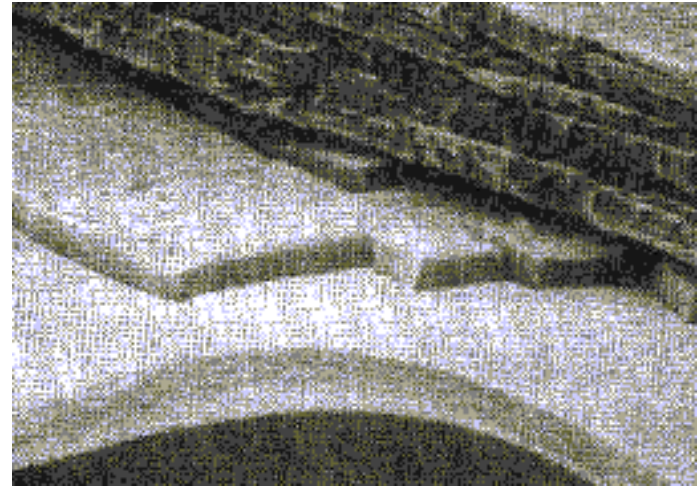
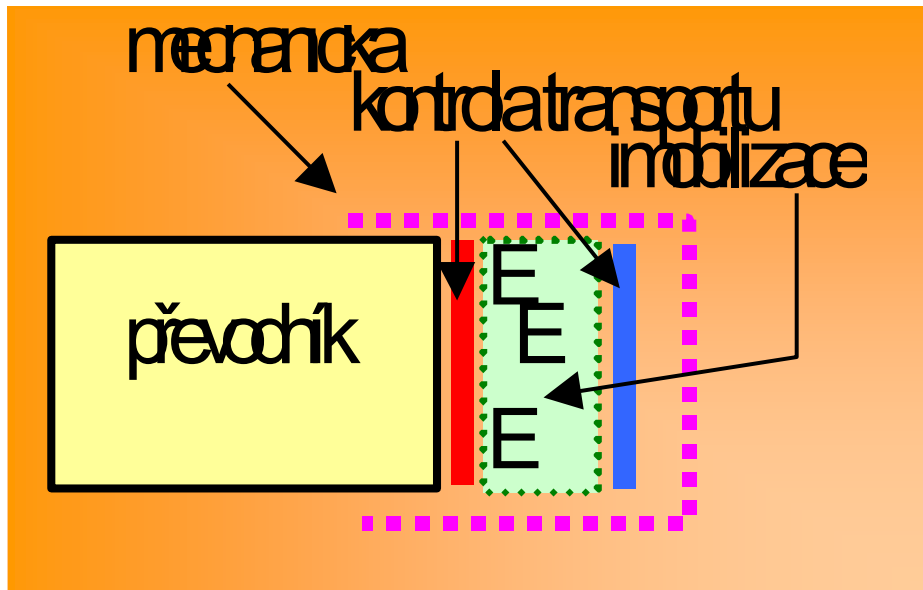


# Technologické aspekty biosensorů

- **imobilizace biomolekul na povrch sensorů**
  - **uchování aktivity a specificity**
  - **robustní spojení**
  - **dobrý převod signálu**
  - **povrchová hustota bioreceptoru**
  - **reprodukovatelná a snadná procedura**



# Membrány a biosensory



- **membrány v biosensorech plní několik funkcí:**
- **imobilizace biorekogničních molekul – nosná funkce.**
- **řízení transportu látek buď prostřednictvím difúzní kontroly nebo ovlivněním selektivity (antiinterferenční)**
- **zlepšení mechanické stability**
- **biokompatibility.**



# Rozdělení membrán

- membrána = porézní prostředí, rozdělení:
- hrubě porézní - póry nad 5 nm (skelná frit), permeabilitu ovlivňuje rozdíl hydrostatického tlaku na obou stranách, osmotický tlak se neuplatňuje (pokud polymer membrány neinteraguje s rozpouštědlem); permselectivita je velmi špatná až žádná (prochází všechny látky)
- jemně porézní - póry 1 až 5 nm (např. acetylcelulosa), rozpouštědlo prochází konvekcí a difúzí, permeabilita je dána velikostí rozpuštěných látek
- neporézní (husté) - nevykazují porézní strukturu, rozpouštědlo prochází pouze difúzí



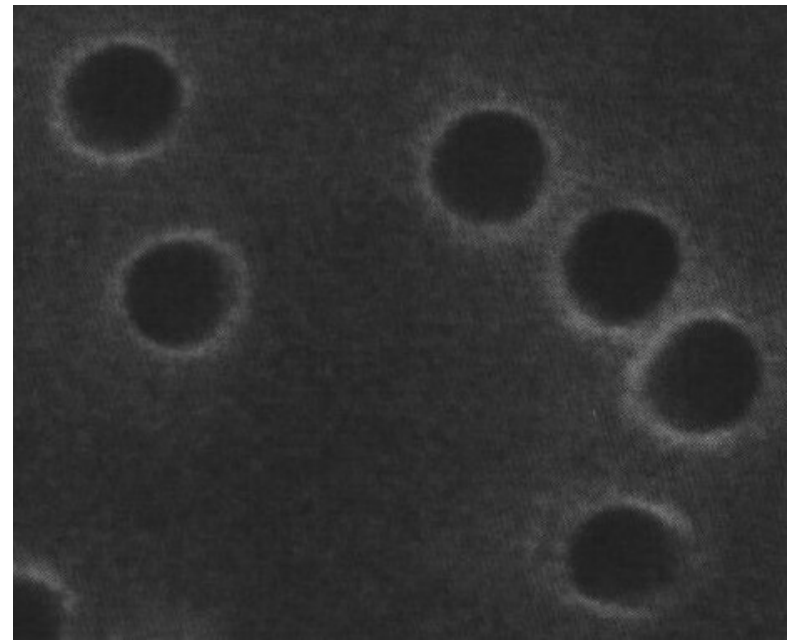
# Příprava membrán

- je potřeba pečlivě kontrolovat podmínky (vlhkost, teplota), které silně ovlivňují vlastnosti vznikajících membrán
- **fázová konverze** - roztok polymeru ve vhodném rozpouštědle se nalije na pevný povrch a vyčká se odpaření rozpouštědla
  - polyvinyl chlorid (tetrahydrofuran - THF), acetylcelulosa (aceton), polyethersulonát (dimethylsulfoxid) nebo polyurethan (THF, aceton)
  - vyšší vlhkost a nižší teplota okolí - vznikají větší póry
  - nalití roztoku polymeru v org. rozpouštědle nemísitelném s vodou na vodní hladinu, zde se na rozhraní utvoří asymetrická membrána
- **polymerace** z mono či oligomerů přímo na místě použití (tvorba „in situ“) - vhodná k přípravě fragilních gelovitých membrán (polyvinylalkohol, polyakrylamid), které obsahují velký podíl vody
- **dodatečná tvorba pórů** - tzv. nukleární membrány (Nucleopore)
  - vrstva polymeru se „prostřílí“ urychlenými nukleony, lokálně narušená struktura polymeru se naleptá a vzniknou póry
  - velmi dobrá reprodukovatelnost a homogenita pórů o poměrně přesně definovaném průměru
  - lokální změny lze vyvolat mechanickým natahováním (polyenové membrány, obsahující krystalické a amorfní oblasti, v amorfních pak následně vzniknou póry)



# Úpravy membrán

## Nucleopore membrána



- velikost pórů membrány lze dodatečně změnit:
- zvětšení průchodnosti se dosáhne naleptáním polymeru membrány, které vede ke zvětšení průměru pórů
  - alkalická hydrolýza acetylcelulosy nebo polykarbonátů
- zmenšení průchodnosti a zlepšení permselectivity se dosáhne depozicí vhodných látek uvnitř pórů
  - např. organosilanů nebo lipidických látek
- symetrické membrány - obě strany jsou rovnocenné, průchodnost oběma směry je stejná
- asymetrické membrány - připravují se na rozhraní dvou fází



# Biokompatibilita

- při použití biosensorů v živém organismu (in vivo) nebo v klinické praxi při kontaktu zejména s krví (in vitro)
- při kontaktu povrchu membrán s prostředím dochází k adsorpci proteinů – zejména albuminu a fibrinogenu na povrch
- pak se vytváří další vrstva krevních destiček (koagulační trombóza)
- při dlouhodobé implantaci dochází k zarůstání biosensoru tkání
- postupné snižování citlivosti důsledkem snížené prostupnosti
- biosensor může vyvolávat rušivé reakce u živého organismu
  - srážení krve, zánětlivé procesy
- je potřeba povrch biosensoru povléknout vhodnými polymery
  - silikon, polytetrafluorethylen a zejména polyurethany)
- modifikovat povrchní obal (hydrofilizace, konverze aminoskupin na hydroxyskupiny)
- do vnější vrstvy vpravit látky omezující rušivé reakce fosforylcholin, fosfolipidy, heparin

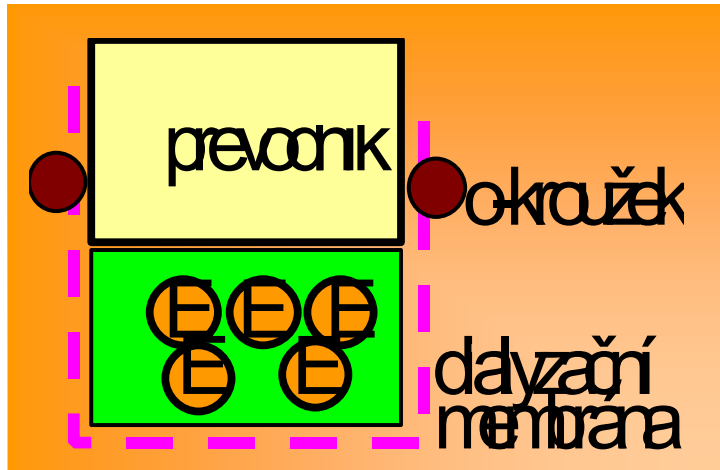


# Adsorpce biomolekul

- jednoduchá a levná metoda probíhající za mírných pracovních podmínek
- bílkoviny se adsorbují v náhodné orientaci, přitom může docházet ke konformačním změnám, které mohou (negativně) ovlivnit funkční vlastnosti
- adsorpce bílkovin na pevný povrch bude záviset na:
  - vlastnostech proteinu: velikost, hmotnost, difúzní koeficient, rozložení nabitých / hydrofilních / hydrofobních / redoxaktivních skupin, konformační stabilitě
  - povrchovém napětí a náboji, hydrofobnosti / hydrofilnosti povrchu, stupni hydratace a struktuře hydratované vrstvy, přítomných funkčních skupinách
  - pH, iontové síle roztoku, přítomnosti interagujících aditiv
  - dalších parametrech – teplota, „inkubační geometrie“ – poměr objemu přidaného roztoku a velikosti povrchu, hydrodynamice – míchání, třepání, ...



# Mechanické zachycení biomolekul



- nejjednodušší - kápne se roztok biokomponenty na povrch převodníku a překryje se dialyzační membránou
- alternativní metodou je zachycení biomolekul uvnitř vhodného polymeru (inkluze), polymerní vrstva se vytvoří na povrchu podpůrné dialyzační membrány





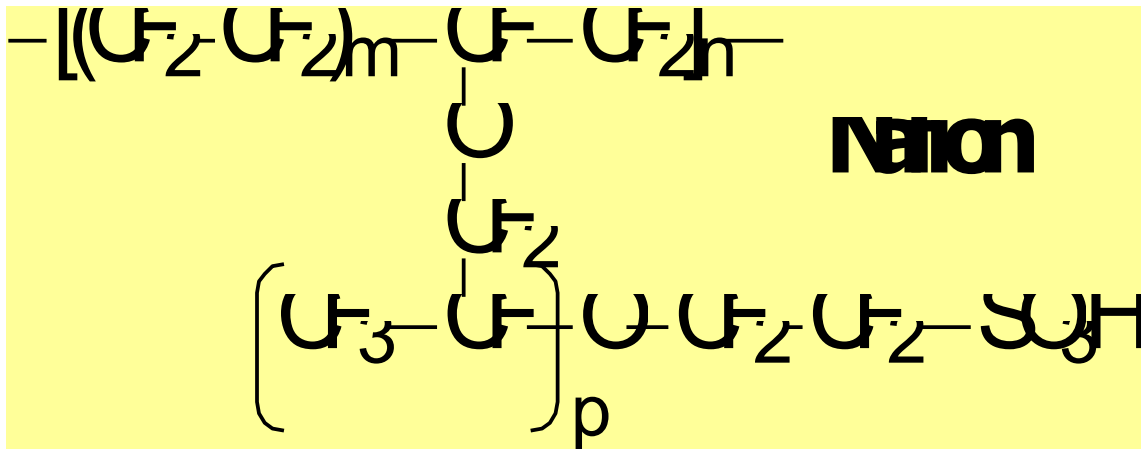
# Zachycení v gelu

- inkluze biomolekul uvnitř struktury membrány při její tvorbě
- polyakrylamid (PAG) příprava ze směsi akrylamidu a methylen-bis(akrylamid) v přítomnosti enzymu, iniciace UV světlem, polymer obsahuje vysoký podíl vody (80 až 95%)



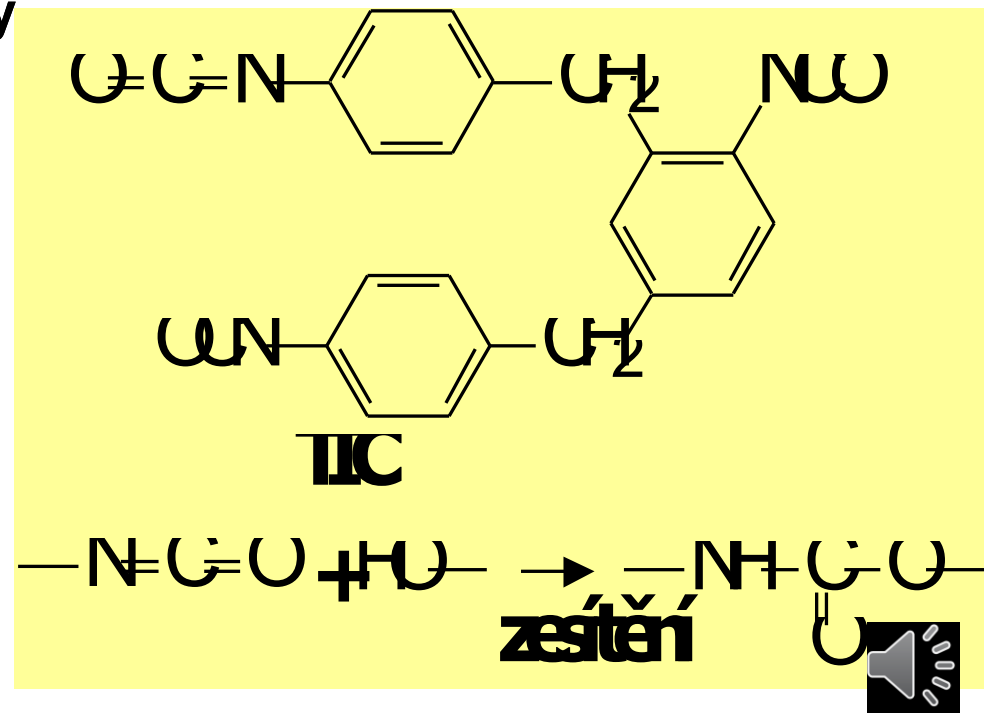
# Zachycení v gelu

- želatina je často používána pro enzymové membrány; 5% roztok se rozpustí při zvýšené teplotě (až 50 °C) a přidá se enzym, promíchá se a naleje na podložku (např. dialyzační membrána)
- Nafion je polymer rozpuštěný ve směsi alkoholů s vodou
  - používá se pro tvorbu permselektivních membrán - jako iontoměnič
  - může zachycovat biomolekuly



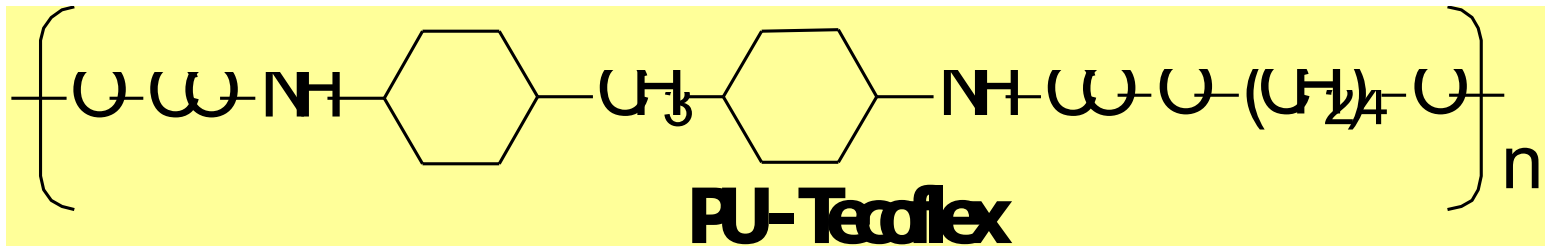
# Zachycení v PVA

- polyvinylalkohol (PVA) je hydrofilní, neutrální a biokompatibilní polymer, ve vodě silně bobtná; dostupný ve formě oligomerů (90 kDa), které po zesíťování vytvoří konečný polymer
- radiační polymerace využívá ozáření směsi oligomerů a enzymu  $\gamma$ -zářením (generuje  $^{60}\text{Co}$ )
  - vzniklé radikály vyvolají další polymeraci a zesíťování
  - výsledná membrána neobsahuje žádné nežádoucí produkty a současně je sterilizována
- chemické síťování – triisokyanáty (TIC), spojí postranní hydroxyly
- UV polymerace - PVA obsahující styrylbipyridiniové skupiny (PVA-SbQ, 1.3%)
  - vůbec nejšetrnější postup imobilizace pomocí PVA



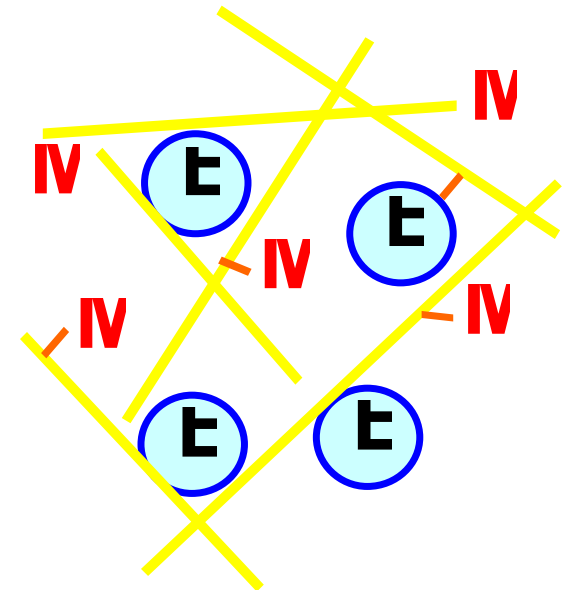
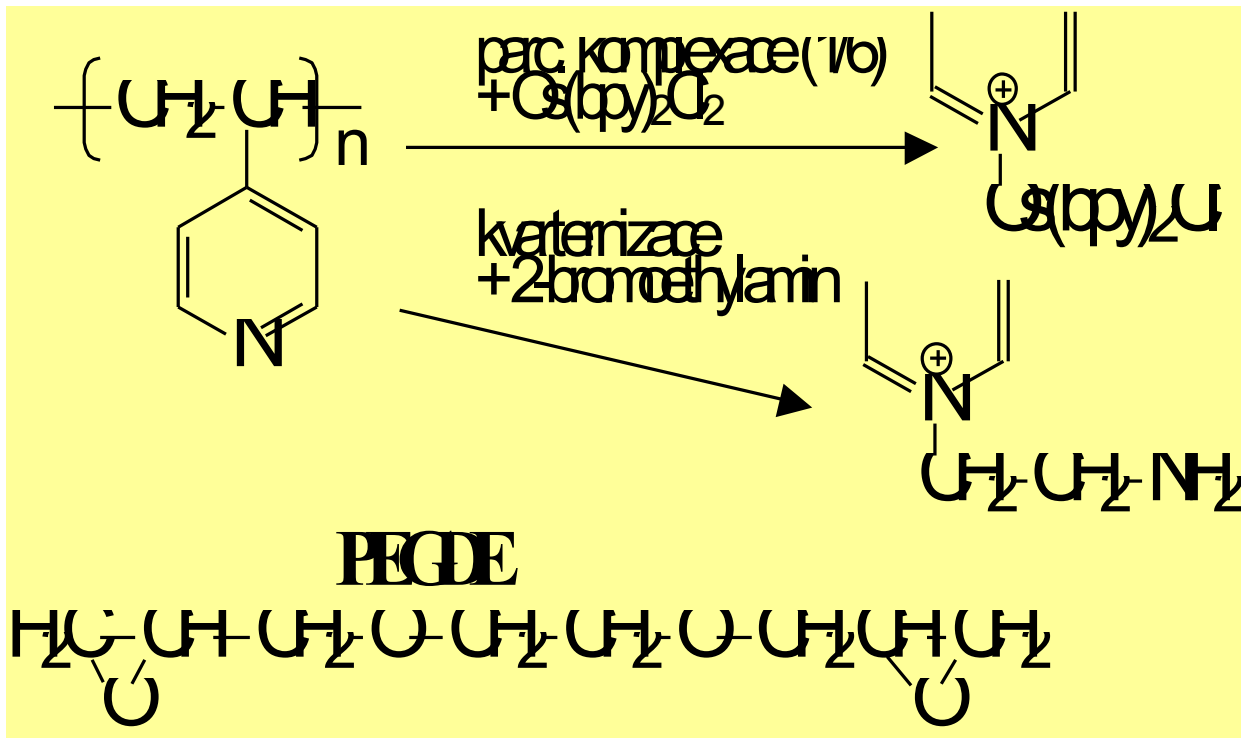
# Polyurethany

- reprezentují velice širokou skupinu biokompatibilních polymerů s velmi dobrými adhezními vlastnostmi
- vychází z oligomerů (kolem 50 kDa), které se v přítomnosti enzymu zesít'ují např. difenylmethan diisokyanátem



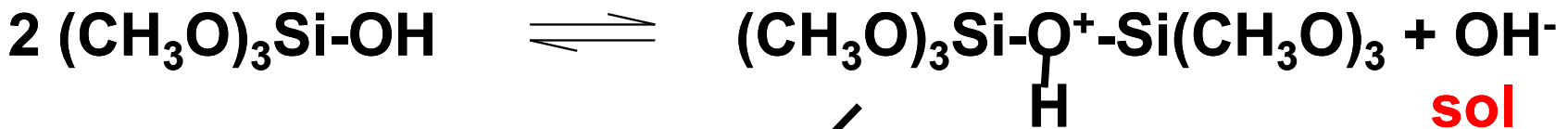
# Multifunkční polymery

- kombinují imobilizaci enzymu s polymerní strukturou nesoucí skupiny mediátorů přenášející elektrony, tzv. redox relays
- poly-4-vinylpyridin (oligomer kolem 50 kDa) se částečně využije pro tvorbu komplexu s osmiem (mediátor), a částečně se do něj kvarternizací zavedou aminoskupiny
- směs modifikovaného oligomeru, enzymu a bifunkčního činidla PEGDE (polyethylenglykoldiglycidylether) se nanese na elektrodu



# Sol-gel matrice

- sol-gel proces – vznik „skla“ hydrolytickou polymerací monomolekulárních prekursorů  $(\text{CH}_3\text{O})_4\text{Si}$  tetramethyl-o-křemičitan (TMOS):



biomakromolekula

gelovatění

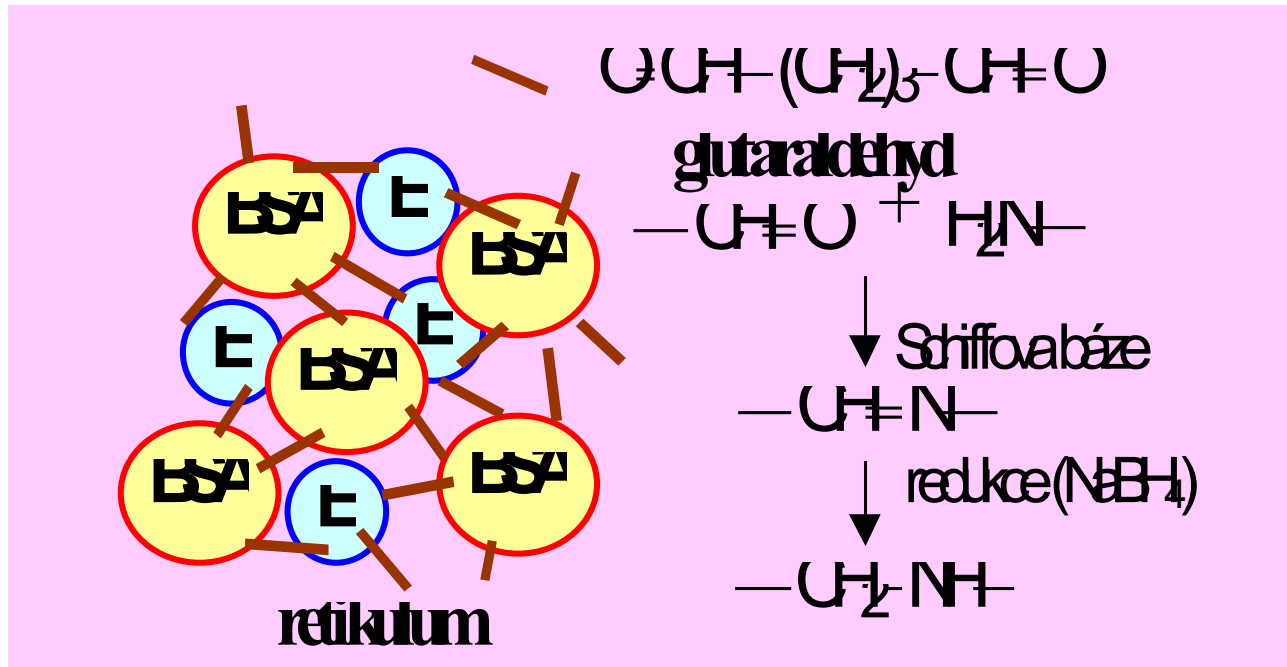


zachycení v pórech

stárnutí a vysychání



# Zesít'ování biomolekul



- zdaleka nejčastěji se používá glutaraldehyd; jeho směs s roztokem bílkoviny v závislosti na koncentraci složek vytváří spontánně retikulum buď přímo na povrchu sensoru, nebo na vhodném podkladovém materiálu (polyamidová síťka, dialyzační membrána)
- reakcí mezi aldehydovou skupinou činidla s aminoskupinou bílkoviny (postranní lyzinové zbytky) vzniká propojením Schiffova báze, která se ještě může zredukovat na stabilnější aminovou vazbu



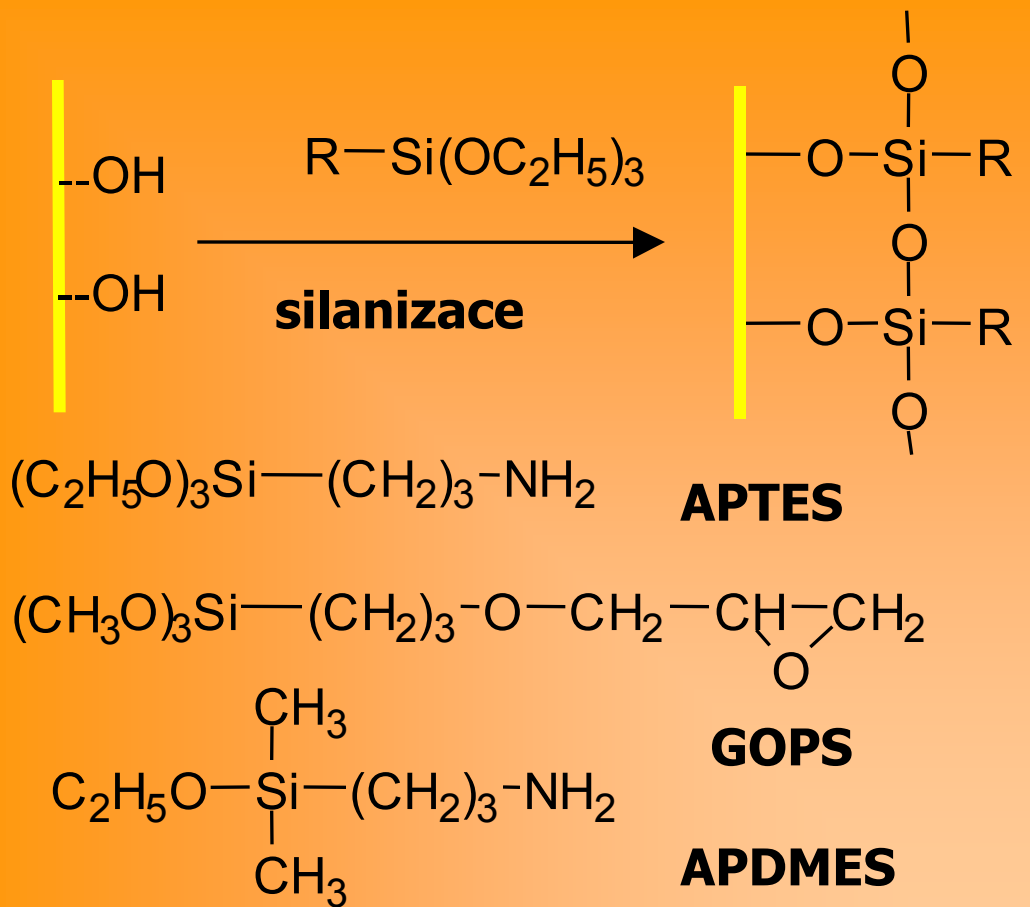
# Aktivace inertních povrchů

- pracovní povrch sensorů tvoří malá skupina poměrně inertních materiálů: sklo, křemík, různé modifikace uhlíku (grafit, skelný uhlík, kompozitní směsi) a ušlechtilé kovy (zejména zlato a platina)
- některé biomolekuly se na tyto materiály adsorbují s různou pevností, avšak spolehlivá a dlouhodobě stabilní imobilizace vyžaduje kovalentní vazbu mezi biomolekulou a povrchem
- prvním krokem imobilizace jsou aktivační postupy, které na málo reaktivní povrch sensoru zavádějí reaktivní skupiny schopné pak kovalentní vazby s biomolekulami





# Silanizace



- metoda aktivace inertních povrchů částečně pokrytých vrstvou oxidu (sklo, křemík, kovy) kontaktní vrstvou silanu s vhodnou reaktivní skupinou
- nepoužívají se organické halogenované silany (jsou příliš reaktivní a žádná další skupina už by nezbyla), ale méně reaktivní alkoxyderiváty
- $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilan (APTES nebo APTS)
- glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPS)
- jejich účinkem se na povrchu vytvoří několik molekulárních vrstev



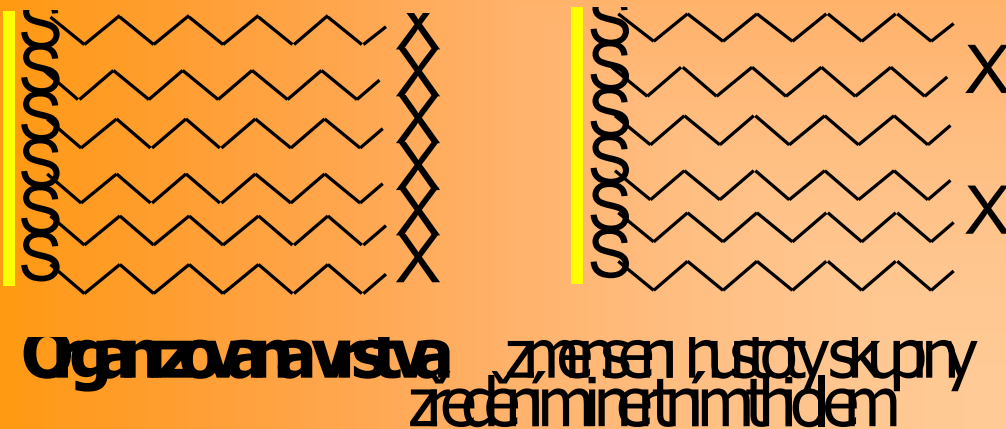
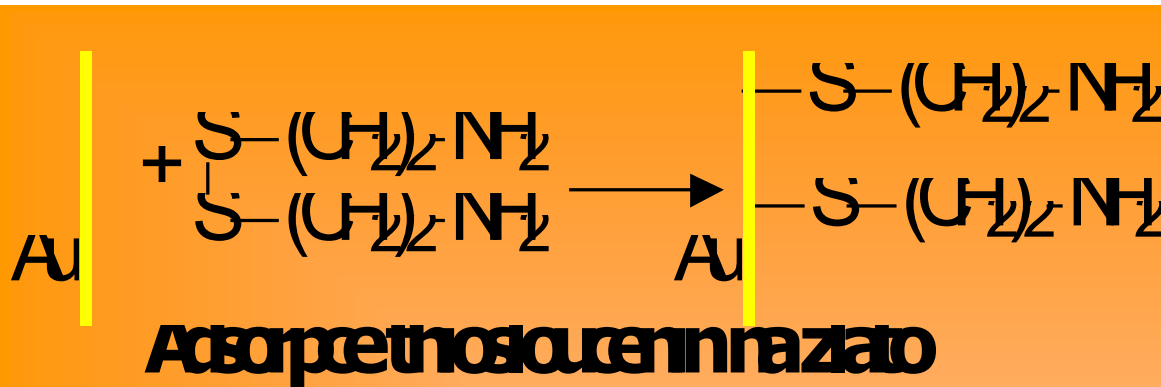
# Silanizace

- Ize provádět z organické fáze
  - 10% roztok silanu v toluenu, v něm se daný povrch refluxuje 12 až 24 hod, po promytí toluenem či acetonem a vysušení se dále zahřívá 2 až 4 hod při 110 °C
- z vodné fáze se dosáhne menší vazebná kapacita, ale vrstva je stabilnější při použití ve vodném prostředí
  - povrch se hydratuje 30 min povařením ve vodě
  - zahřívá 3 až 4 hod při 75 °C v 10% vodném roztoku silanu, pH 4
  - po usušení se zahřívá přes noc při 110 °C
- odpařovací nanesení je nejjednodušší
  - povrch se inkubuje 1 hod v 1% silanu v acetonu
  - po opláchnutí acetonem a vysušení se zahřívá 1 hod při 110 °C
- nanášení silanu z vodné fáze nebo z polárních rozpouštědel vede ke tvorbě složitějších struktur (4 až 5 vrstev silanu)



# Spontánní vznik monovrstev

- monovrstvy (SAM, „self-assembled monolayers“) mohou vzniknout samovolnou organizací na nosném povrchu

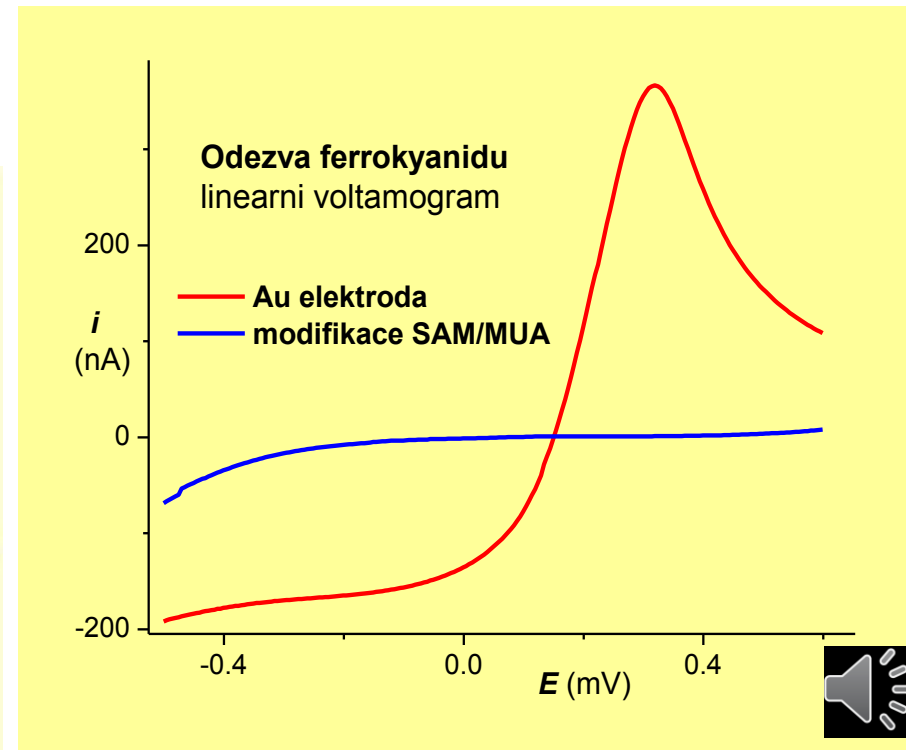
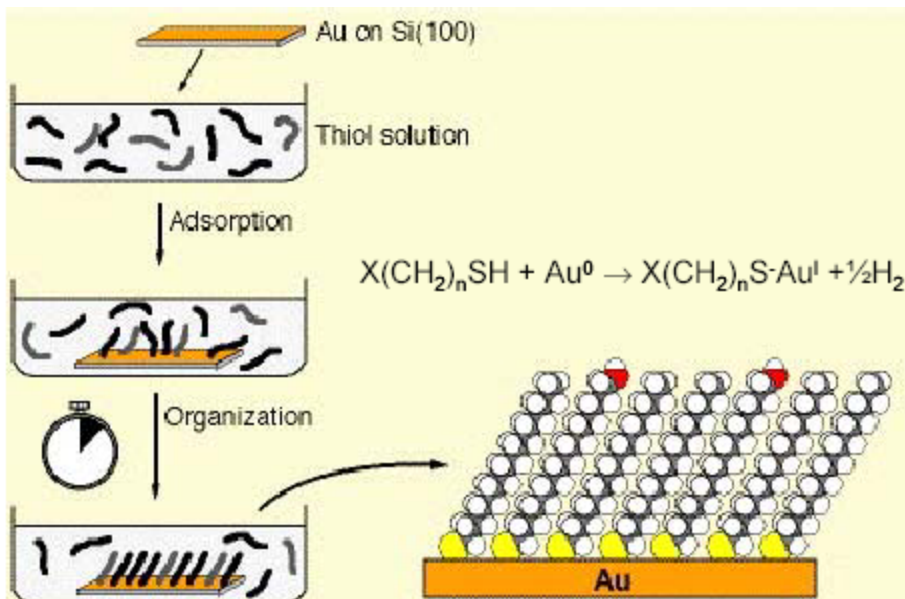
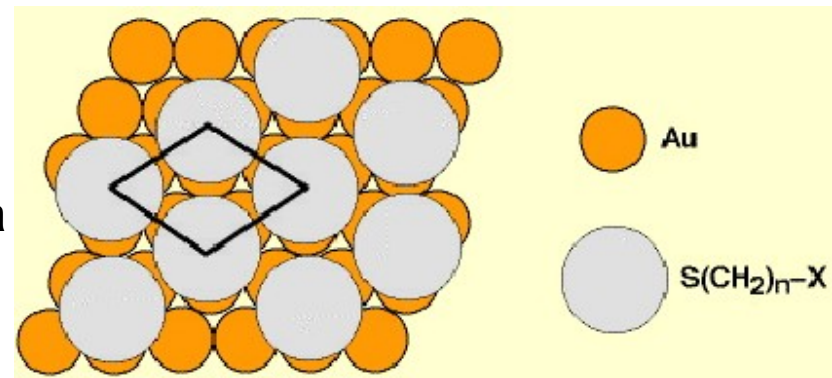


- nejběžnějším příkladem je velmi pevná adsorpce thiosloučenin na povrchu zlata
- vhodnou volbou dalších funkčních skupin thiolu nebo disulfidu lze získat reaktivní skupiny využitelné pro další imobilizační kroky



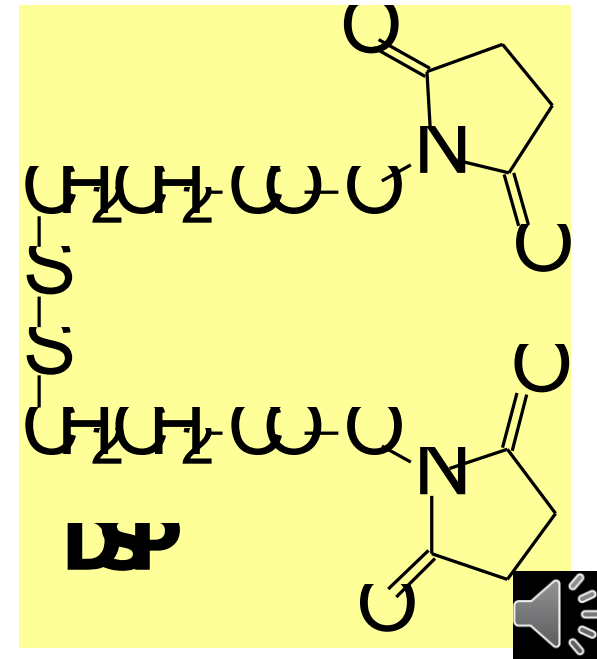
# SAMs

- vždy vzniká monomolekulární vrstva, která může být tak hustá, že povrch je prakticky elektricky izolován
- naopak adsorpce krátkých thioderivátů často zlepšuje elektrochemické odezvy bílkovin a jiných látek (usnadněná výměna elektronů s cyt c)
- hustotu a kompaktnost vrstvy lze určit elektrochemicky
  - na základě signálu vhodné elektroaktivní látky (ferrikyanid)
  - nebo sledovat pokles vodivosti povrchu v průběhu vzniku SAM



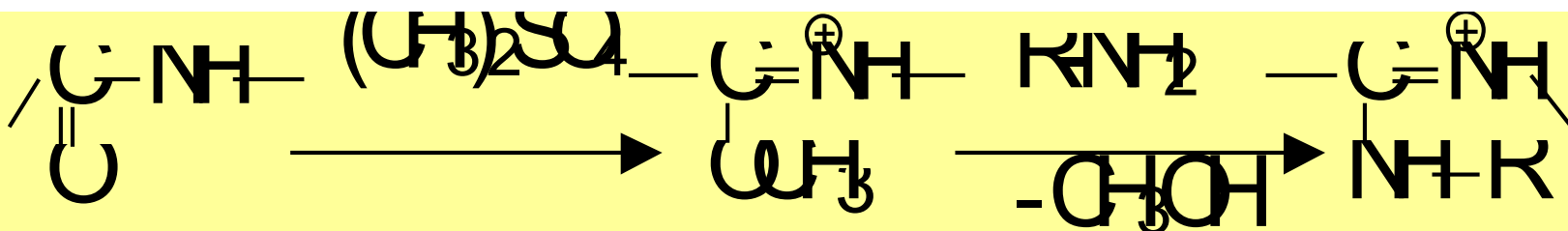
# Thiosloučeny

- nejčastěji se používají thioly obsahující v molekule aminoskupinu (cysteamin, cystamin, thiofenol), hydroxyskupinu (16-merkaptohexadekanol) nebo karboxyskupinu (12-merkaptoundekankarboxylová kyselina)
- bis(N-hydroxysukcinimidester) kyseliny 3,3'-dithiopropionové (DSP) je speciální činidlo, které se váže na zlato
  - N-hydroxysukcinimidová skupina (NHS) je reaktivní a může být vyměněna za volnou postranní aminoskupinu z bílkoviny, přičemž vznikne amidová vazba



# Aktivace polyamidu

- polyamidy se připravují polykondenzačními reakcemi
  - Nylon 66 - z 1,6-diaminohexanu a hexan-1,6-dikarboxylové kyseliny
  - Silon - kondenzací  $\epsilon$  kaprolaktamu
- využívány ve formě membrán, sítěk, kuliček a trubiček pro imobilizaci enzymů
- málo volných koncových skupin - nutné strukturu částečně narušit
  - opatrnou hydrolýzou (3 M HCl, doba závisí na formě materiálu, 10 sec až 1 hod)
  - často se však polyamid mechanicky naruší
- výhodnější aktivační postupy, které amidovou vazbu nepřerušují
  - O-alkylace amidové vazby oxoniovou solí (triethyloxonium  $\text{BF}_4^-$ ) nebo dimethylsulfátem
  - vzniklý imidoester reaguje v slabě alkalickém prostředí s aminoskupinou (lyzin, 1,6-diaminohexan) za vzniku amidinu, kladný náboj zvyšuje polaritu polymeru
- získá se větší povrchová hustota využitelných karboxy nebo aminoskupin



**Aktivace polyamidu dimethylsulfátem**



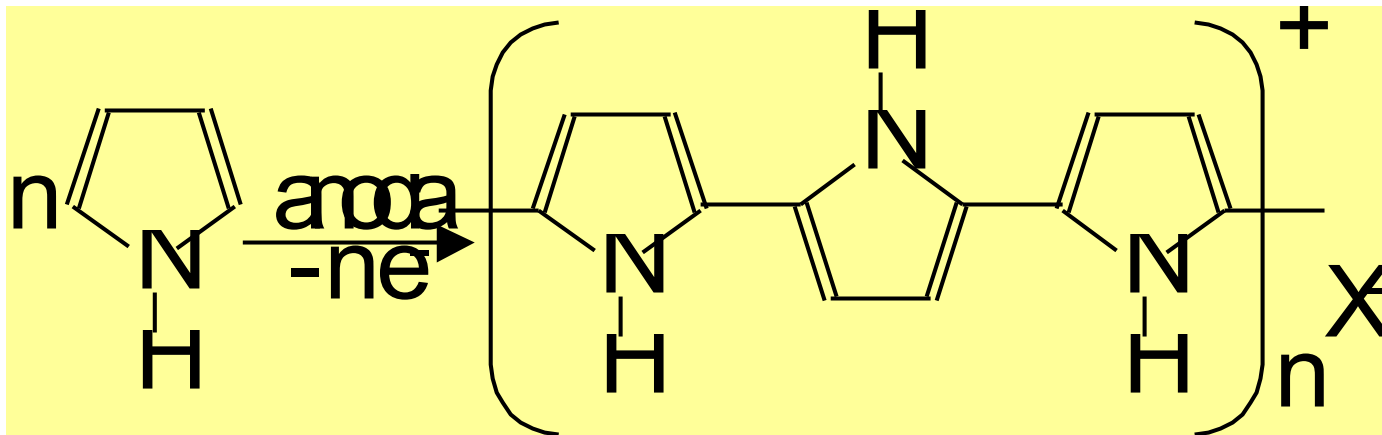
# Elektropolymerace

- využívá elektrochemickou oxidaci k přípravě reaktivních monomerů, ty spontánně vytváří polymerní film na povrchu elektrody
- funguje i na členitém povrchu nebo na povrchu mikroelektrod
- pokud jsou v průběhu elektropolymerace v roztoku přítomné biomolekuly, dochází k jejich zachycení uvnitř vznikající membrány; méně se může uplatnit také kladný náboj polymeru
- vlastnosti membrány je možné ovlivnit přidávkem dalších látek do elektropolymerační směsi
- tloušťku membrány určuje velikost prošlého náboje, tak se dá snadno reprodukovatelně ovlivnit množství imobilizované biomolekuly
- některé elektropolymerární vrstvy mohou být navíc vodivé, což usnadňuje přenos elektronů mezi elektrodou a biomolekulami; tyto polymery jsou obvykle barevné



# Polypyrrol (PPY)

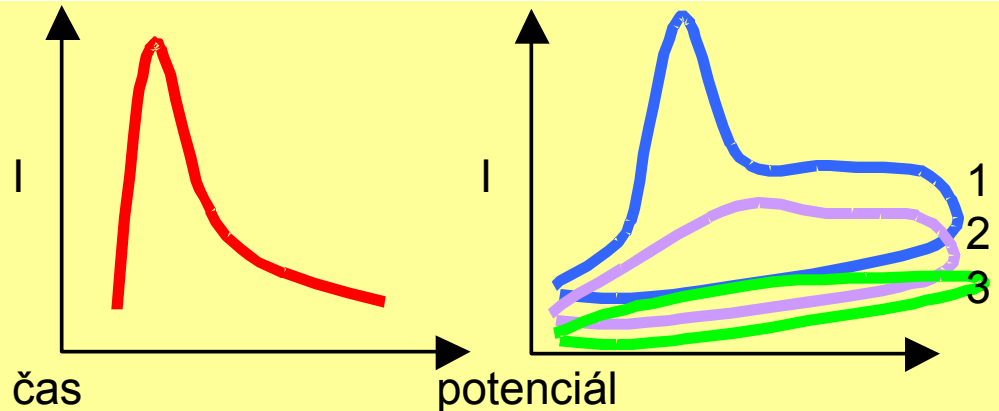
- klasický příklad, provádí se oxidací 50 až 200 mM pyrrolu amperometrickou oxidací při potenciálu kolem 0.8 V, jako elektrolyt se přidává KCl, pracuje se v anaerobním prostředí
- tloušťka filmu je úměrná množství prošlého náboje (5 mC/cm<sup>2</sup> odpovídá 13 nm), lze dosáhnout až 100 nm tlustých vrstev
- vzniklý PPy film je vodivý, vodivost dosahuje asi 500 S/cm
  - pro srovnání jsou vodivosti mědi 10<sup>6</sup>, křemíku 10<sup>-4</sup> a skla 10<sup>-11</sup> S/cm).
- obdobně probíhá elektropolymerace methylpyrrolu





# Polyfenylenoxid (PPO)

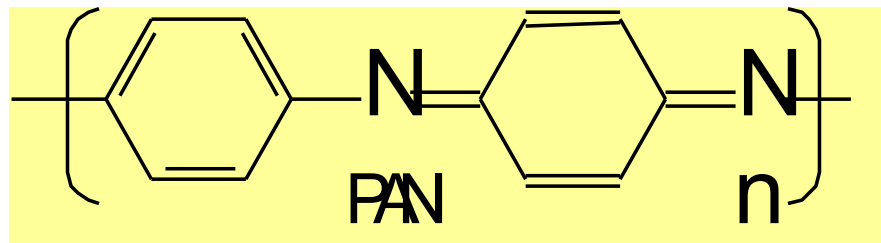
- velmi tenké a mechanicky stabilní filmy PPO na povrchu elektrod vznikají elektropolymerací fenolu
- nevodivé, takže elektropolymerace se samovolně zastaví, jakmile je povrch elektrody elektricky izolován
- průběžně se dá pozorovat pokles oxidačního proudu při vzniku filmu:



## Elektropolymerace fenolu

amperometricky a cyklickou voltametrií

- méně stabilní jsou polyanilinové (PANI) filmy vzniklé z anilinu:



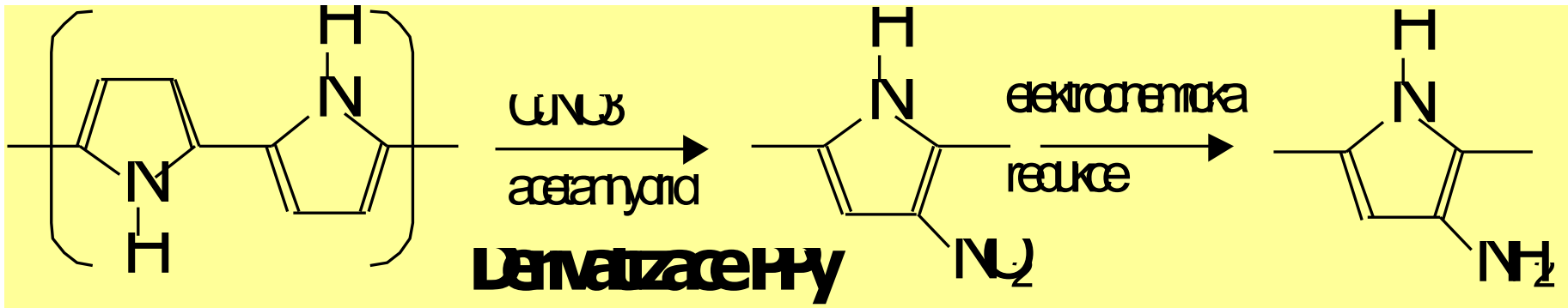
# Kontrolní membrány

- elektropolymerní vrstvy jsou také vhodné pro ovlivňování transportu látek jako kontrolní membrány - [polyfenylendiaminové \(PPD\)](#) filmy z 1,2 diaminobenzenu
- nevodivé o tloušťce kolem 10 nm; snadno přes ně prochází peroxid vodíku, přitom jiné rušivé látky jsou odstíněny
- protože zachycení bílkovin uvnitř polymeru je poměrně volné, dochází časem k uvolnění do roztoku a tím k poklesu aktivity
- jiné postupy proto používají elektropolymerní film jen jako výchozí chemickou modifikaci povrchu elektrody, a film se pak dále upravuje chemickými reakcemi.

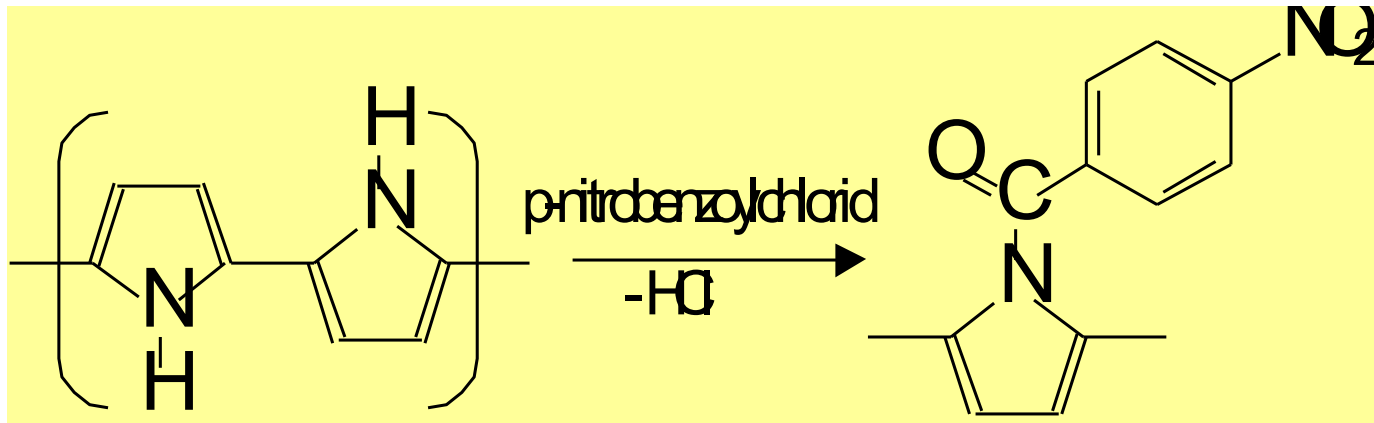


# Modifikace elektropolymerů

- polypyrrol se dá nitrovat v  $\beta$  poloze a elektrochemickou redukcí nitroskupiny se získá aminoskupina vhodná pro další kovalentní vazbu biomolekul:

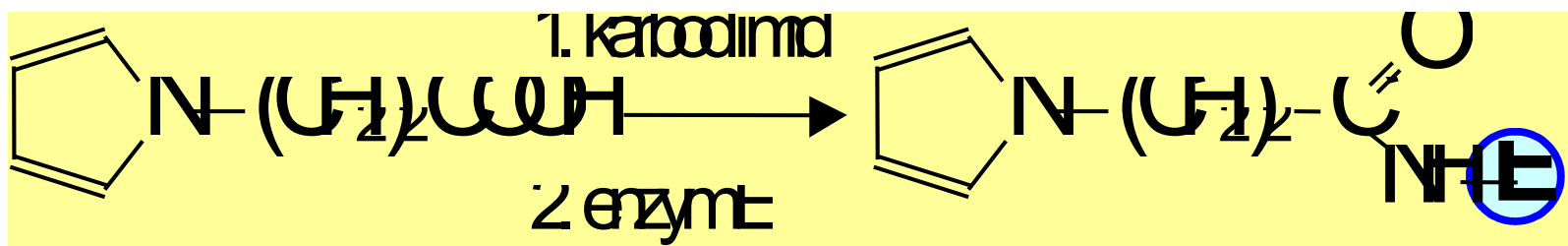


- možností je i reakce PPy s nitrobenzoylchloridem, nitroskupinu je pak možné redukovat také chemicky zinkem v kyselině octové:



# Elektropolymerace bílkovin

- elektropolymerovat se dají také vhodné deriváty biomolekul ve směsi např. s pyrrolem
- k postranním skupinám enzymů je možné připojit pyrrolová jádra, takže po skončení elektropolymerace je enzym nedílnou součástí řetězce polymeru:



- podobně je možné využít i derivát s koncovou aminoskupinou



# Kovalentní vazba biomolekul

- předpokládá se vazba zvolené biomolekuly na výchozí materiál (povrch sensoru, membrána, ...) nesoucí některou z následujících skupin:

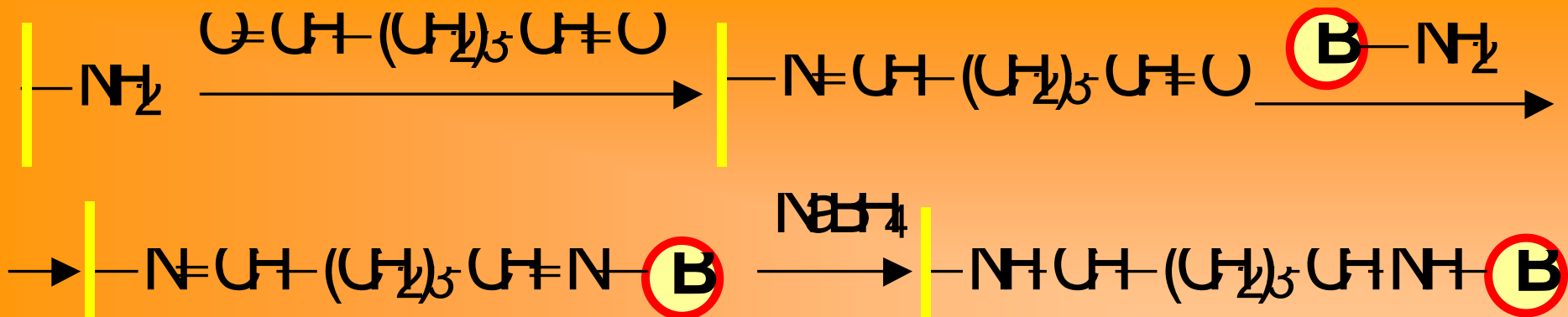
amino karboxyl hydroxyl

- dále jsou popsána vhodná činidla umožňující kovalentní vazbu biomolekul, zejména bílkovin
- následující část je samozřejmě míněna pouze jako neúplný přehled základních postupů
- neustále se objevují nová speciální činidla použitelná obecně nebo pro speciální aplikace; nové reagenty lze nalézt v katalogích firem (Pierce, Merck)



# Imobilizace na aminoskupinu

- nejjednodušší je aktivace aminoskupiny vhodným bifunkčním činidlem, pak reaguje svou druhou reaktivní částí s vhodnou povrchovou skupinou navazované biomolekuly (B)
- používá se **glutaraldehyd**, který je běžně dostupný a dostatečně reaktivní; inkubací (0.5 až 5% vodný roztok, 0.5 až 2 hod) s povrchem se vytvoří Schiffova báze a po promytí pak je druhá volná aldehydová skupina k dispozici pro stejnou reakci s aminoskupinou biomolekuly

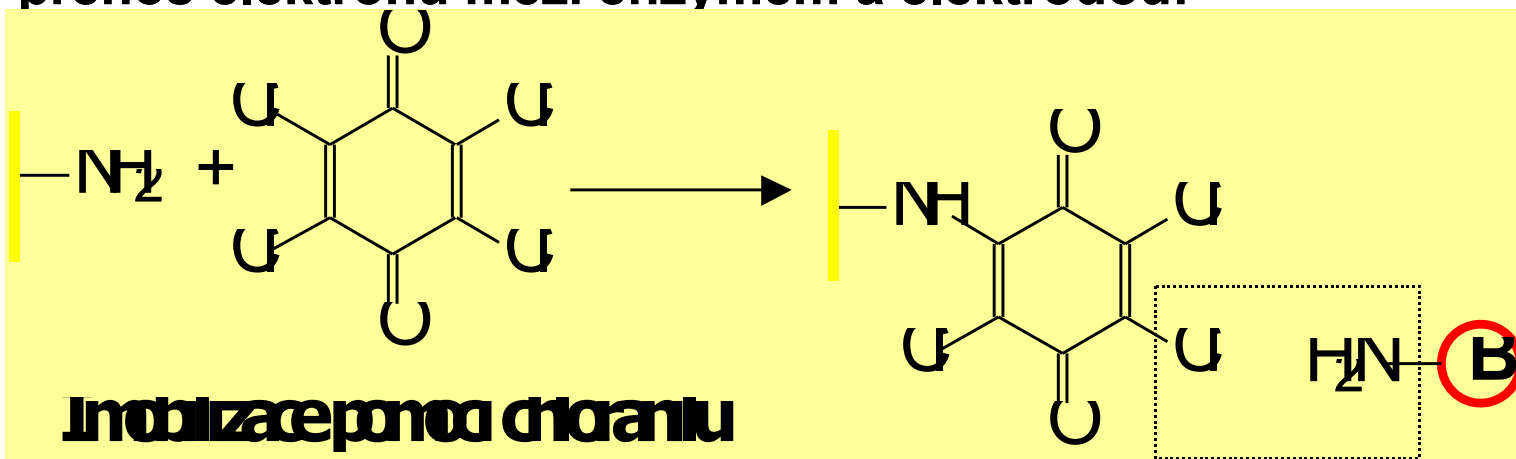


**Imobilizace pomocí glutaraldehydu**

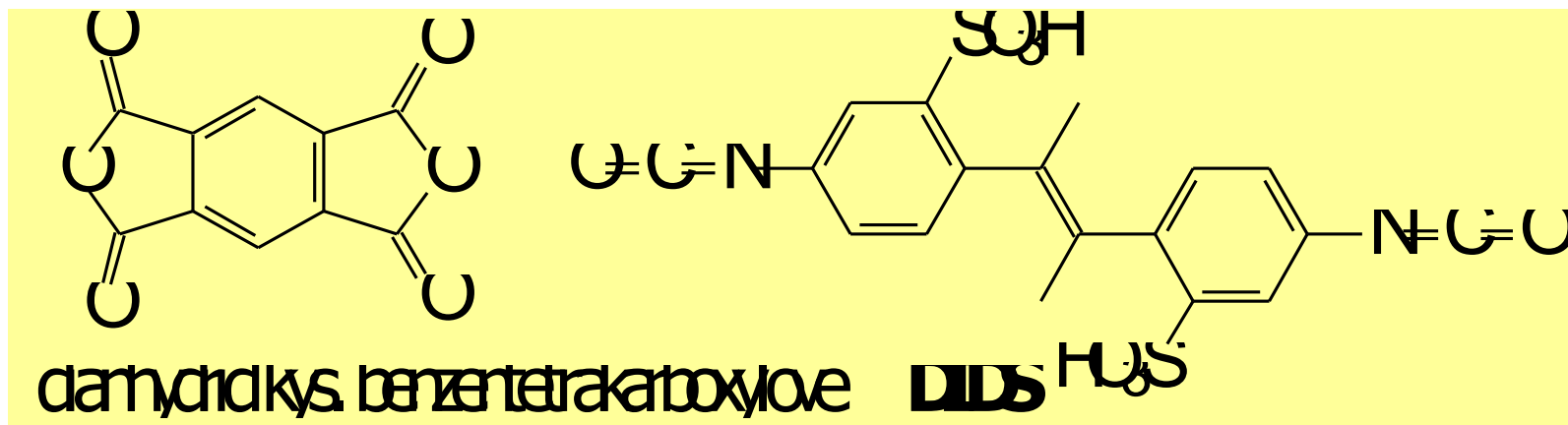


## Další bifunkční činidla pro $-NH_2$

- chloranil (tetrachlor-*p*-benzochinon), který mimo imobilizační funkci obsahuje redoxaktivní chinonové uspořádání využitelné pro přenos elektronů mezi enzymem a elektrodou:

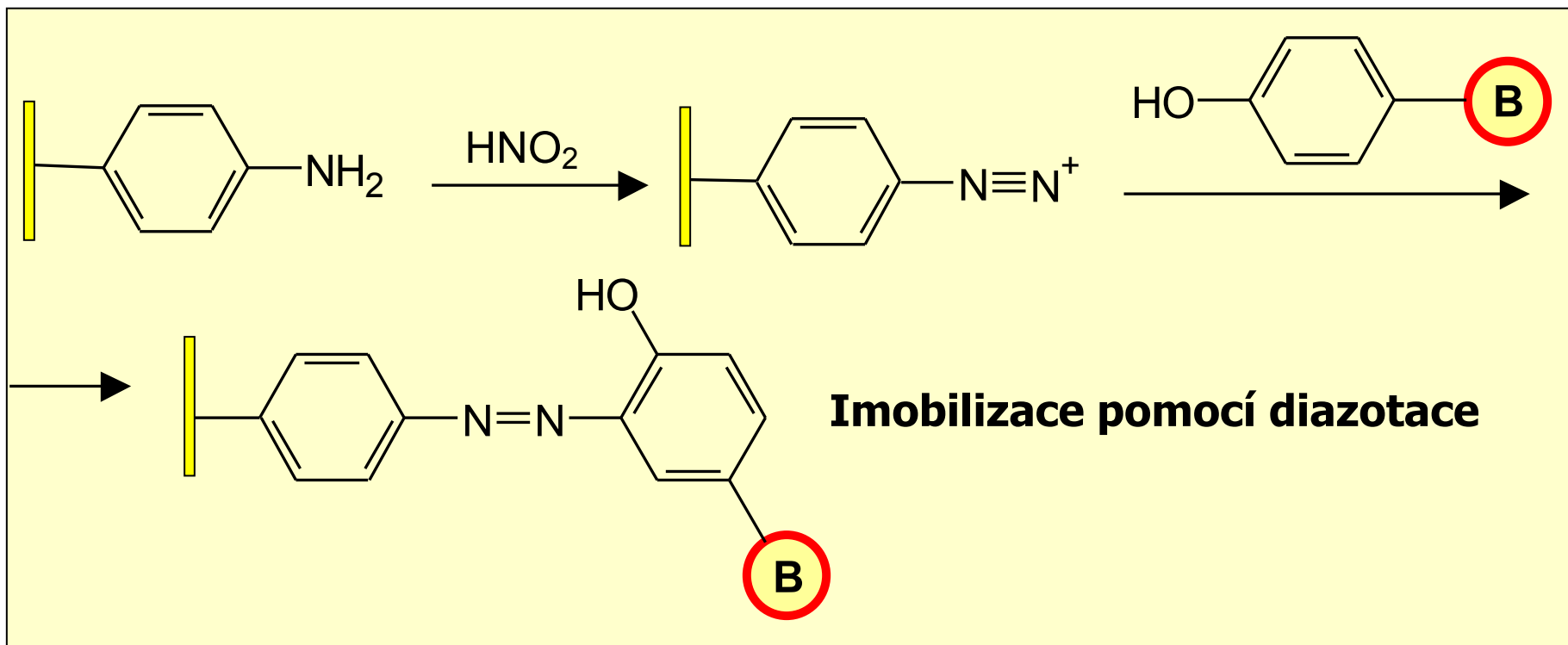


- dianhydrid kyseliny benzentetrakarboxylové nebo DIDS, trans-stilben-(4,4'-diisothiokyanát)-2,2'-disulfonová kyselina:



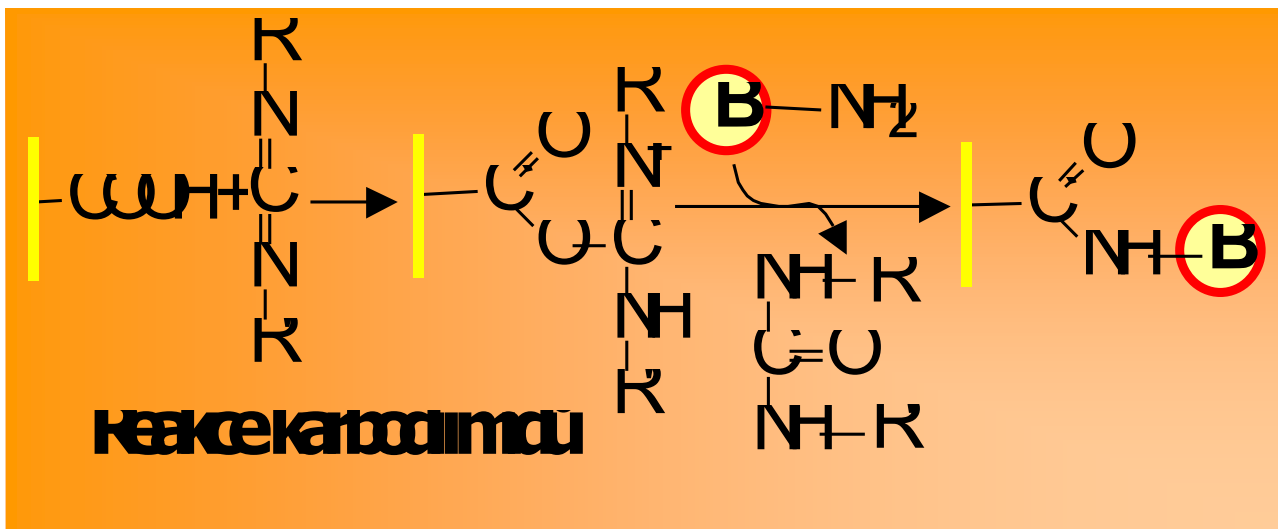
# Aromatická $-NH_2$ skupina

- aromatické aminoskupiny lze velice snadno aktivovat diazotací kyselinou dusitou, biomolekula se naváže přes tyrozinový zbytek:

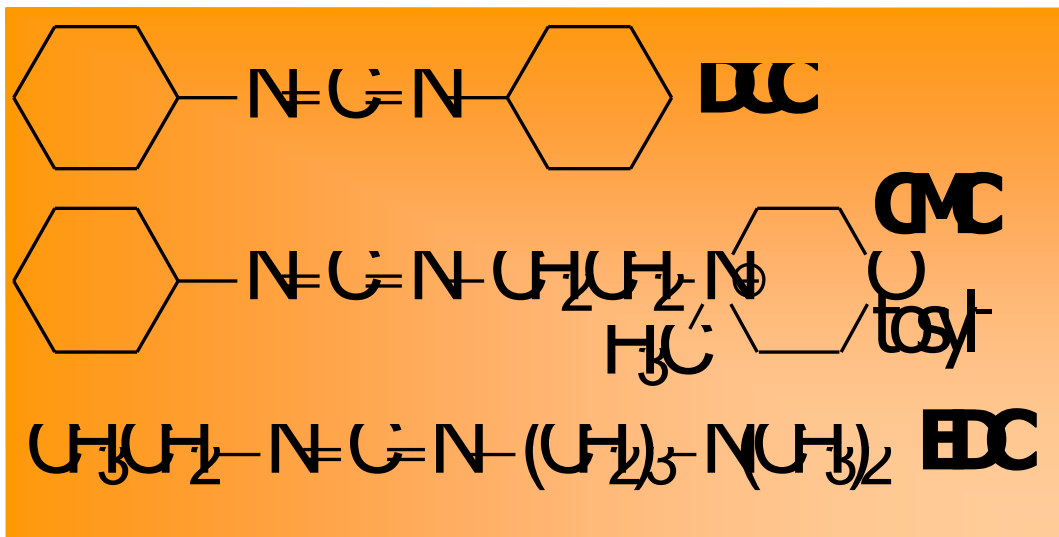




# Imobilizace na karboxyskupinu



- pro aktivaci se užívá reakce s karbodiimidy, které působí vlastně vázání vody při vzniku amidové, esterové či thioesterové vazby

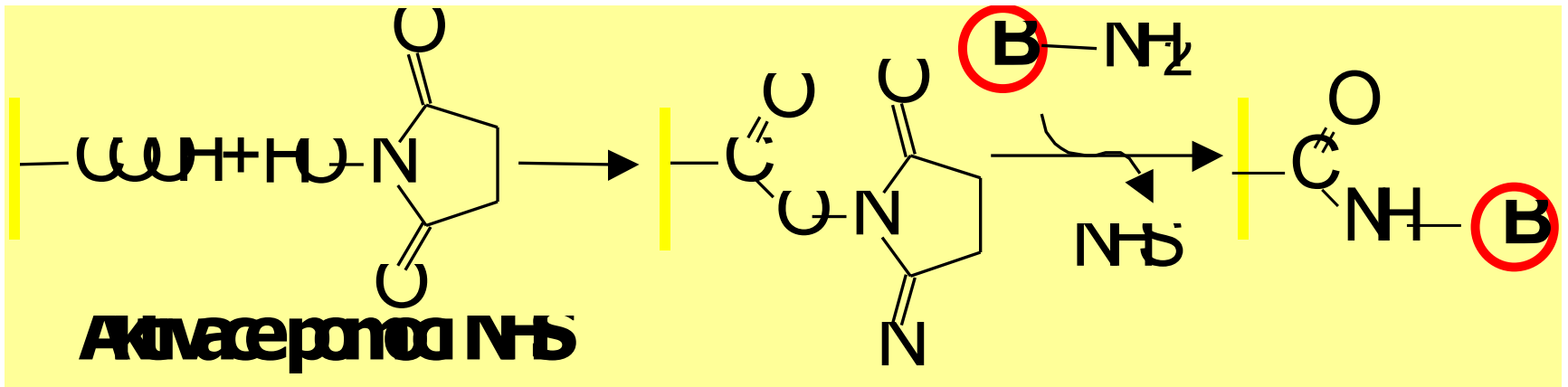


- dicyklohexylkarbodiimid **DCC**, nevýhodou je nerozpustnost ve vodě
- ve vodě rozpustný je **EDC**, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid, a **CMC**, 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)-karbodiimid methoxy-*p*-toluensulfoná



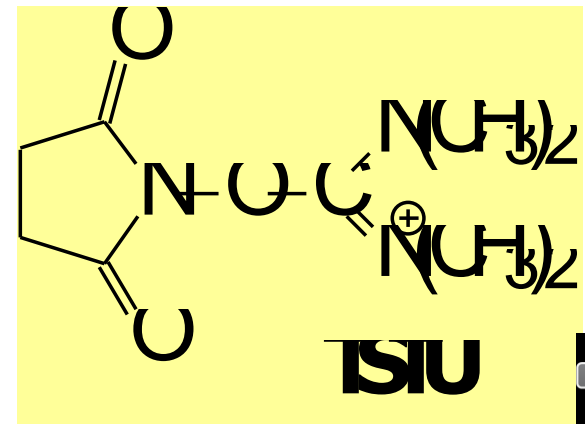
# Vazba přes NHS

- Pro imobilizaci citlivějších bílkovin se neprovádí přímo reakce s CDI, ale pomocí CDI a N-hydroxysukcinimidu (NHS) se připraví reaktivní a stabilní NHS derivát karboxylu
- ten pak reaguje s aminoskupinou např. bílkoviny, proti reakci pouze s CDI je průběh mírnější a nevznikají nežádoucí meziprodukty

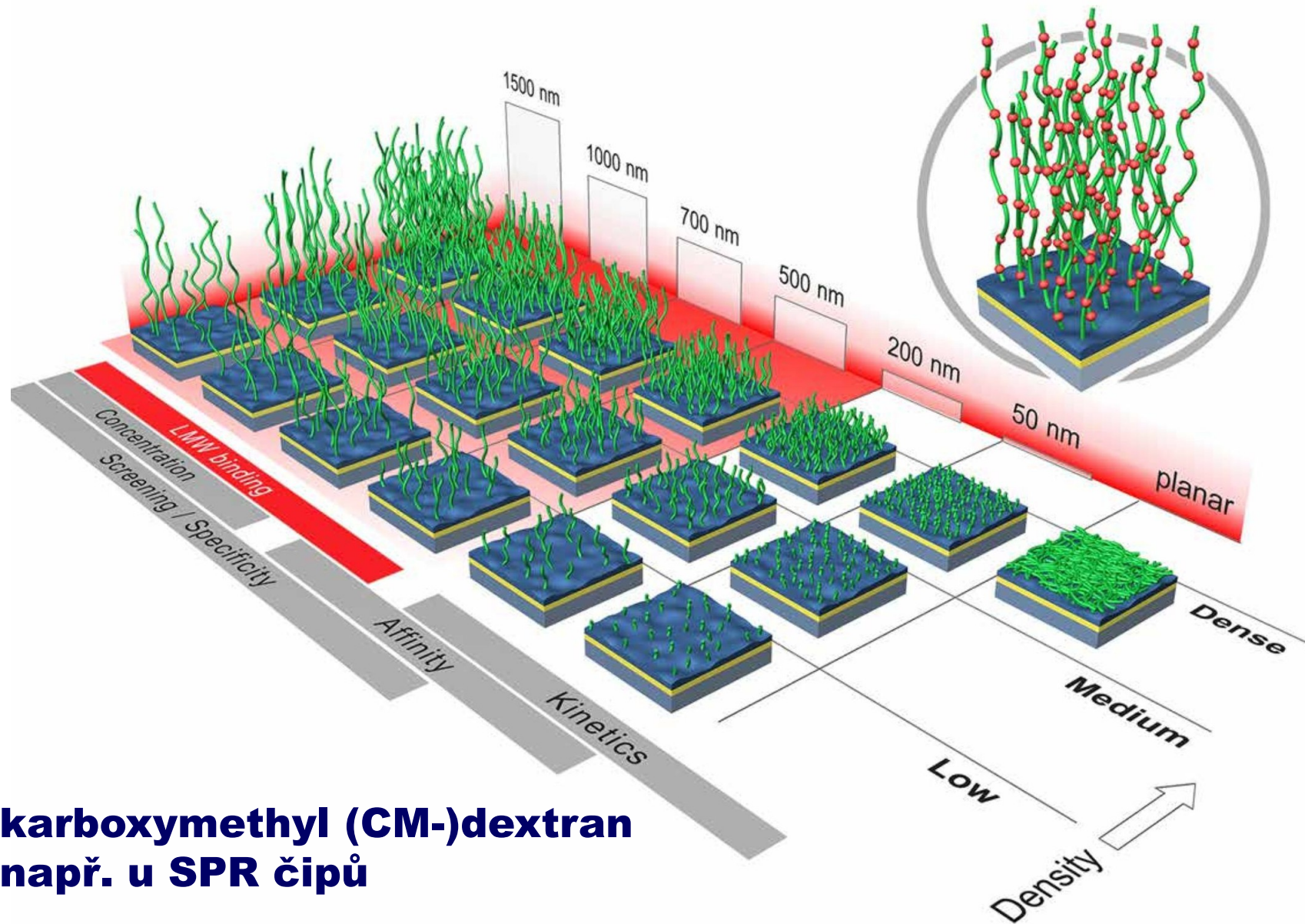


## ■ TSTU

O-(N hydroxy-sukcinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroboritan inkubací (vDMF) s ekvimolárním množstvím karboxylu poskytne NHS derivát přímo



# Sacharidové matrice s -COOH

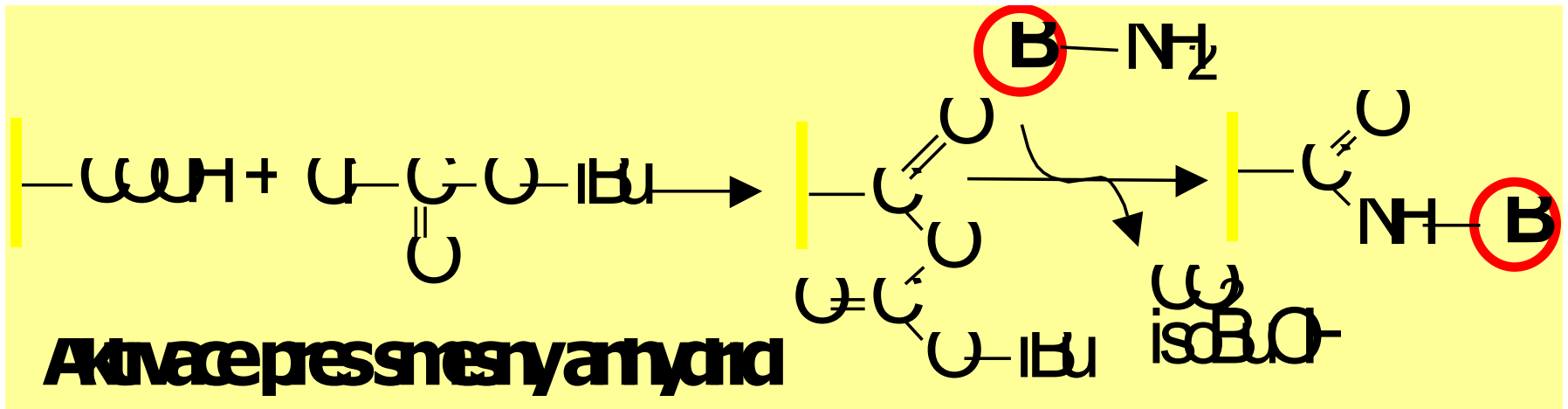


**karboxymethyl (CM-)dextran**  
např. u SPR čipů



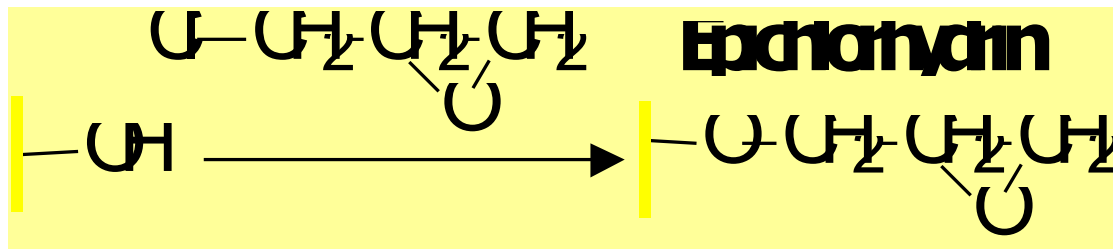
# Metoda směsných anhydridů

- využívá aktivaci pomocí isobutylchloroformiátu, který aktivuje karboxyskupinu na reaktivní anhydrid a ten pak umožňuje vznik amidové vazby:

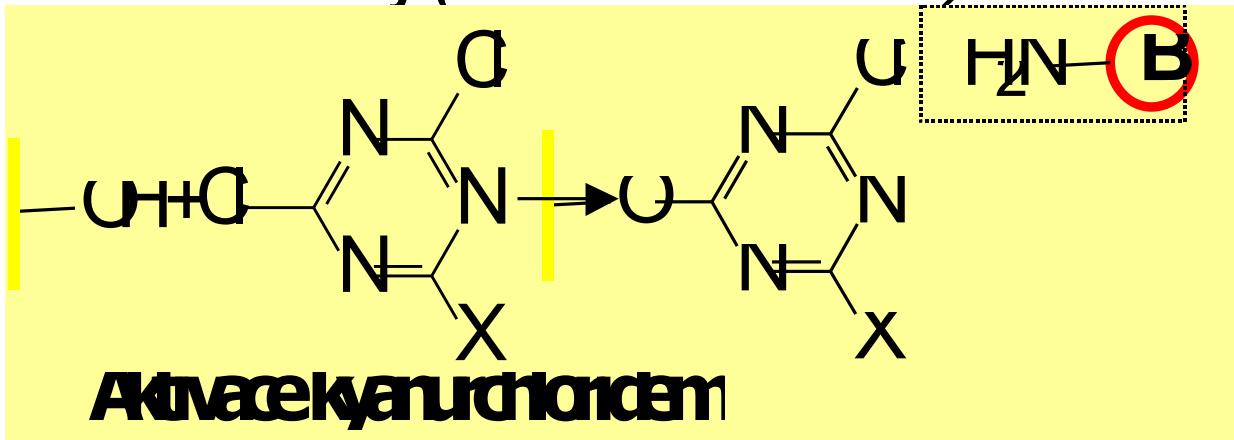


# Aktivace hydroxyskupiny

- pro imobilizace na povrchy modifikované sacharidovou vrstvou (nejčastěji dextran), která dodává hydrofilní vlastnosti zvyšující biokompatibilitu
- epichlorhydrin - na oxiranový cyklus se mohou adovat biomolekuly prostřednictvím amino či hydroxyskupiny:

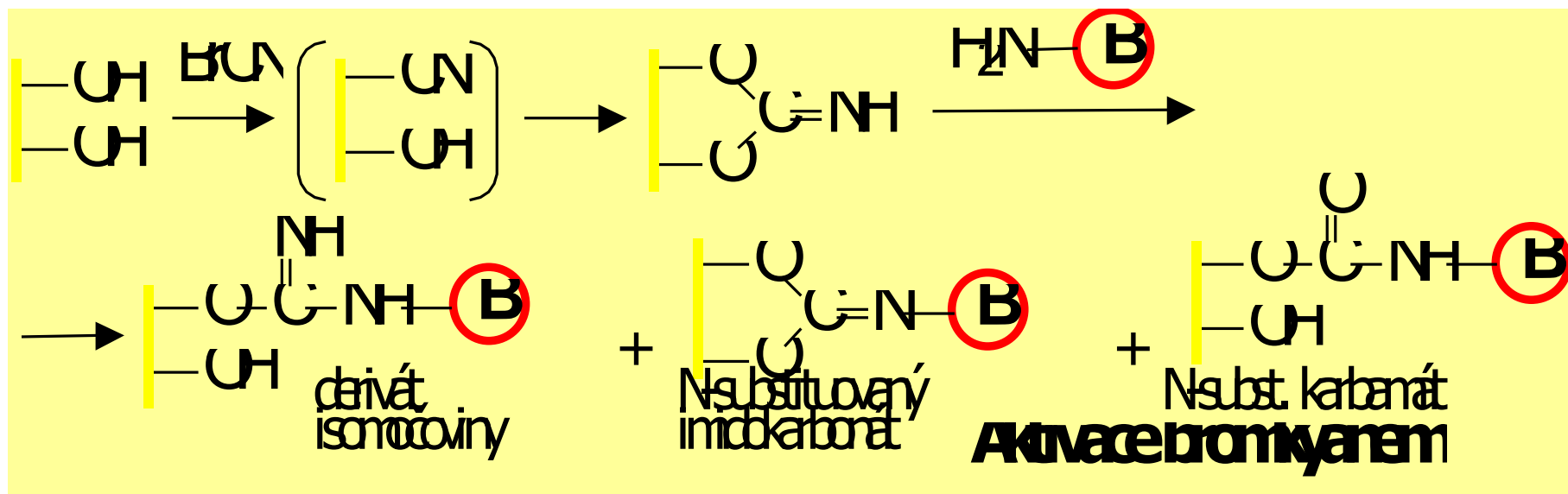


- triazinová metoda využívá kyanurchlorid a zejména jeho méně reaktivní deriváty (X substituent  $\text{O-CH}_2\text{-COOH}$  či  $\text{NH-CH}_2\text{-COOH}$ )



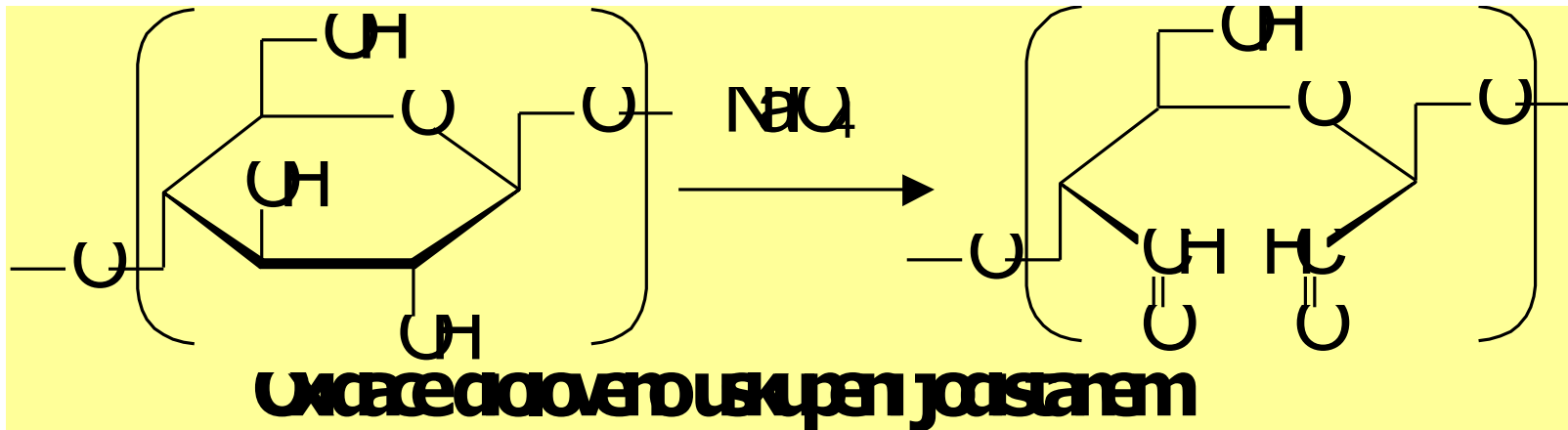
# Bromkyanová metoda

- klasickým činidlem aktivace polysacharidových materiálů je použití bromkyanu, jeho nevýhodou je vysoká jedovatost
- reakce s hydroxyly probíhá v alkalickém prostředí, rozsah aktivace je úměrný koncentraci činidla
- meziproduct imidokarbonát reaguje s aminoskupinou biomolekuly za vzniku různých derivátů:



# Oxidace jodistanem

- sacharidové materiály obsahující diolové uskupení je možné za mírných podmínek oxidovat jodistanem, přitom vzniklé aldehydové skupiny reagují s aminoskupinami biomolekul za vzniku Schiffových bází
- tato reakce je použitelná i pro aktivaci bílkovin nesoucích postranní sacharidové zbytky, ale například také pro RNA



- lze využít i pro aktivaci hydroxyly po připojení glycidolu:



# Amidoskupina

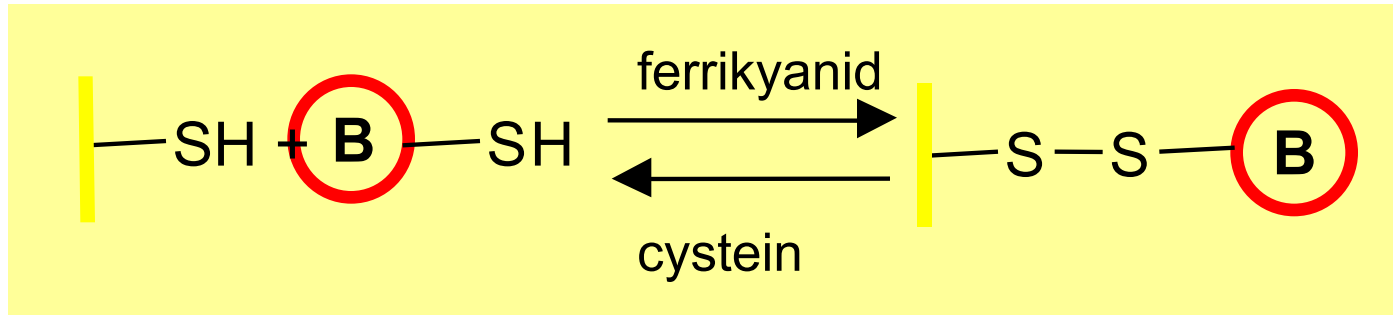
- především v polyakrylamidu
- alkalickou hydrolýzou (zahřívání 60 °C, pH 10.5, NaHCO<sub>3</sub> a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) lze převést na karboxylovou skupinu
- hydrazinolýza vedoucí k hydrazidu kyseliny, který se kyselinou dusitou převede na reaktivní azid kyseliny
- zahřívání polyakrylamidu v bezvodém ethylendiaminu povede k substituci a získá se koncová aminoskupina





# Thioskupina

- umožňuje reverzibilní imobilizaci bílkovin s volnými cysteinovými zbytky, vazba vznikne oxidací a přeruší se redukcí:



# Imobilizace přes afinitní komplexy

- nevzniká kovalentní vazba, ale navázání cílové biomolekuly se děje prostřednictvím velmi pevné nebo jinak výhodné afinitní interakce:
- biotin – avidin (streptavidin)
- protein A (G, L) - molekula imunoglobulinu
- boronátové komplexy
- metaloafinitní komplexy s histidinovými zbytky



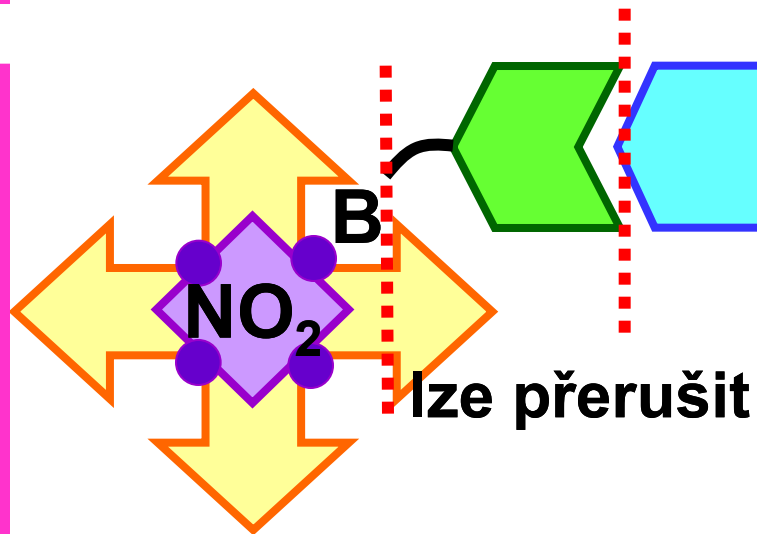
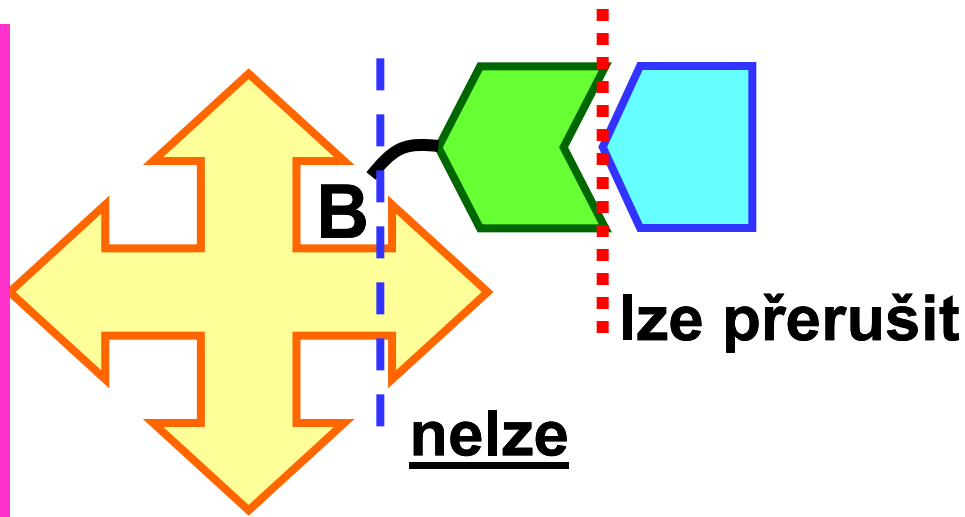
# Biotin / Avidin

## D-biotin

- velmi pevná interakce,  $K_D = 1.3 \times 10^{-15} \text{ M}$
- odolnost komplexu - stabilní v 8 M guanidinu při pH 5, disociuje až při pH sníženém na 1.5
- avidin - tetramer (4 x 16.4 kDa), každá podjednotka má vazebné místo pro biotin, glykoprotein, pI 10, izoluje se z vaječného bílku
- streptavidin - obdobná struktura (tetramer 4 x 15 kDa), strukturně odlišný od avidinu, pI 5-6 - menší celkový náboj - méně nespecifických interakcí, ze *Streptomyces avidinii*
- široce používáno pro přípravu konjugátů, značení a imobilizace



# Reverzibilita komplexu



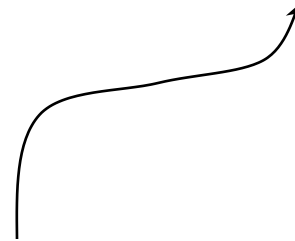
- interakce mezi biotinem a avidinem za normálních podmínek nelze přerušit
- imobilizace různých biotinylovaných biomolekul na avidinovaný povrch
- nitroavidin – připraví se nitrací tyrosinových zbytků v avidinu (volný nebo imobilizovaný) pomocí tetranitromethanu
- interakci mezi biotinem a nitroavidinem lze narušit nadbytkem biotinu nebo při pH 10



# Biotinylace - lysin, ev. jiné -NH<sub>2</sub>

**NHS-biotin**

**NHS**



- alternativně lépe rozpustný

**Sulfo-NHS-biotin:**

nebo s delším spacerem:

**NHS-LC-biotin:**  
(i sulfo varianta)

1.35 nm

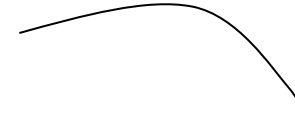
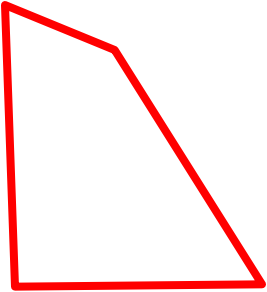
x

2.24 nm



# Biotinylace -SH

maleimido-propionylbiocytin



...

N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid

biotin-HPDP



...



# Biotinylace sacharidů

**biocytin-hydrazid**

**po oxidaci jodistanem  
na aldehyd**



**s CDI účinkuje i na  
Asp a Glu**



# Biotinylace Tyr, His

**diazobenzoyl-biotin**





# Fotobiotin

**N-(4-azido-2-nitrofenyl)-aminopropyl-  
-N'-(N-D-biotinyl-3-aminopropyl)-N'-  
-methyl-1,3-propandiamin**



# Boronátové komplexy

- kyselina boritá je schopna vytvářet komplexy se sloučeninami obsahujícími diolové uskupení – sacharidy, glykoproteiny
- možnost využití pro reversibilní immobilizaci biomolekul pomocí kyseliny *m*-aminofenylborité (APBA):
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- nejznámější je možnost měření hladiny glykosylovaného hemoglobinu



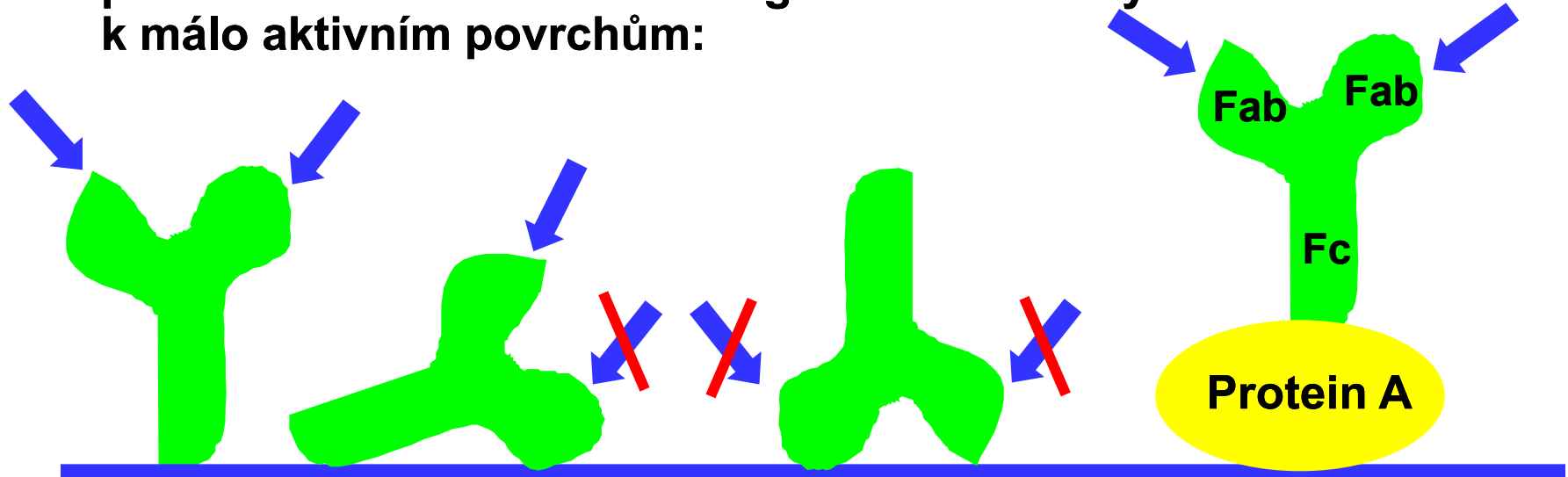
# Boronátové komplexy (Versalinx)

- velmi silnou komplexaci mezi kyselinou fenyloboritou (PBA) a salicylhydroxamovou (SHA) využívá firma Prolinx pro generický způsob imobilizace biomolekul či tvorbu biokonjugátů:
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- SHA je obvykle kovalentně navázána na povrch sensoru a PBA (nebo diboritá varianta PDBA) je dostupná v preaktivované formě pro modifikaci biomolekul:



# Imobilizace IgG

- přímá kovalentní imobilizace IgG můž vést díky nevhodné orientaci k málo aktivním povrchům:



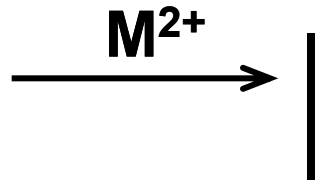
- end-on
- side-on
- top-on
- orientovaně

- Protein A – izolován z buněčné stěny Stafylokoka,  $M_r = 42$  kDa má silnou afinitu k Fc části imunoglobulinů (do jisté míry závisí na původu Ig) – 4 vazebná místa pro Fc
- orientovaná imobilizace IgG zvyšuje vazebnou kapacitu povrchu
- podobně fungují i protein G a protein L

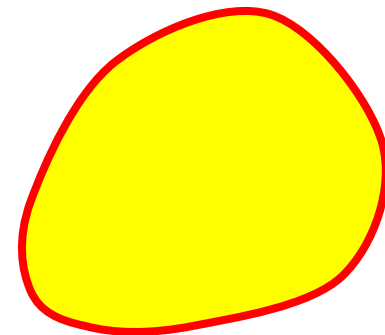
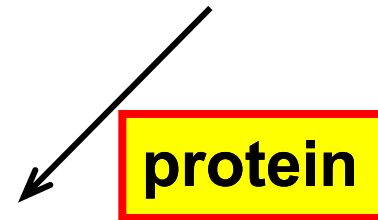


# Metaloafinitní interakce

- komplexotvorná reakce nitrilotrioctové kyseliny (NTA) s vhodným iontem kovu ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) a imidazolovým kruhem histidinových zbytků



- lysin-NTA



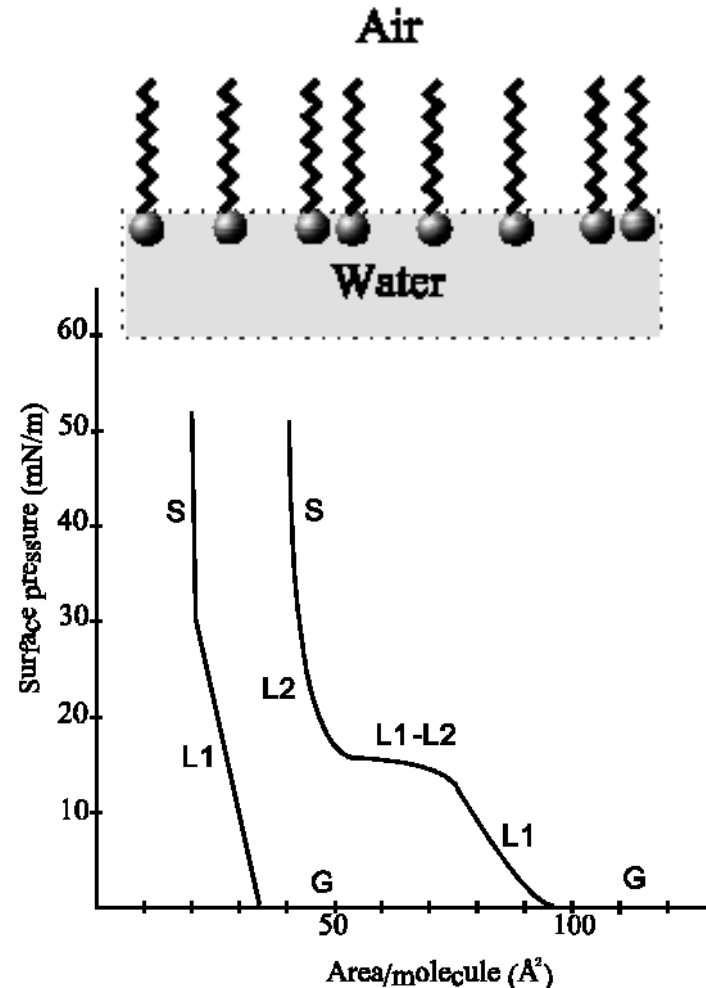
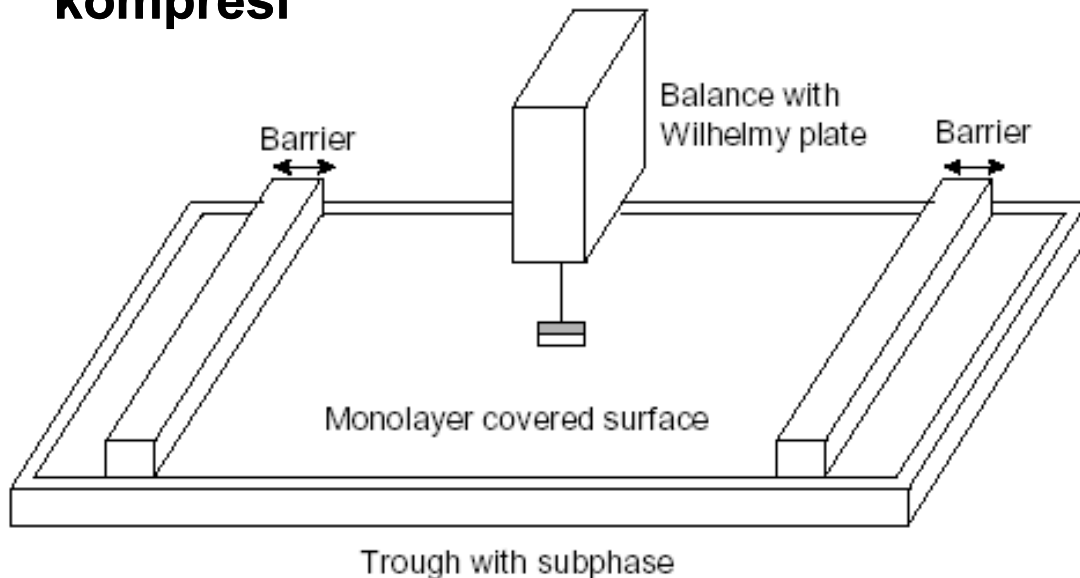
# Metaloafinitní interakce

- rekombinantní proteiny – na N nebo C konci nesou velmi často několik (5-6) histidinových zbytků – „oligohistidine tag“
- využití při purifikaci a při imobilizaci na povrch sensorů
- snadná obměna ligandů - komplex se rozruší EDTA nebo imidazolem
- „přidání“ povrchových His skupin k bílkovinám – např. oxidace sacharidových zbytků jodistanem a pak navázání His, stabilizace Schiffových basí redukcí



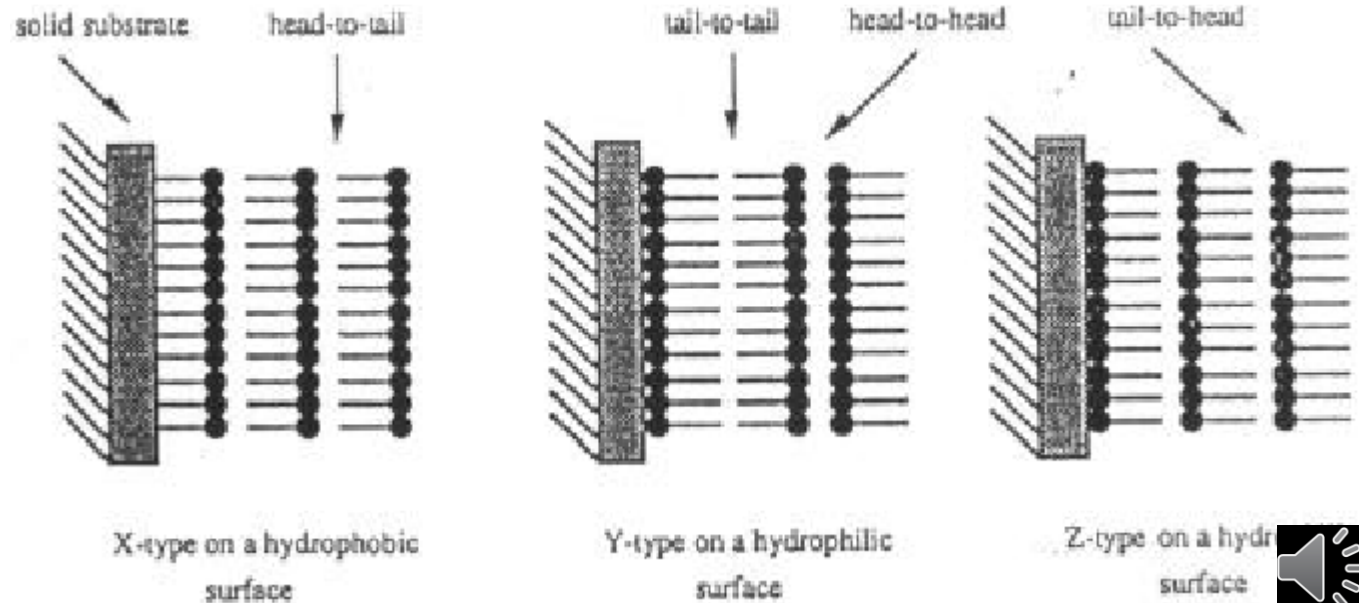
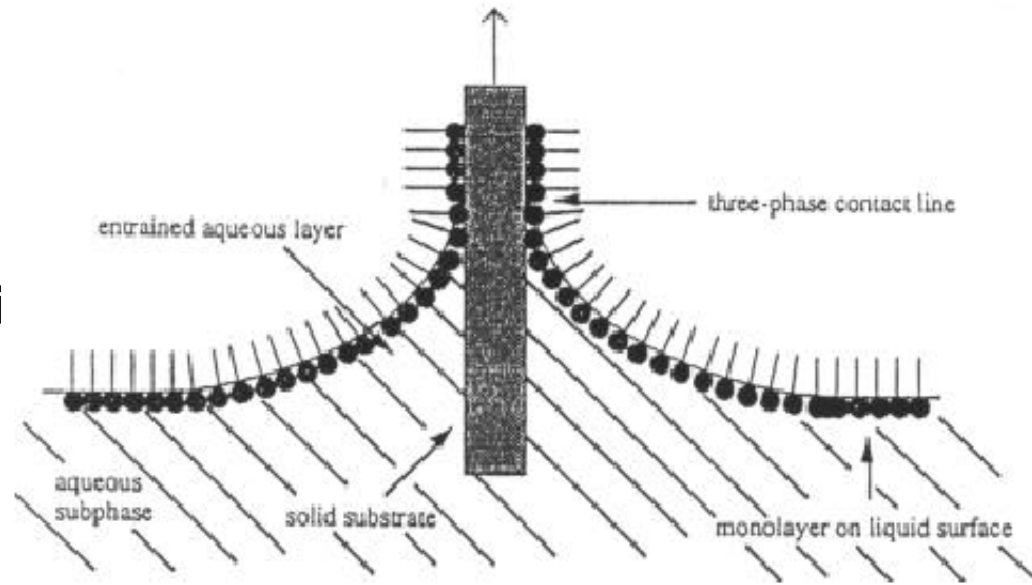
# Langmuir-Blodgett technika

- amfifilní molekuly (surfaktanty, fosfolipidy) utváří orientovanou monovrstvu na rozhraní vody a vzduchu (Langmuirův film)
- uhlíkatý řetězec  $(CH_2)_n$ 
  - pro  $n \ll 12$  vznikají micely
  - pro  $n \gg 12$  vznikají krystaly
- struktura filmu se ovlivní kompresí



# Přenos LB filmů

- typ LB filmu určují:
- složení subfáze, teplot
- povrchové napětí při depozici
- rychlost depozice
- typ povrchu, doba inkubace ve vzduchu a v subfázi
- způsob nanášení:
  - up (vynořování)
  - down (ponořování)





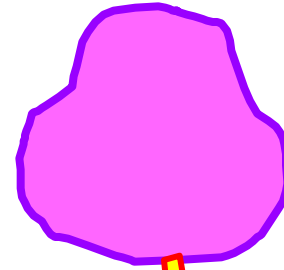
# LB filmy

- lze použít prakticky pro jakýkoliv typ pevného substrátu
- přesná kontrola tloušťky nanášené vrstvy
- homogenní struktura i pro rozměrné plochy
- možnost vytvářet multivrstevné struktury s různými typy jednotlivých vrstev
- typická aplikace – lipidové dvojvrstvy

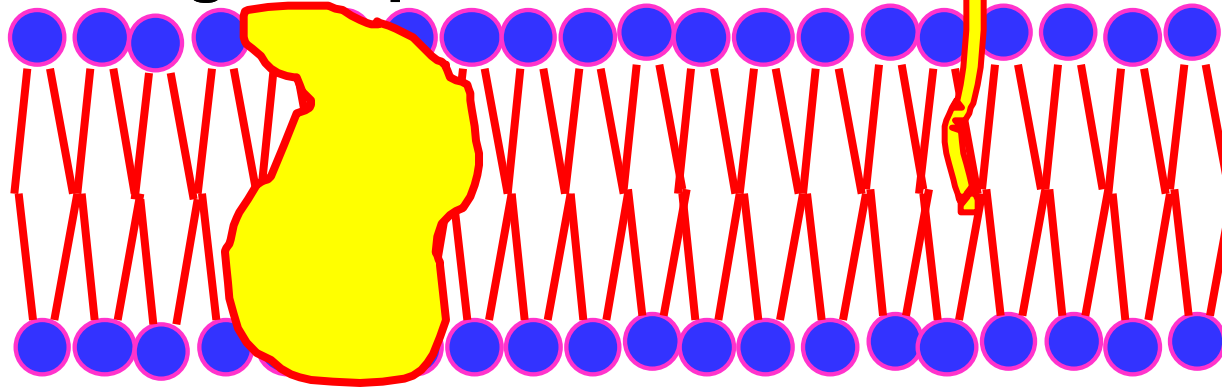


# Lipidové membrány (BLM)

hydrofilní protein  
zakotvený přes  
hydrofobní část



integrální protein



lipidová  
dvojvrstva

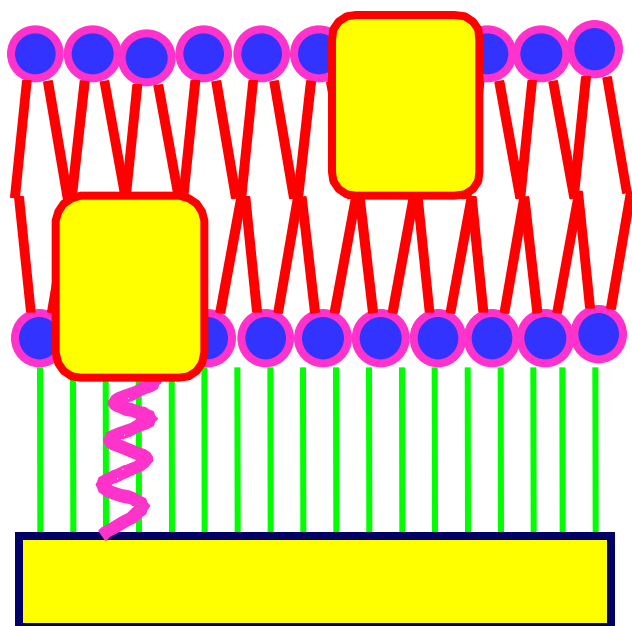
amfifilní  
molekuly

struktura biomembrány

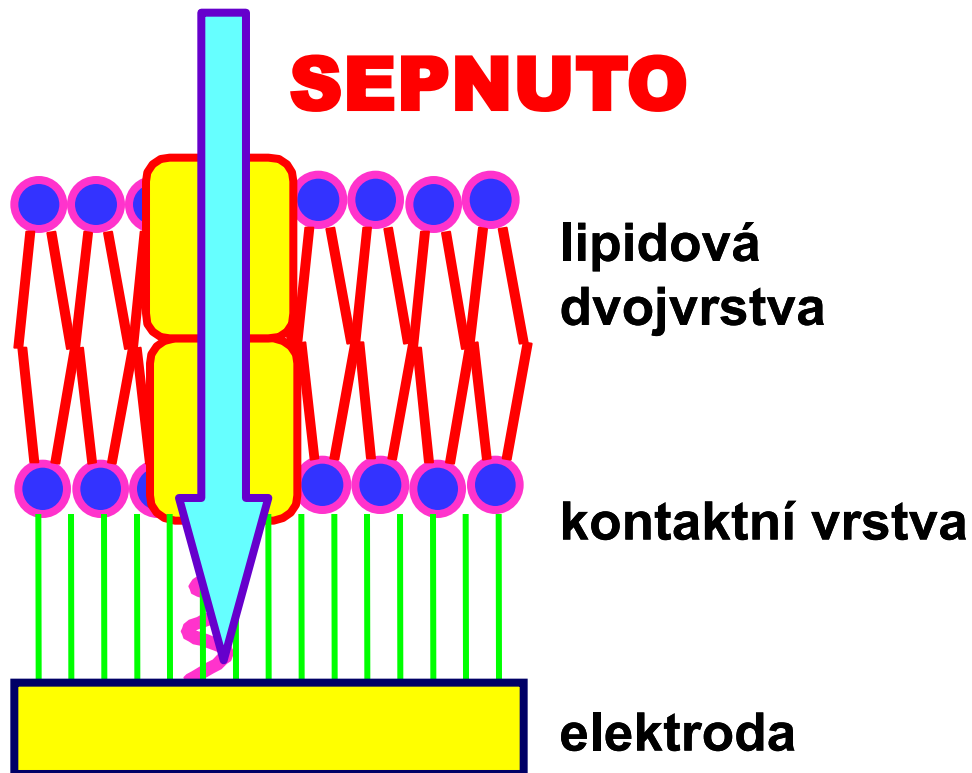


# Biochemický spínač

**VYPNUTO**



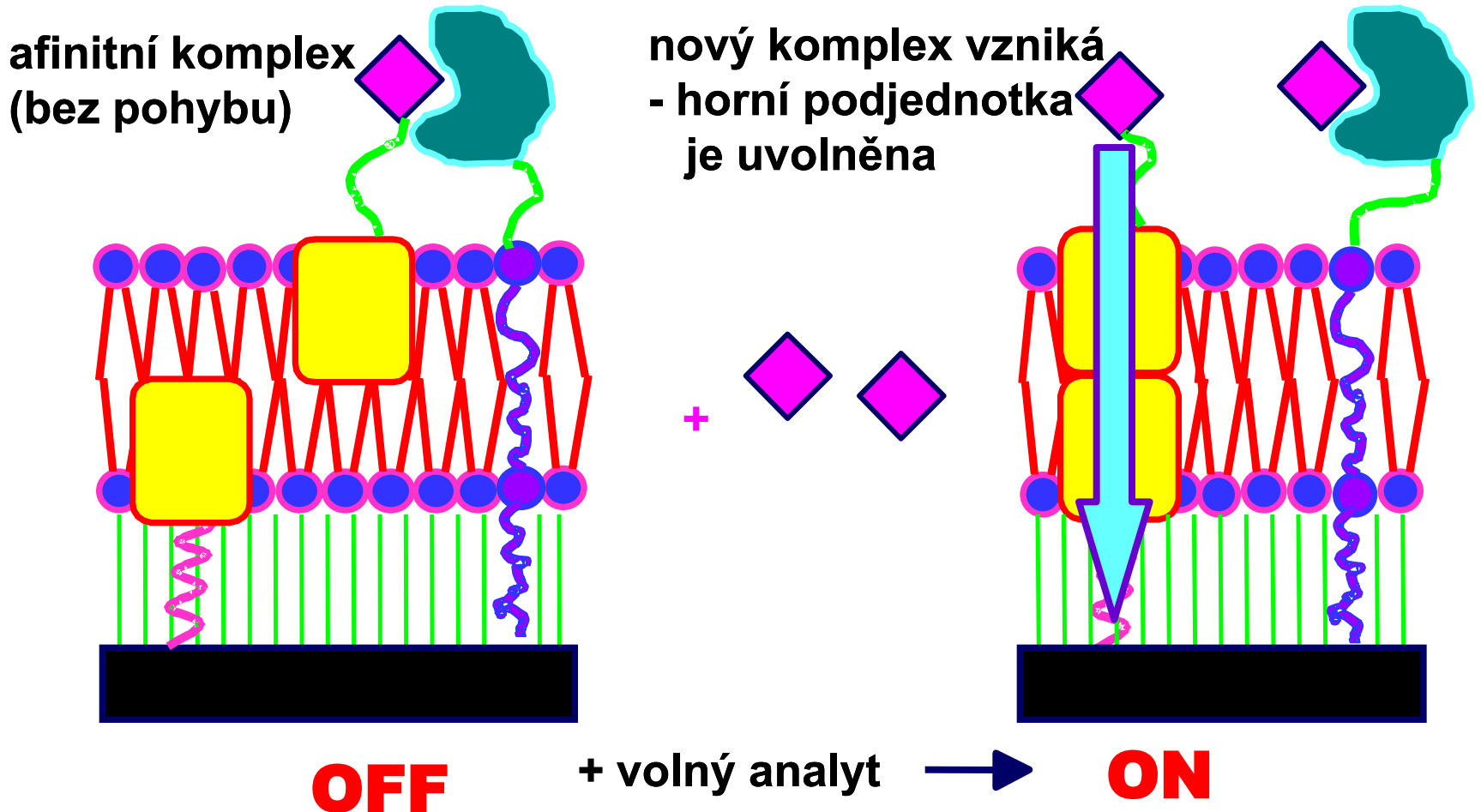
**SEPNUTO**



**Princip: volná disociace podjednotek gramicidinu v lipidové dvojvrstvě umožňuje jejich asociaci, vedoucí k funkčnímu iontovému kanálku**



# Afinitní převodník



Příklad kompetitivního stanovení  
na bázi biochemického spínače

