

# Biosensory

**Petr Skládal**

***Ústav biochemie***

***Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita,***

***Kamenice 5, 625 00 Brno***

**[skladal@chemi.muni.cz](mailto:skladal@chemi.muni.cz)**



# **BIOSENSORY**

- **Co to je biosensor?**
- **Přehled témat přednášky**
- **Zlepšení očekávaná od biosensorů**
- **Historická východiska**
- **Informace o biosensorech**
- **Vlastnosti ideálních biosensorů**



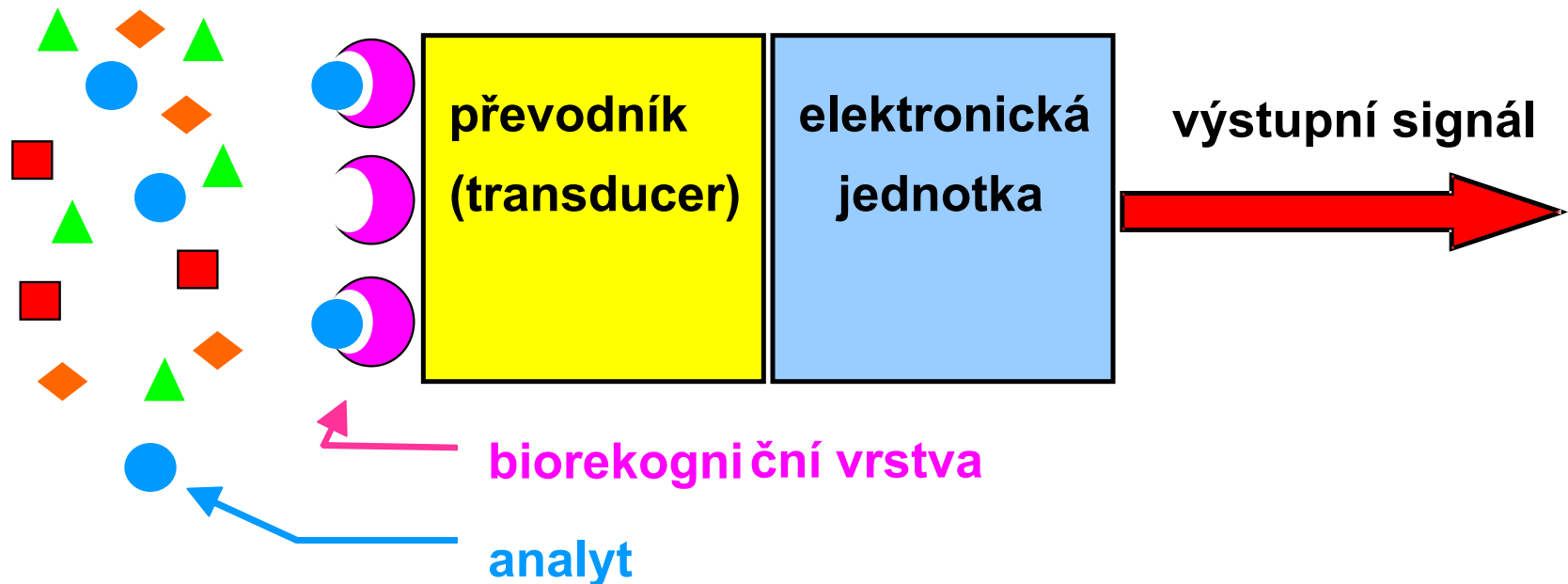
# Sylabus

- **1. Definice biosensoru. Historický přehled. Charakteristiky ideálního biosensoru. Základní měřicí přístupy.**
- **2. Elektrochemické biosensory, enzymové elektrody. Potenciometrické systémy a ISFETy. Referenční elektrody. 3. Amperometrické měření kyslíku, peroxidu vodíku a NADH, biosensory s oxidázami a dehydrogenázami. 4. Přenos elektronů z enzymů na elektrodu pomocí mediátorů. Kompozitní a organokovové molekuly. 5. Měření impedance a konduktometrické biosensory. Voltametrické techniky.**
- **6. Spektrofotometrické, fluorimetrické a chemiluminiscenční sensory, optická vlákna. Optické biokatalytické sensory. Bioluminiscence.**
- **7. Biosensory pro detekci inhibitorů. Recyklační enzymové systémy. Mikrobiální, tkáňové a receptorové sensory.**
- **8. Afinitní biosensory s nepřímou detekcí pomocí značek. Imunosensory. 9. Hybridizační biosensory pro stanovení nukleových kyselin a detekci sekvencí oligonukleotidů. 10. Přímé optické afinitní sensory. Využití exponenciální vlny a resonance povrchových plasmonů ke sledování bioafinitních interakcí v reálné čase. Integrované optické systémy, interferometry a podobné techniky.**
- **11. Imobilizace biomolekul při konstrukci biosensorů. Membránové techniky. Elektropolymerace. 12. Aktivace povrchu sensorů. Kovalentní vazba biomolekul. 13. Miniaturizace a masová produkce biosensorů. Sítotisk, litografie, biosensory jako součást integrovaných analytických systémů, biočipy.**
- **14. Komerční biosensory. Perspektivy biosensorů, oblasti uplatnění v medicíně, potravinářství a ochraně životního prostředí, vojenství.**



# 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 buď:

- specificky přeměňuje = biokatalytická reakce:  
enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus
- nebo specificky váže = bioafinitní reakce:  
vazba protilátek s antigeny (hapteny)  
hybridizace nukleových kyselin  
vazba ligandů na receptory  
interakce sacharidů s lektiny



# Fyzikálně-chemický převodník

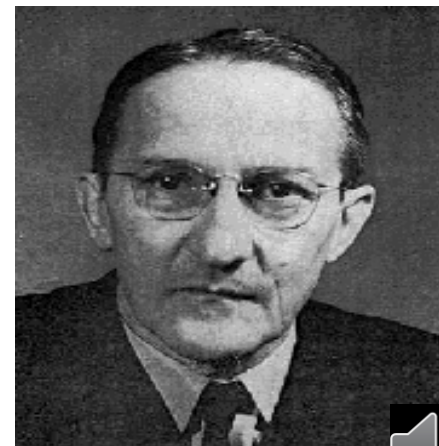
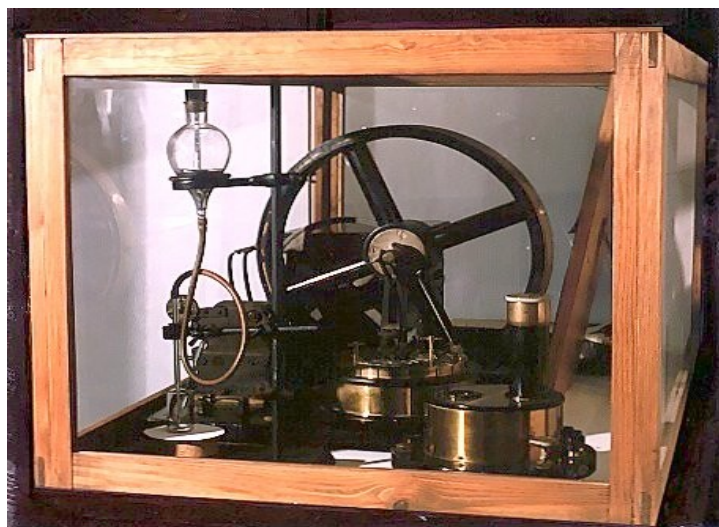
převádí biorekogniční reakci na signál vhodný pro další zpracování, lze je rozdělit do následujících skupin:

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

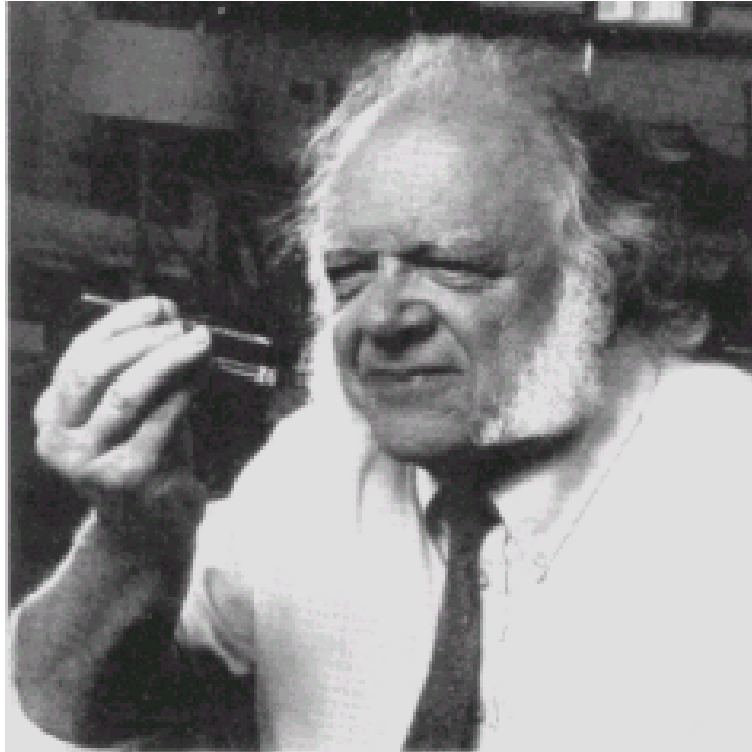


# Historická východiska

- počátek 20. století: formulace koncepce redoxního potenciálu a první měření pH.
- 1922: Heyrovského objev polarografie - zlom na poli elektrochemie
- 1935: pokusy měřit koncentrace kyslíku v biologických tekutinách pomocí rtuťové kapkové elektrody (Müller a Bamberger)
- 1938: měření spotřeby kyslíku živými organismy - sinice, kvasinky a krevní buňky, Petering a Daniels); tyto pokusy vyžadovaly práci se rtuťí a poměrně komplikovanou polarografickou aparaturu.
- 40. léta: využití katodické redukce kyslíku na ušlechtilých kovech (Au, Pt); holé elektrody však v biologickém materiálu postupně ztrácely citlivost.

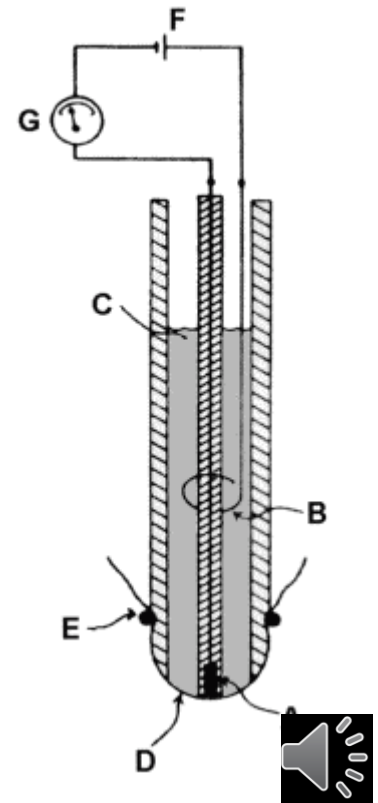


# Spolehlivé měření koncentrace $O_2$



- 1956: revoluční změnu provedl Clark: předřadil elektrodovému systému membránu propustnou pro plyny, a tak elektrody (pracovní Au nebo Pt katoda zatavená ve skle a Ag/AgCl referentní) fyzikálně izoloval od měřeného prostředí.

**Leland C. Clark, Jr.**  
s první enzymovou elektrodou





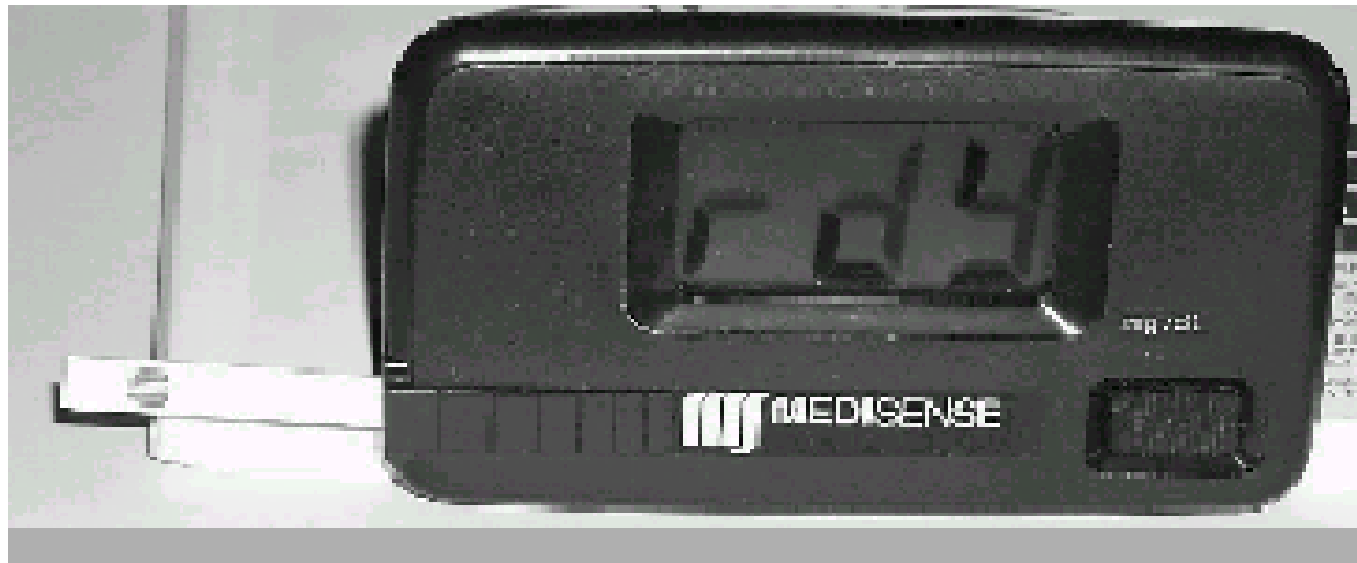
- **1962: na sympoziu New York Academy of Sciences Clark popsal jak „udělat elektrochemické sensory (pH, polarografické, potenciometrické nebo konduktometricé) inteligentnějšími přidáním enzymových převodníků uzavřených jako sendvič v membránách“**
- **tento koncept ilustroval experimentem s glukosa oxidasou zachycenou na povrchu kyslíkové elektrody pomocí dialyzační membrány - měřený pokles koncentrace kyslíku byl úměrný koncentraci glukózy**
- **Clark s Lyonsem v publikaci poprvé uvedli termín enzymová elektroda (často nesprávně připisovaný Updikovi a Hicksovi, kteří propracovali experimentální detaily potřebné k získání funkční enzymové elektrody pro glukosu)**



- 50.-60. léta: první enzymové elektrody
- 1969: potenciometrická enzymová elektroda (Guilbault)
- 1974: enzymový termistor (Mosbach)
- 1975: komerční biosensor pro glukosu (fa. YSI, Ohio)
- 70. léta: objevuje se pojem „**biosensor**“ (byla snaha použít "bioprobe", tento název však byl chráněn).
- zavádí se pojem „optoda“ pro sensory na bázi optických vláken (Lubbers a Opitz)
- 1976: na trhu umělý pankreas Biostator (fa. Miles), biosensor pro laktát (fa. La Roche)
- 1982: popsán implantovatelný glukosový biosensor – jehlová enzymová elektroda (Schichiri)
- výzkum imunochemických biosensorů (imunosenzory)
- 1990: na trh uveden BIAcore (fa. Pharmacia)
- ~2000: nástup DNA biočipů



# Biosensor pro glukosu



- dosud nejúspěšnější biosensor je založen na ferrocenu - přenašeči elektronů z oxidoreduktas na elektrodu (fa. Medisense).
- Levný osobní biosensor pro domácí měření krevní glukosy diabetiky.



# Glucometry nyní


- běžně dostupné
- propojitelné s telefonem

glukometr | Alza.cz x +

://www.alza.cz/search.htm?exps=glukometr

Poslední 2 kusy za tuto cenu


-10% **DOPRAVA ZDARMA**



-10% 1 995,-  
**1 795,-**   
bez DPH 1 561,-

**Skladem 2 ks**

-7% **DOPRAVA ZDARMA**




★★★★★

**1 259,-**   
bez DPH 1 040,-

**Skladem > 5 ks**

-7% **DOPRAVA ZDARMA**



-7% 1 425,-  
**1 325,-**   
bez DPH 1 152,-

**Rozbaleno skladem**



**Beurer GL50**  
 Glukometr vhodný pro osobní použití pro měření obsahu cukru v krvi, svícený LCD displej, jednoduché měření, doba měření cca 5 sekund, 480 měření s datem a časem, částí balení je odběrové zařízení, 5 jehel, 5 testovacích proužků, baterie, pouzdro, návod.

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

**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

**DOPRAVA ZDARMA**



★★★★★

-10% 1 349,-  
**1 208,-**   
bez DPH 999,-

**1x VYSTAVENO**

**DOPRAVA ZDARMA**



★★★★★

**1 929,-**   
bez DPH 1 583,-

**VÍCE NEŽ 98% SPOLEHLIVOST**



★★

**559,-**   
bez DPH 451,-

# Biosensory v Brně

- 1950 - založena Katedra biochemie na PŘF MU
- 1970 - Prof. Lumír Macholán - enzymové elektrody (inhibice tyrosinasy, konduktometrické měření močoviny, diaminoxidasa)
- 1990 – inhibice cholinesterasy pro detekci organofosfátů - spolupráce s armádou (VTUO Brno)
- 1993 – piezoelektrické sensory (první experimenty s Prof. Marco Mascinim) a studie afinitních interakcí pomocí biosensorů
- 1995 – používání sítotiskových sensorů (Krejčí Engineering, dnes BVT Technologies)
- 1999 – mikroraménka jako afinitní sensory (University v Mainzu a Janově, Dr. Roberto Raiteri)
- ~2002 – aktivity na poli elektrochemických imunosenzorů pro biologická agens (*F. tularensis*)



# Biosensory v Brně

- 2005 – přesun do nového kampusu v Brně - Bohunicích zpočátku v rámci ILBIT (integrated laboratories of biomedical technologies)
- 2006 – iniciován výzkum nanobiotechnologií - pod Národním centrem pro výzkum biomolekul
- v současnosti aktivity realizovány v:
  - **A5 / Ústav biochemie - přednášky a výuka zaměřená na biosensory, „tradiční“ oblasti výzkumu (elektrochemické, piezoelektrické, optické, ...)**
  - **A4 / Národní centrum pro výzkum biomolekul - nanobiotechnologie – AFM Ntegra Vita a Solaris, AFM JPK / konfok. Mikroskop Olympus, biointerakce – Biacore 3000)**

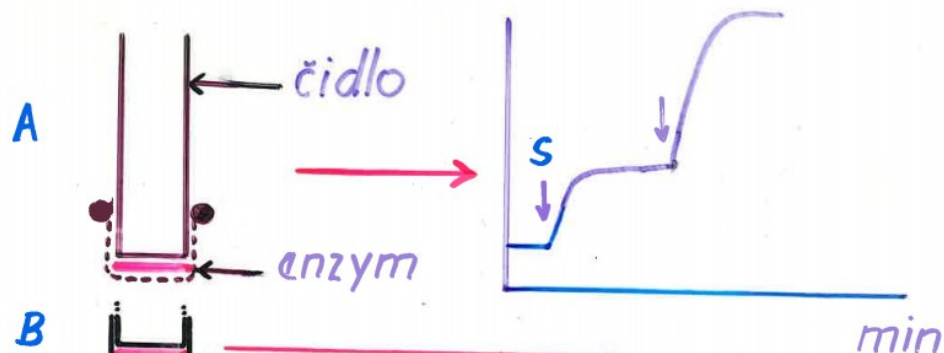


# První setkání ...

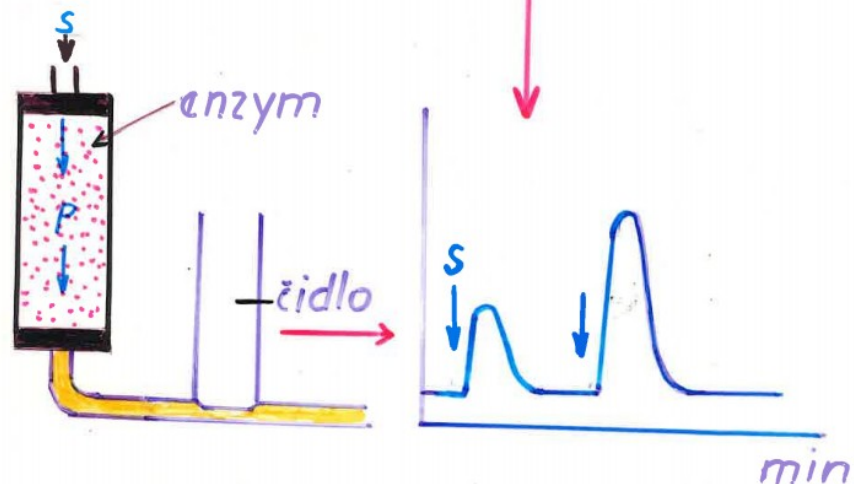
- Enzymologie, přednáška prof. Lumíra Macholána (1985)
- první publikace z Brna: Macholan, L. Use of Czechoslovak analyzer of dissolved oxygen for study of enzymatic oxidations. *Chem. Listy* 62 (1968) 1256

Toul, Z; Macholan, L. Enzyme electrode for rapid determination of biogenic polyamines. *Collect. Czechoslovak Chem. Commun.* 40 (1975) 2208

## 4. Membránový sensor



## 2. Reaktorový sensor



# Časopisy o biosensorech

- **Biosensors and Bioelectronics** – všechny aspekty oboru, nové trendy
- **Sensors and Actuators B Chemical** - zejména fyzikálně-chemické převodníky
- **Electroanalysis / Journal of Electroanalytical Chemistry / Bioelectrochemistry and Bioenergetics** - elektrochemické biosensory
- **Analytical Chemistry / Analytica Chimica Acta / Analytical Biochemistry / Analytical Letters / Analyst / Trends in Analytical Chemistry** - čistě analytické, mnoho článků o biosensorech a jejich aplikacích
- **Enzyme and Microbial Technology** - mikrobiální sensory
- **Journal of Biotechnology** - aplikace při biotechnologických procesech
- **Journal of Immunological Methods** – imunochemické sensory
- **Langmuir / Thin Solid Films** - některé aspekty imobilizačních postupů.



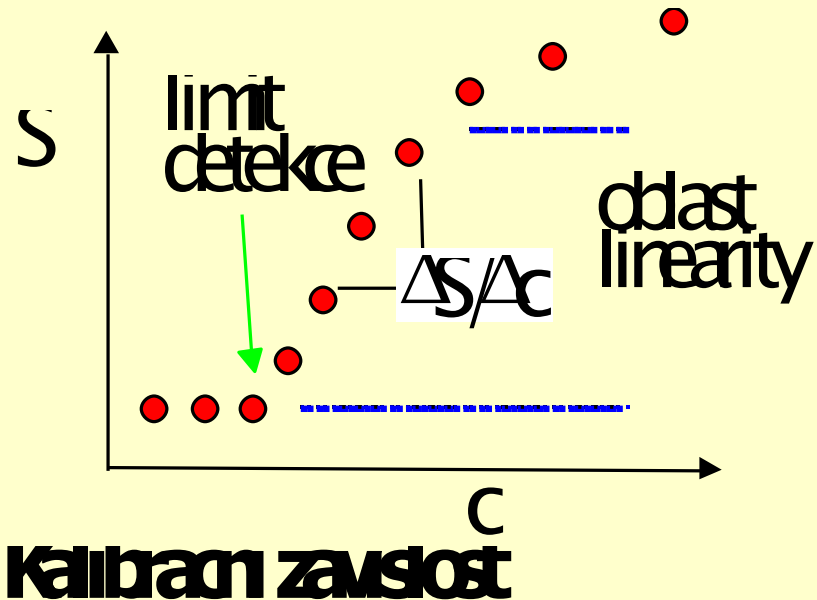
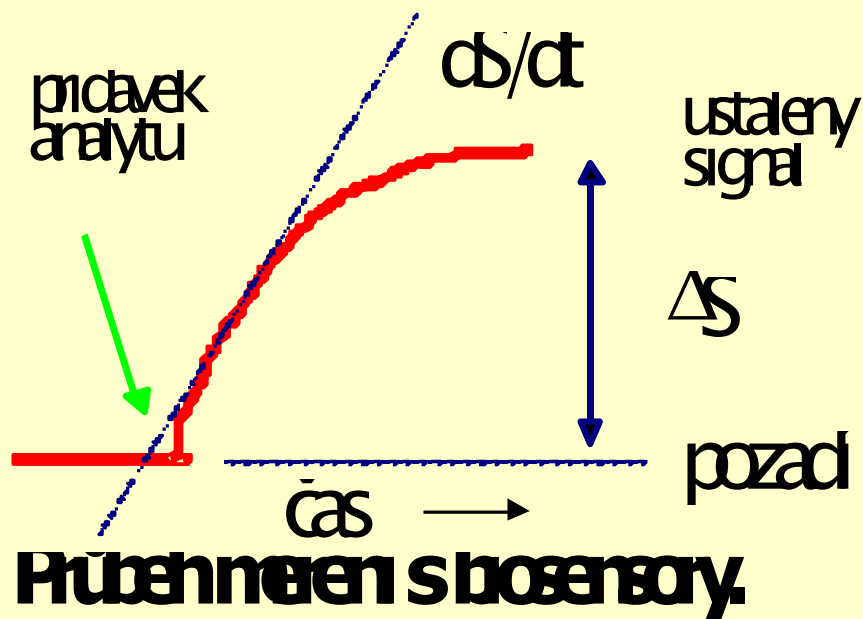


# **Knihy o biosensorech**

- Mosbach K. Immobilized Enzymes and Cells, Methods in Enzymology, Vol. 137, Academic Press, San Diego, 1988.
- 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.
- 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.
- 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, 1993.

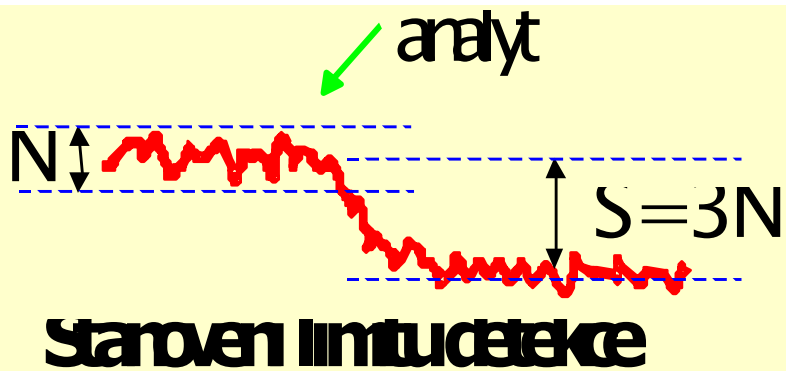


# Základní pojmy



- **Citlivost** je konečná ustálená změna výstupního signálu biosensory ( $S$ ) 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  $\Delta(dS/dt)/\Delta c$ .
- **Kalibrace** spočívá ve vystavení biosensory různým standardním roztokům o známé koncentraci analytu. Kalibrační body by měly uzavírat pracovní oblast biosensory, aby nebylo třeba provádět nespolehlivé extrapolace.





- **Limit detekce (LOD)** biosensoru je nejnižší stanovitelná koncentrace analytu. Ideálně je dán rozlišením měřicího přístroje, obvykle je však zhoršován vedlejšími procesy. Pro definici se používá velikost šumu ( $N$ , noise) signálu a limit detekce se bere pro poměr  $S/N = 3$ .

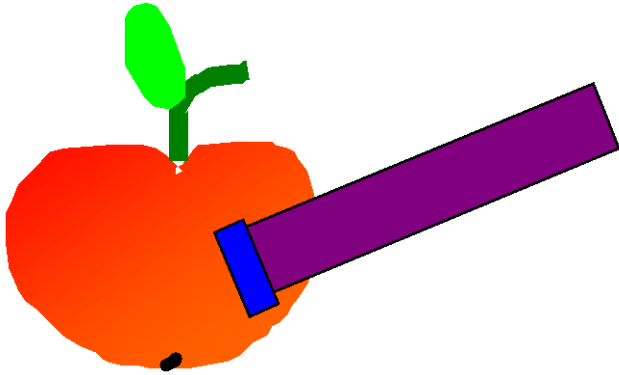
- **Signál pozadí** (background) je signál v nepřítomnosti analytu, obvykle se odečítá od měřeného signálu:  $S = S(\text{měřený}) - S(\text{pozadí})$ . Někdy je výhodnější použít referentní koncentraci analytu a vůči ní vztáhnout měřený signál. Pro semilogaritmický případ dostaneme  $S/S(\text{ref}) = (\text{měření-pozadí})/(\text{reference-pozadí})$ .
- **Dlouhodobá stabilita** (drift) je podmíněna změnami citlivosti biosensoru v čase. Citlivost obvykle klesá, ale může i přechodně 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 vli-vy, mohou často uniknout pozornosti.
- **Selektivita** (vliv interferencí). Odezva biosensoru by měla být vyvolána pouze přítomností stanovované látky. Prakticky je často nutné rušivé látky eliminovat (zře-dění, konverse na nerušící sloučeniny, předřazení selektivní bariéry) nebo jejich příspěvek na měřený signál paralelně určit jiným senzorem (**diferenciální uspořádání**).



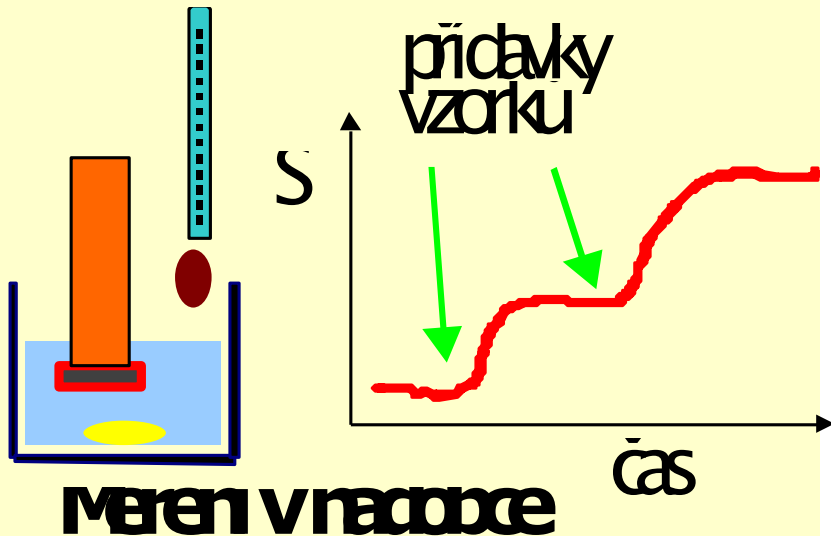
- **Rychlost odezvy** je určována zejména fyzikálními vlastnostmi biosensory (velikost). Závisí na rychlosti difúze analytu z okolního prostředí k povrchu biosensory a dále pak vnitřní difúzí uvnitř systému biosensory.
- **Doba odezvy** se obvykle určuje jako čas potřebný k dosažení určité velikosti signálu v konečném ustáleném stavu ( $t \rightarrow \infty$ ), např.  $\tau_{95}$  pro dosažení 95%.
- **Teplotní závislost** při měřeních s biosensory působí jednak na difúzní jevy, jednak na probíhající chemické reakce. Proto se obvykle pracuje za isothermických podmínek, používá se vodní cirkulující termostat nebo vyhřívaný kovový blok.
- **Životnost biosensory** je obvykle limitována nejslabším 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 biosensory je obecně vhodná nižší teplota (chladnička, mraznička), z praktického hlediska je pohodlnější skladování v suchém stavu.



# Podmínky měření s biosensory



Přímý kontakt se vzorkem

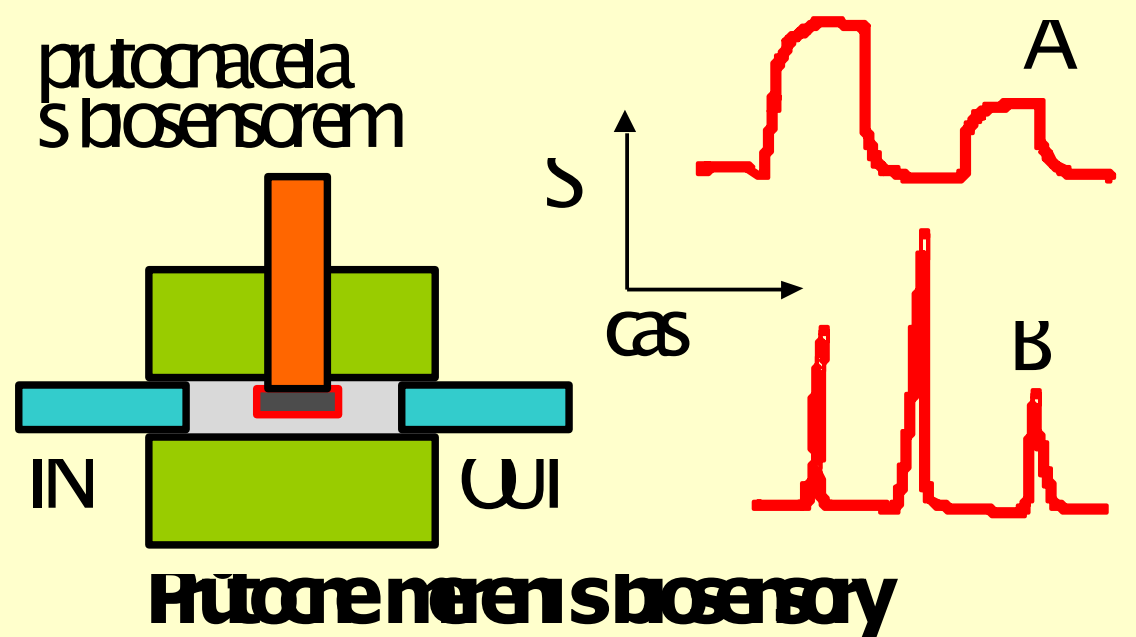


Měření v nádobce

- Biosensor se nachází přímo ve sledovaném prostředí (řeka, tkáň, krevní řečiště, fermentor, ...). Jeho činnost by neměla okolní prostředí ovlivnit - vyčerpávání analytu důsledkem měření, ovlivnění toku jiných látek, ...
- Biosensor je umístěn ve vhodné nádobce (často opatřená vodním pláštěm pro temperaci 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.



# Podmínky měření s biosensory



- Biosensor je umístěn ve vhodné průtočné cele. Jsou možné dva způsoby činnosti. Systémem se nechá střídatvě protékat zóna základního roztoku a zóny vzorku (A). 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 nařadění vzorku a signál má charakteristický tvar píků (B); vyhodnocuje se buď jejich výška nebo plocha. Průtočná uspořádání umožňují automatizovat měření.

