Лекция 3

Биосенсоры

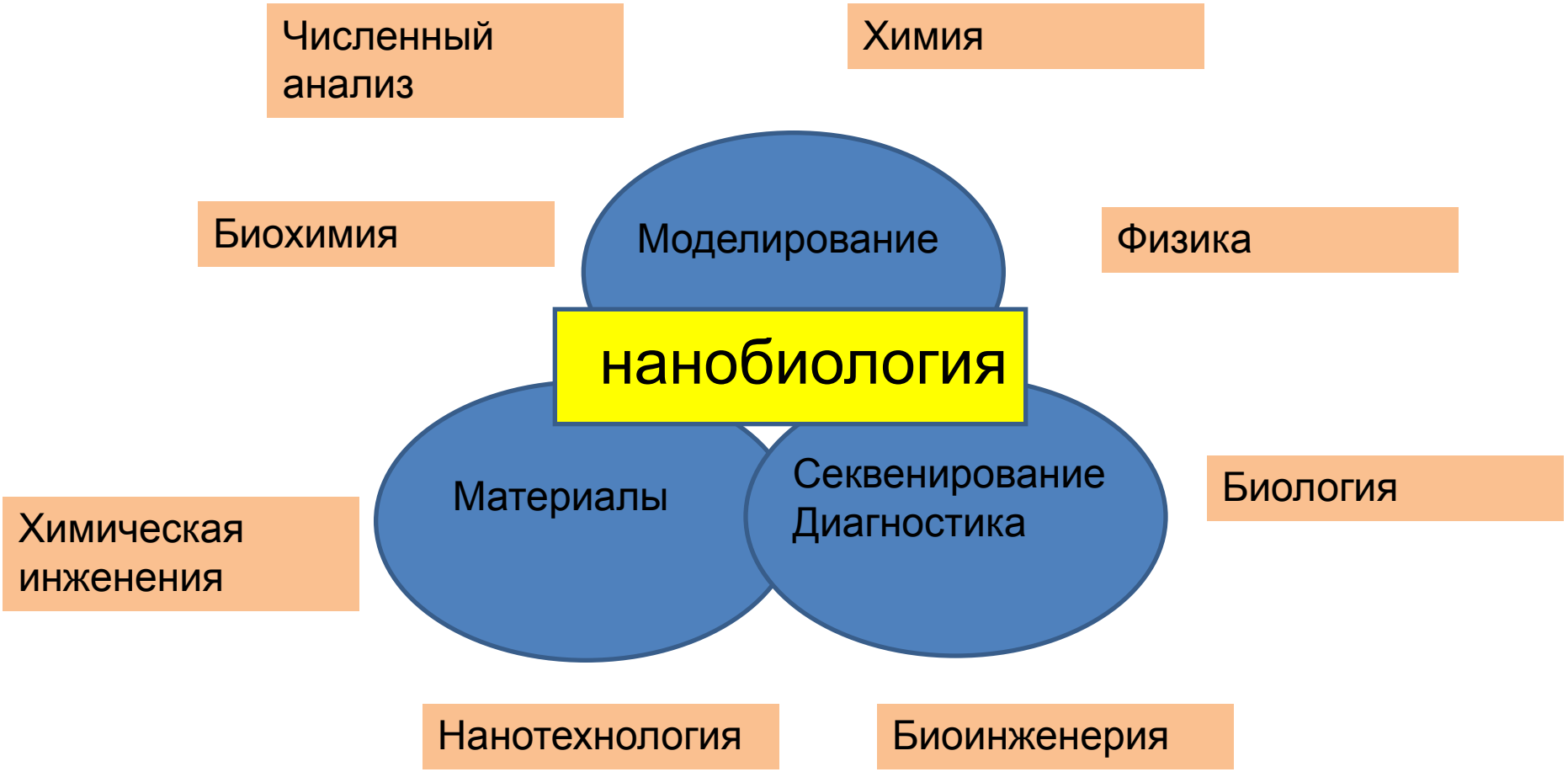
Дополнительная литература

1. Биосенсоры: основы и приложения: Пер. с англ. / Под ред. Тернера и др. - М.: Мир, 1992.
2. Структура и свойства наноразмерных образований : учеб. пособие / Н.Г. Рамбиди – Долгопрудный: ЛЕНАНД, 2011 с. 81-85.
3. [http](http://)http://[www](http://www.)http://www.http://www.[gatewaycoalition](http://www.gatewaycoalition.)http://www.gatewaycoalition.http://www.gatewaycoalition.[org](http://www.gatewaycoalition.org)http://www.gatewaycoalition.org[/](http://www.gatewaycoalition.org/)http://www.gatewaycoalition.org/[files](http://www.gatewaycoalition.org/files)http://www.gatewaycoalition.org/files[/](http://www.gatewaycoalition.org/files/)http://www.gatewaycoalition.org/files/[hidden](http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden)http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden[/](http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/)http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/[sensr](http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr)http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr[/](http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr/)http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr/[tocsenf](http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr/tocsenf)http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr/tocsenf.http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr/tocsenf.[htm](http://www.gatewaycoalition.org/files/hidden/sensr/tocsenf.htm) - биосенсоры. Устройство и принципы работы
4. Биосенсоры С.Д.Варфоломеев, Соросовский образовательный ж
   1. *Clark L.C., Lyons C.* // Ann N.Y. Acad. Sci. 1962. Vol. 102. P. 29–45.
5. Б Будников. Соросовский образовательный журнал №12 1996.

План

1. Мультидисциплинаронсть нанобиологии
2. История создания биочипов.
3. Электрод Кларка.
4. Общие принципы и устройство биосенсоров
5. Применение биосенсоров

1. Мультидисциплинарность нанобиологии



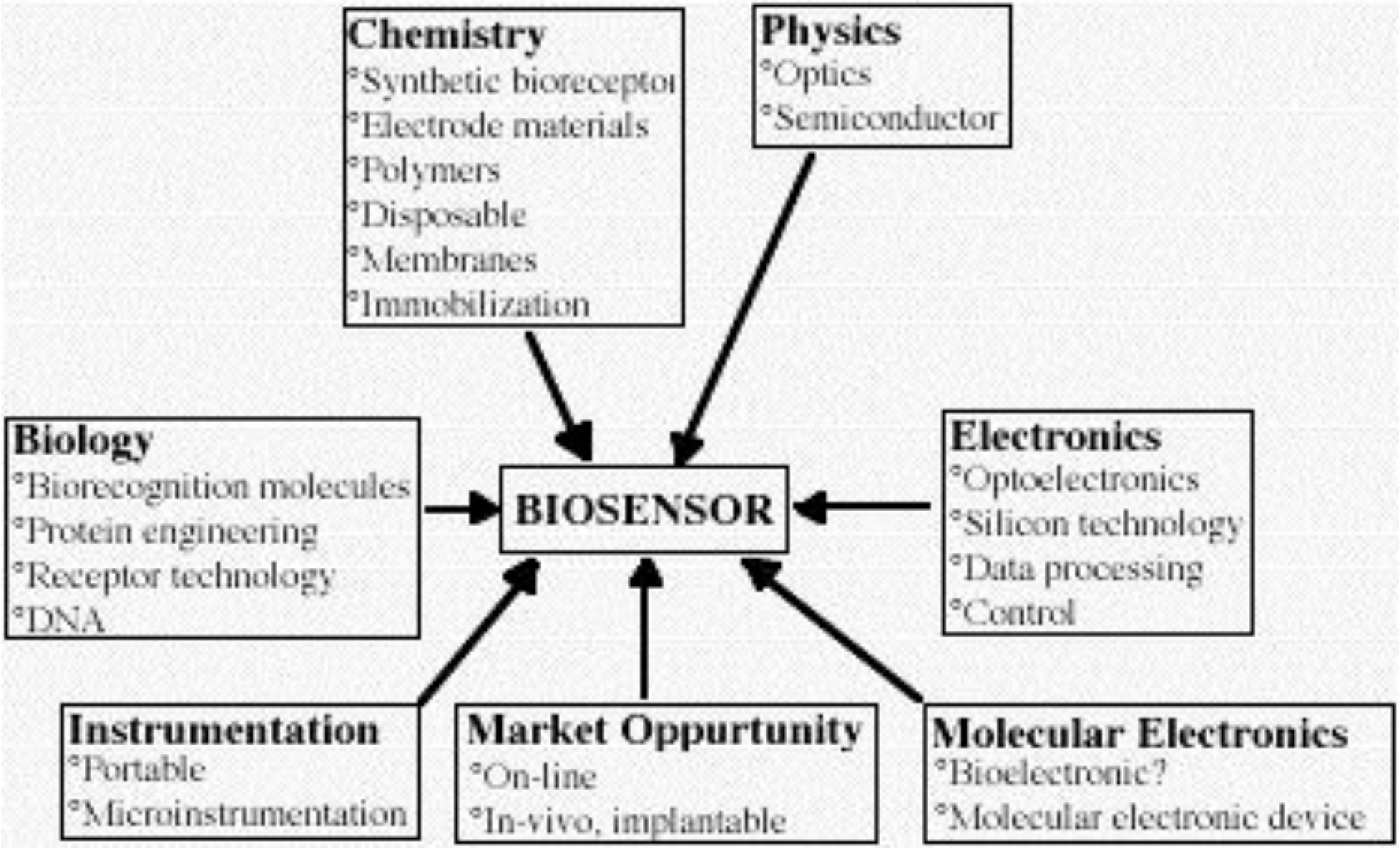
Идея: использовать предельно миниатюризированные устройства для получения результатов на макроуровне.

Результат: аналитические биочипы, молекулярные моторы

Назначение: анализ жидких смесей химических соединений, определение свойств молекулярных образований

Масштаб: в 1 см2 10000 анализаторов

1. Мультидисциплинарность биосенсора



2. История создания биочипов

Важнейшей вехой в развитии биохимии было открытие братьями Бухнерами процесса брожения в фильтрате дрожжевых клеток, оболочки которых были разрушены растиранием с песком. Вслед за тем в 1926 г. Самнер сумел получить кристаллическую уреазу и таким образом показал, что ферменты имеют явно белковую природу. Для этого магическая роль ферментов предположительно сводилась к их органическому вплетению в жизненный процесс. Большинство исследователей полагало, что с ферментами следует обращаться как со скоропортящимися продуктами, такими, как свежие яйца, и перед измерениями или использованием их следует хранить на холоде.

О биосенсорах, т. е. сенсорах, включающих биологический материал (рис. 1.4), впервые сообщалось на симпозиуме New York Academy of Sciences в 1962 г. [6]. В этом сообщении было предложено использовать ферментные преобразователи, «встроенные» в мембраны (так, что получается подобие сандвича), чтобы сделать электрохимические сенсоры (pH, полярографические, потенциометрические или кондуктометрические) более совершенными. В результате получились сенсоры, специфически чувствительные к определенным субстратам, поскольку они детектировали образование продукта ферментативной реакции или расход одного из участвующих в этой реакции веществ. Описана, в частности, комбинация глюкозооксидазы с O_2-электродом Кларка для определения глюкозы по убыли содержания кислорода при превращении глюкозы в глюконовую кислоту и пероксид водорода.

Биочипы в России

В 1992 г. Андрей Дарьевич Мирзабеков организовал в России международный круглый стол по проблеме биочипов. Результаты, полученные в Институте молекулярной биологии РАН, произвели сильное впечатление на участников, среди которых был один из руководителей международной программы «Геном человека» Чарльз Кантор. После этого активные работы по созданию биочипов начались и за рубежом.

В середине 1990-х гг., когда финансирование научных исследований в России было практически прекращено, академик Мирзабеков был приглашен в Аргоннскую Национальную Лабораторию (Чикаго, США). Мирзабеков настоял на том, чтобы работы по созданию биочипов в США проводились совместно с Институтом молекулярной биологии РАН. В результате этих исследований на протяжении 5—6 лет был получен базовый патент на биочипы, который объединил несколько разработанных совместно технологий. Он принадлежал России, но право на его использование было куплено компаниями Моторола и Хьюлетт Паккард. По соглашению с руководством Аргоннской Национальной Лаборатории 50 % доходов от патентов поступало ей, а остальные 50 % в Институт молекулярной биологии РАН. На заработанные деньги было закуплено исследовательское и технологическое оборудование, позволившее организовать не только дальнейшее изучение, но и производство биочипов. Позже, когда доходы от производства биочипов стали заметно расти, компании Моторола и Хьюлетт Паккард зарегистрировали свой собственный патент на модифицированную технологию производства биочипов. В то же время группой академика Мирзабекова была разработана и запатентована более совершенная технология.

3. Ферментный электрод Кларка

Первый ферментный электрод.
Кларк, Лайонс 1962.
Ввели термин «ферментный электрод»

$$\text{Глюкоза} + O_2 \longrightarrow \text{Глюконолактон} + H_2O_2$$

$$\text{Глюконолактон} \xrightarrow{H_2O} \text{Глюконовая кислота}$$

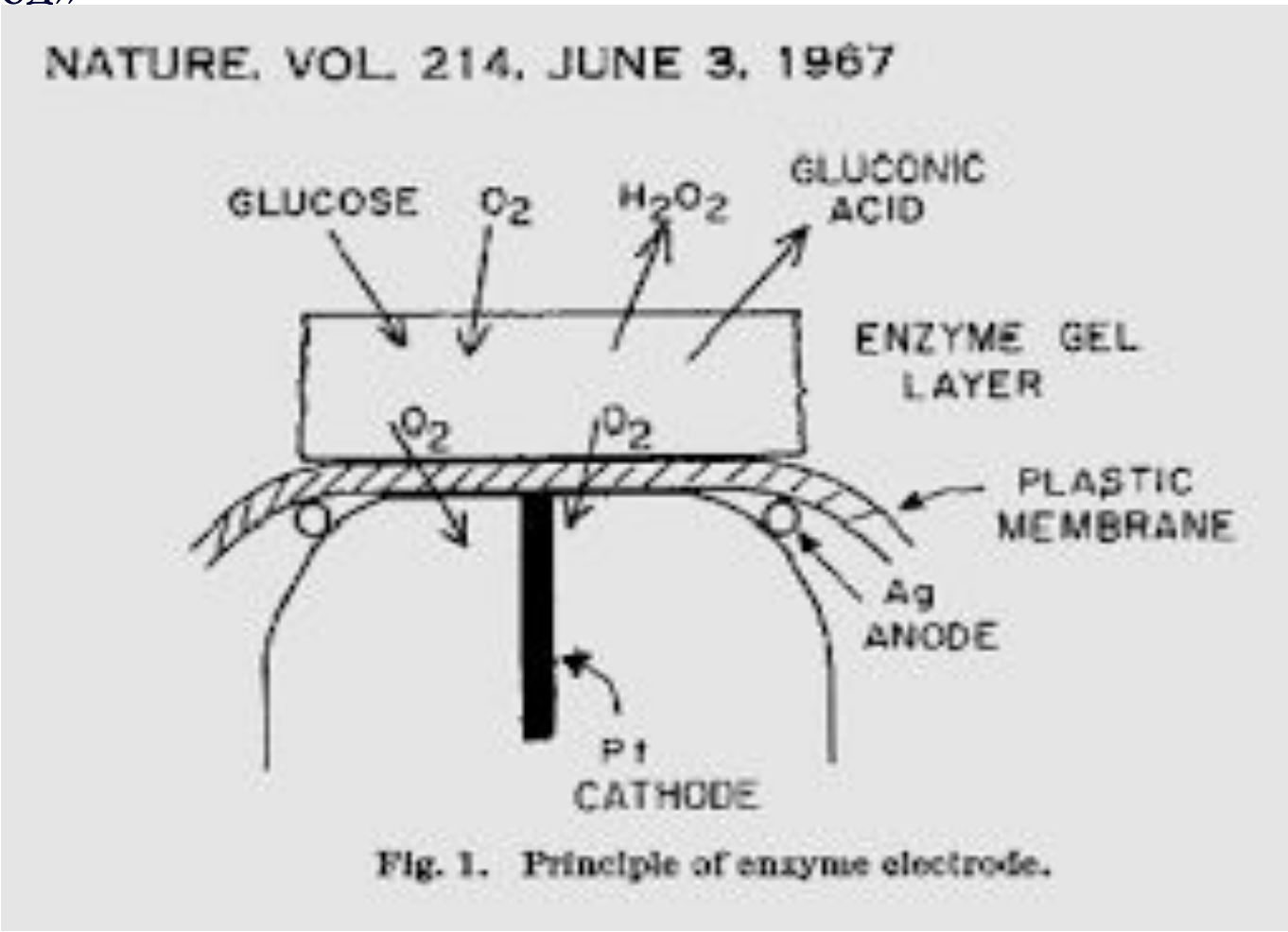


Fig. 1. Principle of enzyme electrode.

Ферментный электрод Кларка

Первая, предложенная Кларком система основана на электроде, измеряющем в диффузионно-контролируемом режиме количество поглощенного кислорода. Было применено большое число оксидаз, использующих кислород для селективного окисления углеводов, аминокислот, органических кислот.

В конечном варианте электрода Кларка использовали:

Фермент: глюкозооксидаза

Электрод: платиновый при напряжении + 0,6 V . На нём закреплен фермент в мембрановом «сэндвиче». Электрод даёт сигнал от результата взаимодействия фермента с субстратом. Целевое определяемое вещество:

$$\text{Глюкоза} + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose Oxidase}} \text{Глюконолактон} + H_2O_2$$

$$\text{Глюконолактон} \xrightarrow{H_2O} \text{Глюконовая кислота}$$

Назначение: измерение уровня глюкозы в крови.

Устройство:Yellow Springs Instrument (Model 23 YSI) появилось в 1974 году

Использование селективной мембраны в электроде Кларка

Назначение мембраны в Yellow Springs Instrument: предотвратить влияние других электрически-активных веществ на показания. При поляризации мембраны на +0.6V, основное влияние на измерение H2O2 происходит за счёт аскорбиновой кислоты.

Критерии выбора сочетания «мембрана-фермент»:

- Мембрана между электродом и слоем фермента должна пропускать H202, и одновременно предотвращать прохождение аскорбиновой к-ты и других влияющих на измерение в-тв
- Мембрана между слоем фермента и образцом должна пропускать субстрат/аналит к слою фермента

В YSI: слой фермента находился между целюллозо-ацетатной мембраной и поликарбонатной (Nucleopore polycarbonate membrane.)

Принципиальная схема биосенсора

Задание: найдите на схеме P, где происходит перенос электронов?

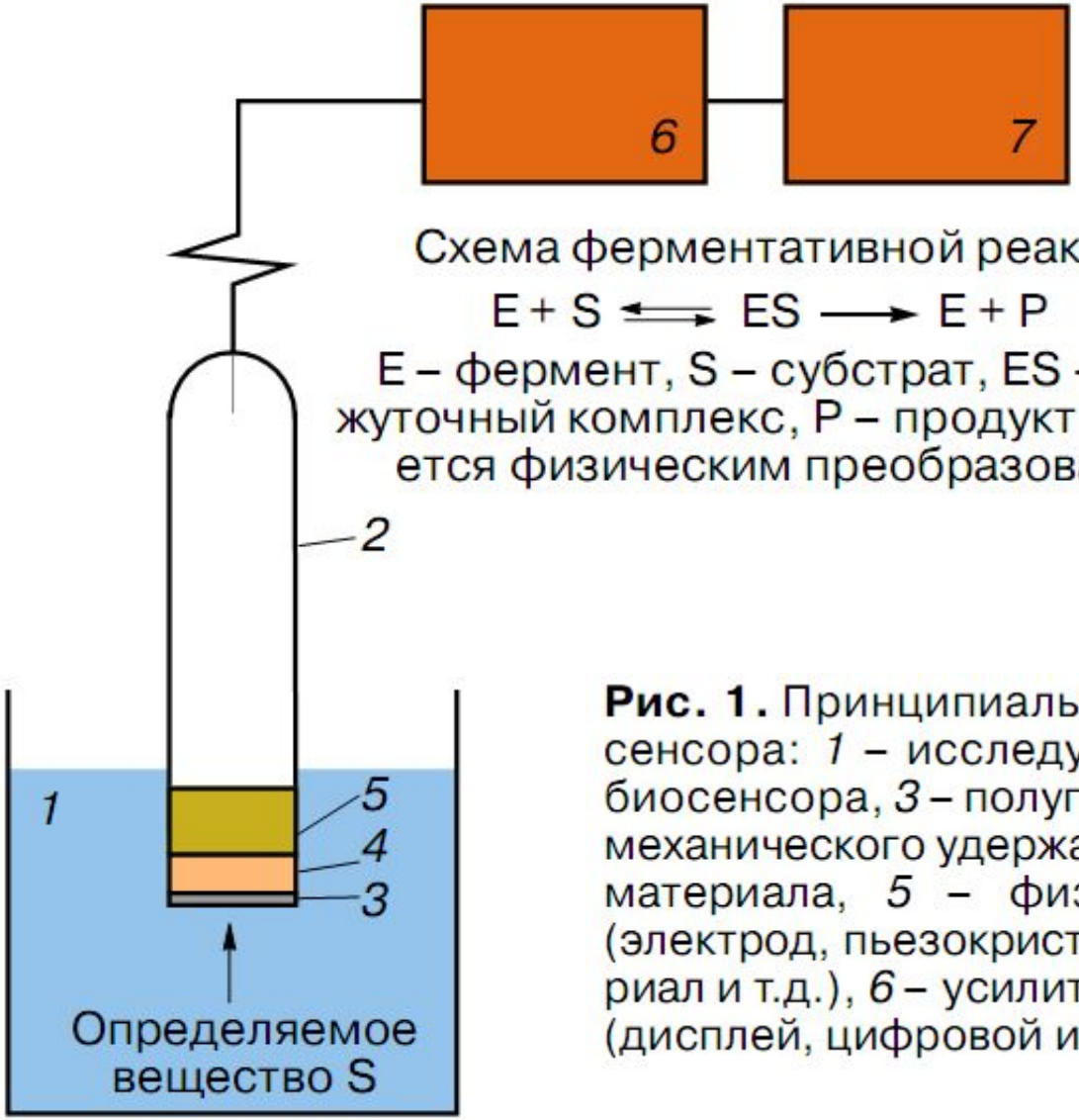


Схема ферментативной реакции

$$E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$$

E – фермент, S – субстрат, ES – промежуточный комплекс, P – продукт (фиксируется физическим преобразователем)

Рис. 1. Принципиальная схема биохимического сенсора: *1* – исследуемый раствор, *2* – корпус биосенсора, *3* – полупроницаемая мембрана (для механического удержания биослоя), *4* – слой биоматериала, *5* – физический преобразователь (электрод, пьезокристалл, оптоволоконный материал и т.д.), *6* – усилитель сигнала, *7* – самописец (дисплей, цифровой или световой указатель).

Почему измерять силу тока удобно?

В общем случае S или P должны быть электрохимически активны, то есть способны быстро и желательно обратимо окисляться или восстанавливаться на электроде при наложении на него соответствующего потенциала.
Тогда сила тока (поток электронов) будет однозначно связана с концентрацией измеряемого компонента. И поэтому наиболее удобно измерять силу тока.

Например, в электроде Кларка происходит реакция:

$$\text{Глюкоза} + O_2 \longrightarrow \text{Глюконолактон} + H_2O_2$$

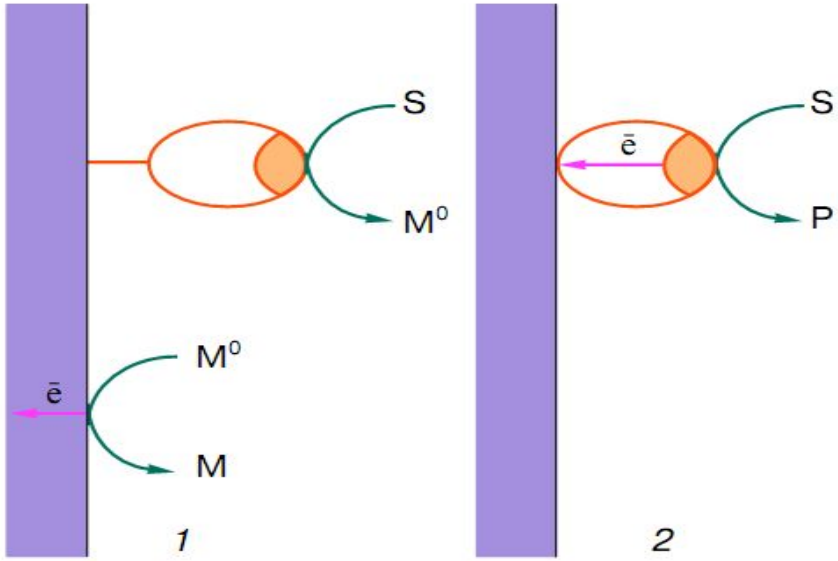
$$\text{Глюконолактон} \xrightarrow{H_2O} \text{Глюконовая кислота}$$

И перекись водорода восстанавливается до воды с выделением 2-ух электронов, что и фиксируется как изменение электрического потенциала на электроде.

Механизмы переноса электронов от субстрата к электроду

При адсорбции ферментов на твердых поверхностях (металлы, керамика, полимеры) они, как правило, сохраняют свою структуру и каталитическую активность. Фермент в режиме амперометрического биосенсора проявляет электрокаталитическую активность, то есть ускоряет процесс обмена электронами между субстратом и электродом.

Транспорт электронов м.б. осуществлён несколькими путями:



1 медиаторный **2 прямой**

Механизмы переноса электронов

1. Перенос электронов протекает с помощью диффузионно-подвижного промежуточного низкомолекулярного переносчика электронов – медиатора. Схему процесса можно представить в виде

$$S + E \longrightarrow P + E^0 \quad E^0 + M \longrightarrow E + M^0$$

$$M^0 \xrightarrow{\text{Электрод}} M^+ - e^-,$$

где E и E^0 – окисленная и восстановленная формы активного центра фермента; M и M^0 – окисленная и восстановленная формы медиатора.

Медиатор должен быть достаточно специфическим субстратом фермента и быть электрохимически активным на электроде из данного материала. Медиаторный механизм транспорта электрона достаточно широко используется для проведения электрохимических ферментативных реакций.

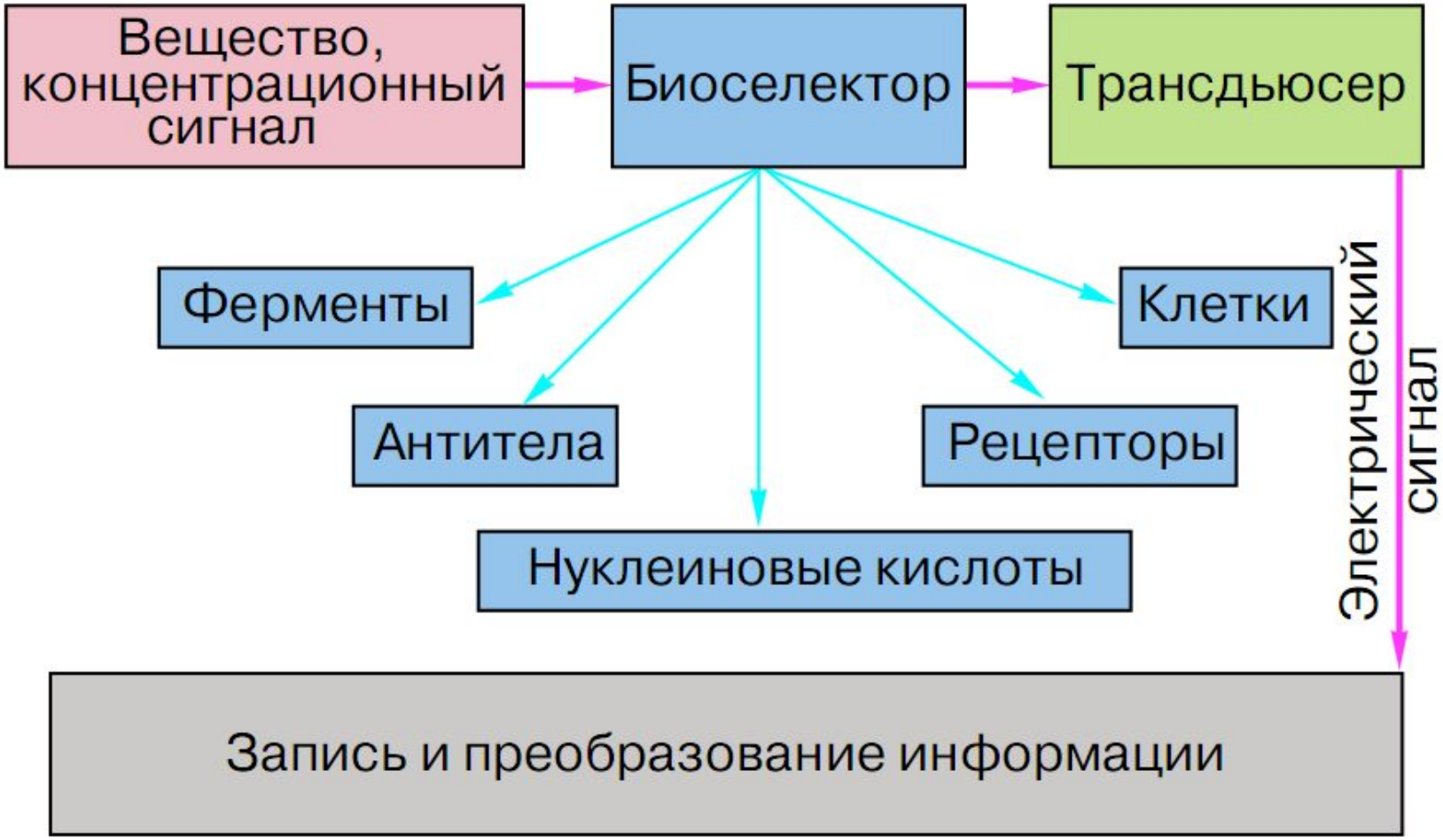
Механизмы переноса электронов

2. Происходит прямой электрокаталитический перенос электронов между электродом и активным центром фермента. Например, в атмосфере кислорода в присутствии медьсодержащей оксидазы — лакказы из Poluporoz versicolor, сорбированной на электродах из различных материалов, устанавливается потенциал, близкий к термодинамически равновесному потенциалу кислорода. При этом имеет место стадия переноса электронов из электрода на активный центр фермента. Описано и электрокаталитическое восстановление пероксида водорода с помощью иммобилизованной пероксидазы, протекающее по такому же механизму.

3. При включении ферментов в органические полупроводники (органические металлы) можно наблюдать перенос электронов между активным центром фермента и доменами в полупроводнике. Все эти механизмы транспорта электронов активно используются при конструировании биосенсоров.

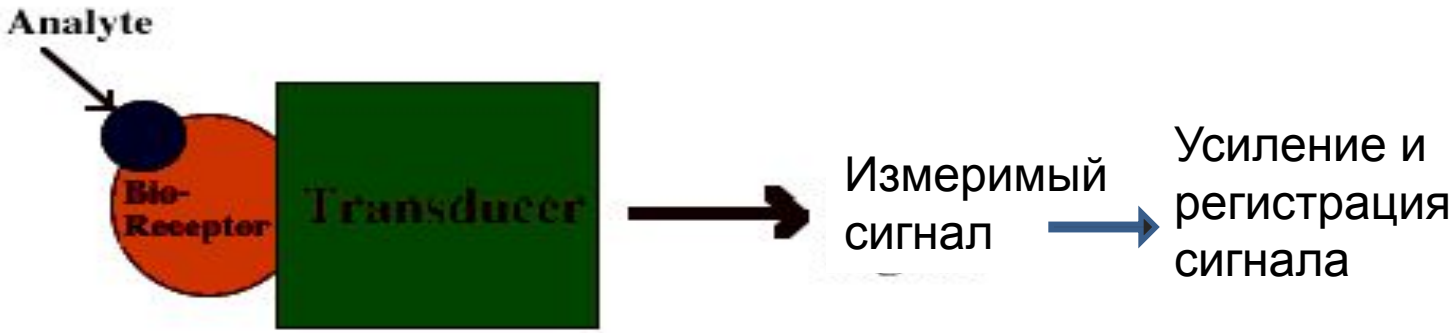
3. Общие принципы функционирования и устройство биосенсоров

Принципиальная схема биосенсора



Принципиальная схема биосенсора

Устройство биосенсора
Биосенсор = биорецептор + преобразователь.



Биорецептор распознает определяемое вещество

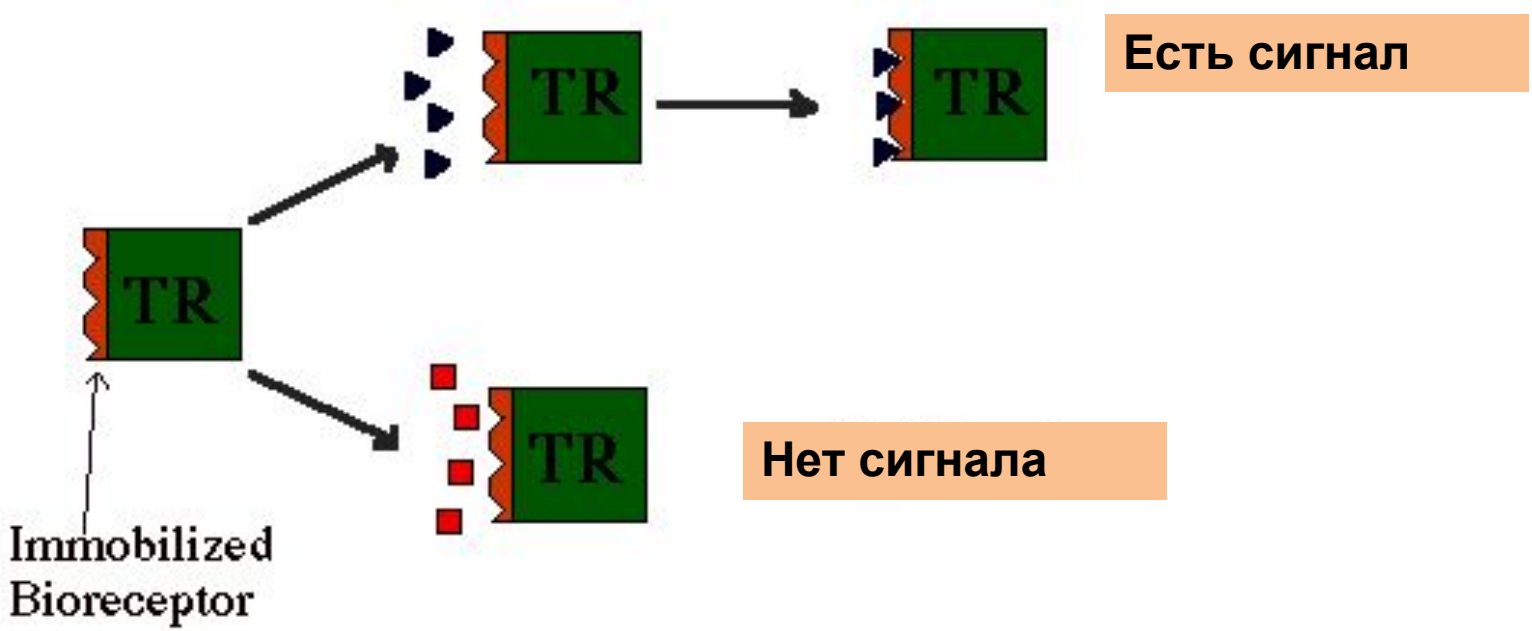
Преобразователь переводит биоузнавание в измеряемый сигнал: **трансформирует концентрационный сигнал в электрический.**

+: 1. Определение веществ без реагентов
2. Экспресс-анализ

Пример: анализаторы глюкозы в крови

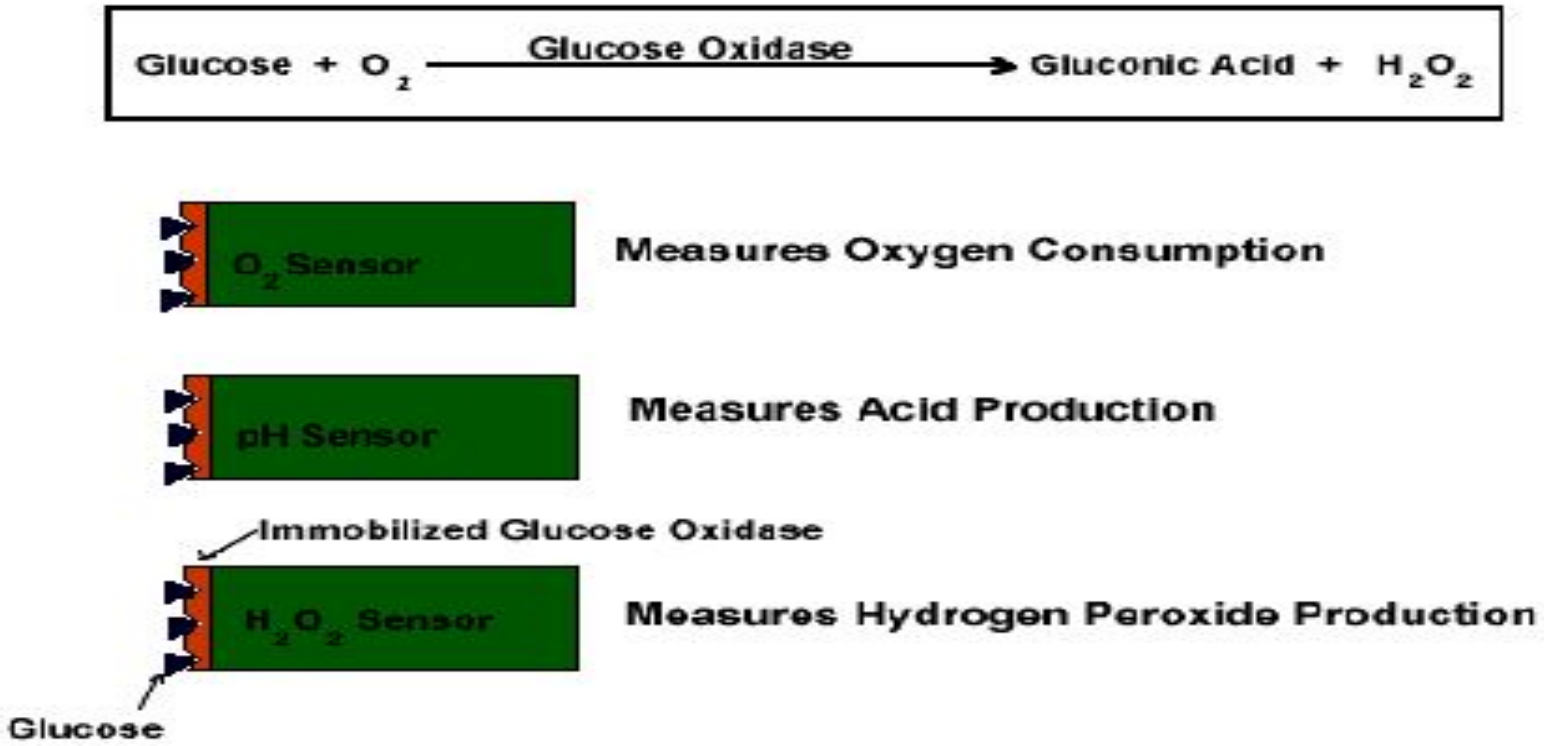
Специфичность биосенсора

В основе лежит принцип биоузнавания: реакция биорецептора специфична.



Биорецепторы: ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты и др.
искусственные распознающие элементы: аптамеры, пептиды, полимеры, полученные методом молекулярной печати

Три возможных способа электрохимической детекции для измерения количества глюкозы



Для определения глюкозы могут быть использованы:

- кислородный датчик – потребление глюкозы – измеряем **ток**

- pH датчик - концентрация глюконовой кислоты - измеряем **напряжение**

- пероксидный датчик - концентрация H_2O_2 - измеряем **ток**

Способы электрохимической детекции для измерения количества глюкозы

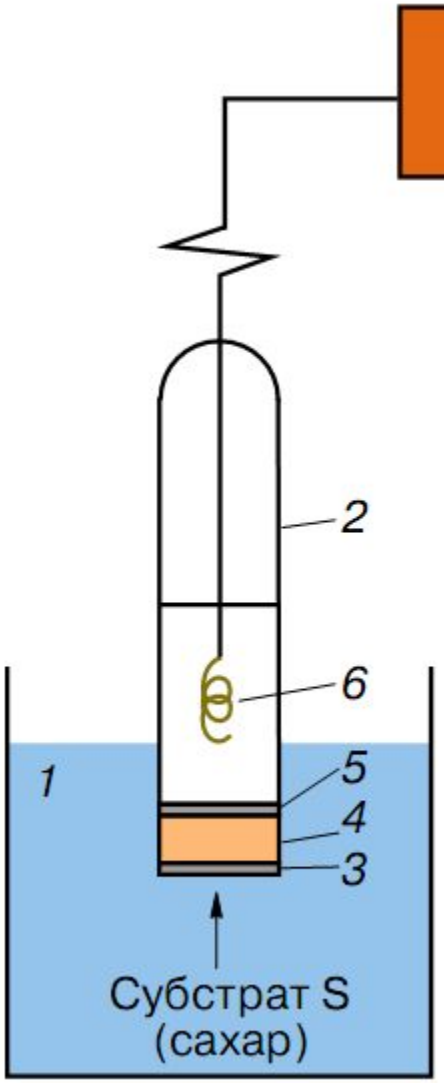


Схема ферментативной реакции

I тип био-сенсора

На катоде (физический трансдьюсер):

$O_2 + 4e + 2H_2O \longrightarrow 4OH^-$

Ферментативная реакция (биологический трансдьюсер):

II тип био-сенсора

$S(red) + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Глюкозоксидаза}} S(ox) + H_2O_2$

(Глюкоза) (Глюконовая кислота)

На аноде: $H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e$

Рис. 3. Схема работы глюкозного биосенсора: *1* – исследуемый раствор, *2* – корпус биосенсора, *3* – внешняя мембрана, *4* – слой глюкозоксидазы, *5* – внутренняя газопроницаемая мембрана, *6* – платиновый электрод (проволока) для восстановления кислорода, *7* – усилитель сигнала, *8* – самописец (дисплей, цифровой или световой указатель и т.д.).

Алгоритм конструирования биосенсоров

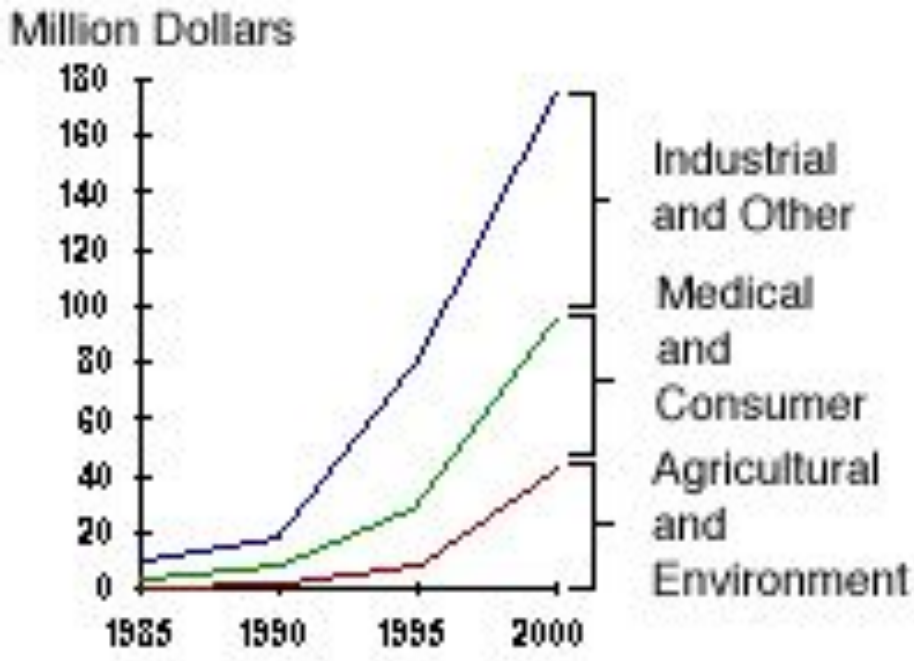
1. Задать определяемое вещество
2. Выбор подходящего биорецептора
3. Выбор подходящего метода иммобилизации
4. Выбор подходящего преобразователя
5. Конструирование биосенсора с заданным пределом измерения, минимизацией помех
6. Создание рабочего устройства

Общие параметры оценки коммерческих биосенсоров

1. Соответствие среды в которой происходит измерение и сигнала
2. Точность и воспроизводимость результатов
3. Чувствительность и достаточное разрешение
4. Динамика измерения
5. Скорость ответа
6. Нечувствительность к температуре (температурная компенсация)
7. Нечувствительность к эклектическим и др. воздействиям среды
5. Возможность тестирования и калибровки
9. Надежность и возможность самодиагностики
10. Прочность
11. Необходимость обслуживания
12. Капитальные затраты
13. Переменные затраты и время жизни
14. Удобство для пользователя
15. Датчик не должен загрязнять среду где происходит измерение

Вопрос: Сферы применения биосенсоров

Обзор рынка биосенсоров в США



Оценка рынка биосенсоров в 1990-е

Рынок	Оценка (млн. долларов)
Медицина и хирургия	220
Ветеринария и с/х	105
Окружающая среда и мониторинг безопасности	67
Мониторинг за промышленными процессами	59

Прогнозы развития и производители биосенсоров

Прогноз P&S Market Research: мировой рынок биосенсоров к 2020 достигнет 22,49 миллиарда долларов.

Глобальный рынок стремительно расширяется.

Причина: огромное количество больных сахарным диабетом 2 типа. В Европе, согласно данным Международной федерации диабета (IDF), в 2013 году приблизительно 52 миллиона человек страдали сахарным диабетом.

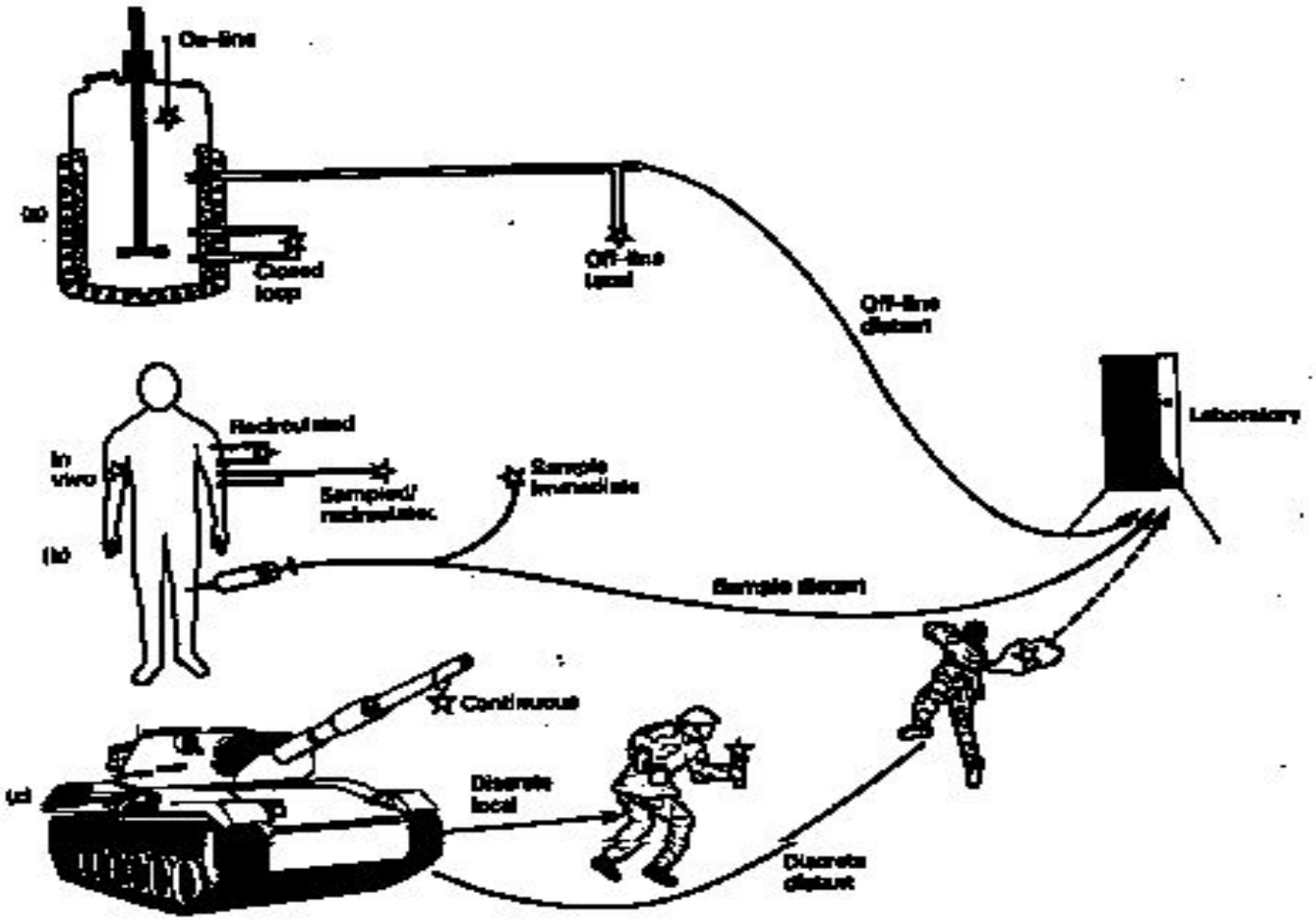
Скорость распространения биосенсорных устройств для диабетиков вышее всего в Европе, Северной Америке, Китае

Лидеры по производству биосенсоров:

- Siemens Healthcare
- Abbott Laboratories
- Johnson and Johnson
- Hoffmann La Roche
- Medtronic Inc.
- Bayer AG

Основные направления применения биосенсоров

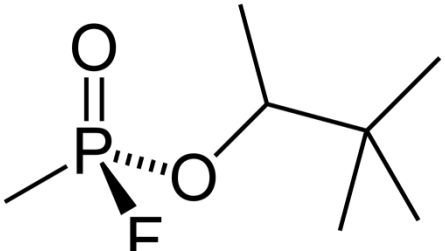
Comparison of sensing modes: (a) bioreactor; (b) clinical applications; (c) military or environmental monitoring



Определение супертоксинов и боевых отравляющих веществ

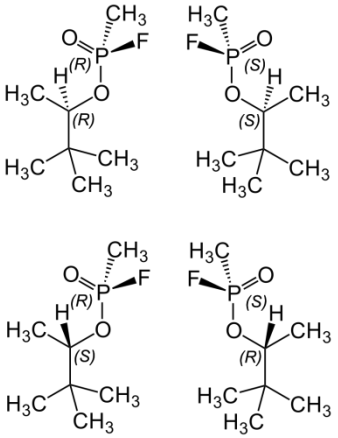
Яды, блокирующие в ЦНС ацетилхолинэстеразу - группа фосфоорганических соединений.

По аналогичному механизму действуют большинство пестицидов.



зоман

Зома́н — фосфорорганическое вещество, бесцветная жидкость, имеющая, по разным данным, запах яблок, камфоры или слабый запах скошенного сена.
Обозначения: GD, EA 1210, PFMP



изомеры зомана

Боевое отравляющее веществоБоевое отравляющее вещество нервно-паралитического действия. По многим свойствам очень похож на заринБоевое отравляющее вещество нервно-паралитического действия. По многим свойствам очень похож на зарин, однако токсичнее его более чем в 2,5 раза. Стойкость зомана несколько выше, чем у зарина. Используется смесь

Определение супертоксинов и боевых отравляющих веществ

Существуют биосенсоры для детекции этих соединений.
В основе определения лежат реакции:

$$\text{ацетилхолин} \xrightarrow{\text{Ацетилхолинэстераза}}$$

$$\xrightarrow{\text{Ацетилхолинэстераза}} \text{холин} + \text{уксусная кислота},$$

$$\text{холин} + O_2 \xrightarrow{\text{Холиноксидаза}} H_2O_2 + \text{оксихолин},$$

$$H_2O_2 \xrightarrow[\text{Пероксидаза}]{} H_2O + 2e^-.$$

В электрокаталитическом режиме

Определение супертоксинов и боевых отравляющих веществ

Механизм определения:

ингибитор (зарин, зоман) блокирует активность ацетилхолинэстеразы в конечном итоге **уменьшая пероксидазный электрокаталитический ток** через поверхность электрода.

Чувствительность биосенсора до 10^{-12} М.

Перенос электронов между активным центром фермента и электродом происходит за счет использования для иммоби лизации ферментов в **матрице проводников и полупроводников** двух классов:

1: полипирол, полианилин, полимер метиленовый синий;

2: соли на основе тетрацианхинодиметана.

Аналитические возможности применения биосенсоров

Применения клеточных биосенсоров достаточно многообразны. Созданы биосенсоры для селективного определения фенолов, пролина, глутамина, тирозина, молочной и аскорбиновой кислот, глюкозы. Интересные возможности связаны с анализом сульфат-иона, аммония, монометилсульфата. Уникальные возможности обеспечивают клеточные биосенсоры для экспресс-анализа качества воды и сточных вод. Существует метод определения БПК (биологического потребления кислорода) – анализ на определение совокупности органических соединений, которые могут быть использованы микроорганизмами. Традиционный метод требует для получения данных несколько дней. Биосенсор с иммобилизованными клетками позволяет получать эти же результаты в течение нескольких минут.

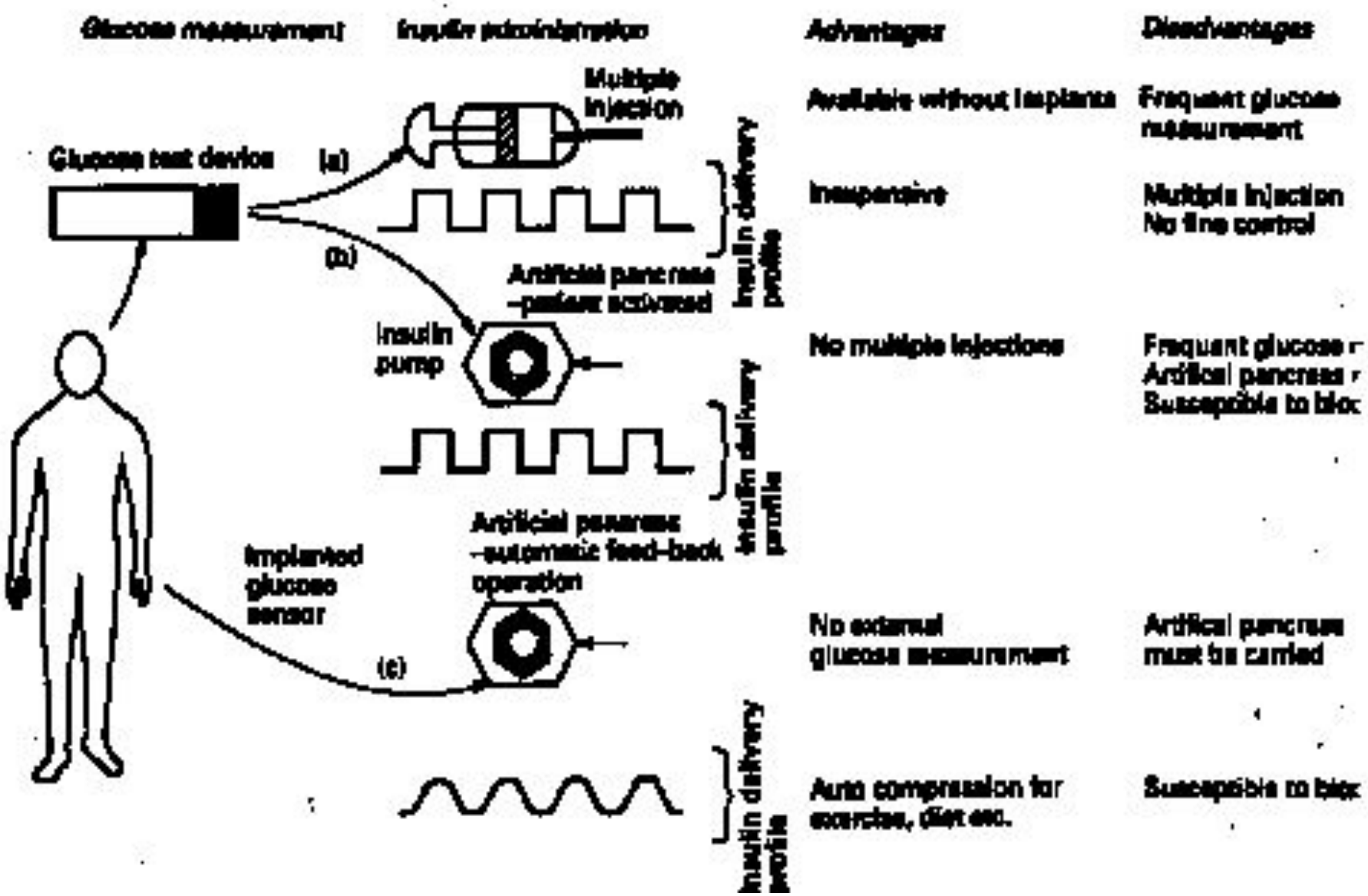
Здравоохранение и биосенсоры

- **1. Measurement of Metabolites** The initial impetus for advancing sensor technology came from health care area, where it is now generally recognized that measurements of blood gases, ions and metabolites are often essential and allow a better estimation of the metabolic state of a patient. In intensive care units for example, patients frequently show rapid variations in biochemical levels that require an urgent remedial action. Also, in less severe patient handling, more successful treatment can be achieved by obtaining *instant* assays. At present, the list of the most commonly required *instant* analyses is not extensive. In practice, these assays are performed by analytical laboratories, where discrete samples are analyzed, frequently using the more traditional analytical techniques.
- **2. Market Potential.** There is an increasing demand for inexpensive and reliable sensors to allow not only routine monitoring in the central or satellite laboratory, but also analysis with greater patient contact, such as in the hospital ward, emergency rooms, and operating rooms. Ultimately, patients themselves should be able to use biosensors in the monitoring and control of some treatable condition, such as diabetes. It is probably true to say that **the major biosensor market may be found where an immediate assay is required.** If the cost of laboratory maintenance are counted with the direct analytical costs, then low-cost biosensor devices can be desirable in the whole spectrum of analytical applications from hospital to home.

Здравоохранение и биосенсоры

- **3. Diabetes.** The 'classic' and most widely explored example of closed-loop drugcontrol is probably to be found in the development of an artificial pancreas. Diabetic patients have a relative or absolute lack of insulin, a polypeptide hormone produced by the beta-cells of the pancreas, which is essential to the metabolism of a number of carbon sources. This deficiency causes various metabolic abnormalities, including higher than normal blood glucose levels. For such patients, insulin must be supplied externally. This has usually been achieved by subcutaneous injection, but fine control is difficult and hyperglycaemia cannot be totally avoided, or even hypoglycaemia is sometimes induced, causing impaired consciousness and the serious long-term complications to tissue associated with this intermittent low glucose condition.
- **4. Insulin Therapy.** Better methods for the treatment of insulin-dependent diabetes havebeen sought and infusion systems for continuous insulin delivery have been developed. However, regardless of the method of insulin therapy, its induction must be made in response to information on the current blood glucose levels in the patient. Three schemes are possible (Fig. 1.6), the first two dependent on discrete manual glucose measurement and the third a 'closed-loop' system, where insulin delivery is controlled by the output of a glucose sensor which is integrated with the insulin infuser. In the former case, glucose has been estimated on 'finger-prick' blood samples with a colorimetric test strip or more recently with an amperometric 'pen'-size biosensor device by the patient themselves. Obviously these diagnostic kits must be easily portable, very simple to use and require the minimum of expert interpretation. However, even with the ability to monitor current glucose levels, intensive conventional insulin therapy requires multiple daily injections and is unable to anticipate future states between each application, where diet and exercise may require modification of the insulin dose. For example, it was shown that administration of glucose by subcutaneous injection, 60 min before a meal provides the best glucose/insulin management.

Схемы инсулиновой терапии с применением биосенсоров



Требования к вживляемому биосенсору для контроля глюкозы

1. Линейный сигнал в диапазоне 0 - 20 мМ с разрешением 1 мМ
2. Специфичен для глюкозы; не зависит от изменения концентрации метаболитов и условий окружающей среды
3. Биосовместимые
4. Маленький --- вызывает минимальное повреждение ткани во время введения
5. Внешняя калибровка и дрейф <10% за 24 часа Время отклика <10 мин
6. Продолжительное время жизни - не менее нескольких дней, предпочтительно несколько недель

Здравоохранение и биосенсоры

- **5. Artificial Pancreas.** The introduction of a closed-loop system, where integrated glucose measurements provide feedback control on a pre-programmed insulin administration based on habitual requirement, would therefore relieve the patient of frequent assay requirements and perhaps more desirably frequent injections. Ultimately, the closed-loop system becomes an artificial pancreas, where the glycaemic control is achieved through an **implantable glucose sensor**. Obviously, the requirements for this sensor are very different to those for the discrete measurement kits. As summarized in Table 1.4, the prolonged life-time and biocompatibility represent the major requirements.

Контроль производственных процессов биосенсоры

Три метода контроля биореакторов:

1. Off-line distant: central laboratory coarse control with significant time lapse
2. Off-line local: fine control with short time lapse
3. On-line: real-time monitoring and control

On-Line Control. Method 3 is most desirable, which allows the process to follow an ideal pre-programmed fermentation profile to give maximum output. However, many problems exist with on-line measurements including in situ sterilization, sensor life-time, sensor fouling, etc. Some of the problems can be overcome if the sensor is situated so that the sample is run to waste, but this causes a volume loss, which can be particularly critical with small volume fermentations.

Off-Line контроль. Менее жесткие требования к биосенсорам

Преимущества контроля производственных процессов

- улучшенное качество продукта, уменьшение доли брака
- увеличение выхода
- управляемость процесса для настройки оптимальных условий в течение всей ферментации
- снижение требований к сырью. Варьирование характеристик может быть компенсирование точным регулированием параметров.
- уменьшение человеческого фактора
- повышение производительности и уровня автоматизации
- повышение энергоэфективности

Военное применение

- количественные тесты на основе моноклональных антител для определения (to Q-fever, nerve agents, yellow rain fungus, soman, etc.) в боевых условиях. Обычно эти измерения требуют до 20 минут.
- обнаружение всех возможных токсинов системами на основе ацетилхолина (13-20 необходимых белков позволяют обнаружить до 95% вероятных токсинов)

Мониторинг окружающей среды

- **1. Air and Water Monitoring.** Another assay situation which may involve a considerable degree of the unknown is that of environmental monitoring. The primary measurement media here will be water or air, but the variety of target analytes is vast. At sites of potential pollution, such as in factory effluent, it would be desirable to install on-line real-time monitoring and alarm, targeted at specific analytes, but in many cases random or discrete monitoring of both target species or general hazardous compounds would be sufficient. The possible analytes include biological oxygen demand (BOD) which provides a good indication of pollution, atmospheric acidity, and river water pH, detergent, herbicides, and fertilizers (organophosphates, nitrates, etc.). The survey of market potential has identified the increasing significance of this area and this is now substantiated by a strong interest from industry.

Мониторинг окружающей среды

- **2. Tuning to Application.** The potential for biosensor technology is enormous and is likely to revolutionize analysis and control of biological systems. It is possible therefore to identify very different analytical requirements and biosensor developments must be viewed under this constraint. It is often tempting to expect a single sensor targeted at a particular analyte, to be equally applicable to on-line closed-loop operation in a fermenter and pin-prick blood samples. In practice, however, the parallel development of several types of sensor, frequently employing very different measurement parameters is a more realistic.

Перспективные направления использования биосенсоров

- Клиническая диагностика и биомедицина
- с/х и ветеринарные анализы
- Контроль процессов: ферментация, анализ пищевых продуктов и напитков
- производство и анализ в микробиологии: бактериальные и вирусные анализы
- Фармацевтический и лекарственный контроль
- Контроль производственных выбросов
- Контроль загрязнений, мониторинг шахтных, промышленных и токсичных газов
- Военное дело

Тестирование КР 1
Файл КР 1

- **Тест на тему «Биосенсоры»**
- 1. Нанобиология не включает в себя область знаний:
- А. Численный анализ
- Б. Биохимия
- В. Химия
- Г. Физика
- Д. Экология
-
- 2. При проектировании и создании биосенсоров учитывают:
- А. Физические, химические и микробиологические законы
- Б. Физические и химические законы
- В. Физические, химические, микробиологические законы, электронные технологии и ориентируются на требования рынка.

- И т.д.

Принципы классификации биосенсоров

- по способу детектирования целевого аналита
- по типу используемых биорецепторов
- по механизму преобразования сигнала

Биорецепторы это…

Биологические компоненты

Целые организмы
Ткани
Клетки
Органеллы
Мембраны
Ферменты
Компоненты ферментов
Рецепторы
Антитела
Нуклеиновые кислоты
Органические молекулы

Классификации биосенсоров по типу рецептора

Рецептор	Тип биосенсора
Фермент	Аффинный / Каталитический
Антитело / Антиген	Аффинный (иммуносенсор)
Нуклеиновые кислоты / ДНК	Каталитический
Искусственный (синтетические) биоматериал	Аффинный
Клеточные структуры / Клетки	Каталитический
Ионофор	Аффинный

Аффинные рецепторы не влияют или не изменяют целевой аналит (биомаркер)

Каталитические рецепторы катализируют биохимическую реакцию.

Большинство ферментов - каталитические рецепторы.

Если ферменты не позволяют обнаружить аналит, используют антитела, как высоко селективных рецепторов.

Вывод: чувствительность биосенсора – его важная характеристика

Требования к чувствительности биосенсоров

Тип аналита + Конкретное вещество = требования к конечному диапазону обнаруживаемых концентраций (чувствительность).

Чувствительность рецепторов по некоторым анализируемого вещества (аналита):

Метаболиты:> 10^{-6} моль/л,
Гормоны: 10^{-10}-10^{-5} моль/л, и желательны уровни до 10^{-20} моль/л.
Вирусы: желательно 10^{-12} моль/л.

Диапазоны обнаружения, необходимые для некоторых клинически важных аналитов

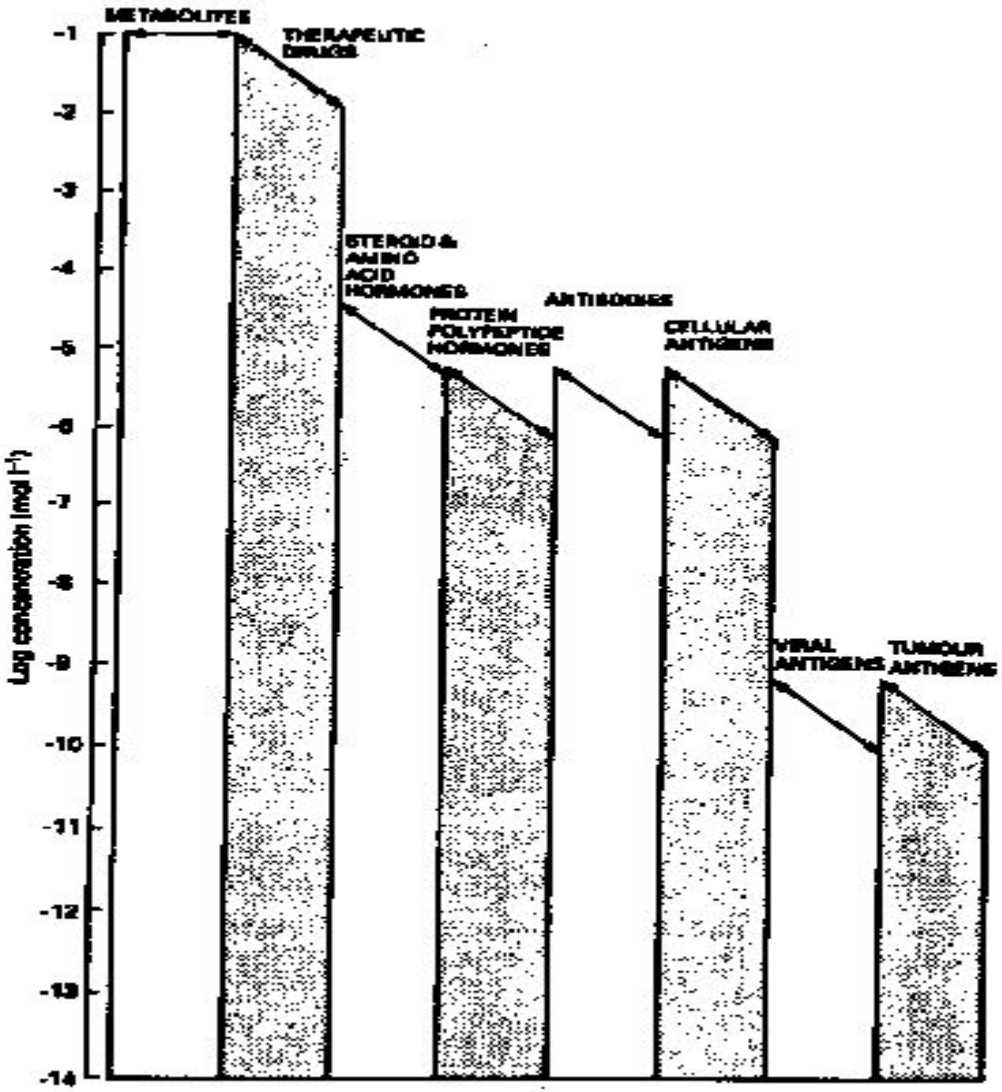


Fig. 1.13. Detection ranges required for some clinically important analytes.

Вывод: Судя по пределам обнаружения, для датчика антигена следует использовать различные подходы измерения концентрации ионов.

Ферменты наиболее часто используемые для создания биосенсоров

Аналит	Фермент
Амигдалин	β-Гликохидаза
Аспарагин	Аспарагиназа
Холестерин	Холестерол оксидаза
Сложные эфиры	Химотрипсин
Глюкозы	Глкозооксидаза
Пероксид водорода	Каталаза
Липиды	Липаза
Пенициллин G	Пенициллиназа
Белки	Трипсин
Крахмал	Амилаза
Сахароза	Инвертаза
Мочевина	Уреаза
Мочевая кислота	Уриказа

Иммуноанализ и ДНК-зонды

В **иммуноанализе** связывание антитела и антигена приводит к увеличению молекулярной массы и объема, за ним обычно следует фотометрический, радиоактивный или даже ферментный маркер.

ДНК-зонды

В анализе ДНК-зонда гибридизация нитей ДНК-антигена приводит к увеличению молекулярной массы и объема. Обнаружение этого события такое же, как и при иммуноанализе.

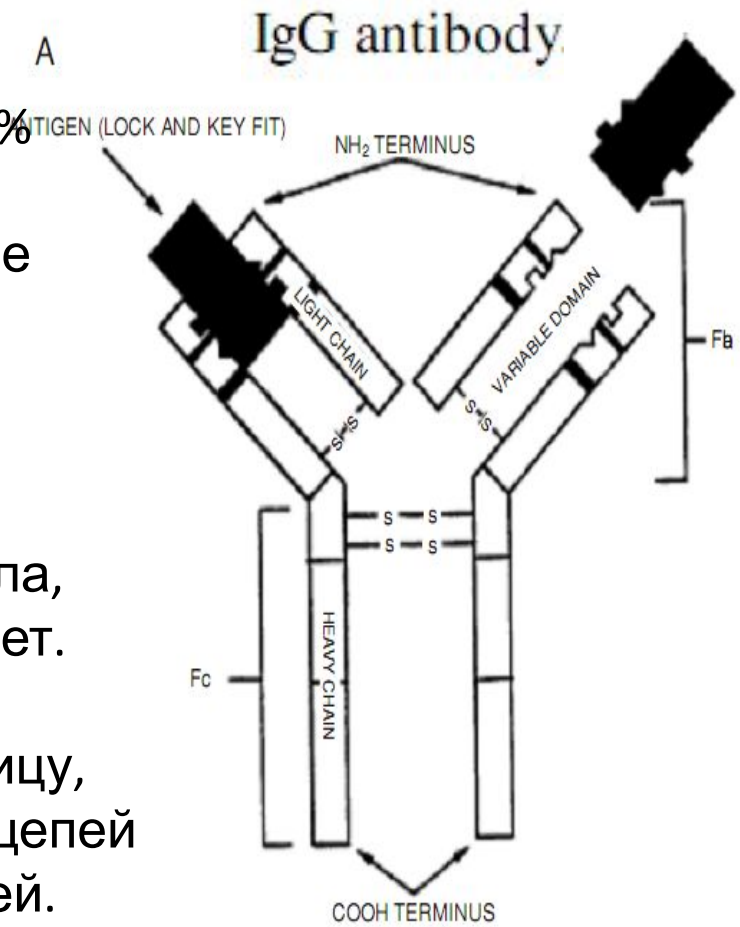
Радиоизотопы - существует множество причин замены радиоизотопных меток на нерадиоактивные,

Фотометрия - низкая чувствительность

Ферменты - наиболее перспективная формоа маркировки.

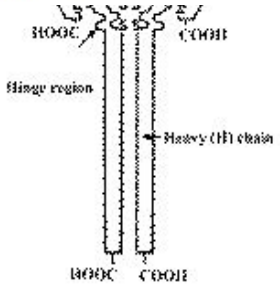
Биомолекулы - рецепторы

1. **Антитела.** Белки; составляют около 20% общего белка плазмы, называются иммуноглобулинами (ig). Самые простые антитела Y-образные молекулы с двумя идентичными сайтами связывания для антигена.



Антиген - практически любая макромолекула, способная индуцировать иммунный ответ.

Антитело имеет базовую структурную единицу, состоящую из четырех полипептидных цепей - двух легких цепей и двух тяжелых цепей. Антитело обратимо связывается со специфическим антигеном.



Антитело - не катализатор.

Биомолекулы - рецепторы

2. Рецепторные белки.

Белковые молекулы со специфическим сродством к гормонам, антителам, ферментам и другим биологически активным соединениям. В основном связаны с мембраной (рис. 1.9с). Существуют гормональные рецепторы, вкусовые рецепторы, обонятельные рецепторы для обоняния, фоторецепторы для глаз и т.д. Рецепторные белки отвечают за открытие и закрытие мембранных каналов для транспорта специфических метаболитов.

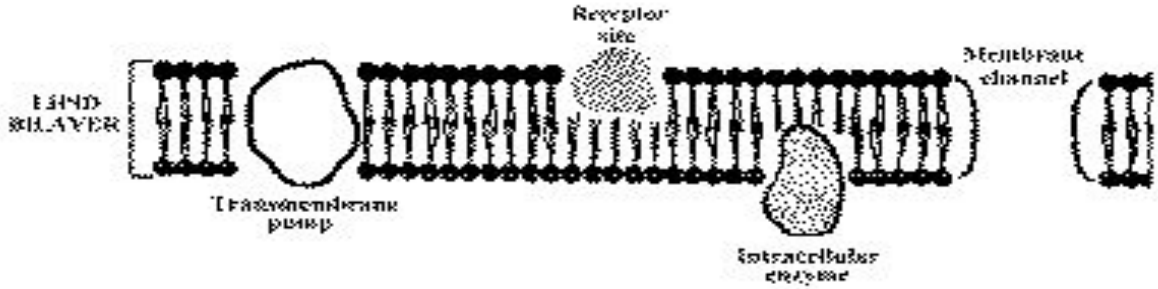


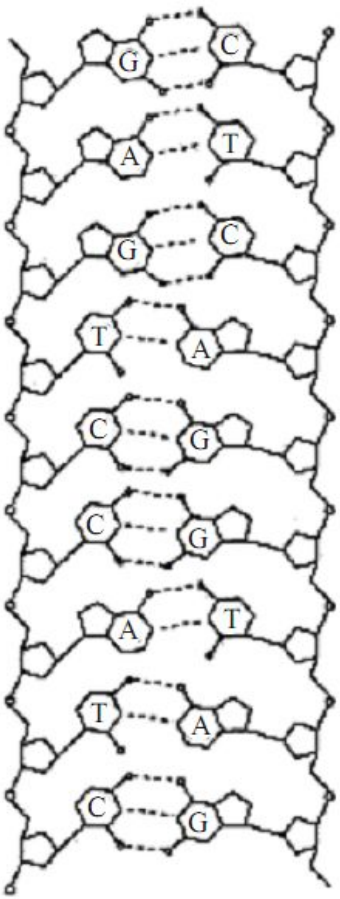
Fig. 1.9. Bioreceptor molecules used for biosensor applications: (a) enzyme; (b) antibody; (c) protein receptor

3. ДНК - молекула-рецептор (геносенсор)

Принцип комплементарности:

:thymine (A:T) and cytosine:guanosine (C:G)

Double-Stranded DNA



Hybridization Principle

3. ДНК - молекула-рецептор

If the sequence of bases composing a certain part of the DNA molecule is known, then the complementary sequence, often called a probe, can be synthesized and labeled with an optically detectable compound (e.g., a fluorescent label). By unwinding the double-stranded DNA into single strands, adding the probe, and then annealing the strands, the labeled probe will hybridize to its complementary sequence on the target molecule.

DNA biosensors have been developed for the monitoring of DNA-ligand interactions [26]. Surface plasmon resonance was used to monitor real-time binding of low molecular weight ligands to DNA fragments that were irreversibly bound to the sensor surface via Coulombic interactions. The DNA layer remained stable over a period of several days and was confirmed using ellipsometry. The sensor was capable of detecting binding effects between 10 and 400 pg/mm^2. Binding rates and equilibrium coverages were determined for various ligands by changing the ligand concentration. In addition, affinity constants, association rates and dissociation rates were also determined for these various ligands.

Another type of biosensor uses a peptide nucleic acid as the biorecognition element [33]. The peptide nucleic acid is an artificial oligo amide that is capable of binding very strongly to complimentary oligonucleotide sequences. Using a surface plasmon resonance sensor, the direct detection of double stranded DNA that had been amplified by a polymerase chain reaction (PCR) has been demonstrated.

3. ДНК - молекула-рецептор

Vo-Dinh and coworkers have developed a new type of DNA gene probe based on surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection [16, 49]. The SERS probes do not require the use of radioactive labels and have great potential to provide both sensitivity and selectivity via label multiplexing due to the intrinsically narrow bandwiths of Raman peaks. The effectiveness of the new detection scheme is demonstrated using the *gag* gene sequence of the human immunodefficiency (HIV) virus [16]. The development of a biosensor for DNA diagnostics using visible and near infrared (NIR) dyes has been reported [48]. The system employed a two-dimensional charge-coupled device and was used to detect the cancer suppressor *p53* gene.

Клетки как рецепторы биосенсора

1. Клетки – доступный биологический материал. Используют клетки растений, животных, человека, но наибольшее применение нашли клетки микроорганизмов, которые культивируются, легко воспроизводятся и поддерживаются в чистой культуре. В отличие от ферментов при использовании клеток не требуется дорогостоящих стадий очистки.

2. Имеющиеся методы иммобилизации позволяют получить клетки, сохраняющие около 100% активности ферментов и способные функционировать достаточно длительные промежутки времени. Клетки сохраняют все наиболее важные структуры и проявляют большую стабильность. В некоторых случаях клетки сохраняют жизнеспособность и активность ферментных систем в течение нескольких лет.

Клетки как рецепторы биосенсора

3. Клетки сохраняют, как правило, все системы жизнеобеспечения, включая ферментные стадии регенерации кофакторов. Это позволяет проводить сложные последовательные реакции, осуществляя многостадийные процессы.

4. Для многих типов клеток, особенно микробных, разработаны эффективные методы генетических операций, дающие возможность получать мутанты с высоким содержанием того или иного белка или фермента, что дает возможность оперировать с высокоэффективными каталитическими системами. Поскольку клетки сохраняют аппарат биосинтеза белка, потенциально могут быть разработаны высокоэффективные методы генодиагностики.

Клетки как рецепторы биосенсора

3. Клетки сохраняют, как правило, все системы жизнеобеспечения, включая ферментные стадии регенерации кофакторов. Это позволяет проводить сложные последовательные реакции, осуществляя многостадийные процессы.

4. Для многих типов клеток, особенно микробных, разработаны эффективные методы генетических операций, дающие возможность получать мутанты с высоким содержанием того или иного белка или фермента, что дает возможность оперировать с высокоэффективными каталитическими системами. Поскольку клетки сохраняют аппарат биосинтеза белка, потенциально могут быть разработаны высокоэффективные методы генодиагностики.

Биомолекулы - рецепторы

3. Другие. В принципе, любые биомолекулы и молекулярные сборки, которые способны распознавать целевой субстрат (= аналит), могут быть использованы в качестве биорецепторов.

Фактически, это могут быть мембранные срезы или **целые клетки**.

Биорецепторам требуется подходящая среда для поддержания их структурной целостности и биораспознающей активности.

Клетки - рецепторы

1.2.1.4. Cellular Bioreceptors Cellular structures and cells have been used in the development of biosensors and biochips [12]. These bioreceptors are either based on biorecognition by an entire cell/microorganism or a specific cellular component that is capable of specific binding to certain species. There are presently three major subclasses of this category: 1)cellular systems, 2) enzymes and 3) non-enzymatic proteins. Due to the importance and large number of biosensors based on enzymes, these have been given their own classification and were previously discussed. One of the major benefits associated with using this class of bioreceptors is that often the detection limits can be very low because of signal amplification. Many biosensors developed with these types of bioreceptors rely on their catalytic or pseudocatalytic properties.

Microorganisms offer a form of bioreceptor that often allows a whole class of compounds to be monitored. Generally these microorganism biosensors rely on the uptake of certain chemicals into the microorganism for digestion. Often, a class of chemicals is ingested by a microorganism, therefore allowing a class-specific biosensor to be created. Microorganisms such as bacteria and fungi have been used as indicators of toxicity or for the measurement of specific substances. For example, cell metabolism (e.g., growth inhibition, cell viability, substrate uptake), cell respiration or bacterial bioluminescence have been used to evaluate the effects of toxic heavy metals. Many cell organelles can be isolated and used as

Клетки - рецепторы

bioreceptors. Since cell organelles are essentially closed systems, they can be used over long periods of time. Whole mammalian tissue slices or *in vitro* cultured mammalian cells are used as biosensing elements in bioreceptors. Plant tissues are also used in plant-based biosensors because they are effective catalysts as a result of the enzymatic pathways they possess [9].

A microbial biosensor has been developed for the monitoring of short-chain fatty acids in milk [34]. Arthrobacter nicotianae microorganisms were immobilized in a calcium-alginate gel on an electrode surface. To this gel was added 0.5 mM $CaCl_2$ to help stabilize it. By monitoring the oxygen consumption of the anthrobacter nicotianae electrochemically, its respiratory activity could be monitored, thereby providing an indirect means of monitoring fatty acid consumption. Detection of short-chain fatty acids, ranging from 4 to 12 carbons in length, in milk was accomplished with butyric acid being the major substrate. A linear dynamic range from 9.5–165.5 μM is reported with a response time of 3 min. Methods for shortening the response time and recovery time of microbial sensors are also discussed.

Many proteins often serve the purpose of bioreception for intracellular reactions that will take place later or in another part of the cell. These proteins could simply be used for transport of a chemical from one place to another, such as a carrier protein or channel protein on a cellular surface. In any case, these proteins provide a means of molecular recognition through one or another type of mechanism (i.e. active site or potential sensitive site). By attaching these proteins to various types of transducers, many researchers have constructed biosensors based on non-enzymatic protein biorecognition.

Клетки - рецепторы

Detection of endotoxin using a protein bioreceptor based biosensor has been reported [17]. The liposaccharide endotoxin is a causative agent in the clinical syndrome known as sepis, which causes more than 100,000 deaths annually. This work describes an evanescent wave fiber optic biosensor that makes use of a covalently immobilized protein, polymyxin B, as the biorecognition element. The sensor is based on a competitive assay with fluorescently tagged lipopolysaccharide. When this sensor was applied to the detection of lipopolysaccharides in *E. coli*, detection of concentrations of 10 ng/mL in 30 s was reported.

Lipopeptides have been used as bioreceptors for biosensors [3]. A lipopeptide containing an antigenic peptide segment of VP1, a capsid protein of the picornavirus that causes foot-and-mouth diseases in cattle, was evaluated as a technique for monitoring antigen antibody interactions. The protein was characterized via circular dichroism and infrared spectroscopy to verify that upon self-assembly onto a solid surface it retained the same structure as in its free form. Based on surface plasmon resonance measurements, it was found that the protein was still fully accessible for antibody binding. This technique could provide an effective means of developing biomimetic ligands for binding to cell surfaces.

Биомиметические рецепторы

Методы конструирования:

-генная инженерия

-получение искусственных мембран

-молекулярные отпечатки

Техника молекулярных отпечатков:

and molecular imprinting. The molecular imprinting technique, which has recently received great interest, consists of mixing analyte molecules with monomers and a large amount of crosslinkers. Following polymerization, the hard polymer is ground into a powder and the analyte molecules are extracted with organic solvents to remove them from the polymer network. As a result the polymer has molecular holes or binding sites that are complementary to the selected analyte.

Биомиметические рецепторы

Рекомбинантная техника

Recombinant techniques, which allow for the synthesis or modification of a wide variety of binding sites using chemical means, have provided powerful tools for designing synthetic bioreceptors with desired properties. Development of a genetically engineered single-chain antibody fragment for the monitoring of phosphorylcholine has been reported [27]. In this work, protein engineering techniques are used to fuse a peptide sequence that mimics the binding properties of biotin to the carboxyterminus of the phosphorylcholine-binding fragment of IgA. This genetically engineered molecule was capable of being attached to a streptavidin monolayer and total internal reflection fluorescence was used to monitor the binding of a fluorescently labeled phosphorylcholine analog.

Биомиметические рецепторы

Искусственные мембраны

Bioreceptor systems also used artificial membranes for many different applications. Stevens and coworkers have developed an artificial membrane by incorporating gangliosides into a matrix of diacetylenic lipids (5–10% of which were derivatized with sialic acid) [5]. The lipids were allowed to self-assemble into Langmuir-Blodgett layers and were then photopolymerized via ultraviolet irradiation into polydiacetylene membranes. When cholera toxins bind to the membrane, its natural blue color changes to red and absorption measurements were used to monitor the toxin concentration. Using these polydiacetylenic lipid membranes coupled with absorption measurements, concentrations of cholera toxin as low as 20 μg/mL were capable of being monitored.

Принципы классификации биосенсоров

- по способу детектирования целевого аналита
- по типу используемых биорецепторов
- по механизму преобразования сигнала

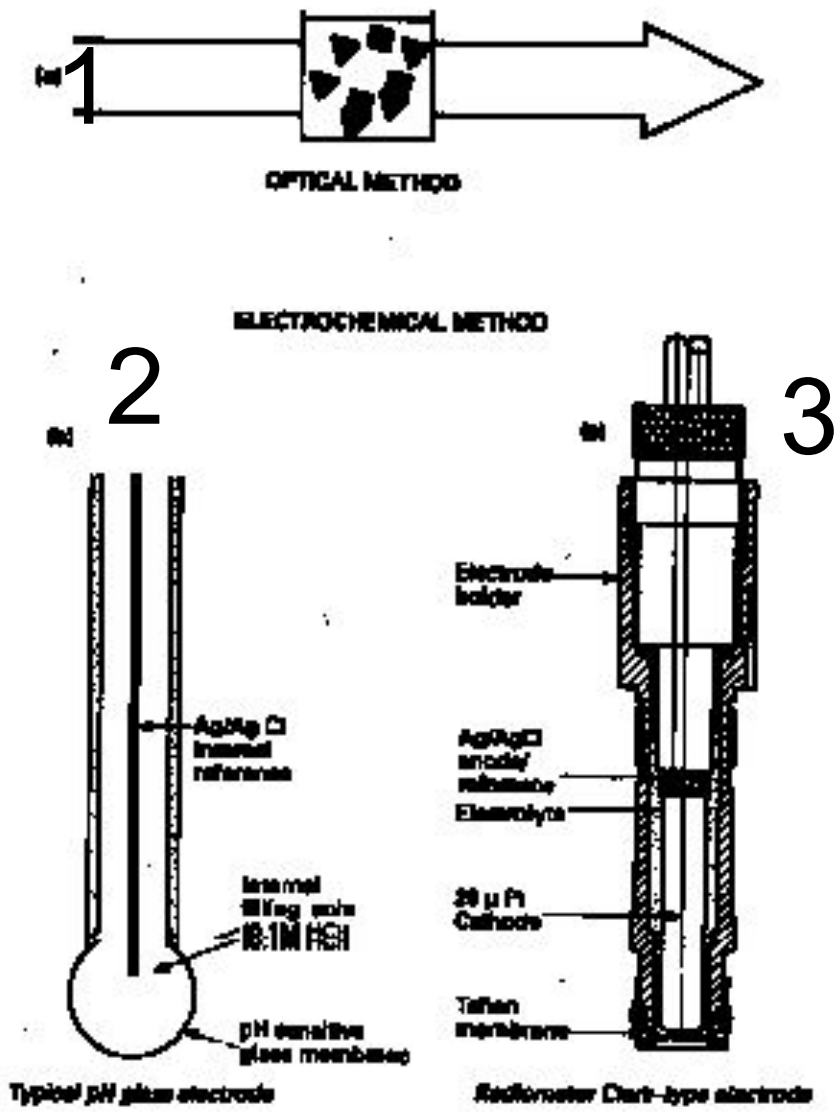
Классификация биосенсоров в зависимости от способа преобразования сигнала и используемых методов детектирования

Механизм преобразования	Метод
Механический	– изменение/определение поверхностного напряжения – изменение/определение массы – изменение/определение резонансной частоты
Оптический	– флуоресценция – хемолюминесценция – биолюминесценция – поверхностный плазмоновый резонанс – рассеивание – интерферометрия затухающих волн
Электрический	– определение проводимости – определение ёмкости – определение сопротивления
Пьезоэлектрический	– микробаланс кварцевого кристала (QCM) – поверхностная акустическая волна
Электрохимический	– потенциометрия – вольтамперометрия – использование ион-селективного полевого транзистора (ISFET) – использование химически чувствительного полевого транзистора (ChemFET)
Термальный	– калориметрия

Классификация биосенсоров в зависимости от способа преобразования сигнала и используемых методов детектирования

Используемые преобразователи

- Три типа преобразователей действий от молекулы-биорецептора в измеряемый сигнал в современных биосенсорах
- (1) фотометрический с использованием оптически волокон;
- (2) потенциометрический : pH-метрия или ионометрия
- (3) амперометрия основанная на H_2O_2 или O_2 измерениях (основан на датчике Кларка);



Откуда электрический ток при измерении концентрации аналита?

- Электрические и электрохимические биосенсоры основаны на измерении электрических величин, которые изменяются в системе при взаимодействии между рецептором и аналитом.

Определение ряда ключевых метаболитов. Многие ферменты осуществляют оксидазную реакцию с различными веществами (глюкоза, аминокислоты) с образованием перекиси водорода. В этом случае пероксидазный электрод используется для трансформации концентрационного сигнала в электрическую форму. При совместной иммобилизации двух ферментов – оксидазы и пероксидазы проходят следующие процессы:

$$AH_2 + O_2 \xrightarrow{\text{Оксидаза}} A + H_2O_2,$$

$$H_2O_2 \xrightarrow[\text{Пероксидаза}]{} H_2O + 2e^-.$$

В электрокаталитическом режиме

В условиях, когда лимитирующей является первая стадия, величина тока линейно связана с концентрацией метаболита AH_2.

Используемые преобразователи: Вольтамперометрические, амперометрические

- Реакции биологического распознавания часто генерируют химические вещества, которые могут быть измерены электрохимическими методами.

- ***Вольтамперометрические*** сенсоры позволяют осуществлять обнаружение аналитов, участвующих в О-В реакциях. Между рабочим электродом и электродом сравнения устанавливается: фиксированная величина разности потенциалов, после чего осуществляют контроль за изменением напряжения в цепи, которое пропорционально концентрации одного из продуктов аналитической реакции [18].

- **Амперометрия** по H_2O_2 (или O_2) - измеряют парой электродов. Напряжение подается на один из электродов относительно электрода сравнения (обычно Ag / AgCl или каломельный), целевые частицы (H_2O_2 или O_2) восстанавливаются на электроде, и это генерирует электрический ток.

Электрод Кларка – пример амперометрического преобразователя

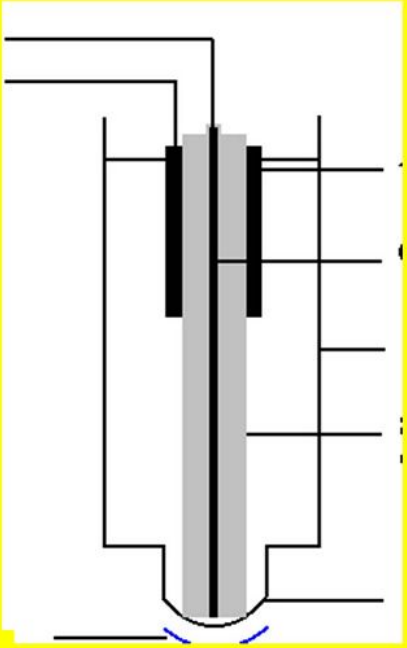
Амперометрические сенсоры
Кислородный электрод

Электрод Кларка:

- Катод (рабочий электрод): платина, золото
- Анод (элеткрод сравнения) Ag/AgCl,

Pt = катод

Анод = Ag/AgCl



Амперометрические биосенсоры

Субстрат	Биорецептор	Определяемый продукт	Уровень, mM
choline	choline oxidase	H_2O_2	500
ethanol	alcohol oxidase	H_2O_2	0 - 10
formaldehyde	f. dehydrogenase	NADH	10-3
glucose	glucose oxidase	H_2O_2, O_2	0-7 g/L
glutamine	glutamine oxidase	H_2O_2	0-25
glycerol	g. dehydrogenase	NADH, O_2	
hypoxanthine	x. oxidase	H_2O_2	4-180
lactate	lactate oxidase	H_2O_2	1-40
oligosaccharides	glucoamylase, glucose oxidase	H_2O_2	0.1-2.5
phenol	polyphenol oxidase	quinone	

Вывод: Амперометрическими биосенсорами в основном определяют H_2O_2 (за исключением NADH и хинона) который является обычным продуктом окислительно-восстановительных ферментов.

Потенциометрические преобразователи

- **Потенциометрические сенсоры** формируют аналитический сигнал как разность потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения, иммобилизованными в полупроницаемую мембрану. Измеряют мембранный потенциал (отсюда и название потенциометрия), возникающий в результате разницы в концентрациях ионов H+ или других положительных ионов на мембране.
- При этом ион-селективпый электрод (ISE) используется в качестве преобразователя/усилтеля сигнала.
- Наиболее распространён - это pH-электрод.

Потенциометрические биосенсоры

Субстрат	Биорецептор	Определяемый продукт	Уровень, mM
aspartam	L-aspartase	NH_3	0.1-0.6
fats	lipase	fatty acids	0.005-0.05
glucose	glucose oxidase	gluconic acid	0.12-2 g/L
urea	urease	NH_4, CO_2	0.01-10
nitrite	nitrite reductase	NH_4	1
penicillin	penicillinase	H^+	0.2-70
sulfate	sulfate oxidase	HS	
antigen or antibody	partner of couple	complex	0-100 ppm

Вывод: Потенциометрические биосенсоры в основном определяют содержание кислот по величине pH (CO_2 and NH_3 определяются косвенно по изменению pH).

Кондуктометрические преобразователи

Кондуктометрические сенсоры осуществляют измерение электропроводности раствора в ходе протекания аналитической реакции.

Кондуктометрические сенсоры мало пригодны для использования в каталитических реакциях, по широко применяются в реакциях, где осуществляются аффинные взаимодействия.

Преобразователи: кондуктометрические

- Мониторинг проводимости раствора изначально применялся как метод определения скорости реакции.
- Методика включает измерение изменений проводимости из-за миграции ионов. Многие связанные с ферментами реакции приводят к изменению общей концентрации ионов, поэтому они подходят для проводящих биосенсоров.

Импедансные преобразователи

Импедансные сенсоры основаны на измерении сопротивления в электрохимической ячейке или на фиксировании изменения сопротивления при варьировании вольтамперметрических характеристик.

Фотометрические преобразователи

- В **фотометрии** свет от индикаторной молекулы является измеренным сигналом. Чтобы этот метод работал, один из реагентов или продуктов реакции биораспознавания должен быть связан с колориметрическими, флуоресцентными или люминесцентными индикаторными молекулами. Обычно оптическое волокно используется для направления световых сигналов от источника к детектору.

Другие преобразователи биосенсоров

Тип преобразователя	Что измеряет	Примеры
Пьезоэлектрический	Изменение массы	Датчики на основе микробаланса
Ёмкостный	Диэлектричекие константы	Датчики антител
Термометрический	Температура	Ферментные термисторы

Преобразователи: пьезоэлектрические

В пьезоэлектрических и поверхностных акустических волновых устройствах используется поверхность, чувствительная к изменениям массы. Эти преобразователи используются там, где реакция биораспознавания вызывает изменение массы.

Преобразователи: ёмкостные

- Если реакция биопознания изменяет диэлектрическую проницаемость среды в окрестности биорецептора, в качестве преобразователя может использоваться метод измерения электрической емкости.
- Пример реакции антиген-антитело:
- Предположим, что молекулы антител иммобилизованы между двумя металлическими электродами. Когда антиген добавляется и связывается с антителом, ожидается, что диэлектрическая проницаемость среды между двумя электродами значительно изменится. Это изменение приводит к изменению емкости.

Преобразователи: термометрические

Все химические реакции сопровождаются поглощением (эндотермическим) или выделением (экзотермическим) тепла. Измерения **H**, (энтальпии) реакции при различных температурах позволяют рассчитать **S** (энтропию) и **G** (свободную энергию Гиббса) для реакции, а ,значит, собрать основные термодинамические данные.

- **Пример 1:** гидролиз АТФ является экзотермическим процессом:

$ATP_4^- + H_2O \sim ADP_3^- + HPO_4^- + H^+$; $\Delta H_{298} = -22.2$ kJ (pH 7)

- **Пример 2:**

иммунореакция между анти-HSA и его антигеном HSA дает -30,5 кДж / моль. Для этой последней реакции общее повышение температуры на 1 моль антитела составляет порядка 10^{-5} К, но многие реакции, катализируемые ферментами, имеют более высокую ΔH и вызывают более легко измеряемые изменения

Преобразователи: ферментные термисторы

- Для биосенсорного устройства биораспознавающее соединение должно быть иммобилизовано на чувствительном к температуре элементе, способном обнаруживать очень малые изменения температуры.
- Разработчики: университет Лунда.
- Первоначально они иммобилизовали глюкозооксидазу или пенициллиназу в небольшой колонке, так что термисторы контролировали изменения температуры на выходе из колонки чтобы получить термистор фермента, чувствительный к глюкозе и пенициллину, соответственно.

Ферментные биосенсоры на оптоволоконных сенсорах, детектирующие с помощью флюоресценции и взаимодействии антитела с антигеном (на оптродах)

Субстрат	Биорецептор	Определяемый продукт	Уровень, mM
ethanol	alcohol dehydrogenase	NADH	0-1
glucose	glucose oxidase	O_2	0.1-20
urease	urease	ammonia	0.3-3
lactate	lactate monooxygenase	pyruvate	0.5-1
penicillin	penicillinase	penicillinic acid	0.25-10

Биосенсоры на полевых транзисторах

Сенсоры на основе полевых транзисторов основаны на использовании ион-селективных электродов и потенциометрических системах, при этом входной транзисторный элемент помещается в анализируемый раствор. Это существенно повышает разрешающую способность и улучшает аналитические возможности биосенсора.

Чувствительный слой биосепсора располагается непосредственно па поверхности ион-селективпого электрода, представляя собой ворота полевого транзистора.

Использование: непосредственное обнаружение коротких белков и пептидов по величине их заряда.

Преобразователи: полевые транзисторы

- Идея - миниатюризация и массовое производство.
- Полевые транзисторы (FET), широко используемые в полупроводниковой промышленности в микросхемах памяти и логических микросхемах, реагируют на изменение электрического поля.
- Принцип: полевой транзистор способен обнаруживать изменения концентрации ионов, под воздействием ион-содержащих растворов. Следовательно, pH и концентрация ионов могут быть измерены с помощью FET.

- **+:** FET преобразователь может быть встроен в электронную схему обработки сигналов.

Сегодня в продаже есть датчик pH на основе FET размером с ручку

Биосенсоры на полевых транзисторах

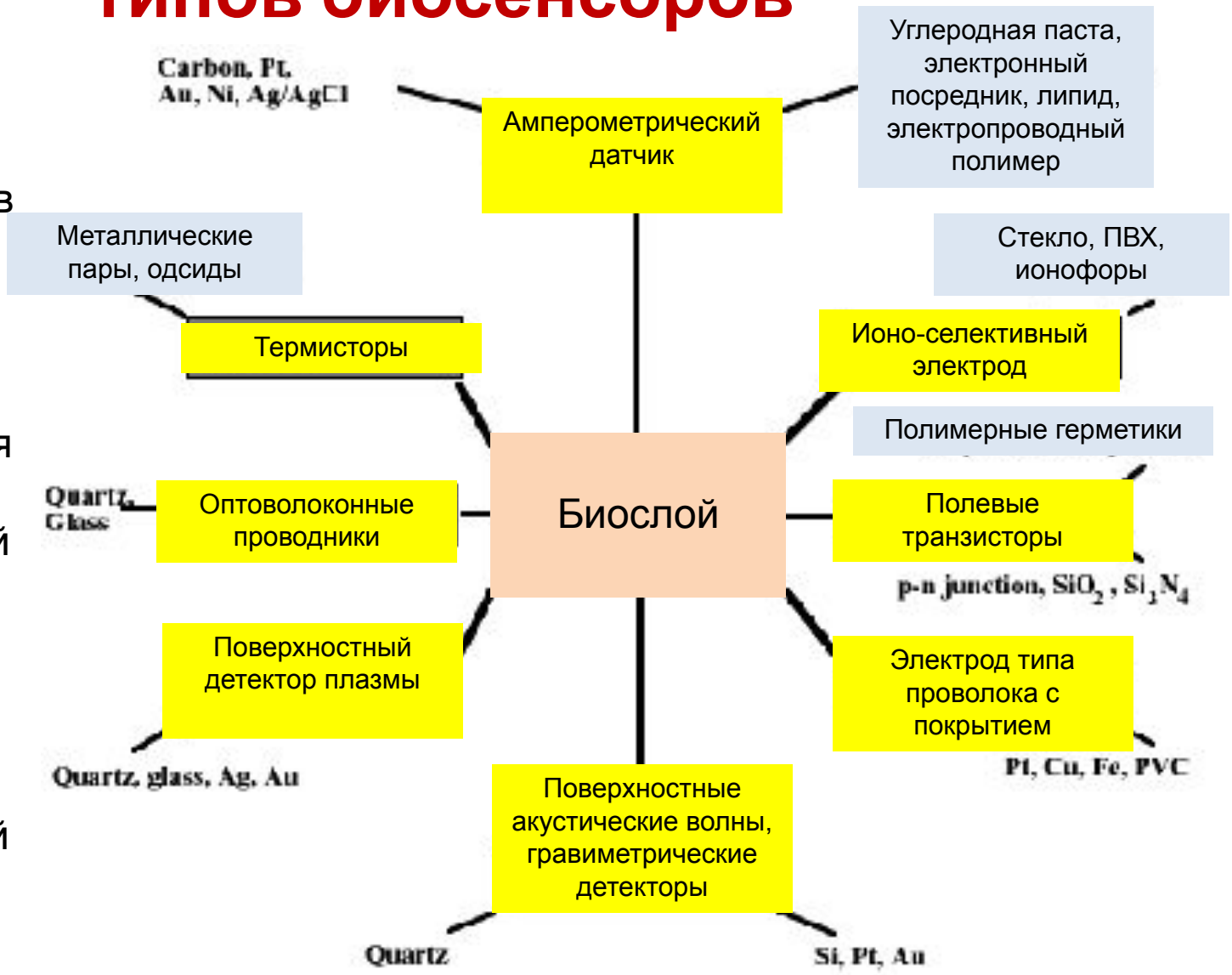
Субстрат	Биорецептор	Определяемый продукт	Уровень, mM
glucose	glucose oxidase	gluconic acid	0-20
urea	urease	CO_2, NH_3	0-6
penicillin	penicillinase	penicillic acid	0.2-20
triolein	lipase	fatty acids	0.6-3

Вывод: в настоящее время ферменты наиболее широко применяют в качестве биосенсоров. Антитела имеют ограниченное применение.

Материалы для создания различных типов биосенсоров

Молекулы биорецепторов иммобилизуются в подходящей матрице для образования биослоя, который затем помещается в непосредственной близости от датчика.

Материалы конструкций для преобразователей также приведены на рисунке.

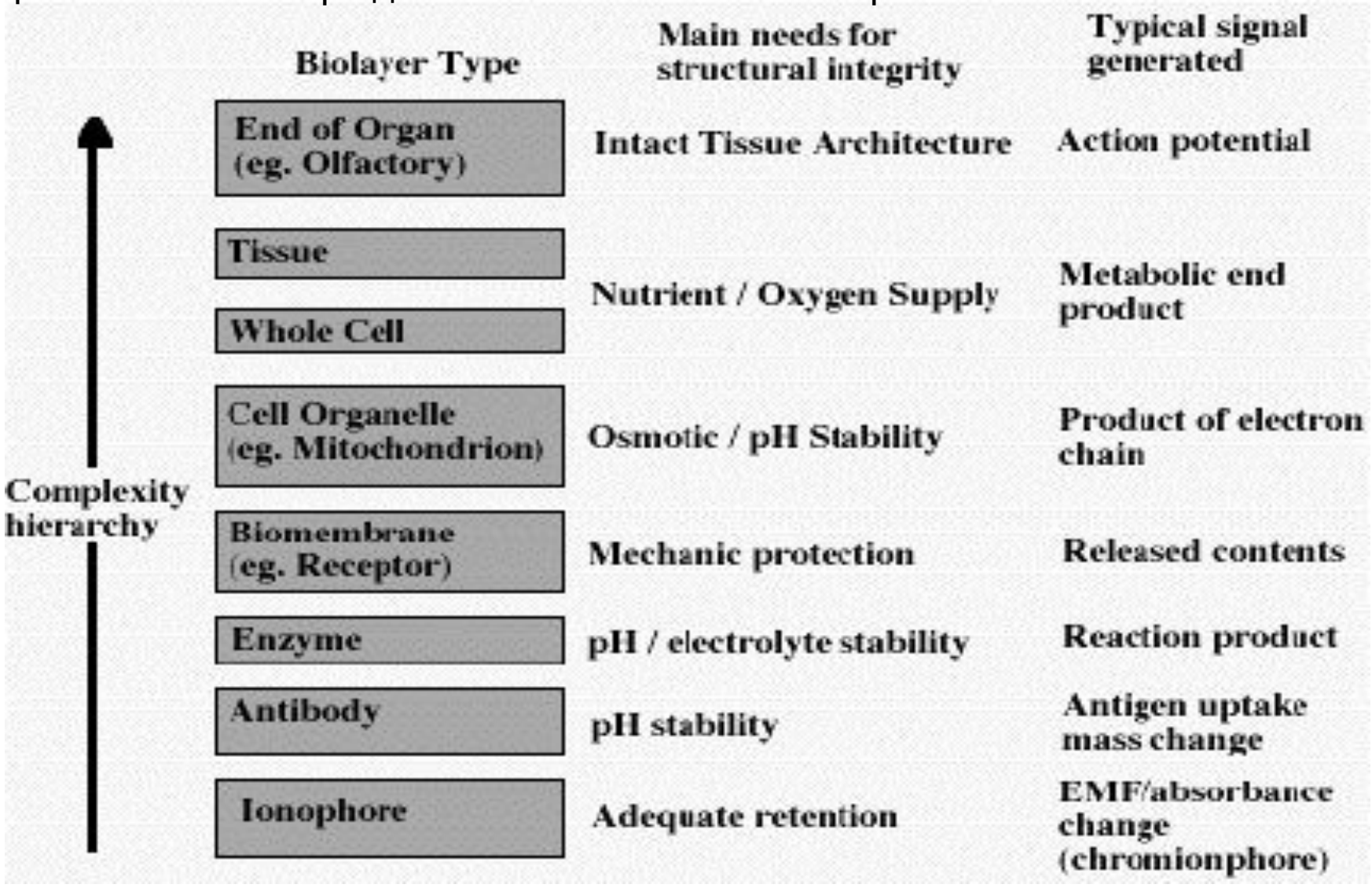


Классификация биосенсоров в зависимости от наличия специальных меток и красителей

Детектирование с меткой	Безметочное детектирование		
	оптическое	механическое	электрическое
– ELISA; – FRET; – использование квантовых точек	– поверхностный плазмоновый резонанс; – интерферометрия; – эллипросометрия; – метод резонансного зеркала	– использование кантиливера; – использование наномеханического осциллятора; – метод микробаланса кварцевого кристалла	– использование полевых транзисторов (ISFET, EnFET, HFET, NanowireFET); – использование микрофлюидных электрохимических устройств (μPED)

Требования к иммобилизации различных биорецепторов и генерируемые сигналы

Датчик в биосенсоре должен быть способен измерять этот сигнал.

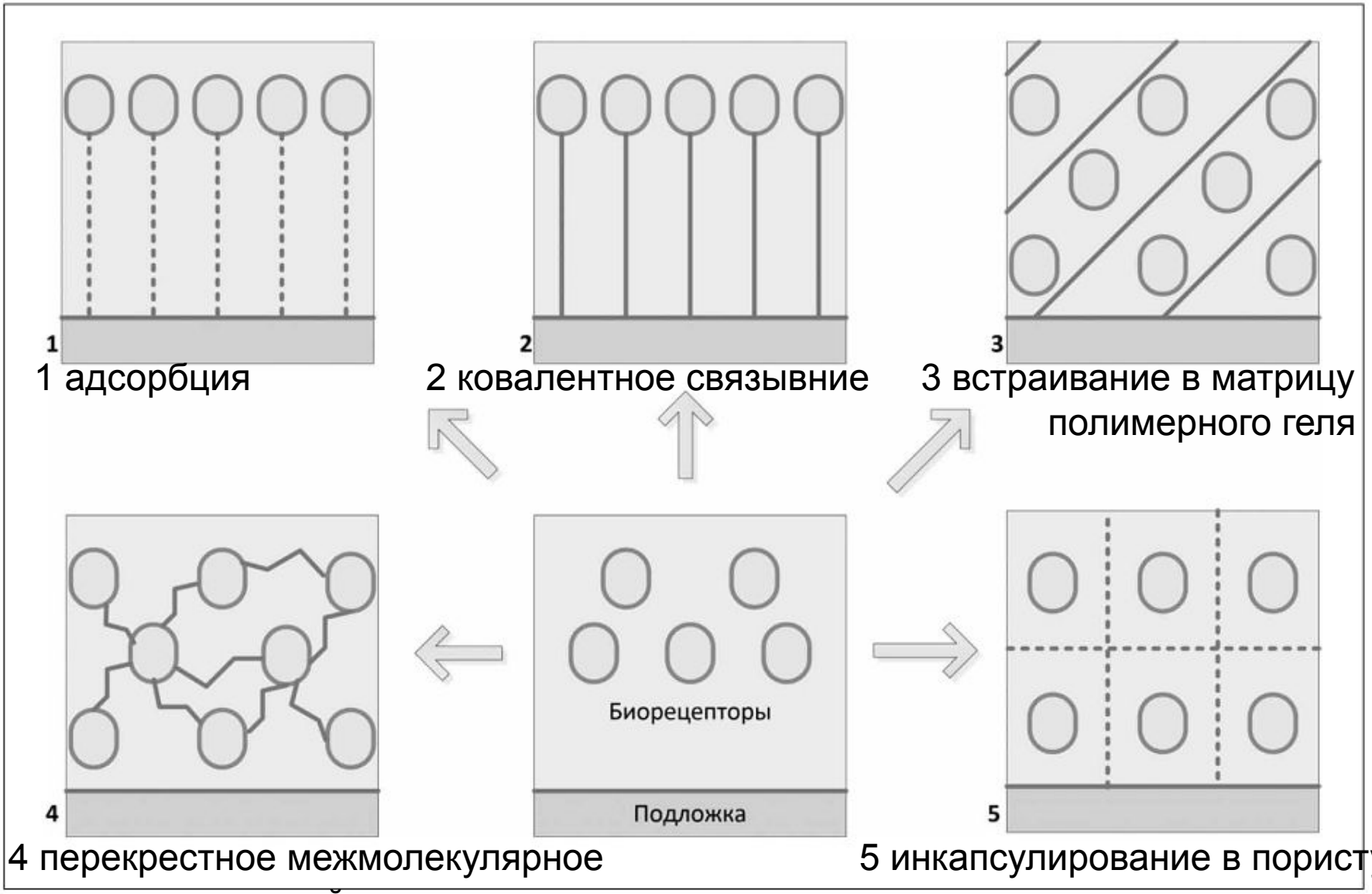


Иммобилизация ферментов на биосенсорах

Обычно проводится двумя методами:

- Физическая, когда фермент физически включается в носитель
- Химическая, когда образуется ковалентная связь между ферментом и носителем

Способы иммобилизации ферментов на биосенсорах



1 адсорбция

2 ковалентное связывние

3 встраивание в матрицу полимерного геля

4 перекрестное межмолекулярное взаимодействие

5 инкапсулирование в пористую матрицу

Способы иммобилизации рецепторов для выявления патогенных микроорганизмов

1. ***Адсорбция на поверхности золота***

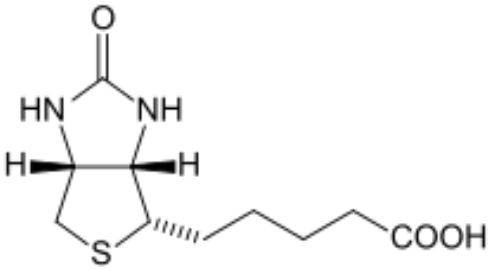
прикрепление антител к субстрату в случайном порядке, без направленного пространственного ориентирования.

+: просто быстро

-: адсорбция рецепторов па поверхности золота является неспецифической, значит, невысокие аналитические характеристики сенсора.

2. Авидин-биотиновые системы - рецепторы прикрепляют к покрытой авидином поверхности.

Авидин — гликопротеид, антагонист биотина, обладает способностью образовывать в организме биологически неактивный комплекс с биотином. Содержится в яичном белке птиц и рептилий.



Авидин

Природа взаимодействия - нековалентная, что позволяет осуществлять множественную отмывку поверхности сенсора и использовать его повторно.

-: высокая стоимость реагентов

+: просто, надёжно, быстро

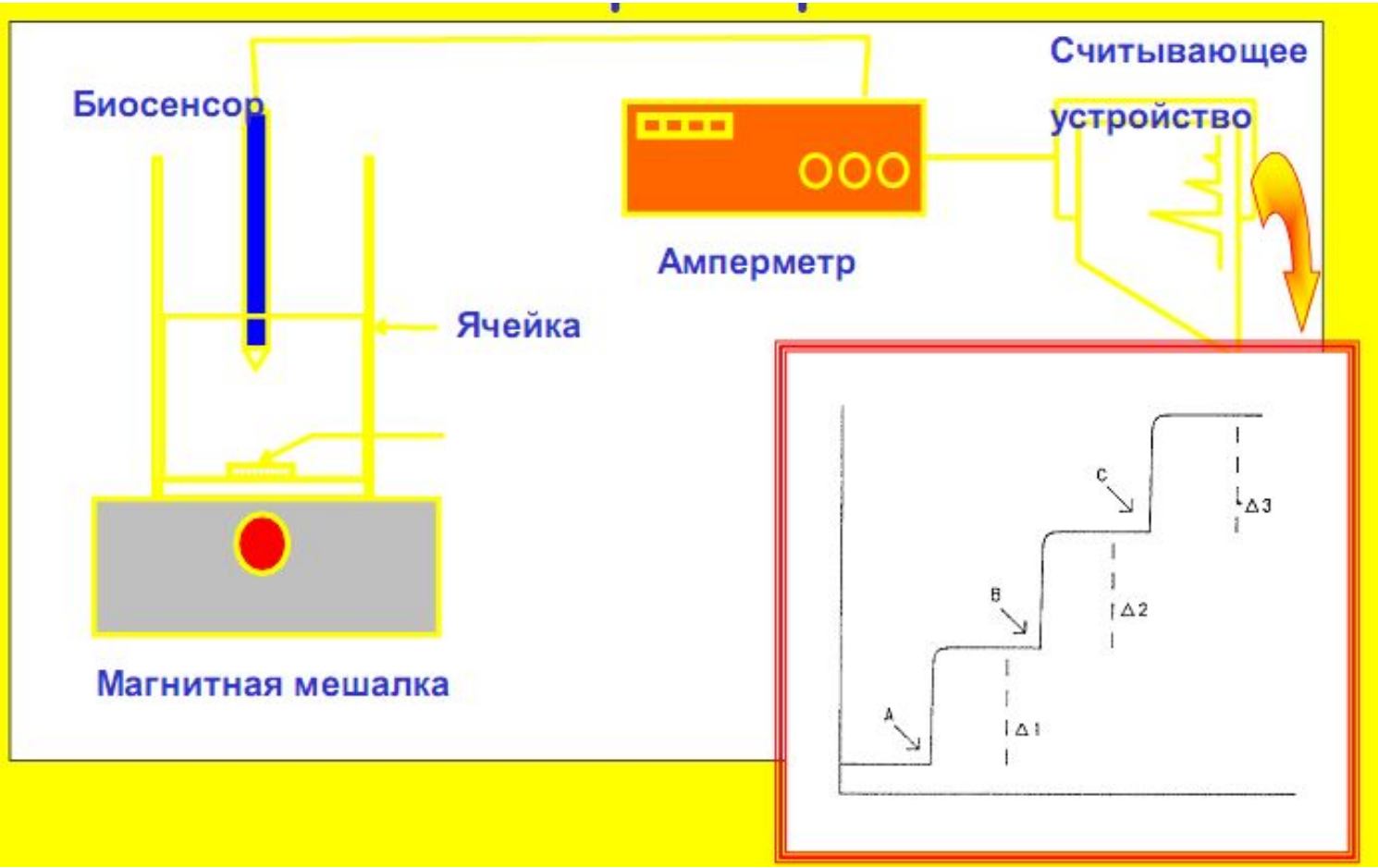
Способы иммобилизации рецепторов для выявления патогенных микроорганизмов

3. Монослойные структуры, способные к самосборке (**self-assembled monolayers - SAMs**), получают при эмульгировании плоских микрочастиц золота в растворителе в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ).
Основной растворитель: этанола с добавками дисульфидов или тиолов.
Формирование и взаимодействие монослое в осуществляется при реакции радикалов с сульфидными группами.
Присоединение биорецептора происходит посредством тиольной группы.

Тиольная группа —SH	Тиолы (меркаптаны)	R—SH

Проведение измерений с помощью биосенсора

Стационарный режим измерения

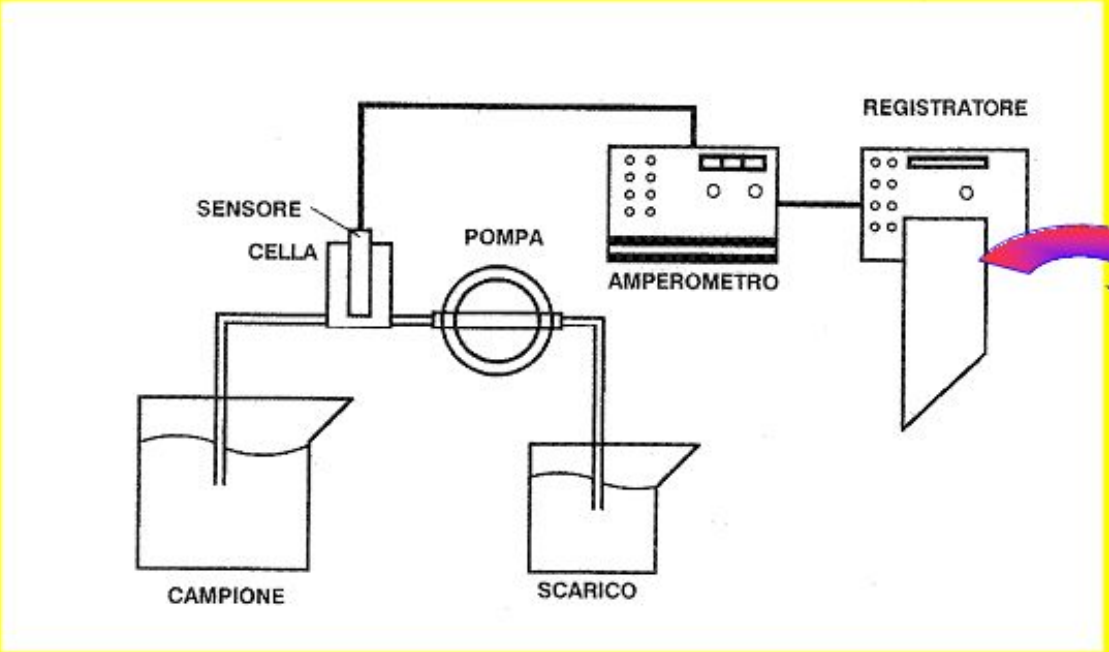


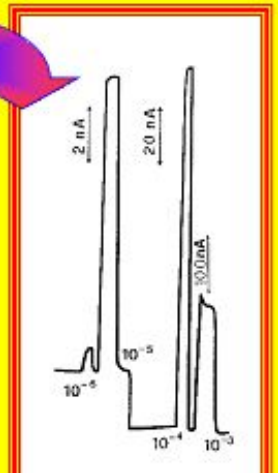
Проведение измерений с помощью биосенсора

Проточная система

Биосенсор помещен в электрохимическую проточную ячейку.

Электрохимическая ячейка связана с перистальтическим насосом, прокачивающим буферный раствор с постоянной скоростью.



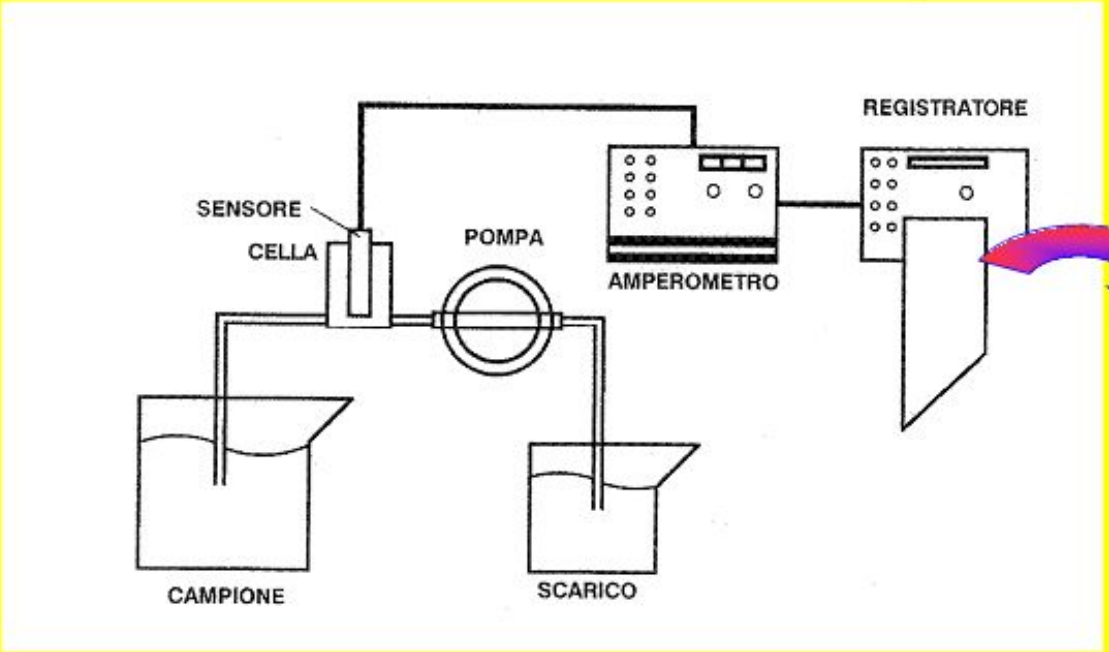


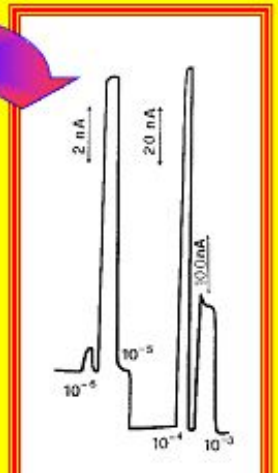
Проведение измерений с помощью биосенсора

Проточно-инжекционный анализ

Биосенсор помещен в электрохимическую проточную ячейку.

Электрохимическая ячейка связана с перистальтическим насосом, прокачивающим буферный раствор с постоянной скоростью.





Создание биосенсора

Молекулы биорецептора, иммобилизованные на походящей матрице для формирования биослоя
+
подходящий преобразователь
=
Биосенсор

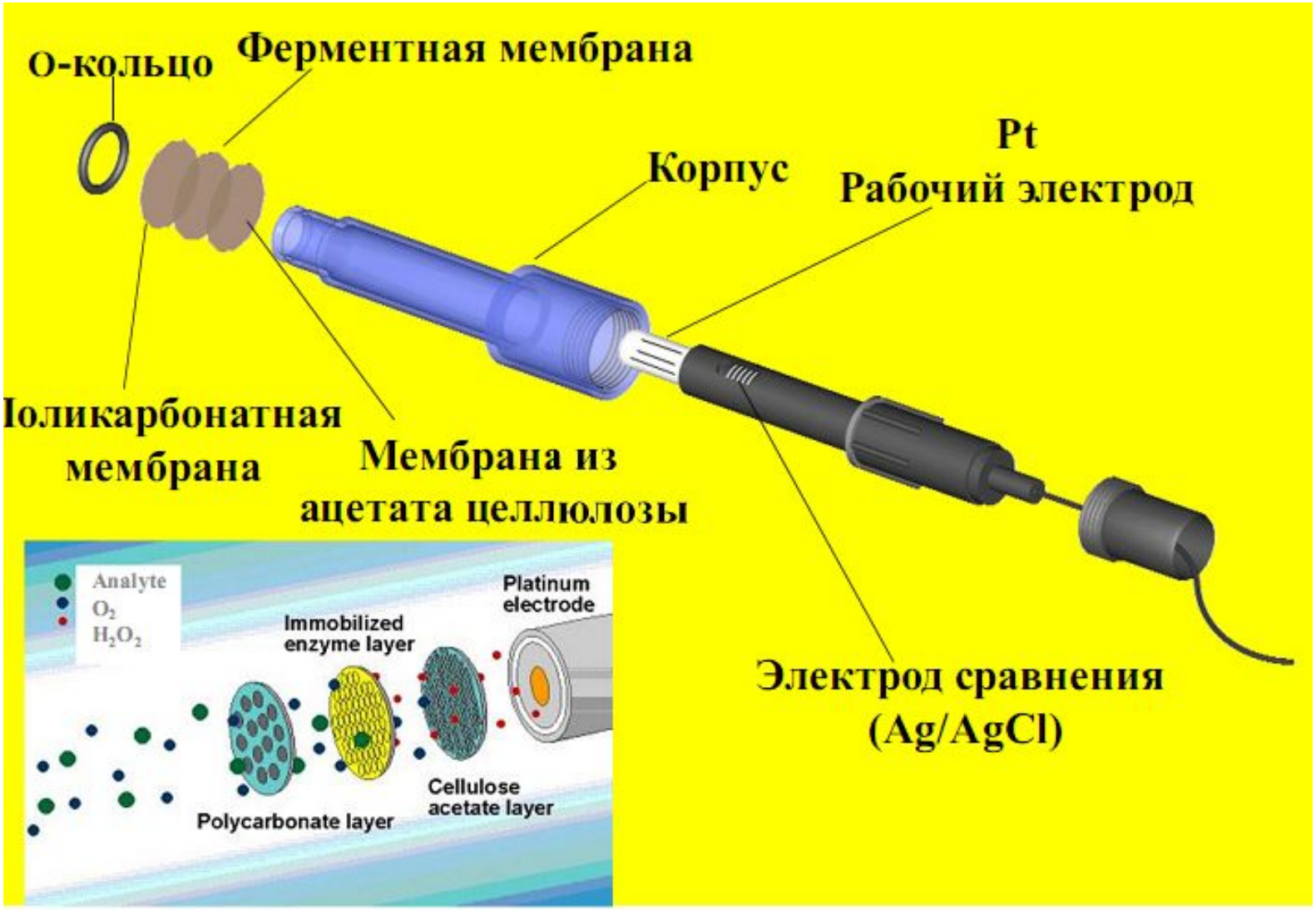
Создание биосенсора

Преобразователи ионоселективного электрода и полевого транзистора - **потенциометрические преобразователи**;

Проволока с покрытием - **амперометрические преобразователи**;

Поверхностный детектор плазмы и детектор поверхностных акустических волн **пьезопреобразователи**.

Мембраны электрода Кларка



Мембраны биосенсора

Мембраны являются одним из важнейших компонентов биосенсора.

Они используются для

(1)предотвращения загрязнения;

(2) устранение помех;

(3)управление режимом работы биосенсора.

Примеры:

1. Когда аналитом является небольшая молекула, то мембрана с небольшим размером пор может предотвратить попадание макромолекул, таких как белки, в чувствительную зону.

2. Транспорт заряженных молекул можно контролировать с помощью мембран ионного обмена.

Покрытия для амперометрических биосенсоров

Механизм транспорта	**Полуселективная пленка мембраны**
Исключение по размеру	Ацетат целлюлозы Гидролизованный ацетат целлюлозы Фазоинверсионный ацетат целлюлозы Полианилин, Полипиррол , Акрилонитрил
Исключение по заряду	Винилпиридин, Полиэфир сульфоновой кислоты
Полярность	Фосфолипиды
Смешанный контроль	Ацетат целлюлозы - Полиинилпиридин

Развитие биосенсоров

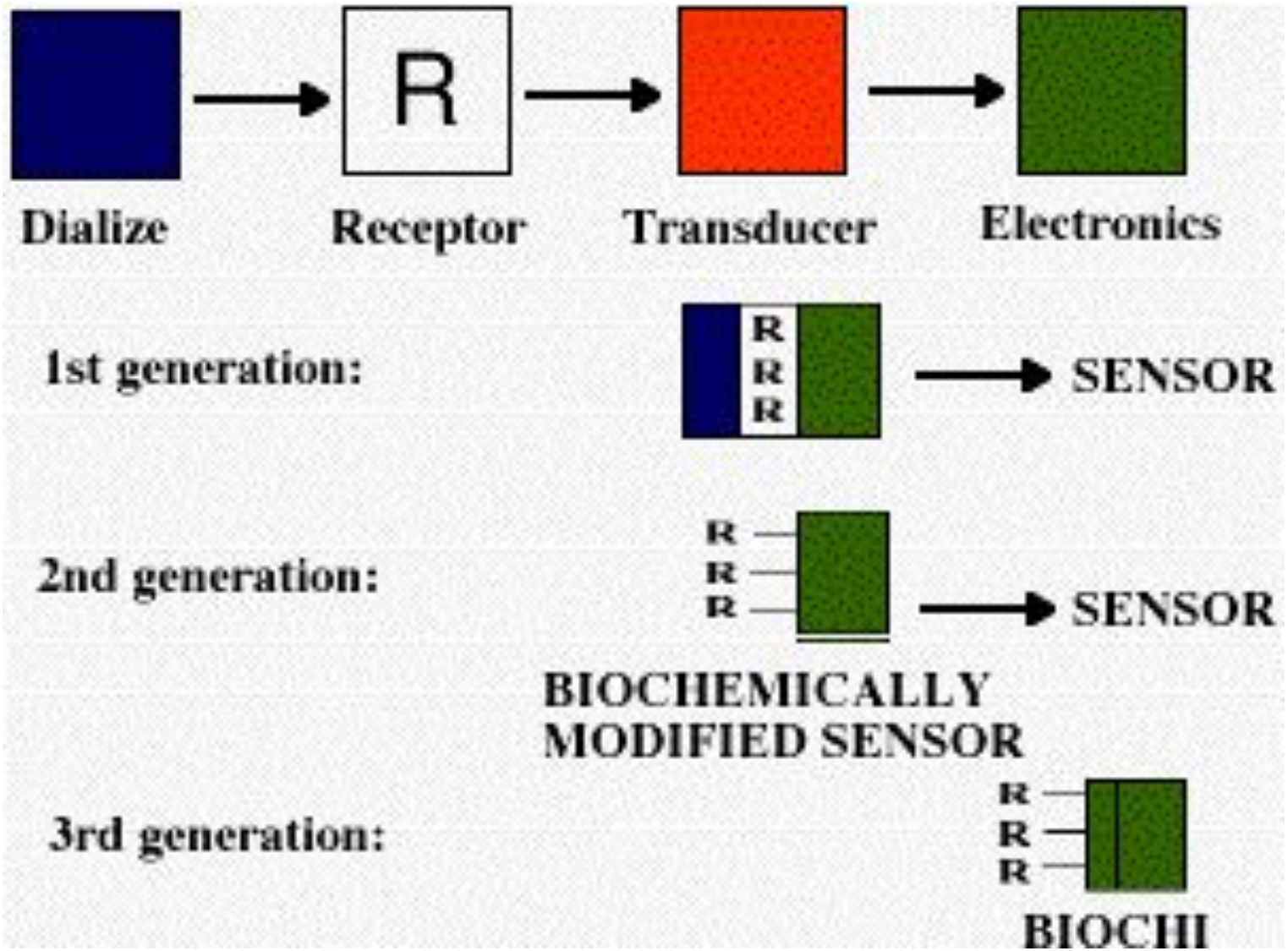
Три поколения по методу присоединения биорецептора к элементу преобразователя.

1. **Первое поколение** биорецептор располагается в непосредственной близости от базового датчика за диализной мембраной.

   Во втором и третьем поколении: иммобилизация биорецептора достигается с помощью сшивающих реагентов или бифункциональных реагентов на подходяще модифицированной матрице преобразователя или путем включения в полимерную матрицу на поверхность трансдукции.

2. **Во втором поколении** отдельные компоненты остаются по существу различными (например, управляющая электроника-электрод-биомолекула),
3. **В третьем поколении** молекула биорецептора становится неотъемлемой частью базового чувствительного элемента.

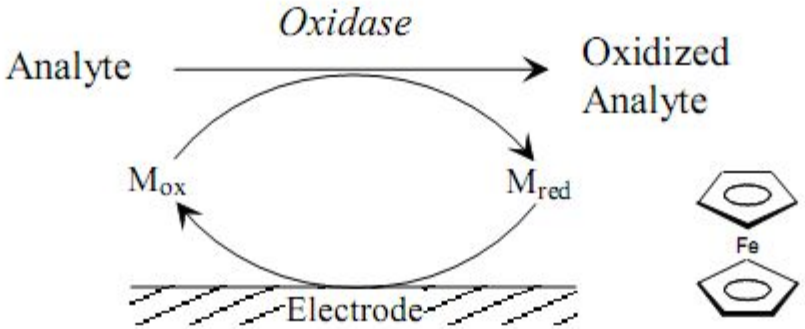
3 поколения биосенсоров



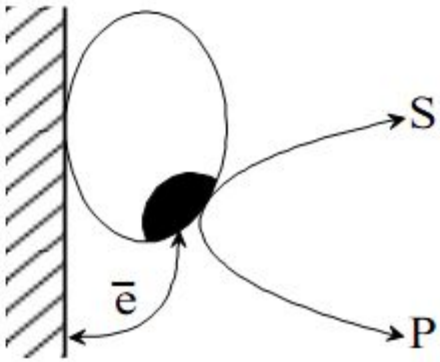
Сопряжение фермента и электродных реакций

I поколение: детектирование субстрата или продукта ферментативной реакции: $E + S \Leftrightarrow ES \rightarrow E + P$

II поколение: использование медиаторов:

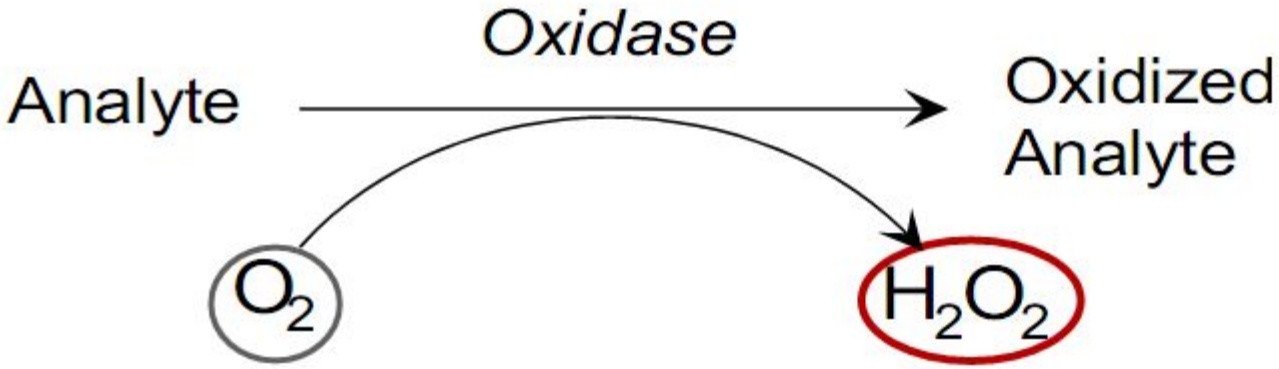


III поколение: прямой биоэлектрокатализ:

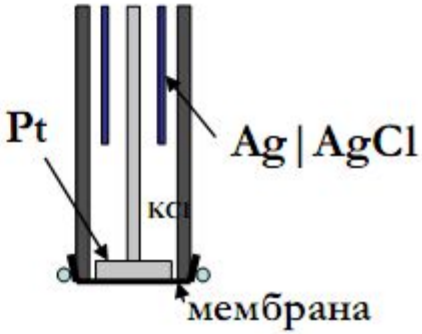


Биосенсор I поколения

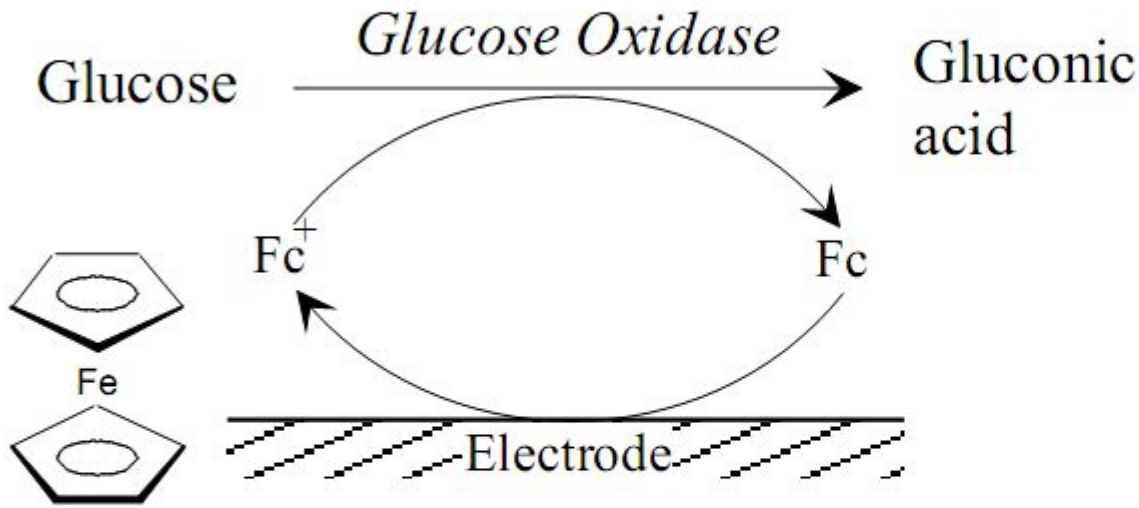
(амперометрия)

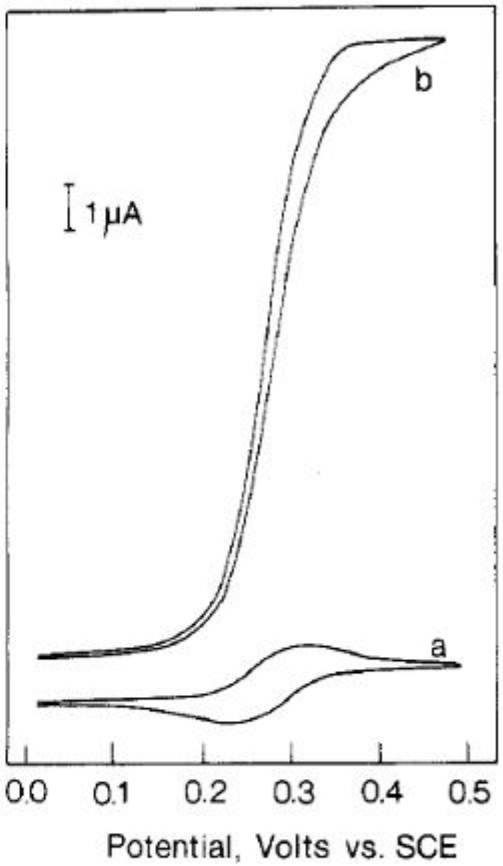


Глюкозоксидаза и O_2-электрод Кларка



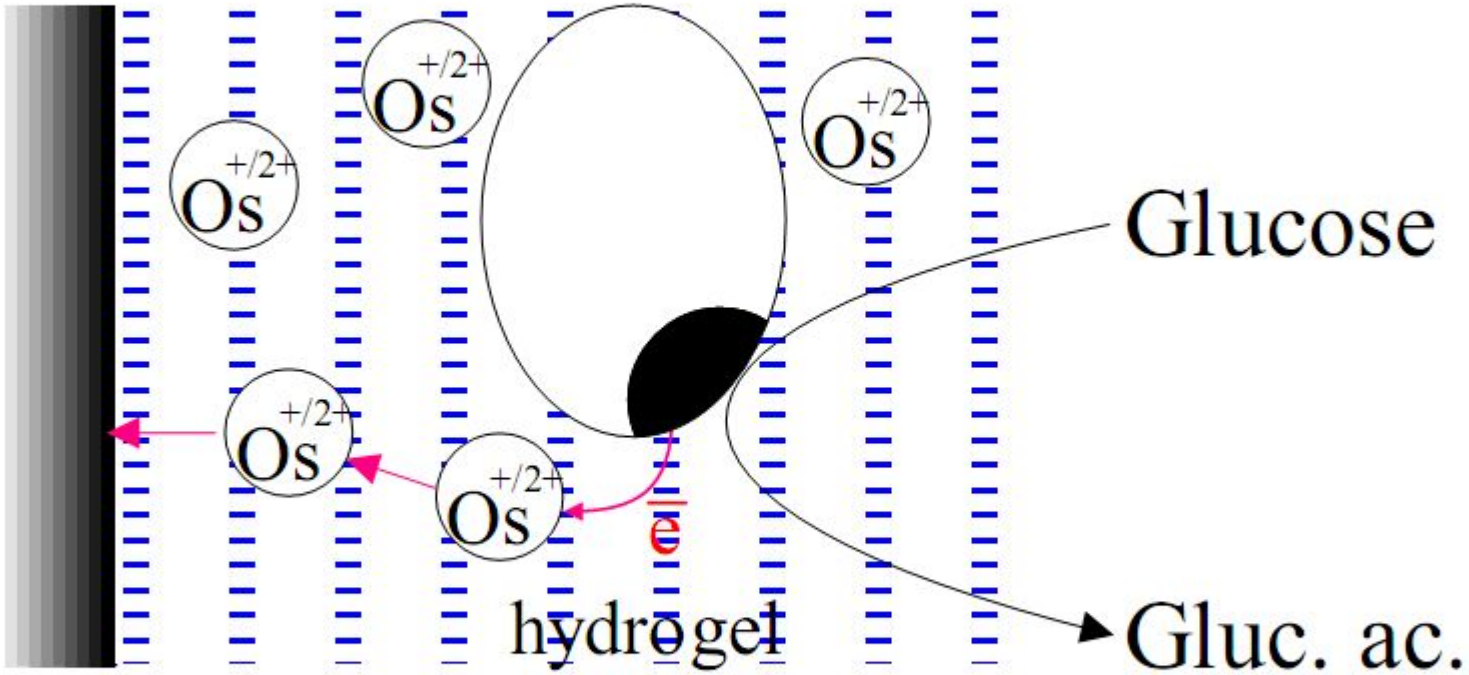
Биосенсор II поколения





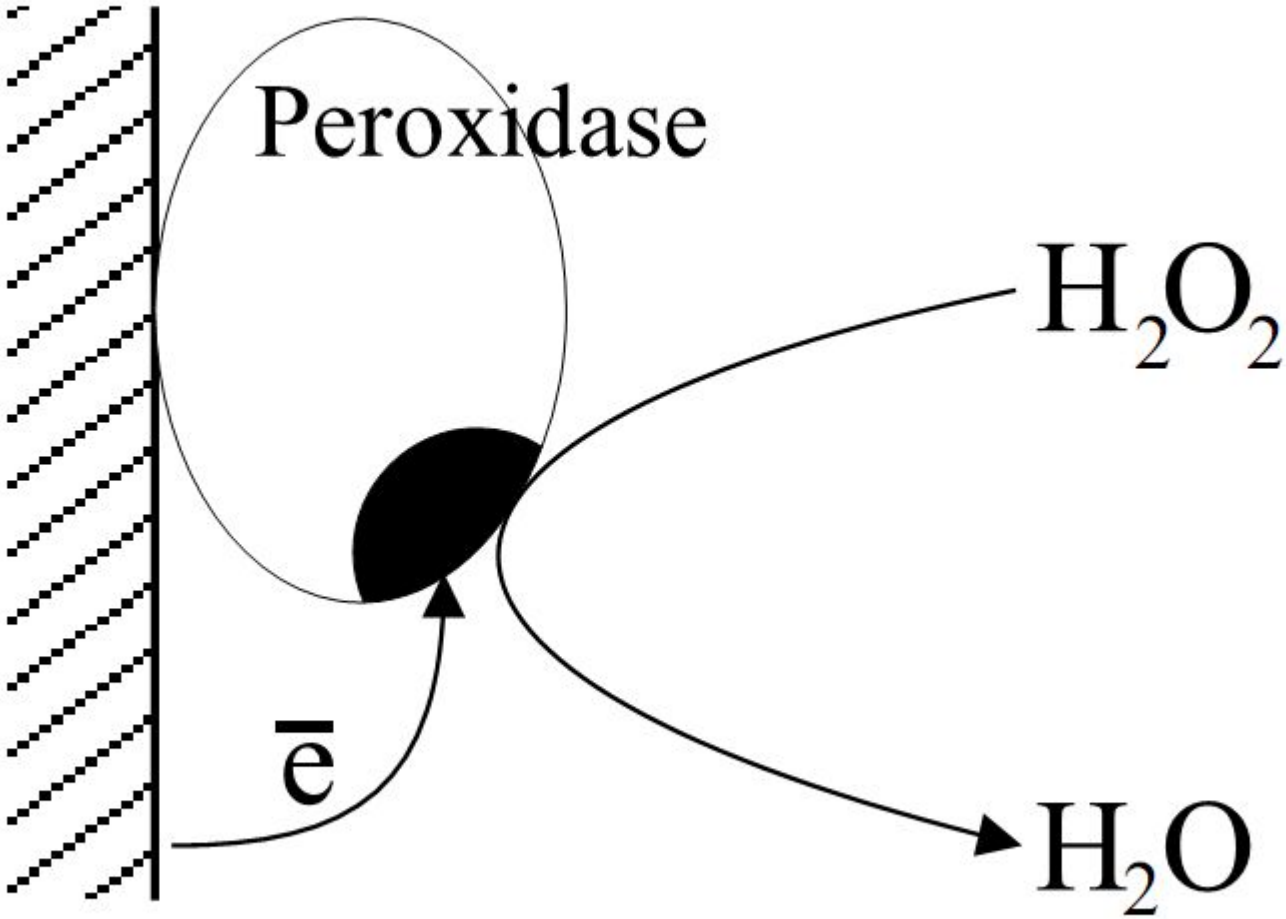
A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. G. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, and A. P. F. Turner, *Analytical Chemistry* 56, 667-671 (1984).

Биосенсор II поколения



B.A. Gregg, A. Heller. *Anal. Chem.* 62 (1990) 258

Биосенсор III поколения



A.I.Yaropolov, V.Malovik, S.D.Varfolomeyev, I.V.Berezin. *Proc. Russ. acad. Sci.*, 249 (1979) 1399

Перспективы развития биосенсоров

1. Обработка данных и распознавание образов.

Если мы сравним существующие биосенсоры с натуральными (например, нос или глаз), они будут очень грубыми и упрощенными. Молекулы распознавания в «естественных сенсорах» не обязательно являются высокоспецифичными, но передача сигнала через биомолекулы является сложной. Специфика «естественных сенсоров» состоит в обработке собранных данных и распознавания посредством непрерывного процесса обучения.

Ожидается, что этот режим работы с использованием данных, собранных от нескольких биосенсоров, будет использоваться в будущем, поскольку постоянно растущие возможности микропроцессоров обеспечат быстрые вычисления.

Перспективы развития биосенсоров

2. Микроинструмент**.**

Биосенсоры третьего поколения имеют встроенную схему обработки сигналов. Когда такие датчики объединяются с микромасштабными клапанами и приводами, разрабатываемыми в настоящее время (с использованием технологии микрообработки), на кремниевой пластине может быть построен целый аналитический инструмент.

ДНК-микрочип с системой детекции

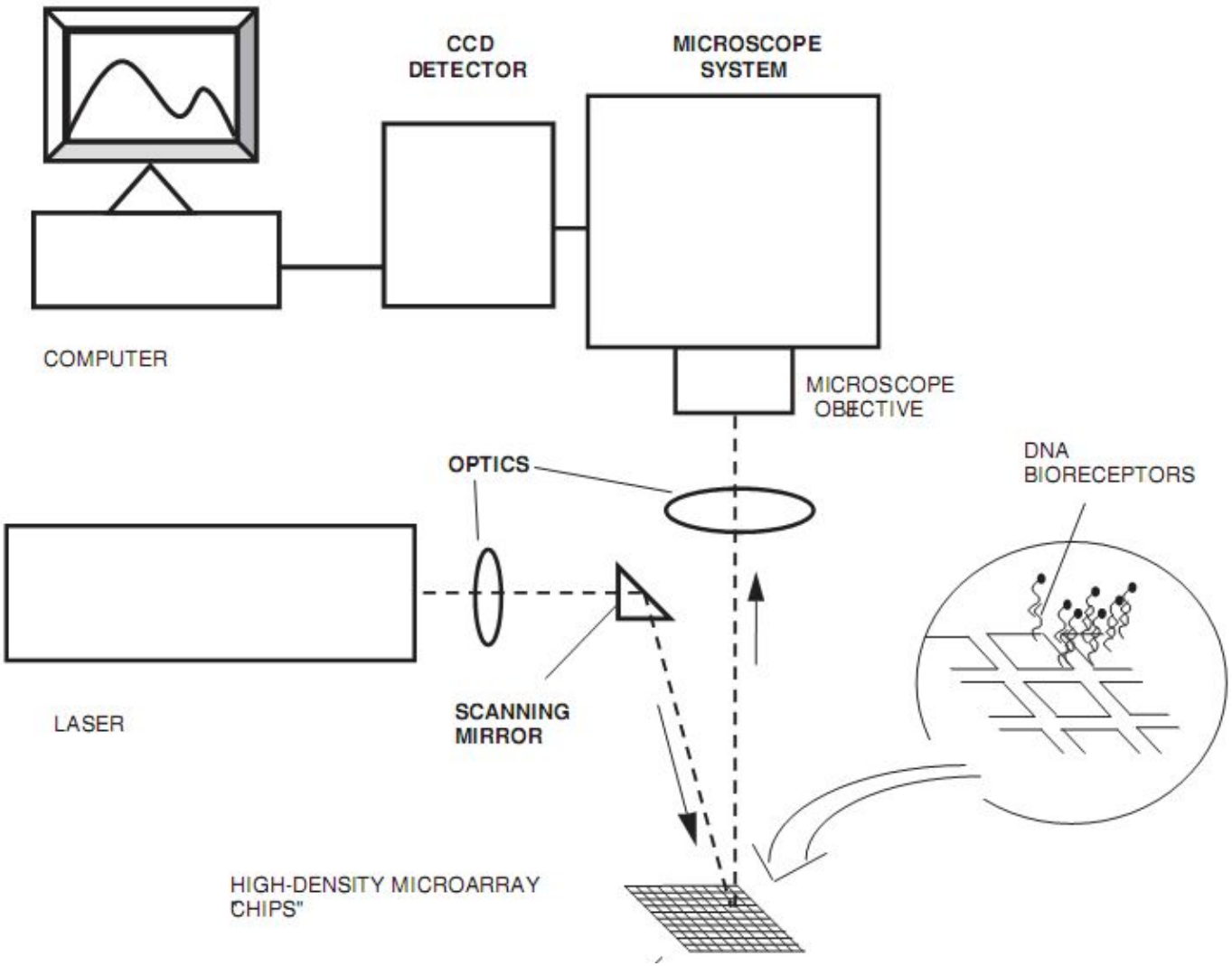
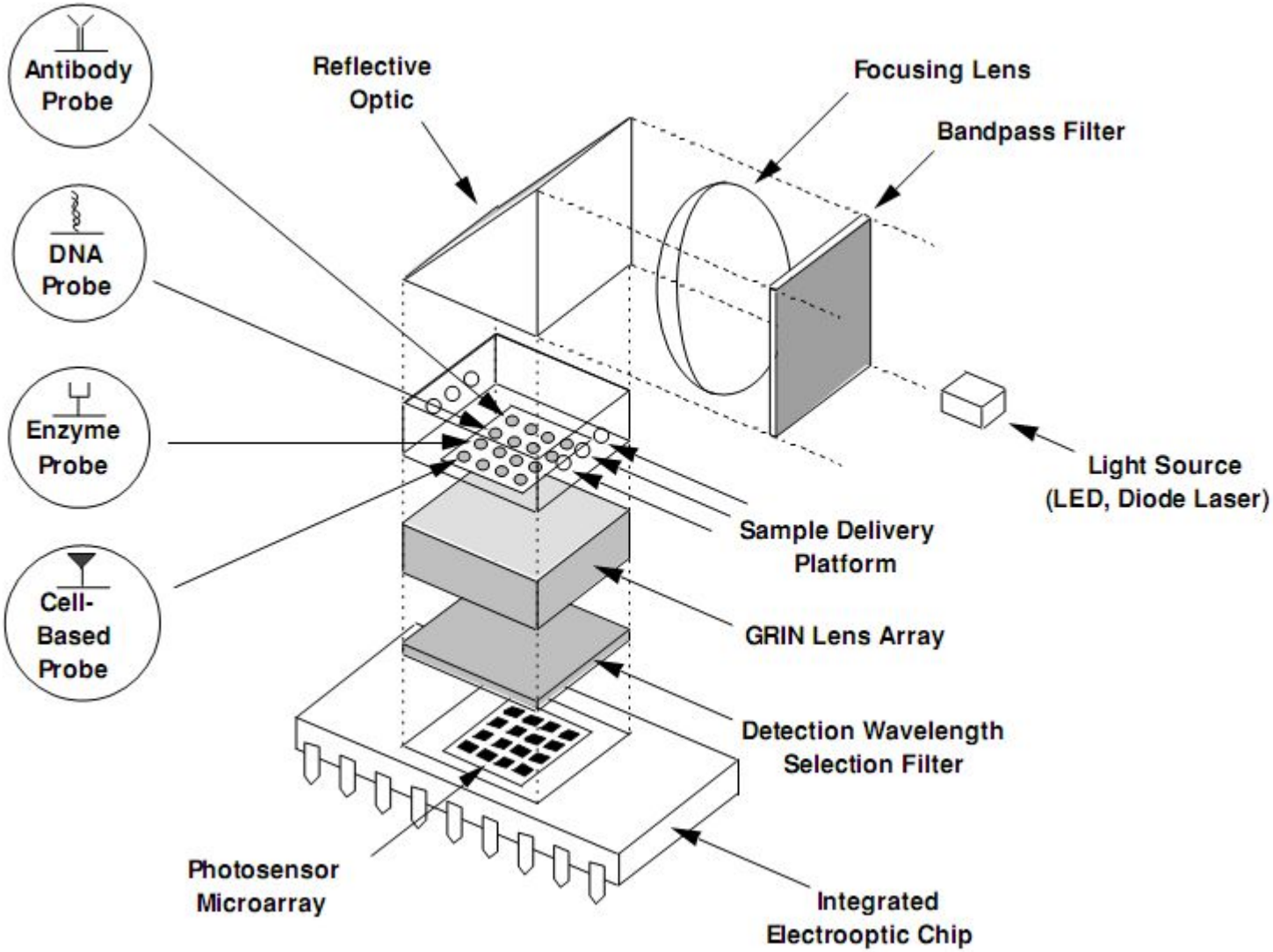


Схема совмещенной диагностической системы биочипов с микрочиповыми датчиками



Перспективы развития биосенсоров

3 Молекулярная электроника.

Как минимизировать транзистор (обратите внимание, что «транзистор» является строительным блоком микропроцессоров и чипа памяти).

Многие биологические молекулы способны синтезировать сложные самоорганизующиеся молекулы с, по-видимому, только необходимыми электронными свойствами. Это говорит о том, что минимальный по размеру транзистор можно построить заменой кремния на биомолекулярные компоненты. Эта идея привела к предложению многих молекулярных электронных систем. В прошлом материалы и методы обработки, разработанные для применения в микроэлектронике, использовались при разработке датчиков. Поэтому любые будущие разработки в области молекулярной электроники, как ожидается, будут импортированы в биосенсорные технологии

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !

Домашнее задание

Контрольная по этой лекции