

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

2009

Michaela Čadková

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**IMUNOSENZORY A JEJICH KOMBINACE  
S MAGNETICKÝMI ČÁSTICEMI**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Michaela Čadková

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

2009

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL  
SCIENCES

**IMMUNOSENSORS AND THEIR COMBINATION WITH  
MAGNETIC PARTICLES**

BACHELOR'S WORK

Author: Michaela Čadková

Supervisor : RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

2009

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela ČADKOVÁ**

Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**

Název tématu: **Imunosenzory a jejich kombinace s magnetickými částicemi**

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

Vypracovat teoretickou rešerši zabývající se tematikou využití biosenzorů.

1. Teoretický úvod o jednotlivých typech biosenzorů.

2. Podrobně popsat využití biosenzorů v imunologii a immunochemii

3. Prostudovat a rozepsat dostupné informace o spojení imunosenzorů s magnetickými částicemi, přípravě takových imunosenzorů a jejich využití.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Internetové vědecké databáze (Sciencedirect, Medline), odborné knihy zabývající se danou problematikou**


Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání bakalářské práce: **1. října 2008**

Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, 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 výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 31.7. 2009

.....

Michaela Čadková

Chtěla bych poděkovat RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za odborné vedení a zapůjčení odborné literatury během průběhu zpracování bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu během studia.

## **Souhrn**

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat dostupné informace zabývající se tématikou využití biosenzorů, hlavně spojení imunosenzorů s magnetickými částicemi.

V první části bakalářské práce jsou uvedeny základní informace o biosenzorech a jejich členění, ve druhé části jsou zpracovány informace o spojení imunosenzorů s magnetickými částicemi, přípravě takovýchto imunosenzorů a jejich využití.

**Klíčová slova:** biosenzory  
imunosenzory  
biosenzory s magnetickými částicemi

## **Summary**

The aim of this work was to study available information about the use of biosensors, especially about possible combination of immunosensors with magnetic particles.

In the first section of this work there are basic information about biosensors and their classification, in the second part information about association of immunosensors with magnetic particles, their preparation of such immunosensors and their utilization are mentioned.

**Keywords:** biosensors  
immunosensors  
biosensors with magnetic particles

## Obsah

1	ÚVOD .....	10
2	Biosenzory.....	11
2.1	Definice biosenzoru .....	11
2.2	Historie biosenzorů .....	12
2.3	Vlastnosti senzorů.....	13
2.4	Ideální biosenzor.....	15
2.5	Rozdělení biosenzorů podle fyzikálně-chemického převodníku .....	15
2.5.1	Elektrochemické biosenzory.....	16
2.5.2	Optické biosenzory .....	17
2.5.3	Kalorimetrické biosenzory .....	18
2.5.4	Piezo-elektrické biosenzory.....	18
2.6	Rozdělení biosenzorů podle biologické složky.....	19
2.6.1	Enzymové biosenzory.....	19
2.6.2	Mikrobiální a tkáňové elektrody.....	20
2.6.3	Biosenzory s nukleovými kyselinami (DNA biosenzory).....	21
2.6.4	Imunosenzory .....	22
2.7	Dělení imunosenzorů podle detekčního zařízení .....	24
2.8	Členění imunosenzorů na přímé a nepřímé .....	27
3	Imunosenzory s magnetickými částicemi .....	29
3.1	Příprava senzorů s magnetickými částicemi .....	30
3.2	Využití imunosenzorů s magnetickými částicemi .....	33
4	Závěr.....	36
5	Seznam použité literatury .....	37
6	Použité zkratky:.....	40

# 1 ÚVOD

Biosenzory se v současné době těší velkému zájmu jak ze strany vědeckého, tak i z hlediska komerčního využití. Velká pozornost se věnuje použití biosenzorů na poli klinické analýzy, potravinářské analýzy, v oblasti vojenské a ochrany životního prostředí.

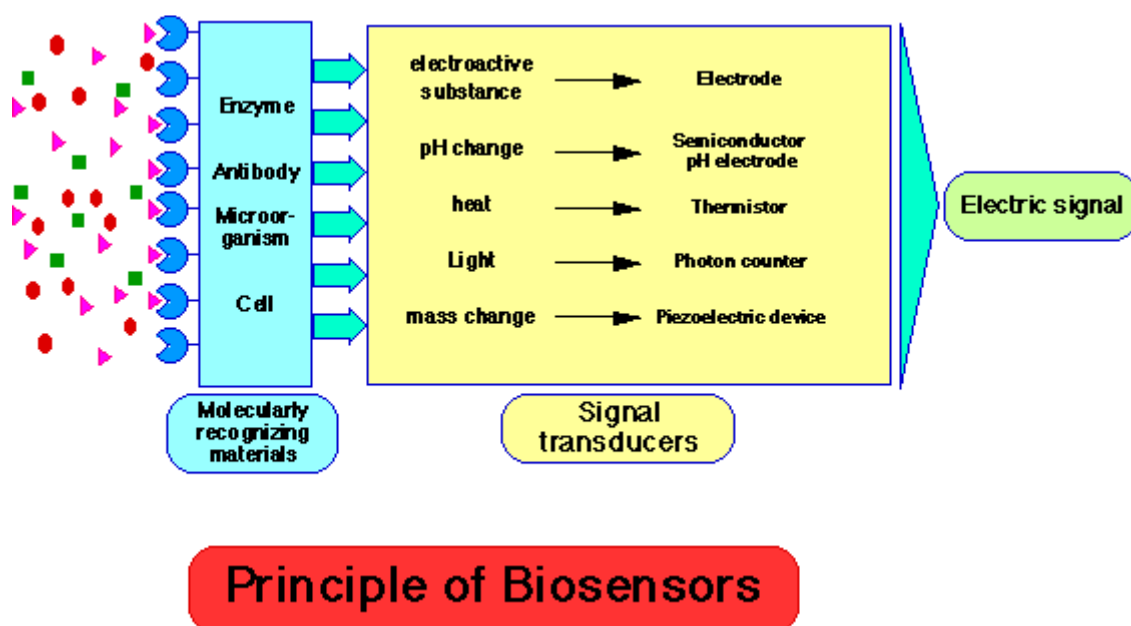
Biosenzory nacházejí uplatnění tam, kde jejich použití je výhodnější oproti použití jiného nebiologického senzoru. V medicíně se využívají v klinické diagnostice při stanovování nejrůznějších složek krve, metabolitů, patogenů apod. V potravinářství se využívají při zjišťování kvality potravin, rozkladných produktů a kontaminací jako např. plísňovými toxiny či patogeními mikroorganismy. Při ochraně životního prostředí se biosenzory používají k detekci znečištění.

Tato bakalářská práce je zaměřena na imunosenzory ve spojení s magnetickými částicemi a jejich využití. Imunosenzory jsou analytické systémy tvořené imunorozpoznávací složkou (protilátkou či antigenem), která je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem poskytujícím elektronický signál jako odezvu na vznik imunokomplexu a zprostředkovaně tak na koncentraci analytu ve vzorku. Užití magnetický částic zlepšuje průběh imunologické reakce jak velkým povrchem pro navázání řady ligandů, snadnou separací z kapalné fáze a dobrou manipulací za pomoci magnetického pole, tak i rychlejší kinetikou reakce.

## 2 Biosenzory

### 2.1 Definice biosenzoru

Biosenzor je analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem [1]. Skládá se ze tří hlavních komponent: biorekogniční složky, převodníku a výstupního zařízení [2]. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupiny) chemických látek ve vzorku [1].



Obr. č.1 Základní schéma biosenzoru

(převzato z [www.jaist.ac.jp/~yokoyama/images/biosensor.gif](http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/images/biosensor.gif) ze dne 20.7.2009 [3] )

Biorekogniční část biosenzoru je část, která dává biosenzoru jeho unikátní vlastnosti selektivity [4]. Je možné ji dále dělit do dvou základních skupin – biokatalytická (enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus), kdy analyt je přeměňován v průběhu chemické reakce a obvykle vystupuje jako substrát enzymové reakce – a bioafinitní (lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor), kdy analyt je specificky vázán ve vznikajícím afinitním komplexu [1].

Fyzikálně-chemické převodníky, které poskytují signál vhodný k dalšímu zpracování, lze rozdělit do následujících skupin: elektrochemické (potenciometrické, amperometrické, konduktometrické, voltametrické), optické (fotometrické, fluorimetrické, luminiscenční), piezoelektrické, akustické a konečně kalorimetrické.[1]

Přestože existuje mnoho detektorů, které mohou být použity v biosenzorech, výběr je limitován typem chemické interakce která probíhá mezi analytem a rekogniční složkou [4].

## 2.2 Historie biosenzorů

První chemický senzor, a to ve formě sondy umístěné ve vzorku, byla skleněná pH měrná elektroda k měření koncentrace vodíkových iontů [4].

Za zakladatele biosezorů je ale považován Leland C. Clark Jr., který v roce 1956 popsal kyslíkovou elektrodu, v roce 1962 společně s Lyonsem spojil enzym s kyslíkovou elektrodou a vytvořil tak glukózovou elektrodu [4].

První komerční biosenzor uvedla na trh úspěšně firma Yellow Springs Instrument Company (Ohio) v roce 1975. V témže roce je navrženo použití bakteriální buňky místo enzymů. O rok později Clemens začlenil glukózový senzor do systému umělého pankreatu uvedeného na trh jako Biostator firmou Miles. V roce 1976 firma La Roche zavedla biosenzor pro laktát LA 640 s umělým mediátorem (ferrikyanidem). Koncem 70. let začíná výzkum imunochemických biosenzorů (imunosenzorů) [1]. Od roku 1975 začalo testování hladiny glukózy ve vzorku krve, ale vývoj vhodného komerčního ručního formátu v roce 1987 způsobil převrat v jejich použití. Původní glukózový biosenzor měl formát pera, pozdější verze připomínají kreditní karty [5].



**Obr.č.2** Glukometr založený na principu biosenzoru

(převzato z [compex.zdravi-cz.eu/glukometry-glukomery.php](http://compex.zdravi-cz.eu/glukometry-glukomery.php) ze dne 20.7.2009) [6]

Dnes pokračuje explozivní nárůst výzkumu biosenzorů v celosvětovém měřítku. Biosenzory vystupují z vědeckých laboratoří do reálného světa [5].

**Obr.č.3** Biosenzor vyvinutý pro detekci virů, bakterií a parazitů

(převzato z [medgadget.com/archives/space medicine/](http://medgadget.com/archives/space-medicine/) ze dne 21. 7. 2009) [7]



## 2.3 Vlastnosti senzorů

### Rychlost odezvy

Rychlost odezvy je určována zejména fyzikálními vlastnostmi biosenzoru [1]. Limitujícím faktorem jsou nejčastěji difuzní procesy, které zahrnují difuzi analytu k povrchu senzoru, difuzi skrz membránu a difuzi skrz jednotlivé části senzoru [4]. Uplatňují se faktory jako koncentrace analytu, velikost difuzních koeficientů, délka difuzní dráhy. Z praktického hlediska je však výhodné, pokud je odezva limitována difuzí a nikoliv rychlostí bioreakce [1].

### Citlivost

Citlivost vychází z nejnižší koncentrace, kterou je systém schopný detekovat. Dynamické rozmezí je obvykle definováno jako poměr nejvyšší a nejnižší koncentrace, kterou je konkrétní metoda spolehlivě schopna měřit [4].

## **Selektivita**

Odezva biosenzoru by měla být vyvolána pouze přítomností stanovované látky, ostatní látky by se neměly projevit. Prakticky je často nutné rušivé látky eliminovat (zředění, konverze na nerušící sloučeniny, předřazení selektivní bariéry) nebo jejich příspěvek na měřený signál paralelně určit jiným senzorem. Při tomto diferenciálním uspořádání se použijí dva stejné převodníky, avšak biorekogniční vrstvou je pokrytý pouze jeden. Druhý slouží jako referentní, lze ho potáhnout vhodnou indiferentní vrstvou pro vyrovnání difuzních podmínek [1].

## **Doba odezvy**

Doba odezvy se obvykle určuje jako čas potřebný k dosažení určité velikosti signálu v konečném ustáleném stavu [1].

Jestliže biorekogniční částí je enzym, potom celková rychlost reakce je dána koncentrací enzymu a substrátu. Je-li biologickou částí protilátka nebo bioreceptor, kinetika je podobná velikosti afinitní konstanty  $K_a$  [4].

## **Životnost biosenzoru**

Životnost je obvykle limitována nejslabším prvkem, což je biorekogniční část. Přitom je třeba odlišit stabilitu při skladování od operační stability, která může být závislá na počtu a druhu analyzovaných vzorků. Optimální podmínky je třeba vždy hledat individuálně [1].

## **Biokompatibilita**

Biokompatibilita má zvláštní význam pro biomedicínské aplikace (měření *in vivo*). Při umístění biosenzoru přímo v krevním toku je třeba zamezit srážení krve. To je zajištěno např. impregnací heparinem. Ve tkáních hrozí nebezpečí zánětlivých reakcí, zajištění a zarůstání pojivovou tkání. Případná sterilizace biosenzoru nesmí negativně ovlivnit jeho aktivitu [1].

## 2.4 Ideální biosenzor

Chceme-li získat co nejdělanější biosenzor, musí vykazovat přinejmenším několik následujících vlastností:

- a) biokatalyzátor musí být vysoce specifický pro účely analýzy, být stabilní při normálních skladovacích podmínkách a vykazovat dobrou stabilitu pro řadu analýz (mnohem větší než sto)
- b) reakce by měla být nezávislá na takových fyzikálních parametrech jako míchání, pH a teplotě. Splnění této podmínky umožňuje analýzu vzorků s minimální předběžnou úpravou.
- c) odezva by měla být přesná, absolutní, reprodukovatelná a lineární v užitečném analytickém rozmezí bez zředování nebo nutnosti zakoncentrování
- d) jestliže je biosenzor užíván pro invazivní monitoring v klinických situacích, sonda musí být malá a biokompatibilní, neměla by mít žádné toxické nebo antigenní efekty [8]. Jak bylo zmíněno v kapitole 1.3, je nutné zamezit srážení krve [1]. Jestliže je užíván ve fermentorech, měl by být sterilizovatelný [8], ale případná sterilizace biosenzoru nesmí negativně ovlivnit jeho aktivitu [1].
- e) kompletní biosenzor by měl být levný, malý, pokud možné přenosný a co nejjednodušeji ovladatelný [8].

## 2.5 Rozdělení biosenzorů podle fyzikálně-chemického převodníku

Klíčová část biosenzoru je převodník, který zužitkovává fyzikální změnu doprovázející reakci. Tím může být:

1. tepelný vstup/výstup při reakci - kalorimetrický biosenzor
2. změna elektrického potenciálu - potenciometrický biosenzor
3. pohyb elektronů produkovaných v redoxní reakci - amperometrické biosenzory
4. světlo produkované během reakce a rozdíl absorpance světla mezi výchozí látkou a produktem - optický biosenzor
5. změny afinitních interakcí výchozích látek a produktů v reálném čase - piezo-elektrické biosenzory [8]

## **2.5.1 Elektrochemické biosenzory**

Elektrochemické systémy jsou nejstaršími a nejčastěji užívanými převodníky [9] pro konstrukci katalytických biosenzorů. Hlavními výhodami jsou jednoduchá konstrukce měřicího systému, nízké pořizovací náklady, vysoká citlivost [1] a relativní nezávislost na interferenci [10]. Pro sestavení elektrochemického měřicího systému jsou zapotřebí nejméně dvě elektrody, pracovní (měrná) a referentní, jejíž potenciál je přesně definovaný a pokud možno časově stálý. Dále může být použita pomocná elektroda, která musí mít dostatečnou plochu vodiče a být elektrochemicky neaktivní. Konstrukční uspořádání elektrod může být velice různorodé [1].

### **2.5.1.1 Potenciometrické bioelektrody**

Potenciometrické biosenzory využívají nejčastěji iontově-selektivní elektrody k převádění biologické reakce na elektrický signál. Za nejjednodušších podmínek [8] je převodníkem iontově selektivní elektroda (ISE) v kombinaci s enzymovou vrstvou [1] obklopující sondu pH-metru, kde katalyzovaná reakce generuje nebo absorbuje vodíkové ionty [8].

Potenciometrický převodník měří změnu potenciálu systému [11]. Základem je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem. Rozsah měřitelných koncentrací je dán vlastnostmi ISE. [1]

### **2.5.1.2 Amperometrické bioelektrody**

Amperometrické senzory měří proud generovaný elektrochemickou reakcí [11], který je úměrný koncentraci analytu. Proud se obvykle měří při konstantním napětí (potenciál  $E$ , nebo  $U$ ) pracovní elektrody. Velikost proudu prošlého za daný čas  $t$  v systému udává náboj, který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách [1].

### **2.5.1.3 Vodivostní bioelektrody**

Tyto systémy mohou být využity pro konstrukci imunosenzorů, které pracují na principu detekce změny elektrického pole díky vazbě antigen-protilátka, které jsou připisovány změnám elektrické vodivosti nebo kapacitance na povrchu elektrody [9].

Kapacitní imunosenzory jsou založeny na změně v dielektrických vlastnostech a tenké dielektrické vrstvě na rozhraní mezi analytem a elektrodou [12].

### 2.5.2 Optické biosenzory

Po elektrochemických jsou optické druhé nejčastěji používané převodníky. Hlavní optický senzor se skládá ze světelného zdroje, řady optických částí generujících světelný paprsek se specifickými vlastnostmi, modulačního zařízení, které světelný paprsek směřuje, a nakonec fotodetektoru [9].

Základem optických biosenzorů je interakce světelného záření s chemickými látkami. Pro konstrukci katalytických biosenzorů se využívají optické techniky jako absorpce, fluorescence a luminiscence [1]. Změny v adsorpci, fluorescenci, luminiscenci, rozptylu či refrakčním indexu (RI) se vyskytují ve chvíli, kdy je světlo odraženo od senzitivní vrstvy. Tato informace je fyzikálním základem optických biosenzorů. Obvykle používanými detektory jsou fotodiody či fotonásobiče [11].

Absorpční spektroskopie využívá změn, které nastávají v molekulách při absorpci záření v rozmezí vlnových délek asi 200 nm až 800 nm. Pokles absorpce po průchodu měřicí kyvetou je úměrný koncentraci stanovované látky [13]. Protože absorpce závisí také na tloušťce vrstvy, jsou rozměry měřicího prostoru limitujícím faktorem. Rozptyl světla se obvykle zanedbává [1].

Reflekční techniky jsou založeny na odrazu světla od vhodného povrchu nebo od opticky hustšího média. Při totálním odrazu světla proniká část energie ve formě exponenciální vlny (zhášivá vlna) do spodních vrstev, což se využívá při studiu povrchových dějů [1].

Fluorescence je využívána velmi často z důvodu vysoké citlivosti. Absorpce ultrafialového záření vede k excitaci z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Fluorescence se projeví při přechodu na základní elektronovou hladinu [13]. Pro budící záření se často

používá světlo laseru, je také výhodné používat polarizované záření. Výstupní intenzita fluorescence závisí na kvantovém výtěžku a na koncentraci fluoreskující látky [1].

Luminiscence je sekundární záření, které látka vydává po absorpci elektromagnetického záření. Chemiluminiscence nastává, produkuje-li chemická reakce elektronově excitované látky, které emitují fotony, aby dosáhly základního stavu. V biologických systémech potom hovoříme o bioluminiscenci [13].

### 2.5.3 Kalorimetrické biosenzory

Tyto biosenzory využívají změny teploty v průběhu enzymových reakcí. Při konstrukci biosenzorů to je spíše okrajová záležitost, ale existují některé analyty, pro které mohou být kalorimetrické převodníky zvláště výhodné. Meze detekce bývají do 10  $\mu\text{M}$ , rozlišení 0,001  $^{\circ}\text{C}$ . Pokud vlastní reakce s analytem neuvolňuje teplo, lze zařadit následný krok uvolňující teplo [1].

Převodníkem je obvykle termistor, jehož odpor  $R$  závisí na absolutní teplotě  $T$  [1]. Teplotní změny jsou obvykle dány možnostmi termistorů [8].

Výhodou je, že nevadí případné pevné částice ve vzorku, interferující látky nebo zbarvení. K použití kalorimetrických biosenzorů se přistupuje také v případech, kdy jiné metody mohou být dosti těžkopádné - např. stanovení triglyceridů lipasou se sleduje kalorimetricky velmi výhodně [1].

### 2.5.4 Piezo-elektrické biosenzory

Piezo-elektrické senzory jsou přístroje založené na takových materiálech, jako jsou krystaly [9], které vibrují pod vlivem elektrického pole. Frekvence jejich oscilace závisí na jejich tloušťce a průřezu a každý krystal má vlastní rezonanční frekvenci [8].

Pro každý piezo-elektrický krystal je změna ve frekvenci úměrná množství adsorbovaného materiálu, až do změny okolo 2%. Tato změna frekvence je jednoduše detekována relativně jednoduchými elektrickými obvody [8].

Hlavní nevýhodou těchto zařízení je interference atmosférické vlhkosti a obtížnost jejich použití pro stanovení analytu v roztoku. Nicméně jsou levné, malé a robustní, a schopné podávat rychlou odpověď [8].

## 2.6 Rozdělení biosenzorů podle biologické složky

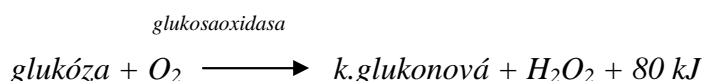
Bioreceptory jsou klíčem ke specifitě biosenzorových technologií. Jsou zodpovědné za vazbu analytu na senzor k měření [2].

### 2.6.1 Enzymové biosenzory

Biokatalytické senzory mají jako rekogniční element enzym – bílkovinu schopnou biokatalyticky přeměnit určitý specifický substrát na produkt [1].

Enzymy jsou často vybírány jako biorekogniční složka biosenzoru z mnoha důvodů, hlavně díky jejich specifickým vazebným schopnostem, stejně jako jejich katalytické aktivitě [8]. Také technologie výroby enzymů pro komerční účely je velmi dobře rozvinuta a řada enzymů je běžně užívána v konvenčních bioanalýzách jako je ELISA. Detailně známé metody jejich izolace, přečištění a imobilizace z nich dělá velmi praktický zdroj pro aplikace v biosenzorech [4].

Enzymy selektivně reagují s chemickou substancí a modifikují ji. Jednoduchým příkladem může být selektivní reakce glukosaoxidázy s glukózou za produkce kyseliny glukonové a peroxidu vodíku [14].



Analyt u těchto senzorů je substrátem pro imobilizovaný enzym. Fyzikálních převodníků, použitelných pro enzymy, existuje celá řada různých variant. Téměř vždy lze použít elektrody nebo optický systém [1].

## 2.6.2 Mikrobiální a tkáňové elektrody

V těchto biosenzorech je biochemická složka v aktivním živém stavu. Jedná se o mikrobiální, rostlinné nebo živočišné buňky, jejich buněčné elementy (organely) nebo celé tkáně či orgány. Hlavní výhodou je, že biokomponenta je ve svém přirozeném biologickém prostředí, což může příznivě ovlivnit její aktivitu a stabilitu. Navíc lze místo jediného enzymu použít celé metabolické reakční sekvence, optimalizované přirozenou cestou.

Odpadá také nutnost izolačních a purifikačních kroků. Biosenzory obsahující současně vedle mikrobiální či tkáňové složky navíc izolovaný enzym se nazývají hybridními [1].

Mikrobiální systémy mohou obsahovat buňky bakterií, sinic či kvasinek, imobilizované buď na povrchu převodníku (membránový typ) nebo ve formě předřazeného reaktoru [1]. Jsou založeny na měření např. změny pH, ke které může dojít působením škodlivin na metabolismus mikroorganismů [4].

Mezi takové systémy patří systémy pro rychlé stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BSK, angl. BOD, biochemical oxygen demand). Z vhodných mikroorganismů lze zmínit *Trichosporon cutaneum*, *Bacillus subtilis* a *licheniformis*. Měří se rychlost respirace po přidavku vzorku, potřebná doba je přitom pouze několik minut. Dále je možno je použít k detekci toxických látek ve vodních tocích (azidy, kyanidy, pesticidy, fenoly, těžké kovy), kde se využívá inhibice respiračního řetězce nebo fotosyntézy vhodného indikačního mikroorganismu (např. *Synecoccus*, aktivovaný kal). Tyto systémy jsou vhodné pro nepřetržité sledování, avšak nejsou příliš specifické a nevýhodou je také poměrně nízká citlivost [1].

Jako biorekogniční složky mohou být využity i rostliny nebo houby. Nejčastěji se využívá žampion jako zdroj tyrosinasy (polyfenol oxidasy) pro stanovení fenolů. Obvykle se používají buď rostoucí části (mladé listy) nebo zásobní části (plody ovoce, zeleniny), ale vždy je třeba otestovat, ve které části se nachází žádaná enzymová aktivita [1].

Rostlinná tkáň se používá jako tenký řez přichycený pomocí řídké sítě na povrch pracovní elektrody. Stabilita takových biosenzorů je řádově týdny až měsíce. Jistým problémem je selektivita odezvy, protože jsou samozřejmě přítomné nejrůznější enzymové systémy [1].

Stabilita tkáňových řezů je nižší ve srovnání s rostlinnými systémy. V posledních letech se značná pozornost obrací k nervovým buňkám, které se kultivují na podložce tvořené souborem miniaturních elektrod (microelectrode array), ze zaznamenaných potenciálů se usuzuje na fyziologický stav [1].

Dráždivé buňky, jako neurony a myokardiocyty, poskytují také velmi citlivý zdroj pro monitoring určitých analytů, zvláště toxických činitelů jako jsou zneužívané drogy (léčiva) a bojové látky s ochromujícím účinkem na nervovou soustavu [4].

Problémem ale zůstává specifita naměřeného signálu [1]. Protože dráždivé buňky jsou typicky dosti nestabilní, je obtížnější použít tuto techniku v rutinním provozu [4]. Oblast použití buněčných kultur nabývá na důležitosti v souvislosti s náhradou testů nově vyvíjených látek prováděných na zvířatech [1].

Tento typ biosenzoru je zvláště užitečný, pokud je nutné stanovit, zda vzorek obsahuje substance, které by mohly být škodlivé pro buňky, spíše než k identifikaci specifických materiálů nebo jejich koncentrací [4].

Jiný systém, využívající mikroorganismy, byl zkonstruován za použití geneticky modifikovaného proteinu, který v přítomnosti škodlivé látky vykazoval bioluminiscenci [4].

### **2.6.3 Biosenzory s nukleovými kyselinami (DNA biosenzory)**

V souvislosti se sekvenováním genů se měření DNA fragmentů stalo základním klinickým nástrojem pro sledování nemocí [4]. Stimulem rozvoje této oblasti biosenzorů bylo hledání rychlejších sekvenačních metod, potřeba detekovat mutační poškození důležitých genů, které se projevuje metabolickými poruchami. Potřebnou citlivost získávají biosenzory pro detekci DNA díky spojení s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) [1].

Pro analýzu se využívá hybridizace vzorku s komplementární sekvencí, tzv. próbou, která je navázána na citlivém povrchu biosenzoru jako biorekogniční prvek. Základem rozpoznávací afinitní reakce je známé párování bází [1]. Komplementarita adenin:thymín a cytosin:guanin párů v DNA tvoří základ pro specifitu rozpoznání v DNA biosenzorech [2]. Průběh hybridizace případně také její kvantitativní rozsah je pak vyhodnocen pomocí fyzikálně-chemického převodníku [1].

Tyto biosenzory pro detekci DNA se využívají k určování příbuzenských vztahů (HLA komplex, oblast D-smyčky mitochondriální DNA), detekci onkogenů a supresorových genů zhoubného bujení (c-myc, c-abl, c-cis, c-ras), dědičných chorob (cystická fibróza, hypercholesterolemie, Huntingtonova choroba, hemofilie A), virů (cytomegalovirus, lidský papilomový virus, rotaviry, HIV), bakterií (*Mycobacterium tuberculosis*, *Gonorrhoea*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus burgdorferi*) [1].

#### **2.6.4 Imunosenzory**

Imunoanalýzy, jako slibné přístupy pro selektivní a senzitivní stanovení různých látek, získaly zvýšenou pozornost v různých oblastech [15] zahrnujících klinické, biochemické analýzy, kontroly životního prostředí či kontroly kvality potravin [16]. Značné úsilí je celosvětově věnováno vytvoření a zdokonalování přenosných a cenově dostupných zařízení pro imunoanalýzy [15].

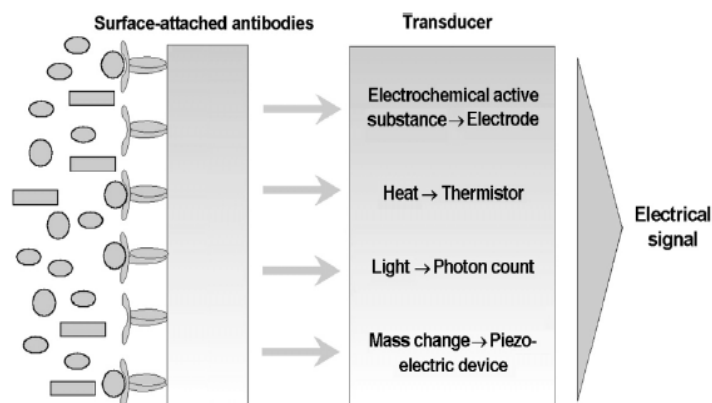
Konvenční imunoanalytické metody jako imunoradiometrie, imunoturbidimetrie, radiální imunodifuze a enzymové imunoanalýzy (ELISA) mají řadu limitujících vlastností, jako je krátkodobá skladovatelnost značených protilátek, nebezpečí radiace, komplikované promývání, velká časová náročnost analýz a v neposlední řadě vysoká cena [16].

Imunosenzory jsou analytické systémy tvořené imunorozpoznávací složkou [17] (zakotvenou protilátkou nebo antigenem), která je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem poskytujícím průběžný elektronický signál jako odezvu na vznik imunokomplexu a zprostředkovaně tak na koncentraci analytu ve vzorku [18].

Imunosenzory se také dále rozdělují podle typu použitého převodníku. Ty mohou být piezoelektrické, optické, elektrochemické, nebo vzácně termické [18].

Další možností členění imunosenzorů je na přímé a nepřímé. Přímé imunosenzory jsou schopné detekovat fyzikální změny během tvorby imunokomplexu, zatímco nepřímé imunosenzory využívají signál generující značku, která poskytuje větší senzitivitu a všestrannější detekční režimy, je-li zahrnuta do komplexu. Nejčastěji používanými značkami jsou enzymy, jako např. peroxidasa, glukosaoxidas, alkalická fosfatasa, katalasa nebo luciferasa, dále elektroaktivní složky jako ferrocen nebo  $\text{In}^{2-}$  sůl, a řada fluorescenčních značek (např. rhodamin, fluorescein, ruthenium diimin komplexy atp.) [11].

Existují čtyři typy detekčních zařízení pro imunosenzory: elektrochemický (potenciometrický, amperometrický, konduktometrický), optický, mikrogravimetrický a termometrický. Poslední zmíněný detektor je opomíjen z důvodu nedostatku v použití [11].



**Obr.č.4** Schéma imunosenzoru (převzato z LUPPA P.B., SOKOLL L.J., CHAN D.W., *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*) [11]

Immunochemické afinitní biosenzory používají jako biorekogniční element protilátky – bílkoviny schopné specificky rozpoznávat jiné molekuly. Pro bioanalytické účely slouží nejčastěji protilátky typu imunoglobulinu G (IgG) [1]. Představují ideální biorekogniční element díky vlastnostem, jako specifita a vysoká afinita k rozpoznávanému antigenu [10].

Klasický ELISA formát imunochemických stanovení je zejména v klinických laboratořích běžnou analytickou technikou. Vývoj nejrůznějších typů imunosenzorů má především za cíl zjednodušit práce spojené s imunochemickou analýzou (např. ELISA vyžaduje přesné dávkování vzorků a reagens, inkubace separační a promývací kroky), dospět k přenosným systémům a zrychlit průběh stanovení. U vlastních imunosenzorů pak citlivý povrch funguje nejen jako nosič imobilizovaného vazebného partnera, ale přímo slouží pro generování a měření signálu [1].

## 2.7 Dělení imunosenzorů podle detekčního zařízení

### Elektrochemické imunosenzory

Tento typ spojuje jednoduché, levné a velmi citlivé elektrochemické převodníky s vysokou specifitou protilátek. Jako pracovní povrch slouží přímo pracovní elektroda, ale je možné použít také výměnné membrány s imobilizovanou protilátkou, nebo pracovat s předřazeným imunoreaktorem. Jako značka slouží především enzymy [19], jejichž aktivitu lze měřit elektrochemicky, méně častou alternativou jsou různé redoxaktivní látky nebo cheláty kovů, které se po uvolnění z komplexu stanou voltametry [1].

Potenciometrický imunosenzor se řídí Nernstovou rovnicí, kde změny potenciálu jsou logaritmičtě úměrné specifické aktivitě iontů. Potenciometrické převodníky, schopné měřit potenciálové změny při téměř nulovém proudu, jsou konstruovány pro další techniky: transmembránový potenciál, elektrodový potenciál, FET (field-effect transistor) a ISFET (ion-selective field effect transistor) [11].

Amperometrický imunosenzor měří proud generovaný elektrochemickou reakcí za konstantního napětí [20]. Často je však nutné použít jako značku enzymy (HRP, glukosaoxidasa, atp.). Zajímavým využitím je stanovení lidského choriového gonadotropinu (hCG) amperometrickým imunosenzorem. Použitím polyanionického perfluorosulfonovaného ionometru k imobilizování anti-hCG monoklonálních protilátek na uhlíkovou elektrodu [11].

Elektrochemické imunosenzory jsou obvykle vyráběny imobilizací imunoreagencie na povrchu elektrodového převodníku. Konvenční imobilizační metody zahrnují fyzikální adsorpci, kovalentní vazbu a polymerové zachycení [19].

### Piezelektrické imunosenzory

V některých anizotropních krystalech (např. křemen, turmalín, apod.) se při mechanickém namáhání generují orientované dipóly a vzniká elektrické napětí. Naopak pokud se na krystal přivede střídavé elektrické napětí o vhodné rezonanční frekvenci, začne krystal se stejnou frekvencí vibrovat. Při tom téměř všechna energie zůstává uchována v oscilujícím systému a nerozptyluje se do okolí [21].

Senzor se získá imobilizací ligandu na povrch elektrod krystalu a umístěním krystalu v průtočné cele. Krystal má určitou rezonanční frekvenci určenou fyzikálními vlastnostmi křemene a také tloušťkou destičky. Při navázání látky na aktivní povrch elektrod dojde ke změně rezonanční frekvence – změní se hmotnost celého systému, vibrace se zpomalí a frekvence klesne. Ovšem pokud krystal osciluje v kapalině, dochází také ke změnám frekvence tlumením oscilací viskozitou prostředí [21].

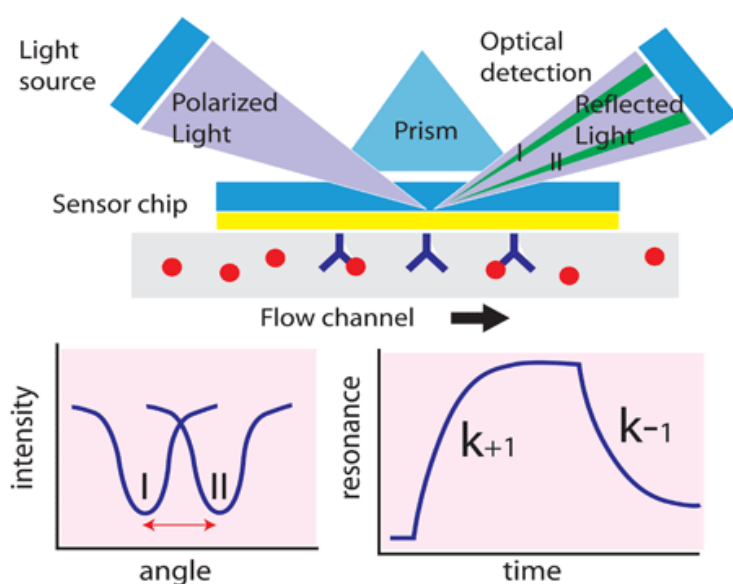
### Optické imunosenzory

Nejčastější principy konstrukce těchto zařízení jsou následující: **Odrazové techniky** jako *reflektometrie* či *elipsometrie*. Kvantitativní informaci o vazbě antigenu na povrchově vázanou protilátku obdržíme při reflektometrii pomocí reflektometru [21]. Elipsometrie vyhodnocuje u odraženého polarizovaného světla změny v amplitudě a fázi světla [11].

U **povrchové plazmové rezonance (SPR)** odražený paprsek od vrstvy kovu generuje nestálou exponenciální vlnu (tlumená či zhášivá vlna), která interaguje s elektronovou plazmou kovové vrstvy. Výsledkem jsou oscilace elektronů a vznik povrchové plazmové vlny. Úhel, pod kterým SPR vzniká, je závislý na tloušťce povrchové kovové vrstvy a refrakčním indexu média, které se dotýká kovu z opačné strany, než

přichází paprsek. Navážeme-li z této strany na kovovou vrstvu protilátky, je možné měřením změny úhlu, ve kterém dochází k SPR, zjišťovat interakci protilátek s antigenem [21]. SPR je popsána jako změna hustoty oscilace na rozhraní mezi dvěma médii s opačně nabitými dielektrickými konstantami [20].

Ve srovnání s jinými technikami, má SPR biosenzor několik výhod, jako monitoring v reálném čase, detekce bez potřeby značek či minimální spotřeba reagens [17].



Obr. č.8 SPR – schéma

U další techniky se světlo dopadající na hranol při určitém úhlu váže přes spojovací vrstvu skla do světlovodu – dielektrické rezonanční vrstvy ( $\text{TiO}_2$ , šířka 100 nm) – šíří se podél jeho povrchu a odráží se zpět. Tato konstrukční struktura se nazývá **rezonanční zrcátko**. V tomto optickém systému nedochází ke ztrátám energie světla, avšak rezonance vnáší fázový posun světelného paprsku. Používá se polarizované světlo, a protože rezonance existuje pro elektrickou i magnetickou složku současně, slouží jejich měření jako reference pro určení fázového posunu. Při měření se pak sleduje změna rezonančního úhlu v čase. Oproti SPR se dosahuje lepší citlivosti. Pracuje se v míchaném uspořádání v komůrce objemu 250  $\mu\text{l}$  [21].

**Totální vnitřní reflexní spektroskopie (IRS)** je shodná s výše popsanou SPR. Avšak protože druhým materiálem zde není kov, nedochází k excitaci elektronů, ale energie se soustředí do vlny, která postupuje paralelně s povrchem opticky hustšího prostředí [21].

Nejčastěji se uplatňují optická vlákna nebo planární světlovody. **FCFD** (fluorescence capillary fill device) využívá k detekci fluorescentní značku (fluorofor), která emituje světlo do planárního světlovodu, nesoucího imobilizovaný bioligand [1]. Využívá nestálé pole na povrchu světlovodu. Protilátky jsou imobilizovány na vnější stěně vlákna. Optické parametry světla jsou závislé na tom, zda je fluoroforem značený antigen volný v roztoku, či zda je vázán na protilátku [21]. Po výstupu světla z konce světlovodu pak lze podle výstupního úhlu odlišit fluorescenci z volného roztoku a z povrchové oblasti, tím lze kvantitativně určit podíl vázaného fluoroforu bez potřeby separačního kroku – homogenní stanovení [1].

Jako zdroj světla slouží výbojka fotoblesku, omezení výstupních úhlů se provede pomocí štěrbin, další součásti jsou filtry, čočky a detektor. Zařízení je jednoduché, levné, snadná masová výroba, na jedno použití [1].

## 2.8 Členění imunosenzorů na přímé a nepřímé

### Přímé imunosenzory

Tento typ zařízení umožňuje bezprostředně monitorovat změnu koncentrace analytu v médiu. Děje se tak měřením změn optických či elektrických vlastností ve vrstvě ze speciálního materiálu, na níž jsou imobilizovány protilátky, po interakci protilátky s antigenem. Tyto změny jsou způsobeny odlišnou konformací, hmotností nebo odlišným elektrickým nábojem molekul imunoglobulinů po navázání analytu. Výhody takových senzorů zahrnují rychlý detekční čas, žádné separační kroky a minimální množství spotřebovaných reagentů. Ačkoliv jsou principiálně jednoduché, je obtížné dobrý a spolehlivý přímý imunosenzor získat. Vyskytují se zde problémy s imobilizací protilátky, s dostatečným přístupem analytu k zakotvené protilátce, s minimalizováním nespecifických interakcí, s opakovanou reaktivitou rozpoznávací imunovrstvy.

Zvláštní nároky jsou kladeny na podložku, a to v závislosti na použitém principu monitorování imunochemické interakce. Tak např. při aplikaci diferenční pulzní volumetrie se používá vícevrstvý potah elektrody polymerem [21].

#### Nepřímé imunosenzory

Jsou představovány především zařízeními s potenciometrickými či amperometrickými elektrodami, které v kvantifikační koncepcí enzymové imunoanalýzy umožňují na základě elektrochemického stanovení produktu enzymové reakce kvantifikovat antigen. Měření je tedy až výsledek sekundární interakce, nikoliv primární imunoreakce. Tomuto měření předchází řada inkubačních a promývacích kroků jak jsou běžné např. při ELISA metodách v mikrotitračních destičkách. Amperometricky může být měřen např. peroxid vodíku, kyslík, fenol, jako produkty enzymové reakce katalyzované peroxidasou, glukosaoxidasou, katalasou, alkalickou fosfatasou. Potenciometricky např. amoniak vznikající při reakcích katalyzovaných ureasou [21].

### 3 Imunosenzory s magnetickými částicemi

Imunosenzory si získaly značnou pozornost díky rychlé senzitivní imunologické odezvě na poli klinické diagnostiky a použitím v environmentálních analýzách. Během přípravy takového imunosenzoru je základem úspěšná imobilizace biomolekuly. V posledních letech roste zájem o rozvoj imunosenzoru založeného na funkční membráně složené z nanočástic. Díky atraktivním vlastnostem, jako dobrá biokompatibilita, nízká toxicita, silný paramagnetismus a jednoduchá příprava, jsou nanočástice používány k sestavení vysoce citlivých imunoanalytických biosenzorů [17,22].

Užití magnetických částic pro separaci DNA, proteinů apod., bylo v posledních letech podrobněji popsáno a vedlo k mnoha různým aplikacím [23]. Značení analytů magnetickými částicemi a jejich použití v kombinaci s odděleními měřitelnými molekulami bylo popsáno Wangem (2005). Zde byla magnetická částice využita jako vazebný základ a spojovací článek mezi analytem a značkou [24].

Magnetické nanočástice hrají hlavní roli v imunomagnetických analýzách. Superparamagnetické částice jsou široce užívané pro zachycení biomolekul a buněk v diagnostice a jiných výzkumných aplikacích (buněčná separace, purifikace nukleových kyselin nebo vychytávání bakterií) [25]. Jsou malé, převážně kulovitého tvaru a obsahují oxidy železa (magnetit), které zajišťují paramagnetickou nebo superparamagnetickou přitažlivost nanočástic k magnetu [15]. V oblasti biosenzorů mohou sloužit jako nosič pro řadu protilátkových značek či jako linker na elektrodě [16].

Užití neporézních magnetických částic zlepšuje průběh imunologické reakce [17] jak velkým povrchem, kam je možno imobilizovat řadu ligandů, snadnou separací z kapalně fáze a dobrou manipulací za pomoci magnetického pole (použitím permanentního magnetu nebo elektromagnetu) [17], tak i rychlejší kinetikou reakce. Analýzy provedené s využitím magnetických částic mohou být provedeny bez předchozích obohacujících kroků či jiných úprav, které jsou jinak nezbytné pro standardní metody. Analýzy, které využívají magnetické částice, jsou rychlé, senzitivní, jednoduché a nejsou příliš drahé [26].

Magneticky řízená molekulární elektronika a bioelektronika se zabývá efektem externího magnetického pole na elektrochemický signál magnetických částic asociovaných s elektrodou. Přitažlivost magnetických nanočástic k elektrodovému povrchu externím magnetem aktivuje elektrický kontakt mezi imobilizovanými proteiny a výchozí elektrodou. Umístění magnetu mimo původní místo stahuje magnetické nanočástice z povrchu elektrody a elektrochemická aktivita funkčních magnetických klesá [27].

Zdokonalení představuje imunosenzor tvořený magnetickými nanočásticemi ve spojení se zlatými. Magnetické částice zajišťují jednoduchou separaci a lokalizaci cílového proteinu za použití externího magnetu, rychlou imunoreakci mezi antigenem a protilátkou, a nízkou nespecifickou vazbu při povrchové modifikaci. Zlaté částice usnadňují citlivou detekci díky unikátním optickým a katalytickým vlastnostem a snadnou konjugací biomolekul. Navíc oba druhy částic mohou být připraveny v širokém rozmezí velikostí (např. od 1 nm do 100 nm pro zlaté částice) [28]. Konkrétní aplikace jsou uvedeny níže v kapitole 3.2 .

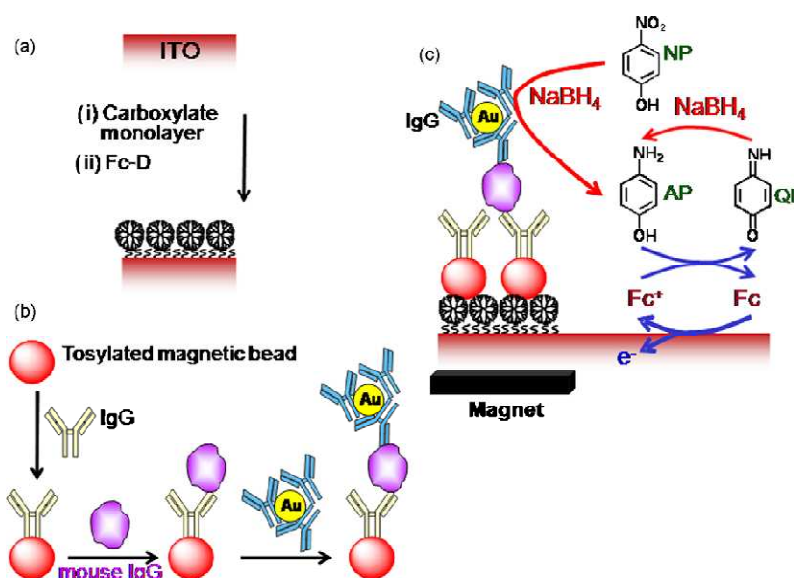
### **3.1 Příprava senzorů s magnetickými částicemi**

Vůbec prvním krokem při konstrukci těchto imunosenzorů je příprava nanočástic, imobilizace protilátek a teprve nakonec výroba vlastního biosenzoru [16].

Např. užitím amino-skupiny na povrchu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetických částic, je protilátka kovalentně imobilizována na magnetické částice [18] a poté jsou modifikované magnetické částice zachyceny magnetickým polem na magnetosenzor. Dále následuje elektrochemická detekce [26].

Při stanovení IgG pomocí protilátek anti-IgG značených křenovou peroxidasou na povrchu magnetické nanočástice bylo obnovení IgG imunosenzoru jednoduše dosaženo odebráním magnetu a odstraněním veškerých magnetických částic z povrchu elektrody [18].

Další možností je případ spojení magnetických a zlatých nanočástic. Modifikace povrchu magnetických částic (MB) je zajištěna použitím tosylových skupin. Králičí IgG proti myším protilátkám jsou kovalentně vázány na tosylované magnetické částice. Po promytí a odstranění pomocí magnetického separátoru, jsou tyto částice inkubovány s cílovými myšími protilátkami. Ty jsou vychytávány IgG-MB konjugátem a magneticky separovány. Dále je vytvořen konjugát anti-myší-IgG-AuN přímou adsorpcí IgG na zlatou částici (AuN). Nakonec jsou obě reagentie inkubovány a výsledný imunokomplex je opět separován pomocí magnetu. Konjugát IgG-MB zde poskytuje snížení nespecifické vazby konjugátu IgG-AuN a jednoduché vychytání myších IgG, a zlaté konjugáty IgG-AuN poskytnou zesílení signálu díky katalytické redukci nitrofenolu. Produkt je měřen cyklickou voltametrií a diferenční pulzní voltametrií [28].

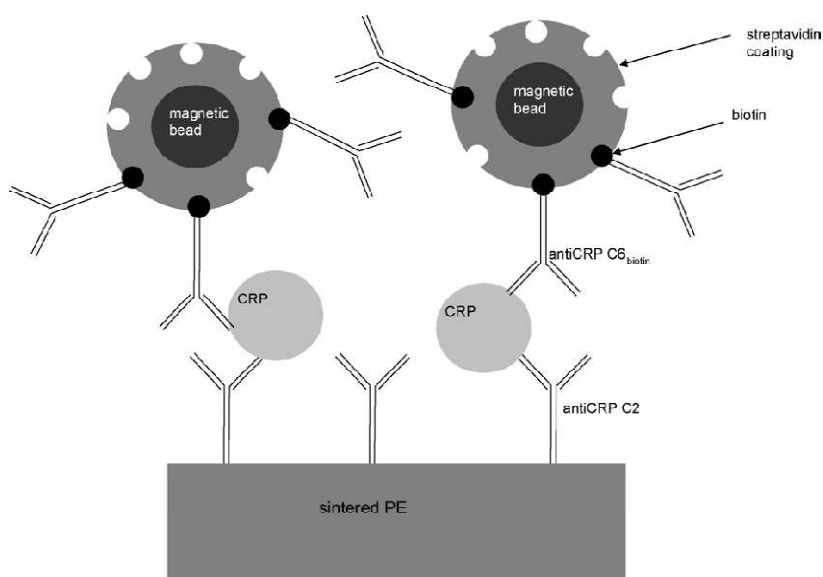


**Obr.č.10** Spojení magnetických a zlatých nanočástic ke stanovení IgG ve vzorku [28]

Varianta použití třívrstevných magnetických nanočástic se také ukázala jako vhodná pro přípravu elektrochemického imunosenzoru. Tyto nanočástice jsou složeny z  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  jádra, mezivrstvy tvořené pruskou modří, zlatého povrchu a enzymaticky značené křenuvou peroxidasou a glukosaoxidase. Využití se předpokládá pro ultrasenzitivní a

reprodukovatelnou elektrochemickou imunoanalýzu karcinoembryonálního antigenu (CEA), použitím protilátky anti-CEA, a  $\alpha$ -fetoproteinu (AFP), za použití protilátky anti-AFP [29].

Meyer a kol. (2007) popsali magnetický biosenzor za použití komplexu streptavidin-biotin. Protilátka konjugovaná s biotinem byla snadno navázána na magnetickou částici konjugovanou se streptavidínem. U biosenzoru pro detekci CRP bylo použito dvou protilátek. Protilátka anti-CRP C2 byla nejprve imobilizována adsorpcí na polyetylenovou fritu. Protilátka anti-CRP C6 zajišťovala vazbu magnetických částic s antigenem [24].



**Obr.č.11** Schéma komplexu streptavidin-biotin na magnetických částicích pro stanovení CRP za použití dvou protilátek [24].

Často se jako elektroda vyskytuje také uhlíková pasta, která se připravuje vmačkáním homogenní pasty připravené z grafitového prášku a kapalného pojiva [19]. Takto zhotovená pasta se naplní do elektrodové trubice, kam je mezitím umístěn magnet [30].

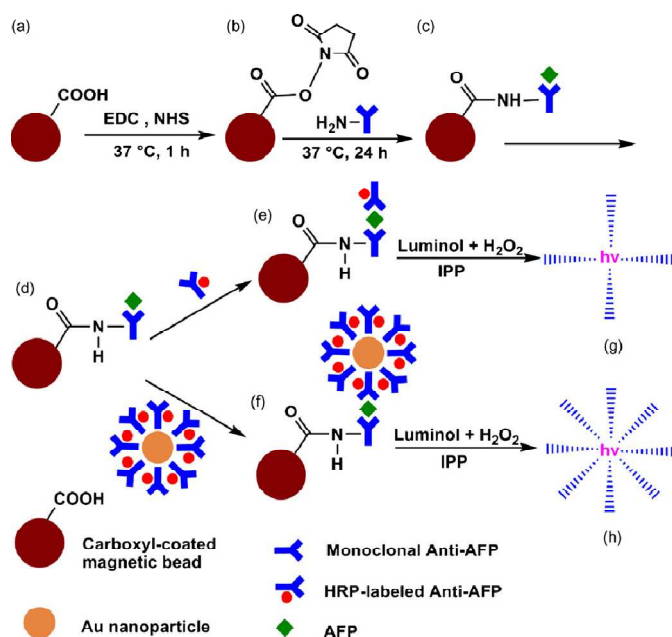
### 3.2 Využití imunosenzorů s magnetickými částicemi

Stále se zvyšující zájem o využití magnetických částic ve spojení s vysoce citlivou elektrochemickou detekcí potvrzuje řada publikovaných vědeckých prací. Magnetické částice oplývají řadou výhod, jako je snadná manipulace a separace od vlastního vzorku, vysoká aktivita navázaných enzymů či protilátek, možnost miniaturizace a v neposlední řadě možnost opakovaného použití. Navíc citlivá elektrochemická detekce umožňuje stanovení nízkých koncentrací sledovaného analytu, což je důležité v analýze biologických vzorků (krev, moč, mozkomíšní mok), stejně jako farmaceutických či potravinářských vzorcích.

Je možné také stanovení reziduí takových antibiotik v mléce, která mají nízkou molekulární hmotnost, obsahují pouze jednu antigenní determinantu (např. sulfonamidy), použitím elektrochemické magneto-immunoanalýzy. Zde byly použity anti-sulfonamidové protilátky na tosyl-modifikované magnetické částice. Tyto částice poskytují jednoduchou cestu pro odstranění nespecifické adsorpce. Navíc mají dobré vlastnosti týkající se senzitivity a selektivity analýzy [26].

$\text{CoFe}_2\text{O}_4$  je dobře známý tvrdý magnetický materiál s velmi vysokou magneticko-kryystalovou anizotropií a byl použit k analýze karcinoembryonálního antigenu (CEA). Na připravené částice z tohoto materiálu, po jejich pročištění, byla navázána protilátka anti-CEA značená křenovou peroxidasou (HRP-anti-CEA). Produkt byl měřen diferenciální pulzní voltametrií [27].

Protože senzory ve spojení s magnetickými částicemi poskytují nižší detekční limity, bylo stanovení  $\alpha$ -fetoproteinu (AFP) Yangem a kol (2009) srovnáváno s ELISA metodou. Při použití 4-(4'-iodo)fenylfenolu, dvojité kodifikovaných zlatých nanočástic a detekce chemiluminiscencí bylo dosaženo velmi nízkého detekčního limitu (5 pg/mL), mnohem nižšího než klasická ELISA metoda [31].



**Obr. č.12** Stanovení AFP [31].

Imunosenzory spojené s magnetickými částicemi mohou být využity při stanovení polychlorovaných bifenylnů ve vzorcích mléka. Po imunochemické reakci, kdy jsou modifikované magnetické částice, spojené s proteinem G, na který se pevně váží protilátky jako ovčí polyklonální sIgG-antiPCB28 a králičí polyklonální rIgG-anti PCB77, zachyceny magnetem na povrch pracovní uhlíkové elektrody. Elektrochemická detekce je dosažena přidáním substrátu pro alkalickou fosfatasa (naftylfosfátu) [32].

Varshney a Li (2007) představili biosenzor spojený s magnetickými částicemi pro detekci *Escherichia coli* O157:H7 ve vzorcích potravin. V tomto případě byla použita kozí purifikovaná polyklonální protilátka proti *E.coli* (specifická pro O a K antigen), konjugovaná s biotinem, imobilizována na magnetické částice potažené streptavidinem. Při měření impedance v roztoku manitolu bylo dosaženo nejnižšího detekčního limitu tohoto senzoru v čisté kultuře a sekaném hovějším mase  $7,4 \cdot 10^4$  a  $8,0 \cdot 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>[33].

Stanovení C-reaktivního proteinu (CRP) pomocí biosenzoru, navrženého Meyerem M.H.F. et al. (2007), je založeno na principu dvou odlišných anti-CRP protilátek (monoklonálních IgG) pro CRP vycytání a značení. Tato metoda byla popsána a testována pro lidské krevní sérum, sliny a moč [24].

V posledních letech se pozornost také ubírala směrem ke stanovení 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT) a jiných výbušnin. Pittman et al. (2009) sestavili zařízení, kde biotinylované anti-TNT protilátky byly spojeny se streptavidinem potaženými magnetickými částicemi a polystyrenovými částicemi s ECL značkou ( $\text{Ru}^{\text{II}}$ ). Takto vytvořený agregát byl magneticky separován z vodného reakčního média a rozpuštěna v roztoku acetonitrilu. Následně byl vzorek proměřen elektrochemiluminiscencí [34].

Piezoelektrická detekce aflatoxinu  $\text{B}_1$  za použití krystalu křemene byla, ve studii Wanga a Gana (2009), založena na změně frekvence před a po imunoreakci mezi aflatoxinem  $\text{B}_1$  a jeho protilátkou. Tato analýza s průtokovým zařízením byla jednoduchá, senzitivní, snadno regenerovatelná, nízkonákladová a rychlá pro stanovení aflatoxinu  $\text{B}_1$  [35].

Křemenného krystalu bylo použito také při detekci CEA imobilizací anti-CEA protilátek na magnetickou částici  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ . Za optimálních podmínek, je změna frekvence úměrná CEA koncentraci [36].

V oblasti biosenzorů jsou využívány zlaté nanočástice. Na toto téma byla publikována řada prací. Jsou ideální v biotechnologických systémech díky jednoduché přípravě, dobré biokompatibilitě atp. Toho bylo značně využíváno ke značení různých biologických receptorů jako protein A, imunoglobulin G a glukosaoxidas. [15]. Ve spojení s povrchovou plazmovou rezonancí byly použity v časně diagnostice orálního nádoru [37]. Zlaté částice byly také použity v kombinaci s laserovou energií k zabíjení nádorových buněk u zvířecích modelů. Podobného principu bylo využito v práci V.P.Zharova et al. (2006), který popsal fyzikální poškození bakteriální buňky ( $\text{G}^+$  *Staphylococcus aureus*) v kombinaci pulsní laserové energie se světlo absorbujícími zlatými nanočásticemi, konjugované se specifickou protilátkou (anti-protein A). Po ozáření částice absorbují energii, která je rychle převedena na teplo, a tak mohou způsobovat nenapravitelné poškození bakteriální buňky [38].

## 4 Závěr

Biosenzory jsou analytická zařízení zahrnující citlivé biologické prvky, které jsou součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem.

Nejvíce se biosenzory uplatňují v klinické, kde převážnou část představují *in vitro* stanovení prováděná v klinických laboratořích (např. stanovení glukózy u diabetiků). Tato zařízení jsou oblíbená díky rychlosti, specifitě a potřebě malého množství vzorku. Problémem jsou však vysoké náklady na jejich pořízení. Výjimku tvoří pouze osobní glukometry pro diabetiky, těhotenské testy či alkoholtestery.

Další oblastí využití je potravinářský průmysl, který se zabývá stanovováním bakterií, virů, patogenů či látek v potravinách obsažených a také kontrolou čerstvosti potravin.

V neposlední řadě jsou senzory využívány v ochraně životního prostředí, např. příslédování znečištění zdrojů pitné vody, či ve vojenské oblasti. Zde se stanovují chemické bojovné otravné látky (sarin, soman), biologické zbraně i výbušniny.

V posledních letech se pozornost zaměřuje na bioafinitní senzory spojené s protilátkami (případně antigeny) a magnetickými částicemi. Jsou rychlé, snadno dostupné, senzitivní, vysoce specifické, snadno separovatelné a stanovitelné. Díky jejich vlastnostem mohou být senzory založené na použití magnetických částic ve spojení s protilátkami použity pro detekci analytů ve velmi nízkých koncentracích.

Budoucí rozvoj biosenzorů předpokládá rozvoj takových zařízení, která budou cenově dostupná široké veřejnosti, jednoduše ovladatelná, přenosná a rutinně použitelná. Výhodou by mělo být stanovení přímo u lůžka pacienta, stanovení *in vivo*, které by mohlo zkrátit dobu do získání výsledků.

## 5 Seznam použité literatury

- [1] SKLÁDAL, P., *Biosenzory*, Brno 2002
- [2] VO-DINH T., CULLUM B., *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*, Fresenius J Anal.Chem., 366,(2009), 540-551
- [3] [www.jaist.ac.jp/~yokoyama/images/biosensor.gif](http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/images/biosensor.gif) (ze dne 20.7.2009)
- [4] WNEK G.E., BOWLIN G.L., *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* – Schultz J.S., *Biosensors*, Marcel Dekker, New York, 2004, ISBN 0-8247-5498-0
- [5] TURNER P.F.A., *Biosensors – Sense and Sensitivity*, Science, Vol 290,(2000), 1315-1317
- [6] [compex.zdravi-cz.eu/glukometry-glukomery.php](http://compex.zdravi-cz.eu/glukometry-glukomery.php) (ze dne 20.7.2009)
- [7] [medgadget.com/archives/space medicine/](http://medgadget.com/archives/space%20medicine/) (ze dne 21. 7. 2009)
- [8] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html> (ze dne 15.3.2009)
- [9] JINAG X., LI D., XU X., YING Y., LI Y., YE Z., WANG J., *Immunosensors for detection of pesticide residues*, Biosens.Bioelectr., 23, (2008), 1577-1587
- [10] CONROY P.J., HEARTY S., LEONARD P., O'KENNEDY R.J., *Antibody production, design and use form biosensor-based applications*, 20, (2009), 10-26
- [11] LUPPA P.B., SOKOLL L.J., CHAN D.W., *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*, Clinica Chimica Acta, 314, (2001), 1-26
- [12] PRODROMIDIS M.I., *Impedimetric immunosensors –A review*, Electrochim.Acta (2009)
- [13] KLOUDA P., *Moderní analytické metody*, nakl.Klouda, Ostrava 2003, ISBN 80-86369-07-2
- [14] DORF R.C., *Sensors, nanoscience, biomedical engineering and instruments*, Boca Raton: CRC Press, 2006, ISBN 0-8493-7346-8
- [15] TANG D., YUAN R., CHAI Y., *Ultrasensitive electrochemical immunosensor for clinical immunoassay using thionine-dopped magnetic gold nanospheres as labels and horseradish peroxidase as enhancer*, Anal.Chem., 80, (2008), 1582-1588
- [16] TANG D., YUAN R., CHAI Y., *Direct electrochemical immunoassay based on immobilization of protein-magnetic nanoparticle composites on to magnetic*

- electrode surfaces by sterically enhanced magnetic field force*, Biotechnology Letters, 28,(2006), 559-565
- [17] SUN Y., BAI Y., SONG D., LI X., WANG L., ZHANG H., *Design and performances of immunoassay based on SPR biosensor with magnetic microbeads*, Biosens. Bioelectron.23, (2007), 473-478
- [18] GAO H.L., LI J.-P., *Amperometric immunosensor based on magnetic inorganic bionanoparticles sensing films*, Chin J Anal Chem, 36(12), (2008), 1614-1618
- [19] LIU Z.-M., YANG H.-F., LI Y.-F., LIU Y.-L., SHEN G.-L., YU R.-Q., *Core-shell magnetic nanoparticles applied for immobilization of antibody on carbon paste electrode and amperometric immunosensing*, Sensors and Actuators B, 113, (2006), 956-962
- [20] LEONARG P., HEARTY S. et al., *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water*, Enzyme and Microbial Technology, 32, (2003), 3-13
- [21] Prof.Ing. L.FUKAL, CSc.; Ing.B.HOLUBOVÁ, PhD.: *Imunochemie a immunoanalýza*, Praha, 2007, str 97-105, ISBN 978-80-239-8903-8
- [22] YUN Z., HUA W., BANI Y. et al., *A reusable piezoelectric immunosensor using antibody-adsorbed magnetic nanocomposite*, Journal of Immunological Methods, 332, (2008), 103-111
- [23] OLSVIK O., POPOVIC T., SKJERVE E. et al., *Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology*, Clin.Microbiol.Rev.1 (7),(1994), 43-54
- [24] Meyer M.H.F., Hartmann M., Krause H.-J., et al., *CRP determination based on a novel magnetic biosensor*, Biosens.Bioelectron.,22, (2007), 973-979
- [25] MUJIKA M., ARANA S., CASTANO E., et al., *Magnetoresistive immunosensor for the detection of Escherichia coli O157:H7 including a microfluidic network*, 24, (2009), 1253- 1258
- [26] ZACCO E., ADRIAN J., GALVE R., MARCO M.-P., ALERGRET S., PIVIDORI M.I., *Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk*, Biosens.Bioelectron 22, (2007), 2184-2191
- [27] FU X.-H., *Magnetic-controlled non-competitive enzyme-linked voltammetric immunoassay for carcinoembryonic antigen*, Biochemical Engineering Journal, 39, (2008), 267-275

- [28] SELVARAJU T., DAS J., HAN S.W., YANG H., *Ultrasensitive electrochemical immunosensing using magnetic beads and gold nanocatalysts*, *Biosens.Bioelectron.*23,( 2007), 932-938
- [29] ZHUO Y., YUAN P.-X., YUAN R., CHAI Y., HONG Ch., *Bienzyme functionalized free-layer composite magnetic nanoparticles for electrochemical immunosensors*, *Biomaterials*, (2009), 2284-2290
- [30] WANG L., GAN X., *Antibody-functionalized magnetic nanoparticles for electrochemical immunoassay of alfafetoprotein in human serum*, *Microchim.Acta*, 164, (2009), 231- 237
- [31] YANG X., GUO Y., BI S., ZHANG S.-S., *Ultrasensitive enhanced chemiluminiscence enzyme immunoassay for the determinativ of  $\alpha$ -fetoprotein amplified by double-codified gold nanoparticles labels*, *Biosens.Bioelectron* 24, (2009), 2707-2711
- [32] CENTI S., SILVA E., SASCHI S., PALCHETTI I., MASCINI M., *Polychlorinated biphenyls detection in milk samples by an electrochemical magneto-immunosensor (EMI) coupled to solid-phase extraction (SPE) and disposable low-density arrays*, *Analytica Chimica Acta* 594, (2007), 9-16
- [33] VARSHNEY M., LI Y., *Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of *E.coli* O157:H7 in food samples*, *Biosens.Bioelectron.*,22, (2007), 2408-2414
- [34] PITTMAN T.L, THOMSON B., MIAO W., *Ultrasensitive detection of TNT in soil, water, using enhanced electrogenerated chemiluminiscence*, *Anal.Chim.Acta*, 632, (2009), 197-202
- [35] WANG L., GAN X.-X., *Biomolecule-functionalized magnetic nanoparticles for flow-through quartz crystal microbalance immunoassay of aflatoxin B<sub>1</sub>*, *Bioprocess Biosyst.Eng.*, 32, (2009), 109-116
- [36] CHEN Z.-G., TANG D.-Y., *Antigen-antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors based on magnetic CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> composite nanoparticle-functionalized biomimetic interface*, *Bioprocess Biosyst.Eng*, 30, (2007), 243-249
- [37] KAH J.C.Y., KHO K.W., LEE C.G.L., SHEPPARD C.J.R., SHEN Z.X., OLIVO M.C., *Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles*, *International Journal of Nanomedicine*, 2 (4), (2007), 785-798

[38]ZHAROV V.P., MERCER K.E., GALITOVSKAYA E.N., SMELTZER M.S.,  
*Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of  
bacteria targeted with gold nanoparticles*, Biophysical Journal, 90, (2006), 619-627

## 6 Použité zkratky:

ATP	adenosintrifosfát
CEA	karcinoembryonální antigen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme linked immunoassay – enzymová imunoanalýza
FCFD	fluorescence capillary fill device - fluorescenční kapilární plnicí zařízení
FET	field-effect transistor - tranzistor řízený polem
HRP	horse radish peroxidase - křenová peroxidasa
ISE	ion selective electrode - iontově selektivní elektroda
ISFET	ion-selective field effect transistor - iontově selektivní tranzistor řízený polem