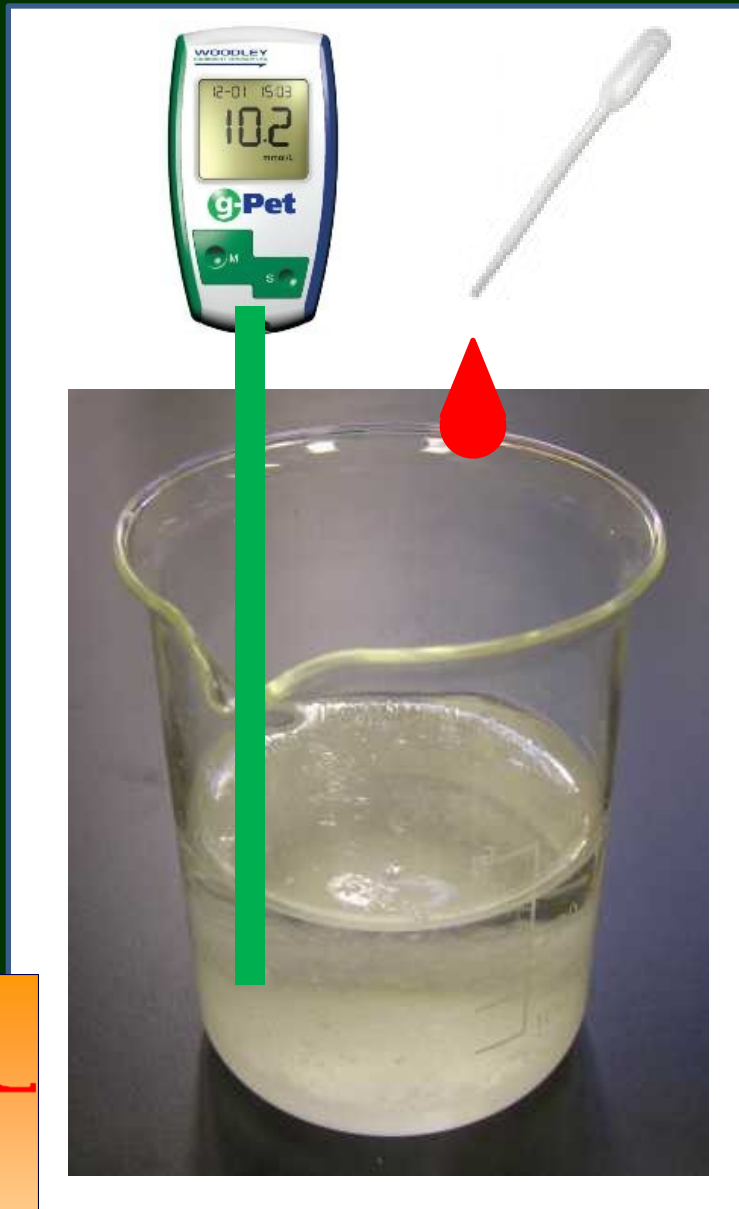
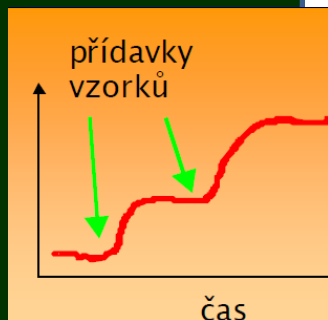
Biosenzor

- Cílem je zjednodušit práce spojené s analýzou vzorku, dospět k přenosným systémům a zrychlit průběh stanovení.
- Zařízení, které převádí fyzikální nebo chemický signál na signál elektrický a jehož součástí je biologický materiál

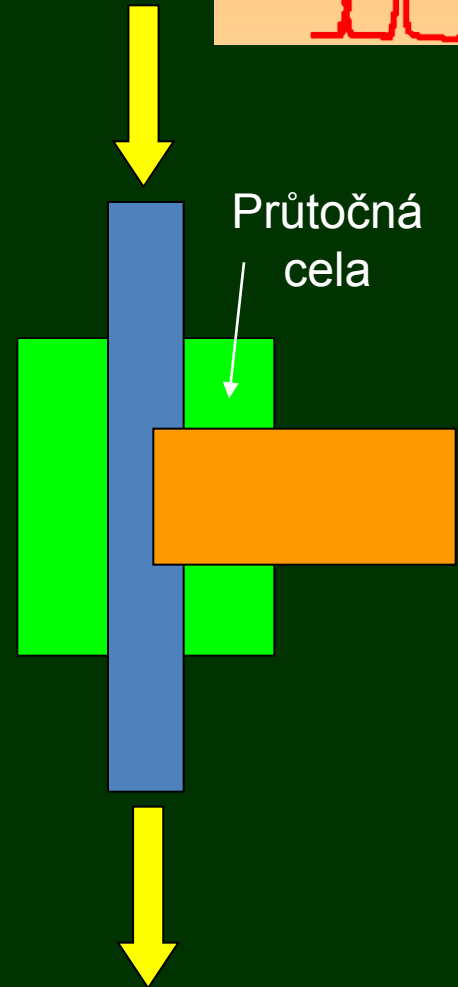
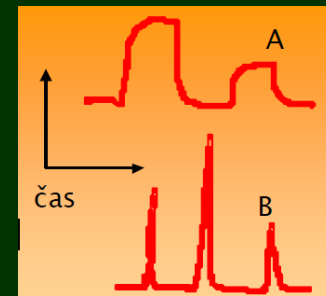




Přímý kontakt
se vzorkem



Měření v nádobce



Průtočné měření

Biorekogniční vrstva

Rozpoznává stanovovanou látku

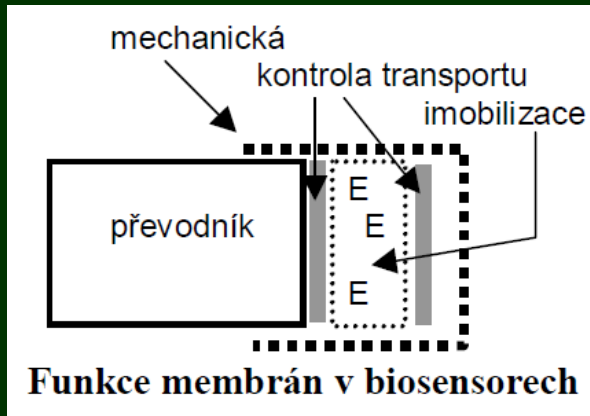
Biokatalytická reakce (specifická přeměna):
enzym, organela, buňka

Bioafinitní reakce (specifická vazba):
protilátka, nukleová kyselina (aptamer),
receptor, bakteriofág

Imobilizace molekul na povrch převodníků

Biosenzorové materiály: kovy, křemík, uhlík a kompozitní materiály

Membrány pro biosenzory: imobilizace biorekogničních molekul, řízení transportu látek (difuze, selektivita), zajištění mech. stability a biokompatibility



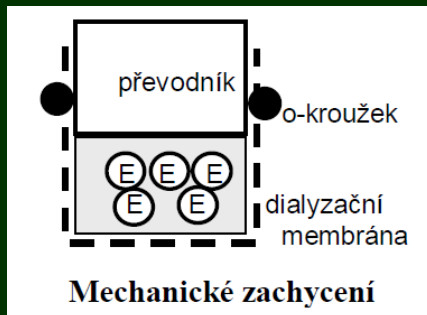
Hrubě porézní (pory nad 5 nm): např. skleněná frita, permeabilitu ovlivňuje rozdíl hydrostatického tlaku na obou stranách, osmot. tlak se neuplatňuje, špatná permselectivita (projde vše)

Jemně porézní (pory 1 až 5 nm): např. acetylcelulosa, difuze, permeabilita dána velikostí rozpuštěných látek

Neporézní: rozpouštědlo prochází difuzí

Mechanická imobilizace biomolekul: zejména pro biokatalytické senzory

- **mechanické zachycení:** kápnutí roztoku biokomponenty + zakrytí dialyzační membránou (celulosa, acetylcelulosa, polykarbonáty)



- **adsorpce:** někdy ve spojení s povrchem grafitu, reverzibilní proces na bázi hydrofobních interakcí, iontových sil, vodíkových můstků)

Zachycení v gelu: inkluze biomolekuly uvnitř struktury membrány

Polyakrylamid: směs akrylamidu, methylen-bis(akrylamidu) a enzymu, iniciace UV

Želatina: často pro enzymové membrány. 5% želatina nabobtnat ve vodě a přidá se enzym, nechá se vyschnout, přiložit na povrch převodníku, překrýt dial. membránou

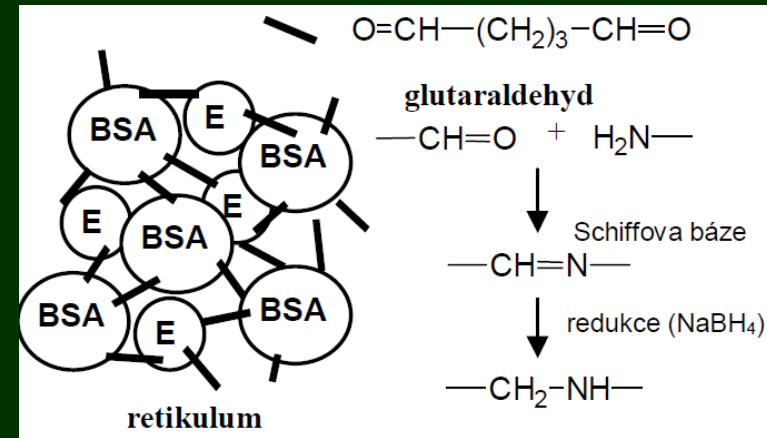
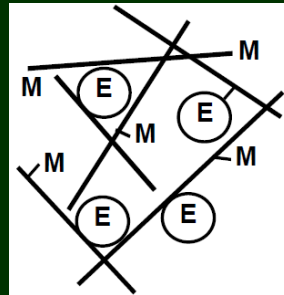
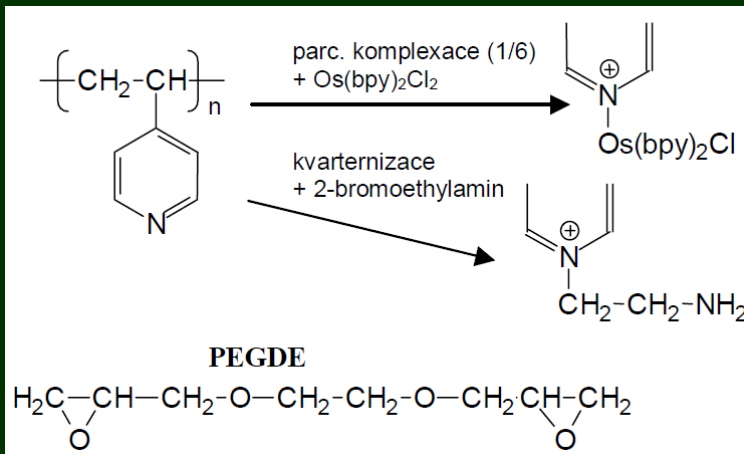
Nafion: pro tvorbu permselektivních membrán, také funguje jako inotoměnič akukumulující kationty a odpuzující anionty

Polyvinylalkohol (PVA): hydrofilní, neutrální, biokompatibilní, zesíťováním se tvoří polymer. Radiační polymerace ozáření směsi oligomerů a enzymu gama zářením (možnost poškození biomolekul). Pro chemické zesíťování PVA se používají triisokyanáty TIC, které spojují postranní hydroxyly PVA

HEMA (poly (2-hydroxyethylmethakrylát): hydrofilní, biokomp. polymer. Směs s vodným roztokem enzymu se nechá zmrazit -80 C, poté polymerace gama zářením. Možnost poškození biomolekul

Zajímavou a úspěšnou kombinací jsou speciální polymery kombinující funkci imobilizace enzymu s polymerní strukturou nesoucí skupiny mediátorů přenášející elektrony, tzv. **redox relays**. Výchozím materiálem je poly-4-vinylpyridin. Ten se částečně využije pro tvorbu komplexu s osmiem (mediátor), a částečně se do něj kvarterizací zavedou reaktivní aminoskupiny.

Pak se směs modifikovaného oligomeru, enzymu a bifunkčního PEGDE nanese na povrch grafitové elektrody, kde se vytvoří biovrstva nesoucí uvnitř struktury fixované molekuly mediátoru



Zesíťování biomolekul: membránu lze vytvořit přímo z molekul enzymu či jiných bílkovin jejich zesíťováním vhodným bifunkčním činidlem, nejčastěji glutaraldehydem

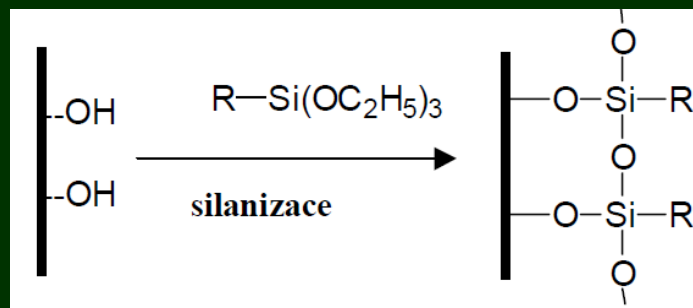
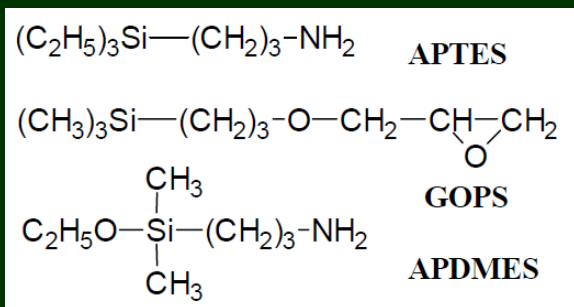
Kovalentní immobilizace biomolekul

Pracovní povrch senzorů: sklo, křemík, modifikace uhlíku (grafit, skelný uhlík, kompozitní směsi), ušlechtilé kovy (Au, Pt)

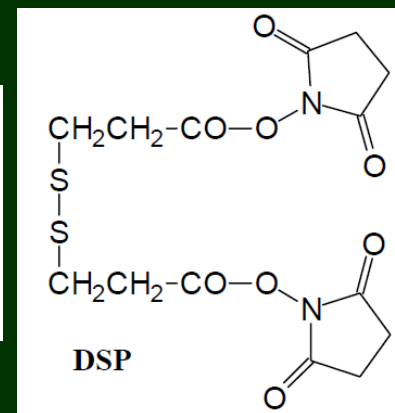
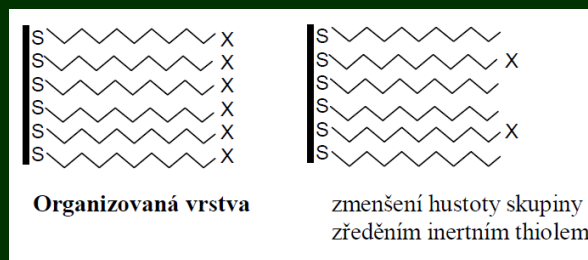
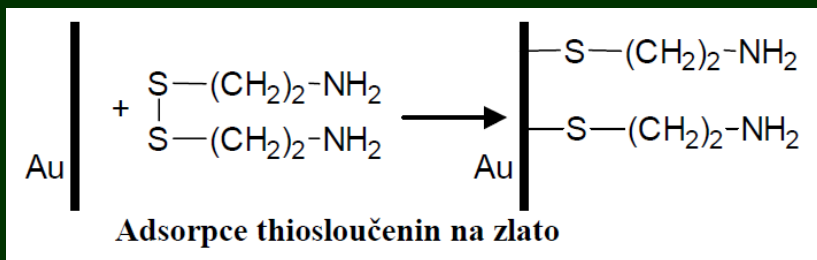
Immobilizaci nutno zajistit kovalentní vazbou

Úprava povrchu senzorů

1. Silanizace: aktivace povrchu kontaktní vrstvou silanu (gamma-aminopropyltriethoxysilan APTES nebo APTS a glycidoxypropyltriethoxysilan GOPS)



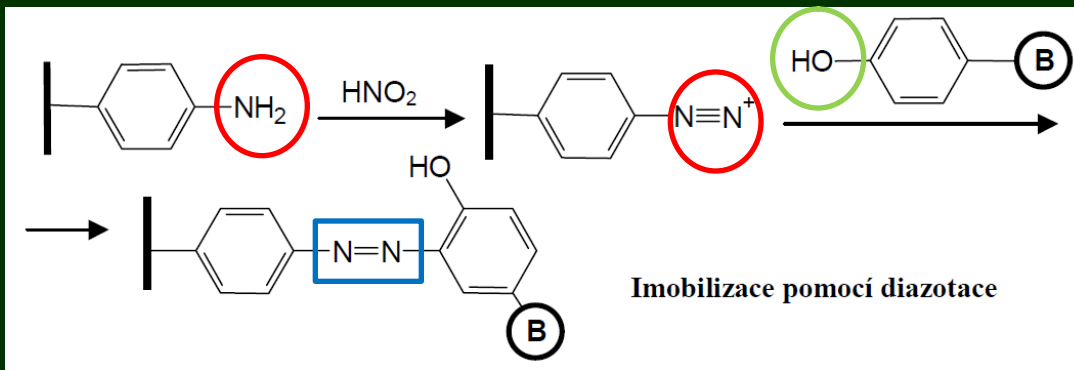
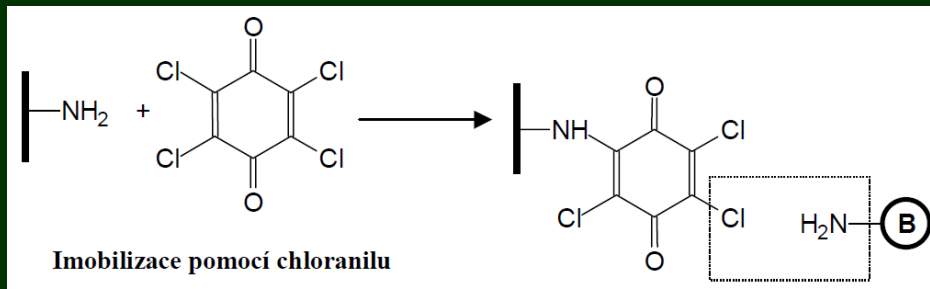
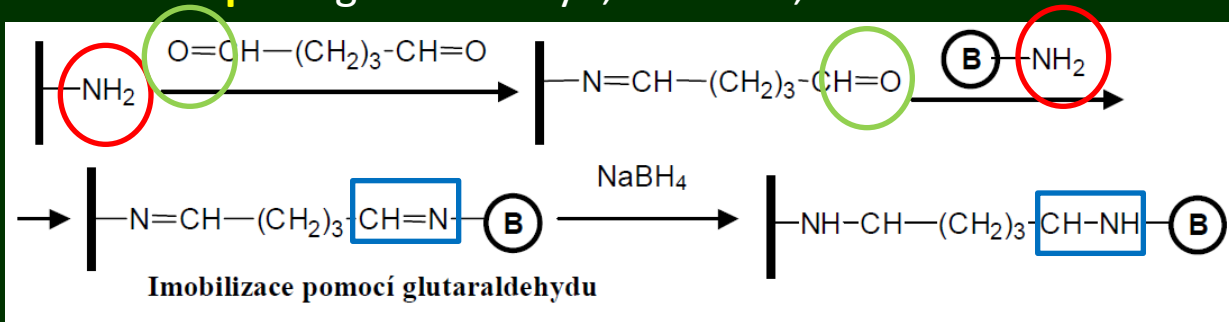
2. Spontánní tvorba monovrstev: pevné adsorpce thiosloučenin (thioly , disulfidy) na povrch Au, Pt a Ag



Bis(N-hydroxysukcinimidester kys. 3,3 -dithiopropionové DSP

Navázání biomolekul: předpokládá se vazba biomolekuly na některou z následujících funkčních skupin

1. Aminokupina: glutaraldehyd, chloranil, diazotační reakce

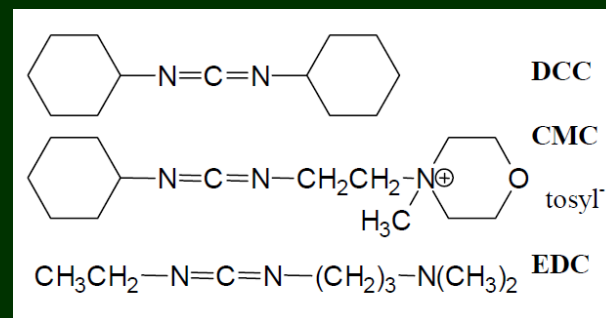
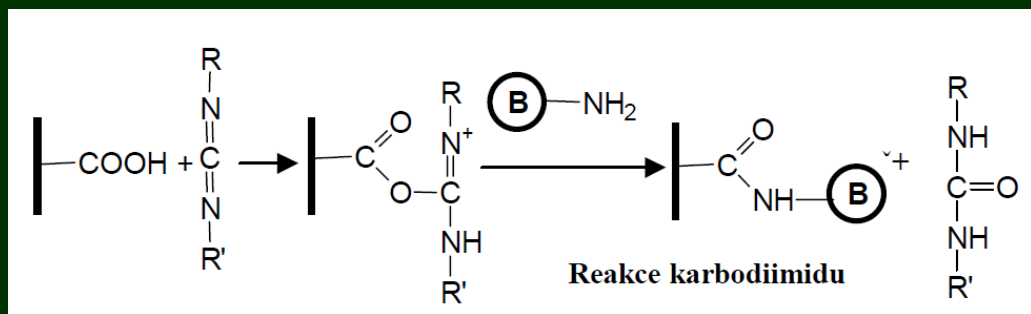


2. Karboxykupina: karbodiimidy, vznik amidové, sestrové či thioesterové vazby

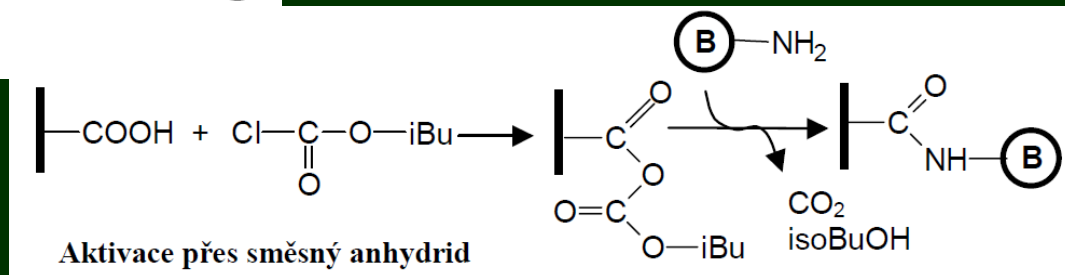
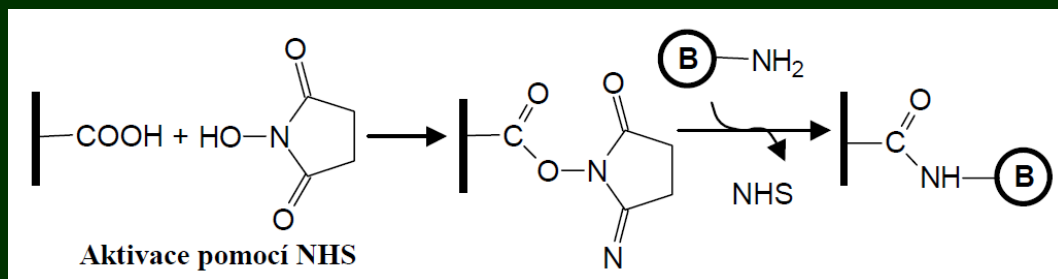
DCC (dicyklohexylkarbodiimid) ve vodě nerozpustný (provádět v DMFO)

EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid

CMC (1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)-karbodiimid methoxy-p-toluensulfonát

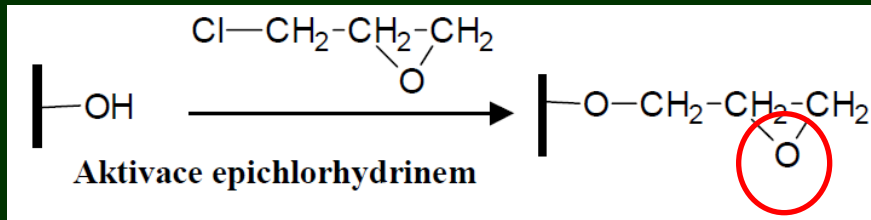


Citlivější bílkoviny: pomocí karbodiimidů a N-hydroxylsukcinimidu NHS, nebo přes směsné anhydridy

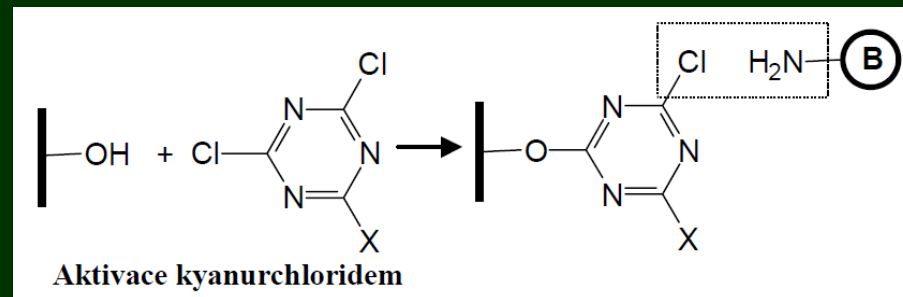
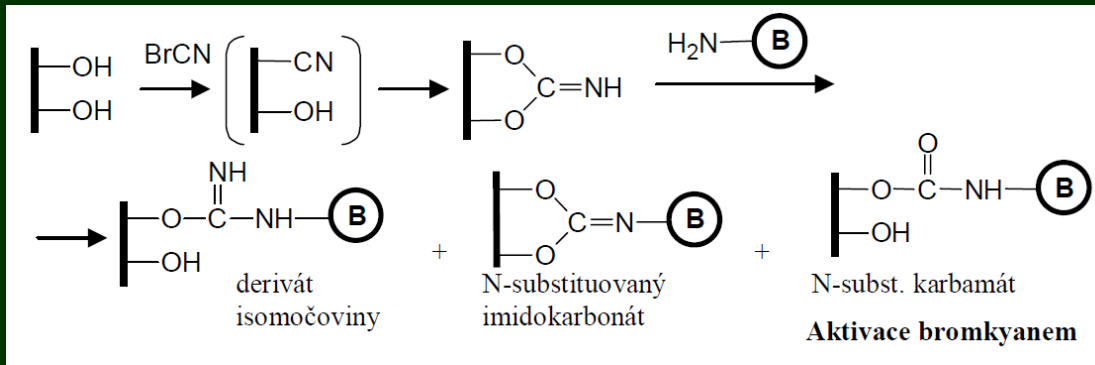


3. **Hydroxyskupina:** pro imobilizace na povrchy modifikované sacharidovou vrstvou (dextran)

- aktivace epichlorhydrinem, bromkyanem (jedovatý), triazinová metoda



oxyranová cykloadice biomolekul
přes NH₂- nebo OH-



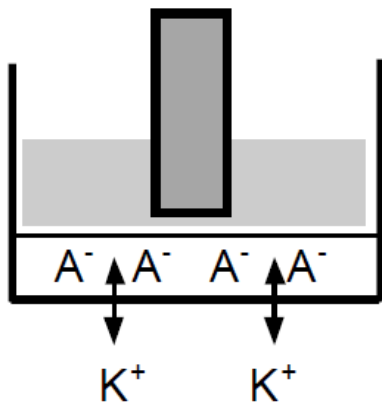
Biokatalytické senzory

Elektrochemické převodníky

- referentní elektrody, pomocné elektrody, pracovní elektrody

Potenciometrické elektrody:

- změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody a roztoku
- převodník: iontově-selektivní elektroda (ISE) s enzymovou vrstvou
- využití hlavně pro enzymové senzory
- rozsah měřitelných koncentrací závisí na ISE: 10 uM až 0,1 M, obvykle však 0,1 až 10 mM
- měří se potenciál pracovní elektrody proti referentní elektrodě, v systému přítom neteče proud



- * pH : penicilin (penicilináza), acetylcholin (cholinesteráza), glukóza (GOD), esterázy, nukleové kyseliny (nukleázy)
- * NH_3 / NH_4^+ : močovina (ureáza), aminokyseliny (deaminace - glutamát DH, oxidáza L-/D-aminokyselin; α, γ -eliminace amoniaku - L-methionin γ -lyáza), nitrát a nitrit (bakterie)
- * CO_2 : močovina (ureáza), aminokyseliny (lysin dekarboxyláza, tyrosin dekarboxyláza), laktát (laktát monooxygenáza - dekarboxylující oxidáza)
- * I^- : potenciometrická detekce peroxidu vodíku v přítomnosti peroxidázy
- * F^- : peroxid vodíku (peroxidáza - oxidace fluorofenolu)
- * CN^- : amygdalin (β -glukosidáza)

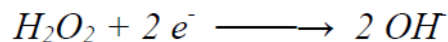
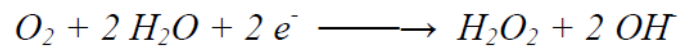
Amperometrické bioelektrody

- poskytují jako signál proud, který je úměrný koncentraci analytu.
- proud se měří při konstantním napětí pracovní elektrody
- velikost proudu prošlá za daný čas v systému pak udává náboj, který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách.
- elektrochemická oxidace na anodách
- redukční děje na katodách

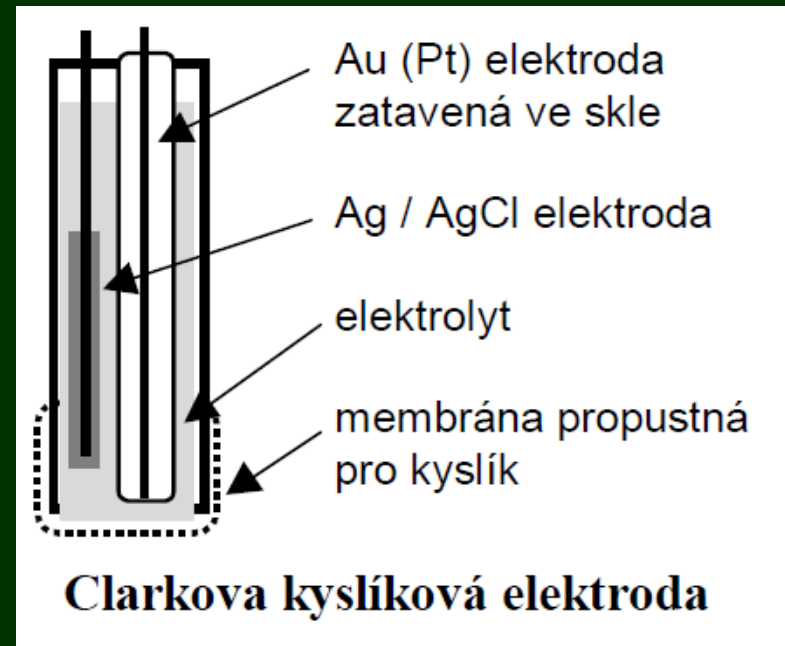
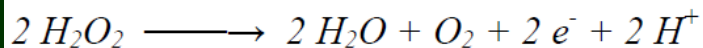
Biosenzory na bázi elektrod pro kyslík a peroxid vodíku

- raný typ biosenzorů typu enzymových elektrod, kyslíkové elektrody (Clarkovy)
- **membrána propustná pro kyslík** (teflon, polypropylen, polyetylen)

- **Katodická redukce kyslíku:**

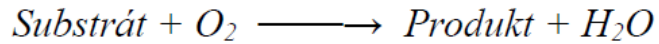
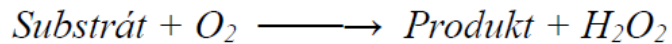


- **Anodická oxidace peroxidu vodíku:**



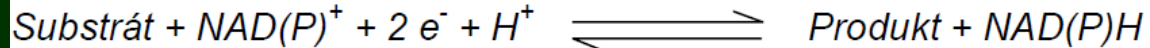
Enzymy oxidázy – jako biorekogniční element

- oxidace molekuly substrátu (analytu) za účasti kyslíku, vzniká peroxid vodíku nebo voda

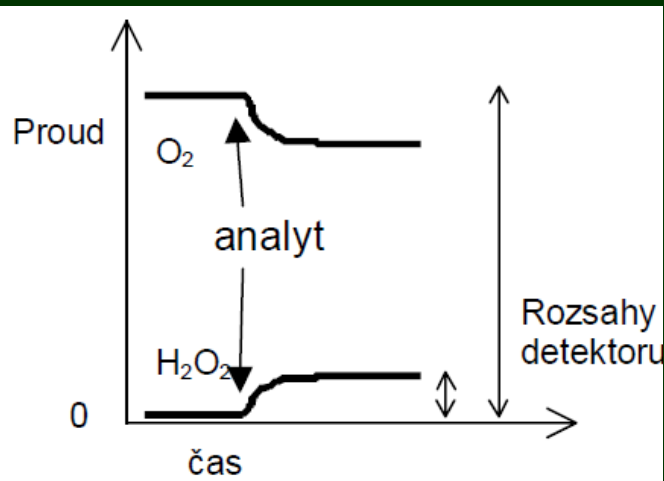


Enzymy dehydrogenázy – jako biorekogniční element

- katalyzují redoxní reakce s účastí NAD(P)⁺/NAD(P)H párů



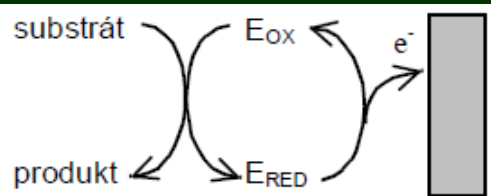
- Pro elektrochemickou detekci NADH je použitelná amperometrická reoxidace vznikajícího NADH.



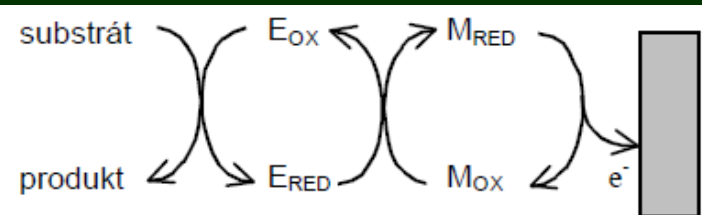
Oxidázové biosensory založené na detekci kyslíku nebo peroxidu vodíku

Substrát (oxidáza)	Zkratka	EC	Typ	H ₂ O ₂
Alkohol	AOD	1.1.3.13	FAD	+
L-Aminokyselin		1.4.3.2	FAD	+
D-Aminokyselin		1.4.3.3	FAD	+
L-Askorbát		1.10.3.3	Cu	-
Bilirubin		BRO	1.3.3.5	-
Diamin	DAO	1.4.3.6	Cu	+
Fenol (Tyrosinasa)		1.14.18.1	Cu	-
Galaktóza		1.1.3.9	Cu	+
Glukóza	GOD	1.1.3.4	FAD	+
L-Glutamát		1.4.3.11	FAD	+
Cholin		1.1.3.17	FAD	+
Cholesterol	COD	1.1.3.6	FAD	+
Lakáza		1.10.3.2	Cu	-
L-Laktát	LOD	1.1.3.2	FAD	+
L-Laktát (dekarb.)	LMO	1.13.12.4	FMN	-
L-Lysin		1.4.3.14		+
Monoamin	MAO	1.4.3.4	FAD	+
NADH				+
Oxalát		1.2.3.4	Fp	+
Pyruvát	PyOD	1.2.3.3	FAD	+
Sulfit		1.8.3.1	Mo	+
Urát (Urikáza)		1.7.3.3	Cu	+
Xanthin	XOD	1.1.3.22	Mo	+

Substrát DH	zkratka	EC
Alkohol	ADH	1.1.1.1
Aldehyd	AIDH	1.2.1.5
Alanin	Ala-DH	1.4.1.1
Formiát	FDH	1.2.1.2
Galaktosa	Gal-DH	1.1.1.48
Glycerol	Gly-DH	1.1.1.6
Glukosa	GDH	1.1.1.47
Glukosa-6-fosfát	G6P-DH	1.1.1.49
Glutamát	GIDH	1.4.1.3
3-Hydroxybutyrát	3-HBDH	1.1.1.30
3-Hydroxysteroid	3-HSDH	1.1.1.50
Isocitrát	ICDH	1.1.1.42
Inositol	IDH	1.1.1.18
L-Laktát	L-LDH	1.1.1.27
D-Laktát	D-LDH	1.1.1.28
L-Leucin	L-LeDH	1.4.1.9
L-Malát	L-MDH	1.1.1.37
Sorbitol	SDH	1.1.1.14

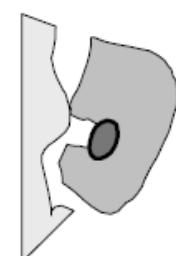
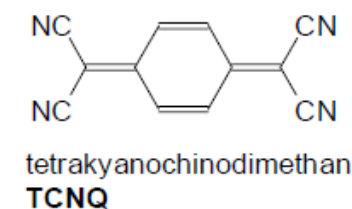
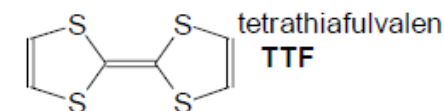
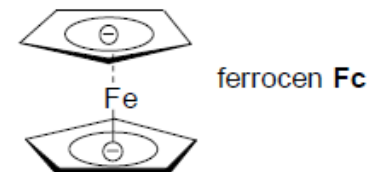


Přímý přenos elektronů

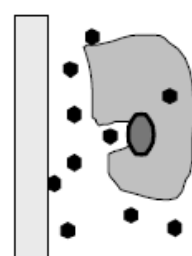


Přenos elektronů pomocí mediátoru

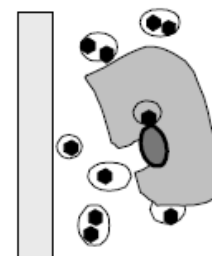
Mediátor	E° (V/SCE)
tris-(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III)	1.031
tris-(2,2'-bipyridyl)osmium(III)	0.603
ferrocen-1,1'-dikarboxylová kyselina	0.403
ferrocenylmethyltrimethylamonium ⁺	0.388
1,1'-bis(hydroxymethylferrocen]	0.224
ferrokyanid $K^+[Fe(CN)_6]^{4-}$	0.190
hydroxyethylferrocen	0.161
N,N' -dimethyl-p-fenylendiamin	0.139
ferrocenová kyselina	0.124
p-benzochinon	0.039
N,N,N',N' -tetramethyl-p-fenylendiamin	0.029
2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP)	-0.016
1,2-naftochinon	-0.090
fenazin methosulfát (PMS)	-0.161
metylenová modř	-0.230
tetramethyl-p-benzochinon (durochinon)	-0.191
2-hydroxy-1,4-naftochinon	-0.378
fenosafranin	-0.493



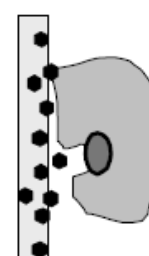
přímý přenos



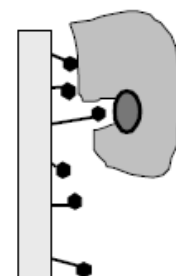
rozpuštěný



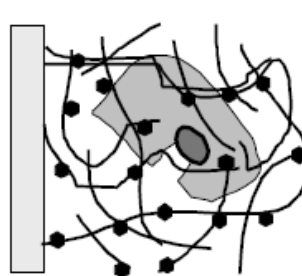
v micelách



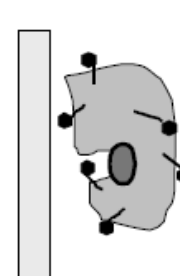
v kompozitní elektrodě



kovalentně navázaný na povrch elektrody



polymerní mediátor zachycující enzym

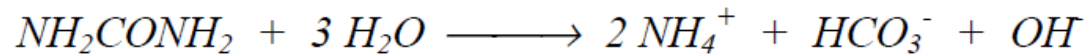


enzym modifikovaný mediátorem

Principy konstrukce bioelektrod s mediátory

Konduktometrické převodníky

- použití střídavého napětí na pracovní elektrodě (proti stejnosměrného u elektrochemických technik)
- měření vodivosti je málo specifické, takže se může uplatnit jako univerzální typ převodníku.
- Sledování změn vodivosti při biochemických reakcích vyžaduje produkci či spotřebu iontů nebo jiné změny (změna velikosti nabitých částic)
- produkce iontů je velmi často spojena s účinkem hydroláz a amidáz, změnu velikosti nabitých částic zase vyvolává účinek fosfatáz, fosfatáz a nukleáz.
- např. stanovení močoviny pomocí reakce ureázy:



- problém je vlastní vodivost prostředí, nutno používat málo vodivé pufrы (např. imidazol)

Kalorimetrické biosenzory (toto už není elektrochemie)

- využívají změny teploty v průběhu enzymatických reakcí.
- spíše okrajová záležitost, meze detekce do 10 μM , rozlišení 0,001 $^\circ\text{C}$

Vývoj tepla při biochemických reakcích (–kJ/mol):

Kataláza	GOD	Hexokináza	Laktát DH	Ureáza	Urikáza
H_2O_2	glukóza	glukóza	pyruvát	močovina	kys. močová
100	80	28	62	61	49

Dva nejběžnější enzymové biosenzory

1. Glukometr

- stanovení glukosy v krvi (diabetes)
- praktický lineární rozsah do 20 mM a LOD 0,1 mM
- imobilizovaný enzym: glukóza oxidáza (*A. niger*, *Penicilium notatum*) se dvěma PAD kovalentně vázanými na podjednotky
- nebo glukóza dehydrogenáza (NAD⁺ dependentní)
- dnes také PQQ-dependentní glukóza dehydrogenáza z *Acinetobacter calcoaceticus* (PQQ je koenzym pyrolochinolinochinon) – snadný přenos elektronů na mediátor (ferrocen)
- dále také pyranóza oxidáza, reaguje i s dalšími sacharidy

2. Biosenzor pro stanovení ethanolu

- v nápojích a také u řidičů z dechu
- výhradní užití alkohol oxidázy z kvasinky *Pichia pastoris*
- specifická aktivita kolem 40 IU/mg

Optické enzymové systémy

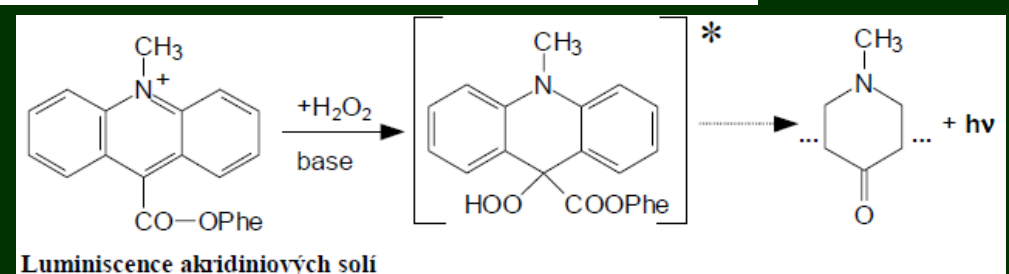
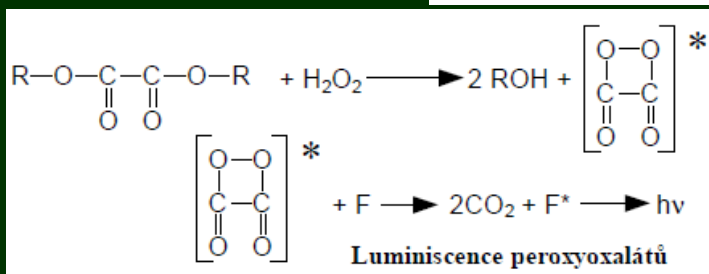
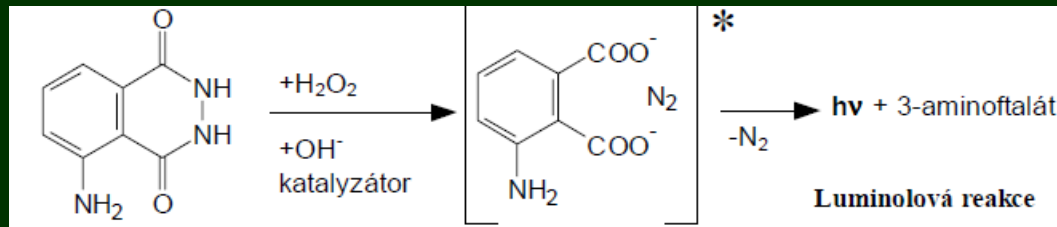
- využití planárních světlovodů nebo optických vláken
- přímé a zprostředkované
- u přímého typu se opticky měřená látka (nejčastěji fluorofor) přímo vyskytuje v biokatalytické reakci (měříme např. NADH (pro stanovení alkoholu), nebo FADH. NADH je slabý fluorofor, kvant.výtěžek = 0,02, ex/em = 350/450 nm)
- biorekogniční element jsou dehydrogenázy imobilizované před koncem optického vlákna
- zprostředkované: využívají optické indikátory (nejčastěji pro pH a kyslík)
- detekce kyslíku: zhášení fluorescence (kyselina pyromásečná, perylen, dekacyklen, organokovové komplexy ruthenia)
- pH změny pomocí acidobazických fluorescenčních indikátorů (1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonová kyselina, nebo 4-methylumbelliferon)

Chemiluminiscence:

- pro detekci peroxidu vodíku se používá luminol, peroxyoxaláty nebo akrydinové soli

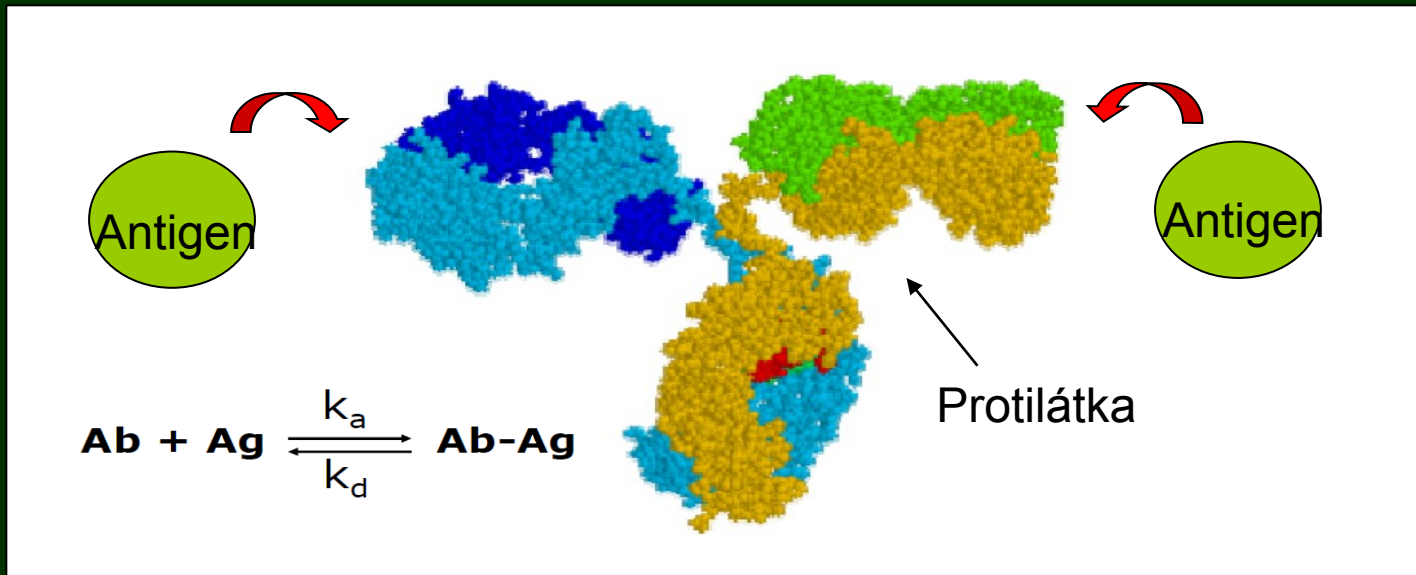
Bioluminiscence:

- využití luciferázy



Bioafinitní senzory

Využívají jako biorekogniční složku biomolekuly, tvorba biokomplexu s molekulou analytu.



Bioafinitní senzory

jeden z afinitních partnerů imobilizován na povrchu převodníku

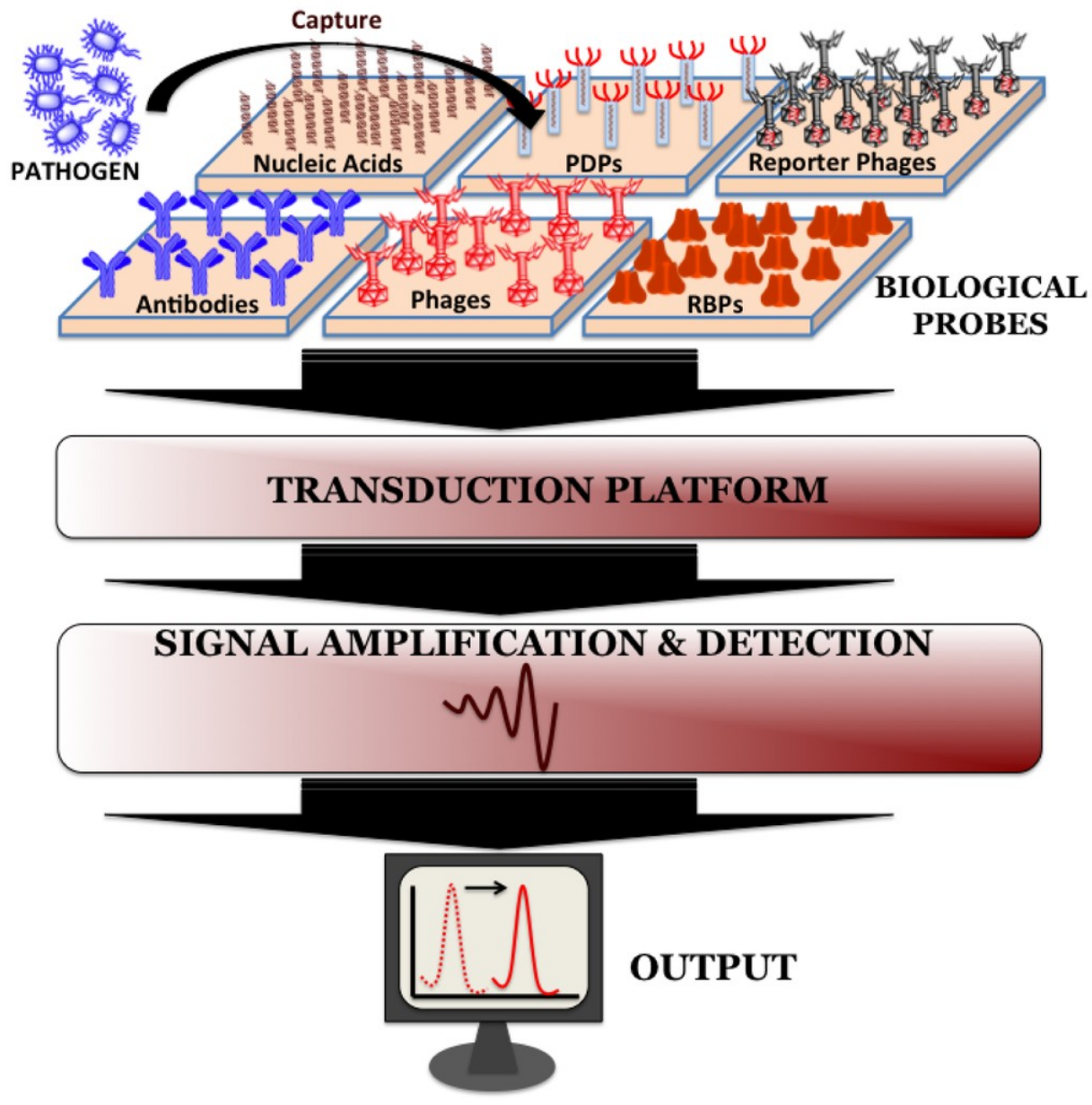
- **přímé afinitní biosensory**

- vznik biokomplexu je možné sledovat přímo v průběhu afinitní interakce (v reálném čase)

- jako převodníky slouží speciální optické světlovodné systémy nebo piezosensory

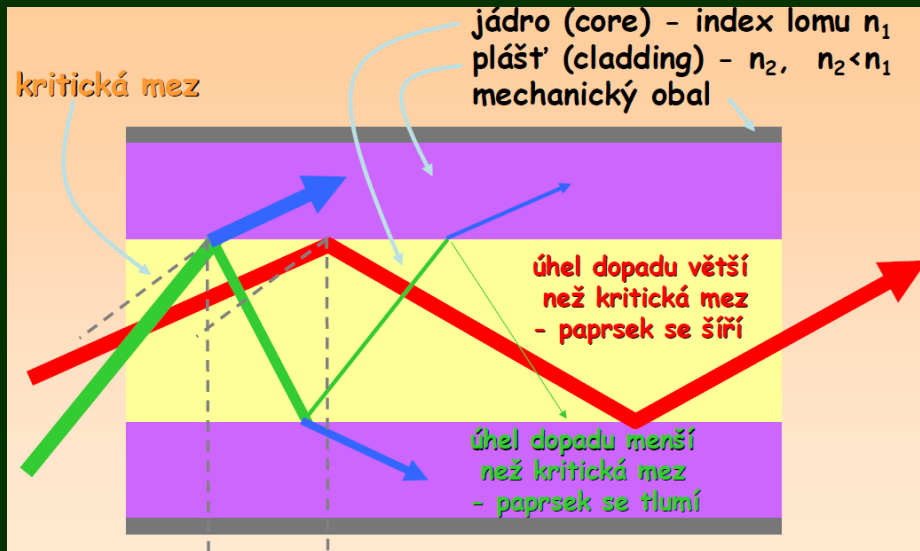
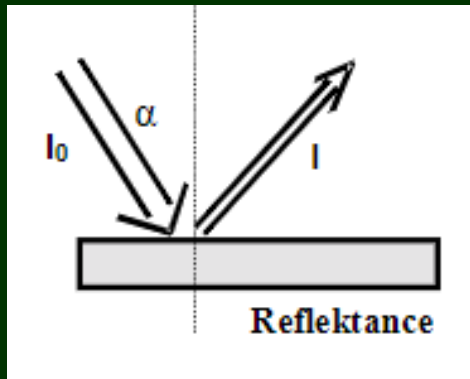
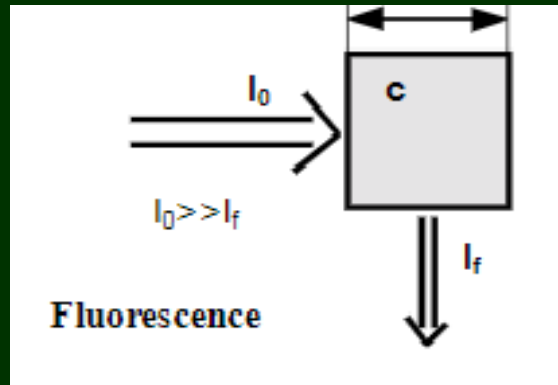
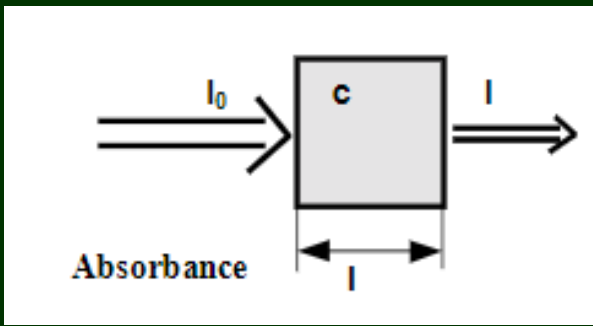
- **nepřímé afinitní biosensory**

- jeden z afinitních partnerů je vhodně označen, na konci interakce se pak stanoví množství značky navázané na povrchu sensoru



Převodníky pro přímé afinitní senzory

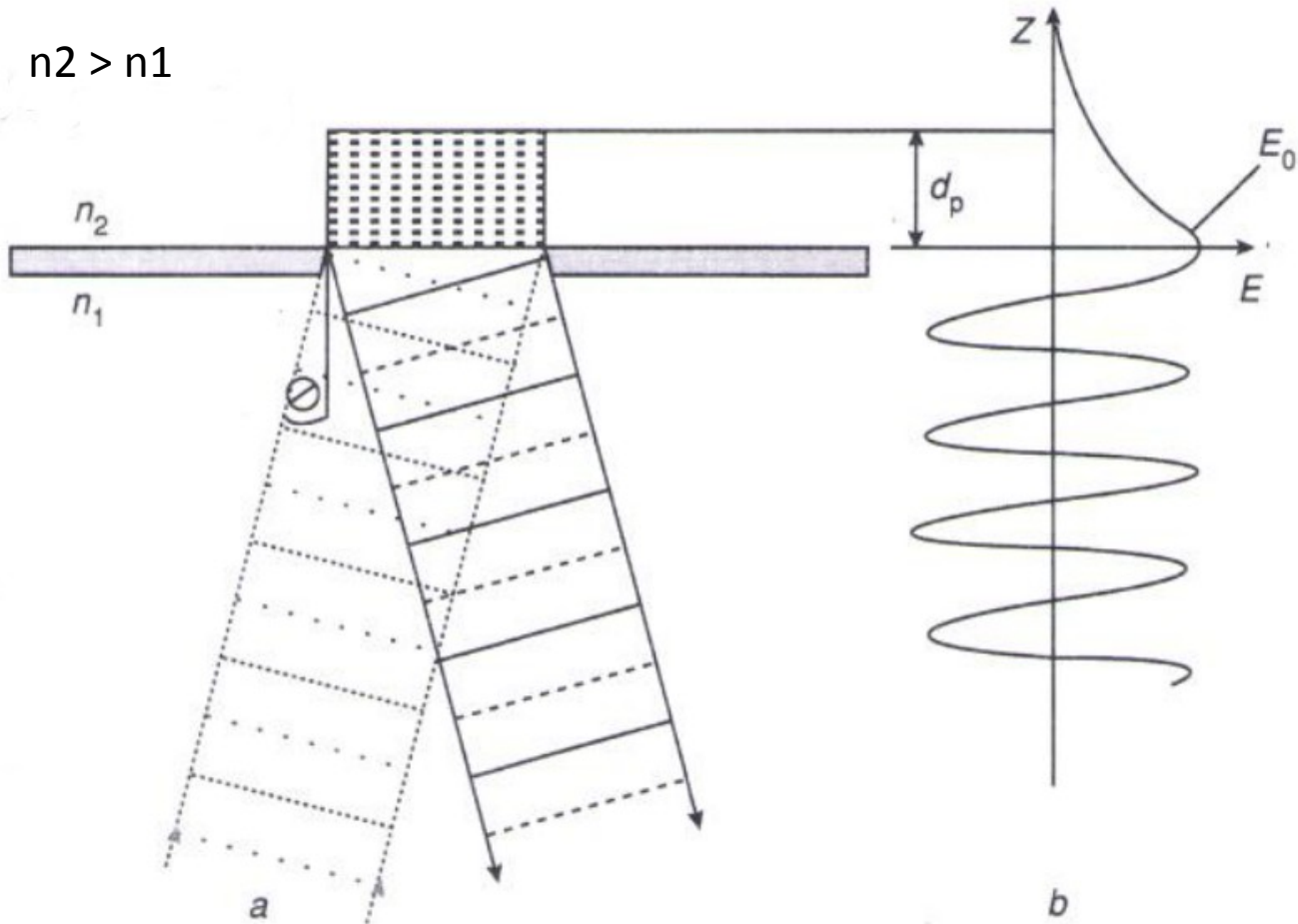
- vznik biokomplexu průběžně v reálném čase bez pomoci značek
- jeden reakční partner je imobilizován na povrchu převodníku, druhý je volně v roztoku, průběžně se sleduje vazba na citlivém povrchu
- měřený signál odráží pouze změny na povrchu sensoru a v jeho těsné blízkosti
- **optické převodníky**
- **piezoelektrické převodníky**
- **použitelné pro imunosenzory, DNA-senzory, fágové senzory atd.**

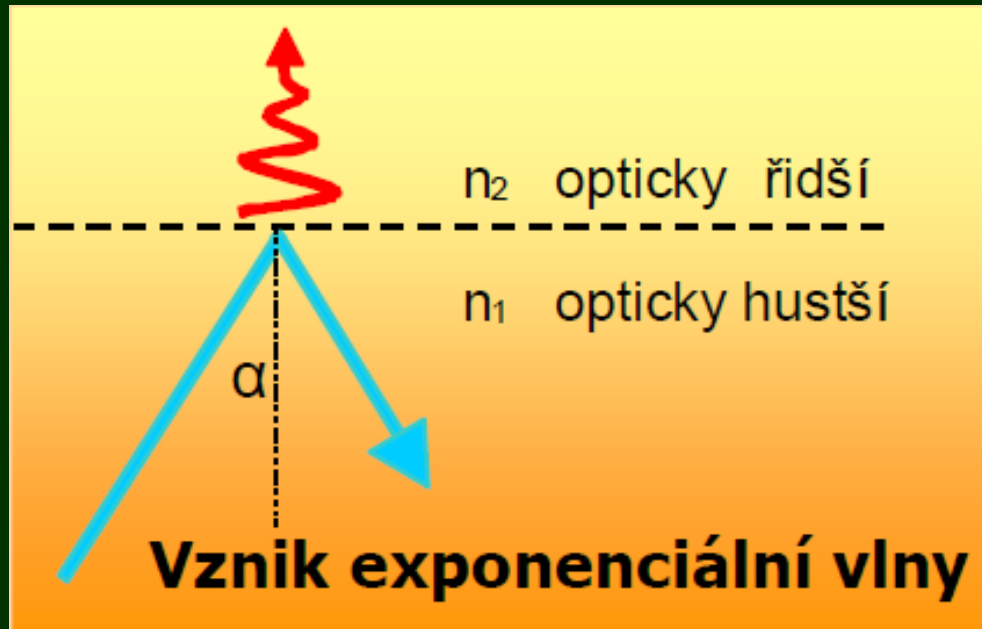


Odraz světla od vhodného povrchu. Při totálním odrazu světla proniká část energie ve formě exponenciální vlny (zhášivá vlna, evanescentní vlna) do spodních vrstev, což se využívá při studiu povrchových jevů

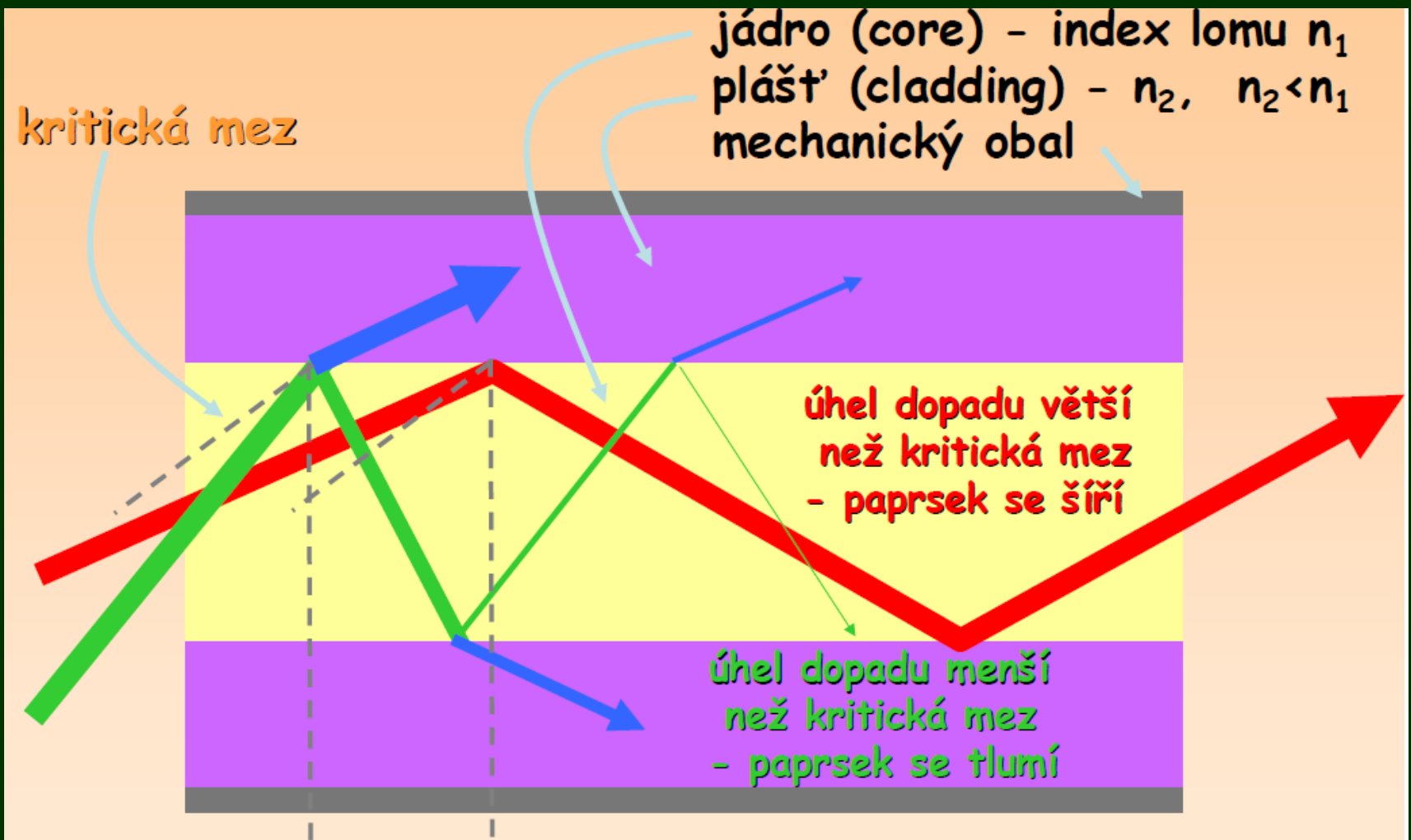
Evanescentní vlna

$n_2 > n_1$



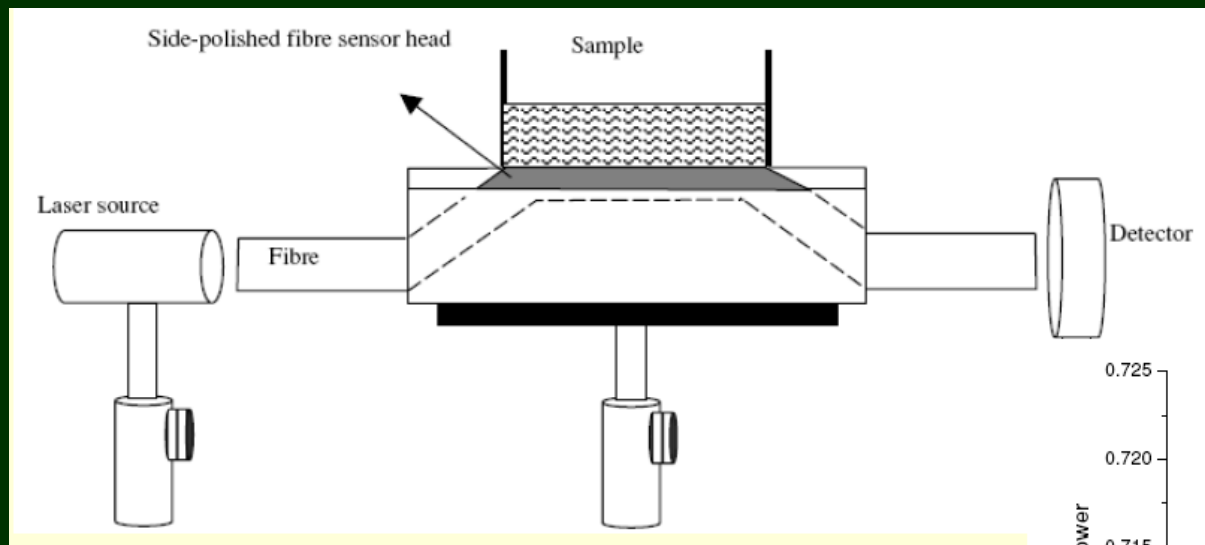


Exponenciální vlna: šíření světla světlovodem – interference mezi dopadajícím a odraženým paprskem – vznik elmag. stojatého vlnění, tzv. exponenciální vlna

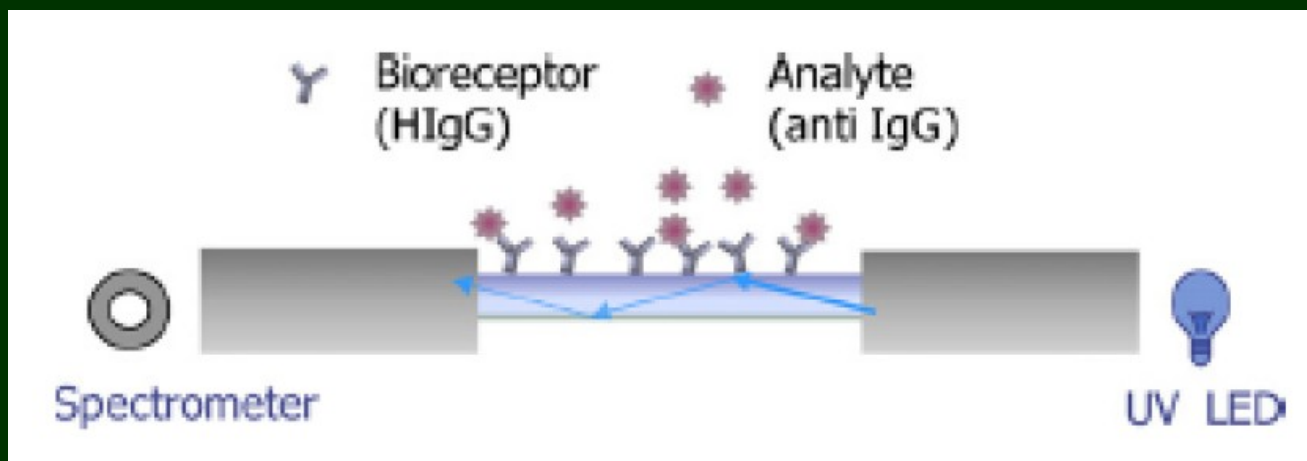


Odraz světla od vhodného povrchu. Při totálním odrazu světla proniká část energie ve formě exponenciální vlny (zhášivá vlna, evanescentní vlna) do spodních vrstev, což se využívá při studiu povrchových jevů

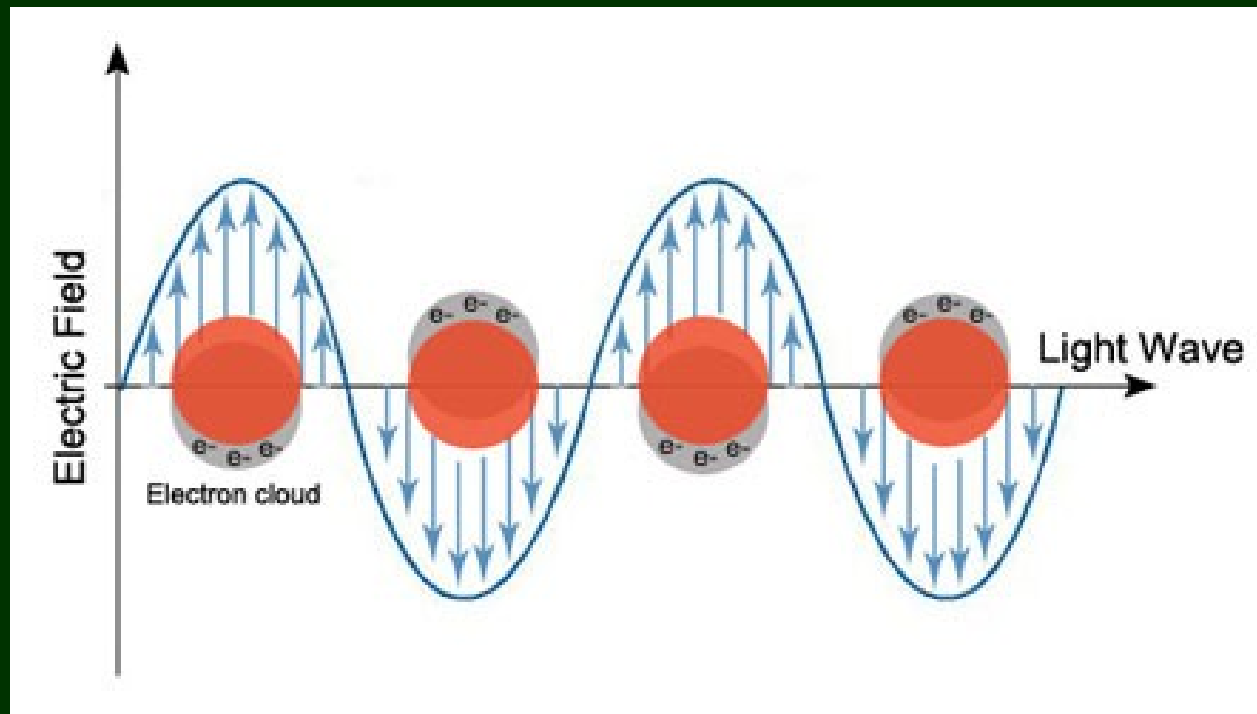
Refraktometrický převodník – změna extiknč. koef, indexu lomu



Zvýšení citlivosti zavedením afinitních převodníků



Povrchová plasmonová rezonance



Interakce exponenciální vlny s látkami na vnějším povrchu senzoru (změny indexu lomu v poli exp. vlny vyvolané navázáním biomolekul na citlivý povrch)

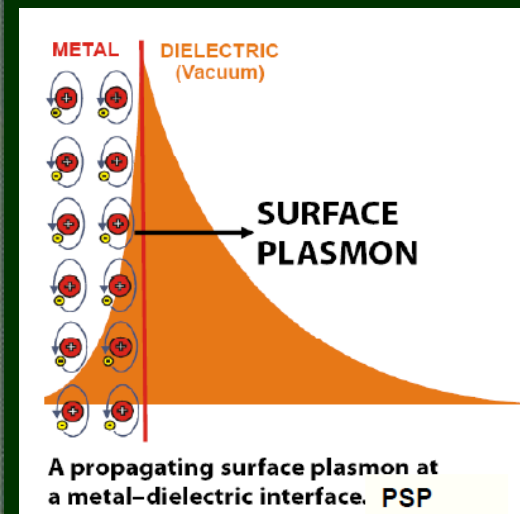
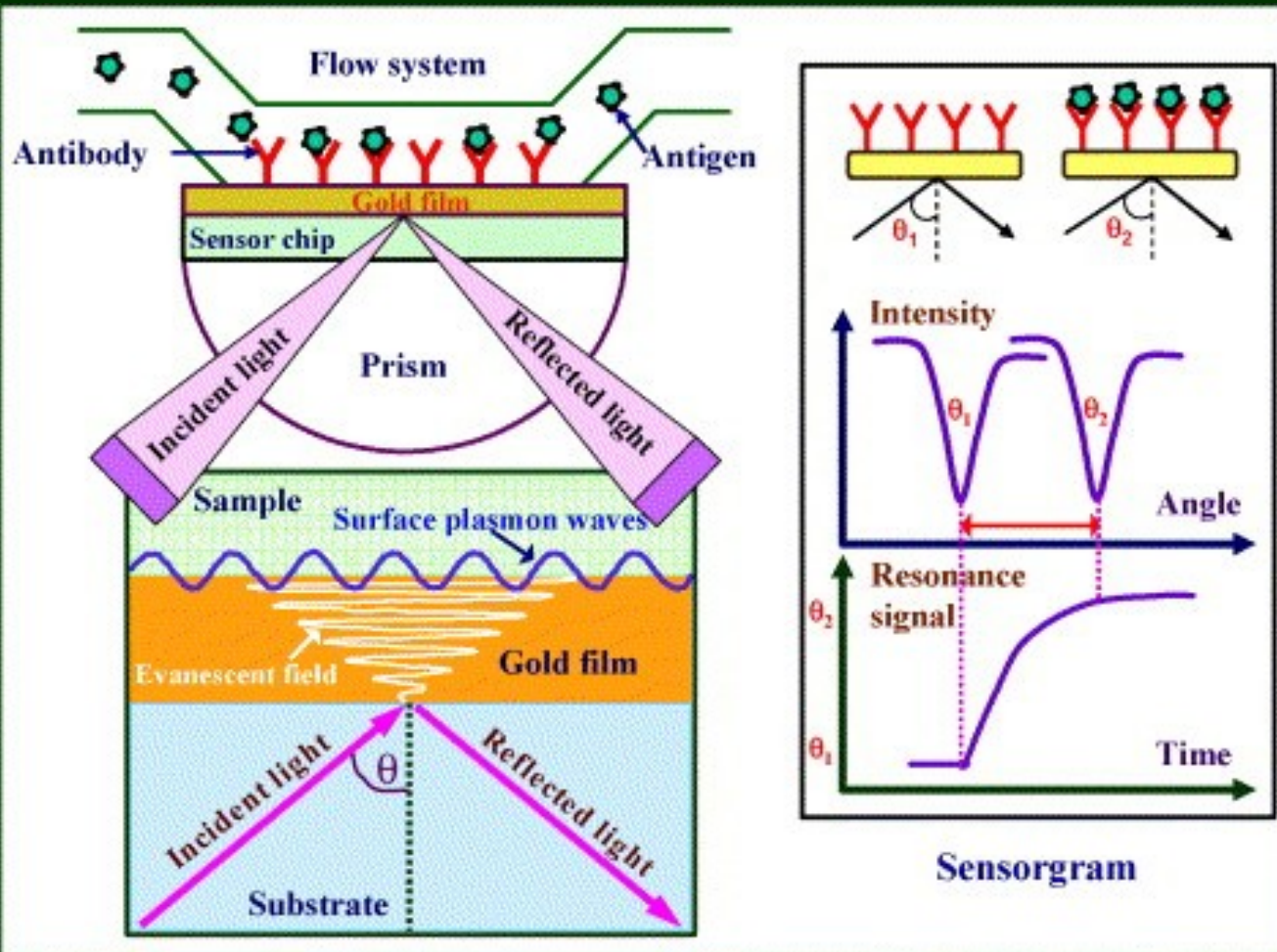


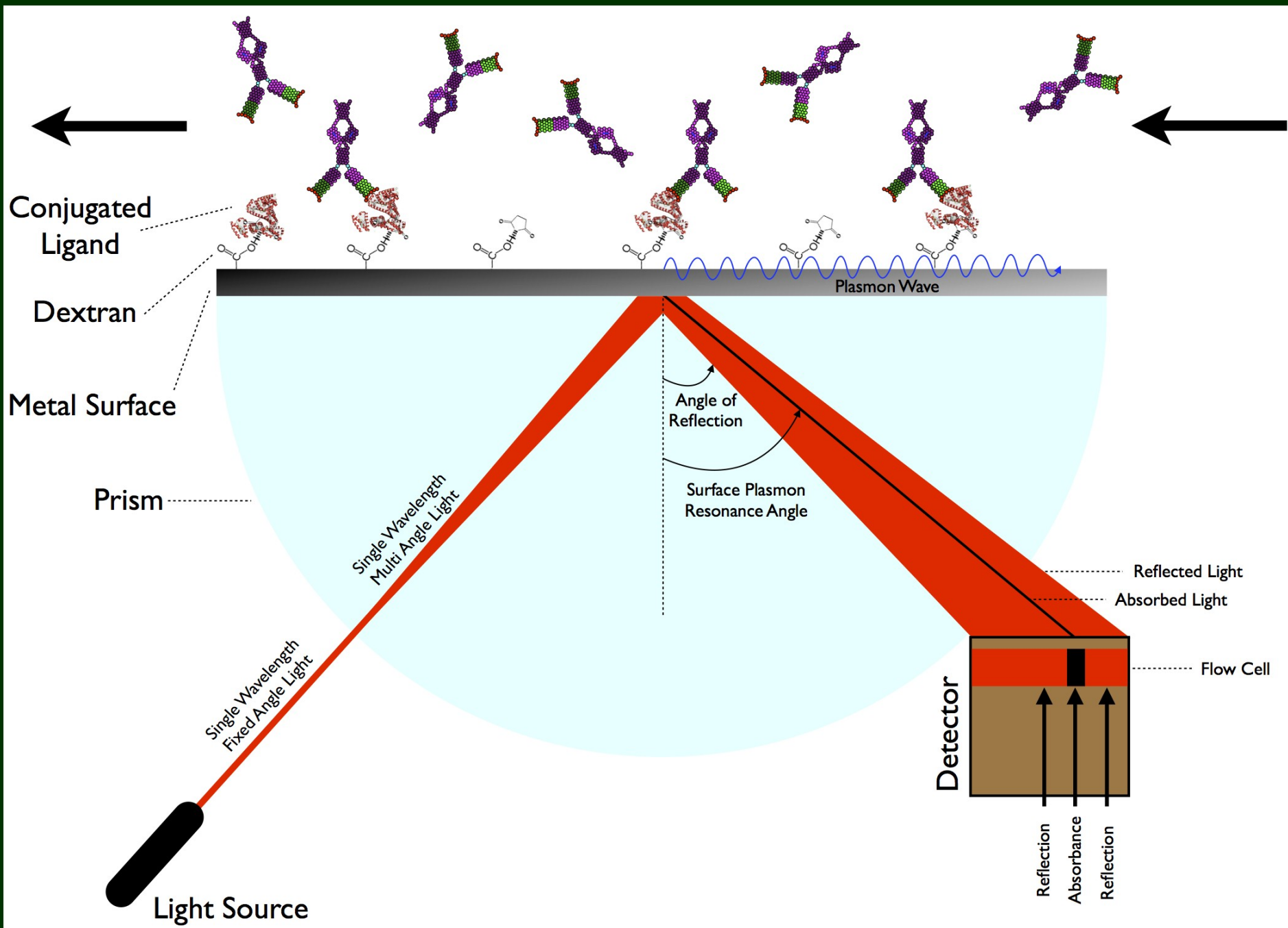
Změna podmínek pro šíření světla v optickém systému



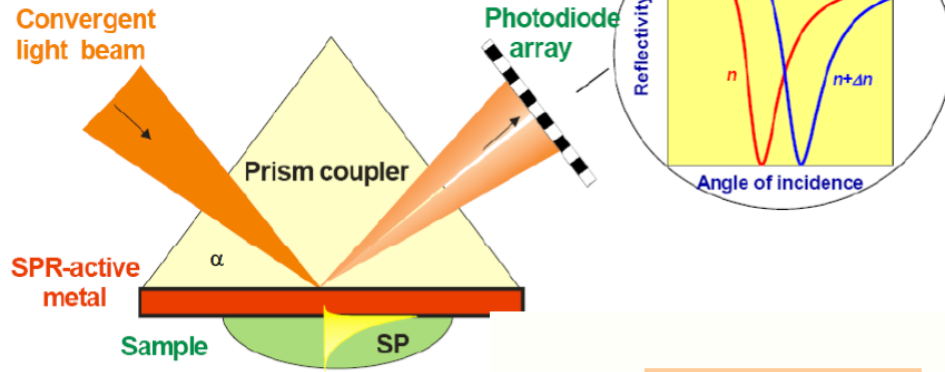
Kvantifikace podle změn **intenzity** nebo **fázového posunu** vedeného světla, které jsou úměrné množství povrchově navázané látky

Povrchová plasmonová rezonance („surface plasmon resonance“)





I. Angular spectroscopy

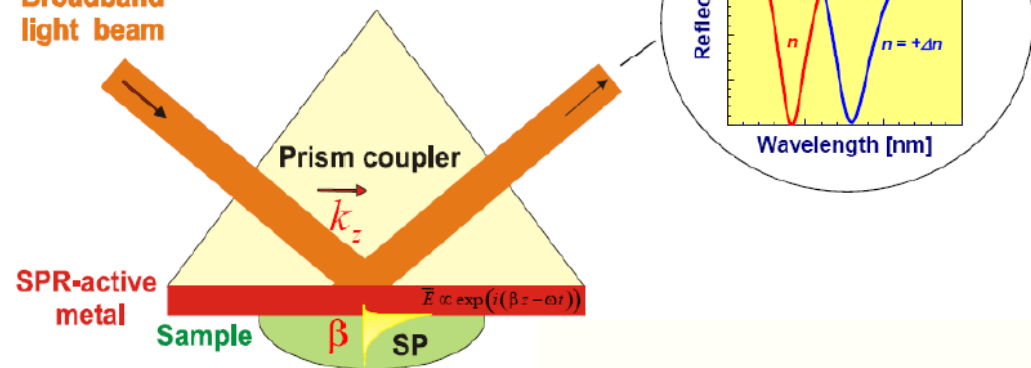


$$\Delta \alpha_r \approx \Delta n$$

FIXED WAVELENGTH!

II. Wavelength spectroscopy

Broadband light beam



FIXED ANGLE OF INCIDENCE!

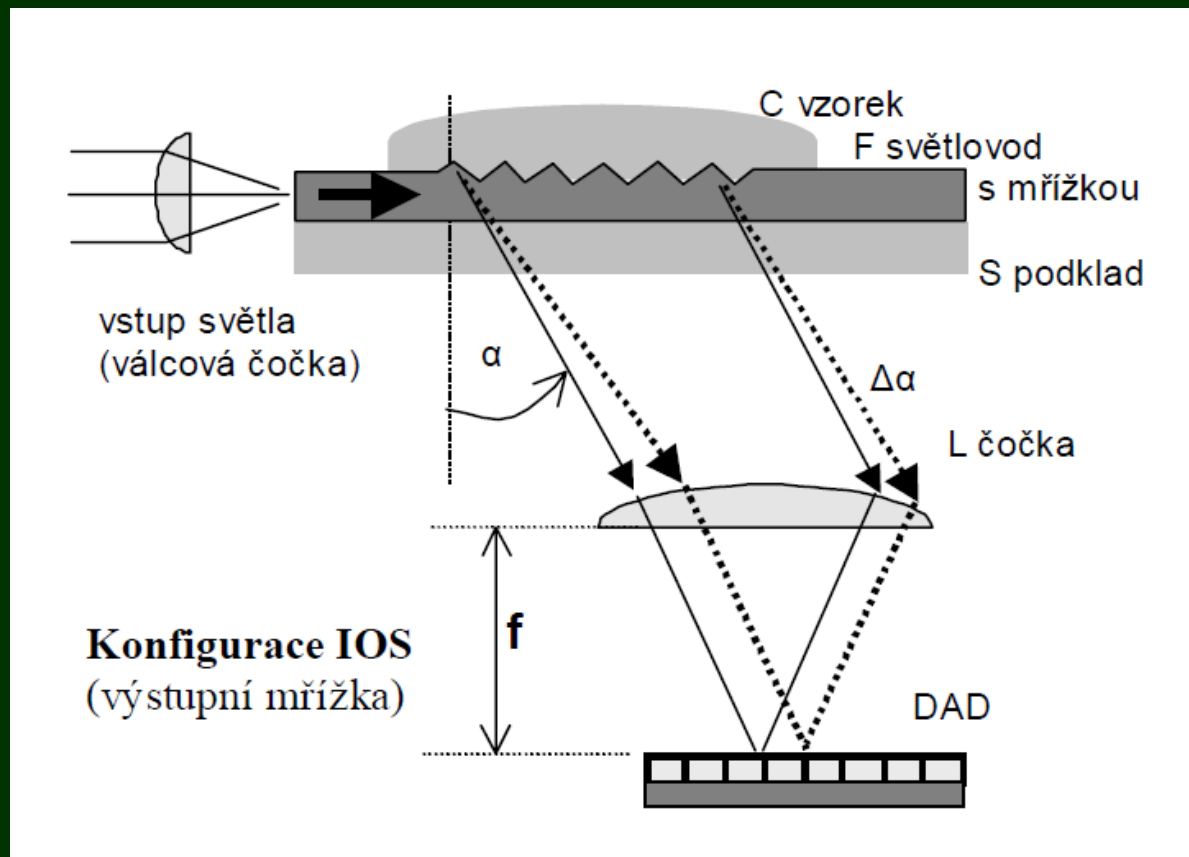
$$\Delta \lambda_r \approx \Delta n$$

SPR - video

<https://www.youtube.com/watch?v=sM-VI3alvAI>

IOS (INTEGRATED OPTICAL SENSOR) – výstupní mřížka

- citlivá oblast je umístěna v oblasti refrakční mřížky pro výstup světla z planárního světlovodu
- paprsek se zavede do světlovodu pomocí čočky, v oblasti difrakční mřížky vystupuje paprsek pod úhlem α
- po výstupu ze senzoru se svazek paprsků pomocí čočky sleduje pomocí detektoru citlivého na změnu pozice



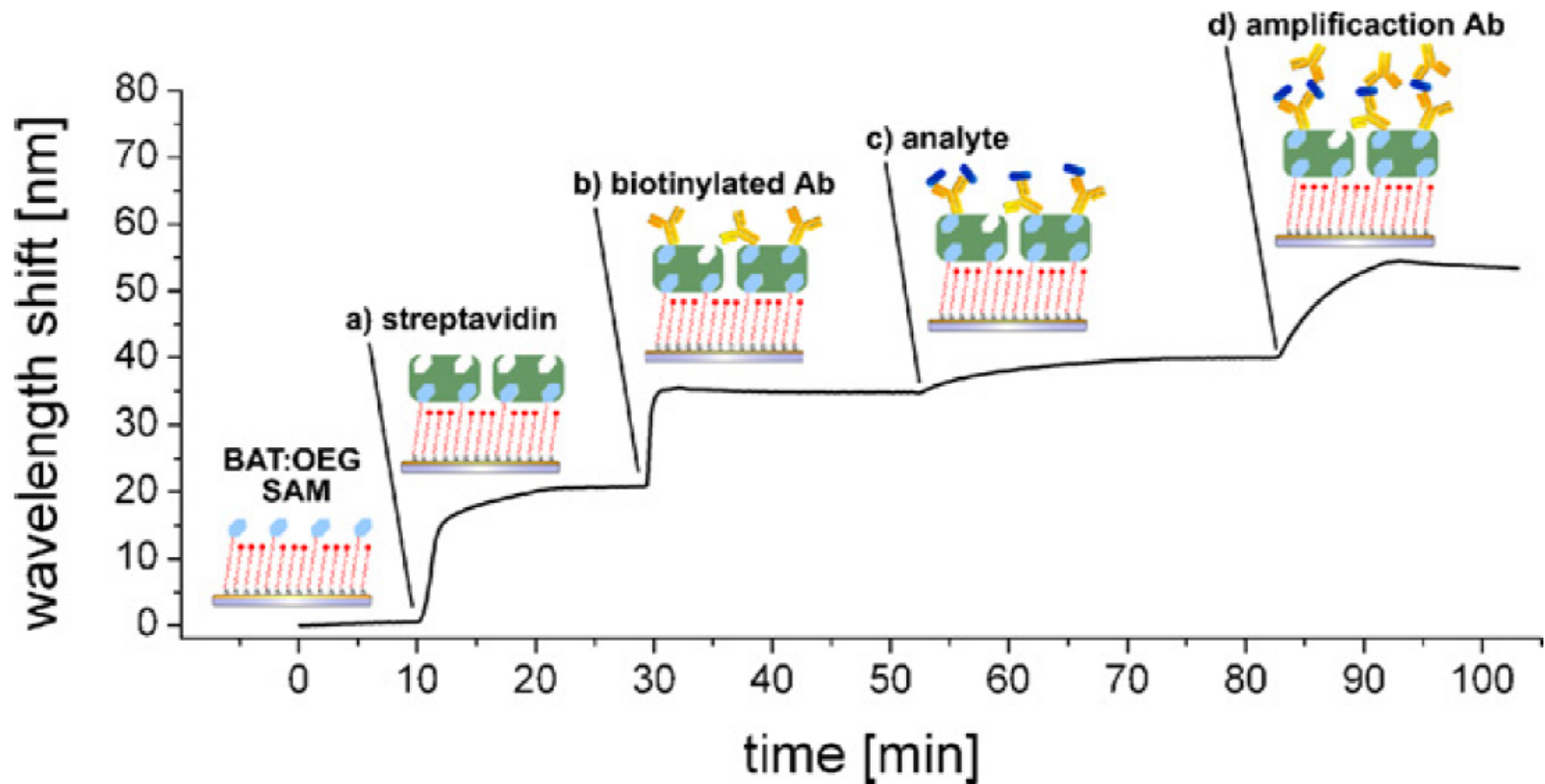


Fig. 2. Sensorgram showing (a) binding of streptavidin to an OEG:BAT mixed SAM on Au, (b) binding of biotinylated PAb to streptavidin, (c) direct detection of an analyte, and (d) secondary amplification using PAb.

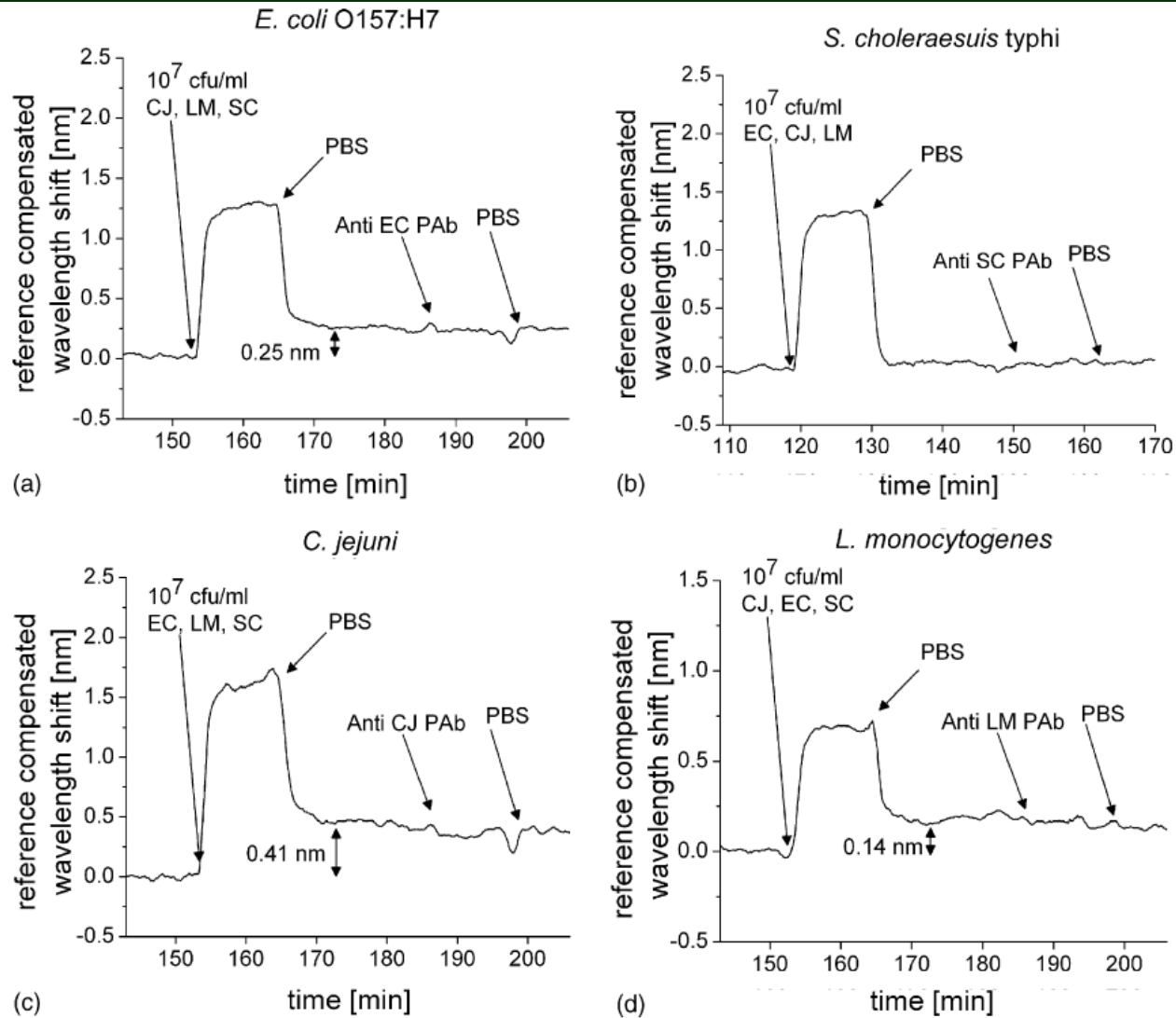


Fig. 4. Control experiments demonstrating that the sensor surfaces are relatively non-fouling to non-target species of bacteria and the amplification antibodies do not bind to non-target species of bacteria: (a) anti-*E. coli* O157:H7 (EC) sensor surface, (b) anti-*Salmonella choleraesuis* (SC) serotype typhimurium sensor surface, (c) anti-*Campylobacter jejuni* (CJ) sensor surface, and (d) anti-*Listeria monocytogenes* (LM) sensor surface.

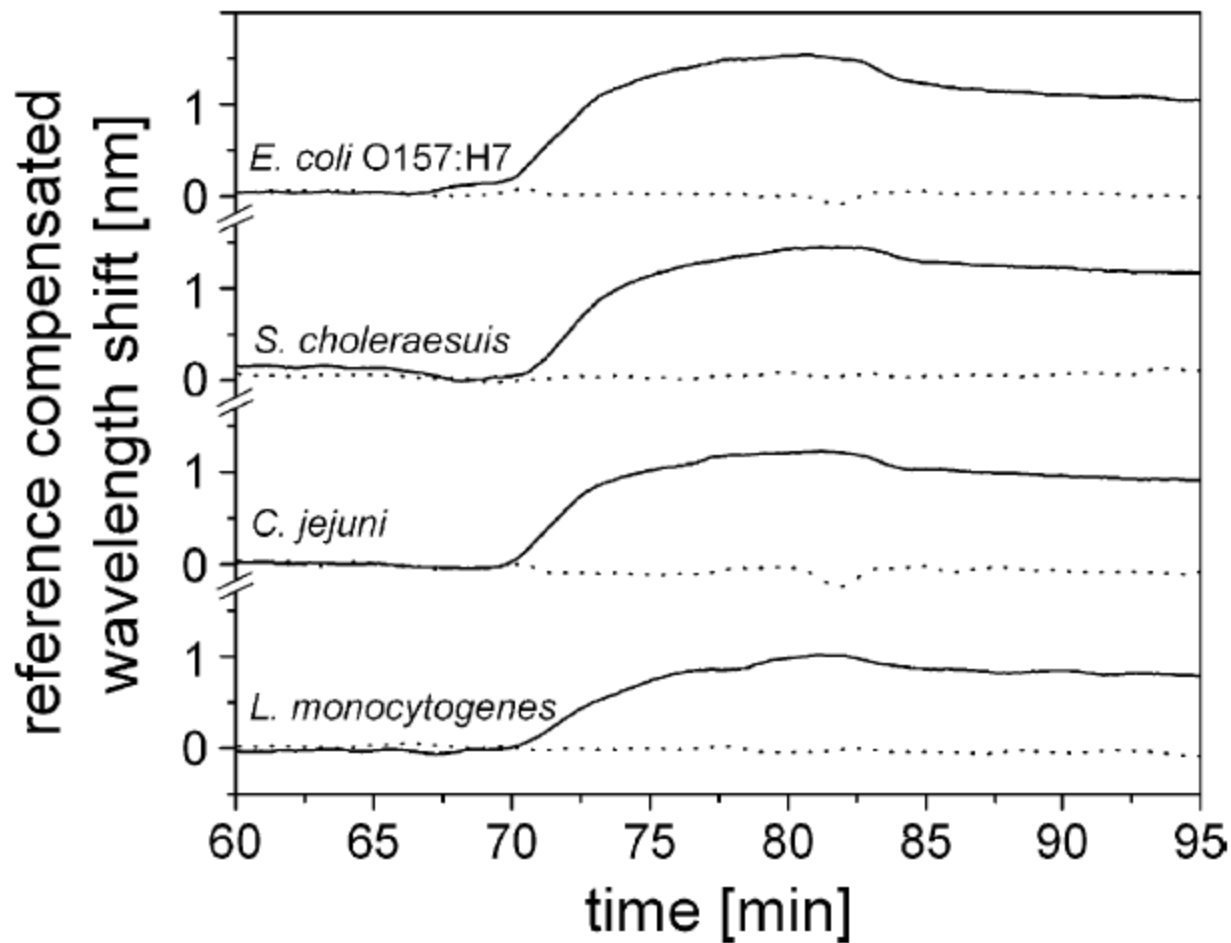


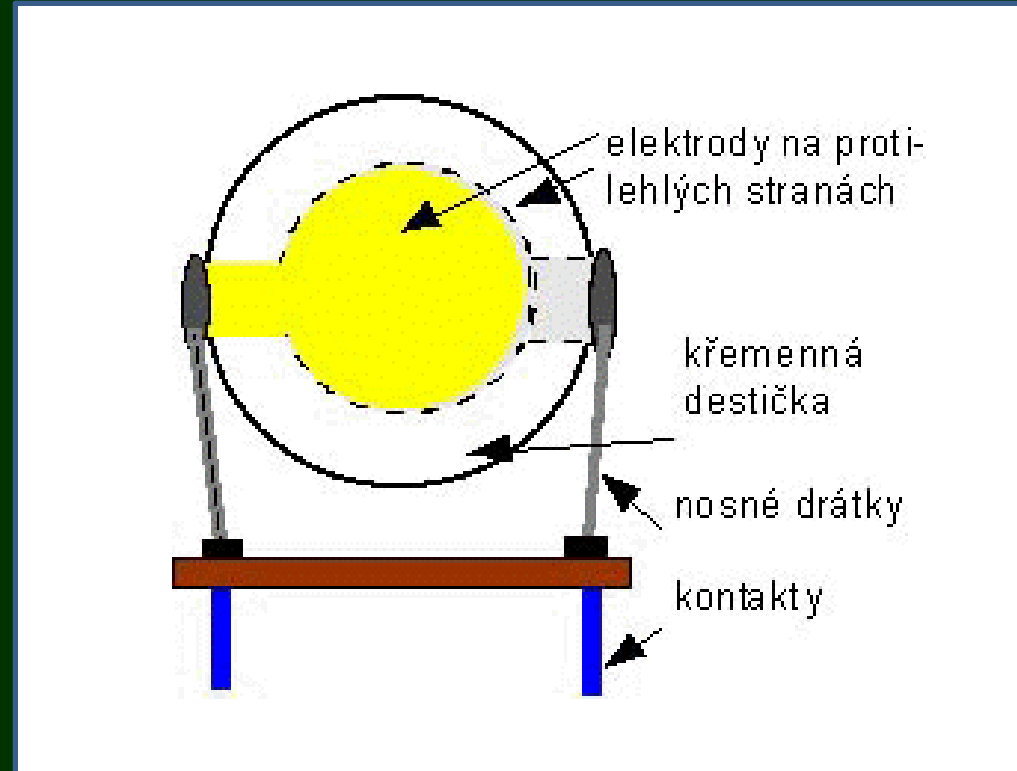
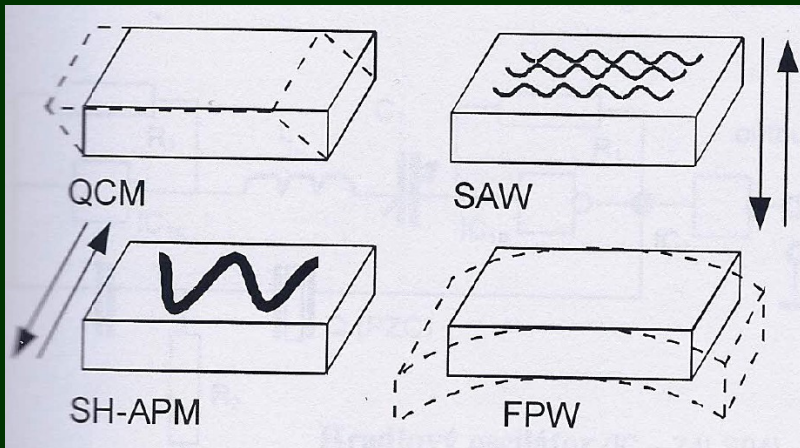
Fig. 5. Reference compensated SPR sensorgrams showing the simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens in a mixture (solid lines) (i.e. 5×10^5 cfu/ml *E. coli* O157:H7 (EC), 5×10^5 cfu/ml *S. choleraesuis* (SC) serotype typhimurium, 10^7 cfu/ml *C. jejuni* (CJ), and 5×10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* (LM)) compared to three non-target bacteria as control (dotted lines).

Piezelektrické biosenzory

Piezeletrický efekt

V anizotropních krystalech (křemen, turmalín, Rochellova sůl) vzniká při mechanickém namáhání elektrické napětí. Pokud se na krystal přivede střídavé napětí o vhodné rezonanční frekvenci, začne krystal se stejnou frekvencí vibrovat.

Piezoelektrické biosenzory



Po navázání látky na povrch elektrod dojde ke změně rezonanční frekvence. Změní se hmotnost celého systému a vibrace se zpomalí – frekvence poklesne.

Nepřímé afinitní senzory

Použití vhodného značkového systému:

fluorescence, chemi/bio-luminiscence, enzym

Průběh heterogenní:

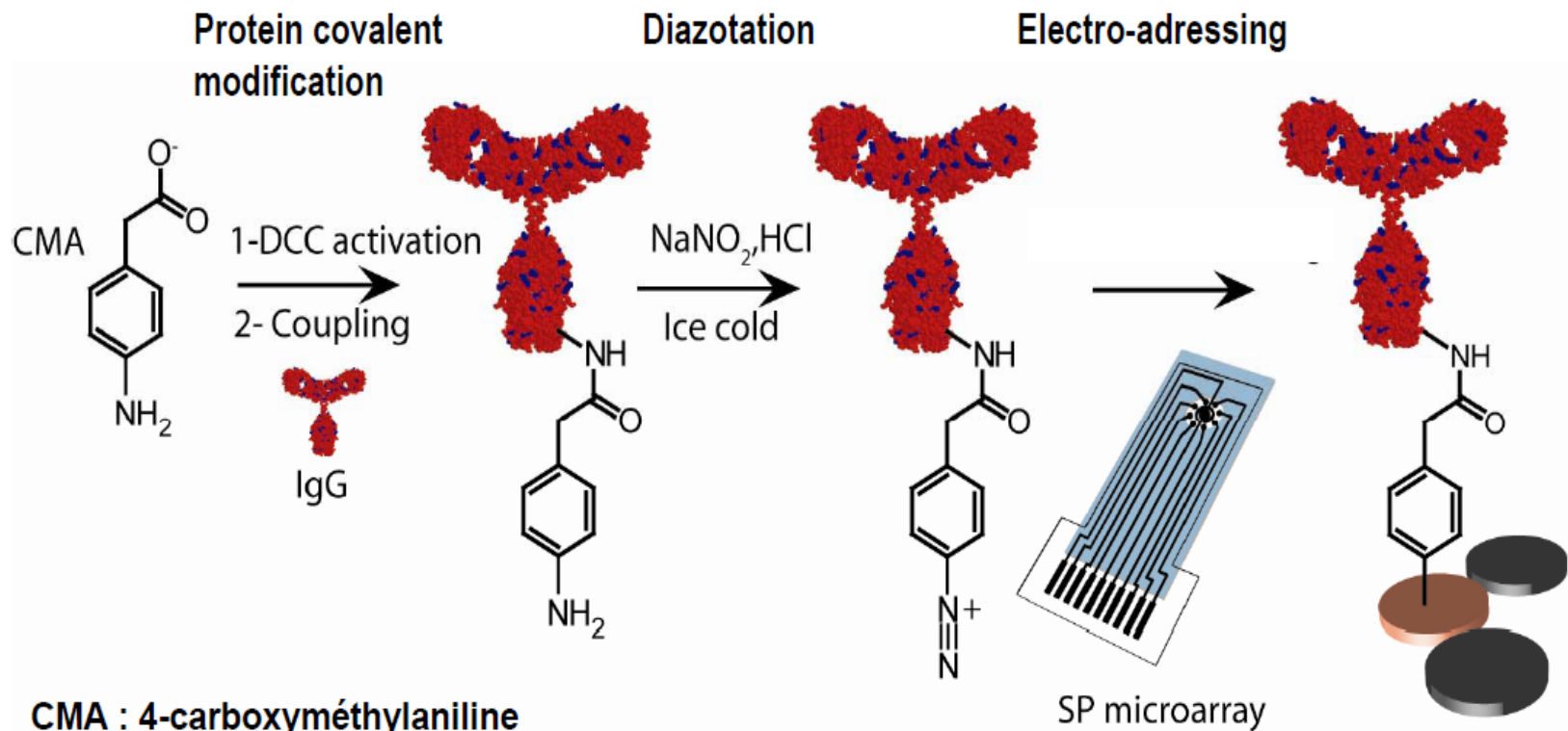
1. komplex je zachycen na vhodném povrchu (citlivá oblast převodníku),
2. po proběhnutí reakce se odstraní reakční směs,
3. povrch se promyje,
4. změří se množství zachycené značky

Výchozí metoda: ELISA, FIA, CLIA

Imunosenzory

- Imunochemické afinitní biosenzory používající jako biorekogniční element protilátky

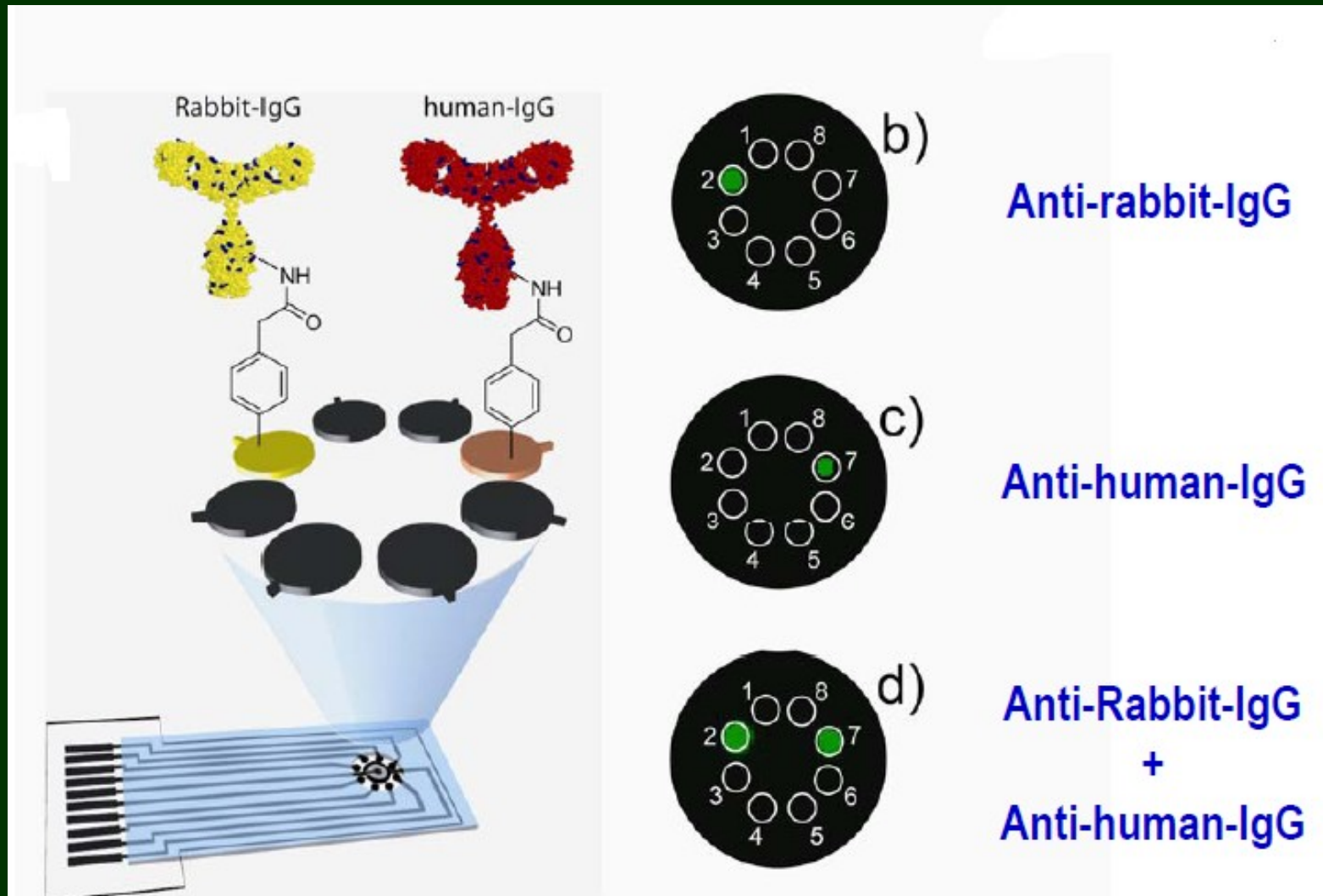
Imobilizace protilátky na biočip



CMA : 4-carboxyméthylaniline

DDC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

Imobilizace různých protilátek na biočip



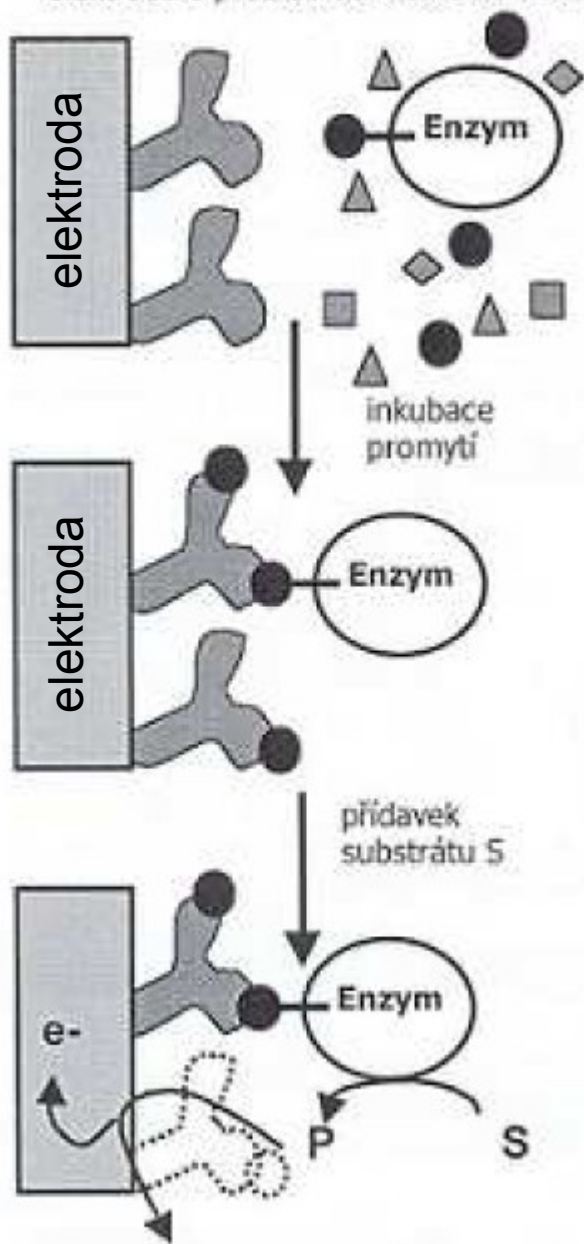
Elektrochemické imunosenzory

Spojení jednoduchého, levného, velmi citlivého elektrochemického převodníku s vysokou specifitou protilátky

Pracovní povrch: pracovní elektroda nebo výměnná membrána s imobilizovanou protilátkou

Značka: enzymy (aktivitu měříme elektrochemicky) nebo redox aktivní látky a cheláty kovů (po uvolnění z komplexu se stanoví voltametricky)

elektroda s protilátkou vzorek s tracerem



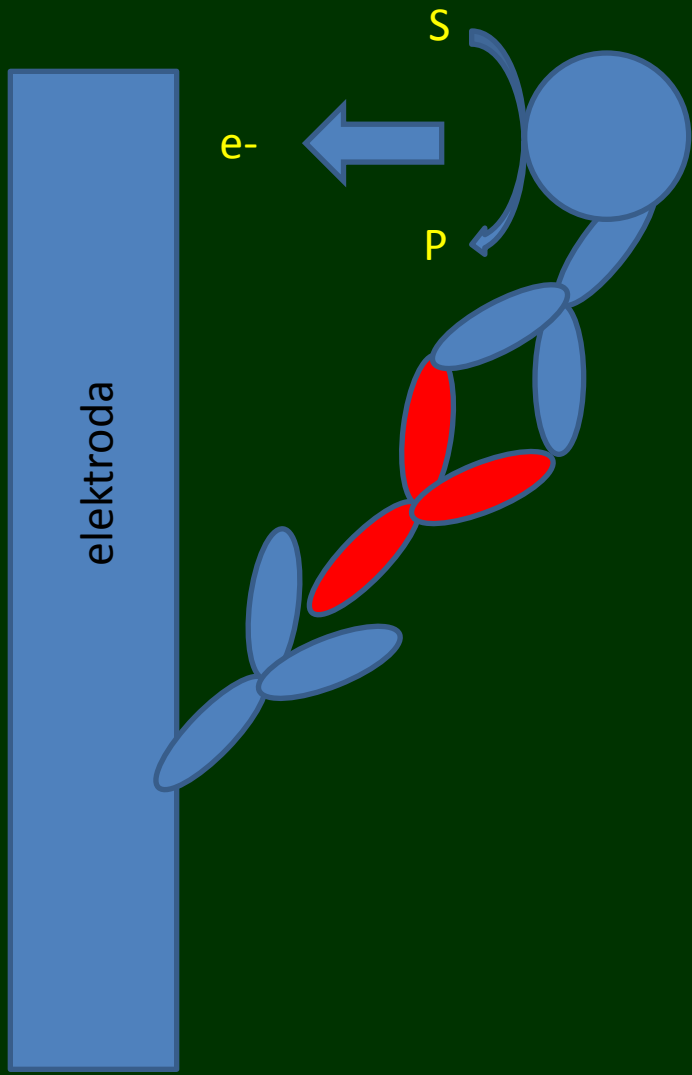
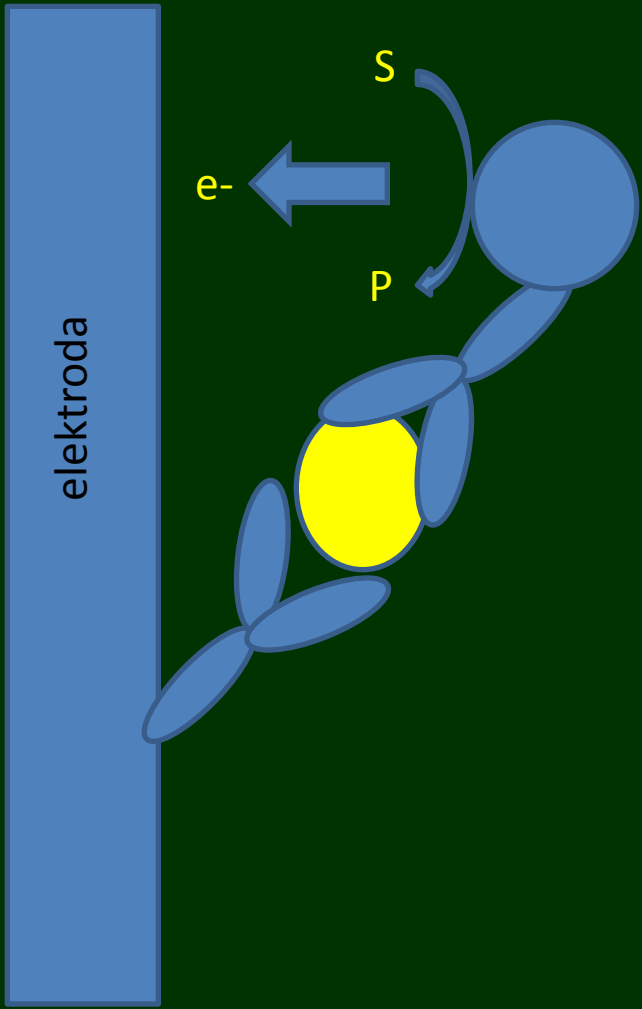
Elektrochemické imunosenzory

Heterogenní stanovení

- elektroda je modifikována protilátkou
- váže tracer při kompetitivním stanovení
- zachycená enzymová aktivita se pak stanoví po přidavku substrátu:

-**amperometricky** (změna proudu)

-**potenciometricky** (změna potenciálu)



Amperometrické stanovení

peroxidáza (peroxid vodíku + jodid, ferrocen nebo hydrochinon)

laktáza (kyslík + hydrochinon)

kataláza (peroxid vodíku)

glukóza oxidáza (kyslík nebo ferrocen + glukóza)

alkalická fosfatáza (p-aminofenylfosfát)

galaktosidáza (p-aminofenyl-beta-D-galaktosid)

acetlycholinesteráza (acetylcholin)

Potenciometrické stanovení

ureáza (močovina)

Nepřímé optické imunosenzory

Značky: fluorescenční, luminiscenční

Zdroj světla: laser, světlo emitující diody, výbojky či lampy

Detektor: fotonásobič, fotodiody

Fluorescenční značky pro nepřímé optické imunosenzory

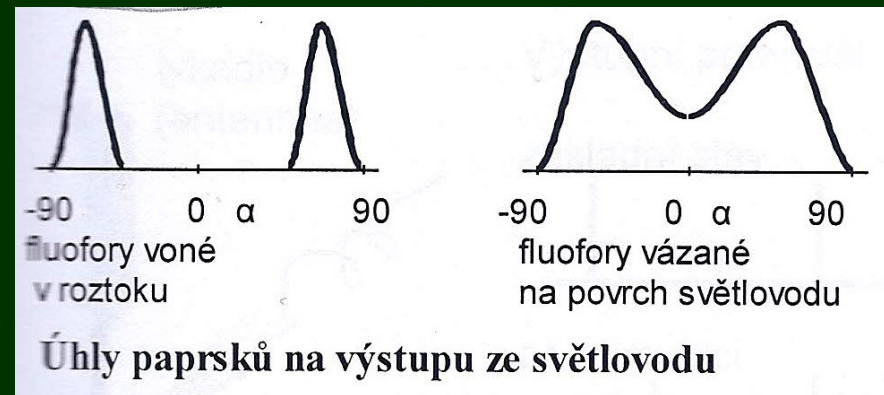
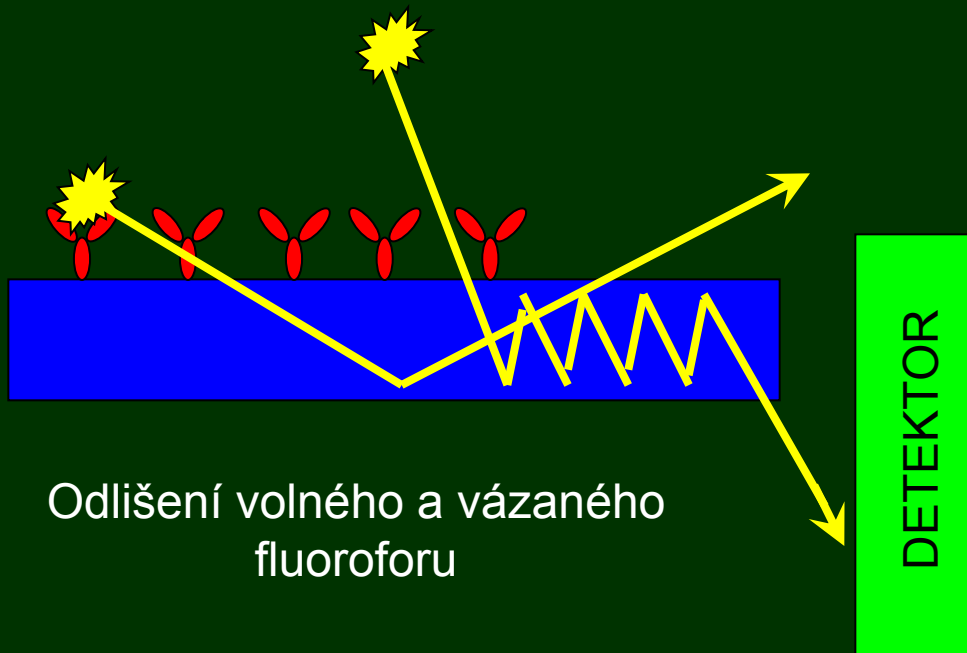
fluorescein, tetramethylrhodamin

cyaniny Cy5, Cy3

QD „quantum dots“

Fluorescence capillary fill device (FCFD)

Afinitní imunosenzor využívající k detekci fluorescenční značku, která emituje světlo do planárního světlovodu

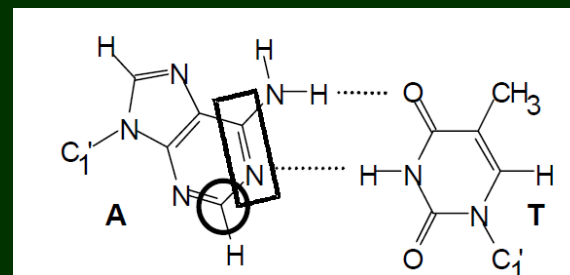
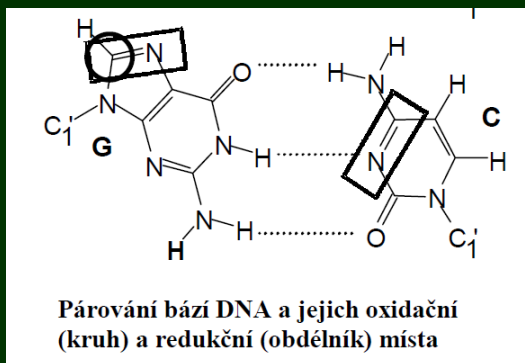


Biosenzory na bázi nukleových kyselin

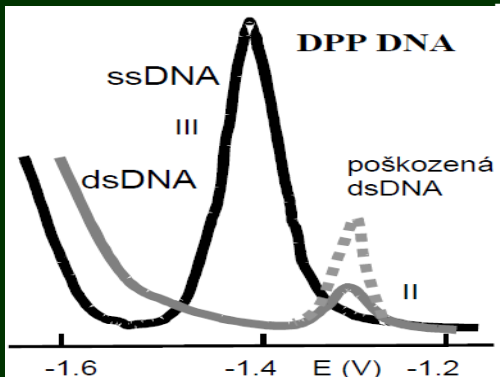
- nejen k diagnostickým účelům, ale i rychlejší sekvenační metody, detekce mutací a poškození DNA při analýze genetických chorob
- kombinací s PCR získávají tyto typy senzorů vyšší citlivost (vývoj křemíkových čipů, na kterých přímo běží PCR)
- pro analýzu se využívá **hybridizace** vzorku s komplementární sekvencí (sondou, próbou), která je navázána na citlivém povrchu biosenzoru jako biorekogniční prvek
- průběh hybridizace a její kvantitativní rozsah vyhodnocuje **fyzikálně-chemický převodník: 1) elektrochemický a nebo 2) optický**

Elektrochemické biosenzory pro DNA

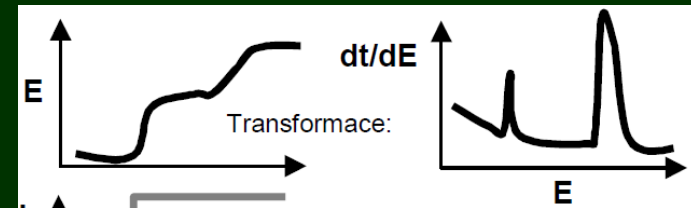
- založena na elektrochemické (elektrolytické) oxidaci/redukci určitých skupin v molekulách bazí



- v průběhu elektrolýzy dochází k oxidaci/redukci určitých skupin bazí v nukleových kyselinách
- typické metody pro stanovení: cyklická voltametrie, diferenciální pulzní polarografie, adsorpční přenosová voltametrie, chronopotenciometrie
- obecně pro všechny tyto metody: elektrochemická odezva klesá pro dsDNA, kdy jsou báze párovány, a tedy méně přístupné pro přenos elektronů. Elektrochemické přeměny nastávají u DNA adsorbované na povrch elektrody



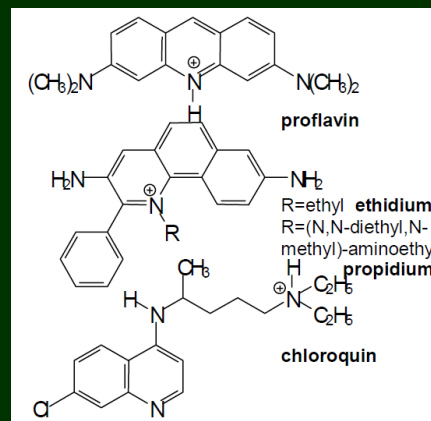
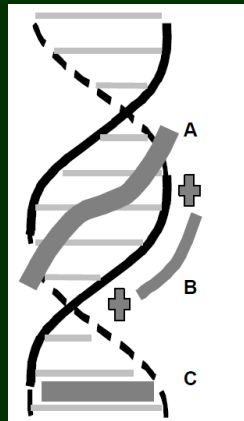
Diferenciální pulzní polarografie: signál ssDNA (III) je mnohonásobně vyšší než dsDNA (II), a jeho velikost ukazuje na změny stavu dsDNA (studium poškození DNA)



- Chronopotenciometrie: mezi pracovní a pomocnou elektrodu se přivede konstantní proud a měří se časová změna potenciálu mezi prac.a ref. elektrodou
- Odezva je dána konc. změnami látek v okolí elektrody v průběhu elektrolýzy
- Záznam potenciálu na čase se matematicky transformuje – signál s oddělenými maximy.
- Principem je pokles elchem signálu oxidace guaninu po vytvoření dsDNA

Indikátory hybridizace

- využívá se vazby indikačních molekul na ds DNA, umožňují citlivou detekci průběhu hybridizace
- interkalátory: váží se dovnitř dsDNA mezi sousední páry bazí (ethidium, propidium, proflavin, chloroquin, doxorubicin).
- vazba do malého žlábků: netropsin, [Co(2,2 -bipyridyl)3]3+
- interakce oběma způsoby: DAPI
- povrchová interakce se záporně nabitou kostrou: nevyžívá se
- Měření: (I) immobilizace probe na povrch elektrody adsorpcí, (II) hybridizace se vzorkem, (III) vazba indikátoru, (IV) elektrochemické měření (např. chronopotenciometrie)
- Možno též optické převodníky (optická vlákna): detekce fluorescence indikátorových molekul, nebo SRP (bez fluoroforu), nebo piezoelektrické senzory



Aplikace biosensorů pro detekci DNA⁴²

- * **určování příbuzenských vztahů:** HLA komplex, oblast D-smyčky mitochondriální DNA, délkový polymorfismus (VNTR místa)
- * **detekce onkogenů a supresorových genů zhoubného bujení:** c-myb, c-myc, c-abl, c-sis, c-ras, G protein, jun, p53, retinoblastomové geny
- * **dědičné choroby:** cystická fibróza, hypercholesterolemie, Huntingtonova choroba, sickle-cell anemie, Duchenneova svalová dystrofie, β -thalassemie, polycystická porucha ledvin, hyperchromatosis, hemofilie A, Von Willebrandtova nemoc
- * **viry:** cytomegalovirus, lidský papilomový virus, rotaviry (RNA), HIV, lidský virus leukemie T-lymfocytů
- * **bakterie:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Gonorrhea* (RNA, DNA), *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia*, *Escherichia coli* (RNA), *Bacillus subtilis* (RNA), *Bacillus burgdorferi*

Hybridizační sekvenace

Využití kombinatorických přístupů

Analyzovaná sekvence se nechá hybridizovat se souborem krátkých prob (6 až 20 bazí), který obsahuje všechny možné kombinace stejné délky sestavených ze 4 bazí

Podle toho, se kterými probami DNA hybridizuje, se usuzuje na přítomnost známé krátké sekvence v jejím řetězci

Pomocí překrývajících se úseků pak rekonstruujeme celou sekvenci.

Probíhá na křemíkovém čipu, rychlé stanovení (minuty)

Vyhodnocení: fluorescenční sonda na analyzovanou DNA, nebo indikátor hybridizace. Detektor: CCD kamera, počítačové vyhodnocení, rekonstrukce sekvence

Table 2
Features of bacterial sensors^a

Bacteria type	Biosensor type	Assay format	LOD (cells/ml)	Reference
<i>Optical biosensors</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	RM	Direct	8×10^6	Watts et al., 1994
<i>Salmonella typhmurium</i>	EWI	Direct	5×10^8 cfu/ml	Schneider et al., 1997
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	FA	Indirect	10^5	Pyle et al., 1995
<i>Salmonella typhmurium</i>	IMAS	Indirect	10^3	Yu and Bruno, 1996
<i>Piezoelectric biosensors</i>				
<i>Candida albicans</i>	QCM	Direct	10^6	Muramatsu et al., 1986
<i>Escherichia coli</i>	QCM	Direct	10^6	Plomer et al., 1992
<i>Salmonella</i>	QCM	Direct	10^6	Koenig and Gratzel, 1993a,b
<i>Phylococcus epidermidis</i>	QCM	Direct	10^2	Bao et al., 1996
<i>Electrical impedance biosensors</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>		Direct	10^6	Silley and Forsythe, 1996
<i>Proteus vulgaris</i>	BAWI	Direct	3×10^2	Deng et al., 1996
<i>Potentiometric immunosensors</i>				
<i>Neisseria meningitidis</i>	LAPS	Indirect	10^3	Libby and Wada, 1989
<i>Brucella militensis</i>	LAPS		6×10^3	Lee et al., 1993a,b
<i>Francisella tularensis</i>	LAPS		3×10^3	Thompson and Lee, 1992
<i>Amperometric immunosensors</i>				
<i>Escherichia coli</i>		Indirect	5×10^2	Nakamura et al., 1991
<i>Salmonella</i>			1–5 cfu/g	Brooks et al., 1992
<i>Salmonella</i>			8×10^3	Brewster et al., 1996
<i>Escherichia coli</i> O157:H7			50	Abdel-Hamid et al., 1999a,b

^a RM, resonant mirror; EWI, evanescent wave interferometer; FA, fluorescent labeled antibody method; IMAS, immuno-magnetic assay system; LAPS, light-addressable potentiometric sensor array; LOD, limit of detection; QCM, quartz crystal microbalance; BAWI, bulk acoustic wave impedance sensor.

Table 3
Manufactures and/or developers of the commercial instruments for detection of bacteria^a

Commercial instrument	Detection technique	Detection limit (cells/ml)	Analysis time (min, h)
Midas Pro (Biosensori SpA., Milan, Italy)	Amperometry	10 ⁶	20 min
The PZ 106 Immuno-biosensor System (Universal Sensors, New Orleans, USA)	Piezoelectric	10 ⁶	40 min
Bactometer (Bactomatic, Princeton, NJ, USA)	Impedimetry	10 ⁵	3–8 h
Integrated Genetics, MA, USA	DNA probe for <i>Salmonella</i>	1 cell/g	2 days
Enzo Biochem, NY, USA	DNA probe for the bacterium <i>Chlamydia</i>	–	–
Hybritech, CA, USA	DNA probe for bacteria	–	–
Malthus 2000 (Malthus Instruments, Stoke-on-Trent, England, UK)	Conductance	10 ⁵	8–24 h
Unilite (Biotrace, Bridgend, UK)	Bioluminescence	10 ³	15 min
Lumac Biocounter (Lumac B.V., Schesberg, Netherlands)	Bioluminescence	10 ³	20 min
Coulter counter (Coulter Electronics, Canada)	Coulter counter	5 × 10 ⁴	30 min
Thermal activity monitor (Thermometric, Northwich, Cheshire, UK)	Microcalorimetry	10 ⁵	3 h
BIA-core (Pharmacia, Uppsala, Sweden)	Surface plasmon resonance	10 ⁵	1 h
Vitek AutoMicrobic System (BioMerieux Vitek, Hazelwood, MO)	Optical	10 ⁴	4 h

^a Nelson, 1985; Feng, 1992; Tietjen and Fung, 1995; Hobson et al., 1996.

Biočipy pro afinitní senzory

- Imobilizace protilátek, receptorů, ligandů, nukleových kyselin, uhlovodíků, látek s určitými biologickými vlastnostmi (kationty, anionty, látky s hydrofilním/fobním povrchem)
- Některé mají nízkou specifitu a vážou celé skupiny proteinů, jiné jsou vysoce specifické
- Stacionární vs. průtočné uspořádání
- Výroba: mikroelektronické technologie: sítotisk, litografie, nanotechnologie

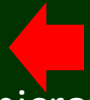
Table 1. Selected companies with biochip programs

Company	Program
Affymetrix (Santa Clara, CA)	GeneChip Arrays, high-density probes per chip (64–400K spots per chip)
Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)	Cy3 and Cy5 fluorescent dyes for detection by molecular array scanners
Applied Biosystems (Foster City, CA)	High throughput single nucleotide polymorphism mapping
Axys Pharmaceuticals (S. San Francisco, CA)	Variable density per chip approach
Caliper Technologies (Palo Alto, CA)	Lab-on-a-chip microfluidic technologies
Cepheid (San Jose, CA)	Microfluidics for clinical diagnostic applications
Gene Logic (Gaithersburg, MD)	READS microarray technology for expression profiles
Hewlett Packard (Palo Alto, CA)	Array scanners
Hyseq (Sunnyvale, CA)	Sequence-by-hybridization chips for sequencing, expression analysis, and diagnostics (8K per chip)
Incyte Genomics (Palo Alto, CA)	Gene expression microarrays, medium density standardized and/or customized DNA chips (10K spots per chip)
Micronics (Redmond, WA)	Microfluidics technology development
Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA)	Expression analysis molecular arrays, surface plasmon resonance array chips
Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA)	Medium density chips; confocal scanners
Mosaic Technologies (Boston, MA)	Acryite polyacrylamide gel arrays
Orchid BioSciences (Princeton, NJ)	3-D microfluidic chip for genotyping and DNA synthesis
Nanogen (San Diego, CA)	Chips use electronically mediated hybridization to move and concentrate DNA
Packard Instrument Co. (Meriden, CT)	Arrayer gel-based biochip for DNA diagnostics
ProtoGene (Palo Alto, CA)	Low density standardized and/or customized DNA chips (1K spots per chip)
Sarnoff (Princeton, NJ)	Microfluidics technology development
Sequenom (San Diego, CA)	Spectrochips for DNA diagnostics by mass spectrometry
Soane BioSciences (Hayward, CA)	Multiplexed chip for DNA sequencing and fragment analysis
Xenometrix (Boulder, CO)	Gene expression profiling by microarrays

Sources: Biovista (www.biovista.com); BioCentury.



DNA chips



microfluidic



surface plasmon resonance



fluorescent probes



Schematické znázornění principu mikročipových/microarrayových technologií

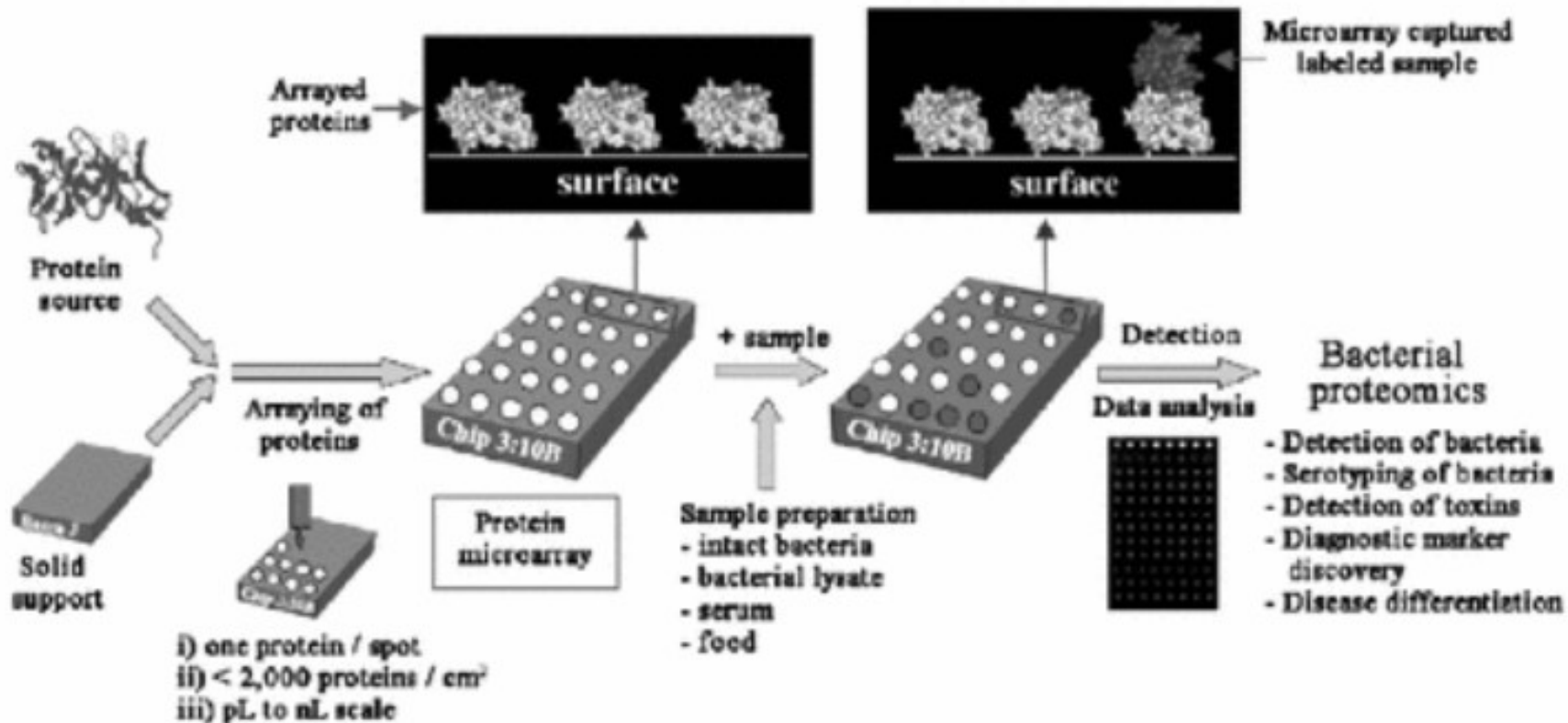


Figure 26.1. Schematic illustration of the protein microarray technology.

Biočipy založené na bakteriofágách



Phage

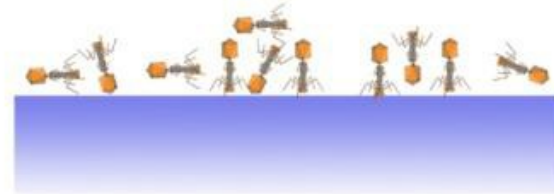


BSA

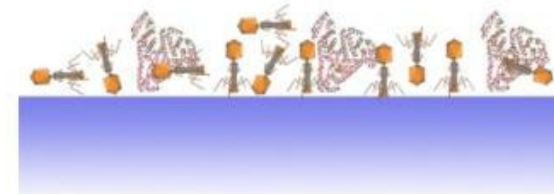


Bacteria

1) *phage incubation*



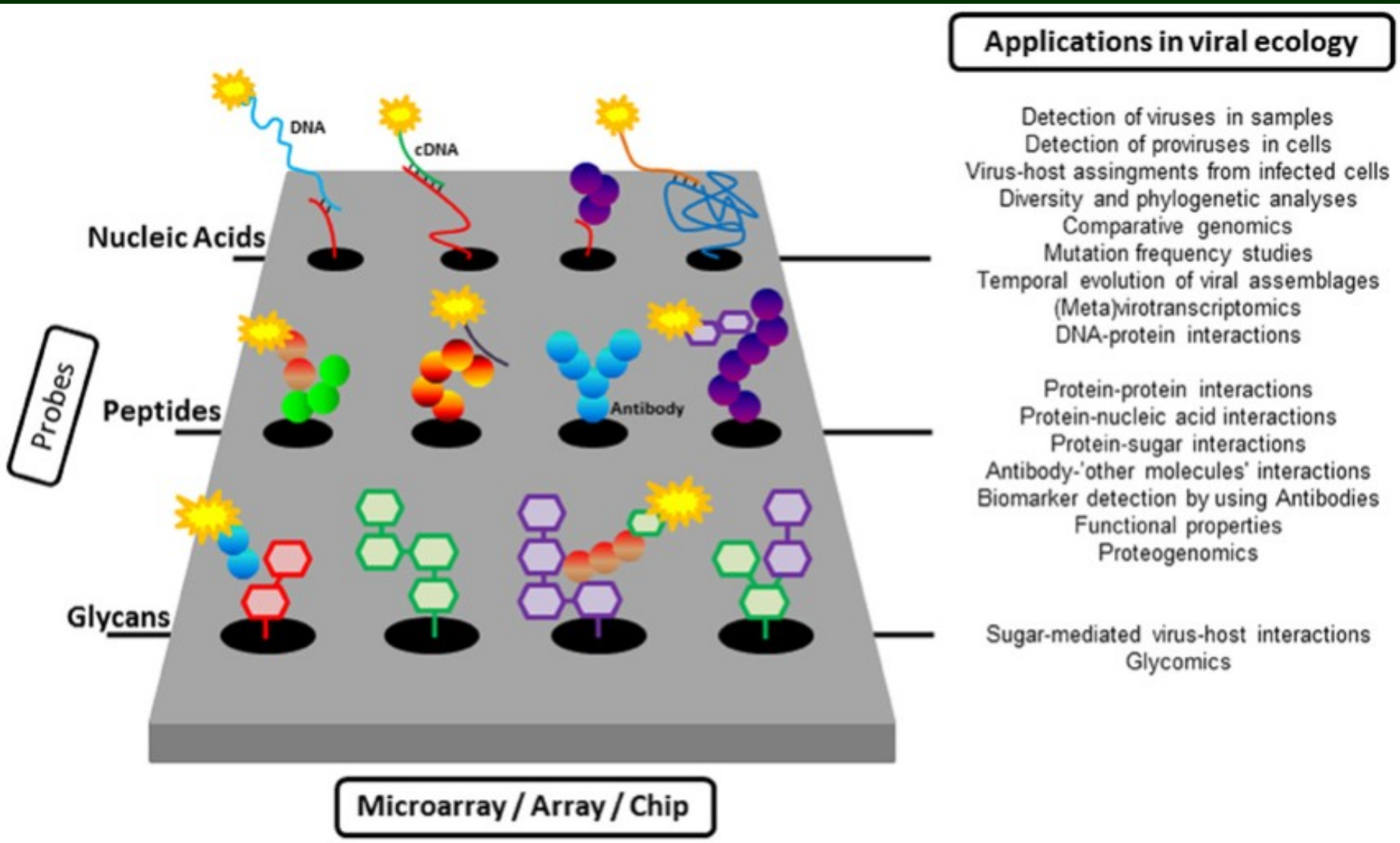
2) *BSA incubation*



3) *bacteria introduction*



Mikročip pro studium interakce virus-hostitel

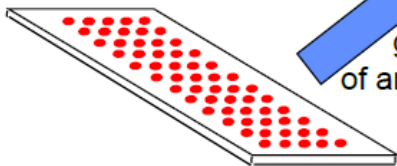


Multi-analytové mikročipy (arrays)

detekce a identifikace mnoha antigenů
v jediném stanovení

Array analysis

1. biochip

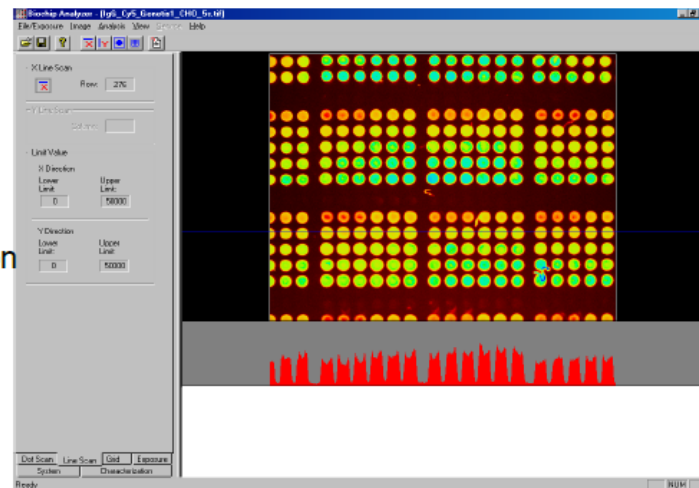


Typical dimensions

chip size: 76 mm x 26 mm
dot diameter: 100 – 200 μm
pitch: 500 μm
dot density: 400 dots/ cm^2

generation
of an image

2. fluorescence image



evaluation of
numerical values

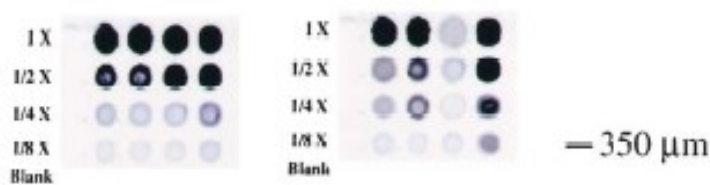
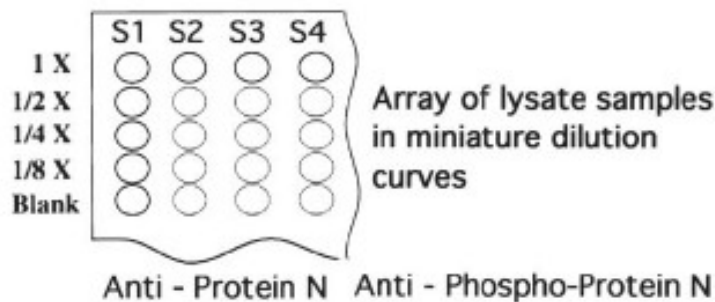
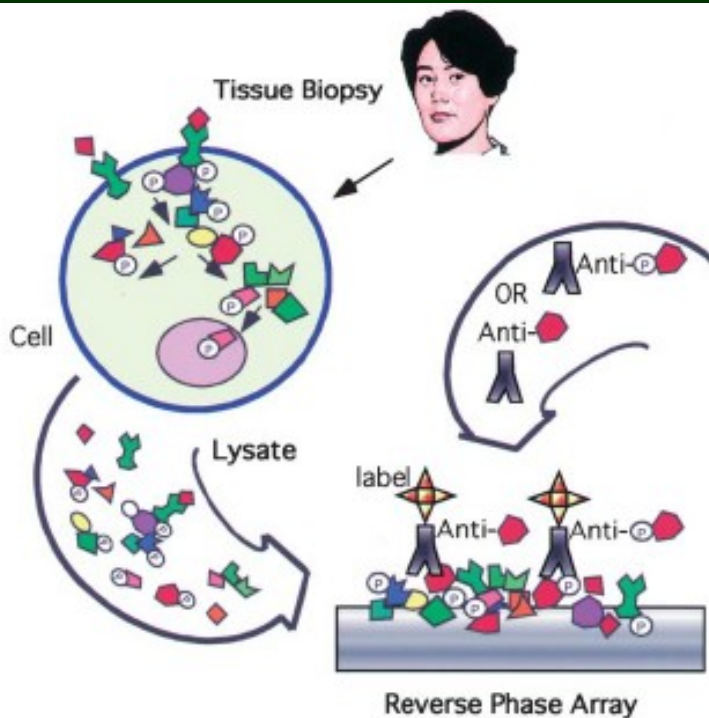
3. biochip data

2.57	3.71	4.65	7.43
8.42	5.81	3.64	2.54
6.43	8.21	9.27	1.10



Aplikace mikročipů pro studium vztahů virus-hostitel

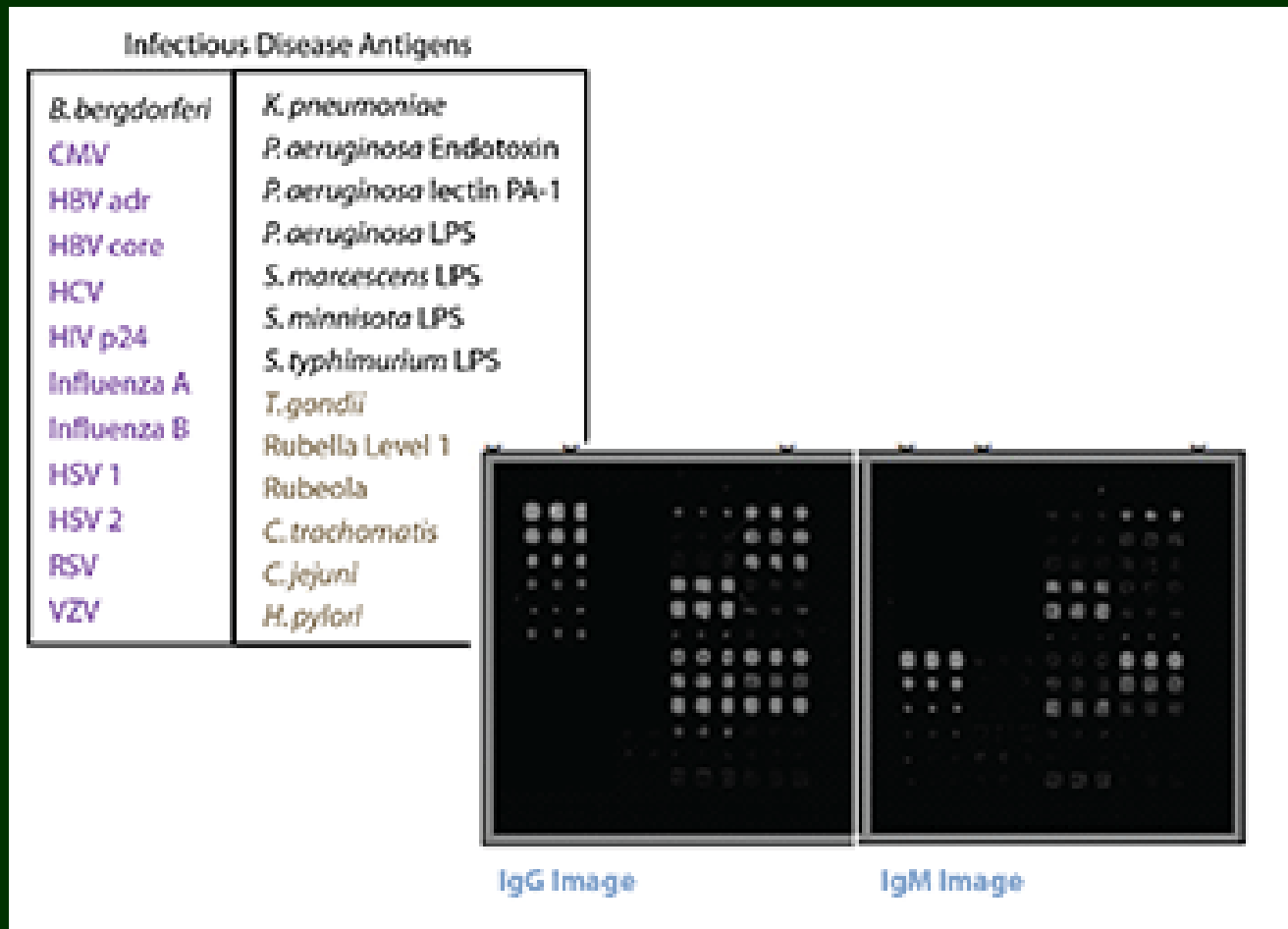
Virus-host system/samples analyzed	Issue addressed	References
Bacteriophage T4 and <i>E. coli</i> ^b Viruses infecting hyperthermophilic <i>Archaea</i>	Virus/host gene expression during infection	Luke et al., 2002 Walther et al., 2011
Dehalococcoides-containing microbial consortium GTAs ^c and <i>Rhodobacter capsulatus</i>	Characterization of prophages in prokaryotic genomes Encapsulation of GTAs	Waller et al., 2012 Hynes et al., 2012
Coccolithoviruses and <i>Emiliana huxleyi</i>	Viral diversity and gene expression during infection	Allen and Wilson, 2008
Cyanophages and <i>Prochlorococcus</i>	Phage and host transcriptome dynamics	Lindell et al., 2007
Cyanophages and <i>Synechococcus</i>	Comparative phage genomics	Millard et al., 2009
Feces of new borns	Diversity and dynamics of the viral assemblage	Breitbart et al., 2008
<i>Archaea</i> -dominated acidic hot spring samples	Identification of CRISPRs spaces within the viral metagenome	Snyder et al., 2010
Candidatus <i>Accumulibacter phosphatis</i> - enriched sludge	Phage expression and dynamics	Kunin et al., 2008
Hypersaline sample	Expression of the viral assemblage	Santos et al., 2011
<i>Archaea</i> -dominated hypersaline samples	Identification of viral-hosts pairs	Martínez-García et al., in press
Gut bacteriophages	Interactions between bacteriophages and gut mucus	Barr et al., 2013



Aplikace mikročipů
pro detekci
biomarkerů infekce
v séru pacienta

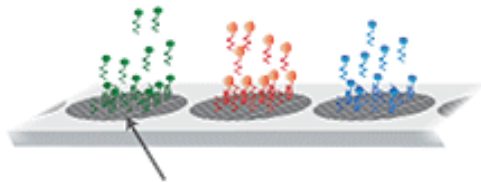
sandwich upřádání
protilátka-
biomárker-
protilátka

Mikročip pro detekci protilátek proti mnohočetným patogenům v lidském séru

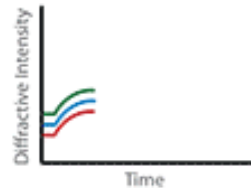


Mikročip (tzv. multiplex microarray) pro detekci mnohočetných patogenů v lidském séru)

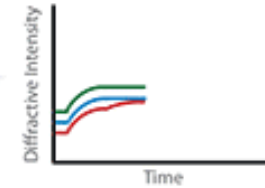
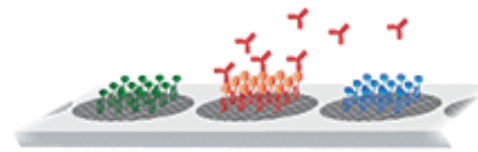
1. Hybridization of panelPlus™ labeled biomarkers



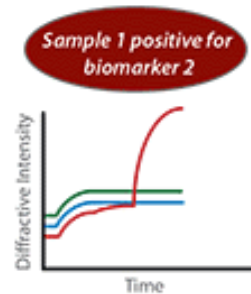
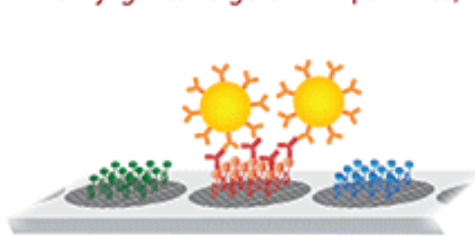
On the surface of an optical sensor, individual diffraction spots are addressed with a unique oligonucleotide linker.



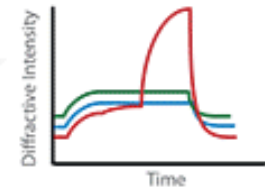
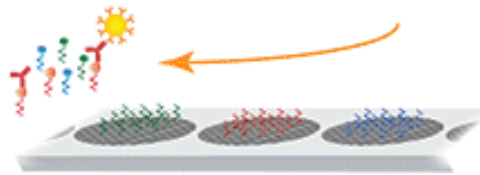
2. Incubation of the first sample



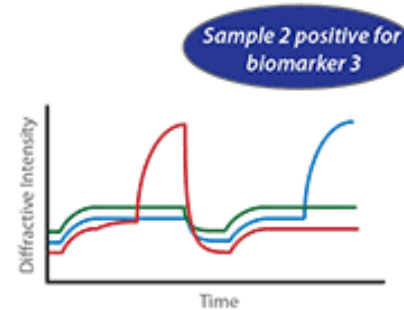
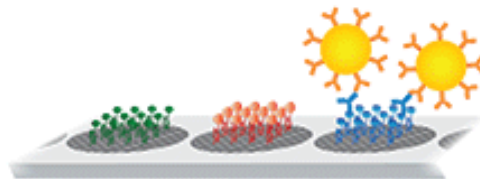
3. Amplification (eg. anti-human antibodies conjugated to gold nanoparticles)



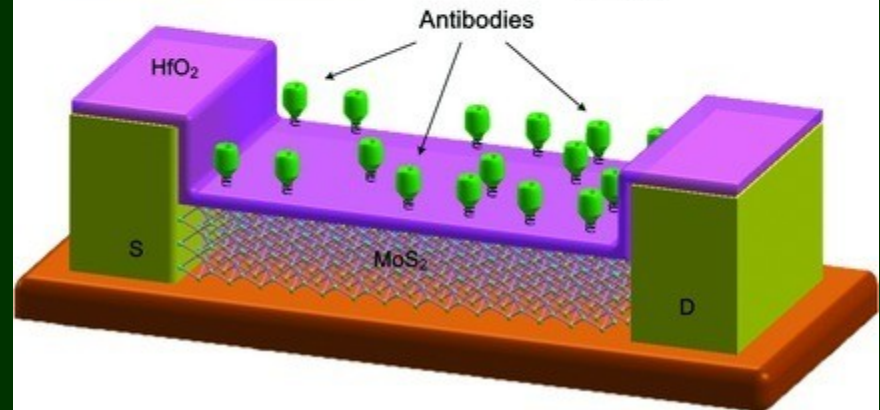
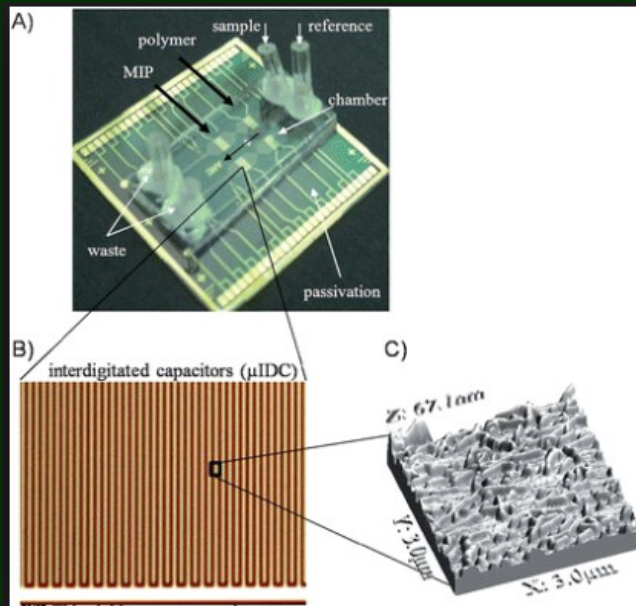
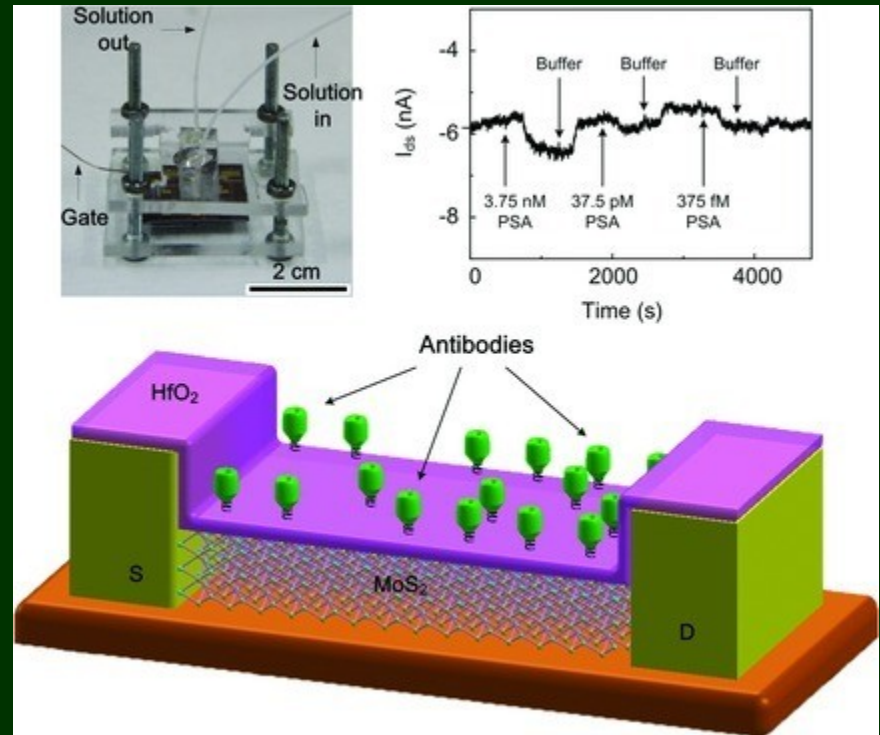
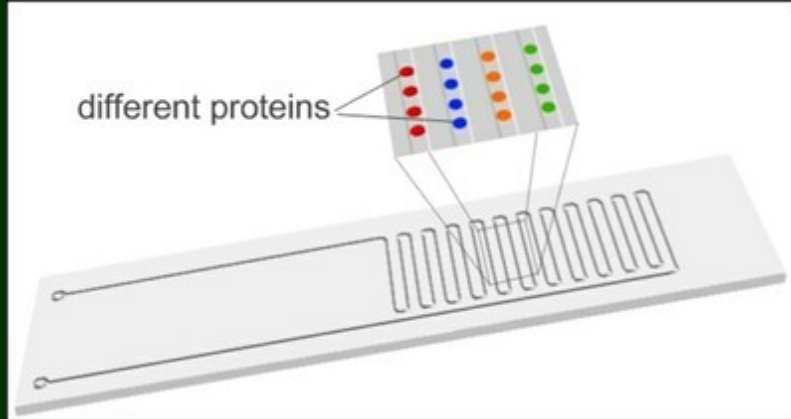
4. Regeneration to the original sensor surface



5. Repeat steps 1 to 4 with another sample



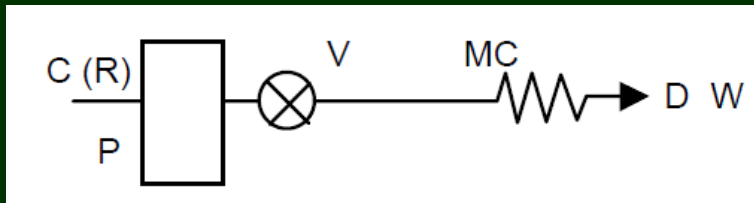
Mikrofluidní (průtočné) senzory/mikročipy



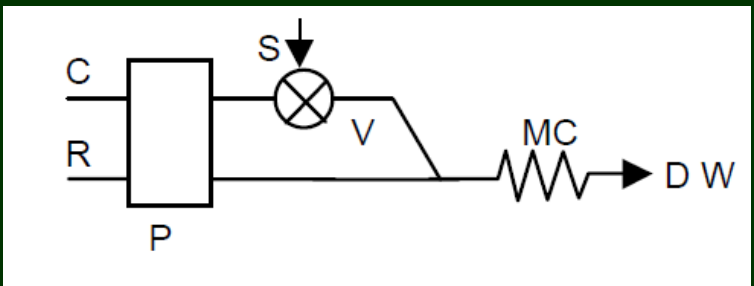
Průtoková injekční analýza (FIA)

- nástřik vzorku do toku nosného média a jeho definované naředění – disperze
- disperzní faktor (D) dán poměrem původní koncentrace vzorku a maxima koncentrace v zóně vzorku procházející detektorem, $D = C_0/C_{\max}$
- FIA je tvořena pumpou P, vedením pro nosné médium C (carrier) a pomocným reagentem (R, referenční)
- po nástřiku vzorku (S, sample) pomocí injekčního ventilu V se obě větve spojí, smíchají v míchací smyčce MC (mixing coil) a nakonec prochází detektorem D do případného odpadu W (waste)
- vedení kapaliny: hadičky (vnitřní průměr 0.5 až 1 mm), polypropylen, teflon, PVC, silikonová guma
- pumpa: peristaltická, tvořena krokovým motorem, ten otáčí diskem, který má lna obvodu několik otočných válečků rolerů, které tlačí na pružnou hadičku, a tak vytlačují kapalinu
- ventily: pro nástřik vzorku
- detektor: klasický (chemický, fotoemtrický, fluorometrický či elektrochemický, nebo je detektorem přímo biosenzor (biokatalytický, afinitní...)
- poloha detektoru vzhledem k proudícímu médiu: (A) detektor pralelně s tokem média, (B) v ústí trubičky – pro elektrochem. detekci, (C) kaskádové, (D) wall-jet cela
- signál je buď maximum nebo plocha píku odpovídající zóně vzorku prošlé detektorem.

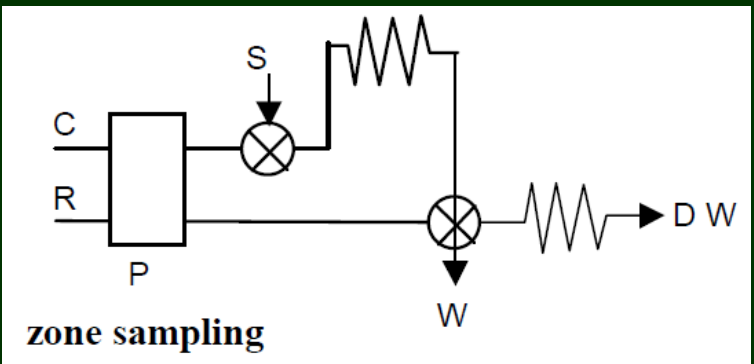
Single-line



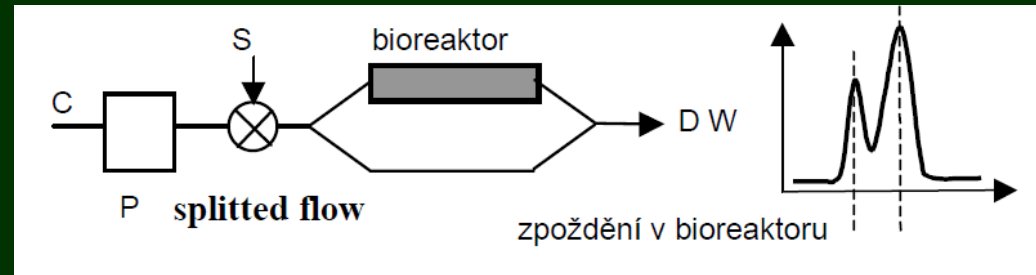
Two-line



Zone sampling



Splitted flow



Splitted flow s představeným bioreaktorem: rozdělení vzorku na dvě linie, jedna projde bioreaktorem. Před vstupem do detektoru se obě větve spojí, na záznamu jsou dvě maxima. Stanovení 2 reagentů vedle sebe: sacharóza a glukóza ve vzorku: detektor je biosenzor s imobilizovanou glukosa oxidasou, v bioreaktoru je imobilizována invertáza s mutarotázou. První pík je volná glukóza, druhý pak navíc glukóza vzniklá v reaktoru ze sacharózy.

Závěr

- zjednodušení práce spojené s analytickými metodami
 - zrychlení analýzy
- zpřístupnění analýzy v provozech a oblastech mimo výzkum (např. pacient, jatka)
 - přenosné systémy, možnost analýzy v terénu
 - rychlá detekce mnoha analytů v jediném stanovení
- minimální nebo žádné zpracování vzorku před analýzou
 - Studium kinetiky afinitních interakcí