



Molekuláris és bioszenzorok

Bevezetés

A molekuláris szelektivitású szenzorok egy része bioszenzor, mivel azokban biológiai érzékelő rétegek (receptorok) találhatóak. Ezeket lehet **molekuláris bioszenzorok**nak is hívni. Egy másik megközelítés szerint a bioszenzorok feladata lehet biológiai ágensek, mikroorganizmusok detektálása (pl. a baktériumok, vírusok, spórák, stb.), amelyek nyilván egészen más érzékelési mechanizmusok alkalmazását igénylik (többnyire az antitest-antigén kölcsönhatáson alapulókat). Ezeket a bioszenzorokat hívhatjuk munkanévként **mikrobiológiai szenzorok**nak. Általában mindkét kategóriát együttesen szokás bioszenzoroknak hívni. Egy harmadik, újszerű koncepció a biológiai receptorokat imitáló (mimicking) **molekuláris lenyomatok** (MIP) készítése; ezek segítségével szintén lehet molekuláris szelektivitású vagy mikrobiológiai anyagokat kimutató szenzorokat készíteni.

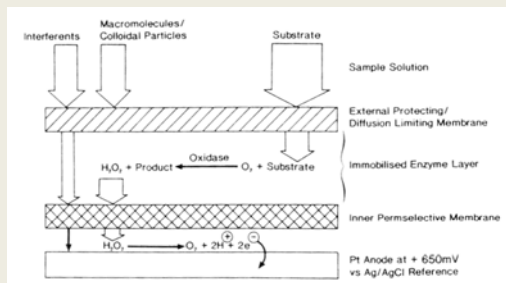
A korábbiakban már láttak példákat a molekuláris bioszenzorokra (pl. GOD enzim alapú amperometriás glükóz elektród, vagy karbamid érzékelése ureáz enzimmel bevont pH elektróddal, stb.). Most a bioszenzorok területének más vonatkozásaival is foglalkozunk:

- a membránok kiemelt fontosságát a bioszenzorok működésében
- a funkcionális receptorok és membránok létrehozásának korszerű módszereit
- az immunelemzés (antitest-antigén kölcsönhatás) alapelveit
- a bioszenzorok kialakítási lehetőségeit

Molekuláris bioszenzorok

A membránok szerepe a bioszenzorok működésében

A bioszenzorok működésében kiemelt szerep jut a membránoknak; egy enzimelektród esetében legalább egy membránra szükség van. Egy általános bioszenzorban két membrán is található, amint azt az alábbi ábra (amperometriás oxidáz-alapú enzimelektród):



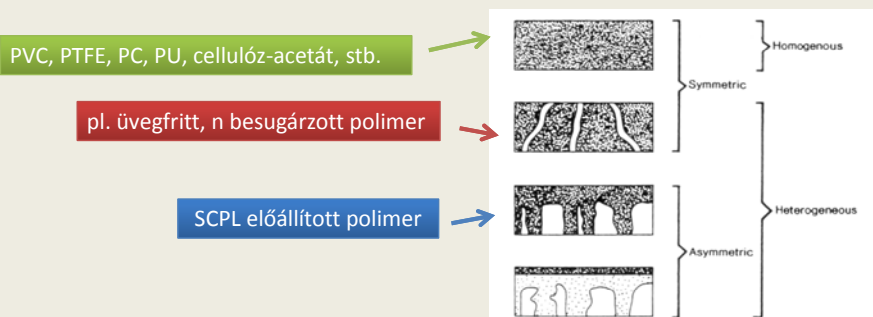
Ha két membrán réteg van, akkor ezek funkciói:

- a rétegek zárva tartják, immobilizálják a „bioreaktív” érzékelő réteget
- a külső, nagy pórusméretű membrán „megszűri” a mintát és lassítja a diffúziót
- a belső, kis pórusméretű (permszelektív) membrán a szelektivitást fokozza

Molekuláris bioszenzorok

A membránok szerepe a bioszenzorok működésében

A membránok tehát itt nagymértékben hozzájárulnak a szelektivitás fokozásához. A használatos szintetikus vékony membránok (5-40 μm) az alábbi csoportokba sorolhatók:



SCPL= solvent casting and particulate leaching; membrán előállítási eljárás, amely során a polimerizáció során szilárd szemcséket (pl. sók) adnak az oldathoz, amelyek beépülnek a polimerbe. Ezeket aztán alkalmas oldószerez/reagenssel kioldják a vékonyréteg formába öntött kész polimerből, amivel meghatározott pórusméret (üreg-méret) állítható elő.

Molekuláris bioszenzorok

A membrán transzport folyamatok

Homogén szimmetrikus membránokban, amelyek nem rendelkeznek az 5-50 nm tartományban határozott szerkezettel, a transzport folyamatok elég bonyolultak. A transzportált specieszeknek a polimerrel kölcsönhatásba kell lépnie – abban oldódniuk kell. Az oldhatóság hajtóereje dolgozik tehát ellene a membrán két oldalán fennálló nyomás vagy koncentráció különbségeknek. Lágyító adalékok (pl. dioktil-ftalát [DOP] vagy izopropil-mirisztát [IPM] a PVC esetében) a polimer láncok mozgékonyágát javítják, ezért általában a membrán transzportot segítik. A homogén membránok többségét vagy a „solvent casting” módszerrel állítják elő (üveg vagy teflon hordozni).

A **heterogén membránoknak** határozottabb szerkezete van (részben), és transzport viselkedésük jobban definiálható. Nagyobb (mikronos) pórusméretek esetén a transzport egyszerű „szűrés/szítálás”, míg kisebb pórusméreteknel a permszelektív diffúzióának egyre nagyobb szerep jut. 1-5 nm-es membrán esetében a transzport részben a nagy pórusokon, részben a polimer anyagán keresztül valósul meg. Ez utóbbi esetben tehát a viselkedés kialakításában legalább akkora szerep jut a membrán gyártási folyamatának, mint magának az alapanyagának. A gyártás módja leginkább az SCPL és a „track etching”.

Molekuláris bioszenzorok

A membránok funkcionálizálása

A bioszenzoroknak általában vizes, összetett közegben kell dolgozniuk, a target (szubsztrát) molekula pedig lipofil. Ebből következően a diszkrimináció érdekében a membránok legtöbbször lipofil funkcionálizációval rendelkeznek. Egy másik gyakori szituáció, amikor a membránnak kation vagy anion szelektívnek kell lennie, hogy a zavaró komponenseket kizárják.

A **lipofil funkcionálizáció** lehetőségei:

- lipofil adalékot (pl. IPM, DOP lágyítót) adnak a polimerhez
- a polimer felületét/pórusait hidrofobizálják (pl. szilanizáció organo-kloroszilánnal, vagy amorf hidrokarbon (DLC) bevonattal)



Az **ionszelektivitás** növelése ioncserélő tulajdonságú membránnal lehetséges; pl. egy anioncserélő polimer a kationokat nagymértékben kizárja a transzportból (és fordítva). Pl. Nafion (egy perfluoro-szulfonált szénhidrogén) jól bevált kationcserélő membrán alapanyag, ami kationokra nagyon jó szelektivitású.

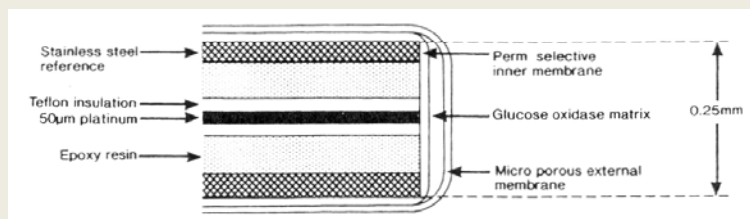
Egyes esetekben bevált a cellulóz-acetát membrán is, ami lipofil anyagokat jól transzportál, ugyanakkor egyben anionos interferenseket kizáró tulajdonsága is van.

Molekuláris bioszenzorok

In vivo membrán alkalmazások

In vivo szenzorok esetében a fém injekciós tűre kell felvinni a szenzor struktúrát; ilyenkor a tű anyagához igen jól tapadó polimerre van szükség. Erre a célra leginkább a poliuretán a megfelelő. Az alábbi ábra egy ilyen *in vivo* glükóz szenzor felépítését mutatja.

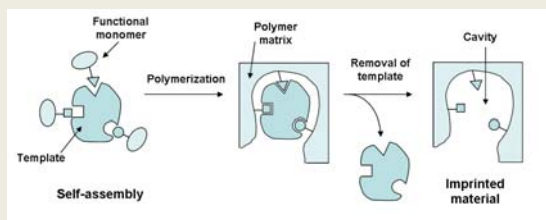
Az ilyen alkalmazásokban a vérrel szembeni biokompatibilitás is fontos szempont; erre a lágyított PVC membrán vált be a leginkább.



Molekuláris lenyomatok (molecularly imprinted polymers, MIP)

A molekuláris lenyomatok készítésének módszere

A legújabb molekuláris szelektivitású szenzorok receptorai/membránjai egy speciális, sok keresztkötéssel bíró makropórusos polimerben kialakított funkcionális üreget tartalmaznak, amelyek pl. az enzimekhez hasonlóan egyetlen, meghatározott orientációjú molekula megkötését teszik lehetővé. Ezeket hívjuk **molecularly imprinted polymer (MIP) anyagoknak**. A készítés folyamatát az alábbi ábrásor illusztrálja.

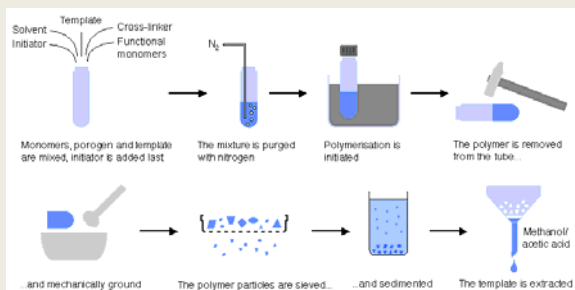
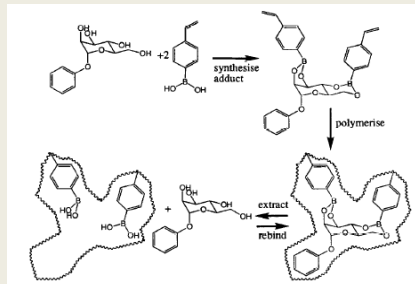


Első lépésként a templát molekulát kölcsönhatásba hozzák funkcionális monomerekkel (a majdani kötőhelyeket tartalmazó „horgonymolekulákkal”); a kölcsönhatás típusa lehet reverzibilis kovalens vagy reverzibilis nem kovalens (pl. H-híd, ionpár képzés, stb.) – az eredmény egy „önrendeződő komplex”. Ezután a monomert polimerizálják, majd a templátot kioldják a helyéről; ezzel kész az üreg. Ez az üreg később kiváló szelektivitással csak a templát molekulát fogja befogadni.

Molekuláris lenyomatok (molecularly imprinted polymers, MIP)

A molekuláris lenyomatok készítésének módszere

Kovalens imprint (lenyomat) készítése
fenil- α -D-mannozid számára
vinil-fenil-bórsav segítségével.



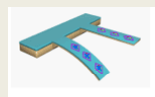
Egy imprint (lenyomat)
készítésének részletes
gyakorlati lépései.

Molekuláris lenyomatok (molecularly imprinted polymers, MIP)

A molekuláris lenyomatok használata szenzorokban

A korábban elmondottak alapján a MIP struktúrák sokféle módon felhasználhatók molekuláris szenzorok készítésére. Például:

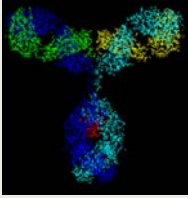
- vékony MIP membránok készíthetők, amelyek molekuláris szelektivitású transzportot biztosíthatnak
- optóda végén rögzítve az MIP réteget, fluoreszkáló templát (analit) esetén fluorimetriás detektálást lehet elérni
- kvarckristály mikroméregre vagy cantileverre (mikrokonzol) rögzíthető MIP receptor réteg a szelektív érzékeléshez (oldatban nem használható és érzékeny a nedvességtartalomra)



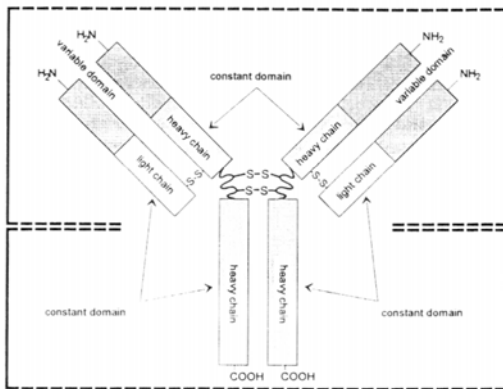
A MIP konstrukciójú (bio)szenzorok készítésének további kiaknázásának gátja jelenleg abban rejlik, hogy meg kell találni a megfelelő transzdukciós mechanizmusokat; ezek a fenti triviális eseteket kivéve nem egyszerűek. Kísérleteznek FET eszközökkel, elektrokémiai detektálással, surface plasmon rezonanciával, stb. Másik nehézség, hogy a szenzor felületét mérés után fel kell szabadítani...

Immunelemzés (immunoassay)

Az antitest-antigén kölcsönhatás



Az immunoglobulin G szerkezete (IgG, 150 kDa)



Antitest (antibody, Ab): a fehérjék egy igen fontos csoportja, amelyeket immunreakció során a szervezet termel. Feladata az antigént megkötni.

Antigén (Ag): a szervezetben az ellenanyag termelést kiváltó anyag, vagyis az antitestten megköthető makromolekula. Egy antigén mono- vagy multivalens is lehet.

Epitóp: Az antigén azon molekularészlete, amellyel az antitesthez kötődik. mérete kb. 2-5 nm³.

Haptén: Monovalens idegen molekula, amely tömege kisebb mint 3-5 kDa; ezek közvetlenül nem váltanak ki immunválaszt, csak ha egy kellően nagy fehérje hordozza őket.

Immunelemzés (immunoassay)

Az antitest-antigén kölcsönhatás

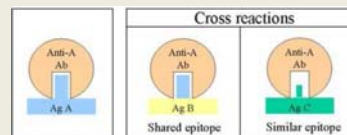
Az Ab – Ag kölcsönhatás egyensúlyi asszociációs reakció, amely természetére nézve nemkovalens jellegű (pl. elektrosztatikus, H-híd, van der Waals erők, stb.):

$$K = \frac{AbAg}{[Ab][Ag]} \approx 10^5 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$$

K értékének nagy volta miatt a kölcsönhatás praktikusán irreverzibilis. Szenzorikai alkalmazásokban elvben elengedhetetlen a reverzibilitás, hogy mind a növekvő, mind a csökkenő koncentrációk követhetők legyenek. Az antitest-antigén kölcsönhatás csak oly módon tehető kvázi-reverzibilissé, ha

- a kapcsolódó fehérjék szerkezetét megváltoztatjuk (pl. közeg pH vagy ionerősség változtatás)
- a megkötött partnert leszorítjuk egy még erősebben kötő komponenssel

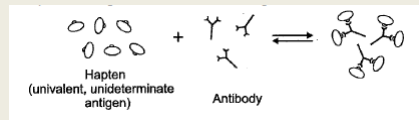
Nem elfelejtendő, hogy antitestek nem csak egyetlen antigénnel, hanem strukturálisan hasonló vegyületek (makromolekulák) hasonló epitópjaival is képesek kölcsönhatásba lépni, tehát **a kapcsolódás nem specifikus, csak igen nagy szelektivitású**. Ez előnyös is lehet, mert lehetővé teszi egy vegyületcsoportra egyszerre reagáló bioszenzorok létrehozását.



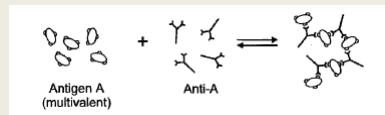
Immunelemzés (immunoassay)

Az antitest-antigén kölcsönhatás

An antitest-antigén kölcsönhatás folyamata elsődleges és másodlagos részfolyamatokra bontható. Az elsődleges reakció az epitóp(haptén) közvetlen bekötése, ami igen gyors (ms időtartam) és nem jár oldhatóságbeli változással. Tanulmányozása hapténekkal (amelyek monovalensek) egyszerű:



Másodlagos kölcsönhatás amiatt jöhet létre, hogy a legtöbb antigén multivalens, így egyszerre több antitesttel is kölcsönhatásba léphet; amelyek viszont több paratóppal is rendelkeznek, vagyis egy polimerszerű AbAg hálózat jöhet létre:



Ez a másodlagos reakció lassabb (percek-órákat igényel) és egy vizuálisan is megfigyelhető asszociátum képződésével jár (agglutináció vagy precipitáció).

Immunelemzés (immunoassay)

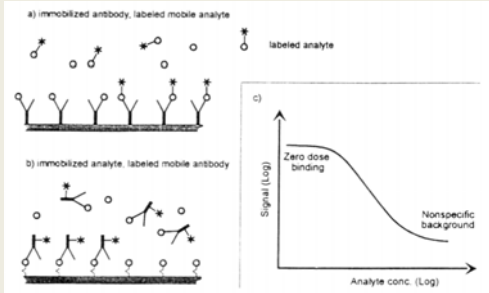
Az immunelemzés alapkoncepciója

Az immunelemzés főként az elsődleges Ab-Ag reakción alapul, bár léteznek a másodlagos folyamatokat kihasználó technikák is. Az immunelemzés során akár az antitestek, akár az antigének szerepelhetnek mérendő komponensként. A reakció analitikai felhasználása oly módon történik, hogy szilárd fázison immobilizáljuk az egyik partnert, amelyet a mérendő makromolekulát tartalmazó mintával hozzuk érintkezésbe. A kölcsönhatásra elegendő időt hagyva, majd a mintaoldat „feleslegét” lemosva a felületről az üresen maradt vagy az elfoglalt kötőhelyek számát (arányát) mérjük; mindkét mennyiség arányos a mérendő komponens koncentrációjával. A mérés során jelölt/címkézett (labeled) molekulákat alkalmazunk, amelyeket optikai vagy radiometrikus módon könnyen detektálhatunk.

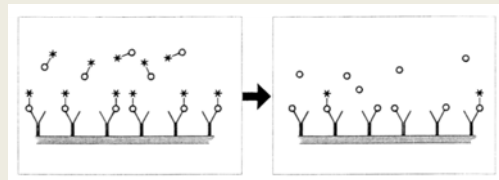
Alapvetően az immunelemzési eljárások két csoportja ismeretes; a „kompetitív” és a „nem kompetitív (szendvics)” módszer.

Immunelemzés (immunoassay)

A kompetitív immunelemzés



a) kompetitív immunelemzés alapesetei (ezek immobilizált vagy jelölt analitot igényelnek)



kiszorításos rendszerű kompetitív immunelemzés – ez a legpraktikusabb immunoszenzorokhoz

Az ún. kompetitív immunelemzésnél elvben a betöltetlenül maradt (pontosabban nem a mérendő által elfoglalt) kötőhelyek száma (aránya) adja a kalibrálható jelet.

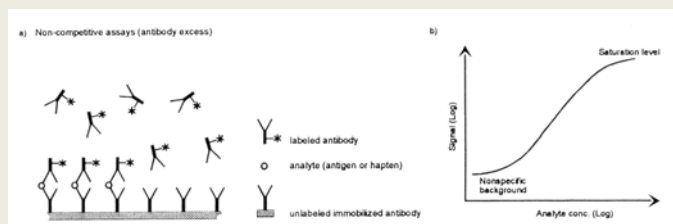
Ezt úgy kivitelezük, hogy a mérendővel azonos, de jelölt makromolekulákat adunk a mintaoldathoz, amelyek a mérendő makromolekulával versengve, koncentráció arányuknak megfelelően fogják elfoglalni a kötőhelyeket. A kontaktidő után a felületről lemossuk a nem kötött molekulákat és mérjük a jelölt molekuláktól származó jelet (pl. radioaktív vagy fluoreszcenciás sugárzás intenzitása), ami annál kisebb lesz, minél több kötőhelyet foglalt el maga a mérendő (jelöletlen) komponens.

Immunelemzés (immunoassay)

A nem-kompetitív (szendvics) immunelemzés

Egy antigén molekula felületének különböző részén többféle epitóp is előfordulhat; ezek is felhasználhatók az azonosításra és megkötésre. Ezt használja ki a „szendvics” elemzési módszer, amely a nem-kompetitív, vagyis a megkötött mérendő komponensek koncentrációjával arányos jelet szolgáltat.

A módszer lényege, hogy a már megkötött makromolekulához (legyen pl. az analit egy Ag antigén) olyan jelölt antitesteket (Ab_2^*) adunk feleslegben, amelyek meg tudnak kötődni rajtuk, de csak kizárólag az antitest-antigén (Ab_1 -Ag) komplexen, létrehozva az Ab_1 -Ag- Ab_2^* együttest. Ha ez sikerül, akkor a felesleges, nem kötődő Ab_2^* komponenseket lemosva, a mérhető jel nagysága a megkötött mérendő komponens számával, koncentrációjával (Ag) lesz arányos.



Immunoszenzorok

Az immobilizálás és a címkézés

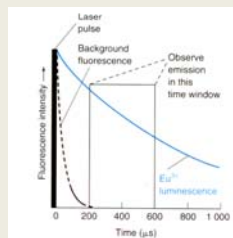
Immunoszenzoroknál az Ab kerül immobilizálásra általában, és ez kielégítő módon végrehajtható egyszerűen a molekula egy PS hordozón való adszorpciójával (pl. microtiter plate). Ezzel szemben immunoszenzoroknál ismételt használatra és esetleg az Ag rögzítésére van szükség, tehát más megoldások kellene:

- a rögzítés erősebb (általában kovalens)
- orientált rögzítés kell (pl. egy immobilizált „capture” fehérje ami az Ab F_c -jét köti)
- ha Ag kerül rögzítésre, egy „spacer” lánc (pl. C_6) is kell a hozzáférés biztosítására

A labelok immunoszenzoroknál a legtöbbször fluoreszcenciások, bár kezdetben radioaktív címkézést is használtak. Az érzékeny fluoreszcenciás méréshez a hasznos jelnek nagymértékben meg kell különböztethetőnek lennie a háttértől, vagyis lehetőleg:

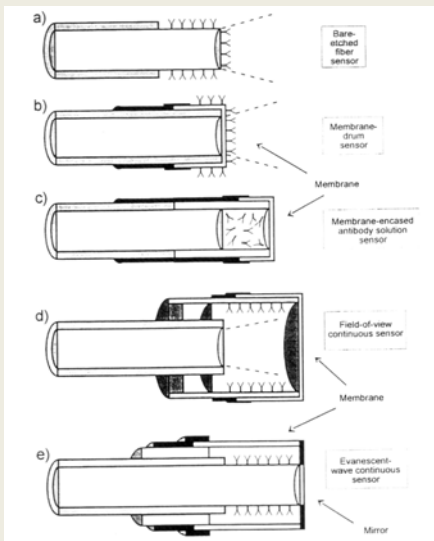
- az emissziós hullámhossz legyen 600 nm felett
- lassú lecsengésű fluoreszcencia legyen (min. 200 μ s)
- min. 50 nm Stokes shift a szórás csökkentésére

Az elérhető kimutatási határ kb. 10^{-9} - 10^{-10} M.



Száloptika alapú fluoreszcenciás bioszenzorok

A fizikai kialakítás alapelvei és módzatai



A legelterjedtebb fluoreszcenciás bioszenzorok száloptika alapúak (lásd ábrák). Az érzékelő réteget általában a szilika szálra kell rögzíteni, amit funkcionális szilánokkal (pl. aminopropil-trietoxi-szilán, ATS; mercapto-propil-trietoxi-szilán, MTS; stb.) érnek el.

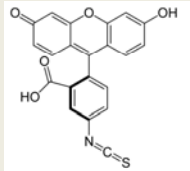
Az érzékeny fluoreszcenciás detektálás nagy gerjesztő fényintenzitást igényel, ezért gondot jelenthet a receptorok fotostabilitása. Erre megoldás lehet az evanescens hullámok felhasználása (pl. E típus), amikor direkt megvilágítás nem éri a receptort; illetve hogy ha rövid fényimpulzusokkal gerjesztünk.

A száloptika vége ezüst bevonattal látható el a reflektivitás fokozására. Ha a receptorok rögzítése előtt nanorészecskéket rögzítenek a száloptikára, akkor surface plasmon rezonancia (SPR), illetve fluoreszcencia kioltás jelensége is kihasználható.

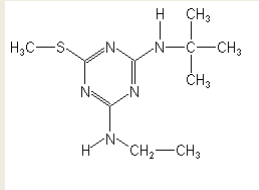
Száloptika alapú fluoreszcenciás bioszenzorok

Terbutryn (triazid-származék) növényvédőszer érzékelése

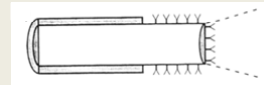
A triazid-származék növényvédőszer általában kis toxikusságúak, azonban jó indikátorai a vízben az egyéb növényvédőszer-maradványoknak. A detektálandó analitot (triazid) immobilizálták szilanizálással a lecsupasztított optikai szálvégen. FITC (fluorescein-izotiocianát) címkézett antitestekkel (K1F4 típus, triazidra specifikus) reagáltatták kompetitív immuelemzés során a mintaoldattal. Az FITC gerjesztése 495 nm-en, emissziója 525 nm-en történik. Az elért kimutatási határ 0.1 µg/L volt (ez megfelel a környezetvédelmi határértéknek), és a bioszenzort egymás után 200 alkalommal tudták használni oly módon, hogy az analit-Ab kötést minden mérés után glicin-HCl pufferrel vagy proteinázzal megbontották.



FITC



terbutryn



F.F. Bier et al., Sensors and actuators, B7, 1992, p509.

Száloptika alapú fluoreszcenciás bioszenzorok

Toxin mérése (α-bungarotoxin – kígyóméregben található fehérje)

Evaneszcens hullámokat és fluoreszcenciás detektálást alkalmaz a következő bioszenzor, amely nikotin-acetilkinin receptor (AcChR) érzékelő réteget tartalmaz. Ez a receptor egy membrán transzport fehérje, ami nagyon szelektíven köti meg az ACCh-t, illetve analógjait, mint pl. az α-bungarotoxint. Itt is kompetitív immuelemzést alkalmaztak az analit BTX és az FITC-vel jelölt BTX között. A kölcsönhatás itt azonban irreverzibilis, ezért a receptor réteget minden mérés után meg kell újítani.

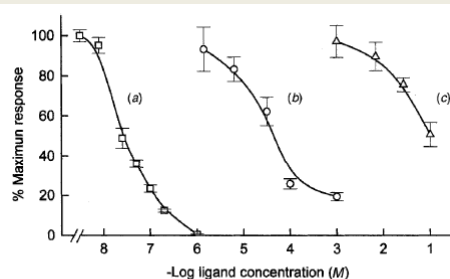
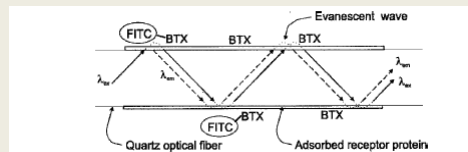


Figure 7.7. Calibration curves of relative fluorescence response against log concentration for three analytes at the fiber/AcChR/FITC-BTX sensor: (a) BTX; (b) tubocurarine; and (c) carbamylcholine. [Reprinted, with permission, from K. R. Rogers, J. J. Valdes, and M. E. Eldefrawi, *Analytical Biochemistry* **182**, 1989, 353–359. "Acetylcholine Receptor Fiber-Optic Evanescent Fluorosensor". Copyright © 1989 by Academic Press, Inc.]

Enzim termisztorok

Példák

Az enzimek működését jelentős entalpiaváltozás kíséri (ez pl. kataláz vagy glükóz oxidáz esetén 100-225 kJ/mol), ezért lehetőség van arra is, hogy a jelátalakítást hőmérsékletmérésre (termisztor esetén ellenállásmérésre) vezessük vissza. Az enzim termisztorokban egy termisztor enzimmel vonnak be, és annak hőmérsékletét és referencia termisztorhoz képest figyelik.

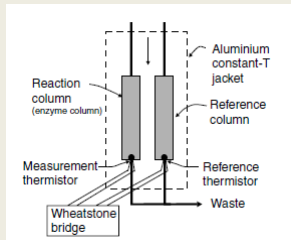


TABLE 7.1. Thermal Biosensors^a

Analyte	Immobilized Enzyme(s)	Conc. Range (mM)
Ascorbic acid	Ascorbate oxidase	0.05-0.6
ATP	Apyrase	1-8
Cellobiose	β -Glucosidase + glucose oxidase/catalase	0.05-5
Cephalosporin	Cephalosporinase	0.005-10
Cholesterol	Cholesterol oxidase + catalase	0.03-0.15
Creatinine	Creatinine iminohydrolase	0.01-10
Ethanol	Alcohol oxidase/catalase	0.01-2
Galactose	Galactose oxidase	0.01-1
Glucose	GO/catalase	0.001-0.8
Glucose	Hexokinase	0.5-25
Lactate	Lactate-2-monooxygenase	0.005-2
Lactate	Lactate oxidase/catalase	0.002-1
Lactose	β -Galactosidase + GO/catalase	0.05-10
Oxalic acid	Oxalate oxidase	0.005-0.5
Oxalic acid	Oxalate decarboxylase	0.1-3
Penicillin	β -Lactamase	0.01-500

Bioelektronikus szenzor

Immunelemzés B-limfocitákkal, fluoreszcencia kombinálása képalkotással

Ebben a szenzorban élő, mesterségesen módosított, különböző B-limfocita sejtek (amelyek felülete antitestekkel borított) található. A sejteket mesterségesen módosították, hogy midegyik más antigénnel lépjen reakcióba és beoltották az aequorin génnel is, ami miatt a sejt az Ab-Ag kötés létrejöttékor lumineszkál. A reakcióidő kb. 30 másodperc.

(1) Bioagents injected into cell culture liquid

(2) B-cell antibodies recognize bioagent antigens

(3) Biochemical signal amplification in B cell releases Ca^{2+}

(4) Ca^{2+} makes aequorin emit photons

(5) CCD-array detects glowing cells

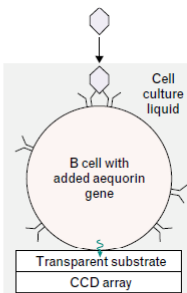


FIGURE 22. Principles of a bioelectronic identifying sensor using living B cells. B cells are genetically engineered so that their surface antibodies recognize bioagent antigens. The aequorin gene (which is what makes certain jellyfish glow) is also added to the B cells. When a bioagent antigen attaches itself to the engineered B cell, a biochemical amplification process results in the B cell emitting light. This light can then be detected by a CCD array.

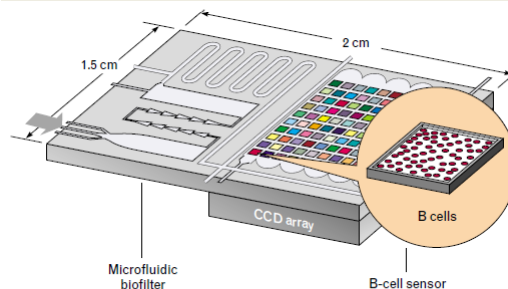


FIGURE 23. Schematic illustration of a bioelectronic identifying sensor. A microfluidic bioprocessor takes in a sample and purifies it for presentation to the measurement section. The measurement section comprises many patches of B cells, with the cells in each patch engineered to detect a particular bioagent. The bioagent is identified by observing which CCD element senses light output. Microfluidics in the measurement section brings nutrients to the B cells and carries waste products away.