

# Předmět: Biosenzory a monitoring životního prostředí.

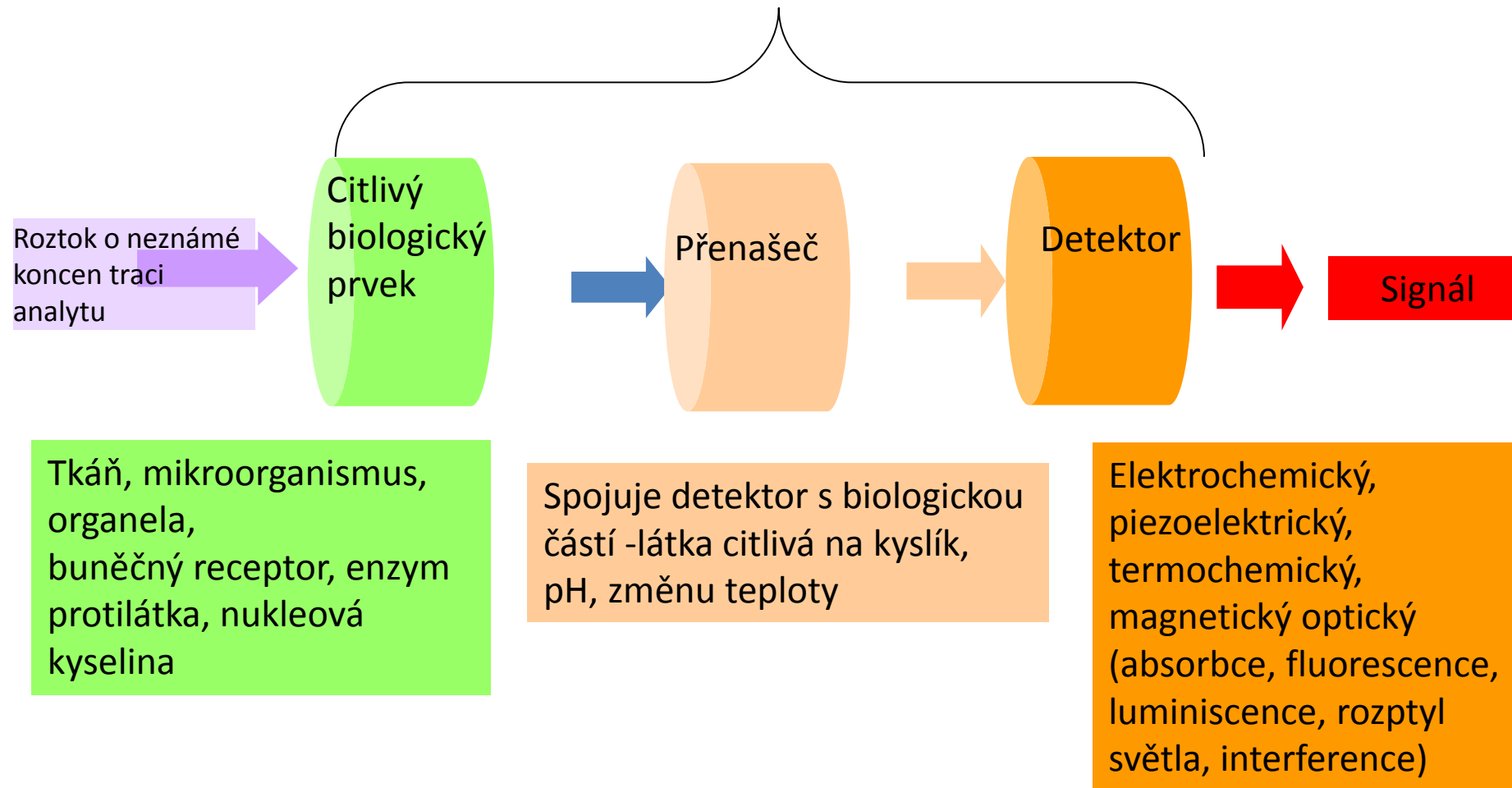
- ❑ **23.2.2017**- Konstrukce biosenzorů, způsoby detekce, imobilizace enzymů a živých buněk (G.K., Ústí)
- ❑ **2.3.2017** - Geneticky upravené mikroorganismy, jejich konstrukce a principy fungování (J.T.Ústí)
- ❑ .....Měření kyslíku elektrickou a optickou sondou
- ❑ .....Měření s enzymatickým senzorem (Praha)
- ❑ **23.3.2017** - Konzultace k návrhům prezentace + přednáška
- ❑ **30.3.2017** - Detekce kontaminace pomocí bioluminescenčních a fluorescenčních bioreportérů ( J.T.,Ústí)
- ❑ **6.4.2017** - Optická vlákna při konstrukci biosenzorů (G.K., Ústí)
- ❑ **13.4.2017** - Monitorování životního prostředí senzory a biosenzory .
- ❑ **20.4.2017** - Prezentace biosenzoru použitelného v diplomové práci (Ústí.J.T.+G.K.)

# • Předmět: Biosenzory a monitoring životního prostředí.

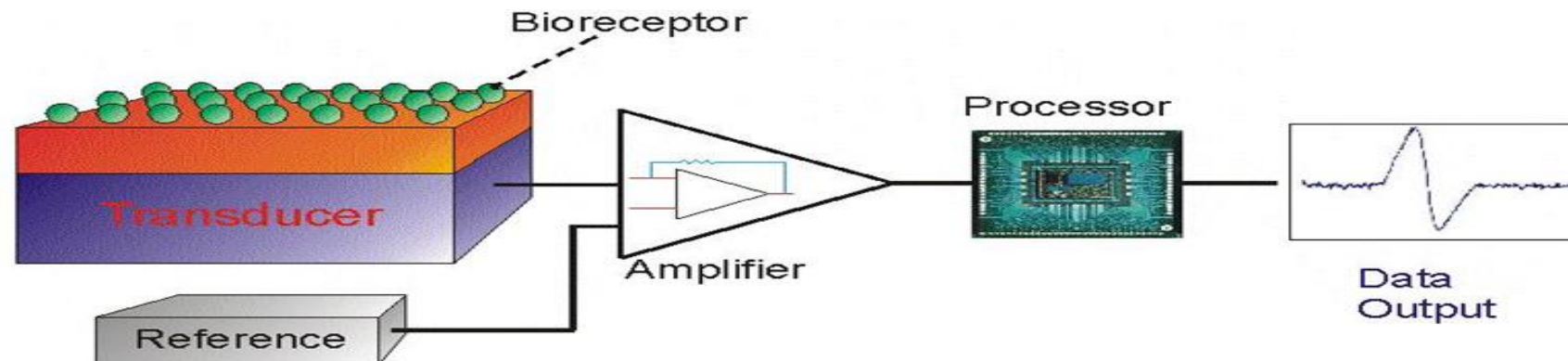
## **23.2.2017- Konstrukce biosenzorů, způsoby detekce, Imobilizace enzymů a živých buněk (G.K., Ústí)**

- Imunosensory
- Elektrické převodníky - rozdělení
- LAPS (light addressable potentiometric sensor)
- FRET (Försterův rezonanční přenos energie)
- Schéma vývoje detekce patogenu
- Imobilizace v přírodě
- Imobilizace živých buněk – rozdělení, zachycení v gelu, mechanismy gelace,
- Imobilizace do alginátu
- Imobilizace do křemičité matrice
- Imobilizace enzymů
- Techniky využívané při přípravě biosenzorů v laboratořích –glutaraldehyd, avidin-biotin, samoskladná vrstva na povrchu zlata, využití magnetických částic
- Biomineralizace, silaffin, auto-enkapsulace.

Biosenzor je zařízení pro detekci analytu, které kombinuje biologickou část s fyzikálně chemickým detektorem.



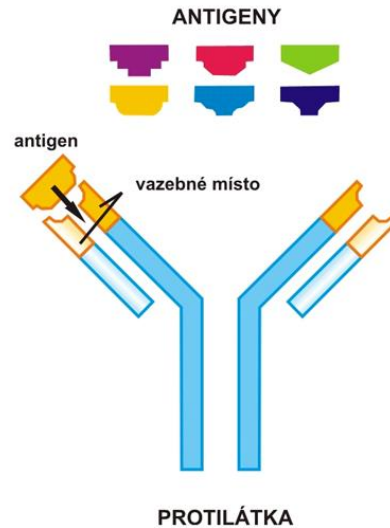
Biosenzor je zařízení pro detekci analytu, které kombinuje biologickou část s fyzikálně chemickým detektorem.



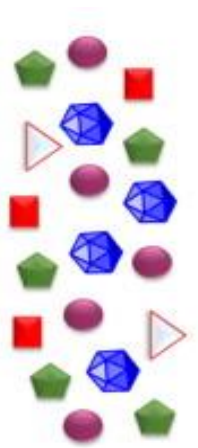
<http://lib.znate.ru/docs/index-150828.html>

# Imunosensory

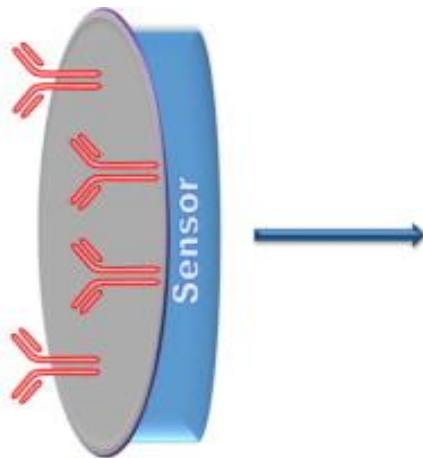
**Protilátka** je látka bílkovinné povahy která se specificky nekovalentní vazbou váže na antigen



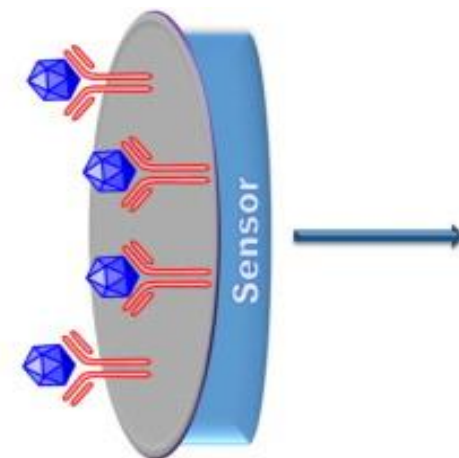
Biomolekuly které vytvářejí bioafinitní komplex s analytem - biorekogniční vrstva



Směs obsahující analyt



Antigen-antibody interakce



Převodník

Amperometrický  
Potenciometrický  
Konduktometrický  
Impedimetrický

Plasmonový  
Fluorescenční  
Absopční  
Evanescentní

Vibrační

# Elektrochemické převodníky

## • AMPEROMETRICKÉ

- Měřicí systém se skládá ze dvou elektrod, **měřicí** a referenční.
- Na **měřicí elektrodu** (Pt, Au, C) je imobilizována biorekogniční vrstva.
- Mezi elektrodou a redoxním párem molekul dochází k heterogennímu přenosu elektronů. Signál je proud úměrný koncentraci analytu.

## • POTENCIOMETRICKÉ

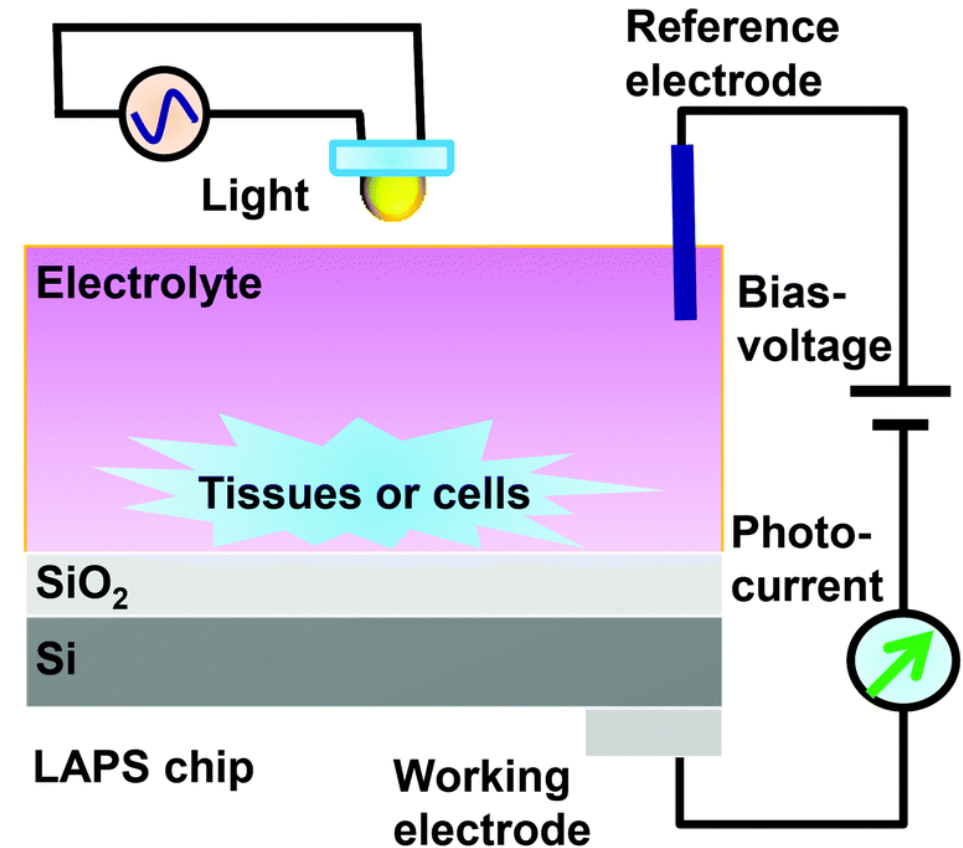
- Měří se změna potenciálu na rozhraní elektrody a roztoku. V systému neteče proud. Ionově selektivní elektroda (např. pH elektroda) v kombinaci s biologickou vrstvou na membráně (sklo, polymer)

## • KONDUKTOMETRICKÉ

- Změny vodivosti při biochemických reakcích
- produkce a spotřeba iontů (účinek hydrolas a amidas)
- Je třeba odlišit změnu vodivosti vyvolanou přidavkem vzorku,

# LAPS biosensory (light addressable potentiometric sensor)

- polovodičový převodník
- Základem je křemíkový čip potažený vrstvami  $\text{SiO}_2$  a  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .
- V neosvětleném stavu je sensor neaktivní.
- Pokud se z druhé strany osvětlí (infračervená LED, při 940 nm pronikne světlo do křemíku 50 nm hluboko), dojde k lokální aktivaci a získá se signál odpovídající změnám pH v aktivované zóně.
- Výhodou je jednoduchá možnost vícekanálového měření

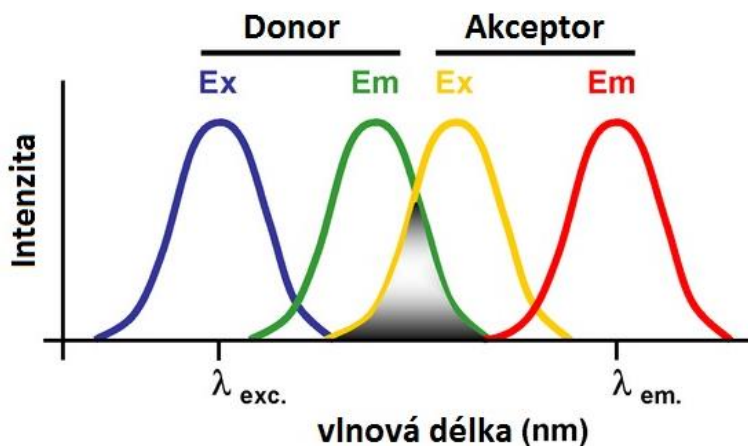


# FRET

**Försterův rezonanční přenos energie (FRET)** (Fluorescenční rezonanční přenos energie) je mechanismus nezářivého přenosu energie mezi dvěma molekulami prostřednictvím dipól-dipólové interakce. Energie se přenáší z molekuly donoru na akceptor .

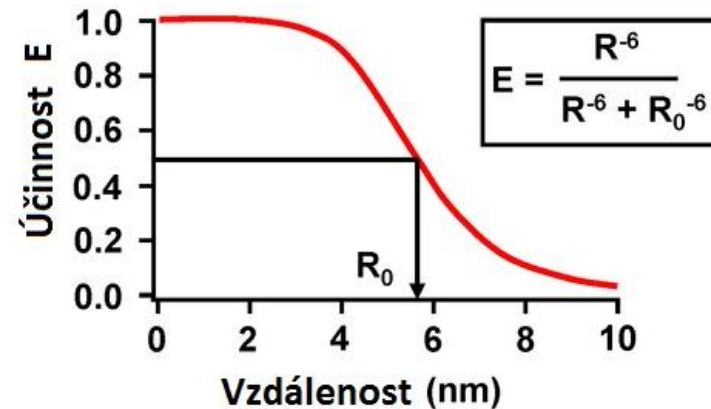
Účinnost je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi donorem a akceptorem, k jevu tedy prakticky dochází jen tehdy, jsou-li obě molekuly v těsné blízkosti. Z intenzity FRET (kterou lze určit různými metodami analýzy fluorescence vzorku) lze proto získat informaci o míře interakce mezi donorem a akceptorem.

## Překryv spekter

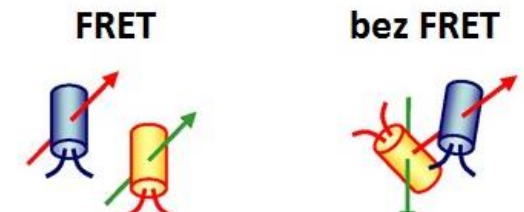


## Tři podmínky pro FRET

### Vzdálenost molekul



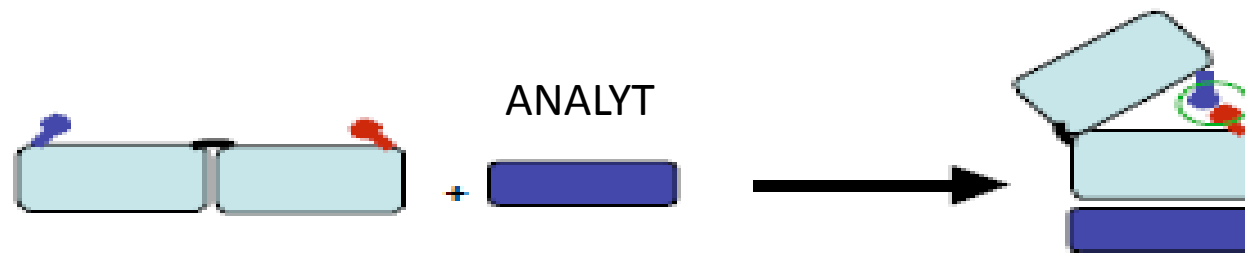
### Orientace





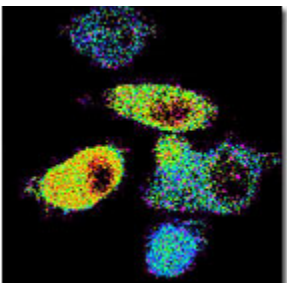
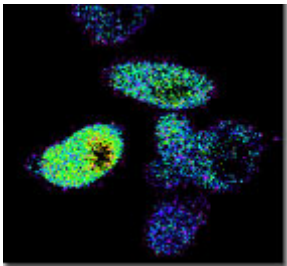
# FRET

Citlivý biologický prvek=  
makromolekula, která má  
oddělené části které slouží  
jako donor a akceptor

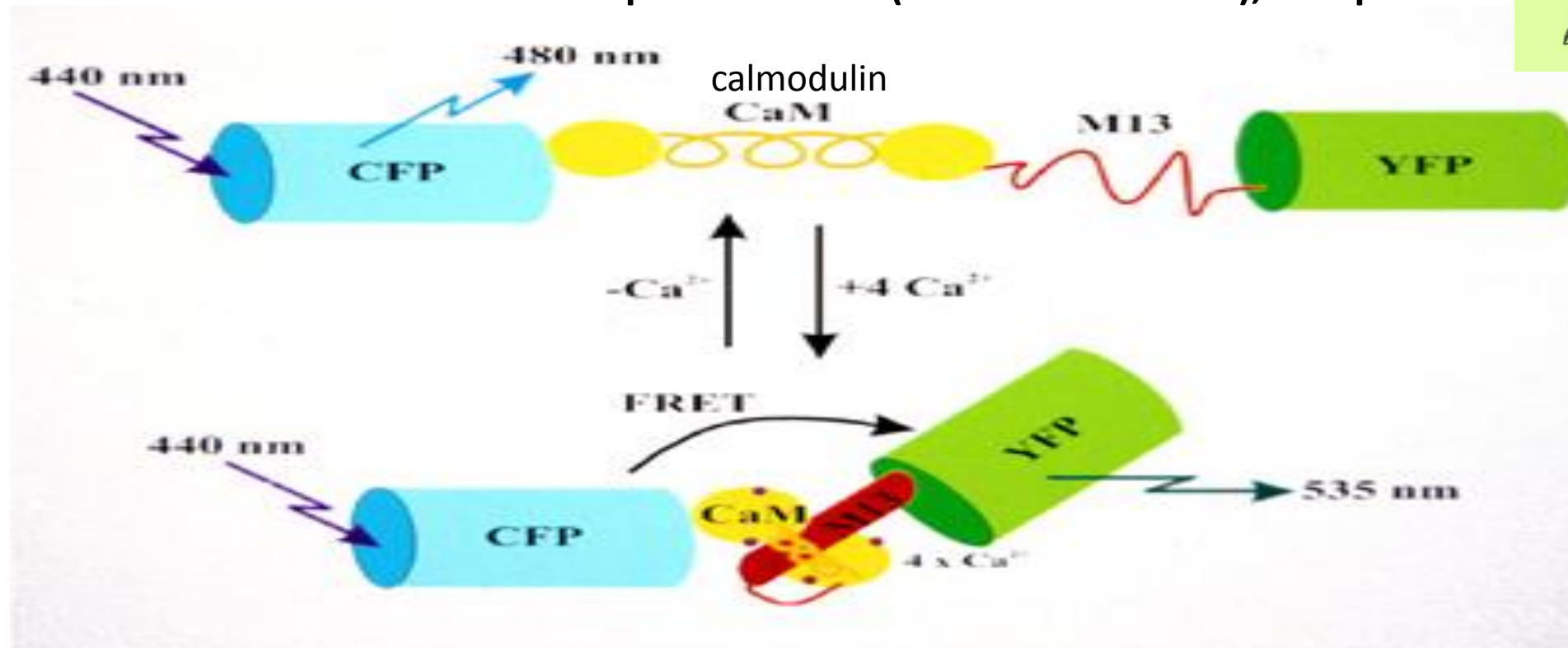


Interakce s analytem  
způsobí přiblížení donoru  
a akceptoru a tím přenos  
energie FRET.

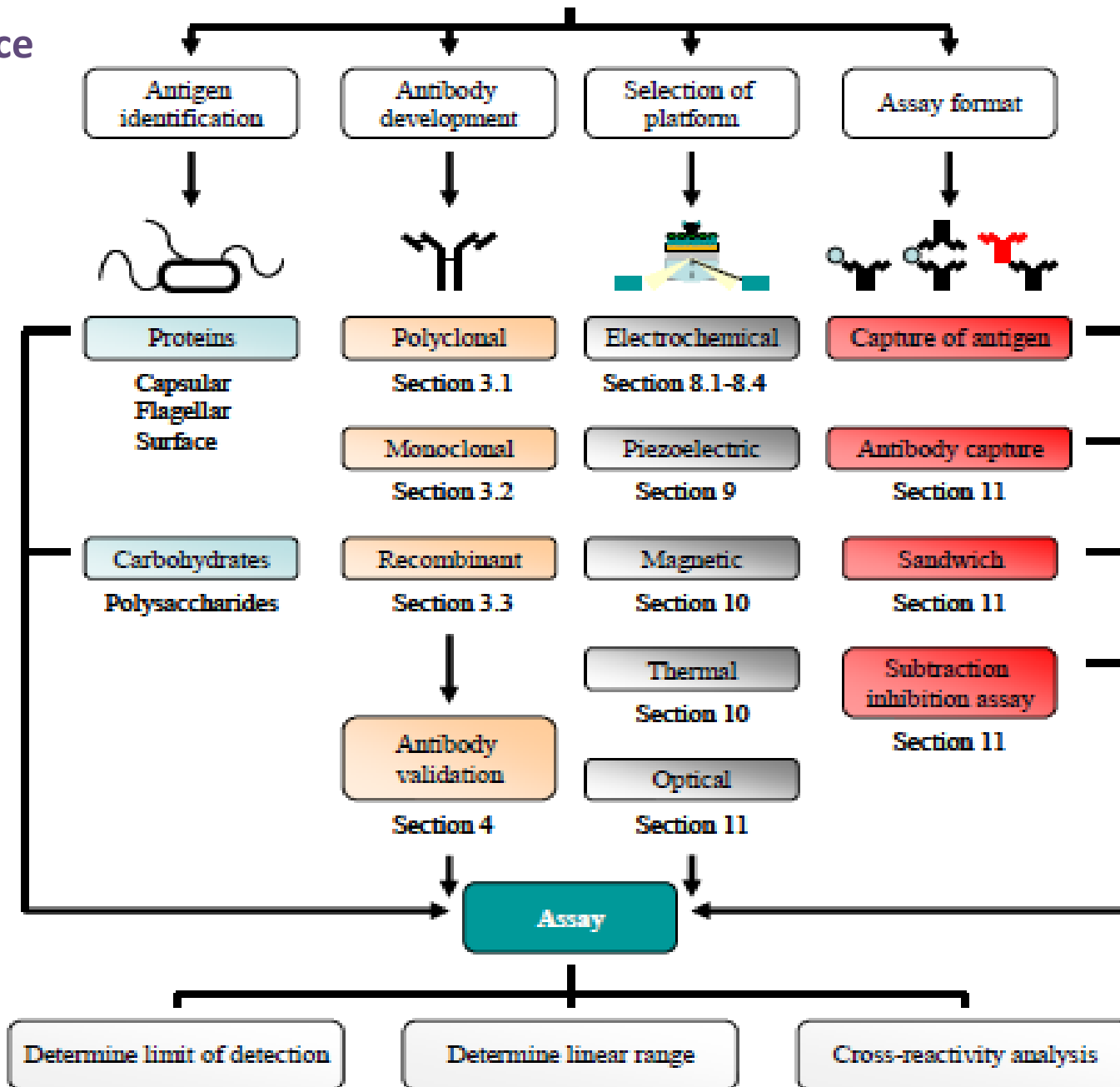
HeLa buňky  
fluorescenční  
mikroskop



Detekce koncentrace vápníku v buňce (cameleon chiméra), GFP protein.



# Schéma vývoje detekce patogenu

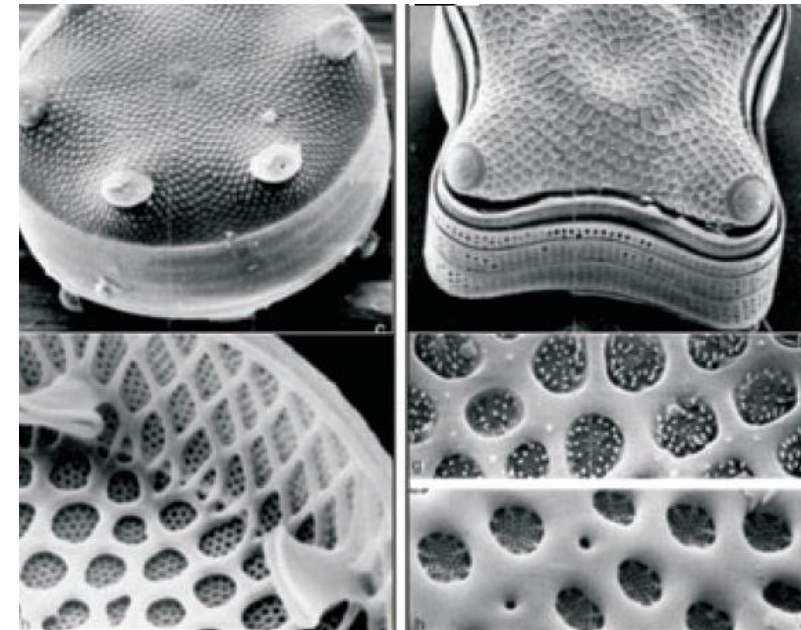




JD Ruby & VF Gerencser

Courtesy, ASM

V přírodě imobilizace slouží k ochraně proti stresům. Adsorpce na povrch - biofilm. Anorganické schránky rozsivek.



Yellowstone Puddle  
Photographs by  
John Lennox, Penn  
State Altoona

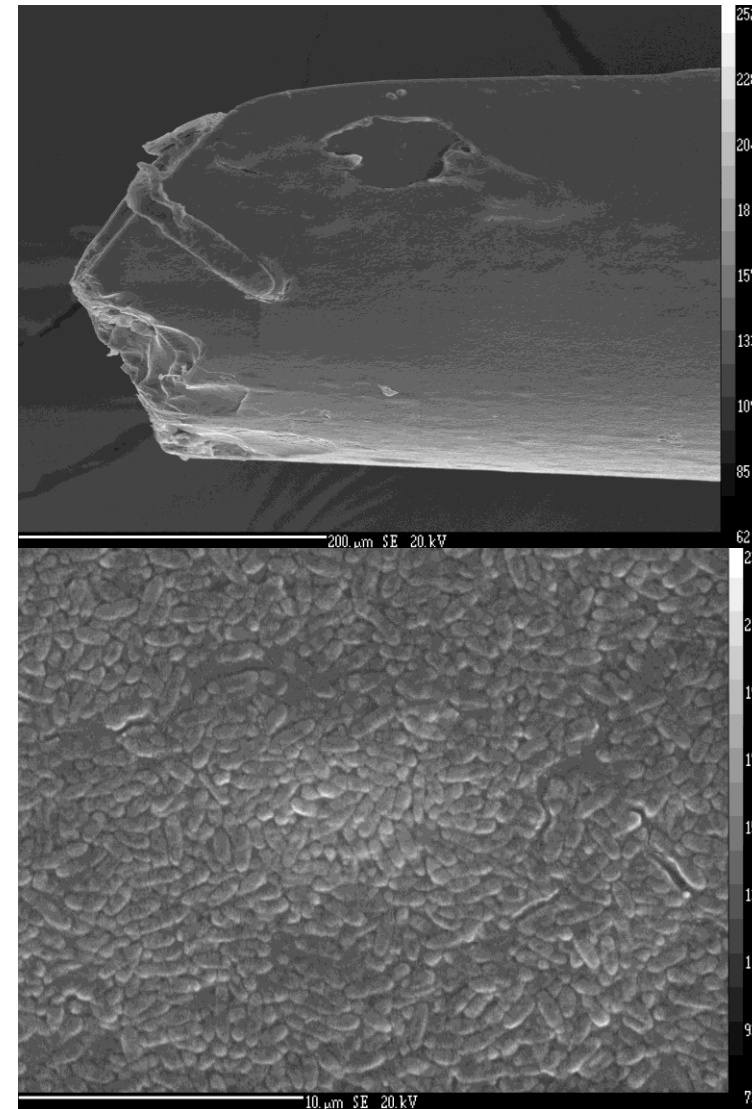
**Imobilizace celých buněk = fyzikální zachycení nebo lokalizace neporušených buněk v definovaném prostoru při zachování požadované aktivity buněk.**

Whole cell immobilization = physical confinement or localization of intact cells to a certain defined region of space with preservation of desired activity Karl S.F., Libicki S.B., Robertson C.R. Chem. Eng Sci. 40, 1321 (1985)

## Imobilizace živých buněk



Imobilizované mikroorganismy nebo jejich části v průmyslu, náplňové kolony např. výroba fruktosového sirupu, výroba tryptofánu.



Imobilizované mikroorganismy pro konstrukci senzoru. Bioluminiscenční bioreportér *Pseudomonas fluorescens* HK44 na čele jádra křemenného optického vlákna  $\varnothing$  300  $\mu\text{m}$ .

# Zachycení v gelu

## Přírodní polymery

### Polysacharides

**Alginate**, pectin, cellulose,  
chitosan, agar, carrageenan,

### Proteiny

Collagen, gelatine

## Synthetické polymery

### Organické

Polyvinylakohol,  
polyacrylamide,  
polyurethane,  
polyethyleneglycol

### Anorganické

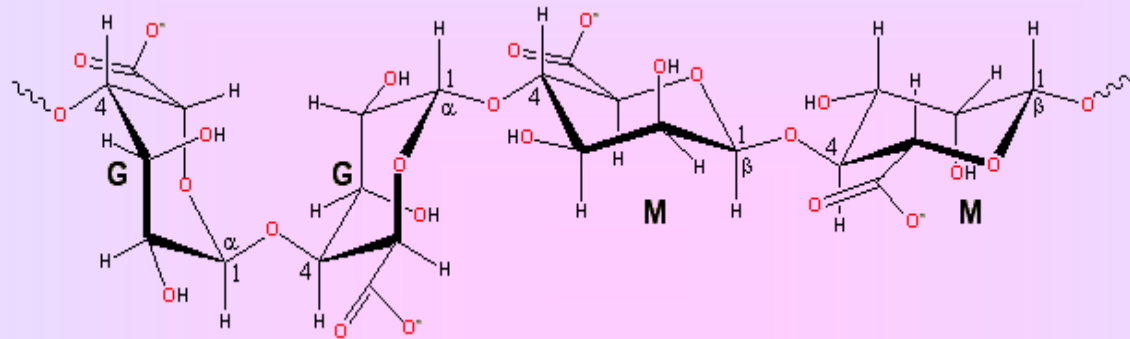
křemičitý nanosol, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>

# Mechanismy gelace

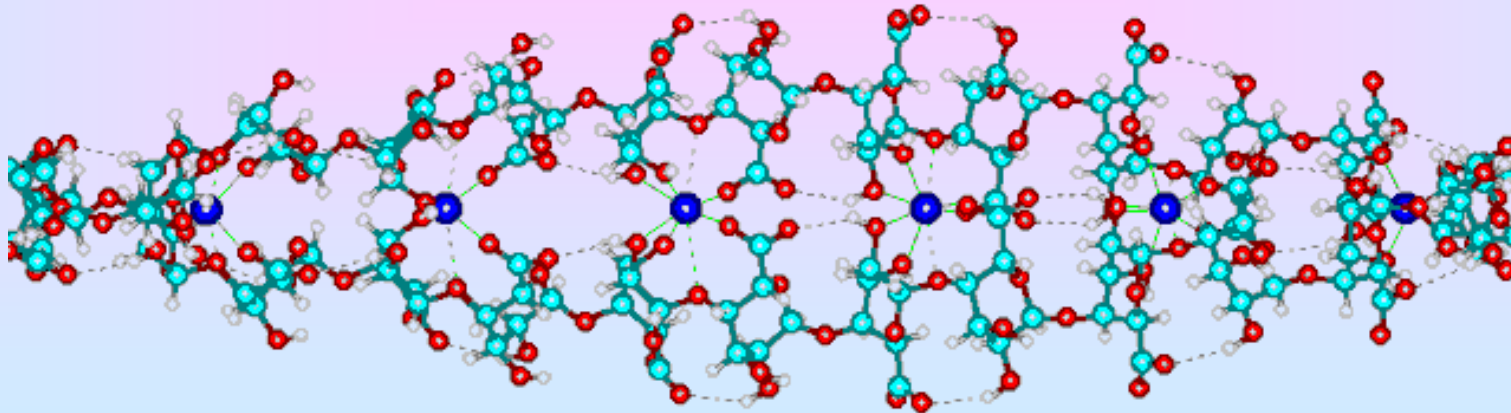
- Inotropní gelace – alginate, chitosan
- Termální gelace – agar, gelatine, collagen
- Zmražení – PVA, silica, ceramic
- Srážení – cellulose, silica
- Polykondenzace – polyurethane, silica
- Zesítnění činidlem – polyacrylamide
- Radiační polymerizace – PVA, PEG

# ALGINATE

- linear unbranched polymers containing  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-mannuronic acid (M) and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked L-guluronic acid (G) residues

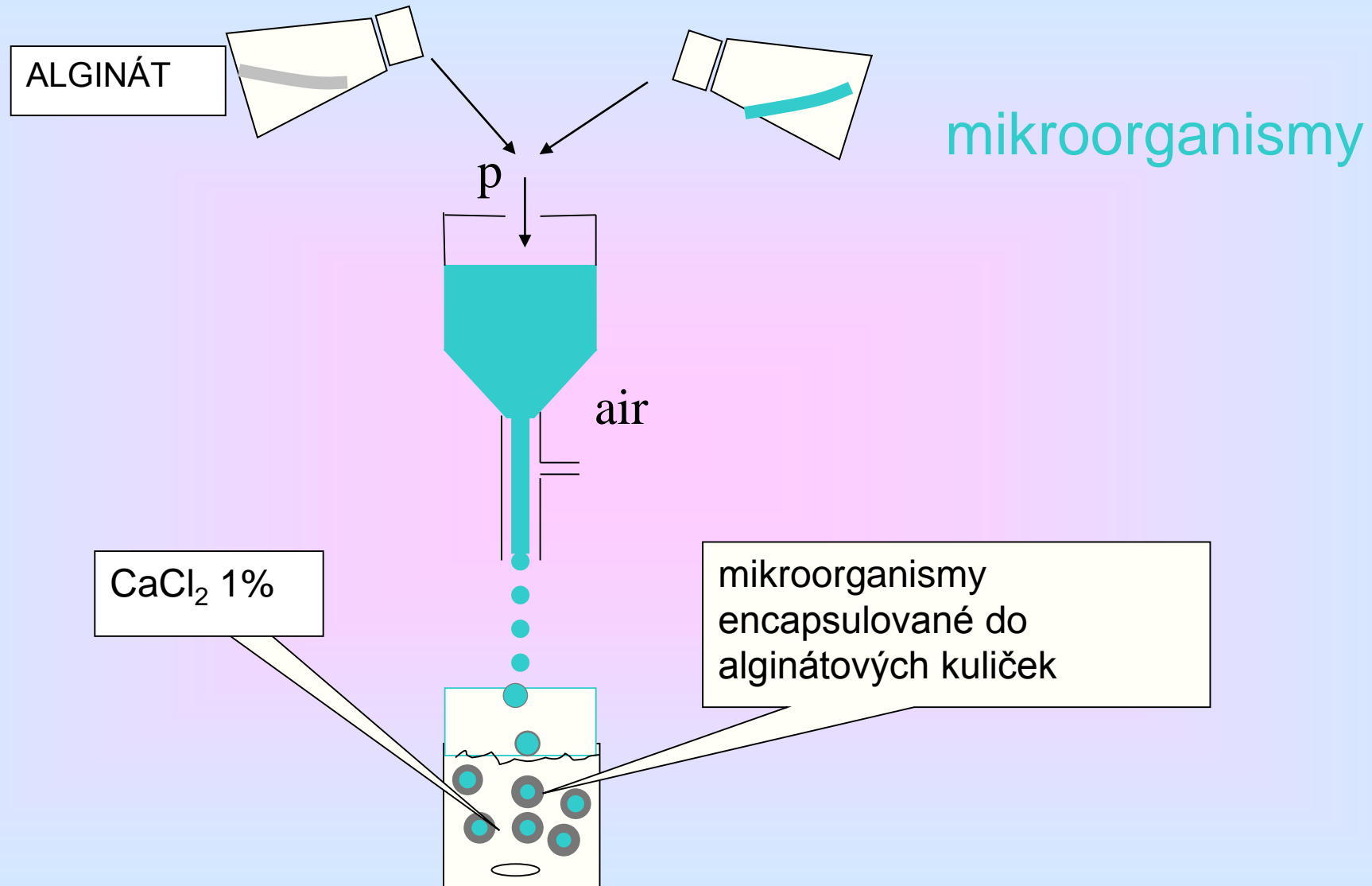


- Calcium poly- $\alpha$ -L-gulonate





# Encapsulace do alginátových kuliček



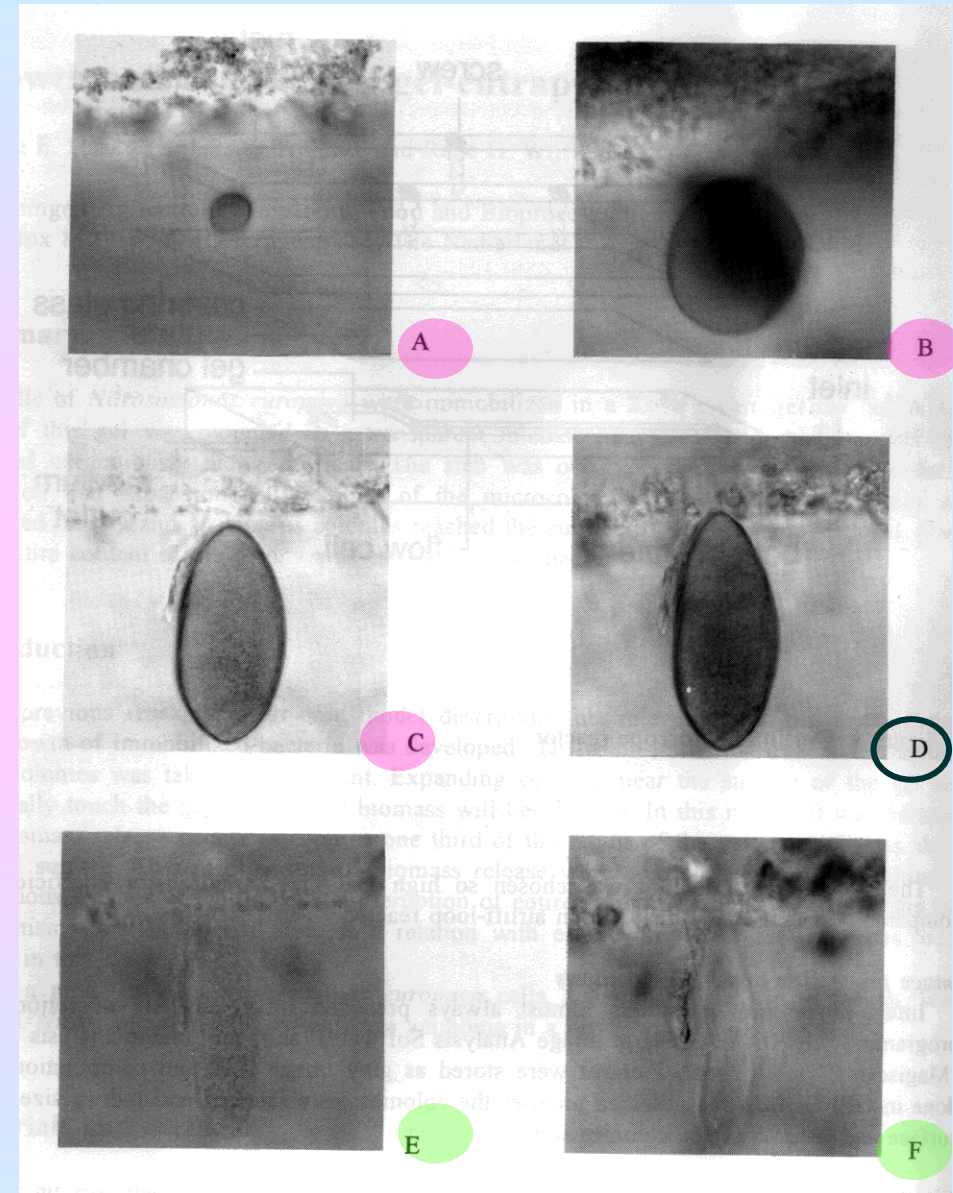
## Imobilizací do alginátu

### ■ Růst a erupce kolonie

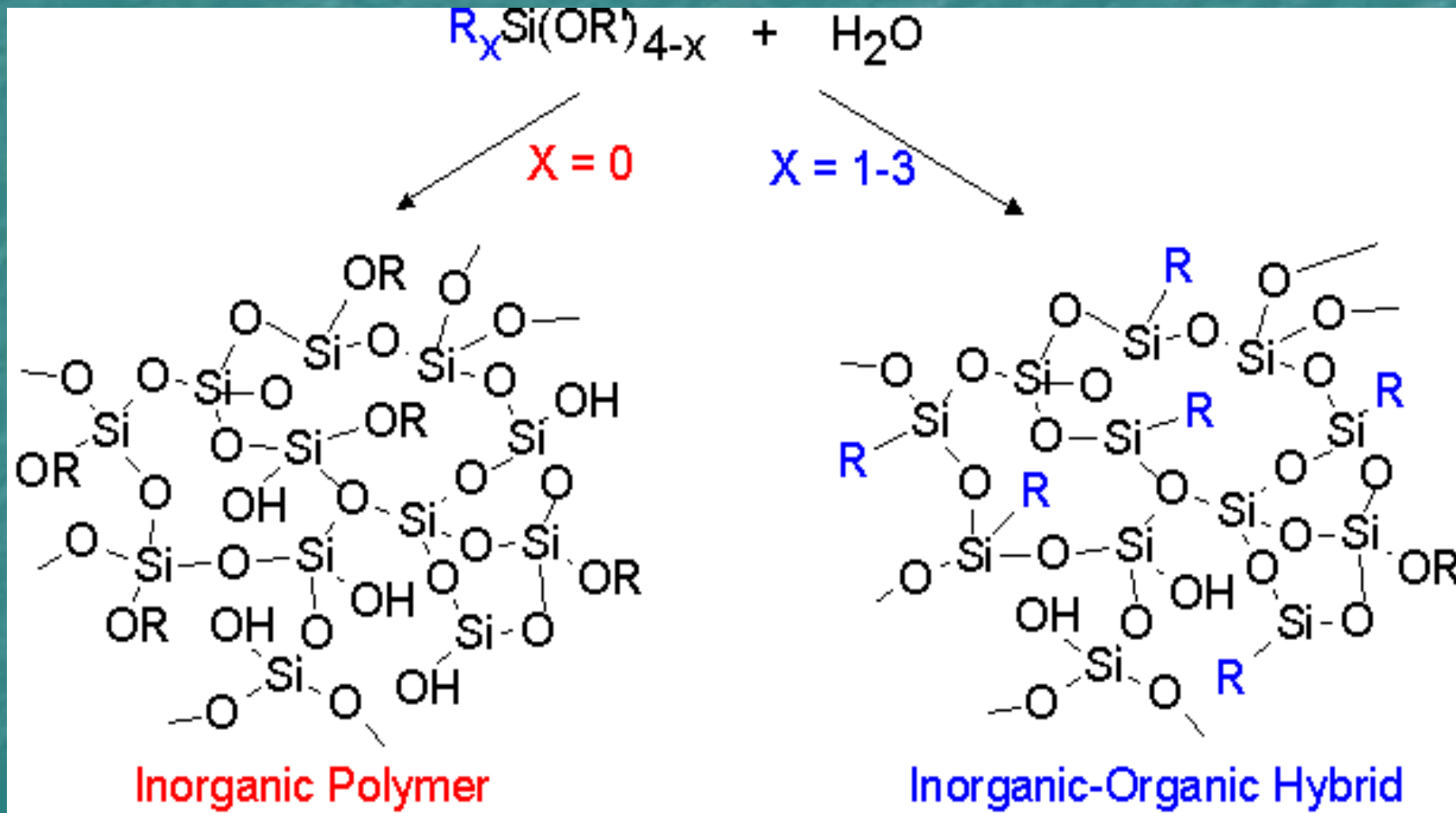
*Nitrosomonas europaea*

- A: 4 dny
- B: 9 dní
- C: 30 dní
- D: 32 dní kolonie dosáhla povrchu gelu
- E: 36 dní eruption start and only a few cells are left
- F: 37 days, eruption is completed and an empty cavity is all that remains of the erupted colony

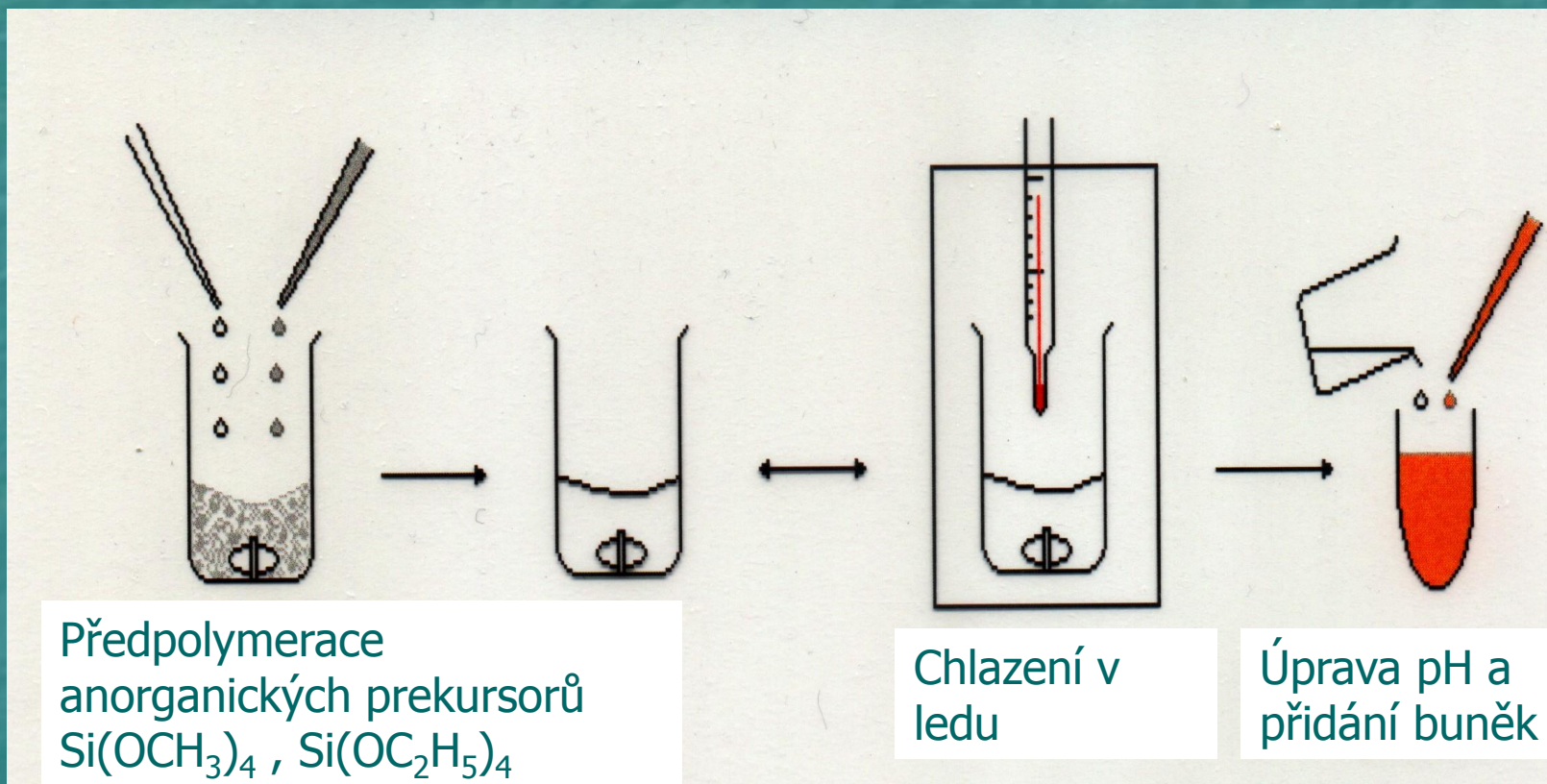
- L.E.Hüsken, J. Tramper, R.H.Wijffels:
- Growth and eruption of gell entrapped microcolonies
- in Immobilized Cells Basics and Applications, (Eds. Wijffles R.H., Buitelaar R.M., Bucke C., Tramper J.), Elsevier, p. 336- 340(1996).



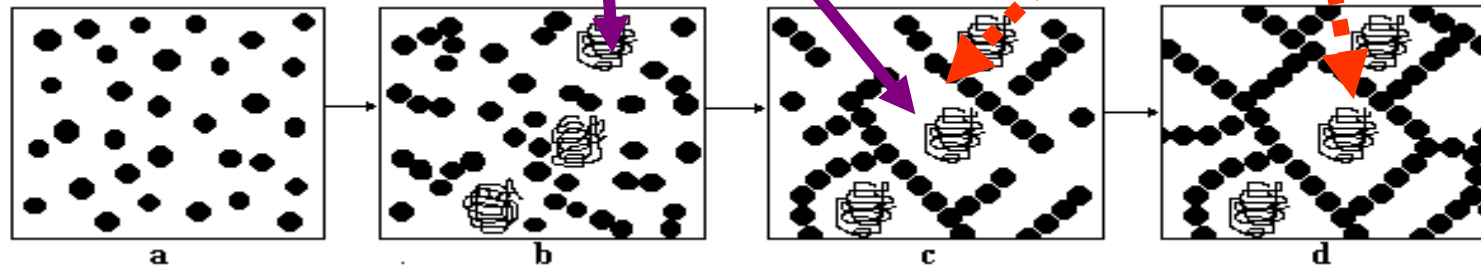
# Křemičitá matrice



# Zachycení buněk do křemičitého solu

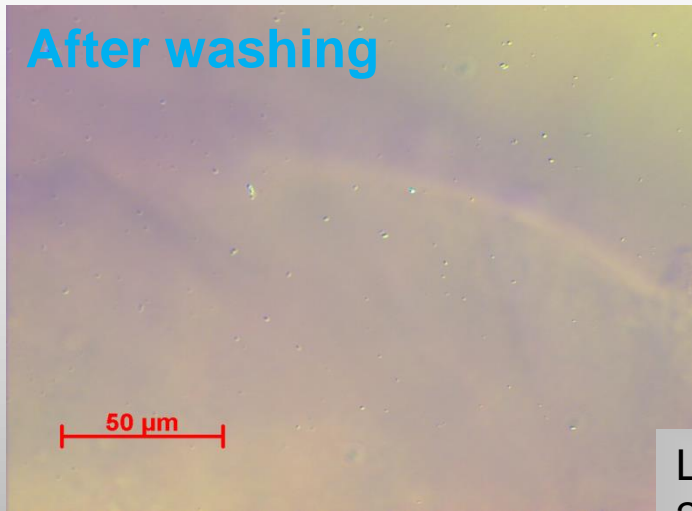


Immobilizace (encapsulace+entrapment) do křemičité matrice sol-gel metodou je často poškozující pro buňky díky extrémům pH, produkci alkoholu při kondenzaci a smrštění během stárnutí gelu.



# Diferential Interference Contrast Zeiss, LSM 510 META

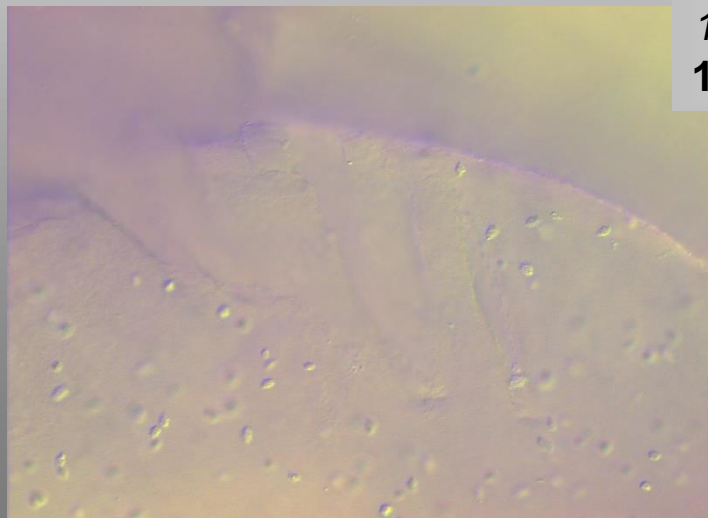
A piece of layer( ~0.5x0.5 cm) washed 3x buffer, 1x d.d. water.



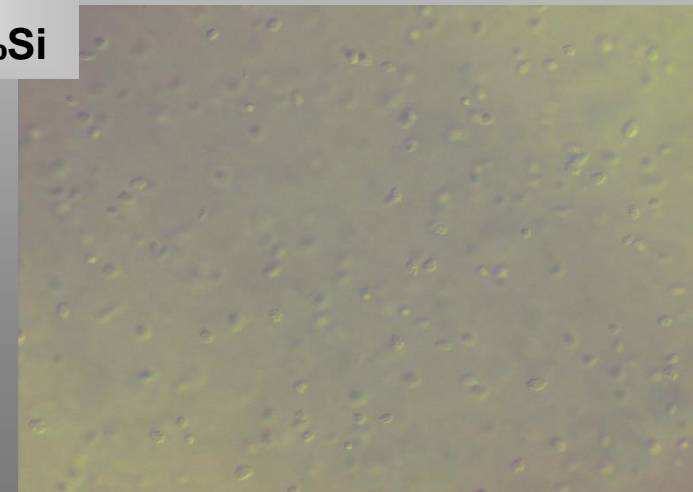
Surface

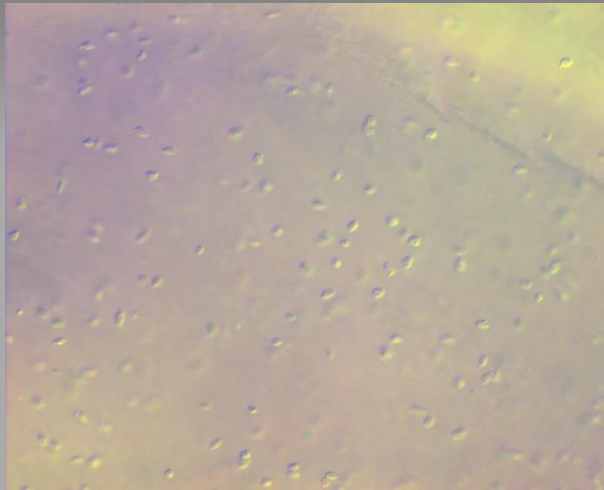


Layer:  
26.9.2003  
1 3.10.2003  
**10<sup>7</sup> cell HK44/g, 3%Si**



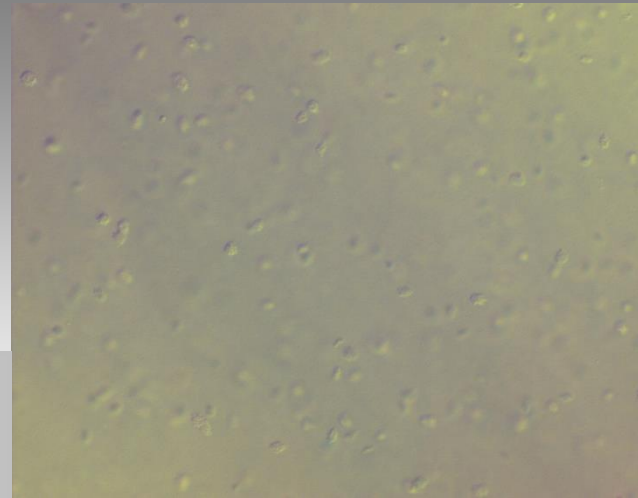
30 μm





100 µm

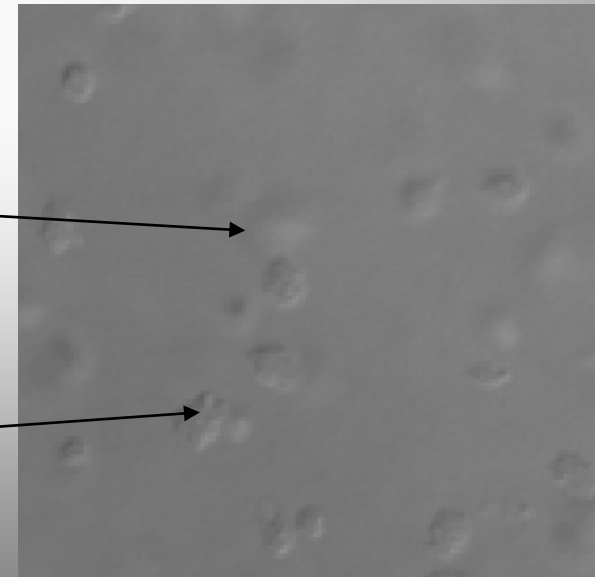
Layer:  
26.9.2003  
1 3.10.2003  
10<sup>7</sup> cell HK44/g, 3%Si



**The cells attached on the surface were washed out. The content of cells in the depth of 100 µm was not changed by washing.**

Cell covered with matrix

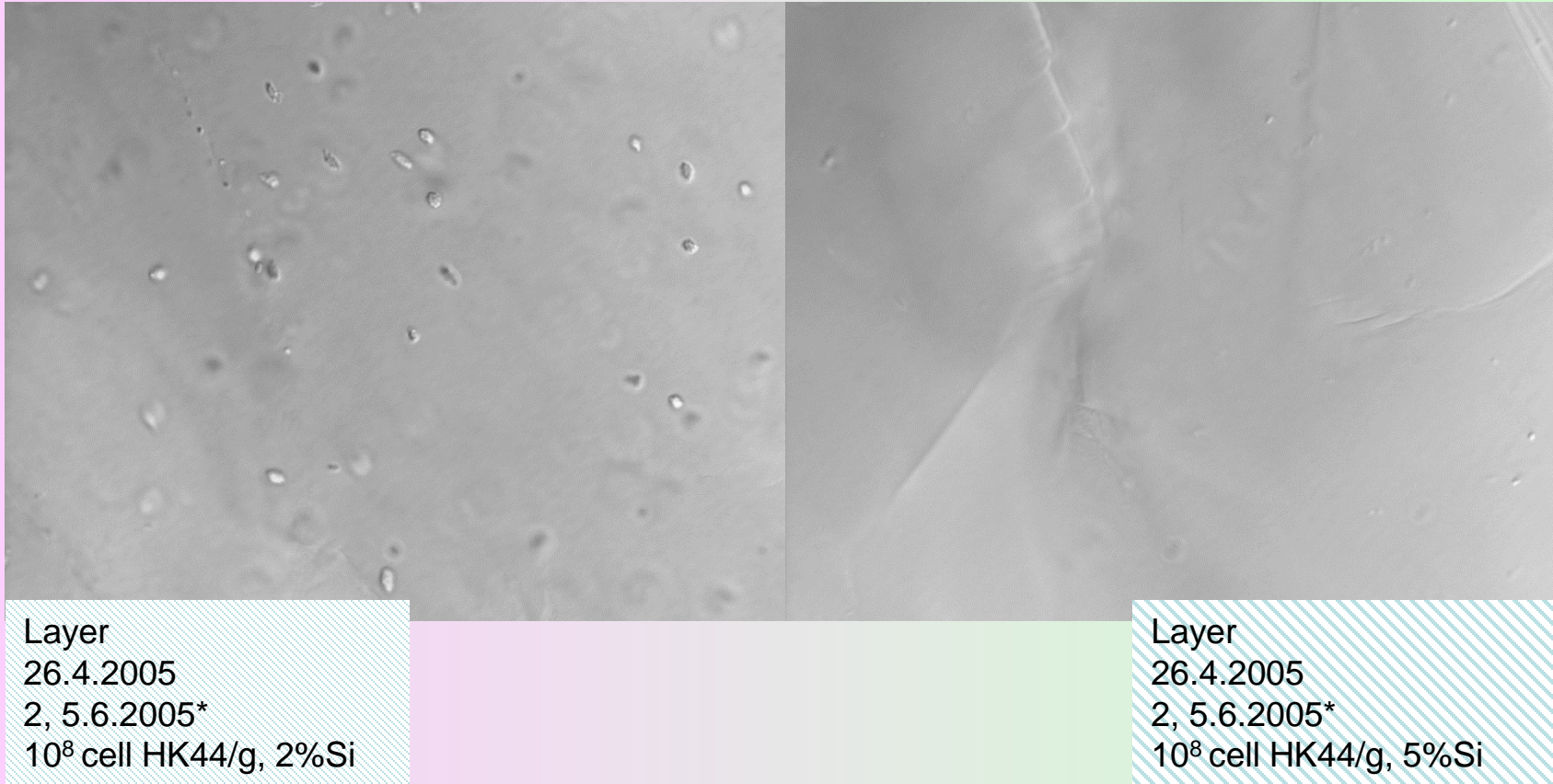
Dead cells in tough silica matrix (high resolution) had irregular rough surface.



# Depth 30 $\mu\text{m}$

2%Si

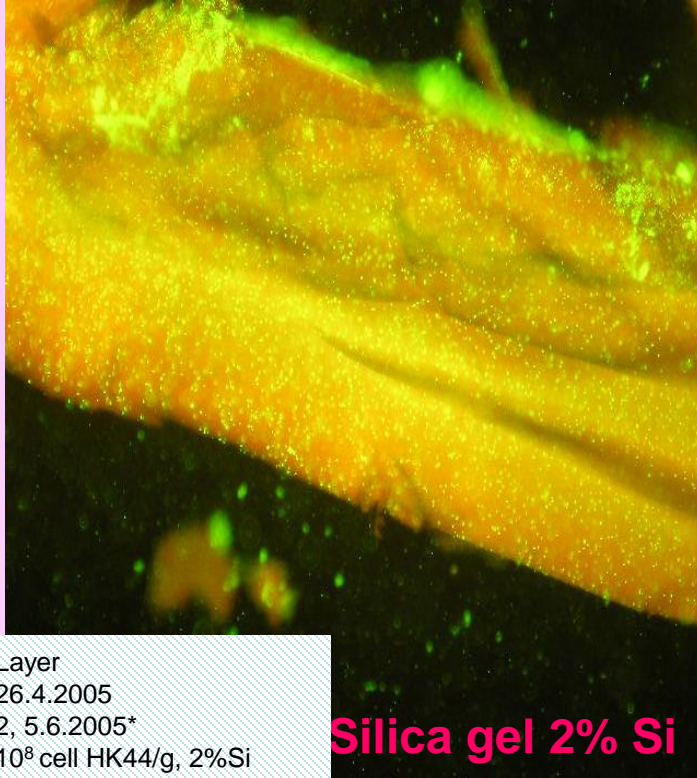
5%Si



Increase in content of Si in the biogel, from 2 to 5%, resulted in cell destruction during entrapment procedure. Biogel with 5% Si was brittle with cracks.



Fluorescence Microscope GMBU Halle, 30.05.2005,  
Live/dead test. BacLight™ SYTO9:Propidium J = 1:1

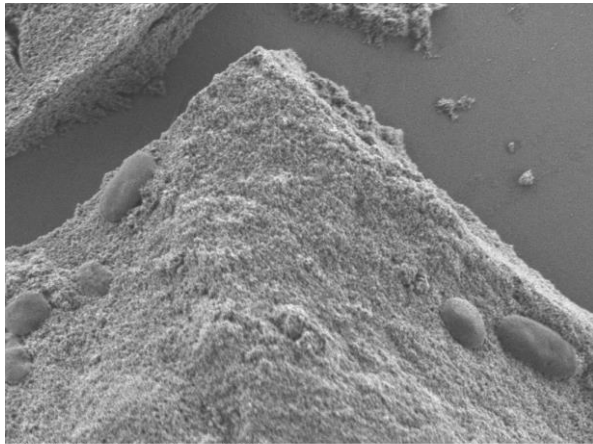


The soft matrix (2% Si) contains substantially higher content of living cells that were dispersed in volume. In both matrices more cells were observed on edges. Large cracks in the hard matrix were evolved during specimen preparation.

BX 60 of Olympus Optical Co. with a wideband blue fluorescence excitation filter system type U-MWB2. The magnification was 1:400.

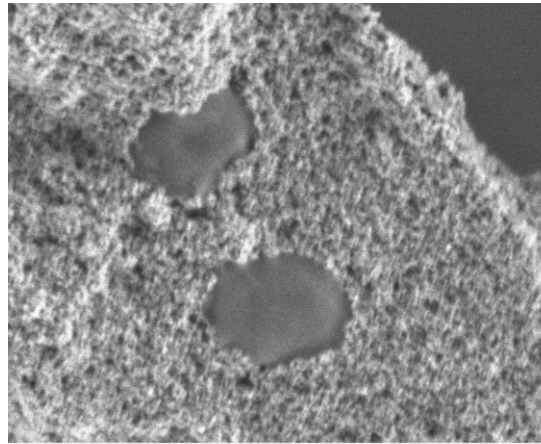
# Biogel 1 month after immobilization Sample preparation B1

2% Si in biogel



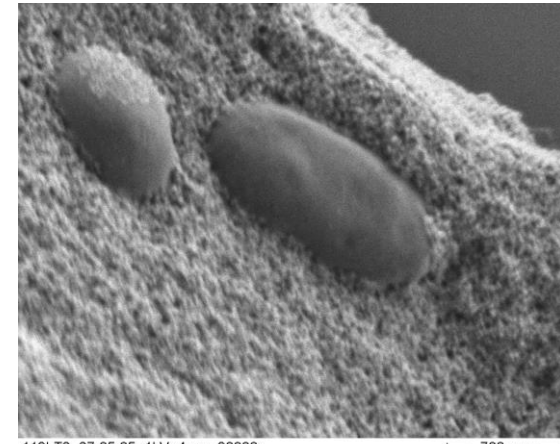
113LT2, 27.05.05, 1kV, 4mm, 10000x,

2 μm



113LT2, 27.05.05, 1kV, 4mm, 30000x,

700 nm



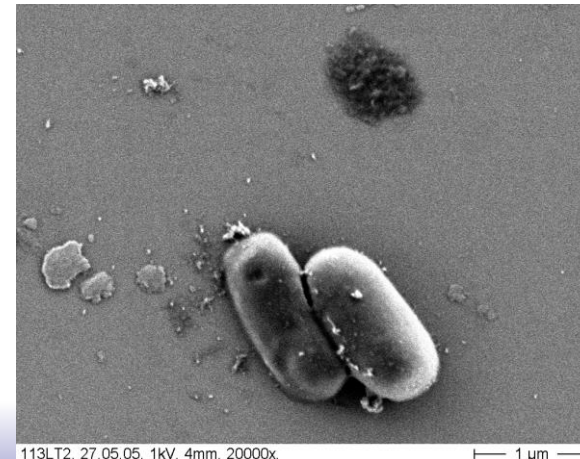
113LT2, 27.05.05, 1kV, 4mm, 30000x,

700 nm

Compact silica matrix .

On silicon wafer were parts of destroyed cells.

Layer  
26.4.2005  
2, 5.6.2005\*  
10<sup>8</sup> cell HK44/g, 2%Si



113LT2, 27.05.05, 1kV, 4mm, 20000x,

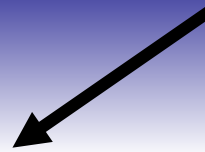
1 μm

REM DSM 982 Gemini

20.11.2003

6,2.3.2005

$10^8$  cell HK44, 2%Si

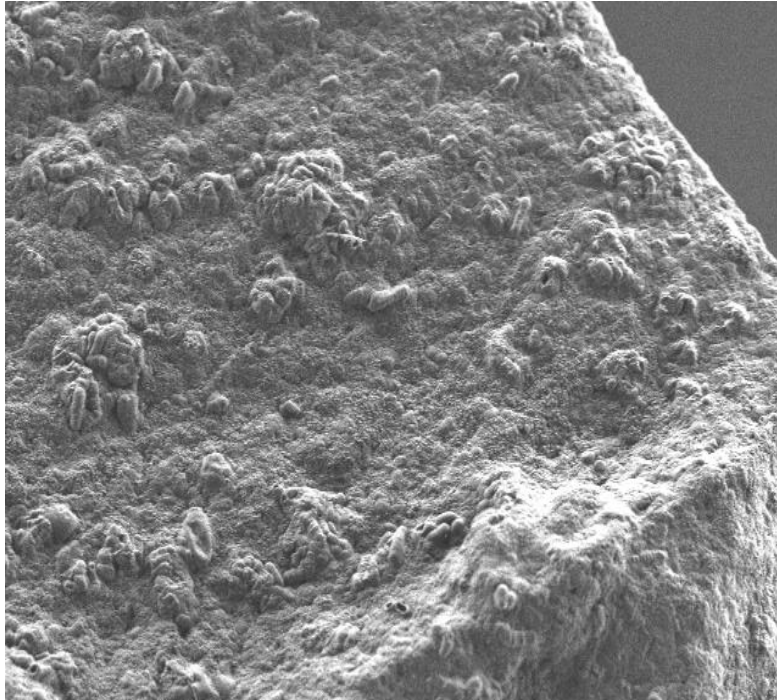


20.11.2003

6,2.3.2005

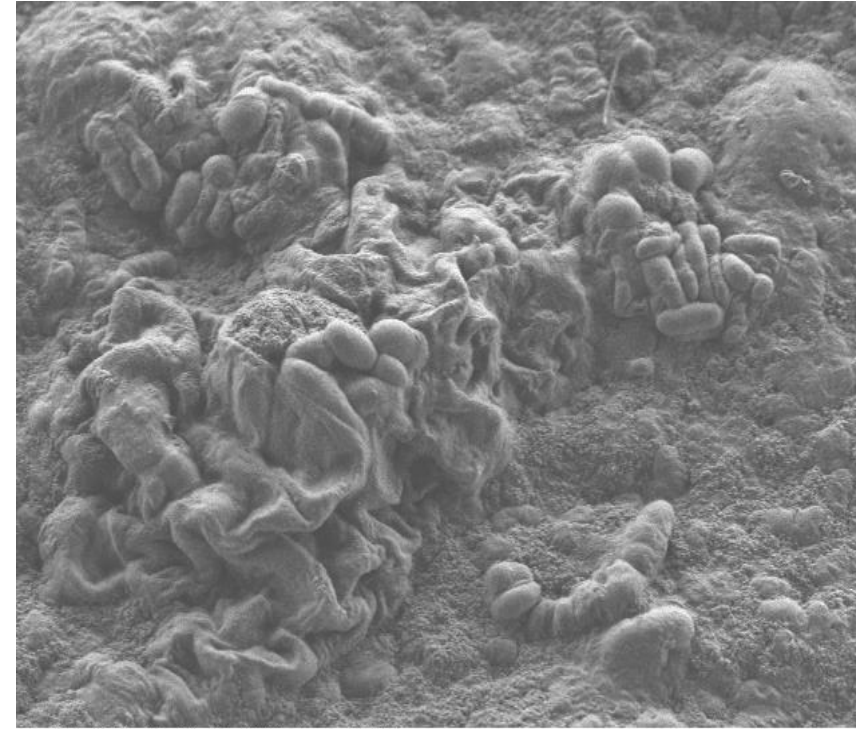
2% Si in biogel

Sample preparation S



Sol-Gel161, 15.04.05, 1kV, 3mm, 2000x,

10  $\mu$ m



Sol-Gel161, 15.04.05, 1kV, 3mm, 5000x,

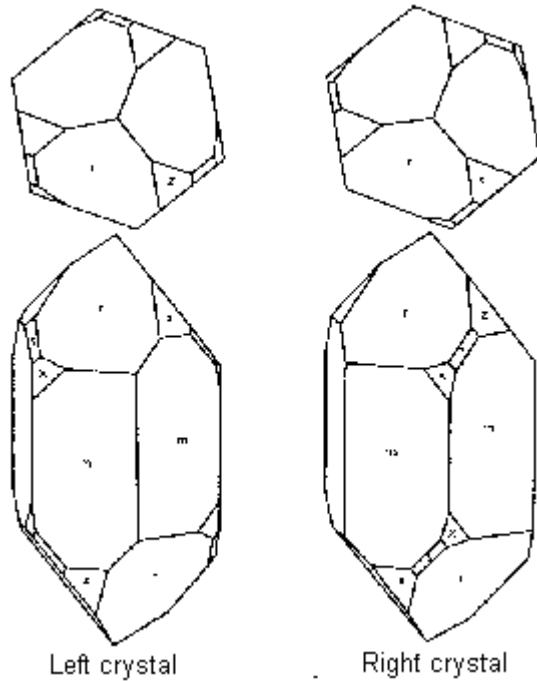
4  $\mu$ m

**In old soft biogel were clusters of cells**

in contrast to separated cells in one week old biogel.

# Imobilizace aminokyselin a proteinů v přírodě.

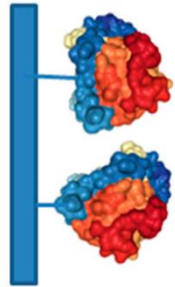
- Bernalova hypotéza probiotické polymerace v adsorbovaném stavu
- Adsorpce na  $\alpha$  – křemen původ převládající L- formy organických molekul v přírodě.



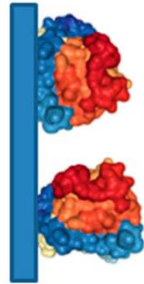
# Imobilizace enzymů



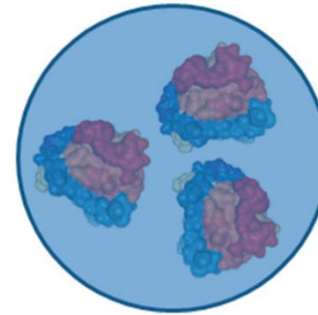
Enzymy v  
částečně  
inaktivované  
buňce



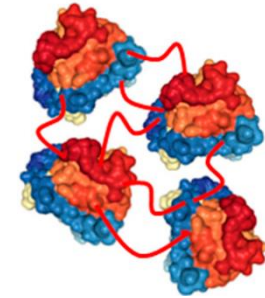
Kovalentní  
vazbou s  
nosičem



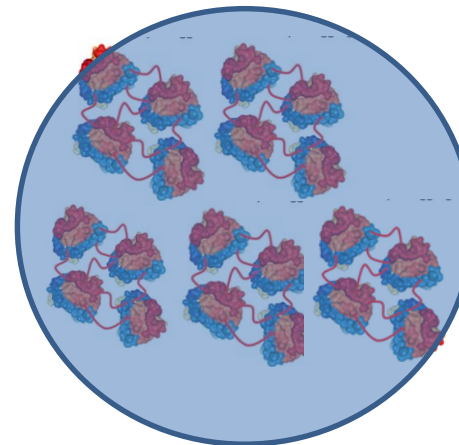
Adsorpcí na  
povrch



Entrapment  
enkapsulace

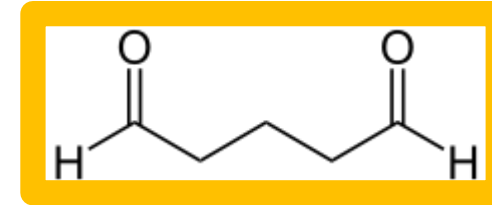


Zesíťení  
enzymů



Enkapsulace, entrapment  
zesíťěných enzymů

# Fixace v parách glutaraldehydu



Glutaraldehyd je při pokojové teplotě olejovitá kapalina s hustotou 1,06 g/cm<sup>3</sup>.  
Je však toxický a způsobuje vážné podráždění očí, nosu, krku a plic, bolesti hlavy, ospalost a závratě.

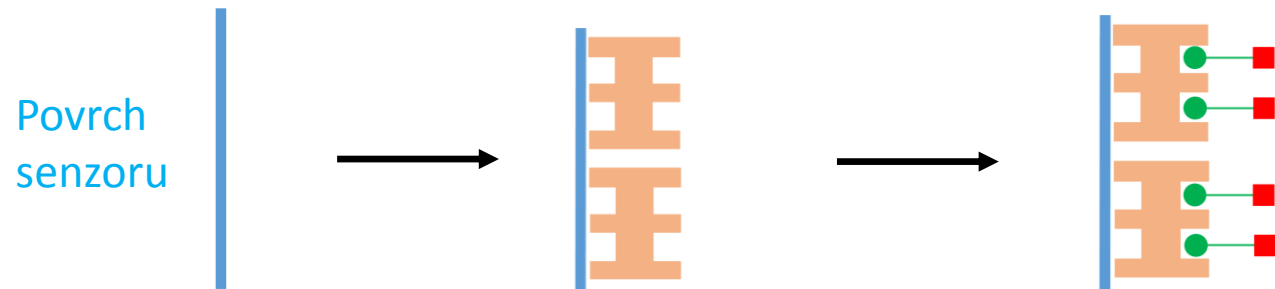
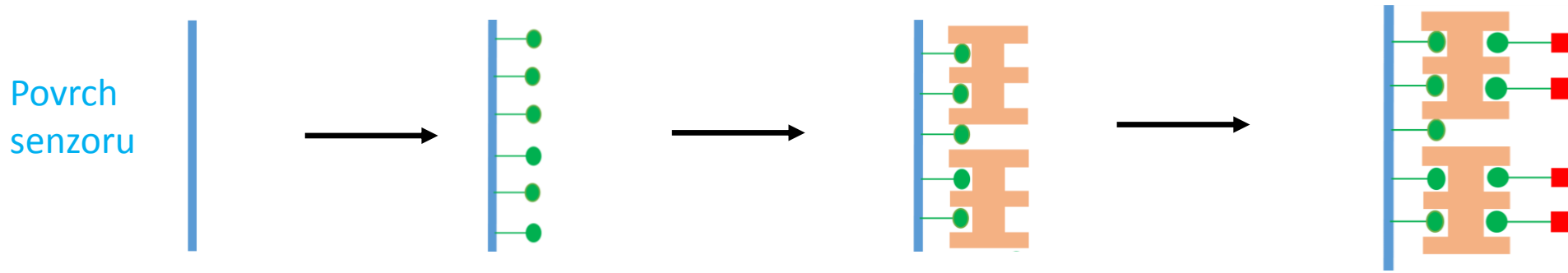
Enzym + hovězí sérový  
albumin (BSA)

1) Nanést na  
povrch elektrody  
nebo čočky.

2) Vystavit působení  
par glutaraldehydu  
(5 - 15 % roztok ve  
vodě, 25°C).



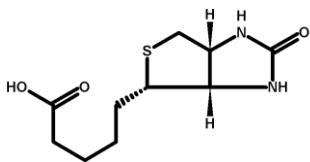
# Princip immobilizace proteinu – Avidin- Biotin



Biotin



vitamin H.



(Strapt)Avidin

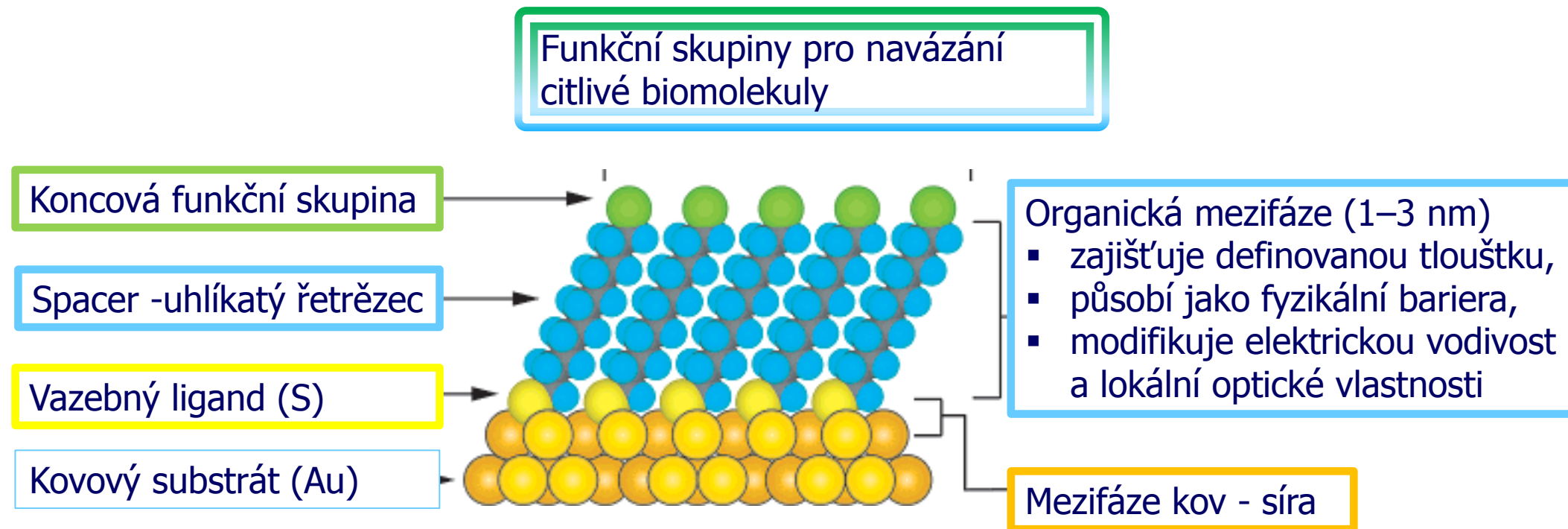


Biotinylovaný protein



Avidin- glykoprotein vaječného bílku 66 kDa tvořený 4 identickými řetězci (128 aminokysel.). Každá podjednotka má vazebné místo pro biotin. Straptavidin má méně interakcí s povrchem.

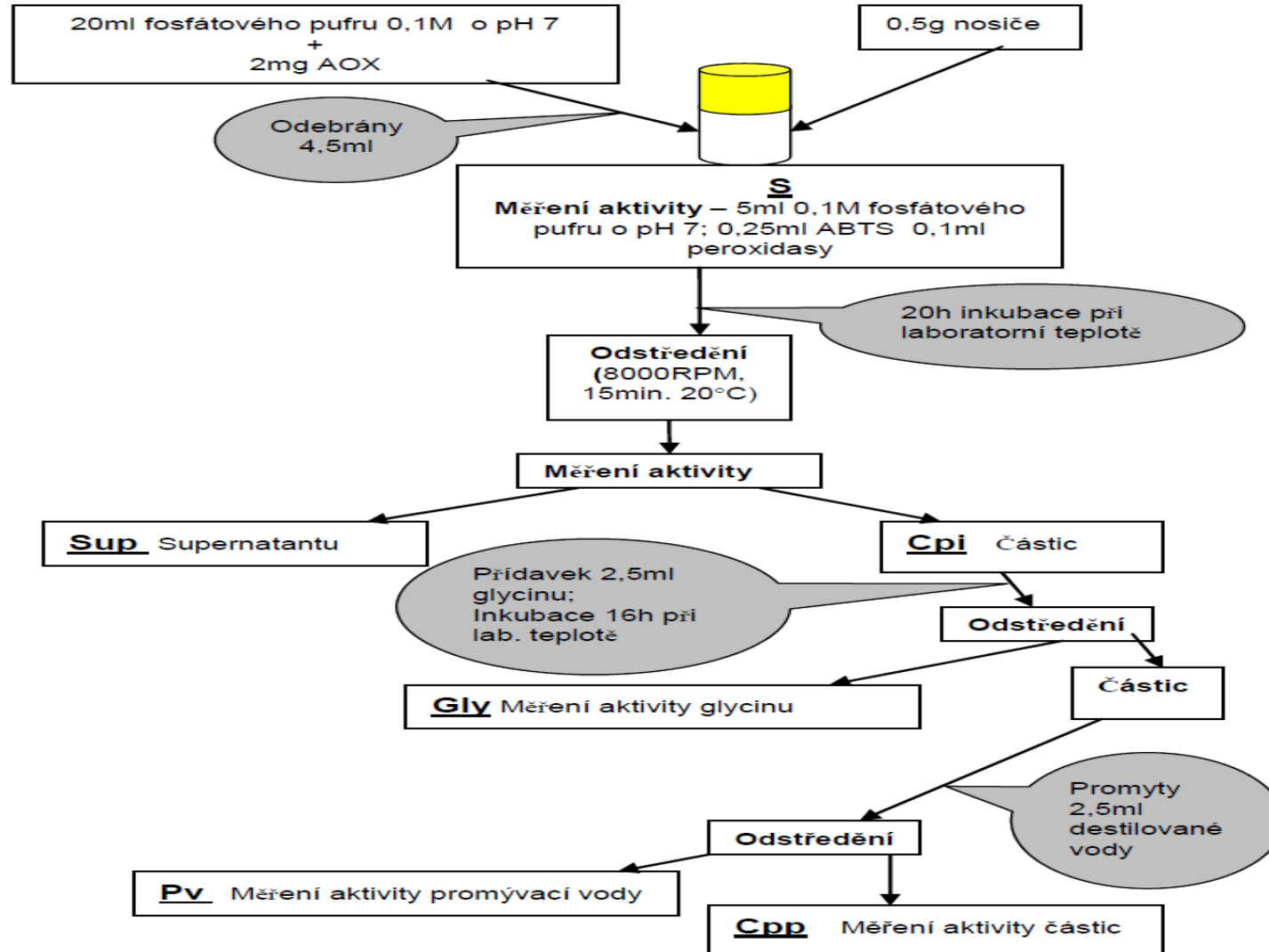
# Samoskladná vrstva na povrchu zlata (SAM)



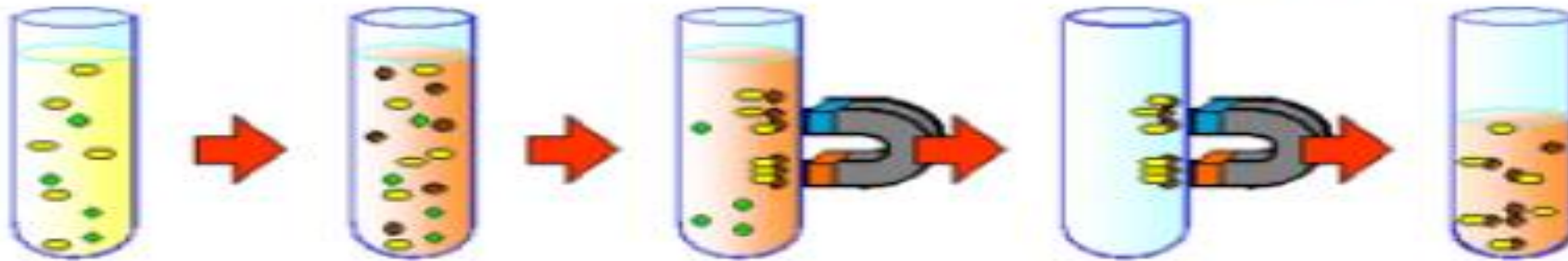
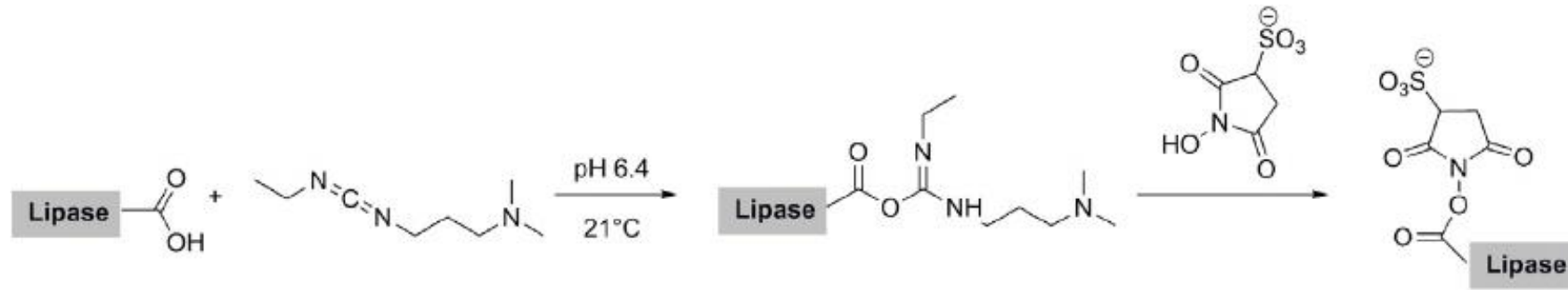
Zlato se ponoří do roztoku thiolu, který se adsorbuje na povrch. Molekuly thiolu se na povrchu zlata samovolně orientují v jednom směru a vytvoří monovrstvu.



# Před-imobilizace glukóza oxidázy pro senzor glukózy s optickým kyslíkovým převodníkem

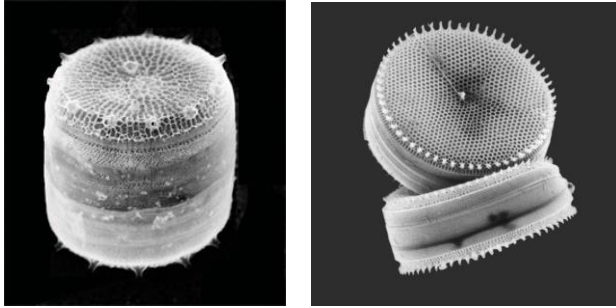


# Využití magnetických částic při immobilizaci enzymů.



# Biomíneralizace - silaffin

Silaffin – peptidy odpovědné za srážení oxidu křemičitého a tvorbu schránek roztivek.

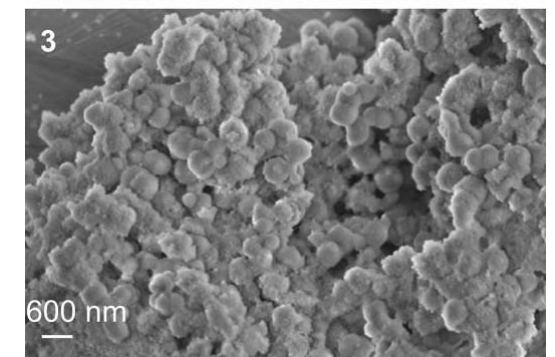
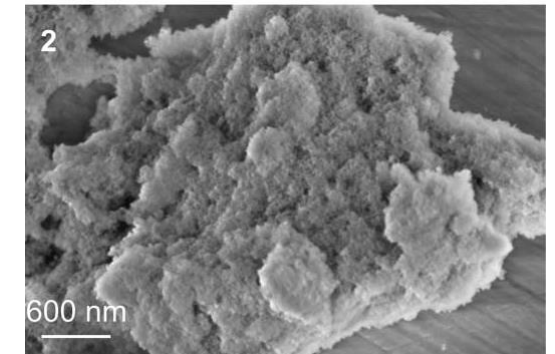
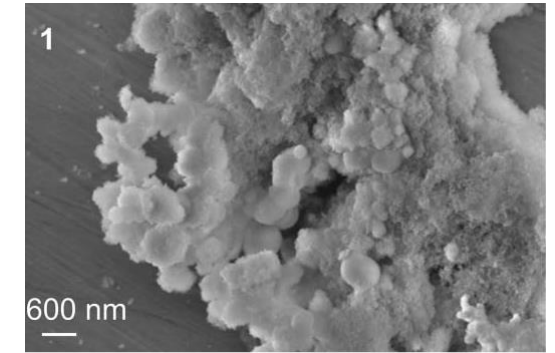
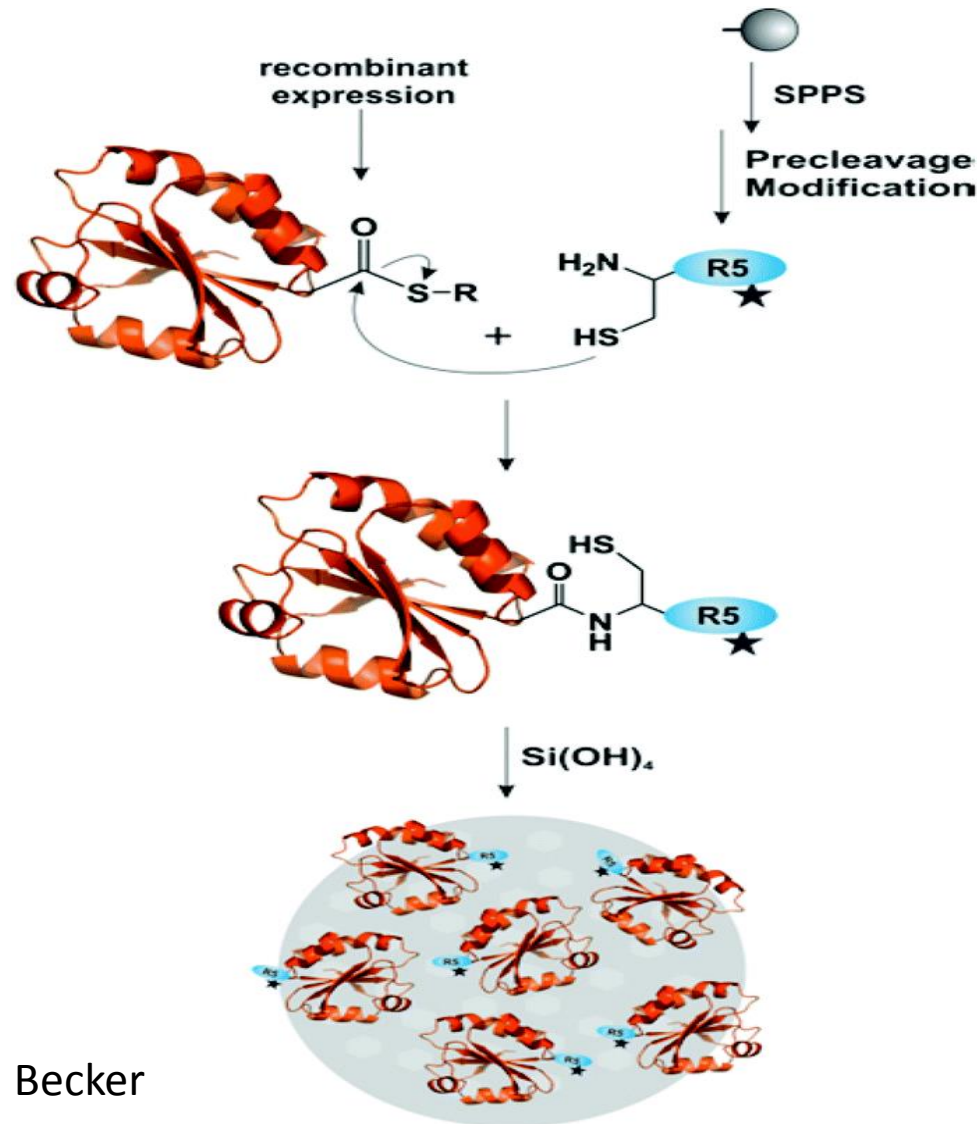


Bio inspirována imobilizace – využití úměle připravených silaffinů k imobilizaci.

Kovalentní protein silaffin konjugáty vedou k homogenní enkapsulaci proteinů v křemičité matrici.

Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 5482

Carolin C. Lechnera and Christian F. W. Becker  
Biomater. Sci., 2015,3, 288-29



Autoenkapsulace – in vitro biomíneralizací