

BIOSENSORY - SOUČASNÝ STAV A PERSPEKTIVY

PETR SKLÁDAL a LUMÍR MACHOLÁN

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Došlo dne 24.X. 1996

1. Úvod

Rozvoj přírodních věd ve druhé polovině dvacátého století se vyznačuje spoluprací vědeckých pracovníků často ze značně odlehlých odvětví. Názorným příkladem je biosensorika jako „horký bod“ chemické analýzy – progresivní interdisciplinární bioanalytický obor na rozhraní biologie, chemie, fyziky a matematiky; její aplikační výstupy zasahují do humánní a veterinární medicíny, do zemědělství, fermentačního, potravinářského a farmaceutického průmyslu i do životního prostředí a vojenství.

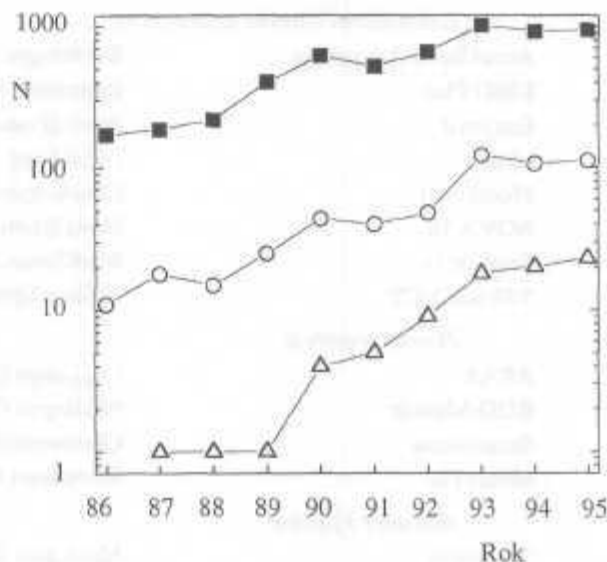
Biosensor lze definovat¹ jako přenosné analytické zařízení sestávající ze dvou základních komponent: z biologické složky, tzv. selektoru (enzym, protilátka, antigen, receptor, lektin, nukleová kyselina), která rozpoznává analyt našeho zájmu, a fyzikálního převodníku (transducer), který tuto biointerakci převádí na vhodný analytický signál; v principu tedy jde o konverzi biochemické informace na určitý druh fyzikální informace. Podle definice a klasifikace připravované IUPAC by se měly kromě „pravých“ biosensorů odlišit „bioanalytical systems“, které vyžadují při měření další operace (např. přidání reagentů), a „bio-probes“, které jsou buď pouze na jedno použití nebo nemohou sledovat koncentraci analytu kontinuálně².

Rozpoznávání analytu na úrovni interakce molekul už samo napovídá, že biosensory mohou být velmi přesné a miniaturní. Z původně laboratorní vědecké kuriozity se zájem o biosensory přesunul do oblastí obchodních kruhů a veřejného zájmu. To je důsledkem ohromného potenciálu těchto čidel pro revoluční změnu analytických postupů. Přednosti jsou zřejmé: vysoká selektivita, měření bez speciálních reagentů, rychlost analýzy, nízké náklady a snadná obsluha. Biosensory dnes už rozhodně nejsou popelkou

v oblasti základního výzkumu; lze to vypožorovat ze čtyř světových kongresů (Hong Kong 1990, Ženeva 1992, New Orleans 1994 a Bangkok 1996, příští je plánován v Německu na rok 1998), řady učebnic³⁻⁵ a monografií pokrývajících celý obor⁶⁻¹³, nebo specializované úseky¹⁴⁻¹⁷ i z existence samostatného mezinárodního časopisu *Biosensors and Bioelectronics* vycházejícího od roku 1985.

2. Historické souvislosti a současný stav

Výzkum na poli biosensoriky prošel od první zmínky o enzymové elektrodě¹⁸ již třemi dekádami vývoje a z několika renomovaných pracovišť se postupně rozšířil do celého světa. Z našeho průzkumu počtu publikací o biosensorech za posledních 10 let (obr. 1) je patrný rostoucí zájem o tento obor, i když se zdá, že je pomalu dosahováno „saturovaného“ stavu na hranici 1000 publikací za rok.



Obr. 1. Vývoj počtu publikací zaměřených na biosensory v posledním desetiletí. Na ose y jsou uvedeny počty prací v jednotlivých letech (N). Vedle celkového počtu jsou uvedeny i práce používající protilátky nebo nukleové kyseliny jako biorekogniční element. Zpracováno dle vlastní databáze a dle Science Citation Index; ■ - celkem prací, ○ - protilátky, △ - nukleové kyseliny

Zajímavá studie o vývoji biosensorů byla zpracována v rámci Evropské unie¹⁹. Zatímco v Evropě a Japonsku jsou dvě třetiny výzkumu prováděny na akademických pracovištích a zbytek v průmyslu, je v USA poměr opačný. Tomu odpovídá i počet udělených patentů, který je nejnižší v rámci Evropy a tradičně největší v Japonsku. Biosensoryvou technologii úspěšně rozvíjí i Rusko²⁰. Dá se odhadnout, že výzkumem v této oblasti se celosvětově zabývá přes 300 pracovišť.

U nás počátky rozvoje biosensorů spadají do počátku sedmdesátých let²¹. Postupně byla vyvíjena a zvládnuta biočidla elektrochemická (ampérometrická, potenciometrická a konduktometrická na MU Brno), na bázi optických vláken (VŠCHT Praha), buněčné biosensory (FN Plzeň) i termochemické systémy (CHÚ SAV Bratislava), v poslední době se rozvíjí i piezoelektrické systémy (MU Brno).

O některých typech bylo již referováno v Chemických listech dříve²²⁻²⁵ další připravované práce se budou zabývat studiem bioafinitních interakcí pomocí biosensorů²⁶ a aplikacemi v nevodném prostředí²⁷.

V minulých dvou desetiletích byl zájem soustředěn především na biokatalytické systémy pro stanovení biologicky významných nízkomolekulárních látek v klinické praxi s použitím enzymů ve spojení s elektrochemickými sensory - hlavně potenciometrickými a amperometrickými elektrodami. Stimulujícím faktorem byla potřeba rychle a spolehlivě sledovat hladinu glukosy u diabetiků; přes dosažené pokroky a komerčně úspěšné systémy (tab. I) tento problém dodnes není zcela dořešen. V posledních několika letech se pozornost předních vědeckých pracovišť přesouvá k bioafinitním systémům, založeným na vysoce specifických vazebných interakcích biomolekul, zejména protilátek s od-

Tabulka I
Komerčně dostupné biosensory

Název	Firma	Analyty
<i>Osobní glukometry</i>		
GlucoPen, Companion	MediSense (USA)	glukosa
GlucoCard	Kyoto Daiichi (Japonsko)	
ELITE Sensor	Bayer Diagnostics (Německo)	
<i>Laboratorní klinické analyzátoary</i>		
AccuCheck Advantage	Boehringer (USA, Německo)	glukosa +
EBIO Plus	Eppendorf/ BST (Německo)	laktát, citrát, askorbát,...
Enzymat	Seres (Francie)	sacharosa, alkohol,...
i-Stat	I-Stat Corp. (USA)	močovina
Model 860	Ciba Corning (USA)	
NOVA 16	Nova Biomedical (USA)	močovina, kreatinin
Satellite G	MediSense (USA)	
YSI SELECT	Yellow Springs Instruments (USA)	laktát, etanol, cholin,...
<i>Životní prostředí</i>		
ARAS	Dr. Lange (Německo)	BOD
BOD-Module	Medingen (Německo)	BOD
SmartSense	Ohmicron (USA)	pesticidy
Midas Pro	Biosensori (Itálie)	množství bakterií
<i>Nukleové kyseliny</i>		
Threshold	Molecular Devices (USA)	
<i>Afinitní systémy</i>		
BIAcore, BIAlite	Pharmacia (Švédsko)	protilátky, antigeny
BIOS	ASI (Švýcarsko)	
IASys	Fisons (Velká Británie)	
PZ 108	Universal Sensors (USA)	

povídajícími antigeny a hapteny. Využívají se převážně integrované optické systémy na bázi světlovodů, biochemické interakce se vyhodnocují ze změn při odrazu a vedení světla na fázových rozhraních. Začíná se prosazovat miniaturizace a komerční produkce biosensorů. Vedle medicíny se uplatnění nachází při ochraně životního prostředí a zájem se upírá i na potravinářský průmysl.

3. Nové trendy nanášení prostřednictvím

Některé směry pro další výzkum byly navrženy ve zmíněné zprávě EU¹⁹. Výzkum by se měl soustředit na problémy spojené s miniaturizací sensorů, dále pak na výrobní techniky, přípravu a chemickou modifikaci povrchů matric a sensorů, vývoj nových materiálů, značení a přípravu konjugátů, proteinové inženýrství, hledání nových enzymů, stabilizační postupy, biokompatibilitu, kinetiku a modelování, neinvazivní monitorování, interakce na rozhraních, chemické procesy v pevné fázi a chemometrii. V tomto přehledu se pokusíme shrnout perspektivní trendy pro obě výše zmíněné konstrukční součásti biosensorů.

3.1. Fyzikálně-chemický převodník

Složka biosensoru poskytující snadno měřitelný signál zaznamenala v poslední době značné změny díky uplatnění nových technologických postupů z oblasti mikroelektroniky – sítotisku a litografie²⁸. Sítotisková technika (thick film technology)²⁹ spočívá ve vytváření žádaných geometrických tvarů na zvoleném podkladovém materiálu (plast, keramika) nanášením vhodných past tiskem přes odpovídající matrice (síta). Takto získaná vrstva je stabilizována (odstranění těkavých složek pasty vysušením, ev. spojení materiálů vypálením) a proces se může opakovat nanášením dalších vrstev. Připravují se tak především elektrochemické biosensory – elektrodové systémy s přívodními kontakty, izolací a biokatalytickou vrstvou – integrované na společném podkladu³⁰. Velmi snadno lze takto připravovat chemicky modifikované grafitové elektrody; vhodné pasty existují dnes i pro nanášení enzymů^{31,32}. Zařízení pro sítotisk (firma DEK) nejsou příliš nákladná a začínají být běžně používána na pracovištích vyvíjejících elektrochemické biosensory komerčně.

Litografické techniky (thin film technology)³³ využívají křemík jako základní podkladový materiál. Pro vytváření vhodných struktur sensorů se používají termální procesy, nanášení kovových materiálů (Pt, Au) pomocí plazmy nebo

iontových svazků, naprašování, odleptávání a odpařování. Výhodou oproti sítotisku je možnost použít zcela čisté kovy, povrchy jsou velmi homogenní a dosažitelné odstupy segmentů jsou v oblasti mikrometrů. Snad nejnámější v této souvislosti jsou iontově selektivní polem řízené tranzistory (ISFET)^{34,35}, které se používají zejména jako miniaturní náhrada klasických pH elektrod. Byly vyvinuty i planární sensory typu Clarkova kyslíkového článku³⁶. Depozice biovrstev dosud není uspokojivě vyřešena³⁷, používá se fotorezistů³⁸, perspektivní se jeví inkluze do elektropolymerovaných vrstev, využití sponatánní adsorpce pro tvorbu molekulárních filmů event. překrytí adhezivními umělohmotnými membránami.

Obdobné techniky (mikrofabrication)^{39,40} se používají k přípravě prostorových struktur. Lze tak vytvářet např. komůrky, poskytující definované prostředí pro inkorporovaný bioelement⁴¹, jinou možností je konstrukce mikrokanálek pro průtočné biosensory integrované na křemíkovém čipu⁴². Existují snahy integrovat na křemíkový čip průtokovou injekční analýzu⁴³ i kapilární elektroforézu⁴⁴, byly vyvinuty i mikromotory⁴⁵ a mikropumpy⁴⁶. V poslední době se mikroelektronické postupy používají i k přípravě integrovaných planárních světlovodů, na nichž jsou založeny optické afinitní biosensory⁴⁷. Výhodami miniaturních (bio)sensorů⁴⁸ jsou minimální objem vzorku a potřebných chemikálií (lze použít velmi drahé reagenty), rychlost analýz a přenosnost zařízení.

Další zmenšení funkčních elementů biosensorů až do oblasti kolem 10 nm (nanotechnology) by mohlo být dosaženo prostřednictvím nových mikrozobrazovacích technik založených na tunelovém efektu (scanning tunnelling microscopy, STM) a meziatomových silách (atomic force microscopy, AFM)⁴⁹. Zatímco klasický elektronový mikroskop se na vzorek „dívá“, tyto techniky ho „osahávají“ a poskytují tak cenné informace o jeho trojrozměrné struktuře. Přes zkoumaný povrch se přejíždí dotykovým hrotem (velikost kolem 5 μm) umístěným na výkyvném raménku. Jakmile se hrot přiblíží k povrchovým molekulám, uplatní se odpudivé síly a přenosem síly dojde k vychýlení nosného raménka, které se zaznamená. Další modifikace této techniky lze nalézt v literatuře^{50,51}. Zejména AFM, která se dá použít i pro vzorky v roztoku, je vhodná pro přímé sledování jednotlivých molekul enzymů či protilátek imobilizovaných na povrchu sensorů^{52,53}. Lze sledovat interakce jednotlivých volných biomolekul, např. vznik komplexu mezi fosforylasou a kinasou a fosforylasou b⁵⁴ nebo vazbu RNA polymerasy na DNA⁵⁵. Pokud se jeden z interagujících partnerů naváže na povrch hrotu, je možné přímo

měřit mezimolekulové síly v průběhu biorekogničního procesu a následné vazby, jak bylo demonstrováno na páru biotin - avidin a při tvorbě dvojité šroubovice mezi komplementárními úseky DNA⁵⁶. Začíná se také zkoumat využití těchto technik při modifikaci povrchů^{57,58}, což by mohlo umožnit umístění biomolekul na povrchu sensorů s dosud nepředstavitelnou přesností.

V posledním desetiletí proběhly hluboké změny na poli afinitních biosensorů. Pro jejich konstrukci lze využít postupy známé u biokatalytických sensorů - jeden z reakčních partnerů se vhodně označí (enzymem nebo fluoreskující molekulou), následuje inkubace biosensoru se vzorkem, promytí a nakonec se změří enzymová aktivita zachycená na citlivém povrchu nebo intenzita fluorescence. Vlastní pracovní formáty jsou obdobné jako u klasických imunochemických metod (ELISA); takto fungují nepřímé afinitní sensory.

Zásadně novým experimentálním přístupem bylo přímé sledování bioafinitních interakcí v reálném čase bez nutnosti značení. Výzkum na tomto poli začal ve Švédsku koncem 70. let, vycházelo se z elipsometrických studií adsorpce bílkovin na pevné povrchy⁵⁹. V roce 1984 tento výzkum přešel pod firmu Pharmacia, kde byla vytvořena divize biosensorů a konečně v roce 1990 byl uveden na trh první přístroj BIAcore. Ten je založený na rezonanci plazmonů na rozhraní kov / dielektrikum, vznikající při totálním odrazu světla dopadajícího na toto rozhraní (surface plasmon resonance, SPR). Při určitém rezonančním úhlu dochází k maximálnímu přenosu energie fotonů na elektrony v povrchové vrstvě kovu (plazmony), což se projeví snížením intenzity odraženého světla. Při navázání biomolekul na kovové vrstvě pak dochází k posunu tohoto minima, což umožňuje sledovat rychlost vazebných dějů⁶⁰. Mimo klasického analytického stanovení koncentrací analytů je s pomocí těchto technik možné získat časový průběh interakcí biomolekul - provádět kinetické studie a určovat kinetické parametry (rovnovážné a rychlostní konstanty) pro sledované děje^{26,61}.

Přístroj BIAcore zaznamenal značný úspěch a stimuloval další rozvoj v této oblasti. Je vyvíjena celá řada optických transducerů založených na interakci tlumené exponenciální vlny (evanescent wave, vznikající při totálním odrazu světla vedeného světlovodem) s okolním prostředím^{24,62,63}; používané principy zahrnují totální vnitřní reflexní fluorescenci (TIRF), vstup nebo výstup světla do/ze světlovodu přes mřížku (integrated optical grating couplers, IOGC), integrované optické interferometry, reflektometrické interferenční spektrometry (RIFS) a rezonanční zrcátka (RM).

Některé z těchto systémů jsou dnes dostupné i komerčně (tab. I). V současnosti jsou však přímé optické biosensory velmi nákladná zařízení vhodná pouze pro laboratorní použití, nicméně přenosné systémy se také očekávají.

Cenově dostupnější jsou dnes piezoelektrické biosensory (o jeden až dva řády levnější než optické) u nichž změna rezonanční frekvence závisí přímo na hmotnosti biomolekul navázaných na citlivý povrch^{22,64}. Lze použít běžně dostupné piezoelektrické řezy z křemenných krystalů nebo planární vrstvy z piezoelektrických keramických materiálů; ty umožňují pracovat při vyšších frekvencích (surface acoustic wave, SAW; acoustic plate mode, APM) a dosáhnout tak vyšší citlivosti.

3.2. Biorekogniční elementy

Převládající biospecifickou složkou jsou doposud enzymy, z nichž pak je zdaleka nejužívanější glukosa oxidasa (β-D-glukosa:kyslík 1-oxidasa, EC 1.1.3.4)⁶⁵. Dosud ne zcela dosaženým cílem je přímá elektrická komunikace mezi bílkovinou a fyzikálním převodníkem. Tento problém je reprezentován nejčastěji přenosem elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou⁶⁶. Přímý přenos není snadno realizovatelný vzhledem k velkým vzdálenostem které musí elektrony překonat. Byl pozorován v případě menších biomolekul, např. cytochromu c⁶⁷ nebo peroxidasy⁶⁸.

K přenosu elektronů z enzymů se dosud používají nejrůznější postupy; nejběžnější je použití kyslíku jako kósubstrátu resp. peroxidu vodíku jako produktu u oxidas, NAD(P)H je detegován jako produkt reakcí dehydrogenas. Bezreagenční sensory se konstruují s pomocí umělých mediátorů přenosu elektronů přímo začleněných do systému biosensoru; téměř ideálním a nejznámějším mediátorem je ferrocen⁶⁹. Velmi rychlého přenosu lze dosáhnout imobilizací enzymů v polymerech s mediátory zakotvenými v postranních řetězcích^{70,71}. Dalším zlepšením je zachycení enzymů ve vodivých polymerech připravených elektropolymerací, z nichž nejznámější je bezpochyby polypyrrol^{72,73}. Také do vodivých polymerů lze zavést mediátorové skupiny, ferrocen⁷⁴ či komplexy osmia⁷⁵. V těchto případech mohou elektrony snáze přeskakovat z aktivního centra přes vázané molekuly mediátoru (relays; wired enzymes) až k povrchu elektrody. Mediátory lze kovalentně navázat i přímo na molekulu enzymů⁷⁶. V budoucnu se bude stále více vycházet ze známé krystalografické struktury enzymů. Již dnes lze teoreticky „plánovat“ kudy může elektron v biomolekule nejsnáze projít a podle toho pak enzym orientovaně navázat na elektrodový povrch⁷⁸.

Využití nukleových kyselin na poli biosensorů začíná narůstat až v poslední době^{79,80} (obr. 1) s rostoucí potřebou stanovovat oligonukleotidové sekvence bakteriálního, virového nebo lidského původu v klinické praxi⁸¹. S postupem sekvenace lidského genomu se také objevují nové sekvence odpovědné za vrozené poruchy. K jejich detekci je nutné dosáhnout vysoké citlivosti; uvážíme-li délku lidské DNA (6×10^9 párů bází), pak v 1 ml krve (cca 8 milionů bílých krvinek) lze očekávat pouze cca 12 attomolů analytu⁸²! Naštěstí lze množství hledané sekvence znásobit (40 až 2000x) použitím polymerasové řetězové reakce (PCR metody)⁸³ a tak dosáhnout meze detekce dnes běžných převodníků. Biorekogniční reakce spočívá v hybridizaci imobilizované próby (min. 16 nukleotidů dlouhé) s komplementární sekvencí analytu v roztoku. K průběžnému sledování tohoto procesu lze obecně využít metodiky přímých afinitních biosensorů, např. SPR⁸⁴ nebo SAW⁸⁵. Vytvoření dvojité šroubovice se projeví také na voltametričtých křivkách DNA⁸⁶ nebo lépe při chronopotenciometrické detekci⁸⁷. Větší citlivosti lze dosáhnout využitím elektrochemicky aktivních látek interagujících specificky s dvouvláknovou DNA. Nejčastěji se používá komplex $[\text{Co}(2,2'\text{-bipyridyl})]^{3+}$ ref. ⁸⁸, dále lze zmínit akridinovou oranž, daunomycin a jiné interkalační látky⁸⁹. Obdobně se uplatňují ve spojení s optickými vlákny fluorescenční značky⁹⁰. Pokud se použije dvouvláknová DNA jako rekogniční element, lze stanovovat toxické látky interagující s její strukturou; opět je možná elektrochemická detekce⁹¹ nebo použití optických vláken ke sledování kompetitivně vytěšňovaného ethidium bromidu⁹².

Mikroelektronické postupy se v této oblasti prosazují prostřednictvím sekvenování hybridizací se souborem oligonukleotidů vázaných na křemíkovém čipu⁹³. Namísto interakce s jedinou próbou je vzorek DNA hybridizován s úplným souborem oligonukleotidů (délka 6 až 20 bází) obsahujícím všechny možné kombinace; tak např. pro $n=8$ bylo cca 65000 prób imobilizováno na čipu 13 x 13 mm. Pozitivní navázání DNA v dané pozici se deteguje obvykle opticky, používají se fluorescenční značky a CCD kamera jako detektor. Zkoumaná sekvence se zrekonstruuje na základě překrývajících se sekvencí prób. Oproti klasickému postupu využívajícímu elektroforetickou separaci by se mělo dosáhnout mnohonásobného zrychlení. Definované umístění prób na čipu se dosahuje syntézou na místě buď pomocí fotolitografie (vyžaduje velké množství masek)⁹⁴ nebo „ink-jet“ technikou; ta je technicky mnohem jednodušší, princip je obdobný jako u inkoustové tiskárny, používají se čtyři trysky s jednotlivými nukleotidy⁹⁵.

Značný pokrok byl zaznamenán na poli imunochemických biosensorů – imunosenzorů^{23,96-98}. Protilátky jsou jako biorekogniční element velmi univerzální, potenciálně je lze připravit proti libovolné chemické struktuře. Od polyklonálních protilátek se přechází k monoklonálním⁹⁹, které jsou homogenní a lze je snadněji připravit ve větším množství v tkáňových kulturách. Dalšího zlepšení bylo dosaženo využitím technik genetického inženýrství k produkci rekombinantních protilátek¹⁰⁰. Fab a Fv fragmenty molekuly IgG se produkují v bakteriálních, kvasinkových nebo savčích buňkách transformovaných vnesením části řetězců DNA kódující výchozí protilátku. Fv fragment tvořený vazebnými doménami V_H a V_L je vlastně nejmenší molekula reprezentující vazebné místo imunoglobulinu; obě domény lze případně spojit krátkou sekvencí (linker) a získat tak jeden peptidový řetězec (single chain Fv, scFv)¹⁰¹. Přípraveny byly i heterodimery nesoucí dvě různá vazebná místa (diabodies)¹⁰². Výhodou oproti celým protilátkám jsou menší nespecifické interakce (malá molekula scFv) a větší stabilita (odolnost k proteinasám). Obecným problémem je zatím vysoká cena přípravy.

Velmi pevná interakce při tvorbě imunokomplexů může být někdy nežádoucí komplikací. Jsou konstruovány levné imunosenzory na jedno použití, pro spolehlivost je výhodné přidat k vlastnímu sensoru paralelní sestavu pro kalibraci¹⁰³. Vysoké citlivosti dosahují nepřímé imunosenzory využívající enzymové nebo fluorescenční značky, obvykle je však třeba provádět promývání a separační kroky. Nadějným se jeví fluorescenční systém využívající plnění kapilaritou (fluorescence capillary fill device, FCFD)¹⁰⁴; spojuje malé nároky na obsluhu (homogenní stanovení) s možností masové produkce. Přímé imunosenzory (BIAcore) dosahují nižší citlivost, pro úspěšnou funkci je navíc nutná regenerace rekogniční vrstvy nutná pro opakované použití poměrně drahých biosensorových čipů.

Již dnes existuje řada pokusů použít v biosensorech zcela uměle připravené rekogniční elementy. Technika molekulárních „otisků“ (molecular imprinting)^{105,106} spočívá v polymeraci vhodných monomerů v přítomnosti ligandu (analytu), který má být rozpoznáván. Ve struktuře polymeru se tak specifickým uskupením postranních funkčních skupin monomerů vytvoří kolem ligandu vazebné místo držené pohromadě strukturou polymeru i po uvolnění ligandu („zapamatování“). Takto získané „umělé protilátky“ jsou již dnes uplatňovány na poli biosensorů¹⁰⁷.

Pro konstrukci rekombinantních protilátek se mohou použít mimo původní nukleotidové sekvence odvozené z monoklonální protilátky i sekvence z knihovny DNA,

která se získá náhodnými mutacemi sekvencí odpovídajících výchozím vazebným místům. Po expresi těchto knihoven v bakteriích následuje hledání protilátek s žádanými vazebnými vlastnostmi^{108,109}. Podobnými kombinatorními postupy však lze produkovat přímo peptidová vazebná místa pro daný ligand. Vychází se z velkého souboru (chemická knihovna)¹¹⁰ různých polypeptidových řetězců, mezi nimiž se vyhledají ty, které interagují s ligandem¹¹¹. Obdobně je možné dokonce konstruovat vazebné molekuly tvořené polynukleotidovým skeletem¹¹².

4. Potenciální oblasti Uplatnění

Prvním komerčním biosensorem z roku 1972 byla enzymová elektroda pro laboratorní měření hladiny krevní glukosy od firmy Yellow Springs Instruments. Dalším mezníkem bylo uvedení osobního glukometru GlucoPen ExacTech pro diabetiky firmou MediSense v roce 1987. V současnosti již jde o desítky společností, které uvedly na trh biosensory pro celou řadu dalších analytů. Mezi předními producenty jsou firmy Yellow Springs Instruments (Ohio, USA), Fuji Electric (Tokyo), MediSense (USA), Seres (Francie). Do programu biosensorů jsou zapojeny i vyhlášené mezinárodní firmy jako Ciba-Geigy, Hoffman-La Roche, Abbott Laboratories (nedávno převzal kontrolu nad MediSense), Pharmacia, Eppendorf. Zatím největšího rozšíření a komerčního úspěchu dosáhly osobní glukometry Pen 2 a Companion 2 (MediSense). Roční prodej dnes představuje 180 milionů USD, což je asi 10 % celosvětových nákladů na stanovení glukosy. Přehled některých komerčních systémů podává tabulka I.

Možnosti rutinního uplatnění biosensorů lze v současnosti nalézt v následujících oblastech¹¹³. Největší pole použití je nesporně v klinické diagnostice. Převážnou část reprezentují *in vitro* stanovení prováděná v centralizovaných nemocničních laboratořích; jedná se o velmi lukrativní trh představující roční objem 9 mld USD, k dispozici je dnes již řada biosensorových systémů. Decentralizované uplatnění biosensorů zahrnuje přímo ordinaci lékaře, nemocniční pokoje, operační sály a sportovní medicínu; je znesnadňováno vyššími ekonomickými náklady a administrativními překážkami. Uživatelské aplikace určené široké veřejnosti budou vždy limitovány, výjimkou jsou osobní glukometry diabetiků, těhotenské testy, případně stanovení alkoholu. *In vivo* aplikace jsou směřovány především na výzkum umělého endokrinního pankreatu¹¹⁴. Tyto systémy překonávají problémy spojené s biokompatibilitou,

stabilitou signálu a vysokou spolehlivostí, což velmi zvyšuje výzkumné náklady. Navíc nejsou dořešeny legislativní a etické aspekty praktické aplikace těchto zařízení.

Potenciálně mnohem větší trh by mohl existovat v potravinářství. Menší zisky v této oblasti oproti klinice však snižují ochotu investovat do nákladných analytických systémů, nicméně stimulačně by mohla působit nová legislativa v oblasti kontroly kvality potravin. Nelze očekávat masové začlenění biosensorů přímo do výrobních linek (*in line*), neboť zatím nejsou kompatibilní s používanými sterilizačními postupy. Spíše půjde o biosensorové systémy analyzující kontinuálně odebírané vzorky (*on line*). Další oblastí pak je kontrola čerstvosti potravin (*off line* systémy). Z hlediska analytů budou převládající stanovení sacharidů, některých vitamínů a detekce bakteriální kontaminace.

Velmi perspektivní je použití biosensorů při ochraně životního prostředí, zvláště dobře by se uplatnily přenosné systémy. V současnosti je nejpropracovanější vodohospodářství - sledování znečištění zdrojů pitné vody a vodních toků. Uplatnění nalézají monitorovací systémy založené na celých buňkách, schopné reagovat na přítomnost širokého spektra toxických látek. *Off line* systémy se používají při laboratorní detekci jednotlivých škodlivin, vyvíjí se automatizované imunochemické systémy, schopné stanovit paralelně několik analytů. Dlouhou tradici má rychlé biosensorové stanovení biologické spotřeby kyslíku (BOD), které zkracuje dobu analýzy na několik minut.

5. Závěr

V současnosti jsou za zenitem rozvoje nesporně nejrozšířenější amperometrické biosensory; nejsou sice univerzální, avšak jsou levné a vyhovují velmi dobře pro řadu aplikací. Intenzivní výzkum na poli optických biosensorů přinesl řadu nadějných modelů, avšak překážkou je velmi vysoká cena bránící masovému rozšíření. Výrazné zlepšení v blízké budoucnosti asi nenastane. Nedá se očekávat ani větší uplatnění piezoelektrických a kalorimetrických systémů, ty budou vyhovovat jen pro některé speciální případy. Trh biosensorů se vyvíjí pomaleji než se původně očekávalo, některé vývojové problémy byly podceňeny. Mimo dalšího studia mechanismů biomolekulárních interakcí bude klíčovým faktorem pro úspěch biosensorů zlepšení výrobního procesu vedoucího ke kvalitním a spolehlivým produktům. Lze říci, že biosensory dnes úspěšně vystoupily z výzkumných laboratoří do reálného světa;

nicméně přes řadu dosažených úspěchů bude na tomto poli ještě řadu let co objevovat a zlepšovat.

LITERATURA

1. Rechnitz G. A.: *Electroanalysis* 3, 73 (1991)
2. Thevenot D. R., Poth K., Durst R. A., Wislon G. S.: *Biosens. Bioelectron.* 11, 455 (1996).
3. Cass A. E. G.: *Biosensors: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1990.
4. Scheller F., Schubert F.: *Biosensors*. Elsevier, Amsterdam 1992. Překlad Biosensoren. Akademie Verlag, Berlin 1989.
5. Buerk D. G.: *Biosensors, Theory and Applications*. Technomic, Lancaster 1993.
6. Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S.: *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
7. Mosbach K.: *Immobilized Enzymes and Cells, Methods in Enzymology*, Vol. 137. Academic Press, San Diego 1988.
8. Buck R. P., Hatfield W. E., Umana M., Bowden E. F.: *Biosensors Technology, Fundamentals and Applications*. M. Dekker, New York 1990.
9. Wise D. L.: *Bioinstrumentation: Research, Development and Applications*. Butterworth, Boston 1990.
10. Turner A. P. F.: *Advances in Biosensors*. JAI Press, London, Vol. 1, 1991; Vol. 2, 1992; Vol. 3, 1994.
11. Blum L. J., Coulet P. R.: *Biosensors: Principles and Applications*. M. Dekker, New York 1991.
12. Wise D. L.: *Bioinstrumentation and Biosensors*. M. Dekker, New York 1991.
13. Scheller F., Schmid R. D.: *Biosensors: Fundamentals, Technologies and Applications, GBF Monographs* 17. VCH, Weinheim 1992.
14. Wise D. L., Lemuel B.: *Biosensors and Fiberoptics*. Humana, Clifton 1991.
15. Alcock S. J., Turner A. P. F.: *In Vivo Chemical Sensors, Recent Developments*. Cranfield Press, Bedford 1993.
16. Wagner G., Guilbault G. G.: *Food Biosensor Analysis*. M. Dekker, New York 1993.
17. Scott D. A.: *Biosensors for Food Analysis*. Royal Society of Chemistry, London 1996.
18. Clark L. C., Lyons C.: *Ann. N. Y. Acad.* 102, 29 (1962).
19. Mascini M.: *Biosensors in Europe*. Zpráva Evropského společenství, Florencie 1992.
20. Dyumaev K. M.: *Biosens. Bioelectron.* 77, 841 (1996).
21. Macholán L.: *Bull. Cesk. Biochem. Spol.* 9, 12 (1981).
22. Skládal P.: *Chem. Listy* 89, 170 (1995).
23. Kaláb T.: *Chem. Listy* 89, 363 (1995).
24. Brynda E.: *Chem. Listy* 90, 14 (1996).
25. Chudobová I., Vrbová E.: *Chem. Listy* 90, 295 (1996).
26. Skládal P.: *Chem. Listy* 90, 863 (1996).
27. Stančík L.: *Chem. Listy* 91, 30 (1997).
28. Liu C. C., Zhang Z. R.: *Selective Electrode Rev.* 14, 147 (1992).
29. White N. M., v knize: *Thickfilms sensors* (Prudenziati M., ed.), str. 3. Elsevier, Amsterdam 1994.
30. Hampp N., Eppelsheim C., Silber A., v knize: *Thick films sensors* (Prudenziati M., ed.), str. 341. Elsevier, Amsterdam 1994.
31. Bilitewski U., Chemnitius G. C., Rüger P.: *Sens. Actuators B* 7, 351 (1992).
32. Gründig B., Strehlitz B., Krabisch C., Thielmann H., Kotte H., Gomol M., Kopinke H., Pitzler R. J.: *GBF Monographs* 17, 275 (1992).
33. Wise K. D., Najafi K.: *Science* 254, 1335 (1991).
34. Hanazato Y., Nakako M., Maeda M., Shiono S.: *Anal. Chim. Acta* 193, 87 (1987).
35. Janata J.: *Anal. Chem.* 62, 33R (1990).
36. Koudelka M.: *Sens. Actuators* 9, 249 (1986).
37. Moser I., Schalkhammer T., Mann-Buxbaum E., Harva G., Rakohl M., Urban G., Pittner F.: *Sens. Actuators B* 7, 356 (1992).
38. Zurn A., Müller H.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 346, 589 (1993).
39. Guvenc M. G.: *Micromachining and Micropackaging of Transducers*. Elsevier, Amsterdam 1985.
40. Liu C. C.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 41, 99 (1993).
41. Steinkuhl R., Dumschat C., Sundermeier S., Hinkers H., Renneberg R., Camman K., Knoll M.: *Biosens. Bioelectron* 11, 187 (1996).
42. Murakami Y., Takeuchi T., Yokoyama K., Tamiya E., Karube I., Suda M.: *Anal. Chem.* 65, 2731 (1993).
43. Shoji S., Esashi M.: *Sens. Actuators B* 8, 205 (1992).
44. Harrison D. J., Fluri K., Seiler K., Fan Z., Effenhauser C. S., Manz A.: *Science* 267, 895 (1993).
45. Fan L. S., Tai Y. C., Müller R. S.: *Sens. Actuators* 20, 41 (1989).
46. Shoji S., Nakagawa S., Esashi M.: *Sens. Actuators A* 27, 189 (1989).
47. Plowman T. E., Reichert W. M., Peters C. R., Wang H. K., Christensen D. A., Herron J. N.: *Biosens. Bioelectron.* 77, 149 (1996).
48. Manz A., Graber N., Widmer H. M.: *Sens. Actuators B* 1, 244 (1990).

49. Göpel W., Heiduscka P.: *Biosens. Bioelectron.* *10*, 853 (1995).
50. Bonnel D. A.: *Scanning Tunnelling Microscopy and Spectroscopy. Theory, Techniques and Applications.* VCH, New York 1993.
51. Wiesendanger R.: *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy. Methods and Applications.* Cambridge University Press, Cambridge 1994.
52. Yaniv D. R., McCormick L., Wang J., Naser N.: *J. Electroanal. Chem.* *314*, 353 (1991).
53. Morgan H., Pritchard D. J., Cooper J. M.: *Biosens. Bioelectron* *10*, 841 (1995).
54. Elings V. B., Edstrom R. D., Meinke M. H., Yang X., Yang R., Evans D. F.: *J. Vac. Sci. Technol. A* *8*, 652 (1990).
55. Rees W. A., Keller R. W., Vesenka J. P., Yang G., Bustamente C.: *Science* *260*, 1646 (1993).
56. Florin E. L., Rief M., Lehmann H., Ludwig M., Dornmair C., Moy V. T., Gaub H. E.: *Biosens. Bioelectron.* *10*, 895 (1995).
57. Ross C. B., Sun L., Crooks R. M.: *Langmuir* *9*, 632 (1993).
58. Jaschke M., Butt H. J., Manne S., Gaub H. E., Hase-mann O., Krimphove F., Wolff E. K.: *Biosens. Bioelectron.* *11*, 601 (1996).
59. Ivarsson B., Hegg P. O., Lunström I., Jönsson U.: *Colloids Surfaces* *13*, 169 (1985).
60. Lundström I.: *Biosens. Bioelectron* *9*, 725 (1994).
61. Karlsson R., Michaelsson A., Mattsson L.: *J. Immunol. Meth.* *145*, 229 (1991).
62. Lukosz W.: *Biosens. Bioelectron.* *6*, 215 (1991).
63. Brecht A., Gauglitz G.: *Biosens. Bioelectron.* *10*, 923 (1995).
64. Grate J. W., Martin S. J., White R. M.: *Anal. Chem.* *65*, 940A; 987A (1993).
65. Wilson R., Turner A. P. F.: *Biosens. Bioelectron* *7*, 165 (1992).
66. Varfolomeev S. D., Kurochkin I. N., Yaropolov A. I.: *Biosens. Bioelectron.* *11*, 863 (1996).
67. Allen P. M., Hill H. A. O., Walton N. J.: *J. Electroanal. Chem.* *178*, 69 (1984).
68. Jonsson G., Gorton L.: *Electroanalysis* *7*, 465 (1989).
69. Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F.: *Anal. Chem.* *56*, 667 (1984).
70. Hale P. D., Inagaki T., Karan H. I., Okamoto Y., Skotheim T. A.: *J. Am. Chem. Soc.* *777*, 3482 (1994).
71. Heller A.: *J. Phys. Chem.* *96*, 3579 (1992).
72. Endršt R., Švorčík V., Rybka V.: *Chem. Listy* *87*, 807 (1993).
73. Foulds N. C., Lowe C. R.: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* *82*, 1259 (1986).
74. Foulds N. C., Lowe C. R.: *Anal. Chem.* *60*, 2473 (1988).
75. Schuhmann W., Kranz C., Huber J., Wohlschläger H.: *Synth. Metals* *61*, 31 (1993).
76. Degani Y., Heller A.: *J. Phys. Chem.* *91*, 1285 (1987).
77. Hecht H. I., Schomburg D., Kalisz H., Schmid R. D.: *Biosens. Bioelectron.* *8*, 917 (1993).
78. Alvarez-Icaza M., Kalisz H. M., Hecht H. J., Aumann K. D., Schomburg D., Schmid R. D.: *Biosens. Bioelec-tron.* *10*, 735 (1995).
79. Downs M. E. A.: *Biochem. Soc. Trans.* *19*, 39 (1991).
80. Mikkelsen S. R.: *Electroanalysis* *8*, 15 (1996).
81. Loewy Z. G., Pottathil R., v knize: *Diagnostics in the Year 2000: Antibody, Biosensor and Nucleic Acid Technologies* (Singh P., Sharma B. P., Tyle P., ed.), str. 389. Van Nostrand Reinhold, New York 1993.
82. Mader S. S.: *Human Biology*, str. 132. W. C. Brown Publishers, Dubuque 1990.
83. McPherson M. I., Quirke P., Taylor G. R.: *PCR: A Practical Approach.* IRL Press, Oxford 1991.
84. Bondeson K., Frosstell-Karlsson A., Fagerstam L., Magnusson G.: *Anal. Biochem.* *214*, 245 (1993).
85. Su H., Kallury K. M. R., Thompson M., Roach A.: *Anal. Chem.* *66*, 769 (1994).
86. Paleček E.: *Electroanalysis* *8*, 7 (1996).
87. Wang J., Cai X., Rivas G., Shiraishi H.: *Anal. Chim. Acta* *326*, 141 (1996).
88. Carter M. T., Rodriguez M., Bard A. J.: *J. Ara. Chem. Soc.* *777*, 8901 (1989).
89. Hashimoto K., Ito K., Ishimori Y.: *Anal. Chim. Acta* *286*, 219 (1994).
90. Piunno P. E. A., Krull U. I., Hudson R. H. E., Damha D. J., Cohen H.: *Anal. Chim. Acta* *288*, 205 (1994).
91. Wang J., Chicharro M., Rivas G., Cai X., Dotha N., Farias P. A. M., Shiraishi H.: *Anal. Chem.* *68*, 2251 (1996).
92. Pandey P. C., Weetall H. H.: *Anal. Chem.* *67*, 787 (1995).
93. Noble D.: *Anal. Chem.* *67*, 201A (1995).
94. Pease A. C., Solas D., Sullivan E. J., Cronin M. T., Holmes C. P., Fodor S. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *91*, 5022 (1994).
95. Blanchard A. P., Kaiser R. J., Hood L. E.: *Biosens. Bioelectron.* *77*, 687 (1996).
96. Oh S.: *Trends Food. Sci. Technol.* *4*, 98 (1993).
97. Marco M. P., Gee S., Hammock B. D.: *Trends Anal. Chem.* *14*, 341 (1995).
98. Morgan C. L., Newman D. J., Price C. P.: *Clin. Chem.* *42*, 193 (1996).

99. Köhler G., Milstein C.: *Nature* 256, 495 (1975).
100. Winter G., Milstein C.: *Nature* 349, 293 (1991).
101. Hudson P., v knize: *Monoclonal Antibodies - The Second Generation* (Zola H., ed.), str. 183. Bios Scientific Publishers, Oxford 1995.
102. Chaudhary V. K., Queen C, Junghans R. P., Waldmann T.A., Fitzgerald D.J., Pastan I.: *Nature* 399, 394 (1989).
103. Robinson G. A.: *Biosens. Bioelectron.* 8, 183 (1991).
104. Badley R. A., Drake R. A. L., Shanks I. A., Smith A. M., Stephenson P. R.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 316, 143 (1987).
105. Arshady R., Mosbach K.: *Makromol. Chem.* 182, 687 (1981).
106. Mosbach K.: *Trends Biochem. Sci.* 19, 9 (1994).
107. Hedborg E., Winquist F., Lundström I., Andersson L. I., Mosbach K.: *Sens. Actuators A* 37/8, 796 (1993).
108. Huse W. D., Sashy L., Iverson S. A., Kand A. S., Altling-Mees H., Burton D. R., Benkovic J. S., Lerner R. A.: *Science* 246, 1275 (1989).
109. Hock B., Dankwardt A., Kramer K., Marx A.: *Anal. Chim. Acta* 311, 393 (1995).
110. Švec F.: *Chem. Listy* 90, 477 (1995).
111. Ohlmeyer M. H., Swanson R. N., Dillard L. W., Reader J.C., Asouline G., Kobayashi R., Wigler M., Still W. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10922 (1993).
112. McGovn L. B., Joseph M. J., Pitner J. B., Vonk G. P., Linn C. P.: *Anal. Chem.* 67, 633A (1995).
113. Griffiths D., Hall G.: *Trends Biotechnol.* 11, 122 (1993).
114. Reach G., Wilson G. S.: *Anal. Chem.* 64, 381A (1992).

P. Skládal and L. Macholán (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*):
Biosensors - Present State and Future Trends

The review concerns the recent progress and future trends in the field of biosensors. A brief historic overview is given. Recent achievements in the miniaturization and microfabrication techniques based on lithography and screen printing are described, nanotechnology using surface probe microscopies is shortly discussed. Developments in optical affinity sensing devices are closely linked to the progress in immunochemical biosensors. An increasing use of nucleic acids as biorecognition elements is expected in the near future. Possible market applications and already available commercial devices are also summarized.