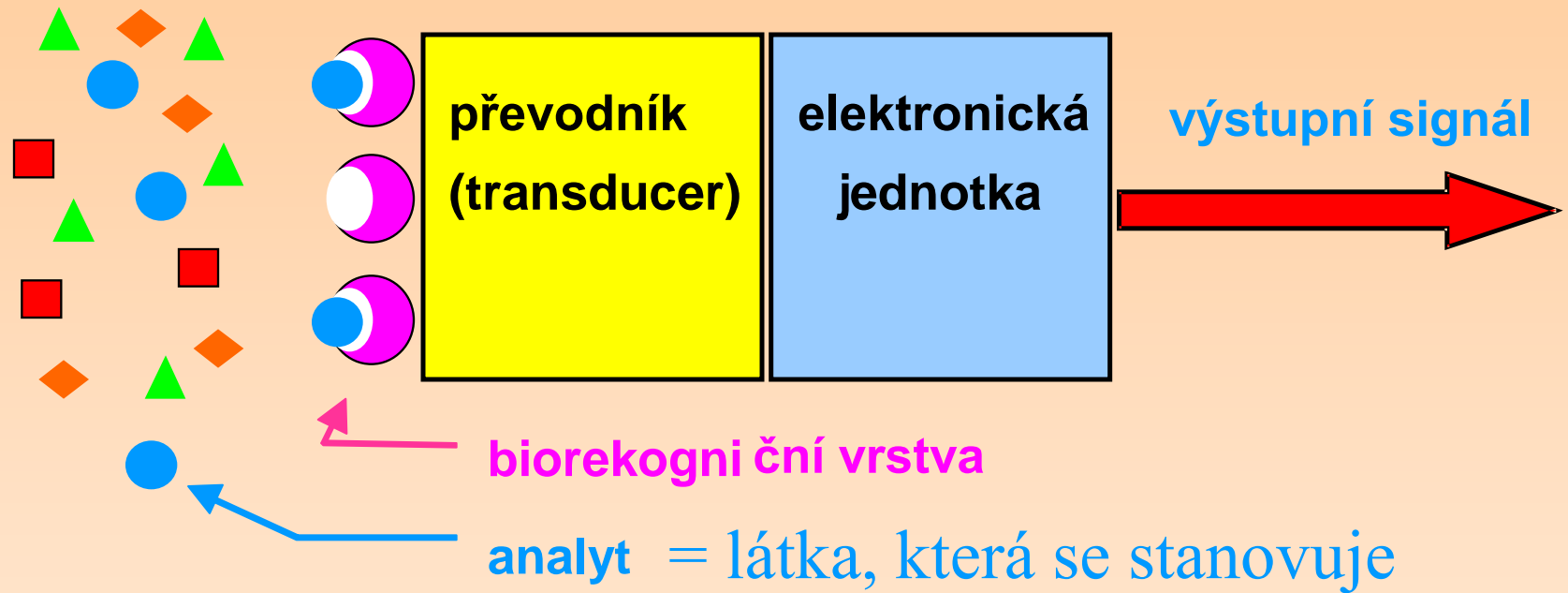


IMUNOSENSORY

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:

- ✓ biokatalytické (enzym)
- ✓ bioafinitní (afinitní vazba – Ab, hormon, receptor)

Převodníky:

- ✓ elektrochemické
- ✓ optické
- ✓ akustické a piezoelektrické
- ✓ kalorimetrické

Bioafinitní sensory:

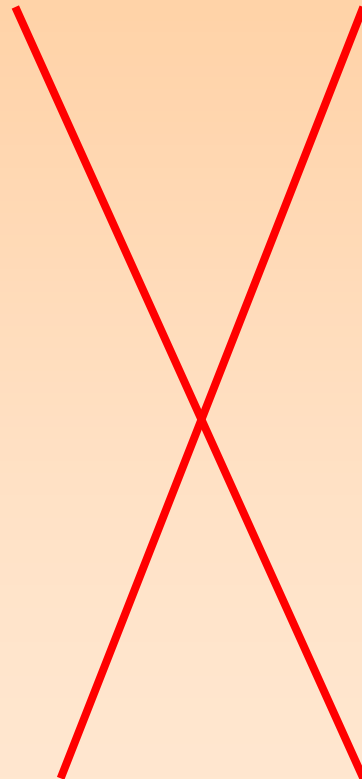
využívají jako biorekogniční složku biomolekuly, které jsou schopné specificky vytvářet komplex s analytem, který je strukturně komplementární k vazebnému místu imobilizované biomolekuly.

TYPY AFINITNÍCH INTERAKCÍ

Molekulární reakce mezi:

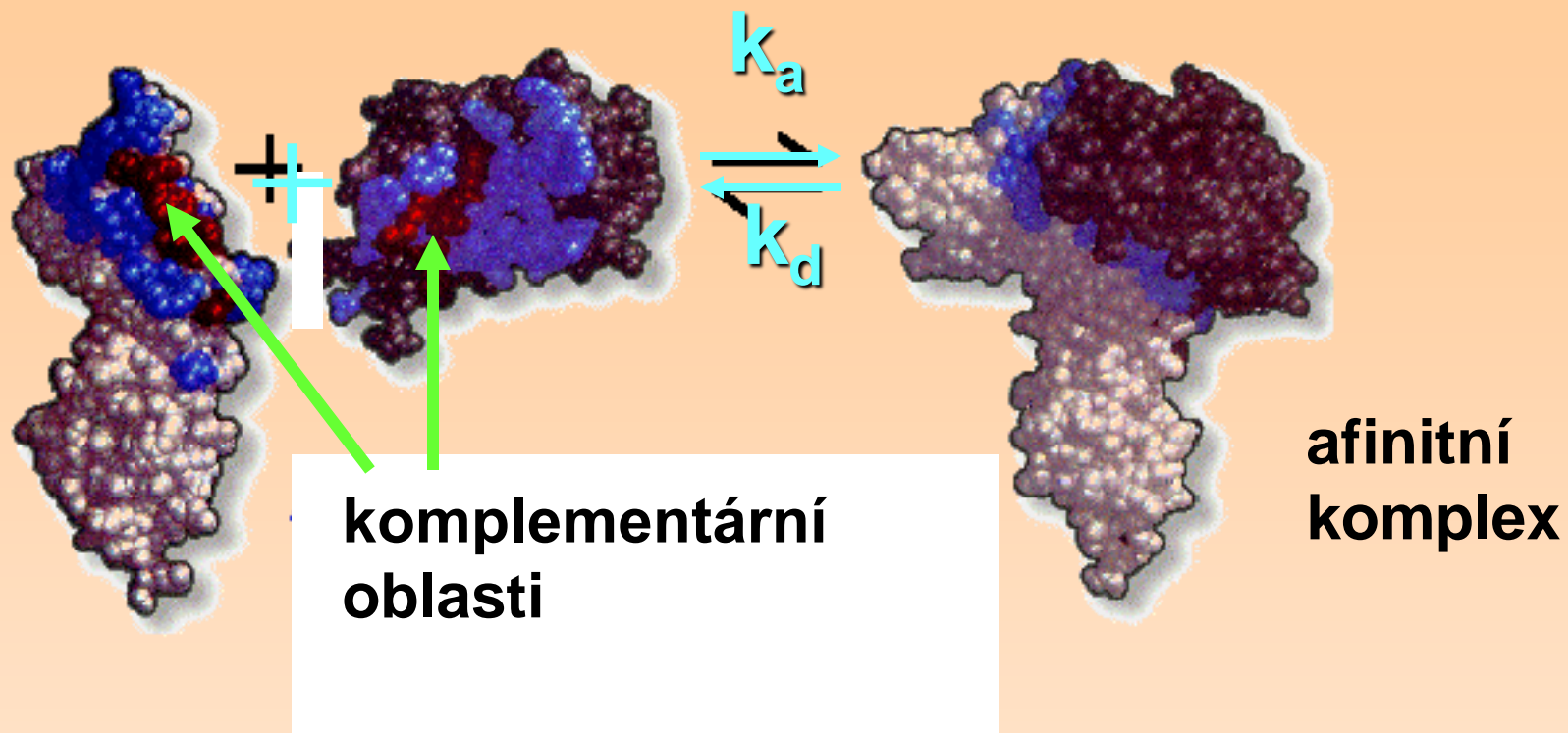
ANTIGEN
HORMON
LÉČIVO
ENZYM

RECEPTOR
NUKLEOVÁ KYSELINA
NUKLEOVÁ KYSELINA



PROTILÁTKA
RECEPTOR
RECEPTOR
KOFAKTOR
(SUBSTRÁT,
INHIBITOR)
MIKROORGANISMUS
VAZEBNÁ BÍLKOVINA
KOMPLEMENTÁRNÍ
ŘETĚZEC

Afinitní interakce



Kinetické konstanty:

k_a ... asociační rychlostní konstanta

k_d ... disociační rychlostní konstanta

$K_A = k_a/k_d$ asociační rovnovážná konstanta

Rozdělení afinitních sensorů

✓ **přímé afinitní biosensory**

vznik biokomplexu je možné sledovat **přímo** v průběhu afinitní interakce (v reálném čase)

převodníky:

- optické světlovodné systémy
- piezosensory
- impedimetrická zařízení

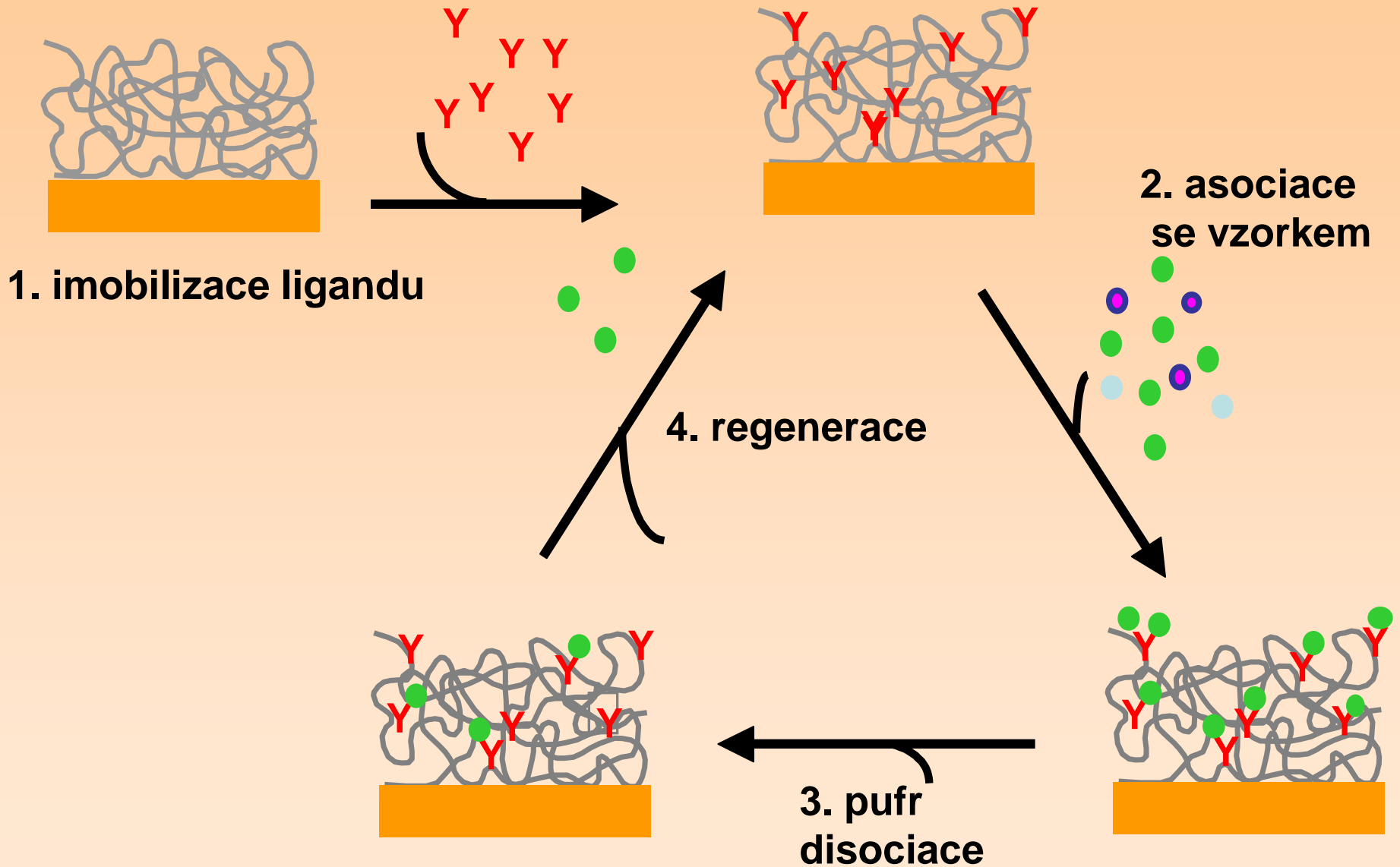
✓ **nepřímé afinitní biosensory**

jeden z **afinitních partnerů** je vhodně **označen**, na konci interakce se pak stanoví množství značky navázané na povrchu sensoru

podle typu značky (enzym nebo fluorofor) se použije **převodník** vhodný pro měření enzymové aktivity nebo fluorescence

Přímé afinitní sensory

Schéma měření



PŘÍMÁ METODA

- ✓ vznik biokomplexu průběžně v reálném čase bez pomoci značek
- ✓ rozvoj telekomunikačních technologií na bázi světlovodu (nelineární optika)

Jeden reakční partner je imobilizován na povrchu převodníku, druhý je volně v roztoku, průběžně se sleduje vazba na citlivém povrchu.

Měřený signál odráží pouze změny na povrchu sensoru a v jeho těsné blízkosti.

Přímé imunosensory

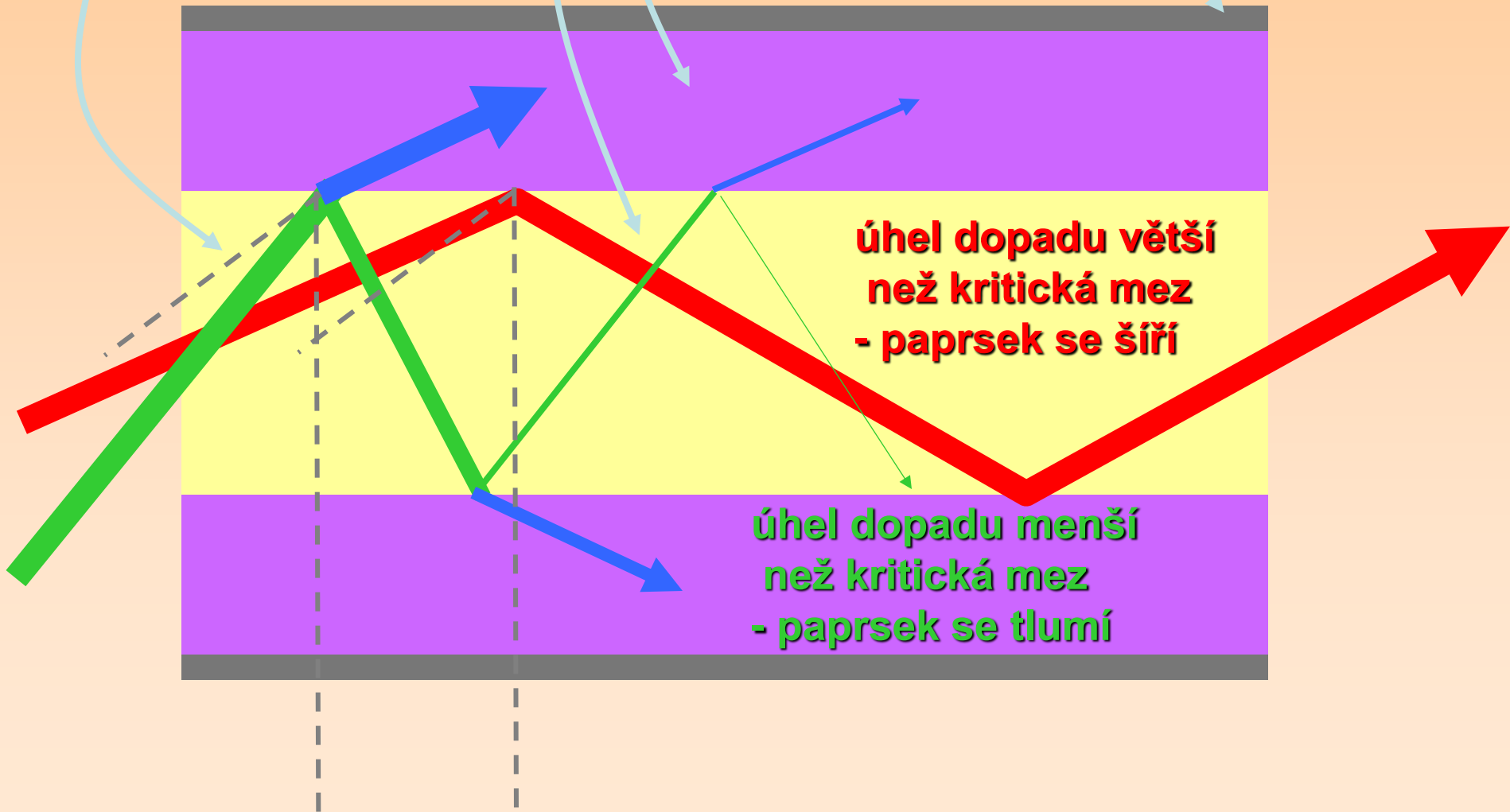
- ✓ **nelineární optika (optická vlákna)**
- ✓ **piezoelektrické imunosensory**
- ✓ **impedometrická zařízení**

Optická vlákna

Šíření paprsku ve světlovodu

jádro (core) - index lomu n_1
plášť (cladding) - n_2 , $n_2 < n_1$
mechanický obal

kritická mez



úhel dopadu větší
než kritická mez
- paprsek se šíří

úhel dopadu menší
než kritická mez
- paprsek se tlumí

Jádro vlákna

sklo

křemen (UV)

plast (levné)

Plášť

silikonový

Obal

plast (polykarbonát)

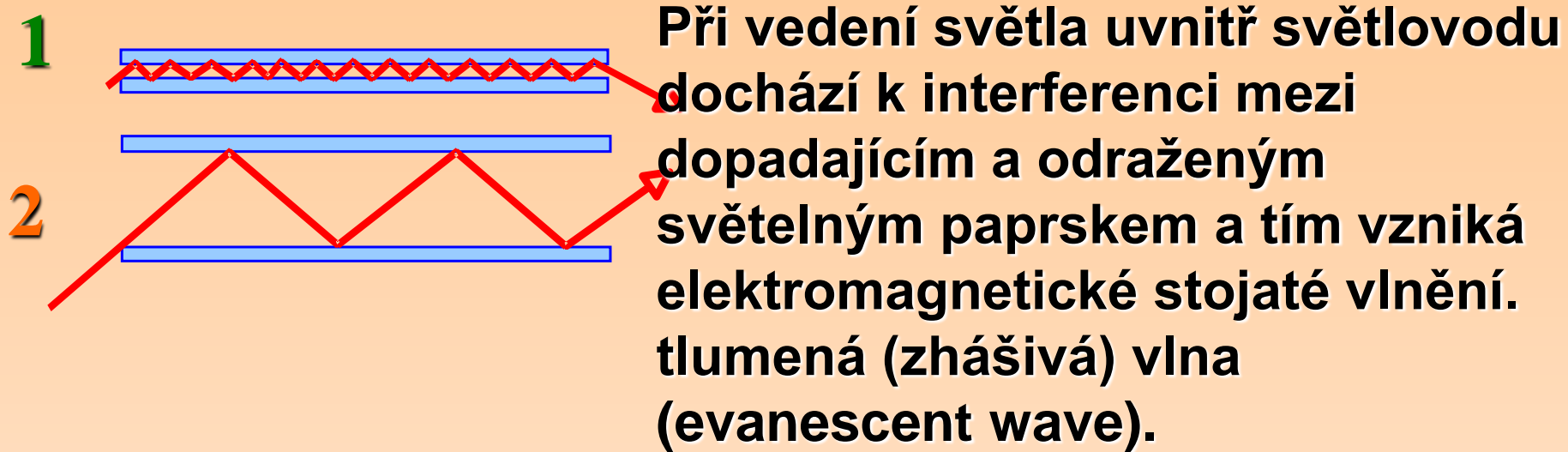
Průměr vlákna

stovky μm

Dva způsoby využití optických vláken

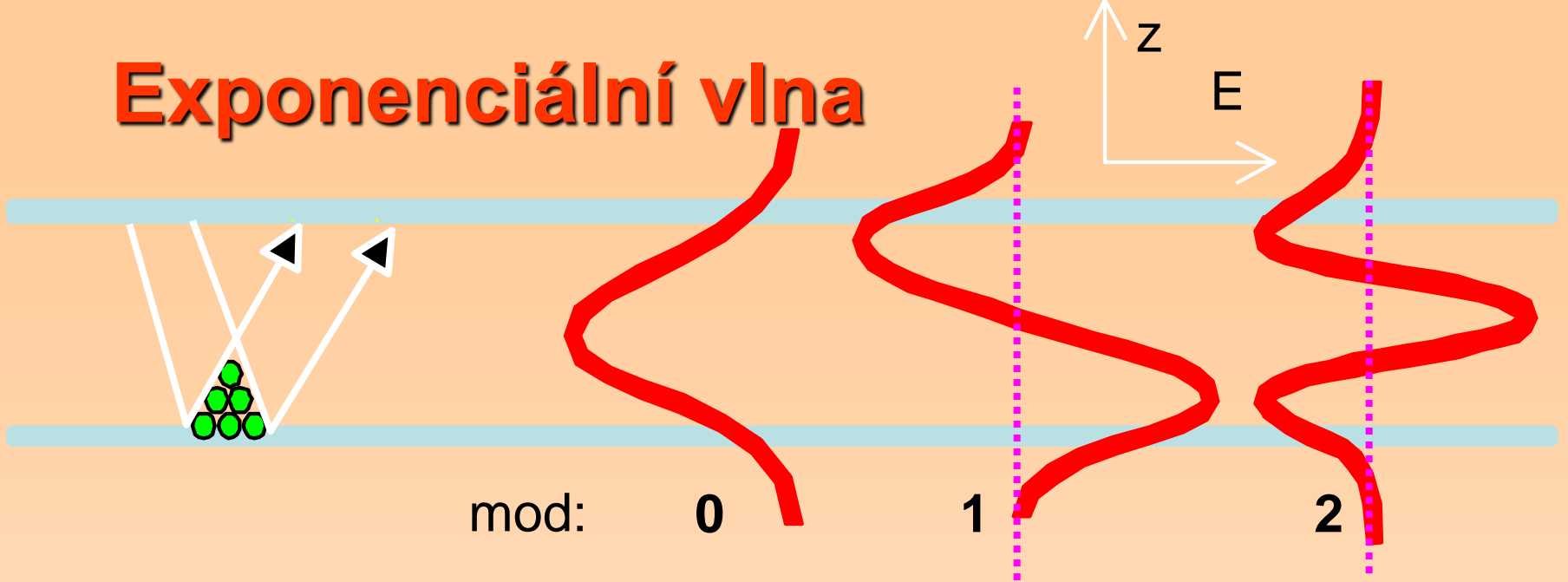
- ✓ **přímé ozařování** (*extrinsic sensing*)
interakce se uskutečňuje na konci vlákna
vlákno slouží k vedení světla
 - ✓ **nepřímé ozařování** (*intrinsic sensing*)
optický vodič neslouží pouze k pasivnímu
vedení světla, ale chemické změny v těsném
okolí světlovodu se sledují na základě
vyvolaných změněných podmínek pro vedení
světla uvnitř světlovodu.
- Význam pro konstrukci přímých imunosenzorů

intrinsic sensing



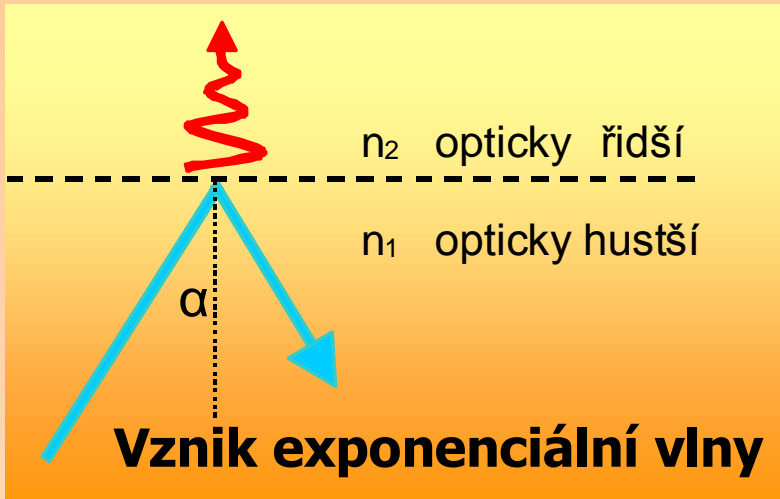
- 1.** Velmi tenký světlovod (tloušťka asi vlnová délka světla), světlo se šíří v určitých diskrétních modech (více odrazů na jednotku délky)
- 2.** Silný světlovod

Exponenciální vlna



- ❖ na vnějším povrchu interakce s látkami elektromagnetická vlna se šíří do okolí mimo světlovod, přitom její intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní („exponenciální vlna“)
- ❖ energetické profily exponenciální vlny jsou pro tři základní mody ukázány na obrázku
- ❖ pro vyšší mody narůstá podíl „vnější energie“ a zvětšuje se penetrační hloubka

Optické převodníky pro afinitní interakce



Princip: Základem interakce je interakce exponenciální vlny s okolím sensoru.

Při dopadu paprsku šířeného v opticky hustším prostředí na rozhraní s řidším prostředím

pod úhlem větším než kritický ($\sin \alpha > n_2/n_1$), dochází k totálnímu vnitřnímu odrazu světla.

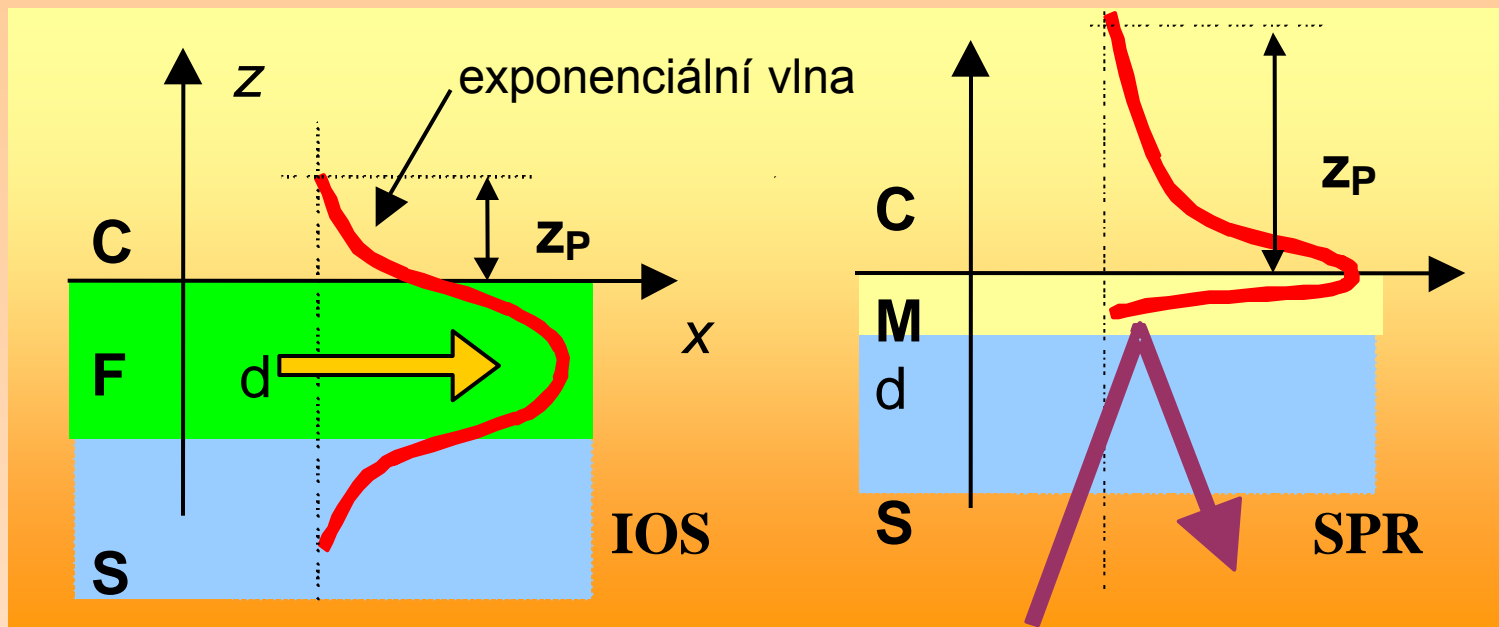
přítom vzniká v opticky řidším prostředí elektromagnetická vlna vyvolaná interakcí dopadajícího a odraženého světla, jejíž intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od povrchu.

Dva typy optických systémů

Interakcí exponenciální vlny s blízkým okolím sensoru, dochází ke změně podmínek pro šíření světla v optickém systému, které se kvantifikují podle změn intenzity nebo fázového posuvu vedeného světla.

- ✓ Planární světlovod
IOS (integrated optical sensor)
- ✓ Rozhraní kov/dielektrikum –rezonance elektromagnetické vlny šířené povrchovou vrstvou kovu (interakce vlny s volnými elektrony v kovu)
SPR (surface plasmon resonance)

IOS A SPR



Teorie vychází ze změn efektivního indexu lomu N pro šíření vedené vlny uvnitř optického systému. Šíří se jeden definovaný mod, který má u:
IOS složku magnetickou TM_0 a elektrickou TE_0
SPR pouze složku magnetickou TM_0 .

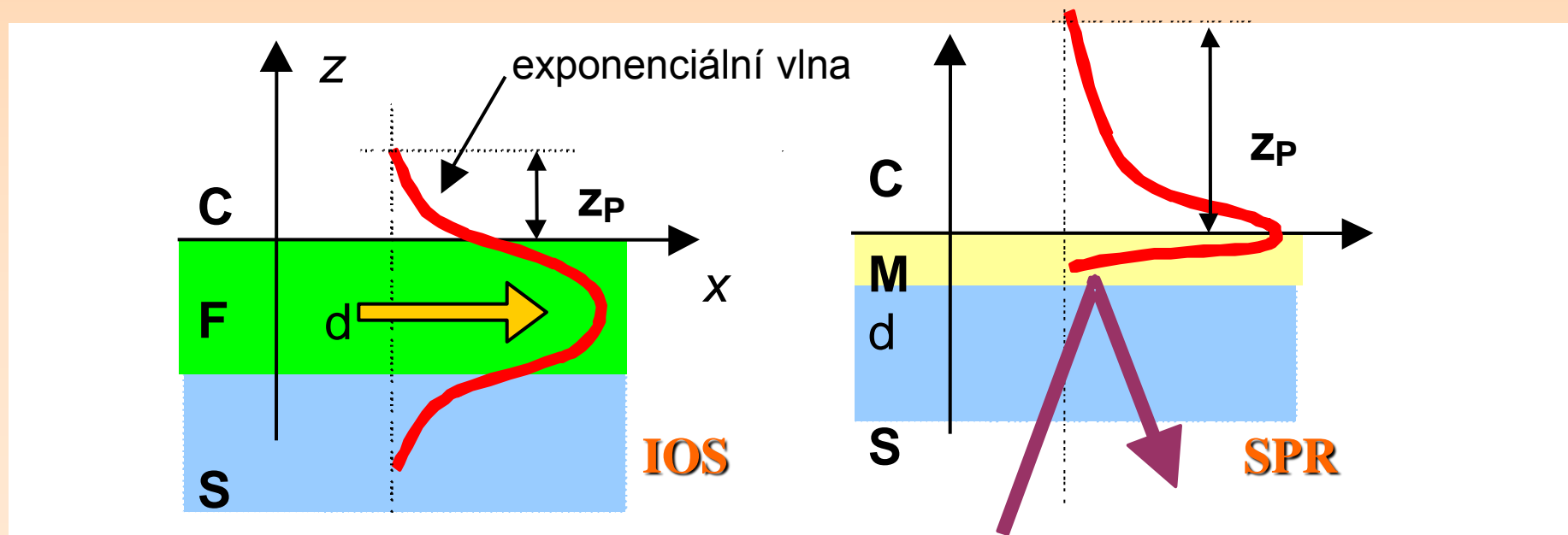
Změny v poli exponenciální vlny jsou vyvolané navázáním biomolekul na citlivý povrch (změny indexu lomu n_C v oblasti vzorku C)

Penetrační hloubka exponenciální vlny v prostoru vzorku Z_P

S je podkladový substrát (obvykle sklo, $n_S = 1,46$)

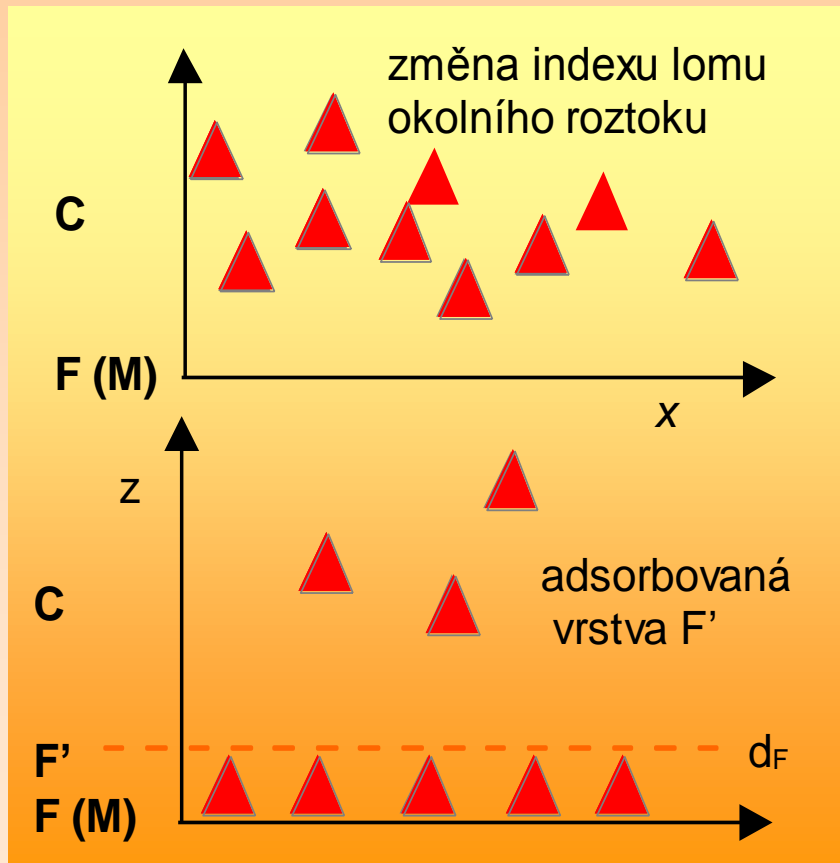
F je planární světlovod (n_F , tloušťka d , n_F asi 2,0, $d = 80$ až 120 nm, materiály $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ nebo Si_3N_4)

M tenká vrstvička kovu (Au, Ag, tloušťky 20 až 60 nm)



Měřené signály:

IOS



vrstvu bílkovin:

index lomu

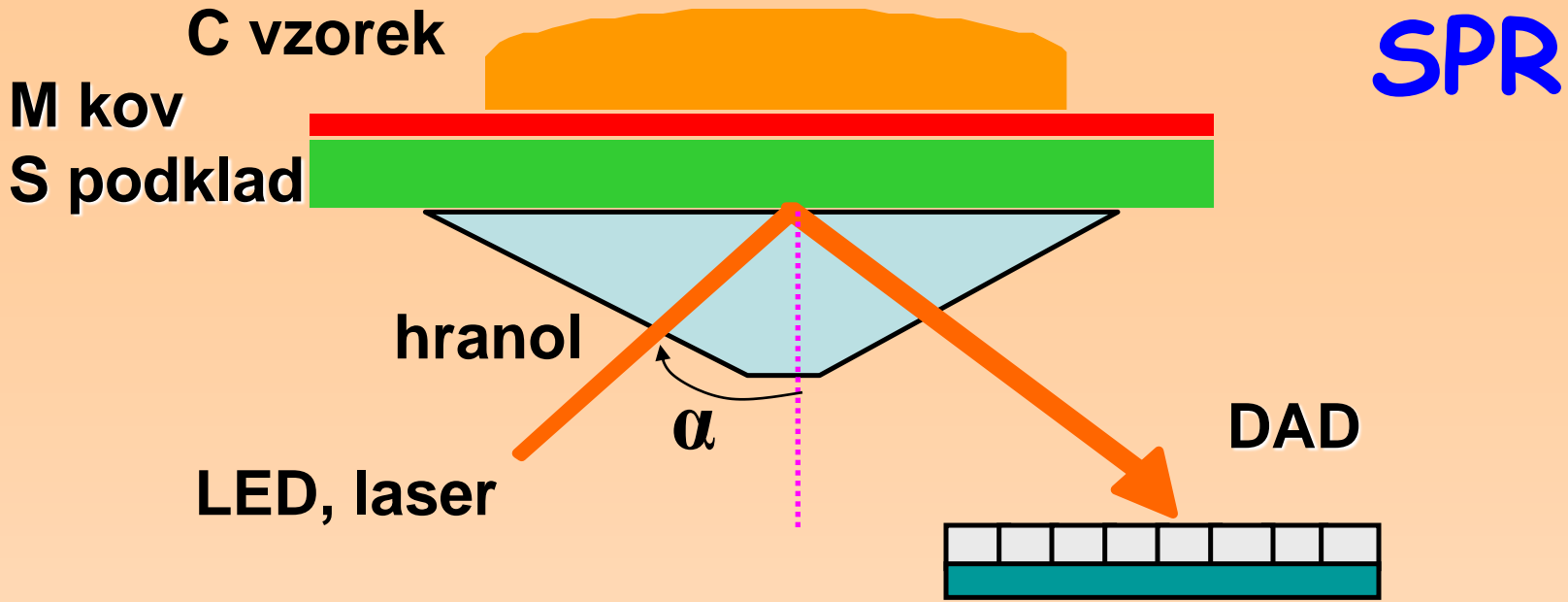
tloušťka vrstvy

$n_{F'}$ 1,45 – 1,55

d_F 4 – 10 nm

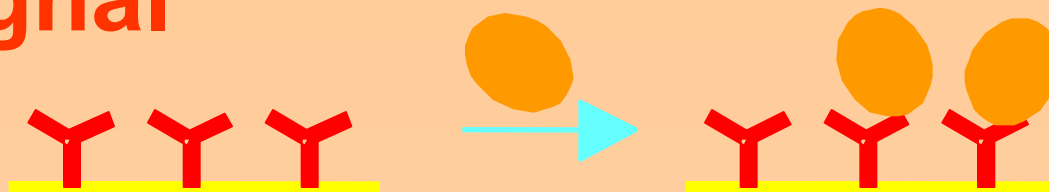
Měří se efektivní index lomu

- ✓ homogenní změna indexu lomu Δn_C celého okolního prostředí C (roztoky pufrů $n_C = 1,33$), systém tedy funguje jako refraktometr
- ✓ homogenní adsorbované vrstvy F' je vlastní děj, má index lomu $n_{F'}$ a tloušťku $d_{F'}$



- ✓ Pro zavedení světla se používá vstupní hranol, povrchová vlna se excituje na rozhraní mezi kovem M a dielektrickou vrstvou C (vzorek).
- ✓ Místo hranolu lze použít i vstupní mřížku
- ✓ Jako detektor slouží řada fotodiód (DAD, diode array detector), což umožňuje určit závislost **intenzity na úhlu odrazu**

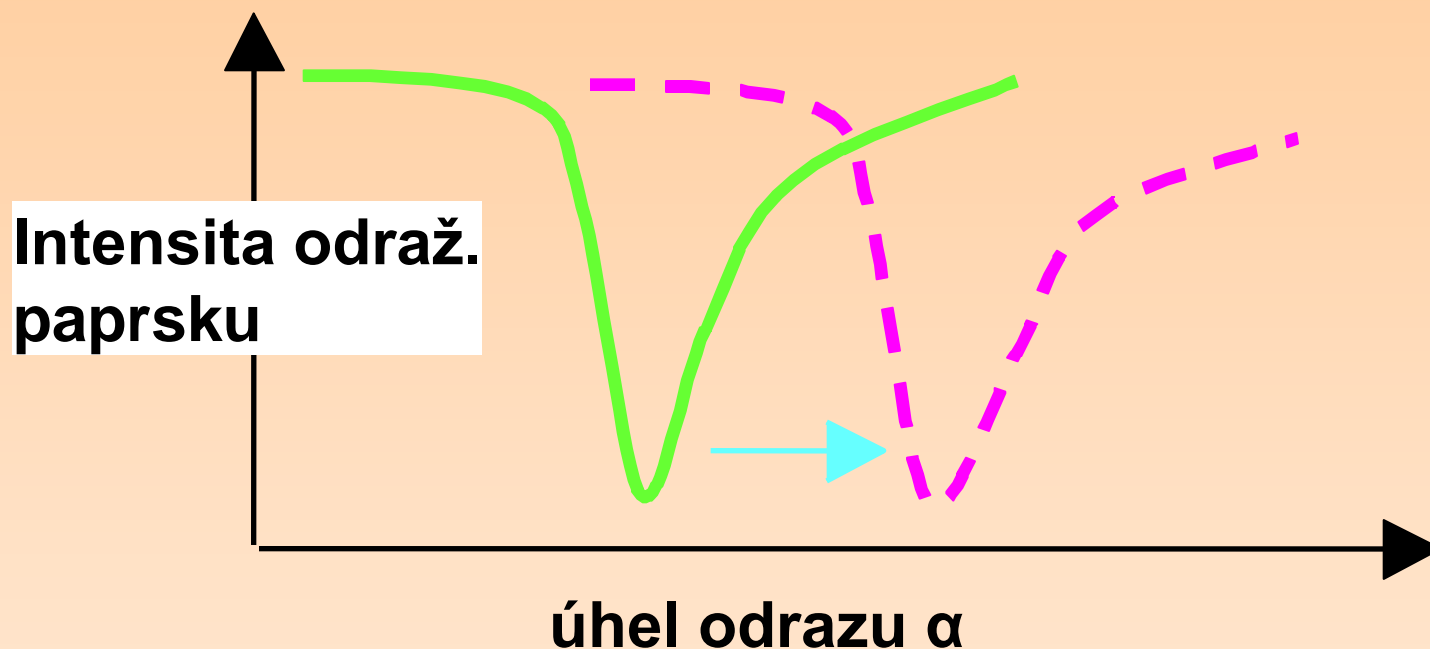
SPR signál



Vazebná reakce

=>

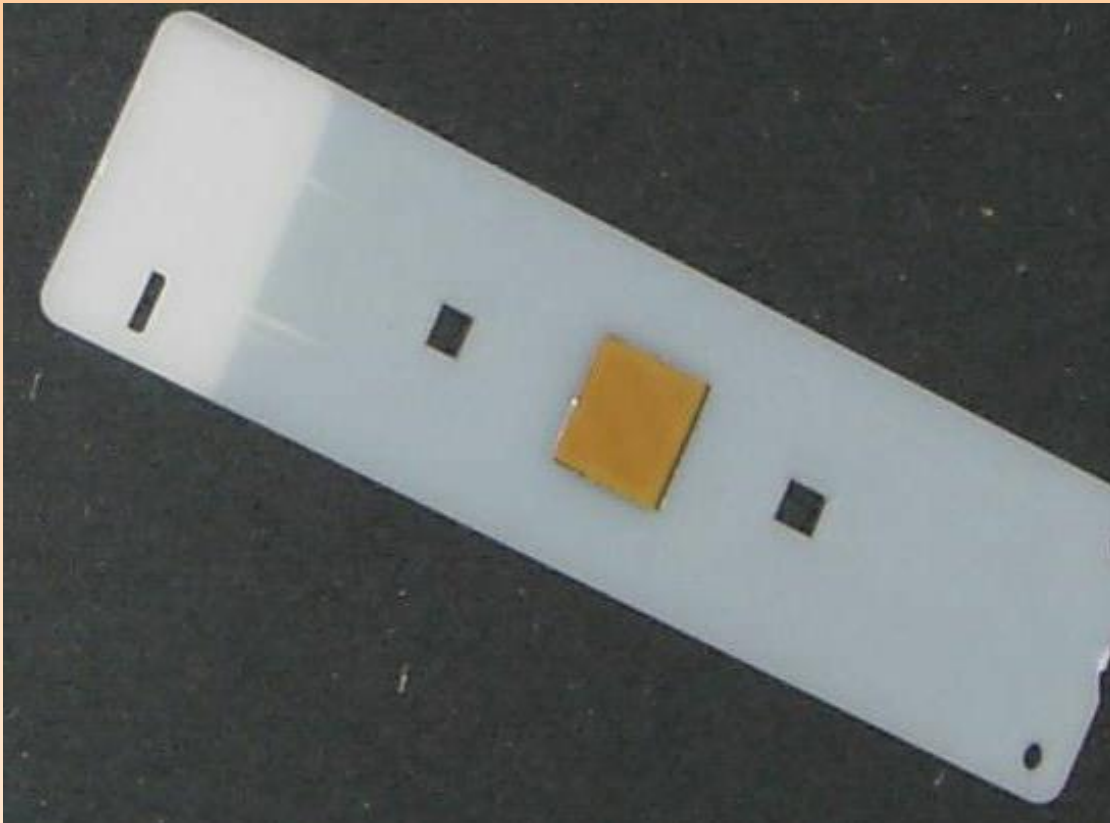
změna rezonančních podmínek



- rezonanční úhel odpovídající minimu intenzity odraženého paprsku je kontinuálně vyhodnocován,
- jeho poloha je úměrná změnám povrchové hmotnosti vyvolaným adsorpcí biomolekul

SPR BIOSENSOR

čip systému
BIACORE



Rozměry:
9 x 2,5 x 0,1 cm

Modifikace povrchu:

**CM5 karboxymethyl-dextran, HPA hydrofobní,
SA streptavidinový, NTA komplexace kovů**

firma Pharmacia



Komerční optické systémy

Biacore 2000 (Biacore)
www.biocore.com



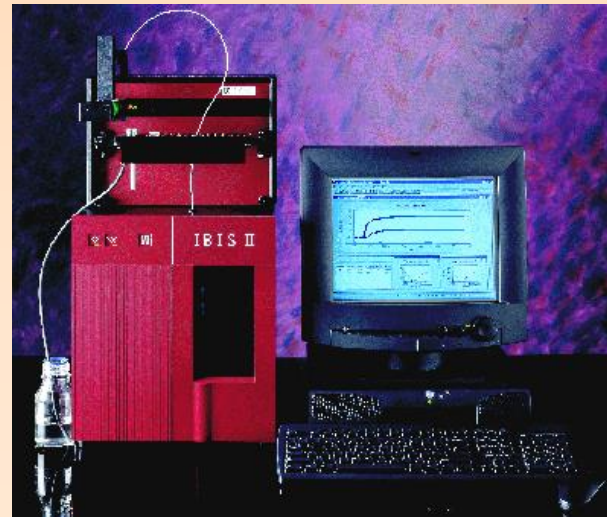
KI 1 (BioTuL)
www.biotul.com



IAsys (Affinity Sensors)
www.affinity-sensors.com



IBIS II (XanTec)
www.xantec.com



Piezoelektrické imunosensory

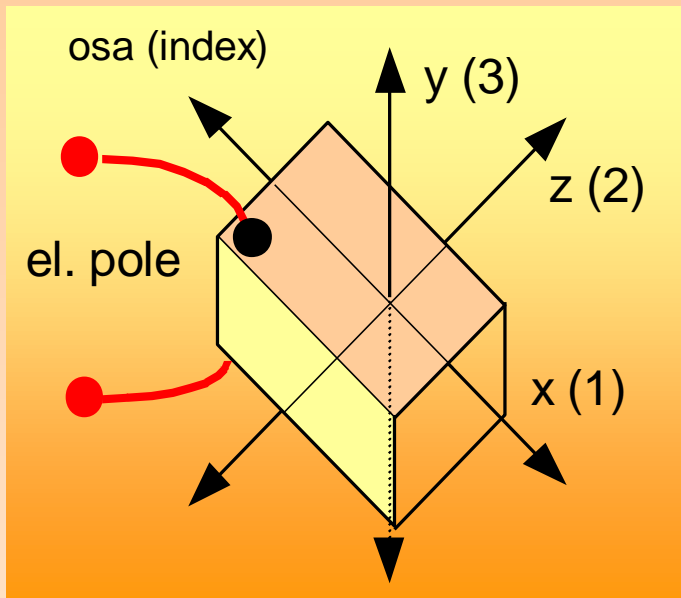
Piezoelektrický efekt (bratři Curieové):

V některých anizotropních krystalech (křemen, turmalín, Rochellova sůl) se při mechanickém namáhání generují orientované dipóly a vznik elektrické napětí.

Tento efekt se uplatňuje i v obráceném smyslu:

Pokud se na krystal přivede střídavé napětí o vhodné rezonanční frekvenci, začne krystal se stejnou frekvencí vibrovat, přitom se převážná část energie (10⁵ : 1) uchová v oscilujícím systému a nerozptyluje se do okolí.

ORIENTACE PIEZOELEKTRICKÉ DESTIČKY



Orientace krystalografických os:
tenký řez krystalu jsou podle tvaru krystalu možné vibrace:

Mechanické deformace

d_{31}	destička	disk
d_{32}	délková	radiální
d_{33}	šířková	
	tloušťková	tloušťková

Předpokládá se, že elektrické pole ve směru osy y (d_3)

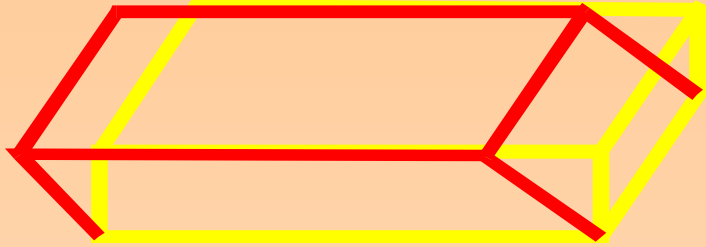
Materiály pro piezoelektrické krystaly

PŘÍRODNÍ monokrystaly křemene, sensor se připraví vyřezáním destičky pod přesnými úhly (řezy AT, BT, ST...)

UMĚLÉ materiály (dnes i křemen), různé druhy keramiky: polykrystalické, ale uniaxiální (orientované), příprava se provádí sintrováním (ZnO, LiNbO₃, LiTaO₃, Bi₁₂GeO₂₀)
Výhoda: snadné tvarování a nanášení tenkých vrstev.

PLASTY polyvinylidenfluorid PVDF (-CH₂CF₂-)_n
směs amorfní a polykrystalická forma (1:1)
sestává se z nepolární náhodně orientované a polární orientované složky

Piezosensory - chemické mikrováčky

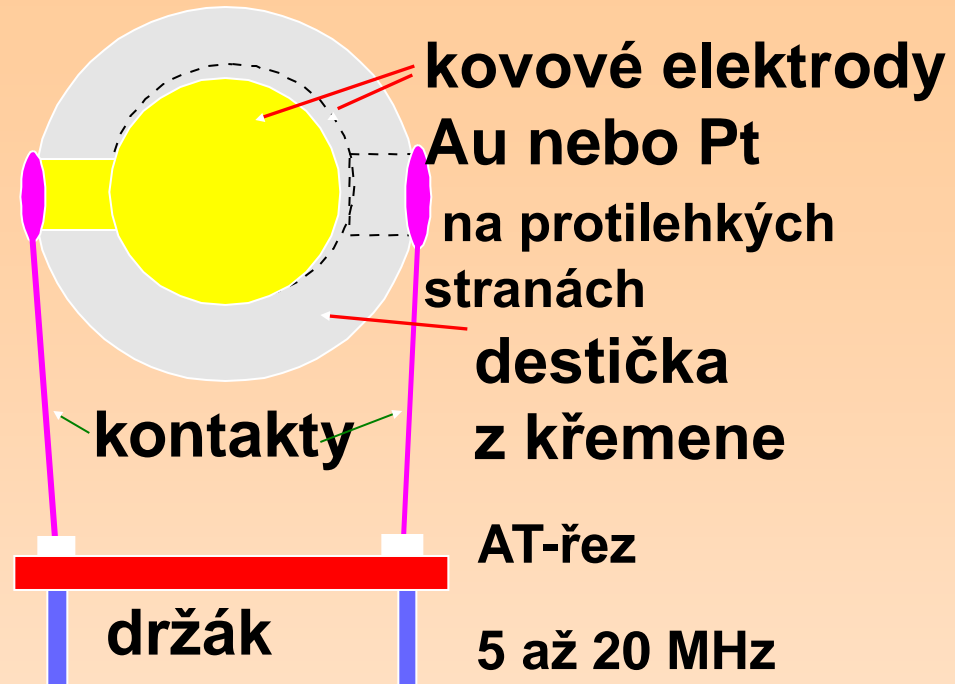


objemová akustická vlna -
schéma tloušťkové
střihové vibrace

základní stav / amplituda

Hmotnostní citlivost:

QCM - quartz crystal
microbalance



Piezoelektrický krystal

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu}}$$

Rezonanční frekvenci f_0 určují fyzikální vlastnosti křemene a tloušťka destičky (čím je tenčí, tím rychlejší vibrace a vyšší f_0)

U typu QCM bývá f_0 od **5 do 20 MHz**, pokud by krystal byl ještě tenčí, lámal by se.

Když dojde k navázání látky na povrch elektrod, dojde ke změně rezonanční frekvence f_0 .

Změní se hmotnost celého systému a vibrace se zpomalí – frekvence poklesne.

Pokud krystal osciluje v **přítomnosti kapaliny**, dojde k dalším změnám f_0 v důsledku tlumení oscilací (viskozita prostředí)

Měření s PZ krystaly

✓ **aktivní metoda**

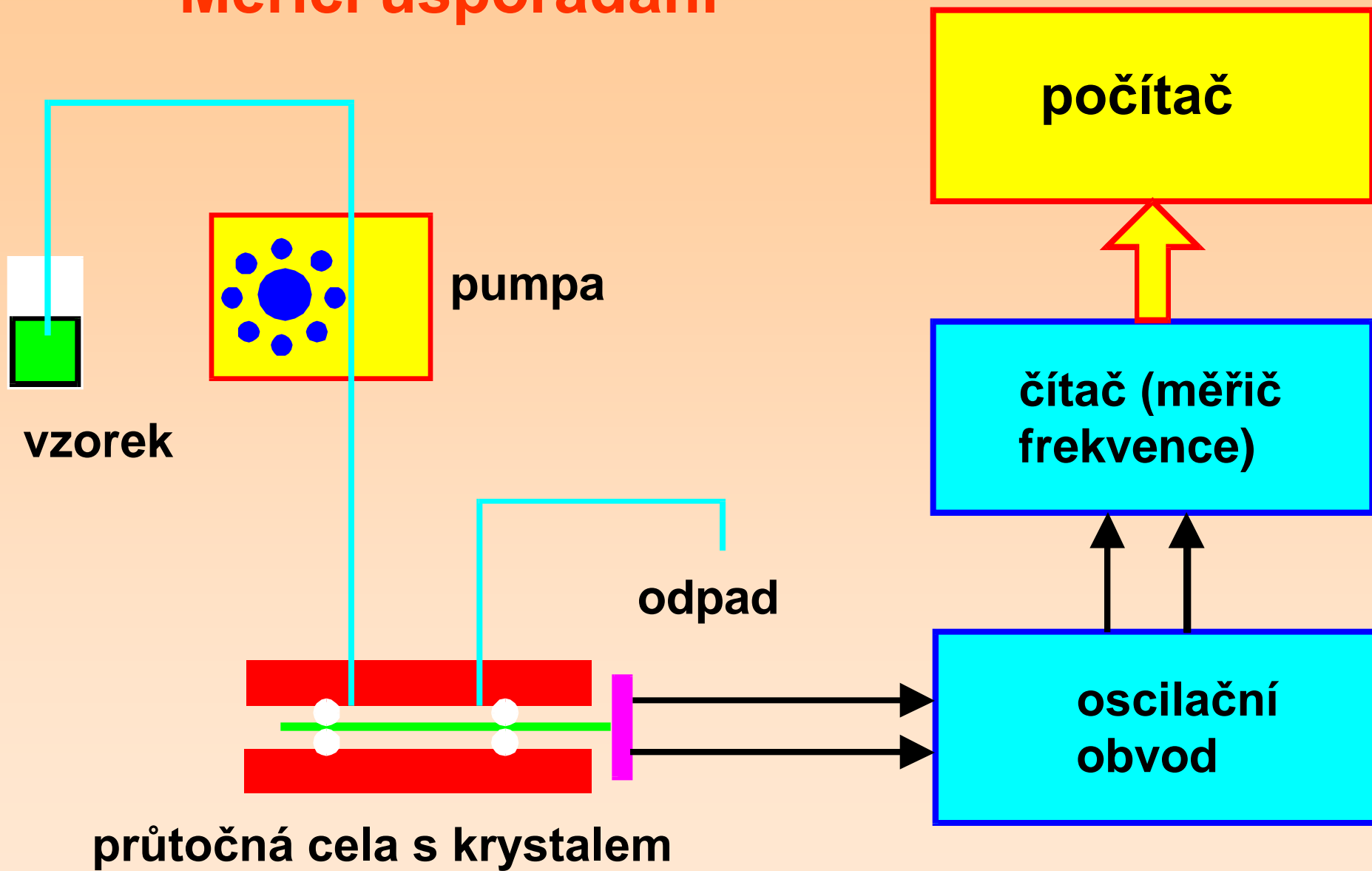
PZ krystal je součástí širokopásmového oscilačního obvodu, jehož frekvence se řídí vlastnostmi krystalu
aktuální frekvence se stanoví pomocí čítače, rozlišení je 0,1 až 1 Hz při základní frekvenci 10 až 20 MHz
citlivost kolem 3 ng/Hz a mez detekce 10 ng/cm²

✓ **pasivní metody**

na PZ krystal se zvenčí přivádí střídavé napětí o známé proměnné frekvenci a v okolí rezonance se proměří impedanční charakteristika, závislost velikosti $|Z|$ a fázového úhlu ϕ na frekvenci.

Nákladná aparatura, impedanční analyzátor několik milionů korun,
ale odliší hmotnostní a viskózní změny.

Měřicí uspořádání

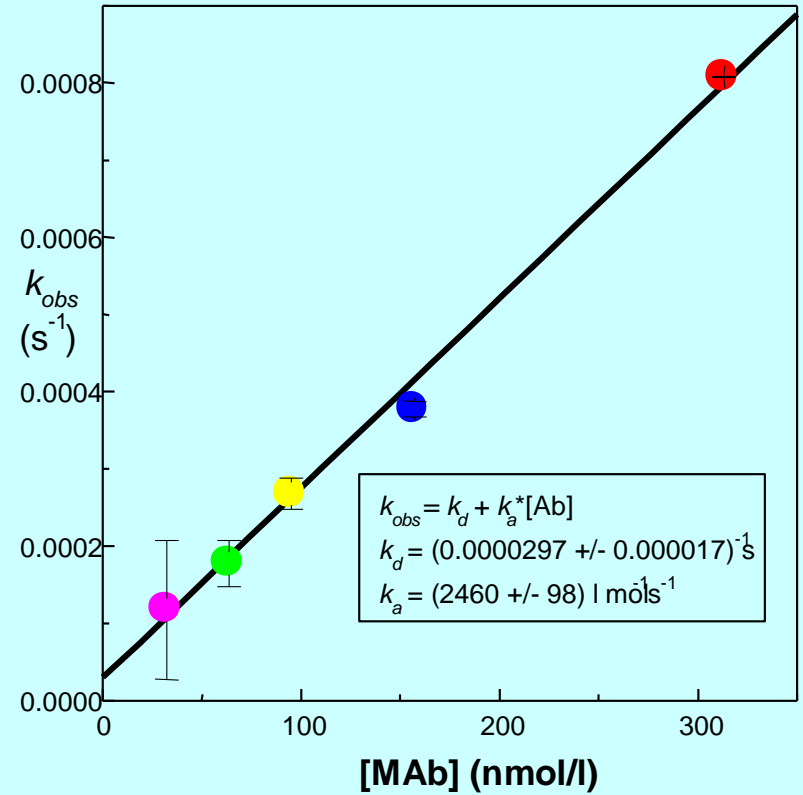
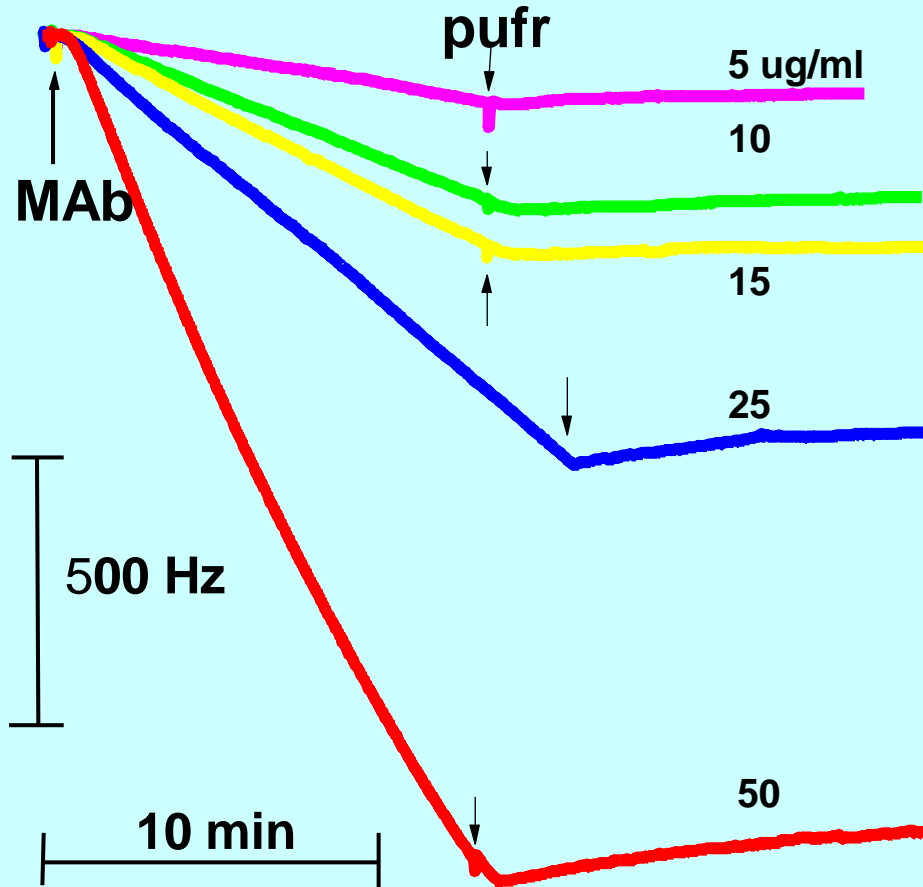


UKÁZKA MĚŘÍCÍHO ZAŘÍZENÍ



Biochemická laboratoř MU Brno, PŘF, katedra biochemie

UKÁZKA KINETICKÉ ANALÝZY



Studium interakce protilátky s imobilizovaným hapténem pomocí piezoelektrického biosensoru

Nepřímé afinitní sensory

Princip: použití vhodného značkového systému

Průběh heterogenní:

- ✓ imunokomplex je zachycen na vhodném povrchu (citlivá oblast převodníku),
- ✓ po proběhnutí reakce se odstraní reakční směs,
- ✓ povrch se promyje
- ✓ změří se množství zachycené značky

značky: radiaktivita (u biosensorů se nepoužívá)
fluorescence
luminiscence
enzymová značka

Výchozí metoda: ELISA

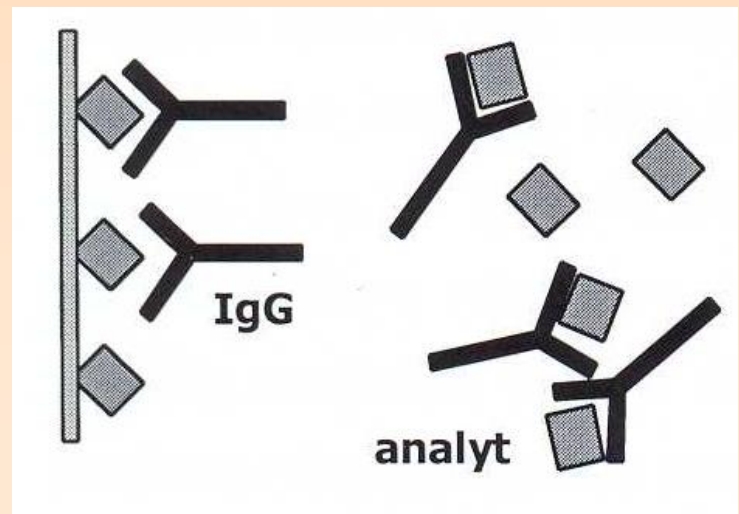
Způsob měření:

- ✓ **kompetitivní**
- ✓ **sendvičové uspořádání**

Kompetitivní uspořádání

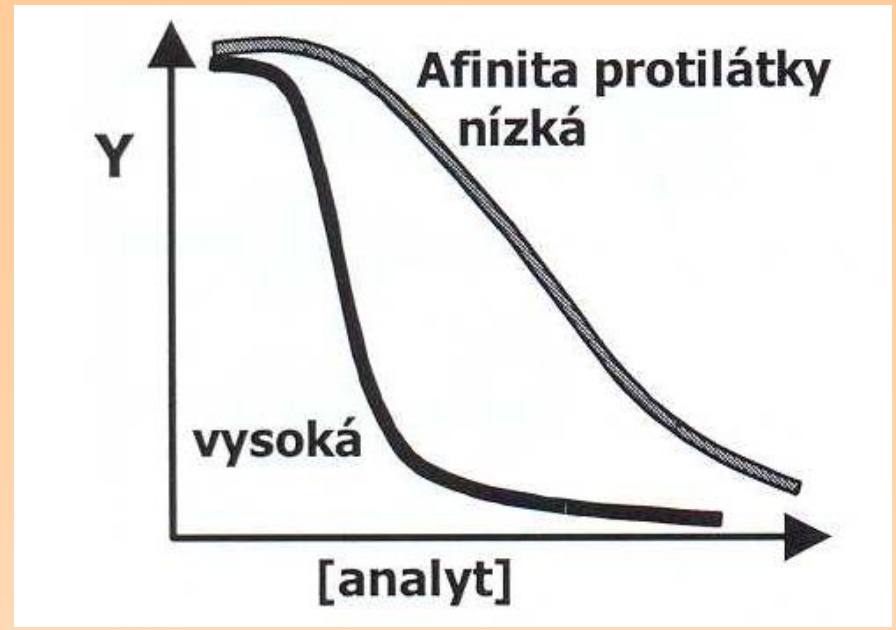
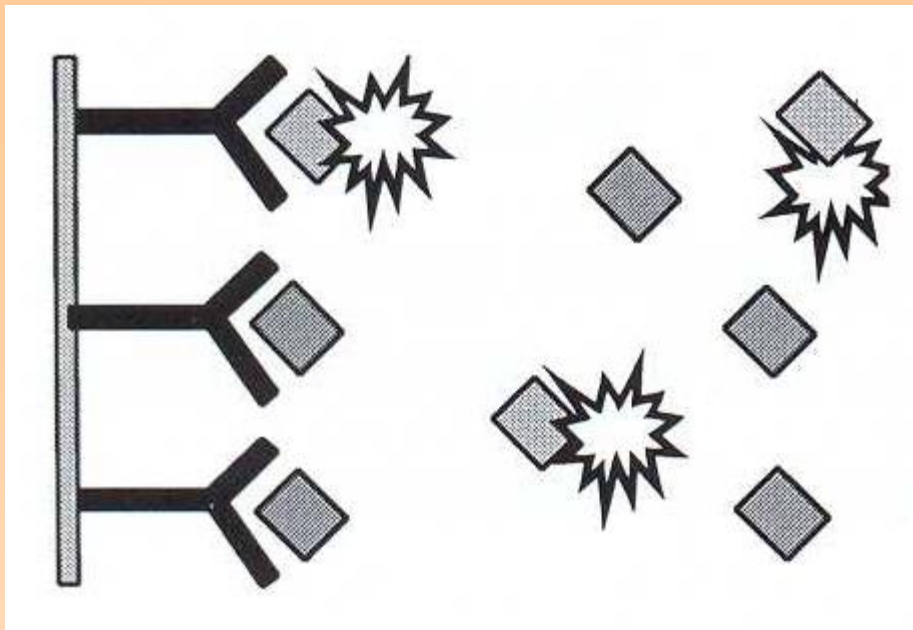
Na citlivý povrch je imobilizován antigen. Při vlastním stanovení se vzorek smíchá s protilátkou a nechá se určitou dobu inkubovat. Směs se přidá k sensoru a zbylé protilátky se váží na modifikovaný povrch. Volný a vázaný antigen soutěží o limitované množství protilátky.

Na konci reakce se povrch opláchně.



**Zachycená protilátka primární se detekuje přidavkem sekundární vhodně označené protilátky.
Sekundární protilátka má specifitu k té části primární protilátky, která neváže analyt (např. Fc část)
Nebo lze používat vhodně označenou primární protilátku.**





Formát kompetitivního stanovení lze také obrátit, **na povrch sensoru lze navázat protilátku.**

Pak se inkubace provádí se vzorkem obsahujícím analyt a navíc se přidá analyt spojený s vhodnou značkou. Konjugátu značky s jedním z vazebných partnerů se říká **tracer.**

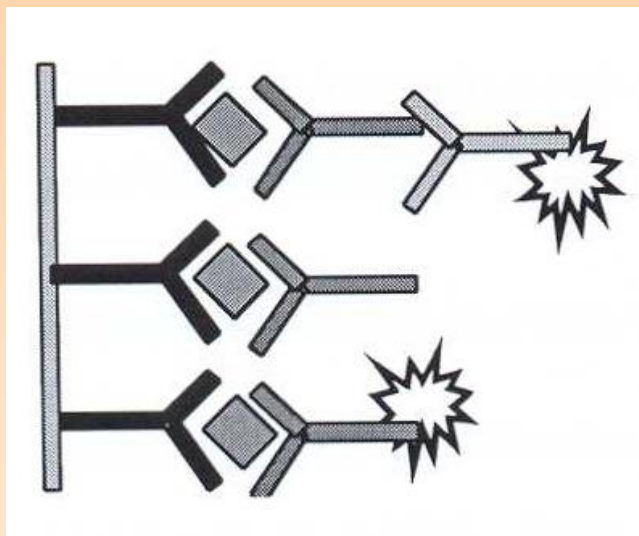
Kalibrační křivka: závislost signálu Y na koncentraci analytu má charakteristický sigmoidní tvar.

Strmost je tím větší, čím vyšší je afinita protilátky

Sendvičové uspořádání

Je vhodné pro rozměrnější analyty, které v molekule nesou několik vazebných míst pro protilátku.

Při inkubaci se vzorkem tato protilátka váže přítomný analyt.



Poté se povrch opláchne a přidá se další protilátka, která rozpoznává jiné vazebné místo na povrchu analytu. Může být vhodně značená nebo se detekce provede pomocí třetí označené protilátky.

Množství navázané značky je přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku.



Průběh kalibračních křivek při sendvičovém stanovení je závislý na afinitě protilátek. Afinita hraje menší roli, jak při kompetitivním stanovení.

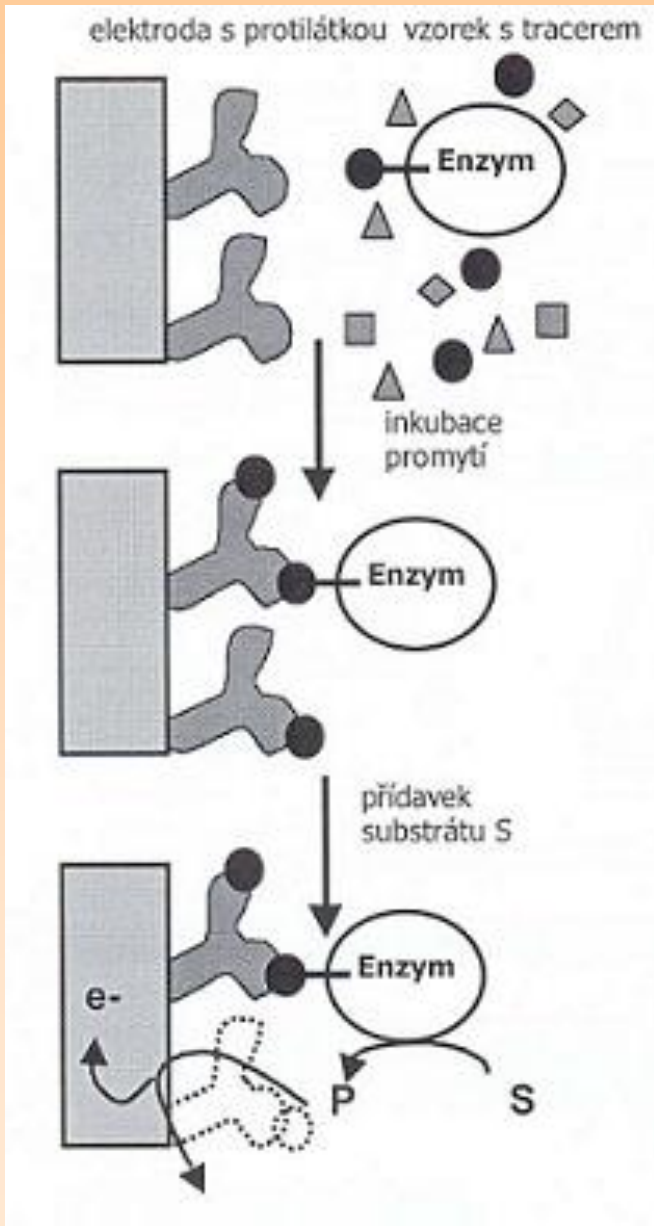
Elektrochemické imunosenzory

Jednoduché
levné
velmi citlivé

} **elektrochemický
převodník** + vysoká specifita
protilátek

Pracovní povrch: pracovní elektroda
výměnná membrána s protilátkou
předřazený imunoreaktor

Značky: enzymy aktivita měřena elektrochemicky
redoxaktivní látky (voltametricky)
cheláty kovů (voltametricky)



Heterogenní stanovení:

elektroda je modifikována protilátkou váže tracer při kompetitivním stanovení, zachycená enzymová aktivita se pak stanoví po přidavku substrátu:

- amperometricky (změna proudu)
- potenciometricky (změna potenciálu)

Amperometrické stanovení

je vhodné ve spojení s těmito:

enzymy

a

substráty

peroxidasa

H_2O_2 + jodid, ferrocen
nebo hydrochinon

lakasa

O_2 + hydrochinon

katalasa

(H_2O_2)

glukosoxidasa

O_2 nebo ferrocen+glukosa

alkalická fosfatasa

p-aminofenylfosfát

galaktosoxidasa

p-aminofenyl- β -D-galaktosid

acetylcholinesterasa

acetylthiocholin

Potenciometrické stanovení

enzym

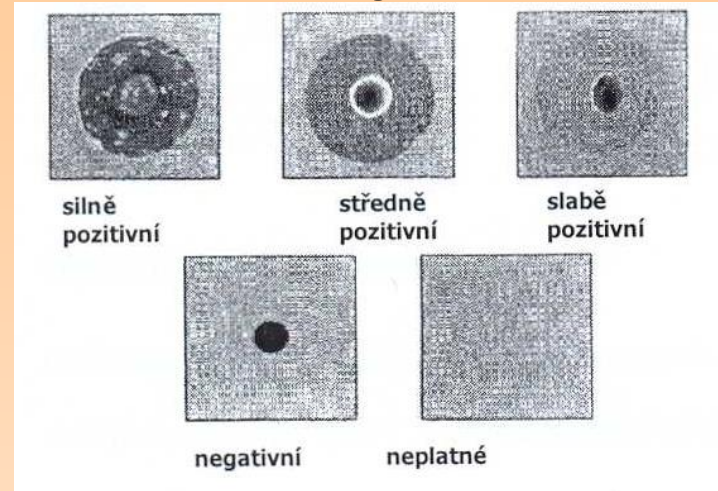
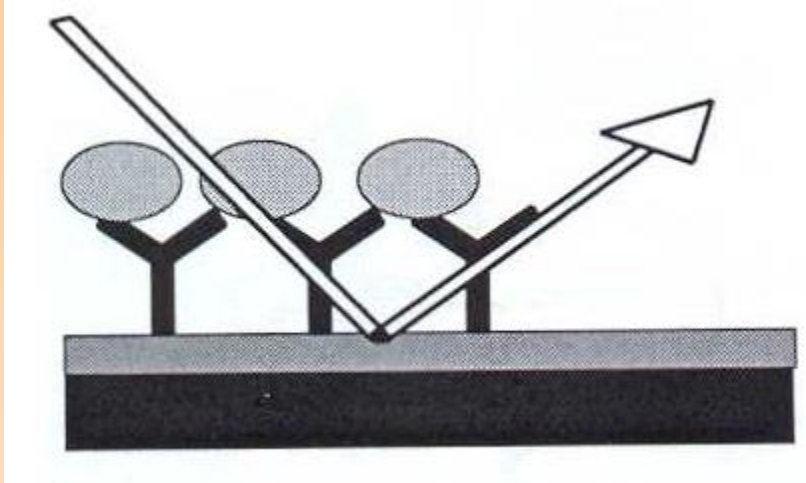
substrát

ureasa

močovina

Páskové varianty imunochemického stanovení s vizuálním vyhodnocováním.

Předstupeň mezi ELISA a nepřímými imunosenzory



Změna tloušťky vrstvy způsobená specifickým navázáním analytu se při vyhodnocování projeví jako **změna pozorované barvy**.

Semikvantitativního imunostanovení na křemíkovém čipu. Barva a tvar pozorovaných skvrn umožňují kvantitativní vyhodnocení přítomnosti analytu ve vzorku. Výhodou je rychlost: nakápnutí a během několika minut lze pozorovat odezvu.

Imunochromatografické testy

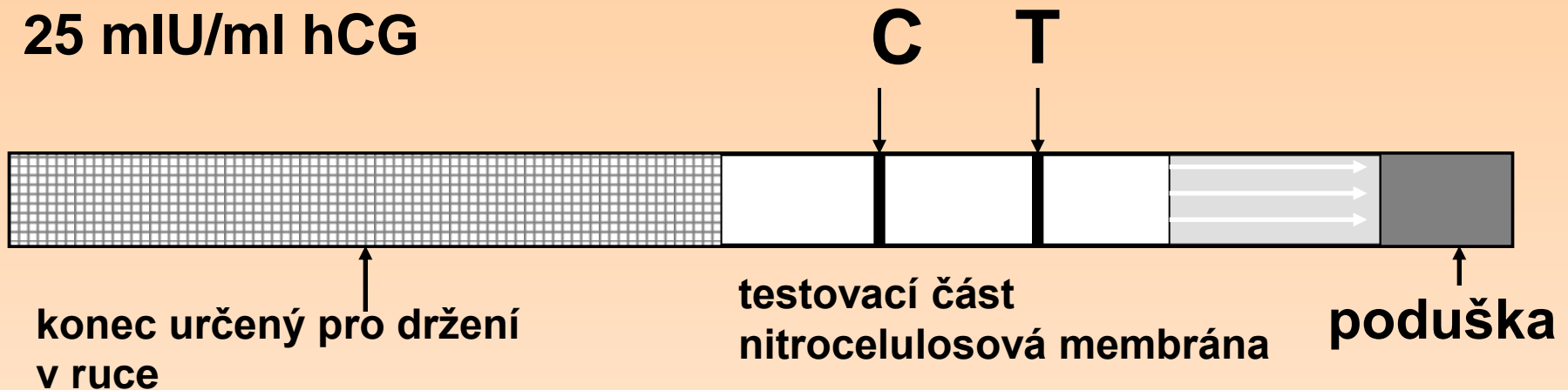
Těhotenský test

zjištění těhotenství z moče

detekce lidského gonádotropinu hCG (hormon placenty)

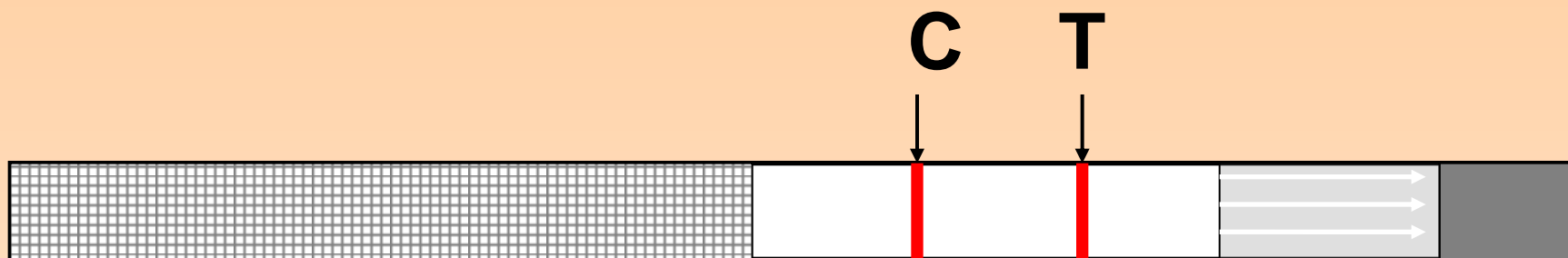
včasná detekce těhotenství

25 mIU/ml hCG

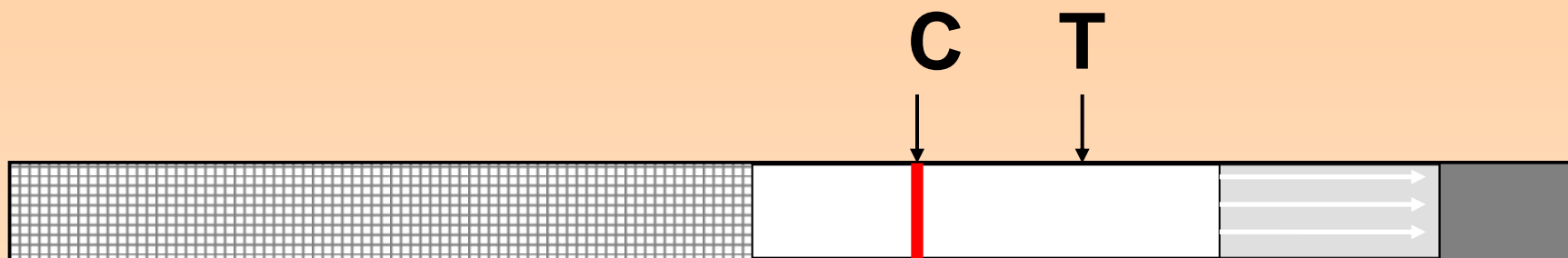


- poduška:** Ab proti hCG konjugát koloid Au
- T:** Ab proti hCG
- C:** Ab proti myší protilátce

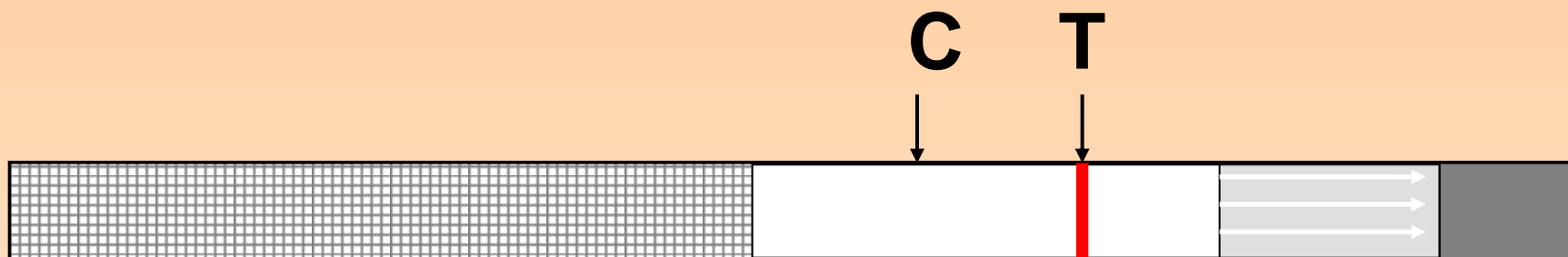
pozitivní



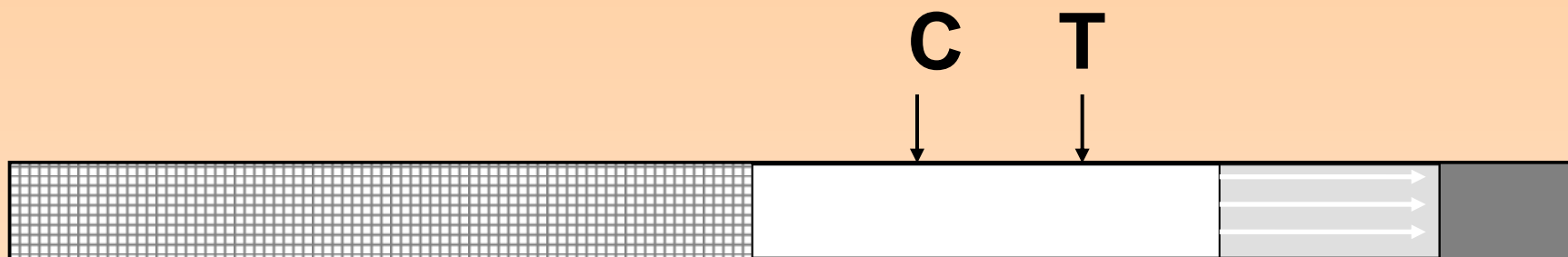
negativní



neplatný



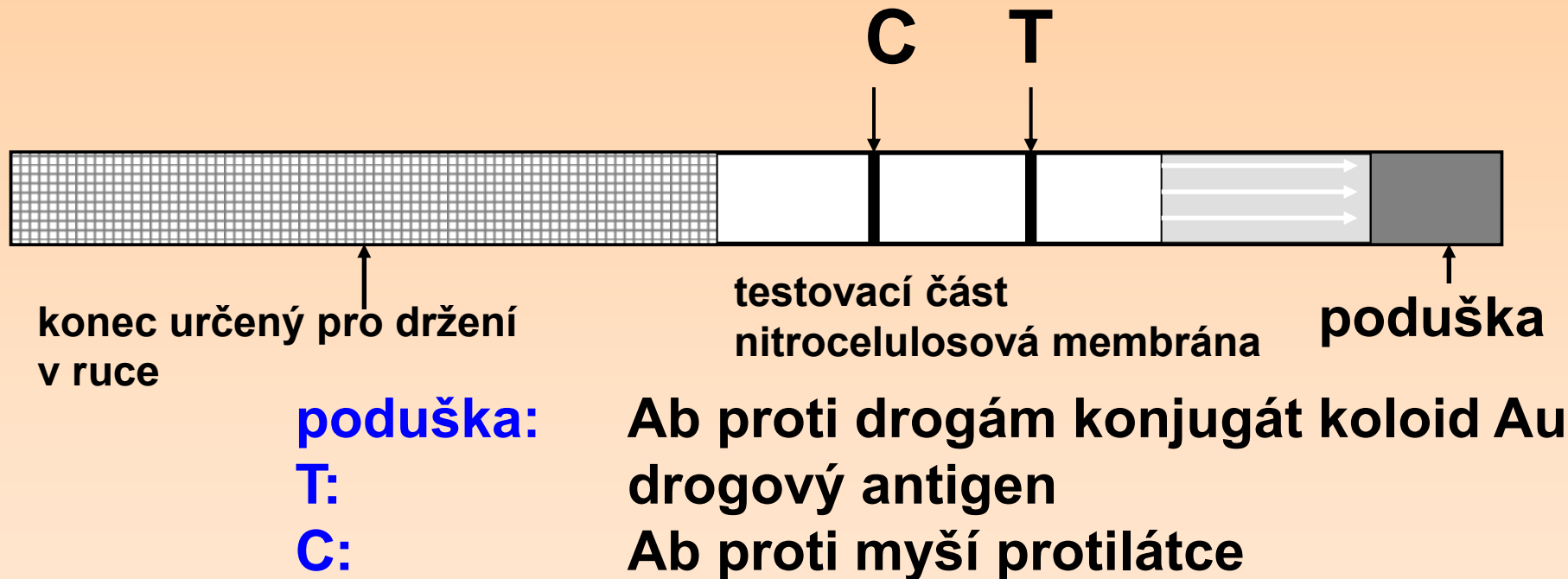
neplatný



Imunochromatografické testy

Detekce drog

stanovení M3: THC, MET, MOR
z moče

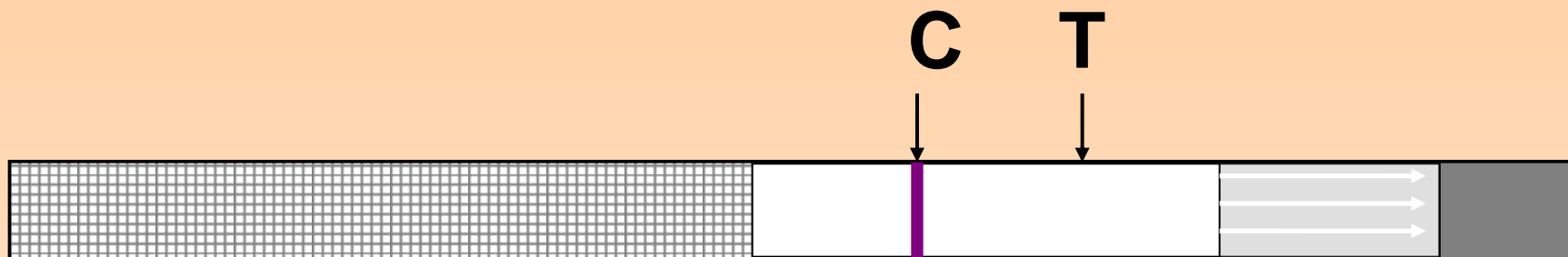


THC- tetrahydrocannabinol (marijuana)

MET- methamphetamin

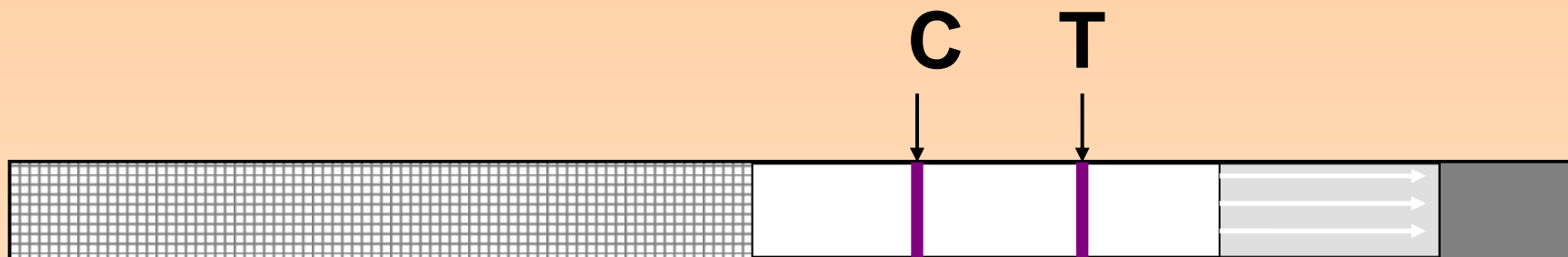
MOR-morfin

pozitivní



**droga z moče se naváže na protilátky z podušky,
fialově zbarvený proužek v T oblasti se objeví**

negativní



- ✓ málo antigenu z moče,
- ✓ konjugát Ab s Au se naváže na antigen v T oblasti vznikne fialové zbarvení
- ✓ konjugát Ab-Au by se vždy měl navázat na antimityšší Ab v oblasti C

výrobce:
Alfa Scientific Designs Inc.
POWAY CA USA

dovozce testů:
ELISABETH PHARMACON, spol.s.o.,
Nám. Svobody 18, Brno