

# Technologické aspekty biosensorů

- manipulace se vzorkem – průtočné techniky



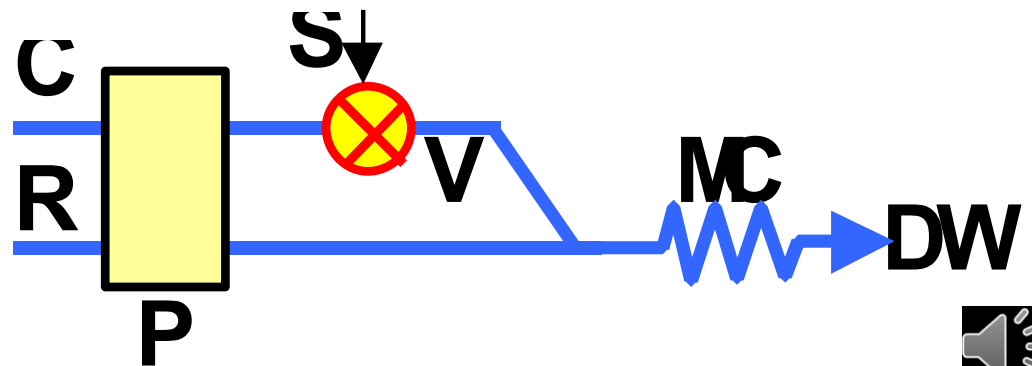
# Průtočné uspořádání

- **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)**
- **průtoková injekční analýza (FIA), sekvenční injekční analýza (SIA) a mikrodialýza**



# FIA

- nástřik vzorku do toku nosného média a jeho naředění – disperze
  - disperzní faktor  $D$  je dán poměrem původní koncentrace vzorku a maxima koncentrace v zóně procházející detektorem,  $D = C_0/C_{\max}$
  - velikost  $D$  se může u různých aplikací značně lišit, ale vždy musí být u daného případu dosažena vysoká reprodukovatelnost  $D$
- 
- FIA systém je tvořen pumpou  $P$ , vedením pro nosné médium  $C$  (carrier) a eventuální pomocný reagent  $R$
  - 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 odpadu  $W$  (waste)

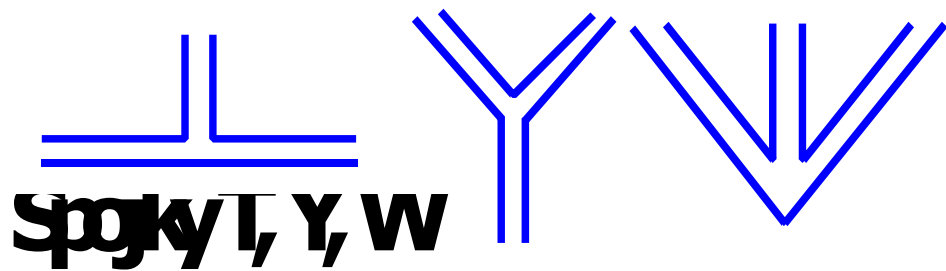


# Pumpa

- 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
  - je vhodné, aby pumpa měla více kanálů (2 až 4)
  - výsledný tok je mírně pulzující (odvalování rolerů), hladký tok se dosáhne buď zvýšením otáček pumpy (alespoň 30 rpm) nebo větším počtem rolerů (minimum 2, běžně 4 až 10)
  - 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, (drahé)
- průtoky (flow rate) jsou kolem 0.1 až 5 ml/min, lineární rychlost toku je 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



## FIA součásti



- pro vedení kapalin se používají hadičky o vnitřním průměru 0.5 až 1 mm, materiálem je polypropylen, teflon, PVC nebo silikonová guma
- spojky pro smísení dvou toků mohou být ve tvaru Y, T nebo W
- spojovací komponenty zahrnují šroubovací konektory pro spojování trubiček navzájem nebo s ventily či detektory
- reakční a míchací smyčky jsou poměrně variabilní; např. ohebné trubičky délky 100 až 1000 mm se hustě navinou do spirály na nosné tyčce průměru 2 až 40 mm, dá využít se i gravitace při proudění ve svislé spirále, jinou možností je náhodně "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
- labyrintové komůrky v plastu
- míchané komůrky umožňují vysoké disperzní poměry



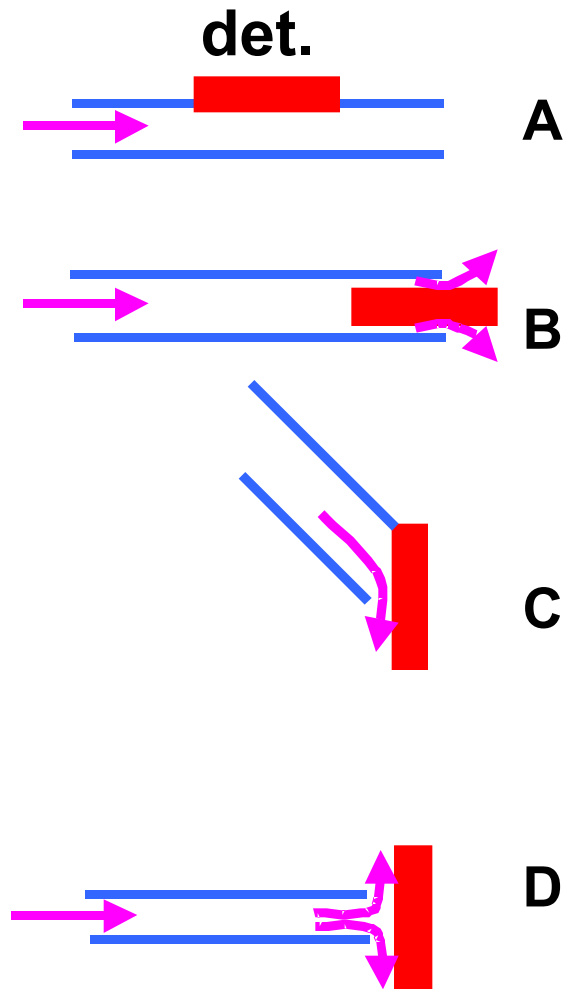
# Ventily

- pro nástřik vzorku, k tomuto účelu se používá 6-cestný dvoupolohový ventil se smyčkou, změnou polohy se smyčka zařadí do hlavního toku média, nástřik se nejjednodušeji provádí ručně
- materiálem je nerez v kombinaci s teflonem
- uplatňují se elektricky ovládané ventily solenoidní, s krokovým motorem nebo pneumatické - úplná automatizace průtočného systému

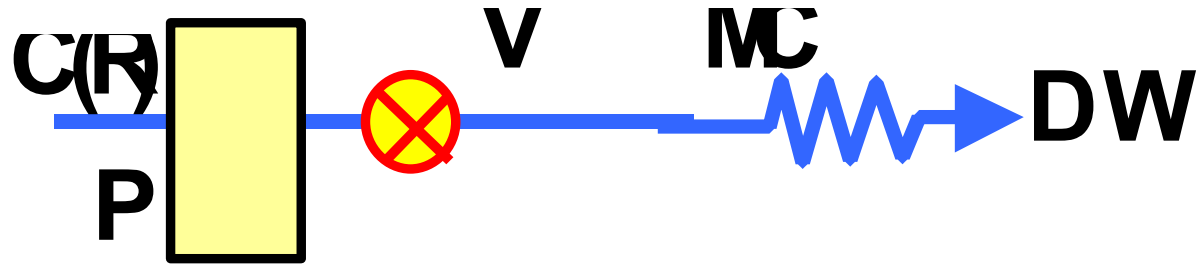


# Umístění detektoru

- důležitá je poloha detektoru vzhledem k proudícímu médiu:
  - nejběžnější varianta (A) je detektor paralelně s tokem média (wall embeded)
  - detektor umístěný v ústí trubičky (B, end on sensor) je často využíván při elektrochemické detekci, je to vlastně jedno nebo více vodivých uhlíkových vláken
  - kaskádové uspořádání (C)
  - wall jet cela (D)
- 
- signál může být buď maximum nebo plocha píku odpovídající zóně vzorku prošlé detektorem
  - ve druhém případě je zkreslena informace o průběhu gradientu koncentrace



## FIA mody

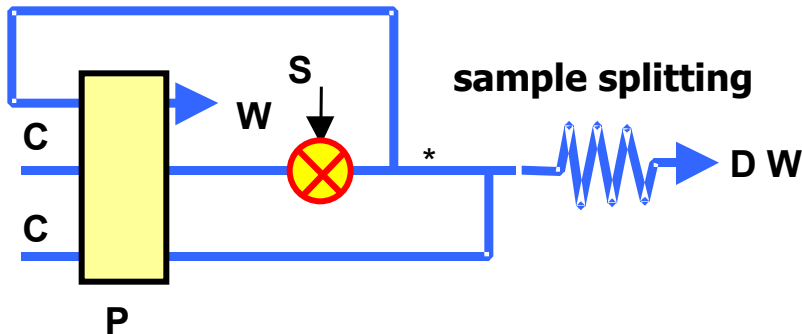
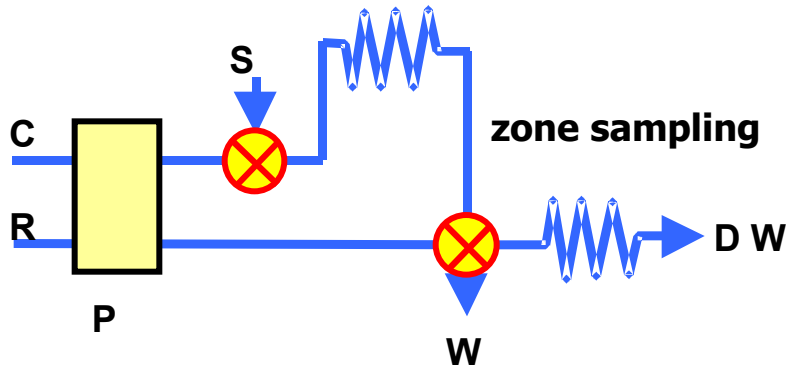


- **single line** - pro použití ve spojení se zejména biokatalytickými biosensory stačí pouze jednolinkové uspořádání
- nástřik vzorku ventilem V může být automatizován přidáním druhé pomocné pumpy
- často není třeba ani přidávat žádné pomocné reagenty a nosným médiem je vhodný pufr - specifickým detektorem je pak vlastní biosensoru
- obměnou může být použití namísto míchací smyčky enzymového reaktoru ve spojení s nespecifickým detektorem, toto uspořádání je výhodné pro enzymy s malou specifickou aktivitou, navíc je životnost bioreaktoru oproti enzymové vrstvě mnohonásobně vyšší
- 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





# FIA mody

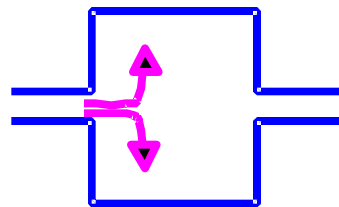


- **two-line** viz dříve
- **merging zones** - realizovatelné pouze s jednou pumpou jsou, kdy se dvěma ventily nastříkují zóna vzorku a zóna reagentu do dvou linií nosného média, které se poté smíchají; při drahém reagentu (NADH), vyžaduje synchronizaci obou ventilů
- **reverse FIA** – „dostupný“ vzorek se nasává přímo do jedné linie kontinuálně, do druhé se může nastříkovat reagent
- **zone sampling** používá opakovaný nástřik nejprve vzorku a pak jeho naředěné zóny. Časování obou ventilů je rozhodující faktor, lze dosáhnout naředění až 1000x
- **sample splitting** - zóna nastříknutého vzorku se částečně odvádí pryč, kritické místo (\*) existuje mezi body odvětvení (divresion) - zóny se vzorkem a místa napojení druhé linie (merging), je zde nízká rychlost průtoku, která má podstatný vliv na dosažené zředění

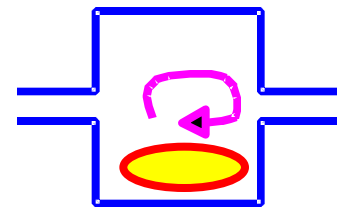




# Naředění v komůrce

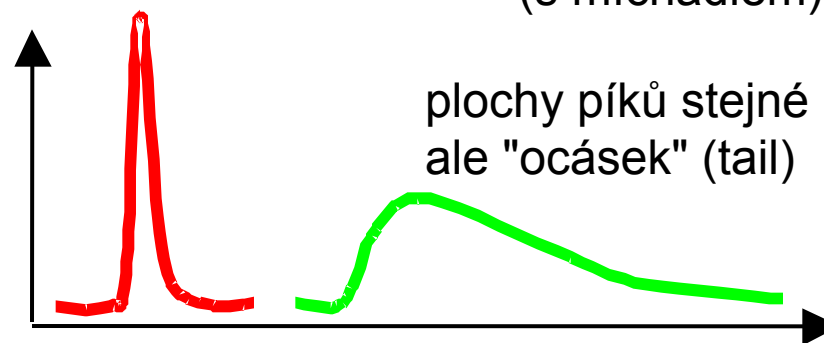


pasivní



aktivní

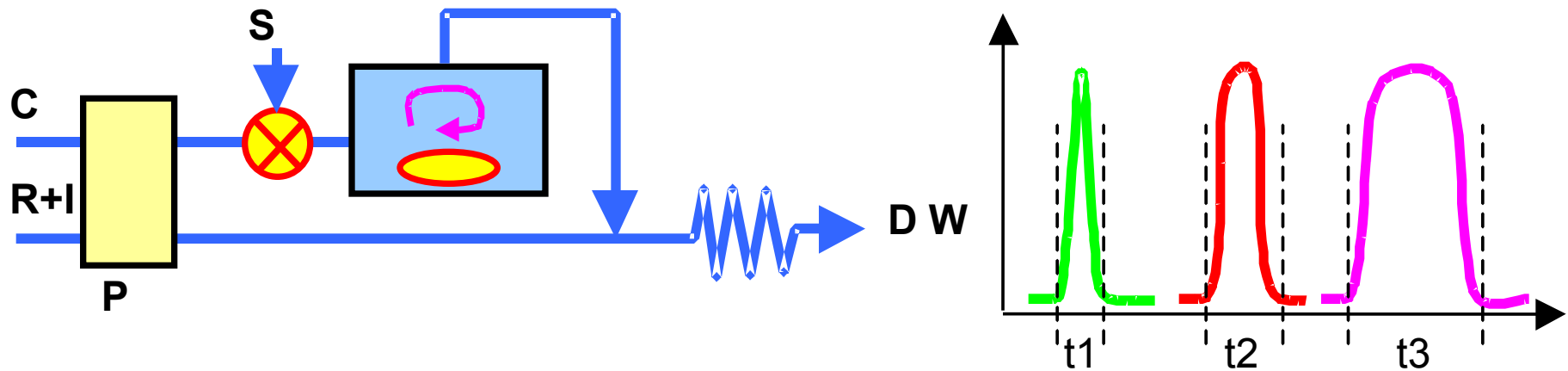
(s míchadlem)



- zvětšování disperzního faktoru
- běžnými postupy (rychlost průtoku, průměr trubiček, objem vzorku, délka míchací kolony) lze ovlivňovat  $D$  v rámci jednoho řádu (cca 3 až 20)
- dosažení vyššího naředění je možné použitím míchací komůrky (mixing chamber)
- nosné médium se vzorkem se nechá protékat rozšířeným místem, případně vybaveným elektromagnetickým mícháním
- nevýhodou je záznam ve tvaru nízkého a širokého píku, který zpomaluje měření



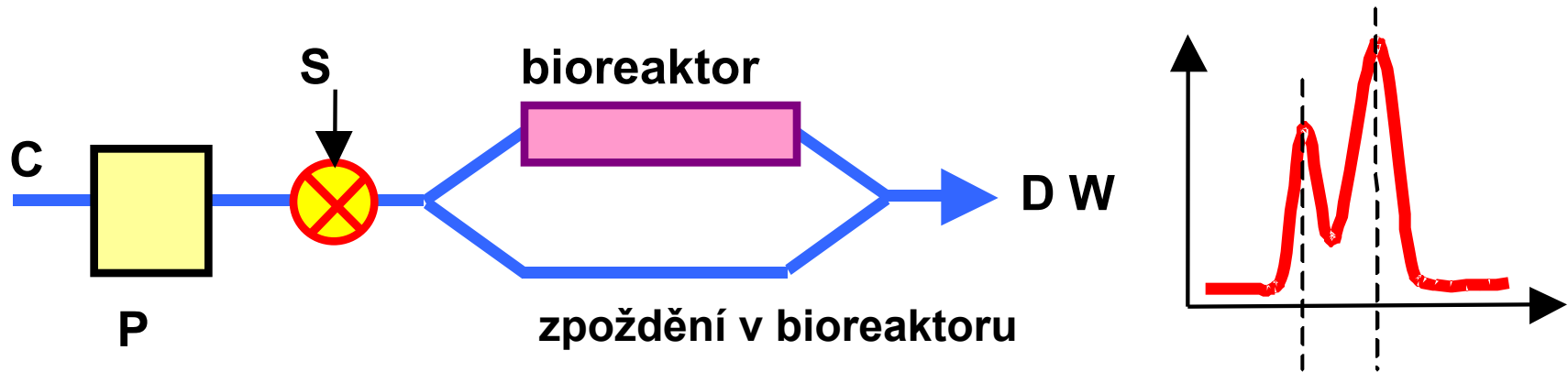
# FIA titrace



- 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



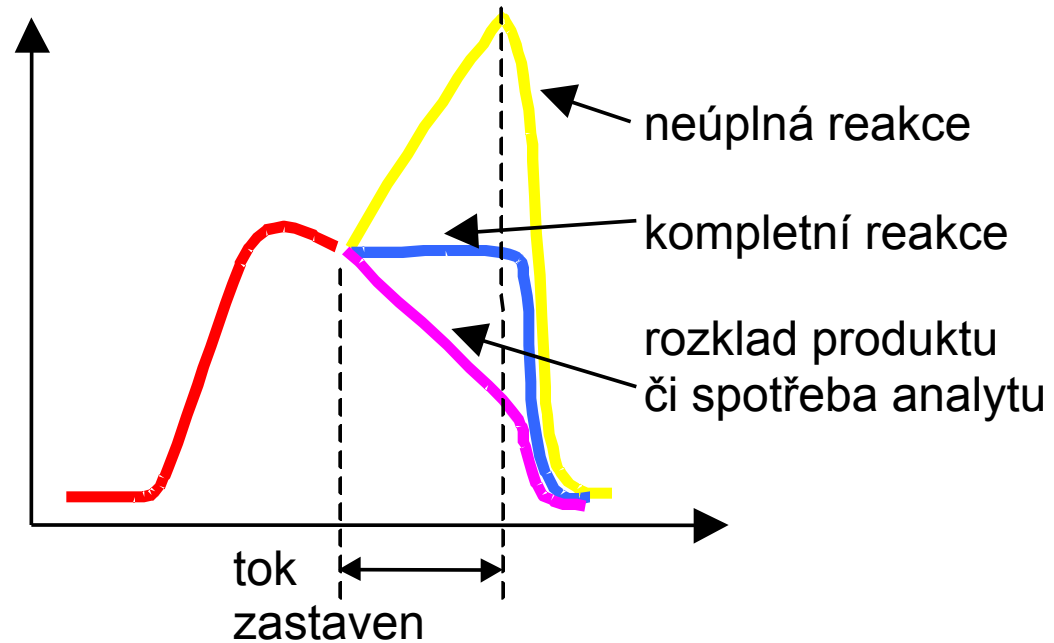
# FIA splitted flow



- výhodné může být rozdělení zóny vzorku na dvě linie (splitted flow), jedna se např. nechá projít enzymovým reaktorem, před detektorem se obě větve spojí, na záznamu se objeví dvě maxima
- stanovení dvou reagentů vedle sebe - např. sacharosa a glukosa ve vzorku: detektor je biosensor s GOD, v bioreaktoru je imobilizována invertasa s mutarotásou; první pík odpovídá volné glukose, druhý pak navíc glukose vzniklé v reaktoru ze sacharosy



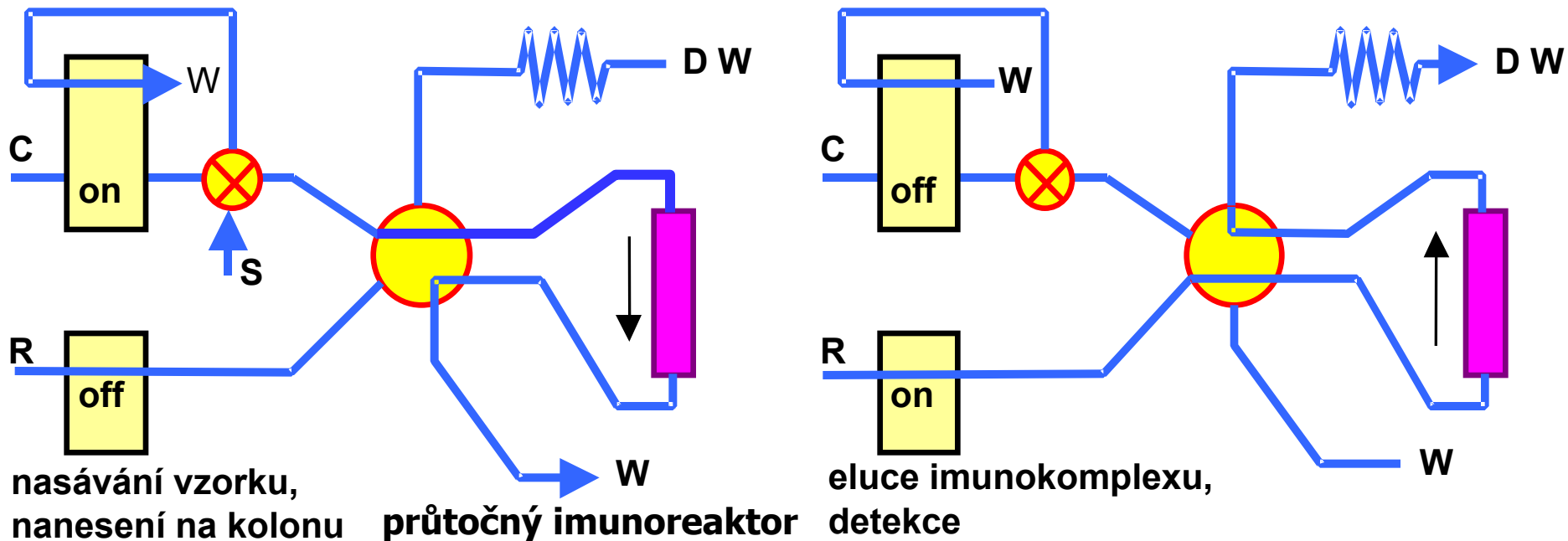
# FIA stopped flow



- 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



# FIA imuno

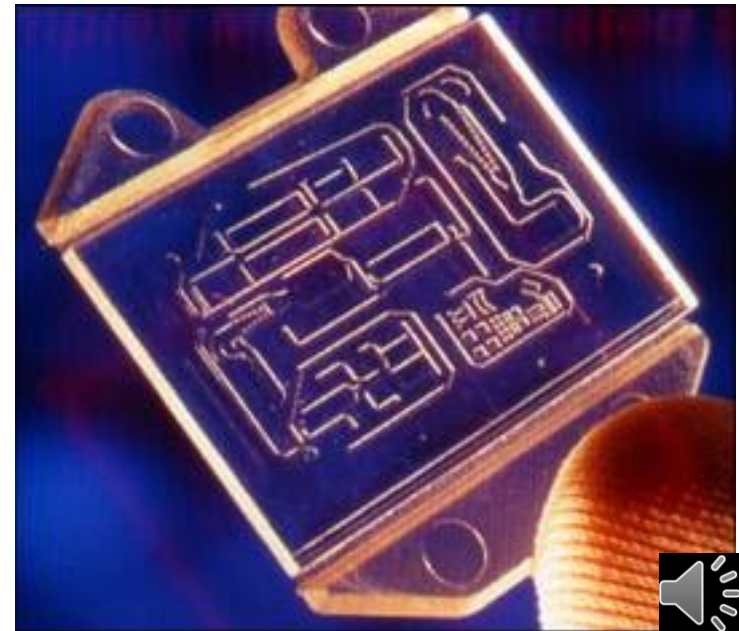


- průtočné techniky dnes stále více pronikají také do oblasti imunochemických stanovení, kde přináší zrychlení analýz a zlepšení reprodukovatelnosti výsledků díky opakované regeneraci téhož imunospécifického nosiče
- často je používán velice komplikovaný systém, nejjednodušší varianta sestává ze dvou pump a ventilů



# Lab-On-Chip koncept

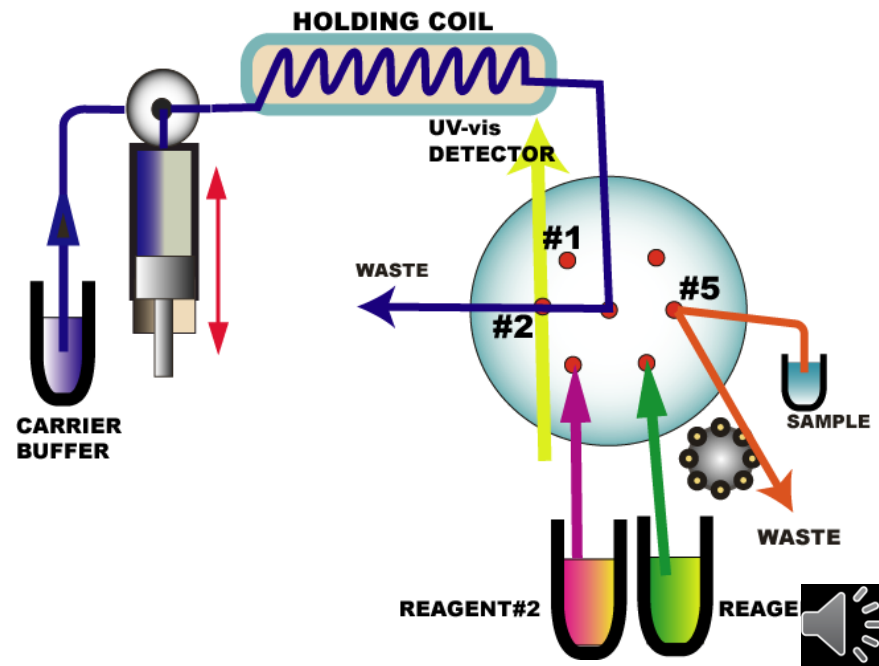
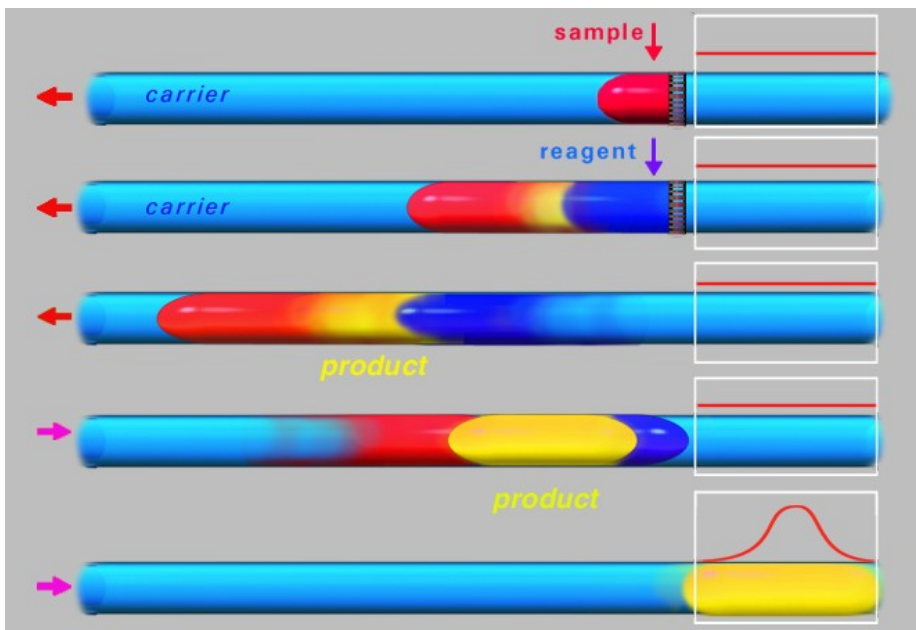
- systém integrovaný na čipu – průtočné kanálky (nižší verze na bázi plastového mikrofluidního modulu; ve vyšších verzích na bázi křemíku i mikropumpy, ventily, detektory, ...)
- systém zaměřený na jedinou konkrétní aplikaci, změny měřicího protokolu často vyžadují nákladné úpravy čipu
- při poruše libovolné části čipu je třeba výměna celého modulu
- alternativa – „programovatelný“ měřicí systém





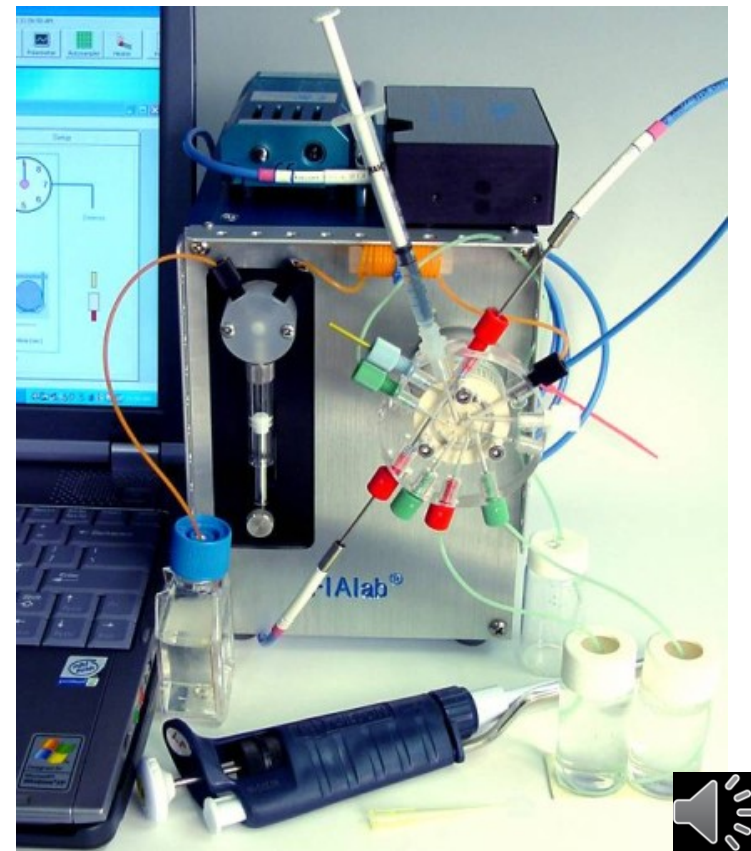
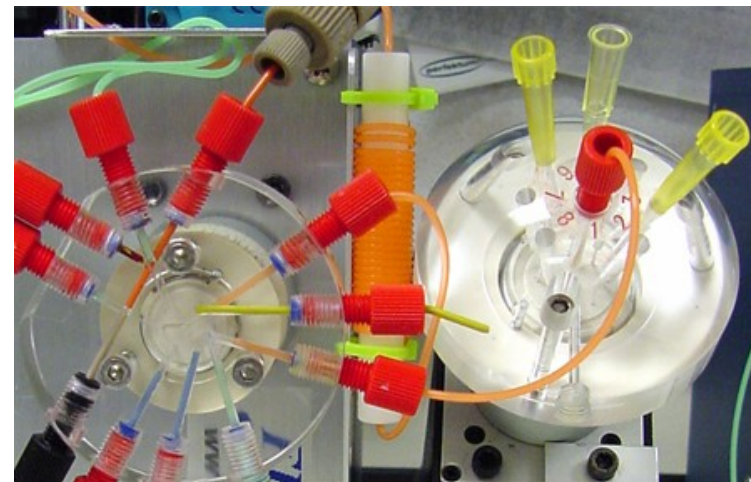
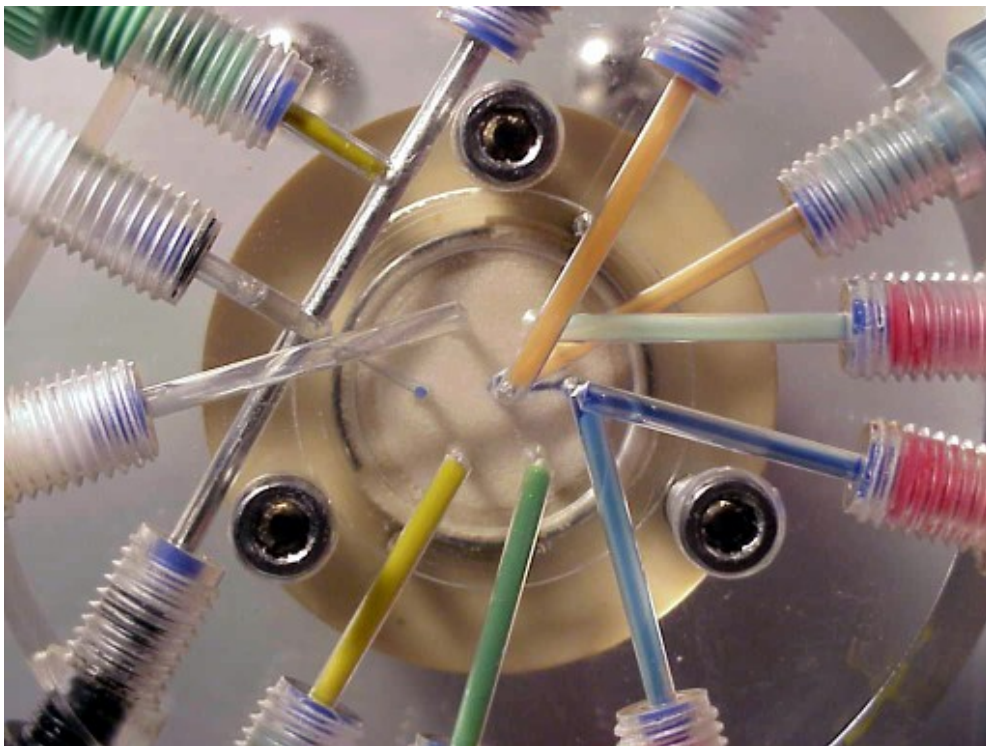
# SIA Sequential Injection Analysis

- robustní, jednoduchá a všestranná technika založená na programovatelném toku látek
- přesné odměření mikrolitrových objemů a jejich následné mikrofluidní zpracování použitím reverzního, zastaveného nebo urychleného toku umožňuje návrh stanovení prostřednictvím počítače ve formě „software“
- roztoky prochází kanálky monolitické mikrofluidní struktury, namontované na multikanálový přepínací ventil – koncept Lab-On-Valve



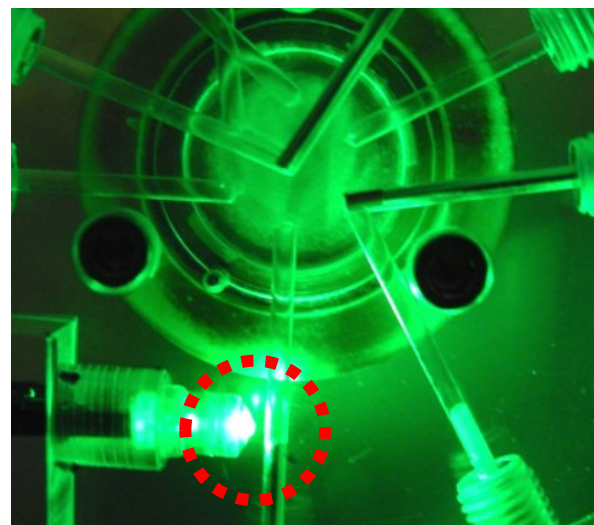
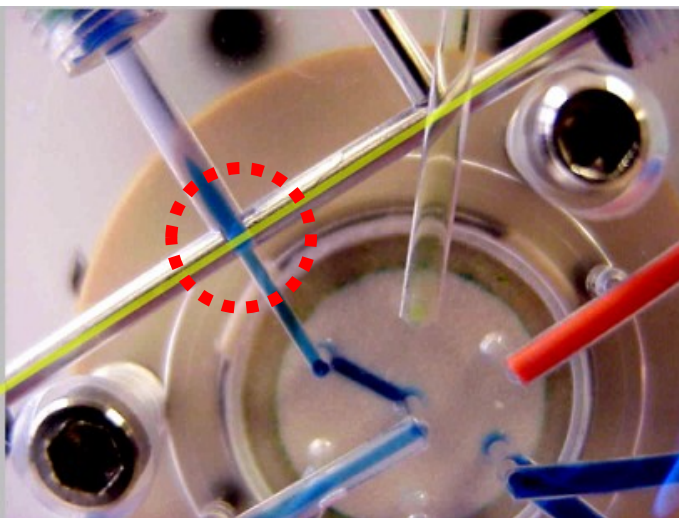
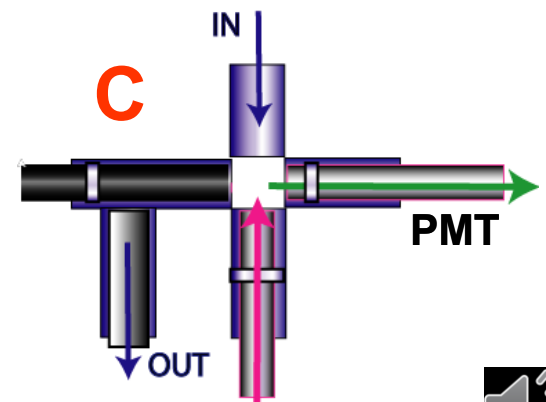
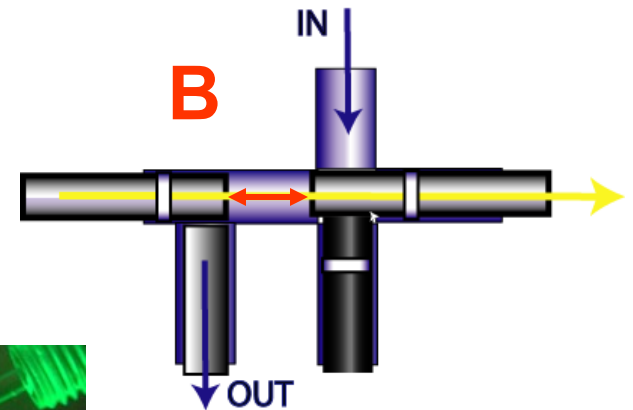
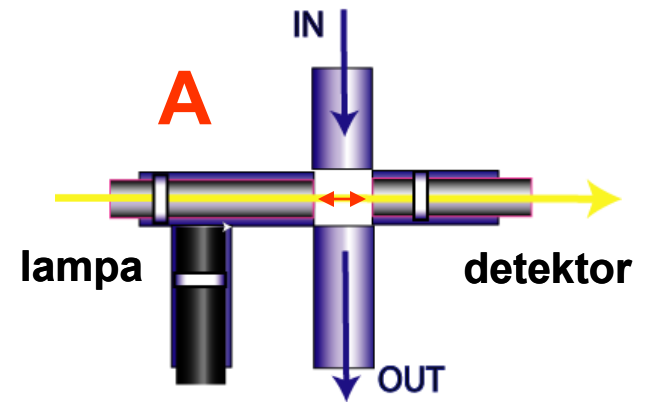
# SIA / LOV

- řízená „syringe“ pumpa pro sekvenční transport roztoků přes ventil do zadržovací smyčky, a z ní pak do průtočné mikrocely (optovláknová detekce)
- typické objemy při stanovení jsou 5 až 25  $\mu\text{l}$  vzorek, reagent 25 to 50  $\mu\text{l}$  a 100 až 200  $\mu\text{l}$  nosný pufr



# SIA / LOV

- průtočná cela integrovaná v LOV umožňuje měření absorbance (A, příp. s delší optickou dráhou B) a fluorescence (C)
- proměnná konfigurace tvořená přívodními trubičkami, optickými vlákny a zarážkami

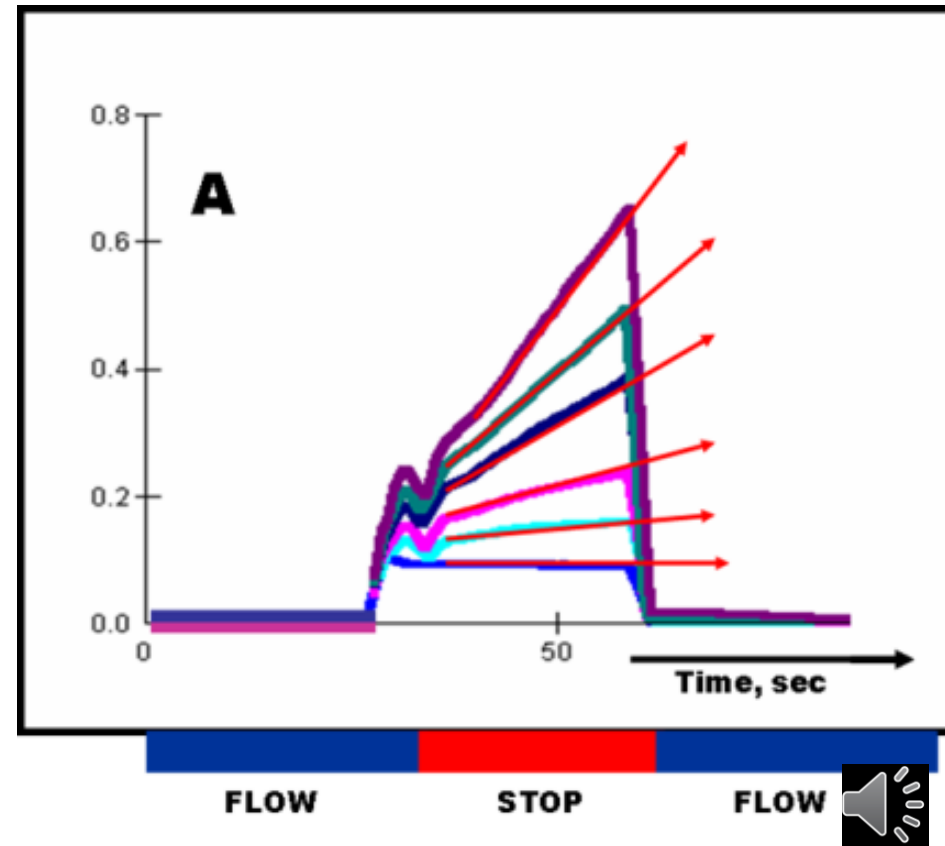


LED nebo laser



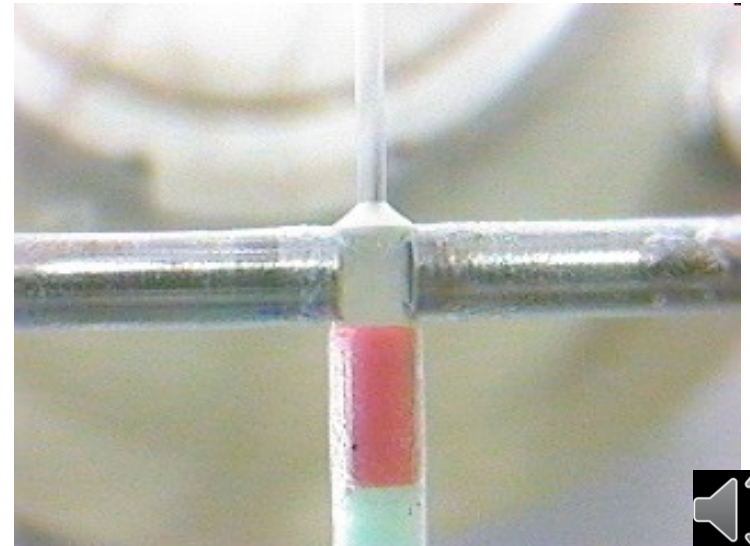
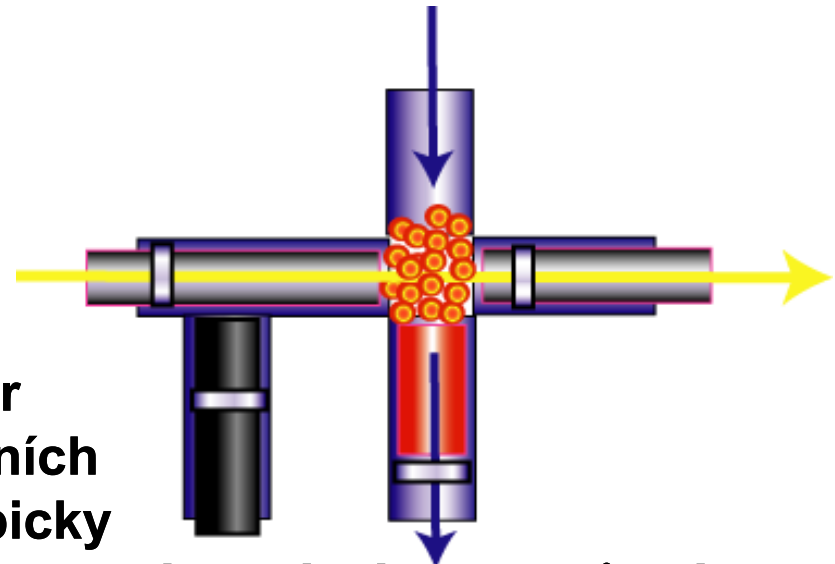
# LOV aplikace

- enzymová stanovení substrátů a inhibitorů
  - měření enzymové aktivity
  - „bioligand interaction assays“ (BIA)
  - affinitní chromatografie
  - ionexová chromatografie
  - spojení s biosensory
- 
- ukázka měření koncentrace glukosy pomocí GDH/NAD<sup>+</sup>



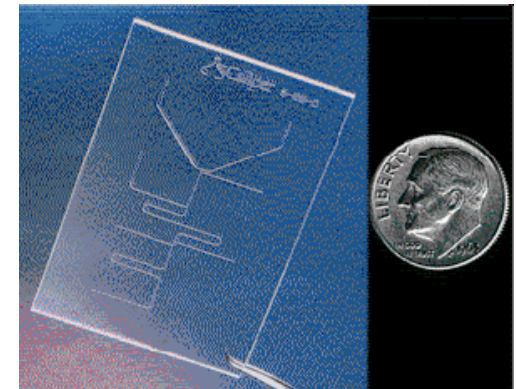
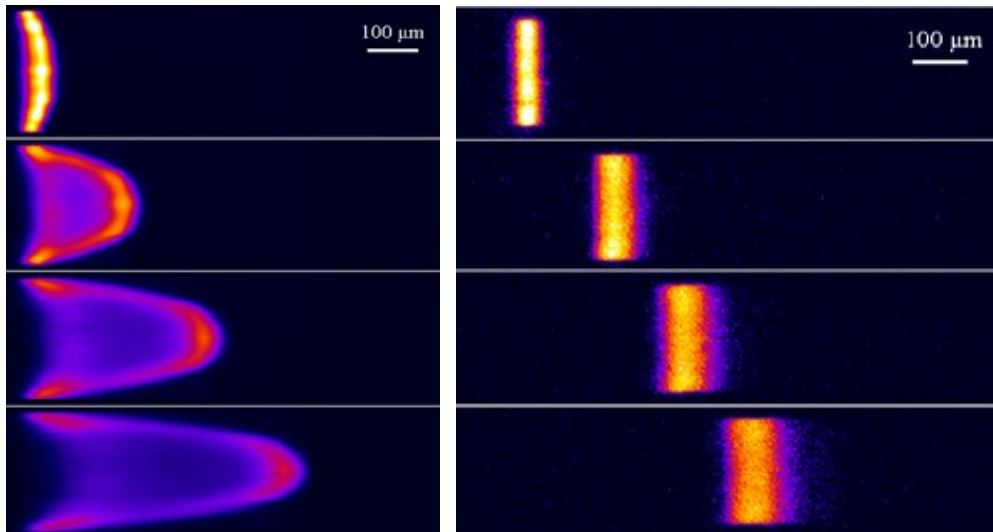
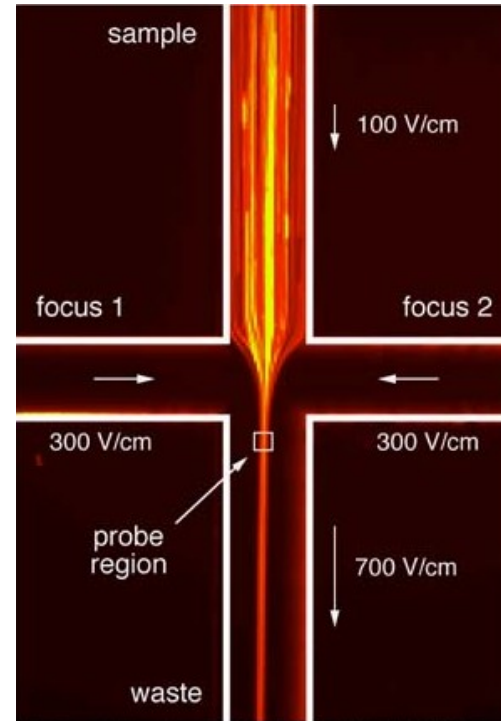
# Bead injection

- použití průsvitných mikročastic jako vyměnitelného nosiče biorekogniční komponenty
- sloupec částic přesně naplní prostor průtočné cely, vazba komplementárních biomolekul se detekuje spektroskopicky (např. v UV pro bílkoviny, při jiných vlnových délkách pro různé kofaktory, ...)
- kuličky jsou v cele drženy mechanicky pomocí vhodné zarážky s otvorem menším než průměr částice, po měření (nebo po výrazném poklesu vazebné kapacity se obrácením směru průtoku z cely jednoduše vypláchnou
- vyšší citlivost než jednoduché průtočné stanovení – akumulace analytu na mikročasticích

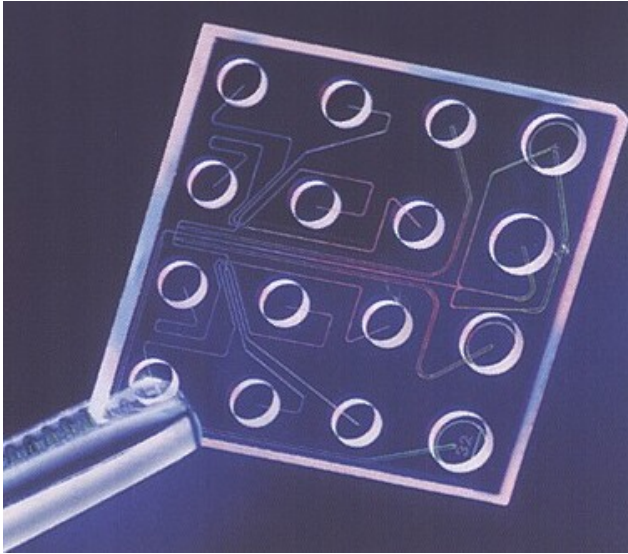


# CE Capillary electrophoresis

- pohyb roztoků vyvolán elektroosmotickou silou
- dole srovnání profilů fluorescenčních barviv při toku vyvolaném mechanicky nebo elektroosmoticky
- elektrokinetické „zaostření“ zóny vzorku
- ukázka čipu pro CE separace



# CE a spol. na čipu



- miniaturizace – kombinace s dalšími technikami (PCR, biosensory ...) – ChipShop

