

PRŮTOČNÉ TECHNIKY

KOMERČNĚ DOSTUPNÉ
BIOSENSORY

Průtočné techniky

- ❖ nosná kapalina pro transport
 - vzorků
 - pomocných reagentů
- ❖ zrychlení a automatizace postupů
- ❖ techniky:
 - průtoková injekční analýza
 - mikrodialýza

Průtoková injekční analýza (FIA)

flow injection analysis

Růžička, Hansen

Princip: nástřik vzorku do toku nosného média
a jeho definované naředění – disperze

Disperzní faktor:

Je dán poměrem původní koncentrace vzorku
a maxima koncentrace v zóně vzorku procházející
detektorem.

$$D = \frac{C_0}{C_{\max}}$$

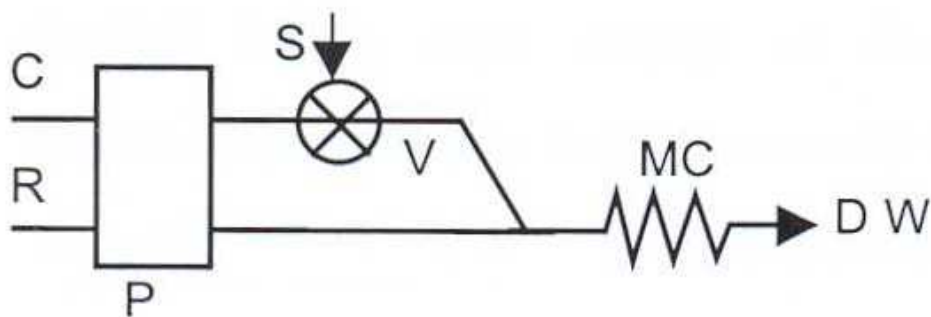
Velikost D se může lišit,
ale musí být zajištěna
reprodukovatelnost.

Systém FIA

- ✓ pumpa P
- ✓ vedení pro nosné medium C
- ✓ pomocný reagent R

SYSTÉM FIA

Po nástřiku vzorku *S* pomocí injekčního ventilu *V* se obě větve spojí a smíchají se v míchací smyčce *MC* (*mixing coil*) a nakonec prochází detektorem *D* do případného odpadu *W* (*waste*).



pumpa *P*
vedení pro nosné médium *C*
pomocný reagent *R*

Vedení kapalin:

hadičky o vnitřním průměru 0,5 až 1 mm

materiál: polypropylen
teflon
PVC
silikonová guma

Pumpa: peristaltická

Základem je krokový motor, který otáčí diskem, který má na obvodu několik otočných válečků – rolerů.

Ty při svém pohybu tlačí na pružnou hadičku, a tak vytlačují kapalinu.

Výsledný tok je mírně pulzující (způsobeno odvalováním rolerů).

Hladký tok se dosáhne:

- ✓ zvýšením otáček pumpy (30 rpm)
- ✓ větší počet rolerů 2 min (4 až 10)
- ✓ odbočka tvaru T s kapalinou

Hadička pumpy: silikonu
tygonu (průhledné PVC)

Průtok je určován: průměrem hadičky
rychlostí otáček

Zvýšení životnosti hadičky: promazáním silikonovým olejem
(zároveň se zmenší pulzy
a ohřev)

Pumpa: lineární pístová
bezpulzní
ale podstatně dražší

Průtoky (*flow rate*) : 0,1 až 5 ml/min
rychlost je závislá na průměru
hadičky

Práce s organickým rozpouštědlem:

může narušovat hadičky v pumpě, lze použít uzavřenou láhev naplněnou organickou fází, která se vytlačuje do systému vodou přitékající z pumpy.

Spojovací komponenty:

pro spojování trubiček navzájem
nebo spojení s ventily nebo detektory

Spojky pro mísení dvou toků:
tvaru Y, T nebo W

Ventily:

k nástřiku vzorku
používá se šesticestný dvoupolohový ventil se smyčkou pro nanesení vzorku. Změnou polohy se smyčka zařadí do hlavního toku média

Materiál: nerez v kombinaci s teflonem

Provedení nástřiku:

- ✓ ručně
- ✓ elektricky ovládané ventily solenoidní s krokovým motorem
- ✓ pneumatické - umožňují automatizaci průtočného systému

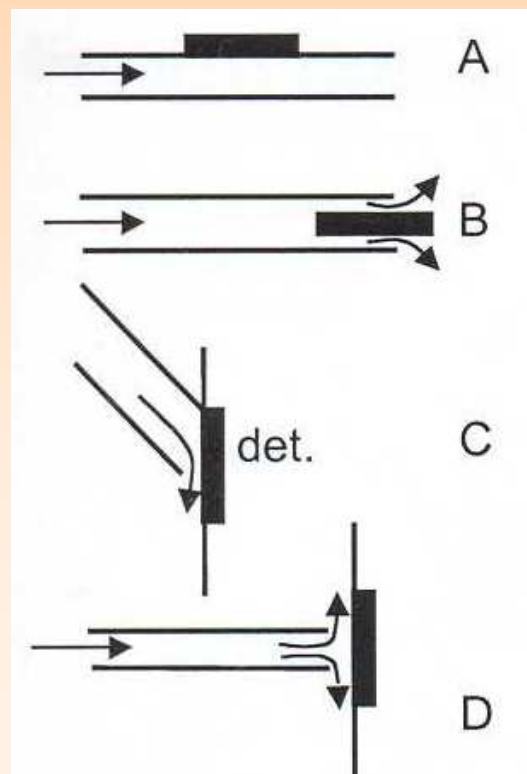
Detektor

průtočný

- 1) klasický: chemický- fotometrický, fluorometrický
nebo elektrochemický
- 2) přímo biosensor

Poloha detektoru vůči proudícímu médiu:

- A: detektor paralelně s tokem média (*wall embedded*)
- B: detektor umístěný v ústí trubičky (*end-on sensor*)
je využíván při elektrochemické detekci, jedno nebo více vodivých uhlíkových vláken
- C: kaskádové
- D: wall-jet cela



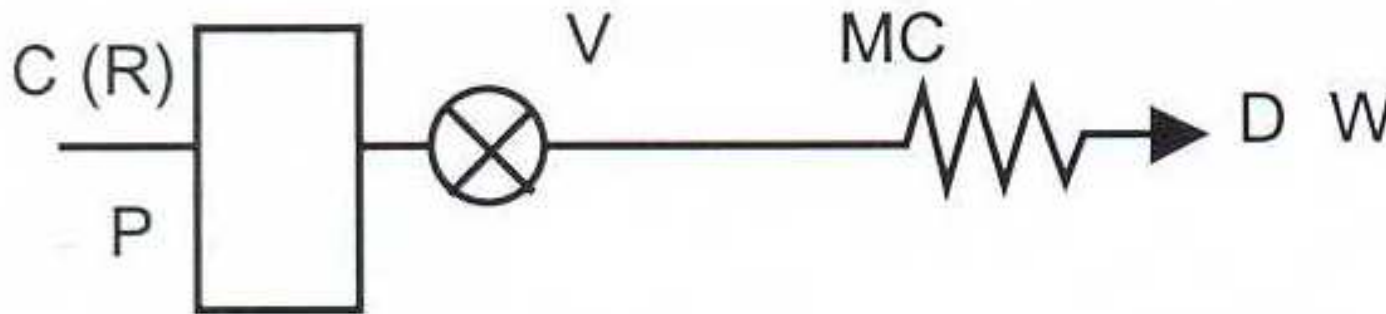
Poloha detektoru vůči proudícímu médiu:

- ✓ jednolinkové uspořádání (*single line*)
- ✓ dvoulinková konfigurace (*two-line*)
- ✓ Merging zones
- ✓ reverse FIA
- ✓ naředění v komůrce
- ✓ zone sampling
- ✓ sampling splitting
- ✓ hydrodynamický nástřik
- ✓ titrace pomocí FIA
- ✓ reverse flow
- ✓ splitted flow - rozdělení vzorku na dvě linie
- ✓ stopped flow - zastavení toku

Jednolinkové uspořádání (*single line*)

nástřik ventilem V může být automatizován přidáním
druhé pomocné pumpy
nosným médiem může být vhodný pufr
specifickým detektorem - vlastní biosensor

Pracovní mody FIA

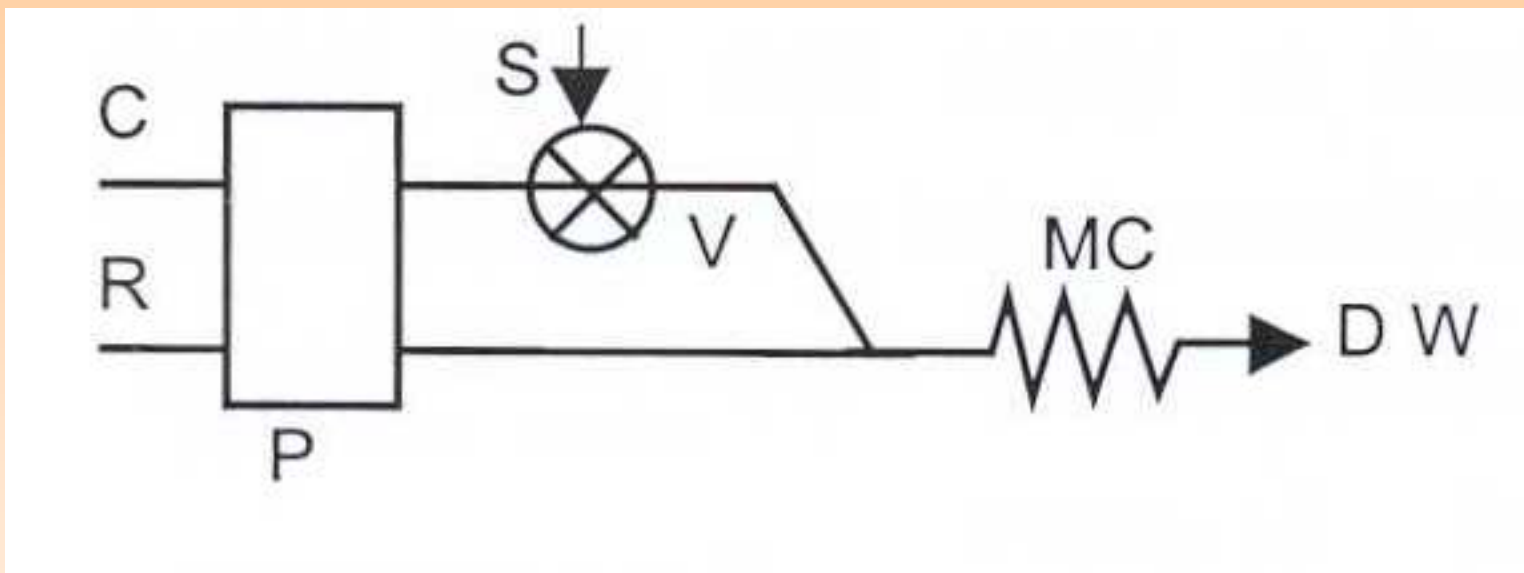


Místo míchací smyčky - **enzymový reaktor** spojený s nespecifickým detektorem

-

- ✓ vhodné pro enzymy s malou specifickou aktivitou
- ✓ životnost reaktoru je vyšší než enzymové vrstvy
- ✓ lze použít odlišné podmínky pro biochemickou reakci a pro vlastní detekci, které se připraví přimísením vhodného pufru za výstup z reaktoru
(např. pH blízké optimu enzymu a pro detekci zvýšit pH pro detekci amoniaku)

Dvoulinková konfigurace (*two-line*)



Merging zones

Jednou pumpou se dvěma ventily se nastřikují zóna vzorku a zóna reagentu do dvou nosných médií, které se poté smíchají.

Význam:

používá se v případě drahého reagentu (NADH) vyžaduje synchronizaci obou ventilů.

Reverse FIA

vzorek dostupný v dostatečném množství se nasává do jedné linie kontinuálně, do druhé se může nastříkovat reagent.

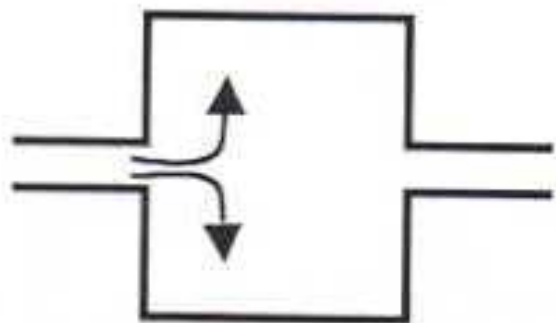
Naředění v komůrce

Běžně lze D ovlivňovat v rámci jednoho řádu ($D=3-20$) (rychlost průtoku, průměr trubiček, objem vzorku, atd.)
Větší naředění lze dosáhnout v míchací komůrce

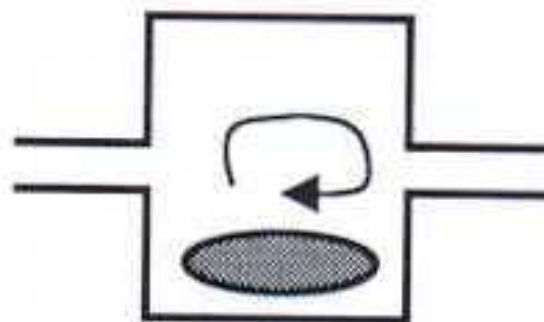
(*mixing chamber*)

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.



pasivní



aktivní
(s míchadlem)

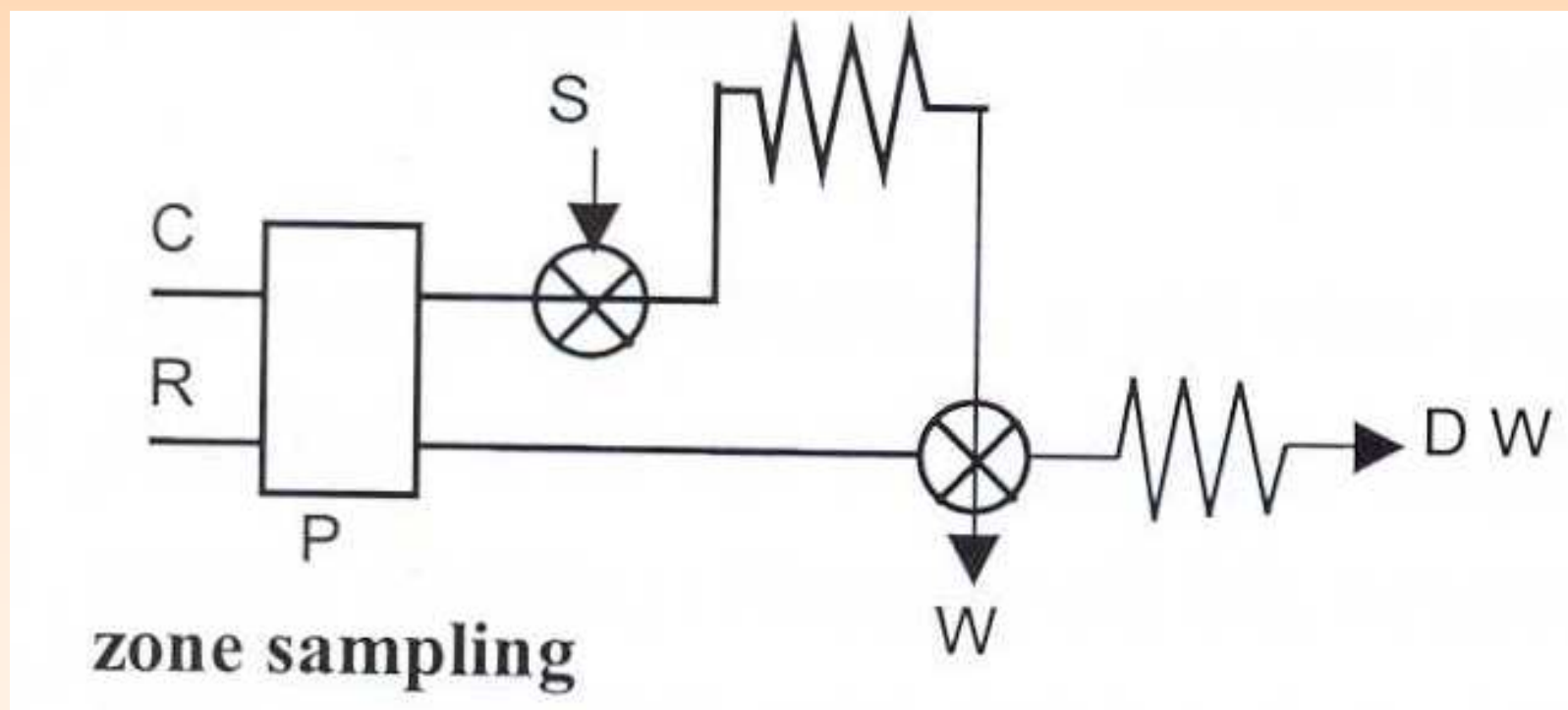
bez

s komůrkou
plochy píků stejné
ale „ocásek“ (tail)



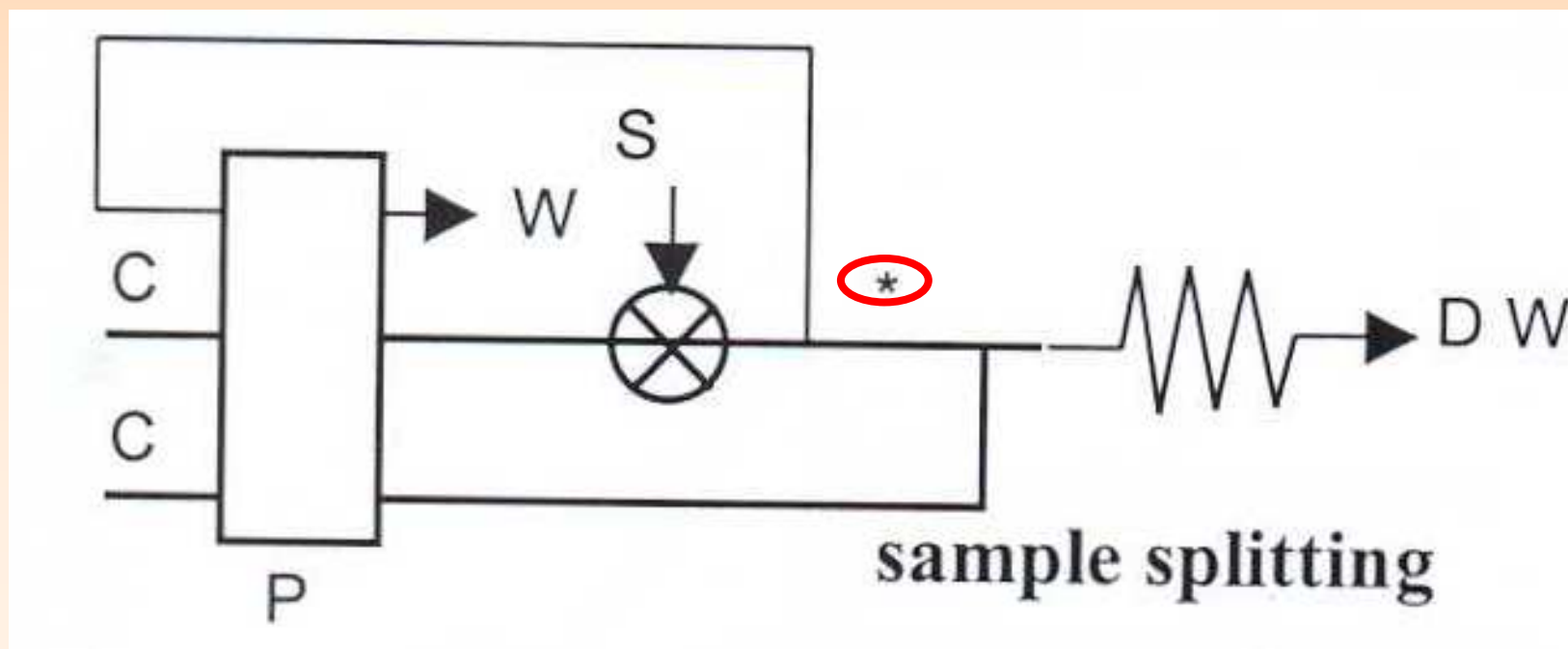
Zone sampling

Metoda využívá opakovaný nástřik nejprve vzorku a pak jeho naředěné zóny.
Rozhodujícím faktorem je časování obou ventilů.
Lze dosáhnout až 1000x naředění.



Sampling splitting

Zóna nastříknutého vzorku se částečně odvádí pryč. Kritické místo (hvězdička) existuje mezi body odvětvení zóny se vzorkem a místa napojení druhé linie (merging), je zde nízká rychlost průtoku, která má podstatný vliv na dosažené zředění.

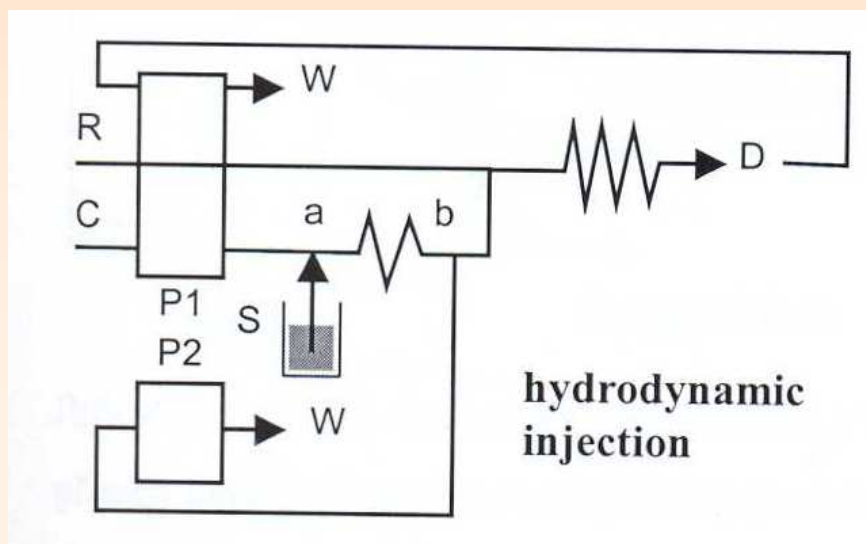


Hydrodynamický nástřik

Nanesení vzorku pomocí dvou pump:

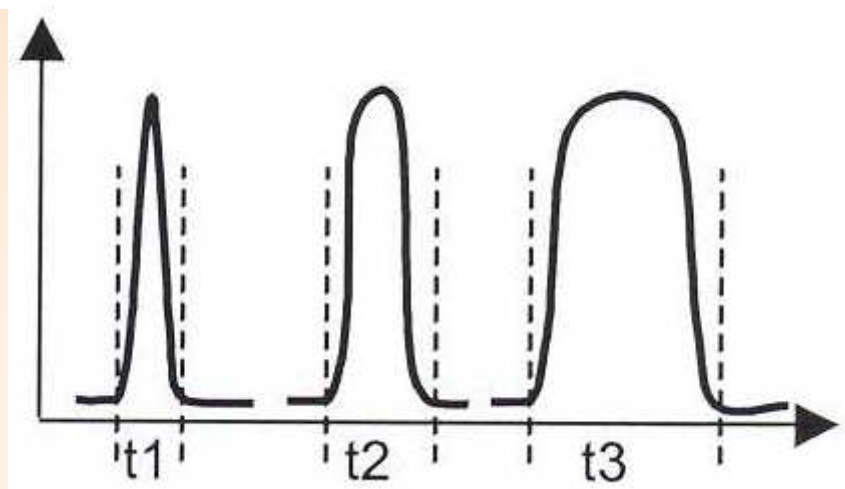
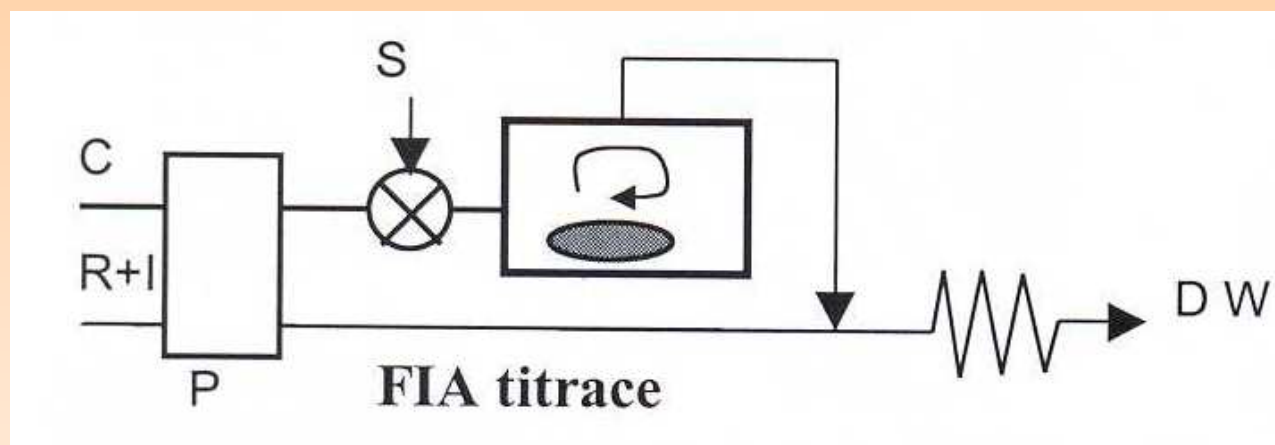
Při kombinaci P1 on, P2 off pracuje systém v obvyklém uspořádání. Při přepnutí pump (P1 off P2 on) se nasaje zóna vzorku do smyčky mezi body a,b, přitom je zablokován zpětný tok zavedením výstupu z detektoru do odpadu přes pumpu P1, ta při zastavení tuto i další linie uzavře, P2 pak nasává vzorek.

Po návratu do výchozího stavu (P1 on, P2 off) se zachycená zóna vzorku pohybuje dále v systému. Přesnost dávkování je dána časováním obou pump.



Titrace pomocí FIA

Vzorek se nastříkne do linie s míchací komůrkou, poté se měří plocha píku odpovídající jedné barvě indikátoru. Doba do odbarvení pak určuje spotřebu činidla potřebnou k dosažení bodu ekvivalence



Reverse flow

Zahrnuje zpětný tok zóny vzorku zpět z detektoru.
Do detektoru nevstupuje závěrečná roztažená část píku,
a měřený pík je symetrický (stejná část se zaznamenává
dvakrát)

Splitted flow - rozdělení vzorku na dvě linie

z nichž jedna projde reaktorem.

Před vstupem do detektoru se obě větve spojí, přičemž na záznamu se objeví dvě maxima.

Příklad: stanovení dvou reagentů vedle sebe:

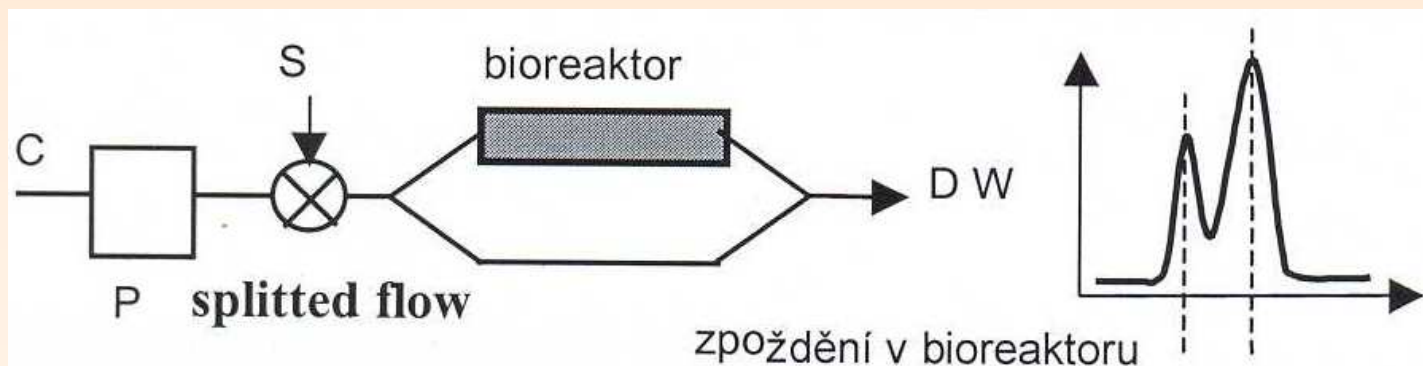
Stanovení sacharosy a glukosy:

detektor je biosensor s glukosoxidasou

V bioreaktoru je imobilizována invertasa a mutarotasa

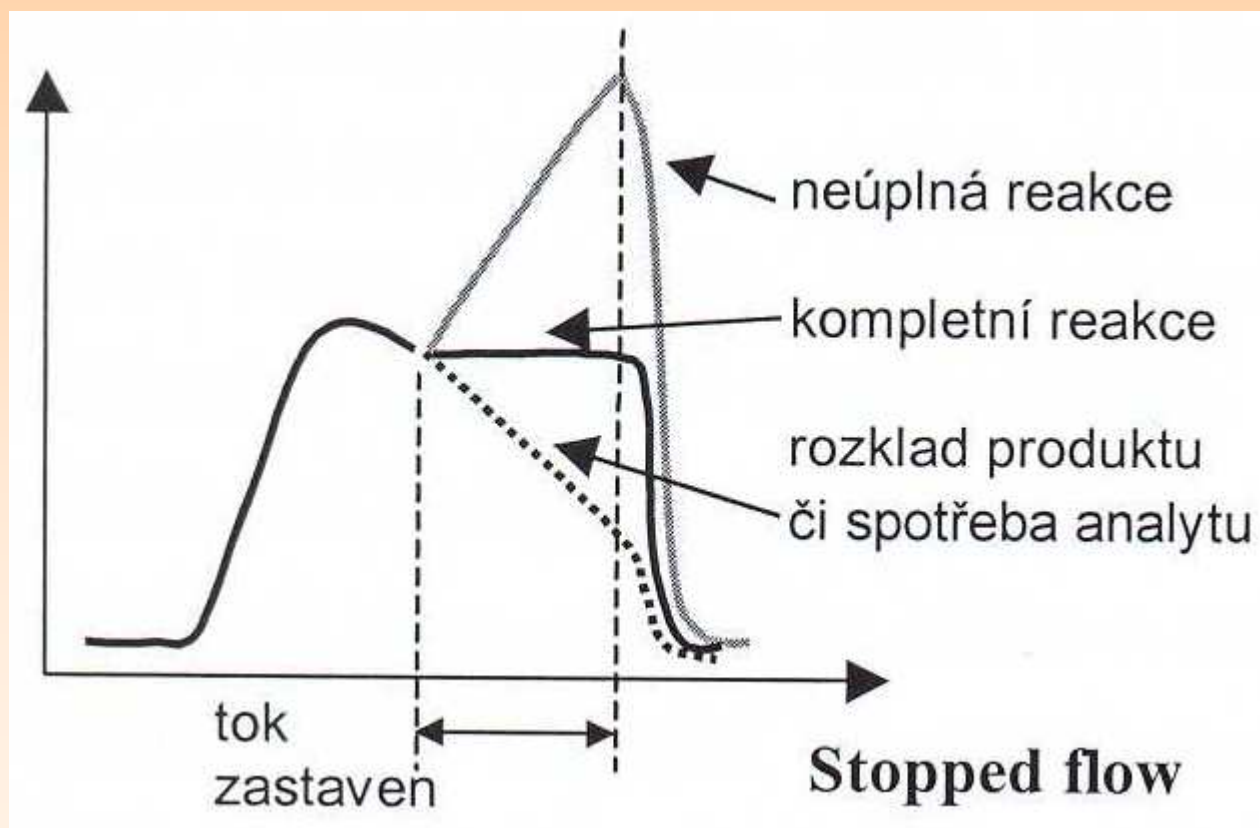
První pík odpovídá volné glukose, druhý pak navíc glukose vzniklé v reaktoru ze sacharosy.

Podobně při reakcích vzniká amoniak a volný amoniak ve vzorku.



Stopped flow - zastavení toku

v době, kdy zóna vzorku je v detektoru, může poskytnout cenné informace o dějích v detektoru (biosensoru). Podle tvaru záznamu lze usuzovat na reakční průběh.

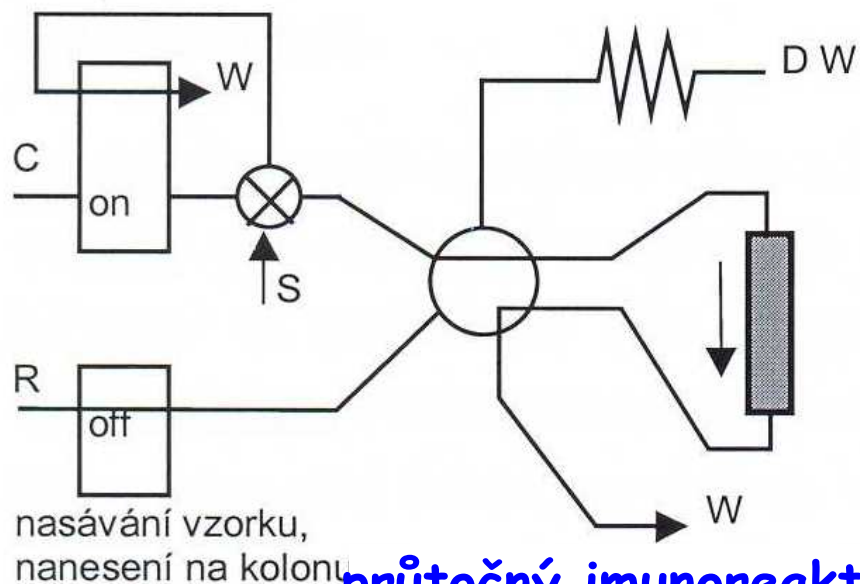


Průtočné techniky v imunochemických stanoveních

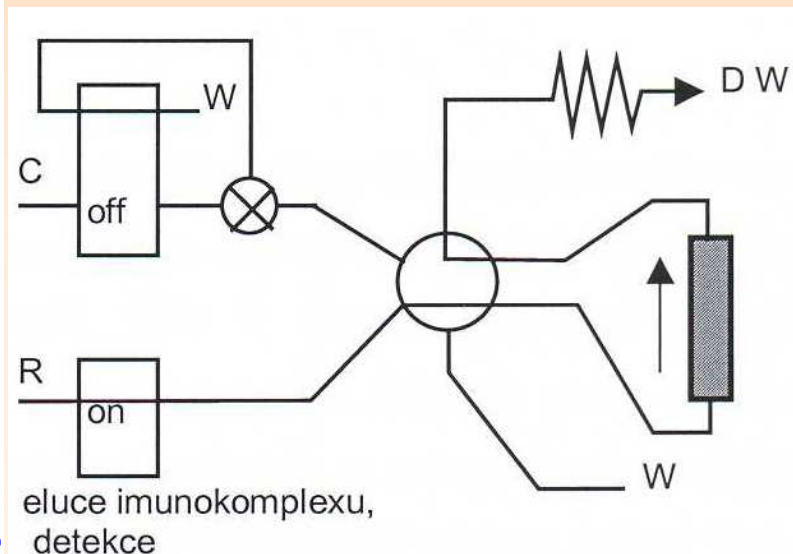
Přinášejí zrychlení analýz a zlepšení reprodukovatelnosti výsledků díky opakované regeneraci téhož imunospecifického nosiče.

Je používán komplikovaný systém.

Nejjednodušší varianta:



průtočný imunoreaktor



Komerčně dostupné biosensory

- ✓ první komerční biosensor-1972
enzymová elektroda pro stanovení krevní glukosy
fa Yellow Spring Instruments
- ✓ osobní glukometr - 1987
glucoPen
fa MediSense
- ✓ dnes: desítky firem, biosensory pro řadu analytů

Firmy produkující biosensory

Yellow Springs Instruments (Ohio, USA)

Fuji Electric (Tokyo)

Seres (Francie)

Do programů biosensorů jsou zapojeny další mezinárodní firmy:

Ciba-Geigy

Hoffman-La Roche

Bayer

Boehringer

Abbott Laboratories

Pharmacia

Eppendorf

Největší komerční úspěch:

osobní glukometry Pen 2 a Companion 2
za MediSense

roční prodej 200 milionů USD, 10% celosvětových
nákladů na stanovení glukosy

uplatnění biosensorů v řadě oblastí...

Oblasti využití biosensorů

- ❖ Klinická oblast (stanovení glukosy u diabetiků)
- ❖ Potravinářství a fermentační průmysl
- ❖ Ochrana životního prostředí
- ❖ Vojenská a bezpečnostní oblast
- ❖ Bioafinitní systémy pro výzkum

Klinická oblast

- ✓ stanovení prováděná v **centralizovaných** nemocničních laboratořích *in vitro*
lukrativní trh roční objem 9 mld dolarů
(část analýz zastoupená biosensorovými systémy)
- ✓ **decentralizované** uplatnění biosensorů v ordinacích lékařů, operační sály, nemocniční pokoje, sportovní medicína
- ✓ uživatelské aplikace určené **široké veřejnosti** jsou limitovány, výjimku tvoří pouze:
 - osobní glukometry
 - těhotenské testy
 - stanovení alkoholu

in vivo aplikace jsou směřovány na výzkum umělého endokrinního pankreatu

- problémy s biokompatibilitou
- stabilita signálu
- spolehlivost

navíc nejsou dořešeny legislativní a etické aspekty praktické aplikace těchto zařízení

Stanovení glukosy u diabetiků

Středem zájmů klinické biochemie je měření hladiny glukosy u diabetiků.

Diabetes mellitus (cukrovka)

hyperglykemie

metabolická acidóza

glykosurie

Diabetes mellitus je chronické endokrinní a metabolické onemocnění, vznikající v důsledku nedostatečného působení insulinu.

Dva typy onemocnění cukrovkou:

- ✓ **insulin-dependentní diabetes mellitus (IDDM)**

četnost 3 až 7 případů na tisíc osob)

Je charakterizována sníženou nebo prakticky chybějící produkcí insulinu, takže pacienti musí přijímat denně insulin v injekčních dávkách

- ✓ **insulin-independentní diabetes mellitus (NIDDM)**

Pacienti na vlastní nebo injekčně podaný insulin nereagují (rezistence).

Vznik a vývoj komplikací tohoto onemocnění je spjat s porušenou regulací hladiny krevní glukosy

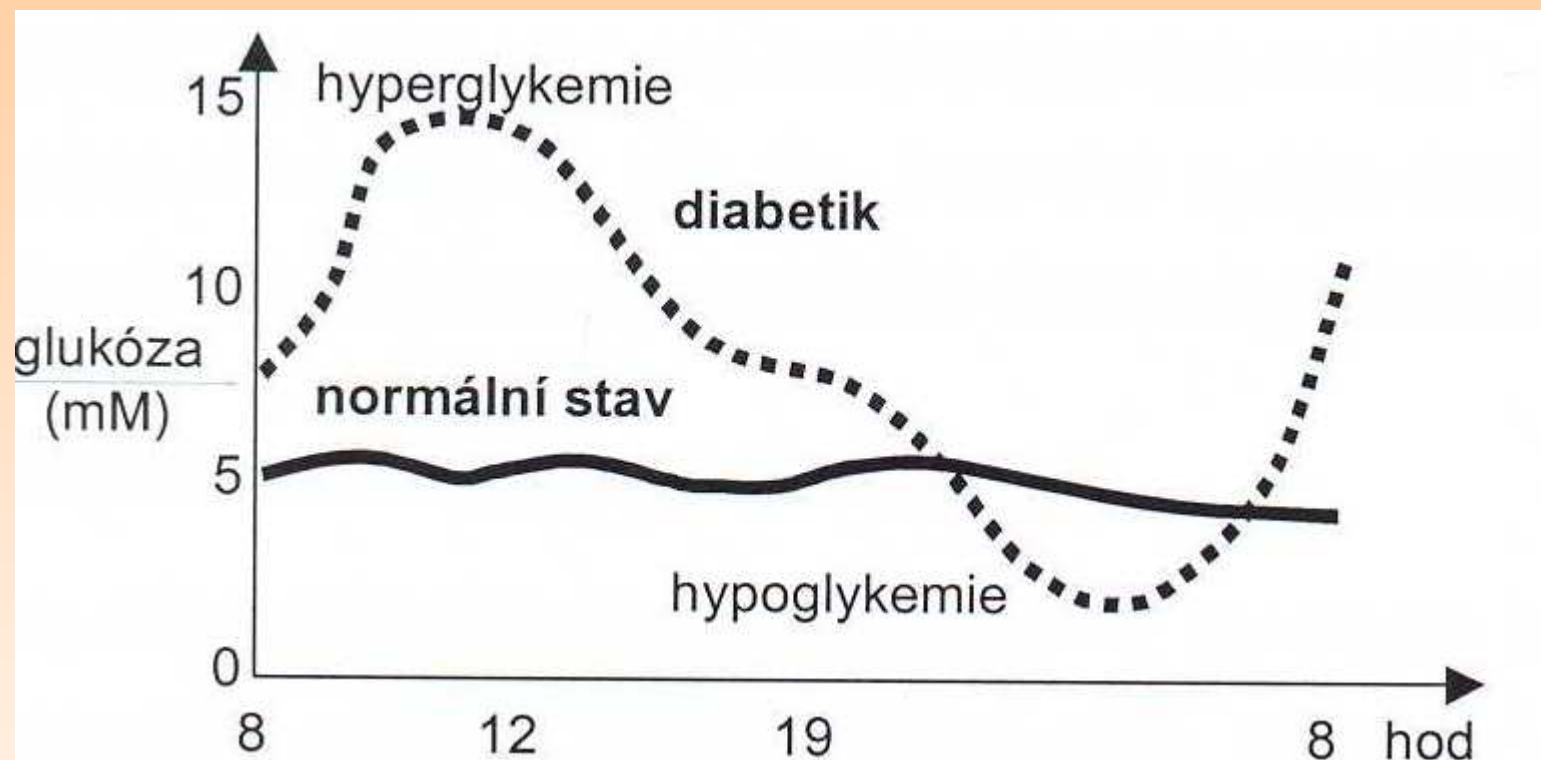
Hladina glukosy u zdravého člověka:

Je udržována mezi 4,4 až 6,6 mM pomocí zpětné vazby -nárůst koncentrace glukosy po jídle, stimuluje rychlé uvolnění inzulínu, který umožní vstup glukosy dovnitř buněk a současně zabrání její tvorbě v játrech.

Hladina glukosy u diabetika:

Regulace je porušena a musí se docílit vnějším podáváním inzulínu. Dávkování však vyžaduje znalost aktuální hladiny glukosy, takže pacienti jsou nuceni si několikrát denně měřit glykemii.

Denní průběh hladin krevní glukosy



snídaně oběd večeře spánek snídaně

Osobní elektrochemické biosensory pro měření glukosy

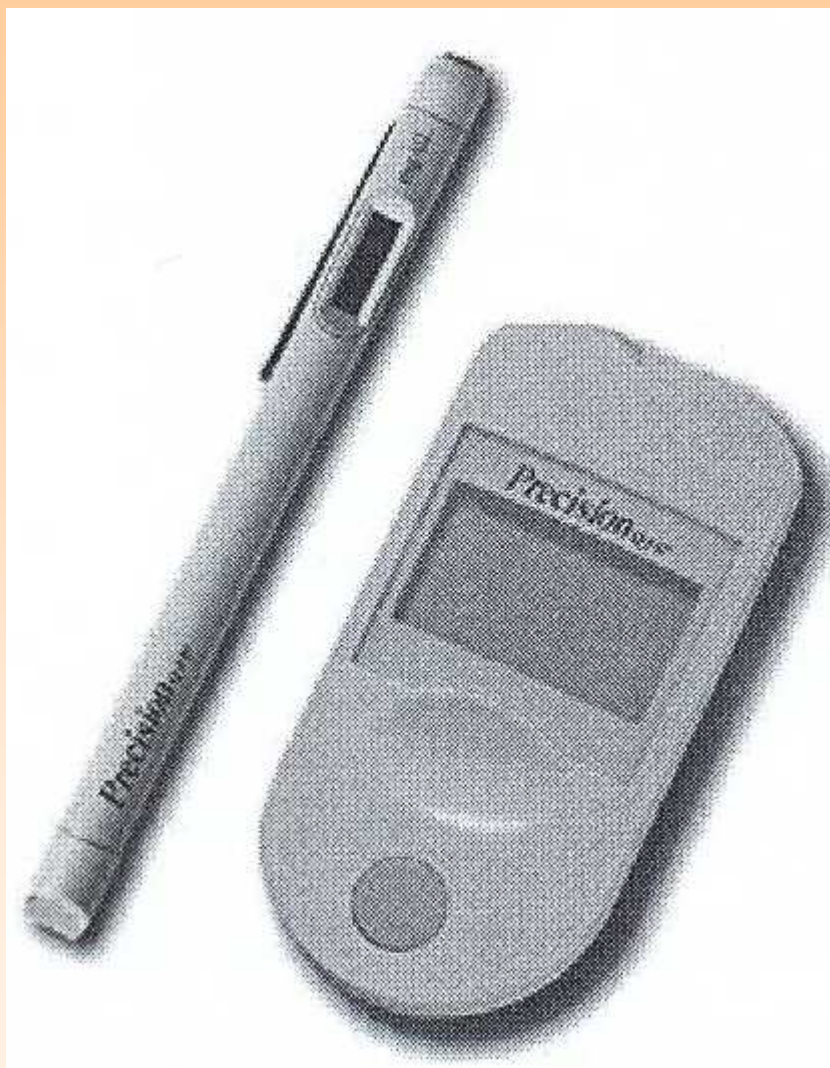
První osobní glukometr fa MediSense na bázi výměnného elektrochemického biosensoru.

Exac Tech velikost psacího pera a zasunovaly se do něj měřící pásky na jedno použití.

Companion formát karty

Dnes MediSense patří do skupiny Abbott Laboratories a současný glukometr má název Precision QID.

Oproti předcházejícím typům potřebuje pro analýzu 5 μ l krve, takže pacient je méně zatěžován.



**Osobní glukometr fy MediSense
Exac Tech - velikost pera
další verze - velikost karty**

Glukometry dalších firem:

Elite (3 μ l krve) od fy **Matsushita** a **Kyoto Daiichi Kagaku**
(distribuce firmou Bayer)

Accu-Chek Advantage fy **Boehringer Mannheim**
nevyužívá na rozdíl od ostatních k výrobě páskových biosensorů síťotisk, ale originální vícevrstvou laminátovou technologii.

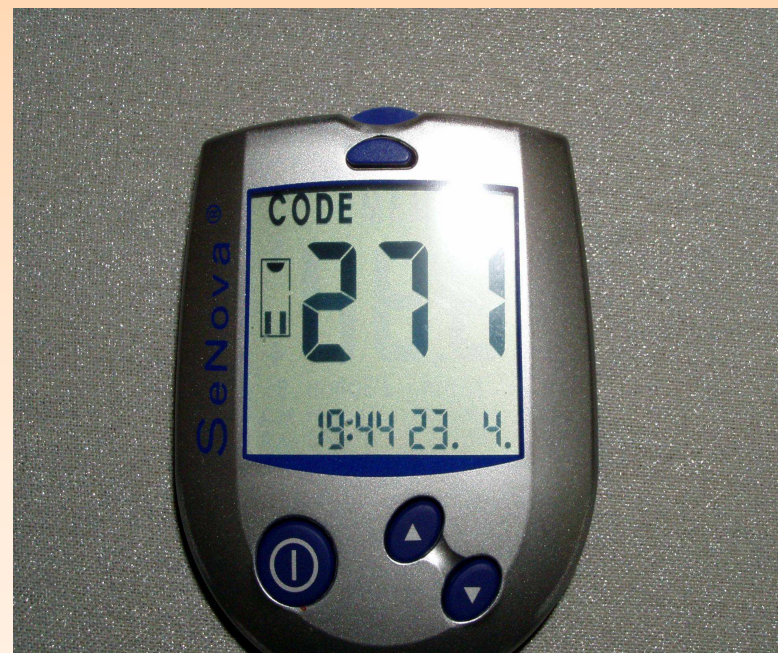
Encore fy **Bayer** - reflektometrický systém

Hlavní cíl: implantovatelný glukosový biosensor pro měření *in vivo*, který by přímo řídil pumpu dávkující kontinuálně inzulin podle okamžité potřeby pacienta.

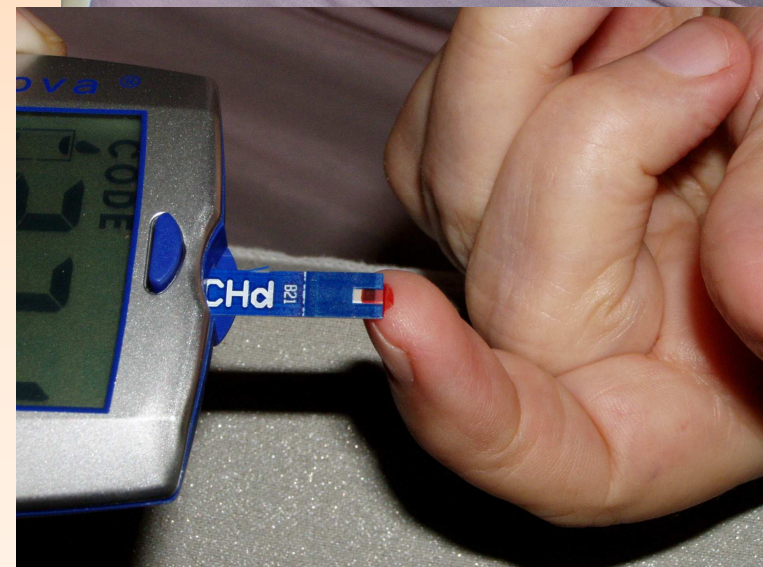
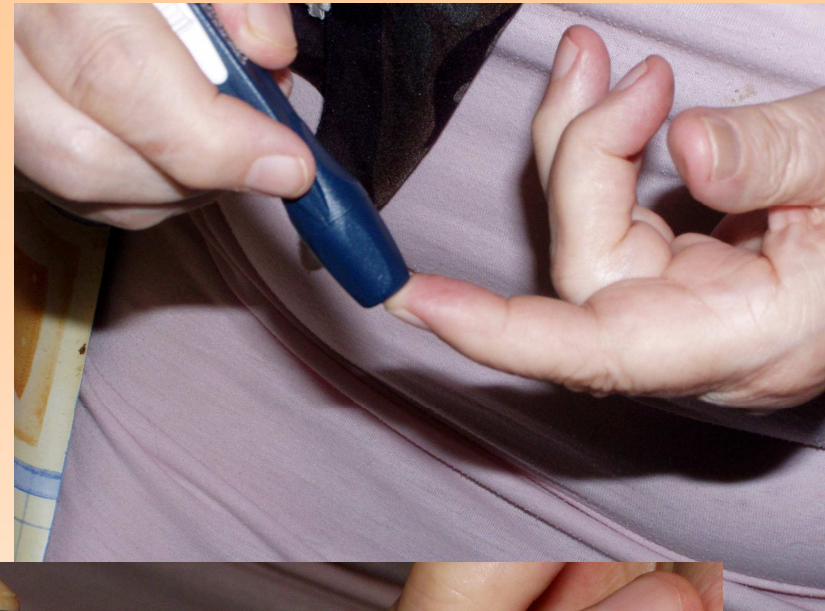
Výsledky jsou nadějně, po implantaci fungují biosensory až 100 dní, komerční systém zatím není k dispozici.

Problémy: spolehlivost, nedostatečná operační stabilita.

OSOBNÍ GLUKOMETR V PRAXI



Jak postupovat?



Výsledek a jak jej řešit.....





Britská společnost
**Cambridge Sensors
Limited (CSL)**

1991 odštěpení
Od institutu biotechnologií
v Cambridge

James Mc Cann -
největší podíl na výrobě
biosensoru MediSense
(1980).

fa MediSense byla v 1996
prodána fě **Abbott
Laboratiries**

za 870 mil USD.

Dovozce

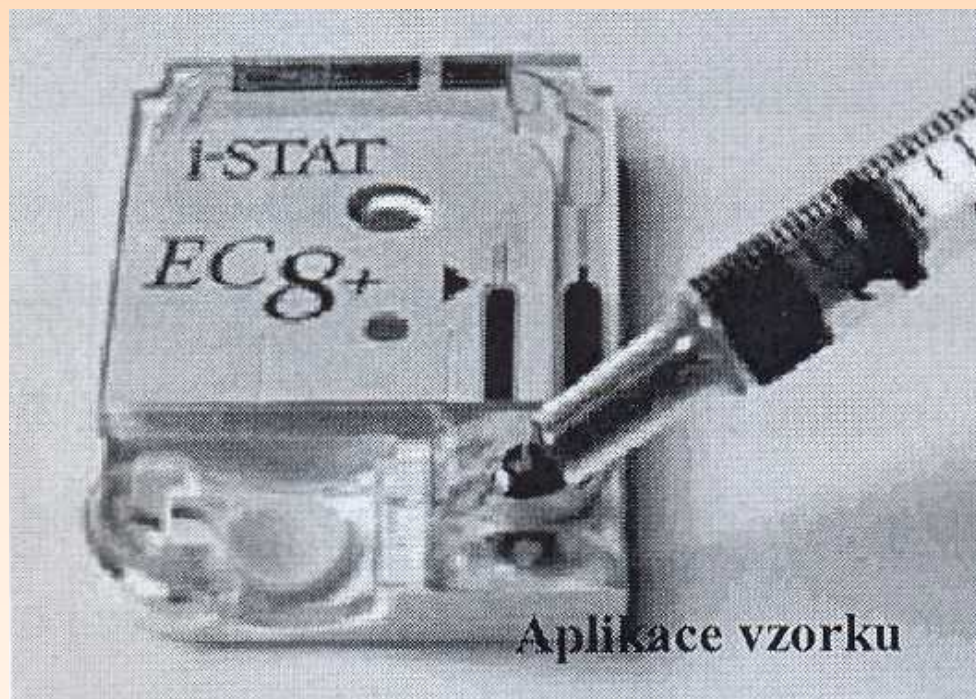
A.Import.cz spol. s r.o.
Praha

Laboratorní analyzátory s biosensory

První měřil pouze glukosu, dnes měří celou řadu klinicky významných analytů.

Název	Výrobce	Analyty (glukóza +)
AUTOSTAT	Daiichi (Japonsko)	
EBIO Plus	Eppendorf / BST (Německo) ⁵⁹	laktát, citrát, askorbát, ...
Enzymat	Seres (Francie)	sacharóza, alkohol, ...
ESAT	PGW Medingen (Německo)	laktát
EXSAN	(Litva)	laktát
GLUCO	Fuji Electric (Japonsko)	
i-Stat	I-Stat Corp. (USA) ⁶⁰	močovina
Model 860	Ciba Corning (USA)	
NOVA 16	Nova Biomedical (USA)	močovina, kreatinin
Satellite G	MediSense (USA)	
YSI SELECT	Yellow Springs Instruments (USA) ⁶¹	laktát, etanol, cholin, ...

i-STAT - ruční přístroj,
analýza v místě odběru vzorku
multikanálový elektrochemický biosensor, poskytuje
informace o klíčových látkách, analyzovaných obvykle
v krizových situacích pacientů.
Základní modul na jedno použití obsahuje měřící sensory,
zásobní roztok standardu a prostor pro nakápnutí vzorku
krve.



i-STAT měří sodík, draslík, chloridy, oxid uhličitý, pH, močovinu, glukosu a hemokrit.

Program pak dopočítá další parametry např. koncentrace hemoglobinu, přebytek bází apod.

Hlavním kritériem při vývoji bylo minimalizovat možnost chyb způsobených uživatelem.

(ten naplní pouze otvor pro vzorek krve a zasune modul do přístroje)

Přístroj poskytuje výsledky srovnatelné kvality jako centrální laboratoř.

- ✓ původně nemocnice
- ✓ ordinace praktických lékařů a veterinářů
- ✓ na palubě raketoplánů.

Potravinářství a fermentační průmysl

Potenciálně mnohem větší trh by mohl existovat v potravinářství.

Ale menší zisky v této oblasti, jak v klinice, snižují ochotu investovat do nákladných analytických systémů. Nová legislativa v oblasti kontroly kvality potravin by mohla vést k rozvoji biosensorů v této oblasti.

Systemy:

- ✓ on line systém - analyzující kontinuálně odebírané vzorky
- ✓ off line systémy - kontrola čerstvosti potravin

Nejčastěji stanovované analyty:

- ✓ Stanovení vitamínů
- ✓ Detekce bakteriální kontaminace
detekce bakterií Midas Pro od fy Biosensori (Itálie)
- ✓ Hodnocení kvality produktů - umělá náhrada
smyslových orgánů, tzv. „elektronický nos“ a
„elektronický jazyk“
(speciální biosensory (biorekogniční složkou -lipid)
jako parametr slouží komplexní odezva více parametrů)

Ochrana životního prostředí

výhoda: přenosné systémy

- ❖ vodohospodářství- znečištění vodních toků a pitné vody. Monitorovací systémy využívají celé buňky, které reagují na širokou škálu toxických látek (**on line**)
Off line systémy se využívají při detekci jednotlivých škodlivin.
Vyvíjejí se automatické imunochemické systémy, které jsou schopné stanovit paralelně několik analytů zároveň.
- ❖ BOD -biologická spotřeba kyslíku, lze zkrátit na několik minut. (fa Nisshin Electric - Japonsko 1983)
- ❖ Imunosensory pro stanovení pesticidů.

Vojenská a bezpečnostní oblast

- ❖ Biosensorové monitory pro osobní použití
- ❖ Mobilní polní detekční systémy

Vojensky významné analyty:

- ✓ chemické a biologické zbraně
- ✓ stanovení výbušnin ve vojenských cvičných prostorech
- ✓ detekce drog při celních kontrolách

Chemické zbraně

Bojové otravné látky ze skupiny nervově paralytických sloučenin (sarin, soman).

Inhibují cholinesterasu, což se využívá v detekčních systémech na bázi biosensorů.

Detektor NAIAD od fy **Thorn EMI**, využívá průběžnou elektrochemickou kontrolu aktivity imobilizované cholinesterasy.

Miniaturizovaný biosensor tohoto typu pro osobní použití se vyvíjí také u nás.

Perský záliv (1991)

Útok na tokijské metro (1995) -sarin

Biologické zbraně

- ✓ souvislost s válkou v Iráku (Saddámův režim)
obava z biologických zbraní
- ✓ zneužití biologických zbraní teroristy

BioDetektor vyvinutý společně americkou armádou a firmou ETG (Environmental Technologies Group) Pracuje na bázi vícekanálového LAPS systému. Je mobilní a dovoluje stanovit až 8 vybraných biologických bojových prostředků.

MiniFlo detekce bakterií a virů na bázi kombinace cytometrie a specifického fluorescenčního značení. Armádní laboratoře dokončují miniaturizovaný přenosný systém pro **detekci specifických sekvencí DNA** nebezpečných mikroorganismů.



BioDetektor - vyvinutý americkou armádou a firmou ETG.

Pracuje na bázi vícekanálového LAPS systému.

Bioafinitní systémy pro výzkum

BIAcore systém SPR - rezonance povrchových plazmonů.
fy **Pharmacia**.

Univerzální biosensor pro studium afinitních interakcí biomolekul pro praktické stanovování látek.

(konkrétní požadavky musí realizovat každý sám, imobilizací konkrétní biorekogniční vrstvy)

IASys rezonanční zrcadlo fy **Affinity Sensors** (VB)

BIOS-1 - mřížkový optický sensor fy **Asi** (Švýcarsko)

Bio Tul -fy **BioTul**, Německo na bázi SPR

IBIS - fy **XanTec**, Německo/HongKong

Ceny: 50 tisíc USD (BioTul)

300 tisíc USD (BIAcore) podle stupně automatizace.

PZ 108 - piezoelektrický systém fy **Universal Sensors** (USA)

QCM-D - **Q-Sense** (Švédsko) Ceny:10 tisíc USD.

Biosensory posledních 20 let

Soustředěnost do dvou hlavních oblastí:

- ✓ stanovení nízkomolekulárních látek v klinické praxi
zejména stanovení hladiny glukosy u diabetiků
- ✓ bioafinitní systémy (novější oblast)
optické systémy na bázi světlovodů
- ❖ prosazuje se miniaturizace a komerční výroba biosensorů
- ❖ v poslední době se biosensory prosazují také
v životním prostředí a potravinářském průmyslu.

Biosensory - výhled do budoucnosti

- miniaturizace sensorů
- výrobní techniky
- příprava a chemické modifikace povrchů sensorů
- vývoj nových materiálů
- příprava a značení konjugátů
- proteinové inženýrství
- hledání nových enzymů
- stabilizační postupy
- biokompatibilita
- kinetika a modelování

Nové technologické postupy v oblasti mikroelektroniky (sítotisk a litografie)

konstrukce mikrokanálků (průtočné biosensory
na křemíkovém čipu)

mikromotory

mikropumpy

integrované planární světlovody (optické afinitní sensory)

Výhody miniaturizace:

minimální objem vzorku a potřebných chemikálií (i drahé)

větší rychlost analýz

přesnější zařízení

další zmenšení pod 10 nm - nanotechnologie

Významné změny v oblasti afinitních biosensorů.

- ✓ jeden z reakčních partnerů se označí enzymem nebo fluoreskující molekulou
- ✓ přímé sledování bioafinitních interakcí v reálném čase, ale tato optická zařízení značně nákladná, vhodná pouze pro laboratorní použití, cenově dostupné pouze piezoelektrické sensory

Přímá komunikace mezi bílkovinou a převodníkem
přenos elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou. V budoucnu se bude více vycházet z krystalografické struktury enzymů. Lze naplánovat kudy může elektron v biomolekule nejsnáze projít a podle toho enzym orientovaně navázat na elektrodový povrch.

Využití nukleových kyselin na poli biosensorů

V poslední době narůstá potřeba stanovovat oligonukleotidové sekvence bakteriálního, virového nebo lidského původu v klinické praxi.

S postupem sekvence lidského genomu se objevují nové sekvence odpovědné za vrozené poruchy.

Technika molekulárních otisků „molecular imprinting“

Spočívá v polymeraci vhodných monomerů v přítomnosti ligandu (analytu), který má být rozpoznán.

ve struktuře polymeru se specifickým uskupením postranních funkčních skupin monomerů vytvoří kolem ligandu vazebné místo držené pohromadě strukturou polymeru i po uvolnění ligandu („zapamatování“).

Tzv. „umělé protilátky“

