

# Bioszenzorok

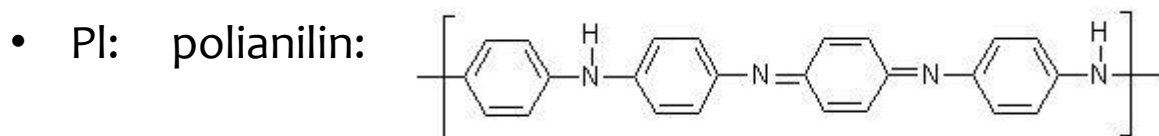
Váradí Márton

2. rész

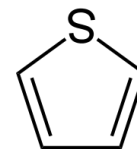
# Immobilizált vezető polimerek

↓  
ENZIMRÖGZÍTÉS

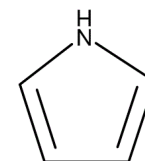
- *in situ* polimerizáció, elektrokémia indukálás



Tiofén:



Pirrol:



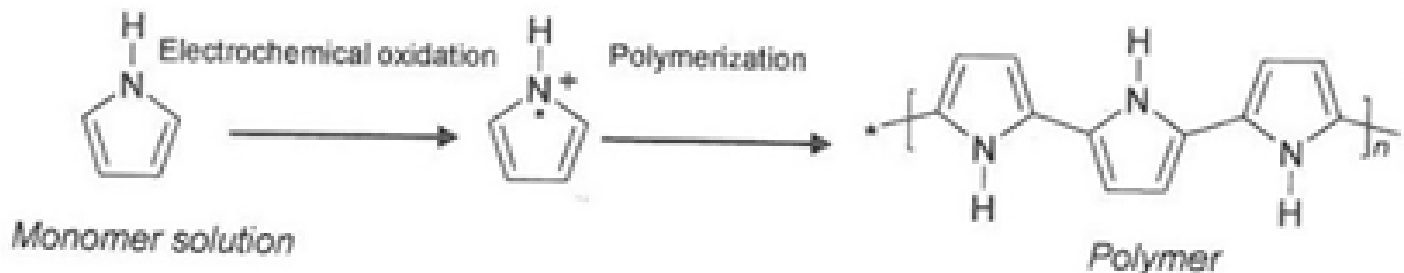
- Előnyök:

- Sokféle monomer, egyszerű elektród alapanyag
- Egyszerű, alap elektrokémiai műszerezettség

- Nehézség:

- Felületi polimer (monomer oldat) tulajdonságai -> reprodukálhatóság, cellageometria, elektród alapanyag, hidrodinamikai körülmények

Pirrol:



# Immobilizált vezető polimerek

**Az enzim molekula fizikailag beszorul a polimer mátrixba:**

- Könnyen kontrollálható, rugalmas, egyszerűen kivitelezhető technika
- Nagy enzimaktivitású töltetet eredményez
- Több enzim rögzíthető, több rétegen (csak a vezető polimerek!)
- Térben lokalizált enzimlerakódás (Elektród felületén, mikroelektródák)

**Példa: Pt elektród felületén -> Polipirrol + Glükóz-oxidáz csapdázás**

- Pirrol oxidációja, filmnövekedés ->  $\alpha$ - $\alpha'$  kapcsolás ( $\beta$ ->  $\beta'$ )

- Polimer nettó töltése pozitív -> tömbfázis anionokkal vegyül (töltés neutralitás)

# Immobilizált vezető polimerek

Összegezve a rögzített enzimeket (félvezető) polimerekben:

- Empírikus (lehetnek szigetelő/vezető polimerek: polifenol, polipiridin, polianilin...
- Immobilizációnak köszönhető változások:
  - kémiai környezet befolyásolja az aktív centrumot – fizikai változás (mátrix környezet)
  - diffúzió lassítja gátolja az enzim szubsztrát kapcsolatot
  - enzim konformációs mozgékonyága változhat
  - látszólagos aktivitás változhat
- Probléma:  
Egy pozitívan töltött polimer mátrix kizárja a protonokat, így az enzim aktivitásához szükséges pH nem feltétlenül lesz optimális (alacsonyabb pH!)

# Transzduktorok = “átalakítók”

## Jelátalakítók:

- energia
- elektromos impulzus

## Aspecifikus (Konduktometria)

- **Ionszelektív elektródok**  
( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  ...)

Az ionszelektív elektródok olyan **potenciometriás** érzékelők, melyek valamely ion aktivitásának többé-kevésbé szelektív meghatározását teszik lehetővé.

## Specifikus: Kitüntetett paramétereket mér

- Termisztor (reakció entalpia)
- Tömegváltozás  
(Piezoelektromos kristály oszcillátor)

## Amperometriás elektród ( $\text{O}_2$ , $\text{H}_2$ , $\text{O}_2$ )

Kontrollált egyenfeszültség mellett, két elektród között átfolyó áram erősségét mérjük. Ennek értékét az elektródokon (munka-referencia) lejátszódó elektrolízis határozza meg.  
Komponens koncentráció -> áramerősség az elektródon

# Transzduktorok = “átalakítók”

**Enzimes elektródokon három féle elektrokémia transzduktor:**

- **Konduktometriás** (nem specifikusak, gyenge jel-zaj arány)
- **Potenciometriás:**

Elektrolitoldatba merített elektródok felületén kialakuló elektródpotenciálok különbségének mérésén alapul. Az elektrokémiai cella (pl.: galváncella) egy indikátor- és egy referenciaelektródból áll, e két félcella közötti feszültséget mérjük, miközben áram nem folyik át a cellán :

- **Amperometria**

# Ionszelektív elektród (Potenciometria)

**Nerst-egyenlet:**

$$E = K + \left( 2.303 \frac{RT}{nF} \right) \log a_i$$

Ahol:

$E$  = a mért potenciál (V)

$R$  = 8,314 J/K \* mol

$T$  - (abszolút hőmérséklet; K )

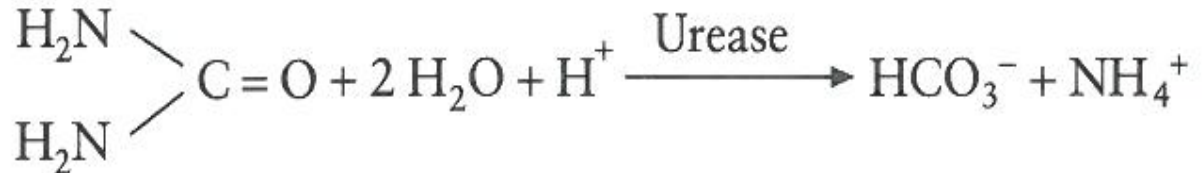
$n$  - az ion töltése

$a_i$  - a választott ion aktivitása

**$\Delta G$  (szabadentalpia változás) -> az iongradienssel, ami a membránon létrejön**

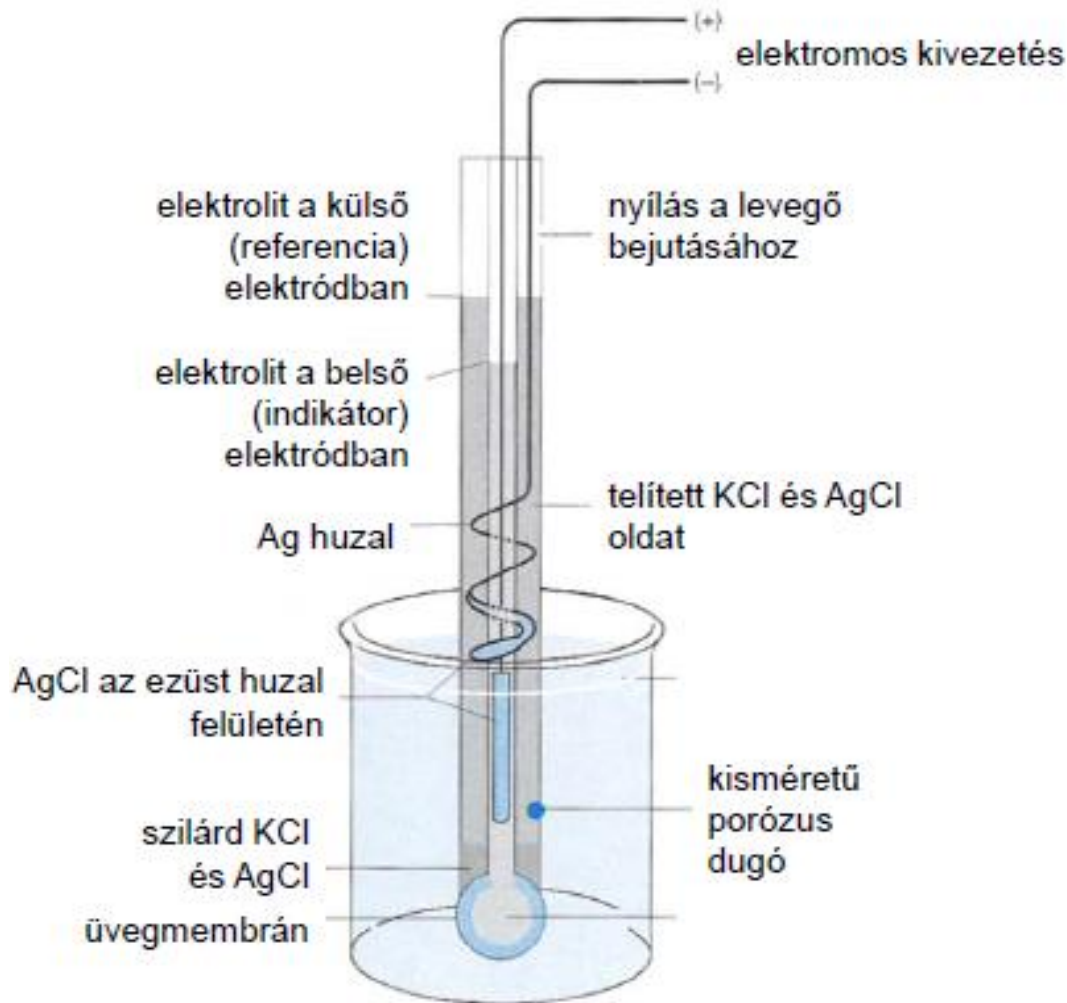
Pl:

**Karbamid mérés urázzal**



Amikor egy immobilizált enzim közel van az érzékelő fejhez, az enzimes reakció a kérdéses részecskével generál egy **változást a potenciálban**, az **ion felhalmozódás** vagy **elfogyasztás** következtében.

# Tipikus pH mérő (Ionszelektív elektród)



## Működés:

Az elektród aktív része a vékony ( $100\ \mu\text{m}$ ) speciális összetételű alumínium-szilikát ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{La}^+$ , ) üvegmembrán.

Ennek a membránnak, a mintaoldatbeli proton koncentráció határozza meg a potenciálját.

$$E = E_0 - 0.0591 \cdot \lg c_{\text{H}^+}$$

$$E = E_0 + 0.0591 \cdot \text{pH}$$



# Ion szelektív elektródok

Szubsztrát	Enzim	Ion-szelektív elektród
urea	ureáz	pH, NH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>
glükóz	glükóz oxidáz	pH, I <sup>-</sup>
L-aminosavak	L-amino acid oxidáz	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , I <sup>-</sup>
L-tirozin	L-tirozin dekarboxiláz	CO <sub>2</sub>
L-glutamát	glutmináz	kation
L-glutaminsav	glutamát dehidrogenáz	kation
L-aszparagin	asparagináz	kation
D-aminosavak	D-aminosav oxidáz	kation
penicillin	penicillináz	pH
amigdalín	B-glükozidáz	CN <sup>-</sup>
nitrát	nitrát reduktáz	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
nitrit	nitrit reduktáz	NH <sub>3</sub>

# Amperometria

## Definíció:

- **Kontrollált egyenfeszültség mellett, két elektród között átfolyó áram erősségét mérjük . Ennek értékét az elektródokon (munka-referencia) lejátszódó elektrolízis határozza meg.**
- **Az elektród potenciálja adja a hajtóerejét az elektrokémiai reakciónak.**
- **Potenciál változik: Reduktív (-) vagy oxidatív (+) elektród folyamatok dominálnak**

**A Faraday-féle áram:** egy direkt mérése az elektrokémiai reakciónak, amely az elektród felszínén valósul meg, és két dologtól függ:

- az adott ion fajtának az elektród felszínére való vándorlásától (anyagtranszport)
- a töltött felületek közötti elektron szállítás nagysága (töltés szállítás)

Faraday-törvény:

$$m = \frac{M}{z \cdot F} \cdot I \cdot t \qquad k = \frac{M}{z \cdot F}$$

# Amperimetriás enzim elektródok

## 1. Redox enzimeken alapulnak

Például: **glükóz-oxidáz**

Ez a fajta enzim osztály **katalizálja az oxidációját** többféle szubsztrátnak, mint például zsírsavaknak, cukroknak, aminosavaknak, aldehideknek, fenoloknak, oxigén felhasználásával, mint **elektronakceptor**.

**Termék:** Hidrogénperoxid -> detektálható amperimetrián.

**Limitáló tényező:** Oxigén fogyás -> mérhető (zárt térben!)

Az oxigén vagy a hidrogénperoxidon alapú elektródokat erősen befolyásolja az **oxigéntenzió helyi változása:**

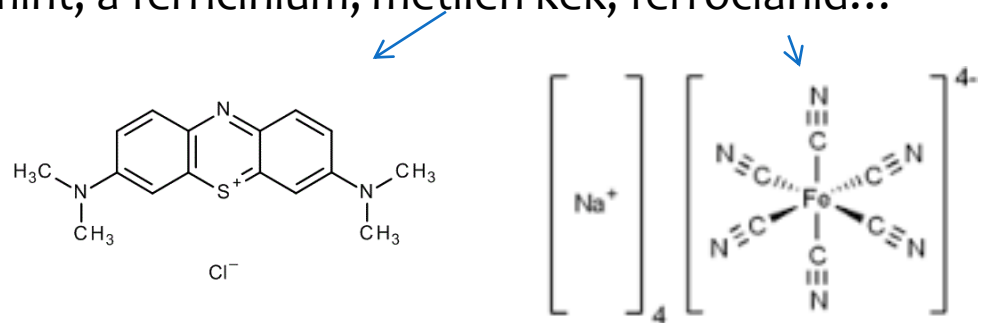
- pH-ban
- T
- ionerősség
- parciális nyomás változás

Emellett, a **hidrogénperoxid elektródák gyengéje**, hogy **interferálhat a jelük a nem-specifikus elektrokémiai oxidációkkal**, mint az aszkorbát, urea, glutation és cisztein.

# Amperometria

**Közvetítő = mediátor:**

Kémiaailag módosított elektródok, amelyeken az enzimek a természetes elektronakceptort használják (dioxidigént – molekuláris oxigént) Ezeket helyettesítették oxidálószerekkel (közvetítők, **mediátorok**) utánszatokkal mint, a ferricinium, metilén kék, ferrocianid...



A közvetítők felvihetők az elektródra:

- adszorpcióval, (biofilm, mögőzése -> elpárologtatás)
- kovalens kötéssel biopolimerekhez (carbon paste elektródák)
- kovalens kötéssel polimerekhez az elektród felületére
- in situ létrehozás az elektropolimerizáció alatt

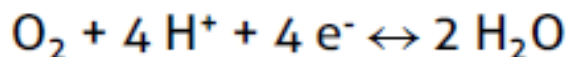
# Amperometria

Számos eszközt (szenzort) fejlesztettek ki ezen alapelv mentén. Ezek között szerepelnek az alábbi fontos gyakorlati alkalmazások:

- oldott oxigén mérése (Clark elektród)
- vércukorszint mérő bioszenzor
- toxikus gázok mérése

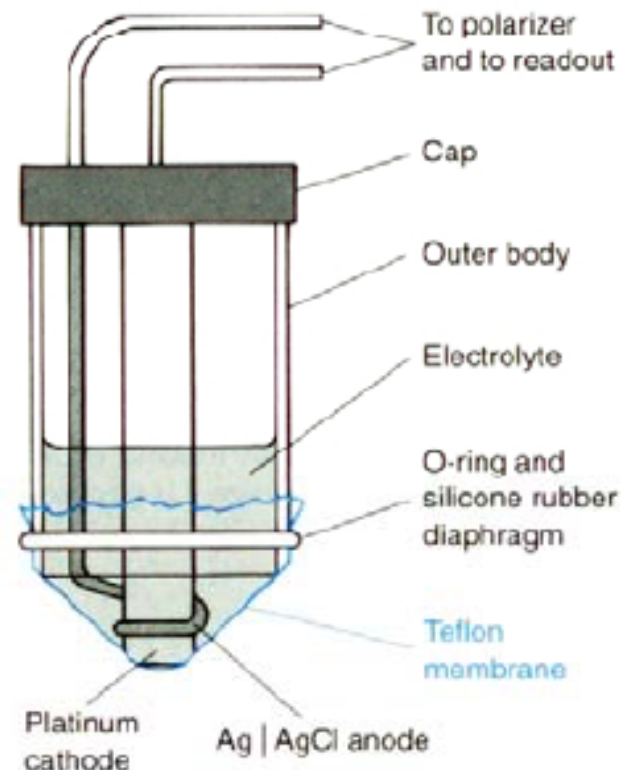
# Oldott oxigén mérése: Clark-módszer

Ebben a szenzorban  $-0.6\text{ V}$  potenciálon tartják a Pt elektródot a referencia Ag/AgCl elektródhoz képest. A félig áteresztő fluoropolimer membránon át percek alatt bediffundál az oxigén és a Pt katódon elreagál:



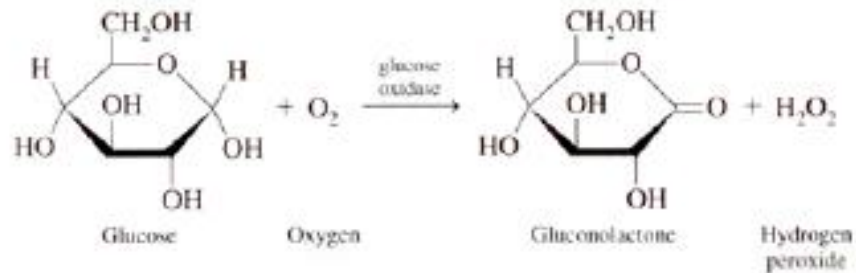
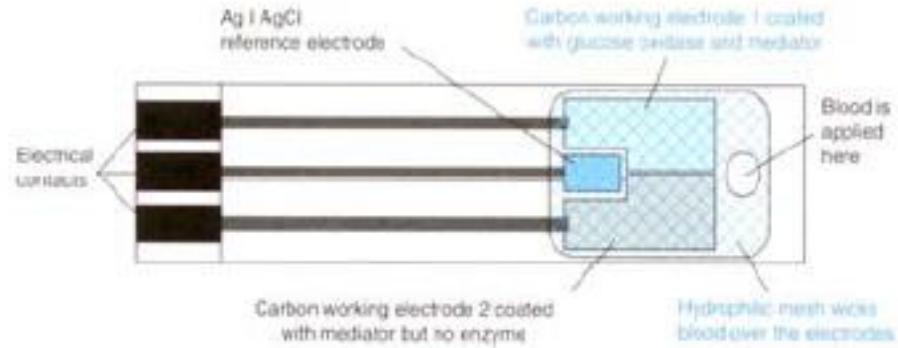
az áramerősség tehát az  $[\text{O}_2]$  függvénye.

Az eszköz miniatűr kivitelben is elkészíthető. Az orvostudományban használatos tipikus mérete kb.  $1\text{ mm}$ , (pl. újszülöttek légzésfunkcióinak ellenőrzése köldökzsinóron keresztül), de készítettek már ilyen mikroszenzort egyetlen sejten belül való mérésre is.

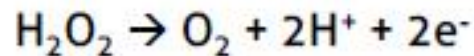


# Vércukorszint mérés

Enzim: Glükóz-oxidáz



A munkaelektrodát +0.6V potenciálon tartva az Ag/AgCl referencia elektróddal szemben a



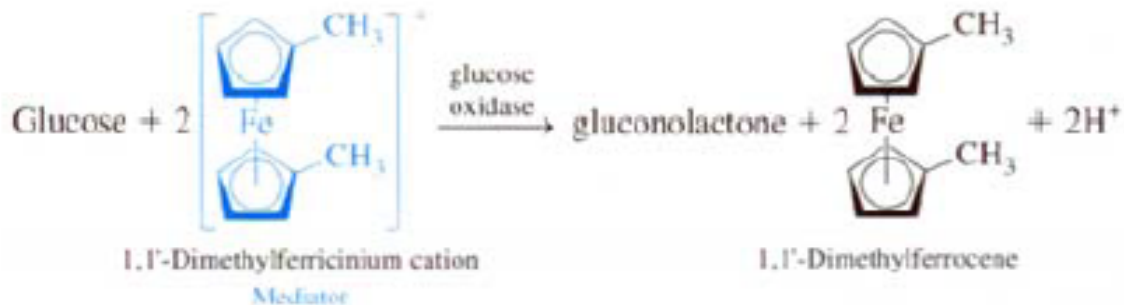
reakció miatt áram mérhető, ami arányos a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , végülis a glükóz koncentrációval.



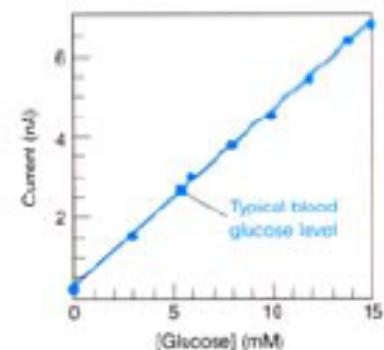
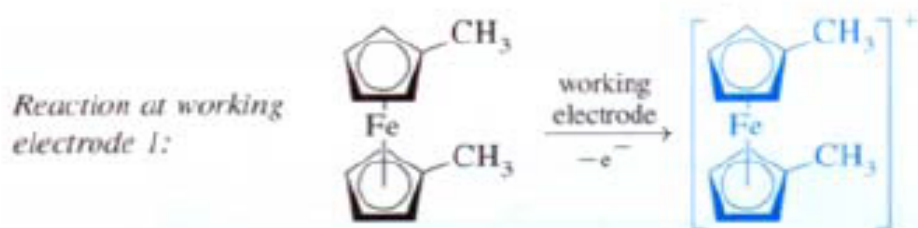
# Modernebb vércukorszint mérés:

Ezzel az első generációs konstrukcióval két probléma volt. Egyfelől a jel az oxigén koncentrációtól is függött, másfelől a működési potenciálon más anyagok, pl. aszkorbinsav, acetaminofén, stb. is oxidálódtak, vagyis mérési hibát okoztak. Emiatt ma már egy mediátor molekulát (dimetilferrocén) is tesznek az enzim mellé, ami szükségtelenné teszi az oxigén jelenlétét a reakcióhoz. A második problémát egy másik, enzimmel nem bevont munkaelektrod alkalmazásával (háttérjel) oldják meg. A meghatározási határ 2 fM, 30  $\mu\text{L}$  oldatban, vagyis kb. 36000 glükóz molekula.

Az enzim+mediátor rétegben lejátszódó reakció:



Reakció a munkaelektrodon (a mediátor regenerálódása):





# Termikus bioszenzor

Elvi alapja: enzimes **reakciók exoterm természeté.**

Ez a tény felhasználható arra, hogy adott mennyiségű **szubsztrát terméké alakulása kalorimetrikusan meghatározható** az enzimes reakciók során. A **moláris entalpia** az enzimkatalizált reakcióknál 5-100 KJ/mol értékek között változik.

A modern termisztorok: hőmérséklet mérését  **$10^{-4}^{\circ}\text{C}$**  pontosan.

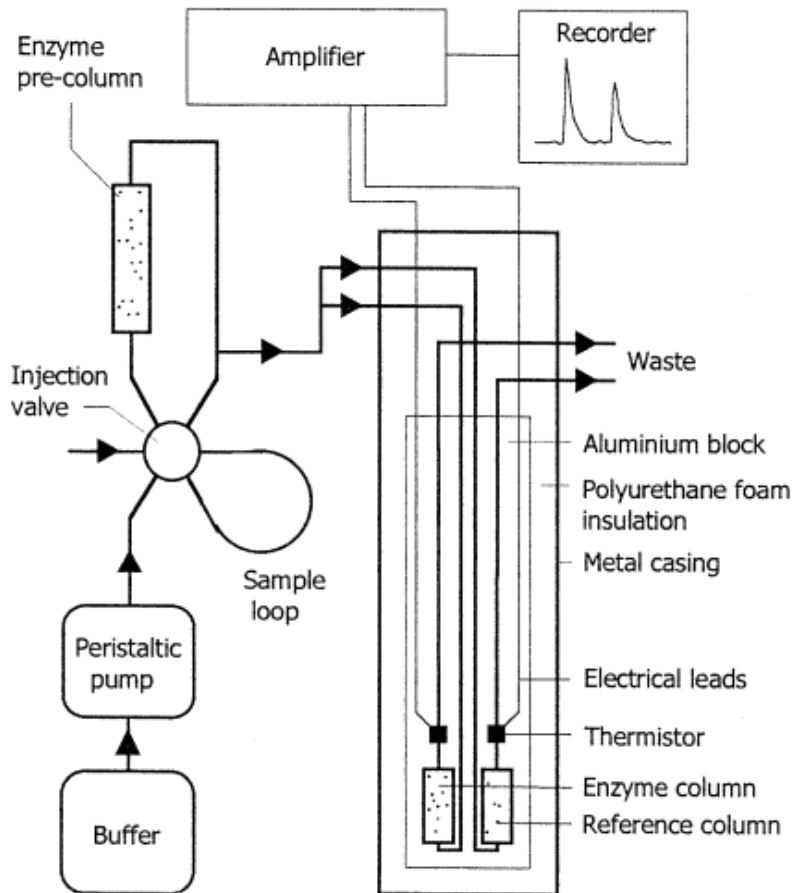
Mint az enzim az elektróddal, az enzim közvetlenül a termisztor felületére rögzített, keresztkötéssel vagy csapdázással.

Egy elrendezési alternatíva, ha az enzim helyére egy **hőmérséklet kontrollált „reaktor oszlopot”** helyezünk és a reakció hőjét mérve regisztráljuk a hőmérsékletkülönbségeket az oszlop „befolyó és kifolyó” között

Két hátrány:

- a nem-specifikus termikus hatások miatt **túlbecsülhető a szubsztrát koncentráció**
- alapvonal változás a **mérőberendezés hűtése** miatt (hűtő hatása miatt)

# Termikus bioszenzorok



- **Biokémiai folyamatokból eredő hőelnyelést vagy -fejlődést detektáljuk termisztorral.**
- **A mintát egy enzimoszlopon vezetjük át, a reakció által hőmérsékletváltozás történik.**

# Optikai bioszenzor

## Optikai változást mér:

- A glükóz oxidáz enzim adja a specifitást és a reakció monitorozható az optikai változásokból.
- **Például (Huang 1991):** leírt egy kemilumineszcenciás detektáló sémát, amelyet FIA használatával kötött egybe.
- **On-line** tudta vele vizsgálni a glükóz szinteket állatsejtes kultúrákban.
- Itt a **glükózt** átalakította az **immobilizált - glükóz oxidáz** és a keletkezett **hidrogénperoxid reagált luminollal** és az **emittált fényt mérték 425 nm-en.**
- Másoknak sikerült ezzel a módszerrel **glutamináz és glutamát oxidáz** használatával glutamin koncentrációját meghatározni.

# Optikai bioszenzor

**Szál-optikai megoldásokon** alapuló oxigénszenzorok szintén kapcsolhatóak glükóz oxidázon alapuló mérésekhez:

Az oxigén **optródok** általában szál-optikán alapulnak amihez hozzá van adva egy gumi film, amely tartalmaz **dekaciklánt** , fluorescens festéket, amely **reagál az oxigén parciális nyomására**.

**Szűrt mintákkal** valósítható meg a mérés, amelyet a immobilizált reaktor oszlopokon engedünk át, és az oxigén parciális nyomásának változása detektálható az optróddal.

# Összefoglalás

- A bioszenzorok **egyszerű és specifikus mérőeszközök**, amelyek használhatóak *in situ* és off-line technikáknál. (Optikai – on-line)
- A bioszenzorok válaszideje **elég gyors**, hogy lehetővé tegye a valós idejű adatgyűjtést és feldolgozást.
- Bioszenzorok **sokféle analitra** készíthetők.
- Még mindig elegendő érdeklődés van a kutatói közösségben, hogy biztosítva legyen a **szignifikáns fejlődés** a területen.
- A tömeggyártóktól megbízható technikák érhetőek el a bioszenzor eszközökhöz.
- A biológiai érzékelőelemek párosíthatóak többféle transzduktorral, aminek az eredményeként a végleges szenzorkonfiguráció méretre szabott a működési körülményekhez

# Köszönöm a figyelmet!

Kérdések:

- Mi az a vezető polimer?
- Mi az elve a Clark féle oxigén mérésnek?
- Mi az a mediátor?