

LOSCHMIDT
LABORATORIES



BIOSENSORY A JEJICH APLIKACE

Mgr. Šárka Bidmanová, Ph.D.

77580@mail.muni.cz

□ Historie

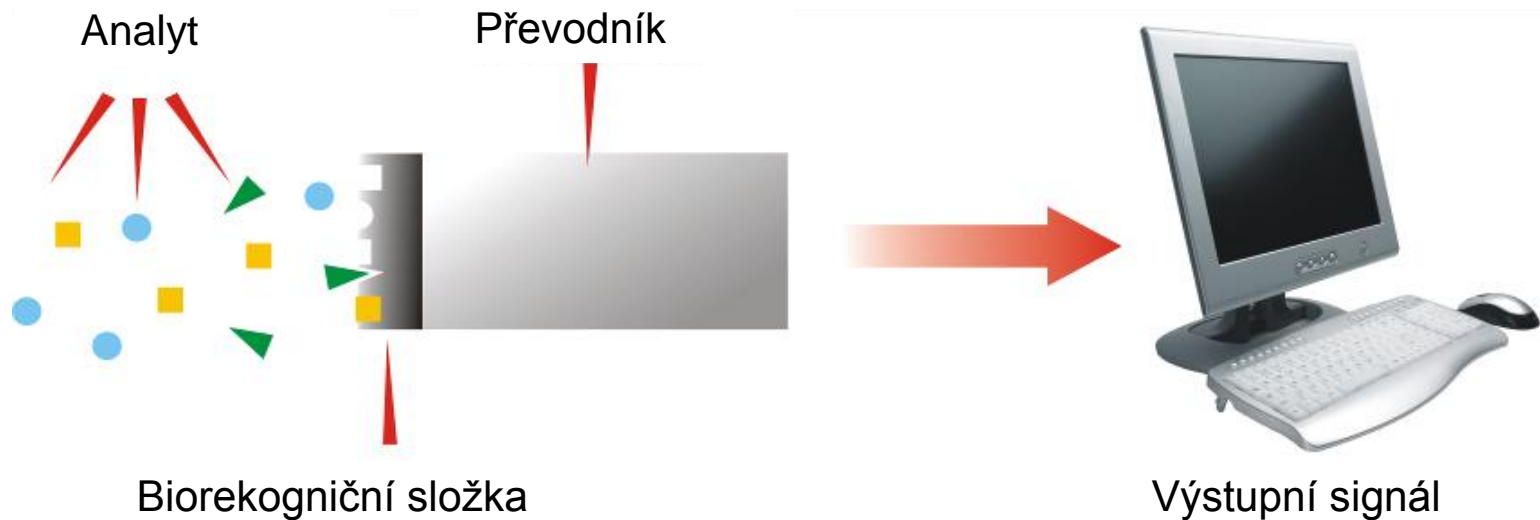
- Počátek 20. st. – měření pH
- 1922 – Heyrovský – objev polarografie
- 1956 – Clark – kyslíková elektroda
- 1962 – Clark, Lyons – enzymová elektroda
- 1975 – Yellow Springs Instrument Company (USA) – 1. komerční biosensor pro stanovení glukosy
- 1975 – pojem biosensor
- 1975 – Lübbers, Opitz – optoda
- 80. léta 20. st. – Liedberg – imunosensory
- 1987 – MediSense – komerční biosensor pro stanovení glukosy v krvi diabetiků



Leonard C. Clark, Jr.

Biosensory

- ❑ Analytické přístroje
- ❑ Biorekogniční složka v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem



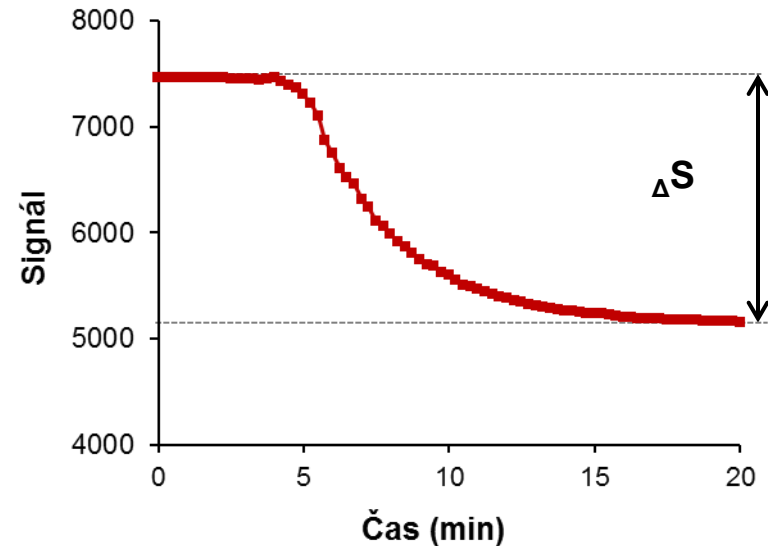
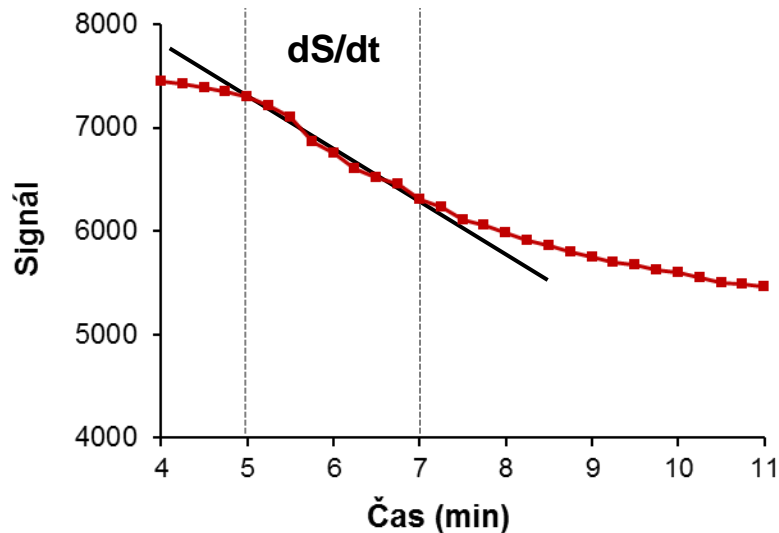
Biosensory vs. tradiční metody



Charakteristiky	Tradiční analytické metody	Biosensory
Citlivost		
Selektivita		
Příprava vzorku		
Spotřeba chemikálií		
Mód měření		
Časová náročnost		
Nároky na obsluhu a vybavení		
Ekonomické náklady		
Standardizace měření		
Komerční dostupnost		

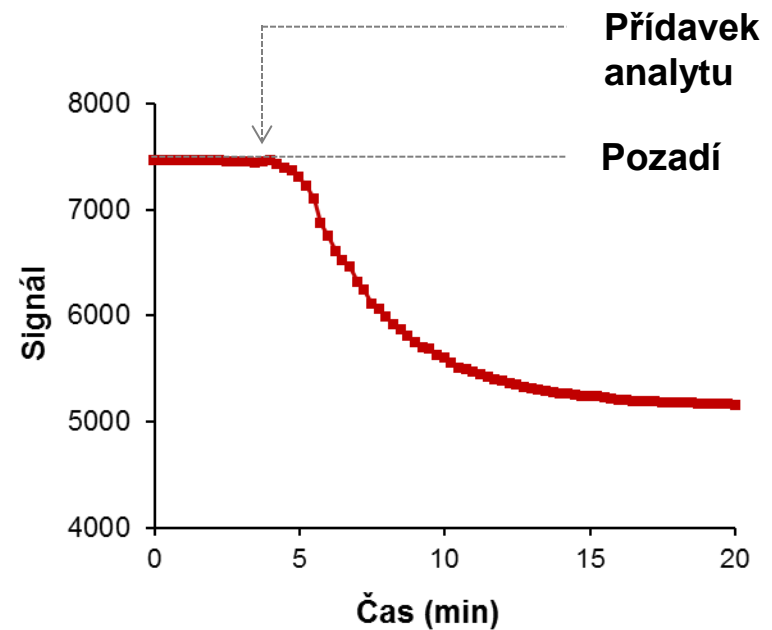
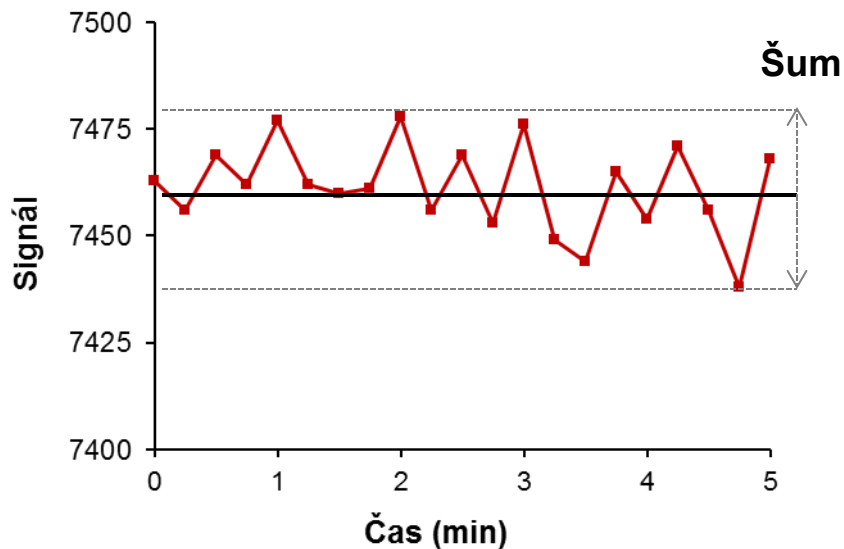
Průběh měření s biosensory

- ❑ Po ustálení pozadí signálu – přidavek vzorku s analytem
- ❑ Měření
 - Kineticky – citlivost = časová změna signálu v důsledku změny koncentrace analytu $\Delta(dS/dt)/\Delta c$
 - Ustálený stav („steady state“) – citlivost = konečná ustálená změna výstupního signálu v důsledku změny koncentrace analytu $\Delta S/\Delta c$



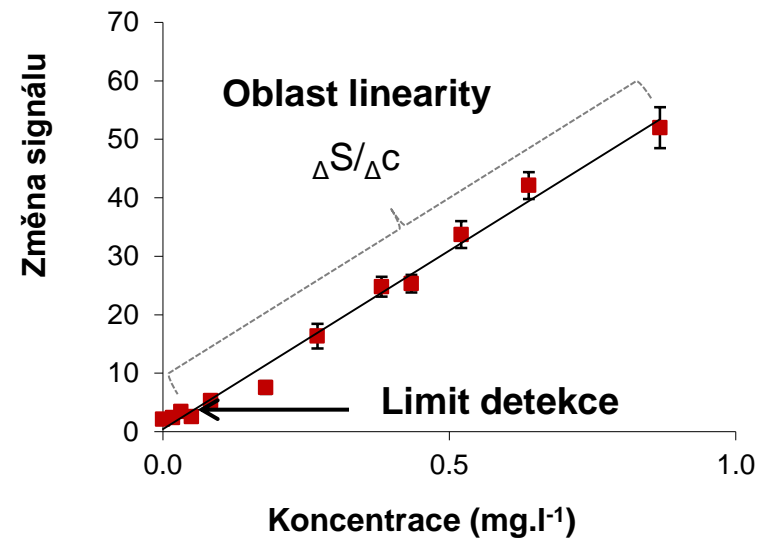
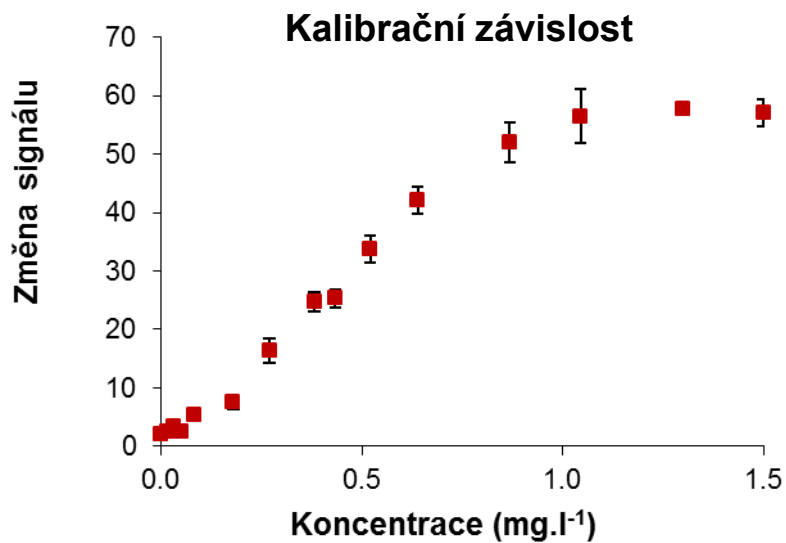
Průběh měření s biosensory

- ❑ Šum – elektromagnetické povahy, turbulence při míchání, rázy pumpy v průtokovém uspořádání
- ❑ Signál pozadí – signál v nepřítomnosti analytu, odečet od měřeného signálu



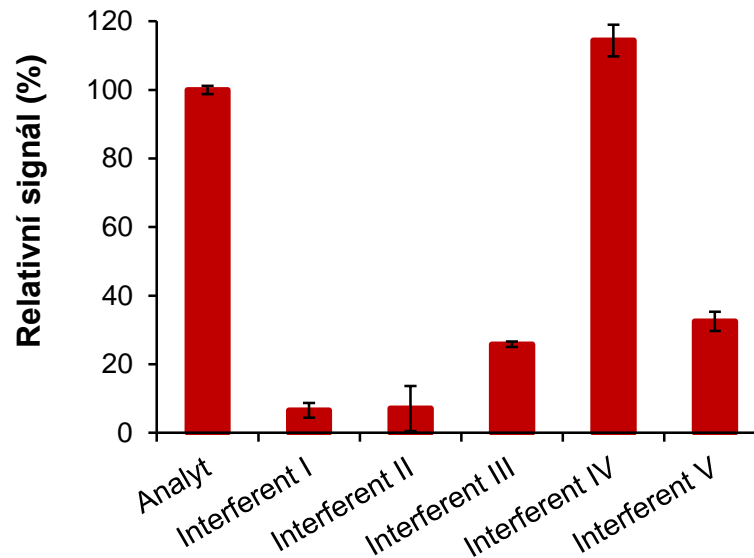
Kalibrace biosensoru

- ❑ Signál biosensoru po přidavku různých koncentrací známého analytu
- ❑ Kalibrační závislost – nejvhodnější přímka
- ❑ Limit detekce = nejnižší stanovitelná koncentrace analytu $S/N = 3$



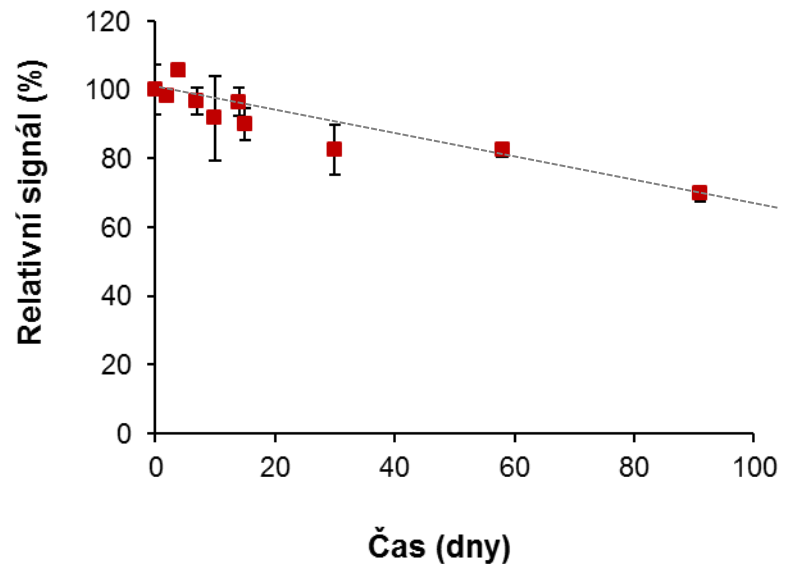
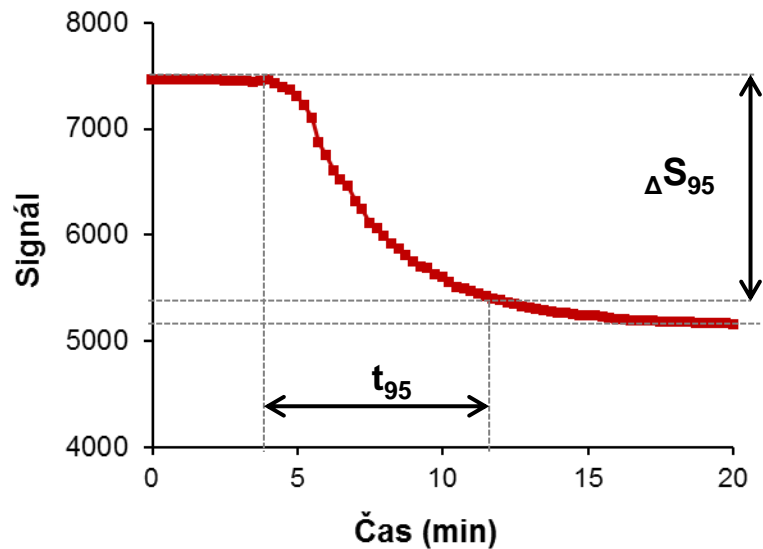
Základní pojmy

- ❑ Dlouhodobá stabilita – změny citlivosti biosensoru v čase, obvykle pokles citlivosti
- ❑ Selektivita biosensoru – odezva biosensoru pouze na stanovovaný analyt, ostatní látky bez vlivu na signál



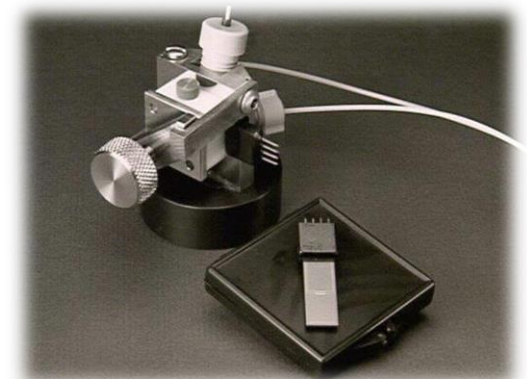
Základní pojmy

- ❑ Doba odezvy biosensoru – čas potřebný k dosažení určité velikosti signálu v konečném ustáleném stavu
- ❑ Životnost biosensoru – limitace biorekogniční složkou
 - Stabilita při skladování
 - Operační stabilita
- ❑ Biokompatibilita – význam pro biomedicínské aplikace



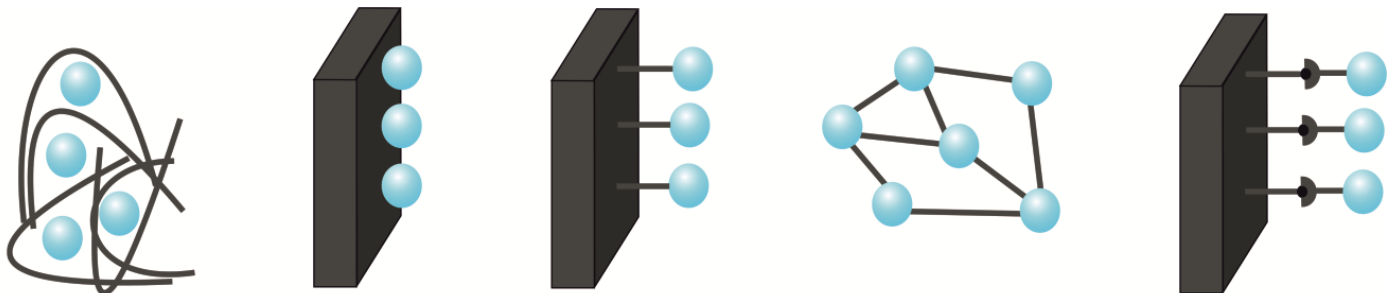
Měřicí uspořádání

- ❑ Přímý kontakt se vzorkem
 - Biosensor přímo ve sledovaném prostředí
- ❑ Měření v nádobce
 - Přídavek vzorku po ustálení pozadí signálu
- ❑ Průtočný systém
 - Střídavý průtok základního roztoku a roztoku vzorků
 - Vstřikování vzorků do protékajícího základního roztoku



Imobilizace biorekogniční složky

- Biorekogniční element v kontaktu s převodníkem
- Nejjednodušší – překrytí převodníku dialyzační membránou
- Imobilizace
 - Zachycení
 - Adsorpce
 - Kovalentní navázání
 - Zesíťování
 - Afinitní navázání

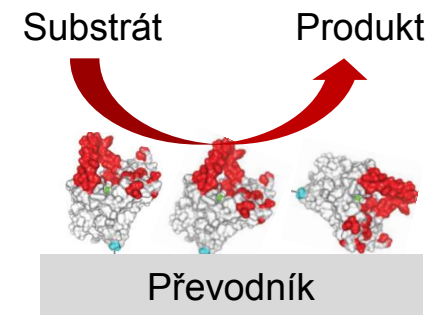


Biorekogniční složka

□ Biorekogniční složka

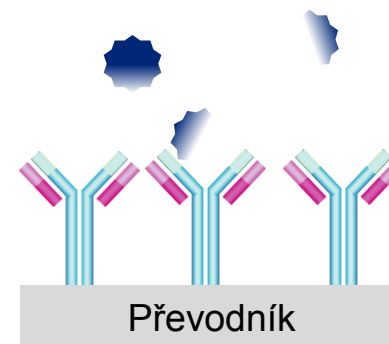
- Enzym
- Buňka
- Organela
- Tkáň

Biokatalytické biosensory



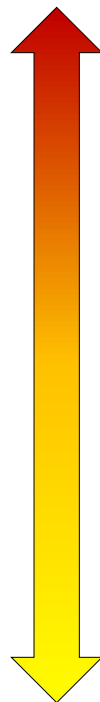
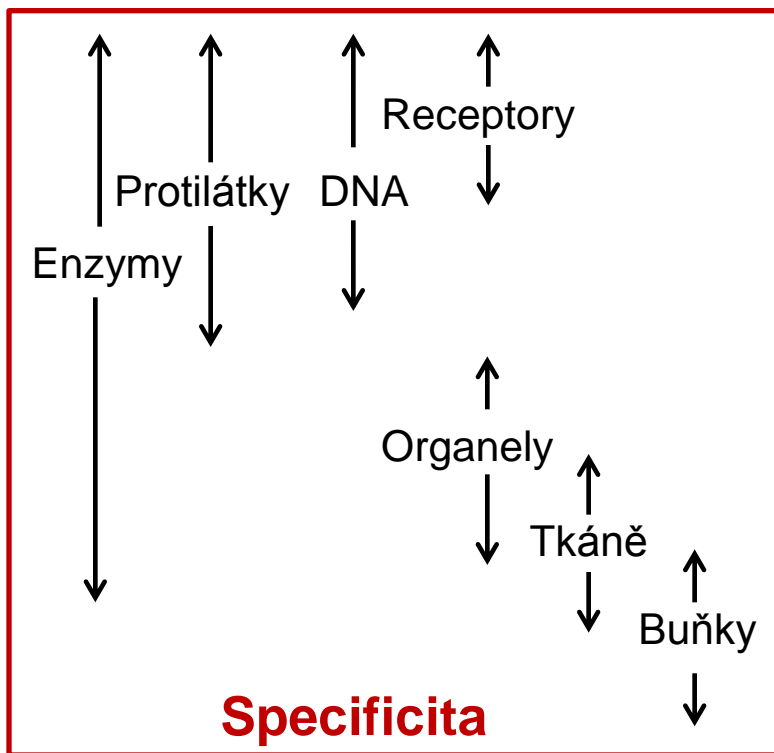
- Protilátka
- Nukleová kyselina
- Receptor

Bioafinitní biosensory

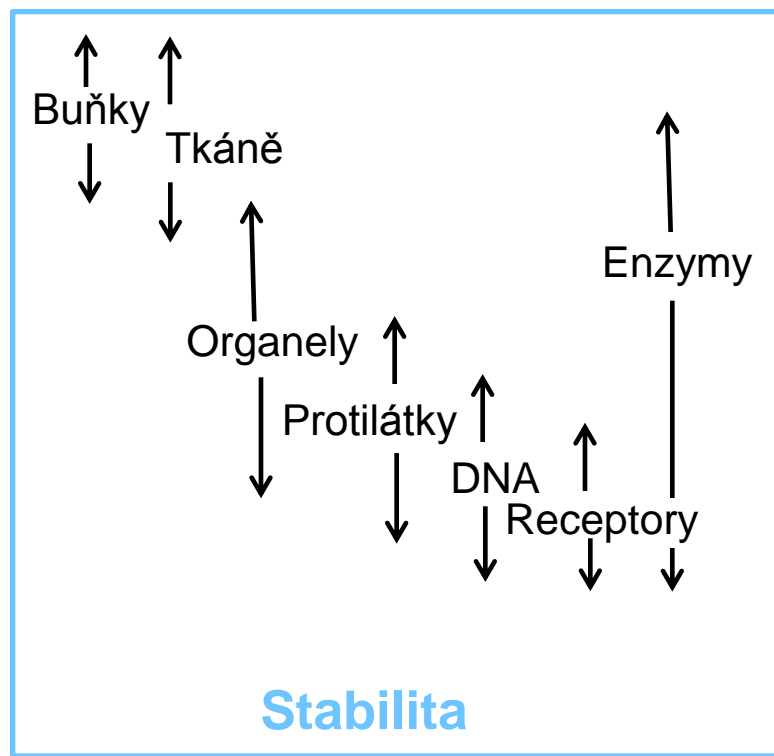


Biorekogniční složka

Vysoká



Nízká



Převodníky

- Fyzikálně-chemické převodníky – signál k dalšímu zpracování
 - Elektrochemické
 - Optické
 - Piezoelektrické a akustické
 - Kalorimetrické

Elektrochemické převodníky

- ❑ Nejčastější
- ❑ Jednoduchá konstrukce, nízké náklady, výborná citlivost, nízké detekční limity, velký dynamický rozsah
- ❑ Měřicí systém nejméně ze 2 elektrod – pracovní a referentní
- ❑ Typy
 - Potenciometrické
 - Amperometrické
 - Konduktometrické

Elektrochemické převodníky

❑ Pracovní elektrody

- Potenciál elektrody volen tak, aby nedocházelo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektrody
- Ušlechtilé kovy (Pt, Au), skelný uhlík, grafit, kompozitní směsi

❑ Referentní elektrody

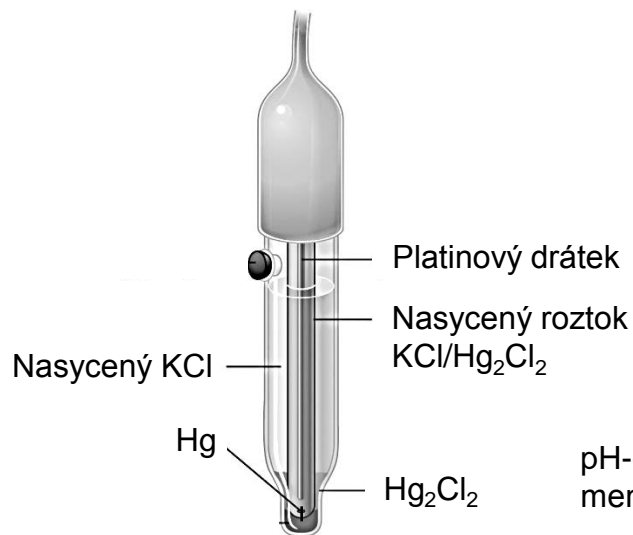
- Srovnávací bod k měření nebo nastavení potenciálu pracovních elektrod
- Normální vodíková elektroda, kalomelové elektrody, argentchloridové elektrody

❑ Pomocné elektrody

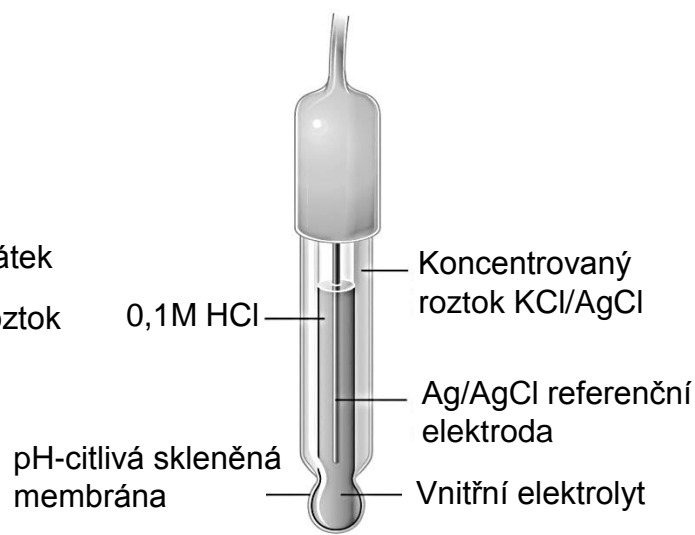
- Dobrý vodič s dostatečnou plochou, elektrochemicky neaktivní
- Platina, uhlíková tyčinka

Potenciometrické převodníky

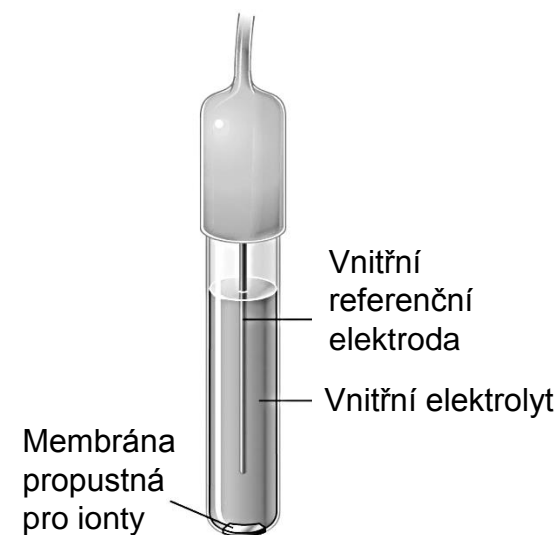
- ❑ Rozdíl elektrického potenciálu mezi pracovní a referenční elektrodou
- ❑ V systému neprochází elektrický proud
- ❑ Pracovní elektroda
 - Selektivní pro ionty nebo plyny
 - Stanovení – H^+ , F^- , Cl^- , I^- , CN^- , CO_2 , NH_3



Kalomelová elektroda



Skleněná elektroda



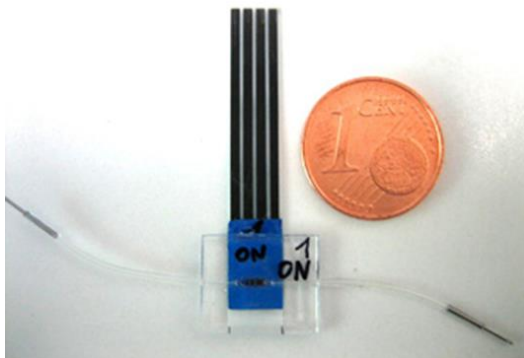
Iontově-selektivní elektroda

Potenciometrické biosensory

Analyt	Biorekogniční element	Princip detekce
Penicilin	Penicilinasa	pH
Acetylcholin	Acetylcholinesterasa	pH
Glukosa	Glukosaoxidasa	pH
Močovina	Ureasa	$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$
Aminokyseliny	Glutamátdehydrogenasa, oxidasa aminokyselin	$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$
Močovina	Ureasa	CO_2
Aminokyseliny	Lysin dekarboxylasa	CO_2
H_2O_2	Peroxidasa	I^-

Amperometrické převodníky

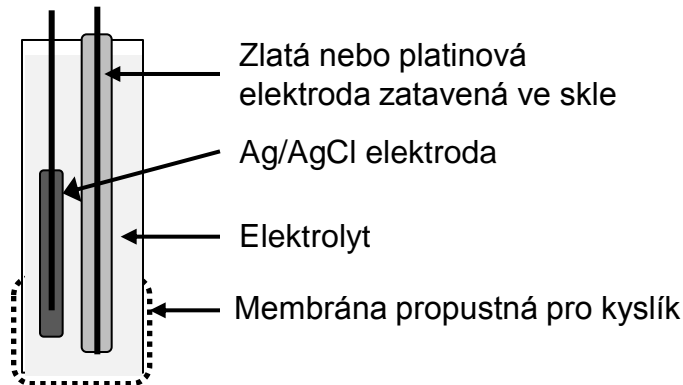
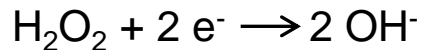
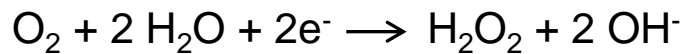
- ❑ Měření elektrický proud vzniklý elektrochemickou oxidací nebo redukcí elektroaktivní látky za konstantního napětí na pracovní elektrodě
- ❑ Amperometrická měření
 - Dvouelektrodový systém – napětí na pracovní elektrodě nastaveno proti pomocné elektrodě
 - Tříelektrodový systém – navíc referentní elektroda, univerzální uspořádání



Amperometrické převodníky

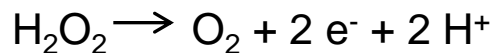
□ Stanovení kyslíku

- Kyslíková elektroda s předřazenou membránou propustnou pouze pro O₂
- Elektrodová redukce O₂:



□ Stanovení peroxidu vodíku

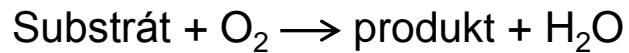
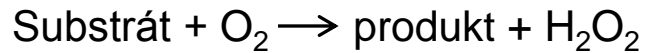
- Elektrodová oxidace peroxidu vodíku:



Amperometrické biosensory

□ Biorekogniční složka - oxidasy

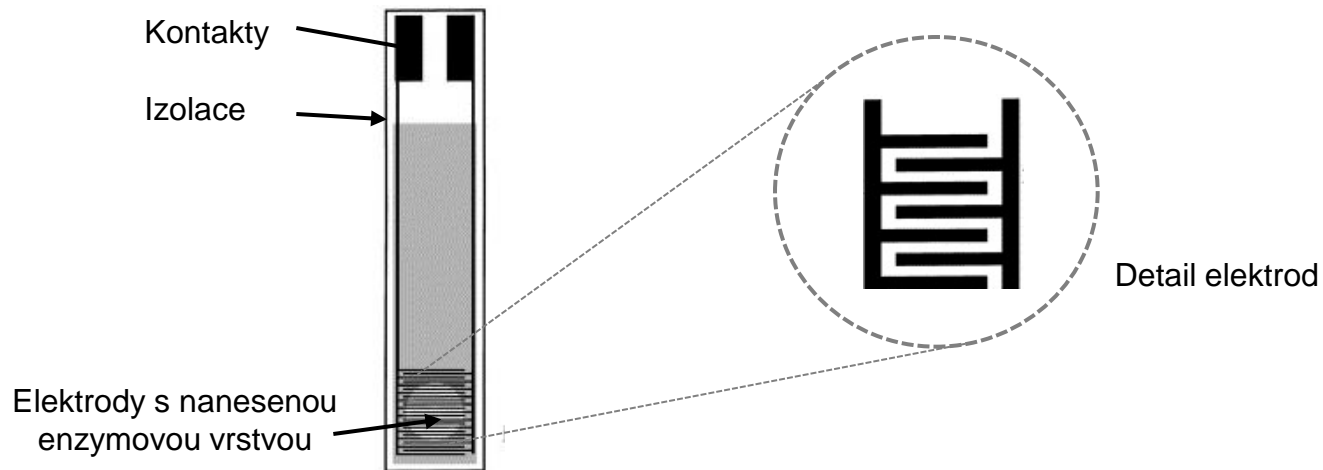
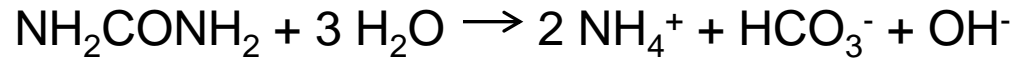
- Spojení s kyslíkovou nebo peroxidovou elektrodou



Analyt	Biorekogniční element	Koenzym	Princip detekce
Alkohol	Alkoholoxidas	FAD	H ₂ O ₂
Fenol	Tyrosinasa	Cu ²⁺	O ₂
Glukosa	Glukosaoxidas	FAD	H ₂ O ₂
Laktát	Laktát oxidasa	FAD	H ₂ O ₂
Pyruvát	Pyruvát oxidasa	FAD	H ₂ O ₂

Konduktometrické převodníky

- Změna vodivosti při biochemických reakcích
 - Produkce a spotřeba iontů
 - Změna velikosti nabitých částic
- Konduktometrické biosensory – stanovení močoviny pomocí ureasy



Optické převodníky

- ❑ Princip – interakce světelného záření s chemickými látkami
- ❑ Typy
 - Absorbance, fluorescence, chemi/bioluminiscence – katalytické biosensory
 - Nelineární optika – afinitní biosensory



Optické (bio)sensory

□ Detektory

- Fotonásobiče
- Fotodiody



Fotonásobič



Fotodioda

□ Zdroje světla

- Laser
- Světloemitující diody (LED)
- UV výbojky
- Lampy

Laser



LED



Rtuťová výbojka



Xenonová



Optické (bio)sensory



□ Výhody

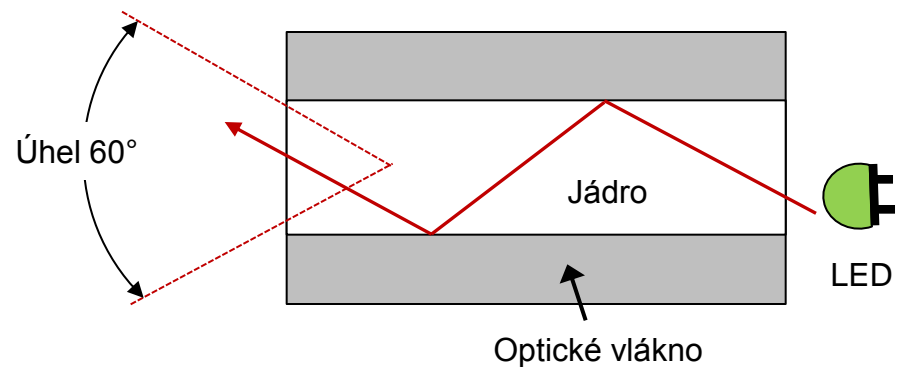
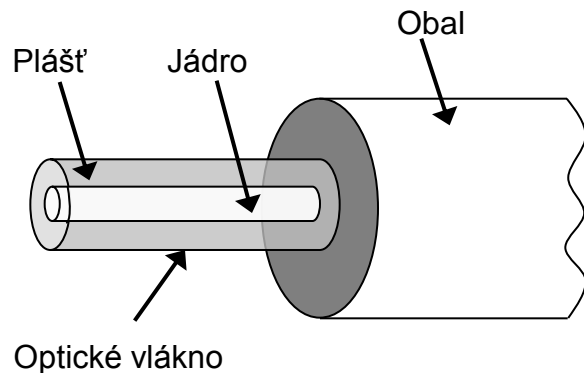
- Bez referentního prvku
- Stabilní kalibrace
- Současné stanovení několika analytů
- Bez interferencí elektromagnetické povahy

□ Nevýhody

- Omezený dynamický rozsah
- Omezená dlouhodobá stabilita
- Bez reference při měření intenzity světla
- Interference okolního záření

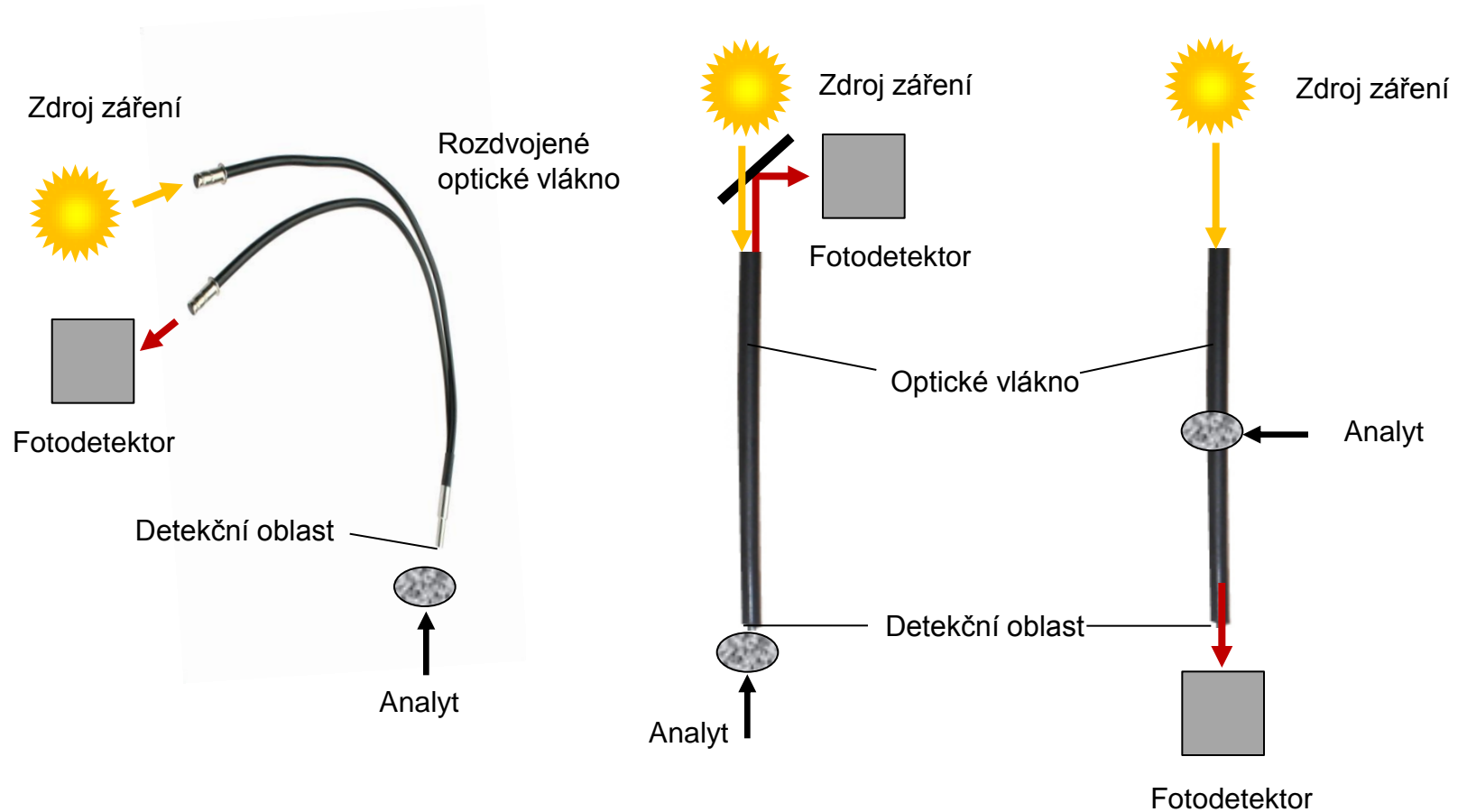
Optické (bio)sensory

- ❑ Optická vlákna (průměr do stovek μm)
 - Jádno – křemen, sklo, plast
 - Plášť – silikonový
 - Mechanický obal - plast
- ❑ Šíření paprsku v optickém vlákně – úhel dopadu větší než kritická mez



Optické (bio)sensory

□ Měřící konfigurace



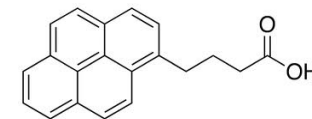
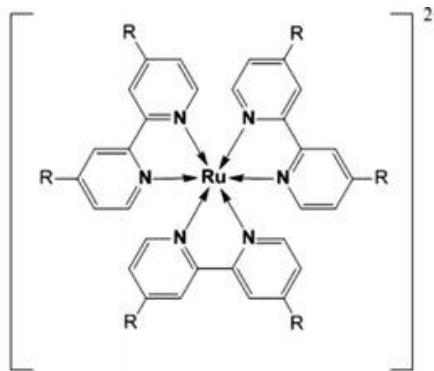
Optické (bio)sensory

□ Přímé měření

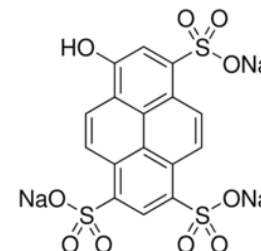
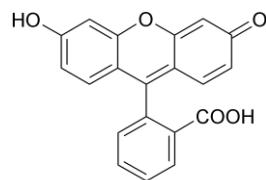
- Výskyt opticky aktivní látky v biokatalytické reakci, např. NADH

□ Nepřímé měření

- Využití optických indikátorů
- Sledování kyslíku – organokovové komplexy ruthenia, kyselina pyrenmásečná



- Sledování pH – fluorescein, kyselina 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonová



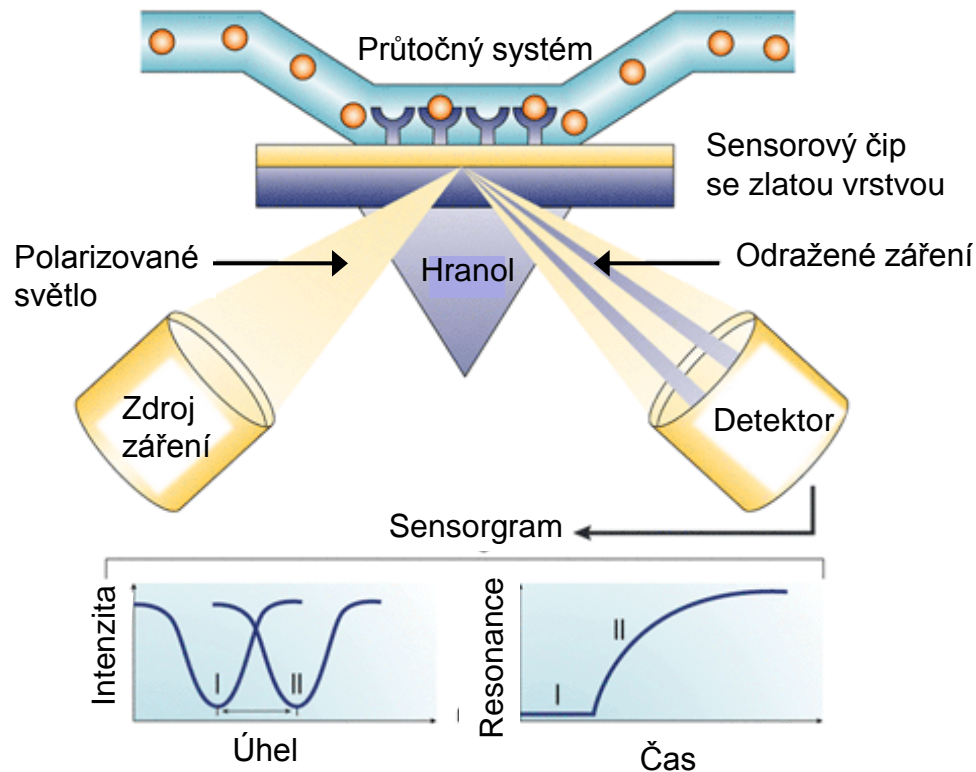
Optické biosensory

Analyt	Biorekogniční element	Princip detekce
Alkohol	Alkoholdehydrogenasa	Fluorescence NADH
Metabolická aktivita	Mikrobiální buňka	Fluorescence NADH
Toxicita	Řasa, sinice	Fluorescence chlorofylu
Glukosa	Glukosaoxidasa	Fluorescence, O ₂ indikátor
Penicilin	Penicilinas	Fluorescence, pH indikátor
Močovina	Ureasa	Fluorescence, pH indikátor
H ₂ O ₂	Peroxidasa	Chemiluminiscence, luminol
ATP	Luciferasa	Bioluminiscence, luciferin

Optické biosensory

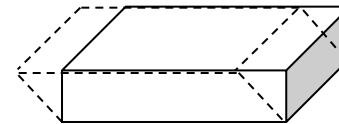
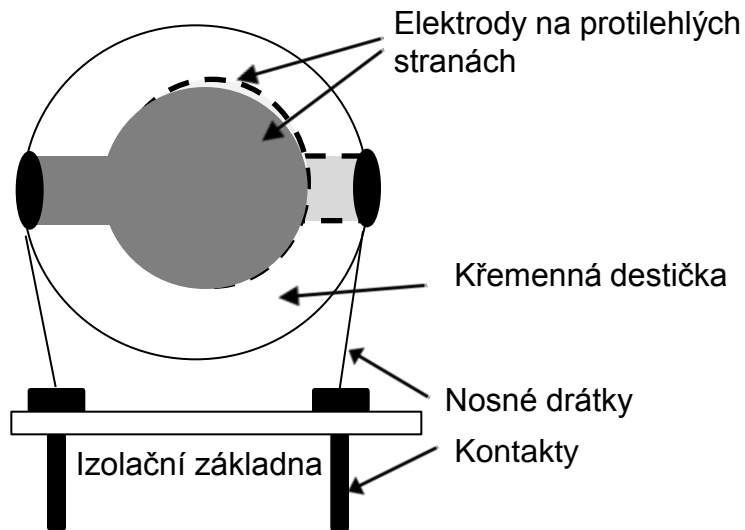
□ Biosensory s povrchovou plasmovou rezonancí (SPR)

- Pokles intenzity odraženého světla na rozhraní kov-dielektrikum při totálním odrazu světla
- Posun rezonančního maxima při interakci protilátka-antigen

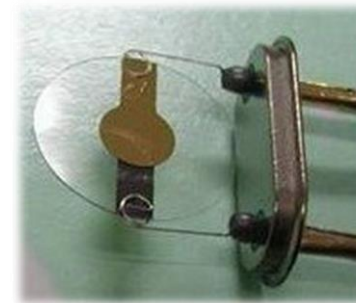


Piezoelektrické převodníky

- Piezoelektrický krystalový rezonátor (QCM)
 - Změna rezonanční frekvence krystalového rezonátoru
 - Detekce plynů, interakce antigen-protilátka

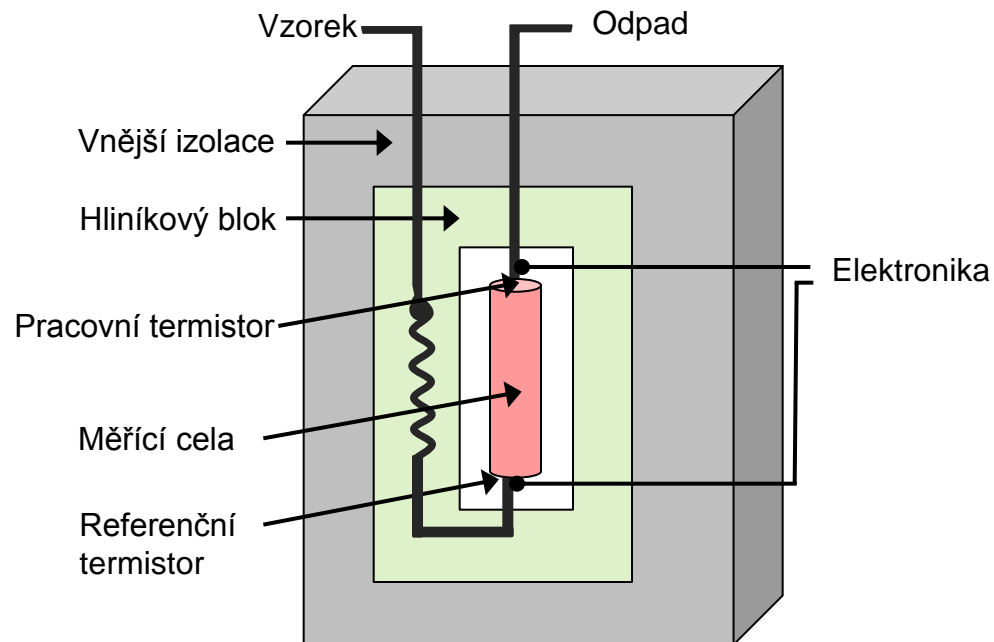


Vibrace piezoelektrického elementu

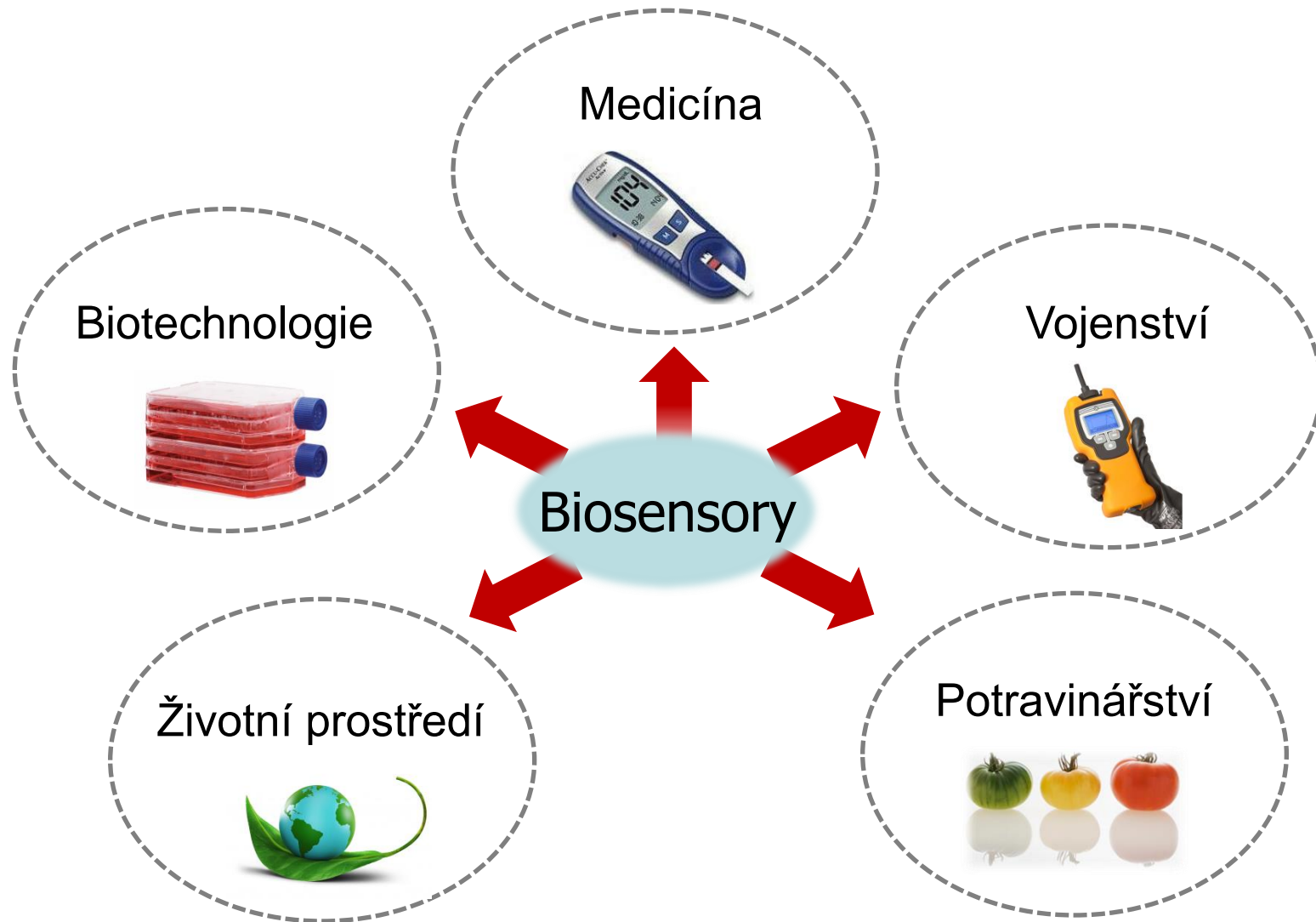


Kalorimetrické převodníky

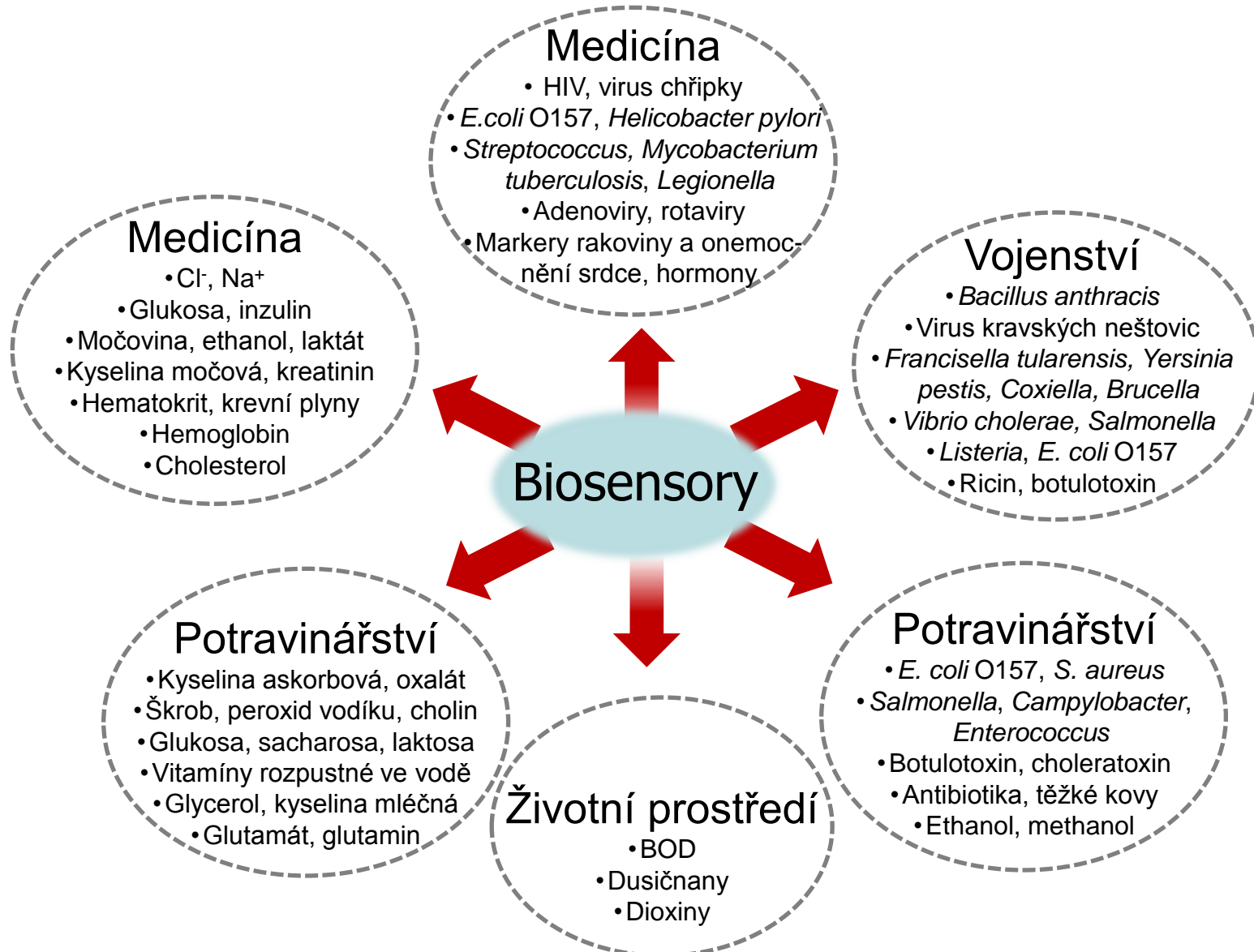
- Změna teploty v průběhu chemických reakcí
- Termistor – odpor závislý na teplotě



Aplikace biosensorů

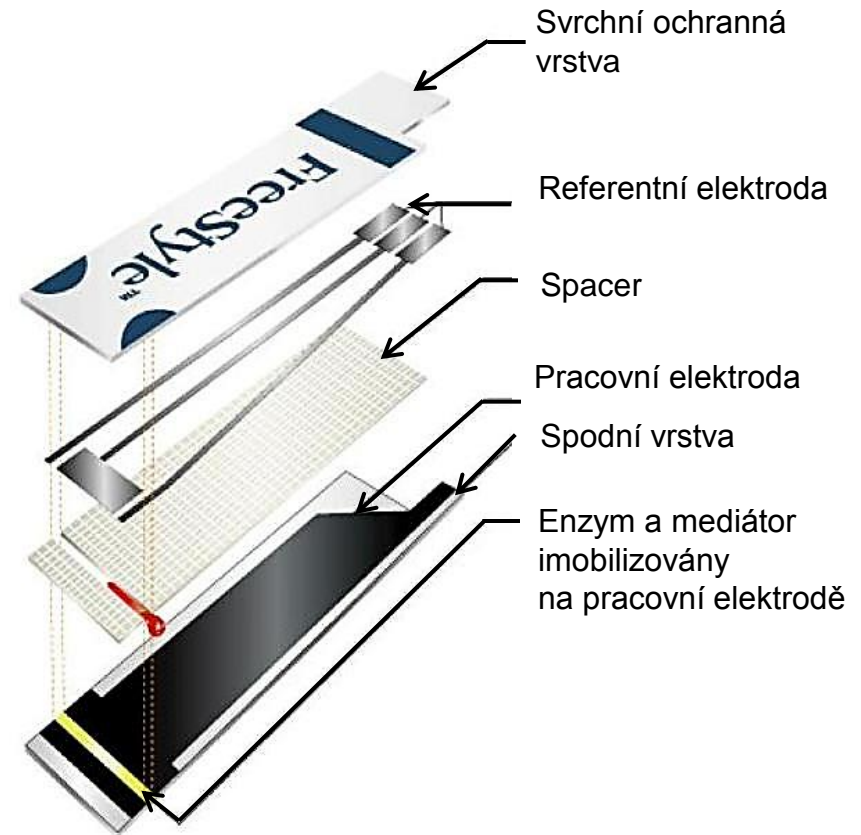


Komerční (bio)sensory



Komerční (bio)sensory

- Nejúspěšnější – biosensory pro detekci krevní glukosy



Komerční elektrochemické (bio)sensory

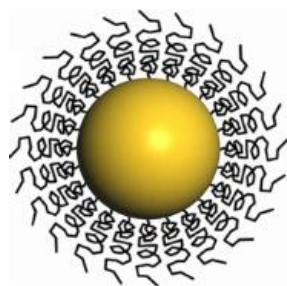
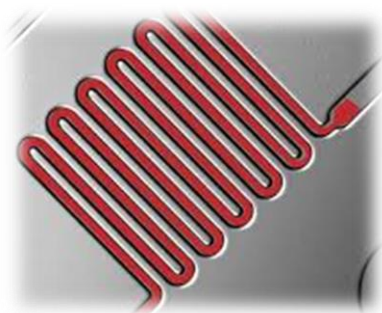
Firma	Produkt	Oblast uplatnění
Abott Point of Care (USA)	i-STAT pro pH, O ₂ , CO ₂ , močovinu, laktát, kreatinin	Medicína
ABTECH Scientific (USA)	Mikrosensorové elektrody	Medicína, životní prostředí, potravinářství
BVT Technologies (ČR)	Elektrochemické (bio)sensory	Medicína, výzkum
Dexcom (USA)	Dexcom G4 pro kontinuální monitoring glukosy	Medicína
LifeScan (USA)	Glukometry OneTouch	Medicína
Roche Diagnostics (Švýcarsko)	Glukometry Accu-Chek	Medicína
Siemens Healthcare Diagnostics (Německo)	DCA Vantage Analyzer pro hemoglobin	Medicína
Windsor Scientific (UK)	Mikroelektrody, mikrosensory	Medicína

Komerční optické (bio)sensory

Firma	Produkt	Oblast uplatnění
Artificial Sensing Instruments (Švýcarsko)	Afinitní systémy pro studium biointerakcí	Výzkum, farmacie, biotechnologie
GE Healthcare (UK)	BIACORE pro studium biointerakcí	Výzkum, farmacie, biotechnologie
Hach Lange (Německo)	LDO luminescenční sensor pro O ₂	Životní prostředí, biotechnologie
Ocean Optics (USA)	NeoFox luminescenční sensor pro pH a O ₂	Medicína, životní prostředí, biotechnologie
PreSens (Německo)	Mikrosensory pro pH, O ₂ a CO ₂	Medicína, farmacie, potravinářství
Sierra Sensors (USA)	Afinitní systémy pro studium biointerakcí	Výzkum, farmacie, biotechnologie
Yellow Springs Instruments (USA)	ProOBOD luminescenční sensor pro O ₂	Životní prostředí

Budoucnost biosensorů

- ❑ Miniaturizace, spojení s mikrofluidikou
- ❑ Využití nanomateriálů
- ❑ Využití umělých rekogničních elementů – aptamery, molekulárně-otištěné polymery (MIPs)
- ❑ Sensorové array + artificiální neuronové sítě



Reference

- ❑ Bahadir E.B., Sezgintürk M.K. (2015): Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental and biothreat/biowarfare analyses. *Anal. Biochem.* 478: 107-120.
- ❑ Clarke S.F., Foster J.R. (2012): A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *Brit. J. Biomed. Sci.* 69: 83-93.
- ❑ Cooper M.A. (2002): Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 515-528.
- ❑ Petr Skládal, <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf> (elektronická verze)
- ❑ Rodriguez-Mozaz S., Marco M.-P., Lopez de Alda M.J., Barceló D. (2004): Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Appl. Chem.* 76: 723-752.
- ❑ Ronkainen N.J., Halsall H.B., Heineman W.R. (2010): Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* 39: 1747-1763.

Reference

A microscopic view of plant cells, showing the intricate network of cell walls and chloroplasts, rendered in a light blue color scheme.

- ❑ Tuner A.P.F. (2013): Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* 42: 3184-3196.
- ❑ Yoo E.-H., Lee S.-Y. (2010): Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sens.* 10: 4558-4576.