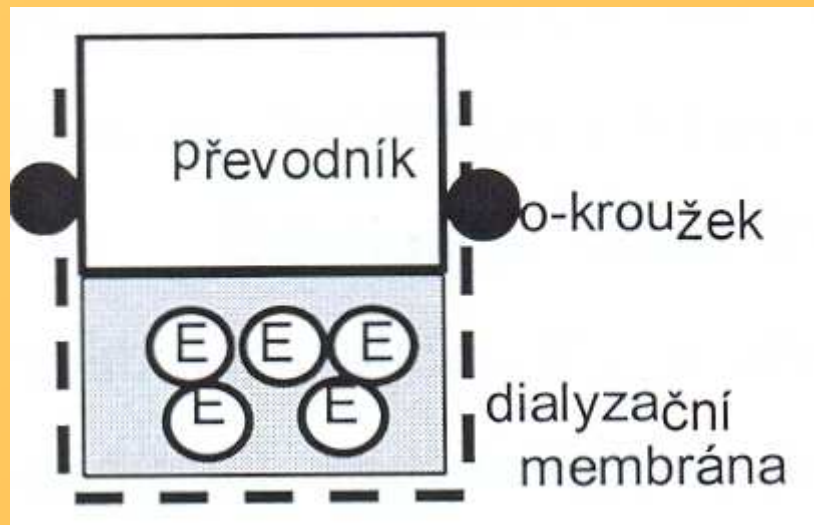


# **IMOBILIZACE BIOMOLEKUL**

## **Způsoby imobilizace biomolekul:**

- ✓ **mechanická imobilizace**
- ✓ **zachycení v gelu nebo polymeru**
- ✓ **zesíťování biomolekul**
- ✓ **kovalentní imobilizace**
- ✓ **elektropolymerace**

## Mechanická imobilizace



**Roztok biokomponenty se kápne na povrch převodníku a překryje se dialyzační membránou, která zadržuje biomakromolekuly, ale nebrání pohybu analytu.**

**Dialyzační membrány:**

celulosa  
acetylcelulosa  
polykarbonáty  
celofán

**limit propustnosti kolem 10 kDa**

**Zachycené biomolekuly musí být ve vhodném pufru, někdy se přidává kolečko filtračního papíru nebo skelný papír, které zároveň definují tloušťku výsledné biovrstvy.**

### **Nevýhody takto připraveného sensoru:**

- ❖ **nelze jej rozebírat**
- ❖ **musí se uchovávat ve vhodném prostředí (pufr)**
- ❖ **stabilita je určována vlastnostmi biomolekuly (pohybuje se v řádů hodin až měsíců)**

### **Výhodné:**

**pro tkáňové řezy: zachycení polyamidovou sít'kou celofánem  
mikrobiální buňky ve formě pasty**

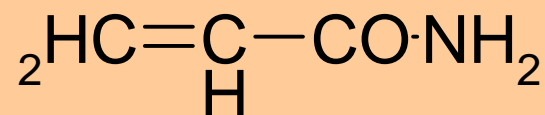
## Adsorpce biomolekul

- ✓ spojení s povrchem grafitu.
- ✓ reverzibilní proces využívající řadu interakcí:
  - hydrofóbní interakce
  - iontové síly
  - vodíkové můstky
- ✓ výrazně závisí na podmínkách (pH, iontová síla, teplota)

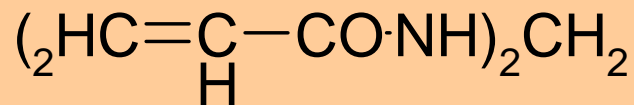
## Zachycení v gelu nebo polymeru

Inkluse biomolekuly uvnitř struktury membrány

Metoda s polyakrylamidem (PAGE)

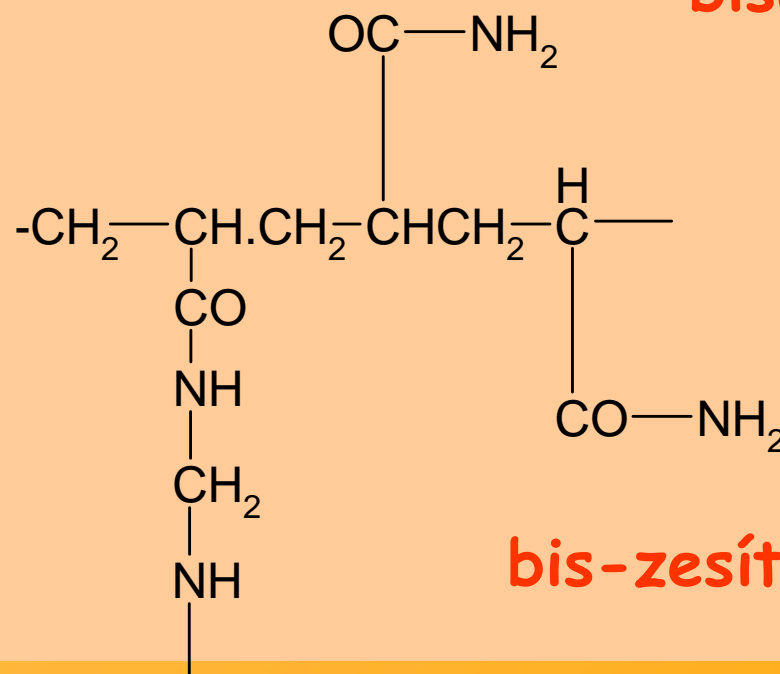


akrylamid



bis(akrylamid)

Vznik PAGE



bis-zesíťování

## PAGE polymer

- ❖ vysoký obsah vody (80 až 95%),
- ❖ horší mechanické vlastnosti biomembrány
- ❖ lze ovlivnit porozitu (poměrem obou komponent)

Biovrstvy nejsou zvláště stabilní, časem dochází k uvolnění biomolekul.

PAGE je možné využít pro kovalentní imobilizaci molekul,  
aktivace pomocí hydrazinu  
(6M, 8 hod inkubace při 45°C),  
následný přídavek kyseliny  
dušité vede k reaktivnímu azidu kyseliny.

## Želatina

velmi často se přidává do enzymových membrán

### Postup:

- želatina (5% roztok) se nechá nabobtnat, zahřeje se téměř k varu, nechá se vychladnout na teplotu 40-50°C
- přidá se enzym a nalije se na vodorovnou podložku (kolem 25 ml na 1 cm<sup>2</sup>).
- po vyschnutí (4°C 12 hodin) se výsledná enzymová plocha přiloží na aktivní plochu sensoru a zachytí se dialyzační membránou.

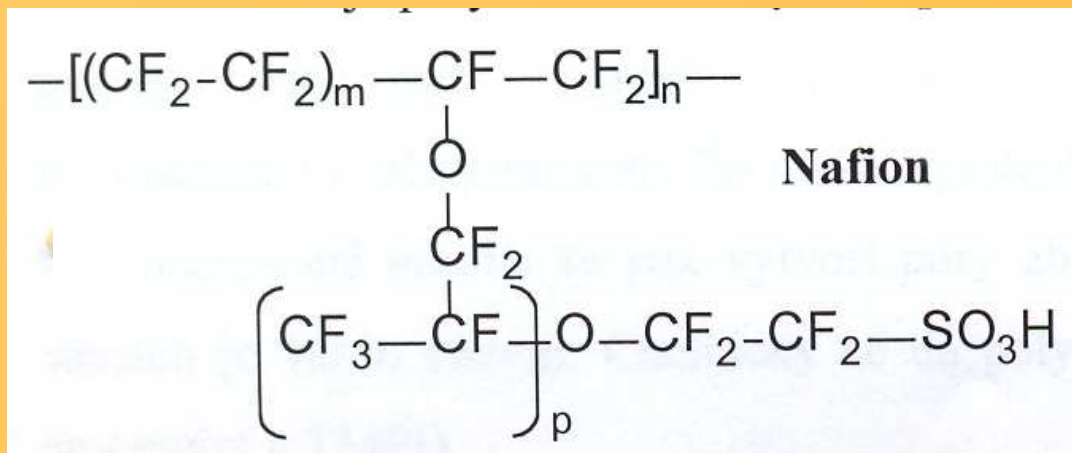
### Doporučení některých autorů:

dodatečně vytvrdit želatinu přídatkem 1 mM síranu chromitého, který zesílí uje karboxylové skupiny želatiny.



## Nafion

je polymer dodávaný v rozpuštěném stavu  
ve směsi alkoholů s vodou.

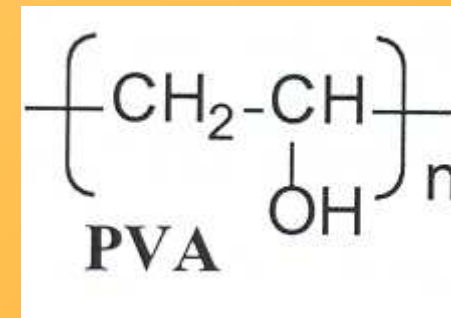


funguje jako iontoměnič  
akumuluje kationty a  
odpuzuje anionty  
(brání interferenci  
askorbátu a urátu)

### přímá imobilizace enzymů

Směs enzymů s Nafionem se kápne na povrch  
sensoru a nechá vyschnout.

## Polyvinylalkohol (PVA)



hydrofilní, neutrální a biokompatibilní polymer, ve vodě silně bobtná.

Připravuje se hydrolýzou polyvinylacetátu ve formě krátkých oligomerů (asi 90 kDa), které po zesíťování vytvoří konečný polymer.

Pro zahájení polymerace existuje několik postupů:

- ❖ radiační polymerace
- ❖ 5% allylmethakrylát
- ❖ triisokyanáty (TIC)
- ❖ přidat styrylbipyridiniové skupiny (PVA-SbQ) + UV

## radiační polymerace

využívá ozáření směsi oligomerů

a enzymu  $\gamma$  zářením

(generuje  $^{60}\text{Co}$ , potřebná dávka 3 až 5 Mrad)

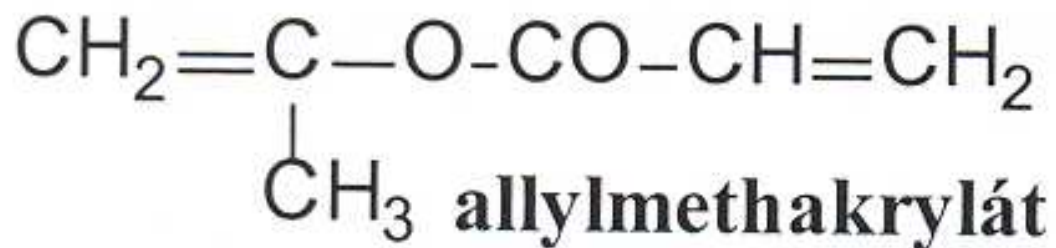
vzniklé radikály vyvolají další polymeraci a zesítní.

Výsledná membrána neobsahuje nežádoucí produkty  
a současně je sterilována.

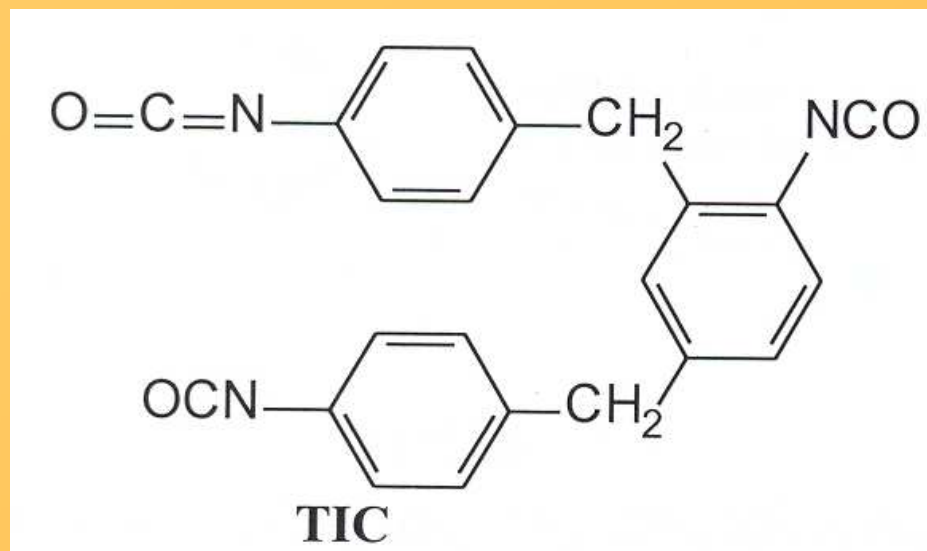
Ale tvrdé záření může poškodit převodník nebo biovrstvu.

## 5% allylmethakrylát

se používá pro dodatečné  
zesítní.

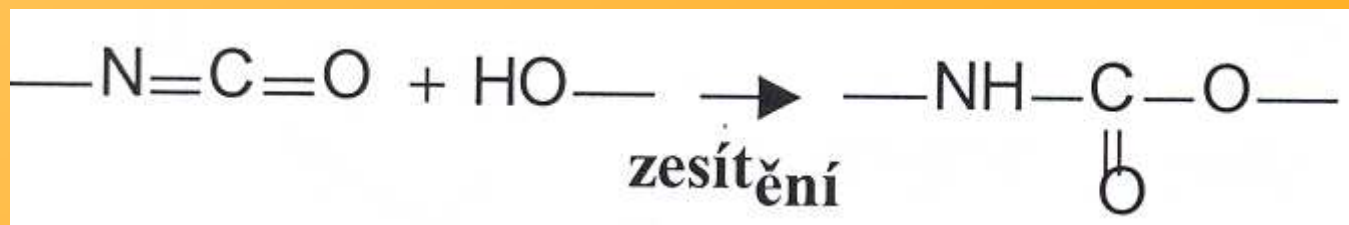


## chemické zesíťování pomocí triisokyanátu (TIC)



**triisokyanáty spojují postranní hydroxyly PVA, mohou zesíťovat i enzym (přes aminoskupiny a hydroxyly),  
Na povrch sensoru naneseeme nejprve enzym a**

**po jeho zaschnutí pak PVA (roztok v dimethylsulfoxidu), přidáním TIC vznikne velmi rychle gel.**



## PVA-SbQ

**komerčně dostupný PVA obsahující malý podíl (1,3%) styrylbipyridiniových skupin, který polymeruje v UV světle.**

**nejšetrnější způsob imobilizace molekul pomocí PVA.**

## HEMA – poly (2-hydroxyethylmethakrylát)

hydrofilní, biokompatibilní polymer

směs HEMA s vodným roztokem enzymu se nechá zmrazit na  $-80^{\circ}\text{C}$  a poté se polymerace vyvolá  $\gamma$  zářením.

Při nízké teplotě dochází k menšímu poškození molekul.

Ve zpolymerované matrici se vytvoří póry zbylé po krystalcích ledu (cavities), na jejichž stěnách je vázán enzym.

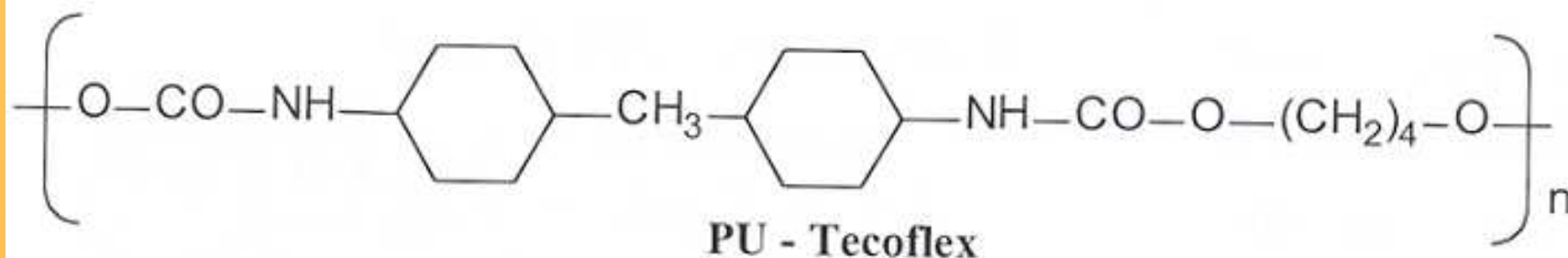
Chemicky se dá polymerace vyvolat pomocí peroxosíranu amonného a TMPD.

## Polyurethany (PU)

**biokompatibilní polymery**

**S velmi dobrými adhezními vlastnostmi.**

**Opět se vychází z oligomerů (kolem 50 kDa),  
které se v přítomnosti enzymu zesít'ují  
např. difenylmethandiisokyanátem.**

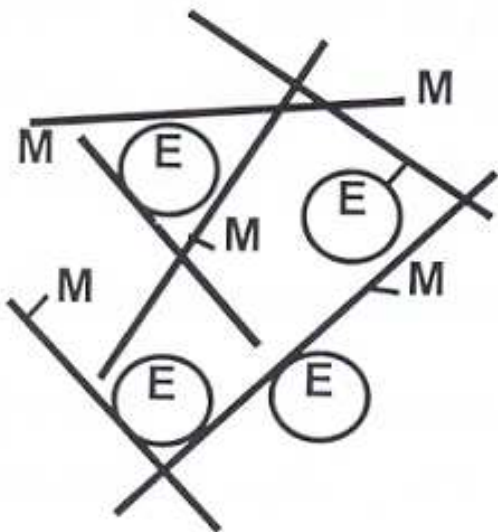


## PEGDE

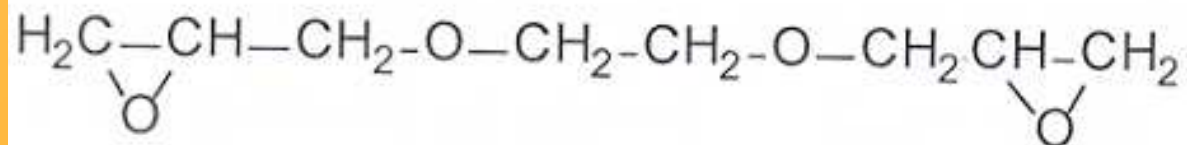
může mimo zesíťování modifikovaného polyvinylpyridinu reagovat s volnými aminoskupinami enzymu.

Přenos elektronů mezi enzymem a elektrodou pak probíhá velmi rychle přeskokováním mezi jednotlivými fixovanými molekulami mediátoru.

Výsledkem jsou vysoké proudové hustoty dosahované u tohoto typu enzymových elektrod.



PEGDE

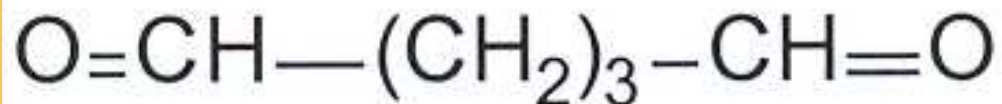




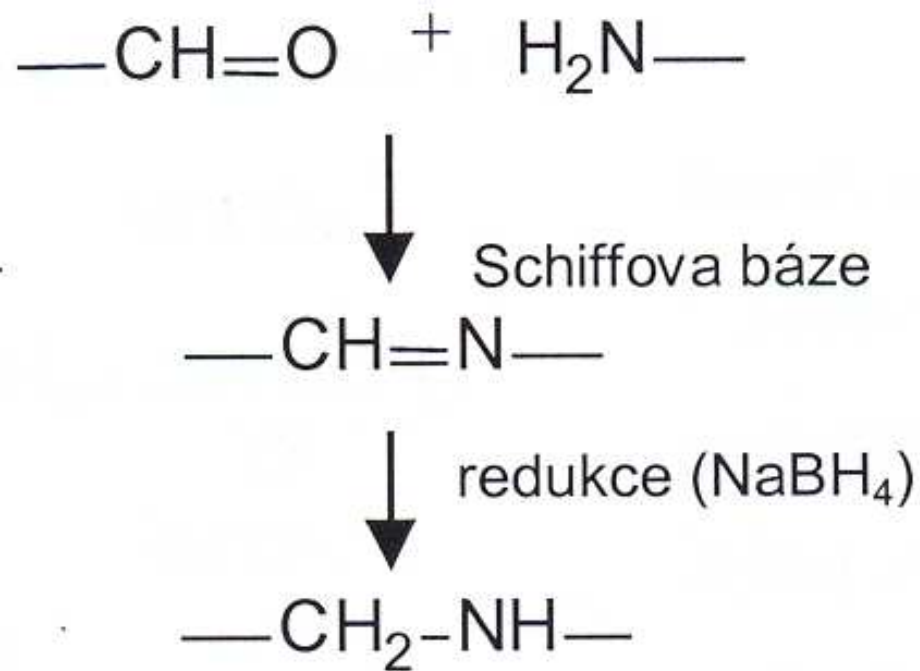
## Zesíťování biomolekul

Membránu lze vytvořit přímo z enzymů či bílkovin zesíťováním (retikulace) vhodným bifunkčním činidlem.

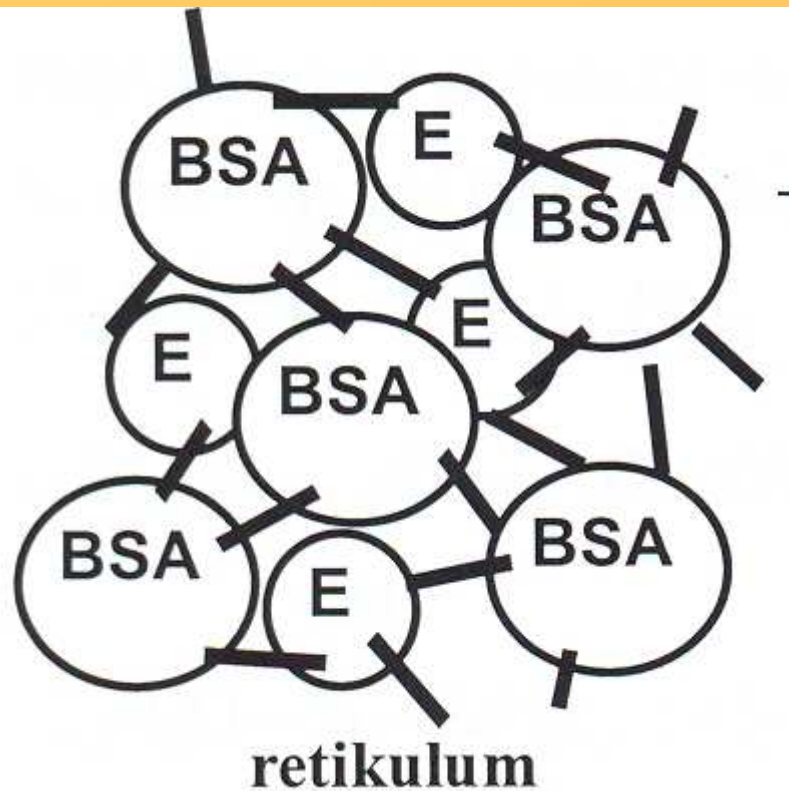
Glutaraldehyd – směs s roztokem bílkovin v závislosti na koncentraci vytváří spontánně síť (retikulum), buď přímo na povrchu sensoru nebo na vhodném podkladovém materiálu (polyamidová síťka, dialyzační membrána)



**glutaraldehyd**



**Reakcí mezi aldehydovou skupinou s aminoskupinou bílkoviny (postranní lysinové zbytky) vzniká propojením Schiffova báze, která se ještě může zredukovat na stabilnější aminovou vazbu, i když se to běžně neprovádí.**



Nezreagované aldehydové skupiny se mohou neutralizovat reakcí s **glycinem** nebo **ethanolaminem**.

Hmotnostní poměr glutaraldehydu : bílkovině = **1 : 1 až 1 : 20**, což ovlivňuje průchodnost membrány.

Zesít'ovat lze pouze enzym nebo se může enzym naředit **inertní bílkovinou**, která má hodně volných aminoskupin (**albumin**).

Tyto enzymové membrány se vyznačují dobrou stabilitou v důsledku značného podílu latentní enzymové aktivity.

## Kovalentní immobilizace molekul:

- ❑ afinitní nosiče
- ❑ nové technologie pro přípravu biosensorů

## Aktivace povrchu sensorů

pracovní povrch sensorů:

**sklo**

**křemík**

**modifikace uhlíku**

**ušlechtilé kovy (Au, Pt)**

**Některé biomolekuly se adsorbují na povrch těchto materiálů s různou pevností, ale spolehlivá a dlouhodobě stabilní imobilizace je možná jen pomocí kovalentní vazby mezi biomolekulou a povrchem.**

## Silanizace

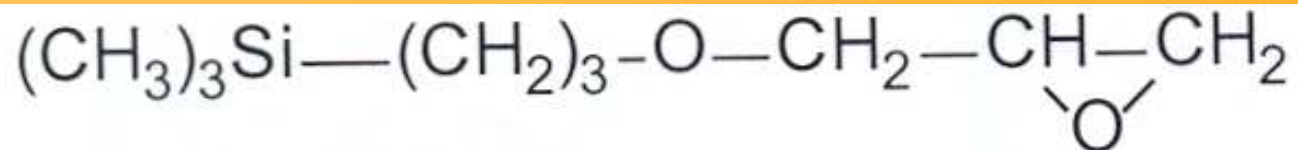
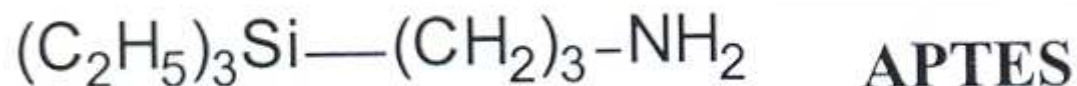
metoda aktivace anorganických povrchů, částečně krytých vrstvou oxidu (sklo, křemík, kovy) kontaktní vrstvou silanu s vhodnou reaktivní skupinou X.

Používají se **alkoxyderiváty**:

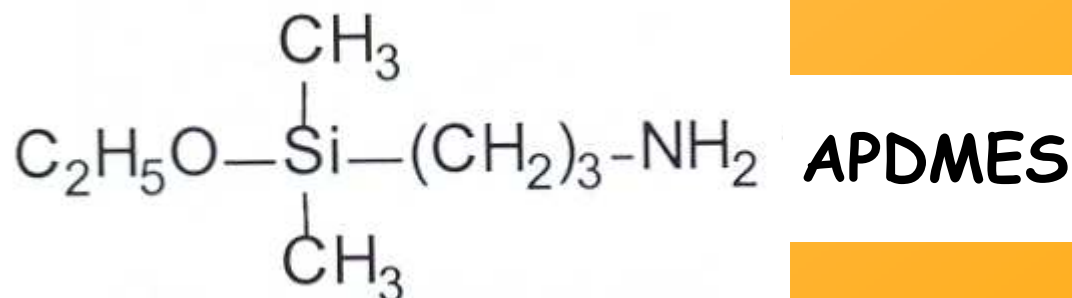
$\gamma$ -aminopropyltriethoxysilan (APTES nebo APTS)

glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPS)

Jejich účinkem se na povrchu vytvoří tenká vrstvička z několika molekulárních vrstev.



**GOPS**

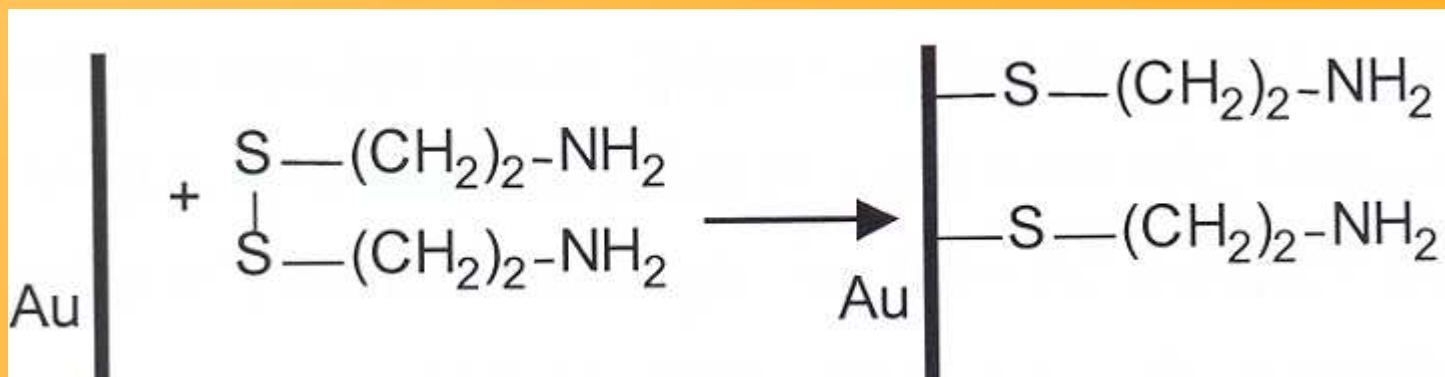


## Spontální tvorba monovrstev (self organized monolayers)

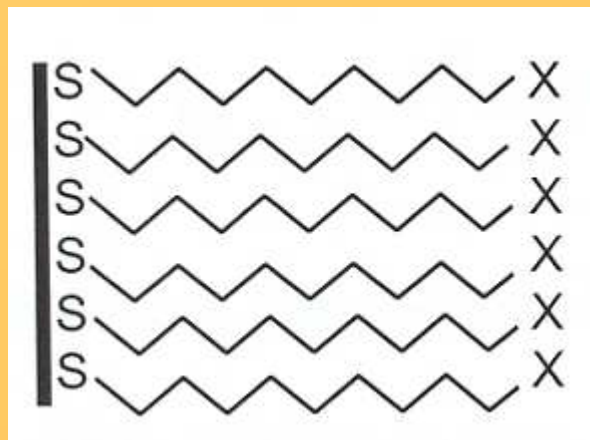
využívá velmi pevné adsorpce **thiosloučenin** (thioly a disulfidy) na povrchu **zlata** a částečně také **platiny** a **stříbra**.

Disulfidová vazba je velmi pevná, slouží jako podklad pro další imobilizační reakce.

Délka uhlíkového řetězce ovlivňuje organizovanost vrstvy, plošnou hustotu reaktivní skupiny lze ovlivnit **přídavkem inertního činidla** – použije se směs: **aminothiolu a thiolu**.



**Adsorpce thiosloučenin na zlato**



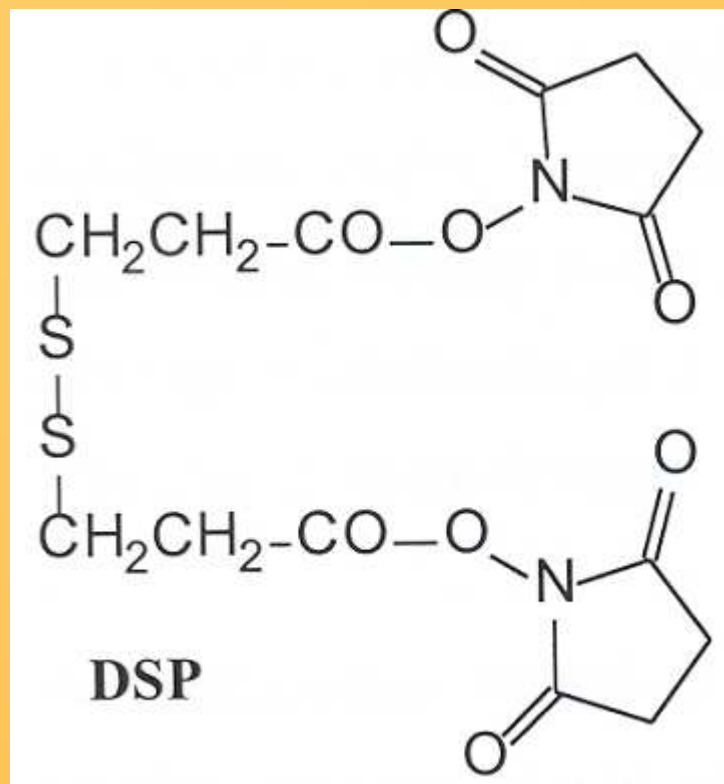
**Zmenšení hustoty  
inertním thiolem**

**Vždy vzniká monovrstva, která však může být tak hustá, že je povrch prakticky elektricky izolován. Adsorpce krátkých thiolů zlepšuje elektrochemické odezvy bílkovin a jiných látek (usnadněná výměna elektronů s cytochromem c).**

**Hustotu lze určit elektrochemicky na základě signálu vhodné elektroaktivní látky (ferrikyanid) nebo sledovat pokles vodivosti povrchu v průběhu vzniku monovrstvy.**

**Thioly:            cysteamin, cystamin, thiofenol (aminoskupina)  
                          16-merkaptohexadekanol (hydroxyskupina)  
                          12-merkaptoundekankarboxylová kyselina COOH**





**Bis(N-hydroxysukcinimidester  
kyseliny 3,3'-dithiopropionová  
DSP**

**je speciální činidlo, které se  
váže na zlato.**

**N-hydroxysukcinimidová skupina  
je reaktivní a může být  
vyměněna za volnou postranní  
aminoskupinu z bílkoviny,  
přičemž vznikne amidová vazba**



### hydrolýza polyamidů:

opatrnou hydrolýzou (3M HCl 10 sec až 1 hod)  
často se však materiál mechanicky naruší

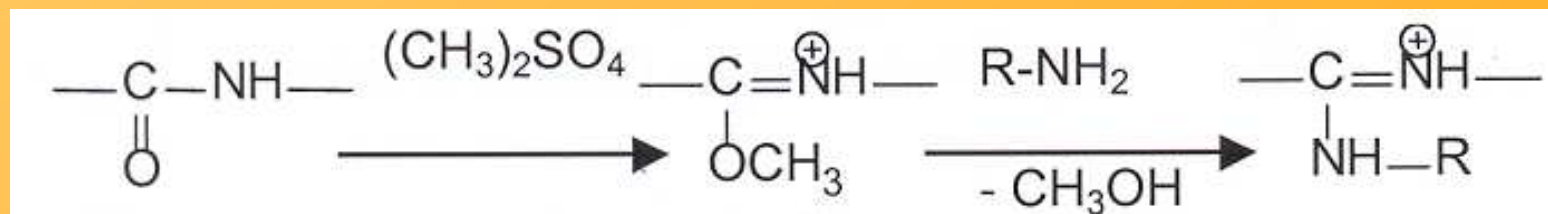
### aktivační postupy:

amidovou vazbu nepřeručí

O-alkylace peptidové vazby oxoniovou solí

triethyloxonium tetrafluoroboritanu

dimethylsulfát



vzniklý imidoester reaguje v slabě alkalickém prostředí s aminoskupinou za vzniku amidinu.

Na trhu existují aktivované polymery (membrány, imobilizace se dosáhne inkubací s biomolekulou.

## Navázání biomolekul

**výchozí materiál**

**(povrch sensoru, membrána...)**

**skupiny:**

**aminoskupina**

**karboxyskupina**

**hydroxyskupina**

**amid skupina**

**reagenty lze nalézt v katalozích**

**firmy Pierce**

# Povrch modifikovaný $\text{NH}_2$ skupinou

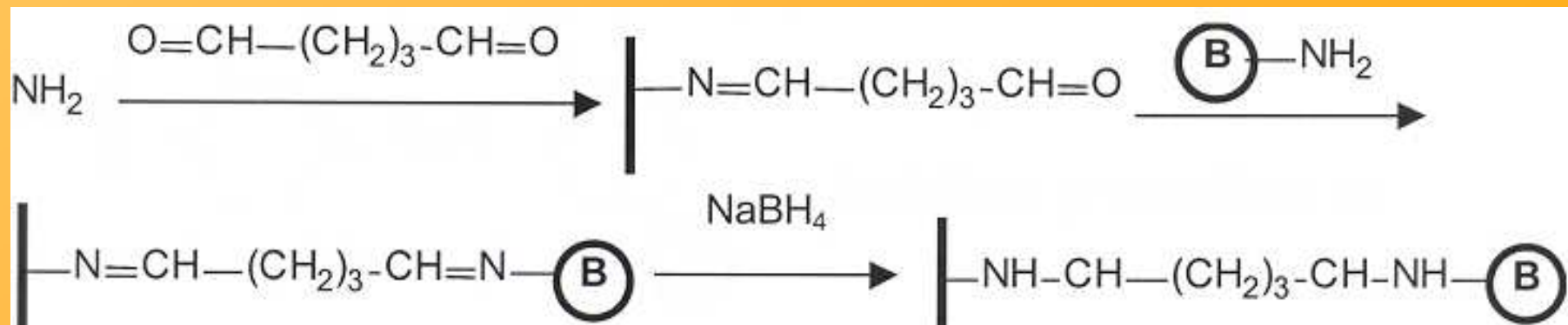
## 1) Aktivace bifunkčním činidlem

Glutaraldehyd (1 až 5% vodný roztok)

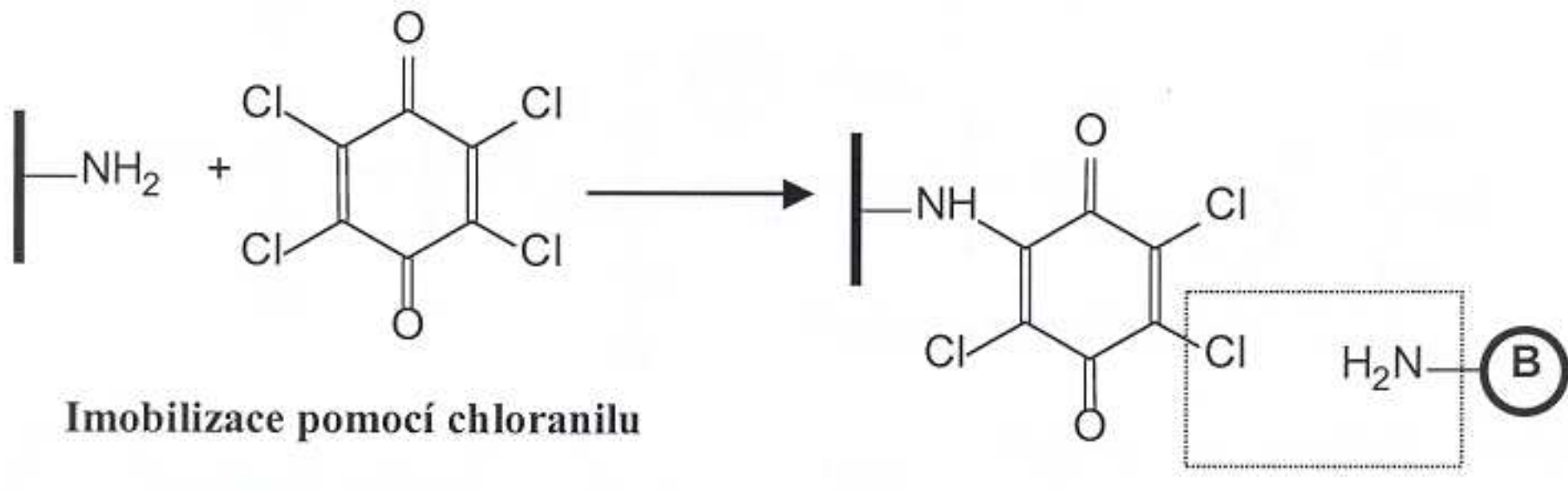
za 0,5 až 2 hod se vytvoří Schiffova baze a po promytí je **druhá volná aldehydová skupina** k dispozici pro stejnou reakci s  $\text{NH}_2$  skupinou biomolekuly.

Zbývající volné aldehydové skupiny se inaktivují **glycinem** nebo **ethanolaminem**.

Někdy se provádí redukce Schiffových bází **borohydridem**, přičemž vzniklá vazba je stabilnější.

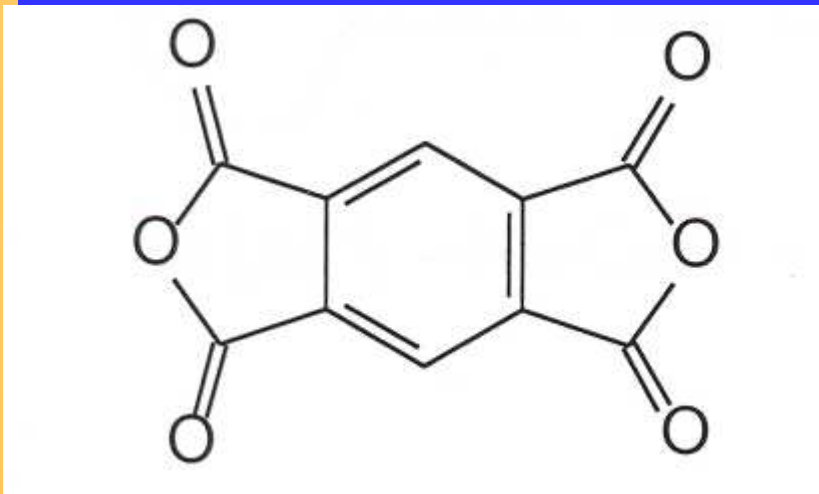


**CHLORANIL** (tetrachlor-p-benzochinon),  
obsahuje redoxaktivní chinonové uspořádání využitelné  
pro přenos elektronů mezi enzymem a elektrodou.

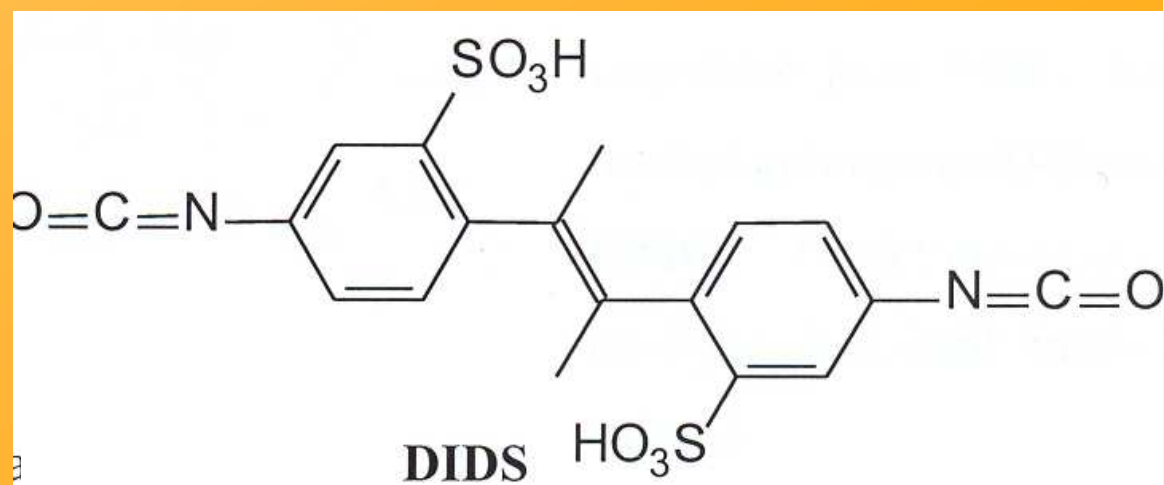


## DALŠÍ ČINIDLA:

### Dianhydrid kyseliny benzentetrakarboxylové



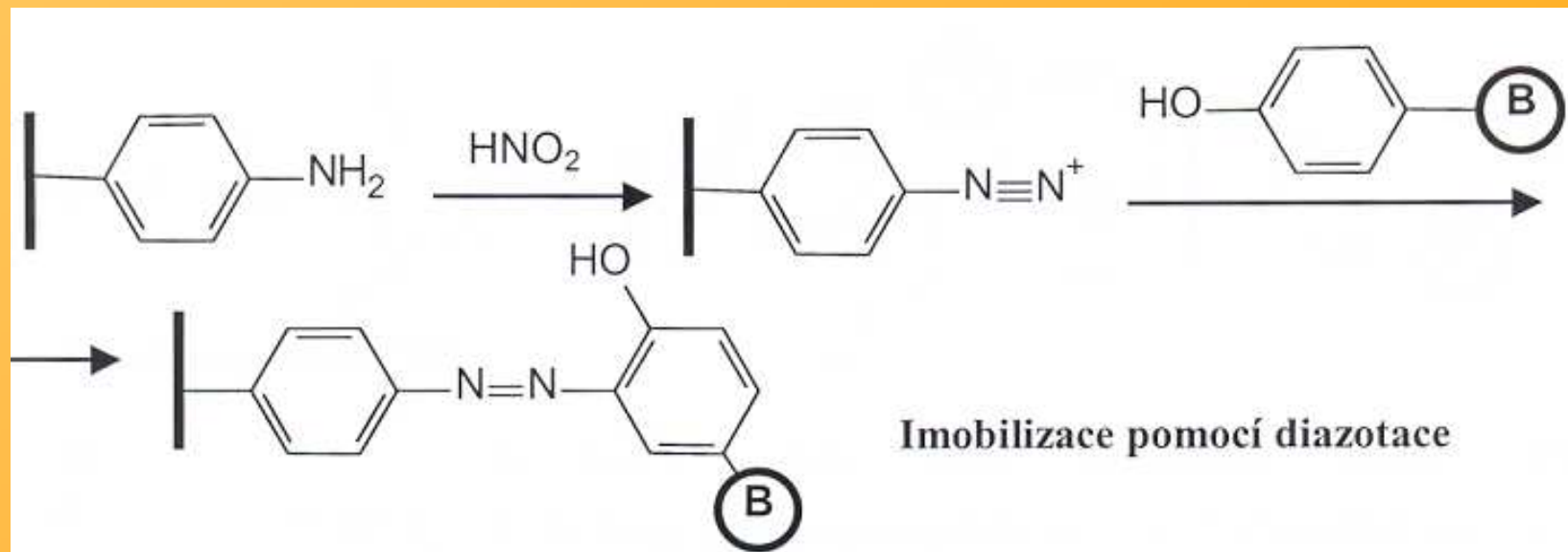
### DIDS trans-stilben-(4,4'-diisothiokyanát)-2,2'-disulfonová kyselina



## 2) Konverze aminoskupiny

**Thiofosgen  $\text{Cl}_2\text{C}=\text{S}$ , vzniklý isothiokyanát pak reakcí s aminoskupinou biomolekuly vede k substituované thiomocovině.**

**Aromatické aminoskupiny lze snadno aktivovat diazotací kyselinou dusitou (biomolekula se váže přes tyrozinový zbytek)**



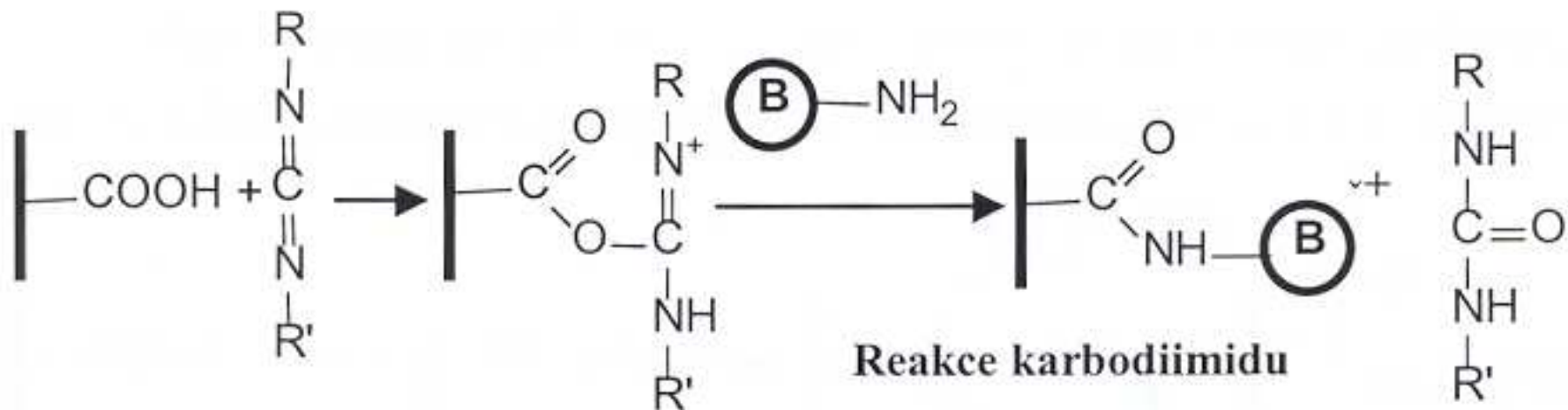


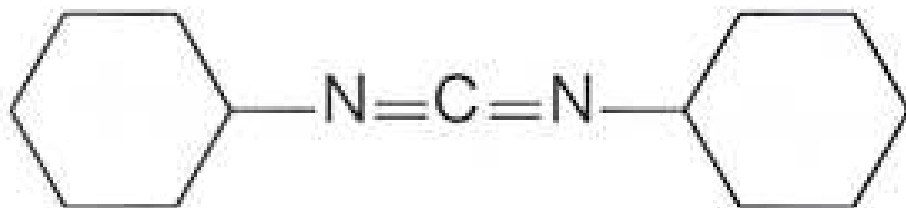
## Povrch modifikovaný karboxyskupinou

je druhá nejčastěji používaná skupina po  $\text{NH}_2$ .

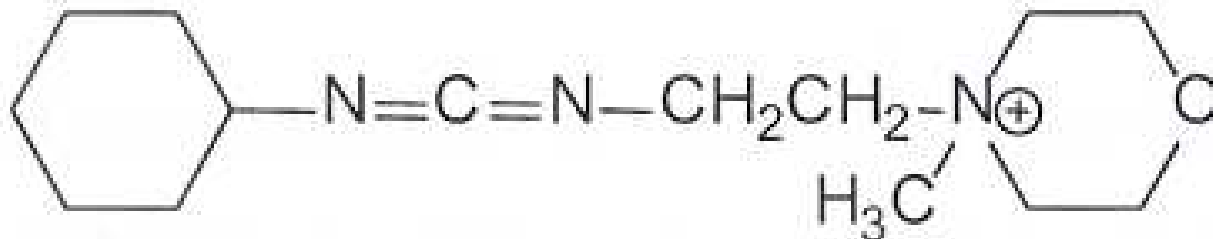
### REAKCE S KARBODIIMIDY (CDI)

Způsobí vázání vody při vzniku amidové, esterové či thioesterové vazby.





**DCC**



**CMC**

tosyl<sup>-</sup>

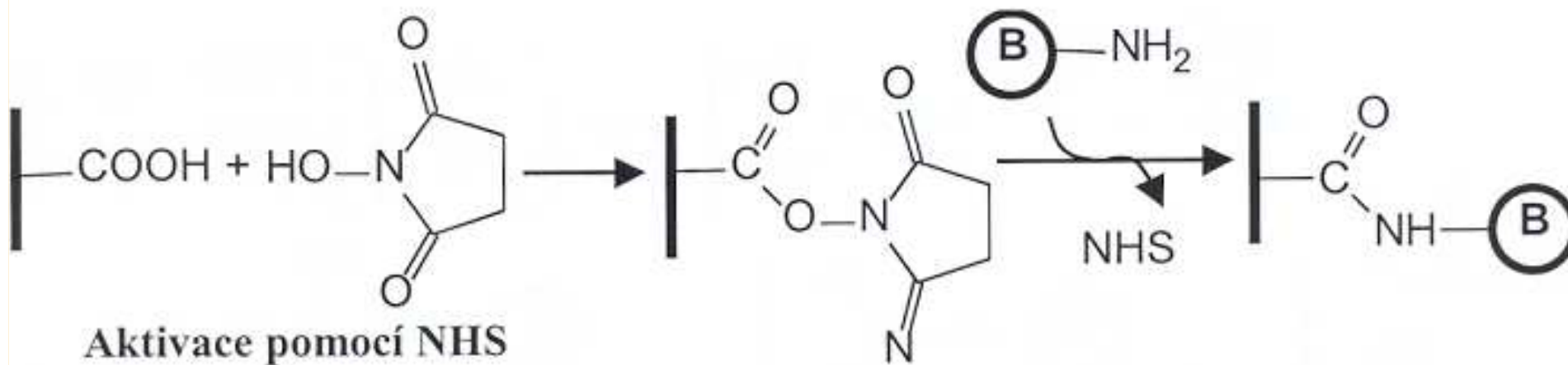


**DCC** – dicyklohexylkarbodiimid – nejdéle používaný, ale **nerozpustný ve vodě**

**CMC**- 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)-karbodiimid methoxy-p-toluensulfonát (**ve vodě rozpustný**)

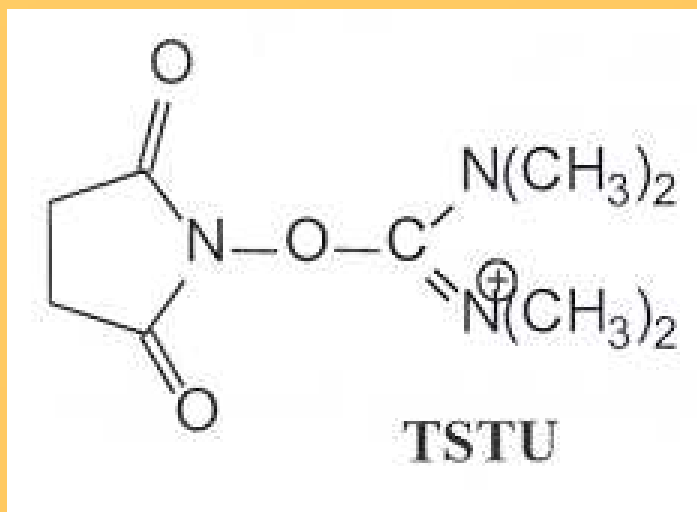
**EDC** 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid (**také ve vodě rozpustný**)

## CDI + N-hydroxysukcinimid (NHS) imobilizace citlivějších bílkovin



**Připraví se reaktivní a stabilní N-hydroxysukcinimidový derivát karboxylu, který pak reaguje s aminoskupinou bílkoviny.**

**Oproti samotnému CDI je reakce mnohem mírnější a nevznikají nežádoucí meziprodukty.**



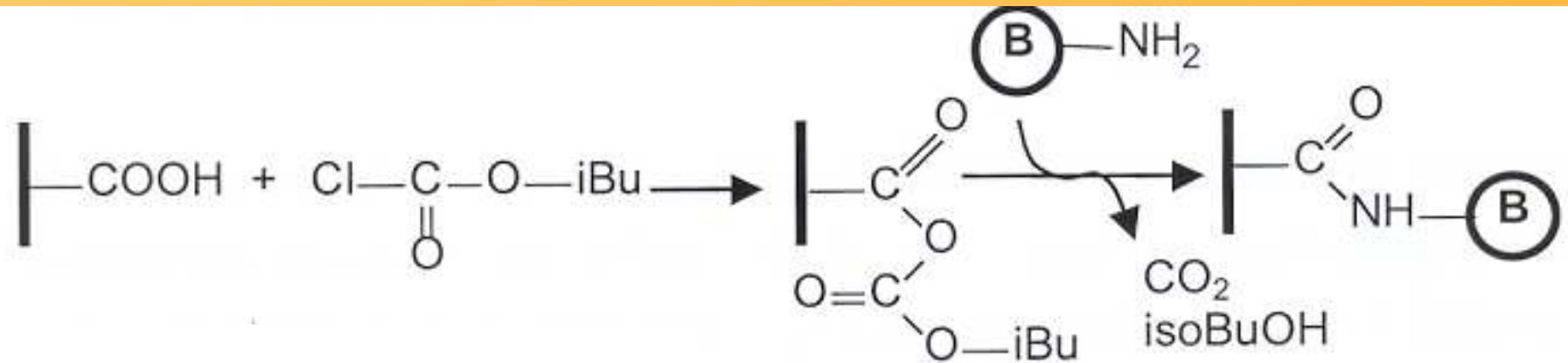
Je dostupný přímo aktivovaný derivát **TSTU**:

**O-(N-hydroxysukcinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroboritan.**

**Inkubace v dimethylformamidu s ekvimolárním množstvím látky nesoucí karboxyl vede ke vzniku NHS derivátu.**

**Na trhu je k dispozici řada biomolekul aktivovaných NHS pro vazbu na aminoskupiny, např. **NHS-biotin, NHS-fluorescein****

## Aktivace přes směsný anhydrid



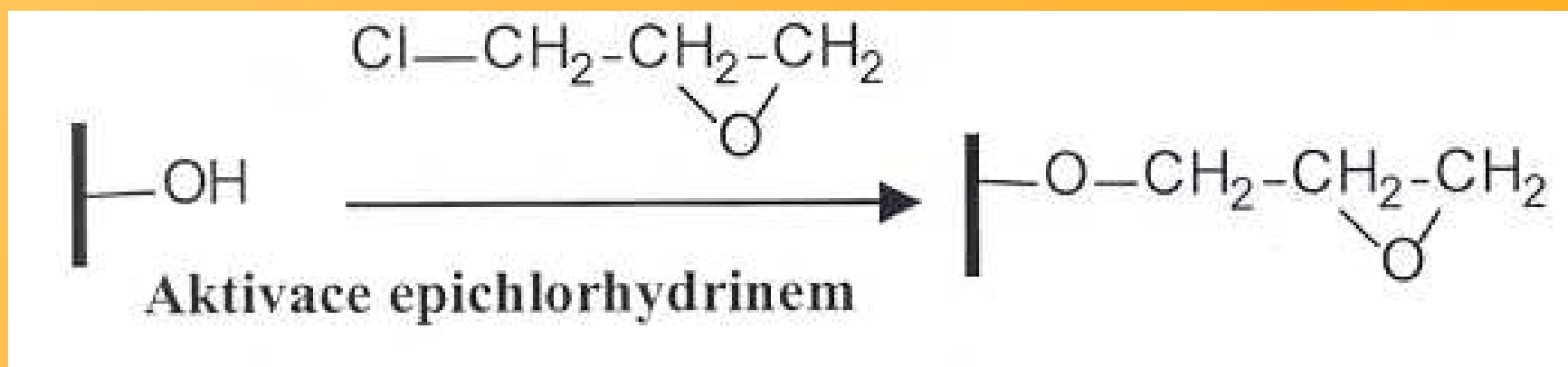
Metoda využívá aktivaci pomocí **isobutylchloroformiátu**, který aktivuje karboxyskupinu na reaktivní anhydrid a ten pak umožňuje vznik amidové vazby.

## Povrch modifikovaný hydroxyskupinou

Vhodná zejména pro imobilizaci na povrchy modifikované sacharidovou vrstvou (nejčastěji dextran), která dodává hydrofobnímu povrchu hydrofilní vlastnosti zvyšující biokompatibilitu.

Jako aktivační činidlo je použitelný **epichlorhydrin**.

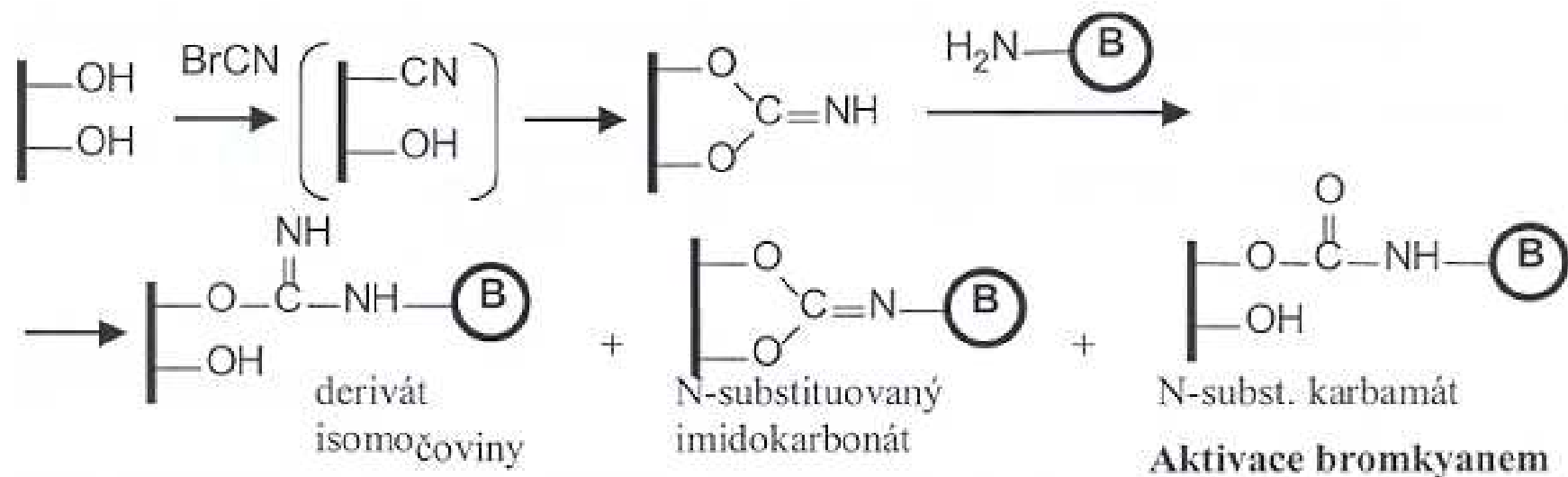
Na oxiranový cyklus se adují biomolekuly prostřednictvím amino či hydroxyskupiny.



## Bromkyan

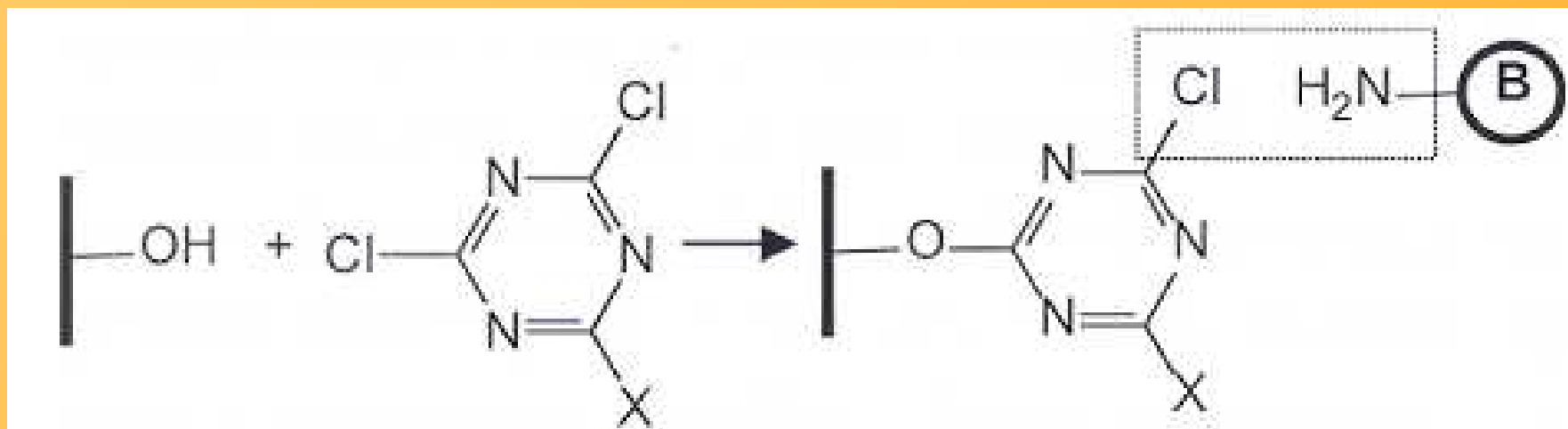
klasické činidlo pro aktivace polysacharidových materiálů  
je jedovaté

reakce s hydroxyly probíhá v alkalickém prostředí,  
meziprodukt imidokarbonát reaguje s aminoskupinou  
biomolekuly za vzniku různých derivátů.



## Triazinová metoda

využívá kyanurchlorid a zejména jeho méně reaktivní deriváty.

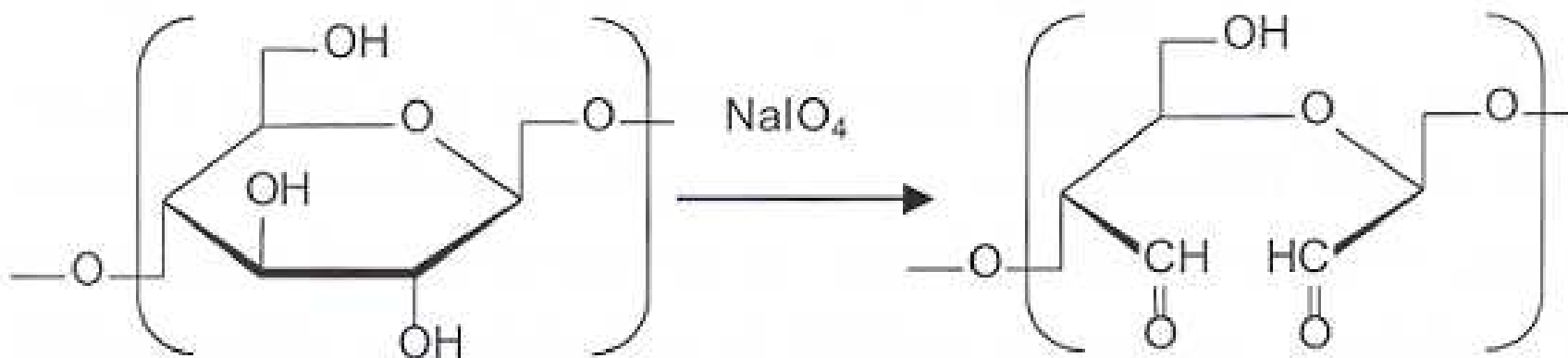


místo jednoho atomu chloru je X substituent jako např.  
 $\text{O-CH}_2\text{-COOH}$  nebo  $\text{-NH-CH}_2\text{-COOH}$



## Oxidace jodistanem

sacharidové materiály obsahující diolové uskupení je možné za mírných podmínek oxidovat jodistanem, vzniklé aldehydové skupiny reagují s aminoskupinami biomolekul za vzniku Schiffových bází. Reakce je použitelná pro aktivaci **bílkovin nesoucích postranní sacharidové zbytky**, ale také pro **RNA**



## Povrch modifikovaný amidoskupinou

amidoskupina se vyskytuje především v polyakrylamidu. Dá se **alkalickou hydrolyzou** (zahřívání 60°C, pH 10,5, NaHCO<sub>3</sub> a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) převést na karboxylovou skupinu.

Další možností je **hydrazinolýza** vedoucí k hydrazinu kyseliny, který se kyselinou dusitou převede na reaktivní azid kyseliny.

při zahřívání polyakrylamidu v bezvodém ethylendiaminu dojde k substituci a získá se koncová aminoskupina.

## Povrch modifikovaný thiolovou skupinou

**Thiolová skupina umožňuje reverzibilní immobilizaci s volnými cysteinovými zbytky.**



**Vazba vznikne oxidací a přeruší se redukcí.**