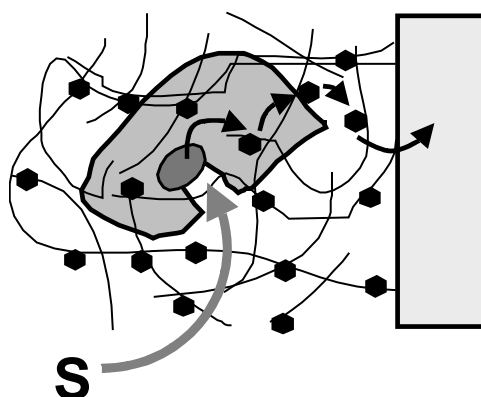


MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

BIOSENSORY

Petr Skládal



Brno 2002

OBSAH

Předmluva	1
Úvod a historická východiska	3
<i>Definice biosensory</i>	3
<i>Historická východiska</i>	4
<i>Informace o biosensorech</i>	6
<i>Základní pojmy.</i>	7
Citlivost	7
Kalibrace. Linearita. Limit detekce	8
Šum. Signál pozadí. Hystereze. Dlouhodobá stabilita. Selektivita	9
Rychlost a doba odezvy. Rychlost konvekce. Teplotní závislost. Životnost	10
Biokompatibilita	11
<i>Podmínky měření s biosensory</i>	11
Přímý kontakt se vzorkem. Uzavřená nádoba. Průtočný systém	11
Převodníky pro biokatalytické sensory	12
<i>Elektrochemické systémy</i>	12
Referentní elektrody	12
Pomocné elektrody. Pracovní elektrody	13
<i>Potenciometrické bioelektrody</i>	14
Druhy ISE	14
Potenciometrické bioelektrody. Polovodičové potenciometrické sensory	15
ISFET "ion sensitive field effect transistor"	16
LAPS biosensory	18
<i>Amperometrické bioelektrody</i>	19
Biosensory na bázi elektrod pro kyslík a peroxid vodíku	21
Dehydrogenázové biosensory	23
Přímý přenos elektronů z biomolekul na elektrodu. Mediátory	24
Kinetika modifikovaných elektrod	26
<i>Speciální elektrochemické techniky</i>	27
Cyklická voltametrie	27
Chronoamperometrie. Rotační techniky (forced convection techniques)	30
<i>Konduktometrie (Impedimetrie)</i>	31
Impedance	32
Konduktometrické biosensory	33
<i>Optické biosensory</i>	34
Optické měřicí techniky	34
Světlovody a optická vlákna	36
Optické enzymové sensory	37
Chemiluminescence	38
Bioluminescence	40
Digitální zpracování obrazu	41
Zhodnocení optických biosensory	42
<i>Kalorimetrické biosensory</i>	43
Enzymové biosensory	44
<i>Stanovení substrátů</i>	44
Stanovení sacharidů	44
Stanovení alkoholů a fenolů	46
Karboxylové kyseliny, aminokyseliny	47
Dusíkaté sloučeniny	48

Estery a amidy	50
Měření enzymových aktivit	50
Inhibitory enzymových sensorů	51
Aplikace stanovení inhibitorů biosensory	53
Zesilovací biochemické systémy	55
Recyklační systémy	55
Aktivace genů analytem	58
Eliminace interferencí	59
Mikrobiální a tkáňové elektrody	61
Mikrobiální systémy	61
Elektrody s tkáňovými řezy rostlin a hub	62
Živočišné tkáně v biosensorech	63
Bioanalytická stanovení v organické fázi	64
Matematické modely biokatalytických sensorů	66
Převodníky pro bioafinitní sensory	71
Přímé optické afinitní biosensory	71
Teoretické základy	71
SPR	74
Rezonanční zrcadlo	75
IOS – výstupní mřížka	76
Interferometry. RIFS	77
Piezoelektrické systémy	80
Piezoelektrické krystaly jako biosensory	81
Planární akustické sensory	83
Aplikace piezoelektrických biosensorů	84
Kinetika afinitních interakcí	85
Sledování asociace a disociace biomolekul	85
Linearizace	86
Nelineární regrese. Disociační fáze. Komplikace při praktickém provádění	87
Protilátky a imunosensory	90
Protilátky	90
Produkce protilátek	92
Rekombinantní protilátky	94
Imunoanalytické metody	95
Kompetitivní stanovení	96
Sendvičové stanovení	97
Nepřímé imunosensory	98
Elektrochemické imunosensory	99
Optické nepřímé imunosensory	99
Receptory a lipidové vrstvy	101
Receptorové biosensory	101
Lipidové vrstvy	102
Biochemický spínač. Příklad afinitního stanovení	103
Nukleové kyseliny	104
Elektrochemické biosensory pro DNA	105
Chronopotenciometrie	106
Indikátory hybridizace	107
Imobilizace a značení nukleových kyselin	108
Aplikace biosensorů pro detekci DNA	110
PCR	110

Hybridizační sekvenace	111
Imobilizace biomolekul	113
Membrány při konstrukci biosensorů	113
Příprava membrán	115
Mechanická imobilizace biomolekul	116
Zachycení v gelu či polymeru	117
Zesíťování biomolekul	119
Kovalentní imobilizace biomolekul	120
Aktivace povrchu sensorů	120
Aktivace polymerních materiálů	122
Navázání biomolekul	123
Elektropolymerace	128
Masová produkce biosensorů	130
Sítotisk	130
Litografie	131
Nanotechnologie	133
Průtočné techniky	134
Průtoková injekční analýza	134
Pracovní módy FIA	136
Komerčně dostupné biosensory	139
Klinická oblast	140
Stanovení glukózy u diabetiků	140
Laboratorní analyzátory s biosensory	142
Potravinářství a fermentační průmysl	143
Ochrana životního prostředí. Vojenská a bezpečnostní oblast	144
Bioafinitní systémy pro výzkum	145
Nukleové kyseliny	146
Perspektivy biosensorů	147
Nové trendy	147
Závěr	149

Předmluva

Rozvoj přírodních věd ve druhé polovině dvacátého století se vyznačuje spoluprací vědeckých pracovníků často ze značně odlehlých odvětví. Názorným příkladem je výzkum biosensorů - progresivní interdisciplinární bioanalytický obor na rozhraní biologie, chemie, fyziky a matematiky; její aplikační výstupy zasahují do humánní a veterinární medicíny, do zemědělství, fermentačního, potravinářského a farmaceutického průmyslu i do životního prostředí a vojenství. Rozpoznávání analytu na úrovni interakce molekul už samo napovídá, že biosensory mohou být velmi přesné a miniaturní. Z původně laboratorní vědecké kuriozity se zájem o biosensory přesunul do oblasti obchodních kruhů a veřejného zájmu. To je důsledkem ohromného potenciálu těchto čidel pro revoluční změnu analytických postupů. Přednosti jsou zřejmé: vysoká selektivita, měření bez speciálních reagensů, rychlost analýzy, nízké náklady a snadná obsluha. Biosensory dnes už rozhodně nejsou popelkou v oblasti základního výzkumu; dá se odhadnout, že výzkumem v této oblasti se celosvětově zabývá přes 300 pracovišť.

Na rozdíl od ostatního světa probíhá u nás výzkum biosensorů spíše na pracovištích biochemických či biotechnologických, jinde je tato oblast vnímána jako něco trochu exotického a snad i odtrženého od analytické praxe. Cílem tohoto textu je snad tento přístup pozměnit a přispět ke zlepšení všeobecných informací o biosensorech.

Úvod a historická východiska

Definice biosensoru

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 vzorku¹. Podle definice IUPAC² je pojem "bioprobe" širší než biosensor, obvykle se jedná o zařízení na jedno použití; jistá přesnost navrhované oficiální definice mnohé dosavadní „biosensory“ vyřazuje z této oblasti. Každá definice ovšem může mít mnohá úskalí. Představme si například skupinu osob osob rozptýlených náhodně po poli, přičemž každá z nich má telefon a hlásí pozorování podmíněná čichem, sluchem, chutí a dotykem. Takový soubor pozorovatelů může poskytovat informace o povaze, intenzitě, prostorovém umístění a časovém průběhu chemických stimulů v daném prostoru. Přitom to bude biosensor - má rekogniční element (lidé) i převodník (telefony). Je patrné, že pojem biosensor je široce použitelný, velmi populární i módní. Na závěr snad jen pro připomenutí, analyt je látka, která se stanovuje.

Biorekogniční část biosensoru je možné zařadit do dvou základních skupin:

- * biokatalytické (enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus) - analyt přeměňují v průběhu chemické reakce; obvykle vystupuje analyt jako substrát enzymové reakce
- * bioafinitní (lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor) analyt je specificky vázán ve vznikajícím afinitním komplexu

Fyzikálně-chemické převodníky poskytují signál vhodný k dalšímu zpracování, lze je rozdělit do následujících skupin:

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

¹ Rechnitz G. A. *Electroanalysis* **3**, 73 (1991).

² Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. *Biosens. Bioelectron.* **11**, 455 (1996).

Studium biosenzorů je typickým příkladem mezioborového výzkumu, zasahuje do oblastí biochemie a biotechnologie, analytické a fyzikální chemie, elektroniky, informatiky a nauky o materiálech.

Historická východiska

Důležitým východiskem bylo formulování koncepce redoxního potenciálu a první měření pH na počátku 20. století. Další zlom na poli elektrochemie přinesl Heyrovského objev polarografie v roce 1922. Záhy bylo zkoušeno měření koncentrace kyslíku v biologických tekutinách pomocí rtuťové kapkové elektrody (Müller a Bamberger, 1935) a spotřeby kyslíku živými organismy (sinice, kvasinky a krevní buňky, Petering a Daniels, 1938). Tyto pokusy vyžadovaly práci se rtuť a poměrně komplikovanou polarografickou aparaturu. Ve 40. letech se objevily práce využívající katodickou redukci kyslíku na ušlechtilých kovech (Au, Pt), ale holé elektrody v biologickém materiálu postupně ztrácely citlivost.



Revoluční změnu těchto senzorů provedl v roce 1956 Leland C. Clark Jr.³ (na obrázku s první enzymovou elektrodou): předřadil elektrodovému systému membránu propustnou pro plyny, a tak elektrody (pracovní zlatá nebo platinová katoda zatavená ve skle a argentchloridová referentní) fyzikálně izoloval od měřeného prostředí. Tím získal spolehlivý měřicí systém vedoucí k mnoha aplikacím a ke zrodu biosenzorů.

Z dalších zdrojů oboru lze uvést pokrok v elektronice v průběhu 2. světové války, vývoj optických biochemických technik (O. Wartburg), konstrukci diferenciálního fotometru (B. Chance). V roce 1962 na symposiu New York Academy of Sciences pak Clark popsal jak „udělat elektrochemické sensory (pH, polarografické, potenciometrické nebo konduktometricé) inteligentnějšími“ přidáním „enzymových převodníků uzavřených jako sendvič v membránách“. Tento koncept ilustroval experimentem s glukóza oxidázou zachycenou na povrchu kyslíkové elektrody pomocí dialyzační membrány. Měřený pokles koncentrace kyslíku byl úměrný koncentraci glukózy. Clark s Lyonsem v publikaci⁴ poprvé uvedli termín **enzymová elektroda**, často nesprávně připisovaný Updikovi a Hicksovi⁵, kteří

³ Clark L. C. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **2**, 41 (1956).

⁴ Clark L. C., Lyons C. *Ann. N.Y. Acad.* **102**, 29 (1962).

⁵ Updike S. J., Hicks, J. P. *Nature* **214**, 986 (1967).

propracovali experimentální detaily potřebné k získání funkční enzymové elektrody pro glukózu.

První enzymové elektrody se objevují na přelomu 50. a 60. let jako "akademická kuriozita" zprvu provázená nedůvěrou. Změna postoje nastává koncem 60. let, kdy došlo k vývoji a k rychlému prosazení se v praxi u iontově selektivních elektrod, zdálo se, že analogické systémy s enzymy jsou také velmi blízko. V dalším desetiletí nastává pokrok na poli enzymových elektrod. Potenciometrickou enzymovou elektrodu uvedl v roce 1969 Guilbault. První komerční biosensor pro glukózu uvedla na trh úspěšně firma Yellow Springs Instrument Company (Ohio) v roce 1975. Pojem **enzymový termistor** zavádí Mosbach roku 1974. V roce 1975 pak je navrženo použití **bakteriální buňky** místo enzymů; tím začíná rozvoj výzkumu biosensorů v Japonsku a vůbec na poli biotechnologie a ochrany životního prostředí. Objevuje se název **biosensor** (původně byla snaha použít "bioprobe", tento název však byl chráněn). Lubbers a Opitz zavádí pojem **optoda** pro sensory na bázi optických vláken. V roce 1976 Clemens⁶ začlenil glukosový sensor do systému **umělého pankreatu** uvedeného na trh jako Biostator firmou Miles, firma La Roche zase zavádí biosensor pro laktát LA 640 s umělým mediátorem ferrikyanidem. Dalším mezníkem je rok 1982, kdy Schichiri popsal implantovatelný glukosový biosensor – jehlovou enzymovou elektrodu. Koncem 70. let začíná výzkum imunochemických biosensorů (imunosenzorů), na počátku současného komerčního úspěchu afinitních biosensorů byla práce Liedberga⁷ který navrhnul sledování afinitních interakcí v reálném čase pomocí rezonance povrchových plasmonů ve vrstvě kovu nanesené na optickém rozhraní; v roce 1990 pak firma Pharmacia uvedla na trh BIAcore, kde se tento princip uplatňuje. Dosud nejúspěšnější biosensor je založen na **ferrocenu** - přenašeči elektronů z oxidoreduktáz na elektrodu⁸.



Tak byl vyvinut firmou Medisense levný osobní biosensor pro domácí měření krevní glukózy diabetiky. Původně měl formát tužkového sensoru, později se prosadil design velikosti kreditní karty.

⁶ Clemens A. H., Chang P. H., Myers, R. W. *Proc. Journes Ann. Diabtol. Hotel-Dieu, Paris* (1976).

⁷ Liedberg B., Nylander C., Lundstrom, I. *Sens. Actuators* **4**, 299 (1983).

⁸ Cass A. E. G., Francis D. G., Hill H.A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott, L. D. L., Turner A. P. F. *Anal. Chem.* **56**, 667 (1984).

Tyto produkty nyní vyrábí firmy Abbott (nedávno převzal firmu Medisense), Boehringer Mannheim a Bayer a společně představují 85% trhu se všemi biosensory. Roku 1996 tyto společnosti dosáhly obrátu 185 mil US\$ a jejich produkce v posledních letech stále narůstá.

Dnes pokračuje explozivní nárůst výzkumu biosensorů v celosvětovém měřítku, který přináší i řadu negativních jevů (opakované objevování již objeveného, omezování technologických informací, zcizování výsledků). Biosensory vystupují z vědeckých laboratoří do reálného světa.

Informace o biosensorech

Vzhledem k přetrvávajícímu bouřlivému rozvoji oboru jsou velmi důležité zejména informace obsažené v časopisech. *Biosensors and Bioelectronics* je specializována na všechny aspekty vývoje a použití biosensorů. Vychází od roku 1985, přináší nejnovější trendy i zajímavé události v oboru. *Sensors and Actuators B Chemical* je zaměřen zejména na otázky spojené s fyzikálně-chemickými převodníky. *Electroanalysis* / *Journal of Electroanalytical Chemistry* / *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* jsou tři časopisy přinášející informace zaměřené na elektrochemické biosensory. *Analytical Chemistry* / *Analytica Chimica Acta* / *Analytical Biochemistry* / *Analytical Letters* / *Analyst* / *Trends in Analytical Chemistry* je řada čistě analytických časopisů přinášející stále častěji články o biosensorech a jejich aplikacích. *Enzyme and Microbial Technology* informují o mikrobiálních sensorech, *Journal of Biotechnology* o aplikacích při biotechnologických procesech, *Journal of Immunological Methods* uvádí aplikace imunochemických sensorů, *Langmuir* / *Thin Solid Films* o některých aspektech imobilizačních postupů. Každé dva roky se koná celosvětový kongres o biosensorech (1990 Singapur, 1992 Ženeva, 1994 New Orleans, 1996 Bangkok, 1998 Berlín, 2000 San Diego), existuje řada specializovaných konferencí zaměřených např. na použití biosensorů v životním prostředí, medicíně. Na analytických konferencích je obvykle nějaká sekce věnována biosensorům. Jedna část řady *Methods in Enzymology*⁹ byla věnována biosensorům a je k dispozici samozřejmě řada učebnic¹⁰ a monografií

⁹ Mosbach K. *Immobilized Enzymes and Cells, Methods in Enzymology*, Vol. **137**, Academic Press, San Diego, 1988.

¹⁰ Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S. *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1987.

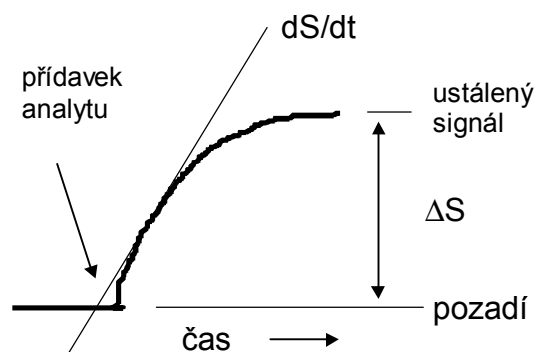
Cass A. E. G. *Biosensors: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1990.

Scheller F., Schubert F. *Biosensors*, Elsevier, Amsterdam, 1992.

Buerk D. G. *Biosensors, Theory and Applications*, Technomic, Lancaster, 1993.

pojdnávajících o všech aspektech biosensorů¹¹ nebo specializovaných monografií zaměřených na užší oblasti¹². Několik článků o biosensorech bylo publikováno i v Chemických Listech¹³.

Základní pojmy



Průběh měření s biosensory.

Schématické znázornění typického měření s katalytickým biosensorem. Po ustavení základní linie signálu následuje přidavek vzorku s analytem. Měření lze provádět buď kineticky - zaznamenává časová derivace signálu, nebo konečná změna signálu po dosažení ustáleného stavu (steady state).

Citlivost

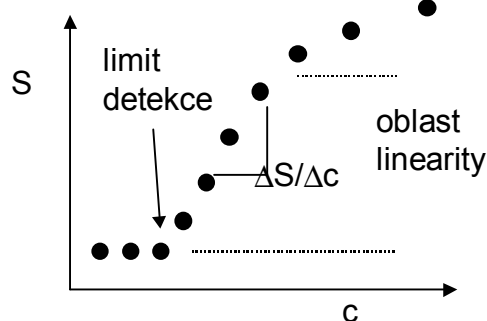
je konečná ustálená změna výstupního signálu biosensuru (S) v důsledku změny koncentrace analytu (c), tj. $\Delta S/\Delta c$, nebo dS/dc . Při provádění kinetických měření (sleduje se časová změna signálu dS/dt) se citlivost vypočítá jako $\Delta(dS/dt)/\Delta c$. Někdy se používá transformovaný signál, např. při potenciometrických měřeních $\ln S$. Speciálními druhy signálu mohou být plocha (časový integrál), frekvenční analýza apod. Signál by měl být tak velký, aby šel dobře

-
- ¹¹ 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.
- ¹² 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.
- ¹³ Skládal P. Piezoelektrické biosensory. *Chem. Listy* **89**, 170 (1995).
 Kaláb T. Imunosensory. *Chem. Listy* **89**, 363 (1995).
 Brynda E. Optické sensory založené na biospecifických interakcích. *Chem. Listy* **90**, 14 (1996).
 Chudobová I., Vrbová E. Optické biosensory pro glukózu. *Chem. Listy* **90**, 295 (1996).
 Skládal P. Použití biosensorů ke sledování afinitních interakcí biomolekul. *Chem. Listy* **90**, 863-72 (1996).
 Stančík L. Amperometrické biosensory pro nevodné prostředí. *Chem. Listy* **91**, 30 (1997).
 Skládal P., Macholán L. Biosensory – současný stav a příští trendy. *Chem. Listy* **91**, 105 (1997).

měřit. V ideálním případě by citlivost měla být konstantní po celou dobu životnosti biosensoru. V reálných systémech se změny citlivosti kompenzují recalibrací.

Kalibrace

spočívá ve vystavení biosensoru různým standardním roztokům o známé koncentraci analytu.



Kalibrační závislost

Kalibrační body by měly uzavírat pracovní oblast biosensoru, aby nebylo třeba provádět nespolehlivé extrapolace. Je vhodné použít co nejméně kalibračních bodů, pokud je znám tvar kalibrační závislosti (nejvhodnější je samozřejmě přímka), stačí 1 nebo 2 body.

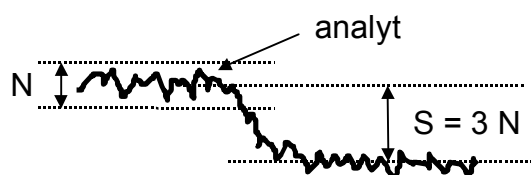
V ideálním případě by stačilo provést kalibraci pouze 1x pro nový biosensor, prakticky je nutné tento proces periodicky opakovat.

Linearita

u ideálního biosensoru existuje v celé pracovní oblasti, tj. biosensor má konstantní citlivost pro všechny možné koncentrace analytu, tj. od nuly po limit daný rozpustností. Prakticky je oblast linearity pouze užším intervalem uvnitř pracovní oblasti. Nelineární části existují zpravidla v horní části (oblast saturace). V lineární oblasti stačí k provedení kalibrace pouze dva body. Pro praktické použití biosensory není linearita nezbytně nutná (počítače), ale je třeba mít stálý průběh kalibrační křivky. Nelineární úseky lze např. aproximovat několika přímkami. Často se linearity dosahuje matematickou transformací měřeného signálu, např. semilogaritmická citlivost $\Delta \ln S / \Delta c$ existuje v potenciometrii. Nelineární kalibrační závislosti samozřejmě vyžadují víc kalibračních bodů a komplikují praktické použití.

Limit detekce

(LOD, limit of detection) biosensoru je nejnižší stanovitelná koncentrace analytu. Ideálně je dán rozlišením elektronického měřicího přístroje, obvykle je zhoršován vedlejšími procesy.



Stanovení limitu detekce

Pro definici se často používá velikost šumu (N, noise) signálu a limit detekce se bere pro poměr $S/N = 3$.

Šum

je zejména elektromagnetické povahy (frekvence 50 Hz rozvodné sítě), lze ho omezit elektrickým stíněním biosensoru a přívodních vodičů. Jiným zdrojem šumu mohou být turbulence vznikající při míchání. Snížení velikosti šumu lze dosáhnout uspořádáním elektronických měřících obvodů (frekvenční závislosti zesilovačů, analogové filtry) nebo digitálními technikami (akumulace signálu, průměrování, vyhlazování).

Signál pozadí

(background) je signál v nepřítomnosti analytu, obvykle se automaticky odečítá od měřeného signálu: $S = S(\text{měřený}) - S(\text{pozadí})$. V některých případech je výhodnější použít referentní koncentraci analytu a vůči ní vztáhnout měřený signál. Pro semilogaritmický případ pak dostáváme $S/S(\text{ref}) = (\text{měření} - \text{pozadí}) / (\text{reference} - \text{pozadí})$. Obvykle se předpokládá stabilita signálu pozadí, to však v praxi nemusí být pravda (signál pozadí obvykle časem klesá).

Hystereze

označuje vliv minulých měření na aktuální signál. Ideálně by měla být nulová. Poznává se ze změny tvaru kalibračních křivek - objevuje se na nich konkávní resp. konvexní prohyb. Důvodem může být to, že vysoká koncentrace analytu může narušit okolí biosensoru nebo prostředí uvnitř biorekogniční vrstvy (nahromadění produktů reakce, lokální změny pH či teploty) a to ovlivní následující měření. Vliv hystereze se může omezit zpomalením měření (je čas na vyrovnání změn).

Dlouhodobá stabilita

(drift) je podmíněna změnami citlivosti biosensoru v čase. Citlivost obvykle klesá, ale může přechodně i 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 vlivy, mohou často uniknout pozornosti. Vždy je proto provádět kontrolu citlivosti a případně provést recalibraci.

Selektivita

(vliv interferencí). Odezva biosensoru by měla být vyvolána pouze přítomností stanovované látky, ostatní látky by se neměly projevit. Prakticky je často nutné rušivé látky eliminovat (zředění, konverse na nerušící sloučeniny, předřazení selektivní bariéry) nebo jejich příspěvek

na měřený signál paralelně určit jiným senzorem. Při tomto diferenciální uspořádání se použijí dva stejné převodníky, avšak biorekogniční vrstvou je pokrytý pouze jeden. Druhý slouží jako referentní, lze ho povlčet vhodnou indiferentní vrstvou pro vyrovnání difúzních podmínek.

Rychlost odezvy

je určována zejména fyzikálními vlastnostmi biosenzoru (velikost). Závisí na rychlosti difúze analytu z okolního prostředí k povrchu biosenzoru a dále pak vnitřní difúzí uvnitř systému biosenzoru. Uplatňují se koncentrace analytu, velikost difúzních koeficientů, délka difúzní dráhy (počet vrstev biosenzoru). Z praktického hlediska je výhodné, pokud odezva je limitována difúzí a nikoliv rychlostí bioreakce.

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%.

Rychlost konvekce

je určena přísunem látek z okolí k biosenzoru. Lze ji zvýšit zrychleným mícháním nebo tokem nosného média, je ovšem třeba dát pozor na vznik turbulentních jevů, které zase konvekci mohou zpomalit.

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 termostat nebo vyhřívaný kovový blok. Pokud se pracuje za laboratorních podmínek nebo v terénu, je vhodné spolu s vlastním měřením sledovat také teplotu.

Životnost biosenzoru

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 biosenzoru je obecně vhodná nižší teplota (chladnička, mraznička), z praktického hlediska je pohodlnější skladování v suchém stavu. Optimální podmínky je třeba vždy hledat individuálně.

Biokompatibilita

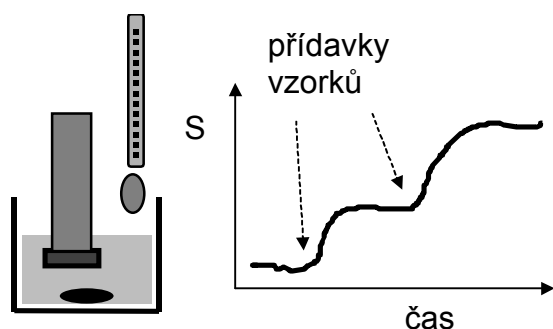
má zvláštní význam pro biomedicínské aplikace (měření in vivo). Při umístění biosensoru přímo v krevním toku je třeba zamezit srážení krve (impregnace heparinem), ve tkáních hrozí nebezpečí zánětlivých reakcí, zajištění a zarůstání pojivovou tkání. Případná sterilizace biosensoru nesmí negativně ovlivnit jeho aktivitu.

Podmínky měření s biosensory

Přímý kontakt se vzorkem

Biosensor se nachází přímo ve sledovaném prostředí (řeka, tkáň, krevní řečiště, fermentor, ...). Přitom by jeho činnost neměla okolní prostředí ovlivnit - vyčerpávání analytu důsledkem měření, ovlivnění toku jiných látek. Při tomto způsobu použití může být užitečné měnit polohu biosensoru, tak lze získat dodatečné informace o distribuci analytu v prostředí a odhalit případné existující koncentrační gradienty.

Uzavřená nádoba



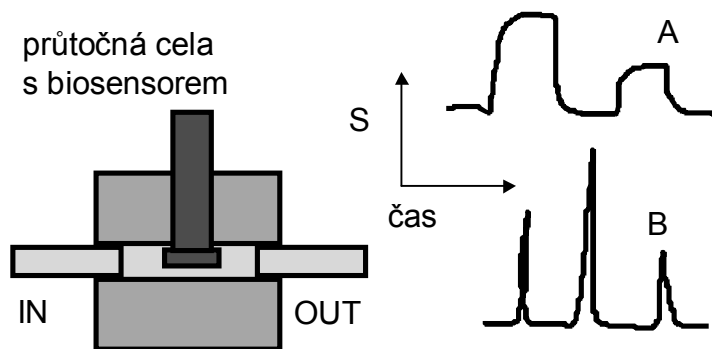
Měření v nádobce

Biosensor je umístěn ve vhodné nádobce (často opatřená vodním pláštěm pro teplotu a magnetickým 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.

Přidavky vzorku lze často několikrát opakovat. Někdy je možné celou nádobku vyplnit vzorkem (např. voda, mléko, ...). Podmínky měření (druh a koncentrace pufru, teplota, pH) je vhodné pro každý typ biosensoru optimalizovat. Toto uspořádání je velmi jednoduché a nenáročné na vybavení, nevýhodou je potřeba manuální obsluhy.

Průtočný systém

Biosensor je umístěn ve vhodné průtočné cele. Jsou možné dva způsoby činnosti. Systémem se nechá střídavě protékat zóna základního roztoku a zóny vzorků (A).



Průtočné měření s biosensory

Měřený signál je tedy vyvolán přímo neřaděným 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, další podrobnosti budou probrány v samostatné kapitole.

Převodníky pro biokatalytické sensory

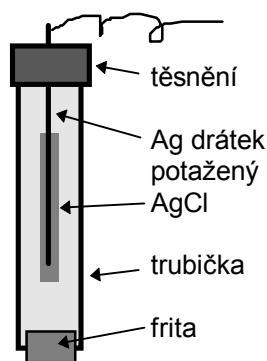
Elektrochemické systémy

Elektrochemické systémy reprezentují nejrozšířenější typ převodníku používaného pro konstrukci katalytických biosensorů. Hlavními výhodami jsou jednoduchá konstrukce měřicího systému, nízké pořizovací náklady a výborná citlivost. Pro sestavení elektrochemického měřicího systému jsou zapotřebí nejméně dvě elektrody, pracovní (měřicí) a referentní. Konstrukční uspořádání elektrod může být velice různorodé.

Referentní elektrody

slouží jako srovnávací bod pro měření respektive nastavování potenciálu pracovních elektrod. Jejich vlastní potenciál je přesně definovaný a pokud možno časově stálý. Základní typy referentních elektrod spolu s hodnotami potenciálu jsou uvedeny v následující tabulce. Komerčně dostupné referentní elektrody jsou obvykle příliš velké, takže se přistupuje k laboratorní výrobě. Referentní elektrody se obvykle uchovávají v roztoku KCl a nesmí se nechat vyschnout. U amperometrických biosensorů, kdy stabilita referentní elektrody není až tak kritická, se často používá pouze holý povrch stříbra a jako elektrolyt slouží okolní prostředí.

Typ referentní elektrody	zkratka	E_{NHE}	E_{SCE}
(V při 25°C)			
Normální vodíková elektroda Pt, H ₂ (1 atm) H ⁺	(NHE) (a=1)	0	-0.2412
Kalomelové elektrody Hg Hg ₂ Cl ₂ KCl	(...)		
nasyčená	(sat.)	(SCE)	0.2412 0
normální	(1 M)	(NCE)	0.2801 0.0389
nasyčená NaCl	(sat.)	(SSCE)	0.2360 -0.0052
Argentchloridové elektrody Ag AgCl KCl	(...)		
nasyčená	(sat.)		0.197 -0.045
	(3 M)		0.2042 -0.037
normální	(1 M)		0.2362 -0.005
Ag AgCl LiCl	(sat. v EtOH)		0.140 -0.101
Merkurosulfátová elektroda Hg HgSO ₄ K ₂ O ₄	(sat.)		0.655 0.414



Konstrukce miniaturní argentchloridové elektrody není příliš obtížná, obdobně lze z improvizovat i kalomelovou referentní elektrodu. Protože nejde jednoduše zatavit Ag drátek do skla, použije se v případě potřeby Pt drátek, který se postříbí. U vyráběných elektrod se vždy před použitím zkontroluje hodnota potenciálu vůči kvalitní referentní elektrodě.

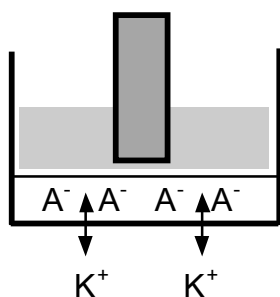
Pomocné elektrody

musí být tvořeny dobrého vodiče s dostatečnou plochou a elektrochemicky neaktivní. Používá se platina ve formě drátku či plíšku, uhlíková tyčinka, mnohdy stačí i nerezový drát.

Pracovní elektrody

použitelné pro biosensory zahrnují velmi širokou škálu materiálů i konfigurací: ušlechtilé kovy (Pt, Au), skelný uhlík, grafit a nejrůznější kompozitní směsi, vodivé polymery a organické vodivé soli. Použitelný rozsah pracovního potenciálu je vždy volit tak, aby nedocházelo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektrody nebo k interferenčním reakcím (rozklad vody nebo jiných složek pracovního roztoku, redukce rozpuštěného kyslíku). Velmi důležitá je často příprava povrchu elektrody před vlastním měřením nebo imobilizací biomolekul. Provádí se leštění povrchu brusnými prášky (diamantový nebo oxid hlinitý), následuje opláchnutí a případně ozvučení ultrazvukem. Někdy je třeba odstranit povrchové nečistoty (oxidy kovů) buď pomocí kyselin nebo anodizací.

Potenciometrické bioelektrody



Základem potenciometrie je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem. Historicky velmi raný typ biosensory, převážně **enzymové elektrody**. Převodníkem je iontově selektivní elektroda (ISE) v kombinaci s enzymovou vrstvou. Rozsah měřitelných koncentrací je dán vlastnostmi ISE: 10 μM až 0.1 M, pro konečné biosensory pak bývá typicky 0.1 až 10 mM, odezva je logaritmická.

Měří se potenciál pracovní elektrody proti referenční elektrodě - ta musí být kvalitní (časově stálá), přitom v systému neteče proud - je třeba měřicí přístroj s velkým vstupním odporem (dnes operační zesilovač). Referenční elektroda je často integrovanou součástí měřicí (komerční systémy - kombinované elektrody), v nouzovém případě ji lze zhotovit v laboratorních podmínkách¹⁴. Potenciál E ISE pro sledovaný iont (aktivita a_i) v přítomnosti rušivého iontu (a_j) je dán rovnicí:
$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln [a_i + k_{ij} (a_j)^{z/y}]$$

Použité symboly: k_{ij} selektivní koeficient (čím menší, tím vyšší koncentrace rušícího iontu je tolerována), nábojová čísla (pro kationty je > 0) pro stanovovaný (z) a rušící (y) iont, standardní potenciál (E_0), plynová ($R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) a Faradayova konstanta ($F = 96487 \text{ C mol}^{-1}$).

Druhy ISE

- * skleněná elektroda - H^+ - měření pH, běžně dostupná
- * pevné ISE (solid state) - tenká vrstva iontového vodiče: monokrystal nebo směs krystalů, precipitát; homogenní nebo heterogenní (mnohonásobně levnější, vlastní materiál dispergován v inertní matrici (PVC, silikonová guma - např. průtočná trubička) na bázi oxidů kovů pro měření pH:
$$\text{M}_x\text{O}_y + 2y(\text{e}^- + \text{H}^+) \longrightarrow x\text{M} + y\text{H}_2\text{O}$$
 nebo dva oxidační stavy:
$$2\text{MO}_y + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \longrightarrow (2y-1)\text{M}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$$
 antimonová elektroda $\text{Sb/Sb}_2\text{O}_3$ - citlivá na přítomnost kyslíku iridiová (IrO_2) nebo paladiová (PdO_2) - termická oxidace povrchu kovů

¹⁴ Bard A. J. v knize Cass A. E. G., *Biosensors: A Practical Approach*. IRL Press, Cambridge, 1990, str. 60.

- * kapalné ISE - organický iontoměnič (kvarterní amoniové soli, antibiotika - valinomycin pro K^+ , nonaktin pro NH_4^+ , tri-n-dodecylamin pro H^+) je v rozpouštědle nasáklém v inertní matici, lze ho i zachytit v polymeru na povrchu Pt drátku (tzv. coated wire electrodes)
- * speciální membrána (teflon) propustná pro plyny na povrchu obvyklé ISE (nejčastěji pH), za ní slabý pufr, pro stanovení CO_2 , NH_3

Velikost směrnice kalibrační přímky není kritická a může se lišit od ideální - $\Delta E/\Delta \log c = 59/z$ mV, super / sub-nerstian), odlišnosti se odstraní kalibrací analytem.

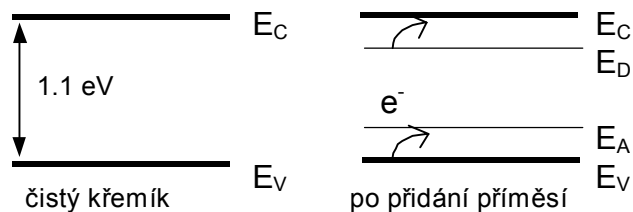
Potenciometrické bioelektrody

Řada enzymů je vhodná pro spojení s potenciometrickými sensory, i když v současnosti se dává přednost amperometrickým biosensorům, pokud je to možné. Nicméně mnohé enzymy pro spojení s amperometrií vhodné nejsou. Některé typické příklady jsou uvedeny v následujícím seznamu setříděném podle typu převodníku:

- * *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)

Polovodičové potenciometrické sensory

Velkou výhodou těchto sensorů jsou miniaturní rozměry, masová produkce a tudíž nízká cena ve srovnání s klasickými potenciometrickými elektrodami. Základním konstrukčním materiálem je křemík. Jeho vodivost je velmi nízká, avšak přidávkem vhodných stopových příměsí lze jeho vodivost zvýšit - získá se **polovodič**. Podmínkou vodivosti je možnost volného pohybu elektronů.



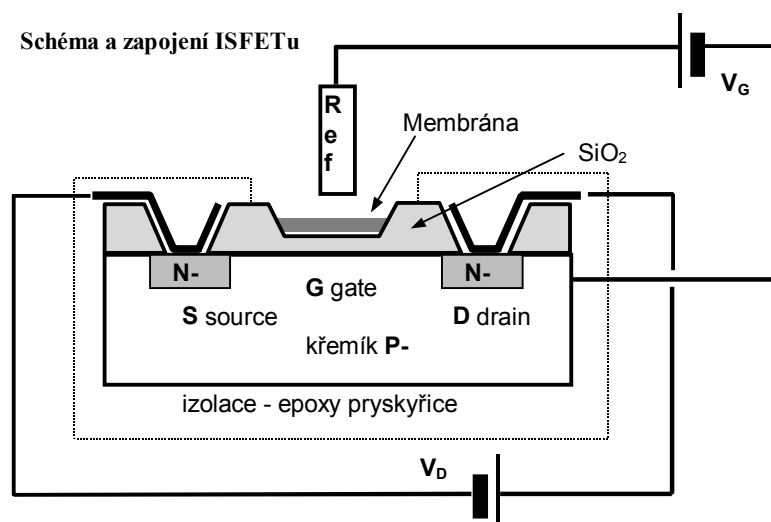
U čistého křemíku je však základní valenční hladina E_V plně obsazena, a elektrony se na ní nemohou pohybovat. Na vodivostní hladině E_C je místo pro pohyb, ale nejsou zde elektrony.

Energetické hladiny elektronů

Vlastní kinetická energie elektronů na E_V je za běžných podmínek kolem 0.04 eV, takže elektrony nemohou přeskočit na vodivostní hladinu E_C . Zvýšení vodivosti se dosáhne dopováním - přidavkem atomů z V. (P, As, negativní - n) nebo ze III. (B, Al, pozitivní - p) skupiny periodické tabulky. Tak při n dopování se vytvoří donorová hladina elektronů E_D těsně pod vodivostní hladinou, takže přenos elektronů z E_D na E_C je snadný. Opačně působí přidání atomů s volnými pozice elektronů (díry, pozitivní dopování), vytvoří se tak akceptorová hladina E_A . U polovodičových materiálů se pak hladina, na které je pravděpodobnost obsazení elektrony 50% nazývá Fermiho (E_F). Nachází se mezi E_V a E_C , její poloha odpovídá množství dopujících atomů.

ISFET "ion sensitive field effect transistor"

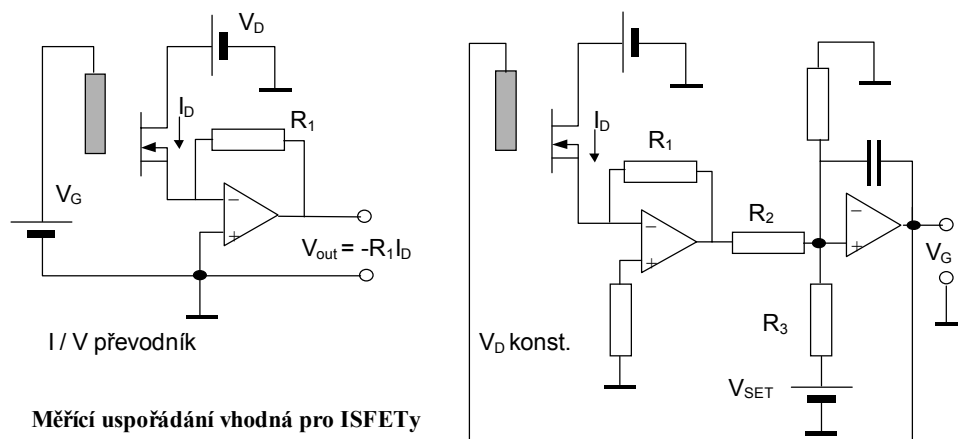
Základem ISFETů je tranzistor řízený polem (FET) fungující na principu změny vodivosti prostřednictvím elektrického pole. Odpor cesty proudu mezi oblastmi S (source) a D (drain) se změní, když se na hradlo G (gate) přivede napětí (změní se elektrické pole). Schématické znázornění ISFETu je ukázáno na obrázku.



Základem je křemík (P), elektrody source a drain mají vodivost N. Povrch ISFETu mimo S a D je povlečen oxidem křemičitým, oblast hradla (gate) je potažena selektivní membránou, která je v kontaktu s okolním roztokem; ostatní části jsou izolovány epoxypryskyřicí.

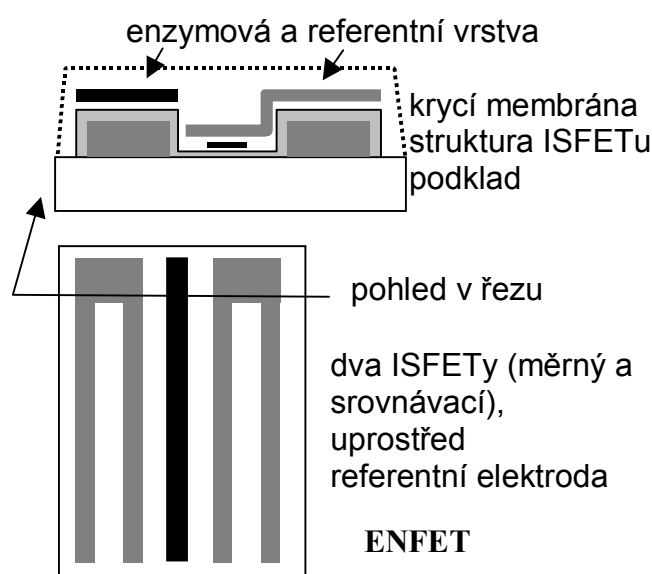
Potenciál hradla se určuje vzhledem k referentní elektrodě. Jako iontově-selektivní membrány lze použít řadu materiálů. Nejběžnější jsou **solid-state** membrány pro sledování změn **pH**,

materiál Si_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 . Odezva těchto ISFETů je logaritmická (52-59 mV/pH), probíhá masová produkce, levně. **Polymerní** membrány mohou být např. valinomycin/PVC pro stanovení draslíku. **Heterogenní** membrány tvoří AgCl, AgI, AgCN krystalky v PNF (polyfluorovaný fosfazin (problémem je adheze polymeru na povrch, odchlipuje se)). Při výrobě ISFETů se používá **litografie** - postupné nanášení jednotlivých vrstev, vytváření struktury pomocí masek.



Měřicí uspořádání vhodná pro ISFETy

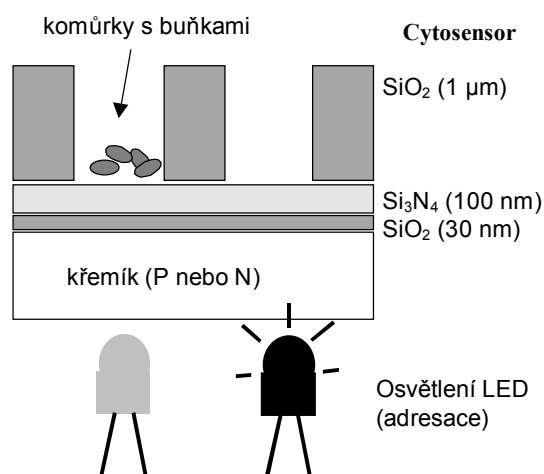
Pro měření s ISFETy se používají operační zesilovače, je také potřebná referenční elektroda (na obrázku znázorněna šedě). První uspořádání (I/V převodník, vlevo) pracuje s konstantním napětím hradla V_G a měří se protékající proud I_D . Při daném konstantním V_G se může výhodně použít stejná referenční elektroda pro několik ISFETů. Naproti tomu druhé uspořádání (V_D konst.) umožňuje měření proměnného V_G zpětnou vazbou při konstantním I_D . Přímou se tak stanoví potenciál rozhraní membrány a roztoku. Druhý operační zesilovač drží $I_D = V_{SET}/R_1$, současně $R_2 = R_3$.



Biosensor typu **ENFET** je ISFET s hradlem potaženým enzymovou vrstvou. Obvykle se sensor připravuje přímo v diferenciálním uspořádání (ENFET s enzymem a REFET s vrstvou inertního proteinu) pro kompenzaci změn vodivosti roztoku, jako pseudoreferenční elektroda může sloužit Au elektroda umístěná uprostřed. Příklad uspořádání je uveden na obrázku.

LAPS biosensory

Zkratka LAPS znamená light addressable potentiometric sensor¹⁵. Tento polovodičový převodník je konstrukčně jednodušší než ISFETy, navíc je možné připojení kontaktů ze strany která není v kontaktu s roztokem.

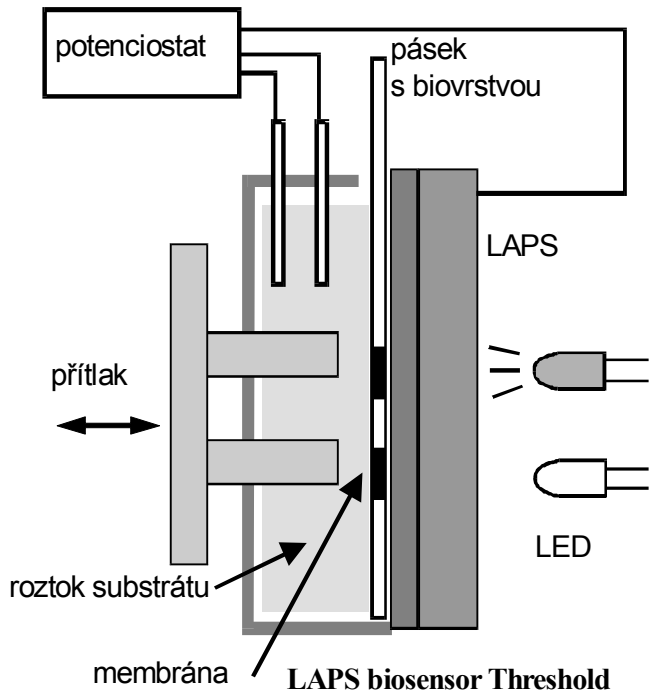


Křemíkový čip je potažený vrstvami oxidu křemičitého a nitridu křemíku, na povrchu je rozdělen na několik oblastí (komůrek) pomocí další vrstvy SiO₂. Celý čip má pouze jeden kontakt. V neosvětleném stavu je neaktivní. Pokud se z druhé strany osvětlí (IR LED, při 940 nm pronikne světlo do Si až 50 nm hluboko), dojde k lokální aktivaci a získá se signál odpovídající změnám pH v „adresované“ zóně.

Použití tohoto převodníku je tedy především pro měření pH změn. Výhodou je možnost vícekanálového měření.

Systém **Cytosensor Microphysiometer** (Molecular Devices) se např. používá pro testování toxicity nebo fyziologických účinků léčiv. Do komůrek se umístí buňky (bakteriální nebo tkáňová kultura - fibroblasty, keratinocyty, rakovinné buňky, 10⁴ až 10⁶). Při mírném průtoku se část buněk zachytí na povrch a v přítomnosti substrátu vyvolávají určitou změnu pH, která je úměrná metabolické aktivitě; např. respirací glukózy vzniká kyselina mléčná a oxid uhličitý. Po přidavku testované látky se pak zaznamená odezva jako časová změna dpH/dt. Na konci pokusu se rychlým průtokem se buňky z komůrek vypláchnou a lze začít další cyklus. Dá se tak studovat účinek růstových regulátorů, hormonů, lymfokinů, virů nebo virostatik. Postup je přesnější než obvyklé použití mikrotitračních destiček. Další komerční aplikace **Threshold** (viz obrázek) je určena pro imunochemická nebo jiná afinitní stanovení využívající ureázu jako značku.

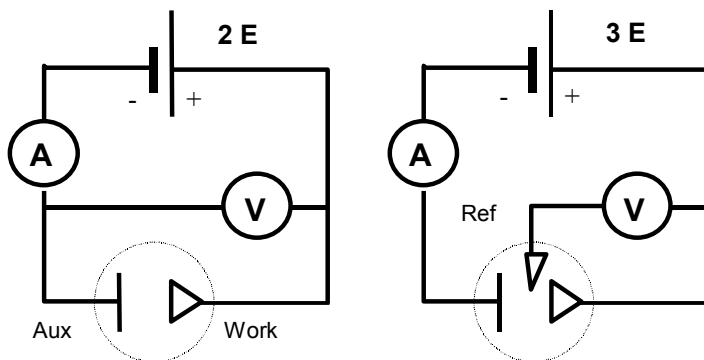
¹⁵ D. G. Hafeman, J. W. Parce, *Science* 240 (1988) 1182-5.; J. C. Ovicke, J. W. Parce, *Nature* 344 (1990) 271-2.



Jednotlivé biovrstvy (např. protilátky) jsou umístěny na výměnném pásku uzpůsobeném pro rychlou výměnu roztoků pomocí filtrace. Po afinitní reakci se vzorkem a značeným činidlem se pásek umístí do komůrky s LAPS převodníkem a zaznamená se signál. Mimo imunochemické systémy je možné sledovat hybridizaci nukleových kyselin.

Amperometrické bioelektrody

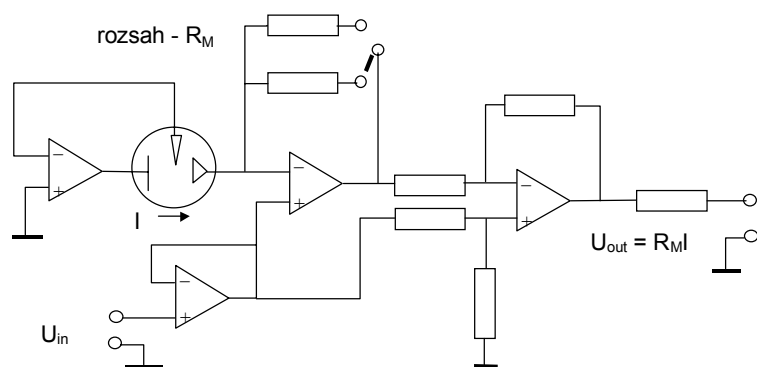
Poskytují jako signál proud, který je úměrný koncentraci analytu. Proud I se obvykle měří při konstantním napětí (potenciál E , nebo U) pracovní elektrody. Velikost proudu prošlá za daný čas t v systému pak udává náboj, který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách: $Q = I t = n F m / M_r$ $F = 96487 \text{ C/mol}$ značí Faradayovu konstantu. K elektrochemické oxidaci látek dochází na anodě ($I > 0$), redukční děje ($I < 0$) probíhají na anodě. Směr proudu je totožný se směrem toku pozitivních ekvivalentů (nábojů).



Amperometrická měření je možné provádět v dvou- nebo tříelektrodovém uspořádání. Pro první systém se napětí na pracovní elektrodě W (working) nastavuje proti pomocné elektrodě A (auxiliary, counter).

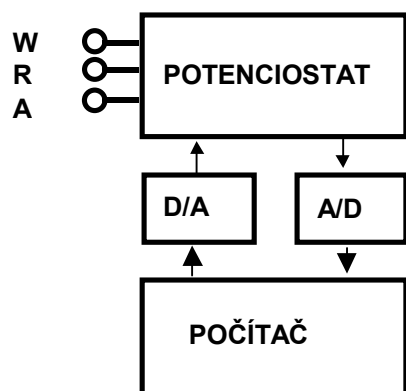
V tříelektrodovém uspořádání se navíc použije třetí referenční elektroda R , vůči které se nastavuje potenciál pracovní; jeho velikost tedy neovlivňuje velikost proudu procházejícího roztokem, což neplatí při dvouelektrodovém měření, kdy se část napětí ztrácí vlivem odporu měřicího roztoku a na rozhraní elektroda / roztok (potential drop). Se dvěma elektrodami ($2E$) se dá velmi dobře pracovat pokud netečou velké proudy (pod asi $10 \mu\text{A}$, např.

mikroelektrody) a odpor roztoku není příliš velký. Třielektrodový systém (3 E) je univerzální, nicméně vyžaduje **potenciostat**. Toto zařízení udržuje konstantní potenciál pracovní elektrody vůči referentní nezávisle na velikosti proudu. Z elektronického hlediska se nejedná o nijak složité zařízení tvořené několika operačními zesilovači (proto jsou amperometrické biosensory velmi levné).

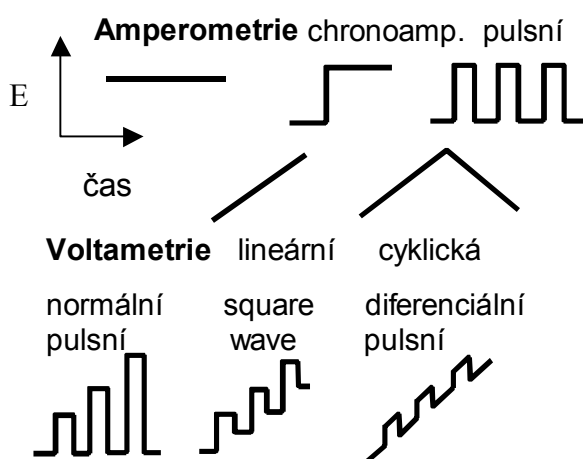


Elektronický obvod potenciostatu

Příklad jedné z možných konstrukcí potenciostatu je ukázán na obrázku. U_{in} značí excitační napětí, které se objeví na pracovní elektrodě, U_{out} pak výstupní signál pro následné zpracování.



To lze provádět pomocí zapisovače, nebo dnes lépe použitím počítače s analogově-digitálním převodníkem (A/D). Pomocí digitálně-analogového převodníku se může řídit i pracovní napětí.

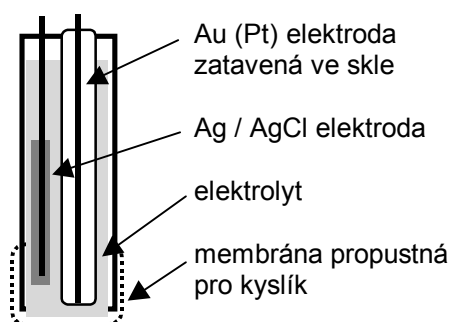


Podle časového průběhu potenciálu na pracovní elektrodě se rozlišuje celá řada měřících technik. Nejjednodušší je samozřejmě prostá amperometrie; na trhu je celá řada detektorů používaných i v chromatografii. Chronoamperometrie umožňuje získat informace o přechodných elektrodo- vých jevech po skokové změně pracovního potenciálu.

Pulsní amperometrie zase zvyšuje podíl signálu vůči šumu. Lineární a zejména cyklická voltametrie mají důležitou úlohu při vývoji amperometrických biosensory. Pulsní voltametrické techniky již vyžadují poměrně drahé přístrojové vybavení, i když potřebné pulsy lze relativně snadno generovat pomocí počítače s D/A převodníkem.

Biosensory na bázi elektrod pro kyslík a peroxid vodíku

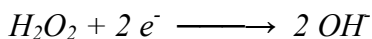
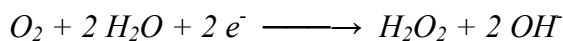
Historicky se jedná o velmi rané biosensory typu enzymových elektrod. Konstrukce **kyslíkové elektrody** (Clarkovy) je ukázána na obrázku.



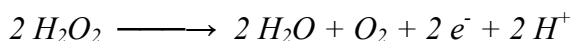
Clarkova kyslíková elektroda

Pracovní elektrodou je zlatý nebo platinový drátek (průměr 0.1 až 5 mm dle žádané citlivosti) zatavený ve skle, potenciále pro redukcí kyslíku je kolem -650 mV vzhledem k vnitřní Ag/AgCl referenční elektrodě. Jako elektrolyt slouží roztok KCl (1 až 3 M) a neutrální až slabě alkalický fosfátový nebo uhličitanový pufr (širší plato pro kyslíkovou vlnu a menší vliv vnějšího CO₂).

Klíčovou součástí je membrána propustná pro kyslík. Jako materiál se používá teflon (nejlepší, rychlá odezva, dobrá propustnost pro O₂), dále pak polypropylen a polyethylen. Tloušťka membrány by měla být co nejmenší, aby se dosáhlo rychlé odezvy, na druhé straně je třeba zajistit mechanickou stabilitu. Důležitá je také vysoká propustnost pro kyslík (nejlepší u silikonové gumy, ta je ale mechanicky nevhodná) a nízká propustnost pro vodní páru (podmiňuje stabilitu elektrolytu). Tělo elektrody je obvykle plastové (může nastávat hystereze při odezvě - plasty adsorbují kyslík: nylon < PVC < akrylát < polykarbonát < teflon), ev. skleněné nebo keramické. Elektrodová redukce kyslíku je čtyřelektronový proces:



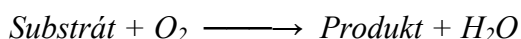
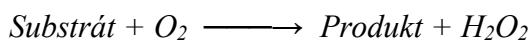
Velkou výhodou tohoto sensoru je prakticky absolutní specifita pouze ke kyslíku. Žádné rušivé látky z roztoku nemohou projít předřazenou membránou. Konstrukce elektrody pro stanovení **peroxidu vodíku** je podobná kyslíkové s tím rozdílem, že není použita plynopropustná membrána a používá se pozitivní polarizace (> 0.6 V) při které nastává anodická oxidace peroxidu:



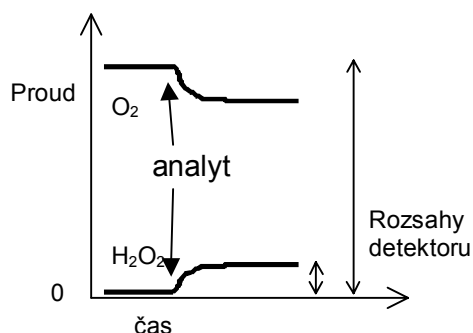
Často se dá kyslíková elektroda po vynechání membrány použít pro detekci peroxidu vodíku. Mimo kovové platiny je možné použít i grafitové elektrody elektrolyticky platinizované. Oxidace peroxidu na uhlíkových elektrodách vyžaduje značné přepětí. Obecně je oxidace peroxidu vodíku spojená s nebezpečím interference ze strany jiných oxidabilních látek, např. v séru mohou vadit kyseliny askorbová a močová či paracetamol. Specifita se dá zlepšit předřazením kontrolní membrány, která omezí přístup interferujících látek. Pro tento účel jsou

vhodné jsou např. hustá acetylcelulosová membrána a vrstvy polyfenylenoxidu (malá molekula peroxidu prochází póry, větší látky ne) nebo záporně nabitě membrány z Nafionu.

Oba výše zmíněné sensory jsou použitelné pro biosensory využívající enzymy *oxidázy* jako biorekogniční element. Tyto enzymy oxidují molekulu substrátu (analytu) za účasti kyslíku, přitom vzniká buď peroxid vodíku nebo voda:



První reakce je typická zejména pro oxidasy s flavinovým koenzymem (obvykle žluté barvy, např. *glukóza oxidáza*, *laktát oxidáza*), druhý typ převažuje např. u kuproteinů (*tyrosináza*). Přehled dalších typů bioanalyticky využitelných oxidáz je uveden v tabulce.



Oxidázové biosensory založené na detekci kyslíku nebo peroxidu vodíku

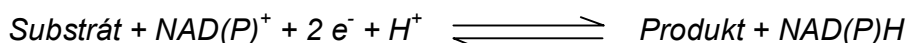
Vždy je třeba brát v úvahu, že koncentrace kyslíku v pracovním roztoku závisí na tlaku, teplotě a koncentraci použitého pufru. Zejména při měření kyslíku je vhodné roztok na počátku každého měření nasytit kyslíkem (probublání vzduchem). Jako signál se použije přímo měřený proud, nebo lze určit změnu koncentrace nebo parciálního tlaku kyslíku; ty pak nezávisí na druhu použité elektrody.

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	+

Pokud existuje možnost volby, je vhodnější měření peroxidu vodíku vzhledem k vyšší dosažitelné citlivosti. Sleduje se produkce a na počátku měření je tedy proud prakticky nulový, takže lze nastavit citlivý rozsah detektoru a stanovit nízké koncentrace peroxidu i původního analytu. Druhý způsob sleduje spotřebu kyslíku, takže výchozí signál je maximální a odpovídá nejvyšší koncentraci kyslíku; proto se musí nastavit poměrně hrubý rozsah detektoru, a malé změny mohou zaniknout v šumu signálu.

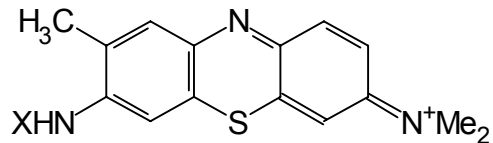
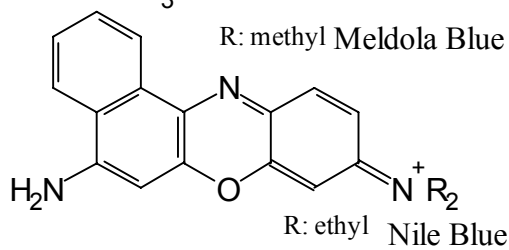
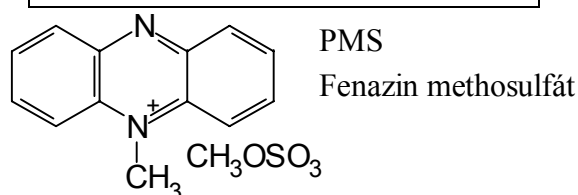
Dehydrogenázové biosensory

Největší skupinou oxidoreduktáz jsou dehydrogenázy (existuje přes 250 NAD^+ a 150 $NADP^+$ dependentních enzymů), analyticky významné druhy jsou shrnuty v tabulce. Katalyzující redoxní reakce s účastí $NAD(P)^+/NAD(P)H$ párů:



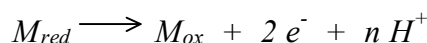
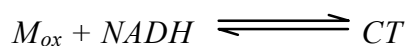
Substrát DH	zkratka	EC
Alkohol	ADH	1.1.1.1
Aldehyd	AIDH	1.2.1.5
Alanin	Ala-DH	1.4.1.1
Formiát	FDH	1.2.1.2
Galaktosa	Gal-DH	1.1.1.48
Glycerol	Gly-DH	1.1.1.6
Glukosa	GDH	1.1.1.47
Glukosa-6-fosfát	G6P-DH	1.1.1.49
Glutamát	GIDH	1.4.1.3
3-Hydroxybutyrát	3-HBDH	1.1.1.30
3-Hydroxysteroid	3-HSDH	1.1.1.50
Isocitrát	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

Tato reakce má rovnovážný průběh, přitom oxidace obvykle probíhá v slabě alkalickém prostředí. Pro elektrochemickou detekci $NADH^{16}$ je použitelná amperometrická reoxidace vznikajícího $NADH$ ($E^\circ = -560$ mV/SCE, reakce je heterogenní). Přímá oxidace však vyžaduje vysoký potenciál (přes 1 V na uhlíku), současně nastává i dimerizace a adsorpce produktů na povrch elektrody, - odezvy jsou pak nestabilní odezvy. Reoxidace se může provést pomocí **modifikujících látek** (E° -200 až -50 mV) vázaných na povrchu elektrody.



X: naphthoyl Naphthoyltoluidine Blue O

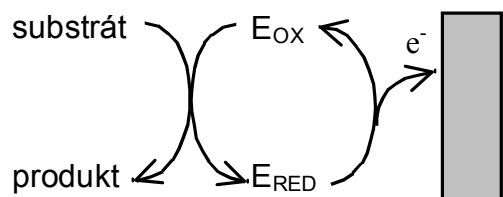
Nejčastěji se používají substituované fenaziny, fenoxaziny a fenothiaziny, oxidace nastává již kolem 0 V/SCE. Jinak lze užít také hexakynoželezitan nebo TTF.TCNQ. Průběh reakce je homogenní. Nejprve vzniká charge transfer komplex CT, po rozpadu je pak reoxidován mediátor, přitom $E > E^\circ$. Lze tedy pracovat při podstatně nižším potenciálu.



¹⁶ M. J. Lobo, A. J. Miranda, P. Tunon, *Electroanalysis* 9 (1997) 191.

Přímý přenos elektronů z biomolekul na elektrodu

Přenos elektronů v biologii a chemii je předmětem intenzivního výzkumu. Přímý reverzibilní přenos elektronů z biomolekuly (bílkovina, nukleová kyselina) je obvykle ztížen řadou faktorů. V bílkovinách se sice vyskytuje celá řada redoxně aktivních skupin (disulfidické můstky, Fe-S skupiny, flaviny, hem, řada iontů kovů), ale nachází se obvykle uvnitř molekuly. Kontakt redoxní skupiny s povrchem elektrody je možný pouze pro určitým způsobem orientované molekuly, což výrazně snižuje proudové odezvy.

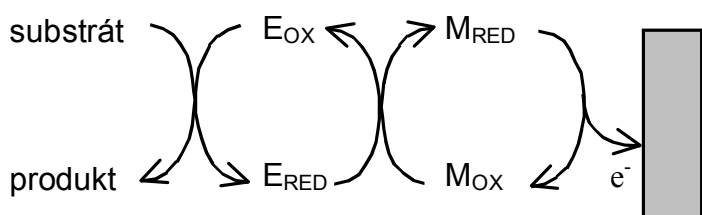


Velikost molekuly zase vede k velmi pomalé difúzi. Navíc se biomolekuly často adsorbují pevně na povrch elektrod a dochází tím současně k jejich denaturaci.

Přímý přenos elektronů

Pro konstrukci biosensorů je tento proces velice atraktivní, protože by výrazně zjednodušil konstrukční problémy. Bohužel, přímý přenos elektronů mezi biomolekulami a elektrodou byl pozorován zřídka, lze zmínit některé malé redoxní bílkoviny (cytochrom c, cytochrom b, azurin, ferredoxin) a výjimečně některé enzymy (lakáza, peroxidáza). Obvykle se používají uhlíkové elektrody, kovové elektrody se musí modifikovat vhodnými pomocnými látkami, které jednak brání adsorpci biomolekul a dále napomáhají jejich orientaci.

Mediátory přenosu elektronů



Pro usnadnění výměny elektronů mezi enzymy nebo jinými redoxními biomolekulami a elektrodou se používají nízkomolekulární redoxní látky – **mediátory**.

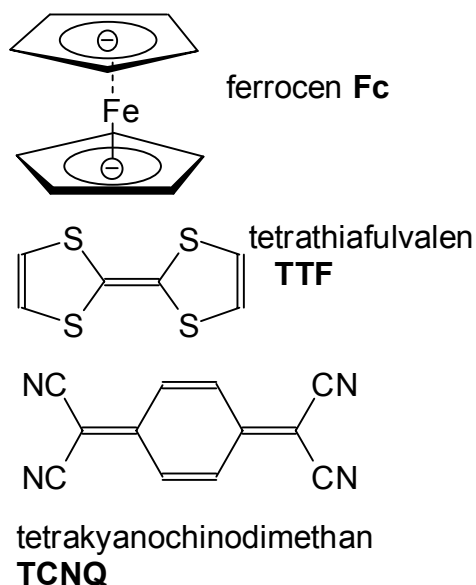
Přenos elektronů pomocí mediátoru

Použití mediátorů urychluje a obvykle vůbec umožňuje výměnu elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou. V tabulce jsou uvedeny hodnoty redoxních potenciálů. Byly zformulovány základní požadavky na mediátor¹⁷:

- * reaguje s biokomponentou a elektrodou
- * dostatečně rychlý přenos elektronů (je známa stechiometrie a počet přenášených elektronů)

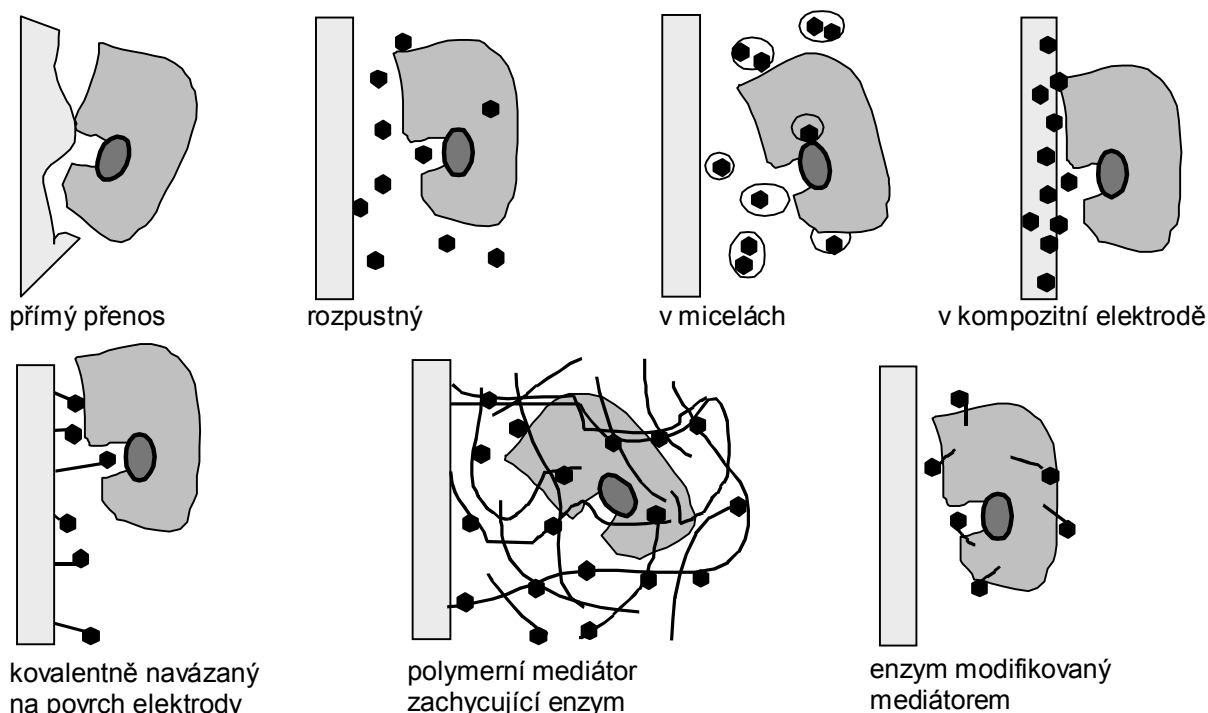
- * stabilní formy (redukováná i oxidovaná) za podmínek použití
- * neúčastní se postranních reakcí (např. s kyslíkem)
- * vhodný redoxní potenciál (větší rozdíl redoxních potenciálů E° mezi enzymem a mediátorem sice zvětší užitečný proud, současně však naroste také šum, nebezpečí interferencí a doba ustalování pozadí; přiměřený rozdíl je asi 100 mV)
- * bez vlivu pH na průběh redoxní reakce
- * netoxický (např. pro aplikace in vivo)
- * vhodný k imobilizaci (nejlépe nerozpustný či snadno adsorbovatelný např. na grafitu)

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 $K^4[Fe(CN)_6]^{4-}$	0.190
hydroxyethylferrocen	0.161
N,N'-dimethyl-p-fenylendiamin	0.139
ferrocenooctová 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
methylenová modř	-0.230
tetramethyl-p-benzochinon (durochinon)	-0.191
2-hydroxy-1,4-naftochinon	-0.378
fenosafranin	-0.493



Vlastnostem ideálního mediátoru se asi nejvíce blíží ferrocen. Existuje celá řada možností, jak začlenit mediátory do systému bioelektrody (obrázek). Nejjednodušší je použití rozpustných mediátorů volně v roztoku nebo uvnitř micel, snadné je také použití kompozitních směsí s mediátorem při přípravě elektrody (např. grafit + mediátor + acetylcelulosa jako pojivo). Na povrch kovových elektrod se dá navázat mediátor kovalentně. Prostorové polymerní struktury obsahující mediátorové skupiny mohou být výhodně použity k zachycení enzymů na povrchu elektrody. Poslední možností je navázat mediátor přímo na povrch enzymu.

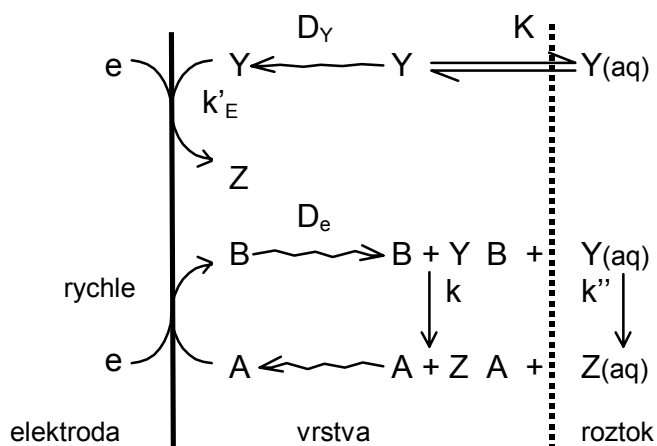
¹⁷ Turner A. P. F. *Meth. Enzymol.* **137**, 90 (1987).



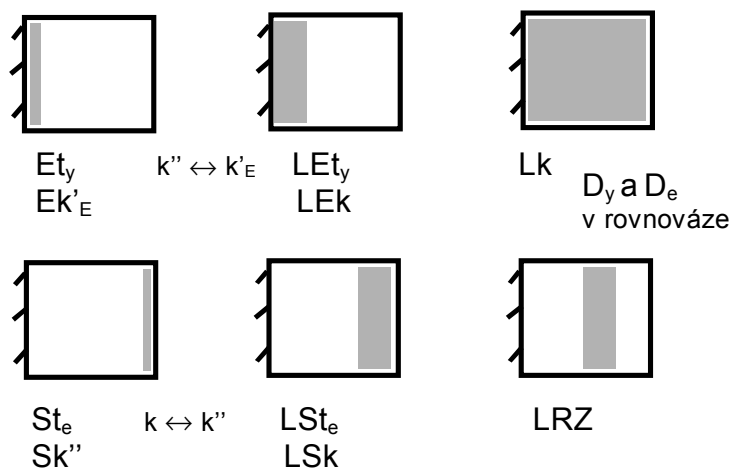
Principy konstrukce bioelektrod s mediátory

Kinetika modifikovaných elektrod

Použití mediátorů při konstrukci enzymových elektrod vyžaduje bližší pohled na děje probíhající na povrchu chemicky modifikovaných elektrod, proto jsou dále uvedeny některá východiska. Základem je elektroda pokrytá vrstvou obsahující přenašeč elektronů (modifikující látka - mediátor s formami A a B). Na obrázku jsou shrnuty jednotlivé možnosti přenosu elektronů z molekuly substrátu Y na elektrodu buď přímo (k'_E) nebo prostřednictvím mediátoru. Prvním krokem je rozdělení substrátu mezi okolním roztokem s $Y(aq)$ a vrstvou, dané partičním koeficientem K . Přenos (značí klikaté čáry) substrátu uvnitř vrstvy je popsán difúzním koeficientem D_Y , pro přenos elektronů pak máme koeficient D_e .



Předpokládá se, že pohyb elektronů uvnitř vrstvy probíhá velmi rychle přeskoky mezi jednotlivými molekulami mediátoru. Reakce přidaného substrátu s mediátorem ve formě B může probíhat buď uvnitř vrstvy (k) nebo na rozhraní s roztokem (k'').



Důležitá je velikost a poloha reakční zóny (RZ), tj. místa, kde dochází k reakci mezi substrátem Y a mediátorem B. Existuje 6 možností polohy zóny (velká písmena E electrode, L layer, S surface) a celkem 10 různých případů podle kroku limitujícího rychlost (k kinetika, t transport).

Pro posouzení má význam rychlost mediované reakce v homogenních podmínkách (k_2); tak např. případ Sk'' nastává pro $k_2 > 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, LSk pro $k_2 > 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a velké D_y (cca $10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Odhad množství imobilizované látky se provádí v indierentním elektrolytu, kde jedinou faradaickou reakcí je studovaný redoxní děj. Proudové pozadí - nabíjení dvojvrstvy - se obvykle separuje „podle oka“ (by eye), lze také porovnat odezvu pro nemodifikovanou elektrodu. Pokud je celkový náboj (úměrný I_p) pro daný děj závislý na rychlosti změny potenciálu v (sweep rate), tak není daný děj řízen elektrodovou reakcí, ale kineticky (pomalejší změna vede k většímu náboji - je dost času zareagovat). Další informace se získá výnosem I_p proti v nebo proti $v^{1/2}$. Lineární závislost I_p na $v^{1/2}$ indikuje difúzní limitaci procesu (přenos uvnitř filmu, současně $\Delta E_p \neq 0$). Pro I_p platí vztah:

$$I_p = 0.4463 [B]_0 A (nFD_e v)^{1/2} (RT)^{-1/2}$$

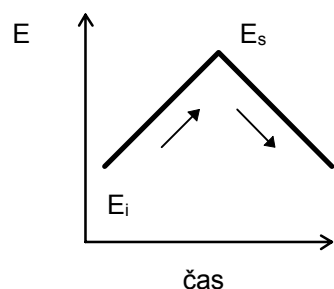
Lineární závislost I_p na v indikuje vliv povrchové reakce bez difúzní limitace, přitom $\Delta E_p = 0$.

Speciální elektrochemické techniky

Tyto postupy se uplatňují zejména při vývoji a optimalizaci elektrochemických biosenzorů.

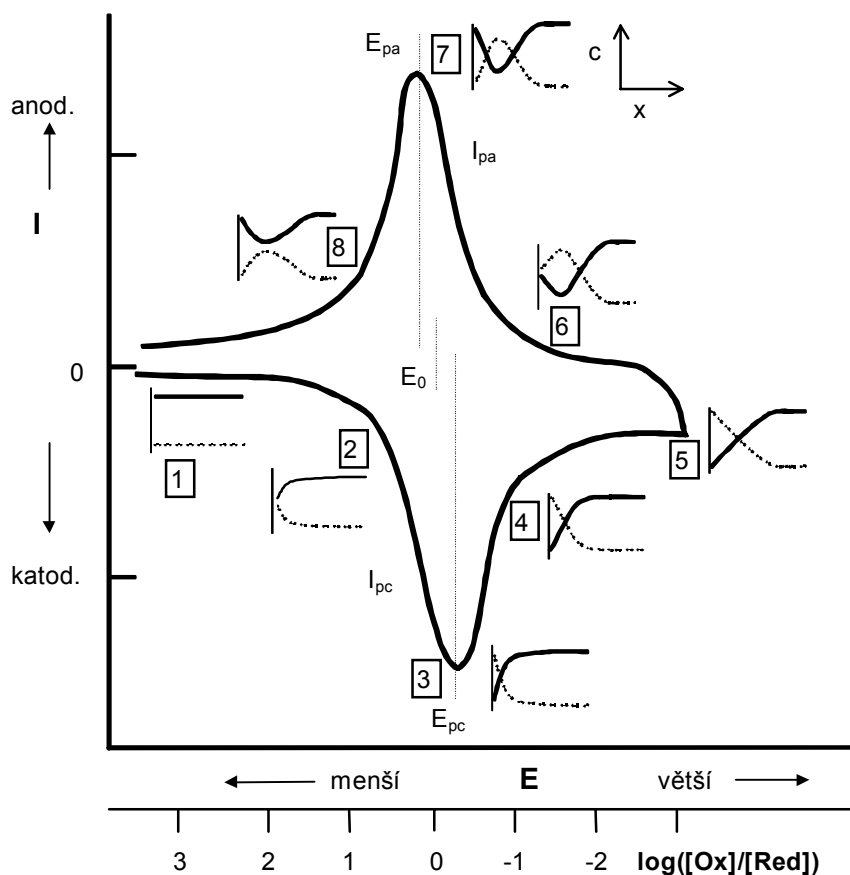
Cyklická voltametrie

Tato metoda je obvykle použita první při studiu nového elektrochemického systému.



Průběh potenciálu v čase má tvar trojúhelníku. Výchozí hodnota je E_i , poté následuje přímý běh (forward scan) až do zlomového bodu E_s (switch) a zpětný běh (reverse scan). Důležitým parametrem je rychlost změny potenciálu (scan rate).

Výsledná křivka - voltamogram - je záznamem proudu na napětí. Modelový voltamogram a jeho rozbor je uveden na následujícím obrázku.



Mimo základní voltametrické křivky jsou uvedeny také koncentrační profily (1 až 8) v blízkosti povrchu elektrody pro oxidovanou (plná čára) a redukovanou (přerušovaná čára) formu sledovaného redoxního páru. Poměry koncentrací jsou znázorněny na dolní stupnici. Znázorněný voltamogram by mohl odpovídat např. hexakynoželezitanu. Popis úseků grafu:

- 1) neprobíhá žádný děj (výchozí potenciál se volí tak, aby tekl minimální proud a neprobíhal žádný redoxní děj)
- 2) začíná probíhat redukční děj, proud narůstá a oxidovaná forma se postupně spotřebovává
- 3) maximum proudu I_{pc} při charakteristickém potenciálu E_{pc} , oxidovaná forma před elektrodou je spotřebována
- 4) pokles proudu - málo látky k dispozici pro redukci
- 5) mění se směr potenciálu, ale redukční děj ještě stále pokračuje
- 6) nárůst potenciálu působí oxidaci redukované formy nahromaděné před elektrodou, objevuje se anodický proud, postupně narůstá
- 7) maximum anodického proudu I_{pa} při potenciálu E_{pa}

8) pokles anodického proudu s vyčerpáváním redukované formy, návrat do výchozího stavu. Příčný běh potenciálu vede ke vzniku nového oxidačního stavu, který se pak testuje při zpětném kroku. Vnucený elektrodový potenciál kontroluje poměr koncentrací daného redoxního páru: $E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

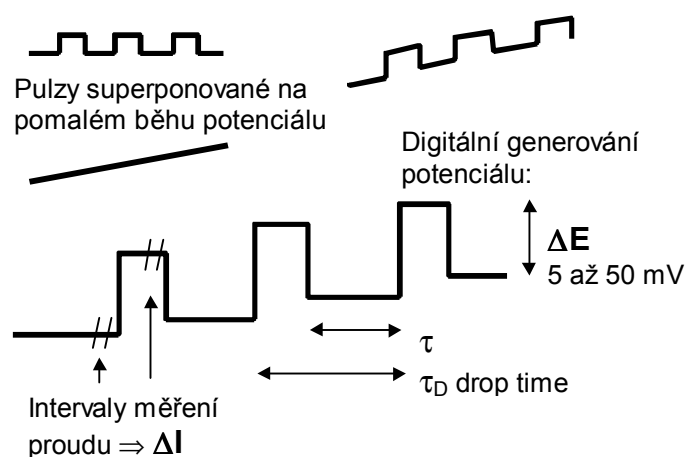
Logaritmická závislost působí prudké nárůsty proudu v přechodových oblastech. Proud je přitom úměrný $c - x$ profilu na povrchu elektrody (grafy 1 až 8): $I = nFAD \left(\frac{\delta c}{\delta x} \right)_{x=0}$

Při určování velikostí potenciálů a proudů ze záznamu je vždy třeba správně určit odpovídající základní linie. Lze vypočítat standardní redoxní potenciál pro daný děj:

$$E^\circ = (E_{pa} + E_{pc})/2, \quad \text{počet vyměňovaných elektronů } n, \quad \text{platí}$$

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx (59 \text{ mV})/2. \quad \text{Předpokladem je ovšem reverzibilita redoxních dějů.}$$

U pomalých procesů (ireverzibilní děje) se zvětšuje separace obou maxim; u reverzibilních (rychlých) dějů pak navíc jsou velikosti katodického a anodického maxima přibližně shodné (pokud neprobíhá nějaká chemická reakce generující / spotřebovávající jednu z látek!). Aplikace cyklické voltametrie zahrnují široké pole kvalitativního studia redoxních reakcí, plocha pod maximy je úměrná množství látek navázaných na povrchu elektrody.

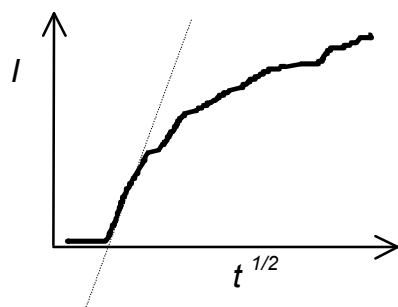


Podstatně citlivější než obyčejná cyklická voltametrie jsou **pulzní polarografické techniky**; ty řeší kapacitní problémy spojené s nabíjením povrchové dvojvrstvy. Na obrázku je ukázán průběh měření při diferenciální pulzní polarografii (DPP).

Proud se měří pouze v krátkých intervalech po doznění změn vyvolaných kapacitními pochody. Šířka pulzu je mnohem menší v porovnání s celkovou dobou cyklu τ_D . Časovou konstantu obvodu lze ovlivnit zařazením sériového odporu 100 až 1000 Ω . Obdobně probíhá normální pulzní polarografie (NPP).

Chronoamperometrie

Na elektrodu se aplikuje potenciálový skok, tím se vyvolá náhlá změna redoxního stavu jejího povrchu.



Proběhne velmi krátce kapacitní proud, pak následuje faradaický proces řízený difúzí k volnému povrchu (2. Fickův zákon), průběh proudu $I(t)$ je dán rovnicí:

$$I(t) = \left(\frac{D_e}{\pi t} \right)^{1/2} \frac{\Delta Q}{L} \left\{ 1 + 2 \sum_{m=1}^{\infty} (-1)^m \exp \left(- \frac{m^2 L^2}{D_e t} \right) \right\}$$

Symboly ΔQ značí změnu náboje ve vrstvě, D_e difúzní koeficient přenosu náboje ve vrstvě a L tloušťku vrstvy. Analýza se provádí výnosem proudu proti odmocnině z času t . V počáteční fázi platí $t \ll D_e/L^2$, tj. koncentrační polarizace ve vrstvě nedosáhla ještě vnějšího povrchu

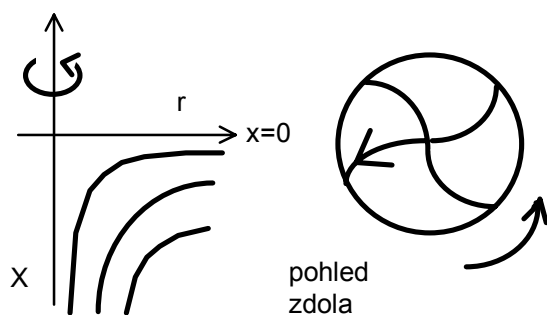
dostáváme zjednodušenou formu - Cottrellův vztah:

$$I(t) = \left(\frac{D_e}{\pi t} \right)^{1/2} \frac{\Delta Q}{L}$$

Náboj ΔQ se určí integrací přes celý časový interval, tloušťka L pak z celkového pokrytí elektrody (určí se cyklickou voltametrií). Difúzní koeficient lze určit ze směrnice v počáteční fázi záznamu, hodnoty jsou kolem $D_e \approx 1$ až $10 \times 10^{-13} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Často se tato technika kombinuje s opticky transparentními elektrodami.

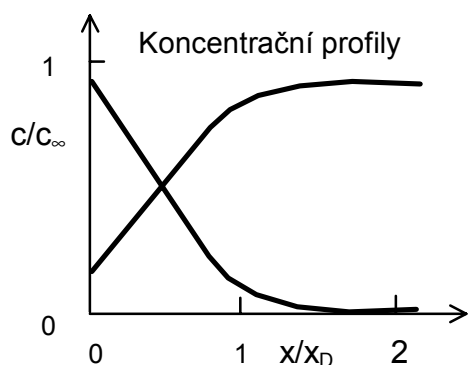
Rotační techniky (forced convection techniques)

Tyto postupy jsou užitečné při studiu reakce vázaného mediátoru s rozpustným partnerem, kdy je třeba znát jeho povrchovou koncentraci.



Výhodou je kontrola hydrodynamiky lze reprodukovatelně nastavit a řídit látkový transport mezi rotující elektrodou a okolním roztokem. Rotující elektroda "pumpuje" čerstvý roztok z okolního prostředí ke svému povrchu.

Před elektrodou se utvoří stacionární vrstva, která také rotuje (diffusion layer); mimo ni pak existuje "dokonale míchaný" roztok.



Tloušťku této vrstvy x_D lze vypočítat ze vztahu:

$$x_D = 0.643 D^{1/3} \nu^{1/6} W^{1/2}$$

Jednotlivé symboly jsou kinematická viskozita $\nu = \eta / \rho$, rychlost míchání W (Hz) a difúzní koeficient; typické tloušťky vrstvy jsou kolem 10^{-5} m, vrstva je uniformní přes celý povrch.

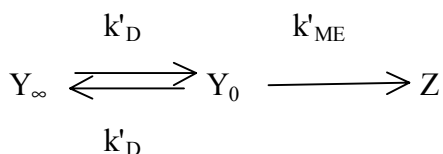
Profily koncentrací produkované a spotřebovávané látky poblíž povrchu elektrody jsou ukázány na obrázku. Přitom pro rychlost toku j platí:

$$j = \frac{D}{x_D} (c_\infty - c_0) = \frac{I}{nAF}$$

Pro rychlou elektrodovou reakci ($c_0 \rightarrow 0$) dostáváme velikost limitního proudu (Levichova rovnice):

$$I_L = 1.554 nFAD^{2/3} \nu^{-1/6} c_\infty W^{1/2}$$

Po zavedení efektivní rychlostní konstanty pro reakci na elektrodě k'_{ME} a konstanty $k'_D = D/x_D$ lze uvažovat děj:



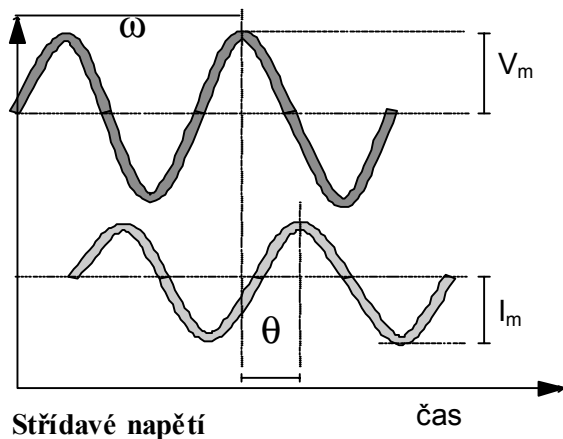
Pak platí vztah pro převrácené velikosti látkového toku a proudu (Koutecký - Levich):

$$\frac{1}{j} = \frac{1}{k'_D c_\infty} + \frac{1}{k'_{ME} c_\infty} \quad \text{resp.} \quad \frac{1}{I} = \frac{1}{1.554 nFAD^{2/3} \nu^{-1/6} W^{1/2} c_\infty} + \frac{1}{nFAk'_{ME} c_\infty}$$

Uvedený vztah lze využít při charakterizaci elektrodových mechanismů. Velikost k'_D někdy může záviset na c_0 .

Konduktometrie (Impedimetrie)

Základním rozdílem oproti výše uvádeným elektrochemickým technikám je použití střídavého elektrického napětí na pracovní elektrodě. Neuplatní se tedy faradaické procesy, koncentrační polarizace, nabíjení dvojvrstvy a podobně.



Na dvouelektrodivý systém se přivádí střídavé napětí (sinusoidální vlnění). Mimo velikosti napětí V_m (běžně kolem 100 mV) lze měnit i frekvenci f ($\omega=2\pi f$), jde tedy o jistý druh "spektroskopie". Studuje se odezva systému (elektrody a prostředí mezi nimi), měří se proud i a jeho fázový posun θ .

Impedance

Impedance Z je vektorová veličina charakterizující chování systému v přítomnosti střídavého napětí. Jako komplexní veličina má velikost $|Z|$ a úhel θ , nebo složky reálnou R (resistance) a imaginární X (reaktance). Platí pro ni následující vztahy:

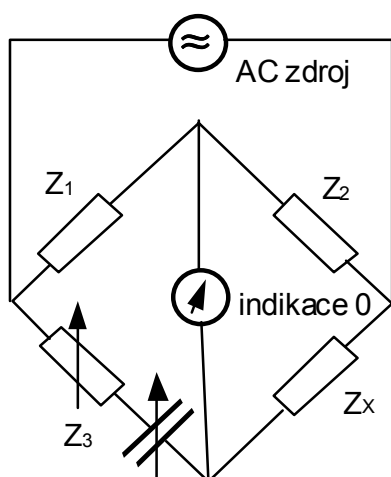
$$Z=R+jX \quad \operatorname{tg}\theta=-X/R \quad |Z|=(R^2+X^2)^{1/2} \quad |Z|=V_m/i_m$$

Jednotka impedance: 1Ω . Vodivost (konduktance) má symbol G , jednotka $1 \text{ S} = 1 \Omega^{-1}$ (Siemens). Experimentální měření: závislosti velikosti impedance a fáze na frekvenci vloženého napětí. Potřebný přístroj je můstek (automatické vyvažování), frekvenční analyzátoř, impedanční analyzátoř. Nejjednodušší systémy jsou:

odpor R $i = V_m/R \sin(\omega t)$;

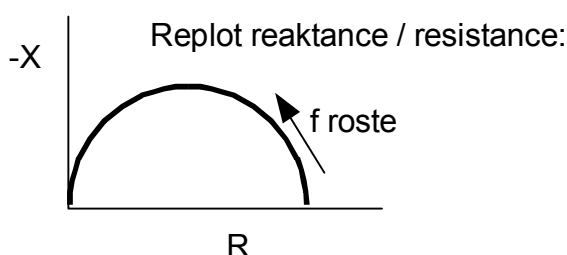
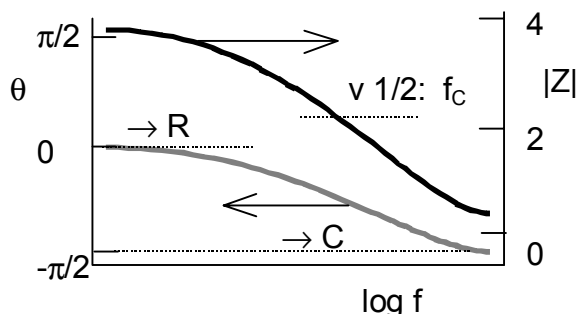
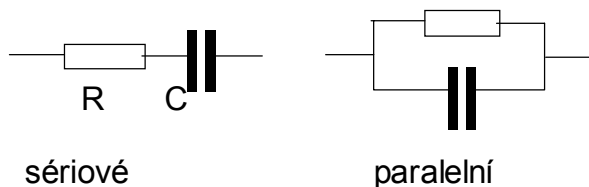
kondenzátor C $i = V_m\omega C \sin(\omega t + \pi/2)$ proud "předbíhá" napětí

indukčnost L $i = V_m/(\omega L) \sin(\omega t - \pi/2)$ proud se zpoždíuje



Sestaví se náhradní schéma studovaného systému jako kombinace R , C , L (L je obvykle zanedbatelná) a určují se velikosti prvků v závislosti na probíhajících (bio)chemických pochodech. Pro měření impedance je nejjednodušší zařízení založené na klasickém můstku, použitelné pracovní frekvence jsou do asi 10 až 100 MHz. U vyváženého můstku v rovnováze platí $Z_1 Z_X = Z_2 Z_3$, neprochází žádný proud. Protože je pevně nastaveno $Z_1 = Z_2$, platí pak také $Z_X = Z_3$.

Náhradní schéma reálného systému může být buď sériové, nebo paralelní.



seriově

impedance $Z=R+jX$

resistance R

reaktance $X=-1/(\omega C)$

paralelně

admittance $Y=1/Z=G+jB$

konduktance G

susceptance $B=\omega C$

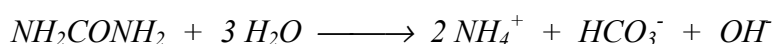
Experimentální záznam - impedanční charakteristika - sestává ze závislosti velikosti impedance $|Z|$ a fázového posunu θ na proměnné frekvenci vkládaného napětí. Pokud je θ blízké k 0, chová se systém jako čistý odpor, naopak blíží-li se $-\pi/2$, chová se jako kondenzátor. Záznam dále umožňuje určovat charakteristické frekvence f_c , odpovídající relaxačním časům $\tau=1/(2\pi f_c)$ dějů probíhajících ve studovaném systému.

Impedanční charakteristika

Lze tak provádět studium biopolymerů na povrchu elektrod a elektrodoých dějů obecně (lze zjistit relaxační časy charakterizující děje v biomembránách, rotaci molekul bílkovin, konformace postranních řetězců, hydrataci, ...). Je možné zjišťovat množství mikroorganismů ev. jejich druhového zastoupení (tvar frekvenčních spekter).

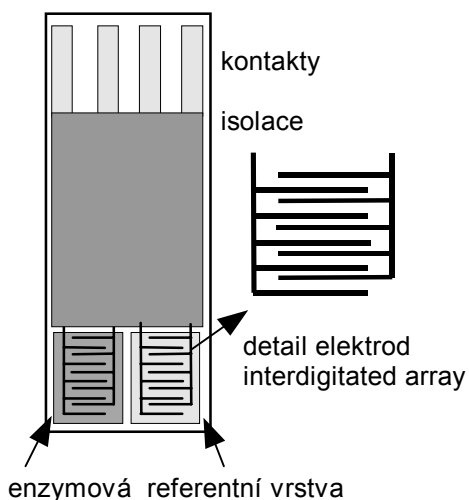
Konduktometrické biosensory

Měření vodivosti je málo specifické, takže se může do jisté míry uplatnit jako univerzální typ převodníku. Sledování změn vodivosti při biochemických reakcích vyžaduje produkci či spotřebu iontů nebo jiné změny (např. změna velikosti nabitých částic). Produkce iontů je velmi často spojena s účinkem hydroláz a amidáz, změnu velikosti nabitých částic zase vyvolává účinek fosfatáz, sulfatáz a nukleáz. Klasickým příkladem konstrukce konduktometrického biosensory je stanovení močoviny pomocí reakce ureázy.



Velkým problémem je obvykle vlastní vodivost pracovního prostředí. Je nutné používat málo vodivé organické pufrů, např. imidazol. Také změnu vodivosti vyvolanou samotným přidavkem vzorku je třeba odlišit, je žádoucí zanedbat změny vodivosti v celém roztoku a

sledovat především těsné okolí elektrod s imobilizovanými enzymy (vlastní signál v důsledku bioreakce).



Konduktometrický biosensor

Proto se výhodně používá diferenční uspořádání, kdy změny vodivosti v okolním roztoku vykompenzuje srovnávací elektroda.

Příklad takového biosensoru je ukázán na obrázku. Elektrody "interdigitated array" jsou z ušlechtilého materiálu Pt nebo Au, pracovní frekvence jsou od 100 Hz do 10 kHz dle očekávané vodivosti. U nás se úspěšně používá konduktometrický biosensor pro stanovení močoviny v mléce.

Optické biosensory

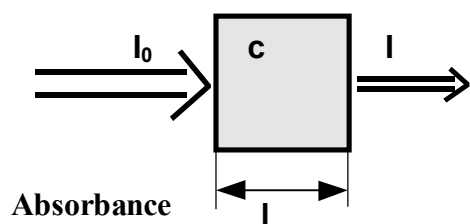
Optické metody byly vždy využívány při studiu biochemických procesů, získané zkušenosti se úspěšně uplatnily i na poli bioanalytických systémů. Základem je interakce světelného záření s chemickými látkami. Pro konstrukci katalytických biosensorů se využívají se optické techniky jako absorbance (poměrně málo), fluorescence a luminiscence.

Optické měřicí techniky

Jako **detektory** pro měření intenzity světla jsou nejcitlivější fotonásobiče, nevýhodou je potřeba vysokého napětí. O něco méně citlivým detektorem jsou fotodiody typu „avalanche“, ty však mají větší šum. Nejméně citlivé jsou obyčejné fotodiody (1000x méně než fotonásobiče), vykazují větší šum (malý vnitřní odpor), avšak jsou velmi levné, mechanicky stabilní a vhodné zejména pro přenosná zařízení. **Zdrojem** světla jsou lasery, světloemitující diody (LED), výbojky (pro UV oblast) či lampy.

Absorbční spektroskopie

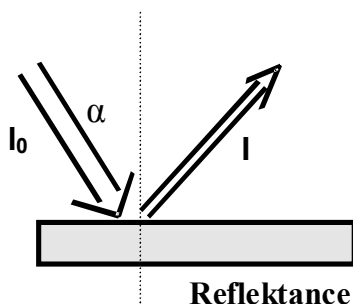
Pokles intenzity světelného paprsku (je dána počtem fotonů za čas) po průchodu měřicí květou je úměrný koncentraci stanovované látky. Protože absorbance závisí také na tloušťce vrstvy, jsou rozměry měřícího prostoru limitujícím faktorem. Rozptyl světla se obvykle zanedbává.



V praxi se používá absorbance A úměrná koncentraci (extinkční koeficient ϵ je konstantou úměrnosti). Vztah vyjadřuje Lambert-Beerovův zákon $I = I_0 \exp(-\epsilon c l)$ běžně se uvádí ve tvaru $A = \ln(I_0/I) = \epsilon c l$

Reflekční techniky

jsou založeny na odrazu světla od vhodného povrchu nebo od opticky hustšího média.

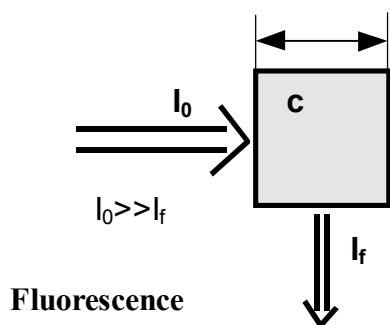


Při totálním odrazu světla proniká část energie ve formě exponenciální vlny (zhasivá vlna, evanescent wave) do spodních vrstev, což se využívá při studiu povrchových dějů (podrobněji viz dále). Penetrační hloubka (stovky nm) je dána vztahem:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{(\sin \theta)^2 - (n_2/n_1)^2}}$$

Fluorescence

je využívána velmi často z důvodu vysoké citlivosti. Absorbací energie přechází molekula do excitovaného stavu, návrat do základního stavu je provázen emisí záření - fluorescence. Pro budící záření se často používá světlo laseru, je také výhodné používat polarizované záření.



Uspořádání při měření fluorescence. Výstupní intenzita fluorescence závisí na kvantovém výtěžku Φ_f a na koncentraci fluoreskující látky: $I_f = k \Phi_f \epsilon c l$
Emisní spektrum látky je oproti excitačnímu posunuto k vyšším vlnovým délkám (Stokesův posuv).

Luminiscence

$A \xrightarrow{k_1} B^* \xrightarrow{k_2} X + h\nu$ Luminiscence je emise světla z molekuly v excitovaném stavu, aktivace rozpad který vznikl jako důsledek chemických reakcí.

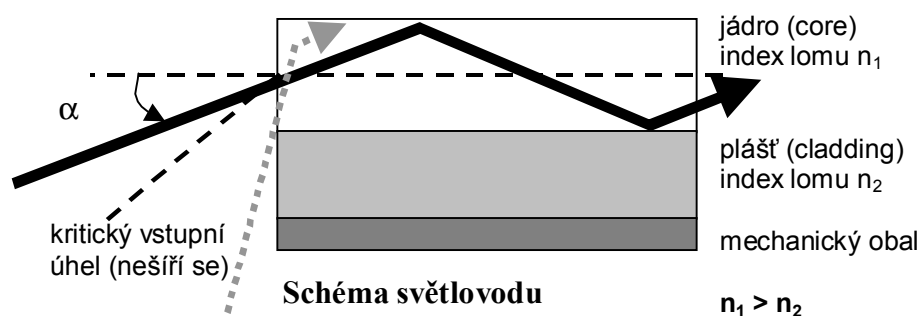
Intenzita vyzářovaného světla je závislá na čase, v určitém okamžiku prochází maximem:

$$I \approx [A]_0 \frac{k_1 k_2}{k_1 - k_2} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad t_{\max} = \frac{\ln(k_2/k_1)}{k_2 - k_1}$$

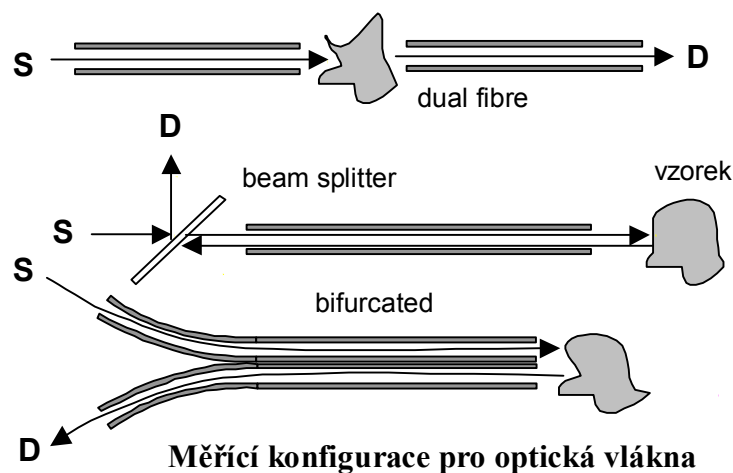
Kvantový výtěžek luminiscence odpovídá podílu počtu vyzářených fotonů a excitovaných molekul. U přírodních systémů (bioluminiscence) může dosahovat až 90%.

Světlovody a optická vlákna

Pro konstrukci optických biosensorů se nejlépe hodí optická vlákna - světlovody. Obvykle jsou cylindrická (vlákna), ale uplatňují se i planární systémy¹⁸.



Světlovody sestávají z několika vrstev o různém indexu lomu. Světlo se uvnitř vlákna šíří opakovanými odrazy na rozhraní jádra a pláště. Přitom limitním úhlem pro vstupující světelný paprsek je kritický úhel, který ohraničuje kuželovitý prostor, z něhož je světlo zachycováno a šířeno. Jádro vlákna je ze skla, křemene (pro použití ultrafialového světla), stále častěji také z levného plastu. Plášť je silikonový, obal z plastu (polykarbonát). Průměr optického vlákna se pohybuje od jednotek po stovky μm .

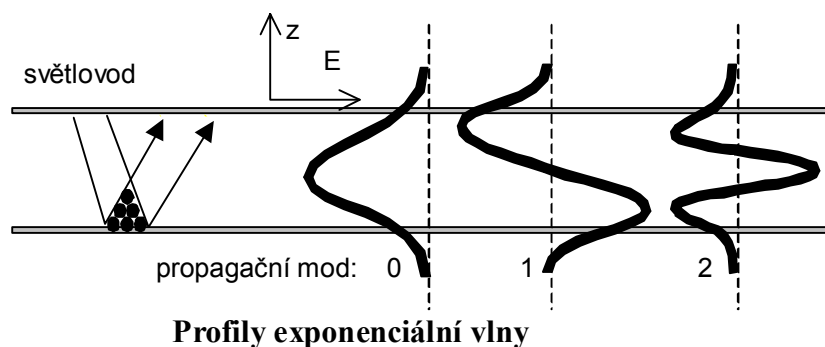


Podle vzájemné polohy vlákna a vzorku lze rozlišit tři základní konfigurace. První odpovídá klasickému měření absorbance. Druhá využívá jedno vlákno (jeden svazek) pro vedení dopadajícího i odraženého nebo vyzářeného světla. Poslední uspořádání používá nezávislé vedení světelných paprsků.

Nejběžněji se optická vlákna v oblasti biosensorů používají pro **přímé ozařování** vzorků (extrinsic sensing), interakce se tedy uskutečňují na konci vlákna. Jednotlivé vlákno se používá při delších vzdálenostech (nižší cena), jako zdroj světla je výhodný laserový paprsek. Pro odstranění vlivu okolního prostředí se někdy používá modulace světelného paprsku přerušováním (chopper). Větší množství světla lze dosáhnout při pužití svazku vláken (bundle), pak je možné použít méně citlivé detektory. V současnosti se na poli chemických

¹⁸ Dessy R. E. *Anal. Chem.* **61**, 1079A (1989)

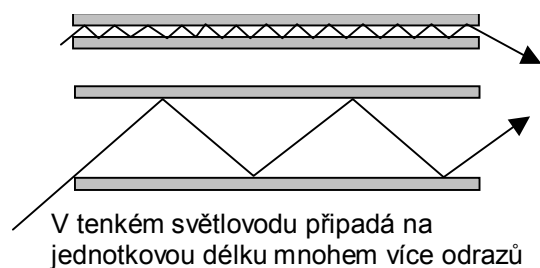
sensorů začíná uplatňovat tzv. **intrinsic sensing**, optický vodič neslouží pouze pasivně pro vedení světla, ale chemické změny v těsném okolí světlovodu se sledují na základě vyvolaných změněných podmínek pro vedení světla uvnitř světlovodu.



Profily exponenciální vlny

Při vedení světla uvnitř světlovodu dochází k interferenci mezi dopadajícím a odraženým světelným paprskem a tím vzniká elektromagnetické stojaté vlnění.

Vlnění je kolmé k odrážejícímu povrchu a nazývá se tlumená (zhášivá či exponenciální) vlna (evanescent wave). Šíří se do prostředí mimo světlovod, přitom její intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní. Nicméně na vnějším povrchu světlovodu může docházet k interakcím s přítomnými látkami.



Tento jev nastává u velmi tenkých světlovodů (tloušťka je srovnatelná s vlnovou délkou světla), takže světlo se začíná šířit pouze v určitých diskrétních modech, daných pouze určitými úhly dopadu.

Mody lze určit na základě průměru světlovodu, indexů lomu a vlnové délky světla. V takových světlovodech se mimo jiné zachovává fázová koherence laserového paprsku. Energetické profily exponenciální vlny jsou pro tři základní mody ukázány na obrázku. Pro vyšší mody narůstá podíl „vnější energie“ a zvětšuje se penetrační hloubka. Podrobněji budou tyto sensory popsány až v části bioafinitních sensorů, v této části bude pozornost věnována pouze obvyklému použití pro vedení světla.

Optické enzymové sensory

Optody (někdy optrody jako analogie elektrod) mohou být přímé nebo zprostředkované. U přímého typu se opticky měřená látka (nejčastěji fluorofor) přímo vyskytuje v biokatalytické reakci. Typickým příkladem může být **NADH**. Je to poměrně slabý fluorofor ($\Phi_f=0.02$), extinkční a emisní maxima jsou při 350 a 450 nm. Biorekogničním elementem jsou dehydrogenázy imobilizované před koncem optického vlákna. Aby se i koenzym dal zachytit v systému biosensoru, používá se někdy jeho konjugát s polyethylenglykolem, který neprochází dialyzační membránou. Výhodná je konstrukce sensoru pro alkohol, kde je vzorek

oddělen mikroporézní teflonovou membránou, NADH se pak nachází ve vnitřním roztoku sensoru.

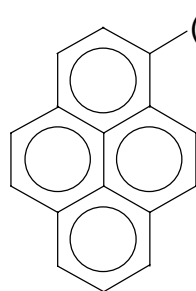
U sensorů využívajících **celé buňky** se sleduje vnitřní fluorescence NADH (je úměrná metabolické aktivitě) nebo **chlorofylu**, tak se konstruují různé systémy pro detekci toxicity. Existuje řada pokusů jak využít fluorescenci **flavinových koenzymů** (FADH₂, FMNH₂) vázaných pevně v molekule mnoha oxidáz. Při vyšší koncentraci substrátu se zpomaluje zpětná oxidace redukované formy kyslíkem a intenzita fluorescence redukovaného koenzymu narůstá. Výhodou je reverzibilita takového systému.

Nepřímé („mediované“, extrinsic) optické biosensory využívají optické indikátory. Nejčastější jsou optické sensory pro sledování pH a kyslíku.

Detekce sledování **kyslíku** využívá zhašení fluorescence indikační molekuly, pokles intenzity

fluorescence je dán Stern-Volmerovým vztahem:
$$I_f = \frac{I_{f0}}{1 + K_{SV}[O_2]}$$

Indikátor se obvykle nachází v silikonové vrstvě před čelem optického vlákna.



PBA

Nejčastěji se používá kyselina pyrenmásečná (PBA, pyrenebutyric acid), excitace při 350 až 400 nm Další možnosti jsou perylen a dekacyklen, organokovové komplexy ruthenia jsou výhodně excitovatelné při 460 nm, takže jako zdroj může sloužit modrá LED.

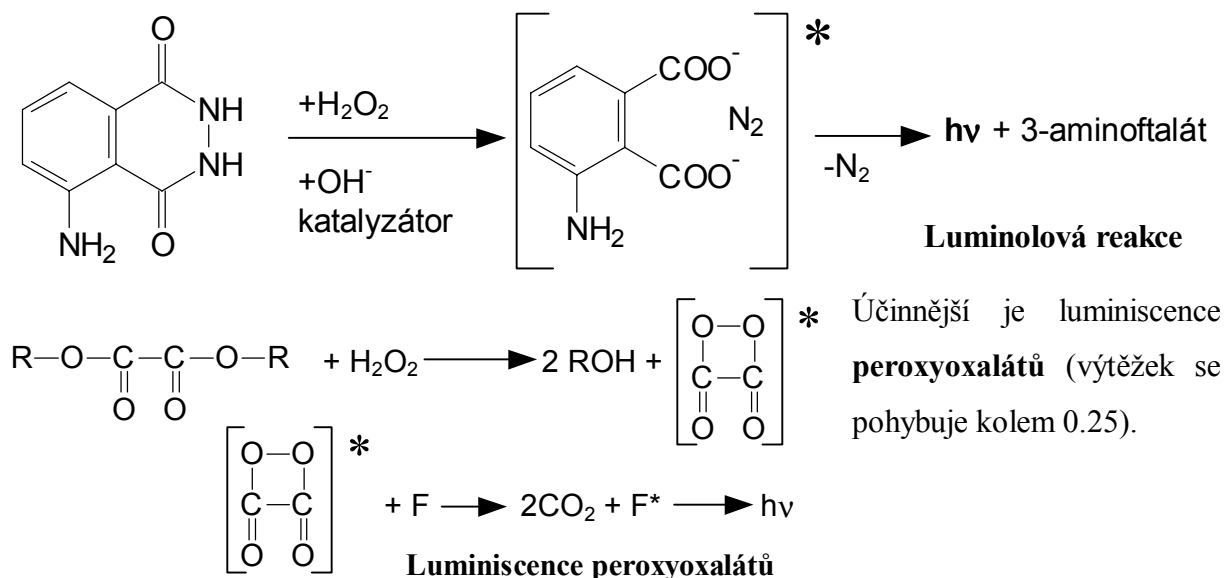
pH změny je možné sledovat pomocí acidobasických indikátorů. Z fluorescenčních lze jmenovat 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonovou kyselinu (HPTS, pH přechod 5 až 8) nebo 4-methylumbelliferon. Absorbčních indikátorů je také celá řada, např. kresolová zeleň, bromthymolová modř.

Chemiluminescence

Účinnost luminiscence závisí na chemickém výtěžku reakce vedoucí k aktivovanému meziproductu (B*), podílu excitovaných molekul a fluorescenčním výtěžku (ten by se měl blížit 1). Aktivovaný meziproduct je výhodnější v singletovém stavu, delší životnost tripletového stavu zvyšuje pravděpodobnost, že dojde ke „zhasnutí“ v nějaké vedlejší reakci.

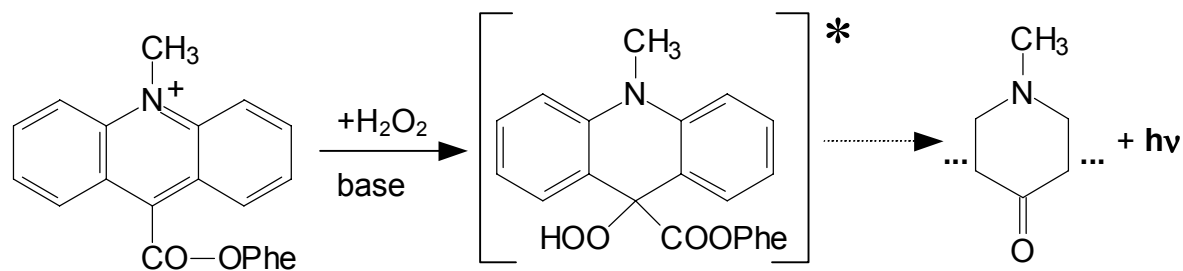
Pro citlivou detekci peroxidu vodíku se používá **luminol** (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion). Intenzita světla je úměrná koncentraci H₂O₂, jako katalyzátor se může uplatnit ferrikyanid, hemin nebo v neutrálním prostředí peroxidáza,

v nevodném prostředí vyvolá luminiscenci jen kyslík a báze. Celkový výtěžek je pouze 0.01 (špatná fluorescence).



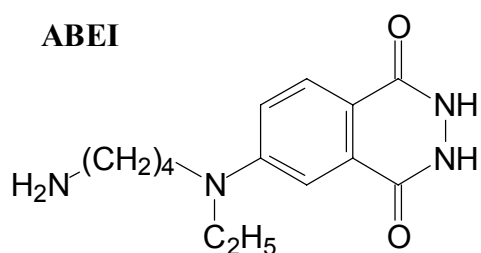
V přítomnosti peroxidu vodíku vznikne aktivovaný meziprodukt, který nefluoreskuje, ale přeneše energii na vhodný fluoreskující akceptor F (difenylantracen perylen), a až ten vyzáří světlo. Z používaných sloučenin lze zmínit např. TCPO - bis(2,4,6-trichloro)fenyl oxalát nebo CPPO - bis(2,4,5-trichloro-6-pentoxykarbonyl) oxalát. Určité problémy činí rozpustnost těchto sloučenin ve vodném prostředí.

Posledním zmíněných chemiluminiscenčním systémem jsou **akridiniové soli**:



Luminiscence akridiniových solí

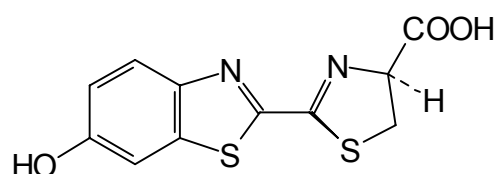
V biokatalytických senzorech jsou chemiluminiscenční systémy používány jako vysoce citlivá finální reakce detekce peroxidu vodíku vznikajícího v primární reakci oxidasy se stanovovaným substrátem. Dále jsou „luminogenní“ substráty používány k detekci hydroláz.



Často se používá značení derivátem isoluminolu (ABEI), který má volnou aminoskupinu. Tato aplikace bude zmíněna v části věnované nepřímým afinitním biosensorům.

Bioluminiscence¹⁹

Vedle chemiluminiscence nachází v oblasti biosensorů široké uplatnění bioluminiscence - emise světla při biochemické reakci v živém organismu (cca 1000 druhů). Obvykle se jí účastní enzymy *luciferázy*.



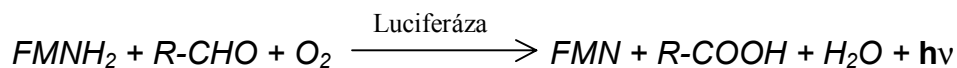
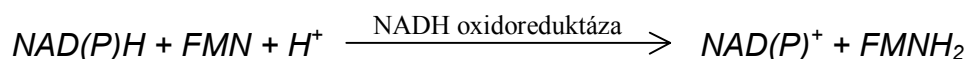
Luciferin

Tyto enzymy štěpí substráty luciferiny (různé druhy dle organismu), přičemž dochází k emisi světla.

Světluška (firefly, *Photinus pyralis*) - *luciferáza* (EC 1.13.12.7) oxiduje příslušný luciferin za účasti ATP, emise při 560 nm (žlutozelené světlo) výtěžek asi 0.88 (!):

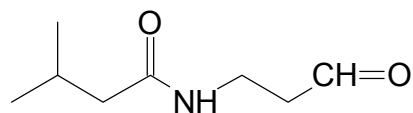


Mořské bakterie (*Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium phosphoreum*) - *luciferáza* (EC 1.14.14.3) tvoří až 5% obsahu buňky, oxiduje vyšší **aldehydy** (C₈, např. dekanal, tetradekanal), v buňce obsahují i enzym NAD(P)H:FMN oxidoreduktázu:



což umožňuje napojení na dehydrogenázy - spolu s bakteriální luciferázou jsou imobilizovány na konec optického vlákna.

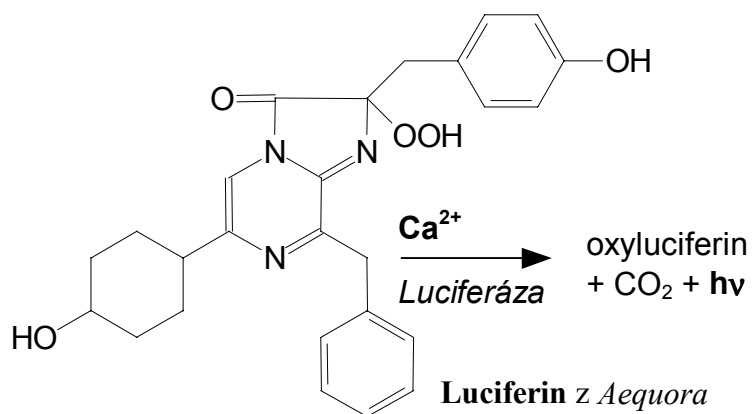
Bioluminiscentní systémy jsou v přírodě velice variabilní. Např. u druhu *Renilla* je luciferin ve formě enolsulfátu, ze které je uvolňován reakcí s 3',5'-fosfoadenosinfosfátem za účasti sulfokinázy.



Luciferin z *Diplocardia longa*

U *Diplocardia* je luciferáza kuproprotein s peroxidázovou aktivitou, luciferin je poměrně jednoduchá sloučenina.

¹⁹ Girotti S., Ferri E. N., Ghini S., Fini F., Carrera G., Roda A., Rauch P. *Chem. Listy* **91**, 325 (1997).



Biosensor pro detekci vápenatých iontů využívá bioluminiscentní systém druhů *Aequora* a *Obelia*. Luciferin je zde jako peroxid vázán v komplexu s luciferázou, který se v přítomnosti Ca^{2+} rozpadá za vyzáření světla. Mez detekce je pod $0.1 \mu\text{M}$.

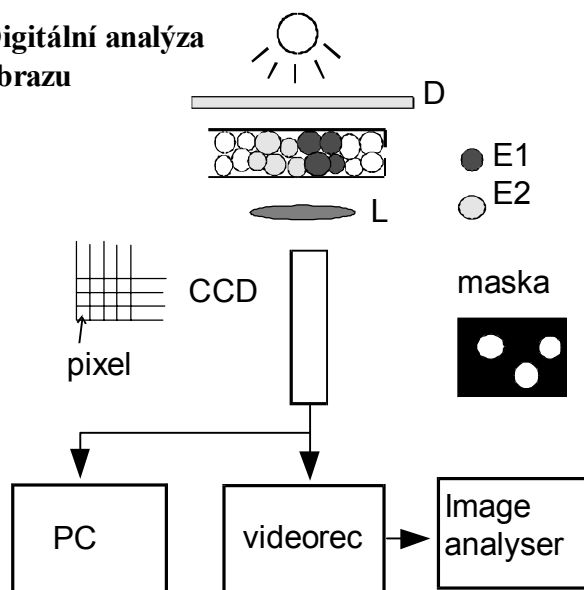
Aplikace bioluminiscence

- * citlivá detekce ATP - 10^{-12} M, stanovení biomasy
- * stanovení s účastí ATP (kreatin kináza, ATPáza, pyruvát kináza)
- * specifická detekce druhu mikroorganismů pomocí bakteriofágů nesoucích *lux* gen (z *Vibria*, u světlušek *luc* geny, viz také dále)
- * citlivá detekce těžkých kovů (rtuť, arsen): genový konjugát *mer-lux* (*mer* je promotor aktivovaný Hg) je vpraven do plazmidů v *E. coli*, v přítomnosti se Hg se aktivuje, proběhne exprese luciferázy a následuje luminiscence, citlivost 200 nM rtuti (podrobněji viz kapitola o biochemických zesilovacích systémech)
- * stanovení Ca^{2+} - působí rozpad a luminiscenci fotoproteinu (peroxoforma luciferinu vázaná v komplexu s luciferázou, *Aequora*)

Digitální zpracování obrazu

Základem techniky je hodnocení obrazu (image analysis), cílem současné stanovení několika (potenciálně až stovek) analytů v jednom vzorku. Je třeba provést separaci jednotlivých odezev, např. časově, spektrálně, chemicky nebo **prostorově** (plošně). Průběh daných (bio)chemických reakcí musí být uzavřen pouze v přesně vymezeném prostoru, protože imobilizované systémy jsou umístěné vedle sebe. Jednoduchá ukázka je popsána podrobněji. Kapilára se dvěma zónami s různými enzymy (E1, E2) je shora osvětlena přes difúzní folii D.

Digitální analýza obrazu



Po zaostření čočkou L je obraz zachycen CCD kamerou, zaznamenan a dále digitálně zpracován jako soubor pixelů o určitém stupni šedi. Jednotlivé obrazy lze pomocí masky M (ručně nebo automaticky) rozseparovat na "objekty", které se pak vyhodnotí (průměrná šedivost a RSD). Přitom objekty mohou vykazovat odezvy na reakce E1, E2, E1 i E2, na žádnou, to se určí při kalibraci (průtočný systém).

Příkladem může být kombinace glukóza oxidáza a glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, oba enzymy lze spojit se systémem PMS/DCIP (PMS přijímá elektrony z FADH_2 i NADH). Odezvy nemusí být lineární. Systém lze rozšířit na větší počet analytů např. použitím reaktoru tvořeného řadou částic s vždy jiným biosystémem ("pearls on the string" reaktor).

Techniky vyhodnocování obrazů nabývají velký význam při vyhodnocování multisensorových čipů pro identifikaci sekvencí nukleových kyselin (viz další kapitoly).

Zhodnocení optických biosensorů

Výhody:

- * není třeba referentní prvek
- * imobilizovaná fáze nemusí být ve fyzikálním kontaktu s optickým systémem (snadná výměna biovrstvy)
- * stabilní kalibrace (zvláště při použití dvou vlnových délek)
- * současně mohou reagovat na několik analytů (různé reagenty, různé vlnové délky) - vysoká hustota přenosu informací
- * nemají vliv interference elektromagnetické povahy (lze měřit na velké vzdálenosti)
- * při použití v živém organismu nehrozí elektrický šok (při zkratu)

Nevýhody:

- * není reference při měření intenzity světla (svítivost zdroje může kolísat), proto se vždy provádí kalibrace ve dvou bodech
- * dynamický rozsah je omezený (pro pH 2 až 6 řádů, elektrochem. 12!)
- * odezvy jsou často pomalé a vadí světlo z okolí
- * stabilita limitována vyčerpáním indikátoru (fotorozklad, raději "svítit" méně intenzivně)

Kalorimetrické biosensory²⁰

Využívají změny teploty v průběhu enzymových reakcí (některé typické příklady jsou uvedeny v tabulce). Při konstrukci biosensorů to je spíše okrajová záležitost, ale existují některé analyty, pro které mohou být kalorimetrické převodníky zvláště výhodné. Meze detekce bývají do 10 μM, rozlišení 0.001 °C.

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

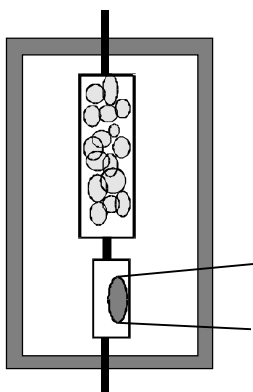
Kataláza	GOD	Hexokináza	Laktát DH	Ureáza	Urikáza
H ₂ O ₂	glukóza	glukóza	pyruvát	močovina	kys. močová
100	80	28	62	61	49

Pokud vlastní reakce s analytem neuvolňuje teplo, lze zařadit následný krok uvolňující teplo:



Hydratační teplo protonu činí v Tris pufru $\Delta H = -48$ kJ/mol, ve fosfátu $\Delta H = -4.7$ kJ/mol.

Použití recyklačních pochodů (viz dále) umožňuje produkci tepla několikanásobně zvýšit.



Enzymový reaktor
s termistorem

Převodníkem je obvykle **termistor**, jeho odpor R závisí na absolutní teplotě T :

$$1/T = a + b \ln R + c (\ln R)^2$$

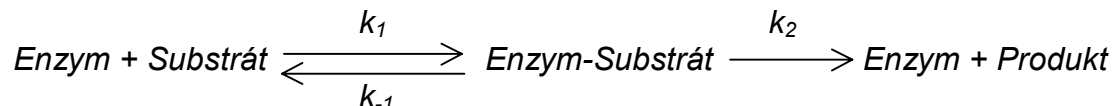
Často se pracuje v prů-točném systému s enzymovým reaktorem tepelně izolovaným od okolí. Použití diferenciálního uspořádání umožňuje pracovat při teplotě místnosti. Měření odporu termistoru se provádí pomocí Wheatstoneova můstku. Jiné převodníky mohou být termočlánek (CMOS).

Výhodou je, že nevadí částice ve vzorku, interferující látky nebo zbarvení. Někdy také jiné metody mohou být dost těžkopádné, např. stanovení triglyceridů lipázou se sleduje kalorimetricky velmi výhodně. Dlouholetou tradici má tato oblast biosensorů na univerzitě ve švédském Lundu.

²⁰ Mosbach K., Danielsson B. *Anal. Chem.* **53**, 83A (1981).

Enzymové biosensory

Biokatalytické sensory mají jako rekogniční element enzym - bílkovinu schopnou biokatalyticky přeměnit určitý specifický substrát na produkt. V nejjednodušším případě lze tuto interakci popsat následujícím schématem:



Rychlost vzniku produktu popisuje známá rovnice Michaelise-Mentenové: $v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$

V_{\max} je maximální rychlost při saturaci enzymu substrátem, platí $V_{\max} = k_2[E]$; K_M značí Michaelisovu konstantu, $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$. Pro odezvu enzymových biosensorů platí upravená rovnice Michaelise-Mentenové, pouze místo rychlostí v ní vystupuje měřený signál a jeho maximální velikost. Je snahou udržovat koncentraci substrátu mnohem menší než K_M , protože pak odezva závisí lineárně na koncentraci substrátu (pro $[S] \ll K_M$ se dá $[S]$ ve jmenovateli zanedbat). Při imobilizaci enzymů v biosensorech dochází obvykle ke změně Michaelisovy konstanty, takže se dá určit pouze její zdánlivá hodnota.

Enzym se používá v biosensorech převážně v purifikovaném stavu, avšak je také možné použít biologický materiál (buňky, tkáňové řezy) obsahující v dostatečném množství požadovanou enzymovou aktivitu. Nejčastěji se používá pouze jeden enzym, někdy je výhodnější použít současně dva nebo výjimečně i více enzymů, které navzájem kooperují - katalyzují například následné reakce nebo recyklační procesy.

Stanovení substrátů

Analyt u enzymových biosensorů vystupuje nejčastěji jako substrát imobilizovaného enzymu. Následující přehled uvádí nejběžnější příklady takových biosensorů. Co se týká fyzikálního převodníku, existuje obvykle řada různých variant, která je pro dále uvedené enzymy použitelná; téměř vždy se dá použít buď nějaká elektroda, nebo optický systém.

Stanovení sacharidů

Nejběžnější látkou měřenou pomocí biosensorů je **glukóza**. Stanovení je důležité v klinické biochemii. Normální hladina krevní glukózy je kolem 5 mM, při patologických stavech může dosáhnout až 50 mM; v moči je obvykle okolo 1 mM. V současnosti existuje řada

glukózových biosensorů určených pro diabetiky, kteří s jejich pomocí kontrolují několikrát denně koncentraci glukózy a podle toho pak upravují dávkování inzulínu. Toto měření výrazně zlepšuje zdravotní stav a oddaluje komplikace spojené s tímto onemocněním. Další oblastí měření glukózy je potravinářský průmysl. Prakticky použitelný biosensor pro glukózu by měl mít lineární rozsah do 20 mM a limit detekce 0.1 mM. Koncentrace glukózy ve vzorku krve s erythrocyty není stabilní, ale klesá asi o 10% za hodinu (i v přítomnosti 25 mM fluoridu sodného). Po hemolýze (naředění hypotonickým roztokem s detergentem) je vzorek stabilní 1 den. Pro stanovení se nejčastěji volí enzym *glukóza oxidáza*²¹ (β -D-glukóza : O₂ 1-oxidoreduktáza, EC 1.1.3.4, GOD), je běžně dostupná z plísní *Aspergillus niger* nebo *Penicillium notatum*. GOD je dimer se dvěma FAD kovalentně vázanými na podjednotky, obsahuje asi 16% glykosylových zbytků, molekulová hmotnost je 160 kDa, specifická aktivita komerčních preparátů přesahuje 200 IU/mg a je poměrně velmi stabilní. Oxiduje pouze β -formu. Dalším použitelným enzymem je *glukóza dehydrogenáza* (NAD⁺ dependentní, EC 1.1.1.47), úspěšně se zejména dříve používala ve spojení s převodníky detekujícími NADH. Dnes je spíše perspektivní PQQ-dependentní *glukóza dehydrogenáza* z bakterie *Acinetobacter calcoaceticus* (EC 1.1.99.17, PQQ značí koenzym pyrolochinolochinon); snadno přenáší elektrony na mediátory (ferrocen), a má velmi vysoké číslo přeměny, takže poskytuje nejvyšší signál. Je dostupná i v rekombinantní formě. Posledním enzymem použitelným pro glukózu je *pyranóza oxidáza*, což je vlastně glukóza-2-oxidáza, reaguje i s dalšími sacharidy.

Dalším klinicky stanovovaným monosacharidem je **galaktóza**, potenciálně toxická při poruchách odbourávání; hladina v séru je normálně pod 0.25 mM. Používá se enzym *galaktóza oxidáza* (EC 1.1.3.9, kuproprotein), má afinita k oběma anomerům.

Koncentrace **fruktózy** se určuje v řadě potravinářských výrobků, kde funguje jako alternativní sladidlo. *Fruktóza dehydrogenáza* je mikrobiálního původu, jedná se o membránově vázaný enzym přenášející elektrony na umělé akceptory, např. ferrikyanid.

Sacharóza se měří v potravinářství a v cukrovarnictví (v cukrovce je obsah 15 až 25%). Je zapotřebí imobilizovat společně několik enzymů. Nejprve se tento disacharid hydrolyzuje *invertázou* (EC 3.2.1.26) na α -glukózu a fruktózu, poté se pomocí *mutarotázy* (EC 5.1.3.3) urychluje ustavení rovnováhy mezi oběma anomery glukózy (spontánně tento proces probíhá pomalu) a nakonec se β anomer glukózy oxiduje *glukóza oxidázou*.

Laktóza (β -D-galaktosyl-4-O-glukóza) se nazývá jinak mléčný cukr (obsah 0.3 až 0.6 mM v lidském a 0.25 až 0.28 mM v kravském mléku), často se analyzuje v potravinářství

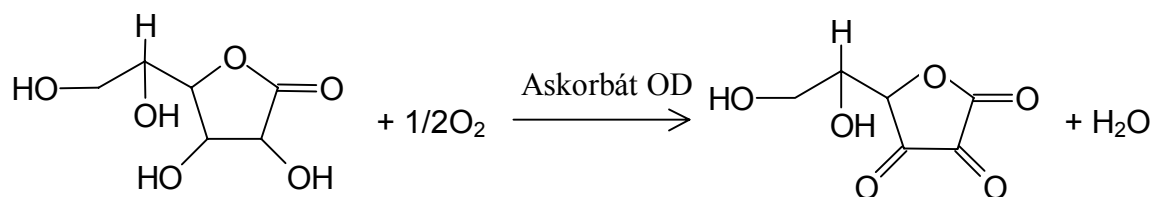
²¹ Hecht H. J., Schomburg D., Kalisz H., Schmid R. D. *Biosens. Bioelectron.* **8**, 197 (1993).

k určení obsahu sušeného mléka v produktech. Hydrolyza β -galaktosidázou (EC 3.2.1.23) poskytuje oba monosacharidy, pak se použije buď *galaktóza* nebo *glukóza oxidáza*.

Maltóza se hydrolyzuje *maltázou* (EC 3.2.1.20), poté se měří vzniklá glukóza.

Škrob (spojení glukosových molekul α -1,4) funguje jako zásobní polysacharid, stanovení se provádí v obilí, rýži a bramborách. Nejprve je nutná hydrolyza *glukoamylázou* (= *amyloglukosidáza*, *exo-1,4- α -glukosidáza*, EC 3.2.1.3), navíc lze přidat i *α -amylázu* (*1,4- α -D-glukan-glukanohydroláza*, EC 3.2.1.1), která produkuje maltózu a dextryny délky 4 až 12 glukózových jednotek). Nakonec se použije *glukóza oxidáza*. Problémem je velikost molekuly škrobu, je vhodnější provést hydrolysu v enzymovém reaktoru než imobilizovat hydrolytické enzymy v biokatalytické vrstvě na povrchu převodníku.

Do skupiny sacharidů lze zařadit navíc i **vitamín C** (kyselina askorbová), jehož stanovení se provádí v potravinách, ovoci, a mnoha vitaminových preparátech. *Askorbát oxidáza* (EC 1.10.3.3, kuproprotein) oxiduje vitamín C podle schématu na obrázku, větší citlivost lze dosáhnout zpětnou chemickou recyklací (redukcí) vznikající dehydroaskorbové kyseliny např. cysteinem.



Stanovení alkoholů a fenolů

Ethanol je měřen v alkoholických nápojích, v klinické praxi a zejména při kontrole řidičů. Pro poslední účel jsou biosensory zvláště výhodné, protože jsou snadno přenosné a i pokusy měřit alkohol ve vydechovaném vzduchu jsou nadějně. Prakticky výhradně se používá *alkohol oxidáza* (EC 1.1.3.13), která je mikrobiálního původu - z kvasinky *Pichia pastoris*, specifická aktivita bývá kolem 40 IU/mg.

Cholesterol je důležitý analyt klinické praxe (ukládá se ve stěnách cév při kardiovaskulárních chorobách), stanovení obsahu se provádí i v potravinách. *Cholesterol oxidáza* (EC 1.1.3.6, produkuje peroxid vodíku) účinkuje na volný cholesterol, pokud je třeba stanovit i formu vázanou v esterech, je třeba přidat ještě navíc *cholesterol esterhydrolázu* (EC 3.1.1.13); pak je vhodné pracovat v prostředí detergentu (Triton X-100, deoxycholát) nebo v organickém rozpouštědle.

Cholin se často měří při studiu nervové funkce. *Cholin oxidáza* (EC 1.1.3.17, z *Alcaligenes* sp.) produkuje betain a 2 molekuly peroxidu vodíku.

Stanovení **fenolů** má značný význam v průmyslových odpadních vodách, v některých potravinách (oleje) a průmyslové produkty. *Tyrosináza* (*Fenol oxidáza* nebo jinak *polyfenol oxidáza*, EC 1.14.18.1) je kuproprotein izolovaný z žampionů, nebo používaný přímo jako tkáňový řez houby). Působí na fenol, jednoduché substituované fenoly, katechol, chlorfenoly. Oxidace jde přes katechol na *o*-chinon, který spontánně polymeruje (tmavnutí enzymových vrstev). Dalším enzymem je *lakáza* (EC 1.10.3.2, izoluje se z houby *Polyporus versicolor*, kuproprotein) působí zejména na hydrochinon a *p*-difenoly.

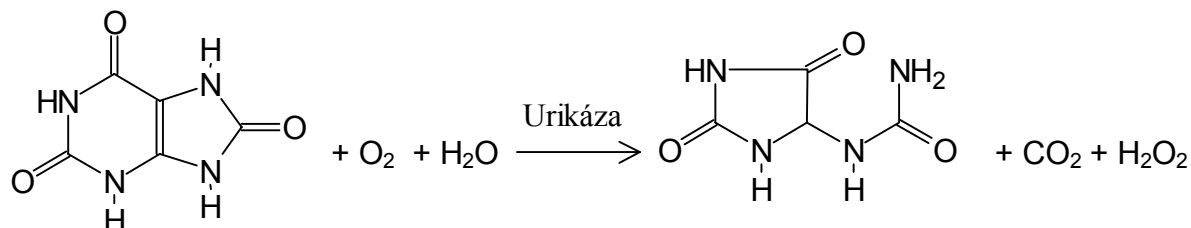
Karboxylové kyseliny, aminokyseliny

V této skupině je nejdůležitějším analytem **kyselin mléčná** (L-laktát). Měří se v klinické medicíně (stanovení koncentrace v séru slouží pro rozlišení příčin acidóz). Normální hladina je 2.7 mM. Ve sportovní medicíně slouží jako ukazatel pro hodnocení trénovanosti (nárůst koncentrace nastává jako reakce na fyzickou zátěž), v potravinářském průmyslu vzniká při mléčném kvašení - jogurty, víno. *Laktát dehydrogenáza* (EC 1.1.1.27, u savců, ze svalů) má jako koenzym NAD^+ , pro analýzu biosensory se prakticky nepoužívá. Další dehydrogenázou laktátu je *cytochrom b_2* (EC 1.1.2.3, izoluje se z kvasinek nebo se používají přímo kvasinky), jeho akceptorem je ferrikyanid a další mediátory. Nejběžnější je dnes *laktát oxidáza* (EC 1.1.3.2, LOD, z bakterie *Pediococcus*), jedná se o flavoprotein produkující peroxid vodíku. *Laktát monooxygenáza* (EC 1.13.12.4) produkuje acetát a oxid uhličitý a používala se spíše dříve před objevením LOD. Při mléčném kvašení může vznikat i D-forma laktátu, její stanovení se provádí pomocí *D-laktát dehydrogenázy* (NAD^+ -dependentní).

Kyselina jablečná se určuje v ovoci a ve víně (hodnocení kvality), potřebný enzym je *malát dehydrogenáza* (NAD^+ , EC 1.1.1.37).

Kyselina oxaloctová se měří v moči při hyperoxalurii. *Oxalát oxidáza* (EC 1.2.3.4) katalyzuje reakci $(\text{COOH})_2 + \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

Kyselina močová v klinické praxi - hematologické poruchy (v séru 0.14 až 0.4 mM). Enzym *urikáza* (*urát oxidáza*, EC 1.7.3.3, obsahuje měď) ji oxiduje na allantoin:



Kyselina isocitronová je vedlejším produktem při fermentační výrobě kyseliny citronové, ke stanovení slouží *isocitrát dehydrogenáza* (EC 1.1.1.42, NADP⁺).

Aminokyseliny je možné stanovit jako sumu (v potravinách) pomocí *oxidázy L-aminokyselin* (EC 1.4.3.2), obdobný enzym existuje také pro D-aminokyseliny (EC 1.4.3.3), může se uplatnit při oxidaci glycinu. **Lyzin** je jako esenciální faktor přidáván do krmných směsí. *Lyzin- α -oxidáza* (EC 1.4.3.14, dekarboxylující, z *Trichoderma viridae*). *Lyzin dekarboxyláza* (EC 4.1.1.18, z *Escherichia coli*, *Bacterium cadaveris*) produkuje CO₂ a kadaverin, ten lze následně stanovit *diaminoxidázou* (z hrachu, EC 1.4.3.6). **Kyselina glutamová** je součástí polévkových koření a sojové omáčky. *Glutamát oxidáza* (EC 1.4.3.11, flavoprotein) produkuje z glutamátu NH₃, CO₂, α -oxoglutarát a H₂O₂. *Glutamát dehydrogenáza* (L-glutamát:NAD(P)⁺ oxidoreduktáza (deaminující), z jater) se uplatňovala zejména dříve před objevením oxidázy.

Mastné kyseliny (olejová, palmitová) se analyzují v krvi, v potravinách indikují denuraci tukových (olejových) složek. Stanovení je dvouenzymové: *acyl-CoA syntáza* v přítomnosti ATP a CoA převede mastnou kyselinu na příslušný acyl-CoA, na který účinkuje *acyl-CoA oxidáza* (EC 1.3.3.6, oxidací vzniká dvojná vazba a současně se produkuje peroxid vodíku).

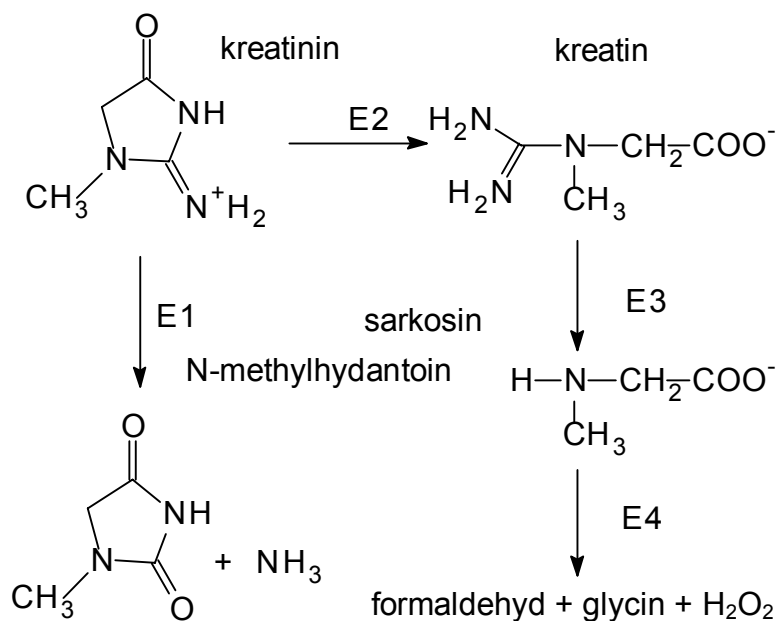
Do této skupiny by snad bylo možné přiřadit i **kyselinu siřičitou**, jejíž obsah se kontroluje ve víně. Její oxidace je možná pomocí *sulfit oxidázy* (EC 1.8.3.1) produkující H₂O₂. Další anorganické kyseliny budou zmíněny v části biosensorů pro detekci inhibitorů.

Dusíkaté sloučeniny

Tady je nejdůležitější látkou **močovina**. V krvi má normální hladinu 3.6 až 9 mM a slouží jako indikátor funkce ledvin. *Ureáza* (EC 3.5.1.5) je vůči močovině prakticky absolutně specifická.

Polyaminy jako putrescin a kadaverin indikují čerstvost masa (vznikají při rozkladu). V klinické praxi má význam stanovení histaminu. Pro obojí se používá *diaminoxidáza* (EC 1.4.3.6).

Kreatin, kreatinin jsou další látky pro posouzení funkce ledvin. Pro stanovení je několik možností:



Ezymy potřebné pro stanovení kreatininu a kreatinu:

E1 *Kreatinin iminohydroláza* (EC 3.5.4.21); E2 *Kreatinin amidohydroláza (Kreatináza)*, EC 3.5.2.10); E3 *Kreatin amidinohydroláza* (EC 3.5.3.3); E4 *Sarkosin oxidáza* (EC 1.5.3.1).

Purinové base slouží v Japonsku jako indikátor čerstvosti rybího masa. Při kažení masa probíhá enzymová autolýza tkáně a dochází k postupnému hydrolytickému rozkladu ATP, nakonec se oxiduje až na kyselinu močovou. Tím nastávají změny kvality a chuti masa.

ATP
 \downarrow *ATPáza*
 ADP + P_i
 \downarrow *Myokináza*
 AMP + P_i
 \downarrow *AMP deamináza*
 IMP + NH_3
 \downarrow *5'-Nukleotidáza*
 inosin + P_i
 \downarrow *Nukleosid fosforyláza*
 hypoxanthin + ribóza-1- P_i
 \downarrow *Xanthin OD*
 xanthin
 \downarrow *Xanthin OD*
 kyselina močová

Pro postižení stupně tohoto procesu byl vyvinut čtyřkanálový biosensor:

- 1) *Xanthin oxidáza* (XOD, EC 1.2.3.2)
- 2) XOD + *Nukleosid fosforyláza* (NP, EC 2.4.2.1)
- 3) jako 2 + *5'-Nukleotidáza* (NT, EC 3.1.3.5)
- 4) jako 3 + *AMP deamináza* (AD, EC 3.5.4.6)

Tak lze postupně určit hladiny všech metabolitů v tkáni, přitom se navíc dopočítá obsah ATP / ADP (jejich výchozí množství je obvykle víceméně konstantní a známé). Vypočítá se procentuální podíl xanthinu a hypoxanthinu k sumě všech metabolitů - tzv. faktor čerstvosti *K*. Podle jeho velikosti se pak rybí maso klasifikuje jako velmi čerstvé ($K < 10\%$), čerstvé ($K < 40\%$) a kazící se ($K > 40\%$).

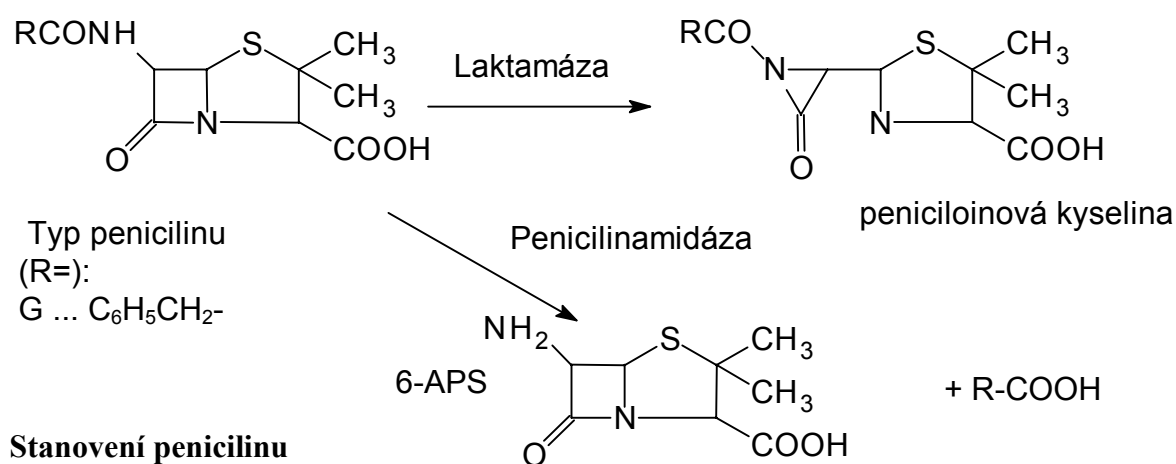
Estery a amidy

Acetylcholin sloužící jako mediátor přenosu vzruchů v nervové soustavě se účinkem *acetylcholinesterázy* (EC 3.1.1.7, z krvinek nebo elektrického úhoře, AChE) štěpí na kyselinu octovou (lze spojit s pH senzorem) a cholin, který je stanovitelný např. amperometricky *cholin oxidázou* (EC 1.1.3.17, ChOD) produkující 2 molekuly H_2O_2 (dvoustupňová oxidace na betain).

Fosfolipidy (v krevní plasmě 2.5 až 3 mM, hlavně fosfatidylcholin) se po hydrolyze *fosfolipázou D* (EC 3.1.4.4) stanoví ze vzniklého cholinu ChOD.

Triglyceridy (v séru 0.35 až 1.7 mM normálně, nárůst při hyperlipidemii) se nejprve hydrolyzují *lipázou* (EC 3.1.1.3) na mastné kyseliny a **glycerol**, který lze následně stanovit dvěma způsoby. Pomocí *glycerol dehydrogenázy* (EC 1.1.1.6) se oxidací produkuje NADH, nebo se glycerol nejprve převede *glycerol kinázou* (EC 2.7.1.30) na glycerolfosfát, pro který je k dispozici *glycerolfosfát oxidáza*.

Penicilin je biosensory stanovován v průběhu fermentační výroby. Pro stanovení jsou vhodné dva enzymy, β -Laktamáza (*Penicilináza*, EC 3.5.2.6) a *penicilinamidáza* (EC 3.5.1.11). Oba se spojují s pH sensory.



Měření enzymových aktivit

Řada enzymových biosenzorů je velmi vhodná také pro měření enzymových aktivit. Přitom produkt reakce měřeného enzymu slouží jako substrát indikačního enzymu imobilizovaného v biokatalytické vrstvě. Oproti klasickým fotometrickým postupům u biosenzorů často nevede k zákalu nebo zbarvení analyzovaného vzorku.

Laktát dehydrogenáza se měří v klinické praxi (normálně v séru 63 až 155 IU/l u mužů, 62 až 131 IU/l u žen), nárůstá při hepatitidě nebo infarktu. Substrátem je laktát, sleduje se produkce pyruvátu pomocí senzoru s *pyruvát oxidázou*.

α -Amyláza se měří v séru (normálně 60 až 150 U/l), narůstá při akutní pankreatitidě. Stanovení je možné buď použitím maltopentaózy jako substrátu a biosensoru s *glukóza oxidázou*, nebo může být substrátem škrob a pro detekci navíc slouží také *glukoamyláza*.

Transaminázy indikují funkci jater a objevují se i při infarkt. ALT (normálně v séru 5 až 24 U/l), AST (5 až 20 U/l), při patologických stavech (hepatitida, alkoholismus) je možné pozorovat nárůst až 100 až 1000x. Pro ALT jsou substráty alanin a α -oxoglutarát, detekuje se vznikající pyruvát nebo glutamát. Pro AST jsou substráty aspartát a α -oxalacetát a měří se vzniklý glutamát.

Argináza je snadno stanovitelná pomocí močovinového biosensoru (*ureáza / amoniak*), substrátem je arginin.

Aktivity stanovitelné pomocí glukózového biosensoru (*glukóza oxidáza / peroxid vodíku*) zahrnují například následující enzymy (v závorce je uveden potřebný substrát): alkalická / kyselá **fosfatáza**, **β -glukosidáza** (glukóza-6-fosfát), **glukoamyláza** (maltóza), **invertáza** (sacharóza), **trehaláza** (α, α' -trehalóza).

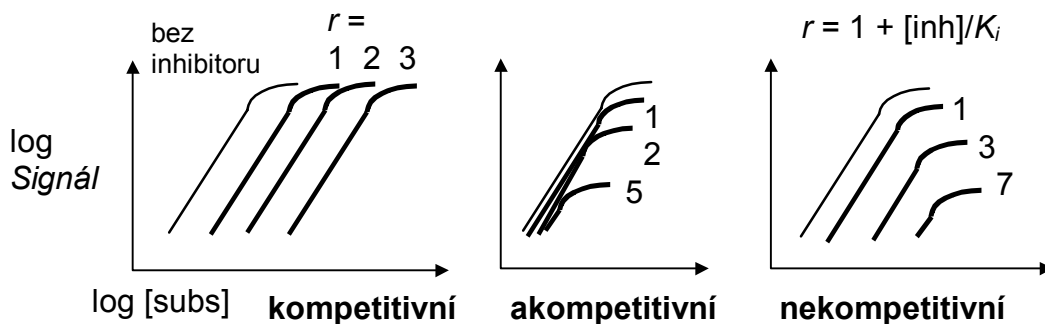
Aktivity stanovitelné pomocí fenolového biosensoru (*tyrosináza / kyslík*) zahrnují: alkalická / kyselá **fosfatáza** (fenylfosfát), **β -galaktosidáza** (fenyl- β -D-galaktosid), **β -glukosidáza** (fenyl- β -D-glukozid), **β -glukuronidáza** (fenyl- β -D-glukuronid).

Inhibitory enzymových sensorů

Pro bioanalytické aplikace je možné využít reakce enzymů s **inhibitory** - ty snižují aktivitu imobilizovaného indikačního enzymu. Měření inhibitorů je obvykle velmi citlivé, jedna molekula analytu zablokuje jednu molekulu enzymu, který následně přestane konvertovat mnoho molekul substrátu - je zde tedy určitá forma zesilovacího mechanismu.

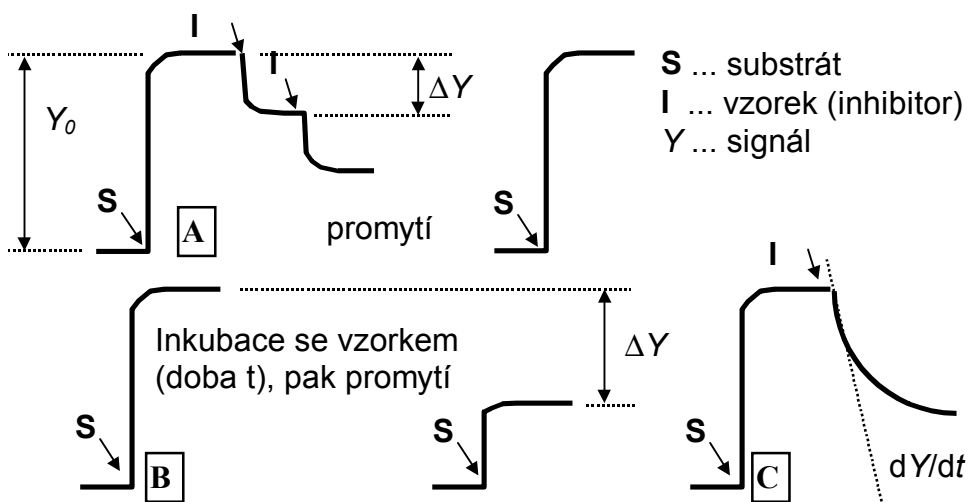
Zejména stanovení reverzibilních inhibitorů je velmi snadné, u ireverzibilních dochází k postupnému poklesu aktivity imobilizovaného enzymu, což vyžaduje v obou případech odlišné přístupy k měření. Typ inhibice lze určit na základě odezvy sensoru na substrát v přítomnosti rostoucích koncentrací inhibitoru²². Podle tvaru kalibračních křivek v dvojitým logaritmickém zobrazení lze určit, jak se inhibitor v přítomnosti daného substrátu s imobilizovaným enzymem váže. Podle typu inhibice (reverzibilní / ireverzibilní) pak je možné zvolit několik měřících postupů.

²² Tran-Minh, C. *Ion Select. Electrodes Rev.* 7, 41(1985).



Rozlišení druhu inhibice

Nejsnadnější je stanovení reverzibilních inhibitorů (metoda [A]). Nejprve se změří výchozí signál Y_0 biosensoru se substrátem. Poté se do reakční směsi přidá vzorek s inhibitorem a sleduje se pokles signálu ΔY , který je úměrný koncentraci inhibitoru. Změna signálu je obvykle rychlá a dosáhne se nového ustáleného stavu. Po promytí je možné celý proces opakovat, přitom výchozí signál se substrátem je beze změny - nedošlo k poklesu aktivity enzymu v biorekogniční vrstvě.



Možnosti stanovení inhibitorů enzymovými sensory

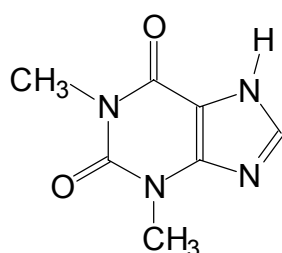
U ireverzibilních inhibitorů je nutné postupovat odlišně. Obvykle se používá inkubační postup [B]. Nejprve se zase stanoví výchozí signál biosensoru. Poté se biosensor po určitou dobu nechá inkubovat s inhibitorem, a nakonec se stanoví zbytkový signál (pokles o ΔY). Dá se využít také kinetické měření [C], kdy se inhibitor přidá přímo do směsi se substrátem a sleduje se časový pokles signálu dY/dt , což je rychlejší. Bohužel, opakované použití biosensoru je možné pouze omezeně (aktivita postupně klesá), dokud nedojde k přílišnému poklesu signálu.

Pro analytické vyhodnocování se často musí provádět nejrůznější transformace vedoucí k linearizaci, např. výnosy $\log \Delta Y \dots \log [I]$, $1/(\Delta Y) \dots 1/[I]$. Nebo lze závislost $\Delta Y \dots [I]$ aproximovat polynomem. Někdy je výhodné používat relativní změny signálu, tj. $\Delta Y/Y_0$

nebo $(dY/dt)/Y_0$ - tak se dá kompenzovat postupný úbytek aktivity při měření. Pro dosažení vysoké citlivosti je potřeba použít malé množství enzymu, na druhou stranu je zase nutné mít dobře měřitelné signály se substrátem. Koncentrace substrátu bude samozřejmě ovlivňovat stanovení kompetitivních inhibitorů. Zlepšení meze detekce je možné dosáhnout prodloužením inkubačního intervalu.

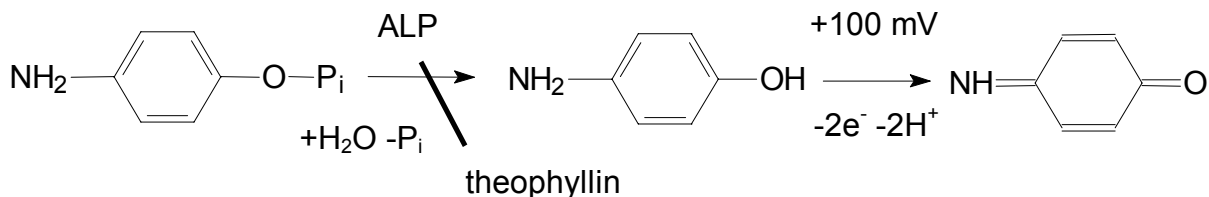
Aplikace stanovení inhibitorů biosensory

Alkalická fosfatáza (EC 3.1.3.1, ALP) je využívána zejména pro dva inhibitory.



Theophyllin účinkuje jako stimulátor centrální nervové soustavy, používá se v klinické praxi jako bronchodilatátor k respirační stimulaci. Terapeutickou hladinu v krvi (10 až 20 mg/l) je třeba sledovat, aby se zabránilo předávkování.

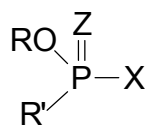
Pro stanovení lze použít biosensor s ALP (hovězí jaterní isoenzym), inhibice je při použití *p*-aminofenylfosfátu (PAPP) akompetitivní. Jako pufr lze použít tris nebo diethanolamin. Stanovení je možné provádět přímo na vzorcích krve, mez detekce je kolem 5 μM .



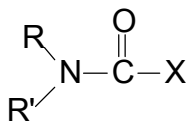
Anorganický fosfát Pi je stanovován mimo jiné v životním prostředí, kde se podílí na znečištění vodních toků (podporuje nadměrný růst řas a sinic). Stanovení se provádí s glukóza-6-fosfátem jako substrátem, jeho hydrolyza ALP je inhibována volným fosfátem kompetitivně. Vznikající glukóza se může stanovit pomocí *glukóza oxidázy* imobilizované ve stejné vrstvě jako ALP. Mez detekce je kolem 10 μM .

Arylsulfatáza (EC 3.1.6.1) funguje podobně a je využitelná pro stanovení **síranu**. Jako substrát slouží 4-nitrokatecholsulfát, který je hydrolyzován. Síran tuto reakci inhibuje kompetitivně. Hydrolyzou vzniklý 4-nitrokatechol je pak anodicky oxidován na chinon.

Vůbec nejrozšířenější pro detekci inhibitorů jsou biosensory s imobilizovanou *cholinesterázou*, používané pro detekci zemědělsky důležitých **organofosforových** a **karbamátových pesticidů**. Mezi organofosfáty patří i **bojové otravné látky** (sarin, soman, tabun, VX).



organofosfáty



karbamáty

organofosfáty

R alkyl, aryl

R' alkyloxy, aryloxy, subst. amin

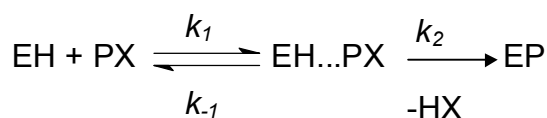
X odcházející skupina - CN, F, p-nitrofenyl, fosfodiester

Z = O nebo S

karbamáty

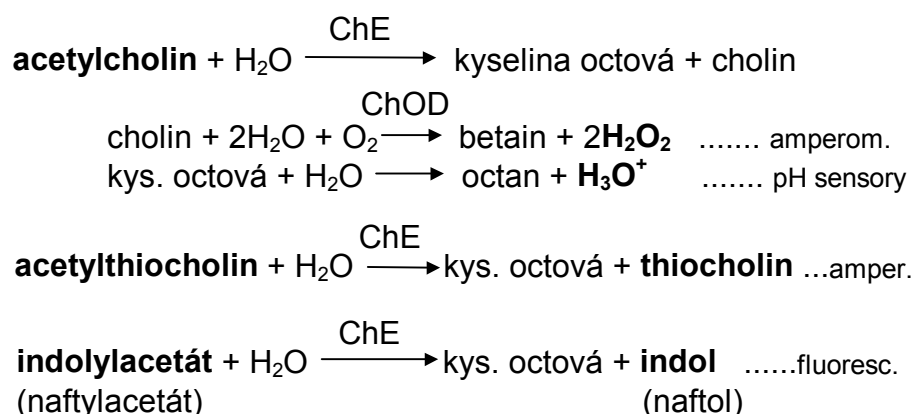
R,R' H, alkyl, aryl

Jsou používány dva druhy enzymů, *acetylcholinesteráza* (AChE, EC 3.1.1.7) a *butyrylcholinesteráza* (BChE, EC 3.1.1.8). AChE se získává nejčastěji z elektrického úhoře nebo z membrán erythrocytů, BChE pak zejména z koňského séra. Inhibice má ireverzibilní charakter, u karbamátů je částečně reverzibilní. Kinetika inhibice byla velmi podrobně studována. Volný enzym EH tvoří komplex s inhibitorem PX který rozpadem poskytuje fosforylovaný enzym EP (fosforyluje resp. karbamoyluje se hydroxyl serinového zbytku v aktivním místě cholinesterasy. Oxofosforové sloučeniny jsou obecně mnohem silnější než analogické thiofosfáty, z těch vznikají oxidací (bromová voda, peroxid vodíku).



První krok charakterizuje rovnovážná konstanta $K_D = k_1/k_{-1}$, druhý pak rychlostní konstanta k_2 .

V praxi se však nejčastěji používá bimolekulární inhibiční konstanta $k_i = k_2/K_D$. Její hodnota byla stanovena pro desítky pesticidů²³ a umožňuje předpovídat citlivost cholinesterázových biosensorů vůči konkrétním látkám. Při inkubačním způsobu měření platí pro signál Y biosensorů $\Delta \ln Y = k_i [\text{PX}] t$. Odezva je tedy určována jednak koncentrací a jednak inhibičními účinky dané látky. Pokud tedy není známý druh pesticidu před vlastní analýsou, lze stanovit parametr anticholinesterasová toxicita. Mez detekce je proměnlivá, pro silné inhibitory i pod 100 ng/l.



Z konstrukčního hlediska jsou tato zařízení velice variabilní, některé přístupy jsou ukázány na obrázku.

Možnosti měření s cholinesterázovými sensory

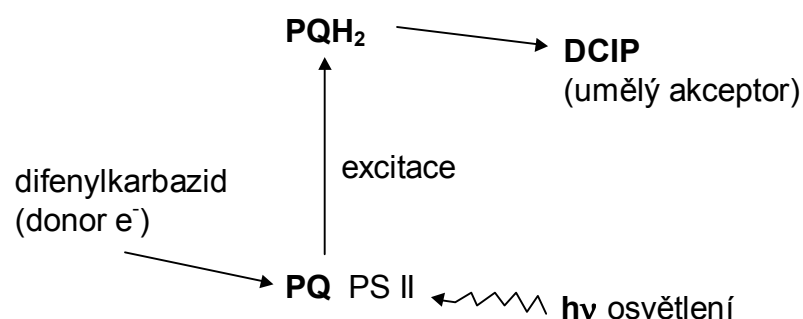
²³ Herzsprung P., Niessner R., Weil L. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **47**, 181 (1992).

Může se jednat o enzymové elektrody potenciometrické (pH, redoxní potenciál thiosloučenin), amperometrické (oxidace peroxidu vodíku z následné reakce *cholin oxidázy*, oxidace thiocholinu) nebo konduktometrické, optické systémy se světlovodnými vlákny (fluorogenní substráty, barevné pH nebo redoxní indikátory, chromogenní substráty). Takovéto stanovení se provádí ve vodách a je užitečné i v potravinářském průmyslu při kontrole zeleniny a ovoce. Intenzivní výzkum je prováděn také ve vojenské oblasti, tam má význam nejen pro případné bojové použití, ale také při likvidaci chemických zbraní. Bohužel jsou známy i teroristické útoky organofosforovými nervovými plyny.

Tyrosináza je použitelná pro celé spektrum různých inhibitorů. **Kyselina benzoová** byla dříve používána jako konzervační činidlo. **Kyselina salicylová** vzniká odbouráváním kyseliny acetylsalicylové (aspirin). Celá řada substituovaných **thiomočovín** vzniká z glukosinolátů, způsobují nepříjemné chuťové vlastnosti pokrutin z produkce řepkového oleje.

Ureáza je velmi citlivá na inhibici, kterou působí různé **těžké kovy**, konstrukčně může jít o potenciometrické enzymové elektrody.

Inhibice *fotosystému* z thylakoidů chloroplastů špenátu nebo fotosyntetických mikroorganismů (*Rhodobacter*) se využívá k detekci řady látek používaných jako herbicidy v zemědělství: **triaziny, karbamáty, fenyльмоčoviny, nitrofenol** aj.



Využívá se vazba těchto sloučenin na místo plastocyaninu ve fotosystému II, takže je zablokován přenos elektronů na umělý akceptor.

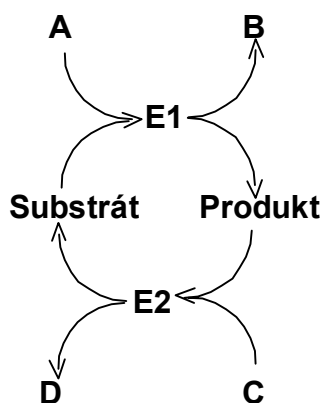
Princip stanovení inhibitorů fotosystému

Zesilovací biochemické systémy

Recyklační systémy

U obvyklých reakcí poskytuje jedna molekula analytu jednu „jednotku“ měřeného signálu. Cílem zesílení (amplifikace) je získat z 1 jednotky analytu (např. 1 molekula) *G* jednotek

signálu (např. G elektronů) a dosáhnout tak podstatného zvýšení citlivosti stanovení. Parametr G pak vystupuje jako zesilovací (amplifikační) faktor.

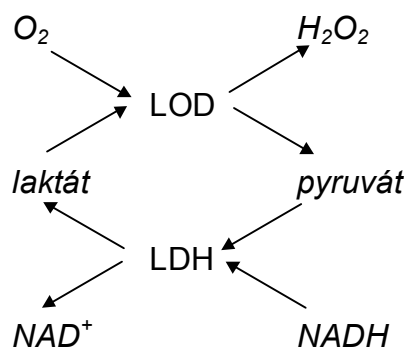


Molekula analytu nastartuje jednu nebo i několik cyklicky probíhajících reakcí, přitom neustále přechází mezi dvěma formami (Substrát, Produkt), které jsou přeměňovány dvěma komplementárními enzymy E1 a E2 (nejjednodušší možnost je kombinace substrát oxidáza a substrát dehydrogenáza), reakčního cyklu se dále účastní pomocné látky A a C a vystupují z něj látky B a D. V nepřítomnosti A nebo C recyklace neprobíhá, jejich přidavek tedy vlastně recyklaci „zapíná“.

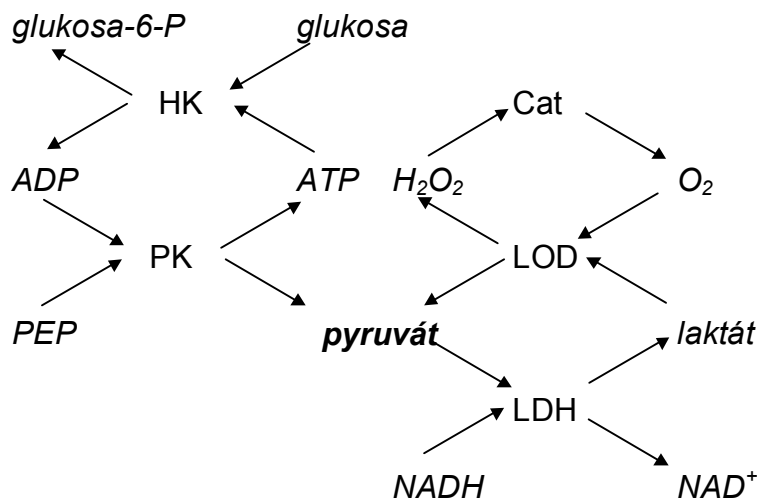
Rychlost recyklace musí být limitována koncentrací analytu, ostatní složky musí být v dostatečném nadbytku. Mimo dvouenzymové recyklace ukázané na schématu je v oblasti biosensorů použitelná i chemická recyklace (dolní část cyklu probíhá bez enzymu E2) nebo elektrochemická recyklace - opět schází E2 a místo něj probíhá redoxní děj na elektrodě.

$$G \approx \frac{K_1 K_2}{K_1 + K_2} \frac{L^2}{D} \quad \text{Amplifikační faktor } G \text{ lze určit pomocí závislosti na parametrech enzymů } K_i = V_{max,i}/K_{M,i}, \text{ tloušťce biovrstvy } L \text{ a difúzním koeficientu recyklované látky uvnitř vrstvy } D.$$

Klasickým použitím zesilovacího systému v biosensorech je vysoce citlivé stanovení laktátu *laktát oxidázou* a *laktát dehydrogenázou* imobilizovanými v jediné biokatalytické vrstvě.

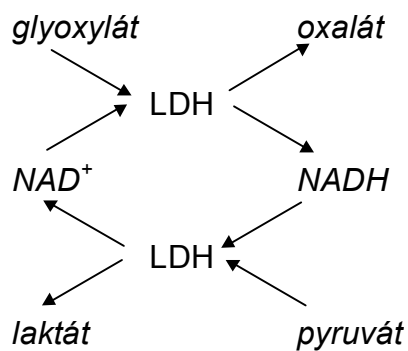


Pro systém LOD / LDH bylo dosaženo G převyšující 4000, mez detekce pro laktát (nebo pyruvát) činila 1 nM. Laktátový systém může být využit také pro citlivou detekci enzymů produkujících pyruvát, např. *alanin aminotransferázy*. Několikanásobný recyklační systém pro citlivou detekci ATP / ADP byl sestaven z enzymů HK hexokináza, PK pyruvát kináza, LOD, LDH a Cat, kataláza.



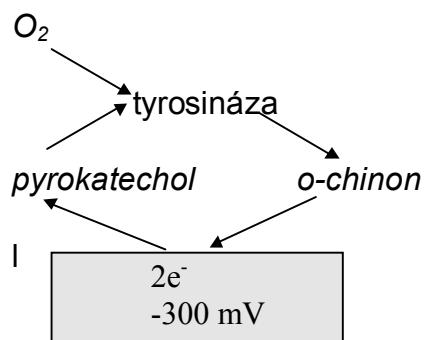
Několikanásobná recyklace

Enzym	G	C_{min}
HK	1	60 μ M
+PEP PK	30	2 μ M
+NADH LOD/LDH	1700	10 nM



Jendoenzymová recyklace

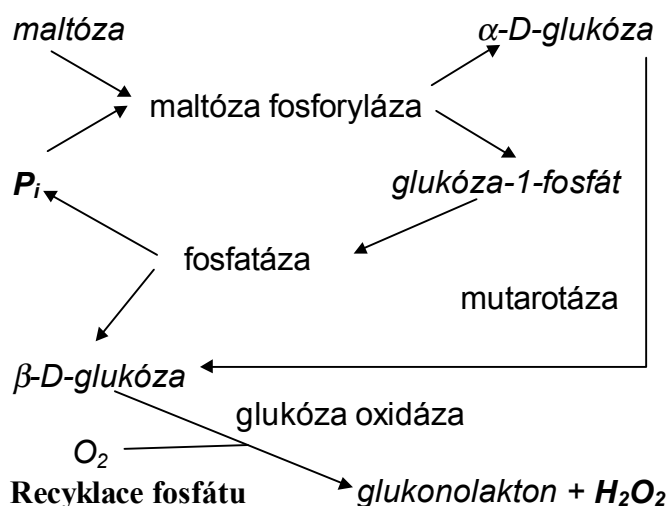
Chemická recyklace byla na poli biosensorů použita ke zcitlivění detekce kyseliny askorbové pomocí kyslíkové elektrody s *askorbát oxidázou*. Zpětná redukce kyseliny dehydroaskorbové probíhala v přítomnosti cysteinu.



Cykly byly propojeny pomocí pyruvátu. Postupným "zapínáním" jednotlivých cyklů byly zlepšovány parametry stanovení. Pro závěrečný detekční stupeň by šlo využít několik možností. Optické sledování úbytku NADH, vynechat katalázu a měřit elektrochemicky produkci peroxidu nebo spotřebu kyslíku, přidavek katalázy zase umožňuje výrazně zvýšit produkci tepla a použití termistoru.

Byl vyvinut také zajímavý recyklační systém využívající různé aktivity jediného enzymu (laktát dehydrogenasa). Další kombinace jsou např.: *glutamát oxidáza / dehydrogenáza* (glutamát ev. amoniak); *alkohol oxidáza / dehydrogenáza* (alkohol); *glutamát oxidáza / alanin aminotransferáza* (α -oxoglutarát, glutamát); *lakáza / cytochrom b2* (benzochinon); *laktát monooxygenáza / malát dehydrogenáza* (malát, oxaloacetát, AST)

Jako příklad elektrochemické recyklace lze uvést *tyrosinázový biosensor*. Postup se používá pro stanovení fenolu, který po oxidaci tyrosinásou poskytne recyklující pyrokatechol. Obdobné schema je využitelné pro *lakázu* a recyklující pár hydrochinon / benzochinon.



Nedávno byl také popsán nový originální systém pro recyklaci fosfátu.

Recyklační systémy se studují velmi intenzivně, uplatnění nachází i při imunochemických stanoveních, kdy se zvyšuje citlivost detekce enzymových značek.

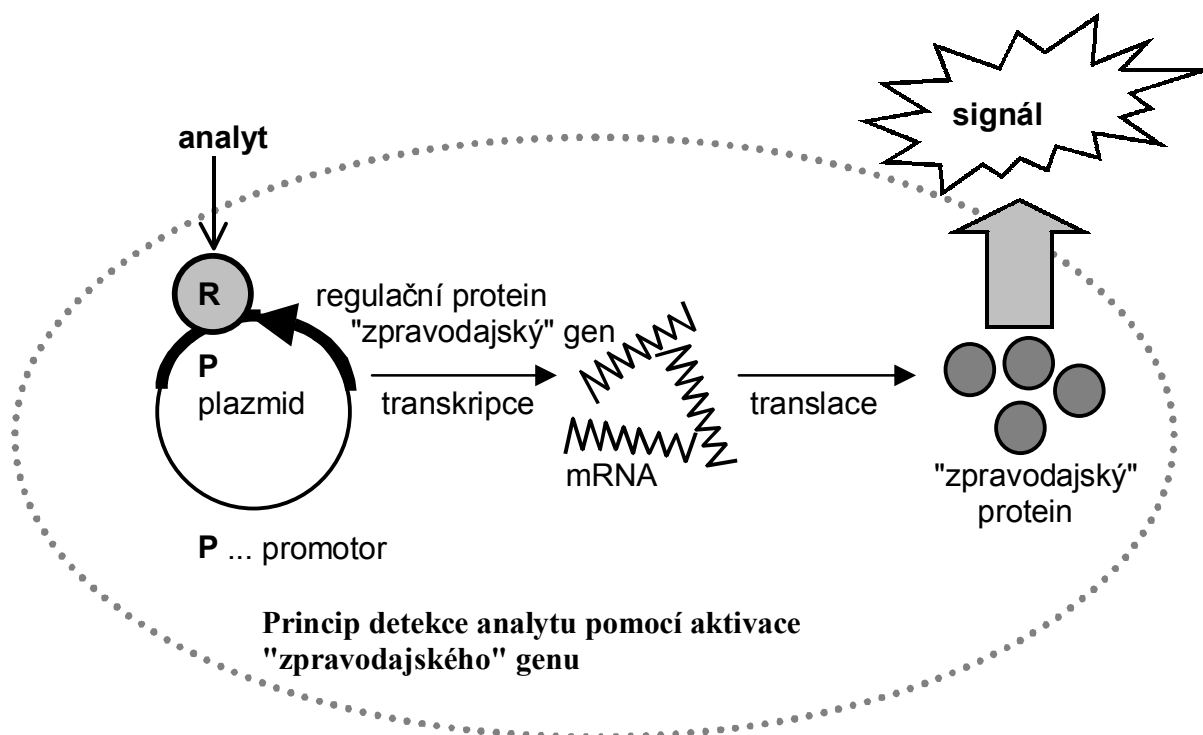
Aktivace genů analytem

Použití této technologie využívá iniciaci transkripce tzv. "reporter" genů v přítomnosti stanovené látky; bílkovinný produkt transkripce a translace tohoto genu se dá snadno detekovat v komplexních směsích na základě enzymové aktivity, fluorescence nebo bioluminiscence²⁴. Tato technika začíná být v biosensorech často využívána, přitom spektrum analytů zahrnuje těžké kovy, toxické organické chemikálie, protilátky i viry. Biorekogniční složka biosensoru je napojena na "zpravodajský" gen, který zajistí generování signálu. Zesilovací faktor může být podstatně vyšší než u enzymových recyklačních systémů. Jedna molekula analytu způsobí syntézu mnoha "zpravodajských" biomolekul, z nichž pak každá může generovat mnoho jednotek signálu (elektronů, molekul produktu, fotonů, ...). Pro přípravu těchto genů se používají rekombinantní techniky, příslušný regulační protein se spojí s genem produkujícím např. luciferázu (*luc* nebo *lux* geny) nebo jiný vhodný enzym. Některé příklady těchto koncových signálních biomolekul jsou uvedeny v přehledu:

Produkt genu	Reakce	Detekce ²⁵
alkalická fosfatáza	hydrolýza fosfoesterů	EC, CL, FL
galaktosidáza	hydrolýza galaktosidů	EC, CL, FL
bakteriální luciferáza	FMNH ₂ + dekanal + O ₂	BL (490 nm)
luciferáza světlušek	ATP + luciferin + O ₂	BL (560 nm)
aequorin	apoequorin + coelenterazin + O ₂ + Ca ²⁺	BL (470 nm)
obelin	apoobelin + coelenterazin + O ₂ + Ca ²⁺	BL (470 nm)
GFP	posttranslačně vzniká chromofor	FL (509 nm)

²⁴ Lewis J. C., Feltus A., Ensor C. M., Ramanathan S., Daunert S. *Anal. Chem.* **70**, 579A (1998).

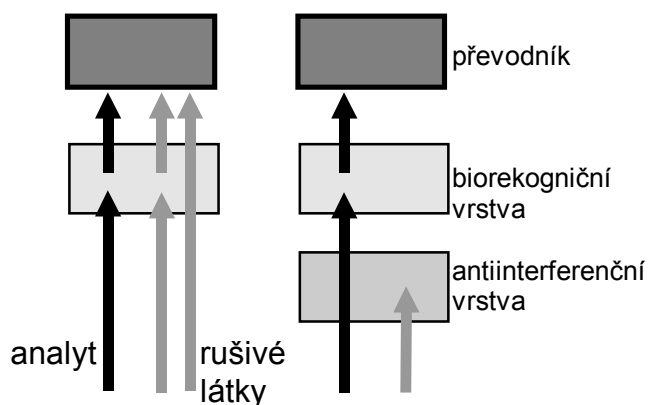
²⁵ použité zkratky: BL bioluminiscence; CL chemiluminiscence; FL fluorescence; EC elektrochemicky; GFP zelený fluoreskující protein



Zvláště citlivá je detekce při použití bioluminiscenční koncové reakce. Pro představu, jeden aktivovaný gen produkuje řadu molekul mRNA a z každé pak vzniká translací asi 12 až 14 molekul luciferázy. Vlastnosti těchto bílkovin se také uměle zlepšují, aby se dosáhlo vyšší stability, lepšího kvantového výtěžku anebo posunu excitační nebo emisní vlnové délky. Limity detekce dnes dosahují úrovně pouze 50 tisíc molekul analytu. Dalším vhodným produktem je zelený fluoreskující protein (GFP); jeho unikátní třírozměrná struktura chrání chromofor uvnitř, takže se fluorescence zachovává v přítomnosti denaturujících látek, detergentů a zvýšené teploty. Navíc nejsou potřeba žádné substráty a kofaktory jako u bioluminiscenčních systémů. Tento postup se také úspěšně uplatnil jako značkovací systém při imunochemických stanoveních.

Eliminace interferencí

Při analýze reálných vzorků se přítomné interferující složky konvertují (váží) vedle vlastního analytu a ruší stanovení na různých funkčních stupních biosensory. Tento efekt je rušivý zejména u elektrochemických systémů, kdy se na elektrodě mimo detekovaného produktu rekogniční enzymové reakce konvertují také mnohé elektroaktivní látky ze vzorku. Nebo alternativní substráty mohou být přeměňovány imobilizovaným enzymem, může docházet k ovlivnění biorekogniční složky a podobně.

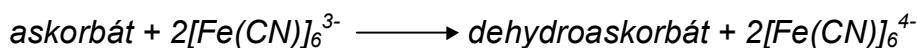


Eliminací by se veškeré interferující látky měly odstranit nebo převést na nerušící produkty. Tohoto efektu se dosáhne předřazením eliminačního systému vlastnímu biosensoru. Příklady eliminačních systémů jsou uvedeny dále.

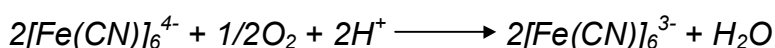
Amoniak je často detekovaným produktem enzymových reakcí, ale současně může být přítomen volný ve vzorku (sérum, moč). Lze ho odstranit pomocí *glutamát dehydrogenázy*:



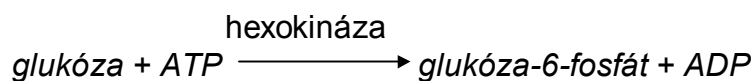
Kyselina askorbová může rušit při stanovení metabolitů v séru kde je konečnou fází amperometrická oxidace peroxidu vodíku. Může být eliminována předřazením biomembrány s *askorbát oxidázou* (neprodukuje peroxid vodíku), jinou možností je použití ferrikyanidu ve spojení s *lakázou* (bez lakasy by vadil vzniklý ferrokyanid). Další možností je předřadit vhodnou antiinterferenční vrstvu přímo vlastnímu převodníku. Pro askorbát přichází do úvahy použít negativně nabitou membránu, např. velmi hustou acetylcelulosu. Další možností je provést elektrooxidaci askorbátu ještě před jeho příchodem do biokatalytické vrstvy předřazením např. platinové sítě nebo trubičky u průtočných systémů.



lakáza



Glukóza ve volném stavu bude vadit u řady víceenzymových systémů pro stanovení složitějších cukrů. Pro její odstranění lze použít antiinterferenční vrstvu obsahující *glukóza oxidázu* a *katalázu* (rozkládá vznikající peroxid vodíku), tento postup funguje do asi 2 mM koncentrace. Pokud nemá být ovlivněna hladina kyslíku v okolí biosensoru, je možné spotřebovat glukosu fosforylací ATP pomocí *hexokinázy*:



Kyslík lze z okolí biosensoru odstranit při oxidaci glukózy *glukóza oxidázou*.

Mikrobiální a tkáňové elektrody

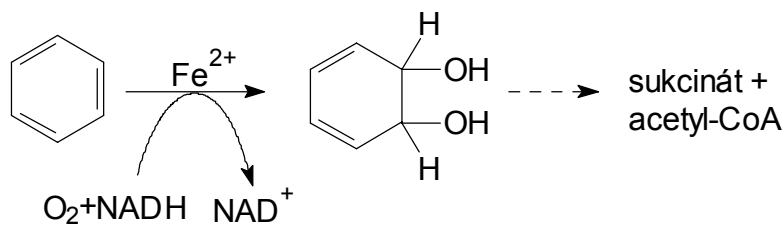
V těchto biosensorech je biochemická složka v aktivním životním stavu - jedná se o mikrobiální, rostlinné nebo živočišné buňky nebo jejich subcelulární elementy (organely) nebo celé tkáně či orgány. Biokomponenta je ve svém přirozeném biologickém prostředí, což může příznivě ovlivnit její aktivitu a stabilitu. Navíc lze místo jediného enzymu použít celé metabolické reakční sekvence, optimalizované přirozenou cestou. Odpadá také nutnost izolačních a purifikačních kroků, což se může příznivě odrazit na ceně. Pokud jsou zachovány životní podmínky, může docházet ke spontánní obnově využívané enzymové aktivity. **Hybridními** biosensory jsou nazývány systémy obsahující současně vedle mikrobiální či tkáňové složky navíc izolovaný enzym.

Mikrobiální systémy

Mohou obsahovat buňky bakterií, sinic či kvasinek, imobilizované buď na povrchu převodníku (membránový typ) nebo ve formě předřazeného reaktoru. Delší životnost lze dosáhnout zajištěním životních podmínek pro dané buňky. Problémem je existence celé řady enzymových systémů v buňce; jistého zlepšení selektivity je možné dosáhnout pomocí **indukce** (přídavek potenciálního analytu = substrátu vyvolá zvýšenou tvorbu komponent metabolické dráhy) nebo **inhibice** (potlačí se funkce nežádoucích aktivit).

Pro imobilizaci se používají některé speciální metodiky. Nejjednodušší je zachycení buněk přefiltrováním přes vhodnou **membránu** ve formě „pasty“ nebo filmu. Buňky jsou zachyceny uvnitř pórů membrány (filtrační papír, polyamid, celulóza). Dynamické vlastnosti výsledného sensoru budou záviset na tloušťce a porozitě membrány a vlastnostech buněčné stěny mikroba. Stabilnější sensory lze připravit zachycením buněk **uvnitř gelu**. Tvorba gelu probíhá v přítomnosti buněk, nelze tedy použít příliš drastické podmínky. Jako vhodné materiály lze zmínit agar, kolagen, želatinu, polyakrylamid nebo polyvinylalkohol. PVA lze připravit zvláště šetrně. Kovalentní vazba buněk není vhodná, protože obvykle dojde ke zničení buněčné stěny.

Mikrobiální složku je nejčastěji možné spojit s kyslíkovou elektrodou, dále pak se sensory pro CO₂ nebo amoniak, je možné použití mediátorů přenosu elektronů (ferrikyanid). Peroxid vodíku obvykle není produkován, protože je toxický pro buňky. Tyto sensory je možné samozřejmě použít především pro stanovení řady substrátů (glukóza, fruktóza, sacharóza).



Zajímavější je biosensor pro detekci benzenu aromátů pomocí kmene *Pseudomonas* obsahujícího aktivitu enzymu *benzen dioxygenázy*.

Nejúspěšnější aplikaci biosensoru z této oblasti představují systémy pro rychlé stanovení **biochemické spotřeby kyslíku** (BSK, angl. **BOD**, biochemical oxygen demand). Oproti klasickému parametru BSK5 (= rozdíl koncentrace kyslíku ve vzorku na počátku a po pětidenní biochemické oxidaci organických látek, probíhá aerobně v uzavřeném systému v přítomnosti mikroorganismů a ve tmě) se může znečištění vod stanovit mnohem rychleji pomocí biosensoru tvořeného kyslíkovou elektrodou a mikrobiální vrstvou. Z vhodných mikroorganismů lze zmínit *Trichosporon cutaneum*, *Bacillus subtilis* a *licheniformis*. Měří se rychlost respirace po přidavku vzorku, potřebná doba je přitom pouze několik minut. Hodnoty stanovené BOD biosensorem jsou úměrné parametru BSK5, převodní vztah se určí kalibrací. Standardními kalibračními substráty jsou obvykle směs glukózy a kyseliny glutamové.

Další zajímavou oblastí je detekce toxických látek ve vodních tocích (azidy, kyanidy, pesticidy, fenoly, těžké kovy). Využívá se inhibice respiračního řetězce nebo fotosyntézy vhodného indikačního mikroorganismu (např. *Synecoccus*, aktivovaný kal). Takovéto monitorovací systémy jsou vhodné pro nepřetržité sledování; nejsou příliš specifické a nevýhodou je také poměrně nízká citlivost.

Elektrody s tkáňovými řezy rostlin a hub

Dalším velmi levným zdrojem biorekogniční složky mohou být rostliny nebo houby, snad nejčastěji se využívá žampion jako zdroj *tyrosinázy* (*polyfenol oxidázy*) pro stanovení fenolů. Vždy je třeba otestovat, ve které části se nachází žádaná enzymová aktivita. Obvykle se používají buď rostoucí části (mladé listy) nebo zásobní části (plody ovoce, zeleniny). Rostlinná tkáň se nejčastěji používá jako tenký řez přichycený pomocí řídké síťky před povrchem pracovní elektrody. Další možností je vpravit rozmělněný materiál do kompozitní směsi pro přípravu uhlíkové pastové elektrody. U tohoto typu se velmi snadno obnovuje aktivní povrch (ze zásobníku se vytlačí kousek čerstvé pasty a uhladí), odezvy jsou rychlé a reprodukovatelnost přípravy je velmi dobrá. Mimo přirozených se používají také uměle připravené buněčné kultury. Stabilita takovýchto biosensorů je řádově týdny až měsíce,

dosahované limity detekce jsou kolem 10 μM . Jistým problémem je selektivita odezvy, protože jsou samozřejmě přítomné nejrůznější enzymové systémy.

Příklady biosensorů s rostlinami

Rostlina (použitá část)	Enzym	Analyt
žampion (plodnice)	tyrosináza	fenoly
brambor (hlíza)	tyrosináza	fenoly
banán (dužina) (banantroda)	tyrosináza	dopamin
okurek, tykev (řez plodu, šťáva)	askorbát oxidáza	vitamin C
okurek		cystein
křen	peroxidáza	peroxid vodíku
sója	ureáza	močovina
chryzantémy (okvětní lístky)		aminokyseliny

Živočišné tkáně v biosensorech

Stejně jako v předcházející části se dříve používaly nejrůznější tkáňové řezy, stabilita byla nižší ve srovnání s rostlinnými systémy. V tabulce uvedené systémy byly vesměs spojené s NH_3 elektrodou.

Příklady biosensorů s tkáňovými řezy živočišného původu

Použitá část	Enzym	Analyt
ledvina (vepřová)		glutamin glukosamin-6-fosfát
játra (králík)	<i>kataláza</i>	peroxid vodíku
sval (králík)	<i>monoamin OD</i>	guanin
střevo (myš)		katecholaminy AMP
		adenosin

V posledních letech se značná pozornost obrací k nervovým buňkám, které se kultivují na podložce tvořené souborem miniaturních elektrod (microelektrode array), ze zaznamenaných potenciálů se usuzuje na fyziologický stav. Obvykle se stanovují toxické látky, které ovlivňují nervový systém. Problémem zůstává specifita naměřeného signálu. Oblast použití buněčných kultur nabývá na důležitosti v souvislosti s náhradou testů nově vyvíjených látek prováděných na zvířatech. Další stimuly přicházejí z oblasti výzkumu nervové činnosti.

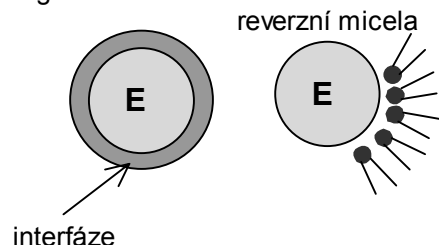
Bioanalytická stanovení v organické fázi

Přírodním prostředím biochemických reakcí je voda, a přítomnost organických rozpouštědel proto byla všeobecně považována za příčinu denaturace bílkovin a ztráty biologické aktivity. Na druhou stranu, v přírodních systémech je řada procesů spojena s hydrofobním prostředím biomembrán. Použitím enzymů jako činidel v organické syntéze započalo podrobnější studium vlivu organické fáze na průběh enzymových reakcí²⁶ a úspěchy na tomto poli byly aplikovány také do bioanalytické oblasti. Výhody bioreakcí v organické fázi jsou následující:

- * zvýšená rozpustnost nepolárních substrátů (možnost přímé analýzy tuků či olejů)
- * změněné reakční rovnováhy (místo hydrolýzy často probíhá syntéza)
- * zvýšená termální stabilita (fixovaná struktura biomakromolekul)
- * zjednodušená imobilizace prostou adsorpcí
- * neprobíhají rušivé reakce s účastí vody
- * nenastává bakteriální kontaminace

Bylo zjištěno, že pro činnost enzymů v organické fázi je potřeba jisté minimální množství vody (1 až 5 %), které vytváří hydratační obal bílkoviny. Obvykle proto nelze používat rozpouštědla volně mísitelná s vodou, která hydratační obal kompletně odstraní.

organická fáze



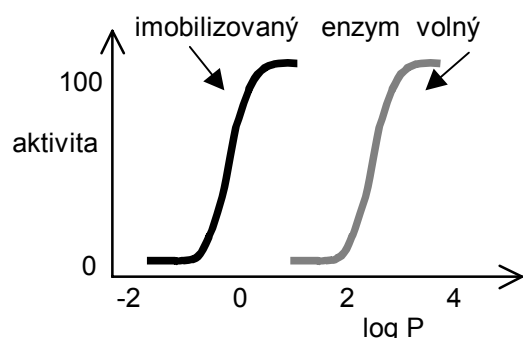
I nepolární rozpouštědla je vhodné nasycit předem vodou. Na povrchu bílkoviny navíc existuje přechodová oblast - interfáze, někdy je pro její tvorbu vhodné přidat hexanol nebo detergent CTAB, cetyl trimethylamonium bromid).

Pro posouzení polaritý rozpouštědel se používá partiční koeficient P , což je vlastně tozďelovací poměr daného rozpouštědla mezi oktanol a vodu: $P = [\text{rozp}]_{\text{oktanol}}/[\text{rozp}]_{\text{voda}}$. Obvykle se používá $\log P$; jeho nižší hodnota znamená méně polární rozpouštědlo. Podle velikosti $\log P$ lze přibližně vymezit tři skupiny rozpouštědel. Mimo polaritu rozpouštědla je samozřejmě nutné zvážit také jeho dostupnost, těkavost, cenu a případně toxicitu.

²⁶ Dordick M. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 194 (1989).

	log P	log P < 2	tato rozpouštědla nejsou vhodná sama
dimethylsulfoxid	-1.3		
dioxan	-1.1		
dimethylformamid	-1.0		
methanol	-0.76		o sobě, narušují vodný obal biomokuly; někdy jsou použitelná
ethanol	-0.24		ve směsi s vodou;
aceton	-0.23		
tetrahydrofuran	0.49	2 < log P < 4	účinek rozpouštědla na aktivitu enzymu
butanol	0.80		
ether	0.85		je třeba vyzkoušet;
cyklohexanol	1.5		
chloroform	2.0		
benzen	2.0		
toluen	2.5	log P > 4	obecně jsou použitelná, vodný obal
pentan	3.0		
hexan	3.4		enzymu není narušen
dekan	5.6		
hexadekan	8.8		

Někdy je výhodné použít místo čistého rozpouštědla mikroemulze tvořené směsí rozpouštědla (1 až 10 %), vody a vhodného detergentu (0.05 až 0.5 %). Při elektrochemických aplikacích je často potřeba zvýšit vodivost organické fáze použitím vhodné soli, tvořené nejčastěji kvartérním amoniovým kationtem (tetramethyl-, tetraethyl- nebo tetrabutylamonium) v kombinaci s objemným aniontem (bromid, tetrafluoroboritan, chloristan). Menší nároky na vodivost mají mikroelektrody, kyslíková elektroda pracuje bez problémů i ve zcela nevodivém prostředí.



Vliv prostředí na aktivitu enzymu

Průběh aktivity enzymu v závislosti na polaritě rozpouštědla má charakteristický esovitý tvar. Imobilizovaný enzym obvykle lépe snáší i méně polární rozpouštědla. Jak bylo zmíněno, imobilizace je možné prostou adsorpcí enzymu na povrch sensoru, nebo lze roztokem enzymu nasýtit porézní nosič (papír, skelná tkanina).

Existuje i speciální ve vodě rozpustný polymer AQ 55 (polyester sulfonát, vyrábí Kodak). Jeho směs s enzymem se kápně na povrch sensoru, nechá uschnout, a poté lze používat v přítomnosti organických rozpouštědel.

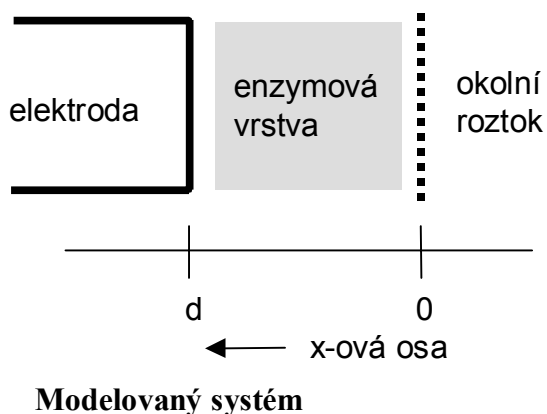
Aplikace této skupiny biosenzorů se zaměřují především na ve vodě nerozpustné analyty nebo vzorky. Asi nejvíce biosenzorů je založeno na použití *tyrosinázy*. Je vhodná pro stanovení fenolů v oleji nebo v organických extraktech z vody. Na základě inhibice jde stanovit substituované thiomocoviny (vznikají z glukosinolátů, které znehodnocují krmné směsi s řepkou). Podobně *lakáza* je vhodná pro *p*-difenoly. *Peroxidáza* mimo detekce peroxidu vodíku slouží také pro detekci organických hydroperoxidů, které vznikají v tucích

při jejich rozkladu. Cholesterol v másle a margarínech lze v organické fázi výhodně stanovit *cholesterol oxidázou*. *Acetylcholinesterázy* slouží pro detekci pesticidů (organofosfáty, karbamáty) po extrakci z vodné fáze. V poslední době se objevují i pokusy provádět v organické fázi některá imunochemická stanovení nízkomolekulárních toxických látek.

Matematické modely biokatalytických sensorů

Při experimentálním studiu činnosti biosensoru se sleduje výsledek funkce celého systému. Pro popis a optimalizaci dílčích procesů tvořících odezvu biosensoru (látkový transport, enzymová reakce, elektrodová reakce, ...) se výhodně používají matematické **modely**. Fyzikálně zaměřené modely se snaží přesně popisovat jednotlivé dílčí procesy, což obvykle znesnadňuje (nebo zcela znemožňuje) nalezení konečného řešení. Na druhé straně kvalitativně zaměřené modely zavádí řadu zjednodušujících předpokladů, což usnadňuje manipulaci s modelem.

Amperometrické biosensory jsou nejčastějším objektem modelování. Uplatňuje se zde několik východisek. **Enzymová reakce** (1, 2, více) převádí analyt stechiometricky na snadno měřitelnou látku. Obvykle se uvažuje **lineární** reakce (reakční rychlost je přímo úměrná koncentraci), nelineární reakce vedou pouze k numerickému řešení. V biosensoru existuje jistý počet navazujících **vrstev**, což je nejčastěji soubor několika membrán (enzymová, dialyzační pro kontrolu transportu, mechanická ochrana, ...) na povrchu elektrody. Modelování lze provádět buď **stacionárně** pro předpokládaný ustálený stav (předpokládá se nezávislost nalezeného řešení na čase), nebo **dynamicky**, kdy model obsahuje časovou proměnnou, takže lze nalézt řešení v žádaném časovém okamžiku. Pro nalezení řešení je velmi důležitý popis **situace v přechodových oblastech** - rozhraní povrch elektroda / biokatalytická vrstva / okolní roztok.



Předpokládá se dobře míchaný okolní roztok, zanedbatelná spotřeba okolního analytu v důsledku činnosti biosensoru, zachování hmoty při přechodu mezi vrstvami a nulový tok neaktivních částic na povrchu elektrody. Elektroaktivní látka je na povrchu elektrody úplně spotřebována (má zde nulovou koncentraci).

Postupy modelování je nejlépe ukázat na praktickém příkladu jednoenzymové amperometrické elektrody s jedinou vrstvou. Pro jednoduchost je potřeba zavést některé symboly. Velká písmena $S, P, A, B (\dots)$ značí koncentrace substrátu, produktu a případných dalších pomocných látek, v okolním roztoku jsou koncentrace S^o, P^o, A^o atd. Rozměr (vzdálenost) je x , počátek má na rozhraní enzymové vrstvy a okolního roztoku. Čas je t , modelování začíná v čase 0. Pro jednotlivé látky jsou difúzní koeficienty D_S, D_P , atd. Rychlostní konstanta enzymové reakce je k (lineární reakce, $k = V_{max}/K_M$).

Koncentrace v daném místě a čase jsou $S(x,t)$, derivace podle času jsou $S_t(x,t) = \frac{\delta^2 S(x,t)}{\delta x^2}$, podle x pak $S_x(x,t)$ a $S_{xx}(x,t)$. Platí např.:

Použití uvedené symboliky pro elektroinaktivní látku S bude vypadat následovně. Časová změna koncentrace bude dána jednak transportem a jednak chemickou reakcí (1. řád, lineární);

$$\frac{\delta[S]}{\delta t} = D_S \frac{\delta^2[S]}{\delta x^2} - k[S] \quad S_t = D_S S_{xx} - kS$$

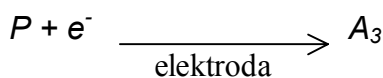
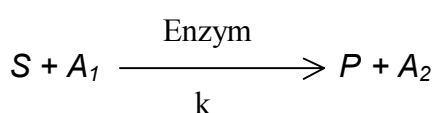
první rovnice odpovídá obvyklému zápisu, druhá pak použití zjednodušující symboliky:

Pro stacionární řešení bude samozřejmě časová změna koncentrace látky nulová. Dále je možné formulovat mezní podmínky - popisující stav na jednotlivých rozhraních:

$S(0,t) = S^o$ pro $t > 0$ na rozhraní biovrstvy / roztok je koncentrace stále stejná jako v celém okolním roztoku

$S_x(d,t) = 0$ pro $t > 0$ na povrchu elektrody je nulový tok elektroinaktivní látky

$S(x,0) = 0$ pro $0 < x \leq d$ na počátku je uvnitř biovrstvy nulová koncentrace



Kompletní řešení pro nejjednodušší amperometrický biosensor (1 vrstva, 1 enzym, lineární reakce) je uvedeno pro ilustraci. Předpokládejme konverzi substrátu (analytu) enzymem a následnou elektrochemickou detekci produktu (A_i značí pomocné látky):

Rovnice a podmínky pro **stacionární** řešení substrátu a produktu jsou následující:

$$\begin{aligned} 0 &= D_S S_{xx} - kS & 0 &= D_P P_{xx} + kS \\ S(0) &= S^o & S_x(d) &= 0 & P(0) &= 0 & P(d) &= 0 \end{aligned}$$

Vyřešení diferenciálních rovnic pak poskytuje rovnice pro koncentrace obou látek uvnitř biovrstvy po ustavení ustáleného stavu:

$$\begin{aligned} S(x) &= S^o \frac{\cosh[Q(d-x)]}{\cosh(Qd)} & \text{kde } Q &= \sqrt{\frac{k}{D_S}} \\ P(x) &= S^o \left\{ \frac{x}{d} \left(\frac{1}{\cosh(Qd)} - 1 \right) + 1 + \frac{\cosh[Q(d-x)]}{\cosh(Qd)} \right\} \frac{D_S}{D_P} \end{aligned}$$

Proud v ustáleném vztahu I_{SS} je vlastně dán tokem produktu P na povrchu elektrody $P_x(d)$:

$$I_{SS} = nFAD_P P_x(d)$$

n značí počet elektronů, F je Faradayova konstanta, A plocha elektrody. Výsledky teroretického modelu je tedy možné přímo porovnat s experimentálně stanoveným proudem biosensoru. Pro tento jednoduchý příklad existuje řešení také pro **dynamický** model:

$$\begin{aligned} S_t &= D_S S_{xx} - kS & P_t &= D_P P_{xx} + kS \\ S(0,t) &= S^o & S_x(d,t) &= 0 & S(x,0) &= 0 & P(0,t) &= 0 & P(d,t) &= 0 & P(x,0) &= 0 \end{aligned}$$

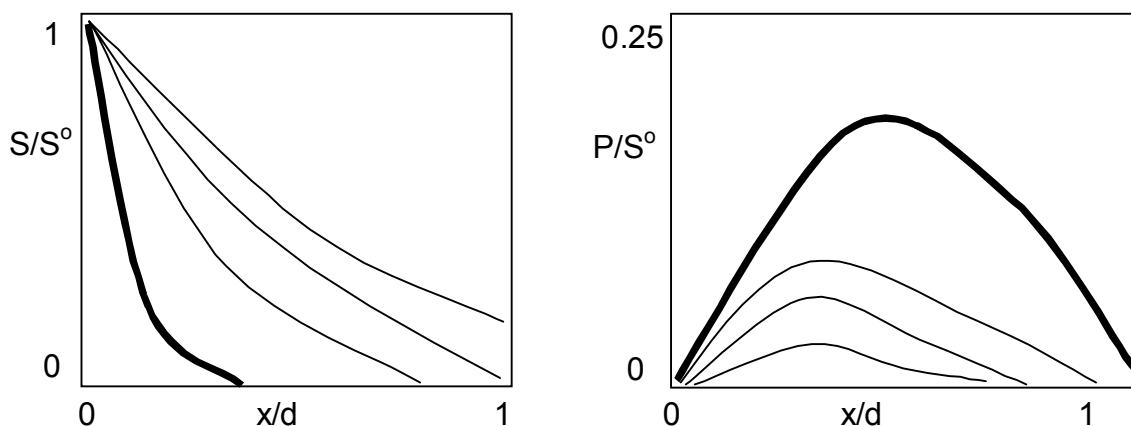
Rovnice průběhu koncentrace substrátu v závislosti na čase má následující tvar:

$$S(x,t) = S^o \left\{ 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \left[\cos\left(\frac{2n+1}{2} \pi \frac{d-x}{d}\right) \right] \left[\frac{k+u \exp[-(u+k)t]}{u+k} \right] \right\} \quad u = D_S \frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4d^2}$$

obdobná rovnice pro $P(x,t)$ se dá najít v literatuře²⁷ (délka cca 3 řádky). Průběh proudu biosensoru po přidavku substrátu je možné vyjádřit stejně jako u stacionárního řešení pomocí toku produktu na povrchu elektrody $P_x(d,t)$ (nyní časově proměnný):

$$I(t) = nFAD_P P_x(d,t)$$

Na základě dynamického řešení je možné zkonstruovat koncentrační profily substrátu a produktu uvnitř biovrstvy na povrchu elektrody. Na obrázku jsou použity pro názornost bezrozměrné souřadnice. Vyvinutý model tedy umožňuje studovat vliv změny parametrů (tloušťka biovrstvy, aktivita enzymu, průchodnost vrstvy) na odezvu biosensoru.



Koncentrační profily v enzymové vrstvě biosensoru

Konečný ustálený stav je znázorněn tlustou čarou.

Mimo velikosti proudových odezev je možné sledovat některé další charakteristiky. Například **doba odezvy** τ je definována jako čas potřebný pro dosažení signálu, který je rovný určitému podílu ε signálu v ustáleném stavu; obvykle se používá 95% (τ_{95}). Tuto charakteristiku je

možné modelovat jako podíl $\varepsilon = I(d, \tau_{95})/I(d)$. Při **kinetických měřeních** se zase jako signál používá časová derivace proudu, která je úměrná $P_t(d, t)$. Přitom se zaznamenává její maximální velikost; polohu maxima lze předpovědět $M_p(\tau) = \int_0^\tau F_p(t) dt$ položením druhé derivace rovné nule, $P_{tt}(d, t) = 0$. Je možné předpovědět rychlost **spotřeby analytu** z okolí $F_S(t) = -AD_S S_x(0, t)$ nebo naopak **uvolňování produktu** do okolí biosensory $F_P(t) = -AD_P P_x(0, t)$. To ukazuje, jak vlastní měření ovlivňuje okolí, význam to může mít při používání biosensory in vivo. Celková produkce (spotřeba) za určitý interval se může jednoduše určit integrací.

Dále je možné posuzovat **účinnost** (efektivitu) biosensory η ; definuje se jako podíl rychlosti reakce uvnitř biovrstvy za daných podmínek ku rychlosti za stavu, kdy by v celém objemu biovrstvy byla koncentrace substrátu rovna S^0 .

$$\eta(t) = \frac{\int_0^d kS(x, t) dx}{\int_0^d kS^0 dx} = \frac{1}{S^0 d} \int_0^d S(x, t) dx$$

$$\eta_{ss} = \frac{\int_0^d \cosh[Q(d-x)] dx}{d \cosh(Qd)} = \frac{\tanh(Qd)}{Qd}$$

Účinnost se v čase mění a ustálí se po dosažení stacionárního stavu:

Uvedené vztahy dostatečně demonstují užitečnost matematického modelování pro optimalizaci biosensory. Byl ukázán pouze nejjednodušší možný systém, v praxi se samozřejmě vyskytují převážně nelineární systémy. Obecně lze v diferenciální rovnici pro časovou změnu koncentrace substrátu zavést obecný rychlostní člen R: $S_t = D_S S_{xx} - R(S, \dots)$, který nabývá různý tvar podle dané biochemické reakce využívané v biorekogniční vrstvě:

Děj	Tvar rychlostního členu
lineární reakce	$R(S) = kS$
rovnice Michaelise-Mentenové	$R(S) = V_{max}S/(K_M+S)$
rovnovážná reakce	$R(S, P) = V_{max}(S-P)/(K_M+S-P)$
nekompetitivní inhibice	$R(S, I) = V_{max}S/[(K_I+K_2I)(K_M+S)]$
kompetitivní inhibice	$R(S, I) = V_{max}S/(K_I+K_2I+S)$
aktivace	$R(S, A) = V_{max}SA/[(K_I+A)(K_M+S)]$

Takovéto řešení již nelze získat ve tvaru matematické rovnice, ale pouze numericky.

²⁷ Schulmeister T. *Select. Electrodes Rev.* **12**, 203 (1990).

Rovnici pro signál v ustáleném stavu lze dále zjednodušit.

Zavádí se **Thieleho modul** Φ :

$$\Phi = Qd = \sqrt{\frac{kd^2}{D_S}} = d \sqrt{\frac{V_{\max}}{K_M D_S}}$$

Pak lze podle velikosti tohoto modulu určit dvě limitní oblasti činnosti biosensoru. Pro ty sepak dají odvodit zjednodušené rovnice pro I_{SS} . Pro velmi malé Φ ($\Phi \rightarrow 0$) je odezva biosensoru určována pouze rychlostí enzymové reakce, existuje **kinetická kontrola**. Pro přibližné řešení se $\cosh \Phi$ nahradí aritmetickou řadou (Taylorův rozvoj, ze které se použije pouze první člen, $\cosh \Phi = 1 + \Phi^2 + \dots$). Tím dostáváme:

$$I_{SS} \approx nFAS^0kd/2$$

Naopak pro velmi velká Φ ($\Phi \rightarrow \infty$) převládne vliv transportních procesů uvnitř biovrstvy, nastává **difúzní kontrola**. Pro zjednodušení se použije: $\lim_{\Phi \rightarrow \infty} \frac{1}{\cosh \Phi} = 0$ což konečně vede ke zjednodušenému výrazu:

$$I_{SS} \approx nFAD_S S^0/d$$

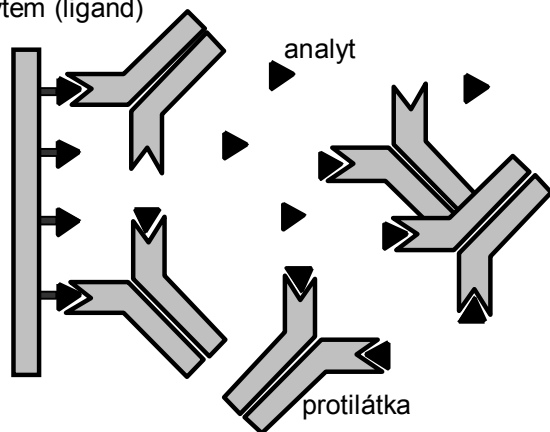
Oba zjednodušené výrazy platí dobře pro reálné odezvy biosensorů. Pokud je analyt substrátem pro enzym imobilizovaný v biosensoru, je výhodné pracovat za podmínek **difúzní kontroly**. Na odezvu nemá výrazný vliv rychlost enzymové reakce, takže případný postupný úbytek enzymové aktivity v biovrstvě enzymu se na velikosti signálu nemusí prakticky vůbec projevit. Biosensor obvykle vykazuje konstantní citlivost, která pak náhle klesne (enzymová aktivita se vyčerpá). Difúzní kontrola nastává u biovrstev s vysokou koncentrací enzymu, jinak ji lze dosáhnout předřazením málo propustné difúzní bariéry (kontrolní membrána). Druhý typ – **kinetická kontrola** – je výhodný zase pokud analyt funguje jako inhibitor imobilizovaného enzymu. Pak se i malé poklesy aktivity v důsledku inhibice ihned projeví poklesem signálu biosensoru.

Matematické modelování odezvy biosensorů nabývá na důležitosti s rozvojem masové produkce, vyžadující dokonalý popis a kontrolu jednotlivých technologických parametrů komponent tvořících biosensor.

Převodníky pro bioafinitní sensory

Afinitní biosensory využívají jako rekogniční složku biomolekuly schopné specificky vytvářet komplex s analytem, který je strukturně komplementární k vazebnému místu imobilizované biomolekuly. Typickým příkladem je vznik imunokomplexu mezi antigenem a protilátkou nebo hybridizace nukleových kyselin. Vznik biokomplexu na povrchu biosensory lze v zásadě sledovat dvěma odlišnými přístupy, přímo a nepřímě. **Nepřímá** metoda využívá toho, že jeden z reakčních partnerů se vhodně označí (enzymem, fluoroforem) a převodník pak vlastně sleduje vazbu značky na svém povrchu; použitelné jsou přístupy uvedené dříve v části věnované biokatalytickým sensorům.

převodník s imobilizovaným analytem (ligand)



Přímý afinitní biosensor

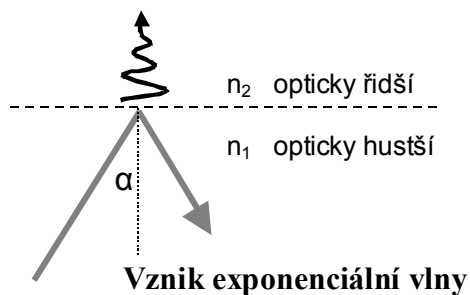
Přímá metoda je mnohem atraktivnější, protože umožňuje sledovat vznik biokomplexu obvykle průběžně. Příklad měřícího uspořádání přímého afinitního biosensory pro kompetitivní stanovení je ukázán na obrázku. Tato metoda je principiálně jednoduchá, avšak jako převodník jsou zapotřebí speciální fyzikální sensory, které budou podrobněji probrány v následujícím textu.

Přímé optické afinitní biosensory

Sledování afinitních interakcí bez pomoci značek začíná až koncem 80. let. V souvislosti s rozvojem telekomunikačních technologií na bázi světlovodů pronikají nové poznatky z nelineární optiky i do oblasti biosensory.

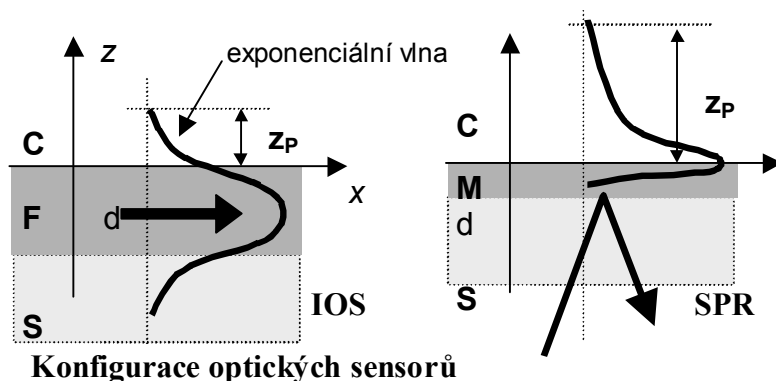
Teoretické základy

Přímé sledování bioafinitních interakcí pomocí optických afinitních biosensory probíhá v reálném čase, bez nutnosti značení a bez separačních kroků. Jeden reakční partner je imobilizován na povrchu fyzikálního převodníku, druhý je volně v roztoku a průběžně se sleduje jeho vazba na citlivý povrch. Měřený signál pak odráží pouze změny na povrchu sensory a v jeho těsné blízkosti.



Základem je interakce **exponenciální vlny** (tlumená či zhášivá; evanescent wave) s okolím sensoru. Při dopadu paprsku šířeného v opticky hustším prostředí na rozhraní s řidším prostředí pod větším úhlem než kritický ($\sin \alpha > n_2/n_1$), dochází k totálnímu vnitřnímu odrazu světla (TIR, total internal reflection).

Přitom vzniká v opticky řidším prostředí elektromagnetická vlna vyvolaná interakcí (superpozicí) dopadajícího a odráženého světla, její intenzita však klesá exponenciálně se vzdáleností od povrchu. V těchto typech sensorů se uplatňují dva druhy optických systémů - buď planární světlovod nebo rozhraní kov / dielektrikum. Interakcí exponenciální vlny s blízkým okolím sensoru dochází ke změně podmínek pro šíření světla v optickém systému, které se kvantifikují podle změn intenzity nebo fázového posunu vedeného světla. Podle konfigurace optického systému je možné odlišit systém **IOS** - planární vodič světla (integrated optical sensor), a dále pak **SPR** - rezonance elektromagnetické vlny šířené povrchovou vrstvou kovu (surface plasmon resonance, vzniká interakcí exponenciální vlny s volnými elektrony v kovu).



U obou typů vychází teorie ze změn efektivního indexu lomu N pro šíření vedené vlny uvnitř optického systému. Šíří se mod, který má u IOS magnetickou TM_0 a elektrickou TE_0 složku, u SPR je pouze TM_0 .

Změny v poli exponenciální vlny jsou vyvolané navázáním biomolekul na citlivý povrch (změny indexu lomu n_C v oblasti vzorku C). Penetrační hloubka exponenciální vlny v prostoru vzorku je z_P . Další součástí systému jsou S podkladový substrát (obvykle sklo, $n_S = 1.46$). F je planární světlovod (n_F , tloušťka d ; $n_F \approx 2.0$, $d = 80$ až 120 nm, materiály SiO_2/TiO_2 nebo Si_3N_4). U SPR pak M tenká vrstvička kovu (Au, Ag, tloušťky 20 až 60 nm). Pro vznik SPR je navíc nutné, aby u komplexní dielektrické permitivity kovu ϵ_M ($\epsilon_M = \epsilon_M' + j\epsilon_M''$) byla reálná složka ϵ_M' záporná a navíc $-\epsilon_M' > n_C^2$ (např. $\epsilon_{Ag} = -18 + 1.2j$, $\epsilon_{Au} = -12 + 0.52j$; všechny hodnoty platí pro vlnovou délku $\lambda = 632.8$ helium-neonového laseru). Pro efektivní indexy lomu N vedených vln a jejich penetrační hloubky platí vztahy:

IOS:
$$N = k_x \lambda / (2\pi) \qquad z_P = \lambda / (2\pi) [N^2 - n_C^2]^{-1/2}$$

$$\text{SPR: } N = [n_C^{-2} + 1/\epsilon_M]^{-1/2} \quad z_P = [\lambda/(2\pi n_C N)](-\epsilon_M')^{1/2}$$

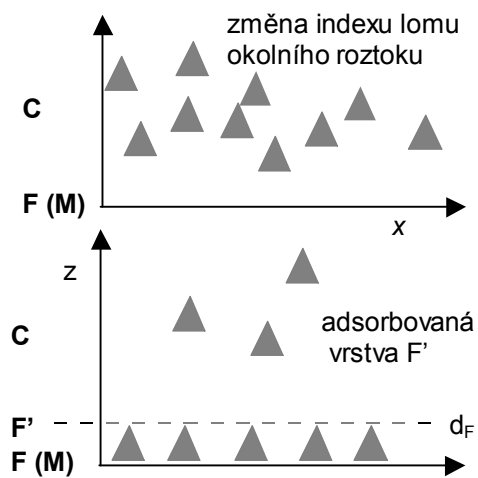
V důsledku absorpce světla v kovu je navíc SPR jev velmi úzce vymezen ve směru osy x na oblast o efektivní délce L_α (propagační délka): $L_\alpha = \lambda(\epsilon_M'')^2 / (2\pi N^3 \epsilon_M'')$

IOS a SPR jsou do značné míry analogické systémy, oba využívají vedení definovaného modu vlnění (buďtotálním vnitřním odrazem ve světlovodu nebo podél rozhraní kov / dielektrikum) a generování exponenciální vlny v oblasti vzorku.

Fyzikální charakteristiky IOS a SPR systémů:

Systém	N	z_P (nm)	L_α (μm)	$\delta N/\delta n_C$	$\delta N/\delta d_{F'}$ (10^{-4} nm^{-1})		
IOS	TE ₀	1.68	98	–	0.12	3.1	U IOS existují jak TE ₀ (s-polarizace), tak TM ₀ (p-polarizace), u SPR existuje pouze TM složka (méně informací).
	TM ₀	1.55	126	–	0.26	4.8	Vedení světla u IOS je možné až na vzdálenost několika cm, u SPR jen na L_α , přitom citlivost je úměrná délce dráhy interakce se vzorkem.
SPR	Au	1.44	180	4	1.27	15.3	
	(TM ₀) Ag	1.40	230	24	1.16	10.9	

V tabulce udává $\delta N/\delta n_C$ citlivost na změnu indexu lomu okolního prostředí (vzorek) a $\delta N/\delta d_{F'}$ pak je citlivost na změnu tloušťky adsorbované vrstvy.



Na změnu efektivního indexu lomu ΔN vedeného světla mají vliv dva procesy. Homogenní změna indexu lomu Δn_C celého okolního prostředí C (pro roztoky pufrů je např. $n_C = 1.33$), systém tedy funguje jako refraktometr, to je ovšem z hlediska senzoru nežádoucí. Tvorba homogenní adsorbované vrstvy F' je vlastní děj, má index lomu $n_{F'}$ a tloušťku $d_{F'}$, např. pro vrstvu bílkovin je index lomu $n_{F'}$ 1.45 – 1.55 a tloušťka vrstvy $d_{F'}$ 4 – 10 nm.

Pokud se oba jevy uplatní současně, lze celkovou změnu vyjádřit jako:

$$\Delta N = (\delta N/\delta n_C)\Delta n_C + (\delta N/\delta d_{F'})\Delta d_{F'}$$

přitom citlivost na změnu tloušťky vrstvy je nepřímo úměrná penetrační hloubce:

$$(\delta N/\delta d_{F'}) \approx (1/z_P) (\delta N/\delta n_C)$$

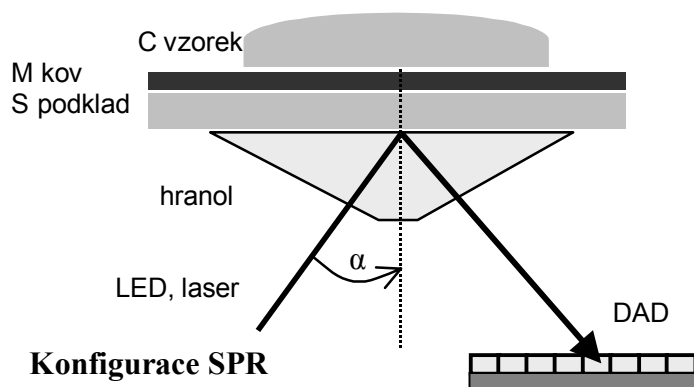
Konkrétní velikosti citlivostí vzhledem ke změnám indexu lomu roztoku a tloušťky adsorbované vrstvy byly uvedeny v tabulce. Ačkoliv je citlivost SPR na adsorpci biomolekul $\delta N/\delta d_{F'}$ lepší, vede 10x zvýšená citlivost $\delta N/\delta n_C$ k asi 2 až 3x většímu rušení od změn v okolním roztoku. V případě IOS lze individuálně odlišit příspěvky obou procesů, u SPR (pouze jedna složka vedeného mod) to možné není (uvažuje se jistá hodnota $n_{F'}$). Minimální

rozlišitelné rozdíly N jsou kolem 3×10^{-4} až 10^{-5} pro SPR, 2×10^{-6} pro IOS a 10^{-7} pro interferometry.

Odpovídající meze detekce pro analyt uvedené jako minimální změna povrchového pokrytí proteiny Γ_{min} jsou pro SPR se zlatou vrstvou 11 a se stříbrnou 2.5 ng/cm^2 , pro IOS pak 0.4 ng/cm^2 . Konstruktivním uspořádáním (interferometrické měření) lze citlivost u IOS ještě dále o řád zlepšit (delší dráha pro interakci). V praxi ovlivňuje činnost těchto optických systémů velmi výrazně teplota okolí. Její kolísání vyvolává fluktuace signálu, takže praktické limity detekce jsou spíše určovány dokonalou temperací měřícího systému. Po modifikaci povrchu imobilizací biospecifické vrstvy tyto systémy fungují jako **afinitní biosensory**.

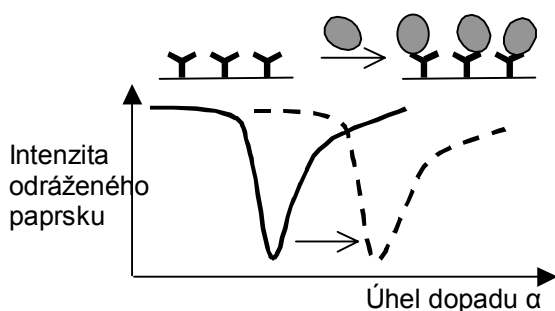
SPR

je nejstarší afinitní biosensor vyvinutý firmou Pharmacia pod názvem BIAcore²⁸.



Pro zavedení světla se používá vstupní hranol, povrchová vlna se excituje na rozhraní mezi kovem M a dielektrickou vrstvou C (vzorek). Místo hranolu lze principiálně použít i vstupní mřížku, vzhledem k rychlému utlumení SPR nelze užít výstupní uspořádání.

Jako detektor slouží řada fotodiód (DAD, diode array detector), což umožňuje určit závislost intenzity na úhlu odrazu.



Změna SPR signálu po vazbě biomolekul

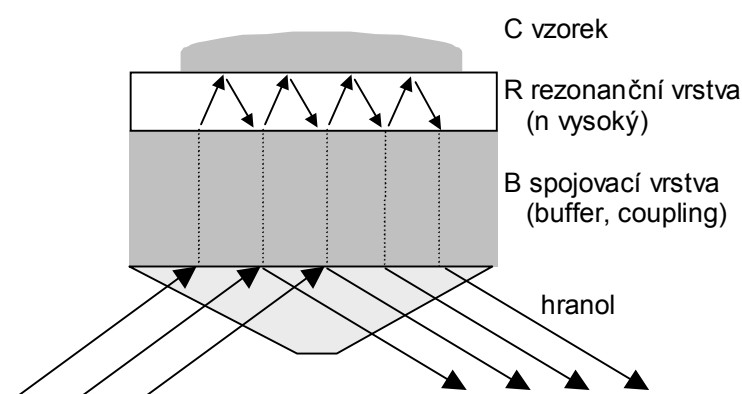
Průběžně se sleduje změna polohy $\Delta\alpha$ a intenzity odraženého paprsku, minimum intenzity přitom odpovídá oblasti rezonance (maximální přenos energie světla do vrstvičky kovu) a posouvá se při vazbě biomolekul. Posuv je přímo úměrný množství povrchově navázané látky.

Výměnný biosensor - integrovaný "čip" $140 \times 30 \text{ mm}$ umožňuje čtyřkanálové měření, citlivá vrstva je napařená zlato potažená karboxylovaným dextranem pro snadnou imobilizaci biomolekul. Dále pak měřící část obsahuje miniaturní průtočný systém s pneumatickými

ventily. Rozměry měřicího kanálku jsou 2.1 x 0.55 x 0.05 mm, jednotlivé měřicí kanály jsou nezávislé. Pracuje se s průtoky kolem 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, takže je minimální spotřeba bioreagencií a vzácných vzorků. Cena sensoru se pohybuje kolem 100 USD, celého systému BIACore kolem 250 tis. USD dle konfigurace a citlivosti. BIACore byl brzy po svém uvedení na trh komerčně velice úspěšný. To stimulovalo řadu dalších firem k vývoji podobných systémů dostupných za přijatelnější ceny, konkrétní zařízení budou uvedena v kapitole o komerčních biosensorech.

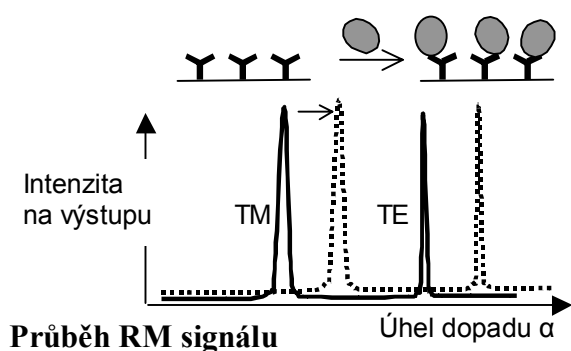
Rezonanční zrcadlo

RM (resonant mirror) IASys je obdobné zařízení britské firmy Affinity Sensors²⁹. Světlovodná vrstva s vysokým indexem lomu je nanosená na povrch optického hranolu.



Rezonanční zrcátko (IASys)

Světlo dopadající hranolem se při určitém úhlu váže přes spojovací vrstvu (sklo, tloušťka asi 1 μm) do světlovodu – dielektrické rezonanční vrstvy (materiál TiO_2 , tloušťka kolem 100 nm). Poté se světlo šíří podél jeho povrchu a odráží se zpět do spojovací vrstvy.



Průběh RM signálu

Tento optický systém nezpůsobuje ztráty energie světla, avšak rezonance vnáší fázový posun světelného paprsku, ten je přesně π při existenci rezonance. Používá se polarizované světlo, a protože rezonance existuje pro elektrickou TE a magnetickou TM složku současně, slouží navzájem jako reference.

Výsledný signál je prakticky nulový mimo oblast rezonance, kde vykazuje ostré maximum. Při měření se pak sleduje změna rezonančního úhlu v čase. Zachovává se jednoduchá konstrukce, avšak oproti SPR se dosahuje lepší citlivosti. Dosažitelné rozlišení tloušťky

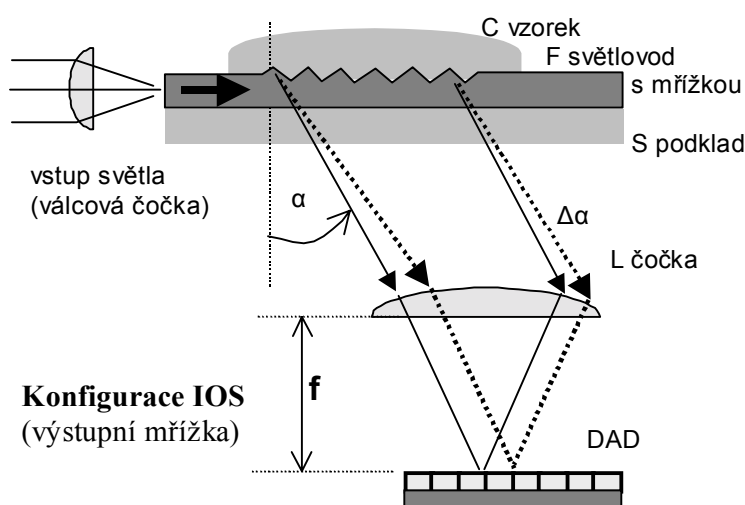
²⁸ Jönsson U., Malmqvist M.. V knize *Advances in Biosensors Vol. II*, JAI Press, London, 1992, str. 293.

²⁹ Cush R., Cronin J. M., Stewart W., Maule C. H., Molloy J., Goddard N. *Biosens. Bioelectron.* **8**, 347 (1992).

navázané biovrstvy je 10 pm a 10^{-4} pro změnu indexu lomu v okolí. Pracuje se v míchaném uspořádání, objem reakční komůrky je 200 μ l. Cena zařízení je 85 až 200 tis. USD dle míry automatizace.

IOS – výstupní mřížka

Integrovaný optický mřížkový sensor (IOGC, integrated optical grating coupler sensor) má více možných konfigurací³⁰. Citlivá oblast je umístěna v oblasti refrakční mřížky pro výstup světla z planárního světlovodu (F). Paprsek se zavede do světlovodu pomocí čočky, přičemž v oblasti difrakční mřížky vystupuje paprsek pod úhlem α .



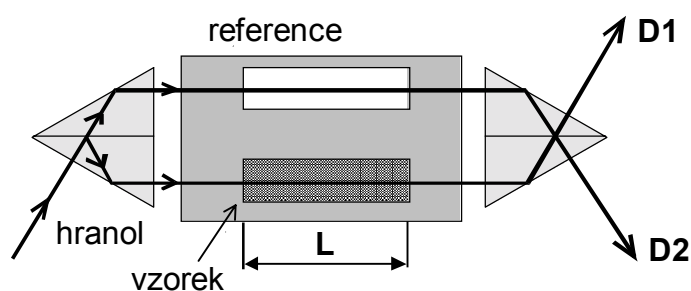
Po výstupu ze sensoru se svazek paprsků pomocí čočky L o ohniskové vzdálenosti f sleduje pomocí detektoru citlivého na změnu pozice DAD. Změny ΔN se určují ze změn výstupního úhlu $\Delta\alpha$:

$$\Delta N = n_{air} \Delta(\sin \alpha)$$

Detekční limit ve formě ΔN_{min} je $2 \cdot 10^{-6}$. Podobný je **vstupní mřížkový IOS**, citlivá oblast je v oblasti difrakční mřížky sloužící tentokrát pro vstup světla do světlovodu F. Detektory lze měřit změnu intenzity odraženého světla R nebo intenzitu světla, které se šíří světlovodem a na konci z něj vystupuje. Citlivost je obdobná jako u výstupního mřížkového IOS. Komerční zařízení BIOS (biochemical integrated optical scanner) švýcarské firmy ASI stanovuje intenzitu světla šířeného světlovodem v závislosti na proměnném úhlu dopadu, sensor je na otáčivé podložce. Velikost výměnného sensoru je 50x16x0.5 mm, mřížka má 2400 čar/mm, materiál světlovodu je TiO_2/SiO_2 . Cena sensoru je 30 SFR, celé zařízení stojí asi 120000 SFR. Citlivosti: relativní změna N $3 \cdot 10^{-6}$, absolutní změna N 10^{-5} , změna tloušťky vrstvy 100 pm.

³⁰ Lukosz W. *Biosens. Bioelectron.* **6**, 215 (1991).

Interferometry³¹



sestávají ze dvou světlovodných větví, z nichž jedna je v kontaktu se vzorkem C a druhá slouží jako reference. Obrázek vlevo ukazuje typickou konstrukci diferenciálního interferometru.

Koherentní paprsek laseru se pomocí Kösterova hranolu rozštěpí na dva stejné sfázované subpaprsky, které prochází referenčním a měřicím kanálem. Po zpětné rekombinaci a interferenci vystupujících paprsků se stanoví jejich fázový posun $\Delta\Phi = 2\pi (L/\lambda)\Delta N$. Změny intenzit na výstupech jsou úměrné $\pm \cos(\Delta\Phi)$. Minimální mez detekce je $[\Delta\Phi]_{\min} = 1$ až $5 \cdot 10^{-3} 2\pi$, tj. pro délku interakce $L = 20$ mm, pak je $\Delta N_{\min} \approx 1.5$ až $0.3 \cdot 10^{-7}$. Systém **PIWI** (planar interferometric waveguide immunosensor), Mach-Zehnderův interferometr, používá pro vstup a výstup světla do planárního světlovodu mřížky (zdola), lze však světlo zavést i čelně pomocí válcové čočky.

Jinou modifikací interferometrického měření je využití rozdílných změn efektivních indexů lomu pro dva různé módy N_{TE} a N_{TM} (jejich ovlivnění je velmi rozdílné)³². Provede se polarizace laserového paprsku. Oba módy kmitají v navzájem kolmých rovinách a jsou sfázované před vstupem do optického systému. Po interakci se vzorkem se pak liší o fázový posuv $\Delta\Phi = 2\pi (L/\lambda)(N_{TE} - N_{TM})$. Praktický detekční limit odpovídá změně 0.2 ng/cm^2 za 10 min.

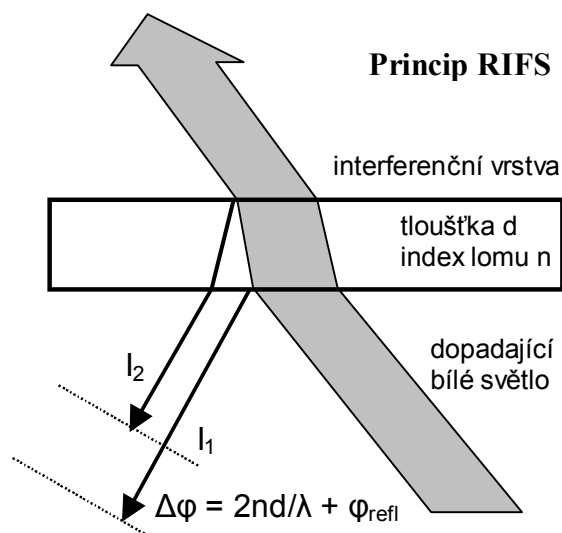
RIFS

reflektivní interferometrická spektroskopie je nyní nejcitlivější metodikou přímého optického sledování bioafinitních interakcí³³. Základem je interference na tenkých průhledných filmech. Světelný paprsek procházející slabě odrazivým tenkým filmem bude částečně odražen na každém rozhraní. Protože různé odražené paprsky prochází různými optickými dráhami, vzniká u nich fázový posuv.

³¹ Fabricius N., Gauglitz G., Ingenhoff J. *Sens. Actuators B* **7**, 672 (1992).

³² Fattinger C., Koller H., Schlatter D., Wehrli P.. *Biosens. Bioelectron.* **8**, 99 (1993).

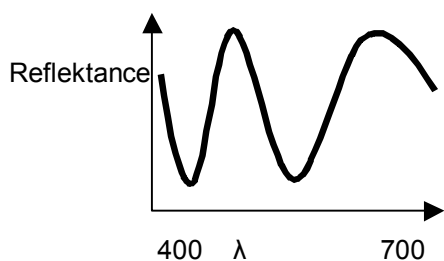
³³ Piehler J., Brech A., Gauglitz G. *Anal. Chem.* **68**, 139 (1996).



Pro tenké filmy je interference pozorována dokonce pro bílé světlo. To vede k modulaci intenzity odraženého světla v důsledku konstruktivní a destruktivní interference. Reflektance je pak dána vztahem:

$$R = R_1 + R_2 + 2\sqrt{R_1 R_2} \cos(4\pi n d / \lambda + \varphi_{refl})$$

kde R_1 a R_2 jsou Fresnelovy reflektance rozhraní a φ_{refl} značí fázový posun po odrazu.



Tvar spektra reflektance

Výsledkem je charakteristické spektrum reflektance, jehož tvar se změní po navázání biomolekul na citlivou plochu rozhraní, jako detektor slouží DAD. Rozlišení tloušťky biovrstvy se blíží 1 pm.

Závěrečná srovnání přímých afinitních sensorů³⁴

V předcházejících částech byly uvedeny principy řady optických sensorů používaných pro konstrukci přímých afinitních biosensorů. Následující tabulka provádí jejich vzájemné porovnání a také jejich dosah v různých osách a bodové rozlišení. Limitujícím pro dosažitelné rozlišení je v podstatě změna okolní teploty; teplotní koeficient indexu lomu vody je kolem 10^{-4} K^{-1} . Závěrem snad jeden údaj ilustrující vliv teploty na přesnost těchto systémů: kolísání teploty o 1 K se projeví stejně jako navázání 100 pg/mm^2 bílkoviny.

³⁴ Brecht A., Gauglitz G. *Biosens. Bioelectron.* **10**, 923 (1995).

Klasifikace optických sensorů podle efektů, rozlišení a šířky oblasti interakce

Technika	TIRF	IOGC	IMB	RM	SPR	WSPR	IO	Eli	RIFS
odraz světla	X			X	X			X	X
interference			X				X		X
exponenciální vlna	X	X	X	X	X	X	X		
světlovod	X	X	X	X		X	X		
„mode coupling“			X	X		X	X		
polarizované světlo			X	X	X	X	X	X	
fázový posuv			X	X			X	X	X
rezonance		X		X	X	X			
x rozlišení	dif	mm	mm	$n\lambda$	10 μm	mm	cm	dif	dif
y rozlišení	dif	dif	dif	dif	dif	10 μm	10 μm	dif	dif
z rozlišení	ev	ev	ev	ev	ev	ev	ev	< 1 nm	< 1 nm
délka - bodů / mm	1000	1	1	10-100	100	1	1	1000	1000
šířka - bodů /mm	1000	1000	1000	1000	100	10-40	5-20	1000	1000

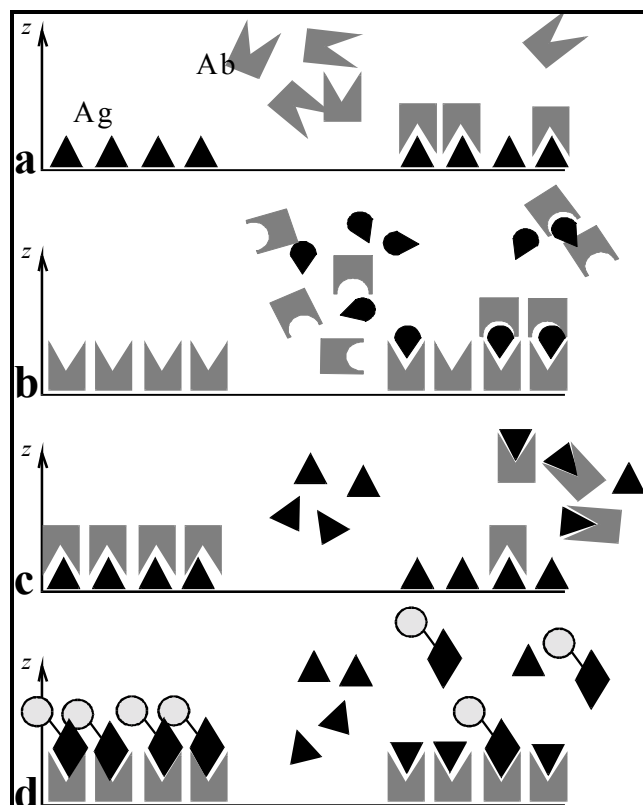
Vysvětlivky: TIRF total internal reflection fluorescence; IOGC integrated optical grating coupler; IMB interferometer – mode beat; RM resonant mirror; SPR surface plasmon resonance; WSPR waveguide-based SPR; IO integrated optical interferometer; Eli Ellipsometry; RIFS reflectometric interference spectroscopy; dif difrakčně limitované rozlišení ($\sim \lambda/2$); ev rozlišení dáno penetrační hloubkou exponenciální vlny ($\sim \lambda$); X uplatňuje se.

Oblasti použití afinitních biosensorů

Nejjednodušším použitím je koncentrační analýza - pomocí imobilizovaného bioligandu je možné specificky stanovit odpovídající analyt (např. pro měření v séru lze pracovat v rozsahu koncentrací 1 až 100 $\mu\text{g/l}$ pro proteiny při době analýzy pod 10 min). Mnohem častěji se však ve výzkumné oblasti provádí strukturní studie a studium bioafinitních interakcí (charakterizace protilátek, mapování vazebných míst), poslední dobou také hledání a současná charakterizace biomolekul připravovaných kombinatorickými postupy nebo z genetických knihoven. Kinetické studie (určování asociačních, disociačních a rovnovážných vazebných konstant) jsou velmi atraktivní z hlediska rychlosti a jednoduchosti měření oproti klasickým rovnovážným postupům zahrnujícím použití radioaktivního značení nebo separační kroky.

Hlavními výhodami jsou práce bez nutnosti značení, přímé sledování interakcí "v reálném čase" a v neposlední řadě i rychlost měření a značný stupeň automatizace. Limitující je zatím nižší citlivost oproti technikám využívajícím citlivé značky. Opakované použití těchto biosensorů je podmíněno **regenerací** citlivého povrchu. Používá se promývání zředěným hydroxidem sodným, kyselinou chlorovodíkovou nebo mravenčí, glycinem

o nízkém pH, organickými rozpouštědly ve směsi s vodou, chaotropními činidly, navázané analyty proteinové povahy je možné naštěpit pomocí proteináz. Ne vždy je regenerace úplná a ne vždy to snáší imobilizovaný bioligand. Hlavní komplikací zejména v našich podmínkách zůstává však vysoká cena těchto zařízení.



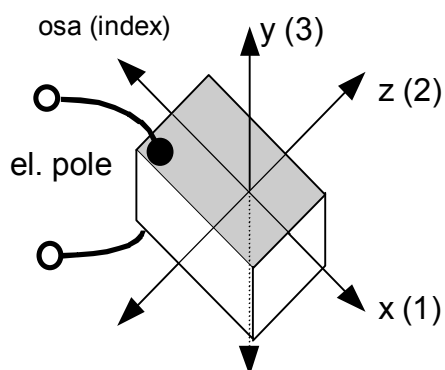
Formáty pro afinitní stanovení:

- a přímé stanovení, vhodné pro rozměrnější biomolekuly
- b sendvičové stanovení
- c vytěšňovací stanovení (displacement assay)
- d výměnné stanovení

Piezelektrické systémy

Piezelektrický efekt objevili roku 1880 bratři Curieové. Ukázalo se, že v některých anizotropních* krystalech (křemen, turmalín, Rochellova sůl) se při mechanickém namáhání generují orientované dipóly a vzniká elektrické napětí. Tento efekt se uplatňuje také v obráceném smyslu. Pokud se na krystal přivede střídavé elektrické napětí o vhodné (rezonanční) frekvenci, začne krystal se stejnou frekvencí vibrovat, přitom se převážná část energie ($10^5 : 1$) uchová v oscilujícím systému a nerozptyluje se do okolí.

* U anizotropních materiálů jsou elektrické, mechanické a magnetické vlastnosti různé vzhledem k různým osám. Orientace materiálu je tedy velmi důležitá.



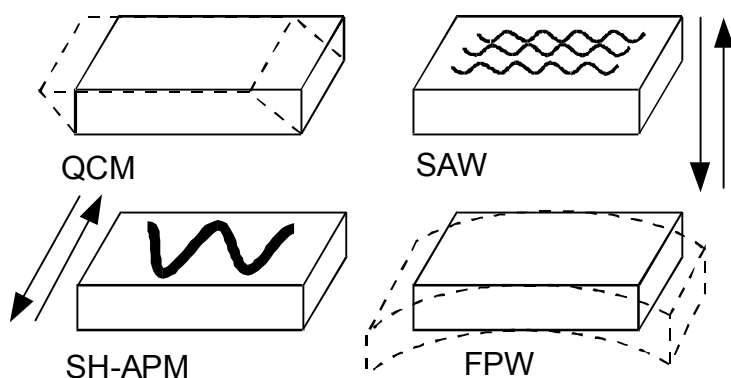
Orientace piezoelektrické. destičky

Na obrázku je ukázána orientace krystalografických os; pro tenký řez krystalu jsou pak podle jeho tvaru možné následující vibrace:

Mechanické deformace

	destička	disk
d_{31}	délková	radiální
d_{32}	šířková	
d_{33}	tloušťková	tloušťková

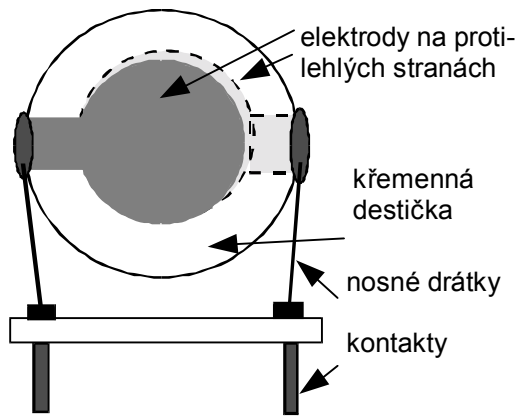
Piezoelektrické (PZ) materiály jsou jednak **přírodní**: především monokrystaly křemene, z nich se připraví vlastní sensory jako destičky vyřezané pod přesným úhlem (řezy AT, BT, ST, ...). **Umělé** materiály (dnes i křemen) mají charakter různých druhů keramiky: polykrystalická, ale uniaxiální (orientované), příprava se provádí sintrováním (ZnO , $LiNbO_3$, $LiTaO_3$, $Bi_{12}GeO_{20}$), výhodou je snadné tvarování a nanášení tenkých vrstev. Piezoelektrické **plasty** jsou zastoupeny polyvinylidenfluoridem PVDF $(-CH_2CF_2-)_n$ - směs (asi 1:1) amorfni a polykrystalické formy, ta sestává z nepolární náhodně orientované a polární orientované složky). Za piezoelektrické lze považovat i biomakromolekuly (DNA, proteiny). V piezoelektrických systémech se mohou využívat vibrace uvedené v tabulce (předpokládá se elektrické pole ve směru osy y (d_3). Přitom může oscilace probíhat v celém objemu materiálu, nebo pouze v povrchové vrstvě. Konkrétní systémy jsou uvedeny na obrázku. Někdy se uplatňuje několik oscilací současně.



Základní typy oscilací. Zkratky značí QCM, quartz crystal microbalance; SAW, surface acoustic wave; SH-APM, shear horizontal acoustic plate mode; FPW, flexural plate wave (Lambova vlna).

Piezoelektrické krystaly jako biosensory

Chemické mikrováčky (QCM) jsou nejstarší systém využívaný pro konstrukci sensorů, uplatňuje zde se přímý objemový stříh. Základem je destička z krystalu křemene (AT řez) s přírodními elektrodami (materiál je ušlechtilý kov, Au nebo Pt) na protilehlých stranách.



Piezoelektrický krystal

Rezonanční frekvenci f_0 určují fyzikální vlastnosti křemene a také tloušťka destičky (čím tenší, tím rychlejší vibrace a vyšší f_0). U tohoto typu bývá f_0 běžně od 5 do 20 MHz, dále už jsou krystaly příliš tenké a lámou se. Při navázání látky na aktivní povrch elektrod dojde ke změně rezonanční frekvence f_0 . Změní se hmotnost celého systému a vibrace se zpomalí - frekvence poklesne.

$$\Delta f = \frac{-2 f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad \Delta f = \sqrt{f_0^3 \frac{\eta_L \rho_L}{\pi \rho_q \mu_q}}$$

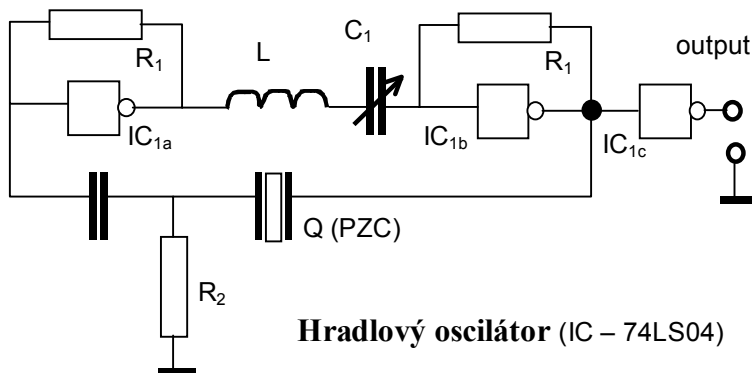
hmotnost viskozita

Pokud krystal osciluje navíc v přítomnosti kapaliny, dochází k dalším změnám f_0 v důsledku tlumení oscilací (viskozita prostředí).

$$\Delta f = -2.26 \cdot 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A}$$

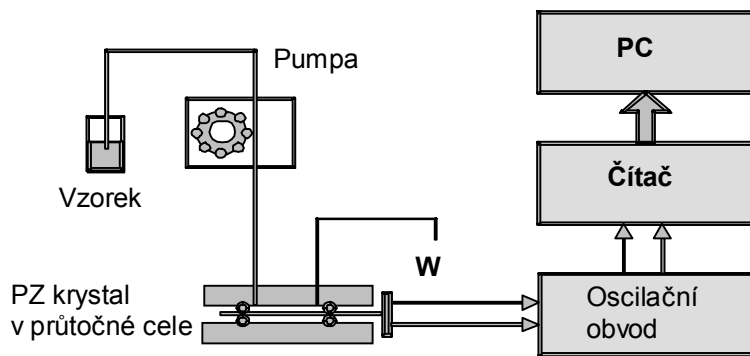
Po dosazení příslušných konstant dostáváme pro hmotnostní změny (Δm g, f_0 v MHz, Δf v Hz, A v cm^2) upravený vztah (Sauerbreyova rovnice).

Měření s PZ krystaly se dá provádět dvěma různými postupy. **Aktivní metoda:** PZ krystal je součástí širokopásmového oscilačního obvodu, jehož rezonanční frekvence se řídí vlastnostmi krystalu. Aktuální frekvence se stanoví pomocí čítače, rozlišení je 0.1 až 1 Hz při základní frekvenci 10 až 20 MHz, citlivost kolem 3 ng/Hz a mez detekce 10 ng/cm².



Nejjednodušší oscilační obvody využívají logická hradla, jiné operační zesilovače. Tyto hmotnostní senzory jsou velmi jednoduché a levné, ale principiálně nejde odlišit hmotnostní změny od viskozitních.

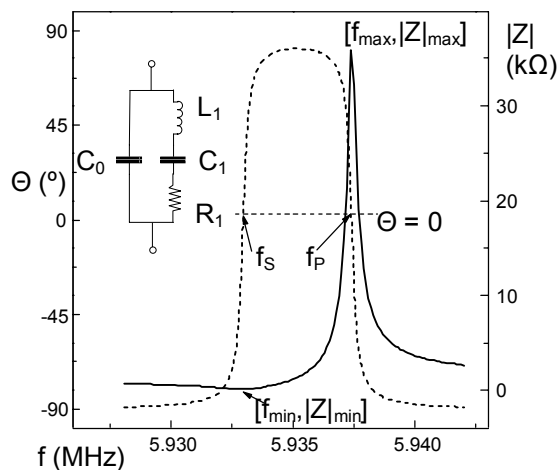
Některé speciální typy oscilátorů umožňují měřit signál úměrný zatížení krystalu v důsledku viskozity pomocí napětí ve zpětné vazbě zesilovače (AGC, autogain control).



Piezoelektrický biosensor

Piezoelektrický biosensor se získá imobilizací ligandu na povrch elektrod krystalu a umístěním krystalu v průtočné komůrce. Poté je tento systém použitelný pro přímé sledování afinitních interakcí v reálném čase podobně jako optické systémy.

Druhá měřicí metoda je **pasivní**. Na PZ krystal se zvenčí přivádí střídavé napětí o známé proměnné frekvenci a v okolí rezonance se proměří impedanční charakteristika, závislost velikosti $|Z|$ a fázového úhlu θ na frekvenci. Je zapotřebí nákladná aparatura (impedanční analyzátor, cena několik milionů korun), ale lze odlišit a spolehlivě změřit hmotnostní a viskozitní změny.

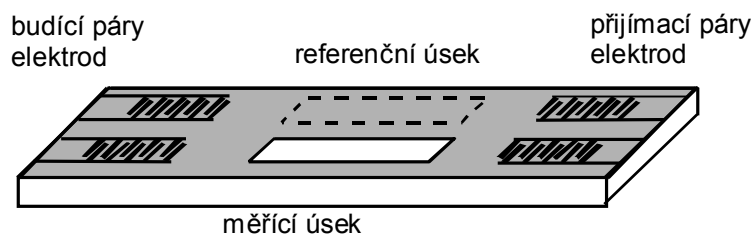


Příklad impedance PZ krystalu

Piezoelektrický krystal se zpracovává pomocí náhradního elektronického schématu tvořeného náhradními součástkami (viz vložený obrázek, C_0 , R_1 , C_1 , L_1). Přížom hodnoty „virtuálních“ součástí odpovídají hmotnosti krystalu a viskozitě okolí (odpor R_1). Hodnota sériové rezonanční frekvence f_s obvykle odpovídá rezonanční frekvenci krystalu určované při aktivní měřicí metodě.

Planární akustické sensory

Citlivost piezoelektrických sensorů závisí na pracovní frekvenci. U křemenných krystalů je pracovní frekvence limitována tloušťkou výbrusu. Velmi tenké vrstvy nanášené na nosný substrát umožňují dosahovat vysoké pracovní frekvence (přes 100 MHz), a tím i vyšší citlivosti. Jako signál slouží změny vlastností povrchové akustické vlny šířené piezoelektrickou vrstvou.



Sensor funguje jako zpožďovací linka (delay line); jeden pár elektrod (vysílač) budí akustickou vlnu.

Ta po průchodu citlivou vrstvou generuje střídavé napětí v protilehlém páru elektrod (přijímač). Vyhodnocuje se fázový posun a změna amplitudy zachycených akustických vln v závislosti na změnách v citlivé oblasti. Často se u těchto systémů vyskytuje několik druhů vlnění současně.

Aplikace piezoelektrických biosensorů:

Klasické použití piezoelektrických (bio)sensorů bylo v měřicích systémech pro plynnou fázi. Základem je imobilizovaný afinitní ligand (např. formaldehyd dehydrogenáza pro formaldehyd, cholinesteráza pro sarin, soman, protilátky pro kokain). Méně selektivní lipidické vrstvy se používají pro charakterizaci vůní (např. pivo nebo ovocné šťávy). Využívá se vícekanálová měření, cílem je konstrukce umělého nosu (electronic nose). Z této oblasti vycházely první piezoelektrické imunosensory. Reakce se vzorkem probíhala v roztoku, následovalo promytí, vysušení (problémy s reprodukovatelností) a stanovení nové rezonanční frekvence opět v suchém stavu. Tato varianta má přednost ve snadné interpretaci – naměřená data reprezentují jen změnu hmotnosti, ale nevýhodou je těžkopádné provedení.

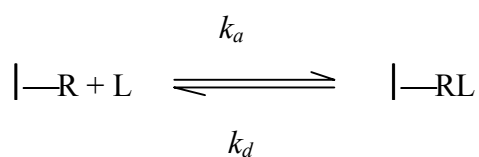
Měření přímo v roztoku umožňuje sledování afinitních interakcí v reálném čase. Je třeba odlišit změny hmotnosti a viskozity (pasivní metoda), i když u běžně používaných koncentrací biomolekul je viskozita jejich roztoků jen málo odlišná od základního pufru. Elektroda krystalu může být navíc spojena s potenciostatem, takže lze současně provádět elektrochemická měření (EQCM). Pro bioanalytické účely je možné i využití změn viskozity - není třeba imobilizace, specifickou reakcí se na povrchu krystalu tvoří precipitační produkt (aglutinační latexové testy), mění se vlastnosti roztoku ("gelovatění"). Nebo dochází k depolymeraci (fibrinolýza urokinázou - srážení krve, rozpad aktomyosinu s ATP -sledování čerstvost masa), Piezoelektrická metoda je rychlejší a citlivější než klasické postupy.

Kinetika afinitních interakcí

Kvantitativní charakterizace afinitních interakcí má základní význam pro řadu oblastí biochemie, biotechnologie i biologie. Metody pro měření afinity jsou obvykle založeny na smísení interagujících partnerů, dosažení rovnovážného stavu, separaci volných a vázaných molekul a kvantifikaci jednoho z partnerů. Užívají se vhodné detekční značky - radioaktivita, fluorescence, enzymy pro sledování afinitních závislostí; nezískají se kinetická data a navíc může dojít ke změnám nativní molekuly. Nejvíce informací lze vždy získat při **průběžném** sledování vazebného děje pomocí vhodného biosensoru. Experimentální metody z oblasti přímých afinitních biosensory fungují tak, že jedna z interagujících látek je navázána jako receptor na povrchu citlivé oblasti vhodného fyzikálního sensoru. Při specifickém navázání druhé látky (ligandu) se pak mění fyzikální charakteristiky citlivého povrchu, na které sensor reaguje změnou signálu. Vazebnou interakci tak lze sledovat v reálném čase a přímo bez nutnosti používat značení.

Sledování asociace a disociace biomolekul

Nejčastěji používaná metoda studia bioafinitních interakcí je schématicky znázorněna na obrázku. Jedna z reagujících látek (receptor R) je imobilizována na citlivém povrchu sensoru ($|—$), druhá (ligand L) je pak přítomná v okolním roztoku v koncentraci c , ta je obvykle během měření prakticky neměnná, např. při průtočném uspořádání. Sleduje se tvorba komplexu RL:

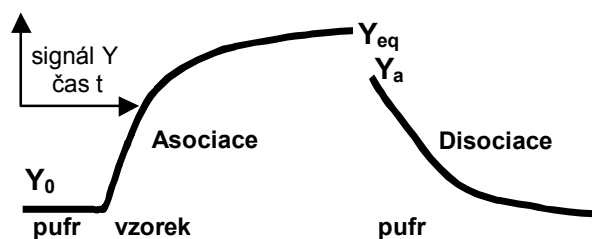


Naznačené děje popisují kinetické rychlostní konstanty k_a (asociační) a k_d (disociační).

Rychlost tvorby komplexu RL je dána rovnicí: $d[RL]/dt = k_a [R][L] - k_d [RL]$ (1)

Po ustavení rovnováhy ($d[RL]/dt = 0$) jsou koncentrace všech forem dány rovnovážnými konstantami K_A resp. K_D ; platí pro ně vztahy $K_A = [RL]/([R][L]) = k_a/k_d$, $K_D = 1/K_A$.

Měřený signál je jistým způsobem úměrný množství vznikajícího komplexu RL. U všech typů sensorů signál vlastně závisí na hmotnosti molekul navázaných na citlivý povrch.



Experimenty se obvykle provádí v průtočném uspořádání. Po ustavení základní linie signálu v pufru celou protéká roztok obsahující ligand a zaznamená se vazebná křivka (Asociace).

Poté lze do cely pustit opět pouze základní roztok bez ligandu a sledovat rozpad komplexu RL (Disociace). Podle toho, jaké jsou velikosti kinetických rychlostních konstant pro daný afinitní pár, je možné pozorovat řadu experimentálních asociačních a disociačních křivek a podle toho pak volit postup výpočtu. Ne vždy lze také určit všechny žádané parametry.

Pro hodnocení experimentálních záznamů se postupuje následovně. Výchozí signál Y_0 se bere nulový, vazebná kapacita povrchu je úměrná celkové změně signálu po obsazení všech přítomných molekul receptoru R, lze ji označit Y_{max} . V průběhu vazby bude zbývající množství volného neobsazeného receptoru R přímo úměrné rozdílu $Y_{max} - Y$, množství navázaného ligandu bude přímo úměrné Y . Rovnice se dá upravit:

$$dY/dt = k_a c(Y_{max} - Y) - k_d Y \quad \text{a další úpravou získat: } dY/dt = k_a c Y_{max} - (k_a c + k_d) Y$$

K určení kinetických parametrů z experimentálních závislostí Y na čase t lze použít dva odlišné postupy, linearizaci transformací nebo nelineární regresi.

Linearizace

byla vypracována pro systém BIAcore. Experimentální závislost $Y = f(t)$ se numerickou transformací (derivace) převede na tvar $dY/dt = f(Y)$. Nově získaná závislost by měla být lineární tvaru $dY/dt = a + bY$. Pro absolutní člen (úsek na ose y) platí $a = k_a c Y_{max}$, pro směrnici $b = -k_a c - k_d$. Pokud se provedou vazebná měření pro řadu koncentrací c volného partnera L, lze kinetické rychlostní konstanty k_a , k_d jednoduše zjistit vnesením závislostí a , b na koncentraci c . Na základě grafu směrnic se určí velikosti konstant a z grafu úseků vazebná kapacita Y_{max} . Lineární transformace primárních naměřených dat bohužel vede také k transformaci chyb počítaných parametrů, a tak jsou kvalitní naměřené údaje částečně znehodnoceny. Postup zcela spolehlivě funguje pro systémy, které se chovají přesně podle jednoduchého kinetického schématu. Pokud transformovaná závislost dY/dt vs. Y není zcela lineární, je proložení přímky subjektivně ovlivněno. Tyto i jiné problémy lze charakterizovat pomocí vhodných parametrů, vypracovat příslušné matematické modely a parametry určit přímo z primárních dat nelineární regresi.

Nelineární regrese

je exaktnější postup vycházející z integrace rovnice výchozí podle času, což přímo vede

k výrazu závislosti velikosti signálu Y na čase t :
$$Y = \frac{k_a c Y_{\max} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\}}{k_a c + k_d}$$

Z jediného experimentu tak je možné určit přímo žádané kinetické konstanty. Pro usnadnění numerického výpočtu lze zavést Y_{eq} , tj. velikost signálu při dosažení rovnovážného stavu:

$$Y_{eq} = k_a c Y_{\max} / (k_a c + k_d) = c Y_{\max} / (c + K_D) = K_A c Y_{\max} / (c + K_A)$$

Rovnice pak přejde na tvar:

$$Y = Y_{eq} \{1 - \exp[-(k_a c + k_d)t]\}$$

Dalšího zjednodušení výpočtu lze dosáhnout zavedením $k_{obs} = k_a c + k_d$. Hodnoty kinetických rychlostních konstant pak lze určit vynesáním k_{obs} proti koncentraci volného vazebného partnera. Nelineární regrese umožňuje vyhodnotit vazebné křivky tvořené ze dvou nezávislých kinetických interakcí (např. nespecifická adsorpce ligandu), je možné uvažovat vliv nestability základní linie, lze korigovat změny signálu vyvolané výměnou pracovního roztoku. Po nástřiku vzorku dochází obvykle k výrazné změně indexu lomu okolního prostředí, které se projeví jako prudká změna signálu u optických sensorů, stejně působí změny viskozity u piezoelektrických sensorů. Nelineární regrese je univerzální, lze použít i tam, kde linearizace selhává nebo není principiálně použitelná vůbec.

Disociační fáze

Po vytvoření komplexu RL na povrchu sensoru se z okolí odstraní volný ligand L a pozorovat zpětný rozpad (disociaci) komplexu na výchozí složky. Kineticky tento proces odpovídá rovnici (1), kde $[L] = 0$, odtud pak plyne $dY/dt = -k_d Y$. Je-li výchozí množství komplexu RL na povrchu sensoru dáno signálem Y_a , integrace vede ke vztahu:

$$Y = Y_a \exp(-k_d t)$$

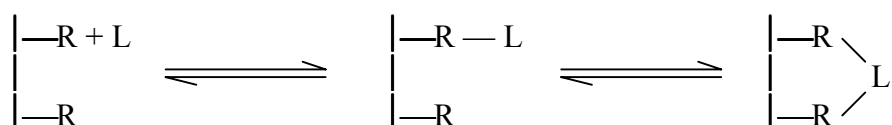
Z experimentální disociační křivky lze pak parametry k_d a Y_a určit nelineární regresí, nebo jednodušeji po úpravě na rovnici přímky lineární regresí:

$$\ln Y = \ln Y_a - k_d t$$

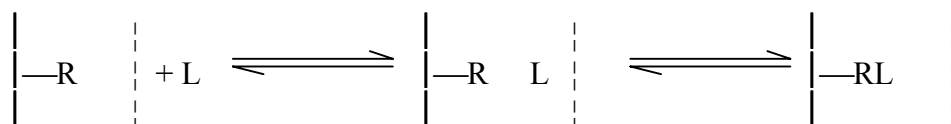
Komplikace při praktickém provádění experimentů

Obě konstanty k_a i k_d je sice možné vypočítat již z asociační reakce, nicméně pro k_d pod 10^{-4} s^{-1} tento postup vede ke zcela nepřesným hodnotám k_d , jak bylo ukázáno i matematickou simulací. Doporučuje se určit k_d z disociační křivky a takto získanou hodnotu použít

v asociačních rovnicích při určování k_a . Při disociaci ligandu z povrchu sensoru se může někdy vyskytovat tzv. "rebinding". Jde o to, že ligand L se sice uvolní z komplexu RL, ale než se stačí dostat do volného roztoku, je zachycen jinými neobsazenými receptory na povrchu. Tento jev nastává zejména pokud je povrchová hustota receptoru vysoká (R je nízkomolekulární), nebo pokud biospecifická vrstva není monovrstvou a má větší tloušťku, např. když se používá imobilizace v dextranové matici. Projevem bývají velmi nízké hodnoty k_d oproti očekávání. Při analýze interakcí protilátek (IgG, ligand L) s imobilizovanými antigeny se obvykle uvažuje stechiometrie interakce 1 : 1. To je vcelku oprávněné pro antigeny. Nicméně při interakci s imobilizovanými hapteny (R) je možná i bivalentní vazba:



Zde se při vyhodnocování již nevystačí s jednoduchým modelem uvedeným výše. Omezení tohoto jevu lze dosáhnout použitím vysokých koncentrací protilátky nebo snížením povrchové hustoty haptenu, aby vzdálenost mezi sousedními molekulami R byla větší ve srovnání se vzdáleností mezi vaznými místy protilátky. Při použití nespecifických imobilizačních postupů lze očekávat různé orientace receptoru, a tím i různé afinity. Lze použít i metody orientované imobilizace, např. vazbu protilátek na Protein A. Další možný problém představuje transport látek z roztoku k sensoru. Při průtočných měřeních obvykle existuje na povrchu sensoru nemíchaná vrstva (hranice |), která jej odděluje od okolního prostředí. Mimo vlastní afinitní interakce je tedy nutné uvažovat difúzní transport ligandu L:

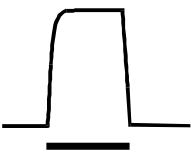
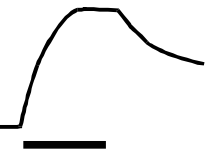
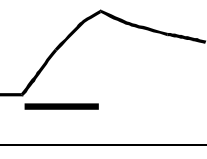
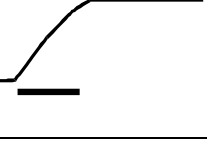
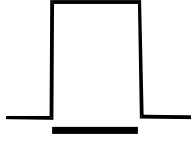
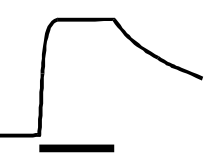
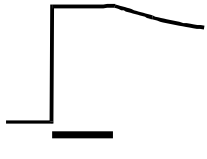


Naznačený proces se dá popsat jako dva následné reverzibilní kinetické děje, nebo je třeba použít 1. Fickův zákon. Aby se nežádoucí jevy neuplatnily, je zapotřebí pracovat při dostatečně rychlém průtoku resp. intenzivním míchání pracovního roztoku. Reálné bioafinitní interakce mohou často sestávat z řady navazujících rovnovážných či nevratných kroků (konformační změny, interakce mezi dalšími částmi biomolekul mimo aktivní centra). Odchytky od zde popsaného modelu pak mohou ovlivnit vypočítané parametry. Pro interpretaci naměřených kinetických křivek pak bude nezbytné vyvinout vlastní kinetické modely lépe vystihující předpokládaný reakční mechanismus.

Technologie z oblasti biosensorů poskytují velmi účinné nástroje ke studiu bioafinitních interakcí v reálném čase. Kvantitativní údaje - rychlostní i rovnovážné kinetické

konstanty - lze získat velmi rychle, nicméně pro dosažení optimálních a spolehlivých výsledků je zapotřebí porozumět základním principům a věnovat dostatečnou pozornost i správné interpretaci naměřených dat. Příklady schématických experimentálních závislostí pro různé velikosti kinetických konstant jsou shrnuty v závěrečné tabulce.

Experimentální záznamy dle předpokládaných velikostí rychlostních konstant.

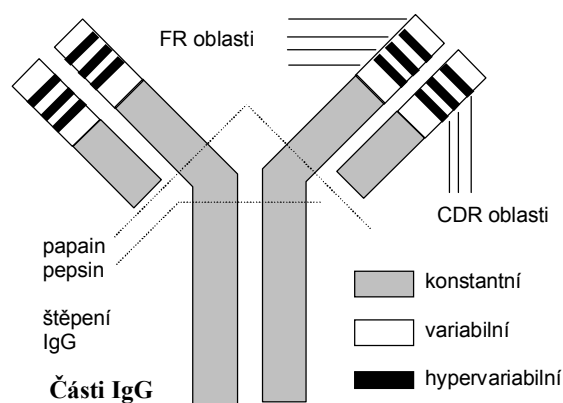
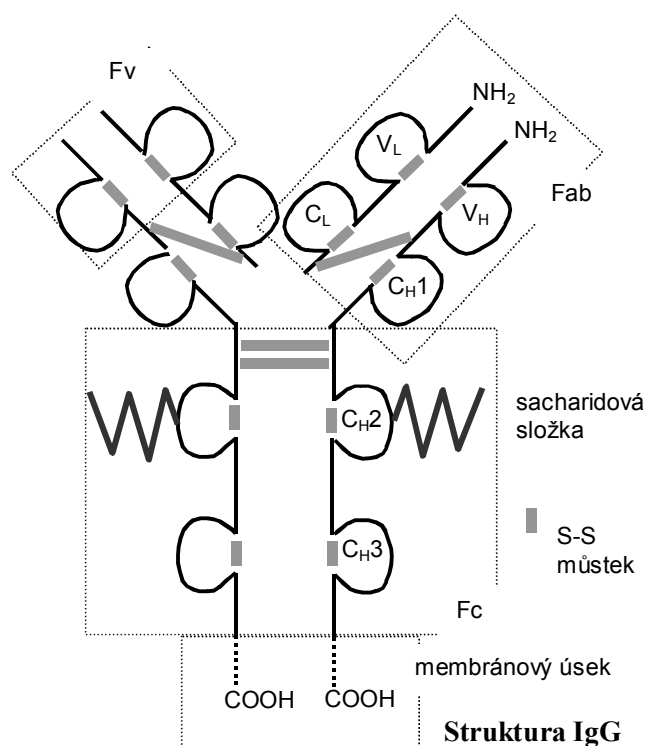
Asociace k_a ($\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Disociace k_d (s^{-1})	Tvar závislosti ^a	Způsoby určení konstant
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	velmi rychlá ≈ 0.01		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováhy $\Rightarrow K_A$ disociace příliš rychlá
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha $\Rightarrow K_A$ disociace $\Rightarrow k_d$
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	středně rychlá 10^{-5} až 0.001		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha nenastává disociace $\Rightarrow k_d$
středně rychlá 100 až $5 \cdot 10^6$	pomalá $< 10^{-5}$		asociace $\Rightarrow k_a$ rovnováha nenastává disociace příliš pomalá
rychlá $> 5 \cdot 10^5$	velmi rychlá ≈ 0.01		asociace příliš rychlá rovnováha $\Rightarrow K_A$ disociace příliš rychlá
rychlá $> 5 \cdot 10^5$	rychlá 0.001 až 0.01		asociace příliš rychlá rovnováha $\Rightarrow K_A$ disociace $\Rightarrow k_d$
rychlá $> 5 \cdot 10^5$	středně rychlá 10^{-5} až 0.001		asociace příliš rychlá disociace $\Rightarrow k_d$

^a tučná vodorovná linka označuje dobu kontaktu se vzorkem

Protilátky a imunosensory

Protilátky

Imunochemické afinitní biosensory používají jako biorekogniční element protilátky - bílkoviny schopné specificky rozpoznávat jiné molekuly. Pro bioanalytické účely³⁵ slouží nejčastěji protilátky typu imunoglobulinu G (IgG), molekulová hmotnost 160 kDa, jsou tvořeny 2 lehkými L po 25 kDa) a dvěma těžkými řetězci H (po 50 až 77 kDa).

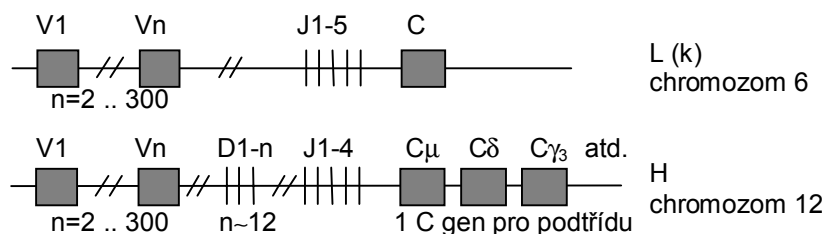


Řetězce jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky, takže vzniká typická struktura tvaru Y, kde část Fc umožňuje vazbu protilátky na membránu a dva Fab fragmenty obsahují na koncích místa vážící antigen. Řetězce sestávají z konstantních C a variabilních V úseků. Variabilní oblasti (V_H, V_L, dohromady Fv) jsou nezbytné pro vznik různých vazebných míst pro strukturně různorodé epitopy (rozpoznávaná část antigenu). Variabilní část sestává ze tří hypervariabilních úseků CDR (complementary determinant region).

Zbytek struktury sestává ze čtyř poměrně konstantních FR (framework) úseků. CDR vytváří vlastní vazebné místo pro antigen. Pomocí proteáz je možné molekulu protilátky rozštěpit na fragmenty; to může být výhodné pro některé aplikace.

³⁵ Killard A. J., Deasy, B., O'Kennedy R., Smyth M. R. *Trends Anal. Chem.* **14**, 257 (1995).

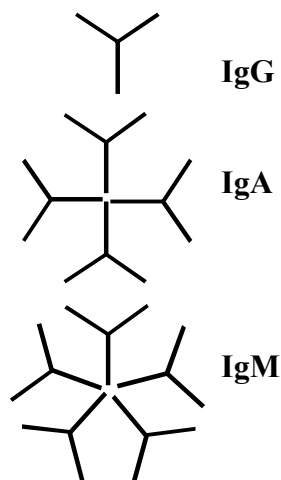
Protilátky jsou vytvářeny jako odezva na přítomnost imunogenu, což může být jakákoliv molekula o hmotnosti přes 1 kDa, kterou organismus rozpoznává jako cizorodou látku. Může vzniknout přes 1 milion různých molekul protilátek díky různým genetickým mechanismům: H a L řetězce jsou kódovány různými geny na různých chromozomech.



Existuje několik stovek genů pro variabilní oblast (na obrázku označeny písmenem V), jejichž náhodné spojení poskytuje přes 10^4 možností.

Skupiny genů protilátek (myš)

Geny J (joining) kódují několik posledních aminokyselin variabilní části, u těžkých řetězců navíc existují D (diversity) geny. Další modifikace vznikají somatickou mutací, vyvolanou opakovaným kontaktem s antigenem; tak vznikají protilátky s vyšší afinitou k antigenu. Protilátky produkují B-lymfocyty vznikající v kostní dřeni, odkud přechází do sleziny a lymfatických uzlin. Na povrchu nesou receptorovou formu protilátky, po navázání antigenu na tento receptor pak daná buňka proliferuje a začne produkovat protilátky o dané specifitě.



Existuje 5 tříd protilátek (IgA, D, E, G a M), z nich každá má odpovídající těžký řetězec α , δ , ϵ , γ a μ . U IgG jsou navíc 4 podtřídy s částečně odlišnými těžkými řetězci. Každá třída protilátek má určité strukturní a funkční vlastnosti.

Některé vlastnosti tříd protilátek (myš)

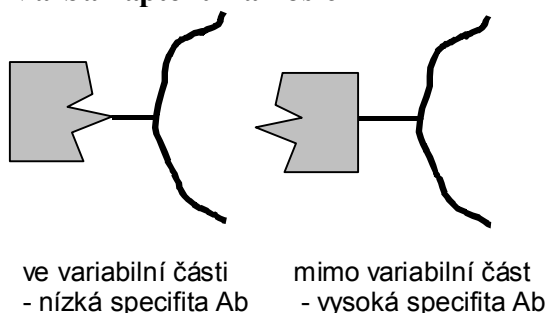
Třída	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
M (kDa)	170	180	190	160	900
H řetězec	α	δ	ϵ	γ	μ
Sacharid (%)	7-11	12-15	12	2-3	9-12

IgG je zdaleka nejrozšířenější v séru, kde se vyskytuje v monomerní formě (L_2H_2). Váže se na pronikající bakterie a viry a aktivuje jejich lyzi za účasti komplementu. Přes Fc část se může vázat na makrofágy. IgM se objevuje jako první odezva na přítomnost antigenu, obvykle má malou afinitu. Díky množství vazebných míst může vyvolávat aglutinaci. IgD se vyskytuje zřídka, funguje jako buněčný receptor pro antigen. IgA je převážně v sekretech (sliny, slzy, trávicí šťávy). Může přecházet ze séra do žluči. IgE vystupuje v souvislosti s alergickými reakcemi. V bioanalytických aplikacích se používají převážně IgG.

Produkce protilátek

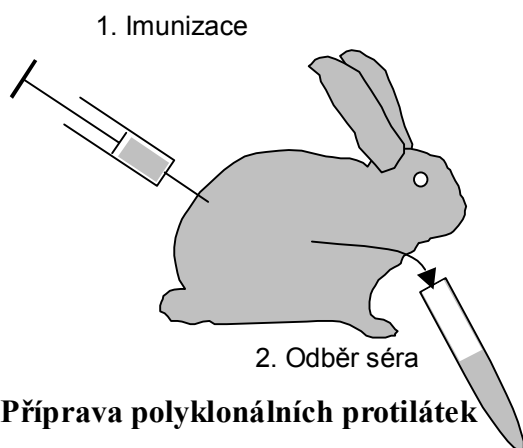
Imunitní odezvu jako obrannou reakci organismu vyvolává obvykle přítomnost cizorodé látky – **imunogenu**. Makromolekulární látky – **antigeny** (molekulová hmotnost přes 1 kDa) jsou schopné iniciovat tvorbu protilátek přímo po vpravení (injekčně) do zvoleného organismu. Nízkomolekulární látky – **hapteny** – je potřeba nejprve spojit s vhodným makromolekulárním nosičem (nejčastěji se používá hovězí albumin, ovalbumin, hemocyanin nebo thyroglobulin), teprve takový konjugát je schopen vyvolat imunitní odpověď.

Vazba haptenu na nosič



Vzniklé protilátky jsou schopné rozpoznávat i volný hapten. Při přípravě imunogenu je na molekule haptenu potřeba volit takové reaktivní skupiny, které netvoří přímo místo, které má být protilátkou rozpoznáváno, protože by se snížila specifita vzniklých protilátek.

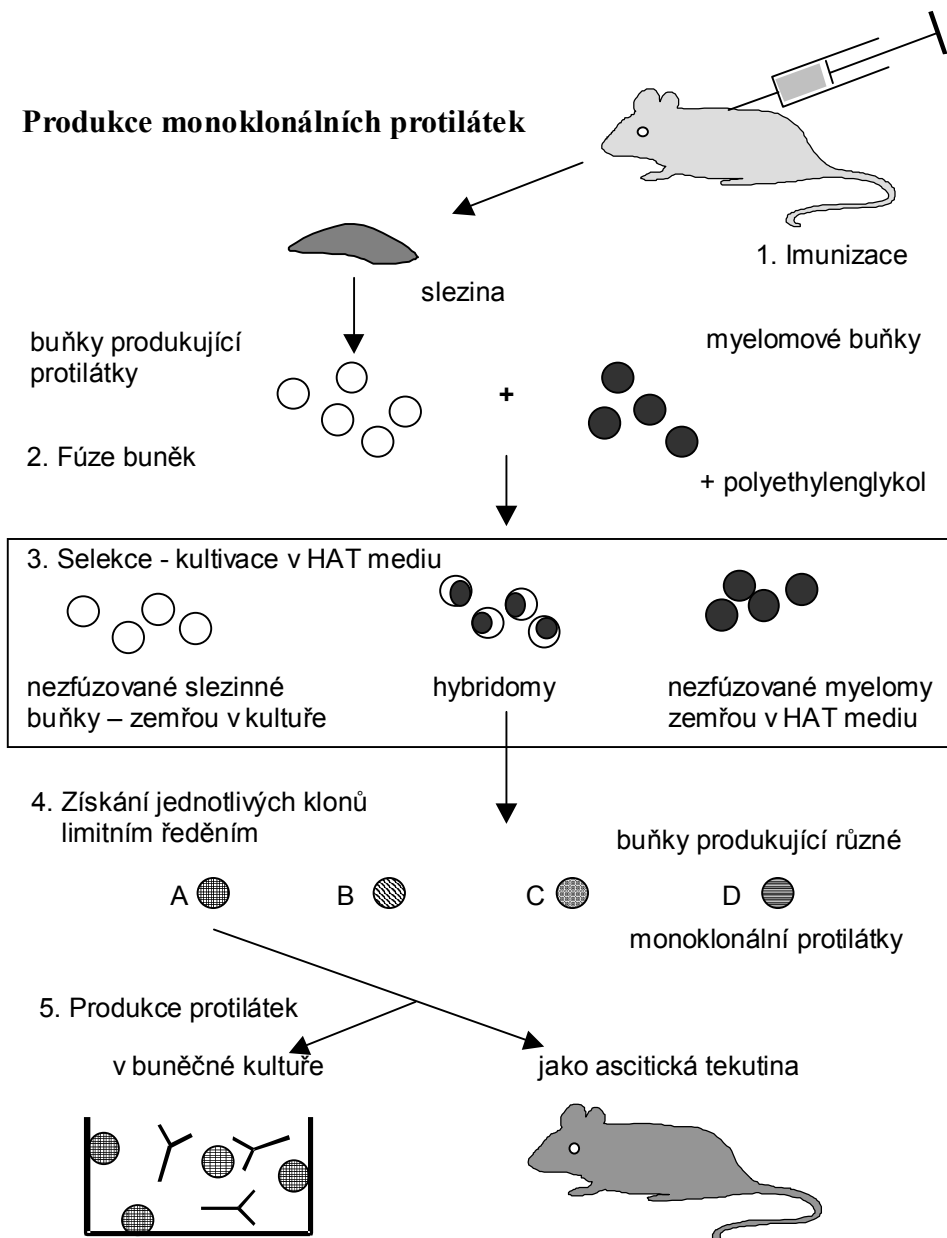
Klasická příprava **polyklonálních** protilátek (pAb) využívá imunizaci experimentálních zvířat (králík, myš, ovce, koza, kůň) vhodně upraveným analytem. Po několikrát opakované imunizaci a kontrole na přítomnost protilátek se nakonec provede odběr krve.



Získané sérum se uchovává zmražené, protože se používá obvykle velmi zředěné (1000x a více), neprovádí se purifikace protilátek. Z chemického hlediska obsahuje polyklonální protilátka řadu imunoglobulinů typu G, které se navzájem liší afinitou a rozpoznávají různé části vázané molekuly. Tento postup začíná být kritizován ze strany organizací na ochranu zvířat, proto je velmi přísně sledován a evidován.

Často je výhodnější použít homogenní protilátku o přesně definovaných vlastnostech - **monoklonální** protilátku; k přípravě slouží hybridomová technologie³⁶. Tak je možné produkovat homogenní protilátky o vysoké specifitě ve velkém množství. Používá se slezina obsahující žádané B lymfocyty z imunizované myši. Tyto lymfocyty se fúzí s rakovinnými

buňkami v přítomnosti PEG. Získané hybridomové buňky se pak selektivní kultivací zbaví nezfúzovaných buněk (HAT medium – hypoxanthin, aminopterin a thymidin). Poté se hybridomová kultura naředí a umístí v mikrotitračních destičkách, po 2 týdnech růstu se pak na jednotlivých jamkách hledají vzniklé protilátky pomocí ELISA. Následuje další ředění až na hranici 1 buňka na jamku, hledají se vzniklé protilátky, a celý proces se znovu opakuje. Tak se nakonec získá jednotná buněčná kultura produkující monoklonální protilátku (mAb).



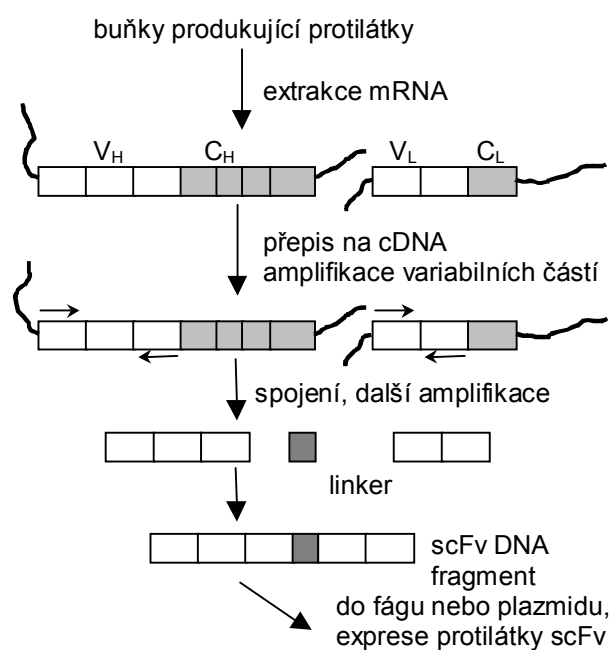
Produkce je možná po aplikaci do experimentálního zvířete, dosahovaná koncentrace mAb je 5 až 15 mg/ml, kultivace je možná i bioreaktorech, koncentrace mAb je 5 až 50 µg/l. Purifikace protilátek se provádí buď pouze srážením síranem amonným, nebo lépe metodami

³⁶ Kohler G., Milstein C.. *Nature* **256**, 495 (1975).

ionexové (DEAE-) nebo afinitní chromatografie (navázaný analyt, nebo Protein A či G, ty váží IgG v Fc oblasti).

Rekombinantní protilátky

Výše popsaná technika není jednoduše schůdná pro přípravu lidských monoklonálních protilátek, potřebných pro terapeutické účely. Proto se hledaly alternativní molekulárně genetické postupy. Technika přípravy **rekombinantních** protilátek³⁷ (rAb) využívá extrakci úseků genů kódujících variabilní úseky protilátek, jejich úpravu a konečně expresi ve vhodných hostitelských buňkách (E. coli, kvasinky, houby, rostlinné buňky, buňky hmyzu). Lze tak produkovat různé fragmenty protilátek jako Fv, Fab, V_H, V_H+V_L a scFv (single chain variable fragment).



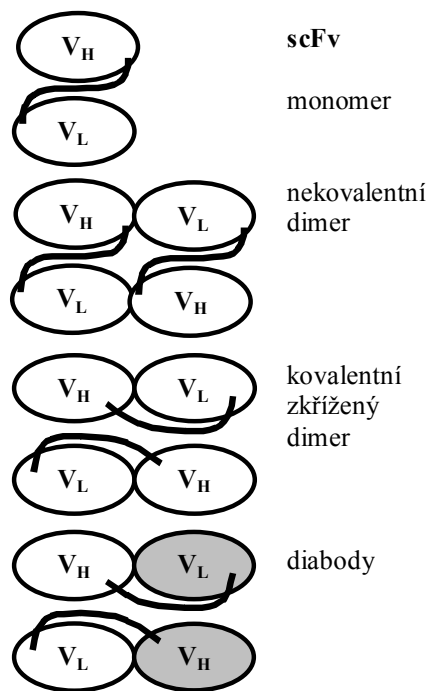
Příprava rekombinantní protilátky

Nejprve se z buněk produkujících protilátku izoluje mRNA, která slouží jako šablona pro syntézu jednořetězcové cDNA, vzniklá směs se pak slouží jako výchozí substrát pro zmnožení (amplifikaci) specifických protilátkových genů technikou PCR (polymerase chain reaction). Potřebné primery - oligonukleotidy komplementární k DNA z oblasti konců variabilní části genů protilátky – byly připraveny na základě znalosti relativně stále struktury FR oblastí. Geny pro V_H a V_L řetězce jsou pak spojeny krátkou nukleotidovou sekvencí.

Tak vznikne spojovací úsek aminokyselin (linker), obvykle je tvořen sekvencí (Gly₄Ser)₁₋₅. Takto získaná DNA kódující fragment protilátky se vpraví pomocí plazmidu nebo fágu do hostitelských buněk a rAb se produkují kultivací ve fermentoru. Komerčně jsou dostupné kity pro celý výše popsaný postup. Rekombinantní protilátky mají oproti monoklonálním celou řadu **výhod**. Produkce může být teoreticky zkrácena na dobu několika týdnů (několik měsíců pro mAb). Protože molekula rAb je podstatně menší než IgG, lze dosáhnout při imobilizaci větší plošné hustoty, rAb může interagovat s epitopy nepřístupnými velké mAb, malá

³⁷ Winter G., Milstein C. *Nature* **349**, 293 (1991).

molekula má navíc méně míst, která mohou nespecificky vázat jiné molekuly (falešně pozitivní výsledky). Zlepšená je také odolnost vůči proteázám. Genetická konstrukce protilátky přináší možnost připravovat konjugáty - chimérické bílkoviny, tvořené jednak fragmentem protilátky, nesoucím vazebné místo, jednak nějaký jiný funkční protein, např. enzym jako značku.



Rekombinantní protilátky

Podobně se dá včlenit část usnadňující imobilizaci, např. Protein A, nebo oligohistidinový úsek (tag), který slouží k zachycování protilátek na základě chelátových komplexů s kovy; využitelné je to k purifikaci nebo k imobilizaci. Také je možné spojovat dva různé fragmenty pro Fv úseky, a tak získat bifunkční protilátkové dimery (diabodies). Protože nukleotidová sekvence DNA kódující scFv se dá snadno určit, přímo se nabízí možnost plánovitě měnit strukturu a zlepšovat vazebné parametry protilátek na základě náhodných nebo cílených mutačních zásahů. Znalost struktury otevírá možnosti matematického modelování stavby vazebného místa protilátky, a tak určit důležité aminokyseliny a případně je změnit.

Rekombinantní technologie také otevírá možnost produkovat protilátky bez potřeby imunizace laboratorních zvířat. Tento klasický postup je v současnosti stále více cílem útoků ze strany ochránců práv zvířat. Znalost struktury DNA protilátek umožňuje připravit **knihovny DNA** pomocí náhodné mutace, a z knihovny pak kombinatorickými postupy hledat sekvence vhodné pro vazbu analyzovaných látek. První výsledky v této oblasti dávají naději do budoucna.

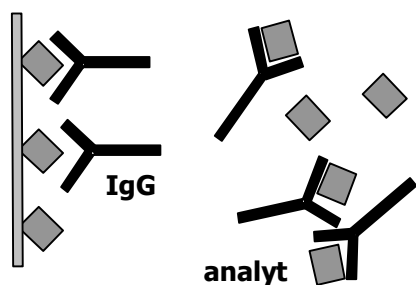
Imunoanalytické metody

Tyto postupy získávají postupem času stále větší popularitu. Od čistě klinického použití se dnes rozšiřují do mnoha dalších oblastí, kde je vyžadováno specifické, rychlé a levné stanovení určité látky v přítomnosti dalších komponent. Další část této kapitoly bude zaměřena především na nepřímé imunochemické metody. V této souvislosti "**nepřímé**" znamená použití vhodného značkového systému, který umožňuje vyhodnotit výsledek

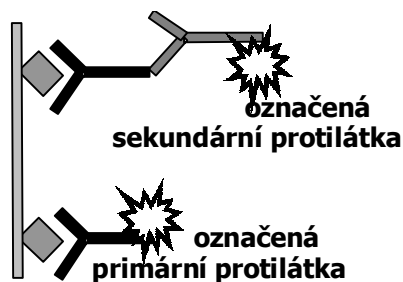
imunochemického (obecně jakéhokoliv afinitního) stanovení. Průběh těchto stanovení je nejčastěji heterogenní, vznikající imunokomplex včetně značky je zachycen na vhodném povrchu (mikrotitrační destička, citlivá oblast převodníku), poté se odstraní reakční směs, povrch se promyje a změří se množství zachycené značky. Použitelné značky jsou radioaktivita (v oblasti biosensorů se nepoužívá), fluorescenční nebo luminiscenční komponenta, nejčastěji pak vhodný enzym. Výchozí metodou při vývoji nepřímého imunosensory je obvykle nějaká již existující ELISA metoda (enzyme linked immunosorbent assay). Existuje řada různých pracovních formátů, avšak nejčastější jsou kompetitivní a sendvičové stanovení.

Kompetitivní stanovení

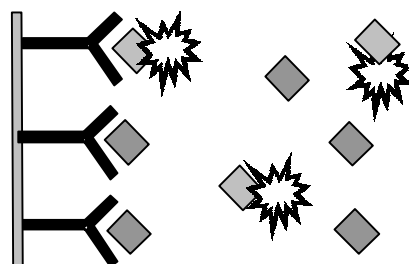
Kompetitivní formát je univerzální metoda, pro nízkomolekulární analyty je pak jedinou možnou volbou. Na citlivý povrch je imobilizován analyt nebo jeho analog. Při vlastním stanovení se vzorek smíchá s protilátkou a nechá se jistou dobu inkubovat.



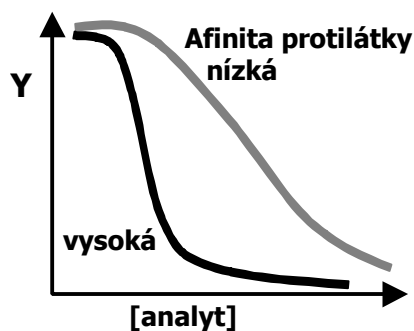
Přitom by se mělo dosáhnout rovnovážného stavu (nebo alespoň přiblížení k rovnováze). Tato směs se přidá k senzoru a zbylé volné protilátky se váží na modifikovaný povrch. Volný a vázaný analyt soutěží o limitované množství protilátky. Na konci imunoreakce se povrch opláchnou



Zachycená protilátka (primární) se detekuje přidávkou sekundární vhodně označené protilátky. Sekundární protilátka má specifitu k té části primární protilátky, která neváže analyt (např. Fc část). Alternativně je možné používat vhodně označenou již primární protilátku, pak odpadá jeden reakční krok.



Formát kompetitivního stanovení je samozřejmě možné obrátit a na povrch senzoru navázat protilátku. Pak se provádí inkubace se vzorkem obsahujícím analyt a navíc se přidá analyt (nebo jeho analog) spojený s vhodnou značkou.



Konjugátu značky a jednoho z vazebných partnerů se často říká **tracer**. Kalibrační křivka - závislost signálu Y na koncentraci analytu - má charakteristický sigmoidní tvar. Strmost křivky je tím větší, čím vyšší je afinita použité protilátky k danému analytu.

Maximální signál (Y_{max} , největší množství zachycené značky) dostaneme v nepřítomnosti volného analytu; naopak při nadbytku volného analytu se žádná značka nezachytí a naměří se minimální (ideálně nulový) signál Y_0 . Alternativně je možné Y_0 změřit, pokud při imunochemické reakci nepřidáme tracer. Místo absolutního signálu je často výhodné použít relativní vyjádření: $B_{rel} = (Y - Y_0) / (Y_{max} - Y_0)$

Tak lze kompenzovat nespecifickou vazbu traceru, nebo zbytkový signál naměřený i v nepřítomnosti značky (často spontánní reakce substrátů i v nepřítomnosti značkového enzymu). Co se týká značení biomolekul, existuje široká škála různých metod přípravy konjugátů bílkovin nebo nukleových kyselin s enzymy nebo fluorescenčními značkami³⁸.

Limit detekce analytu je často definován pomocí určitého minimálního poklesu signálu proti maximu, např. o 10 nebo 20% (tomu odpovídá velikost B_{rel} 0.9 nebo 0.8). Dalším charakteristickým parametrem je koncentrace analytu x_{50} , která způsobí pokles signálu na polovinu maximální hodnoty ($B_{rel} = 0.5$). Tento parametr je přímo úměrný afinitě použité protilátky (čím menší afinita protilátky, tím menší x_{50}).

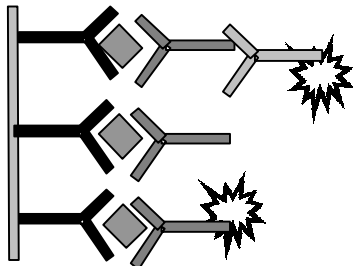
$$Y = \frac{A - D}{1 + (x / x_{50})^b} + D$$
 Průběh kalibrační závislosti se dá aproximovat různým způsobem, např. sigmoidní funkcí, A je maximální, D zbytkový signál.

Křížová reaktivita (cross-reactivity) analytu A a jemu podobné látky B se dá vyjádřit jako relativní poměr x_{A50}/x_{B50} , může se uvádět také v procentech.

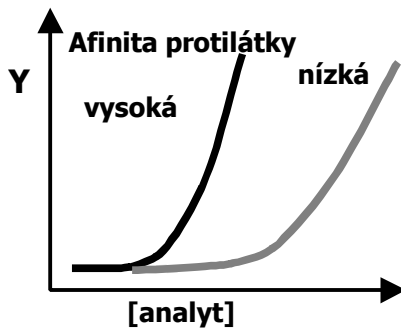
Sendvičové stanovení

je vhodné pro ty rozměrnější analyty, které na molekule nesou několik vazebných míst pro protilátku. Na citlivý povrch sensoru je navázána protilátka s afinitou k analytu. Při inkubaci se vzorkem tato protilátka váže přítomný analyt.

³⁸ Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996.



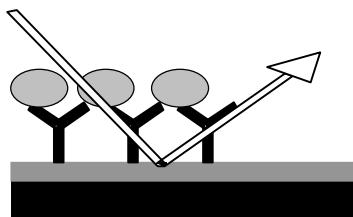
Poté se povrch opláchne a přidá se další protilátka, která rozpoznává jiné vazebné místo na povrchu analytu. Může být vhodně označená, nebo se detekce provede pomocí třetí označené protilátky. Množství navázané značky (měřeného signálu) je tak úměrné koncentraci analytu ve vzorku.



Průběh kalibračních křivek při sendvičovém stanovení v závislosti na afinitě protilátek. Afinita hraje menší roli než při kompetitivním stanovení.

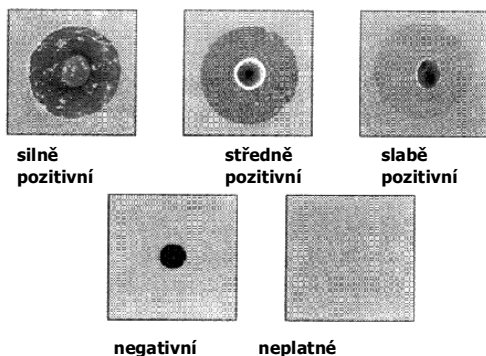
Nepřímé imunosensory

Klasický ELISA formát imunochemických stanovení je zejména v klinických laboratořích běžnou analytickou technikou. Vývoj nerůznějších typů imunosensory má především za cíl zjednodušit práce spojené s imunochemickou analýzou (např. ELISA vyžaduje přesné dávkování vzorků a reagentů, inkubace, separační a promývací kroky), dospět k přenosným systémům a zrychlit průběh stanovení. Předstupněm imunosensory mohou být nerůznější páskové varianty imunochemického stanovení s vizuálním vyhodnocováním.



zachycený analyt
navázaná protilátka
optická vrstva
nosný křemíkový čip

Např. změna tloušťky vrstvy způsobená specifickým navázáním analytu se při vyhodnocování projeví jako změna pozorované barvy.

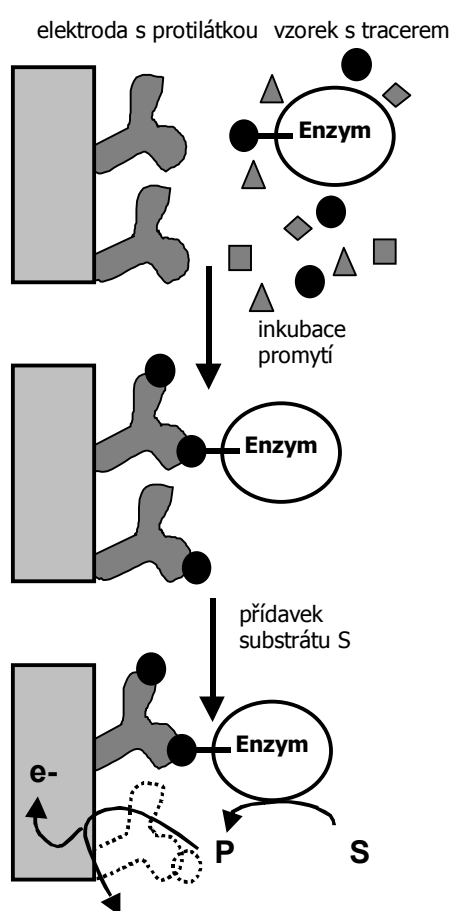


Příklad vyhodnocení semikvantitativního imunostanovení na křemíkovém čipu [dle International Laboratory]. Barva a tvar pozorovaných skvrn umožňují kvalitativní vyhodnocení přítomnosti analytu ve vzorku. Výhodou je snadnost provedení (nakápnutí vzorku) a velmi rychlá odezva (několik minut).

U vlastních imunosenzorů pak citlivý povrch funguje nejen jako nosič imobilizovaného vazebného partnera, ale přímo slouží pro generování a měření signálu.

Elektrochemické imunosensory³⁹

Tento typ spojuje jednoduché, levné a velmi citlivé elektrochemické převodníky s vysokou specifitou protilátek. Jako pracovní povrch slouží přímo pracovní elektroda, ale je možné použít také výměnné membrány s imobilizovanou protilátkou, nebo pracovat s předřazeným imunoreaktorem. Jako značka slouží především enzymy, jejichž aktivitu lze měřit elektrochemicky, méně častou alternativou jsou různé redoxaktivní látky nebo cheláty kovů, které se po uvolnění z komplexu stanou voltametriky.



Obrázek ukazuje typické heterogenní stanovení; elektroda modifikovaná protilátkou váže tracer při kompetitivním stanovení, zachycená enzymová aktivita se pak změní po přidavku substrátu vhodnou elektrochemickou metodou jako změna potenciálu elektrody nebo procházejícího proudu.

Amperometrické stanovení je vhodné ve spojení s následujícími značkovacími *enzymy* (v závorkách jsou použitelné substráty):

peroxidáza (H_2O_2 + jodid, ferrocen nebo hydrochinon)

lakáza (O_2 + hydrochinon)

kataláza (H_2O_2)

glukóza oxidáza (O_2 nebo ferrocen + glukóza)

alkalická fosfatáza (p-aminofenylfosfát)

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

acetylcholinesteráza (acetylthiocholin)

Potenciometricky je zejména stanovována:

ureáza (močovina)

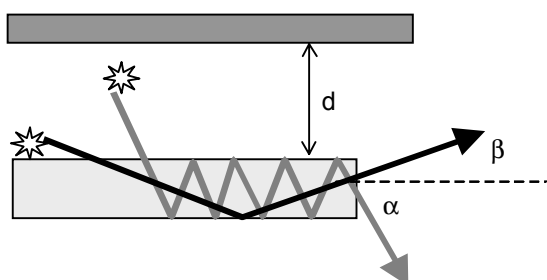
Optické nepřímé imunosensory

Existuje řada optických imunosenzorů, nejčastěji se uplatňují optická vlákna nebo planární světlovody, pro které je uveden následující příklad komerčního systému FCFD.

³⁹ Skládal P., *Electroanalysis* 9, 737(1997).

FCFD (fluorescence capillary fill device)

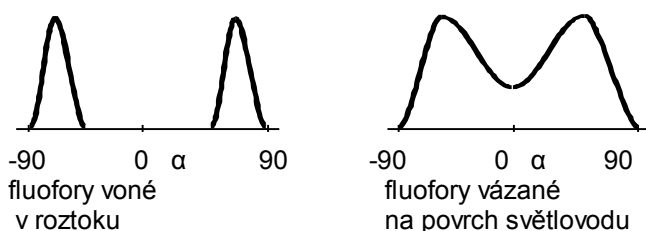
je afinitní (imuno)biosensor, který využívá k detekci fluorescentní značku (fluorofor), která emituje světlo do planárního světlovodu, nesoucího imobilizovaný bioligand.



Odlišení volného a vázaného fluoroforu

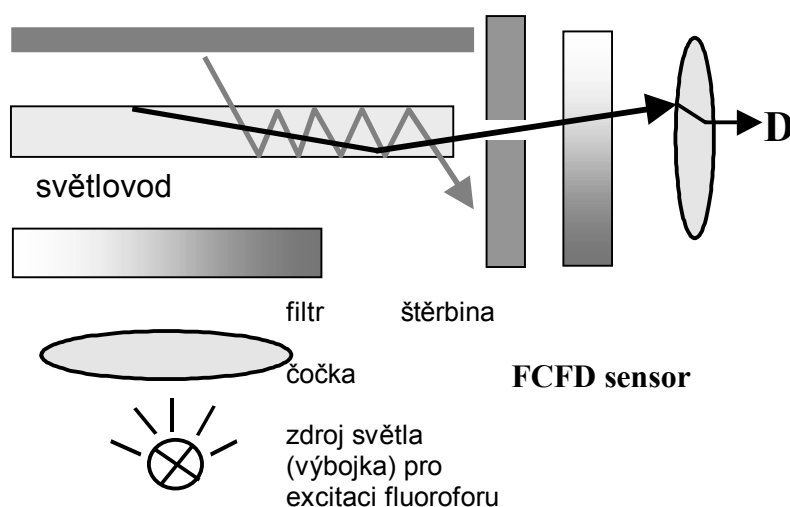
Základem jsou dvě paralelní skleněné destičky vytvářející pracovní prostor o tloušťce pouze 0.1 mm ("kapilární" rozměr), což umožňuje samovolné naplnění definovaným objemem vzorku. Po afinitní interakci je část fluoroforu volně v roztoku a část v komplexu s bioligandem na povrchu světlovodu.

Emitované světlo (fluorescence) z roztoku vstupuje do světlovodu jen pod omezenými úhly (větší než kritické), světlo z vázaných fluoroforů může vstupovat i pod menšími úhly (fluorofor je vázán v penetrační oblasti exponenciální vlny). Po výstupu světla z konce světlovodu pak lze podle výstupního úhlu odlišit fluorescenci z volného roztoku a z povrchové oblasti, tím lze kvantitativně určit podíl vázaného fluoroforu bez potřeby separačního kroku -**homogenní stanovení**.



Úhly paprsků na výstupu ze světlovodu

Výstupní úhly světla emitovaného vázaným a volným fluoroforem, se liší, takže lze rozlišit vázanou a volnou formu fluoroforu a vyhodnotit průběh homogenního stanovení.



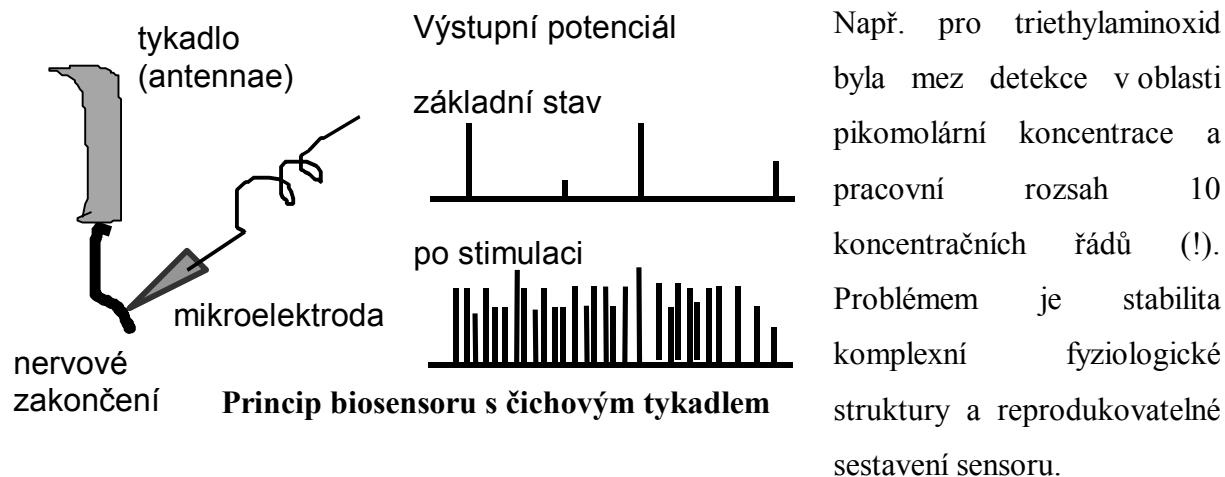
Jako zdroj světla slouží výbojka fotoblesku, omezení výstupních úhlů se provede pomocí štěrbin, další součásti jsou filtry, čočky a detektor. Zařízení je jednoduché, levné, snadná masová výroba, na jedno použití.

Malé vzdálenosti v systému senzoru zkracují dobu odezvy, kterou pak primárně určuje kinetika vazebné interakce, ne transportní pochody (5 min kompetitivní, 15 min sendvičové stanovení). Není třeba odměřovat vzorek (přímo se dá použít krev, sérum nebo moč), nejsou velké nároky na manipulaci a odbornost obsluhujícího personálu.

Receptory a lipidové vrstvy

Receptorové biosensory

Tato oblast chce využít vysoce citlivé čichové systémy živočichů pro konstrukci umělého nosu (artificial nose). První pokusy se prováděly s čichovými tykadly drobných mořských krabů (crayfish, *Callinectes sapidus*). Potenciál výstupního nervu se měřil pomocí mikroelektrody a sledovala se frekvence pulsů v závislosti na přítomnosti stimulačních látek. Výstupní frekvence pulsů potenciálu narůstala v přítomnosti stimulačních fyziologických látek (puriny, aminokyseliny, peptidy). Mimo to byl sledován signál na farmaceutické preparáty (léčiva, drogy) a toxické látky.



Na druhou stranu výhodou je přirozené spojení biorekogniční funkce a funkce převodníku poskytujícího signál u tohoto chemosenzitivního orgánu. Skupinová odezva může být velmi výhodná při detekci toxických látek. Praktické aplikaci se blíží podobný systém obsahující tykadla mandelinky (nebo dokonce celého brouka), která dávají odezvu v případě mechanického poškození rostlin. Je tak možná indikace přítomnosti škůdců například ve sklenících.

Řada pokusů se provádí také s izolovanými membránovými receptory. Ty jsou membránovými komplexy tvořenými obvykle kombinací rozpoznávací vazebné bílkoviny (na

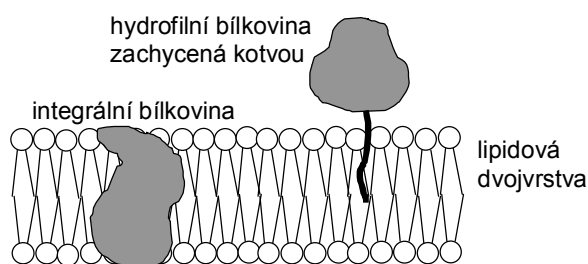
vnější straně membrány) a signál generující části; buď iontový kanálek (integrální transmembránová bílkovina) nebo enzym spouštěný po vazbě (generuje tvorbu sekundárního přenašeče). Problémem je izolace komplexních membránových struktur a jejich stabilní imobilizace v umělých lipidických vrstvách, někdy se proto používají raději celé buňky. Receptory se spojují buď s ISFETy nebo s elektrodami uzpůsobenými pro sledování impedance, která se mění po otevření iontového kanálku.

Zejména se studují dva receptory. **Nikotinický acetylcholinový receptor (nAChR)** se získává z elektrického orgánu úhoře (electric eel), jeho aminokyselinová sekvence odpovídá podobnému receptoru ze svalu savců. Je tvořen 5 podjednotkami (5 kDa, 4 různé typy, dvě α - jsou stejné) uspořádanými v kruhu, jehož střed tvoří Na kanálek. Receptor má cylindrický tvar (8 x 14 nm), normálně je kanálek uzavřen. Po navázání molekuly acetylcholinu na α -podjednotku se na několik milisekund kanálek zvětší (průměr 0.7 nm), takže jím projde hydratovaný ion Na^+ .

GABA typ A receptor (γ -aminobutyric acid) se nachází v mozku, funguje jako chloridový kanálek. Váže kyselinu aminomáselnou a její agonisty. Některé látky (barbituráty, benzodiazepiny, ev. toxiny) prodlužují dobu otevření kanálku.

Lipidové vrstvy

Pro mnohé bílkoviny je přirozeným prostředím biomembrána, obsahující hydrofobní zbytky lipidových řetězců. Struktura biomembrány je založena na lipidové dvojvrstvě (BLM, bilayer lipid membrane). Přitom molekuly lipidů (fosfolipidy, glykolipidy, ...) jsou tvořeny z hydrofilní a hydrofobní části. Hydrofobní řetězce jsou navzájem v kontaktu ve vnitřní vrstvě membrány, naopak na povrchu jsou hydrofilní části obklopeny vodným prostředím.



Struktura biomembrány

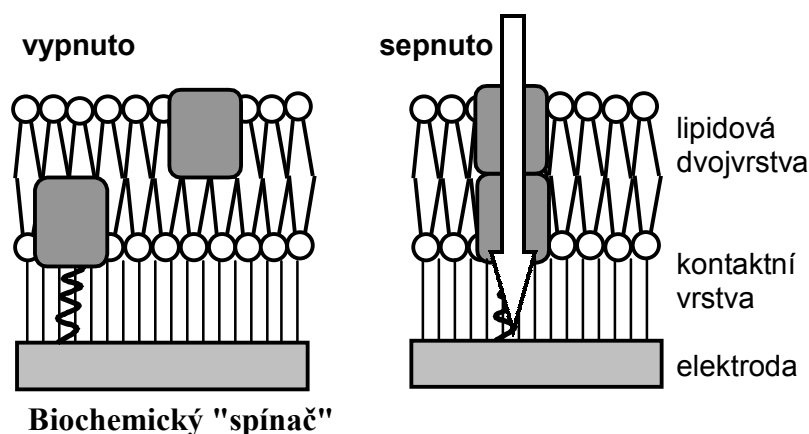
Membránové bílkoviny (receptory, transportní proteiny, iontové kanálky, enzymy, redoxní systémy) obsahují obvykle v molekule hydrofobní domény, které prochází skrze BLM, čímž se dosahuje přirozené imobilizace.

Hydrofilní biomolekuly lze na povrchu BLM přichytit pomocí krátké hydrofobní "kotvy", tento princip lze využít i pro jejich imobilizaci. V oblasti biosensorů hrály BLM dlouho méně významnou roli, což souviselo s jejich nízkou stabilitou (několik hodin za běžných podmínek). Poslední dobou se začínají uplatňovat mnohem více, protože se podařilo zlepšit

jejich mechanickou stabilitu přípravou na podpůrném povrchu (sBLM , supported BLM). Výhodou je reprodukovatelná příprava, vysoká orientovanost a definovaná tloušťka. Originální koncept biosensory na bázi lipidové dvojvrstvy byl vyvinut v Austrálii⁴⁰, funguje jako jistý druh převodníku pro sledování interakcí biomolekul.

Biochemický spínač

Povrch elektrody je pokryt kontaktní vrstvou tvořící rezervoár, na kterou je shora připojena lipidová dvojvrstva. Ta zaručuje, že elektroda je izolována vůči okolnímu prostředí a v systému prakticky neteče proud. V obou vrstvách lipidů tvořících dohromady dvojvrstvu se nachází podjednotky iontového kanálku - bílkoviny gramicidinu, které se mohou navzájem snadno oddělit. Spodní podjednotka je ukotvena k povrchu elektrody, horní se může volně pohybovat v rámci vnější lipidové vrstvy. Pokud jsou podjednotky navzájem oddělené, je struktura ve stavu "vypnuto" - vysoká impedance, teče zanedbatelně malý proud.



Když se ovšem dvě protilehlé podjednotky spojí, tak vytvoří funkční kanálek, který velice rychle propouští ionty - struktura přejde do stavu "zapnuto" a začne protékat proud.

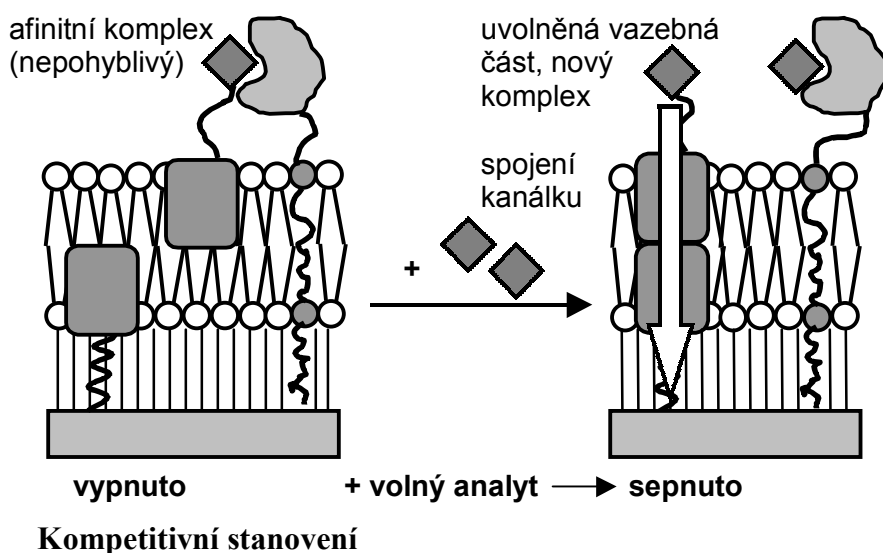
Tato struktura je velmi malá, v podstatě ji může tvořit jediný kanálek. Má také vysoký zesilovací činitel, protože otevřeným kanálkem může procházet až několik milionů iontů za sekundu.

Příklad afinitního stanovení

Tento spínací systém je použitelný jako převodník pro sledování a hodnocení afinitních interakcí. Afinitní vazebný partner se kovalentně naváže na povrch elektrody, takže je v rámci membrány nepohyblivý. Při kompetitivním stanovení je horní pohyblivá polovina kanálku spojena s druhým vazebným partnerem (navázaný analyt) a na povrchu membrány vznikne afinitní komplex. Tím samozřejmě nemůže dojít ke spojení podjednotek kanálku a systém je v rozpojeném stavu. V přítomnosti volného analytu ze vzorku dojde k rozrušení původního

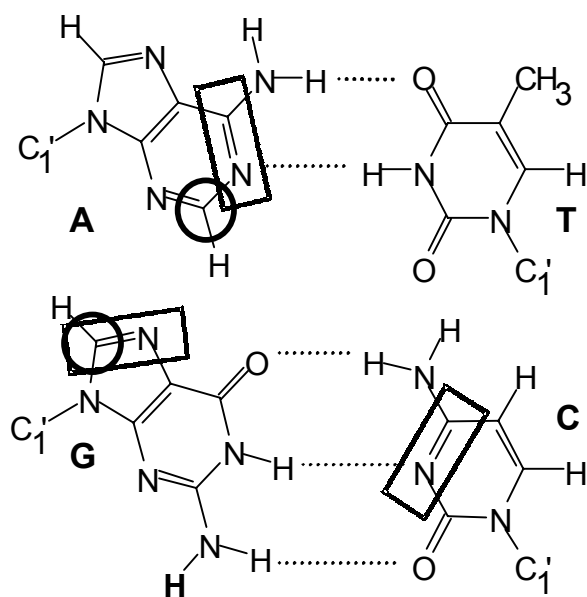
⁴⁰ <http://www.ambri.com.au/institute/technology/ics>

afinitního komplexu, horní podjednotka kanálku se uvolní a může vzniknout funkční kanálek. Jako měřený signál slouží impedance dané struktury, její velikost je úměrná množství vodivých kanálků a tím umožňuje průběžně sledovat množství volného analytu a vznik afinitního komplexu. Variabilita tohoto uspořádání samozřejmě umožňuje provádět také sendvičové a jiné druhy afinitních stanovení. Výhodou tohoto netradičního přístupu je možnost miniaturizace, jednoduchá konstrukce a univerzálnost.



Nukleové kyseliny

Biosensory pro detekci nukleových kyselin nebo s nukleovými kyselinami jako biorekogničním elementem byly poměrně dlouhou dobu mimo hlavní oblast zájmu a výrazněji se prosazují až od počátku 90. let. Stimulem rozvoje této oblasti biosensorů bylo hledání rychlejších sekvenačních metod potřebných při celosvětovém projektu sekvenace lidského genomu. V oblasti aplikací se objevila potřeba detekovat mutační poškození důležitých genů, které se projevuje metabolickými poruchami. Potřebnou citlivost biosensory pro detekci DNA získávají díky spojení s polymerázovou řetězovou reakcí.

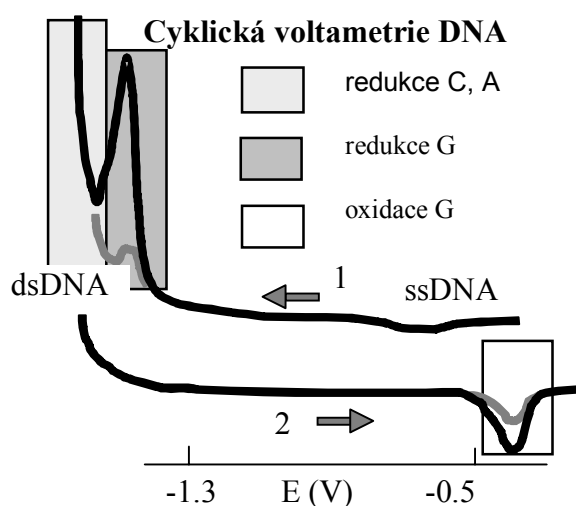


Párování bází DNA a jejich oxidační (kruh) a redukční (obdélník) místa

Bioanalytické stanovení nukleových kyselin má obvykle za úkol určit přítomnost určité sekvence nukleotidů ve vzorku DNA (kvalitativní informace), méně důležité je pak již množství hledané sekvence. Pro analýzu se využívá hybridizace vzorku s komplementární sekvencí – próbou, která je navázána na citlivém povrchu biosensoru jako biorekogniční prvek. Základem rozpoznávací afinitní reakce je známé párování bází (A=T, G≡C, viz obrázek). Průběh hybridizace případně také její kvantitativní rozsah pak musí vyhodnotit fyzikálně-chemický převodník.

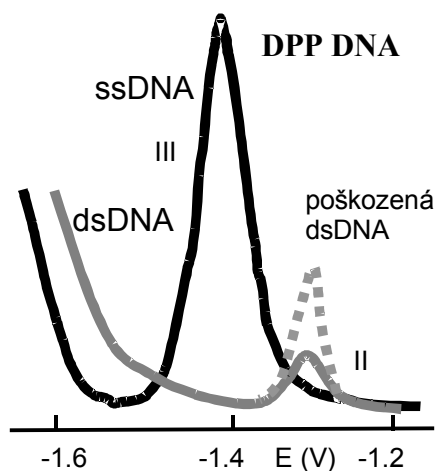
Elektrochemické biosensory pro DNA

Elektrochemická analýza struktury nukleových kyselin má dlouhou tradici⁴¹, v minulosti získané poznatky se dnes aktualizují v souvislosti s biosensory. Některá místa jednotlivých bází podléhající oxidaci nebo redukci byla vyznačena na předchozím obrázku. Pro činnost biosensoru je tedy nutné indikovat vznik dvojité šroubovice nukleové kyseliny v průběhu stanovení.



Na cyklických voltamogramech jednořetězcové a dvouřetězcové DNA jsou patrné změny velikosti proudových maxim, v podstatě elektrochemická odezva klesá pro dsDNA, kdy jsou báze párovány a tím pádem méně přístupné pro přenos elektronů. Elektrochemické přeměny nastávají u DNA adsorbované na povrch elektrody.

⁴¹ Paleček E. *Electroanalysis* **8**, 1(1996).

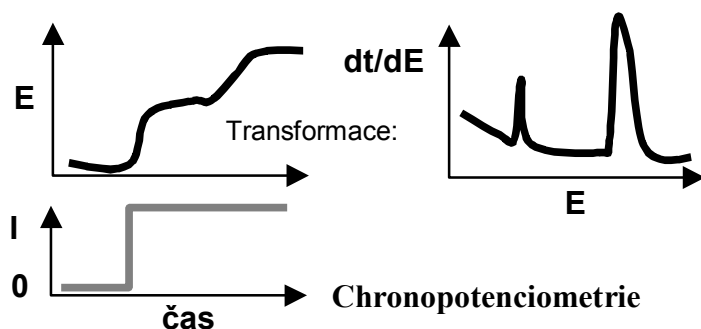


Při diferenciální pulzní polarografii (DPP) je signál jednořetězcové DNA (III) mnohonásobně vyšší než dvouřetězcové (II), jehož velikost ukazuje na změny stavu dsDNA. Po denaturaci dsDNA také narůstá oxidační proud guaninových zbytků (kolem 0.3 V). Další elektrochemickou metodou používanou pro studium přechodů DNA je AC polarografie, pozorované signály odrážejí adsorpci jednotlivých forem DNA na povrchu elektrody.

Pro použití v biosensorech je nejbližší technika adsorpční přenosové voltametrie (adsorptive transfer stripping voltammetry, AdTSV). Na povrch elektrody (rtuťová kapka, grafit) je ireverzibilně adsorbována nukleová kyselina z velmi malého objemu vzorku (několik μl), po opláchnutí a přenosu do nádoby s pufrům se proměří voltamogram. Pro přímé elektrochemické vyhodnocování průběhu hybridizace je nejvhodnější chronopotenciometrická metoda.

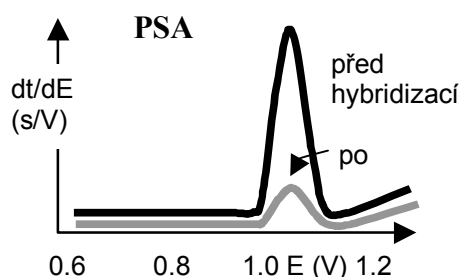
Chronopotenciometrie

Při chronopotenciometrickém měření se mezi pracovní a pomocnou elektrodu přivede konstantní proud a měří se časová změna potenciálu mezi pracovní a referenční elektrodou.

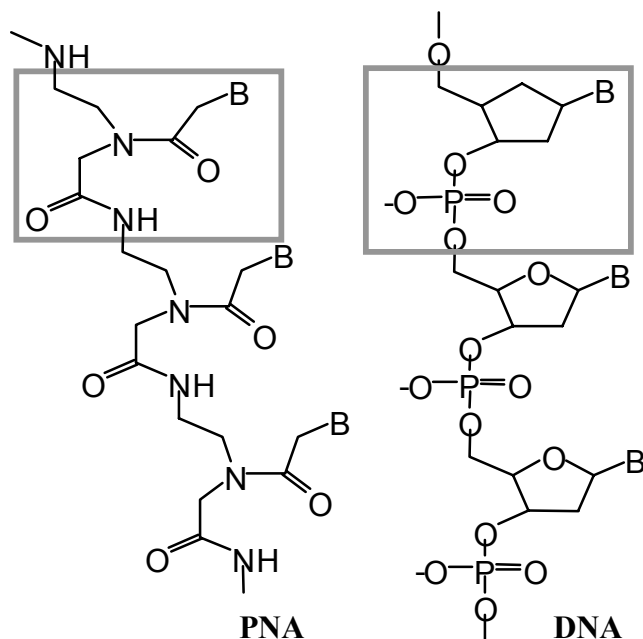


Odezva je dána koncentračními změnami látek v okolí elektrody v průběhu elektrolýzy. Pro měření se používá potenciostat v galvanostatickém modu.

Záznam potenciálu na čase se matematicky transformuje, výsledná závislost převrácené hodnoty derivace potenciálu dle času dt/dE se vynáší proti měřenému potenciálu, čímž se získá signál s dobře oddělenými charakteristickými maximy. Tato metodika byla úspěšně použita pro hybridizační biosensor na bázi grafitové elektrody. Principem je pokles elektrochemického signálu oxidace guaninu po vytvoření dvojité šroubovice DNA.



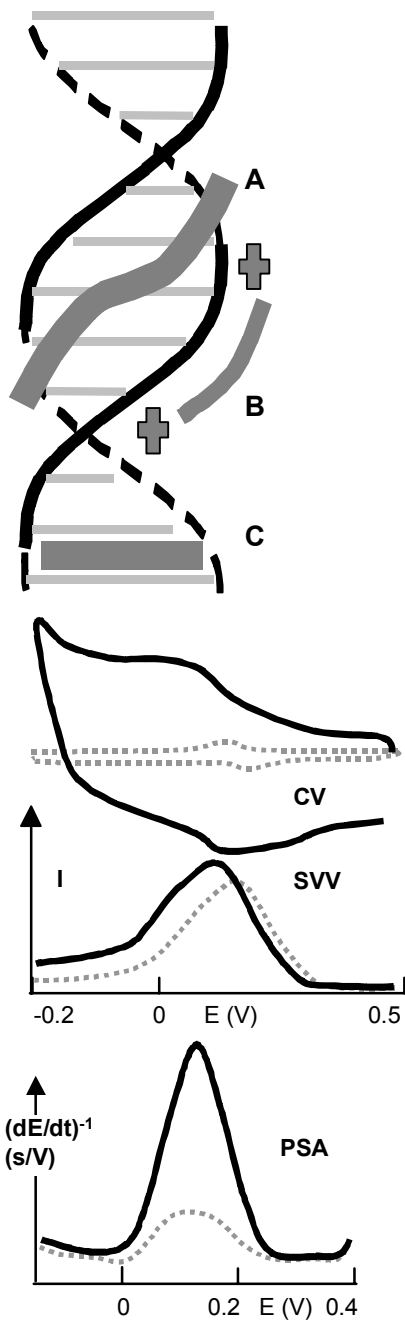
Na grafitovou elektrodu adsorpci imobilizuje próba, po promytí se v přítomnosti vzorku nechá proběhnout hybridizace, a nakonec se změří chronopotenciometrická křivka. Metoda se nazývá potenciometrická stripovací analýza (PSA). Z velikosti maxima oxidace guaninu lze přímo usuzovat na rozsah hybridizace.



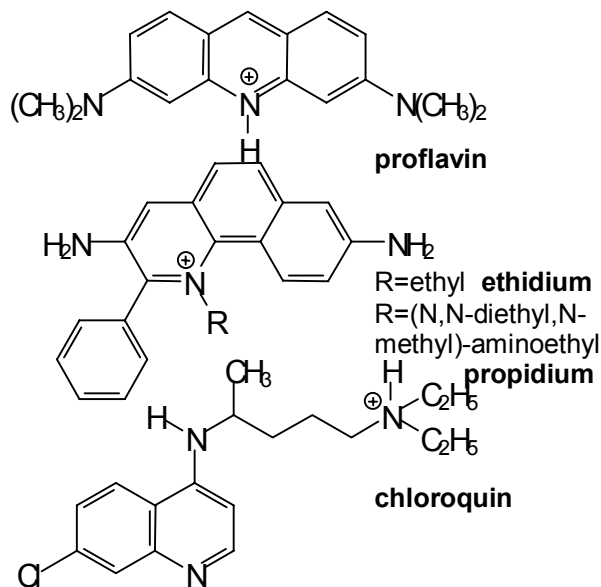
Jako biospecifická komponenta nemusí sloužit jen ssDNA, ale často se uplatňují také analoga nukleových kyselin, u kterých je cukr-fosfátový řetězec nahrazen peptidovou kostrou (PNA, peptide nucleic acid). Na rozdíl od DNA nenese PNA záporný náboj fosfátových skupin, takže hybridizace s normální ssDNA je usnadněna. Vzniklý duplex PNA-DNA je oproti DNA-DNA stabilnější, takže lze použít pro hybridizaci podmínky, které více omezí nespecifické interakce mezi ne zcela komplementárními úseky.

Indikátory hybridizace

Přímá elektrochemická detekce hybridizace je dosud méně citlivá než různé postupy využívající indikační látky. Ty se váží na dvojitou šroubovici DNA, čímž umožňují citlivou detekci průběhu hybridizace. Jako indikátory se využívají zejména **interkalátory** (váží se dovnitř dvojitě šroubovice mezi sousední páry bází - způsob C na obrázku); zástupci jsou ethidium, propidium, proflavin, chloroquin, doxorubicin. Další skupina látek se specificky váže **do malého žlábků** – $[\text{Co}(2,2'\text{-bipyridyl})_3]^{3+}$, netropsin (možnost A). Některé látky pak s dsDNA interagují **oběma způsoby** – $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, 4',6-diaminodifenylindol (DAPI). Povrchové interakce některých látek se záporně nabitou kostrou (typ B na obrázku) jsou poslední možností, která se prakticky nevyužívá.



Vyhodnocení hybridizace pomocí $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$



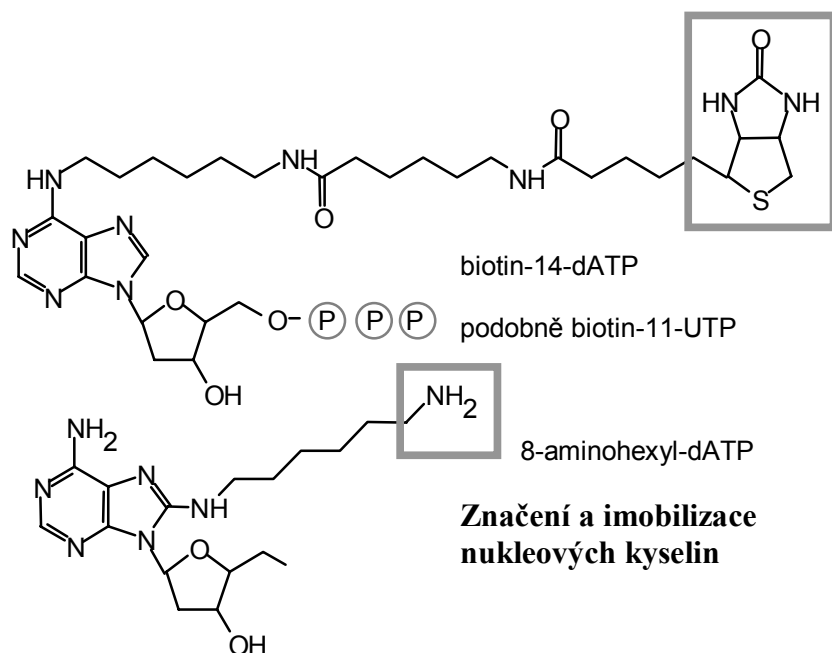
Měření začíná imobilizací próby na povrch uhlíkové elektrody adsorpcí, následuje hybridizace se vzorkem, vazba indikátoru a elektrochemické měření. Pro to je opět vhodná chronopotenciometrie, odečítání signálu při použití cyklické nebo square wave voltametrie je mnohem méně přesné (čárkované křivky značí odezvu bez hybridizace).

Mimo elektrochemických metod byly konstruovány také biosensory na bázi optických vláken, detekuje se fluorescence indikátorových molekul. Použitelné jsou samozřejmě všechny přímé afinitní sensory popsané v předcházejících kapitolách – piezoelektrické sensory, optické systémy jako SPR, integrované mřížkové sensory nebo interferometry.

Imobilizace a značení nukleových kyselin

Imobilizace DNA se obvykle provádí prostou adsorpcí na povrch uhlíku nebo celulosy, u které lze navíc zavést kovalentní spoje ozářením ultrafialovým světlem. Nukleové kyseliny je také možné zachytit uvnitř polymerů (celulosa, agar, polyakrylamid), aktivace náhodných skupin řetězce je možné dosáhnout činidly jako karbodiimid, bromkyan, kyanurchlorid,

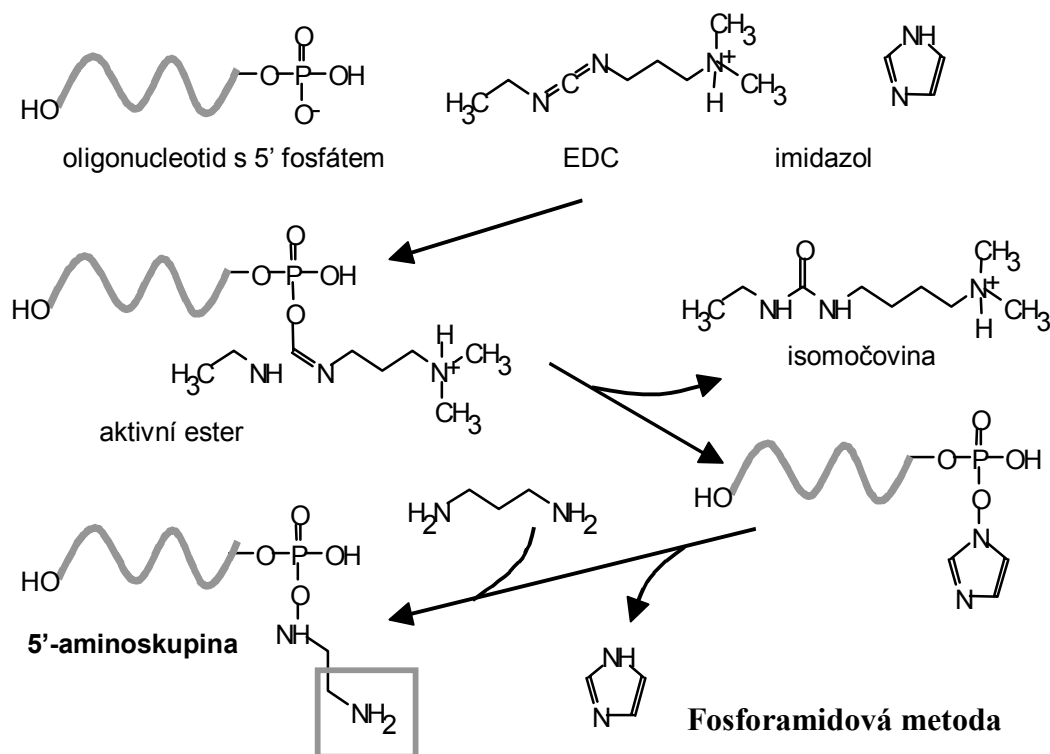
diazotací, u ribózy RNA lze oxidovat jodistanem. Dá se využít i komplexace s kyselinou boritou.



Pro orientované značení nebo imobilizaci nukleových kyselin je možné ke konci oligonukleotidového řetězce enzymově připojit speciální modifikované deriváty biotinu: biotin-14-dATP nebo biotin-11-dUTP (pomocí DNA polymerázy nebo terminální transferázy).

Volná aminoskupina se získá připojením 8-aminohexyl-dATP pomocí terminální transferázy.

Fosforamidová metoda aktivace fosfátového konce je další možností. Koncová fosfосkupina se pomocí karbodiimidu převede na reaktivní imidazolový derivát, který je pak možné substitučně vyměnit za aminoskupinu.

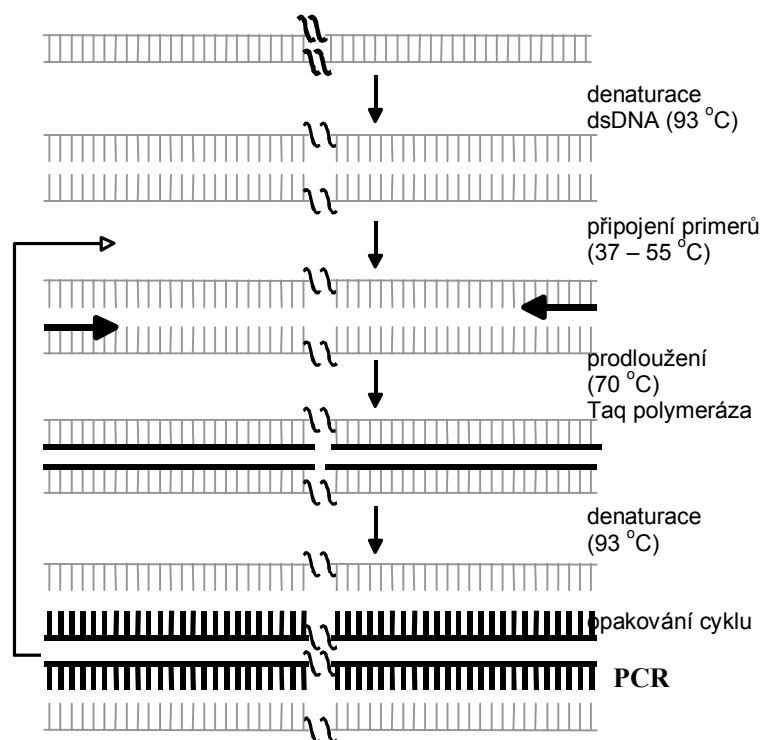


Aplikace biosensorů pro detekci DNA⁴²

- * **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*

PCR

Při stanovení nukleových kyselin častým problémem velmi malé množství hledané sekvence ve vzorku. Před vlastním měřením s biosensorem se zvýší obsah nukleové kyseliny nesoucí hledanou sekvenci metodou polymerázové řetězové reakce (PCR).



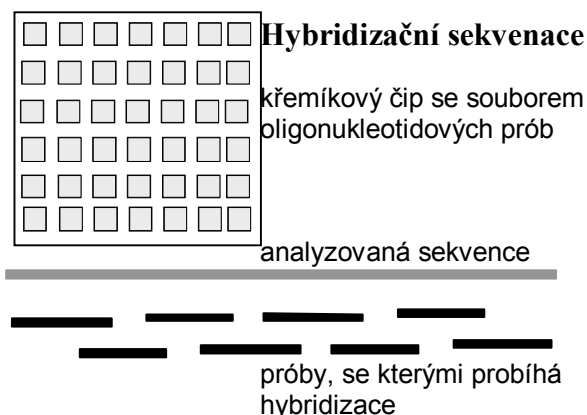
Za vysoké teploty dochází k oddělení obou vláken dsDNA. Poté se k jednovláknovým úsekům připojí krátké oligonukleotidové řetězce – primery, které pak slouží jako startovací úseky pro syntézu nového vlákna pomocí termostabilní Taq polymerázy. Sekvence primerů určuje, jaký úsek DNA bude při PCR kopírován.

⁴² Mikkelsen S. *Electroanalysis* **8**, 15 (1996).

V každém cyklu se tedy množství vybraného úseku DNA zdvojnásobí. Tak je možné mnohonásobně zvýšit původní množství určité sekvence DNA. Oproti klasickému postupu prováděnému v mikrozkmavkách nebo na mikrotitračních destičkách se vyvíjí miniaturizované systémy umožňující provádět PCR na povrchu křemíkového čipu.

Hybridizační sekvenace

Projekt sekvenace lidského genomu klade značné požadavky na rychlost sekvenování nukleových kyselin, a také zde se poslední dobou začínají uplatňovat biosensorové technologie. Klasická metoda sekvenování DNA využívá značení a postupné prodlužování řetězce. Vzorek se rozdělí do čtyř zkumavek, v každé z nich je jeden z nukleotidů značený (obvykle radioaktivně, nověji fluorescenčně). Při prodloužení řetězce se vždy na konec umístí značená báze a další prodlužování se zastaví, takže se získá směs označených fragmentů, jejichž délka odpovídá pozici dané báze. Po rozdělení na gelu se ze čtyř drah A, G, C, T sestaví výchozí sekvence. Kapacita této metody je kolem 1000 bází za několik hodin.

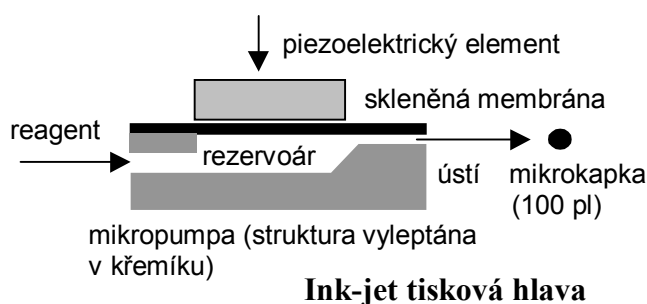


Hybridizační sekvenace využívá kombinatorické postupy. Analyzovaná sekvence se nechá hybridizovat se souborem krátkých prób (6 až 20 bází), který obsahuje všechny možné kombinace stejné délky sestavitelné ze 4 bází. Podle toho, se kterými próbami analyzovaná DNA hybridizuje, se usuzuje na přítomnost známé krátké sekvence v jejím řetězci.

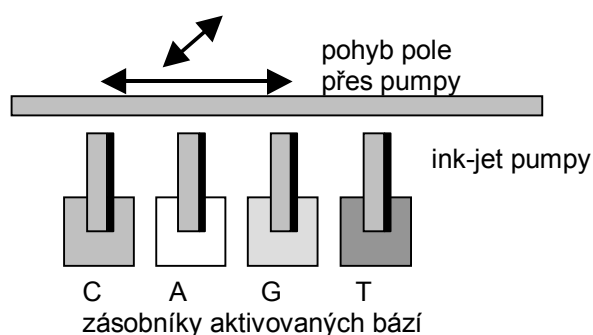
Pomocí překrývajících se úseků se pak dá rekonstruovat celá analyzovaná sekvence. Celý proces probíhá na křemíkovém čipu, takže se dá automatizovat a zrychlit na dobu několika minut. Pro vyhodnocování se využije fluorescenční označní buď analyzované DNA, nebo se přidá vhodný indikátor hybridizace. Jako detektor slouží CCD kamera, obraz pak vyhodnotí počítač a podle známých sekvencí na dané pozici čipu zrekonstruuje sekvenci. Jistým problémem této elegantní metody zůstává opakovaný výskyt krátkých sekvencí, a dále pak různě pevné párování bází (AT se váže pevněji než GC).

Technologickým problémem je umístění známé sekvence na přesně známé pozici čipu. Úplný soubor sekvencí délky 6 bází totiž obsahuje kolem 65000 oligonukleotidů, u délky 10 bází pak velikost souboru přesahuje 1 milion. Klasické postupy chemické syntézy jsou

nepoužitelné, próby se syntetizují postupně přímo na čipu. Pro nanášení reagentů se používá se technologie známá z inkoustových tiskáren (ink-jet printing).

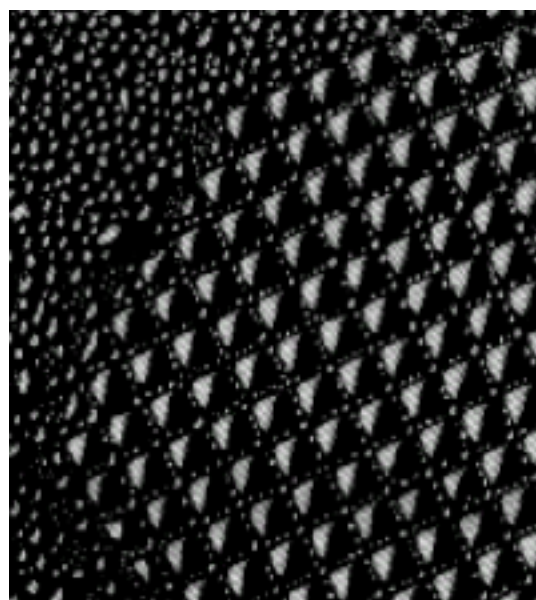


Miniaturní tisková hlava je schématicky ukázána na obrázku. Základem je struktura rezervoáru vytvořená v křemíku (micromachining), překrytá velmi tenkou skleněnou membránou, na kterou přiléhá piezoelektrický element (aktuátor).

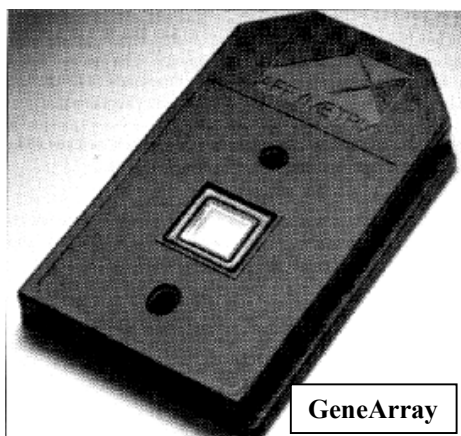


Rezervoár se naplní reagentem, poté nad ústí pumpy posune žádaná pozice čipu, a na piezoelektrický aktuátor se přivede puls napětí. Tím se mechanicky deformuje, zatlačí na membránu, čímž dojde k vystříknutí mikrokapky reagentu. Rychlost „tisku“ je 1 až 6 kHz.

Syntéza souboru DNA prób



Rozptýlení kapky na povrchu brání předcházející modifikace čipu, jsou na něm vytvořeny hydrofilní místa pro imobilizaci prób navzájem oddělené hydrofobními úseky (surface tension wells). Ukázka modifikovaného povrchu čipu je na obrázku vlevo. Velikost jednotlivé zóny je 100x100 μm , dělicí pásy mají šířku 30 μm . Reakční kroky probíhají naráz na všech pozicích čipu, promývání a pomocné reakce se provádí pro celý čip naráz. Pro 100000 pozic trvá prodloužení o jednu bázi asi 5 minut, syntéza souboru o délce 25 bází zabere 2 hodiny.



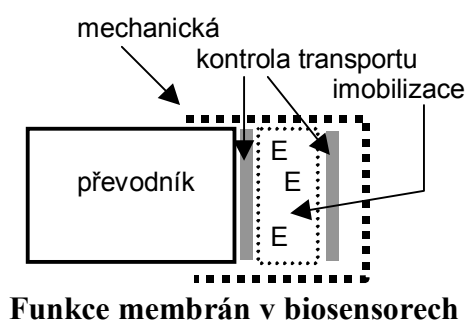
Tyto hybridizační čipy jsou pod názvem GeneArray dostupné např. od firmy Affymetrix ve formě výměnného průtočného modulu (viz obrázek), veškeré manipulace se vzorkem v průběhu fluorescenčního značení a hybridizace jsou automatizované ve čtyřkanálovém systému Fluidics Station. Vyhodnocení sekvence obstarává GeneScanner (HP, rozlišení 20 μm tj. cca 400000 pozic) a řídicí software.

Tato metodika slouží nejen pro sekvenování, ale dnes hlavně pro mapování již známých sekvencí, ve kterých se mohou vyskytovat mutační změny, vedoucí k dědičným chorobám.

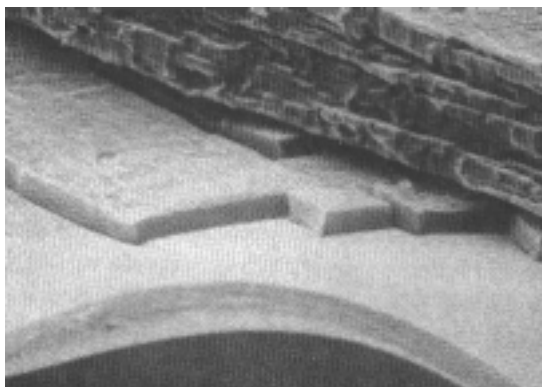
Imobilizace biomolekul

Imobilizace biomolekul byla velmi dobře propracována při vývoji **polymerních** či **skleněných nosičů** pro afinitní chromatografii a dále při biotechnologických procesech s kotvenými enzymy. Nicméně pro konstrukci biosensorů bylo nutné tyto existující postupy upravit, a nebo vyvinout zcela nové originální přístupy vhodné pro modifikaci povrchu **kovů**, **křemíku**, **uhlíku** a nejrůznějších **kompozitních materiálů**.

Membrány při konstrukci biosensorů

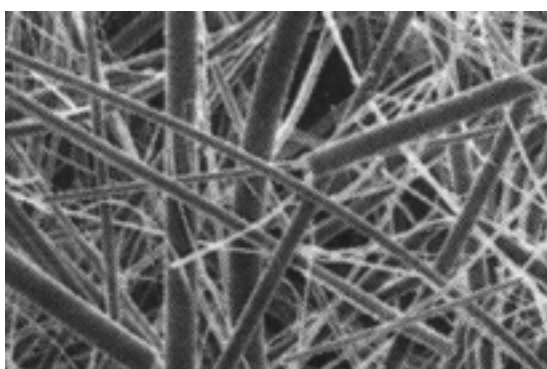


Membrány se v biosensorech uplatňují při plnění několika funkcí. Nejdůležitější je použití pro **imobilizaci** biorekogničních molekul – nosná funkce. Slouží také k **řízení transportu** látek buď prostřednictvím difúzní kontroly nebo jinými mechanismy ovlivňujícími selektivitu.

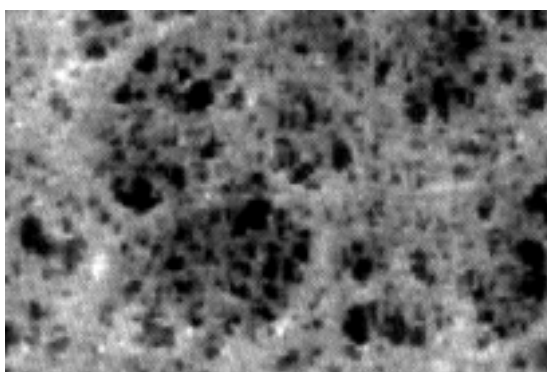


Ukázka multimembránového sendvičového systému tvořícího biorekogniční systém elektrochemického biosensoru pro stanovení glukózy. Jednotlivé části jsou antiinterferenční (brání elektrochemické oxidaci rušivých látek), enzymová a krycí (dodává mechanickou stabilitu).

Z dalších úkolů lze zmínit dodání **mechanické stability** či **biokompatibility**. Membrána je ve své podstatě porézní prostředí, podle toho je také můžeme rozdělovat:



Hrubě porézní mají velikost pórů nad 5 nm (např. skelná fritá), permeabilitu u nich ovlivňuje rozdíl hydrostatického tlaku na obou stranách, osmotický tlak se neuplatňuje (pokud polymer membrány neinteraguje s rozpouštědlem). Permselectivita je velmi špatná až žádná (prochází všechny rozpustné látky).



jemně porézní mají póry 1 až 5 nm (např. acetylcelulosa), rozpouštědlo prochází konvekci a difúzí, permeabilita je dána velikostí rozpuštěných látek.

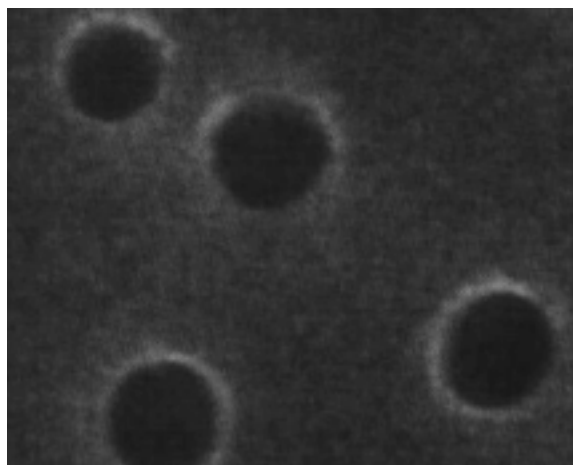
Na obrázku je ukázána struktura polyvinylchloridové membrány.

Neporézní (husté) membrány nevykazují porézní strukturu, rozpouštědlo prochází pouze difúzí. Velikost pórů stávající membrány lze dodatečně změnit; zvětšení průchodnosti se dosáhne naleptáním polymeru membrány, které vede ke zvětšení průměru pórů. Příkladem může být alkalická hydrolyza acetylcelulosy nebo polykarbonátů. Naopak zmenšení průchodnosti a zlepšení permselectivity se dosáhne depozicí vhodných látek uvnitř pórů, např. organosilanů nebo lipidických látek. Membrány mohou být **symetrické** (obě strany jsou

rovnocenné, průchodnost oběma směry je stejná) anebo **asymetrické** (připravují se na rozhraní dvou fází).

Příprava membrán

zahrnuje řadu technik. Obecně je potřeba pečlivě kontrolovat okolní podmínky (vlhkost, teplota), které silně ovlivňují vlastnosti vznikajících membrán. Nejsnadnější je příprava membrán **fázovou konverzí**. Roztok polymeru membrány ve vhodném rozpouštědle se nalije na pevný povrch a vyčká se odpaření rozpouštědla. Příklady polymerů (rozpouštědel) mohou být polyvinyl chlorid (tetrahydrofuran - THF), acetylcelulosa (aceton), polyethersulonát (dimethylsulfoxid) nebo polyurethan (THF, aceton). Pokud se použije vyšší vlhkost a nižší teplota okolí, obecně vznikají větší póry. Variantou tohoto postupu je nalití roztoku polymeru organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou na vodní hladinu, kde se na rozhraní se vzduchem utvoří asymetrická membrána. **Polymerace z mono či oligomerů** přímo na místě použití membrány (tvorba „in situ“) je vhodná k přípravě fragilních gelovitých membrán (polyvinylalkohol, polyakrylamid), které obsahují velký podíl vody.



Dodatečná tvorba pórů zahrnuje produkci tzv. nukleárních membrán (Nucleopore). Vrstva polymeru se „prostřílí“ urychlenými nukleony, přičemž se lokálně naruší struktura polymeru, kde se pak vytvoří póry naleptáním. Výhodou je velmi dobrá reprodukovatelnost a homogenita pórů o poměrně přesně definovaném průměru.

Jinak lze lokální změny vyvolat mechanickým natahováním (polyenové membrány, obsahující krystalické a amorfni oblasti, v amorfniích pak následně vzniknou póry).

Při konkrétní aplikaci je obvykle potřeba zvolit mezi komerčně dostupnou membránou, nebo vytvořením membrány přímo na místě použití. Druhý způsob je jediný možný zejména při práci s miniaturními biosensory nebo při použití velmi tenkých membrán (pod 10 až 15 μm už s membránou nelze mechanicky manipulovat), další výhodou je lepší přilnavost a přizpůsobení se členitému povrchu. Volba membrány bude také ovlivněna dalšími činiteli:

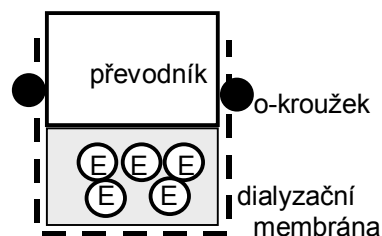
- * (komerční) dostupnost za přiměřenou cenu
- * dostatečná mechanická pevnost pro zamýšlené použití

- * odolnost k mikrobiálnímu působení
- * chemická reaktivita (možnost aktivace před imobilizací biomolekul)
- * dostupnost v žádané „konfiguraci“ (membrána, kuličky, roztok polymeru)

Biokompatibilita membrán nabývá na významu s použitím biosensorů přímo v živém organismu (*in vivo*) nebo v klinické praxi při kontaktu zejména s krví (*in vitro*). Při kontaktu povrchu membrán v těchto případech dochází k adsorpci proteinů – zejména albuminu a fibrinogenu – na povrch, v další fázi se pak vytváří další vrstva krevních destiček (koagulační trombóza). Při dlouhodobější implantaci může docházet k zarůstání sensoru tkání. Tyto procesy vedou k postupnému snižování citlivosti biosensoru důsledkem snížené propustnosti látek. Naopak přítomnost biosensoru může vyvolávat rušivé reakce živého organismu (srážení krve, zánětlivé procesy). Buď je potřeba povrch biosensoru povléknout vhodnými polymery (silikon, polytetrafluorethylen a zejména polyurethany), modifikovat povrchní obal (hydrofilizace, konverze aminoskupin na hydroxyskupiny) nebo do vnější vrstvy vpravit látky omezující rušivé reakce (fosforylcholin, heparin).

Mechanická imobilizace biomolekul

Tyto postupy jsou velmi jednoduché a nenáročné, využívají se zejména jako výchozí postupy při vývoji biokatalytických sensorů, kdy je třeba rychle ověřit funkci nového biosensoru.



Mechanické zachycení

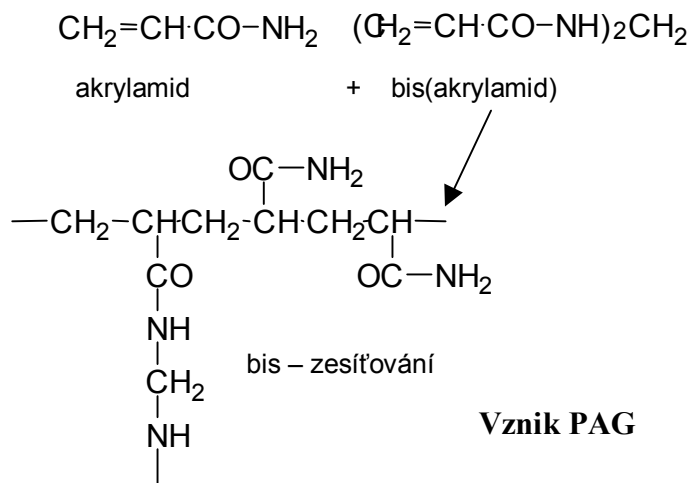
Mechanické zachycení - roztok biokomponenty se kápne na povrch převodníku a překryje se dialyzační membránou, která zadržuje biomakromolekuly, ale nebrání pohybu analytu. Běžné dialyzační membrány mají limit propustnosti (MWCO, molecular weight cut-off) kolem 10 kDa, materiálem jsou celulóza, acetylcelulóza nebo polykarbonáty.

Zachycené biomolekuly jsou v prostředí vhodného pufru, do kterého se někdy přidává kolečko filtračního nebo skelného papíru, které pak vlastně definuje tloušťku výsledné biovrstvy. Takto vytvořený biosensor nelze samozřejmě rozebírat a musí se uchovávat ve vhodném prostředí (pufr s přísadkou stabilizačních činidel). Stabilita biosensoru je určována vlastnostmi biomolekuly, může se pohybovat v rozmezí hodin až měsíců. Tato technika je také vhodná pro tkáňové řezy (k zachycení stačí použít např. polyamidovou síťku) nebo vrstvy tvořené z mikrobiálních buněk ve formě pasty.

Adsorpce biomolekul se používá občas ve spojení s povrchem grafitu. Je to reverzibilní proces využívající řadu interakcí (hydrofobní interakce, iontové síly, vodíkové můstky), které mohou velmi výrazně záviset na podmínkách (pH, iontová síla, teplota).

Zachycení v gelu či polymeru

inkluze biomolekuly uvnitř struktury membrány při její přípravě je snadná metoda imobilizace.

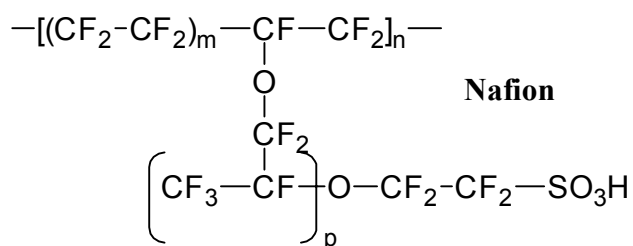


Klasicky je tato metoda používána ve spojení s **polyakrylamidem** (PAG). Polymer se připravuje ze směsi akrylamidu a síťovací komponenty methylen-bis(akrylamid) a enzymu, iniciace se provádí UV světlem. Výsledný polymer obsahuje vysoký podíl vody (80 až 95%), což zhoršuje mechanické vlastnosti biomembrány.

Porozitu lze ovlivnit poměrem obou komponent, bis samozřejmě zvyšuje stupeň zesíťování a tím snižuje průchodnost. Biovrstvy nejsou příliš stabilní, časem dochází k uvolnění zachycených biomolekul. PAG je možné využít také pro kovalentní imobilizaci biomolekul, aktivace polymeru se dosáhne hydrazinem (6 M, 8 hod inkubace při 45 °C), následný přídavek kyseliny dusité vede k reaktivnímu azidu kyseliny.

Želatina je velmi často používána pro přípravu enzymových membrán. Postup je velmi jednoduchý. 5% želatina se nechá nabobtnat a rozpustit ve vodě při zvýšené teplotě (40 až 50 °C), přidá se enzym, promíchá a naleje na vodorovnou podložku (kolem 25 μl na cm²). Po vyschnutí (4 °C, asi 12 hodin) se výsledné enzymové membrány přiloží na aktivní plochu sensoru a zachytí dialyzační membránou. Někteří autoři doporučují dodatečné vytvrzení želatiny přídavkem asi 1 μM síranu chromitého, který zesíťuje karboxylové skupiny želatiny.

Nafion je polymer dodávaný v rozpuštěném stavu ve směsi alkoholů s vodou.



Používá se běžně pro tvorbu permselektivních membrán, mimo omezení průchodnosti funguje jako iontoměnič akumulující kationty a odpuzující anionty (u bioelektrod brání interferenci askorbátu a urátu).

Akumulace kationtů je využitelná pro zcitlivění amperometrických měření; látky zachycené v Nafionové vrstvě se pulzem potenciálu naráz oxidují, takže se dosáhne zesíleného signálu. Je použitelný také pro přímou imobilizaci enzymů, jejich směs s Nafionem se kápne na povrch sensoru a nechá vysušit. Biovrstvy jsou poměrně stabilní.

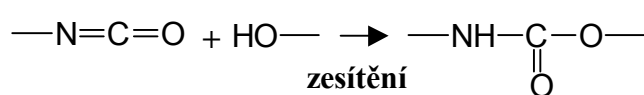
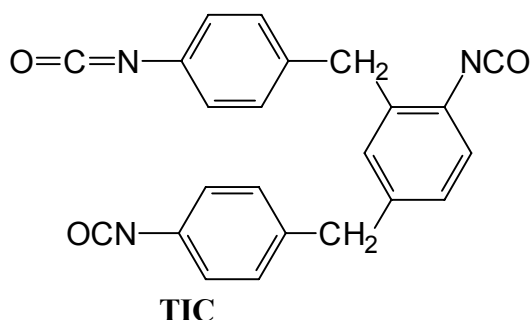
Polyvinylalkohol (PVA) je další hydrofilní, neutrální a biokompatibilní polymer používaný k imobilizacím, ve vodě silně bobtná. Připravuje se hydrolyzou polyvinylacetátu ve formě krátkých oligomerů (asi 90 kDa), které po zesíťování vytvoří konečný polymer. Pro zahájení polymerace se používá řada postupů.

$$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right]_n$$
PVA

Radiační polymerace využívá ozáření směsi oligomerů a enzymu γ zářením (generuje ^{60}Co , potřebná dávka 3 až 5 Mrad), vzniklé radikály vyvolají další polymeraci a zesíťování. Výsledná membrána neobsahuje žádné nežádoucí produkty a současně je sterilizována.

$$\text{CH}_2 = \underset{\text{CH}_3}{\text{C}} - \text{O} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$$
allylmethakrylát

Na druhou stranu může tvrdé záření poškodit převodník nebo biomolekulu. Pro dodatečné zesíťování lze do směsi přidat kolem 5% allylmethakrylátu.

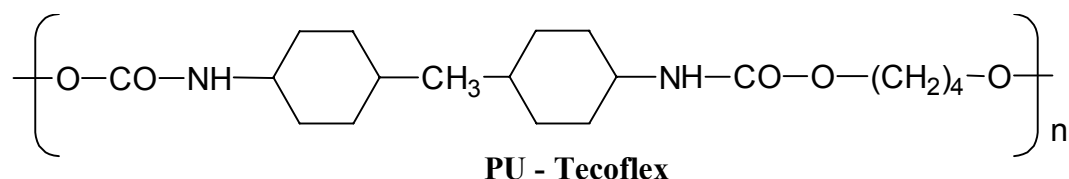


Pro chemické zesíťování PVA se používají triisokyanáty (TIC), které spojují postranní hydroxyly PVA. Mohou však zesíťovat i enzym (přes aminoskupiny a hydroxyly). Na povrch sensoru se nanese nejprve enzym a po jeho uschnutí pak PVA (roztok v dimethylsulfoxidu). Přidáním TIC velmi rychle vznikne gel.

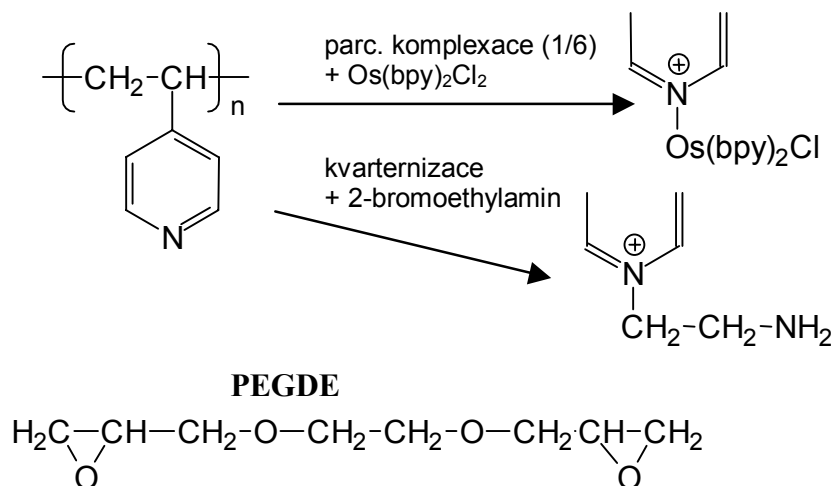
Existuje také komerčně dostupný PVA obsahující malý podíl (1.3%) styrylbipyridiniových skupin (PVA-SbQ), který polymeruje v ultrafialovém světle. To pak je vůbec nejšetnější postup imobilizace biomolekul pomocí PVA.

HEMA – poly (2-hydroxyethylmethakrylát) je další hydrofilní a biokompatibilní polymer. Jeho směs s vodným roztokem enzymu se nechá zmrazit (-80°C) a poté se polymerace vyvolá γ zářením. Při nízké teplotě dochází k menšímu poškození biomolekul. Ve zpolymerované matrici se pak vytvoří póry zbylé po krystalcích ledu (cavities), na jejichž stěnách je vázán enzym. Chemicky se dá polymerace HEMA iniciovat peroxidovosíranem amonným a TMPD.

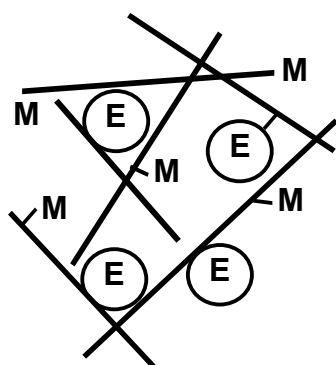
Polyurethany (PU) reprezentují velice širokou skupinu biokompatibilních polymerů s velmi dobrými adhezními vlastnostmi. Opět se vychází z oligomerů (kolem 50 kDa), které se v přítomnosti enzymu zesítují např. difenylmethan diisokyanátem.



Zajímavou a úspěšnou kombinací jsou speciální polymery kombinující funkci imobilizace enzymu s polymerní strukturou nesoucí skupiny mediátorů přenášející elektrony, tzv. **redox relays**. Východním materiálem je poly-4-vinylpyridin (oligomer o hmotnosti kolem 50 kDa). Ten se částečně využije pro tvorbu komplexu s osmiem (mediátor), a částečně se do něj kvarternizací zavedou reaktivní aminoskupiny.



Poté se směs modifikovaného oligomeru, enzymu a bifunkčního PEGDE (polyethylenglykoldiglycidylether) nanese na povrch grafitové elektrody, kde vytvoří biovrstvu nesoucí uvnitř struktury fixované molekuly mediátoru.

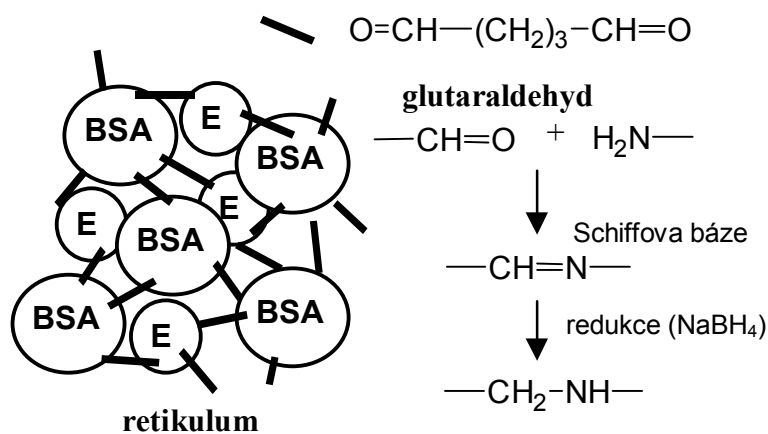


PEGDE může mimo zesítování modifikovaného polyvinylpyridinu reagovat také s volnými aminoskupinami enzymu. Přenos elektronů mezi enzymem a elektrodou pak probíhá velmi rychle přeskokováním mezi jednotlivými fixovanými molekulami mediátoru. Výsledkem pak jsou vysoké proudové hustoty dosahované u tohoto typu enzymových elektrod.

Zesítování biomolekul

Membránu lze vytvořit také přímo z molekul enzymů či jiných bílkovin jejich zesítováním (retikulace) vhodným bifunkčním činidlem. Zdaleka nejčastěji se používá glutaraldehyd. Jeho

směs s roztokem bílkoviny v závislosti na koncentraci složek vytváří spontánně retikulum buď přímo na povrchu sensoru, nebo na vhodném podkladovém materiálu (polyamidová síťka, dialyzační membrána).



Reakcí mezi aldehydovou skupinou s aminoskupinou bílkoviny (postranní lyzinové zbytky) vzniká propojením Schiffova báze, která se ještě může zredukovat na stabilnější aminovou vazbu, i když běžně se to neprovádí.

Nezreagované aldehydové skupiny se mohou neutralizovat reakcí s glycinem nebo ethanolaminem. Hmotnostní poměr glutaraldehydu a bílkoviny bývá obvykle v intervalu 1:1 až 1:20, což samozřejmě ovlivňuje průchodnost vzniklé membrány. Zesíťovat lze buď pouze enzym, nebo se může enzym „naředit“ inertní bílkovinou, která má hodně volných aminoskupin (albumin). Takovéto enzymové membrány se vyznačují velmi dobrou stabilitou v důsledku značného podílu latentní enzymové aktivity.

Kovalentní imobilizace biomolekul

S kovalentní imobilizací bílkovin a nízkomolekulárních bioaktivních látek byly získány značné zkušenosti při přípravě nosičů pro afinitní chromatografii^{43,44}. Tyto poznatky jsou přímo aplikovatelné na poli biosenzorů, protože řada polymerních materiálů je shodná. Na druhou stranu se nově objevuje potřeba kovalentně vázat biomolekuly na aktivní povrch požadovaného převodníku, což si vyžádalo vývoj nových imobilizačních technik.

Aktivace povrchu sensorů

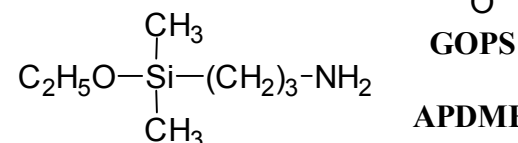
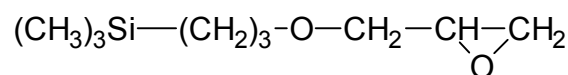
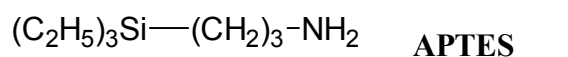
Pracovní povrch sensorů tvoří poměrně malá skupina materiálů: sklo, křemík, různé modifikace uhlíku (grafit, skelný uhlík, kompozitní směsi) a ušlechtilé kovy (zejména zlato a platina). Některé biomolekuly se sice na tyto materiály adsorbují s různou pevností, avšak spolehlivá a dlouhodobě stabilní imobilizace vyžaduje kovalentní vazbu mezi biomolekulou a

⁴³ Lowe C. R., Dean M. *Afinitní chromatografie*, SNTL, Praha, 1979.

⁴⁴ Hermanson G. T., Mallia A. K., Smith P. K. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, San Diego, 1992.

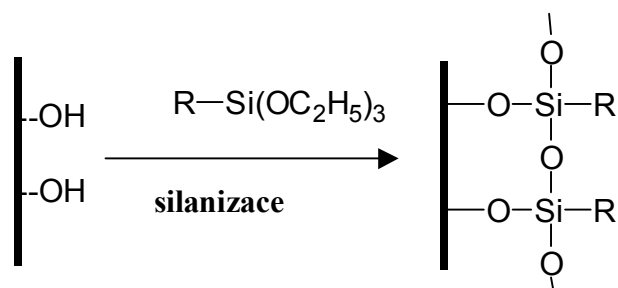
povrchem. Nejprve budou probrány aktivační postupy, které na málo reaktivním povrchu zavádějí reaktivní skupiny schopné pak reagovat s biomolekulami.

Silanizace je metoda aktivace anorganických povrchů částečně pokrytých vrstvou oxidu (sklo, křemík, kovy) kontaktní vrstvou silanu s vhodnou reaktivní skupinou X. Nepoužívají se organické halogenované silany (jsou příliš reaktivní a žádná další skupina už by nezbyla), ale méně reaktivní alkoxyderiváty.



Nejběžnější jsou γ -aminopropyltriethoxysilan (APTES nebo APTS) a glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPS). Jejich účinkem se na povrchu vytvoří tenká vrstvička z několika molekulárních vrstev.

Nanášení se provádí na povrch zbavený organických látek, existují tři základní metodiky⁴⁵.



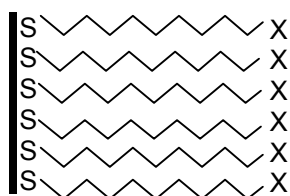
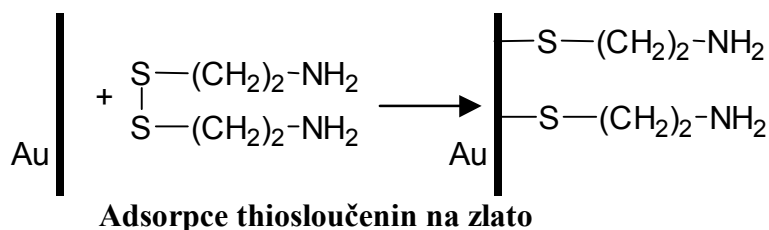
Silanizaci lze provádět **z organické fáze** - 10% roztok silanu v toluenu, v něm se daný povrch refluxuje 12 až 24 hod. Po promytí toluenem či acetonem a vysušení se dále zahřívá 2 až 4 hod při 110 °C.

Z vodné fáze se dosáhne menší vazebná kapacita, ale vrstva je stabilnější při použití ve vodném prostředí. Nejprve se povrch hydratuje 30 min povařením ve vodě, pak se zahřívá 3 až 4 hod při 75 °C v 10% vodném roztoku silanu, pH 4. Po usušení se zahřívá přes noc při 110 °C. **Odpařovací** nanášení je nejjednodušší, povrch se inkubuje 1 hod v 1% silanu v acetonu, po opláchnutí acetonem a vysušení se zahřívá 1 hod při 110 °C. Nanášení silanu z vodné fáze nebo z polárních rozpouštědel vede ke tvorbě složitějších struktur (4 až 5 vrstev silanu). Pokud je žádoucí dosáhnout pouze monovrstvy, lze použít speciální aminopropyl-dimethylethoxysilan (APDMES), který nemůže vytvářet boční křížové vazby. Silanizací se na povrch zavedou buď aminoskupiny, nebo reaktivní oxiranový zbytek.

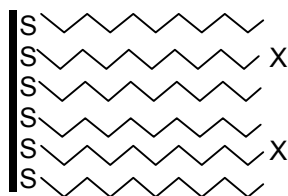
Spontánní tvorba monovrstev (self organized monolayers) využívá velmi pevné adsorpce thiosloučenin (thioly a disulfidy) na povrchu zlata a částečně také platiny a stříbra. Reakce při které vzniká sulfidová vazba se zlatem je velice pevná, takže může sloužit jako podklad pro další imobilizační reakce. Délka uhlíkového řetěze ovlivňuje organizovanost

⁴⁵ Weetall H. H. *Biosens. Bioelectron.* **8** (5), x (1997).

vrstvy, plošnou hustotu reaktivní skupiny lze ovlivnit přidavkem inertního činidla – použije se směs aminothiolu a thiolu.



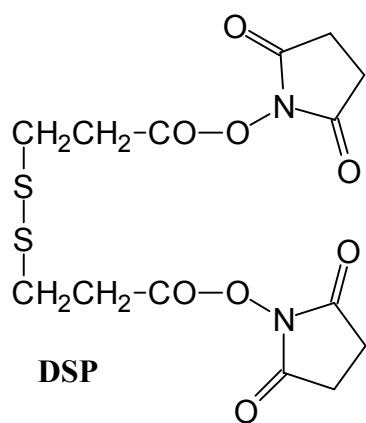
Organizovaná vrstva



zmenšení hustoty skupiny
zředěním inertním thiolem

Vždy vzniká mono-molekulární vrstva, která může být tak hustá, že povrch je prakticky elektricky izolován. Naopak adsorpce krátkých thio-derivátů často zlepšuje elektrochemické odezvy bílkovin a jiných látek (usnadněná výměna elektro-nů s cytochromem c).

Hustotu vrstvy lze určit elektrochemicky na základě signálu vhodné elektroaktivní látky (ferrikyanid) nebo sledovat pokles vodivosti povrchu v průběhu vzniku monovrstvy. Nejčastěji se používají thioly obsahující v molekule aminoskupinu (cysteamin, cystamin, thiofenol), hydroxyskupinu (16-merkaptohexadekanol) nebo karboxyskupinu (12-merkaptoundekankarboxylová kyselina).



Bis(N-hydroxysukcinimidester) kyseliny 3,3'-dithio-propionové (**DSP**) je speciální činidlo, které se váže na zlato. N-hydroxysukcinimidová skupina je reaktivní a může být vyměněna za volnou postranní aminoskupinu z bílkoviny, přičemž vznikne amidová vazba.

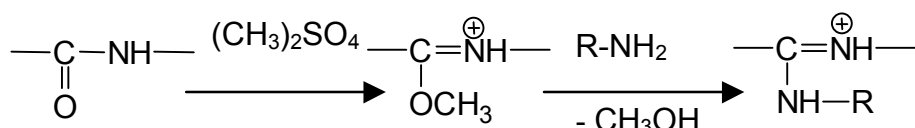
Existují pokusy využít tyto reakce pro imobilizaci bílkovin, jejichž struktura se geneticky pozmění tak, aby na povrchu měly přítomné disulfidické můstky.

Spontánní adsorpce na povrch zlata se vyskytuje také v případě některých přirozených bílkovin – protein A a streptavidin, které mají na povrchu přístupné thioskupiny. Tyto případy budou zmíněny později.

Aktivace polymerních materiálů

Polyamidy vznikají polykondenzačními reakcemi, např. Nylon 66 se připravuje z 1,6-diaminohexanu a hexan-1,6-dikarboxylové kyseliny, tuzemský produkt Silon vzniká kondenzací ε-kaprolaktamu. Tyto polymery jsou v oblasti biosenzorů hojně využívány ve

formě membrán, sítěk, kuliček a trubiček pro imobilizaci zejména enzymů. Přirozený materiál má pro imobilizaci pouze velmi málo volných koncových skupin, takže je nutné jeho strukturu částečně narušit. Štěpení amidových vazeb lze dosáhnout opatrnou hydrolyzou (asi 3 M HCl, doba působení závisí na formě materiálu, 10 sec až 1 hod). Často se však polyamid mechanicky naruší. Výhodnější jsou aktivační postupy⁴⁶, které amidovou vazbu nepřerušují, a to O-alkylace peptidové vazby oxoniovou solí (triethyloxonium tetrafluoroboritan) nebo dimethylsulfátem.



Aktivace polyamidu dimethylsulfátem

Vzniklý imidoester reaguje v slabě alkalickém prostředí s aminoskupinou (lyzin, 1,6-diaminohexan) za vzniku amidinu. Kladný náboj zvyšuje polaritu polymeru. Získá se tak mnohem větší povrchová hustota využitelných karboxy nebo aminoskupin. V současnosti je na trhu dostupná řada aktivovaných polymerů (membrán), imobilizace se dosáhne inkubací s biomolekulou.

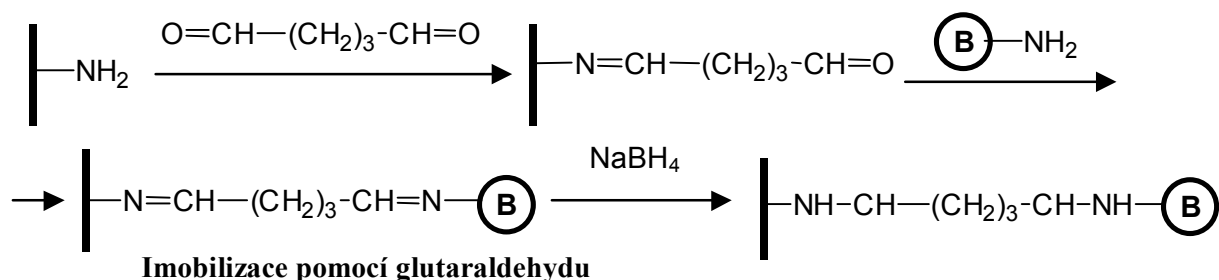
Navázání biomolekul

Předpokládá se vazba zvolené biomolekuly na výchozí materiál (povrch sensoru, membrána, ...) nesoucí některou z následujících skupin. Jsou popsána vhodná činidla umožňující kovalentní vazbu biomolekul, zejména se uvažují reakce bílkovin. Následující část je samozřejmě míněna pouze jako neúplný přehled základních postupů. Neustále se objevují nová speciální činidla použitelná obecně nebo pro speciální aplikace. Nové reagenty lze nalézt v katalogích firem (Pierce).

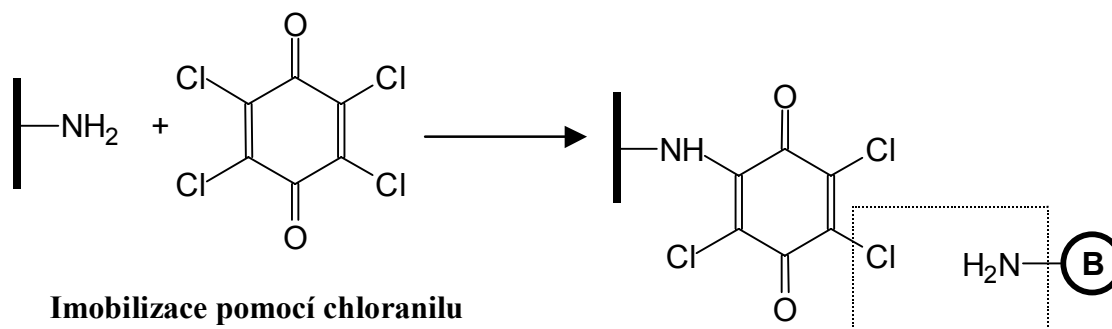
Aminoskupina. Povrch modifikovaný volnou aminoskupinou je pro imobilizaci velmi vhodný, protože existuje celá řada propracovaných a ověřených postupů. Nejjednodušší je aktivovat aminoskupinu vhodným bifunkčním činidlem, které po reakci s povrchovou aminoskupinou reaguje svou druhou reaktivní skupinou s vhodnou povrchovou skupinou navazované biomolekuly (B). Často se používá **glutaraldehyd**, který je běžně dostupný a dostatečně reaktivní. Inkubací (asi 1 až 5% vodný roztok, 0.5 až 2 hod) s povrchem se vytvoří Schiffova báze a po promytí pak je druhá volná aldehydová skupina k dispozici pro stejnou

⁴⁶ Hornby W. E., Morris D. L.. V knize *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides* (Weetall H. H., editor), M. Dekker, New York, 1975, str. 141.

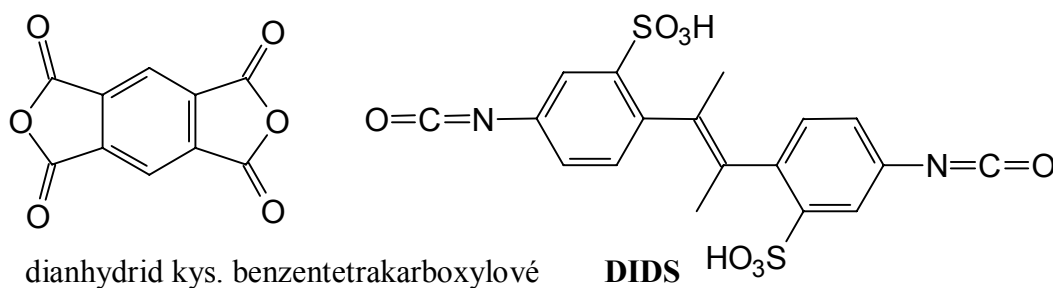
reakci s aminoskupinou biomolekuly. Zbývající volné aldehydové skupiny se inaktivují reakcí s glycinem nebo ethanolaminem. Někdy se také provádí redukce Schiffových bází borohridem, přičemž vzniklá vazba je stabilnější.



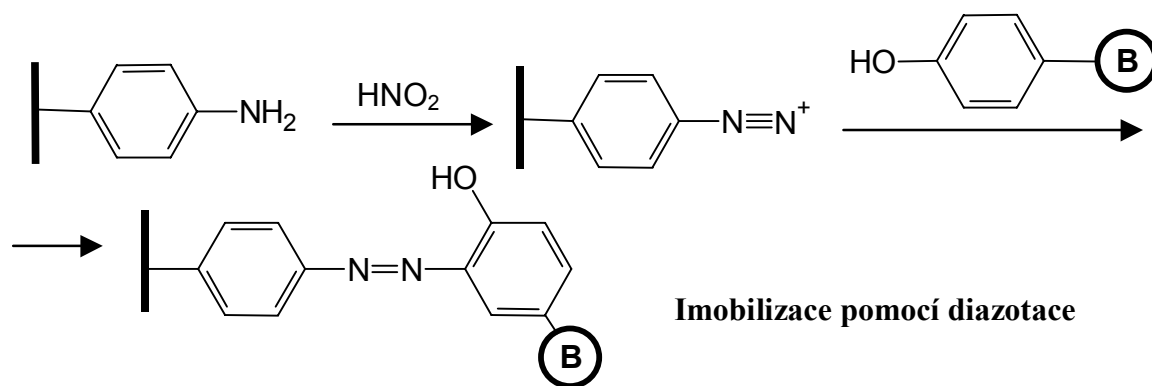
Další vhodné bifunkční činidlo je například chloranil (tetrachlor-p-benzochinon), který mimo imobilizační funkci obsahuje redoxaktivní chinonové uspořádání využitelné pro přenos elektronů mezi enzymem a elektrodou.



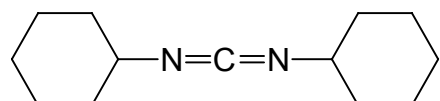
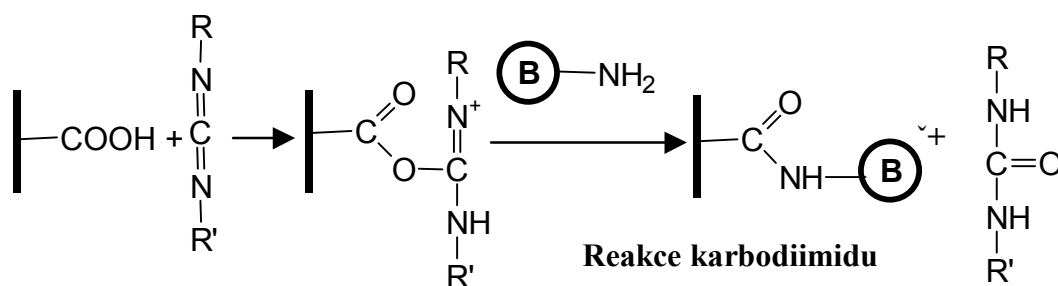
Podobně jsou použitelná další činidla, např. **dianhydrid kyseliny benzentetrakarboxylové** nebo **DIDS**, trans-stilben-(4,4'-diisothiokyanát)-2,2'-disulfonová kyselina.



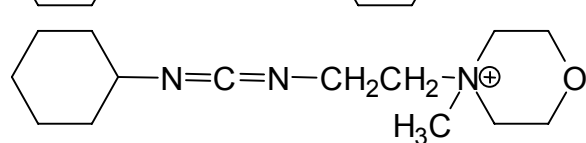
Další možností je konverze aminoskupiny. Obecně je použitelný **thiofosgen** $\text{Cl}_2\text{C=S}$, vzniklý isothiokyanát pak reakcí s aminoskupinou biomolekuly vede k substituované thiomocovině. Aromatické aminoskupiny lze velice snadno aktivovat **diazotací** kyselinou dusitou, biomolekula se naváže přes tyrozinový zbytek.



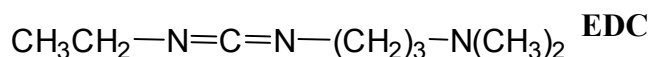
Karboxyskupina je druhou nejčastěji používanou po aminoskupině. Pro aktivaci se užívá reakce s **karbodiimidu** (CDI), které působí vlastně vázání vody při vzniku amidové, esterové či thioesterové vazby.



DCC



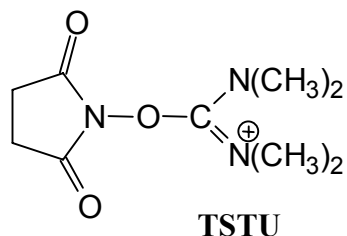
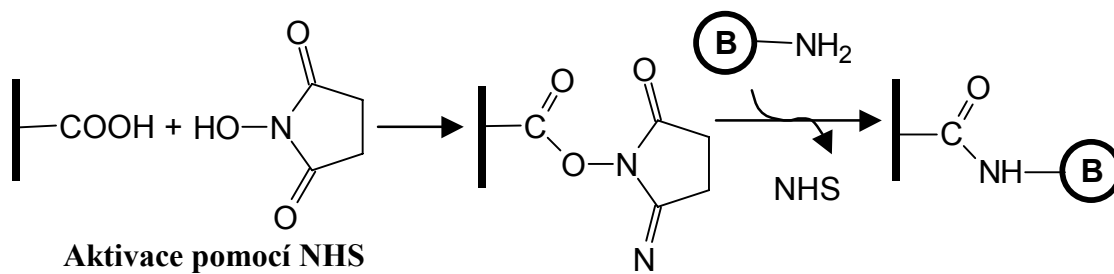
CMC



EDC

Nejdéle se používá dicyklohexylkarbodiimid **DCC**, nevýhodou je nerozpustnost ve vodě. Ve vodě rozpustně jsou **EDC**, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid, a **CMC**, 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)-karbodiimid methoxy-p-toluen-sulfonát.

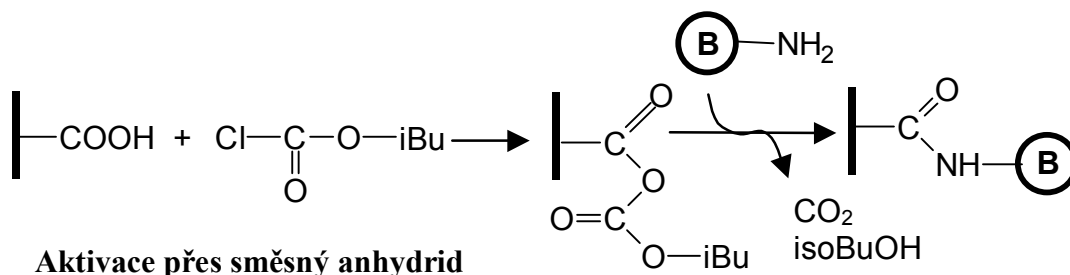
Pro imobilizaci citlivějších bílkovin se neprovádí přímo reakce s CDI, ale pomocí CDI a **N-hydroxysukcinimidu** NHS se připraví reaktivní a stabilní N-hydroxysukcinimidový derivát karboxylu, který pak reaguje s aminoskupinou např. bílkoviny. Oproti reakci pouze s CDI je průběh mnohem mírnější a nevznikají nežádoucí meziprodukty.



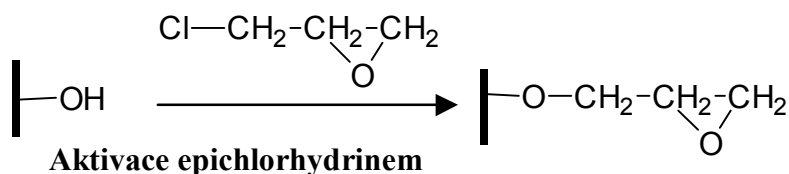
Je dostupný také přímo aktivovaný derivát, **TSTU** O-(N-hydroxysukcinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroboritan. Jeho inkubace (v dimethylformamidu) s ekvimolárním množstvím látky nesoucí karboxyl vede ke vzniku reaktivního NHS derivátu.

Na trhu je k dispozici řada biomolekul aktivovaných NHS pro vazbu na aminoskupiny, např. NHS-biotin, NHS-fluorescein.

Metoda směsných anhydridů využívá aktivaci pomocí isobutylechloroformiátu, který aktivuje karboxyskupinu na reaktivní anhydrid a ten pak umožňuje vznik amidové vazby.

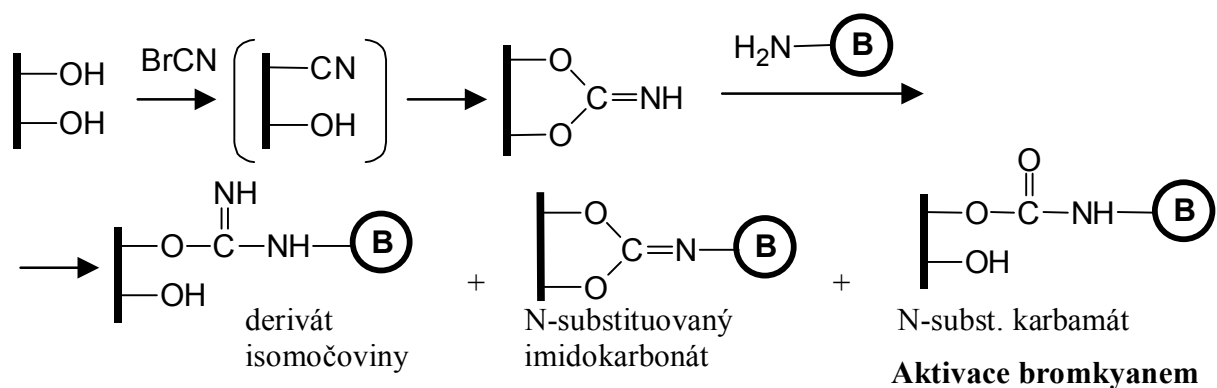


Hydroxyskupina je využívána zejména pro imobilizace na povrchy modifikované sacharidovou vrstvou (nejčastěji dextran), která dodává hydrofobnímu povrchu hydrofilní vlastnosti zvyšující biokompatibilitu. Jako aktivační činidlo je použitelný **epichlorhydrin**.

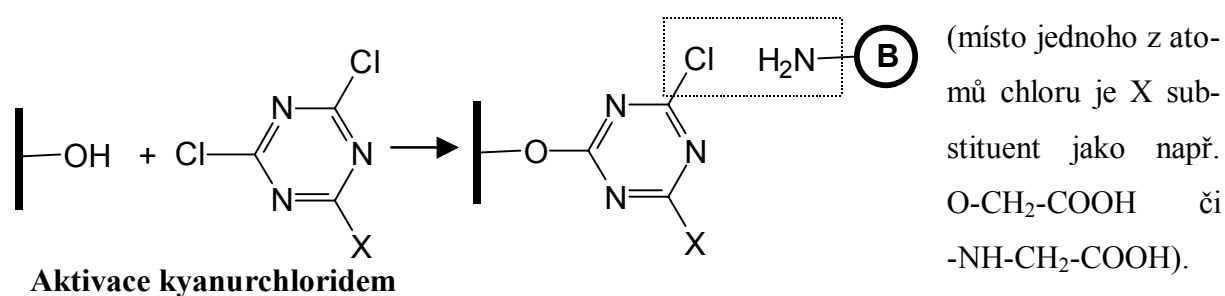


Na oxiranový cyklus se adují biomolekuly prostřednictvím amino či hydroxyskupiny.

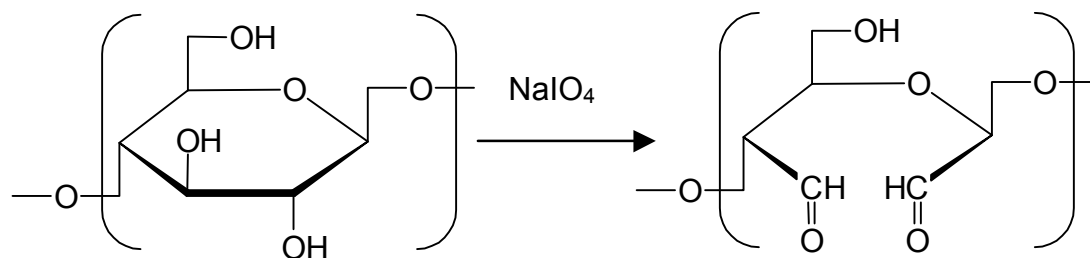
Klasickým činidlem aktivace polysacharidových materiálů je použití **bromkyanu**, jeho nevýhodou je vysoká jedovatost. Reakce s hydroxyly probíhá v alkalickém prostředí, rozsah aktivace je úměrný koncentraci činidla. Meziprodukt imidokarbonát reaguje s aminoskupinou biomolekuly za vzniku různých derivátů.



Triazinová metoda využívá kyanurchlorid a zejména jeho méně reaktivní deriváty.



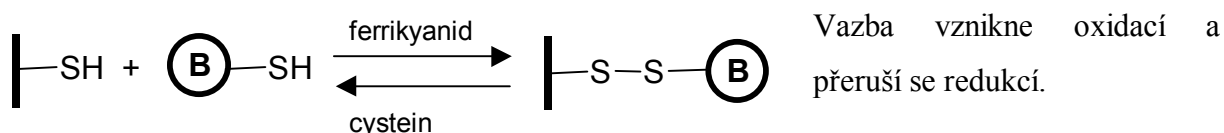
Sacharidové materiály obsahující diolové uskupení je možné za mírných podmínek **oxidovat jodistanem**, přitom vzniklé aldehydové skupiny reagují s aminoskupinami biomolekul za vzniku Schiffových bází. Tato reakce je použitelná také pro aktivaci bílkovin nesoucích postranní sacharidové zbytky, ale například také pro RNA.



Oxidace diolového uskupení jodistanem

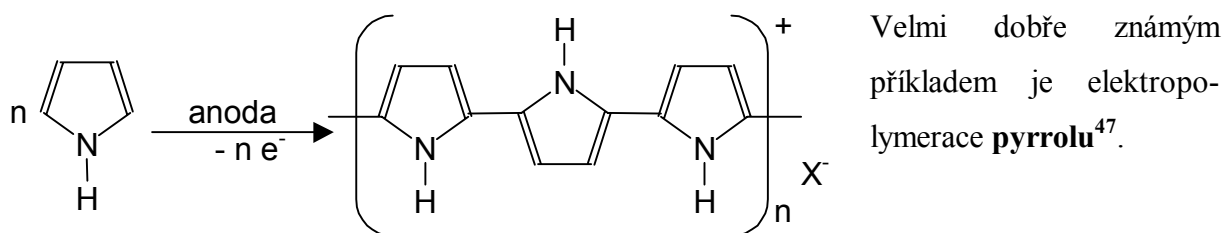
Amidoskupina se vyskytuje především v polyakrylamidu. Dá se alkalickou **hydrolýzou** (zahřívání $60\text{ }^\circ\text{C}$, pH 10.5, NaHCO_3 a Na_2CO_3) převést na karboxylovou skupinu. Další možností je **hydrazinolýza** vedoucí k hydrazidu kyseliny, který se kyselinou dusitou převede na reaktivní azid kyseliny. Při zahřívání polyakrylamidu v bezvodém ethylendiaminu dojde k substituci a získá se koncová aminoskupina.

Thiolová skupina umožňuje reverzibilní imobilizaci s volnými cysteinovými zbytky.

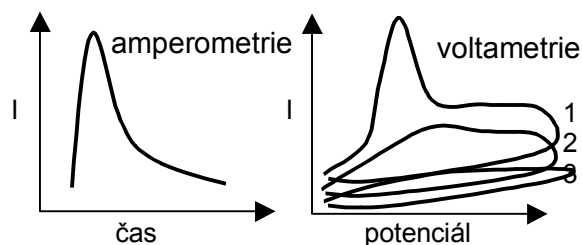


Elektropolymerace

Tato imobilizační technika využívá elektrochemickou oxidaci k přípravě reaktivních monomerů, které pak spontánně vytváří polymerní film na povrchu elektrody. Tyto filmy se dají vytvořit i na členitém povrchu nebo na povrchu mikroelektrod. Pokud jsou v průběhu elektropolymerace v roztoku přítomné biomolekuly, dochází k jejich zachycení uvnitř vznikající membrány. Méně se může uplatnit také kladný náboj polymeru. Vlastnosti membrány je možné ovlivnit přidávkem dalších látek do elektropolymerační směsi. Tloušťku membrány určuje velikost prošlého náboje, tak se dá snadno reprodukovatelně ovlivnit množství imobilizované biomolekuly. Některé elektropolymerární vrstvy mohou být navíc vodivé, což usnadňuje přenos elektronů mezi elektrodou a biomolekulami. Tyto polymery jsou obvykle velmi intenzivně barevné, což působí přítomnost volných elektronů.



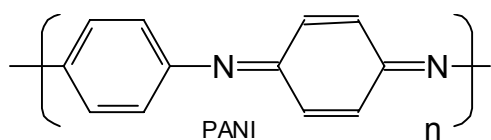
Provádí se oxidací 50 až 200 mM roztoku pyrrolu amperometrickou oxidací při potenciálu kolem 0.8 V v anaerobním prostředí, jako elektrolyt se přidává KCl. Tloušťka filmu (až 100 nm) je úměrná množství prošlého náboje (5 mC/cm² odpovídá 13 nm). Vzniklý polypyrrol (PPy) je vodivý, vodivost dosahuje asi 500 S/cm; pro srovnání jsou vodivosti mědi 10⁶, křemíku 10⁻⁴ a skla 10⁻¹¹ S/cm). Obdobně probíhá elektropolymerace methylpyrrolu.



Elektropolymerace fenolu

Tenké a mechanicky stabilní filmy polyfenylenoxidu (PPO) na povrchu elektrod vznikají elektropolymerací fenolu. Filmy jsou nevodivé a elektropolymerace se samovolně zastaví, když je povrch izolován.

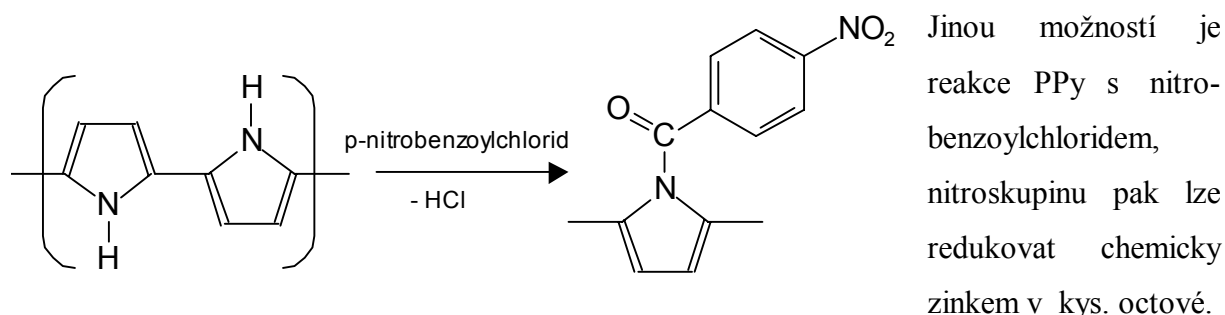
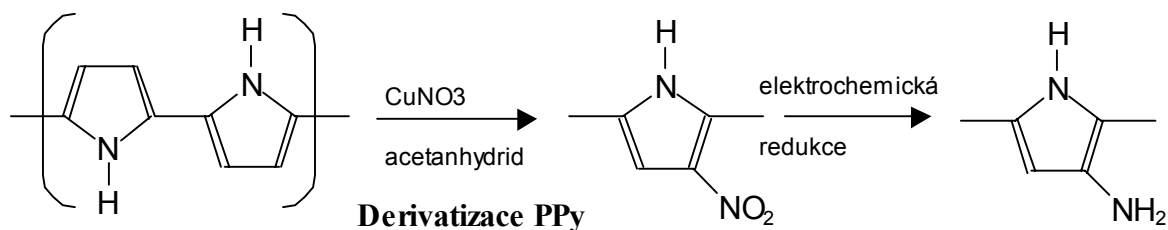
⁴⁷ Umana M, Walter J. *Anal. Chem.* **58**, 2979 (1986).



Průběžně se dá pozorovat pokles oxidačního proudu při vzniku filmu. Méně stabilní jsou polyanilinové (PANI) filmy vzniklé z anilinu.

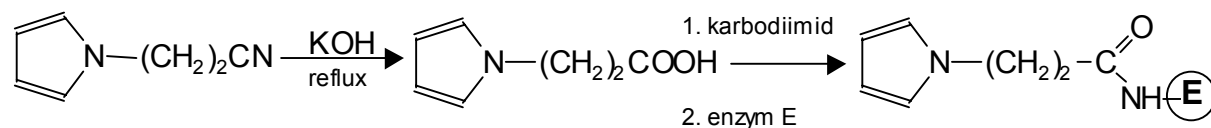
Elektropolymerní vrstvy jsou také vhodné pro ovlivňování transportu látek jako kontrolní membrány. Pro tento účel se používají například polyfenylendiaminové (PPD) filmy připravené z 1,2-diaminobenzenu. Jsou nevodivé o tloušťce kolem 10 nm; snadno přes ně prochází peroxid vodíku, přitom jiné rušivé látky jsou odstíněny.

Protože zachycení bílkovin uvnitř polymeru je poměrně volné, dochází časem k uvolnění do roztoku a tím k poklesu aktivity. Jiné postupy proto používají elektropolymerní film jen jako výchozí chemickou modifikaci povrchu elektrody, a film se pak dále upravuje chemickými reakcemi. Polypyrrol se dá nitrovat v β poloze a elektrochemickou redukcí nitroskupiny se získá aminoskupina vhodná pro další kovalentní vazbu biomolekul.



Jinou možností je reakce PPy s nitrobenzoylchloridem, nitroskupinu pak lze redukovat chemicky zinkem v kys. octové.

Není možné získat aminoskupinu přímou elektropolymerací (podlehla by oxidaci na hydroxylaminovou skupinu), na druhou stranu se dá připravit polynitrofenol, který pak elektrochemickou redukcí poskytne volné aminoskupiny. K elektropolymeraci se dají použít také vhodné deriváty biomolekul⁴⁸ ve směsi např. s pyrrolem. K postranním skupinám enzymů je možné připojit pyrrolová jádra a po skončení elektropolymerace je tak enzym součástí řetězce polymeru.



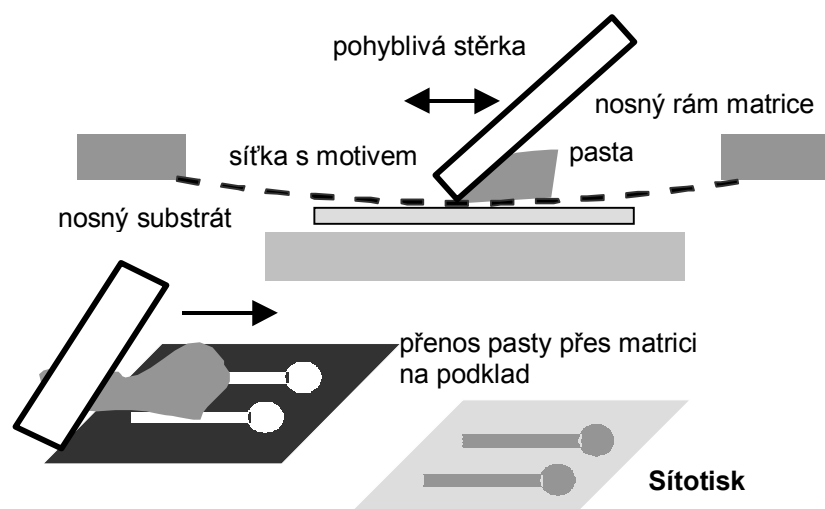
Elektropolymerovat lze indoly, bromthymolová modř, thiofen, thionin, pyrogallol, katecholy.

Masová produkce biosensorů

Pro široké uplatnění biosensorů v praxi je zapotřebí zajistit snadnou dostupnost levných systémů v dostatečném množství. Vychází se především ze zkušeností elektronického průmyslu, kde je masová výroba součástek velmi dobře zvládnuta. Konstrukce fyzikálně-chemického převodníku má k elektronice velmi blízko, jistým úskalím zůstává začlenění biochemické komponenty. Dnes se uplatňují především techniky tlustých a tenkých vrstev.

Sítotisk⁴⁹

Sítotisk (screen printing) vychází z elektronické technologie tlusté vrstvy. Vlastní postup je obdobný jako při tisku grafických listů. Na nosnou podložku se **tiskem přes matici** postupně nanáší různé pastovité vrstvy (past, ink), které po vytvrzení vytváří jednotlivé elementy biosensory. Tiskové pasty jsou směsí **práškovitého materiálu** konečné vrstvy (např. směs grafitového prášku a pojiva) a organického **rozpuštědla**, aby se získala viskózní tekutá pasta. Řada past je přitom dostupná z oblasti elektroniky, jiné pasty jsou vyvíjeny speciálně pro biosensory. Sítotiskový stroj (např. firma DEK) je principiálně velmi jednoduchý.



Na stolek se přichytí podkladový materiál, na jeho horní stranu pak přiléhá rám nesoucí tiskovou matici (ocelové nebo plastové síto s motivem), na kterou se nanese pasta. Pohyblivou pružnou stěrkou se pasta protlačí maticí na podklad.

Poté se vytvořená vrstva ustálí (usušení nebo vypálení). Postupně lze pomocí různých matic nanášet různé vrstvy podle požadované funkce celého systému. Obvykle se na jednom podkladu vytvoří současně více sensorů (10 a více).

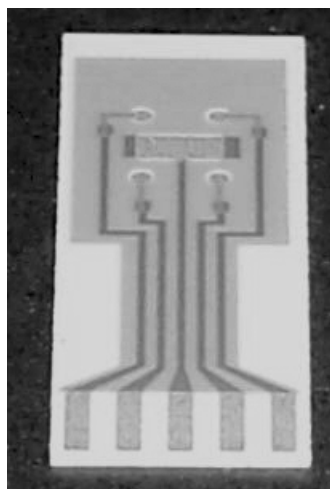
Pro **podklad** se mohou použít různé materiály. Keramické destičky (na bázi korundu) jsou mechanicky velmi odolné a umožňují následné vypalování past za vysokých teplot.

⁴⁸ Yon-Hin BFY, Lowe CR. *J. Electroanal. Chem.* **374**, 167 (1994).

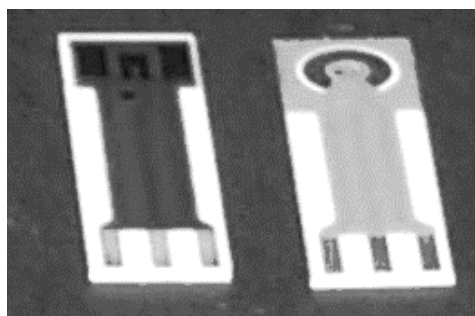
⁴⁹ Prudenziati M. *Thick Film Sensors*, Elsevier, Amsterdam, 1994.

Nevýhodou je nutnost řezání laserem. Plastová folie (PVC) je ohebná a velmi levná, snadno se dá dodatečně stříhat. Někde mezi nimi se nachází „green tape“ (DuPont), materiál používaný při výrobě desek plošných spojů; je to flexibilní keramika, dá se snadno mechanicky opracovávat (vrtání, řezání), může sloužit jako horní krycí vrstva v sendvičovém uspořádání.

Past existuje celá řada komerčních (firmy Acheson, DuPont), ale dají se namíchat i v laboratorních podmínkách. Po nanesení se buď vysuší v sušárně, nebo se mohou vypalovat ve speciální atmosféře, přičemž vznikají slinuté materiály. Rozdělit se dají podle funkce vytvářené vrstvy. Pro **vodivé spoje** se používají stříbrné pasty, levnější jsou grafitové pasty.



Elektrody se dají vytvářet na bázi kovů (platina, zlato, stříbro); výsledné vrstvy pak mimo částičky kovu obsahují navíc sklovité pojivo, to však běžným elektrochemickým aplikacím nevádí. Grafitové kompozitní vrstvy se používají asi nejčastěji. Mimo grafitový prášek je přítomné organické pojivo, navíc se dají přidat různé mediátory přenosu elektronů nebo modifikující látky. **Referentní** elektrody se připravují ze směsi stříbra a chloridu stříbrného. Důležité jsou **krycí vrstvy** izolující vodivé spoje a případně vymezující prostor pro nanášení biovrstev.



K dispozici jsou také směsi pro sítotiskové nanášení **biokatalytických vrstev** sestávajících z enzymu a vhodného pojiva, vytvrzovat se mohou ozářením ultrafialovým světlem. Ukázky reprezentují tuzemské produkty firmy Krejčí Engineering; nahoře je čtyřkanálový sensor, dole pak různé jednokanálové systémy.

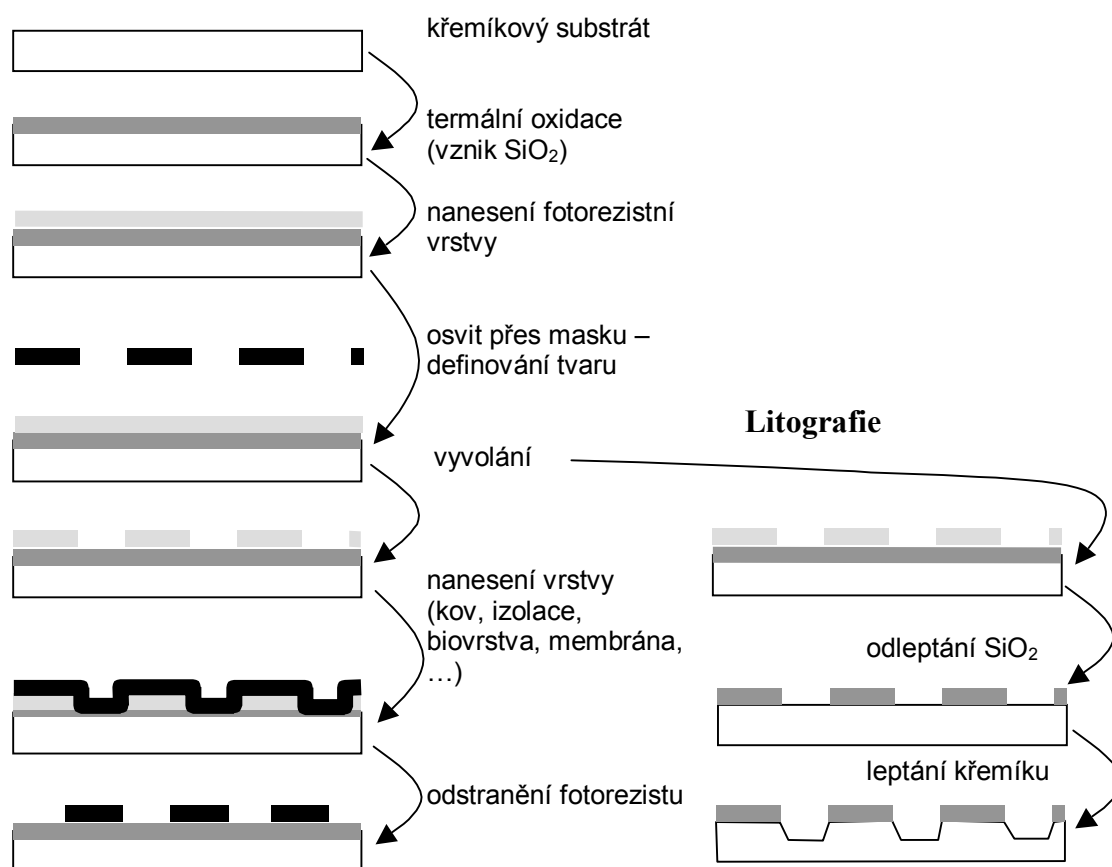
Tloušťky vrstev jsou obvykle kolem 10 až 20 μm , dosažitelné horizontální rozlišení je dáno jemností sítky a pohybuje se kolem 10 μm . Finanční náklady na tuto technologii nejsou příliš vysoké, výhodou je, že přechod od malých pokusných sérií po masovou produkci je velmi snadný.

Litografie

Litografie nebo tenkovrstvá technologie je dnes základem mikroelektroniky. V oblasti biosenzorů se uplatňuje nejen pro výrobu základního chemického senzoru, ale dá se využít

také k produkci integrovaných mikroanalytických systémů, jakési miniaturní laboratoře na povrchu čipu. Oproti tlustovrstvé technologii je zde základním materiálem křemík (silicon wafer), nanášené materiály jsou pak tvořeny čistými kovy, rozlišení je o řád lepší (pod 1 μm). Na druhou stranu jsou také nutné podstatně vyšší vstupní náklady.

Základní křemíková destička (tloušťka 0.4 mm, průměr 8 cm) se nejprve povrchově oxiduje. Poté se na ni nanese fotorezistní vrstva, která se osvití přes masku. Tím se v ní definuje žádaný geometrický tvar (obdoba fotografického procesu). Při vyvolání se v osvětlených místech fotorezist odstraní.



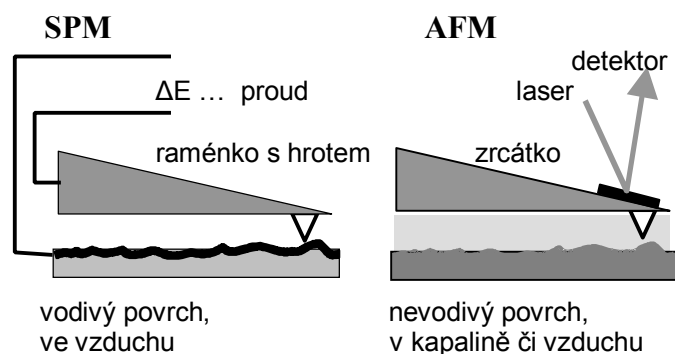
Tam pak lze nanášet žádané vrstvy, po odstranění fotorezistu (lift-off) pak nanesená vrstva zůstane pouze v místech osvětlených přes matrici. Nebo naopak je možné provádět odleptávání křemíku v místech nekrytých fotorezistem. Opakováním těchto postupů je možné vytvářet složité třírozměrné struktury, je také možné spojovat různé čipy k sobě (annealing) a tak vytvořit například průtočné systémy. Tyto postupy (micromachining) byly použity k výrobě miniaturních motorků (základ pro čerpadla) nebo ventilů ovládajících tok kapaliny.

Mikrosystémová technologie zahrnuje miniaturní zařízení rozměrů 1 mm až 1 nm; dolní oblast je předmětem zájmu **nanotechnologie**. Mimo vlastní funkci biosensoru je zde navíc systém manipulace se vzorkem. V budoucnu lze očekávat integrované systémy, obsahující na jediném čipu několik různých biosensory, průtočný systém, kalibrační roztoky a

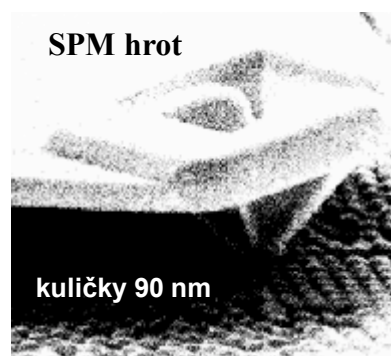
vyhodnocovací elektroniku. V laboratorních podmínkách již existují funkční modely takovýchto systémů.

Nanotechnologie

Pro charakterizaci povrchových struktur se mimo elektronové mikroskopie zabývají také techniky založené na „osahávání“ studované oblasti miniaturním hrotem (SPM, scanning probe microscopy). Získá se tak vlastně třídídimenzionální profil studovaného povrchu.

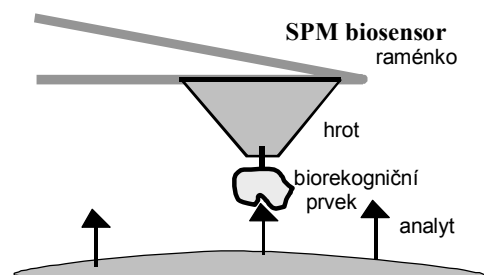


Starší technika STM (scanning tunnelling microscopy) je vhodná pro vodivé povrchy a pracuje se pouze v suchém stavu. Hrot na konci raménka (cantilever) se pohybuje horizontálně (používají se piezoelektrické vychylovací systémy) přes zkoumaný povrch.



Při zmenšování vzdálenosti mezi hrotem a povrchem dojde konečně k přenosu elektronu pomocí tunelového efektu, velikost měřeného proudu je exponenciálně úměrná vzdálenosti. Technika AFM (atomic force microscopy) je založena na mezimolekulových silách (Lennard-Jonesův potenciál). Hrot je tlačěn k povrchu, přičemž se vychyluje podle jeho profilu.

Vychylování se zaznamenává pomocí laserového paprsku, které se odráží miniaturním zrcátkem na povrchu raménka. Je možné studovat nevodivé povrchy a pracovat v kapalném prostředí, takže tato technika je vhodná pro studium interakcí biomolekul v jejich nativním stavu. Rozlišení je tak vysoké, že je možné pozorovat přímo jednotlivé molekuly. Existují úspěšné pokusy pomocí hrotu „posouvat“ molekuly po povrchu nebo je rozmisťovat v přesně daných pozicích s přesností v oblasti nm. Dostáváme se tím do oblasti nanotechnologií.



Využití je nejen při charakterizaci povrchů biosensorů, ale tento hrot je možné modifikovat imobilizací vhodných biorekogničních molekul, čímž dostáváme biosensor teoreticky schopný detekovat jednotlivé molekuly analytu.

V současnosti byl tento postup zatím použit pouze pro přímé měření síly potřebné k přerušení některých bioafinitních interakcí „roztržením“ existující vazby. Některé výsledky jsou shrnuty v tabulce.

Interakce	Síla (pN)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)
avidin – biotin	160 ± 20	60	90
streptavidin – biotin	260 ± 120	77	134
anti biotin IgG – biotin	240 ± 20	proměnlivé	proměnlivé
(ACTG) ₅ – (CAGT) ₅	1500 ± 200	117	430

Průtočné techniky

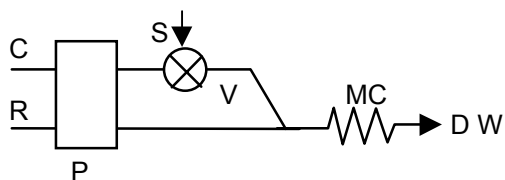
Techniky používající pro transport vzorku nebo pomocných reagentů tok nosné kapaliny umožňují zrychlení a automatizaci analytických postupů a prosazují se výrazně i v kombinaci s biosensory jako specifickými detektory. Variantou velmi blízkou biosensoru je použití průtočného bioreaktoru (enzymového či imunochemického) ve spojení s klasickým detektorem (fyzikálním převodníkem). Tyto techniky zahrnují dnes zejména průtokovou injekční analýzu a mikrodiálýzu.

Průtoková injekční analýza⁵⁰

Tato metodika je známá pod zkratkou FIA (flow injection analysis). Základy FIA formulovali Růžička s Hansenem⁵¹, principem je vlastně nástřik vzorku do toku nosného média a jeho definované naředění - disperze. Disperzní faktor D je dán poměrem původní koncentrace vzorku a maxima koncentrace v zóně vzorku procházející detektorem, $D = C_0/C_{\max}$. Velikost D se může u různých aplikací lišit, ale vždy musí být u daného případu dosažena reprodukovatelnost D . FIA systém je tvořen pumpou P , vedením pro nosné médium C (carrier) a pomocný reagent R .

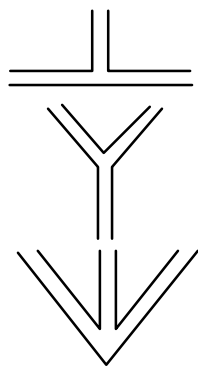
⁵⁰ Karlberg B., Pacey G. E.. *Flow Injection Analysis - A Practical Guide*. Elsevier, Amsterdam, 1989.

⁵¹ Růžička J., Hansen E. H.. *Anal. Chim. Acta* **78**, 145 (1975).



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).

Pro **vedení** kapalin se používají nejčastěji hadičky o vnitřním průměru 0.5 až 1 mm, materiálem je polypropylen, teflon, PVC nebo silikonová guma. **Pumpa** je nejčastěji **peristaltická**. Základem je krokový motor, ten otáčí diskem, který má na obvodu několik otočných válečků - rolerů. Ty při svém pohybu tlačí na pružnou hadičku, a tak vytlačují kapalinu. Výsledný tok je mírně pulzující (způsobeno odvalováním rolerů), hladký tok se dosáhne buď zvýšením otáček pumpy (alespoň 30 rpm) nebo větším počtem rolerů (minimum 2, běžně 4 až 10). Je vhodné, aby pumpa měla více kanálů (2 až 4). Hadičky jsou ze silikonu, tygonu (průhledné PVC) nebo jiných odolnějších materiálů. Průměr hadičky spolu s rychlostí otáček určuje průtok, různé hadičky umožňují různé průtoky v jednotlivých kanálech pumpy. Delší životnost hadiček se dosáhne promazáním otáčivého systému silikonovým olejem, současně se zmenší i pulzy a ohřev hadiček. Bezpulzní tok dosahují **lineární pístové** pumpy, které jsou bohužel podstatně dražší. Průtoky (flow rate) jsou kolem 0.1 až 5 ml/min, lineární rychlost toku je samozřejmě závislá na průměru trubiček. Pokud je potřeba pracovat s organickým rozpouštědlem, které narušují hadičky v pumpě, je možné použít uzavřenou láhev naplněnou organickou fází, která se vytlačuje do systému vodou přitékající z pumpy.



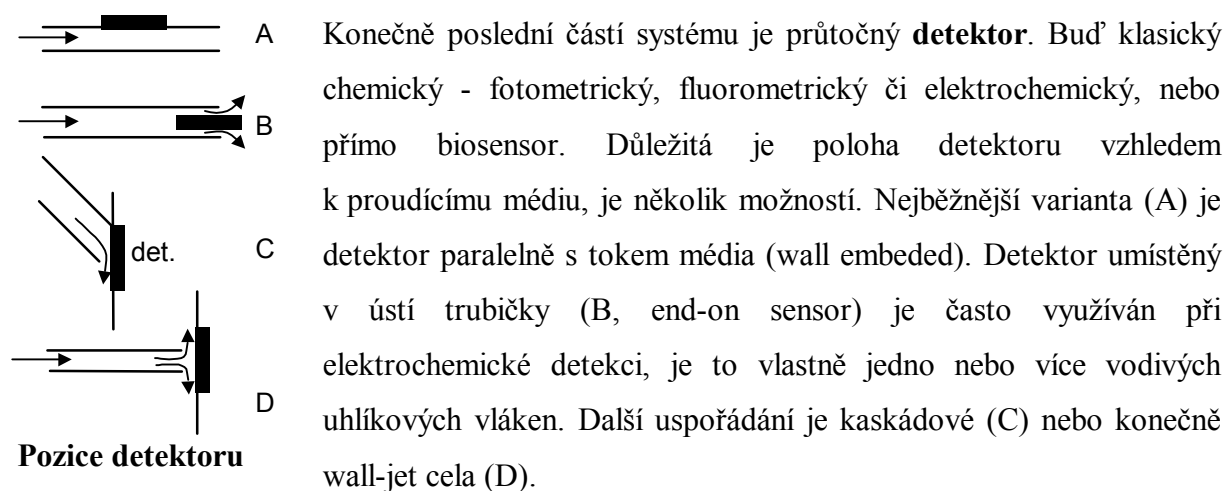
Spojky T, Y, W

Spojovací komponenty zahrnují šroubovací konektory pro spojování trubiček navzájem nebo s ventily či detektory. Spojky pro smísení dvou toků mohou být ve tvaru Y, T nebo W. Reakční a míchací smyčky jsou poměrně velice variabilní. Pokud k tomuto účelu slouží ohebné trubičky délky 100 až 1000 mm, obvykle se hustě navinou do spirály na vodorovné nosné tyčce průměru 2 až 40 mm, k mísení se dá využít i gravitace při proudění ve svislé spirále. Jinou možností je "zauzlovaná" trubička (knitted coil).

Používají se také různé kolonky naplněné kuličkami, podle průměrů kolonky a jednotlivé kuličky se dostane řada možností od řetězce kuliček (single string glass beads) až po homogenní náplně. U komerčních FIA systémů se používají různé labyrintové komůrky v plastu. Průběh mísení má podstatný vliv na velikost šumu základní linie signálu.

Ventily slouží především pro nástřik vzorku, k tomuto účelu se používá šesticestný dvoupolohový ventil se smyčkou pro nanesení vzorku, změnou polohy se smyčka zařadí do hlavního toku média. Materiálem je nerez v kombinaci s teflonem. Nástřik se nejjednodušeji

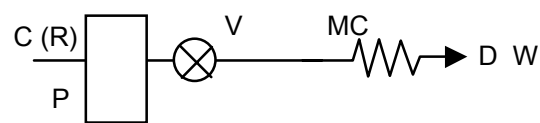
provádí ručně, stále častěji se dnes uplatňují elektricky ovládané ventily solenoidní, s krokovým motorem nebo pneumatické. Ty umožňují automatizaci průtočného systému.



Signál může být buď maximum nebo plocha píku odpovídající zóně vzorku prošlé detektorem. Ve druhém případě je zkruslena informace o průběhu gradientu koncentrace.

Dnešní FIA systémy zahrnují celou řadu dalších prvků, v rámci toku je možné provádět filtraci, dialýzu, extrakci, odstraňování plynů, ...

Pracovní mody FIA



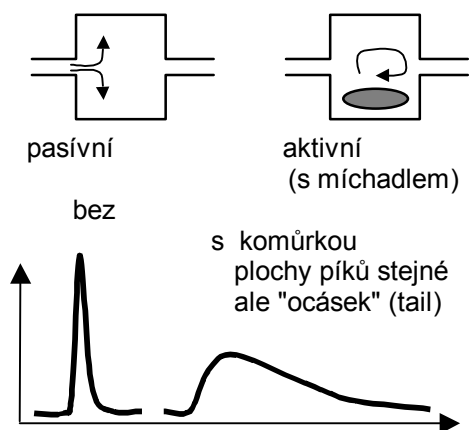
Pro použití ve spojení s biokatalytickými biosensory stačí jednolinkové uspořádání (**single line**).

Nástřik vzorku ventilem V může být automatizován přidáním druhé pomocné pumpy. Často není třeba ani přidávat žádné pomocné reagenty a nosným médiem je vhodný pufr. Specifickým detektorem je pak vlastní biosensor. Obměnou může být použití místo míchací smyčky **enzymového reaktoru** ve spojení s nescifickým detektorem. Toto uspořádání je výhodné pro enzymy s malou specifickou aktivitou, navíc je životnost bioreaktoru oproti enzymové vrstvě mnohonásobně vyšší. Také je možné použít odlišné podmínky pro biochemickou reakci (např. potřeba pufru blízkého pH optimu enzymu) a pro vlastní detekci (zvýšení pH pro detekci amoniaku), pro kterou se upraví podmínky přimísením vhodného pufru za výstup bioreaktoru.

Dvouliniová konfigurace **two-line** byla již znázorněna dříve. Další možnosti realizovatelné pouze s jednou pumpou jsou **merging zones**, kdy se dvěma ventily nastřikují zóna vzorku a zóna reagentu do dvou linií nosného média, které se poté smíchají. Používá se při drahém reagentu (NADH), vyžaduje synchronizaci obou ventilů. V uspořádání **reverse FIA** se vzorek dostupný v dostatečném množství nasává přímo do jedné linie kontinuálně, do

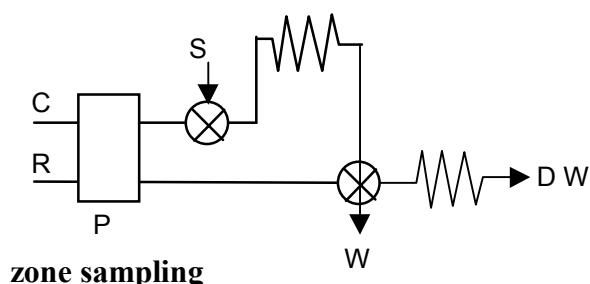
druhé se může nastříkovat reagent. Řada postupů je zaměřena na zvětšování disperzního faktoru.

Naředění v komůrce

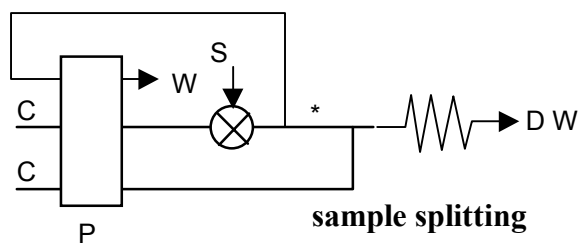


Běžně (rychlost průtoku, průměr trubiček, objem vzorku, délka míchací kolony) lze ovlivňovat D v rámci jednoho řádu, od hodnot kolem 3 do 20. Jedna možnost dosažení vyššího naředění je použití míchací komůrky (**mixing chamber**), kdy se nosné médium se vzorkem nechá protékat rozšířeným místem, případně vybaveným elektromagnetickým mícháním. Nevýhodou je záznam ve tvaru nízkého a širokého píku, který zpomaluje měření (dolní část obrázku).

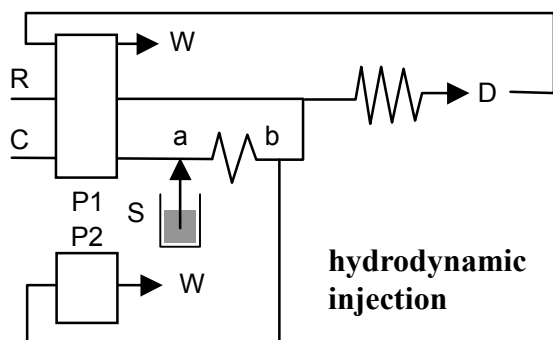
Metoda **zone sampling** používá vlastně opakovaný nástřik nejprve vzorku a pak jeho naředěné zóny. Časování obou ventilů je rozhodující faktor, lze dosáhnout naředění až 1000x.



zone sampling



sample splitting

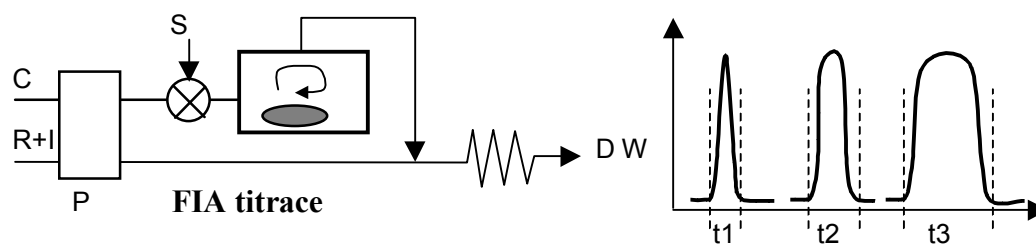


hydrodynamic injection

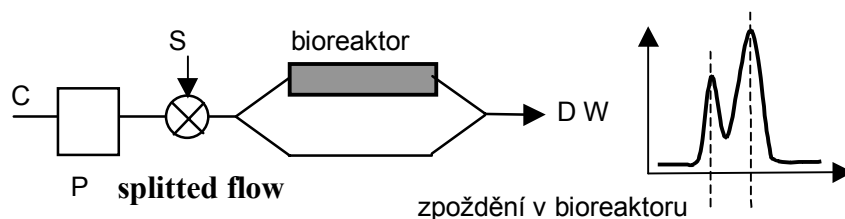
Jiná možnost je **sample splitting**, kdy se zóna nastříknutého vzorku částečně odvádí pryč. Kritické místo (označené hvězdičkou) existuje mezi body odvětvení (diversion) zóny se vzorkem a místa napojení druhé linie (merging), je zde nízká rychlost průtoku, která má podstatný vliv na dosažené zředění. Zajímavou možností dávkování vzorku bez použití ventilu je nanesení vzorku pomocí dvou pump, **hydrodynamický nástřik**. Při kombinaci P1 zapnutá, P2 vypnutá (P1 on, P2 off) pracuje systém v obvyklém uspořádání. Při přepnutí pump (P1 off, P2 on) se nasaje zóna vzorku do smyčky mezi body a, b, přitom je zablokován zpětný tok zavedením výstupu z detektoru do odpadu přes pumpu P1, ta při zastavení tuto i další linie uzavře, P2 pak nasává vzorek.

Konečně při návratu do výchozího stavu (P1 on, P2 off) se zachycená zóna vzorku pohybuje dále v systému. Přesnost dávkování je dána časováním obou pump. Pomocí FIA se dají

jednoduše provádět **titrace**. Vzorek se nastříkne do linie s míchací komůrkou, a poté se měří plocha píku odpovídající jedné barvě acidobazického indikátoru. Doba do odbarvení pak určuje spotřebu činidla potřebnou k dosažení bodu ekvivalence.

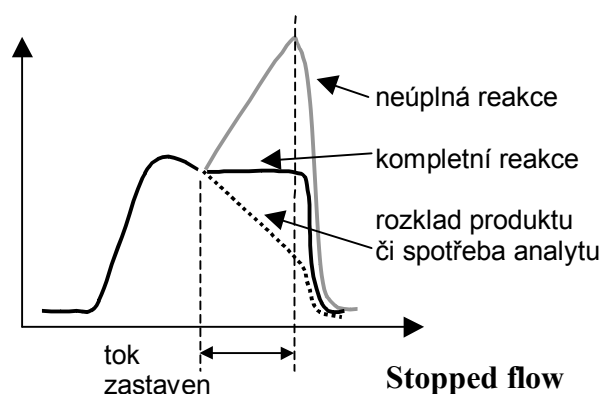


Další moderní variace zahrnují zpětný tok zóny vzorku zpět z detektoru (**reverse flow**). Tak vlastně do detektoru nevstupuje závěrečná roztažená část píku (tail) a měřený pík je symetrický (stejná část se vlastně zaznamenává dvakrát).



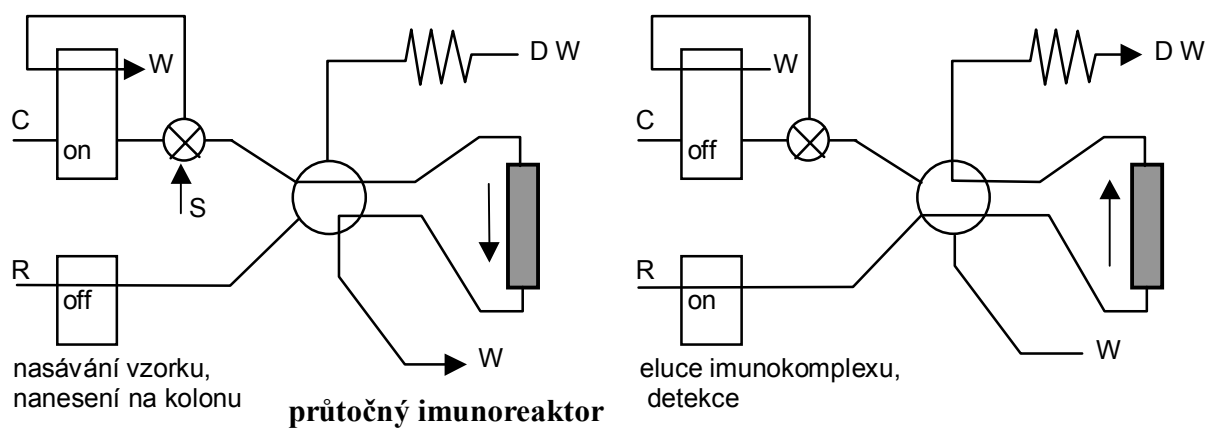
Výhodné může být rozdělení vzorku na dvě linie (**splitted flow**), z nichž jedna např. projde bioreaktorem.

Před vstupem do detektoru se obě větve spojí, přičemž na záznamu se objeví dvě maxima. Příkladem může být stanovení dvou reagentů vedle sebe. Např. sacharóza a glukóza ve vzorku: detektor je biosensor s GOD, v bioreaktoru je imobilizována invertáza s mutarotázou; první pík odpovídá volné glukóze, druhý pak navíc glukóze vzniklé v reaktoru ze sacharózy. Podobně lze při bioreakcích produkujících detekovaný amoniak určit volný amoniak ve vzorku.



Zastavení toku (**stopped flow**) v době, kdy je zóna vzorku v detektoru, může poskytnout cenné informace o dějích v detektoru (biosensoru). Podle tvaru záznamu lze usuzovat na reakční průběh.

Průtočné techniky dnes stále více pronikají také do oblasti imunochemických stanovení, kde přináší zrychlení analýz a zlepšení reprodukovatelnosti výsledků díky opakované regeneraci téhož imunospesifického nosiče. Často je používán velice komplikovaný systém, nejjednodušší varianta sestává ze dvou pump a ventilů sestavených podle obrázku dole.



Vývoj zde stále pokračuje, nedávno byl například vypracován koncept obnovitelného průtočného bioreaktoru na bázi zachycených částic nesoucích biokomponentu⁵².

Komerčně dostupné biosensory⁵³

V dnešní době již biosensory nepatří mezi laboratorní kuriozity, ale úspěšně se uplatňují v reálném světě. Prvním komerčním biosensorem z roku 1972 byla enzymová elektroda pro laboratorní měření hladiny krevní glukózy od firmy Yellow Springs Instruments. Dalším výrazným mezníkem bylo uvedení osobního glukometru GlucoPen **Exactech** firmou MediSense v roce 1987. V současnosti již jde o desítky společností, které uvedly na trh biosensory pro celou řadu dalších analytů. Mezi předními producenty jsou firmy Yellow Springs Instruments (Ohio, USA), Fuji Electric (Tokyo), Seres (Francie). Do programu biosensorů jsou zapojeny i vyhlášené mezinárodní firmy jako Ciba-Geigy, Hoffman-La Roche, Bayer, Boehringer, Abbott Laboratories, Pharmacia nebo Eppendorf. Největšího rozšíření a komerčního úspěchu dosáhly osobní glukometry **Pen 2** a **Companion 2** (MediSense). Roční prodej dnes představuje asi 200 milionů USD, což je 10% celosvětových nákladů na stanovení glukózy. Možnosti rutinního uplatnění biosensorů lze nalézt v řadě oblastí. Přehled některých komerčních systémů podává následující část. Nejaktuálnější informace z této překotně se rozvíjející oblasti lze najít na webových stránkách příslušných firem.

⁵² Růžička J., Scampavia L. *Anal. Chem.* **71**, 257A (1999).

⁵³ Ramsay G., *Commercial Biosensors*, John Wiley, New York, 1998.

Klinická oblast

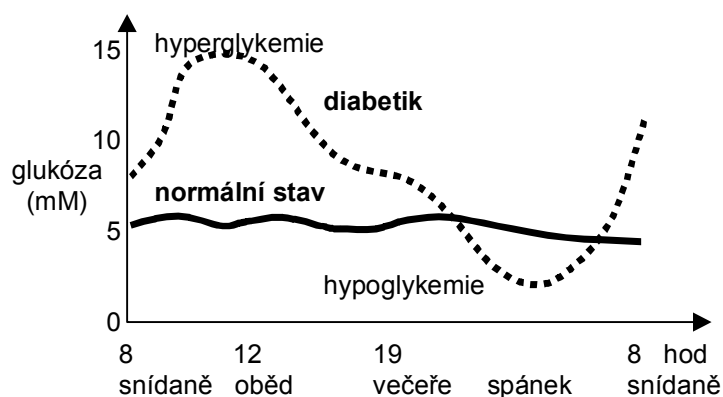
Největší pole použití je nesporně v klinické diagnostice. Převážnou část reprezentují in vitro stanovení prováděná v centralizovaných nemocničních laboratořích; jedná se o velmi lukrativní trh představující roční objem 9 mld USD, k dispozici je dnes již řada biosensorových systémů. Decentralizované uplatnění biosensorů zahrnuje přímo ordinaci lékaře, nemocniční pokoje, operační sály a sportovní medicínu; je znesnadňováno vyššími ekonomickými náklady a administrativními překážkami. Uživatelské aplikace určené široké veřejnosti budou vždy limitovány, výjimkou jsou osobní glukometry diabetiků, těhotenské testy, případně stanovení alkoholu. In vivo aplikace jsou směřovány především na výzkum umělého endokrinního pankreatu. Tyto systémy překonávají problémy spojené s biokompatibilitou, stabilitou signálu a vysokou spolehlivostí, což velmi zvyšuje výzkumné náklady. Navíc nejsou dořešeny legislativní a etické aspekty praktické aplikace těchto zařízení.

Stanovení glukózy u diabetiků

V oblasti klinické biochemické analýzy zůstává stále středem zájmu měření hladiny glukózy u diabetiků. Diabetes mellitus (cukrovka) a s ním spojené komplikace tvoří v dnešní době velký sociální problém. Kromě běžných poruch souvisejících s diabetem, jako je hyperglykemie, metabolická acidóza a glykosurie, se u diabetiků vyskytují i další komplikace, které výrazně ovlivňují kvalitu života pacientů.

Diabetes mellitus je klinicky definován jako chronické, endokrinní a metabolické onemocnění, vznikající v důsledku nedostatečného působení inzulínu. Existují dva typy tohoto onemocnění⁵⁴. 1. typ neboli inzulín-dependentní diabetes mellitus (IDDM, četnost 3 až 7 případů na tisíc osob) je charakterizován sníženou nebo prakticky chybící produkcí inzulínu, takže pacienti ho musí denně přijímat v injekčních dávkách. 2. typ je inzulín-independentní diabetes mellitus (NIDDM), pacienti na vlastní nebo injekčně podaný inzulín nereagují (rezistence). Vznik a vývoj komplikací při tomto onemocnění je velmi těsně spjat s porušenou regulací hladiny krevní glukózy. Za normálních okolností je koncentrace glukózy v krvi udržována mezi 4.4 a 6.6 mM pomocí zpětné vazby - nárůst koncentrace glukózy po jídle stimuluje rychlé uvolnění inzulínu, který umožní vstup glukózy dovnitř buněk a současně zabrání její tvorbě v játrech.

⁵⁴ National Diabetes Data Group. *Diabetes* **28**, 1039 (1979).



Denní průběh hladin krevní glukózy

Tato regulace je však u diabetiků porušena a musí se docílit vnějším podáváním inzulínu. Dávkování však vyžaduje znalost aktuální hladiny glukózy, takže pacienti jsou nuceni několikrát denně sami měřit glykemií.

A právě zde se velmi dobře uplatnily elektrochemické biosensory. Přenosné osobní glukometry představují podstatný podíl z celkového počtu analýz glukózy. První osobní glukometr na bázi výměnného elektrochemického biosensoru představila firma MediSense.



Distribuoval se pod názvem ExacTech a měl velikost psacího pera do kterého se zasunovaly měřící pásky na jedno použití, další verze Companion má formát karty. Nyní spadá MediSense do skupiny Abbott Laboratories a současný její glukometr je distribuován pod názvem **Precision QID**⁵⁵. Oproti předchozím verzím potřebuje nyní pro analýzu pouze 5 mikrolitrů krve, takže pacient je méně zatěžován.

Na tomto lukrativním trhu jsou samozřejmě zastoupeny také glukometry dalších firem. **Elite** (pro analýzu stačí pouze 3 mikrolitry krve) vyrábí japonské firmy Matsushita a Kyoto Daiichi Kagaku, distribuje ho také Bayer⁵⁶. **Accu-Chek Advantage** (Boehringer Mannheim⁵⁷) na rozdíl od ostatních nevyužívá k výrobě páskových biosensorů sítotisk, ale originální vícevrstvou laminátovou technologii. Mimo to se používají také reflektometrické systémy Encore (Bayer), One Touch (existuje ve verzích Basic a Profile, vyrábí firma LifeScan patřící pod Johnson & Johnson), Accu-Chek (verze Instant a Easy, Boehringer). Hlavním cílem však zůstává implantovatelný glukózový biosensor pro měření in vivo, který by přímo řídil pumpu dávkující kontinuálně inzulín podle okamžité potřeby pacienta⁵⁸. I když jsou výsledky vývoje

⁵⁵ <http://www.abbottdiagnostics.com>

⁵⁶ http://www.bayerdiag.com/product_info/self_test/elite/elite2.html

⁵⁷ <http://www.boehringer-mannheim.com>

⁵⁸ Reach G., Wilson G.S. *Anal. Chem.* **64**, 381A (1992).

prováděného paralelně asi na desítky různých pracovišť v celém světě nadějně - po implantaci fungují biosensory až 100 dnů, komerční systém dosud není k dispozici. Problémy jsou zejména se spolehlivostí a dostatečně dlouhou operační stabilitou.

Laboratorní analyzátory s biosensory

Tato oblast má velmi dlouhou tradici. První laboratorní biosensorový analyzátor měřil pouze koncentraci glukózy, dnešní systémy měří mimo to řadu dalších klinicky významných analytů. Přehled systémů uvádí následující přehled:

Název	Výrobce	Analyty (glukóza +)
AUTOSTAT	Daiichi (Japonsko)	
EBIO Plus	Eppendorf / BST (Německo) ⁵⁹	laktát, citrát, askorbát, ...
Enzymat	Seres (Francie)	sacharóza, alkohol, ...
ESAT	PGW Medingen (Německo)	laktát
EXSAN	(Litva)	laktát
GLUCO	Fuji Electric (Japonsko)	
i-Stat	I-Stat Corp. (USA) ⁶⁰	močovina
Model 860	Ciba Corning (USA)	
NOVA 16	Nova Biomedical (USA)	močovina, kreatinin
Satellite G	MediSense (USA)	
YSI SELECT	Yellow Springs Instruments (USA) ⁶¹	laktát, etanol, cholin, ...

Většinou se jedná o malé stolní přístroje, často doplněné zásobníkem vzorků. Konceptně se z této skupiny vymyká ruční přístroj **i-STAT**. Vychází z předpokladu, že analýza vzorků v místě jejich odběru (operační sál, lůžko pacienta) může podstatným způsobem zkrátit dobu do získání výsledků. Pak lze také urychleně provést kroky vedoucí ke zlepšení stavu pacienta.



Byl proto zvolen multikanálový elektrochemický biosensor, poskytující informace o klíčových látkách, analyzovaných obvykle při krizových situacích pacientů. Základní modul na jedno použití obsahuje měřící sensory, zásobní roztok standardu a prostor pro nakápnutí vzorku krve.

⁵⁹ <http://eppendorf.com/katalog/eng98/eglucose.html>

⁶⁰ <http://www.i-stat.com>

⁶¹ <http://www.ysi.com/ysi/medweb.nsf>

Jsou měřeny sodík, draslík, chloridy, oxid uhličitý, pH, močovina, glukóza a hematokrit, program pak dopočítává další parametry jako např. koncentrace hemoglobinu, přebytek bází a podobně. Hlavním kritériem při vývoji bylo minimalizovat možnost chyb způsobených uživatelem (pouze naplní otvor pro vzorek krve a zasune modul do přístroje) a zaručit vysokou kvalitu výsledků (ve výměnné kartridži je inkorporován kalibrační roztok). V rukou uživatelů - lékařů a sester - přístroj poskytuje výsledky srovnatelné kvality jako centrální laboratoř. I když byl tento přístroj původně směřován pouze do nemocnic, objevuje se i v ordinacích praktických lékařů a veterinářů, dokonce ve vojenství a objevil se na palubě při letech raketoplánů.



Potravinářství a fermentační průmysl

Potenciálně mnohem větší trh by mohl existovat v potravinářství. Menší zisky v této oblasti oproti klinice však snižují ochotu investovat do nákladných analytických systémů, nicméně stimulačně by mohla působit nová legislativa v oblasti kontroly kvality potravin. Nelze očekávat masové začlenění biosensorů přímo do výrobních linek (in line), neboť zatím nejsou kompatibilní s používanými sterilizačními postupy. Spíše půjde o biosensorové systémy analyzující kontinuálně odebírané vzorky (on line). Další oblastí pak je kontrola čerstvosti potravin (off line systémy). Z hlediska analytů budou převládající stanovení sacharidů, některých vitamínů a detekce bakteriální kontaminace. Pro tento účel je na trhu k dispozici biosensorový systém detekce bakterií Midas Pro od firmy Biosensori (Itálie). Důležité je také hodnocení kvality produktů, při kterém se neměří určitý konkrétní analyt, ale jde spíše o umělou náhradu smyslových orgánů - vůni by měl hodnotit "elektronický nos" a chuť "elektronický jazyk". Tyto systémy obsahují soubor různých více či méně specifických biosensorů (často je biorekogniční složkou lipid), a jako parametr slouží komplexní odezva tvořená více parametry (pattern analysis).

Ochrana životního prostředí

Velmi perspektivní je použití biosensorů při ochraně životního prostředí, zvláště dobře by se uplatnily přenosné systémy. V současnosti je nejpropracovanější vodohospodářství - sledování znečištění zdrojů pitné vody a vodních toků. Uplatnění nalézají monitorovací systémy založené na celých buňkách, schopné reagovat na přítomnost širokého spektra toxických látek. Off line systémy se používají při laboratorní detekci jednotlivých škodlivin, vyvíjí se automatizované imunochemické systémy, schopné stanovit paralelně několik analytů. Dlouhou tradici má rychlé biosensorové stanovení biologické spotřeby kyslíku (BOD), které zkracuje dobu analýzy na několik minut. BOD sensor založený na mikrobiální vrstvě byl vyráběn již od roku 1983 v Japonsku firmou Nisshin Electric. Jistým problémem zůstává korelace BOD údaje z biosensory s oficiálním parametrem BOD₅, což komplikuje nedostatečná úprava legislativy.

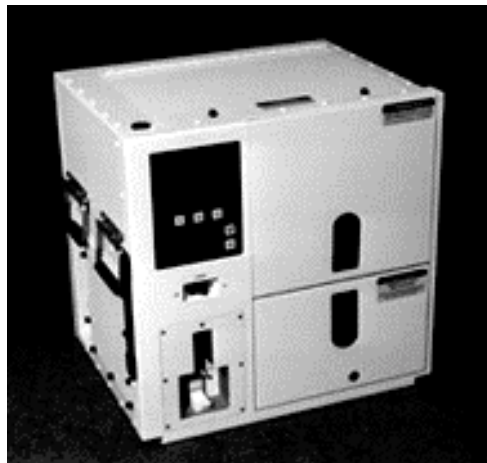
Mimo BOD se objevují také první imunosensory pro stanovení pesticidů. Jednotlivé dostupné systémy z této oblasti uvádí tabulka:

Název	Výrobce	Měření
ARAS	Dr. Lange (Německo)	BOD
BOD-Module	Medingen (Německo)	BOD
SmartSense	Ohmicron (USA)	pesticidy

Vojenská a bezpečnostní oblast

Armády mají velký zájem o biosensorové monitory vhodné jednak pro osobní použití, jednak jako mobilní jednotky pro mobilní polní detekční systémy. Vojensky významné analyty zahrnují chemické a biologické zbraně a k nim přistupuje potřeba stanovení výbušnin ve vojenských cvičných prostorech. Pro potřeby policejních jednotek se vyvíjí biosensory pro detekci drog při celních kontrolách. Chemické zbraně reprezentují bojové otravné látky ze skupiny nervově paralytických sloučenin jako sarin a soman. Inhibují cholinesterázu, což se také využívá v detekčních systémech na bázi biosensorů. Již mnoho let existuje detektor **NAIAD** od firmy Thorn EMI, využívající průběžnou elektrochemickou detekci aktivity imobilizované cholinesterázy. Miniaturizovaný biosensor tohoto typu pro osobní použití se vyvíjí také u nás. Zájem o tuto oblast výrazně stoupl po skončení války v Perském zálivu (1991), mimoto byl sarin použit teroristy při útoku na tokijské metro (1995).

Biologické zbraně jsou předmětem zájmu v souvislosti se situací v Iráku, kde Saddámův režim vlastní zásoby různých bakteriologických zbraní a toxinů. Mimo vojenskou oblast existuje značná obava ze zneužití těchto látek teroristy, protože jejich příprava je ve srovnání s jinými zbraněmi hromadného ničení velmi snadná.



Dostupný je **BioDetector**, vyvinutý společně americkou armádou a firmou ETG (Environmental Technologies Group⁶²), pracuje na bázi vícekanalového LAPS systému. Je to mobilní přístroj umožňující stanovit 8 vybraných biologických bojových prostředků.

Z dalších dokončovaných systémů lze zmínit **MiniFlo**, specifickou detekci bakterií a virů na bázi kombinace průtokové cytometrie a specifického fluorescenčního označení. Armádní laboratoře také dokončují vývoj miniaturizovaného přenosného systému pro detekci specifických sekvencí DNA nebezpečných mikroorganismů.

Bioafinitní systémy pro výzkum

Teoretické základy těchto biosensorů byly již probrány dříve. Dnes se nejvíce uplatňuje systém **BIAcore** (SPR, rezonance povrchových plazmonů) od firmy Pharmacia⁶³ jako univerzální biosensor pro studium afinitních interakcí biomolekul, a samozřejmě také pro praktické stanovování látek. Druhá oblast je samozřejmě dána konkrétními požadavky a možnostmi uživatele, protože jednotlivé biosensory pro individuální analyty k dispozici nejsou a každý si musí imobilizovat příslušný biorekogniční element samostatně. Konkurenční systém **IAsys** (rezonanční zrcadlo) vyrábí firma Affinity Sensors⁶⁴ z Velké Británie. Další systém **BIOS-1** (mřížkový optický sensor) vyrábí malá švýcarská firma ASI. Na bázi SPR pak existují ještě zařízení **BioTul**⁶⁵ (BioTul, Německo) a **IBIS**⁶⁶ (XanTec,

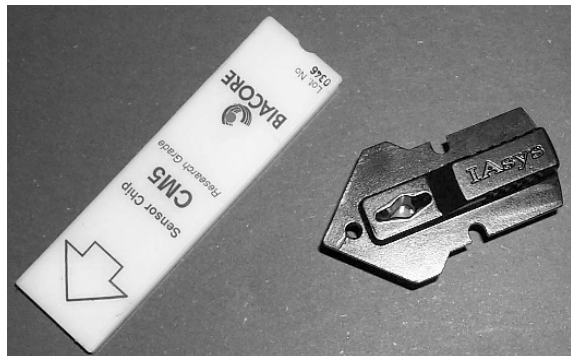
⁶² <http://www.envtech.com>

⁶³ <http://www.biocore.com>

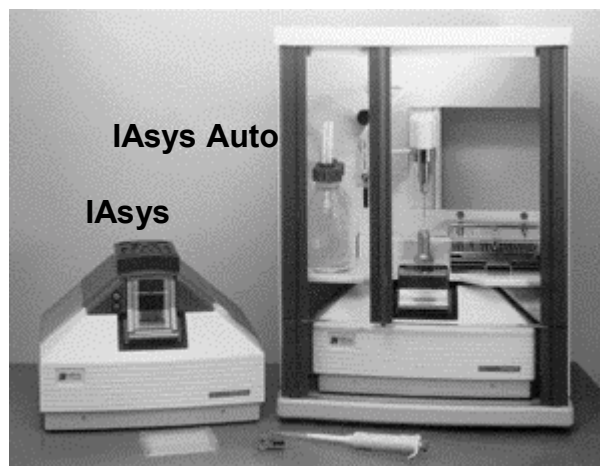
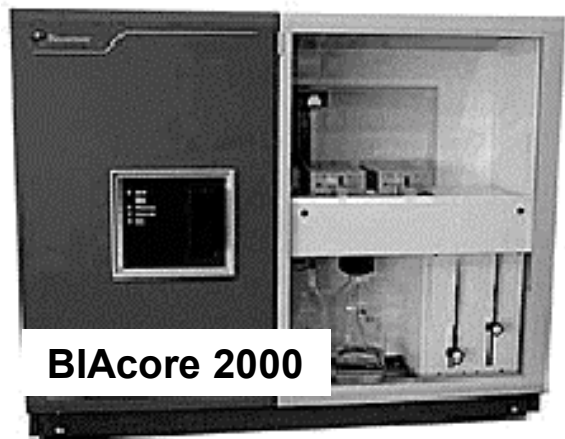
⁶⁴ <http://www.affinity-sensors.com>

⁶⁵ <http://www.biotul.com>

Německo \ HongKong). Ceny jednotlivých produktů se pohybují mezi 50 tis. USD (BioTul) až do 300 tis. USD (BIAcore) v závislosti na stupni automatizace. Z piezoelektrických systémů vhodných pro afinitní studie lze zmínit systém **PZ 108** firmy Universal Sensors (USA) a **QCM-D** švédské firmy Q-Sense⁶⁷. Ceny se pohybují kolem 10 tis. USD.



Výměnné biosensory systémů **BIAcore** a **IA sys**. Kompletní měřicí systémy jsou ukázány na obrázcích dále.



Nukleové kyseliny

Pro detekci nukleových kyselin je nabízen firmou Molecular Devices (USA)⁶⁸ systém Threshold, který je nicméně aplikovatelný pro libovolné afinitní interakce, využívá LAPS biosensor a značení pomocí ureázy. Nicméně hlavní směr reprezentují systémy využívající čipy nesoucí mnoho různých hybridizačních průb sloužících k detekci určité sekvence nukleové kyseliny, případně je umožněno zmapování mutací narušujících správnou funkci určitého genu. Další aplikace umožňují detekci bakterií nebo virů (HIV). Tyto čipy - "gene arrays" produkuje celá řada firem⁶⁹, lze jmenovat např. Affymetrix, Hyseq, Nanogen či Virtek.

⁶⁶ <http://www.xantec.com>

⁶⁷ <http://www.q-sense.com>

⁶⁸ <http://www.moldev.com>

⁶⁹ <http://www.affymetrix.com> <http://www.hyseq.com> <http://www.nanogen.com> <http://www.virtek.com>

Perspektivy biosensorů

V minulých dvou desetiletích byl zájem soustředěn především na biokatalytické systémy pro stanovení biologicky významných nízkomolekulárních látek v klinické praxi s použitím enzymů ve spojení s elektrochemickými sensory - hlavně potenciometrickými a amperometrickými elektrodami. Stimulujícím faktorem byla potřeba rychle a spolehlivě sledovat hladinu glukosy u diabetiků; přes dosažené pokroky a komerčně úspěšné systémy (tab. I) tento problém dodnes není zcela dořešen. V posledních několika letech se pozornost předních vědeckých pracovišť přesouvá k bioafinitním systémům, založeným na vysoce specifických vazebných interakcích biomolekul, zejména protilátek s odpovídajícími antigeny a hapteny. Využívají se převážně integrované optické systémy na bázi světlovodů, biochemické interakce se vyhodnocují ze změn při odrazu a vedení světla na fázových rozhraních. Začíná se prosazovat miniaturizace a komerční produkce biosensorů. Vedle medicíny se uplatnění nachází při ochraně životního prostředí a zájem se upírá i na potravinářský průmysl.

Nové trendy

Některé směry pro další výzkum byly navrženy Evropskou unií. Výzkum by se měl soustředit na problémy spojené s miniaturizací sensorů, dále pak na výrobní techniky, přípravu a chemickou modifikaci povrchů matric a sensorů, vývoj nových materiálů, značení a přípravu konjugátů, proteinové inženýrství, hledání nových enzymů, stabilizační postupy, biokompatibilitu, kinetiku a modelování, neinvazivní monitorování, interakce na rozhraních, chemické procesy v pevné fázi a chemometrii.

Složka biosensory poskytující snadno měřitelný signál zaznamenala v poslední době značné změny díky uplatnění nových technologických postupů z oblasti mikroelektroniky - sítotisku a litografie. Mikrofabrikace se používá k přípravě prostorových struktur, nezbytných pro integrované (bio)analytické systémy. Lze tak vytvářet např. komůrky, poskytující definované prostředí pro inkorporovaný bioelement, jinou možností je konstrukce mikrokanálek pro průtokové biosensory integrované na křemíkovém čipu. Existují snahy integrovat na křemíkový čip průtokovou injekční analýzu i kapilární elektroforézu, byly vyvinuty i mikromotory a mikropumpy. V poslední době se mikroelektronické postupy používají i k přípravě integrovaných planárních světlovodů, na nichž jsou založeny optické afinitní biosensory. Výhodami miniaturních (bio)sensorů jsou minimální objem vzorku a

potřebných chemikálií (lze použít velmi drahé reagenty), rychlost analýz a přenosnost zařízení. Další zmenšení funkčních elementů biosensorů až do oblasti kolem 10 nm bude výsledkem aplikace nanotechnologií.

V posledním desetiletí proběhly hluboké změny na poli afinitních biosensorů. Pro jejich konstrukci lze využít postupy známé u biokatalytických sensorů, pokud se jeden z reakčních partnerů vhodně označí enzymem nebo fluoreskující molekulou. Zásadně novým experimentálním přístupem je přímé sledování bioafinitních interakcí v reálném čase bez nutnosti značení. Mimo klasického analytického stanovení koncentrací analytů je s pomocí těchto technik možné studovat interakce biomolekul. V současnosti jsou však přímé optické biosensory velmi nákladná zařízení vhodná spíše pro laboratorní použití, nicméně přenosné systémy se také očekávají. Cenově dostupné jsou dnes piezoelektrické biosensory (o jeden až dva řády levnější než optické).

Převládající biospecifickou složkou jsou doposud enzymy, z nichž pak je zdaleka nejužívanější glukóza oxidáza. Dosud ne zcela dosaženým cílem je přímá elektrická komunikace mezi bílkovinou a fyzikálním převodníkem. Tento problém je reprezentován nejčastěji přenosem elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou. V budoucnu se bude stále více vycházet ze známé krystalografické struktury enzymů. Již dnes lze teoreticky „plánovat“ kudy může elektron v biomolekule nejsnáze projít a podle toho pak enzym orientovaně navázat na elektrodový povrch.

Využití nukleových kyselin na poli biosensorů začíná narůstat až v poslední době s rostoucí potřebou stanovovat oligonukleotidové sekvence bakteriálního, virového nebo lidského původu v klinické praxi. S postupem sekvenace lidského genomu se také objevují nové sekvence odpovědné za vrozené poruchy. K jejich detekci je nutné dosáhnout vysoké citlivosti; uvážíme-li délku lidské DNA (6×10^9 parů bází), pak v 1 ml krve (cca 8 milionů bílých krvinek) lze očekávat pouze cca 12 attomolů analytu! Naštěstí lze množství hledané sekvence znásobit (40 až 2000x) použitím PCR metody a tak dosáhnout meze detekce dnes běžných převodníků. Mikroelektronické postupy se v této oblasti prosazují prostřednictvím sekvenování hybridizací se souborem oligonukleotidů vázaných na křemíkovém čipu.

Dnes existuje řada pokusů použít v biosensorech zcela uměle připravené rekogniční elementy. Technika molekulárních "otisků" (molecular imprinting) spočívá v polymeraci vhodných monomerů v přítomnosti ligandu (analytu), který má být rozpoznáván. Ve struktuře polymeru se tak specifickým uskupením postranních funkčních skupin monomerů vytvoří kolem ligandu vazebné místo držené pohromadě strukturou polymeru i po uvolnění ligandu ("zapamatování"). Takto získané "umělé protilátky" jsou již dnes uplatňovány na poli

biosensorů. Pro konstrukci rekombinantních protilátek se mohou použít mimo původní nukleotidové sekvence odvozené z monoklonální protilátky i sekvence z knihovny DNA, která se získá náhodnými mutacemi sekvencí odpovídajících výchozím vazebným místům. Podobnými kombinatorickými postupy lze produkovat přímo peptidová vazebná místa pro daný ligand. Vychází se z velkého souboru (chemická knihovna) různých polypeptidových řetězců, mezi nimiž se vyhledají ty které interagují s ligandem. Obdobně je možné dokonce konstruovat vazebné molekuly tvořené polynukleotidovým skeletem.

Závěr

V současnosti jsou za zenitem rozvoje nesporně nejrozšířenější amperometrické biosensory; nejsou sice univerzální, avšak jsou levné a vyhovují velmi dobře pro řadu aplikací. Intenzivní výzkum na poli optických biosensorů přinesl řadu nadějných modelů, avšak překážkou je velmi vysoká cena bránící masovému rozšíření. Výrazné zlepšení v blízké budoucnosti asi nenastane. Nedá se očekávat ani větší uplatnění piezoelektrických a kalorimetrických systémů, ty budou vyhovovat jen pro některé speciální případy. Trh biosensorů se vyvíjí pomaleji než se původně očekávalo, některé vývojové problémy byly podceněny. Mimo dalšího studia mechanismů biomolekulárních interakcí bude klíčovým faktorem pro úspěch biosensorů zlepšení výrobního procesu vedoucího ke kvalitním a spolehlivým produktům.

Lze říci, že biosensory dnes úspěšně vystoupily z výzkumných laboratoří do reálného světa; nicméně přes mnoho dosažených úspěchů bude na tomto poli ještě řadu let co objevovat a zlepšovat.