

BIOSENSORID

Biosensorid on analüüsivahendid, mis muudavad bioloogilise signaali elektriliseks signaaliks ja/või mõõdavad seda.

Biosensorid kasutavad spetsiifilisi bioloogilisi protsesse: ensüüme nende substratide ja teiste ligandide detekteerimiseks, antikehasid nende antigeenide, lektiine süsivesikute ja nukleiinhappeid nende komplementaarsete järjestuste määramiseks.

Biosensorid koosnevad **kahest põhikomponendist:**

- 1. Bioloogiline element**, mis annab sensorile spetsiifilisuse
- 2. Transduktor** e. transduktsiooni tehnika, mille abil on võimalik muuta bioloogiline reaktsioon töödeldavaks signaaliks.

Biosensorite bioloogiline komponent jagatakse kahte rühma: katalüütilised ja mittekatalüütilised molekulid.

Katalüütilised: ensüümid, mikroorganismid ja koed

Mittekatalüütilised: antikehad, retseptorid ja nukleiinhapped

BIOLOOGILINE REAKTSIOON

Biosensori tähtsaim osa on sensorelement. Tavaliselt koosneb see õhukesest bioloogiliselt aktiivse materjali kihist, mis on võimalikult tihedas kontaktis elektronide transduktoriga. Bioloogiline materjal võib olla otseselt seotud (kas kovalentselt või mittekovalentselt) sensori pinnale või moodustada osa õhukesest sensori pinda katvast membraanist. Üldjuhul on bioloogilise protsessi konverteerimine elektrooniliseks signaaliks kõige efektiivsem siis, kui distants bioloogilise reaktsiooni toimumiskoha ja transduktsioonikoha vahel on minimaalne. Seega on väga oluline bioloogilise materjali õige immobiliseerimine.

TRANSDUKTSIOON

1. Elektrokeemilised meetodid.

Elektrokeemilised biosensorid on kõige lihtsamad ja seetõttu kasutatakse neid kõige enam. Jagatakse 3 rühma:

- a) Amperomeetrilised biosensorid**, amperomeetria: lahust läbiva difusioonvoolu tugevuse mõõtmine. Difusioonvool on vool, mille tugevus on sellest kui kiiresti difundeeruvad reageerivad ained elektroodile, mis mõõdavad elektrivoolu konstantsel pingel.
- b) Potentsiomeetrilised biosensorid**: potentsiomeetria: analüüsimeetod mille puhul elektrolüütilahuse kontsentratsioon

määratakse lahusesse sukeldatud elektroodi potentsiaali mõõtmise teel. Kasutatakseioon-selektiivseid elektroode, et määrata teatud ionide (näit. vesinikioonide) kontsentratsiooni muutust konstantsel voolutugevusel (tavaliselt null).

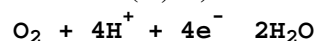
- c) Konduktomeetrilised biosensorid**, konduktomeetria: ingl.k. conductivity “elektrijuhtivus” kr.k. metro “mõõdan”. lahuste elektrijuhtivuse mõõtmine. Meetodiga määratakse ioonse keskkonna muutusest tulenevat keskkonna juhtivuse muutumist.

Amperomeetrilised biosensorid

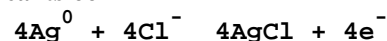
Sii kuulub enamus tööstuslikult toodetavaid biosensoreid (ensüümelektroodid). Kasutatakse ensüümide poolt katalüüsitud redoksreaktsioonide käigus tekkiva redokselektronide voo mõõtmist. Tavaliselt rakendatakse elektroodidele konstantne pinge ja määratakse voolutugevust, mis tekib elektroodreaktsioonil. Sellel põhines esimene biosensor, mis konstrueeriti glükoosi määramiseks ja kasutas nn. Clark'i hapnikelektroodi (1962).

Tsentraalne plaatina katood, mida ümbritseb Ag/AgCl anood. Nende vahele rakendatakse pinge 0.6 V. Lahustunud molekulaarne hapnik redutseeritakse plaatina katoodil ja reaktsioon viiakse lõpule küllastunud KCl lahuse abil. Elektroodi ruum on bioloogilise reaktsiooni toimumiskohast eraldatud õhukese (teflonist) plastmembraani abil, mis on läbitav ainult hapnikule. Ensüümi hoitakse elektroodi juures membraani abil, mis on läbitav vaid madalmolekulaarsetele ühenditele st. substraadile ja produktile.

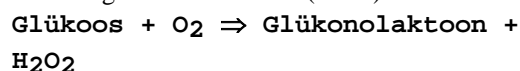
Katoodreaktsioon (-0,6V)



Anoodreaktsioon



1. Glükoosi hulka võib määrata lahustunud hapniku kontsentratsiooni vähenemise kaudu redoksreaktsiooni tagajärjel, mida katalüüsib ensüüm glükoosi oksüdaas (GOD).

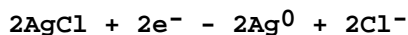


Reaktsiooni kulgemise tingimused saab valida nii, et hapniku tarbimise kiirus on proportsionaalne kogu glükoosi kontsentratsiooniga.

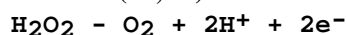
Sellise biosensori konfiguratsiooni juures võib kasutada ka teisi oksüdaase peale glükoosi oksüdaasi.

2. On ka alternatiivne meetod, mille puhul määratakse otse reaktsiooni käigus tekkinud vesinikperoksiidi hulka. Sel juhul vahetatakse elektroodide polaarsused ja kasutatakse tefloni asemel tselluloosatsetaati membraani, mis takistab anionide liikumist ja võimaldab vaba läbipääsu vesinikperoksiidile.

Katoodreaktsioon



Anoodreaktsioon (+0,6V)



Neid elektroode võib arendada edasi ka taoliste substraatide määramiseks, milliste jaoks pole otseselt oksüdaas-ensüümi.

Amperomeetria probleemid:

1. Reaktsioon on sõltuv molekulaarse hapniku kontsentratsioonist. See piirab taoliste sensorite kasutamist ilma hapnikuta keskkonnas näit. *in vivo*.
2. Kasutatav pinge on küllaldane selleks, et põhjustada ka teisi redoksprotsesse nagu näit. vitamiin C oksüdeerumine / redutseerumine, millised võivad analüüsi segada.

Nendest probleemidest ülesaamiseks kasutatakse aineid, mis neis reaktsioonides asendavad hapnikku ehk **mediaatoreid**
Protsess on järgmine:

Substraat + ensüüm(oksüdeeritud) ⇒ produkt + ensüüm (redutseeritud)

Ensüüm(reduts.)+mediaator(oks) ⇒ ensüüm(oks.) + mediaator (reduts.)

Mediaator(reduts.) ⇒ mediaator(oks.) + e⁻

Potentsiomeetrilised biosensorid

Potentsiomeetrilised biosensorid mõõdavad potentsiaalide erinevust aktiivse elektroodi ja teise st. referents elektroodi vahel kontsanttsel voolutugevusel (tavaliselt null). Kuna nendel tingimustel analüüsitavat ainet ei tarbita on see meetod n.ö. "mittedestruktiivne". Tavaliselt kasutatakse 3 tüüpi potentsiomeetrilisi vahendeid:

1. Ioon-selektiivsed elektroodid
2. Gaasi elektroodid
3. Field-effect transistorid (välja efekti transistorid) (FET)

Kõik need riistad mõõdavad logaritmilist sõltuvust meid huvitava iooni aktiivsuse ja elektroodi pinnal genereeritud potentsiaali vahel.

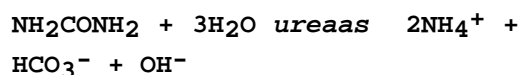
Kõige lihtsam näide ioon-selektiivsest elektroodist on pH elektrood. Paljud biokatalüütilised reaktsioonid sisaldavad laetud osakesi, millised kas absorbeerivad või

vabastavad vesinikioone vastavalt nende pK_a-le ja keskkonna pH-le.

Põhiprobleem: need riistad vajavad "on-line" temperatuuri kompensatsiooni.

Konduktomeetrilised biosensorid

Paljude bioloogiliste reaktsioonide tagajärjel muutub keskkonnas ionide kontsentratsioon. Selliseid muutusi saab mõõta elektrilise juhtivuse muutusi hindavate biosensorite abil. Tüüpiline näide on urea sensor, mis kasutab immobiliseeritud ensüüm **ureaasi** ja mida kasutatakse neeruoperatsioonide ja dialüüsi jälgimiseks. Reaktsiooni tulemusel muutub keskkonna ionide kontsentratsiooni, mis võimaldab seda tüüpi biosensoriga jälgida urea kontsentratsiooni.



Vastuse saab mõne sekundiga võimaldades urea määramist kontsentratsioonivahemikus 0.1-10mM. Tulemust korrigeeritakse mitte-spetsiifiliste pH ja muude faktorite muutumise suhtes referents-elektroodi paariga samal sensoril, mis on ilma ensüümita. Meetodit saab edukalt laiendada kasutades teisi ensüüme ja ensüümikombinatsioone, mis produtseerivad erinevaid ioone näit. amidaasid, dekarboksülaasid, esteraasid, fosfataasid ja nukleasid.

Termomeetrilised biosensorid

Mitmete ensüümreaktsioonide käigus tekib soojust. Termomeetriliste biosensoritega on võimalik mõõta taoliste reaktsioonide soojus-efekti. Mõnikord nim. taolisi biosensoreid ka kalorimeetrilisteks biosensoriteks. Termomeetriliste biosensorite valmistamise juures on üks tähtsaim faktor keskkonna temperatuuri muutuste elimineerimine. Seetõttu viiakse taolised reaktsioonid läbi termiliselt isoleeritud anumades ja analüüsitav aine juhitakse läbi soojusvaheti. Reaktsioon toimub väikeses reaktoris, kusjuures temperatuuri erinevusi sissetuleva analüüsitava aine ja väljamineva produkti vahel mõõdetakse termistoridega. Niimoodi võib mõõta temperatuurivahemikku kuni 0,0001°C.

1. **Reaktoris on võimalik lihtsalt kokku liita mitu reaktsiooni.** See võimaldab kasutada ensüüme ja kofaktoreid.
2. **Taolist meetodit saab edukalt rakendada elusate rakkude puhul ja ka näit ELISA süsteemi osana.**

Piesoelektrilised biosensordid

Kõik kristallid sisaldavad positiivseid ja negatiivseid laenguid. Mõningate kristallide (mida nim. piesoelektrilisteks kristallideks) deformeerumisel toimub laengute eraldumine, mille tulemusel tekib elektriväli. Sellest järelduvalt, kui asetada selline kristall elektrivälja, siis ta deformeerub. Resonantsagedusega ostsillatoorne elektriväli põhjustab kristalli vibratsiooni talle iseloomuliku sagedusega, sõltuvalt tema koostisest, paksusest ja samuti ka sellest kuidas ta on lõigatud.

Antud piesoelektrilise kristalli resonantsagedus muutub kui tema pinnale absorbeeruvad mingid molekulid. Seda efekti on võimalik kasutada biosensori juures, kuna isegi väga väikesed resonantssageduse muutused on kergesti jälgitavad moodsate elektrooniliste mõõteriistade abil. Taoliselt on võimalik mõõta sensori pinnale absorbeerunud aine massi üliväikesi erinevusi - nanogramm cm^2 kohta.

Tavaliselt määratakse resonantssageduse erinevusi teise, täpselt samasuguse, kuid ilma bioloogilise materjalita referents kristalli suhtes.

Näiteks kunstlik "nina" kokaiini mõõtmiseks gaasifaasis. Selleks on võimalik valmistada kokaiini biosensor liites kokaiinivastased antikehad piesoelektrilisele kristallile. Kasutamise juures on tähtis õhu relatiivne niiskus: kui see on liiga madal, siis on sensor vähem tundlik ja kui see on liialt kõrge, siis võib piesoelektriline efekt kaduda.

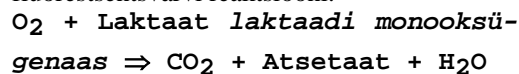
Piesoelektriliste biosensorite laiemat levikut takistab asjaolu, et nende kasutamine on raske ainete määramiseks lahustes.

Piesoelektrilisi biosensoreid on võimalik kasutada ka näiteks viiruste otseseks ja kvantitatiivseks määramiseks sensorile kinnitatud viirusvastaste antikehade abil. **Vt.** Cooper *et al.*, (2001) Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning. *Nat Biotech* **vol.** 19, pp.833-837.

Optilised biosensordid

Optilised biosensordid e. optoodid võimaldavad nii ohtlike materjalide kui ka tundlikus keskkonnas (näit. *in vivo*) toimivate protsesside kindlat ja ohutut mitte-elektronilist jälgimist. Optiliste biosensorite suureks eeliseks on asjaolu, et nende puhul pole vaja referents sensorit: kasutades sama valgusallikat, mida kasutab sensor, on võrdlussignaal tavaliselt lihtsalt genereeritav.

Näiteks fiiberoptiline laktaadi sensor, millega on võimalik jälgida molekulaarse hapniku kontsentratsiooni muutusi määrates fluorestsentsvärvi reaktsiooni.



Hapniku olemasolu reaktsioonikeskkonnas kustutab fluorestsentsvärviga kaetud detektorelemendi fluorestsentsi. Laktaadi kontsentratsiooni tõus vähendab selleni jõudva hapniku kontsentratsiooni leevendades sellega kustutamist, mille tagajärjel väljuv fluorestsentsisignaal tugevneb.

Optiliste biosensorite hulka kuuluvad ka mitmesugused ühekordse kasutamiseiga testribad. Näiteks glükoosi hulga mõõtmiseks veres ja ka uriini analüüsiks. Esimesel juhul on testribale immobiliseeritud ensüümid: glükoosi oksüdaas ja mädarõika peroksüdaas koos kromogeeniga, milleks on näiteks o-toluidiin.

