

Biosensory

(analytická biochemie)

Petr Skládal

Ústav biochemie PŘF MU

skladal@chemi.muni.cz

Biosensory dnes

- hlavně **glukosa**
- běžně v lékárnách, e-shopech, propojení s mobilem

glukometr | Alza.cz

cz a.s. (CZ) https://www.alza.cz/search.htm?exps=glukometr

Search

Poslední 2 kusy za tuto cenu

100% DOPRAVA ZDARMA

10% ~~1 995,-~~
1 795,- Koupit
bez DPH 1 561,-
Skladem 2 ks

Beurer GL50
Glukometr vhodný pro osobní použití pro měření obsahu cukru v krvi, podsvícený LCD displej, jednoduché měření, doba měření cca 5 sekund, 480 pamětí s datem a časem, součástí balení je odběrové zařízení, 5 jehel, 5 testovacích roužků, baterie, pouzdro, návod

100% DOPRAVA ZDARMA

5 ★★★★★

10% ~~1 349,-~~
1 208,- Koupit
bez DPH 1 099,-
Skladem > 5 ks

iHealth BG5
Příslušenství glukometr pro iOS zařízení iPhone a iPad, bezdrátový, bluetooth

1x VYSTAVENO DOPRAVA ZDARMA

5 ★★★★★

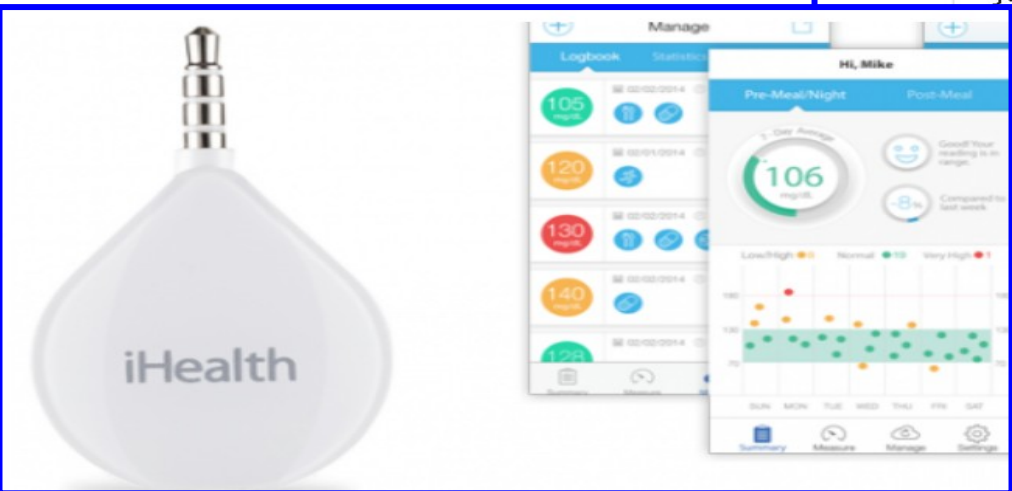
10% ~~1 349,-~~
1 208,- Koupit
bez DPH 1 099,-
Rozbaleno skladem

iHealth AGS-1000I
Příslušenství testovací proužky pro iHealth glukometr BG5, aplikace iHealth Gluco-Smart, po načtení QR kódu na víčku balení aplikace automaticky sleduje množství spotřebovaných testovacích proužků a jejich expiraci

VÍCE NEŽ 98% SPOLEHLIVOST

5 ★★★★★

559,- Koupit
bez DPH 499,-



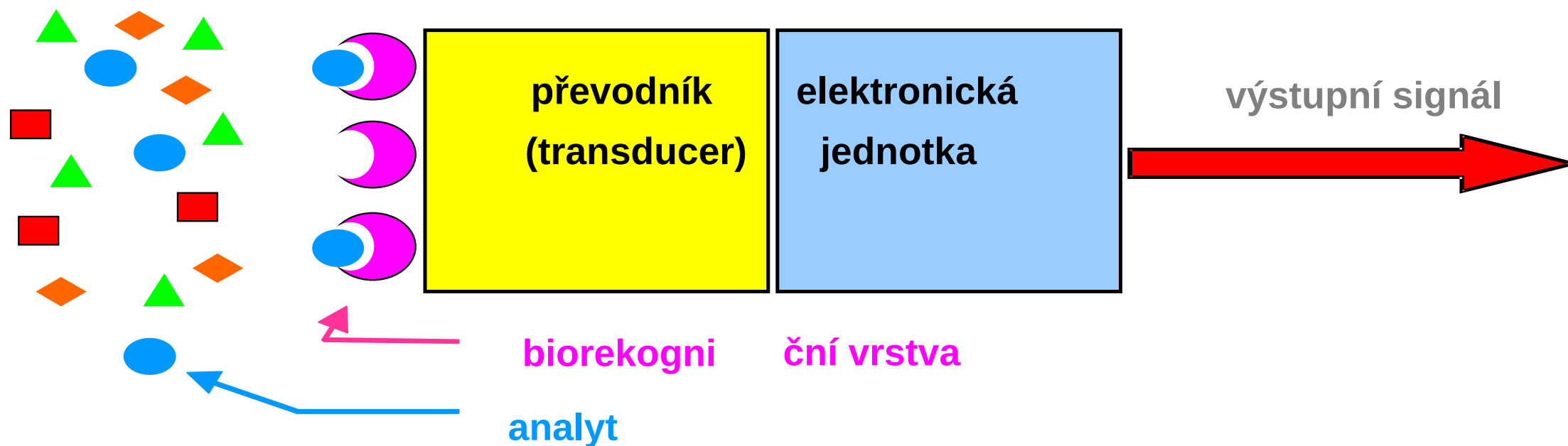
IOT a bioanalytika?

- diabetes: pumpa (1) dávkuje kontinuálně inzulin (2) je na základě dat z biosensoru pro glukosu (3) řízena aplikací ve smartphonu (4), který data posílá na web



Biosensor je analytický přístroj

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



Biorekogniční složka

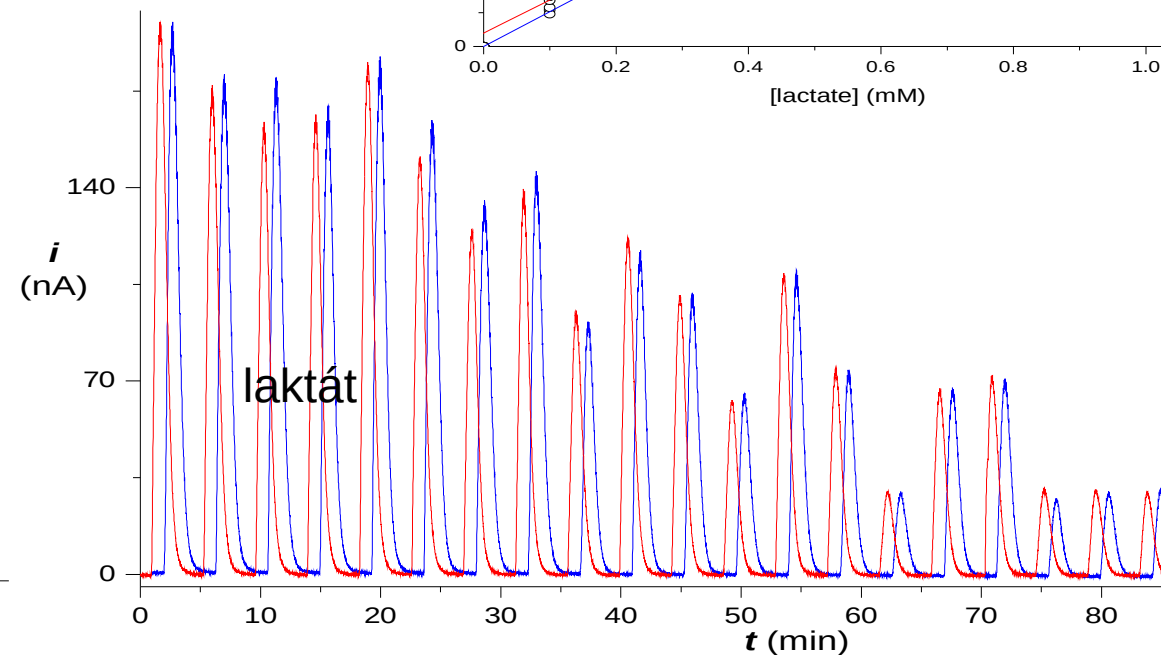
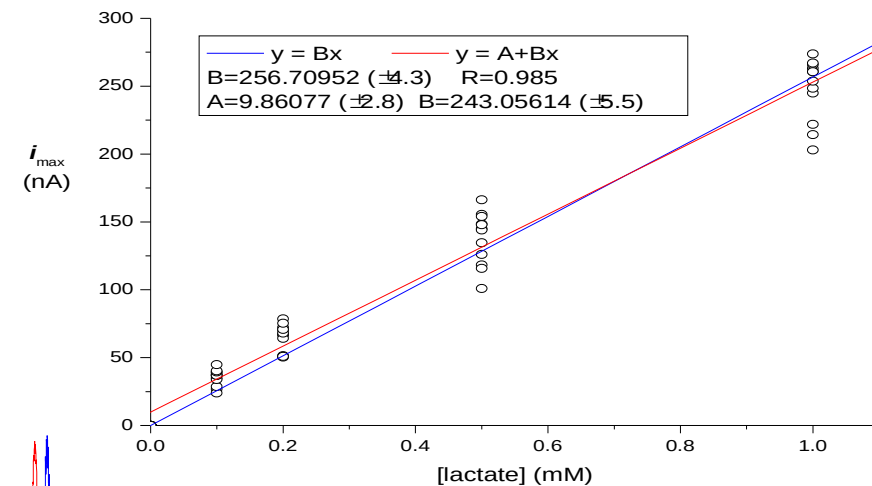
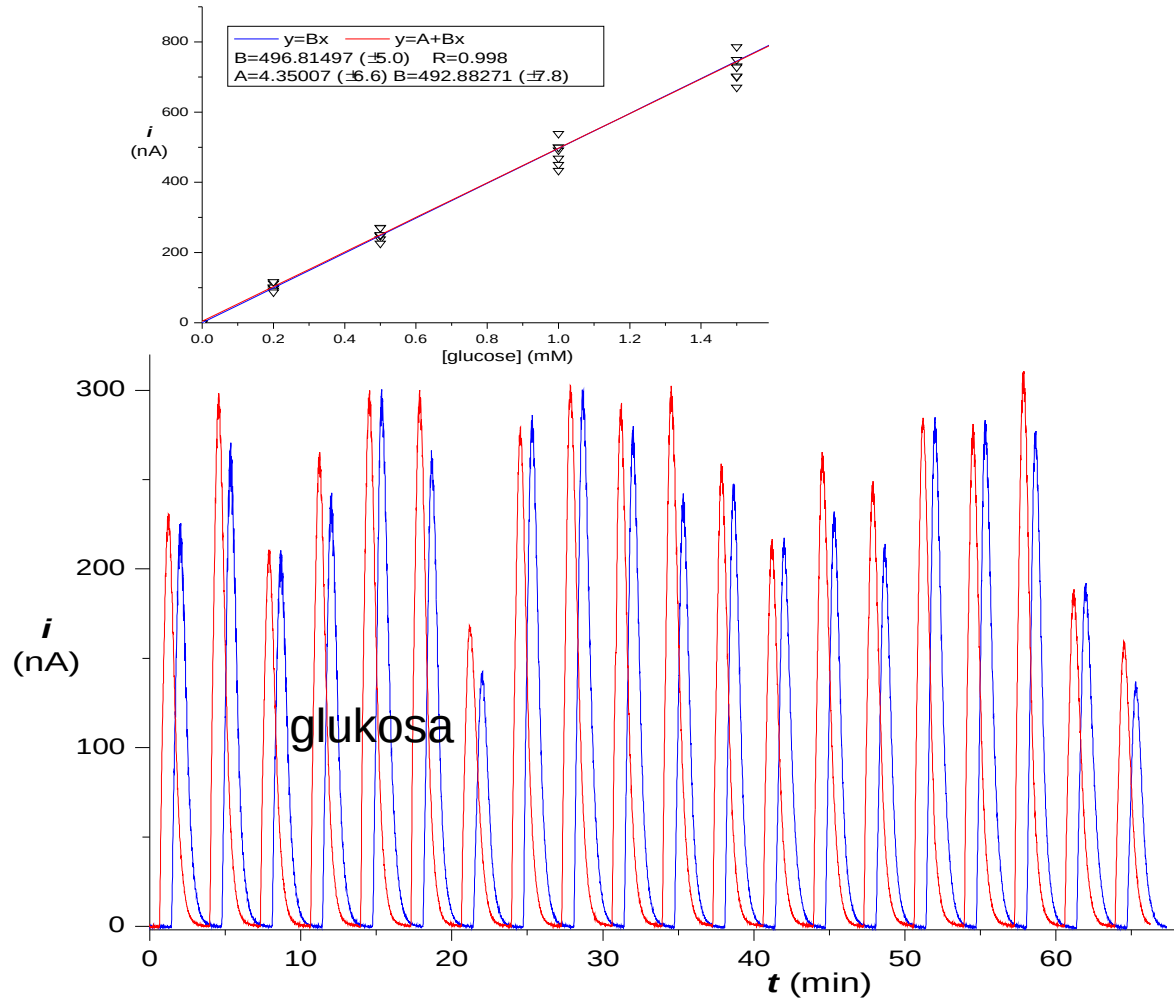
rozpoznává stanovovanou látku, kterou specificky bud':

- **přeměňuje:**
enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus
– analyt je substrátem či inhibitorem
- **nebo váže:**
protilátky s antigeny (hapteny)
hybridizace nukleových kyselin
vazba ligandů na receptory
interakce sacharidů s lektiny

Fyzikálně-chemický převodník

- elektrochemické (potenciometrie, **amperometrie**, voltametrie)
- optické (fotometrie, **fluorimetrie**, luminometrie, **fotonika**)
- piezoelektrické a akustické
- elektromagnetické, kalorimetrické, nanomechanické

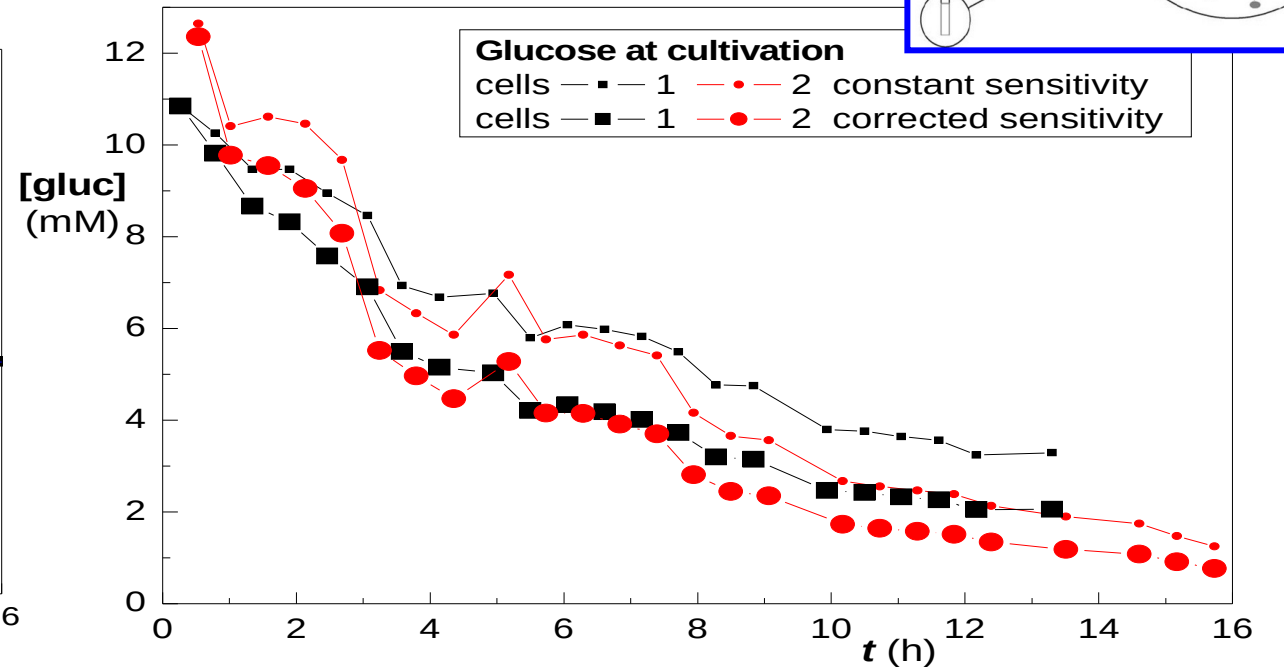
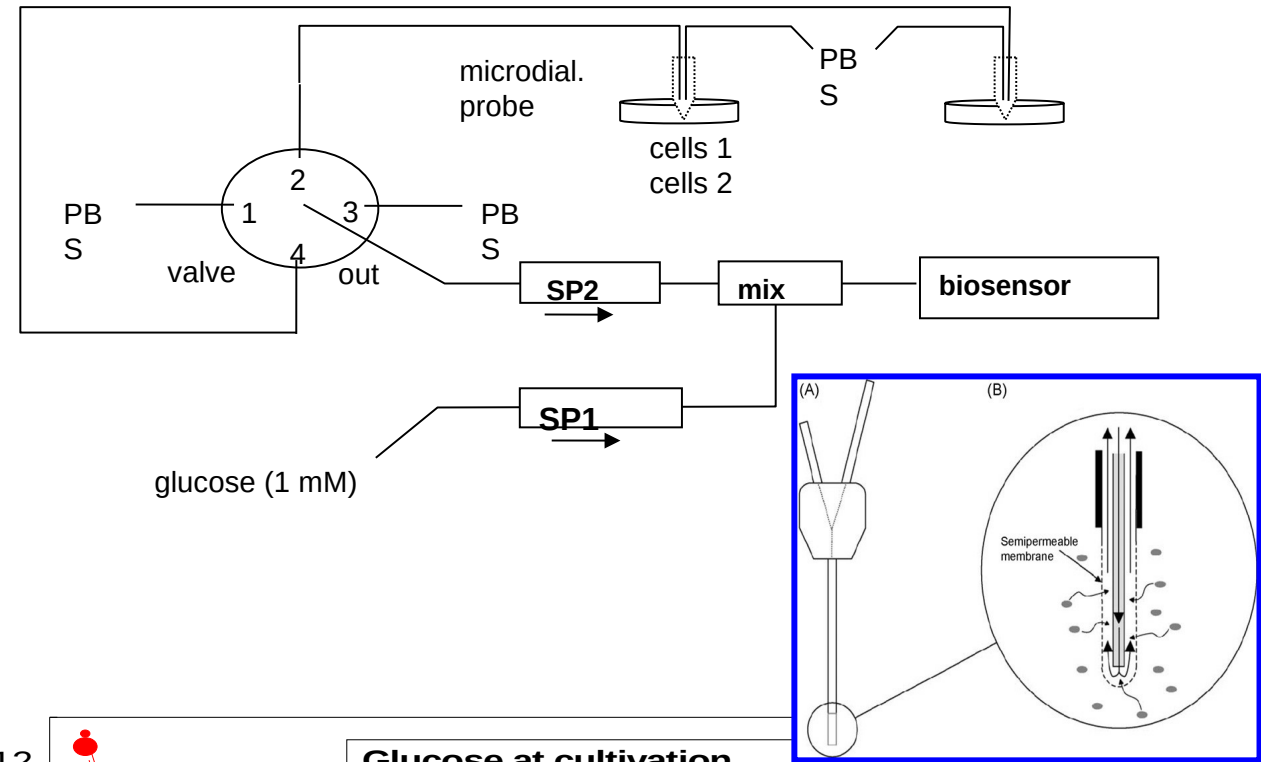
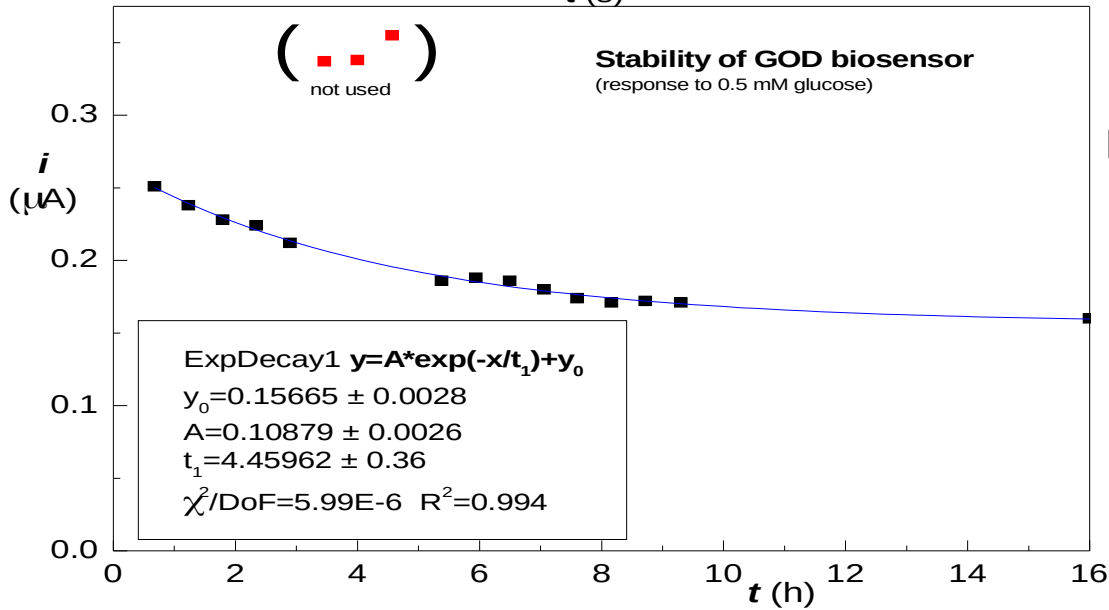
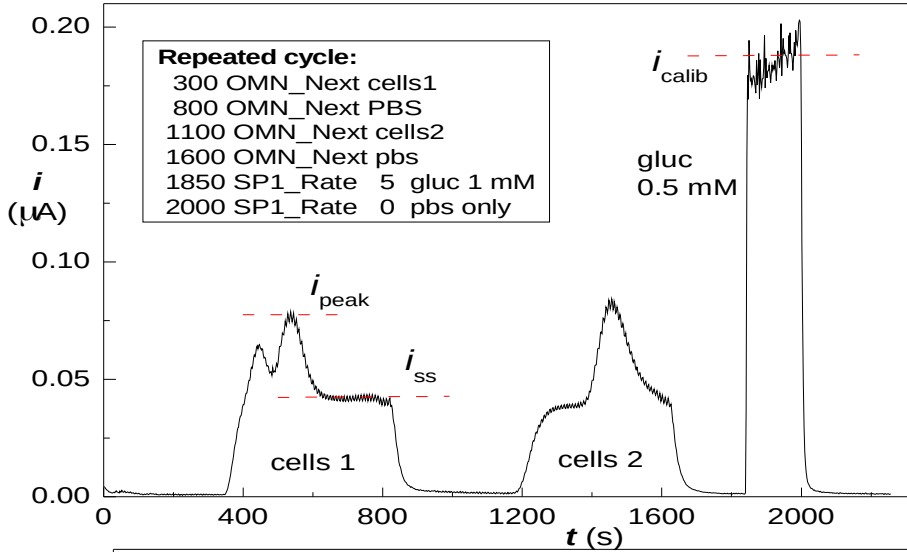
Glukosa, laktát, ...



- amperometrické průtočné biosensory – typicky klinická laboratoř
- analýza kultivačních směsí, dvě opakované série měření

Mikrodialýza

■ dlouhodobé monitorování



Inhibice cholinesterasy

- enzym účinkuje v nervové soustavě při přenosu vzruchů

- organofosfáty

pesticidy (insekticidy dichlorvos, actelic, ...)

bojové otravné látky (sarin, soman, tabun, novičok)

R alkyl, aryl; R' alkyloxy, aryloxy, subst. amin;

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

Z = O nebo S

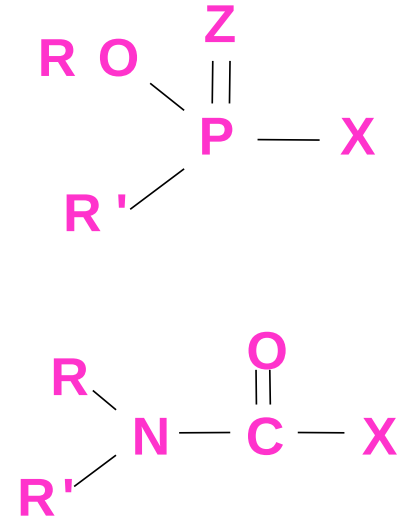
- karbamáty

pesticidy (carbofuran, carbaryl, aldicarb, ...)

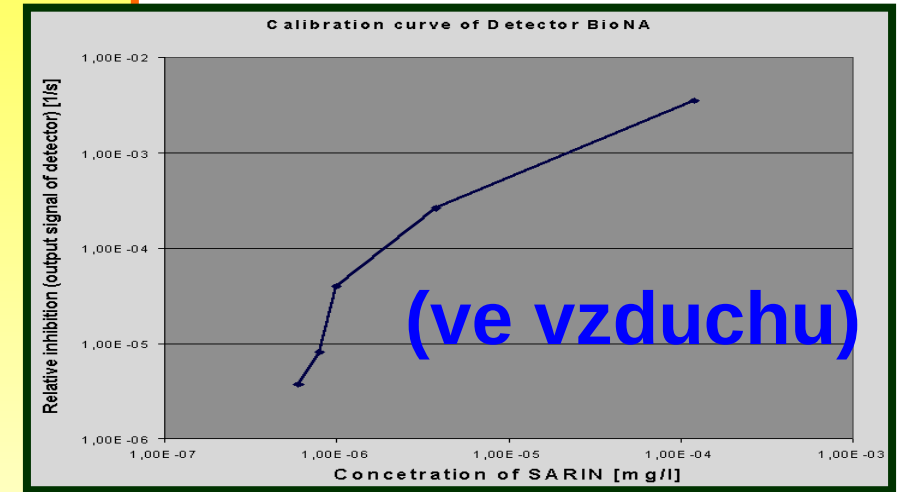
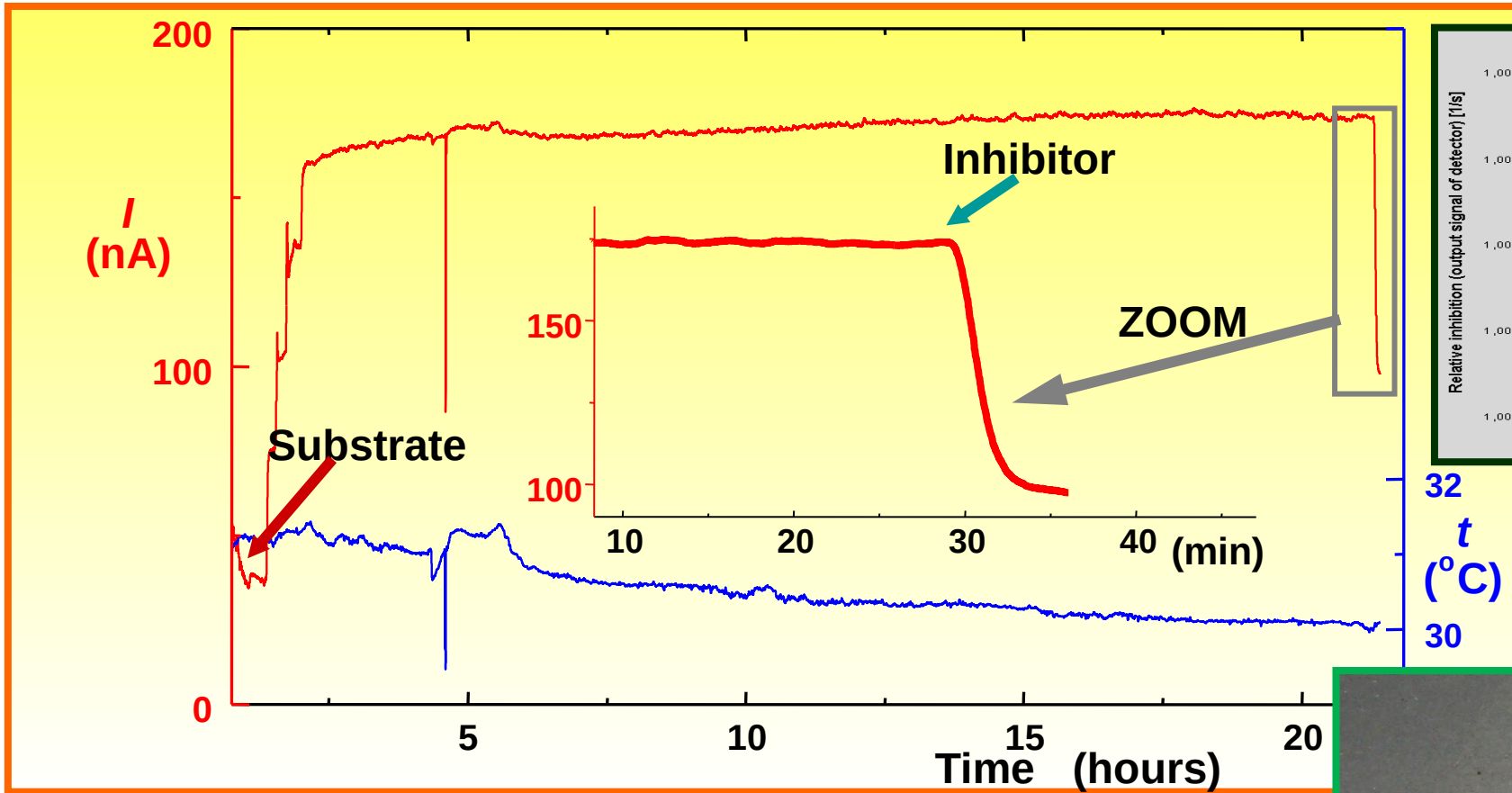
R,R' H, alkyl, aryl; X odcházející skupina - CN, F, *p*-nitrofenyl

- používané enzymy: **acetylcholinesterasa** (AChE, EC 3.1.1.7) a **butyrylcholinesterasa** (BChE, EC 3.1.1.8); rekombinantní ChE - lepší vlastnosti úpravou aktivního místa

- pokud není známý druh pesticidu před vlastní analýsou, lze stanovit parametr **anticholinesterasová toxicita**



AChE biosensor pro armádu

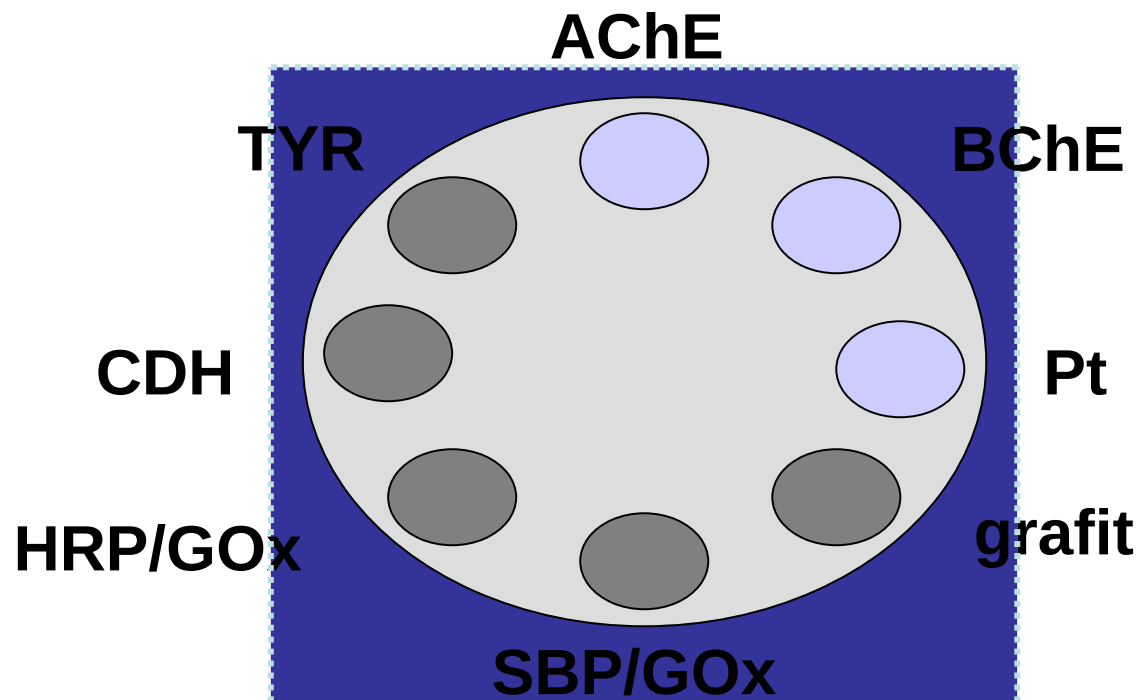


- sarin, soman, novičok – **válečné použití, také moderní teroristé**
- dlouhodobé monitorování **ve vzduchu**
- **alarm systém**

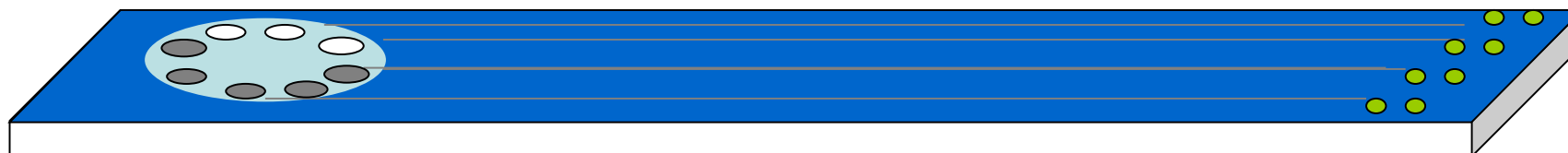


Multikanálový biosensor pro charakterizaci odpadních vod

- acetylcholinesterasa (AChE)
- butyrylcholinesteaasa (BChE)
- tyrosinasa (Tyr)
- peroxidasy (HRP, SBP)
- celobiosa dehydrogenasa (CDH)
- glukosa oxidasa (GOX)



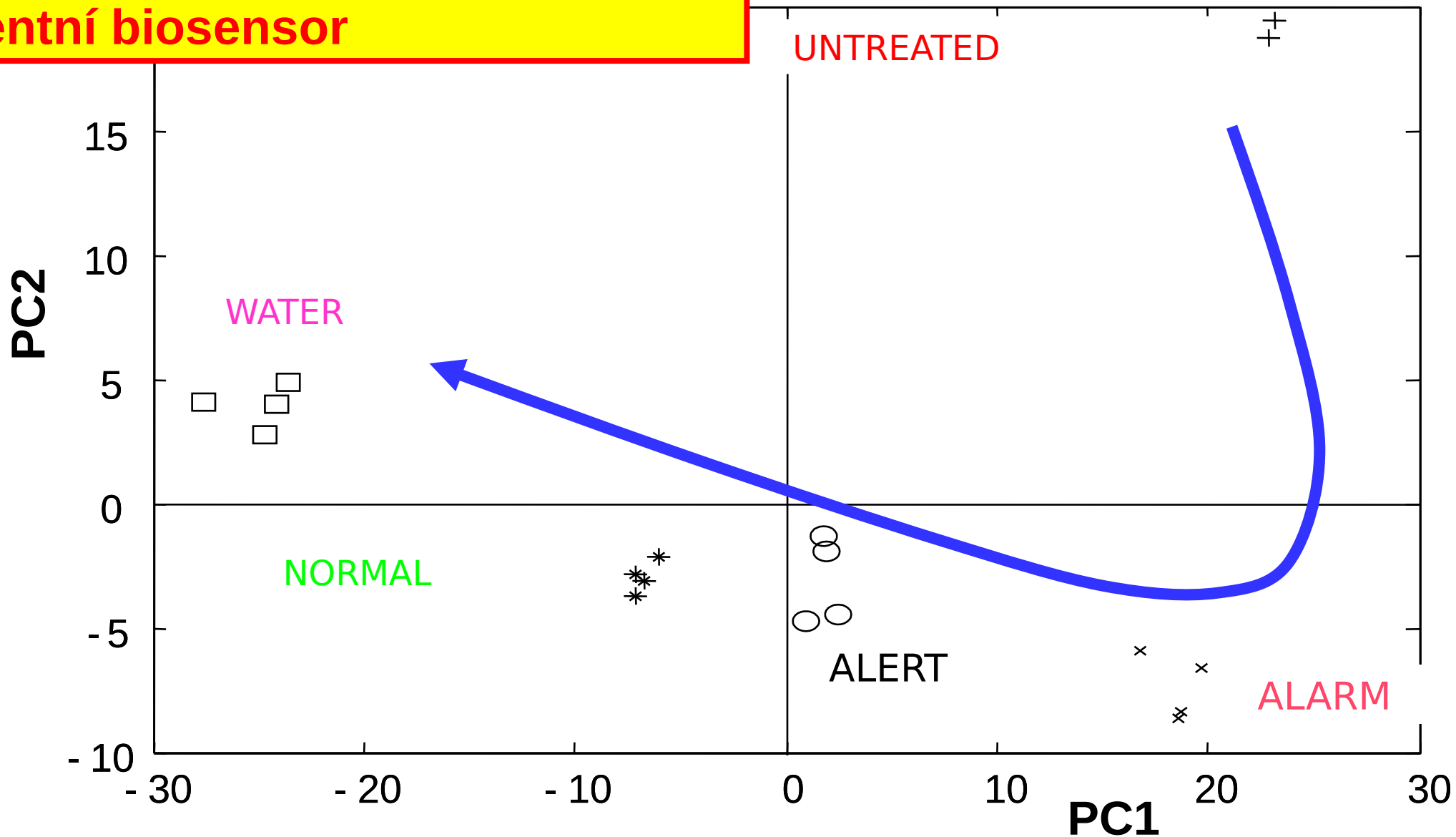
⇒ zesíťování glutaraldehydem



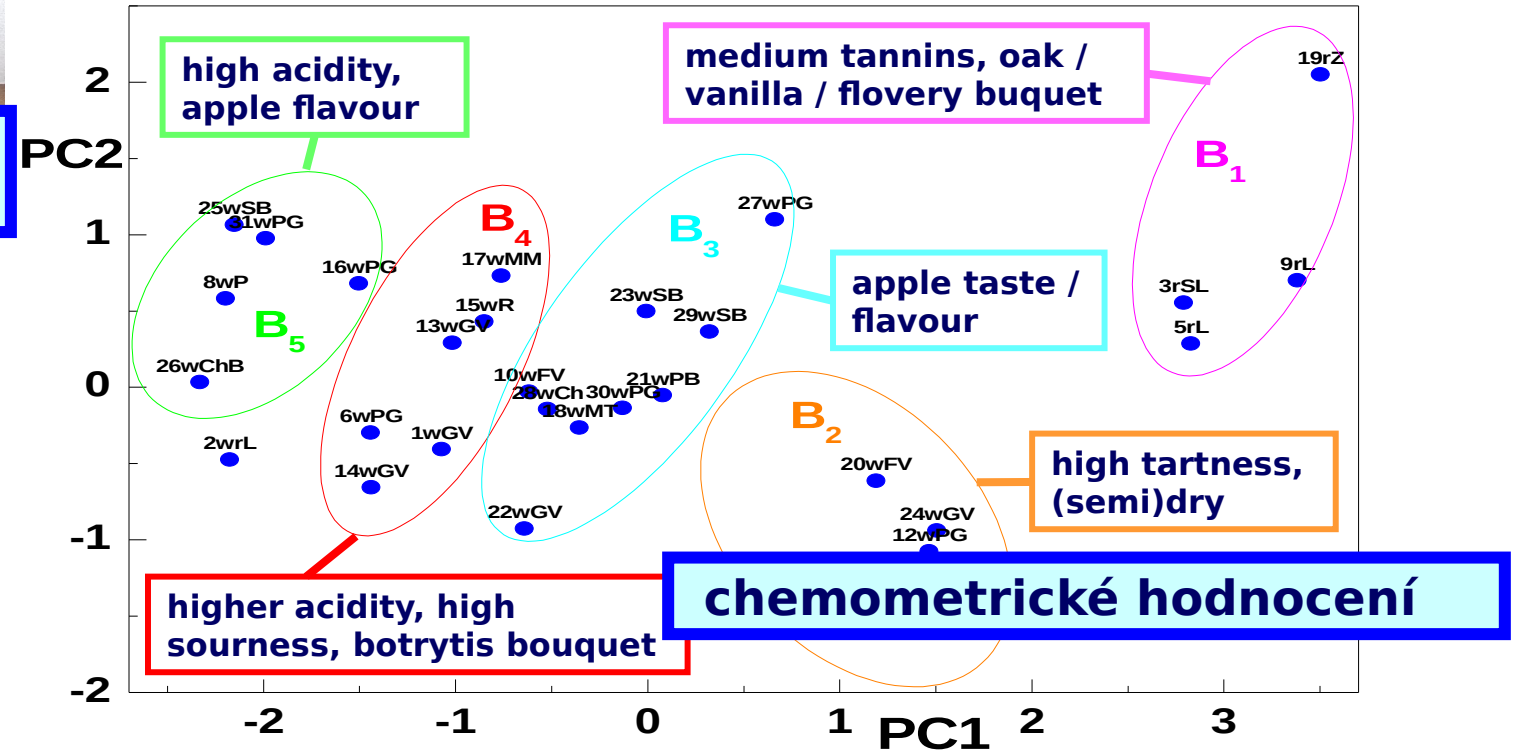
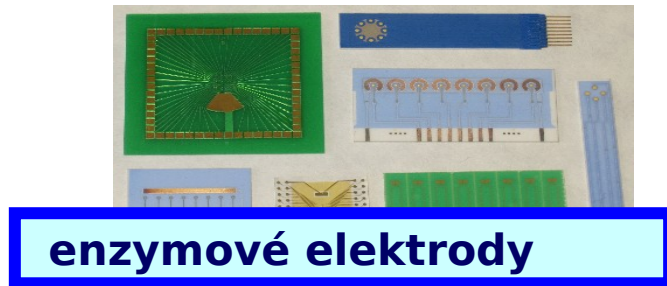
kombinace s chemometrií (PCA) zjednodušuje interpretaci komplexních dat pro uživatele

inteligentní biosensor

Zjednodušená klasifikace



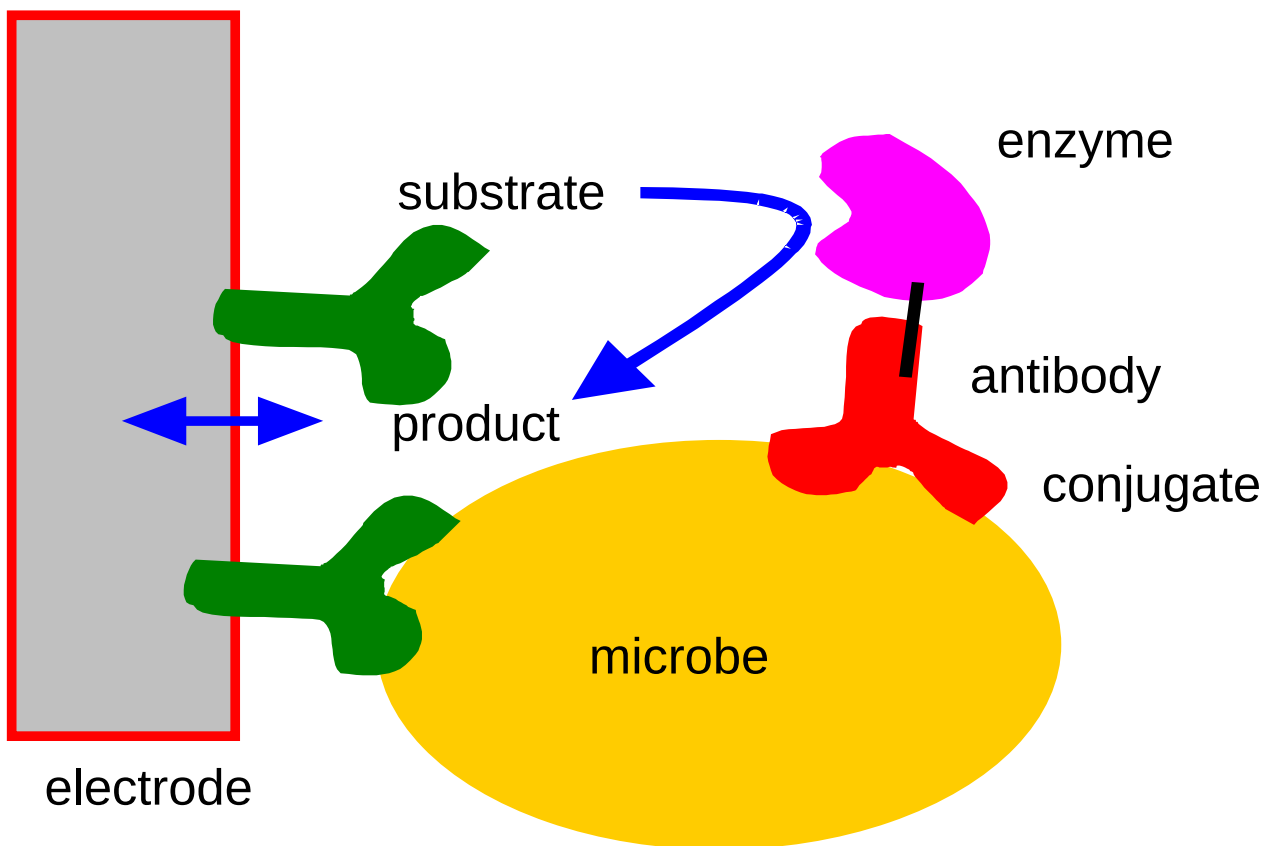
Bioelektronický jazyk: chuť produktu



Výstup: dobrý produkt!
(bezpečnost, originalita, stáří, falšování, složení, ...)

Electrochemické imunosenzory

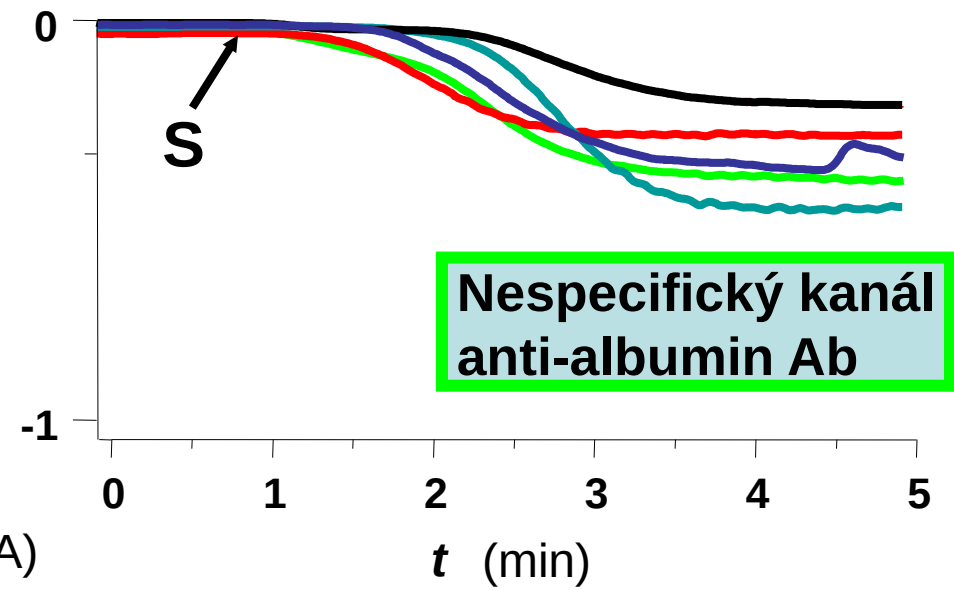
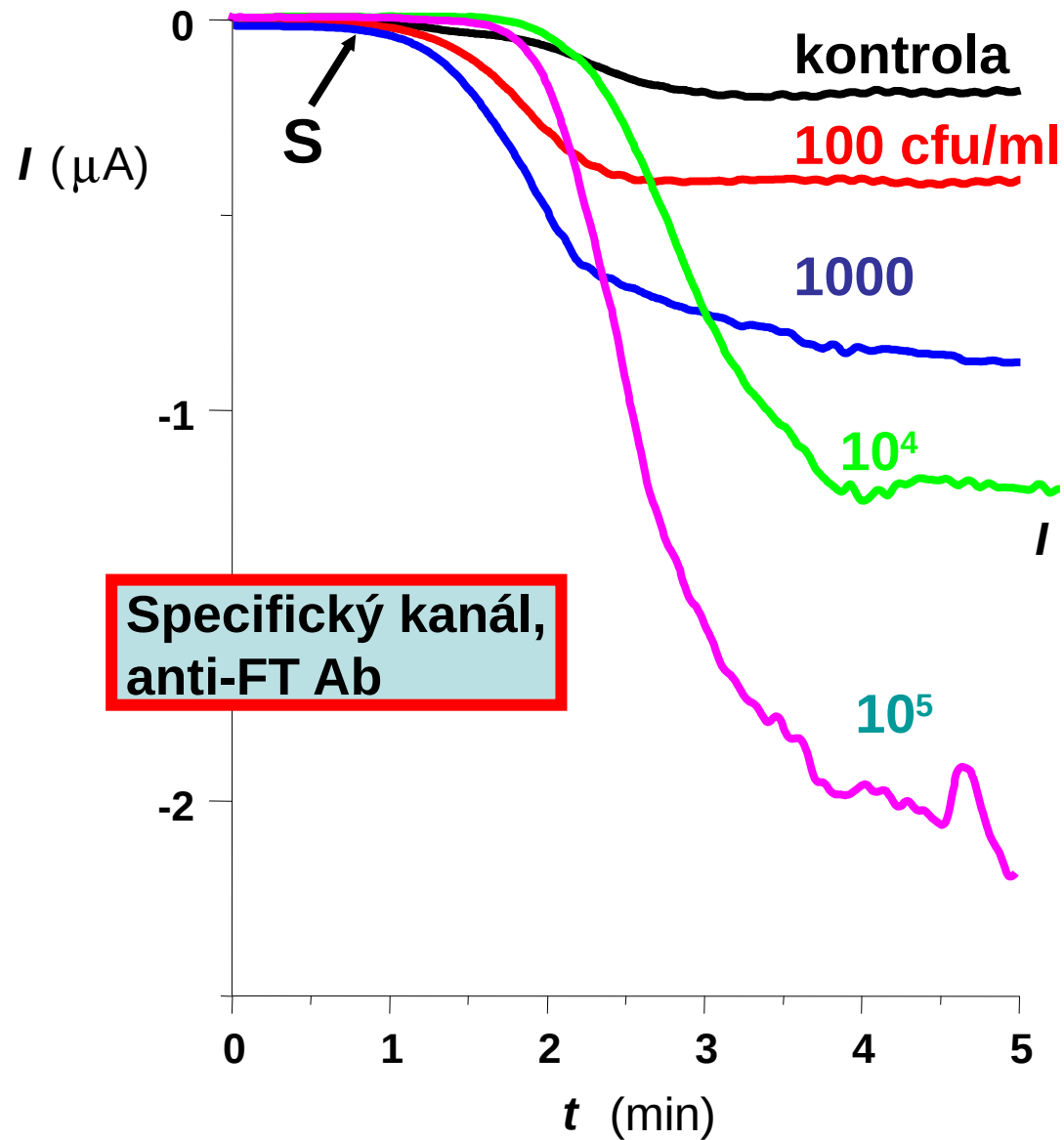
- citlivost a jednoduchost
- specifita – protilátky (Ab)



sensor se **zachytávací Ab**
tracer = **druhá Ab** v konjugátu
s **enzymem-značkou**

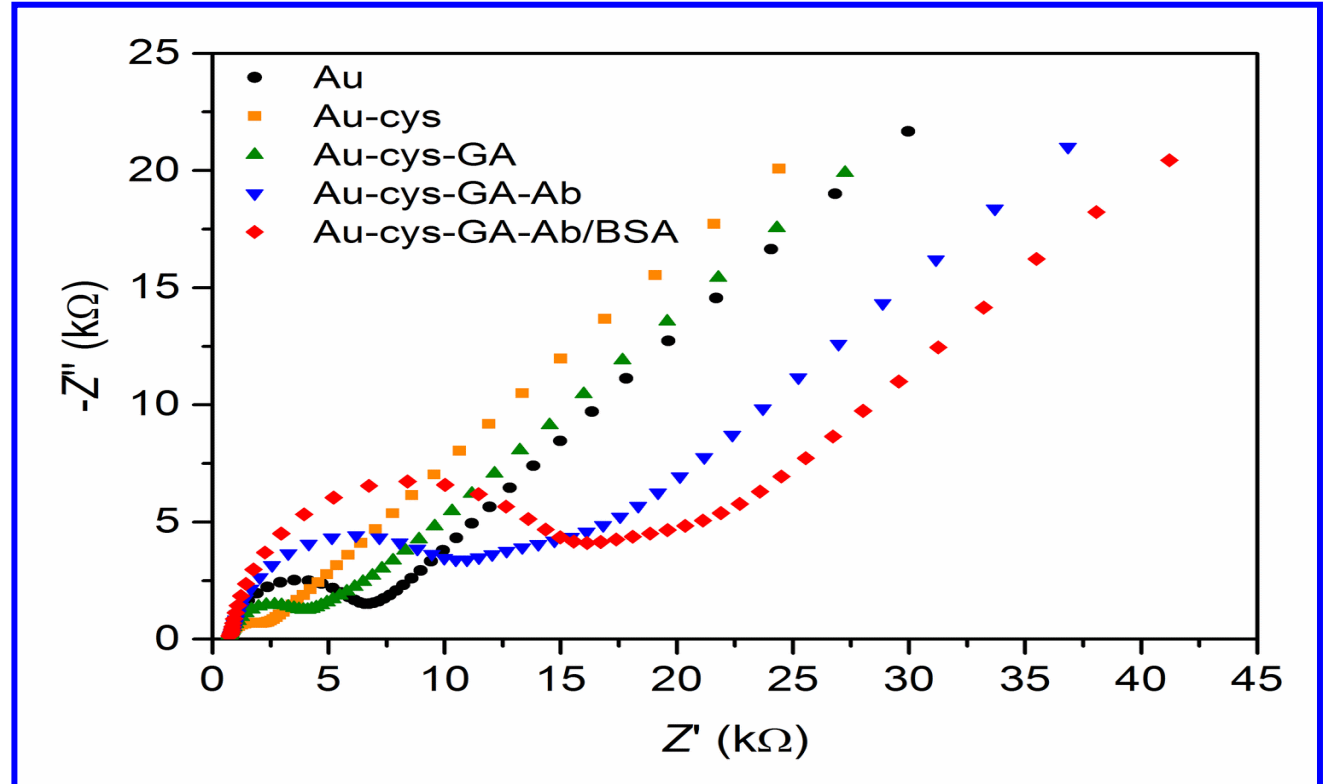
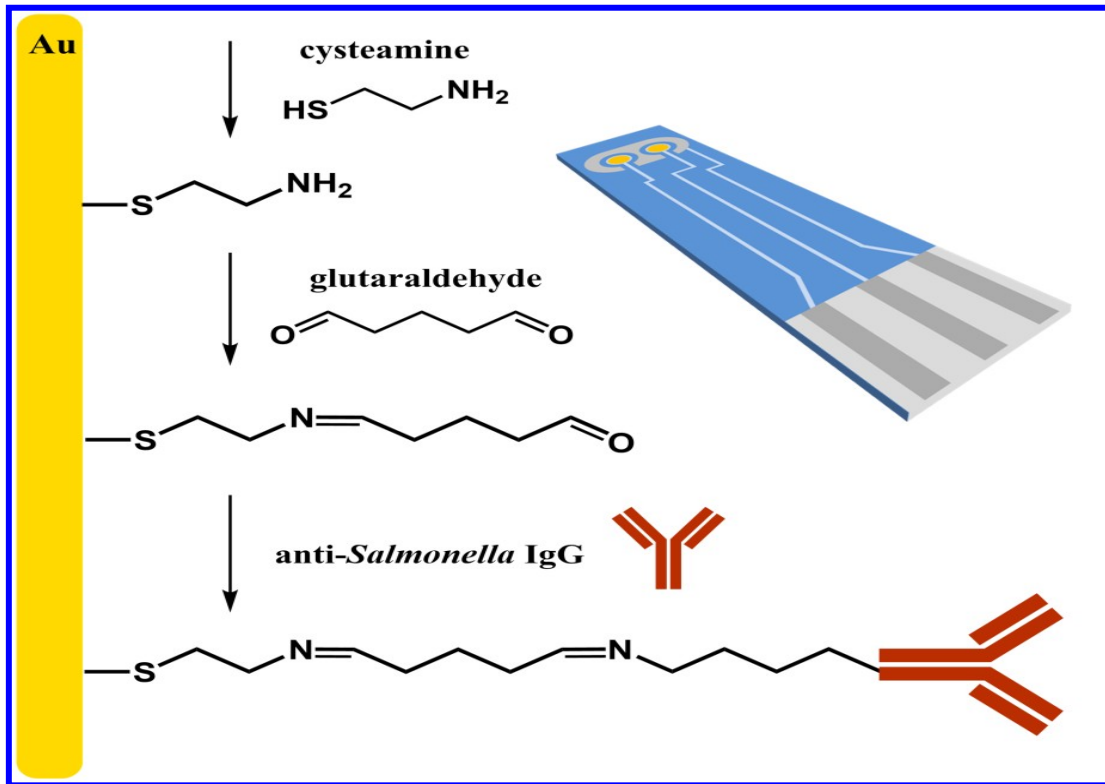
Postup:
Inkubace se vzorkem, promytí
Inkubace s tracerem, promytí
Měření odezvy - elektrochemicky

Živé buňky - *Francisella tularensis*



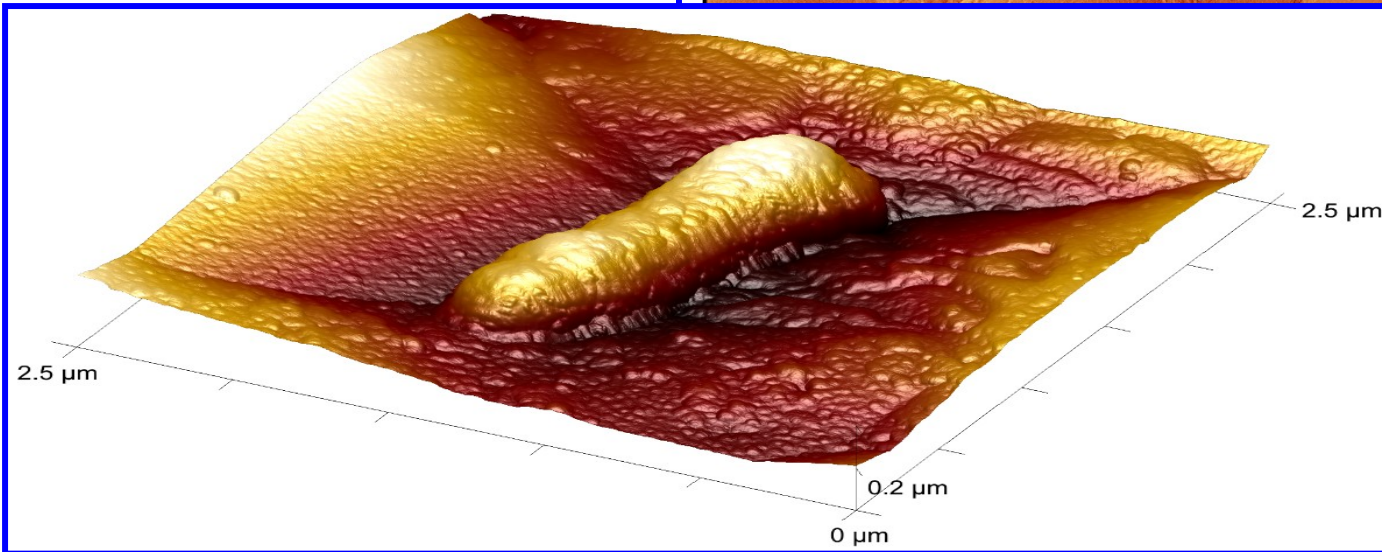
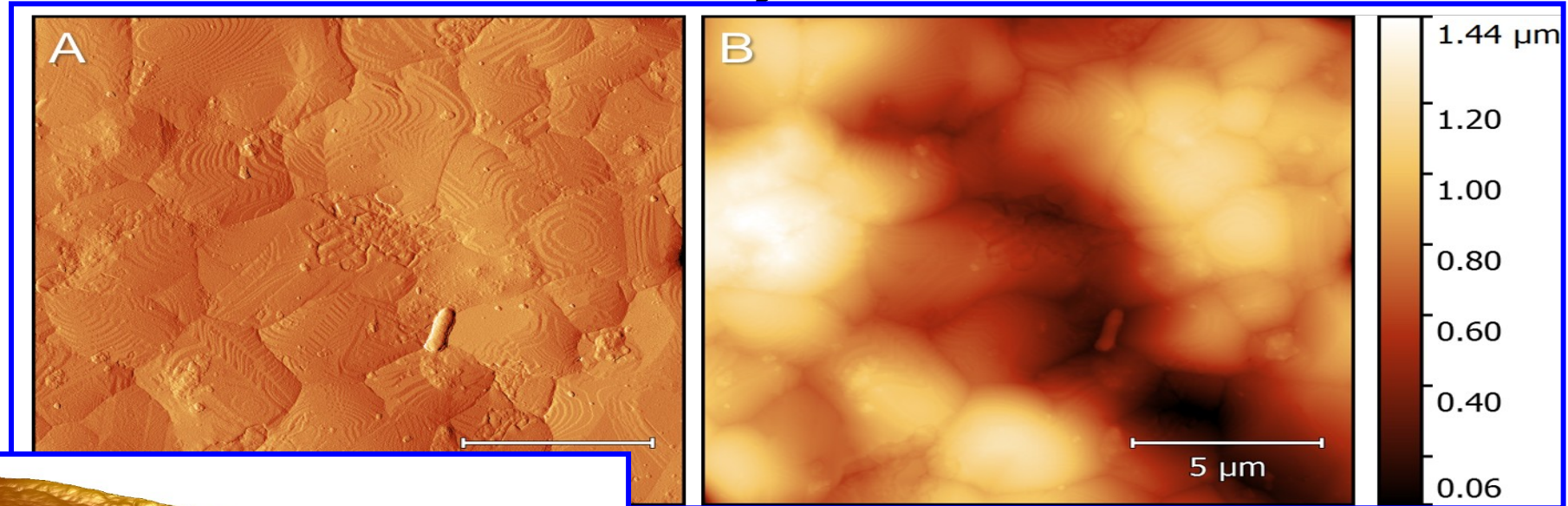
Impedanční imunosenzor - *salmonela*

- EIS – není třeba značit
- duální Au sensor
- imobilizace Ab na cysteamin, blokace BSA



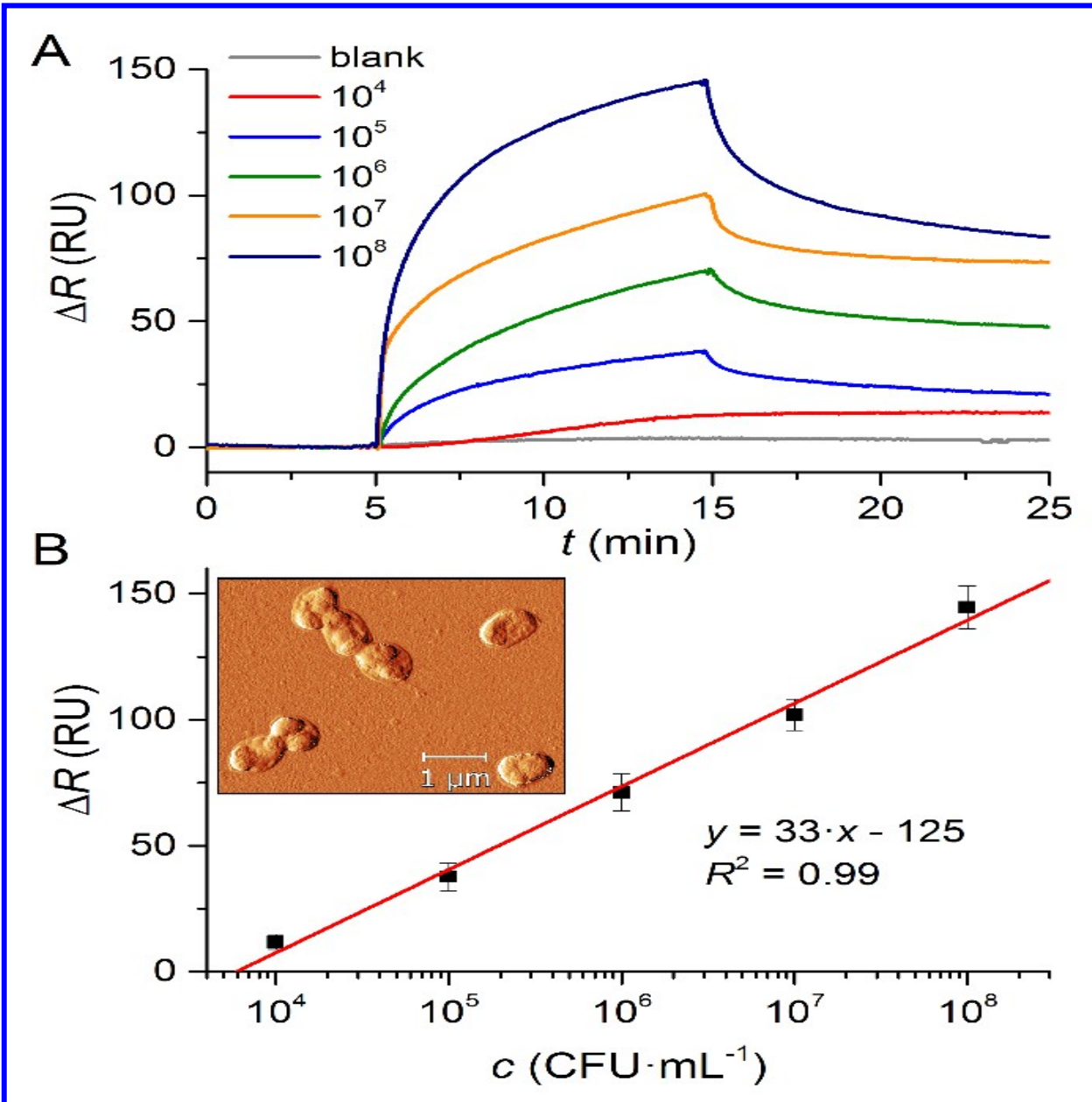
Salmonella a imuno-SPE

- Je bakterie opravdu zachycena?
- AFM sken povrchu – nalezena buňka *Salmonelly*
- A) error, B) height
- (FastScan Bio)

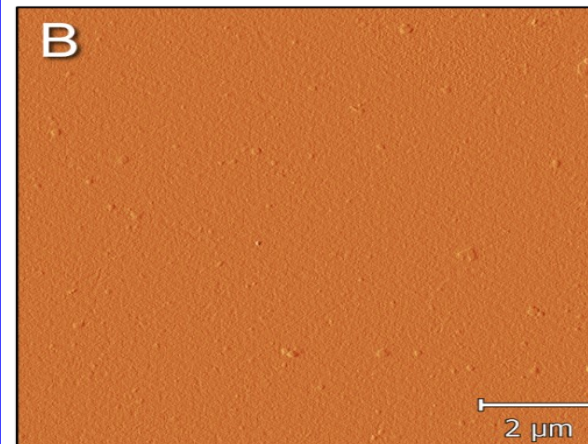


AFM mikroskopie atomárních sil

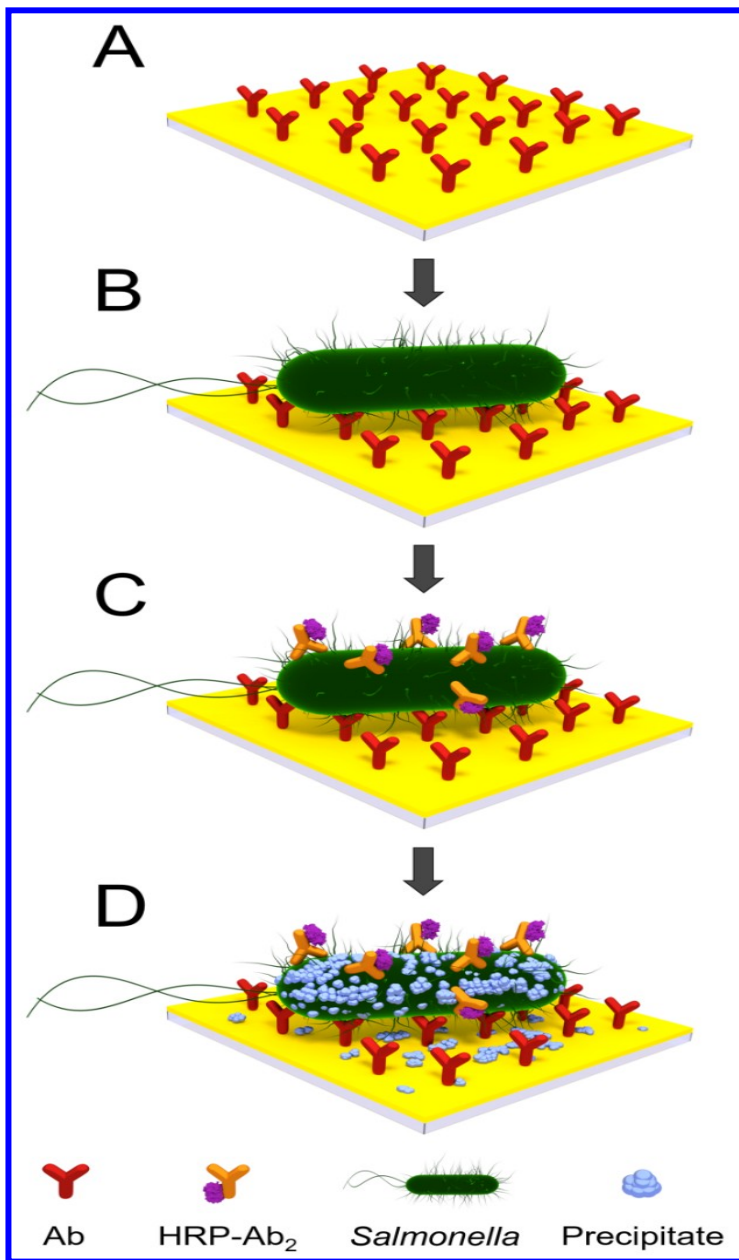
Optický biosensor - *Salmonella*



- přímo, bez značení
- Biacore 3000 ... nejcitlivější systém
-
- A) vazba bakterií
- B) kalibrace
 - AFM skeny měřicího a referenčního kanálu

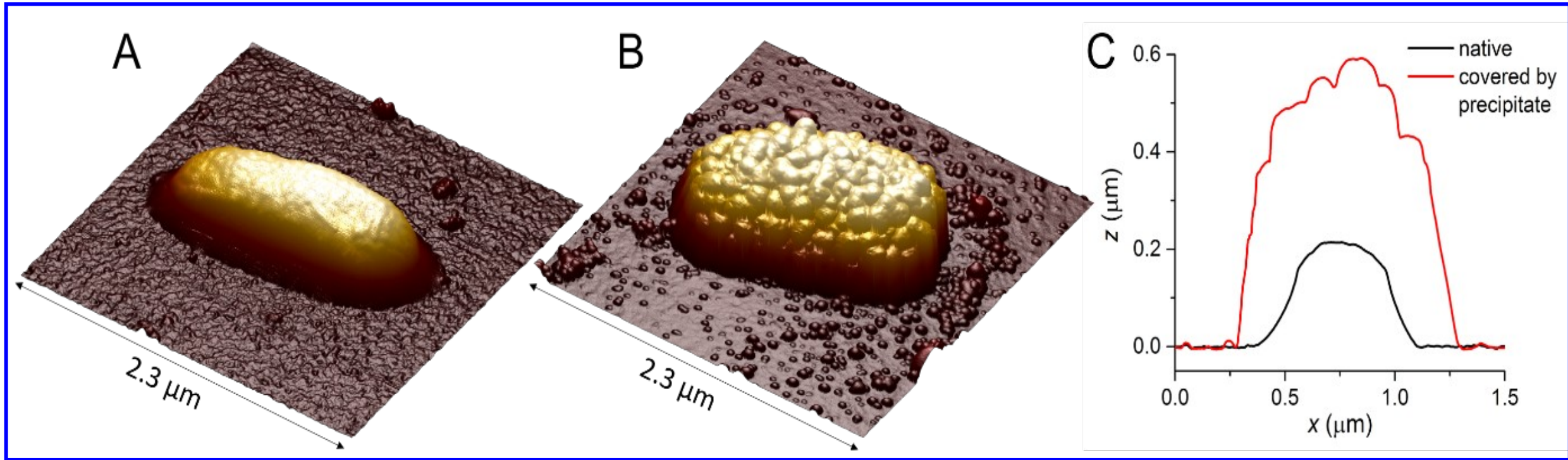


Lepší citlivost – zesílení odezvy

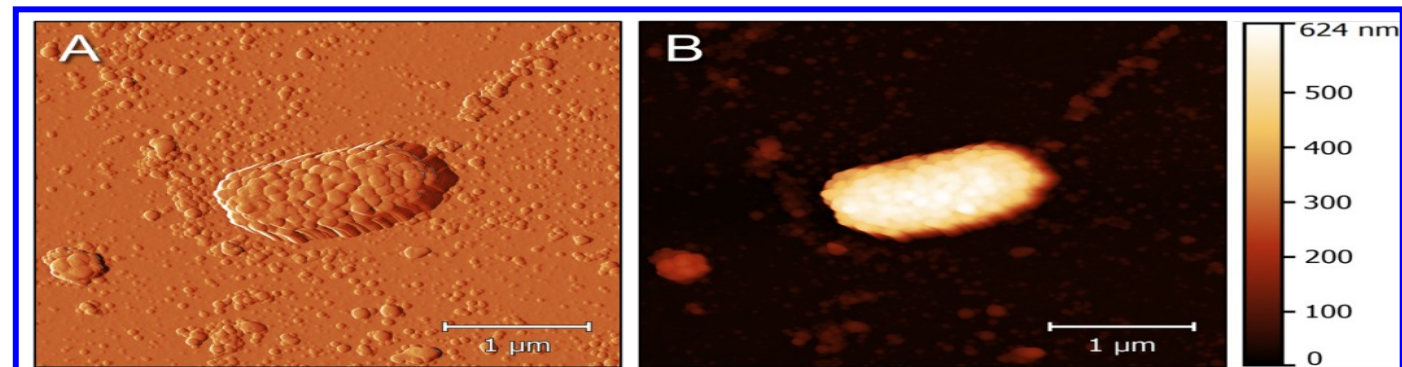


- SPR / BioNavis (robustní ...)
- A) SPR chip s primární protilátkou
- B) zachycená *Salmonella*
- C) vazba HRP-Ab₂ konjugátu
- D) biokatalytická konverze
4-chloro-1-naftolu na **nerozpustný** benzo-4-
chlorocyklohexadienon

Normal vs. “zvýrazněný” mikrob

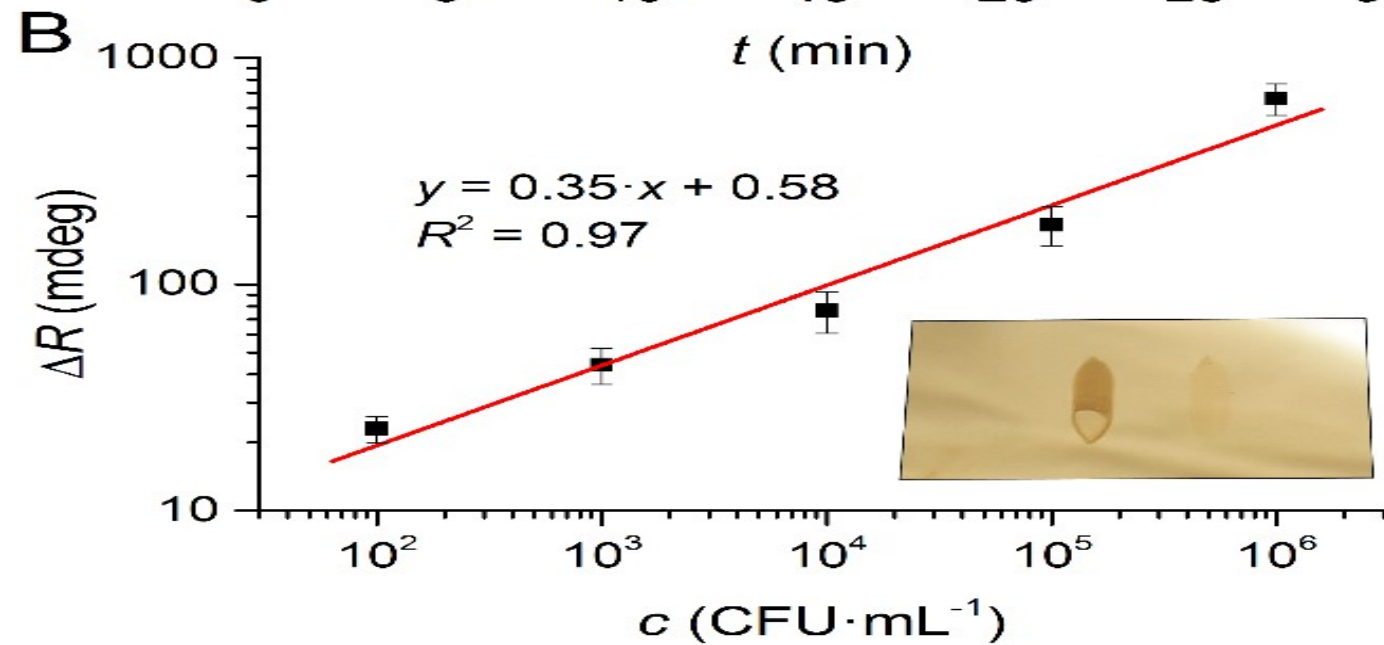
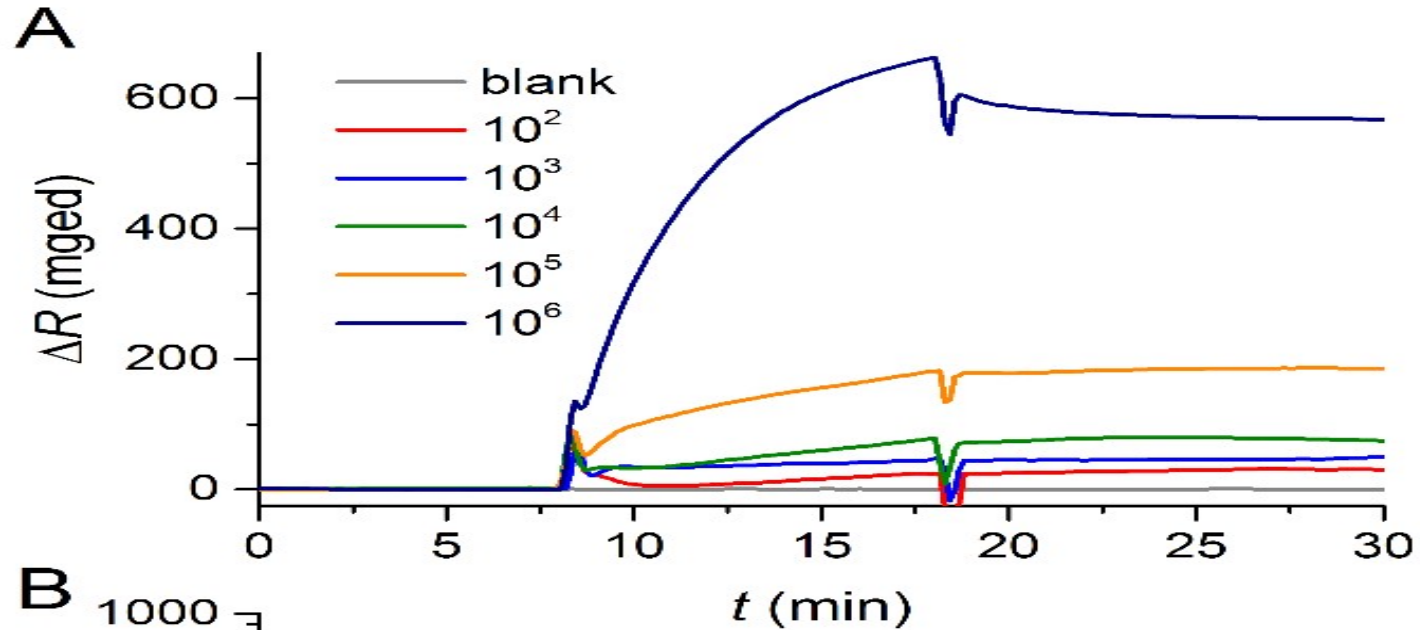


- 3D reprezentace AFM skenů A) **nativní** a B) pokryté **precipitátem** buňky *Salmonelly*
- C) řezy bakterií



Kalibrace

- Odezvy po vzniku precipitátu



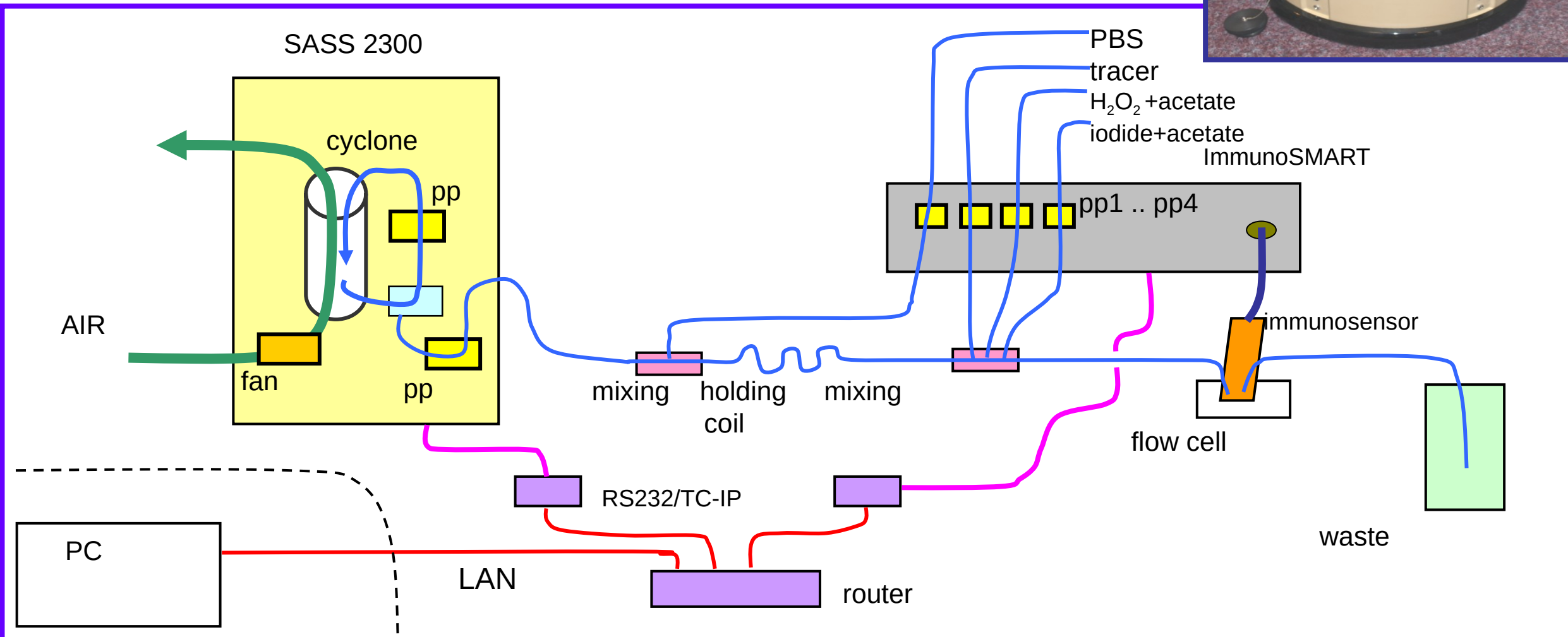
40× lepší citlivost

Limit detekce LOD 10^2 CFU/ml

Bioaerosoly

- (nebezpečné) bakterie ve vzduchu

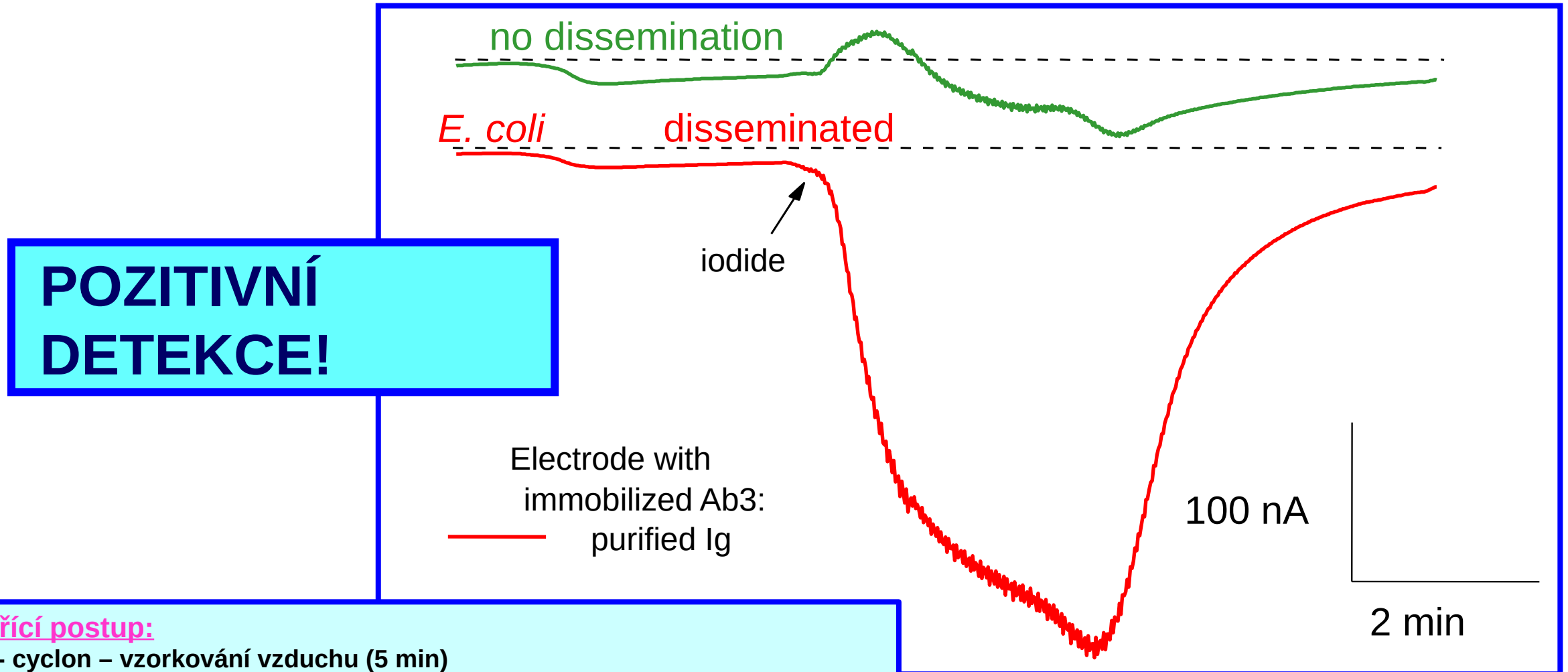
SASS 2300 (Research International)



Polní testy

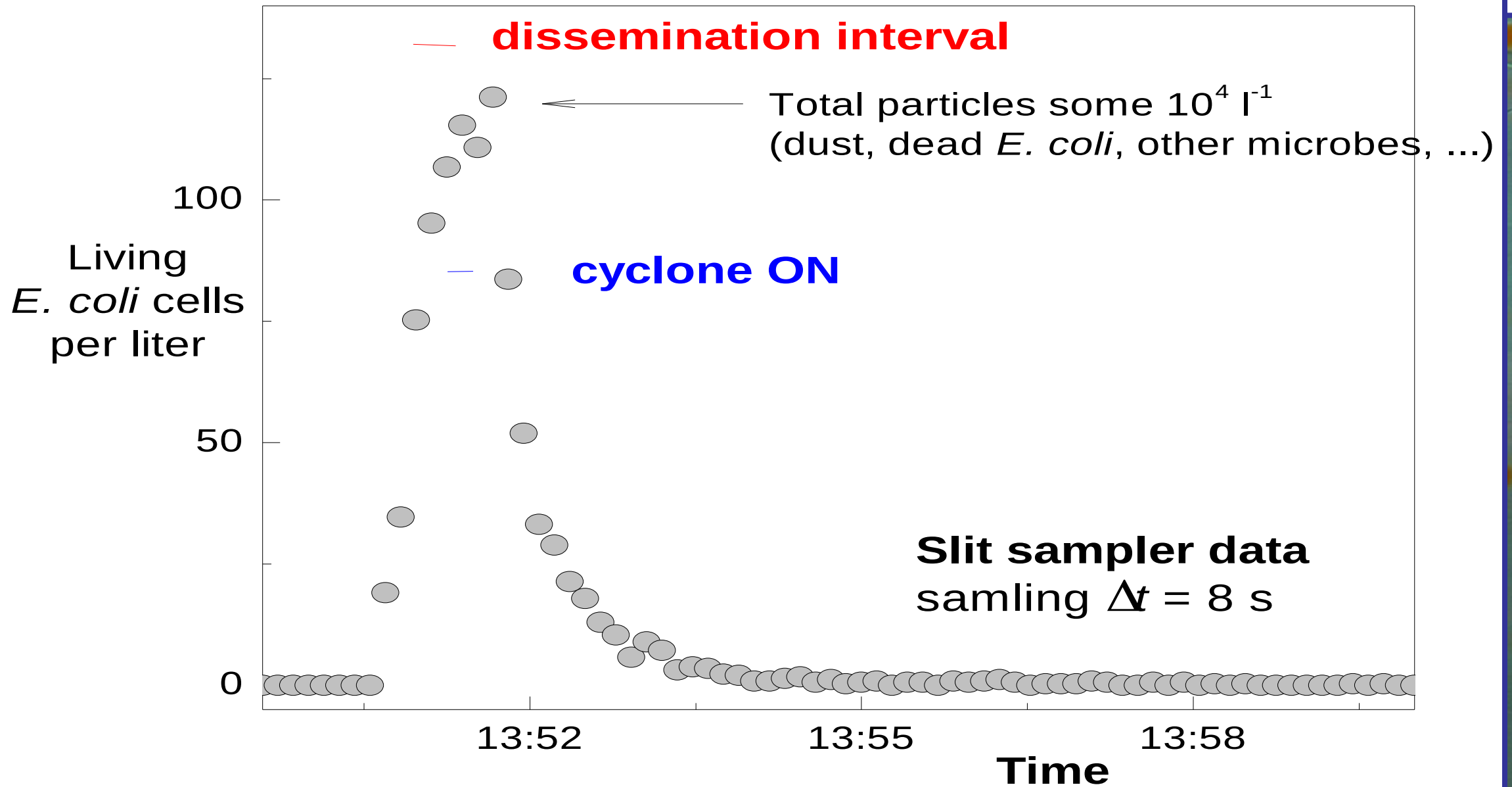


Testy v aerosolové komoře

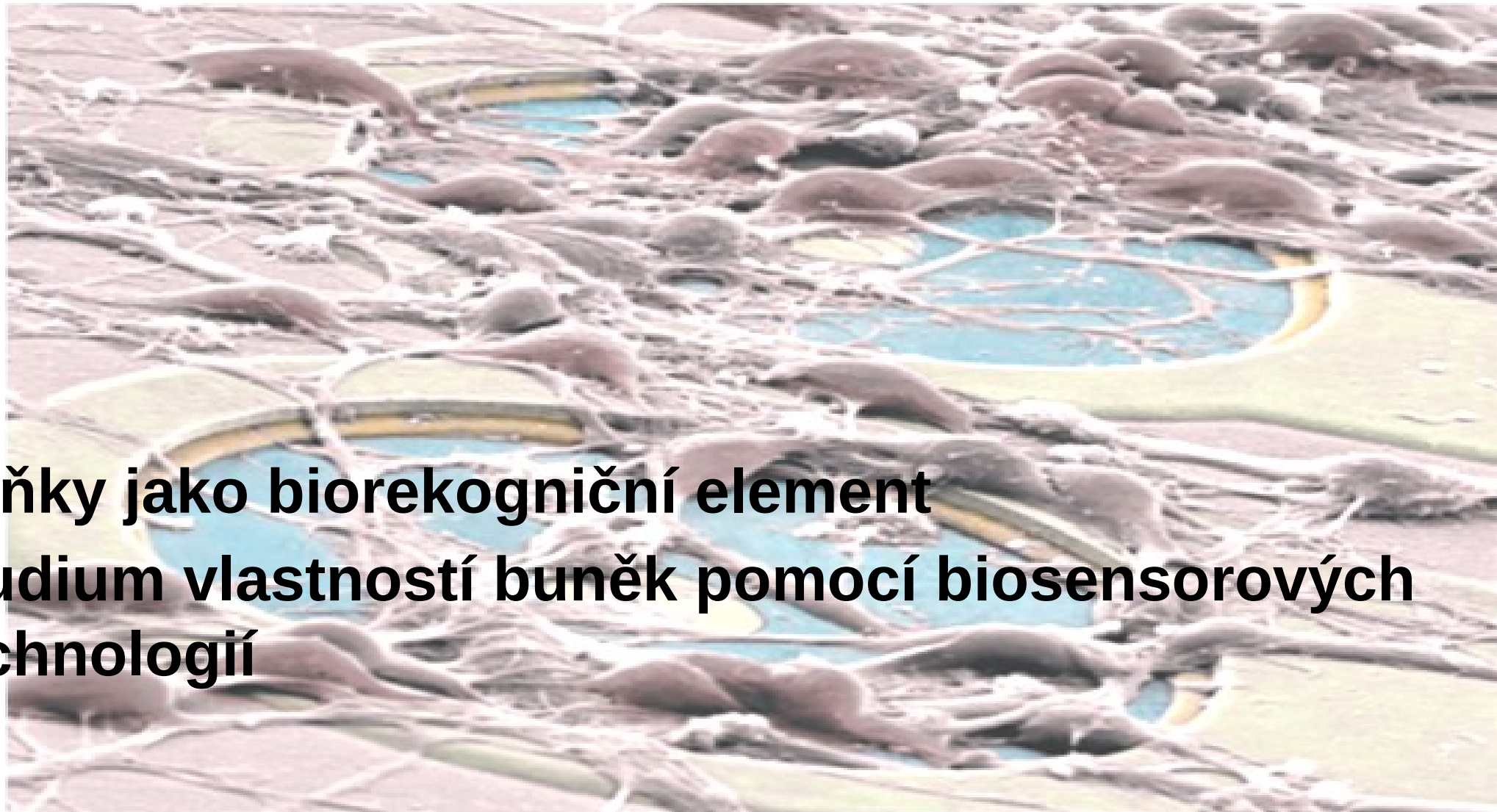


Měřící postup:

- cyclon – vzorkování vzduchu (5 min)
- inkubace vzorku s imunosensořem (10 min)
- H_2O_2 - substrát pro peroxidasu
- přidavek jodidu (2 min) - odezva



Buňky a biosensory

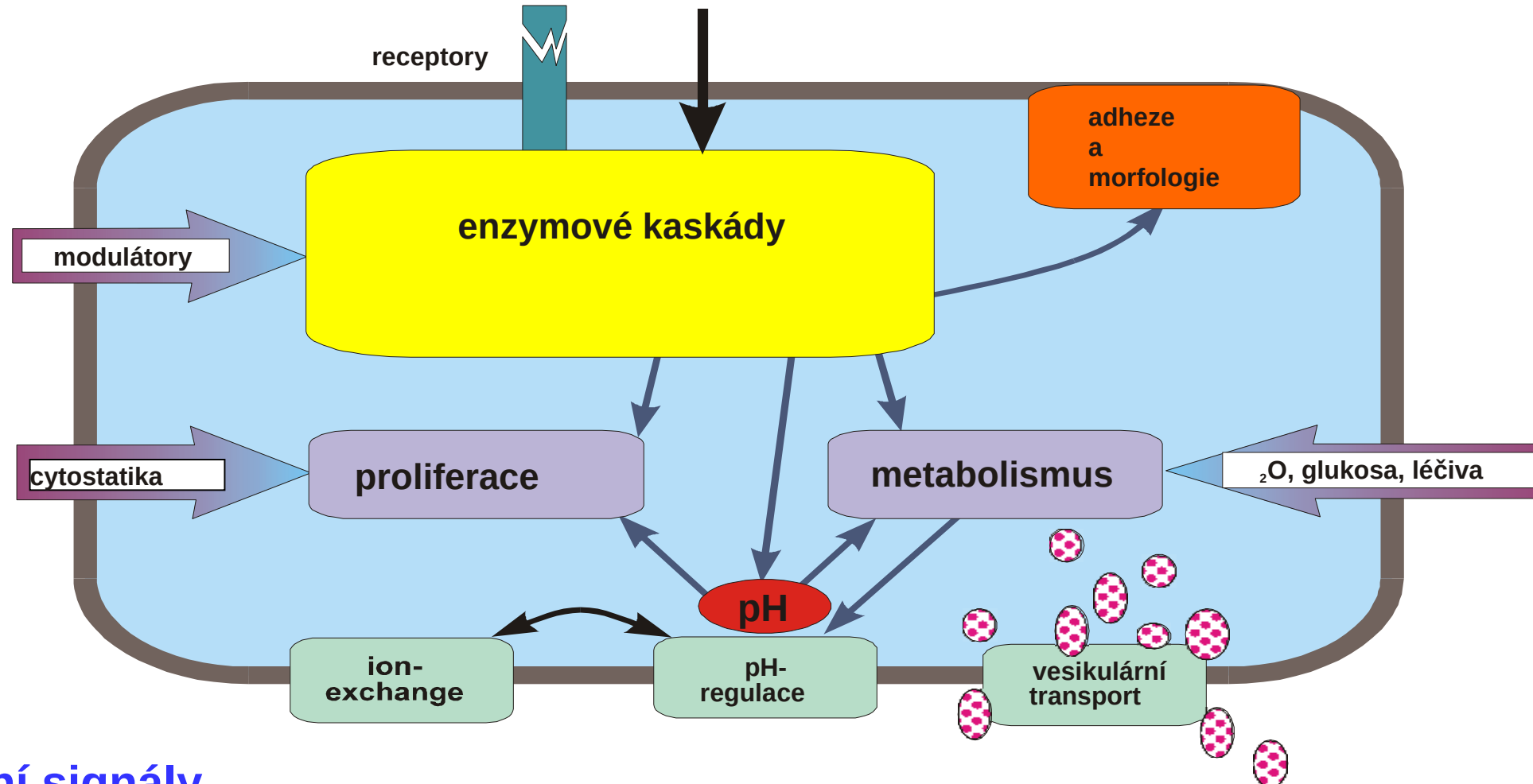


- **buňky jako biorekogniční element**
- **studium vlastností buněk pomocí biosensorových technologií**

Buněčný systém - komplexnost

vstupní signály

růstové faktory, antigeny/protilátky, hormony, adhezní faktory, teplota, pH, ...



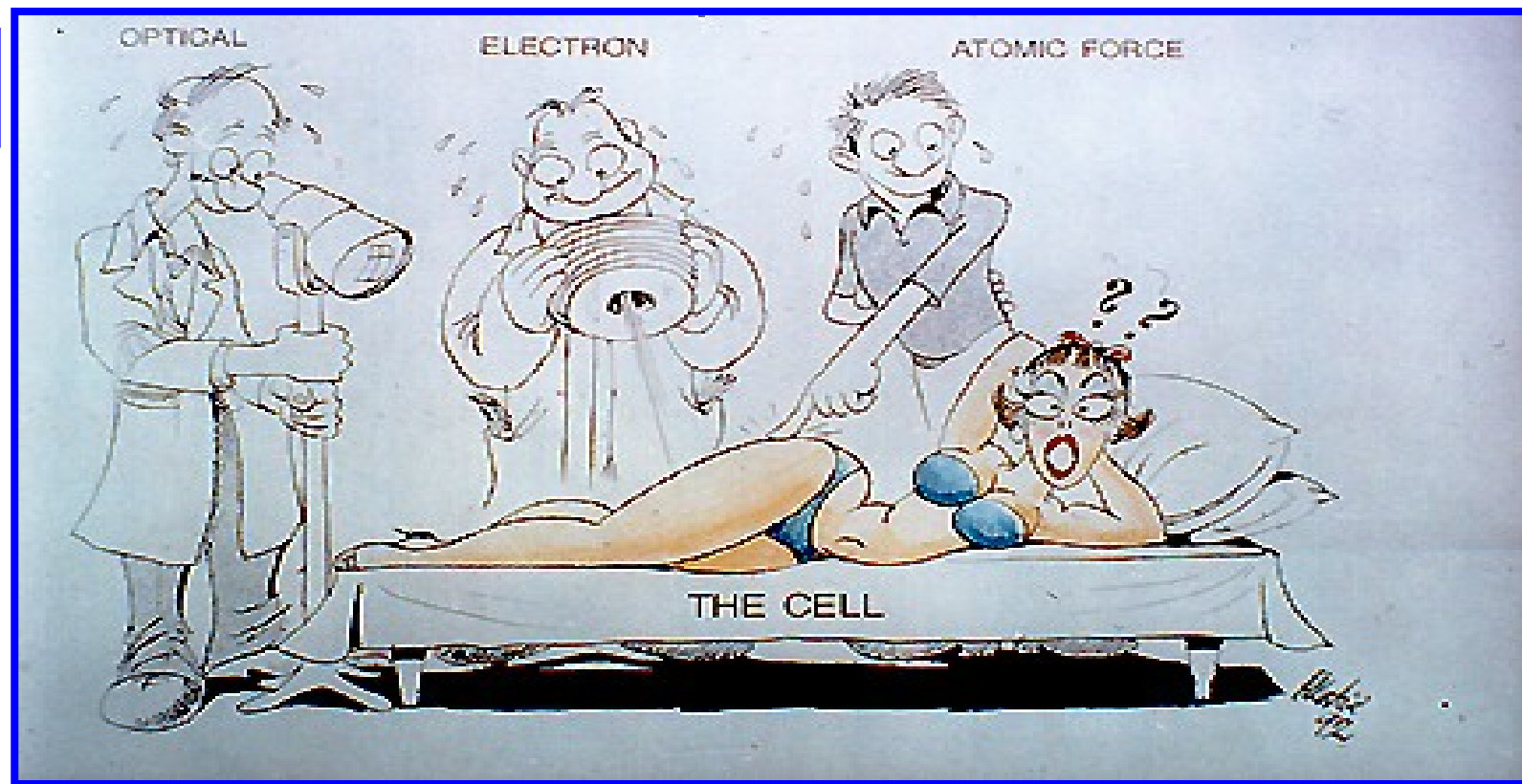
výstupní signály

pH, ionty (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), regulační látky (NO, glutamát, ...), obranné (ROS - peroxid vodíku, superoxid. radikál), adheze, morfologie, CO_2 , membr. potenciál, ...

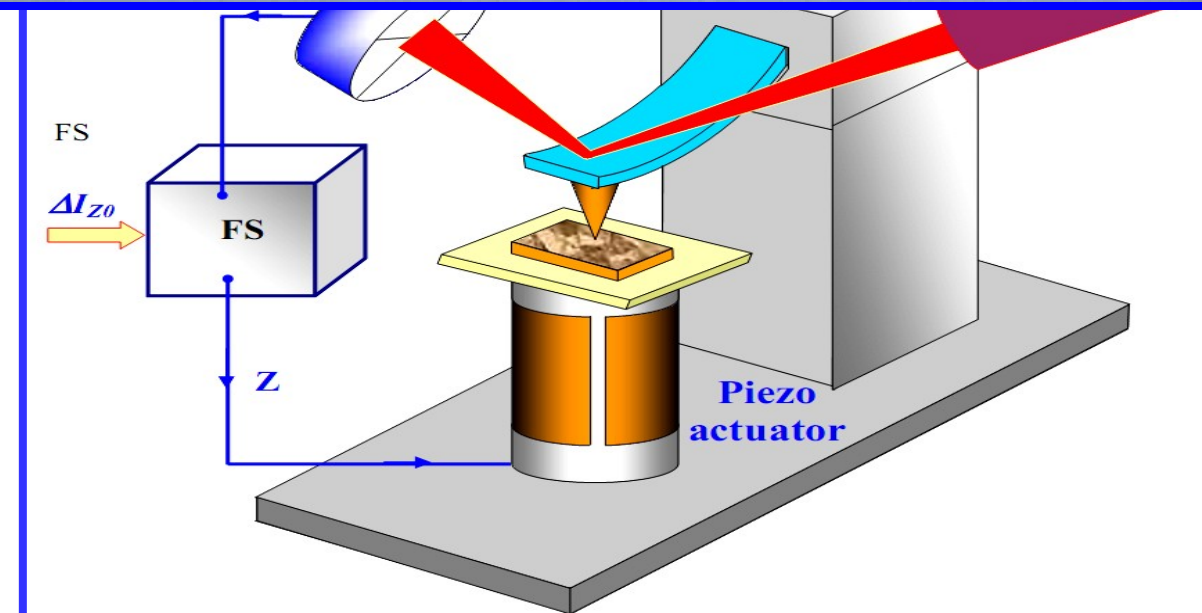
Mikroskopie ...

AFM = mikroskopie
atomárních sil
(atomic force microscopy)

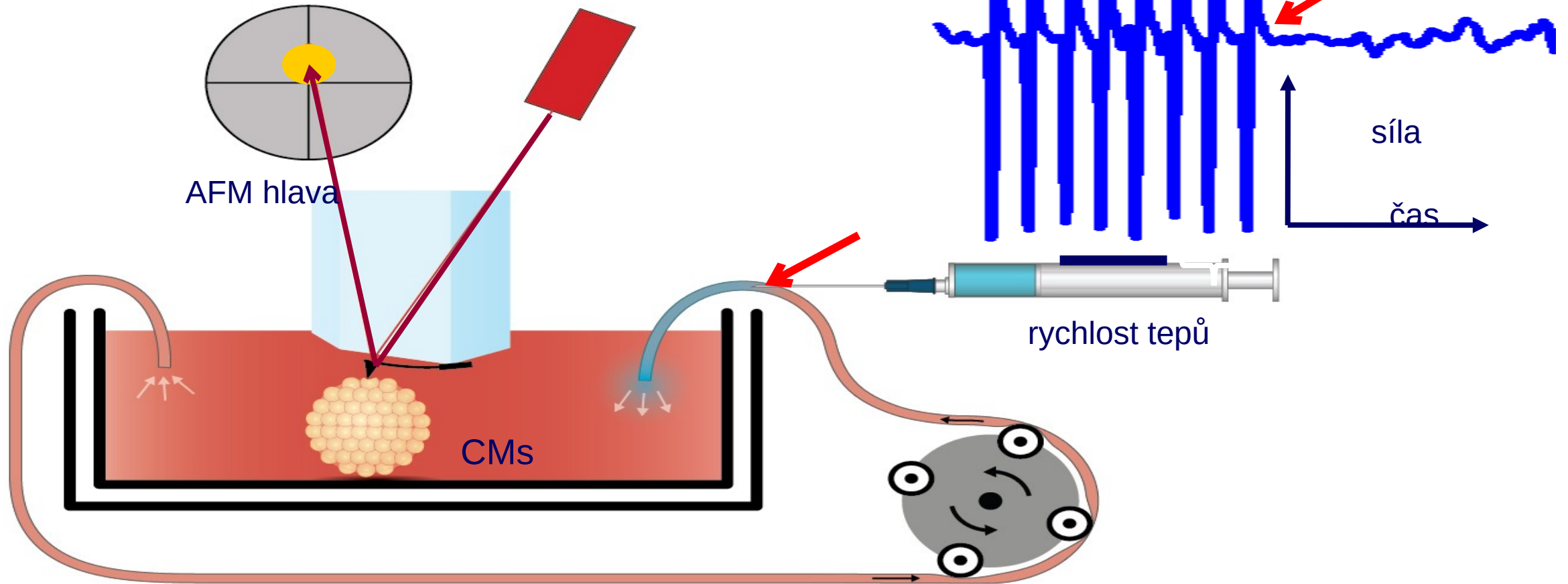
„osaháváme vzorek“
v nativním prostředí



- měření síly mezi hrotem a vzorkem, hrot je na konci pružného nosníku (cantilever)
- vznikající síly vedou k prohnutí nosníku (deflection)
- na základě znalosti jeho tuhosti pak lze vyhodnotit velikosti působících sil



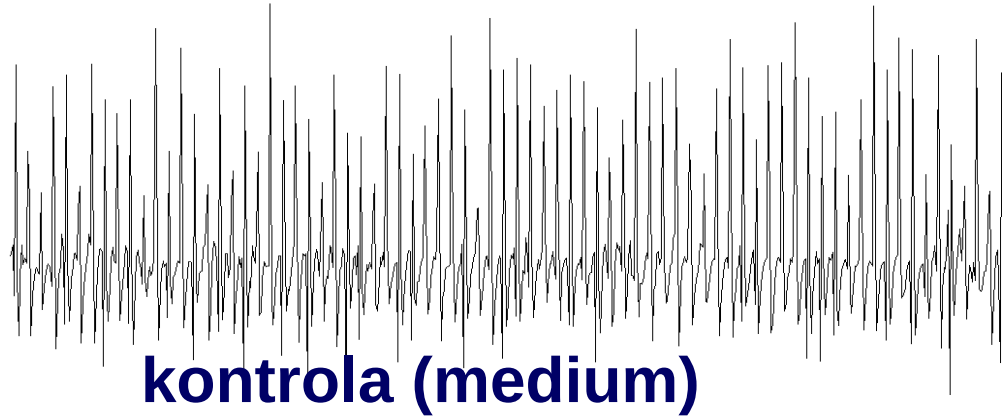
Nano-biosensing s kardiomyocyty (CM)



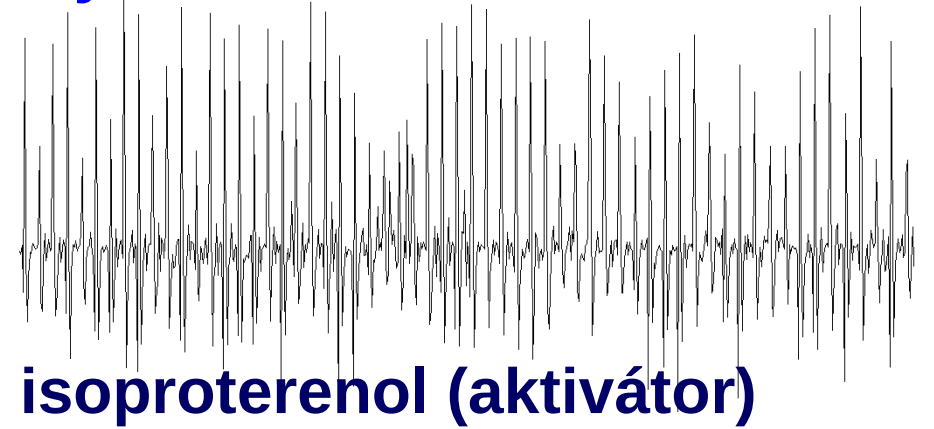
- sledování tepání kardiomyocytů je snadné (mikroskop, video)
- **nanomechanický převodník** – kantilevr z AFM – síla tepů - mechanokardiogram
- efekty testovaných látek v reálném čase
- klinický buněčný model – studium srdečních poruch: Duchennova svalová dystrofie, arytmie, Fabryho nemoc, ...

Výchylka kantilevru v čase pro různé testované látky

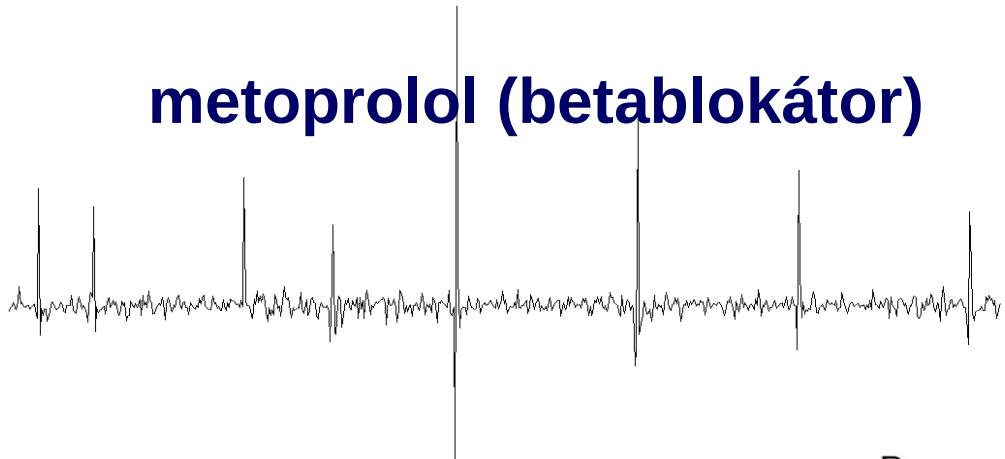
A



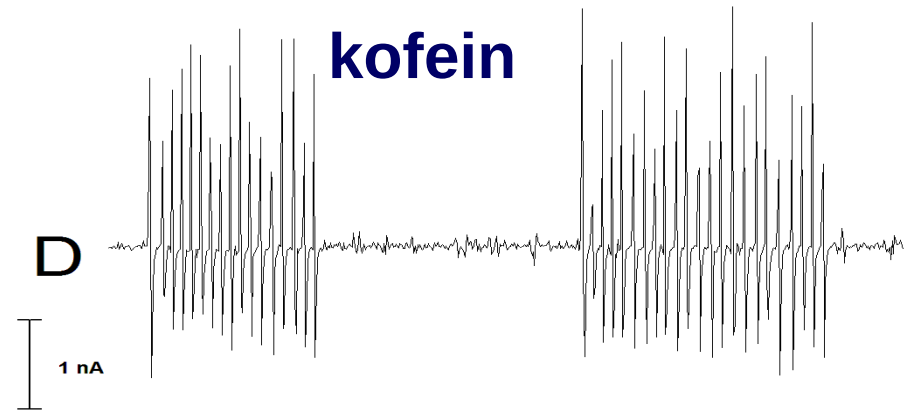
C



B

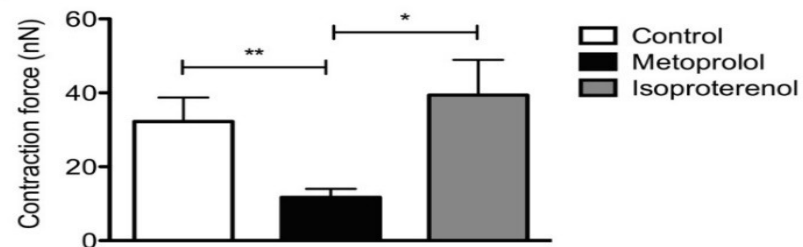


D

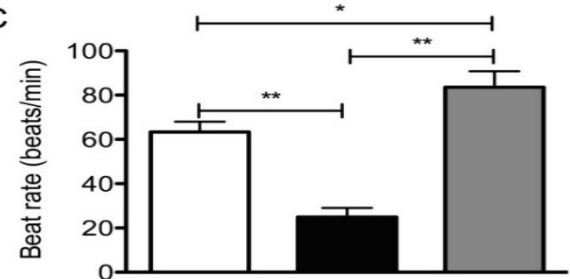


'heart on chip'

B

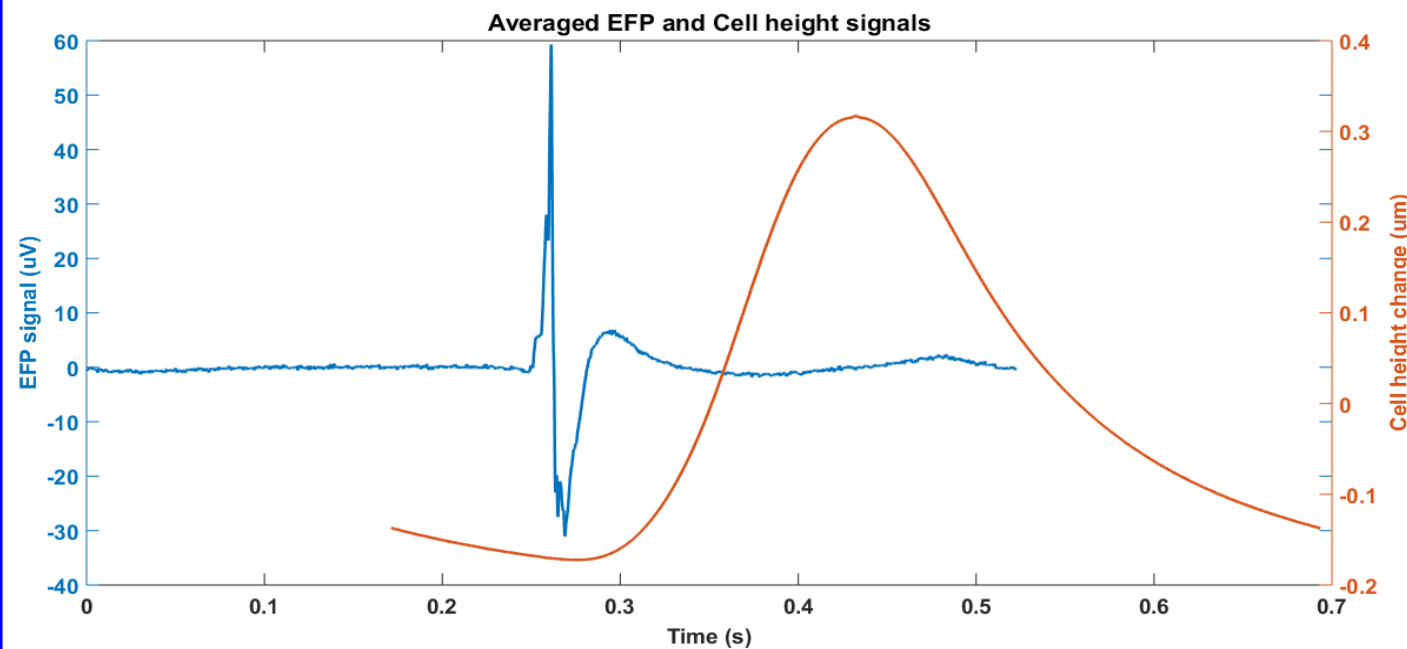
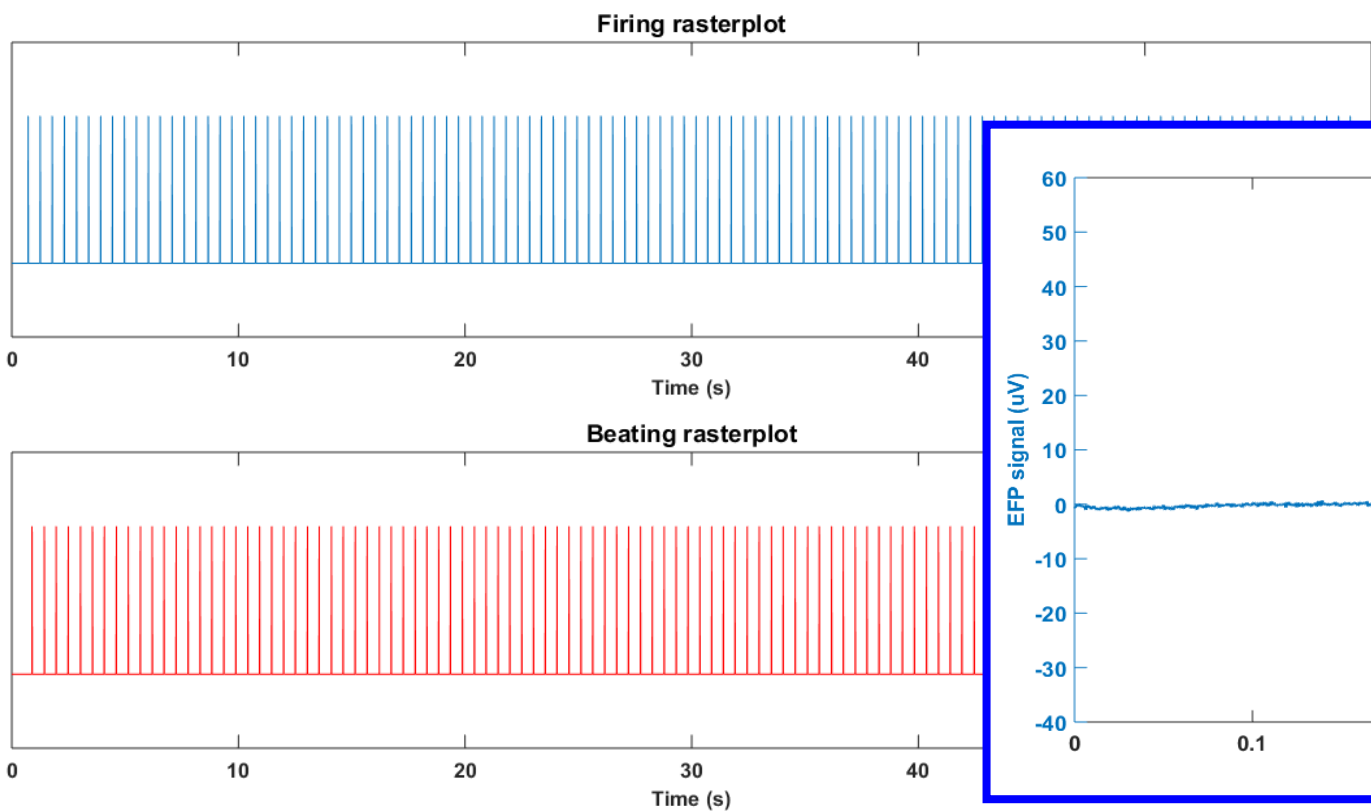
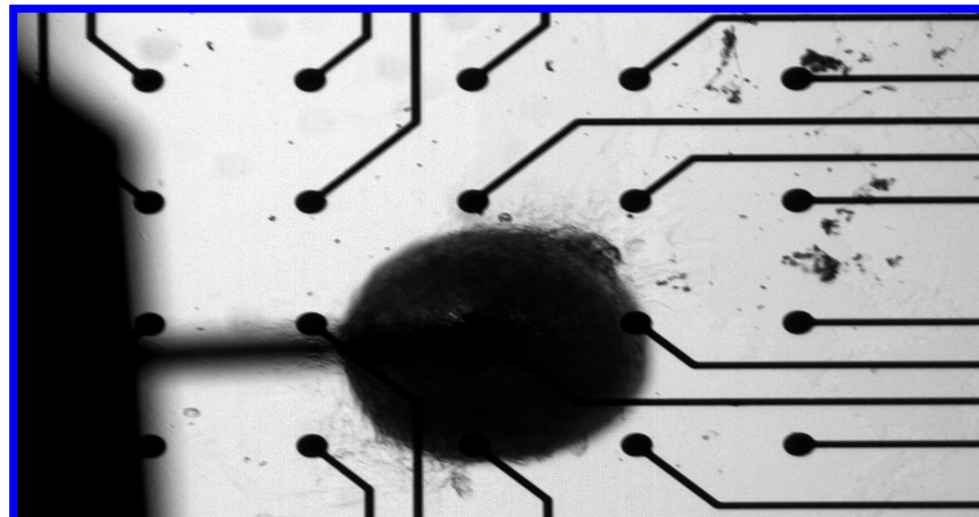


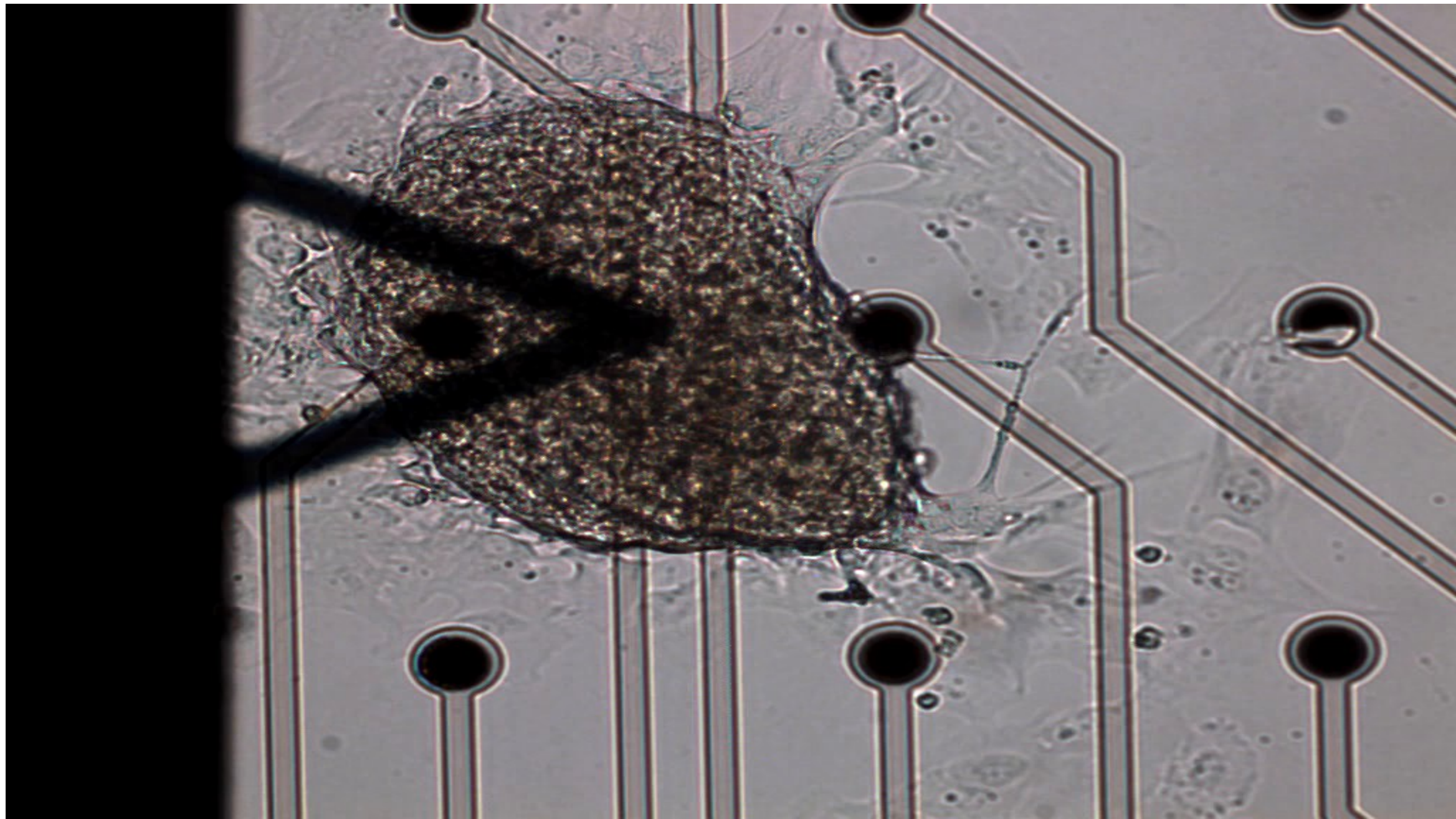
C



Síla a elektrický potenciál

- CMs zachyceny na povrchu pole mikroelektrod
- synchronní záznam síly tepu a iniciace změnou el. potenciálu



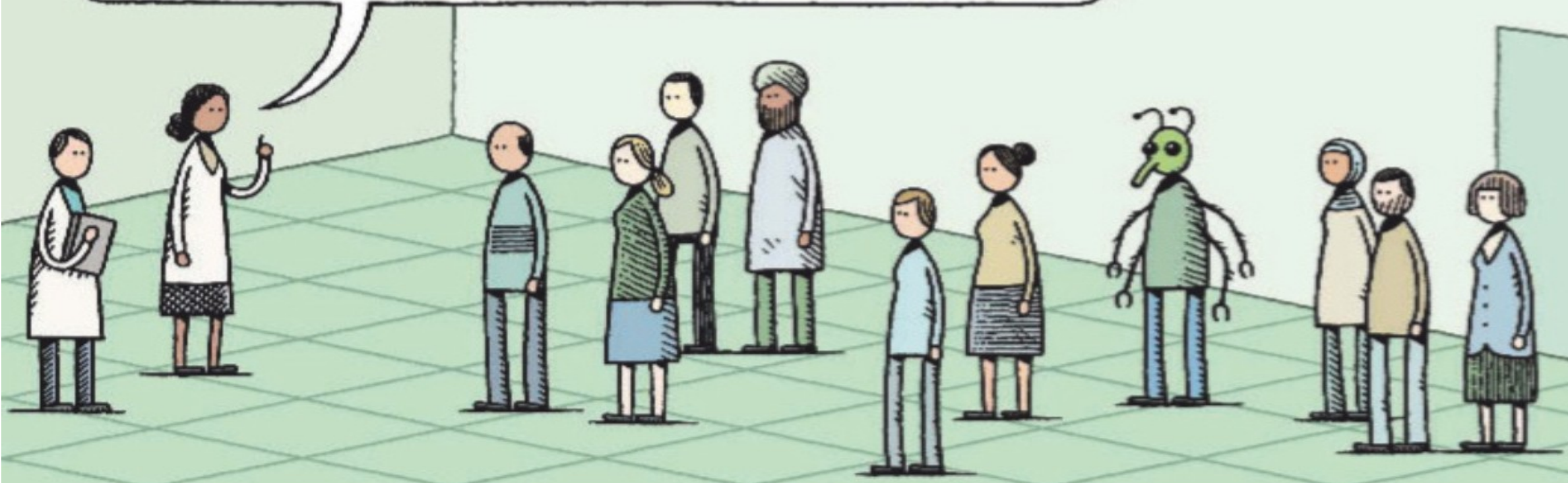


Biosensory ...

- bioanalytické použití – koncentrace látek, detekce mikrobů, ...
- věda - studium biochemických a biologických procesů
- spojení s nanobiotechnologiemi – zlepšení funkce, miniaturizace

- **malé a levné**
- **rychlé, citlivé a specifické**
- **uživatelsky přívětivé**

BEFORE YOU LEAVE, WE'D LIKE TO THANK YOU ALL FOR BEING PART OF THIS STUDY. THERE'S MORE WORK TO BE DONE, BUT THE PRELIMINARY NUMBERS SUGGEST THE DRUG IS WORKING, WITH 90% OF USERS EXPERIENCING NO SIDE-EFFECTS!



- nejzajímavějších je 10% těch zcela neočekávaných výsledků

M U N I Ústav
S C I biochemie