

BIOSENSORY

Ludmila Zajoncová

Literatura:

Petr Skládal: Biosensory (elektronická verze)

(<http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>)

(staženo 19.5.2008)

T.Cass, F.S. Ligler:

Immobilized Biomolecules in Analysis

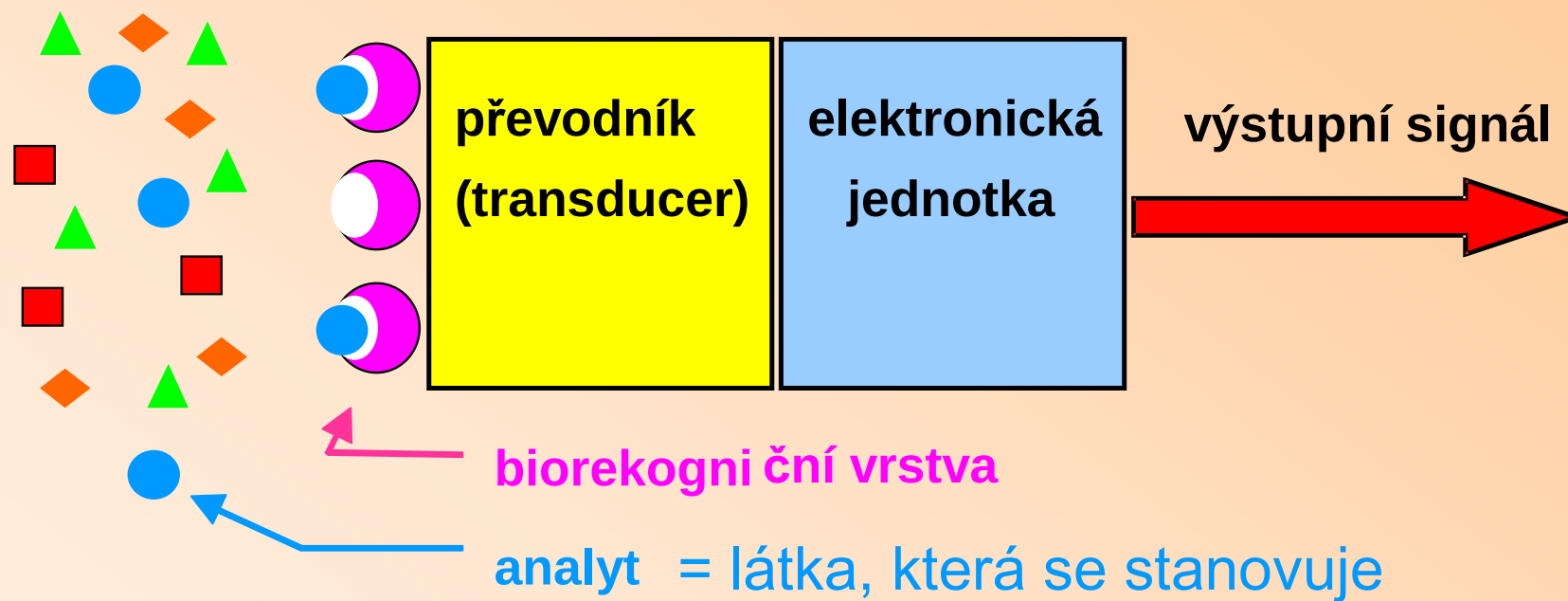
A practical Approach

T.Cass: Biosensors

A Practical Approach, Oxford 1990

DEFINICE BIOSENSORU

Biosensor je analytický přístroj, který obsahuje citlivý prvek biologického původu, který je součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem



BIOREKOGNIČNÍ VRSTVA

Biokatalytická

katalyzují přeměnu analytu v průběhu chemické reakce

Bioafinitní

analyt je specificky vázán ve vznikajícím afinitním komplexu

FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ PŘEVODNÍKY

poskytují signál k dalšímu zpracování

Elektrochemické:

potenciometrie
amperometrie
voltametrie
konduktometrie

Optické:

fotometrie
fluorometrie
luminometrie
nelineární optika

Piezoelektrické a akustické

Kalorimetrické

MEZIOBOROVÉ STUDIUM BIOSENSORŮ

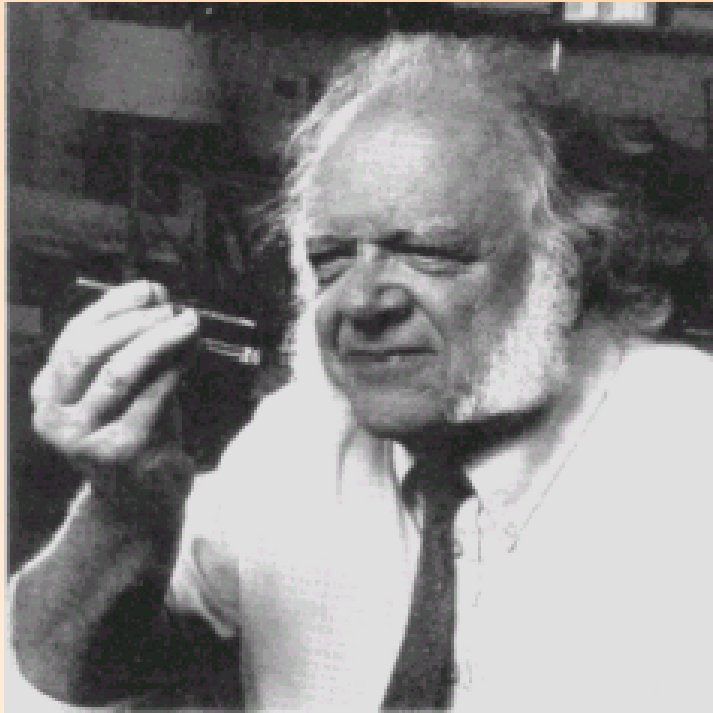
biochemie a biotechnologie
analytická a fyzikální chemie
elektronika
informatika
nauka o materiálech
nanotechnologie
aj.

Historie

- ❖ měření pH (počátek 20. století)
- ❖ Heyrovský - objev polarografie 1922
- ❖ měření O_2 (Müller a Bamberger 1935)
- ❖ měření spotřeby kyslíku (Petering, Daniels, 1938)
- ❖ redukce O_2 na Au, Pt (40. léta min. století)
- ❖ C. Clark 1956 kyslíková elektroda (membrána)
- ❖ Wartburg optické biochemické techniky (2.sv.v.)
- ❖ Chance B. diferenciální fotometr
- ❖ Clark 1962 elektrochemické sensory (glukosa)
- ❖ Clark, Lyons enzymová elektroda 1962
- ❖ Updike a Hickson 1967 experimentální detaily

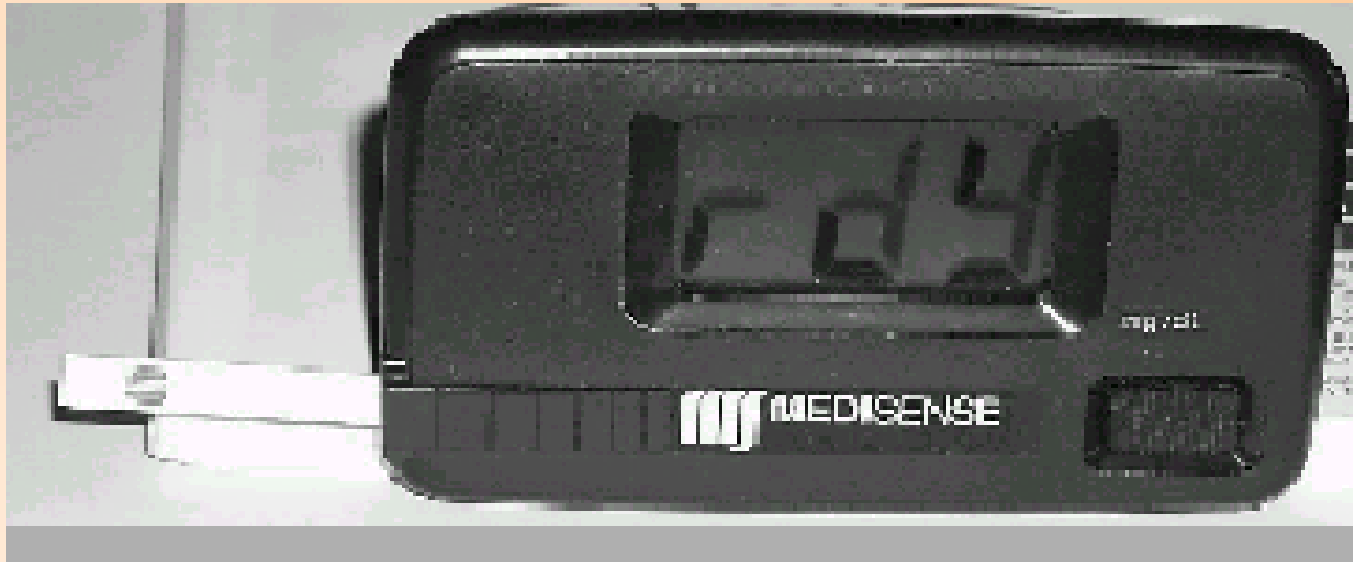
- ❖ konec 60. let - iontově selektivní elektrody
- ❖ 1969 potenciometrická enzymová elektroda Guilbault
- ❖ 1975 Yellow Springs Instrument Company (Ohio) komerční biosensor pro glukosu
- ❖ enzymový termistor Mosbach 1974
- ❖ 1975 místo enzymů bakteriální buňka Japonsko pojem biosensor (bioprobe)
- ❖ Lubbers Opitz optoda (optické vlákno)
- ❖ 1976 Clemens glukosový sensor do umělého pankreatu Biostator fa Miles
- ❖ fa La Roche laktát LA 640 mediátor ferrikyanid
- ❖ 1982 implantovatelný glukosový sensor Schichiri jehlová enzymová elektroda

- ❖ imunosensory (konec 70. let) Liedberg sledování afinitních interakcí pomocí rezonance povrchových plasmonů ve vrstvě kovů nanesené na optickém rozhraní
- ❖ 1990 fa Pharmacia BIAcore přístroj
- ❖ Medisense měření krevní glukosy -osobní ferrocen - přenašeč elektronů z oxidoreduktas na elektrodu
dnes výroba fa Abbott
- ❖ Boehringer Mannheim a Bayer 85% na trhu biosensorů, 1996 -185 mil US dolarů



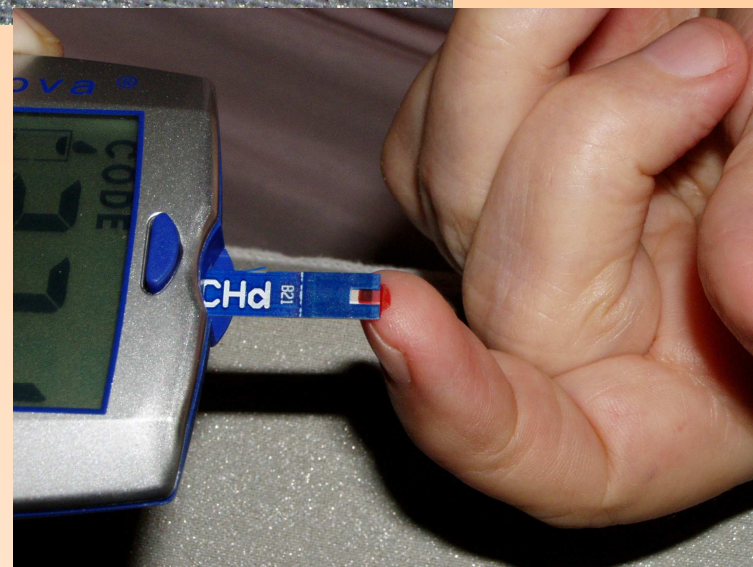
Glukosoxidasa zachycená na povrchu
kyslíkové elektrody pomocí dialyzační
membrány.
Pokles koncentrace kyslíku je úměrný
koncentraci glukosy.

Na obrázku: Leland C. Clark Jr.
s první enzymovou elektrodou



Dosud nejúspěšnější biosensor je založen na ferrocenu - přenašeči elektronů z oxidoreduktas na elektrodu (fa. Medisense).

Levný osobní biosensor pro domácí měření krevní glukosy diabetiky.



Dnes na českém trhu přístroj SeNOVA fa Abbott
dovozce A. Import.cz spol. s r.o.
pro domácí léčbu cukrovky

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

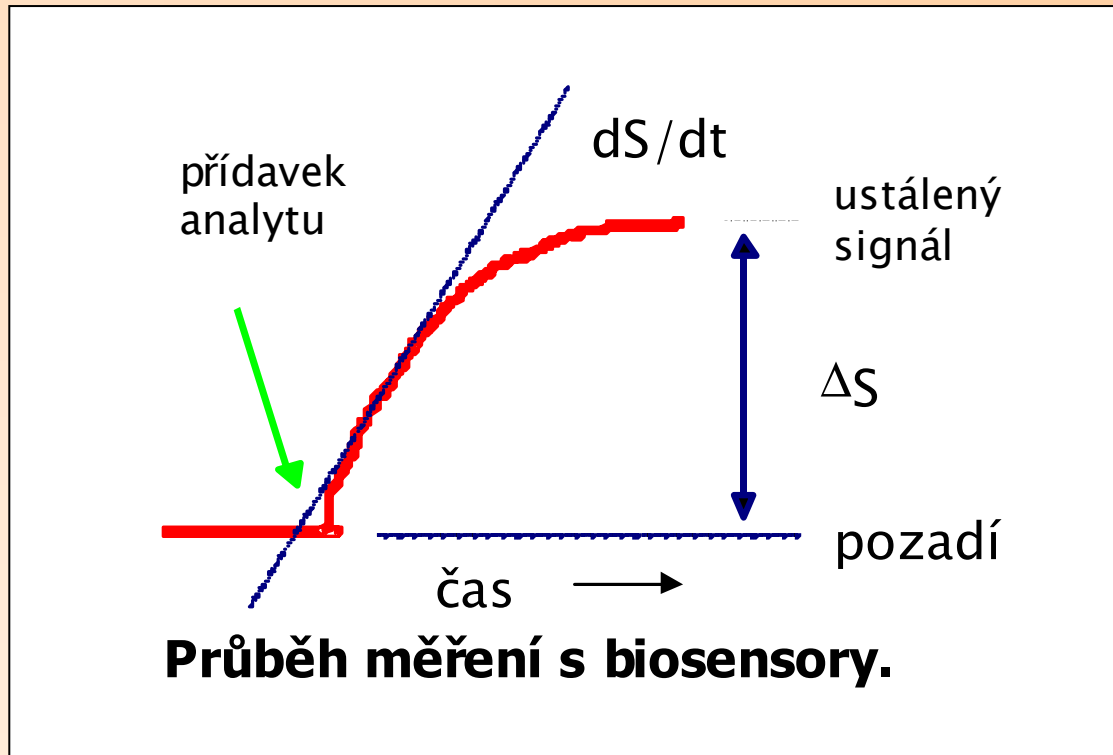
Journal of Biotechnology - aplikace při biotechnologických procesech

Journal of Immunological Methods – imunochemické sensory

Langmuir

Thin Solid Films - některé aspekty imobilizačních postupů.

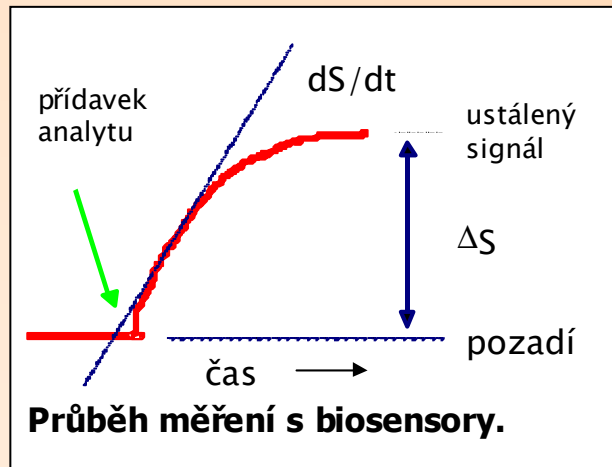
ZÁKLADNÍ POJMY



Po ustavení základní linie signálu, následuje přídavek vzorku s analytem.

Měření: kineticky (časová derivace signálu)
konečná změna signálu po dosažení ustáleného stavu
(steady state)

CITLIVOST



Citlivost je konečná ustálená změna výstupního signálu biosensoru (S) v důsledku změny koncentrace analytu (c), tj. $\Delta S/\Delta c$, nebo dS/dc . Při provádění kinetických měření se sleduje časová změna signálu dS/dt a citlivost vypočítá jako $\Delta(dS/dt)/\Delta c$.

Speciální druhy signálu:

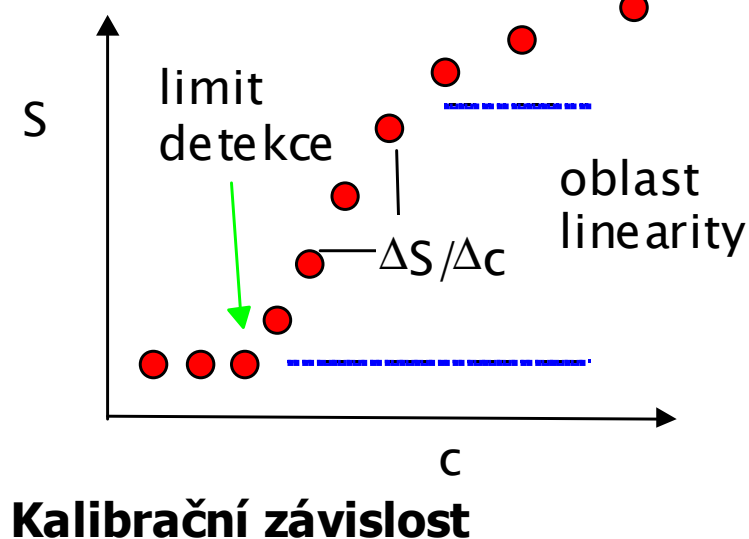
plocha (časový integrál)

frekvenční analýza

Citlivost by měla být konstantní po celou dobu životnosti biosensoru

V reálných systémech se změny citlivosti kompenzují
rekalibrací.

KALIBRACE



Sledujeme signál biosensoru při různých standardních koncentracích známého analytu.

Je vhodné používat co nejméně kalibračních bodů, pokud je znám tvar kalibrační závislosti, nejvhodnější je **přímka**, kde stačí 1 nebo 2 body.

LINEARITA

Ideálního biosensor: v celé pracovní oblasti je konstantní citlivost na všechny možné koncentrace analytu, tj. od nuly po limit rozpustnosti.

Reálný biosensor: oblast linearity je užším intervalem uvnitř pracovní oblasti.

Nelineární části existují v horní -saturační části

V lineární části stačí kalibrace dvěma body.

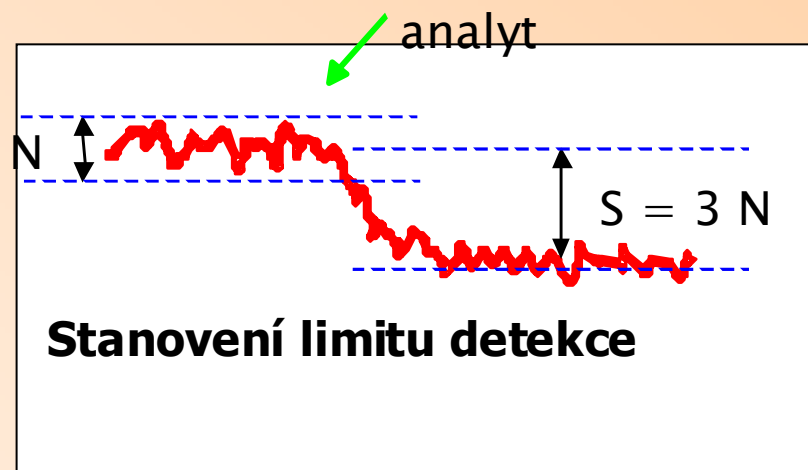
Linearita **není nutná**, při použití

počítače, stačí znát průběh kalibrační křivky.

Nelineární úseky lze aproximovat pomocí několika přímk.

Často lze linearity dosáhnout **matematickou transformací** měřeného signálu (např. semilogaritmická citlivost $\Delta \ln S / \Delta c$ existuje v potenciometrii)

LIMIT DETEKCE



Limit detekce 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 **$S/N = 3$** .

ŠUM

- ❖ elektromagnetické povahy (frekvence 50 Hz rozvodné sítě)
(Lze omezit elektrickým stíněním)
- ❖ turbulence (při míchání)
- ❖ rázy pumpy (průtoková analýza)

Snížení velikosti šumu lze dosáhnout:

- ❖ uspořádáním měřících obvodů
- ❖ digitální techniky (akumulace signálu, průměrování, vyhlazování)

SIGNÁL POZADÍ

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 $S/S(\text{ref}) = (\text{měření} - \text{pozadí})/(\text{reference} - \text{pozadí})$.

Obvykle se předpokládá stabilita signálu pozadí, to však v praxi nemusí být pravda (signál pozadí obvykle s časem klesá)

HYSTEREZE

Vliv minulých měření na aktuální signál

Změna charakteru kalibračních přímek
(konkávní, konvexní prohyb)

Důvod: vysoká konc. analytu naruší okolí
biosensoru nebo uvnitř biorekogniční vrstvy

Řešení: zpomalit měření

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, otrava biovrstvy těžkými kovy.
Je třeba provádět kontrolu citlivosti a případně provést
rekalibraci.

SELEKTIVITA

VLIV INTERFERENCÍ

Odezva biosensoru by měla být vyvolána pouze přítomností stanovované látky, ostatní látky by se neměly projevit.

V praxi: existuje celá řada látek, které stanovení ruší.

Eliminace: zředit
převedení na nerušící sloučeniny
předřazení selektivní membrány
příspěvek na měřený signál určit
jiným biosensorem (diferenciální uspořádání)

RYCHLOST ODEZVY

Rychlost odezvy je určována zejména fyzikálními vlastnostmi biosensoru (velikost). Závisí na rychlosti difúze analytu z okolního prostředí k povrchu biosensoru a dále pak vnitřní difúzí uvnitř systému biosensoru.

DOBA ODEZVY

Určuje jako čas potřebný k dosažení určité velikosti signálu v konečném ustáleném stavu

$t \longrightarrow \infty \quad \tau_{95} \quad \text{Pro dosažení 95\%}$

TEPLOTNÍ ZÁVISLOST

Teplota má vliv:

- ❖ na difúzní jevy
- ❖ na probíhající chemické reakce

pracuje se za izotermických podmínek

používá se: vodní cirkulující termostat
 vyhříváný kovový blok
 práce v laboratoři
 práce v terénu

ŽIVOTNOST BIOSENSORU

Limitována nejslabším prvkem -biorekogniční vrstvou

- ❖ stabilitu při skladování (shelf life)
 - nižší teplota (lednice, mrazák)
 - suchý stav
- ❖ operační stabilita
 - závisí na počtu a druhu analyzovaných vzorků

Optimální podmínky pro skladování a uchovávání biosensoru se hledají individuálně.

BIOKOMPATIBILITA

Má význam pro biomedicínské aplikace (měření in vivo).

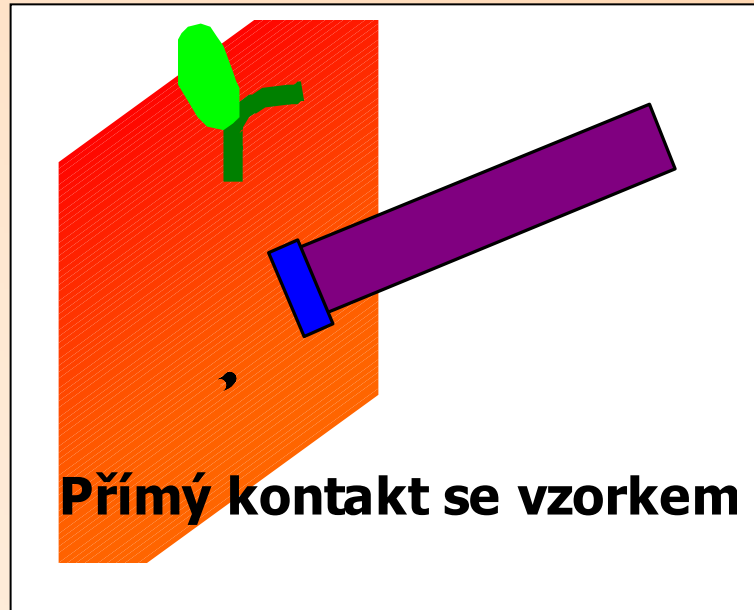
Při umístění biosensoru v krevním toku je třeba zamezit srážení krve (impregnace heparinem), ve tkáních hrozí nebezpečí zánětlivých reakcí, zjizvení a zarůstání pojivovou tkání.

Případná sterilizace biosensoru nesmí negativně ovlivnit jeho aktivitu.

PODMÍNKY PRO MĚŘENÍ S BOSENSORY

- ❖ přímý kontakt se vzorkem
- ❖ měření v nádobce
- ❖ průtočná měření

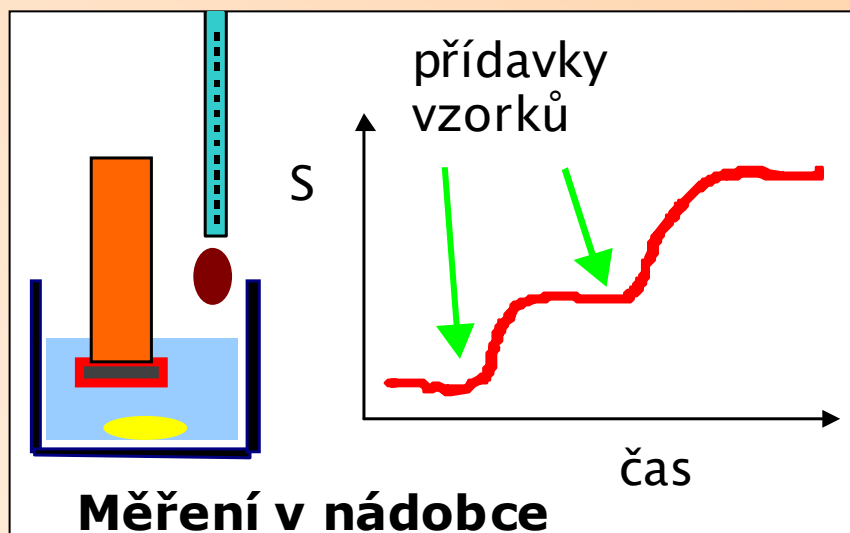
přímý kontakt se vzorkem



Biosensor se nachází přímo ve sledovaném prostředí (řeka, tkáň, krevní řečiště, fermentor) Přitom by jeho činnost neměla ovlivnit okolní prostředí (vyčerpáním analytu v důsledku měření, ovlivnění toku jiných látek).

Užitečné je měnit polohu biosensoru a tak získat dodatečné informace o distribuci analytu v prostředí a odhalit případné existující koncentrační gradienty.

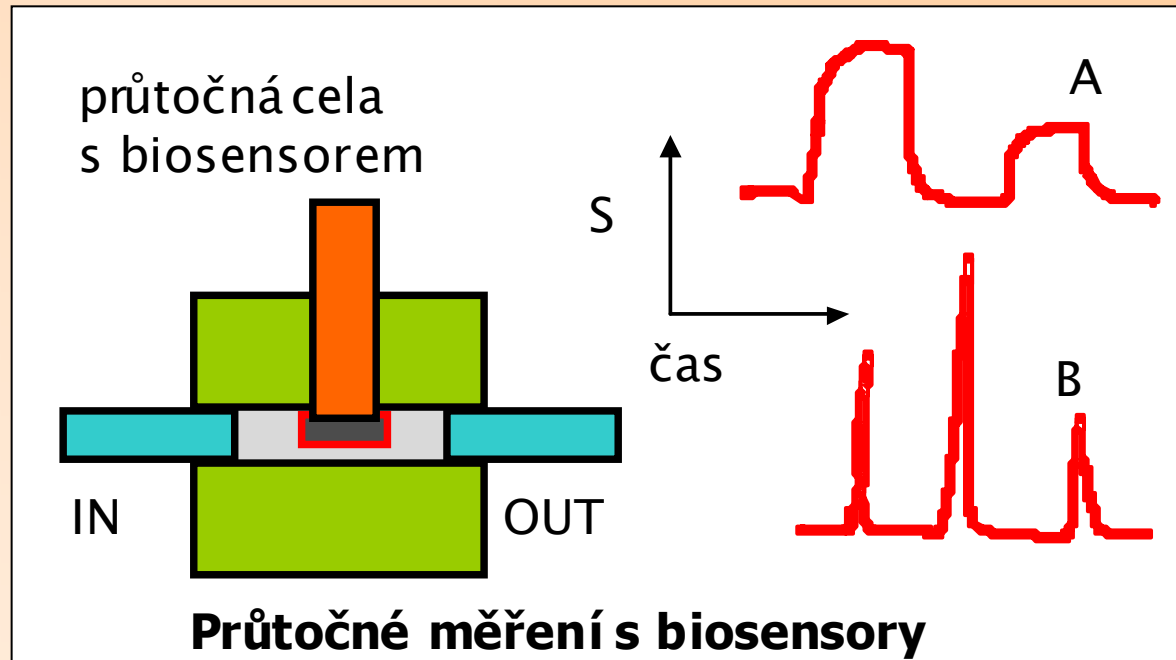
měření v nádobce



Nejprve se vyčká
ustavení pozadí signálu
v přítomnosti pracovního
roztoku.

Pak se přidá vzorek a po ustálení se odečte signál.
Přidavky vzorku lze opakovat. Někdy je možno celou nádobku
zaplnit vzorkem. Podmínky měření (druh a koncentrace pufru,
teplota, pH) je vhodné pro každý biosensor optimalizovat.
Jednoduché uspořádání, nenáročné na vybavení, nevýhodou je
potřeba manuální obsluhy.

průtočný systém



- ❖ Systémem se nechá střídavě protékat základní roztok a roztok vzorků. Signál je vyvolán neřaděným vzorkem
- ❖ Systémem neustále protéká pracovní roztok, do kterého jsou nastříkovány vzorky (flow injection analysis FIA). Přitom dojde k definovanému nařazení vzorku a signál má charakteristický tvar píků (B), vyhodnocení - výška nebo plocha

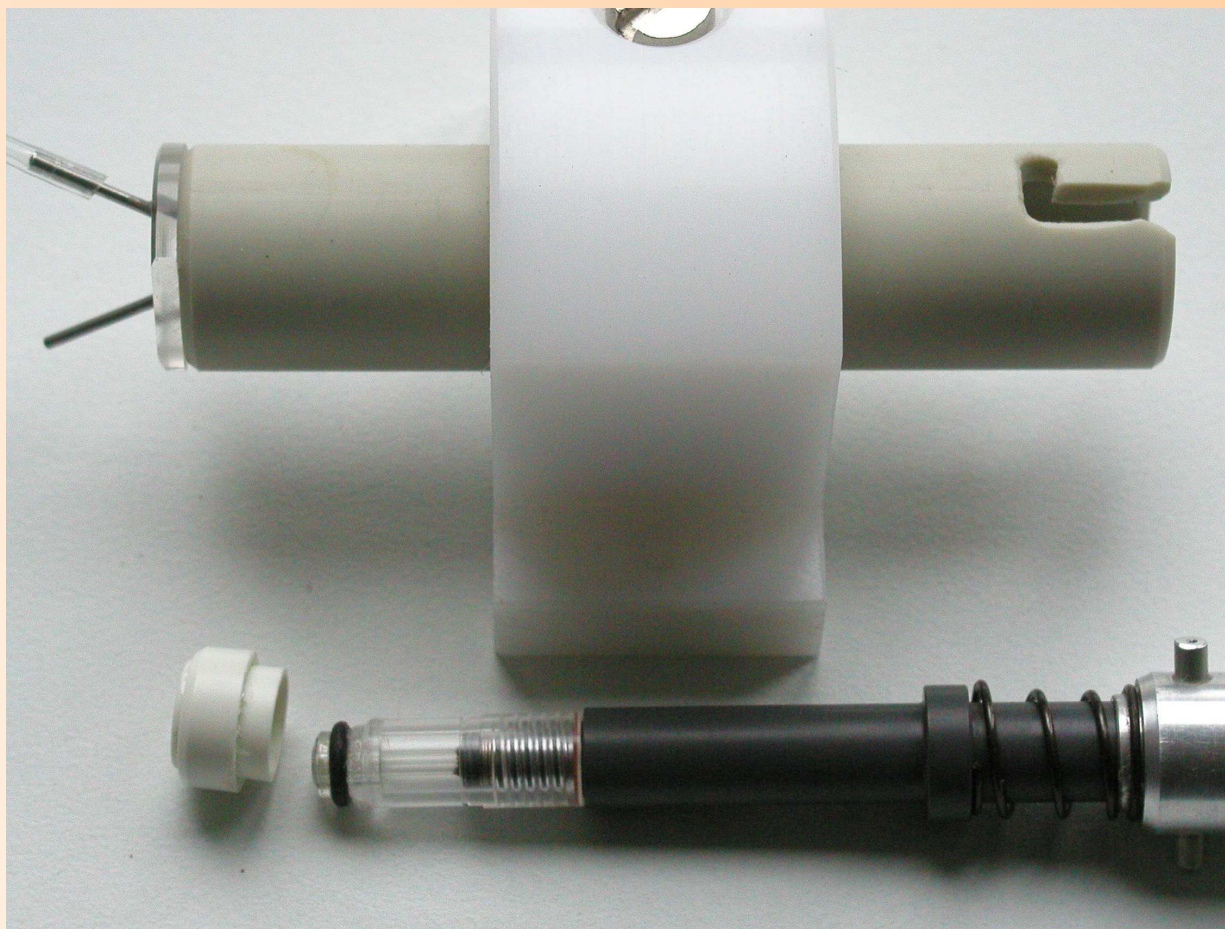
přístrojové vybavení na katedře biochemie

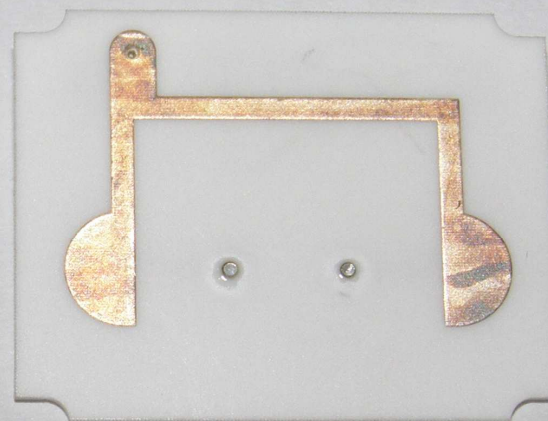


průtočná cela s peroxidovou elektrodou

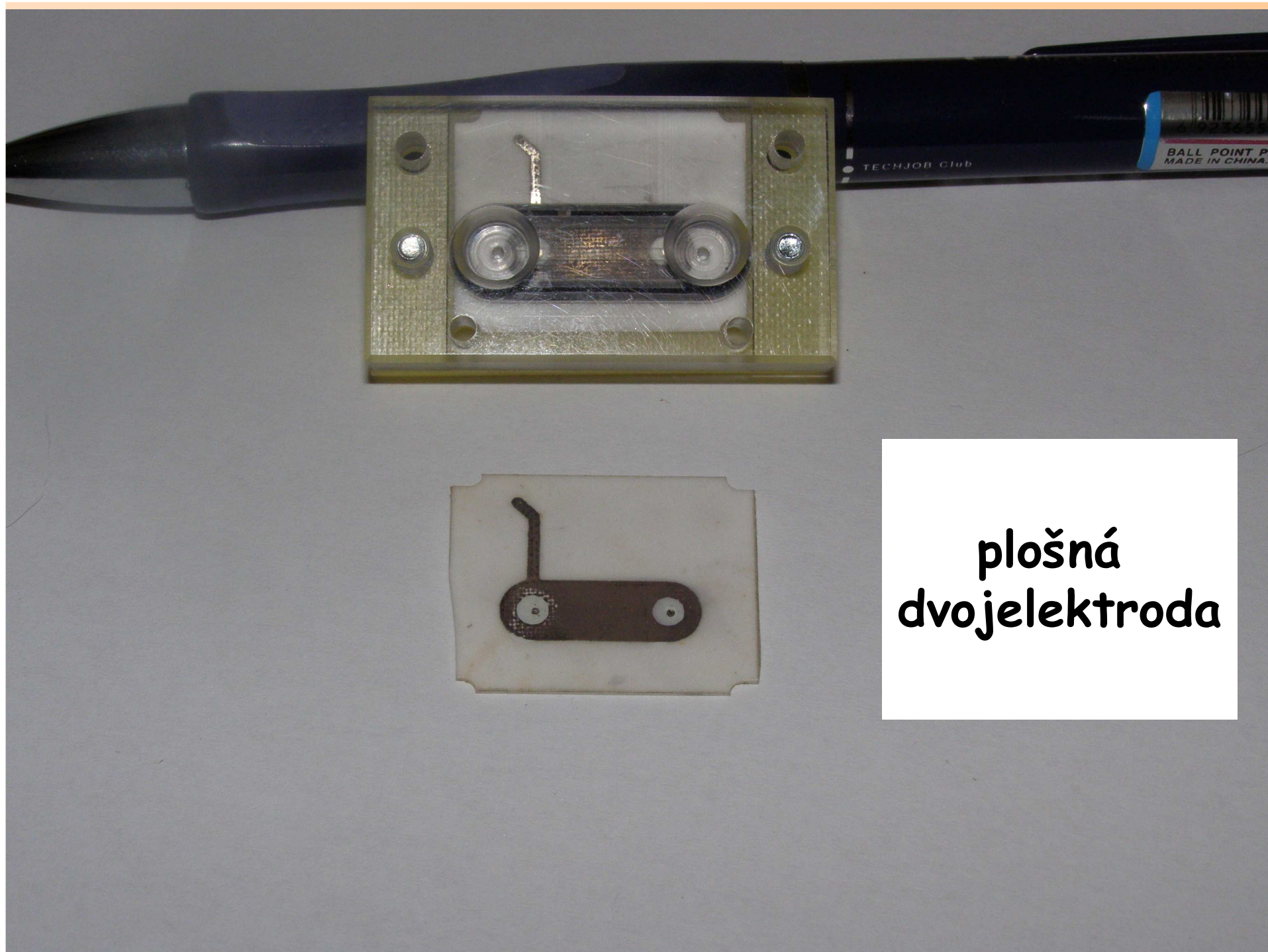


průtočná cela s kyslíkovou elektrodou

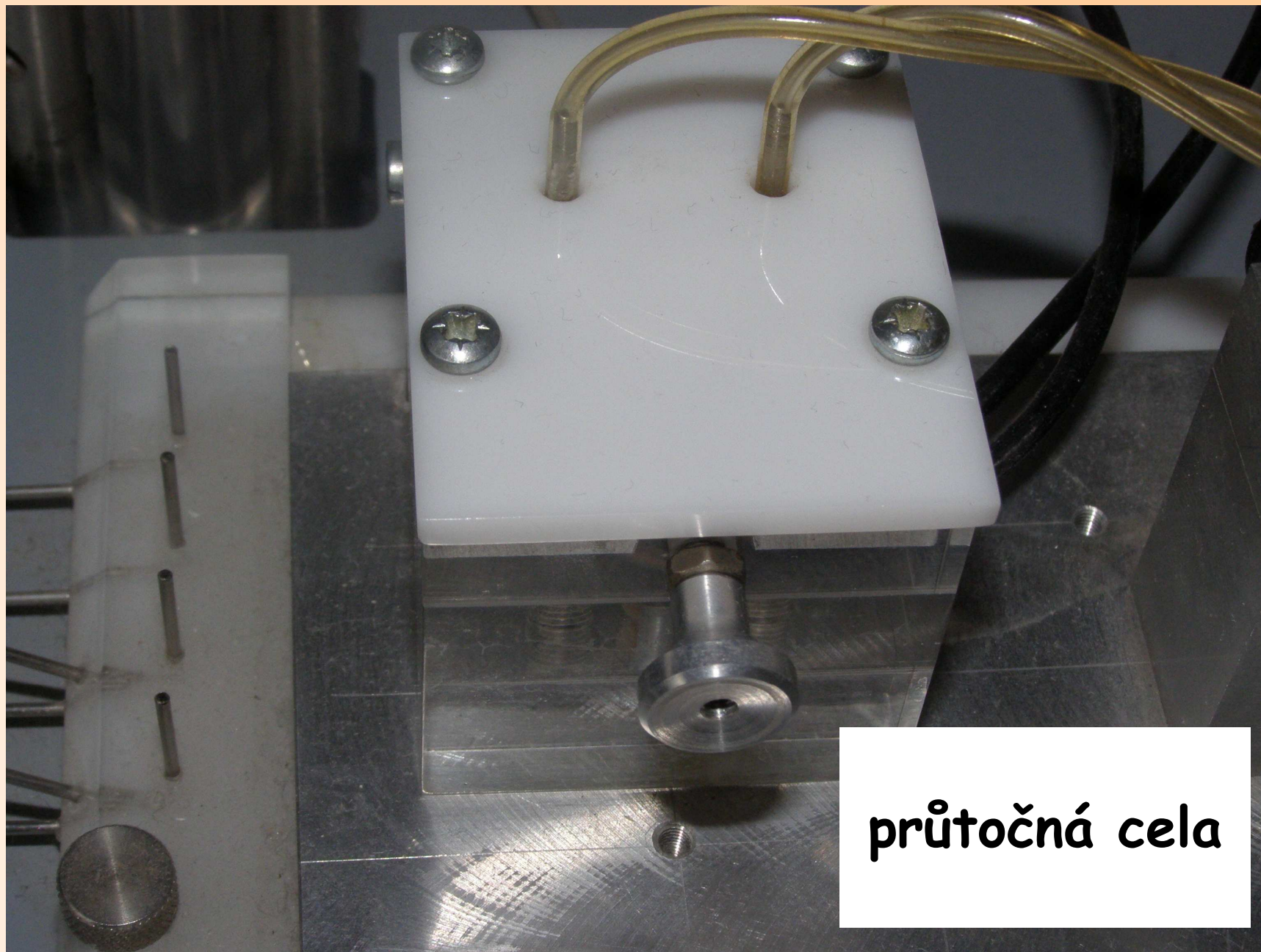




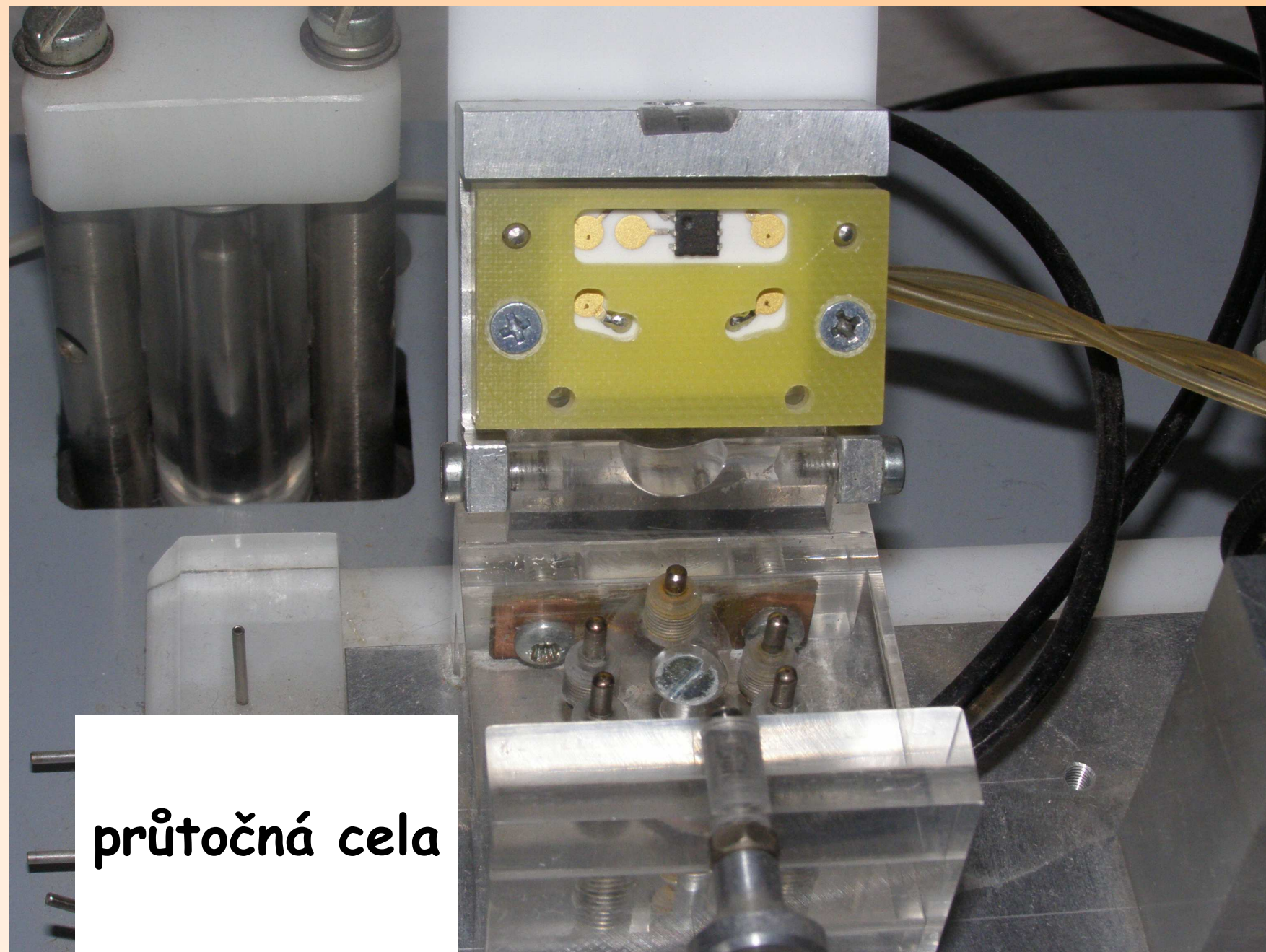
**plošná
dvojelektroda**



**plošná
dvojelektroda**



průtočná cela



průtočná cela