

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemická detekce proteinů

Karolína Paroulková

Bakalářská práce

2014

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karolína Paroulková**
Osobní číslo: **C09252**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Elektrochemická detekce proteinů**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši na téma elektrochemické detekce proteinů.
2. U jednotlivých prací stručně popište nalezené konfigurace biosenzorů a imunosenzorů a princip vlastní elektrochemické detekce. Rozdělte tyto příspěvky do kapitol podle použitého elektroodového materiálu (zlato, platina, uhlík, rtuť atd.).
3. Diskutujte možnosti použití různých elektroodových materiálů pro elektrochemickou detekci proteinů.
4. Výsledky zpracujte formou bakalářské práce.


Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **24. února 2012**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 24. února 2012

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 17. 7. 2014

Karolína Paroulková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Radovanu Metelkovi, Ph.D., za trpělivost a podporu při vypracování bakalářské práce.

Anotace

V této bakalářské práci je popisována elektrochemická detekce proteinů. V první části jsou shrnuty metody používané v elektrochemické detekci a popis principů imunosenzorů a biosenzorů. V další části je uvedeno obecné rozdělení senzorů pro detekci proteinů podle způsobu použitého značení. Následuje kapitola s popisem konkrétních senzorů, kde je kladen důraz na široké spektrum použitých materiálů, od kovů až po biologické látky.

Klíčová slova: elektrochemická detekce, proteiny, biosenzory, imunosenzory

Annotation

In this bachelor thesis, the electrochemical detection of proteins is described. The first part summarizes methods used in electrochemical detection and presents basic principles of immunosensors and biosensors. In next part, the general overview of labelled or label-free sensors for protein detection is given. A chapter with description of concrete sensors follows, with an emphasis on wide spectrum of materials used, from metals to biological species.

Keywords: electrochemical detection, proteins, biosensors, immunosensors

Úvod	13
1 Elektrochemická detekce	14
2 Elektrochemické senzory	15
2.1 Biosenzory	15
2.2 Imunosenzory	16
3 Proteiny	17
3.1 Struktura proteinů	17
3.2 Funkce proteinů	18
4 Značené a neznačené senzory	19
4.1 Neznačené senzory	19
4.1.1 Senzory založené na aptamerech	19
4.1.2 Senzory používající nanotechnologii	20
4.2 Značené senzory	21
4.2.1 Imobilizace biomolekul	22
4.2.2 Katalýza elektrochemických reakcí	22
4.2.3 Zvýšení transferu elektronů	23
4.2.4 Značení biomolekul	23
4.2.5 Nanočástice v roli reaktantů	23
5 Příklady používaných senzorů	25
5.1 Aptasenzory	25
5.1.1 Amperometrické aptasenzory	25
5.1.2 Aptamery spojené s iontově senzitivními tranzistory s efektem pole	26
5.2 Polymery	26
5.2.1 Polypyrrol	27
5.3 Uhlíkaté elektrody	27
5.3.1 Grafen	27
5.3.2 Uhlíkaté nanotrubičky	29

5.4	Zlaté elektrody	29
5.5	Skenovací elektrochemická mikroskopie (SECM)	30
6	Volně prodejné senzory	33
7	Závěr.....	35
8	Literatura.....	36

Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled použití různých nanočástic.....	22
---	----

Seznam obrázků

Obrázek 1 Způsob měření proudu v diferenční pulsní voltametii.	14
Obrázek 2 Obecné schéma biosenzoru.....	16
Obrázek 3 Schéma imunosenzoru v sendvičovém uspořádání.....	16
Obrázek 4 Příklady sekundární struktury proteinů.	18
Obrázek 5 Příprava aptamerů metodou SELEX.	20
Obrázek 6 Struktura SWCNT.	20
Obrázek 7 Struktura MWCNT.....	21
Obrázek 8	25
Obrázek 9	28
Obrázek 10	30
Obrázek 11	31
Obrázek 12	32
Obrázek 13	32
Obrázek 14	34

Seznam zkratk a značek

SECM – skenovací elektrochemická mikroskopie

EIS - elektrochemická impedanční spektroskopie

SELEX – Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment

ATP - adenosintrifosfát

SWCNT – jednoděnné uhlíkové nanotrubičky

MWCNT – mnohoděnné uhlíkové nanotrubičky

MIPs – vtištěné polymery

CPs – vodivé polymery

FET – tranzistor řízený elektrickým polem

IgG – imunoglobulin G

SWCNT-FET – jednoděnné uhlíkové nanotrubičky-tranzistor řízený elektrickým polem

STM – skenovací tunelová mikroskopie

ATM – mikroskopie atomárních sil

SG/TC - generování substrátu/sběr na hrotu

TG/SC – generování na hrotu/sběr substrátu

Úvod

Téma řešené v této bakalářské práci je zaměřeno na elektrochemickou detekci proteinů. Je zde poukázáno na to, proč vstupuje elektrochemická detekce do popředí a za co tomu vděčí. Rovněž jsou zde zdůrazněny rozdíly mezi používanými biosenzory a imunosenzory, a to jak v jejich konstrukci, tak ve způsobu předávání signálu od zachycené biomolekuly k elektrodě.

Pro lepší představu o detekovaných analytech je zde uvedena i kapitola věnovaná proteinům. Vedle obecného popisu je v této části poukázáno na složitou strukturu proteinů a na funkce, které proteiny v těle zastupují. Také jsou tu popsány tři základní typy proteinů – fibrilární, membránové a globulární.

Senzory zaujímají největší část této práce. Nejprve jsou přiblíženy v obecné rovině, a to podle toho, zda jsou při detekci spojené s nějakou zvýrazňující částicí, či nikoli. Běžně jsou tyto částice označovány jako značky a nejčastěji jsou to nanočástice. Dále jsou popsáni konkrétní zástupci několika typů materiálů, používaných k výrobě senzorů. Jednotlivé příklady byly vybrány tak, aby byla pokryta co nejširší škála materiálů. Od zlatých kovových elektrod, přes vodivé polymery až po uhlíkové elektrody. U uhlíkových elektrod je jako jeden ze zástupců zmíněn také grafen, jenž vyniká unikátní strukturou a získává si čím dál větší oblibu. Aptasenzory obsahují biomolekuly s obrovským potenciálem pro aplikaci v různých detekčních metodách, a to nejen ve spojení s proteiny. Díky svým unikátním vlastnostem se uplatnili i v medicíně.

Mezi používané tradiční analytické techniky byla zařazena i jedna málo obvyklá detekční metoda - konkrétně se jedná o skenovací elektrochemickou mikroskopii (SECM). Ta má hned několik výhod, o kterých je zmínka v příslušné kapitole. Zajímavým oborem, kde našla SECM uplatnění, je forenzní analýza, kde se používá na odhalení otisků prstů.

V poslední kapitole jsou popsány komerčně dostupné senzory. Nejde o žádná složitá, velká zařízení. Jsou to doslova příruční přístroje. Tím nejrozšířenějším je bezpochyby glukometr. Ovšem pro detekci proteinů se využívá zcela jiný, volně prodejný senzor, a to je těhotenský test.

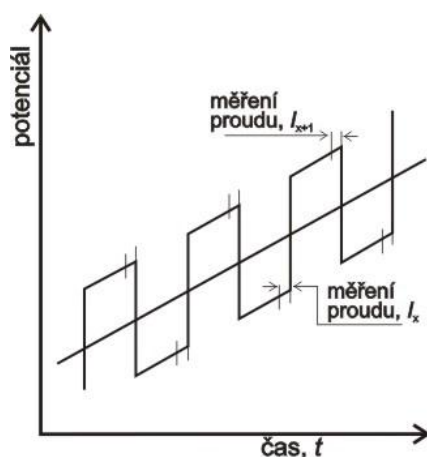
Zpracovaný materiál byl sestaven jako rešerše s myšlenkou obsáhnout toto téma z co nejširšího úhlu pohledu.

1 Elektrochemická detekce

Zájem o elektrochemickou detekci neustále roste. Jde o metodu, která je schopná pracovat i s nepatrným množstvím vzorků. Za svou oblíbenost vděčí i celkem levným zařízením používaných pro detekci [1].

Celá řada elektrochemických metod našla uplatnění v detekci biomolekul. Potenciometrie je jednou z nich. Při potenciometrických měřeních se sleduje změna napětí. Pro detekci proteinů se v případě potenciometrie nejčastěji používají iontově selektivní elektrody, označované i jako membránové elektrody (např. platinový drátek modifikovaný porézním oxidem hlinitým) [2,3,4].

Další metodou je amperometrie, kde se měří velikost procházejícího proudu při konstantním potenciálu pracovní elektrody. Častěji používaná je voltametrie. Zde se měří závislost proudu při změně potenciálu pracovní elektrody. Důležité pro použití voltametrie je vzorek schopný redoxních reakcí spojené s přenosem elektronů, kdy se zaznamenává elektrický signál. Pro detekci proteinů našly uplatnění dvě varianty voltametrie: rozpouštěcí a diferenční pulsní voltametrie. Na obrázku 1 je graficky znázorněn způsob měření proudu při vkládání pulsů během změny potenciálu v čase v diferenční pulsní voltametii [2,5].



Obrázek 1 Způsob měření proudu v diferenční pulsní voltametii.

Posledním příkladem používaných metod je elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), která našla uplatnění nejen v detekci biomolekul, ale i v mnohých dalších odvětvích. EIS poskytuje celistvou informaci o zkoumaném vzorku, což například zahrnuje popis mechanismu elektrochemického děje, a je to nedestruktivní metoda [6].

2 Elektrochemické senzory

Senzory spojené s elektrochemickou detekcí se pro určení proteinů využívají pro svou stabilitu, nízké náklady a citlivost. Kvalitní detekční systém by měl měřit přesně, přímo a rychle. Senzory používané v elektrochemii jsou poměrně levné a citlivé. Materiály, z kterých se senzory vyrábí, by měly být biologicky stabilní, levné, snadno přenosné, chemicky účinné a vyrobitelné ve velkém měřítku. Často se používají uhlíkové nanodrátky a nanotrubičky, polymery, zlaté nanočástice a řada dalších materiálů [3,7,8].

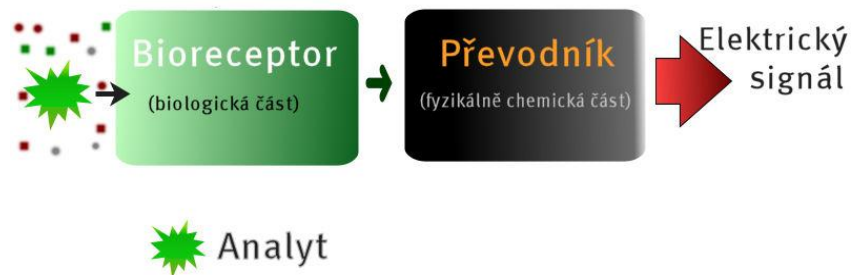
Neustálý vývoj v analytických metodách proteinů otevírá cestu pro využití různých materiálů. Ty se dají rozdělit do dvou kategorií. Do první z nich patří materiály, které fungují jako aktivní složky senzorů, což zahrnuje ty, které jsou schopné podílet se na zachycení a předání signálu. Tím zvyšují citlivost a selektivitu senzorů. Ve druhé kategorii jsou látky, které mají roli pasivní. Podílí se na vylepšení biostability a biokompatibility, čímž se prodlužuje i doba použitelnosti senzoru pro detekci proteinu [3].

V samotné elektrochemické detekci proteinů se používají dva typy senzorů: biosenzory a imunosenzory. Liší se od sebe jak způsobem zachycení proteinu, tak konstrukcí. Proto jsou samostatně popsány v jednotlivých kapitolách.

2.1 Biosenzory

Biosenzory jsou standardně složeny z materiálu, který je schopný rozpoznat danou biomolekulu, a materiálu zajišťujícímu převod elektronů (bývá označován jako převodník), viz obrázek 2. Takto zkonstruované biosenzory převedou rozpoznávaný chemický nebo fyzikální signál na takovou formu signálu, který se dá jednoduše měřit a dále zpracovat. Většinou jde o elektrický signál. Využití biosenzorů se uplatňuje v různých oborech, protože jsou schopné zaznamenat širokou škálu látek, jako jsou proteiny, DNA, ionty, buňky a řadu dalších. Mezi obory, kde našly využití, patří sledování kvality potravin, ochrana životního prostředí nebo lékařské diagnózy [9,10].

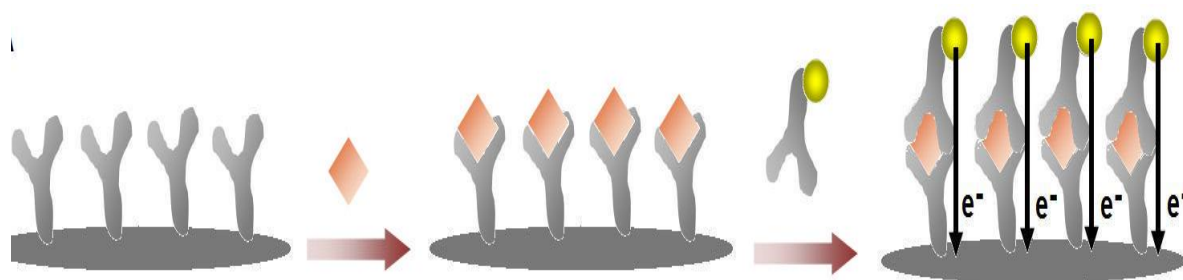
Jako biologická část se nejčastěji na biosenzory aplikují enzymy, a to hlavně pro svou specifickou reaktivnost vůči jedné konkrétní látce. Tím pádem nedochází k rušení měření tím, že by se na enzym navázala jiná látka, než pro kterou je enzym specifický. Enzymy napomáhají i rychlejší detekci [11,12].



Obrázek 2 Obecné schéma biosenzoru.

2.2 Imunosenzory

Imunosenzory jsou založeny na vzájemné interakci specifické protilátky a antigenu. Existují různá uspořádání, nejčastěji jsou založeny na tzv. sendvičovém zachycení. To spočívá v tom, že se první protilátka aplikuje na povrch senzoru. Na ní se naváže příslušný antigen a na něj se připojí druhá protilátka, která je značená enzymem nebo elektroaktivní značkou. Pro názornost je vše zobrazeno na obrázku 3. Podobně jako biosenzory, tak i imunosenzory si našly své uplatnění v širokém spektru oborů. Od lékařských diagnostik po ochranu životního prostředí.[12, 13, 7]



Obrázek 3 Schéma imunosenzoru v sendvičovém uspořádání.

3 Proteiny

Proteiny jsou sestavovány z různých kombinací jednadvaceti α -aminokyselin do polypeptidových řetězců. Jedna molekula proteinu obsahuje více než 100 α -aminokyselin, proto se o proteinech mluví i jako o biopolymerech.[14,15]

Podle tvaru se rozlišují proteiny na fibrilární, membránové a globulární, i když hranice mezi nimi není jasně daná. Fibrilární, čili vláknité proteiny, se vyskytují v cytoskeletu buněk. Bývají nerozpustné ve vodě. Zástupcem je například kolagen nebo keratin. Membránové proteiny jsou součástí biomembrán. Plní zde různé funkce, jako je transport látek, přenos signálu nebo se jen podílí na zpevnění membrán. Poslední globulární proteiny jsou kulovitěho tvaru, rozpustné ve vodě. Protože jde o velmi početnou skupinu, tak i jejich biologické funkce jsou dosti rozmanité. Patří sem například protilátky a enzymy [14, 15].

Proteiny se ovšem dají rozdělit i z chemického hlediska. Na jednoduché, které jsou složeny jen z aminokyselin, a na složené, ty obsahují nebílkovinnou část. Ke složeným proteinům patří hemoproteiny – součástí je krevní barvivo hem (např. hemoglobin), lipoproteiny – s lipidovou částí, nukleoproteiny – součástí je nukleová kyselina, glykoproteiny – se sacharidovou částí, metaloproteiny – s kationty kovů (např. ferritin), fosfoproteiny – se zbytky kyseliny fosforečné [14].

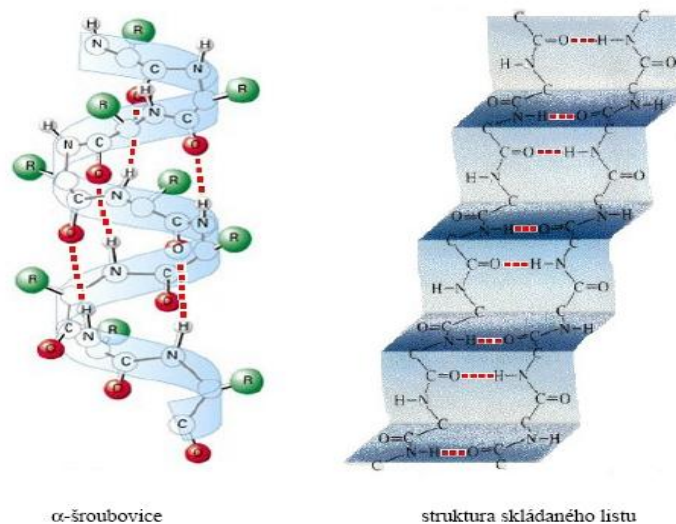
3.1 Struktura proteinů

Struktura proteinů je složitá, rozlišují se u nich čtyři strukturní skupiny. Primární strukturu představuje hlavní řetězec α -aminokyselin, jejichž uspořádání určuje vlastnosti proteinů [15].

Sekundární strukturu představuje uspořádání hlavního řetězce v prostoru. Dva nejtypičtější tvary jsou α -helix a β -hřeben. α -Helix má tvar šroubovice, β -hřeben zase skládaného listu, jak je vidět na obrázku 4 [15,16].

Terciární struktura udává tvar proteinu a je konečným uspořádáním sekundární struktury, což zahrnuje i propojení mezi vedlejšími řetězci. Dojde ke vzniku globulárních nebo fibrilárních proteinů [14,15].

Kvartérní strukturu nemají všechny proteiny, pouze ty, které jsou složeny z globulárních podjednotek. To tedy znamená, že kvartérní struktura představuje prostorové uspořádání podjednotek [14,15].



Obrázek 4 Příklady sekundární struktury proteinů.

3.2 Funkce proteinů

Proteiny se v lidském těle účastní hned několika biologických procesů. Mají svou roli v imunitním systému ve formě protilátek, jako receptory fungují při buněčné signalizaci a v neposlední řadě se objevují v metabolismu jako enzymy [9].

Tři nejhlavnější funkce proteinů jsou metabolické, strukturní a informační. Nejzásadnější roli v metabolických funkcích mají enzymy. Fungují jako katalyzátory v biologických reakcích, protože k tomu mají příslušné vlastnosti. Jsou velmi účinné, reagují pouze na konkrétní látku nebo skupinu látek a jejich aktivita se dá regulovat. [15]

Informační funkce je dána nespočtem množství postranních řetězců aminokyselin, což napomáhá komunikaci mezi buňkami a kontrolují se tak nitrobuněčné děje. Proteiny s informační funkcí se dělí do dvou skupin. Do první se počítají proteiny, které reagují na antigen a dokážou zaznamenat signální molekulu. Předání informace proběhne po navázání a molekula, která začíná děj, mění svou konformaci. To je případ imunoglobulinů. Do druhé skupiny se řadí signální proteiny. Mají obranný význam. Nachází se v cytoplazmatických membránách buněk. Jejich funkcí je rozeznat cizorodé buňky [15].

Strukturní funkci mohou proteiny plnit díky tomu, že jsou součástí buněčných cytoskeletů, biomembrán a buněčných organel. Podílí se tak na vylepšení pevnosti a pružnosti tkání, na pohybu řasinek nebo na stažení svalových buněk. Mohou mít i ochrannou funkci, jako je tomu u keratinu, který se nalézá v nehtech, vlasech a kůži [15].

4 Značené a nezačené senzory

Tato kapitola přiblíží rozdělení senzorů na značené a nezačené. K nezačeným senzorům patří aptasenzory a senzory využívající nanotechnologii. Ke značeným se řadí např. senzory s enzymy nebo nanočásticemi. Jmenovaní zástupci byli vybráni tak, aby se jejich použití týkalo detekce proteinů. Jde pouze o stručné popisy, bližší popis jim bude věnován v následujících kapitolách.

4.1 Nezačené senzory

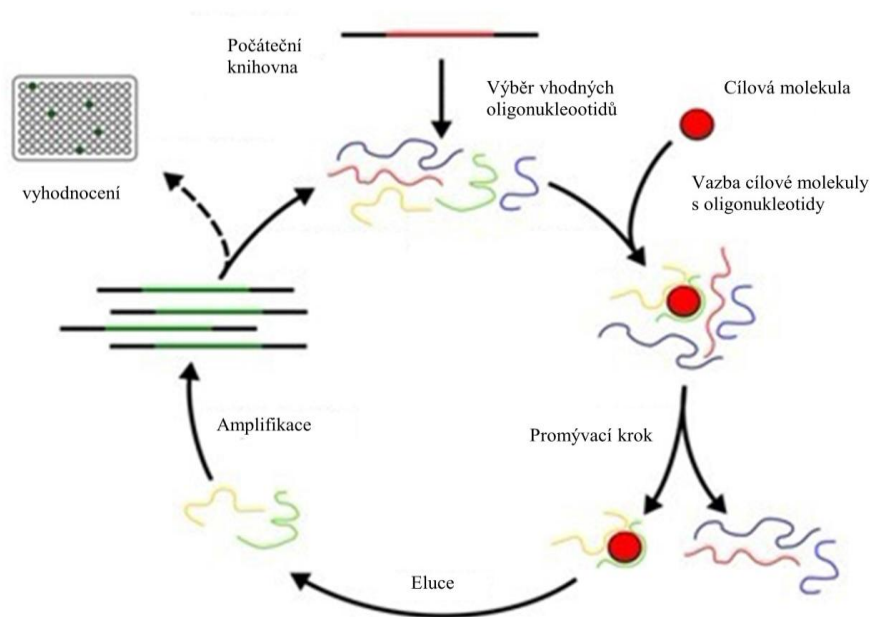
Do této kategorie se řadí senzory, které nevyužívají žádné značené molekuly, které by napomáhaly přenosu elektronů, stabilizaci biomolekul nebo by chránili elektrodu před nežádoucími látkami.

4.1.1 Senzory založené na aptamerech

Všechny biosenzory sestavené z aptamerů jsou nazývány aptasenzory. Aptamery řadíme k syntetickým oligonukleotidům, které jsou syntetizovány pomocí metody SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment), viz obrázek 5. Tato metoda je používána od roku 1990. A protože aptamery vytvořené pomocí SELEX jsou konfigurovány na konkrétní molekulu, mohou se aptamery použít na celé buňky, malé biomolekuly (např. vitaminy, aminokyseliny, ATP), samozřejmě na proteiny (př. trombin) a dokonce na ionty kovů (např. ionty draslíku nebo olova) [17].

Jde o oligonukleotidy, které tvoří vysoce specifickou vazbu s cílovým proteinem. Vyznačují se i velkou afinitou vůči navazujícím se látkám. Aptasenzory jsou řazeny mezi nezačené senzory právě díky svým unikátním vlastnostem při tvoření vazeb [7,17].

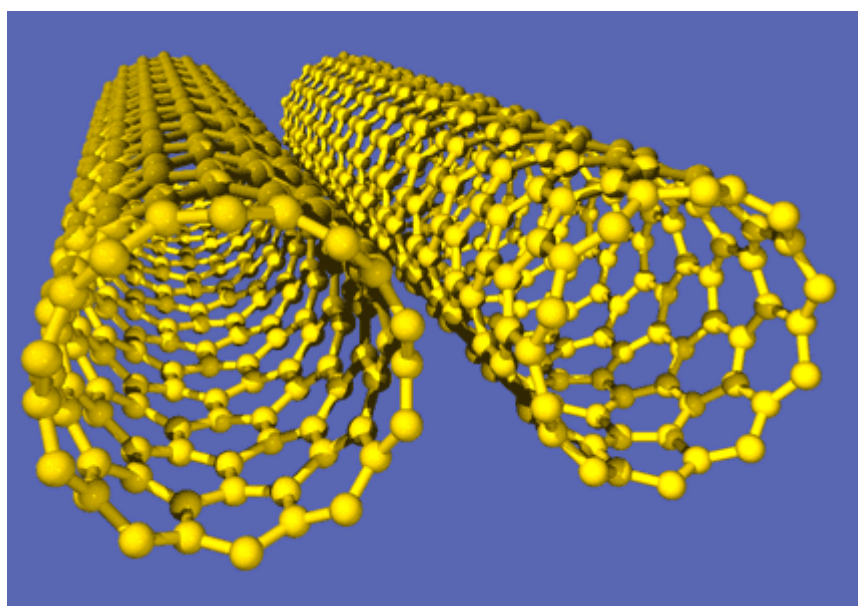
Aptamery konkurují protilátkám, protože nedostatky, které mají protilátky, aptamery nemají. Jedním takovým příkladem je stabilita při vyšších teplotách. Aptamer si svou strukturu zachová, dokonce je schopný účastnit se i opakovaných měření, oproti tomu protilátka svůj tvar ztrácí a podléhá denaturaci. Dalším kladem aptamerů je jejich výroba, protože mohou být vyráběny ve velkém a pro konkrétní cíl. Zato výroba protilátek je poměrně nákladná [7,17].



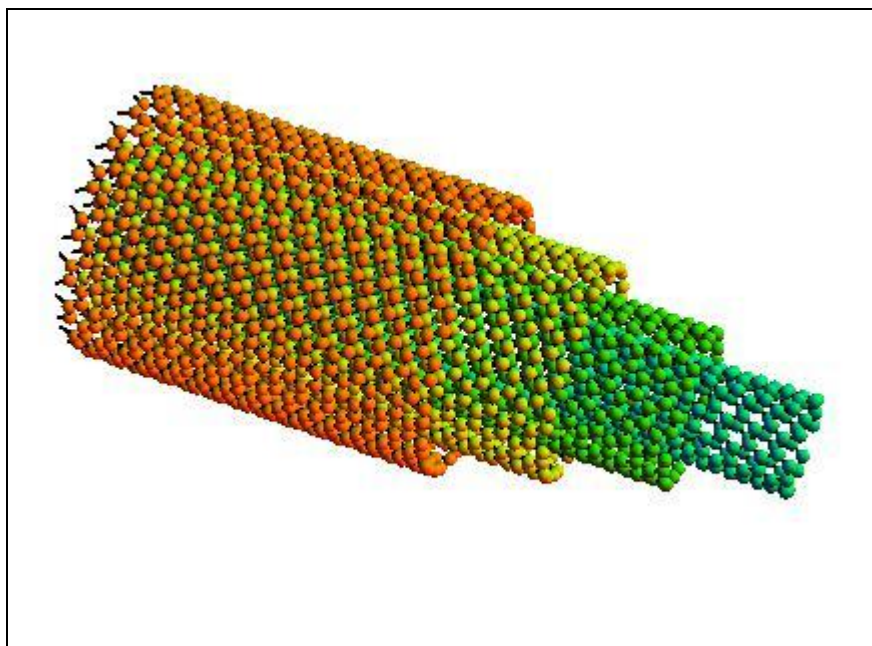
Obrázek 5 Příprava aptamerů metodou SELEX.

4.1.2 Senzory používající nanotechnologii

Zde se často objevují uhlíkové nanotrubic. Jsou oblíbené pro zvyšování citlivosti senzorů [7]. Používají se buď jednotěnné uhlíkové nanotrubic (SWCNT – single-walled carbon nanotubes) nebo mnohostěnné uhlíkové nanotrubic (MWCNT – multi-walled carbon nanotubes). Struktury nanotubic jsou uvedeny na obrázku 6 a 7 [7,18,19].



Obrázek 6 Struktura SWCNT.



Obrázek 7 Struktura MWCNT.

4.2 Značené senzory

Tyto senzory se často spojují s nanočásticemi, a to pro jejich dobré fyzikální a chemické vlastnosti. Výběr nanočástic se neomezuje pouze na jeden typ, naopak je zde hned několik skupin, které se mohou podílet na konstrukci potřebného senzoru. Příkladem mohou být: kovové nanočástice, polovodičové nanočástice a nanočástice oxidů [20].

Velikost nanočástic se pohybuje v rozmezí od 1 do 100 nm, což u nich vykazuje odlišné vlastnosti, než má většina běžně používaných materiálů. Například nanočástice oxidů velmi dobře imobilizují díky své biokompatibilitě. Kovové nanočástice zase zlepšují přechod elektronů z proteinů k povrchu elektrody a v některých případech fungují i jako katalyzátory. Polovodičové nanočástice působí v roli značek a indikátorů [20].

Na základě vlastností nanočástic se oblasti jejich působení rozdělují do pěti skupin: značení biomolekul, imobilizace biomolekul, zlepšení přenosu elektronů, katalýza elektrochemických reakcí a role reaktantu. Vše je shrnuto v tabulce 1, která byla převzata z anglického originálu [20].

Tabulka 1 Přehled použití různých nanočástic.

Funkce	Vlastnosti	Používané nanočástice	Výhody senzorů	Příklady
Imobilizace biomolekul	Biokompatibilita	Kovové nanočástice: Au, Ag nanočástice oxidů: SiO ₂ , TiO ₂	Zlepšení stability	Protilátky imobilizované na Au nanočásticích zůstaly stabilní 100 dní
Katalýza elektrochemických reakcí	Vysoká povrchová energie	Kovové nanočástice: Au, Pt	Zlepšení citlivosti a selektivity	H ₂ O ₂ senzor založený na nanočásticích berlínské modři s citlivostí 103,5 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$
Zlepšení přenosu elektronů	Vodivost	Kovové nanočástice: Au, Ag nanočástice oxidů: TiO ₂ , ZrO ₂	Zlepšení citlivosti, přímá elektrochemie proteinů	Přenos elektronů z glukózaoxidázy byl zvýšen o 5000 s ⁻¹ díky Au nanočásticím
Značení biomolekul	Malá velikost, přizpůsobivost	Polovodičové nanočástice: CdS, PbS kovové nanočástice: Au, Ag	Zlepšení citlivosti, nepřímá detekce	DNA senzor značený Ag nanočásticemi dosahuje detekčního limitu 0,5 pM
Nanočástice v roli reaktantů	Chemická aktivita	Nanočástice oxidů: MnO ₂	Urychlení reakčního mechanismu	Laktátový biosenzor s nanočásticemi MnO ₂ je 50krát citlivější než bez nanočástic

4.2.1 Imobilizace biomolekul

Jde o jednu z významných schopností nanočástic. K imobilizaci dochází např. přitahováním opačných nábojů, které nesou nanočástice a biomolekuly. Nanočástice se dokážou navázat k biomolekulám velmi silně, aniž by došlo ke ztrátě bioaktivity u biomolekul. V tomto je rozdíl oproti kovalentní vazbě biomolekul k senzoru bez nanočástic, kde může dojít ke ztrátě bioaktivity. Výzkumný tým Chena objevil spojitost mezi velikostí nanočástic a kvalitou imobilizace. Bylo prokázáno, že je imobilizace stabilnější, čím menší jsou nanočástice [20]. Nejčastěji používané nanočástice pro imobilizaci jsou zlaté nanočástice, na které se vážou pomocí kovalentní vazby proteiny obsahující síru. Dále se pracuje se stříbrnými nebo křemennými nanočásticemi [20]. Některé nanočástice však mají tendenci se shlukovat v jednom místě a imobilizace nemusí být zaručena [20].

4.2.2 Katalýza elektrochemických reakcí

Protože nanočástice mají velmi dobré katalytické vlastnosti, dá se uvažovat o tom, že jejich spojením s biosenzory by vznikly vysoce citlivé senzory, které by byly schopné detekovat i velmi malé koncentrace látek (v řádech femtomolů; 10⁻¹⁵) ve zkoumaném vzorku [20].

Katalytickými účinky vynikají kovové nanočástice, jako třeba platina, zlato nebo měď. Zástupci s těmito vlastnostmi se dají nalézt i mezi nekovovými nanočásticemi, příkladem je berlínská modř. Tyto nanočástice mají schopnost snížit přepětí při elektrochemické reakci, jako např. u platinové mikroelektrody se zlatými nanočásticemi, kde zlaté nanočástice katalyzovaly oxidaci oxidu dusnatého a přepětí se tak snížilo na hodnotu kolem 250 mV [20].

4.2.3 Zlepšení přenosu elektronů

Přenos elektronů mezi senzorem a proteinem je celkem složitý, protože některé proteiny mají své aktivní centrum chráněno izolační vrstvou, jako je tomu třeba u enzymů. Tento problém lze eliminovat při použití nanočástic, které fungují jako „zprostředkovatelé“ (mediátory) při přenosu elektronů [20].

Dobrou vodivost prokázaly samozřejmě kovové nanočástice (např. Ag nebo Au). Konkrétním použitím stříbrných nanočástic se zabývali Li a spol., kteří použili elektrody z pyrolytického uhlíku potažené stříbrnými nanočásticemi k imobilizaci cytochromu c. Vodivost stříbrných nanočástic zvýšila transfer elektronů a čas přechodu se ustálil na $15,8 \text{ s}^{-1}$ [20].

Použitelní zástupci v této kategorii se objevují i mezi polovodičovými nanočásticemi (CdS) nebo u nanočástic oxidů (MnO_2 , TiO_2 , Fe_3O_4) [20].

4.2.4 Značení biomolekul

V této oblasti se uplatňují kovové (např. zlaté a stříbrné nanočástice) a polovodičové nanočástice (např. CdS). Stejně jako tomu bylo u imobilizace, tak i zde zůstává zachována bioaktivita značených biomolekul. Konečné výsledky je možné získat díky navázaným nanočásticím. Nejvíce využívanou metodou pro měření vzorku je zde rozpouštěcí voltametrie, při které se pracuje s malým množstvím stanovované látky, v řádu pikomolů [20].

4.2.5 Nanočástice v roli reaktantů

Zde mají hlavní úlohu nanočástice oxidů, a to hlavně MnO_2 . Význam této vlastnosti nejlépe ukazuje konkrétní příklad využití MnO_2 : pokud s peroxidem vodíku reaguje oxid manganičitý, je zapotřebí k rozkladu peroxidu katalyzátor, ale pokud s peroxidem reagují nanočástice oxidu, není katalyzátor potřeba. Toto je možné, protože nanočástice jsou

chemicky velmi aktivní, a to díky své velké povrchové energii. Kromě MnO_2 jsou použitelné i oxidy ceru a olova [20].

5 Příklady používaných senzorů

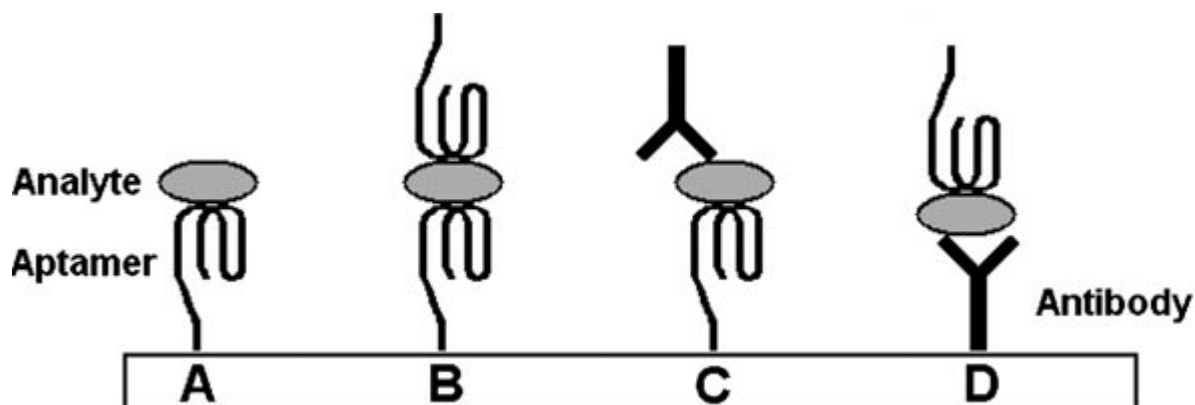
5.1 Aptasenzory

Jde o senzory založené na aptamerech. Aptasenzory jsou velmi výhodné, protože se dají použít opakovaně, i když na povrchu nesou biologický materiál, čili aptamer. Jejich další výhodou je jejich univerzální použití a malá velikost [17].

Aptasenzory vznikají tak, že se aptamer, který je označený elektrochemickou značkou, zachytí na elektrodě. V konkrétních případech tak vznikl aptasenzor z multistěnné uhlíkové nanotrubic, kde byla jako značka použita methylenová modř, nebo trombinový aptasenzor se stejnou značkou. Kromě methylenové modři se používají i zlaté nanočástice a vodivé polymery [21,17].

Uspořádání aptamerů na povrchu elektrody se uskutečňuje čtyřmi způsoby. Za prvé se navazuje jeden aptamer, za druhé se navazují dva při tzv. sendvičovém uspořádání. Třetí a čtvrtá možnost kombinuje sendvičové navázání aptameru s protilátkou. Všechny varianty jsou zobrazeny na obrázku 8 [21].

Aptasenzory mají široké uplatnění v různých elektrochemických senzorech, proto budou dále popsáni vybraní zástupci.



Obrázek 8 Konfigurace aptamerů na povrchu elektrody.

5.1.1 Amperometrické aptasenzory

Existují dvě formy těchto senzorů: značené a neznačené. Značené aptasenzory obsahují aptamery s kovalentně nebo nekovalentně vázanou značkou [22].

Ke kovalentním značkám patří nanočástice, methylenová modř, enzymy, ferrocen nebo antrachinon. Pokud aptamer nese jako značku enzym, vážou se na senzor sendvičovým způsobem. Použití jednotlivých značek je široké a velmi často se pro jednu látku používá víc značek najednou. Tak je tomu například u trombinu. K jeho detekci se používají enzymy, zlaté nanočástice, ferrocen i methylenová modř [17,22].

Mezi nekovalentní značky se řadí rovněž methylenová modř, která byla rovněž použita pro trombický aptasenzor [22].

Neznačené aptasenzory jsou založené na připojení neznačeného aptameru k senzoru. Samotný aptamer ale může zachytávat i jiné značené molekuly [22].

5.1.2 Aptamery spojené s ISFET tranzistory

Jde o spojení FET tranzistoru s uhlíkovými nanotrubicemi a vodivými polymery. Senzory s nanotrubicemi se používají například pro detekci imunoglobulinu E. Z vodivých polymerů se aptamery často spojují kovalentní vazbou s polypyrrolovými nanotrubicemi [22].

5.2 Polymery

Jde o hojně využívané materiály, a to kvůli jejich užitečným vlastnostem, jako je například chemická a biologická stabilita, nebo vhodné fyzikální vlastnosti. Jsou tak schopné vylepšovat stabilitu a citlivost senzorů. Mezi konkrétní příklady využití vlastností polymerů se dá zařadit odolnost vůči teplotním výkyvům při měření, vodivost i při pokojových teplotách (např. polypyrrol) nebo dobrá imobilizace proteinů na jejich povrchu. Mají zároveň velkou oblast využití, bývají použity jak v elektrických, tak i v optických metodách pro detekci proteinů a jiných biomolekul [3,12].

Doposud se v elektrochemických metodách nejčastěji objevovaly polymery ve dvou variantách. Jako molekulárně vtištěné polymery (MIPs – molecularly imprinted polymers), nebo vodivé polymery (CPs – conducting polymers). MIPs zvyšují selektivitu biomolekul, CPs zase zlepšují citlivost při detekci [3].

Škála polymerů, kterými se modifikují elektrody, je velmi pestrá. Například u elektrody z oxidu titaničitého dopovaného indiem, která je potažená polyanilinem, zvyšuje polyanilin selektivitu při navazování protilátek na povrch elektrody. Polyethylenglykol

napomáhá upevnit stabilitu vazby mezi elektrodou a proteinem [3]. Polypyrrol je velmi často používaným polymerem, proto je podrobněji popsán jako zástupce ve skupině polymerů.

5.2.1 Polypyrrol

Tento polymer patří do skupiny vodivých polymerů. Polypyrrol se řadí mezi nejčastěji využívané polymery, za což vděčí svým vlastnostem, jako jsou antikorozi ochrana elektrody, vodivost za pokojové teploty (v rozmezí od 10^{-4} do 10^{-2} S/cm), silné adsorpční vlastnosti, biokompatibilita a mnohé další [12].

Polypyrrol je často aplikován na katalytické a afinitní senzory, a to pro snadnou imobilizaci biomolekul na povrchu senzoru a pro svou biokompatibilitu. To ovšem nejsou jediné důvody, proč se polypyrrol používá při detekci. Mezi čtyři nejhlavnější se řadí: schopnost polypyrrolu chránit elektrodu před nečistotami, co nejméně narušovat pracovní prostředí (opět souvislost s biokompatibilitou), v několika případech je polypyrrol schopný vystupovat jako redoxní mediátor, který napomáhá přenosu elektronů mezi elektrodou a zkoumaným vzorkem, a v neposlední řadě jeho schopnost přizpůsobovat své analytické vlastnosti použitým biosenzorům podle způsobu jeho elektrochemické přípravy [12].

I když se polypyrrol řadí mezi vodivé polymery, našel uplatnění i ve skupině molekulárně vtištěných polymerů. Tento typ elektrod má velmi dobré předpoklady pro širší využití v přímých elektrochemických měřeních [12].

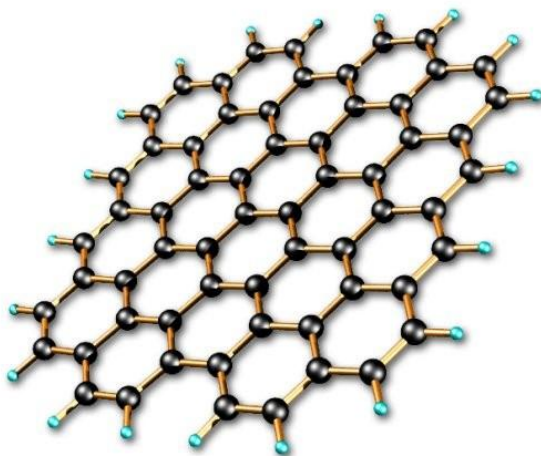
5.3 Uhlíkové elektrody

5.3.1 Grafen

Grafen byl vytvořen v roce 2004 dvěma ruskými fyziky Andre Geimem a Konstantinem Novoselovem, kteří byli za tento objev oceněni v roce 2010 Nobelovou cenou za fyziku [13,23].

Unikátnost grafenu spočívá v jeho vlastnostech a dvourozměrném uspořádání. Jak je vidět na obrázku 9, grafen připomíná rovinnou síť, kde atomy uhlíku tvoří tvar šestihranu. Navzájem jsou uhlíky propojené vazbami sp^2 . Dvourozměrný tvar je v konfiguracích uhlíku netypický. Standardně se objevuje trojrozměrné uspořádání (grafit, diamant), jednorozměrné (uhlíkaté nanotrubičky) a bezrozměrné (uhlíkové nanočástice, fullereny). Kromě atypického uspořádání má grafen i unikátní vlastnosti. Mezi ně patří vysoká pohyblivost elektronů (přibližně $200\,000\text{ cm}^2\text{ (V}\cdot\text{s)}^{-1}$) při pokojové teplotě, nadprůměrná tepelná vodivost

($3000 \text{ W (m}\cdot\text{K)}^{-1}$), pružnost nebo velký specifický povrch pohybující se kolem $2600 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ [13, 24].



Obrázek 9 Struktura grafenu.

Možnost využívat grafen v elektrochemické detekci se jasně nabízel, protože kromě již zmíněných vlastností je grafen levný, chemicky stabilní a vykazuje elektrokatalytickou aktivitu v různých redoxních reakcích. Senzory s grafenem pro detekci proteinů jsou jedny z mnoha, jeho uplatnění se dá pozorovat i u DNA senzorů, imunosenzorů a enzymatických biosenzorů [13].

Senzory s grafenem vylepšují pohyblivost elektronů u proteinů. Tímto jevem se zabýval Zuo a spol., kteří prokázali, že grafenoxid zlepšil vodivost mezi redoxními centry hemových proteinů (např. myoglobin, cytochrom c) a elektrodou. Vědecká skupina Liao a spol. zase zjistila, že přítomnost grafenu na povrchu senzoru zvyšuje zachycené množství proteinů oproti ostatním používaným materiálům. Tento pokus byl proveden na myoglobinu. Podobných projektů existuje celá řada, což dokazuje, že grafen je velmi perspektivním materiálem [13].

Grafen se díky své biokompatibilitě a velkému specifickému povrchu zařadil mezi látky, z kterých se vyrábějí imunosenzory. Například ve spojení se zlatými nanočásticemi vzniká imunosenzor, který je schopný zachytit protilátky, lidský imunoglobulin, alfa-fetoprotein nebo enzymy [13]. Jak je vidět, grafen je velmi výhodný materiál pro výrobu senzorů a zajisté najde široké uplatnění.

5.3.2 Uhlíkové nanotrubicice

Senzory založené na uhlíkových nanotrubicích vykazují rychlejší přenos elektronů, vyšší citlivost a schopnost detekovat i malá množství látky v porovnání s běžněji používanými uhlíkovými elektrodami. Nejčastěji se nanotrubicice používají ve dvou formách: jako jednostěnné uhlíkové nanotrubicice (SWCNT) a mnohostěnné uhlíkové nanotrubicice (MWCNT). Uhlíky v SWCNT jsou spojeny vazbou sp^2 do tvaru šestihranu a vše je stočené do tvaru duté trubice (viz obrázek 6). U MWCNT jde o stejné spojení s tím rozdílem, že zde je několik nanotrubic vloženo do sebe (viz obrázek 7) [8].

Stejně jako grafen, tak i uhlíkové nanotrubicice našly široké uplatnění v elektrochemické detekci. Velké využití mají v imunosenzorech, kde se uhlíkové nanotrubicice používají buď ve spojení s tranzistorem řízeným elektrickým polem (FET) nebo se detekce provádí za pomoci elektroaktivních značek. První metoda používá SWCNT, kde nanotrubicice slouží jako spojení mezi analytem a protilátkou navázanou na povrchu nanotrubic, regulují změny v elektrickém poli, čímž kontrolují i průtok proudu. Druhá metoda je spojená se sendvičovým uspořádáním, kde druhá protilátka nese značku [8].

Konkrétním příkladem měření pomocí uhlíkových nanotrubic dominuje albumin. Ten je hojně zastoupen v těle a velmi často se používá pro testování. Pokus, kde byl použit prasečí albumin, se snažil eliminovat zachycení nežádoucích látek na povrchu elektrody. Na SWCNT byla nanosena ochranná vrstva nitridu křemičitého, který zabránil přístupu vody a kyslíku. Detekční limit albuminu byl v tomto případě 5 nM [8].

Dalším příkladem je detekce imunoglobulinu G (IgG). Pokud se IgG váže na FET tranzistor modifikovaný SWCNT přímo, pohybuje se detekční limit kolem 8 nM [8].

Jak se ukazuje, uhlíkové nanotrubicice jsou slibným materiálem pro spojení s biosenzory pro své katalytické a elektrické vlastnosti. O tom vypovídá i jejich široké využití pro detekci několika typů biomolekul [8].

5.4 Zlaté elektrody

Použití zlata jako elektrodového materiálu má jasné opodstatnění, které vychází z jeho vlastností. Zlato vyniká velmi dobrou vodivostí (je to třetí nejvodivější kov) a antikorozními vlastnostmi. Stejně jako kov samotný mají i zlaté nanočástice cenné vlastnosti. Mezi ně se řadí jejich schopnost zlepšit přenos elektronů mezi elektrodou a proteinem bez použití redoxního mediátoru, imobilizace biomolekul bez ztráty jejich bioaktivity, velký plošný objem a mnohé další [25,26].

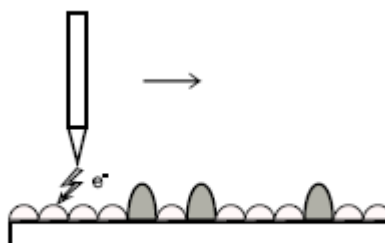
Zlaté nanočástice bývají používány na různé typy senzorů, od enzymových biosenzorů přes DNA senzory až po imunosenzory. Při přípravě biosenzorů pro enzymy se zlaté nanočástice často kombinují s jinými materiály, které se rovněž ve velké míře používají v biosenzorech. Jedním takovým materiálem jsou uhlíkové nanotrubicе. Ke spojení nanočástic s nanotubicemi dochází pomocí elektrostatické interakce. Dalším materiálem, se kterým mohou být nanočástice zlata kombinovány, jsou polymery [25].

Imunosenzory se používají v širokém rozsahu. S jejich pomocí se stanovuje imunoglobulin G, α -fetoprotein, ale i virus hepatitidy B. Tito zástupci jsou jen zlomkem látek, které se imunosenzory se zlatými nanočásticemi dají stanovit. To jen potvrzuje jejich univerzálnost [25].

Nevýhodou zlatých elektrod je jejich cena. Tomuto se snaží předejít výroba jednorázových zlatých elektrod, jejichž výroba není tak cenově náročná. U jednorázových elektrod dochází ke spojení zlata s grafitovými nebo stříbrnými elektrodami [26].

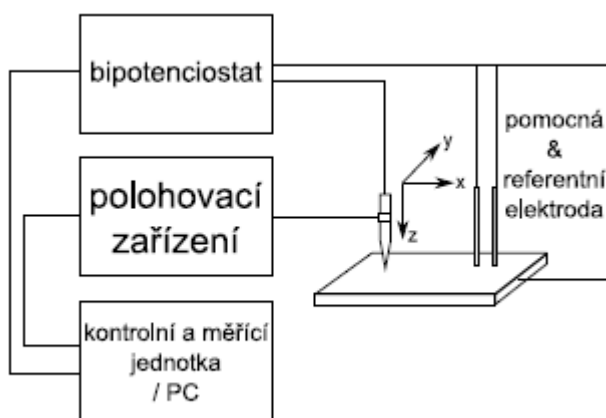
5.5 Skenovací elektrochemická mikroskopie

Skenovací elektrochemická mikroskopie (SECM) se řadí do skupiny metod, které pro své měření používají sondu, jako např. u skenovací tunelové mikroskopii (STM) nebo mikroskopii atomárních sil (ATM). SECM má velice široké uplatnění, využití nalezne od biologických studií až po forenzní vědy (zde je spojena se zobrazením otisků prstů). Měření probíhá tak, že sonda přejíždí nad povrchem zkoumané látky (obrázek 10) a mezi sondou a povrchem dochází k interakci. V případě metody SECM zaznamenává sonda elektrochemické vlastnosti, konkrétně jde o tok faradaických proudů, které vyvolává elektrochemická reakce. Vlastnosti daného povrchu jsou pak určeny z velikosti interakce. Výsledek měření je zaznamenán do podoby trojrozměrného obrázku, a to tak, že na osy X a Y se vynášejí souřadnice sondy, na osu Z se zaznamenává velikost měřené vlastnosti povrchu [27,28,29].



Obrázek 10 Princip SECM.

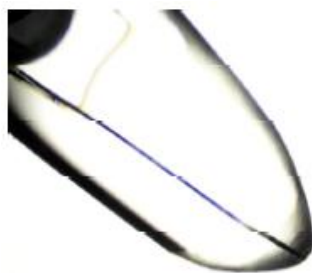
Jako přístroj ke snímání vzorků se u SECM používá skenovací elektrochemický mikroskop. Na obrázku 11 je vidět zjednodušená sestava celého mikroskopu. Jde o relativně nekomplikovaný přístroj v porovnání se zařízeními ostatních skenovacích metod. Jednotlivé části přístroje tvoří polohovací zařízení (pohybuje sondou), elektrochemická cela, potenciostat, který umožňuje elektrochemické měření (na obrázku je uvedený bipotenciostat), jenž dodává potenciál na sondu (pracovní elektrodu) a skenovaný povrch a měří výsledný proud, a v neposlední řadě počítač s řídicím programem [27].



Obrázek 11 Instrumentální uspořádání při SECM.

Za nejdůležitější část skenovacího mikroskopu je považována mikroelektroda, což je podle definice taková elektroda, která má minimálně jeden rozměr v řádu mikrometrů. Vliv na chování mikroelektrody má přenos hmoty v jejím okolí, který je prováděn třemi různými mechanismy. Prvním z nich je migrace, kde se nabitě částice pohybují v závislosti na elektrickém poli. Druhá je konvekce, způsobená mícháním nebo průtokem, částice mají tzv. hydrodynamický pohyb. Třetím typem je difuze, kde se částice pohybují v závislosti na koncentračním gradientu [27,28].

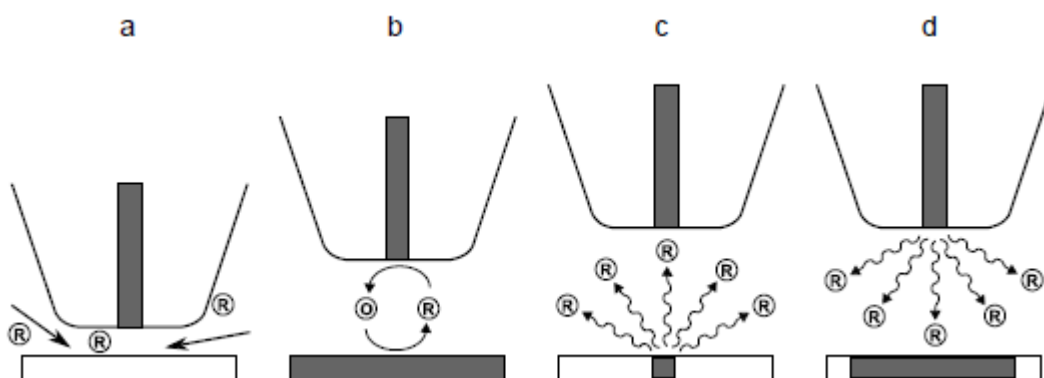
Mikroelektroda je nejčastěji vyrobena z vodivého drátku nebo vlákna s průměrem v jednotkách nebo desítkách mikrometrů, zataveným ve skleněné kapiláře. Na obrázku 12 je uvedena mikroelektroda zhotovená ze skleněné kapiláry a uhlíkového vlákna. Používané drátky se vyrábějí například z uhlíku, platiny nebo zlata. K výrobě kapiláry se kromě skla využívají i jiné izolační materiály jako jsou epoxidy, roztavený vosk či polymery. Tvary mikroelektrod jsou různé: diskové, válcové, svazkové, drátky, kuličky a hroty [27,28].



Obrázek 12 Uhlíková mikroelektroda zatavená v kapiláře jako sonda pro SECM.

Měření u metody SECM se provádí ve dvou základních režimech, které se dělí na dvě podkategorie. Při režimu zpětné vazby dochází k redoxní recyklaci ($R \leftrightarrow O + n e^-$) elektrochemicky aktivní látky (mediátoru) a objevuje se bráněná difuze. Prvním typem zpětné vazby je negativní zpětná vazba, která vzniká, pokud se mikroelektroda přibližuje k izolantu. Povrch izolantu brání volné difuzi, tím pádem mediátor přistupuje k povrchu izolantu jen po okrajích mikroelektrody a odezva měřeného proudu klesá. U pozitivní zpětné vazby se mikroelektroda přibližuje k vodivému materiálu. Vše je téměř stejné jako u předešlé metody s tím rozdílem, že je zde oxidovaná forma mediátoru, která se na povrchu vzorku redukuje, ale znova se může oxidovat na povrchu mikroelektrody. Dochází tak k recyklaci mediátoru a proudová odezva stoupá [27,28].

Druhý způsob měření je generující/sběrný režim. V tomto režimu jeden člen z páru skenovaný povrch-mikroelektroda tvoří elektrochemicky aktivní částice a druhý je přijímá. Při způsobu SG/TC (substrate generation/tip collection) utváří aktivní částice skenovaný povrch. Při TG/SC (tip generation/substrate collection) je tomu přesně naopak. Jednotlivé způsoby měření jsou zobrazeny na obrázku 13 [27, 28].



Obrázek 13 Způsoby měření při SECM: a) negativní zpětná vazba, b) pozitivní zpětná vazba, c) SG/TC, d) TG/SC.

6 Komerčně dostupné senzory

Klasickým zástupcem volně prodejných senzorů jsou glukometry. Ovšem díky rychle se rozvíjejícím technologiím v elektrochemii se začínají objevovat senzory pro domácí použití i pro proteiny [9].

Nejznámějším zástupcem domácího senzoru pro proteiny je těhotenský test. Běžně používané těhotenské testy jsou založené na imunochromatografické metodě. Jejich pomocí se zjišťuje, vyšší hladina tzv. těhotenského hormonu, což je choriogonadotropin. Tento typ je založen na vizuálním vyhodnocení výsledku, ale díky vývoji byla tato metoda spojena s elektrochemickým detekčním systémem. Jasnější zdůraznění rozdílů mezi těmito senzory nabídne popis jejich konstrukce. [9]

Těhotenský test založený na imunochromatografické metodě je tvořený nitrocelulózní membránou a ploškou pro aplikaci vzorku. Na obou koncích senzoru jsou absorpční plochy. Mezi membránu a plošku pro vzorek je vložena spojovací plocha, která obsahuje monoklonální anti-choriogonadotropní protilátky a barvivo pro vyznačení výsledku testu. Tato část obsahuje kontrolní a testovací proužek. Pokud je při testování přítomen choriogonadotropin, zbarví se oba proužky, pokud ne, zbarví se pouze kontrolní proužek [9].

Testy vylepšené o elektrochemickou detekci prozatím využily dvě metody. První z nich vychází z impedimetrického měření, kde se využívá vzájemné interakce protilátky a antigenu, které nese testovací proužek. Místo barviva je zde použita ureáza, a to pro označení monoklonálních protilátek. Výsledek měření se dá určit po změně pH (dojde ke zvýšení pH), ke které dochází, když po nanesení vzorku moči utvoří ureáza a protilátka vazbu. Změna pH je zaznamenána elektrodou potaženou polymerem, což vede k narušení vrstvy polymeru, a výsledkem je změna kapacitance na elektrodě. Druhá metoda využívá jako značky kvantové tečky z CdS a ZnS. V tomto případě nejdříve dojde k rozpuštění kvantových teček v kyselém prostředí, poté se pomocí stripping voltametrie určí ionty kadmia. Zde se pro měření používá jednorázová sítotisková elektroda, která je umístěná pod nitrocelulózní membránou, kde je umístěn testovací proužek. Senzor využívající kvantové tečky je uveden na obrázku 14 [9].



Obrázek 14 Elektrochemický těhotenský test s kvantovými tečkami.

7 Závěr

V bakalářské práci byla přiblížena elektrochemická detekce proteinů a text byl koncipován tak, aby byl srozumitelný i široké veřejnosti, ne jen zasvěceným odborníkům.

Jak je poznat elektrochemie je vědní obor, který má hodně co nabídnout, neustále se rozvíjí a zdokonaluje. Jasným příkladem byly aptamery. Už jen jejich jasné převýšení protilátek jim otevírá cestu ke stále novým uplatněním. Dalším příkladem je grafen. Látka v celku nová, ale s vlastnostmi, kterými zastínila starší a běžněji používané materiály. Další výzkumy a testování by bez pochyby měly najít další obory, kde grafen použít, protože je to materiál s velkým potenciálem.

Kapitola o volně prodejných senzorech ukázala, že senzory nepatří jen do laboratoří, ale lidé s nimi přichází do styku i u sebe doma. A asi příliš mnoho lidí netušilo, že i obyčejný těhotenský test, je skrytým senzorem.

8 Literatura

1. **DYČKA, Filip.** *Elektrochemická detekce oligonukleotidů na površích chemicky modifikovaných elektrod.* Brno, 2006. 31 s. [online] Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Dr. Stanislav Hasoň. [cit. 2014-07-12]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/77671/prif_b/bakalarska_prace_-_Elektrochemicka_detekce_oligonukleotidu_na_povrsich_chemicky_modifikovanych_elektrod.pdf
2. **KOPLÍK, Richard.** Elektroanalytické metody. [online]. [cit. 2014-07-12]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~koplikr/Elektrochem.pdf>.
3. **JONG-IN HAHM.** Functional Polymers in Protein Detection Platforms: Optical, Electrochemical, Electrical, Mass-sensitive, and Magnetic Biosensors. *Sensors*. 2011, **11**, 3327-3355. ISSN 1424-8220.
4. **GUIWAN Koh, SHUCHI Agarwal, PUI-SZE Cheow, CHEE-SENG Toh.** Development of a membrane-based electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*. 2007, **53**, 803-810.
5. Voltametrie a polarografie. [online]. [cit. 2014-07-12]. Dostupné z: web.natur.cuni.cz/~opekar/elchemchzp/elanalchzp3.doc
6. **TATARKOVIČ, M., BRONCOVÁ, G., KRONĎÁK, M.** Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze. *Chemické listy* [online]. 2012, **106**, 1067-1074 [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_11_1067-1074.pdf.
7. **MUN'DELANJI VESTERGAARD, KAGAN KERMAN, EIICHI TAMIYA.** An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors. *Sensors*. 2007, **7**, 3442-3458. ISSN 1424-8220.
8. **JACOBS, C. B., PEAIRS, J. M., VENTON, J. B.** Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Analytica Chimica Acta*. 2010, **662**, 105-127.
9. **MING-HUNG LEE, THOMAS.** Over-the-Counter Biosensors: Past, Present, and Future. *Sensors*. 2008, **8**, 5535-5559. ISSN 1424-8220.
10. **HORÁK, Michal.** Elektroanalytika – Biosenzory [online]. 2006, 27.1.2006 [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: <http://www.chemi.muni.cz/~michalh/biosenzory.html>.
11. **UHROVÁ, Helena.** Biosenzory [online]. [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: <http://fchi.vscht.cz/uploads/pedagogika/nano/predmety/biofyzika/Biosenzory.pdf>.

12. **RAMANAČIUS, A., RAMANAČIENĚ, A., MALINAUSKAS, A.** Electrochemical sensors based on conducting polymer – polypyrrole. *Electrochimica Acta*. 2006, **51**, 6025-6037.
13. **TIAN GAN, SHENGSHUI HU.** Electrochemical sensors based on graphene materials. *Microchim Acta*. 2011, **175**, 1-19.
14. Bílkoviny. [online]. [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: <http://www.e-chembook.eu/cs/bilkoviny>.
15. **DOSTÁL, Jiří a kolektiv,** *Lékařská chemie II – Bioorganická chemie*. 2., zcela přepracované vyd. Brno-Kraví Hora: Tisk Coprint, 2009, 166 s. ISBN 978-80-210-3789-2.
16. **BOJKOVSKÝ, Martin.** Termodynamika. *Vodíková vazba* [online]. 2009, [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: http://fikus.omska.cz/~bojkovsm/termodynamika/vodikova_vazba.html.
17. Aptamery – Funkce, vznik, charakterizace. [online]. [cit. 2014-06-24]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/data/soubory/Aptamery.pdf.
18. **KOŠŤÁKOVÁ, Eva.** Uhlíkové nanotrubic. *Rozdělení, struktura* [online]. [cit. 2014-06-24]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/knt/nanotex/2.predn%C3%A1ska%200_final%202010_na%20web.pdf.
19. Introduction. [online]. [cit. 2014-06-24]. Dostupné z:
 - a. <http://regangroup.physics.ucla.edu/home.html>.
20. **XILIANG LUO, MORRIN. A., KILLARD, A. J., SMYTH, M. R.** Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis*. 2006, **18**(4), 319-326.
21. **HIANIK, T., WANG, J.** Electrochemical Aptasensors – Recent Achievements and Perspectives. *Electroanalysis*. 2009, **21**(11), 1223-1235.
22. **SASSOLAS, A., BLUM, L. J., LECA-BOUVIER, B. D.** Electrochemical aptasensors. *Electroanalysis*. 2009, **21**(11), 1237-1250.
23. *The Nobel Prize in Physics 2010* [online]. [cit. 2014-07-11]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/.
24. Grafen – materiál budoucnosti. [online]. [cit. 2014-07-11]. Dostupné z: <http://fyzmatik.pise.cz/988-grafen-material-budoucnosti.html>
25. **PINGARRÓN, J. M., YÁÑEZ-SEDEÑO, P., GONZÁLEZ-CORTÉS, A.** Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*. 2008, **53**, 5848-5866.

26. **PRIANO, G., GONZÁLEZ, G., GÜNTHER, M., BATTAGLINI, F.** Disposable Gold Electrode Array for Simultaneous Electrochemical Studies. *Electroanalysis*. 2008, **20**(1), 91-97.
27. **LACINA, K., SKLÁDAL, P., NAGY, G.** Skenovací elektrochemická mikroskopie. *Chemické listy* [online]. 2012, **106**, 253-263. [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_04_253-263.pdf
28. Možnosti elektrochemické mikroskopie v oblasti biologických látek [online]. [cit. 2014-07-13]. Dostupné z: web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/dl.php?id=58.
29. **CORTÉS-SALAZAR, F., BUSNEL, J.M., FEI LI, GIRAULT, H. H.** Adsorbed protein detection by scanning electrochemical microscopy. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2009, **635**, 69-74.