

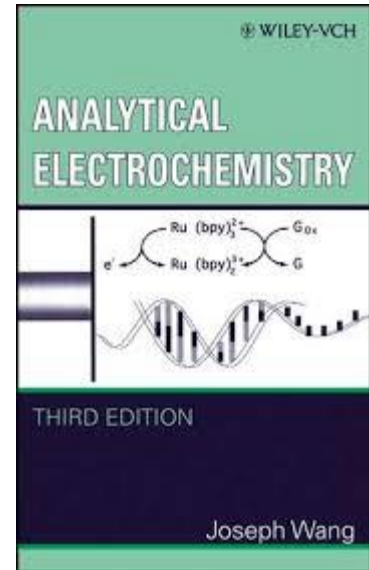
Aplikovaná elektrochemie pro studium biomolekul a jejich detekci

Dr. Karel Lacina

lacinak@chemi.muni.cz

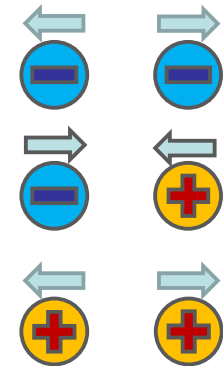
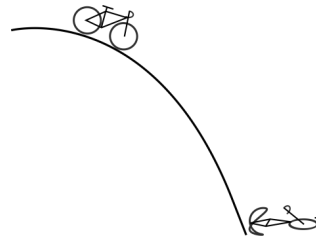
Literatura

- Joseph Wang
Analytical Electrochemistry
- Internet...

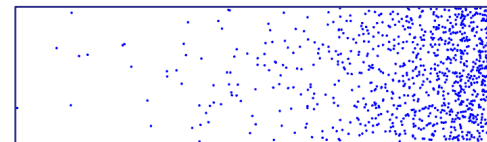
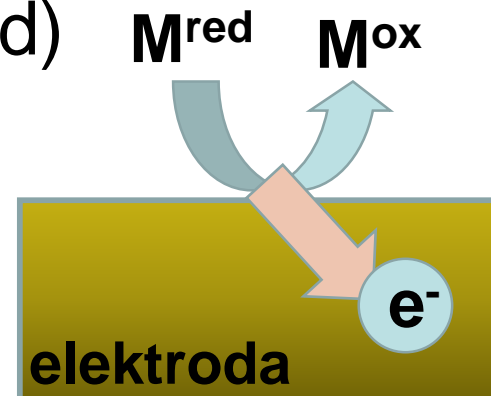


Základní představy a principy

- Přitahování / odpuzování nábojů
- Rozložení potenciálů
 - Chemický potenciál
 - Koncentrační gradienty

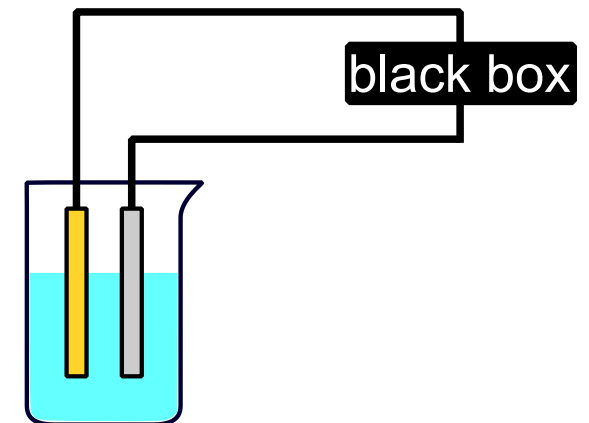
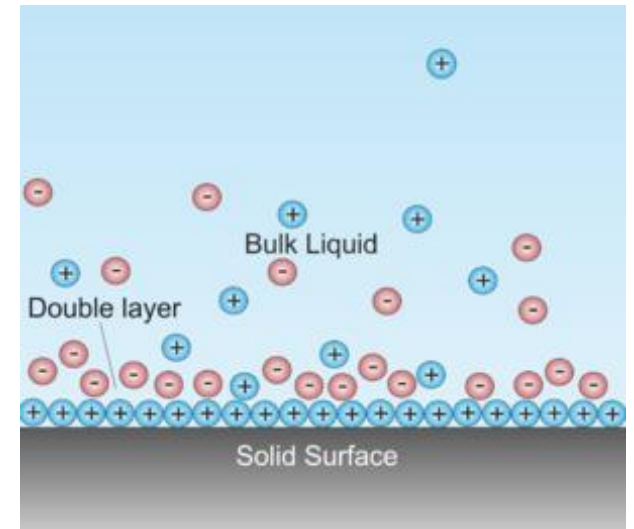


- Přenos elektronů (= proud)



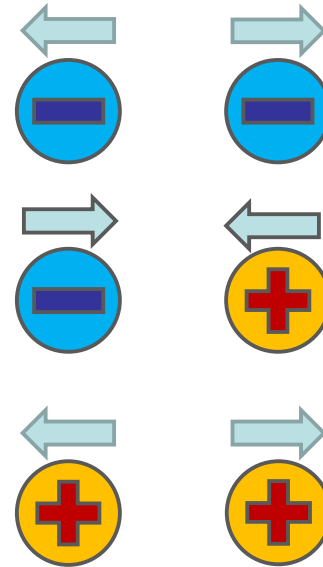
Základní představy a principy

- Děje na elektrodě
- Tzn. kovový povrch ve (vodných) roztocích
- Nutné mít dvě elektrody v roztoku
 - Uzavření „elektrického“ obvodu (elektrochemického)
 - Elektronů musí téct odněkud - někam



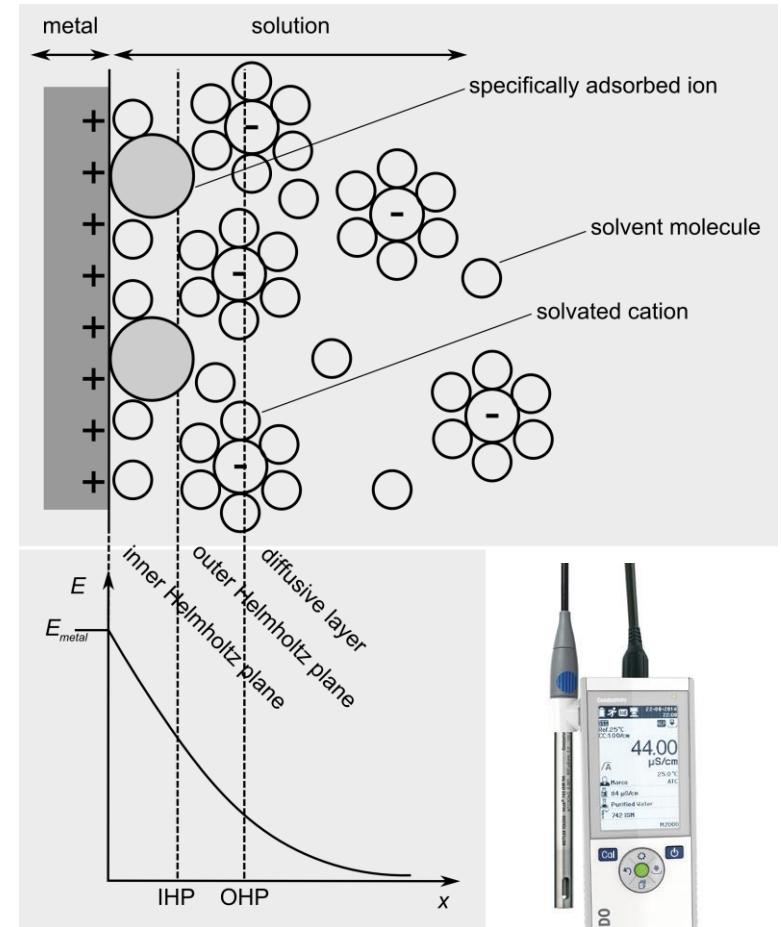
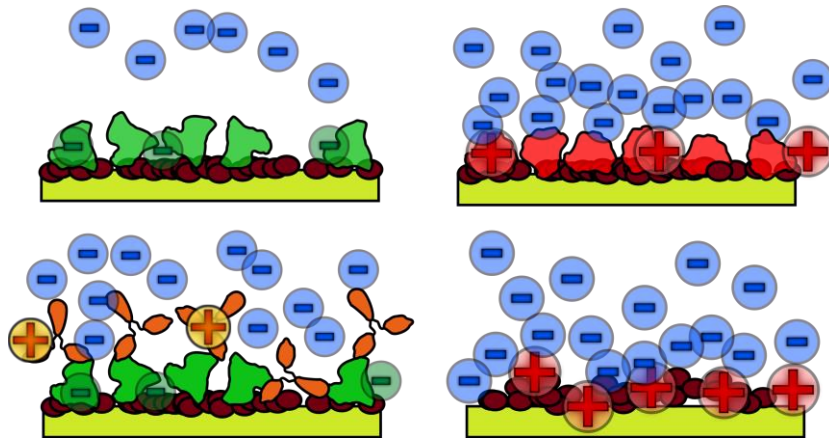
Základní představy a principy Přitahování / odpuzování nábojů

- Elektrostatické interakce
- Analogie s magnetismem
- Stejné póly se odpuzují
- Opačné póly se přitahují



Základní představy a principy Přitahování / odpuzování nábojů

- Nabité látky/molekuly
- Proteiny za fyziologického pH?

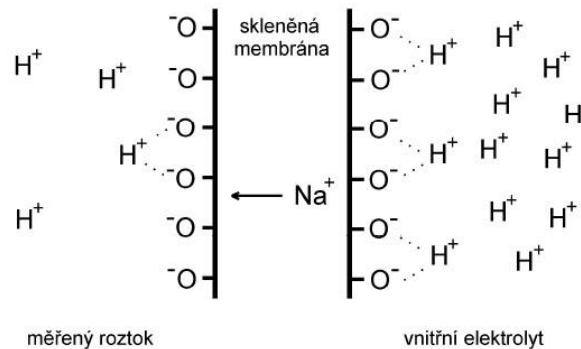
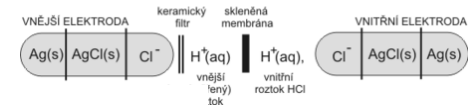
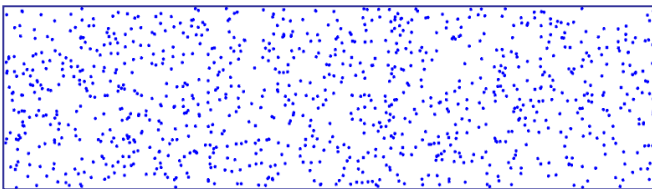
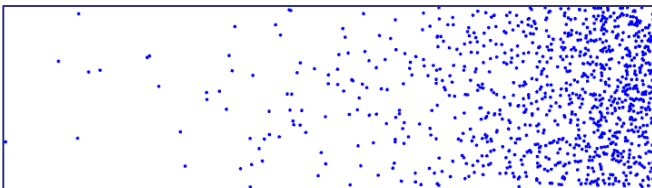
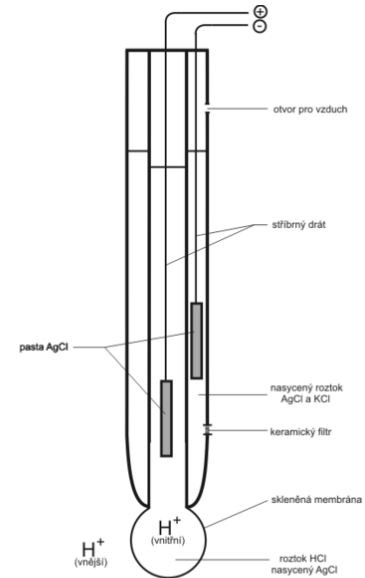
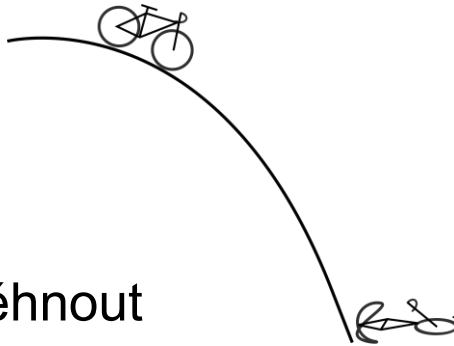


- Konduktometrie (vodivost)



Základní představy a principy Rozložení potenciálů

- Potenciál
- Chemický potenciál
 - Reakce “chce” proběhnout
- Koncentrační gradienty/potenciál

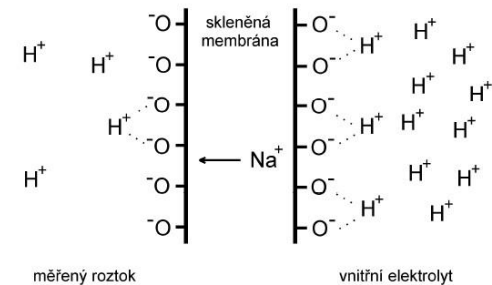
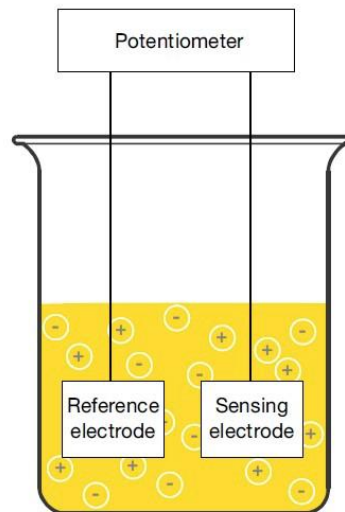
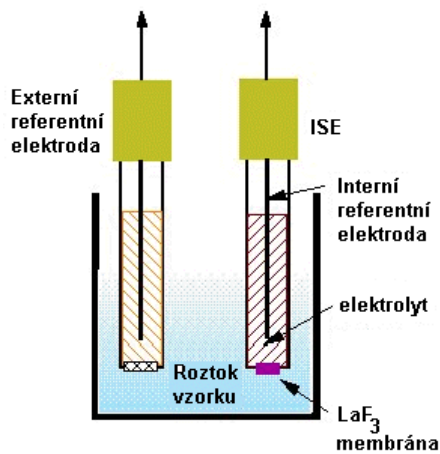


Měření pH

Potenciometrie

Měření potenciálu

- Iontově selektivní elektrody
- Ionofor = nosič měřeného iontu
- pH, Na⁺, K⁺, vápník, chloridy,...

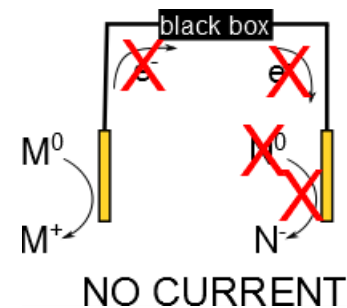
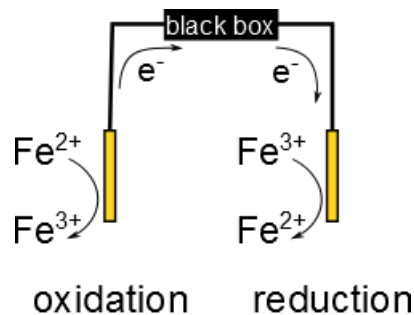
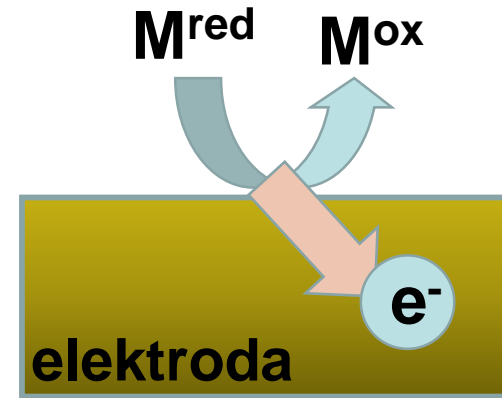


- V klinické laboratoři
- Potravinářství



Základní představy a principy Přenos elektronů

- Elektrický proud
- Náboj prošlý obvodem za čas
- Čím víc, tím víc...
- $4 e^- > 2e^-$
- Amperometrie (měření procházejícího proudu)

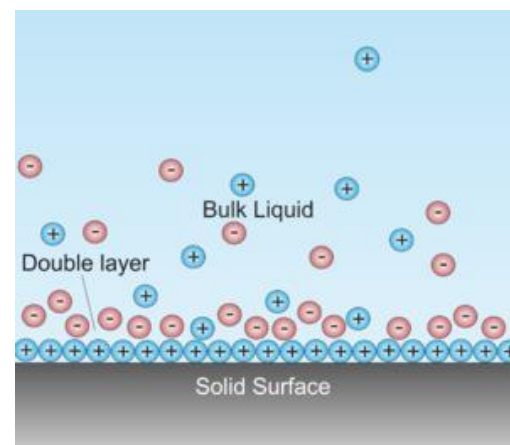


Elektrochemie je všude

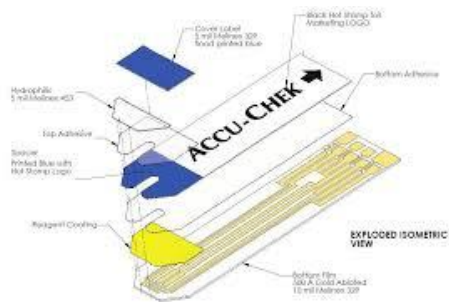
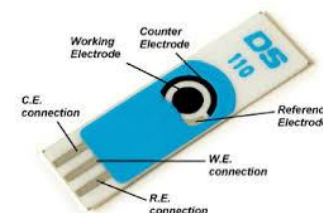
- Analytická chemie, měření (biosenzory, spotřeba O₂, alkohol tester)
- Generování experimentálních podmínek
 - Elektroforéza (vložení napětí/potenciálu)
- Aplikace pro klinické účely (mimo analytiku)
 - Stimulace neuronových tkání
- Homogenní redoxní reakce! (srážecí reakce, syntéza látek)
- ...

Typy elektrod

- Zásadní je rozhraní elektroda/roztok
 - Vše dál je „konstantní“



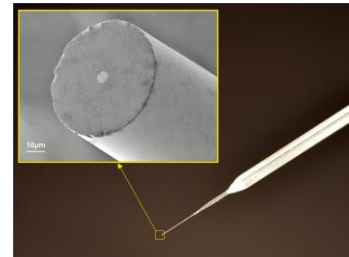
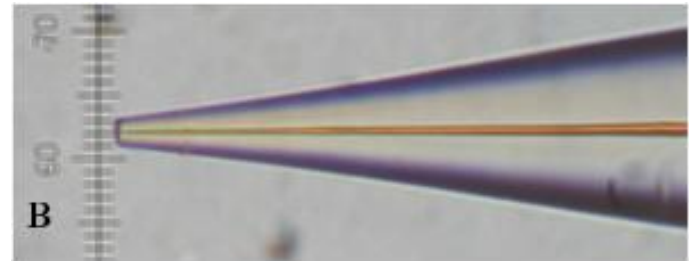
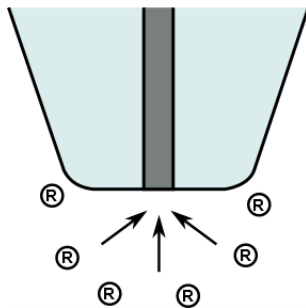
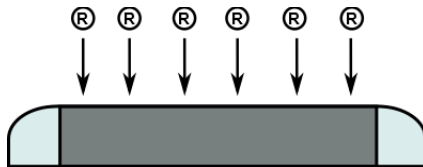
- Kovové elektrody
- Mikroelektrody
- Tištěné elektrody
- Litograficky připravené elektrody
- Speciální elektrody – kombinací metod



Mikroelektrody

Electrode kinetics

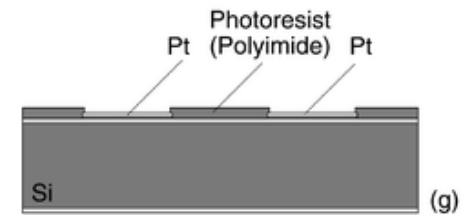
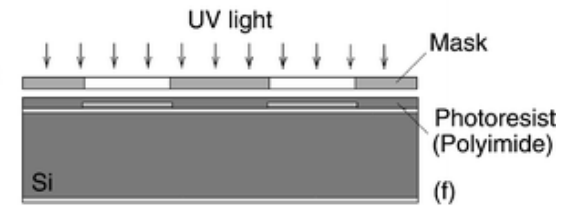
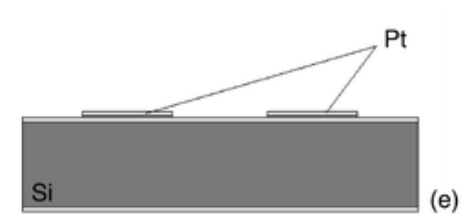
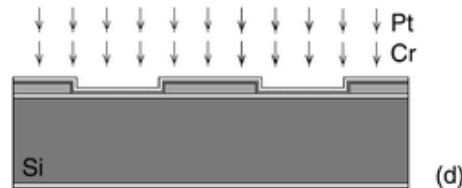
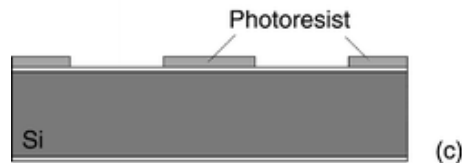
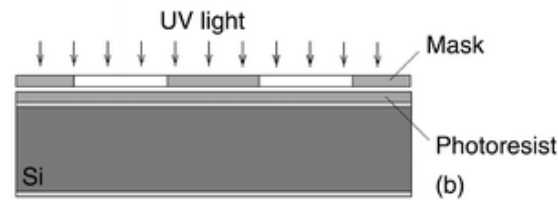
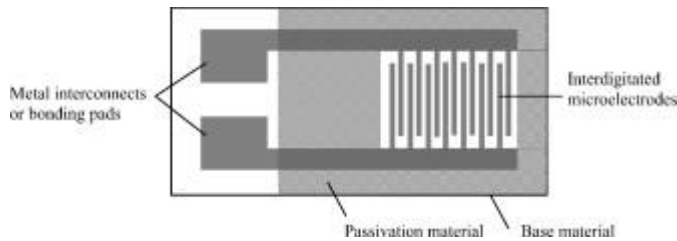
- Zatavení Pt drátku (25 μm) do skleněné kapiláry
- Lepší poměr signál / šum



<http://www.thomasrecording.com>

Typy elektrod

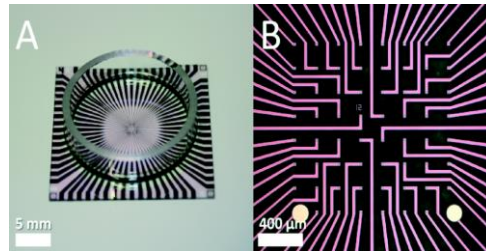
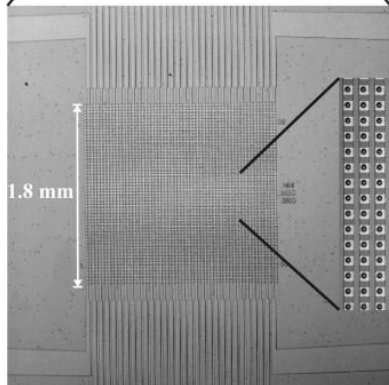
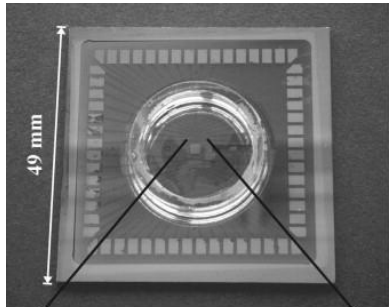
- Mikroelektrody
 - Litograficky definované
 - Různé struktury
 - Různé materiály



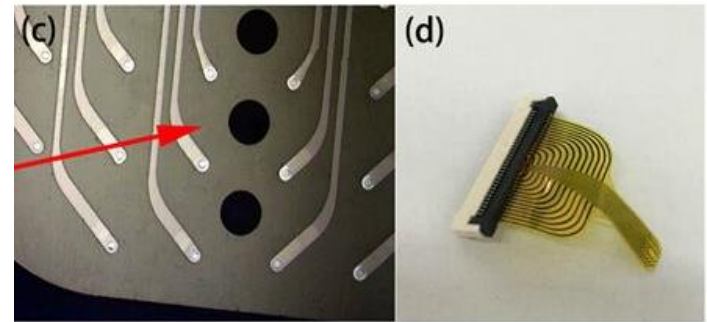
Varshney, Li,
Biosensor Bioelectronic
24 (2009) 2951

Mikroelektrody nejen pro analytiku

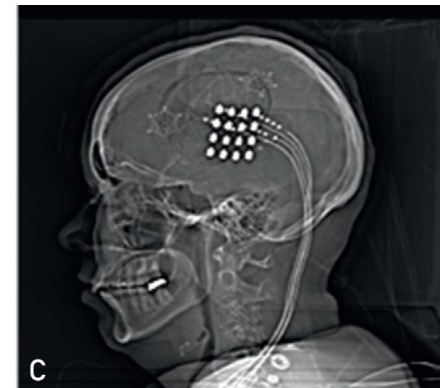
- Experimenty s tkáňovými kulturami
 - Mikroelektrodový svazek / array - MEA Chip
- Neurostimulace



Yakushenko, Mayer, Buitenhuis, Offenhäusser, Wolfrum, Lab Chip 14 (2014) 602



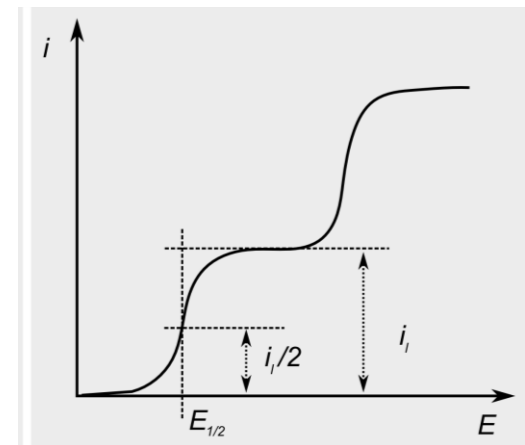
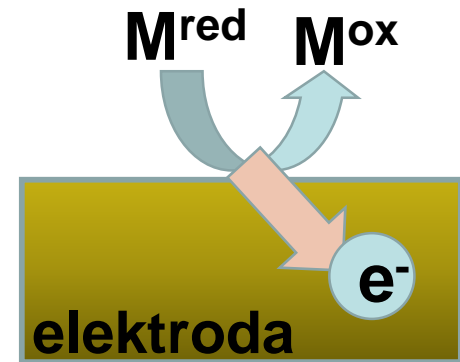
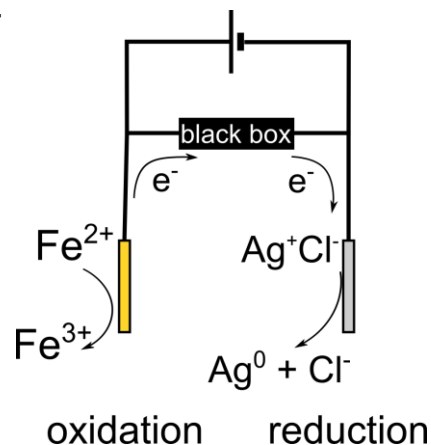
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-07823-3/figures/3>



[https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(17\)30325-7/pdf](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(17)30325-7/pdf)

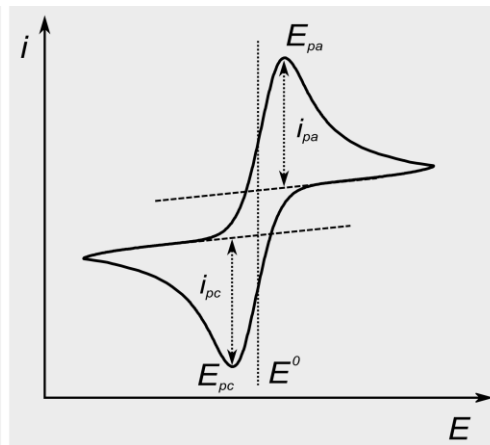
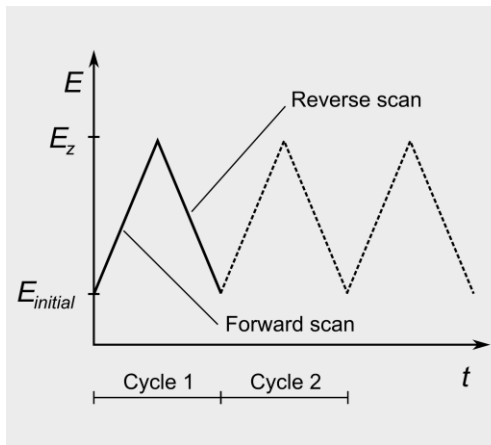
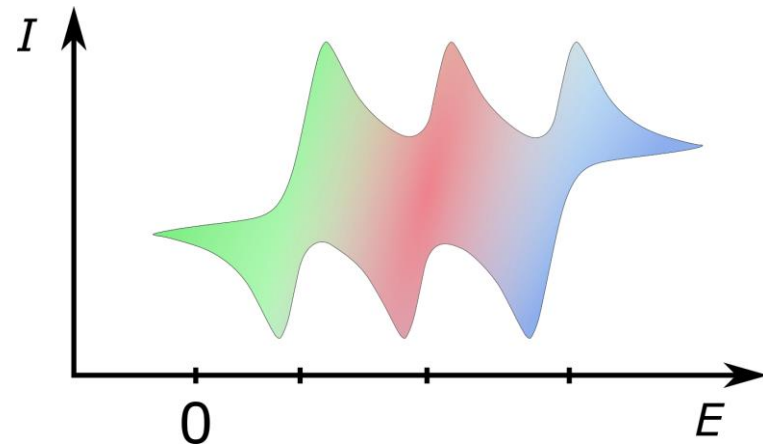
Elektrochemická reakce za daného potenciálu

- Nejčastější využití
- Vložení potenciálu mezi 2 elektrody
- Např.
 - Oxidace probíhá za potenciálu 200 mV
 - Mezi 2 elektrody v roztoku vložíme napětí 200 mV
 - Redoxní látka – ferro/ferrikyanid – $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$



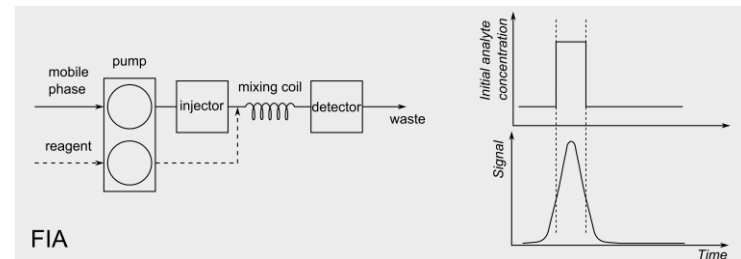
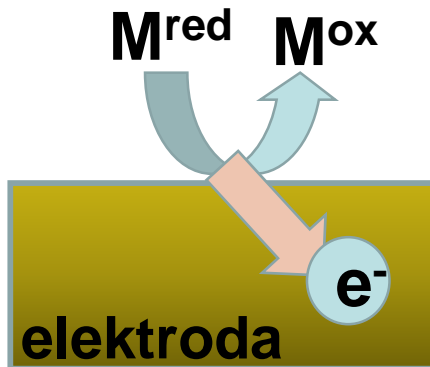
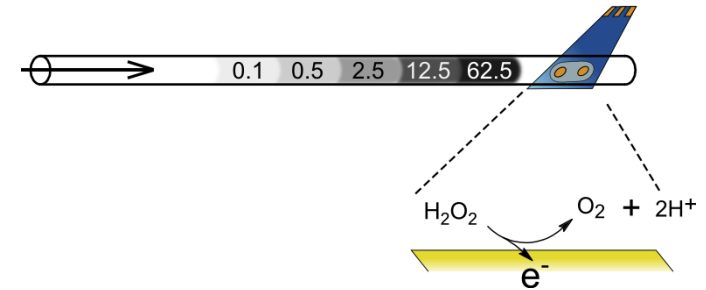
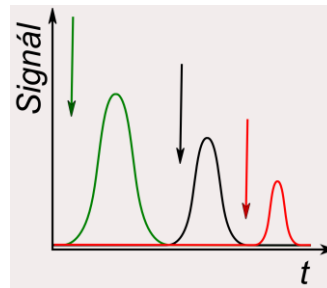
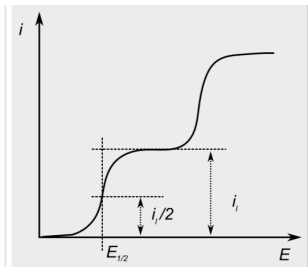
Cyklická voltametrie

- Analogie s optickým „absorpčním“ spektrem
 - Vlnová délka = charakter látky
- Redoxní potenciál = charakter látky
- Detekce těžkých kovů



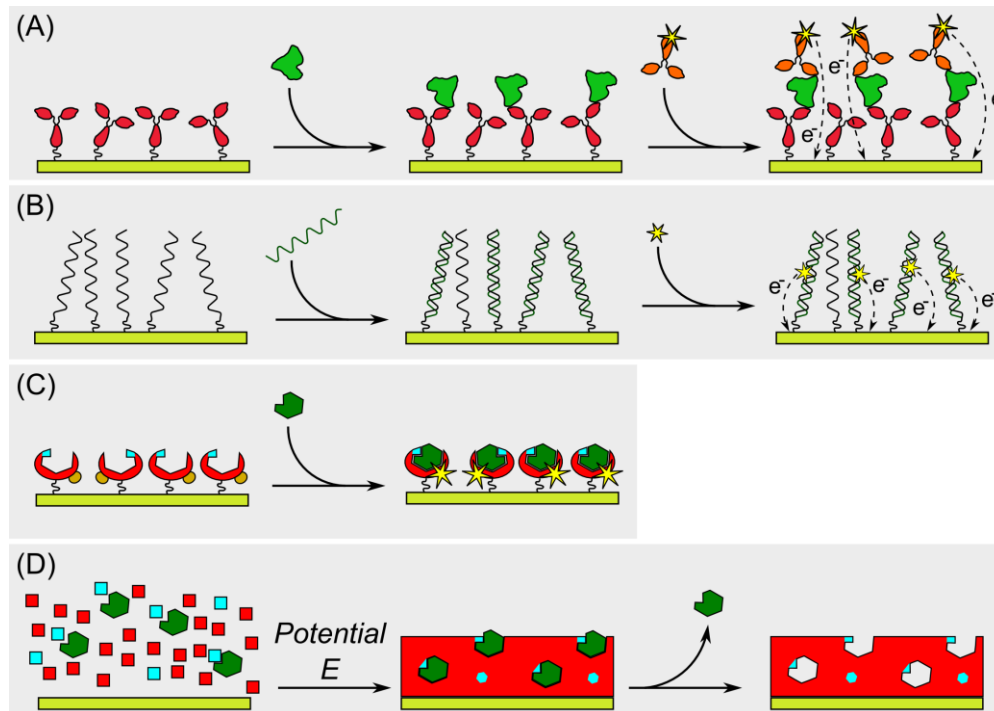
Amperometrie

- Sledování proudu za daného potenciálu
- Redoxní reakce (např. oxidace) v přítomnosti analytu
- Glukometr (biamperometrie), průtoková analýza (flow injection analysis)



Modifikované elektrody

- Dle modifikací získáváme další informace
 - Specifita interagujících partnerů
 - BIOSENZORY (doc. Petr Skládal)

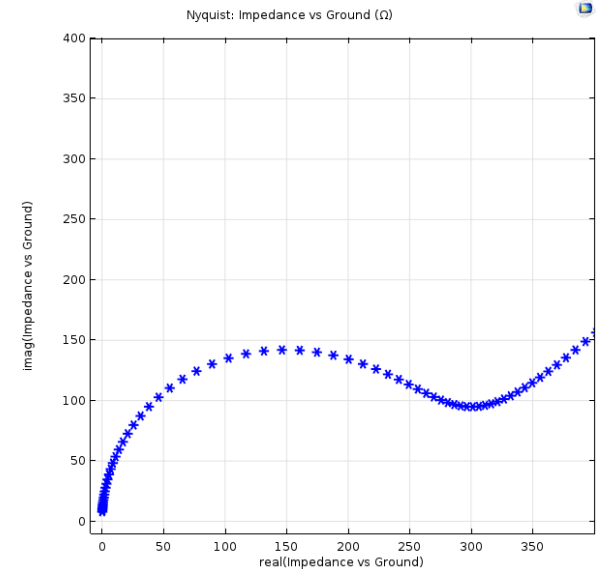
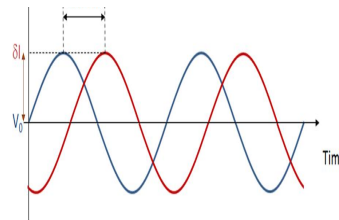
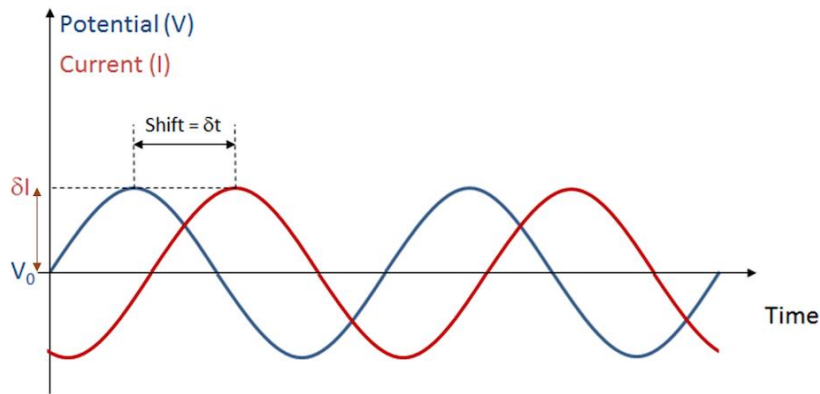
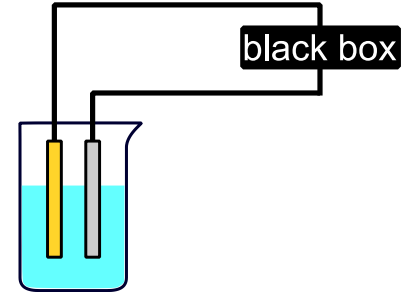


Elektrochemická impedanční spektroskopie

- Dále budou představeny výzkumné (experimentální) metody, umožňující studium interakcí biomolekul využívající jejich přirozený náboj ve vodném prostředí

Elektrochemická impedance

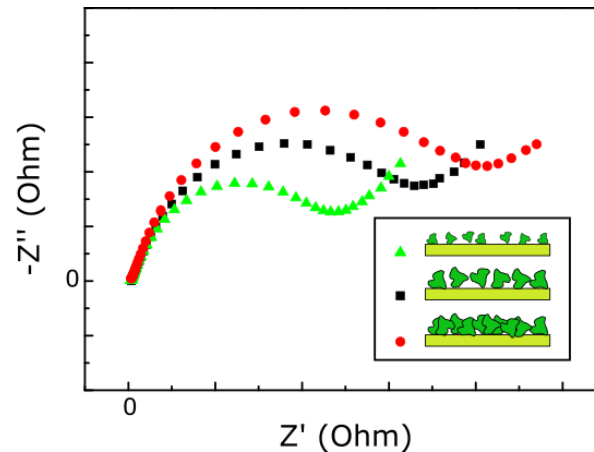
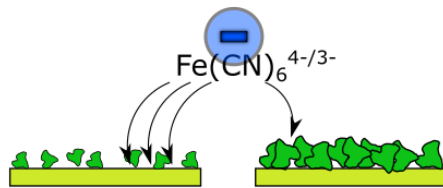
- Vložení střídavého napětí mezi 2 elektrody
- Sledování procházejícího proudu
- Za různých frekvencí



Nyquistův graf

Představa

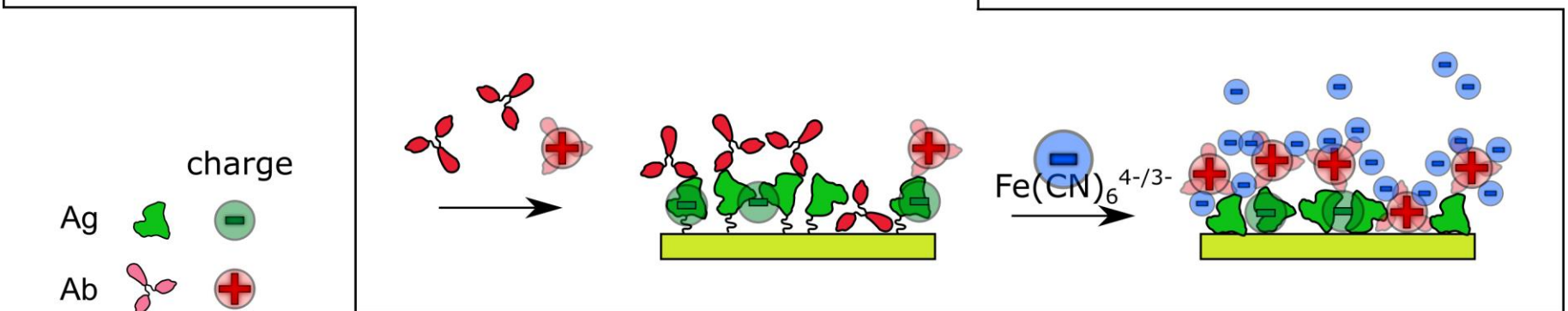
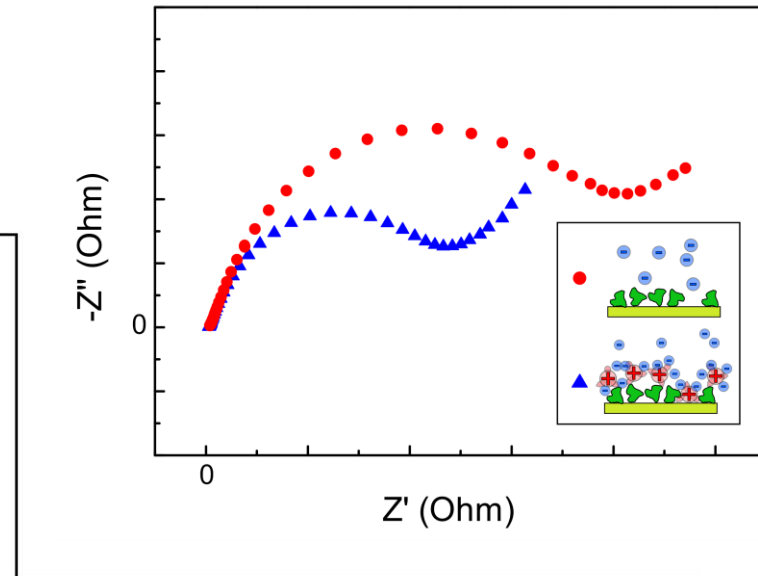
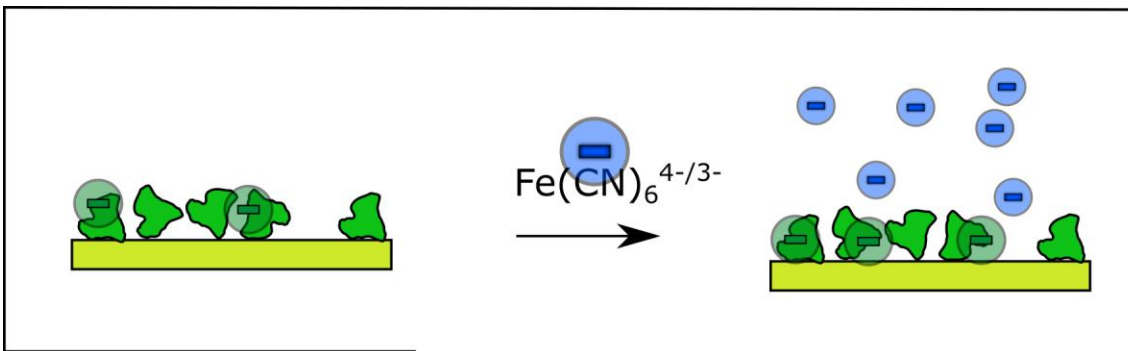
- S narůstajícím materiálem na elektrodě narůstá i impedance
- Redoxní značka – ferro/ferricyanid – $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$




- Náboj látek v blízkosti elektrody!!!


Vliv náboje biomolekul


- Vliv elektrostatických interakcí



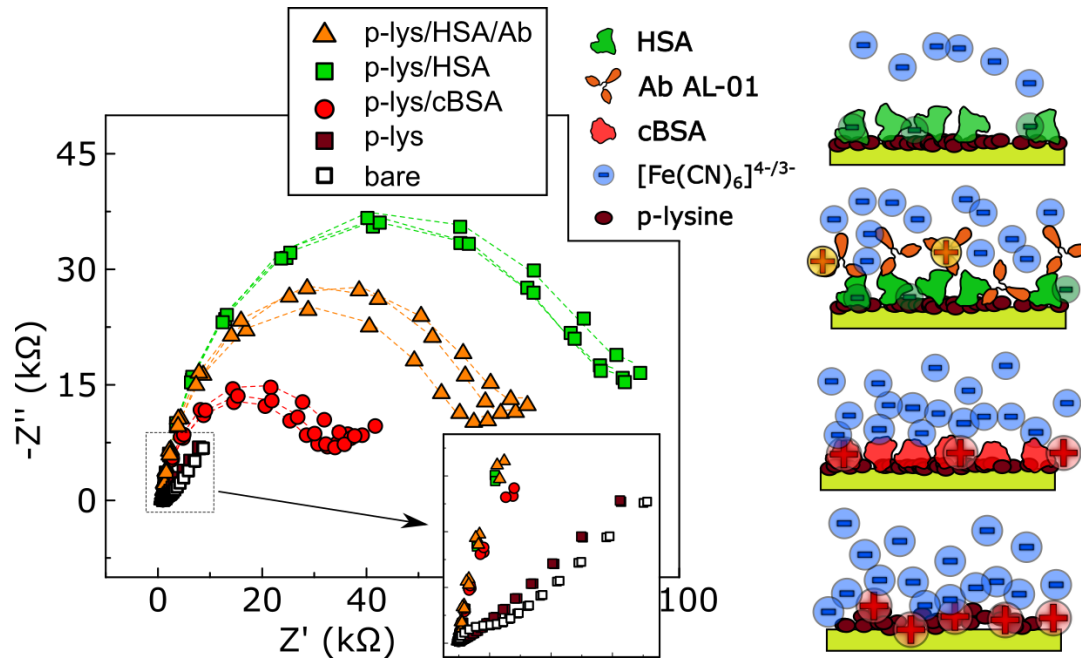
charge

Ag 

Ab 

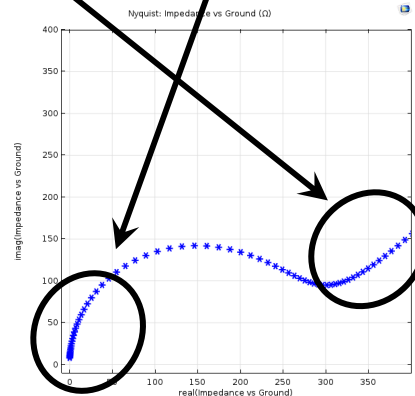
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 

Vliv náboje biomolekul



Elektrochemická impedance

- Elektrochemická detekce budoucnosti
- Možnost detekce bez redoxní značky
- Možnost sledovat děje jak ve střídavé oblasti excitace potenciálu tak i ve stejnosměrné



- V poslední části přednášky budou představeny aplikace elektrochemie uplatňující se v klinické biochemii, analytické biochemii a jejich dopad na každodenní život lidí
- Point-of-care
- Glukometr (implantovatelný)
- DNA sekvenování

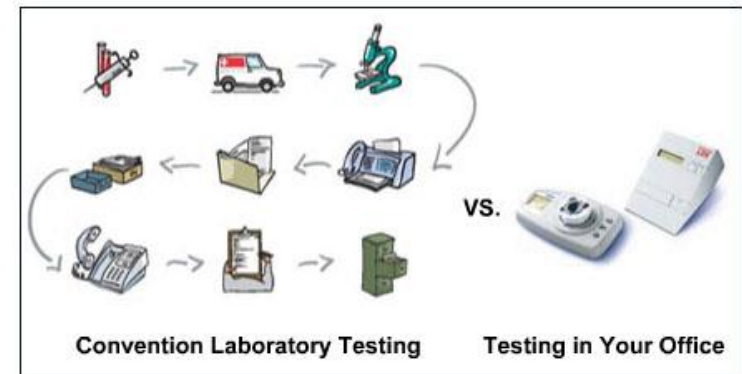
Point-of-care (PoC)

- Obecně
 - Přenesení zdravotnických úkonů (a péče) k místu pacienta (v čase diagnózy)
- **PoC testování**
 - Transfer analytického úkonu na místo odběru vzorku (místo, kde se nachází pacient)
 - Léčba může být upravena, započata než pacient opustí ordinaci
 - „Polní podmínky“, u lůžka (environmentální analýza, krevní testy)



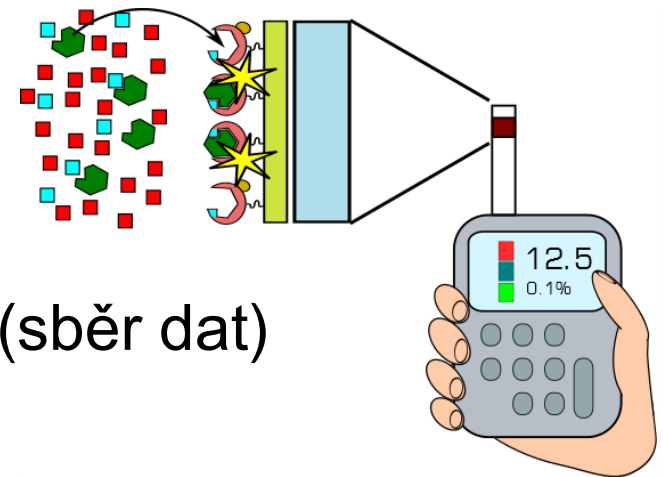
Point of care testing (PoCT)

- Jednoduché
 - Provedení měření
 - Interpretace výsledků
 - Manipulace s přístrojem



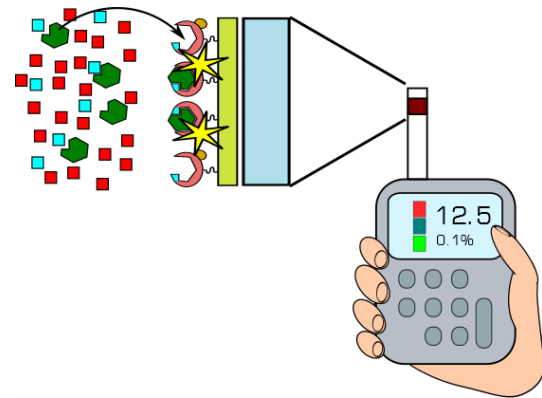
<http://www.whitmiremedical.com>

- Přenosné – Malé rozměry
- Robustní
- Rychlé
- Electronická/vzdálená komunikace (sběr dat)
- **Zajištění spolehlivosti výsledků!**
 - Různě zručné, neškolené osoby



Point-of-care testing (PoCT)

- Detekční část (vnesení vzorku)
- Zpracování signálu (elektronika, mikropočítač)
- Vyhodnocení (algoritmus and programy)
- Výstup/odečet (display)



- Papírkové indikátory – pH, proužky na testování moči
- Složitější přístroje – malé stolní instrumenty

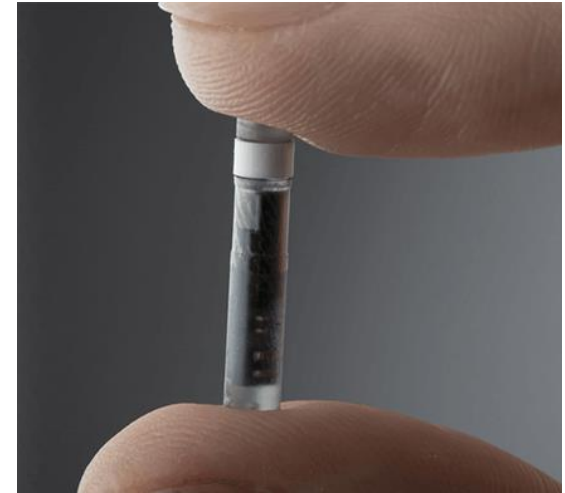
Analyty detekované pomocí PoCT přístrojů

- Glukóza
 - Krevní plyny ($p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$)
 - Laktát
 - CO-oximetrie (O_2Hb , HHb , hypoxie...)
 - Hemoglobin A1c
-
- Abbott Precision Xceed Pro Glucose Meter
 - IL Gem Blood Gas analyser
 - Siemens DCA 2000 Haemoglobin A1C Analyser

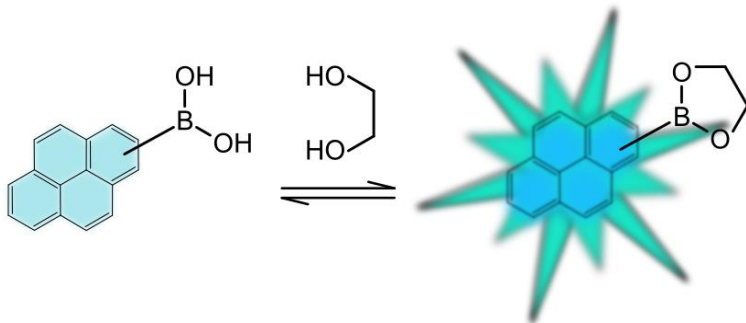


Implantovatelný glukometr

- Interakce glukózy s polymerem
- Současnost - Změna fluorescence

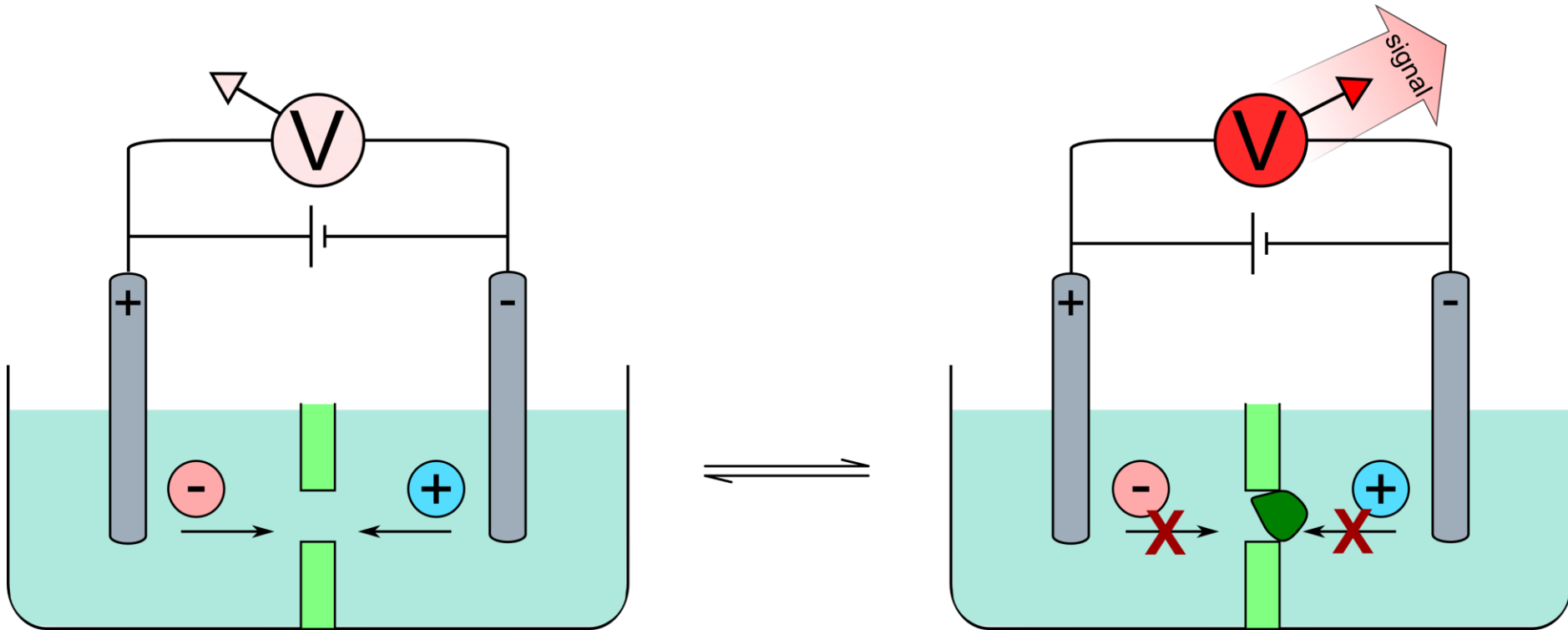


Pro ilustraci:



eversense

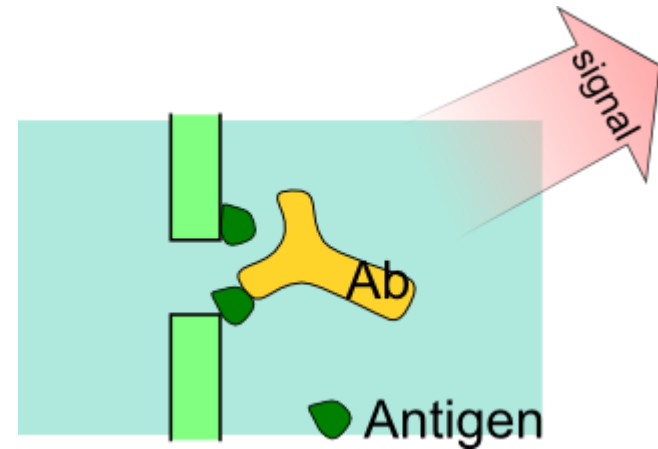
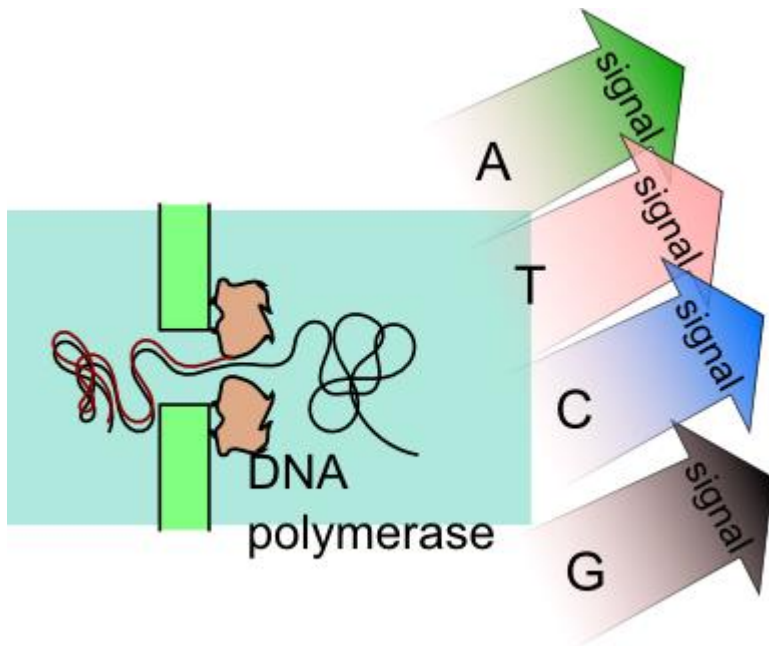
Měření s nanopóry - princip



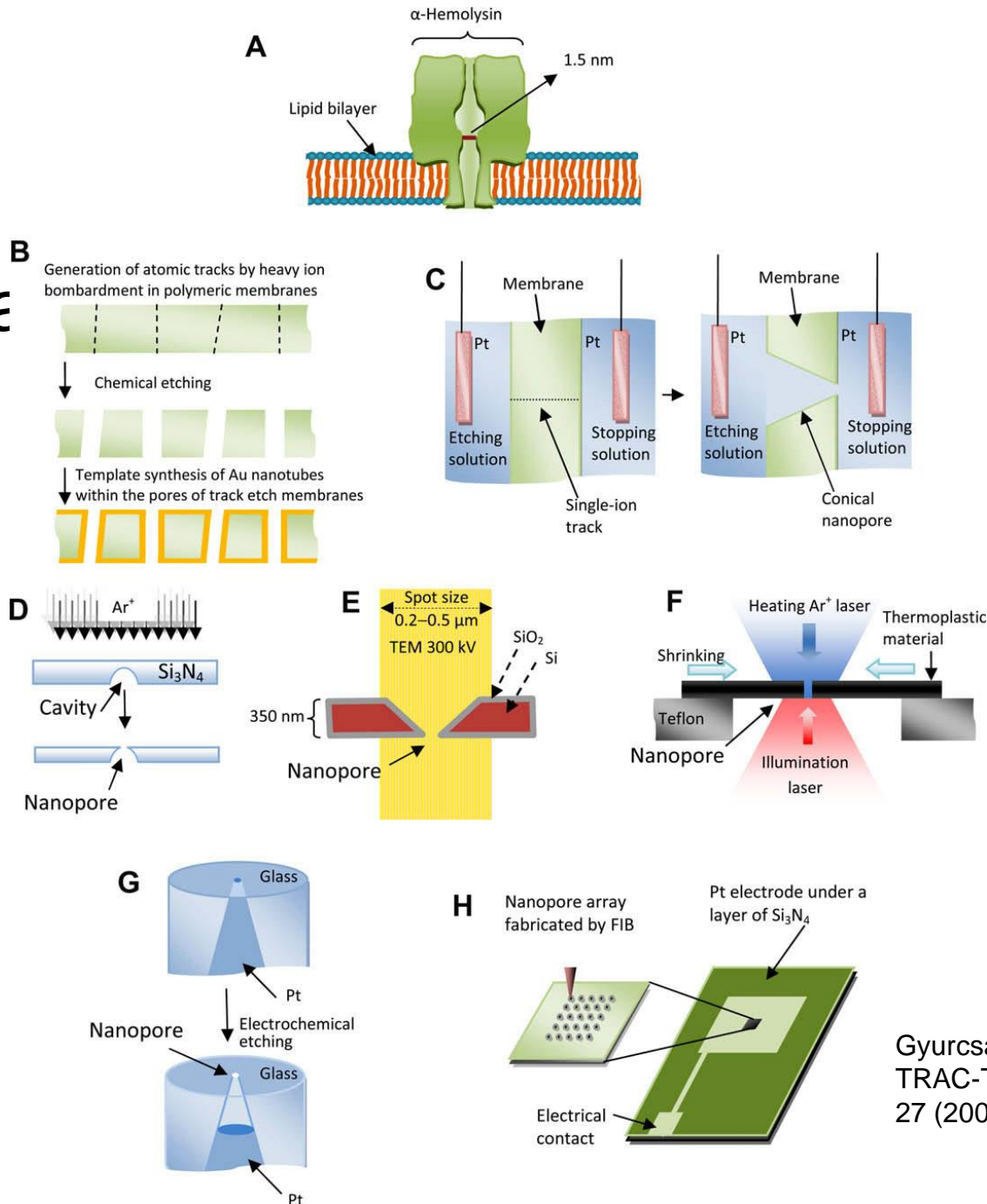
- Sledování toku iontů (proud)
- blokace = generování signálu
- Nanopór = průměr v jednotkách nm

Nanopóry Sensing

- Nanopóry modifikované např.
 - Antigen
 - DNA polymeráza



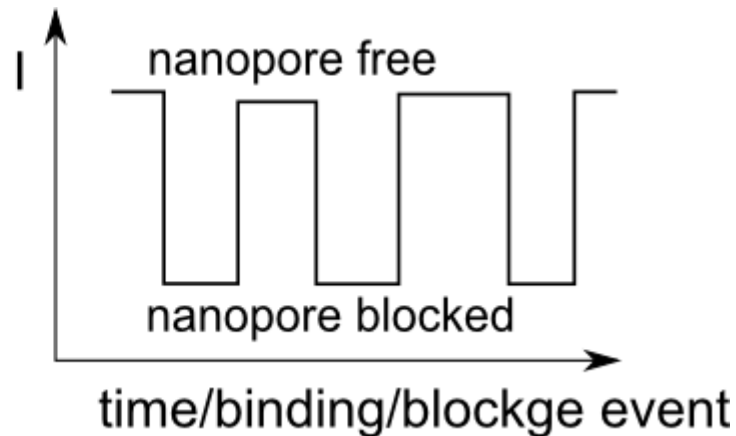
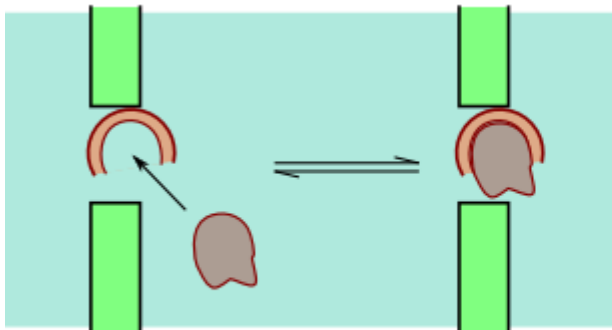
• Zásae



Gyurcsanyi,
TRAC-Trend Anal Chem
27 (2008) 627

Nanopóry

- Afinitní reakce – rovnovážné (Ab-Ag vysoká vazná konstanta)
- Signál podobný pulzům
- Vazba – uvolnění – vazba – atd...
- Odhad afinity biomolekul



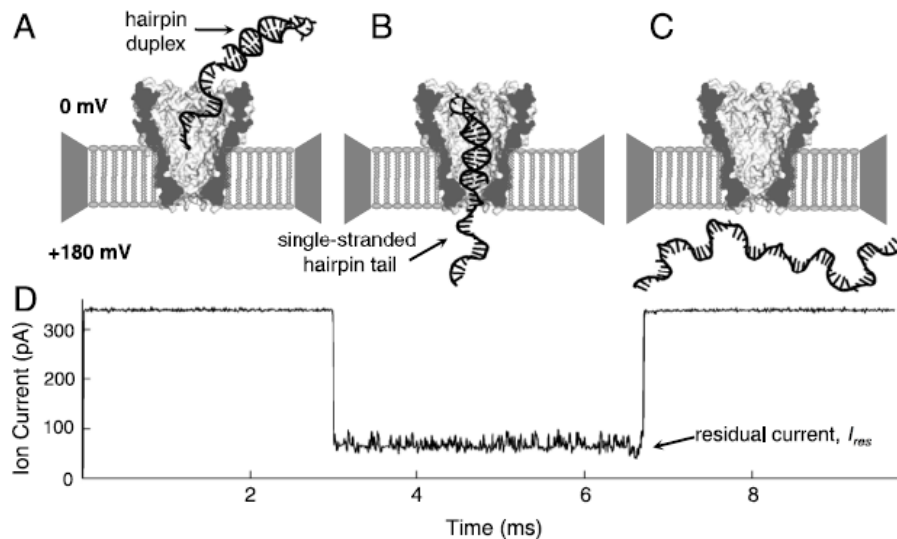
Nanopóry

sekvenování DNA

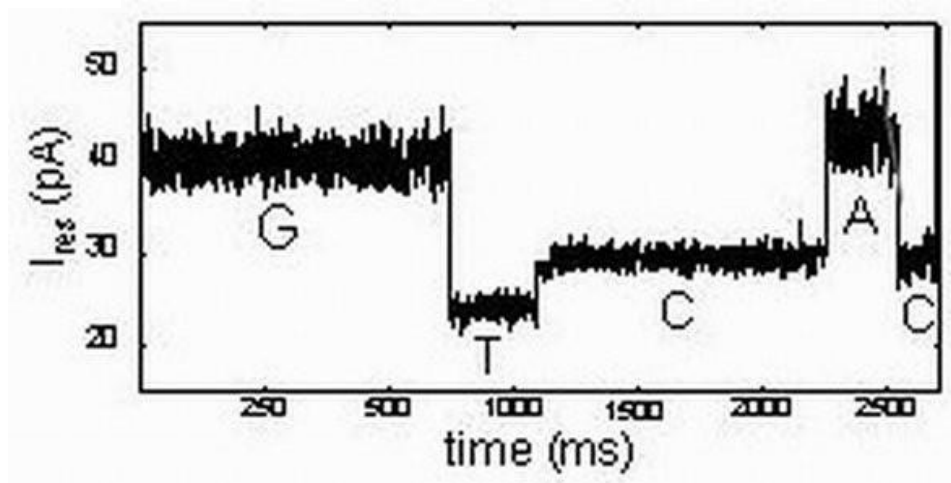
- Možná schémata detekce:
- Póry vytvořené v membráně
 - Pevné (ion beam milling)
 - Bilipidické vrstva (proteinový pór)
- Detekce
 - Náboj jednotlivých bazí (A,G,C,T)
 - Blokace průchodem báze
 - Počet H⁺ uvolněný při DNA polzmerizaci

Real-time DNA sekvenování

Příklad



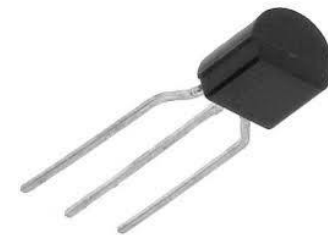
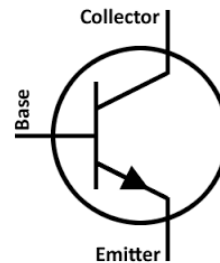
- Různá úroveň reziduálního proudu pro různé nukleotidy



Field-effect transistor (FET)

Unipolární tranzistor

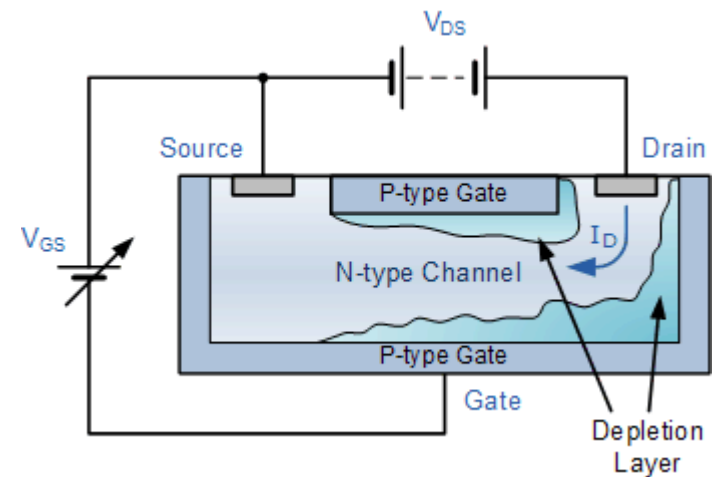
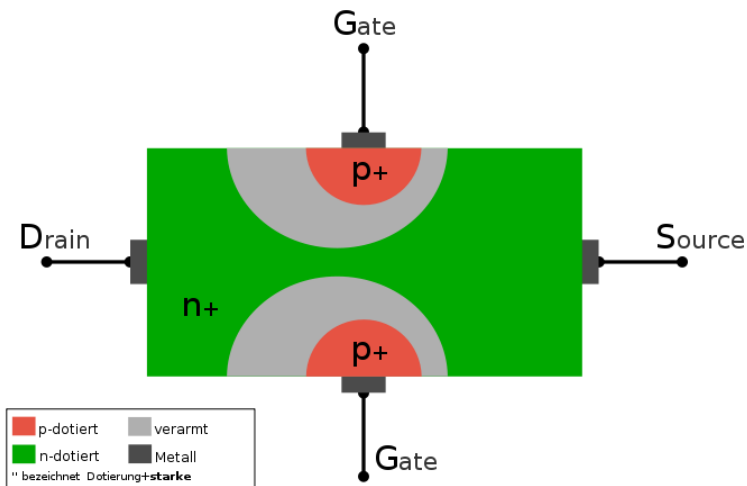
- Polovodičové součástky
- Tranzistory řízené elektrickým polem
- Základ kategorie přístrojů ***Field Effect Devices***
 - *ISFET* (ion-sensitive field-effect transistors)
 - *EGFET* (extended gate field effect transistors)
 - capacitive *EIS* sensor (electrolyte-insulator-semiconductor)
 - *LAPS* (light-addressable potentiometric sensors)
- Tranzistor (bipolární)
 - Elektronická součástka
 - Zesílení signálu



Field-effect transistor

Unipolární tranzistor

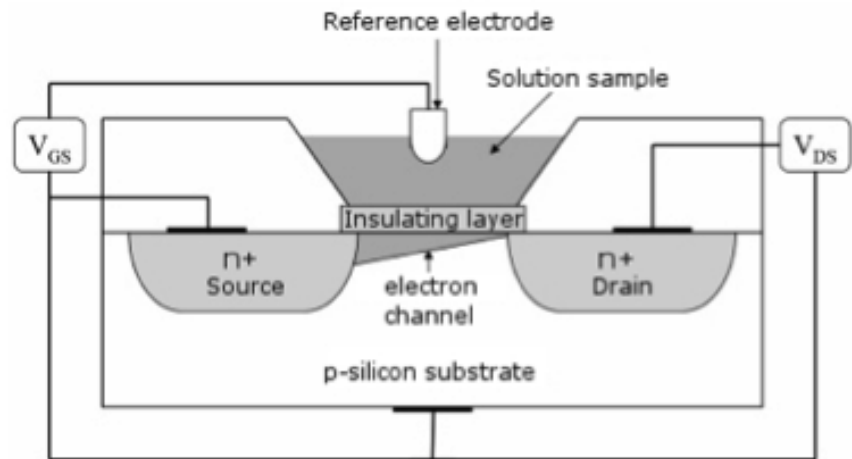
- Princip
 - Elektrické pole tvoří regiony s přebytkem náboje v polovodičových substrátech



FET senzory

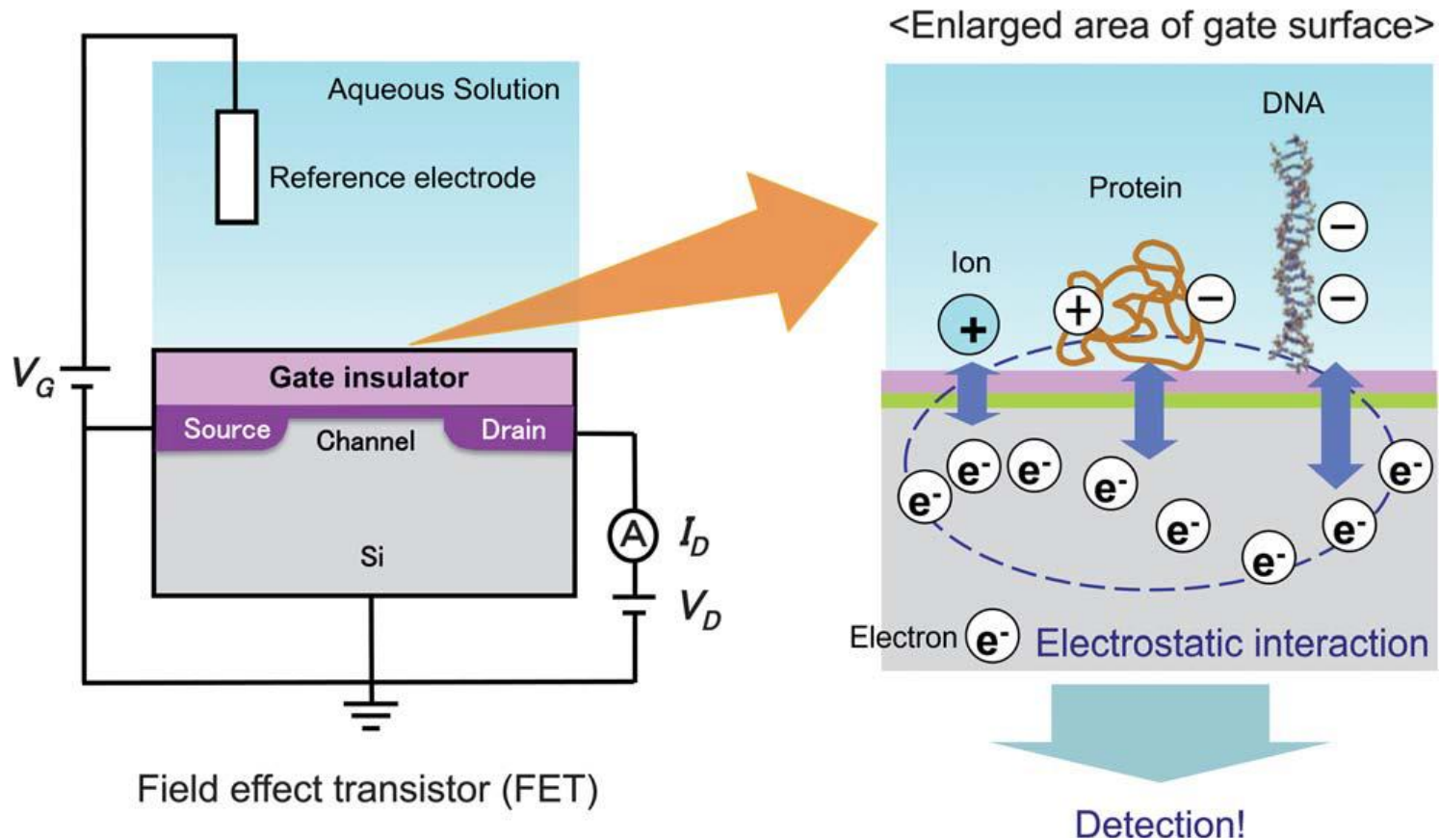
Princip funkce

- Tvorba signálu (modulování elektrického pole)
 - pH
 - Změna koncentrace iontů
 - Změna iontového složení při enzymatických reakcích
 - Adsorpce makromolekul
 - Afinity vazba biomolekul (Ab-Ag, DNA hybridizace)
 - Změny v přítomnosti živých organismů (e.g. Metabolické procesy)



FET senzory

Princip funkce



Kombinace FET s nanopóry sekvenování DNA



- Ion semiconductor sequencing
- ISFET
- Není třeba značených nukleotidů
- Uvolnění H^+ při polymerizaci

