

1. Биолошки сензорни системи: биосензори и биочипови

Биосензор представља скраћеницу од “биолошки сензор”. Са становишта технике спада у **мерне органе**. Користи за анализу “**аналита**” (аналит је назив за супстанцу која се користи у клиничкој хемији за чију смо анализу заинтересовани).

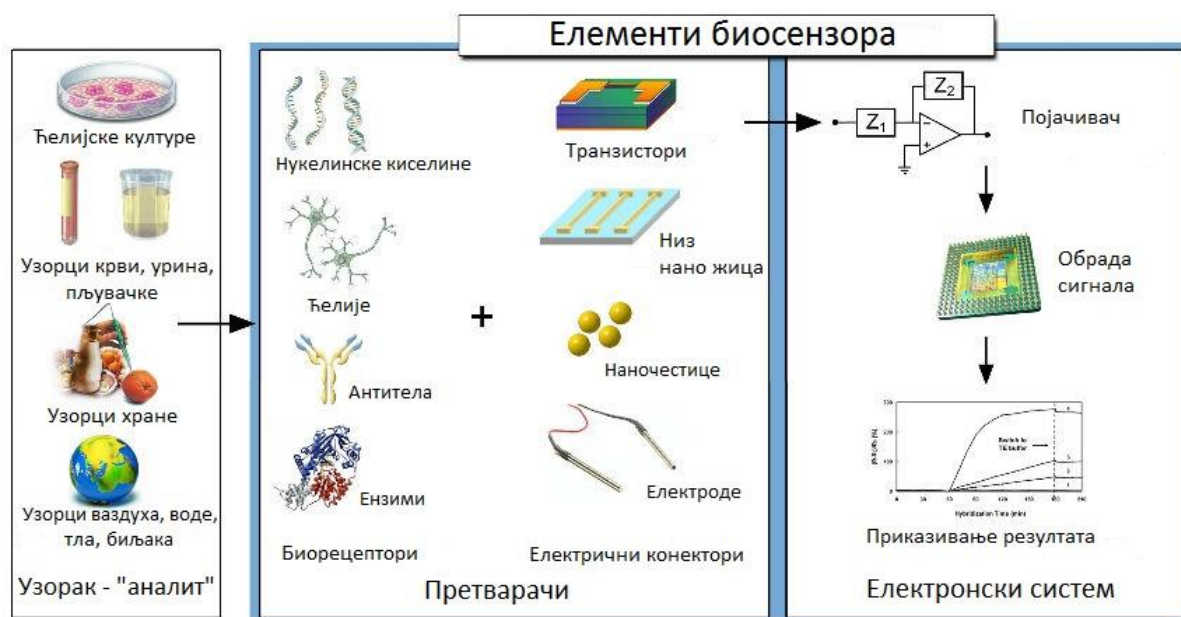
Биосензор се дефинише се као уређај који се састоји од:

- **биолошког система** за препознавање који се назива **биорецептором** и
- **претварача**.

Биочип се састоји од низа појединачних биосензора и користи се за анализу комплексних анализата. Има претвараче засноване на интегрисаним колима.

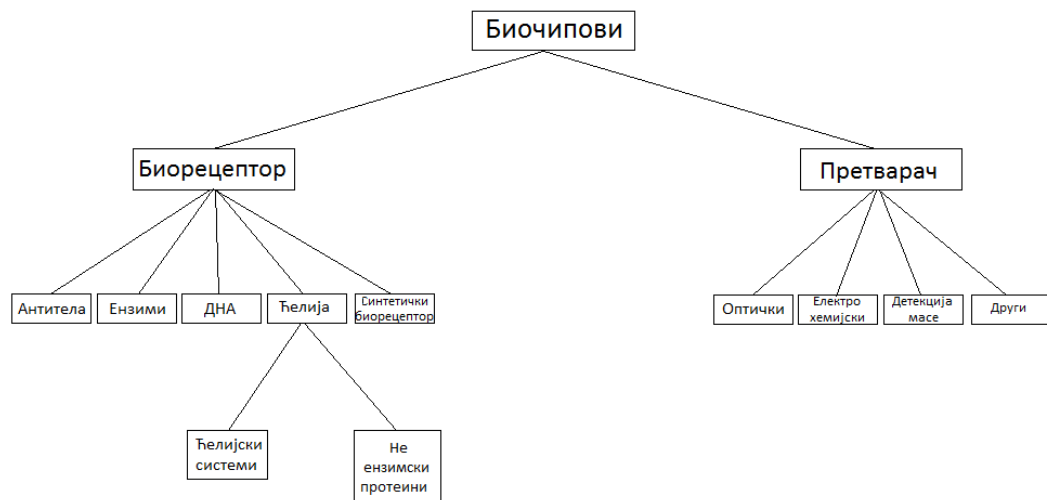
Биолошки елемент који се користи у биорецептору је осетљив само на једну одређену врсту анализата.

Интеракција анализата са биорецептором се мери претварачем који претвара информацију у мерљиву величину као што је електрични сигнал.



Сл. 1

Постоји неколико класификација биосензора и биочипова. Могу се поделити на основу врста биорецептора или врсте претварача.



Класификација биочипова и биосензора

Сл.2

Биорецептор је врста биолошког молекула (на пр. антитело, ензим, протеин или нуклеинска киселина) **или живи биолошки систем** (на пр. ћелија, ткиво или цео организам) **који користи биохемијски механизам за препознавање**. Биосензор садржи био-осетљив слој. Слој може да се састоји само од биорецептора или од биорецептора спојених са претвараčem. Најчешће се биорецептори деле на пет већих група које укључују:

1. антитела/антигене
2. ензиме
3. нукелинске киселине
4. ћелијске структуре/ћелије
5. синтетичке биорецепторе

Биосензори су почели да се развијају почетком 60-тих година прошлог века.

Биорецептори

Биорецептори повезују аналит за који смо заинтересовани са сензором мерног органа. Биорецептори се деле на пет главних група:

1. биорецептори антитела

Антитело је комплексни биомолекул који се састоји од појединачних аминокиселина у строго одређеном распореду. Антитела су биолошки молекули који имају својство да се везују за одређене структуре. Као имуни одговор на одређени молекул неопходна је

одређена величина и комплексност: протеини са молекулском тежином већом од 5000 Далтона. Начин на који антиген и његово одређено антителио интерреагују може да се схвати као однос **кључа и браве** када одређена геометријска јединствена конфигурација кључа омогућује отварање браве. На исти начин антителио за одређени антиген одговара јединственом антигену. Ово јединствено својство антителя се користи код имуносензора где само одређени аналит, у овом случају антиген, одговара антителиу. Спајање антителя и антигена резултује у физичкохемијском променом која се открива помоћу флуоресцентних молекула, ензима или радиоиотопа и генерише се сигнал. Постоје ограничења у коришћењу антителя као биосензора: 1. Капацитет везивања антителя зависи од **pH** или **температуре**, 2. Реакција антителя и антигена је у принципу **неповратна**. Међутим, показано је да везивање може да се поремети органским растварачима или ултразвучним таласима.

2. ензимски биорецептори

Друга широко коришћена врста биосензора укључује **ензиме**. Ензими се често користе као биорецептори због своје особине да се везују и својих каталитичких својстава (убрзавају реакцију). Код биокаталитичких механизма препознавања, откривање се појачава помоћу катализацијске реакције са макромолекулима који се називају **биокатализатори**. Са изузетком мале групе катализатора РНК молекула, сви ензими су **протеини**. Неки ензими захтевају само талог аминокиселина да би могли да се користе као биорецептори. Остали захтевају додатну компоненту које се назива **кофактором**, која може да буде било неоргански јон као Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} или Zn^{2+} или комплекснији органски или металооргански молекул који се назива **коензим**. Каталитичка активност коју остварују ензими дозвољава **много нижи ниво детекције** од оног који би био остварен другим средствима. Каталитичко својство ензима зависи много од целовитости протеина у ензиму. У колико је ензим **денатурисан** (изложен високој температури) и разложен на своје састојке или своје основне аминокиселине, његова каталитичка својства су уништена. Рецептори са ензимима могу да се употребе и за промену механизма препознавања. Активност ензима се обично побољшава коришћењем **ензимске каскаде** која доводи до сложених реакција у ћелији.

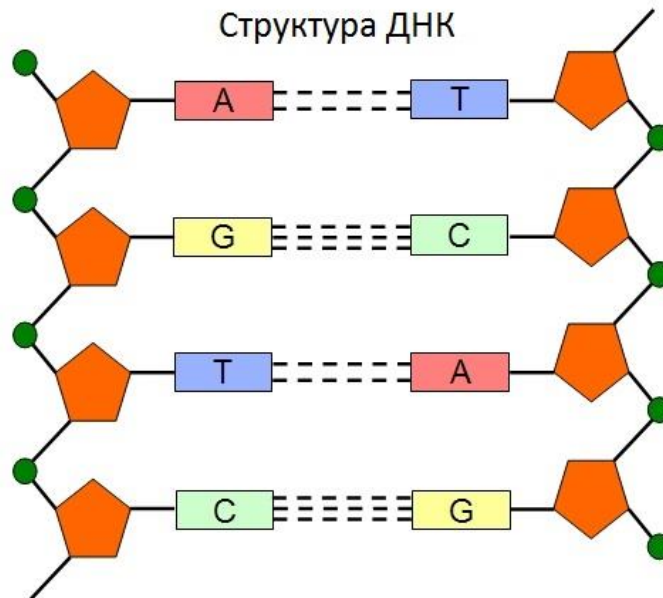
Вишеструки ензими се фиксирају на низу оптичких влакана да би се остварила симултана детекција **пеницилина и ампицилина**. Ови биосензори служе за индиректно мерење пеницилина и ампицилина засновано на променама pH током хидролизе помоћу пеницилиназе (ензима који стварају одређене бактерије и које чине пеницилин неактивним). На влакнима је са пеницилиназом фиксиран и индикатор pH (црнени фенол). Током поступка хидролизе ензим се разлаже на два састојка и при томе се мења спектар одбијене светлости pH индикатора. Развијене су различите методе за анализу спектралних информација за низ сензора који садрже биосензоре.

Оптички биосензори микрометарских димензија се користе за детекцију **глукозе**. Ови биосензори су 100 пута мањи од постојећих сензора и представљају почетке нове

наносензорске технологије. Упоредивањем рада сензора глукозе са различитом димензијом оптичких влакана утврђено је да микрометарски сензори имају 25 пута бржи одговор од сензора са већим димензијама влакана (само 2s). Поред овог својства, ови сензори имају осетљивост детекције од 10^{-15} по молу и апсолутну осетљивост 5-6 пута већу од постојећих сензора.

3. биорецептори са нуклеинским киселинама

Нуклеинске киселине се користе у технологијама биочипова. Користи се својство да су увек у пару: аденин са тимином као и цитозин са гуанином у молекулу ДНК.



Ово својство представља основу за биопрепознавање код ДНК биосензора који се често називају **геносензорима**.

4. Ћелијски биорецептори

Ћелијске структуре и ћелије се користе у развоју биосензора и биочипова. Ови биорецептори се заснивају или на препознавању целе ћелије/микроорганизма или одређене компоненте која је способна да се везује за одређене врсте. Тренутно постоје три главне подкласе у овој категорији:

1. ћелијски системи
2. ензими
3. не-ензимски протеини

Микроорганизми представљају биорецепторе који омогућавају анализу читавог низа једињења. То су организми који користе хемикалије из своје околине као храну. Често када микроорганизми прогутају одређену врсту хемикалија, тиме постају биосензори за њих. Микроорганизми као што су бактерије и гљиве користе се као индикатори за токсичност или меру специфичних супстанци. На пример, ћелијски метаболизам, ћелијско дисање или бактеријска биолуминесценција се користе за процену последице токсичних тешких метала. Многе ћелијске органеле могу да се изолују и користе као биорецептори. Пошто су ћелијске органеле у суштини изоловани системи, могу да се користе у дужем временском периоду. Читави режњеви ткива сисара или *in vitro* развијене културе ћелија сисара се користе као биоосетљиви елементи у биорецепторима. Лабораторијски одгајана ткива се такође користе као биосензори пошто су ефикасни катализатори због свог ензимског одговора који имају.

Микробиолошки биосензор је развијен за мерење количине масних киселина у млеку. Одређена бактерија је фиксирана на површини електроде у облику гела. Мерећи електрохемијски потрошњу кисеоника ове бактерије, могуће је да се индиректно одреди коју је количину масних киселина бактерија унела. Одговор се добија у року од 3 мин.

Многи протеини често се користе као биорецептори унутарћелијских реакција које ће се накнадно догодити на том месту или у другом месту у ћелији. Ови протеини могу да се користе за транспорт хемикалија са једног места на друго ћелијској површини. Повезивањем ових протеина за различите претвараче добијају се биосензори засновани на не-ензимском биопрепознавању протеина.

Протеински биорецептори се користе за детекцију ендотоксина. Ендотоксин је узрочник обољења које проузрокује смрт више од 100 000 годшње. Биосензор са оптичким влакном користи протеин полимиксин Б као биорецепторски елемент. Када је примењен овај сензор за детекцију ендотоксина одговор је добијен за 30 секунди.

5. Синтетички биорецептори

Ови биорецептори се добијају помоћу више метода:

- коришћењем молекула добијених генетским инжењерством
- стварањем вештачких мембрана
- молекуларним утискивањем

Најновија метода, **молекуларно утискивање**, подразумева мешање молекула аналита са мономерима. Мономери су молекули који могу хемијски да реагују са другим молекулом исте врста и формирају веће молекуле - полимере. После полимеризације, полимер се урања у аналит, затим се молекули аналита уклањају из мреже полимера. На тај начин полимер добија структуру **молекулске јаме** и везује се комплементарно изабраном аналиту.

Ова метода молекуларног утискивања се користи за добијање биосензора заснованог на електрохемијској детекцији морфијума:

Полимер добијен молекуларним утискивањем је постављен на жицу од платине. Овај се користи да веже морфијум са електродом. Након везивања морфијума, електронеактивни кодеин се употребљава за чишћење електроде. На тај начин се ослобађа извесна количина морфијума.

Велика предност ове методе је то што ови сензори могу да раде под условима у којима су биосензори обично неупотребљиви (висока температура или присуство хемикалија које би уништиле протеин). С друге стране, због своје фиксне структуре, молекуларно утискивање нема флексибилност и осетљивост као друге врсте биосензора.

Врсте претварача

Већина претварача може да се подели у више класа према методи која се користи:

1. оптичка детекција
2. електрохемијска детекција
3. детекција масе
4. резонантни биосензори
5. термална детекција
6. полупроводници са јон-сензитивном површином
7. мерење проводности
8. амперометријски
9. потенциометријски

1. Оптичке технике

Оптички биосензори могу да користе различите врсте спектроскопија (апсорпција, флуоресценција, Раманова спектроскопија...). Добијају се подаци о амплитуди, енергији, поларизацији, временском и/или фазном кашњењу. Амплитуда је параметар који се најчешће мери у електромагнетном спектру пошто може да се корелира са концентрацијом анализата који је од интереса. Измерена енергија електромагнетског зрачења може да да информацију о променама у локалној средини анализата, њеним интрамолекуларним атомским вибрацијама (Раманова или инфрацрвена апсорпциона спектроскопија). Мерење интеракције слободних молекула са чврстом подлогом може често да се истражи помоћу инструмената заснованих на поларизацији. Поларизација емитоване светлости је увек случајна величина када се емитује од слободног молекула у раствору, док када је молекул везан за чврсту подлогу, емитована светлост увек остаје поларизована. Време кашњења одређеног сигнала (код флуоресценције или фосфоресценције) може да послужи да се добије информација о молекуларним везама, пошто времена кашњења веома зависе од побуђености молекула и њиховог окружења. Утврђено је да на основу промене трајања флуоресценције може да се идентификује постојање одређених

једињења. Важно својство које може да се измери је фаза емитованог зрачења. Када електромагнетно зрачење реагује са површином, брзина или фаза зрачења се мења, зависно од индекса рефракције средине (аналита). Када се медијум промени (састав анализата), може да се промени и индекс рефракције, што доводи до промене фазе зрачења.

2. електрохемијске технике

Електрохемијска детекција је још једна могуће средство за претварач које се користи код биосензора. Ова техника је комплементарна методама оптичке детекције као што је флуоресценција, најосетљивија оптичка метода. Пошто многи анализи немају изражену флуоресценцију, електрохемијски претварачи су веома корисни. Развијени су електрохемијски биосензори на бази ензима за детекцију глукозе и лактозе.

3. детекција масе

Мерење малих промена масе је још једна метода која се користи код биосензора. Заснива се на коришћењу пиезоелектричних кристала и њиховом својству да осцилују под дејством наизменичне струје на одређеној учестаности. Учестаност на којој кристали осцилују је одређена учестаношћу струје и масом кристала. Стога, када се маса кристала повећа због везивања са хемикалијама, учестаност се мења и та промена се мери и служи за одређивање додатне масе кристала. Развијен је биосензор који детектује бактерију која изазива менингитис. Испитивани су различити начини фиксирања узорка бактерије на кристалу помоћу слоја злата на површини. Након фиксирања, узорак је постављен у течност где су антитела и антигени.

4. резонантни биосензори

Рад резонантних биосензора се заснива на својству да се маса мембране сензора мења када се за њу закачи аналит. Промена масе доводи до промене **резонантне учестаности** претварача што је мерена величина.

5. термална детекција

Код биосензора чији рад примењују термалну детекцију користи се фундаментално својство да током биолошких реакција постоји увек апсорпција или одавања топлоте. Ови биосензори садрже фиксиране ензиме и сензоре температуре. Када аналит дође у додир са ензимом, мери се размена топлоте у тој реакцији. Укупна количина створене или апсорбоване топлоте је сразмерна моларној енталпији и укупном броју молекула који учествују у реакцији. Мерење температуре се врши термистором који се у овом случају назива ензимским термистором. Они су идеални за ову намену због њихове велике осетљивости на промену температуре. Нису осетљиви на оптичка и електрохемијска својства мереног узорка. Најчешћа примена ових биосензора је у детекцији пестицида и патогених бактерија.

6. полупроводници са јон-сензитивном површином

Ови биосензори садрже полупроводнике са јон сензитивним слојем. Електрични потенцијал површи се мења када реагују јони анализита и полупроводника. Мери се ова промена потенцијала. Полупроводник се конструише тако да се електрода сензора покрива слојем полимера. Овај полимер је пропустљив за јоне анализита. Јони дифундују кроз слој полимера што узрокује промену потенцијала полупроводника. Овај биосензор се углавном користи за детекцију pH.

7. мерење проводности

Овде се мери електрична проводност/отпорност раствора. У електрохемијској реакцији се стварају јони или електрони што доводи до промене проводности или отпорности целог раствора. Мерења ових величина су релативно мале осетљивости. Електрично поље се генерише помоћу извора наизмечне струје.

8. амперометријски

Амперометријски биосензори су веома осетљиви и могу да детектују електроактивне врсте у биолошком тест узорку. Пошто биолошки тест узорци могу да буду слабо електроактивни, при мерењу се додају ензими као катализатори, који стварају радиоактивне ћелије. У овом случају мерена величина је струја.

9. потенциометријски

Овде је мерена величина оксидацијски или редукцијски потенцијал електрохемијске реакције. Принцип рада ових биосензора се заснива на својству да се при нагибној промени напона на електроди, у раствору јавља струја због електрохемијских реакција. Напон на коме се ове реакције одвијају указује на одређен састав раствора.

Подела биосензора с обзиром на место постављања

In-vivo: биосензор је онај који ради унутар тела. Коришћење таквог биосензора подразумева посебну пажњу током пројектовања и коришћења. Већ приликом усађивања могу да се појаве запаљенски процеси који морају да се санирају. Током дуже употребе може да се појави нежељена интеракција са телом. Друга нежељени догађај је квар биосензора. У том случају он мора да се уклони и замени другим, што подразумева додатну хируршку интервенцију.

Пример за ову врсту биосензора би био in-vivo биосензор за мерење **инсулина** у телу.

In- vitro: биосензор се користи у епрувети, посуди са културом ћелија или било где ван живог организма. Сензор користи биолошки елемент као што је ензим који може да укаже на биохемијске промене у раствору. Претварач даље претвара биохемијски сигнал у мерљиву величину. Пример за in- vitro биосензор би био ензимски биосензор за мерење **глукозе**.

на производној траци: биосензор се користи на производној траци где се узима узорак, тестира се и доноси се одлука да ли да се настави даља производња. Пример за ову врсту биосензора је мерење лактозе у процесу производње млечних производа.

у производној траци: биосензор је редно спрегнут као мерни орган у систему АУ. Примењује се код постројења за пречишћавање воде.

на лицу места: постоји изазов да се створи биосензор који би могао да се користи “на лицу места”, тј. на самој локацији где је неопходно да се изврши одређено мерење. При томе би се избегло лабораторијско тестирање што би повлачило већу брзину мерења и нижу цену. Овакви биосензори би се користили за тестирање на ХИВ вирусе у неразвијеним земљама где је тешко да се обави лабораторијско тестирање. Биосензор би се користио директно на локацији као брз и јефтин тест.



могуће примене биосензора

линкови:

https://books.google.rs/books?id=HRVqs8nu_pUC&pg=PA3&lpg=PA3&dq=biochip+transducer&source=bl&ots=SsB1rXAhUU&sig=wobjMKLneeG6vDruU_hIZojT7QU&hl=en&sa=X&ved=0CCcQ6AEwAmoVChMIv-bC2auDxwIViwcsCh226ADb#v=onepage&q=analit&f=false

<https://en.wikipedia.org/wiki/Biosensor>

http://isites.harvard.edu/fs/docs/icb.topic860667.files/Biosensor_Tutorial.pdf