VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MAGNETICKÉ ČÁSTICE JAKO REVERZIBILNÍ NOSIČ PRO ENZYMOVÉ ELEKTRODY

MAGNETIC PARTICLES AS CARRIER FOR REVERSIBLE ENZYME ELECTRODES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER´S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. ZDENĚK JANÍČEK
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Doc. RNDr. PETR SKLÁDAL, CSc.
SUPERVISOR

BRNO 2012

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor

Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Student: Bc. Zdeněk Janíček ***ID:*** 109604

Ročník: 2 ***Akademický rok:*** 2011/2012

NÁZEV TÉMATU:

Magnetické částice jako reverzibilní nosič pro enzymové elektrody

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši bioanalytického použití magnetických částic, se zvláštním zřetelem na aplikace ve spojení s elektrochemickými biosensory. 2) Navrhněte optimální metodiku konstrukce enzymového senzoru s cholinesterasou imobilizovanou na magnetické částice. 3) Pro imobilizaci využijte kovalentní vazbu, adsorbci nebo zachycení v polymerní vrstvě. Pro měření využijte automatizovaný systém na bázi autoinjektoru Gilson XL, umožňujícího i ovládání elektromagnetu a automatizovaný záznam dat. Odezvy budou sledovány pomocí amperometrického detektoru. 4) Metodiku otestujte při stanovení modelového organofosfátového pesticidu pomocí inhibice cholinesterasy imobilizované na magnetické částice. 5) Vyvinuté enzymové stanovení porovnejte s dřívějšími postupy, kdy byl enzym imobilizován přímo na povrchu elektrody. 6) Proveďte diskusi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Stanciu, L.; Won, Y.; Ganesana, M.; Andreescu, S. Magnetic particle-based hybrid platforms for bioanalytical sensors. Sensors 2009, 9, 2976–2999.

[2] Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Chevolot, Y.; Cloarec, J. P. Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads. Sensors 2007, 7 (4), 589–614.

Termín zadání: 6. 2. 2012 ***Termín odevzdání:*** 18. 5. 2012

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Konzultanti diplomové práce: Ing. Denisa Maděránková

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

Abstrakt

Diplomová práce obsahuje informace o používaných enzymech, biosenzorech, enzymových biosenzorech a magnetických částicích. Cholinesterasa (ChE) je obecné označení pro dva příbuzné enzymy, vzájemně se lišící výskytem a biologickou funkcí. Acetylcholinesterasa (AChE) je nezbytná při přenosu nervového vzruchu. Nachází se na cholinergních synapsích, kde působí hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu a tím i terminaci nervového vzruchu. Příbuzná je butyrylcholinesterasa (BChE) přítomná v séru. Experimentální část byla zaměřena na elektrochemické enzymové biosenzory s cholinesterasou využívající magnetické částice pro reversibilní obnovu biorekogniční vrstvy. Imobilizace cholinesterasy na magnetické částice byla provedena kovalentní vazbou po aktivaci glutaraldehydem. Měření aktivity probíhalo s acetylthiocholinem jako substrátem v průtočném systému, magnetické částice byly zachyceny před platinovou elektrodou a produkovaný thiocholin se detekoval amperometricky. Cílem bylo měřit inhibici AChE. Významná je inhibice ChE způsobovaná některými léky a pesticidy na bázi organofosfátů. Zde byla testována inhibice AChE pesticidem dichlorvosem. Důraz byl kladen na nalezení vhodných experimentálních podmínek pro vytvoření automatizovaného postupu k měření aktivity AChE, který byl založen na autoinjektoru a pumpách firmy Gilson spolu s programem 735 pro definici pracovní konfigurace, přípravu měřících skriptů a provádění aplikačních metod.

Klíčová slova

Enzymy, acetylcholinesterasa, elektrody, biosenzory, magnetické částice.

Abstract

Master's thesis contains information about the enzymes, biosensors, enzyme biosensors and magnetic particles. Cholinesterasa (ChE) is the generally name for the two related enzymes, mutually differing appearance and biological functions. Acetylcholinesterasa (AChE) is necessary for the transmission of nervous excitement. AChE is located at cholinergic synapses, where is the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine and this termination by the nervous excitement. Butyrylcholinesterasa (BChE) is related to AChE and it is present in serum. Experimental part was focused on electrochemical biosensors with cholinesterase enzyme using magnetic particles for reversible reconstruction layer. Cholinesterase immobilization was carried out on the magnetic particles by covalent binding after glutaraldehyde activated. The measurement of activity take place with acetylthiocholin as a substrate in a flow system, magnetic particles were captured before the platinum electrode and produced by thiocholin is detected amperometric. The aim was to measure inhibition of AChE. Significant inhibition ChE is caused by certain drugs and pesticides based on organophosphates. There was tested by inhibition of AChE pesticide dichlorvos. Emphasis was on finding possible experimental conditions for the creation of the automated procedure to measure the AChE activity, which was based on auto-injector and pumps of Gilson, together with a 735 programme for the definition of the working configuration, preparation of measurement scripts and implementation of application methods.

Keywords

Enzymes, acetylcholinesterase, electrodes, biosensors, magnetic particles.

Bibliografická citace

JANÍČEK, Z. *Magnetické částice jako reverzibilní nosič pro enzymové elektrody*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 82 s., 1. příl.. Vedoucí diplomové práce Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci na téma Magnetické částice jako reverzibilní nosič pro enzymové elektrody vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury, včetně dalších informačních zdrojů, které jsou citovány a uvedeny v seznamu literatury na konci diplomové práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujícího autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestně právních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 18. května 2012 .....

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Petru Skládalovi, CSc. za jeho trpělivost, účinně metodicko-pedagogickou odbornou pomoc při zpracování diplomové práce.

V Brně dne 18. května 2012 .....

podpis autora

OBSAH

1. Úvod 12

I. TEORETICKÁ ČÁST 13

2. Enzymy 13

2.1. Enzymové reakce 14

2.2. Aktivace a inhibice enzymu 15

3. Biosenzory 17

3.1. Požadavky na biosenzory 17

3.2. Biorekogniční vrstva 19

3.3. Převodník 19

3.4. Rozdělení biosenzorů podle fyzikálně chemického převodníku 20

3.4.1. Optické biosenzory 20

3.4.2. Piezoelektrické biosenzory 20

3.4.3. Kalorimetrické biosenzory 20

3.5. Elektrochemické systémy 21

3.5.1. Konduktometrické/impedimetrické 21

3.5.2. Potenciometrické 21

3.5.3. Ampérometrické 22

3.6. Enzymové biosenzory 23

3.6.1. Možnosti stanovování inhibitorů 25

3.6.2. Převodník enzymových senzorů 25

3.6.3. Navržení biologické části u enzymových senzorů 26

3.6.4. Příprava citlivé vrstvy biosenzoru 26

3.6.5. Imobilizace 27

3.6.6. Acetylcholinesterasa 28

3.7. Druhy měření s biosenzory 30

4. Magnetické částice 31

4.1. Působení částic v magnetickém poli ... 32
4.2. Syntéza povrchu magnetických částic ... 33
4.3. Modifikace a charakterizace povrchu MPs ... 34
4.4. Imobilizace ... 34
4.5. Určení vzniklého amplifikovaného signálu ... 35
4.6. Detekce pesticidů ... 36
5. Matematická analýza dat ... 37
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 39
6. Technický nástroj - autoinjektor Gilson 231 XL ... 39
6.1. 735 Sampler Software ... 40
6.1.1. Simulační prostředí a programování ... 41
6.1.2. Skupina speciálních editorů a příkazů ... 42
7. Materiál a metody ... 45
7.1. Chemikálie ... 45
7.2. Magnetický materiál ... 45
7.3. Přístroje ... 45
7.4. Příprava pufrů a ostatních roztoků ... 46
7.5. Imobilizace na jednokanálové a vícekanálové elektrody ... 47
7.5.1. Kovalentní imobilizace ... 47
7.5.2. Imobilizace pomocí zesíťování na povrchu elektrody ... 47
7.6. Imobilizace na magnetické částice ... 48
7.7. Příprava syntetizovaných magnetických částic ... 49
7.8. Stanovení množství magnetických částic ... 49
8. Schéma zapojení a postup práce ... 50
9. Výsledky a diskuse ... 55
9.1. Optimalizace podmínek pro enzymový biosenzor za využití magnetických částic a matematická analýza dat ... 55

9.1.1. Určení citlivosti připravených biosenzorů bez použití průtočného systému..... 55

9.1.2. Určení rychlosti u průtočného systému 56

9.1.3. Určení funkčnosti MPs s navázanou cholinesterasou 57

9.1.4. Vliv opakovaného přídavku substrátu na různé množství MPs 59

9.1.5. Ověření způsobu použití různého množství MPs..... 60

9.1.6. Vliv opakovaného přídavku substrátu na 20 µl a 100 µl MPs 60

9.1.7. Vliv konstantního 100 µl ATCh – I při opětovném přidávání 20 µl MPs..... 62

9.1.8. Vliv různého přídavku substrátu na konstantní množství MPs..... 62

9.1.9. Vliv polohy cely na odezvu signálu 63

9.1.10. Závislost elektrického proudu na koncentraci substrátu pomocí MPs 65

9.2. Stanovení organofosfátového pesticidu pomocí inhibice cholinesterasy imobilizované na MPs 67

9.2.1. Vliv inhibitoru na enzym, který je imobilizovaný na MPs 67

9.2.2. Vliv inhibitoru na enzym, který je imobilizovaný na MPs 68

9.2.3. Vliv různého množství MPs na účinek pesticidu 70

9.3. Stanovení funkčnosti a ovládání elektromagnetu 71

9.4. Návrh protokolu pro automatické stanovení komplexu enzym - substrát 73

9.4.1. Závislost elektrického proudu na koncentraci substrátu 73

9.4.2. Vliv inhibitoru na enzym, který je imobilizovaný na MPs 75

10. Závěr a souhrn 77

11. Seznam zkratek 79

Seznam obrázků

Obrázek 1: *Katalytické působení enzymů* 14

Obrázek 2: *Základní schéma biosenzoru* 17

Obrázek 3: *Senzor s tříelektrodovým uspořádáním:* A - pomocná elektroda, R - referenční elektroda, W - pracovní elektroda 22

Obrázek 4: *Znázornění recyklačního procesu* 24

Obrázek 5: *Nanesení enzymů na čtyřkanálový biosenzor* 29

Obrázek 6: *MPs* 32

Obrázek 7: *Částice železa a jejich zachycení v okolí magnetu* 32

Obrázek 8: *Autoinjektor GILSON 231 XL* 39

Obrázek 9: *Softwarové rozhraní* 40

Obrázek 10: *Simulační prostředí* 41

Obrázek 11: *Imobilizované MPs* 48

Obrázek 12: *Schéma měření v nádobce a cela* 50

Obrázek 13: *Cela se senzorem* 51

Obrázek 14: *Schéma měření v průtočném systému* 51

Obrázek 15: *Aparatura pro měření* 52

Obrázek 16: *Automatizované schéma měřícího systému* 53

Obrázek 17: *Automatizovaná aparatura pro měření* 53

Obrázek 18: *Detail autoinjektoru* 54

Obrázek 19: *Závislost elektrického signálu na množství substrátu* 56

Obrázek 20: *Závislost elektrického proudu na množství substrátu pro pumpu 15 a 10* 57

Obrázek 21: *Závislosti elektrického proudu na množství substrátu s MPs (50 μl a 100 μl).* ... 58

Obrázek 22: *Záznam měření dvou přídavku substrátu při přidání 50 μl MPs a závislost elektrického proudu na množství MPs.* 59

Obrázek 23: *Závislost elektrického signálu na množství MPs.* 60

Obrázek 24: *Závislost elektrického proudu na opakovaném přídavku substrátu.* 61

Obrázek 25: *Závislost elektrického proudu na přídavku MPs.* 62

Obrázek 26: *Závislost elektrického proudu na množství ATCh - I.* 63

Obrázek 27: *Určení polohy cely v závislosti na přídavku MPs.* 64

Obrázek 28: *Kalibrační křivka* 66

Obrázek 29: *Závislost změny proudu a relativní inhibice na koncentraci pesticidu.* 68

Obrázek 30: *Závislost relativní inhibice a změny proudu na koncentraci pesticidu.* 69

Obrázek 31: *Závislost relativní inhibice, změny proudu a el. proudu na množství MPs.* 71

Obrázek 32: *Závislost el. proudu na promývacích krocích.* 72

Obrázek 33: *Kalibrační křivka* 74

Obrázek 34: *Závislost změny el. proudu a relativní inhibice na koncentraci pesticidu.* 76

Seznam tabulek

Tabulka 1: *Přehled používaného převodu u citlivých látek* 19

1. Úvod

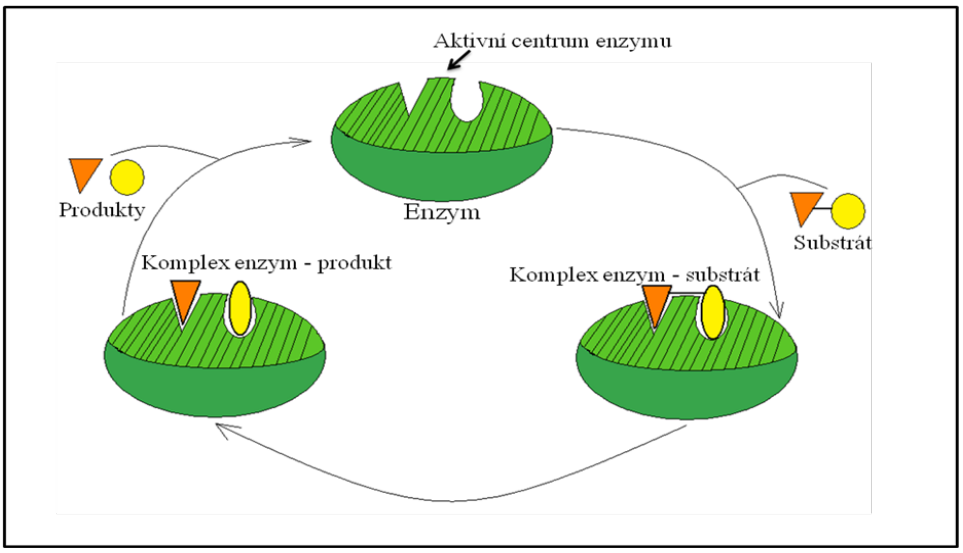
V současném světě není biologie pouze samostatnou vědeckou disciplínou, ale propojuje se úspěšně čím dál více s technickými vymoženostmi dnešní doby. Kvůli vysokým nárokům, které jsou kladeny na vědce, je nutné, aby docházelo k jejich spolupráci i s jinými odvětvími vědy a výzkumu. Věda jako taková se zejména spojuje s informatikou, kde dochází k složitým procesům. Proto je velmi důležité, aby u tohoto oboru docházelo především k pochopení základních pojmů. V tomto oboru se vyskytuje také velká náročnost výzkumu a vybavení laboratoří z hlediska financí. Snadněji se získávají informace, především z cizojazyčných článků, z knih, které se zabývají danou problematikou a z odkazů firem, které působí v tomto odvětví. K využití v praxi jsou potřeba především kvalitně vybavené laboratoře a dostatečně kvalitní tým spolupracovníků, jak z oblasti biologie, tak z oblasti informatiky, aby bylo možné získat a zpracovat relevantní údaje k následující publikaci nových výsledků. K vypracování této práce bylo potřeba provádět experimenty v laboratoři, kde bylo možno pracovat s biologickým materiálem a propojit to s funkčními biosenzory. Spolupráce proběhla s Ústavem biochemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Práce spočívá v použití enzymových elektrod, které reprezentují nejrozšířenější variantu biosenzorů. Způsob imobilizace zesíťováním nebo zachycením je ideální při stanovení enzymových substrátů. Je ale méně vhodný při stanovení enzymových inhibitorů. Použití magnetických částic s imobilizovaným enzymem umožní jednoduché obnovení enzymové vrstvy uvolněním inaktivovaných částic a zachycení čerstvého enzymu pomocí magnetu. Tento přístup byl testován při stanovení organofosforových pesticidů pomocí inhibice cholinesterasy imobilizované na magnetické částice o různé velikosti. Tento koncept je obecně využitelný pro enzymová a imunochemická biosenzorová stanovení.

I. TEORETICKÁ ČÁST

2. Enzymy

Jedná se o látky, které se z hlediska chemického složení řadí mezi bílkoviny a chovají se jako biokatalyzátory. Jsou to katalyzátory s vysokou strukturní specificitou a katalyzují pouze přeměnu jedné látky a ostatní ignorují, přeměna přitom probíhá pouze jediným mechanismem za vzniku předem daného produktu. Umožňují podobně jako ostatní katalyzátory snižovat aktivační energii chemické reakce, kde poté dochází k urychlení jejího průběhu. Enzymy neovlivňují pouze hodnotu rovnovážné konstanty reakcí, ale způsobují, že systém dosáhne rovnováhy mnohem rychleji. Děje, které se vyskytují při působení enzymů, by jinak za normálních teplot vůbec neprobíhaly. Většina reakcí probíhá za účasti enzymů v živých organismech. Enzymy (E) se chemicky vážou se sloučeninami vstupujícími do reakce - se substráty (S) za vzniku přechodné, nestálé sloučeniny – *komplexu enzym-substrát,* což je vyjádřeno rovnicí 1. Substrát je sloučenina přeměňována za optimálních podmínek, pro praktická měření se často volí syntetický substrát, který je levnější, stabilnější, dobře rozpustný a lépe definovaný. Pro stanovení aktivity enzymů by se většinou měly používat co nejvyšší koncentrace, protože dochází k nejmenším změnám koncentrace substrátu v průběhu reakce a enzym pracuje v saturovaném stavu. Naopak může docházet k problémům při použití přirozených substrátů, kdy vznikající produkty nemusí být přímo měřitelné a často jsou nezbytné následné reakce. [1]

$$E + S \underset{\leftarrow}{\overset{\rightarrow}{}} ES \rightarrow E + P \qquad (1)$$



Obrázek 1: *Katalytické působení enzymů*

Vazba mezi substrátem a enzymem probíhá v aktivním centru, což je oblast bílkovinného řetězce, která vzniká přiblížením postraních skupin aminokyselin. Tato vazba je většinou nekovalentní a v aktivním centru dochází obvykle ke zvýšení rychlosti chemických reakcí a k optimální orientaci. Po skončení reakce dochází k uvolnění produktu (P). Katalytické účinky často závisí i na neproteinové složce, která se nazývá kofaktor. Pevně kovalentně vázané na strukturu enzymu se nazývají prostetické skupiny a vázané volněji koenzymy, které jsou přítomné v buňce. [2] Enzymy jsou vysoce specifické a snadno regulovatelné.

2.1. Enzymové reakce

Reakce katalyzovaných enzymů probíhají různými chemickými rychlostmi a závisí na okolních podmínkách. Mezi faktory, které nejvíce ovlivňují daný průběh reakce, patří:

- *Aktivita enzymu* – rychlost reakce zvyšuje přímo úměrně množství enzymu za předpokladu dostatečně velkého množství substrátu při enzymové katalýze.
- *Množství substrátu* – rychlost chemické reakce roste s koncentrací substrátu, dokud nedojde k obsazení aktivního centra u všech molekul enzymu.
- *Teplota prostředí* – při zvětšující se teplotě dochází ke zvětšení energie reagujících částic a s rostoucím počtem vzájemných srážek dochází ke zvýšení rychlosti vzájemné reakce. Enzymy ale mají bílkovinnou povahu a jako takové jsou velmi citlivé na danou teplotu. Většinou se teplota pohybuje

v rozmezí od 10°C do 40°C. Při nižších nebo v případě vyšších teplot bývá aktivita enzymů silně potlačena.

- *pH prostředí* – enzymy mají většinou určitou optimální oblast pH, v níž je účinnost nejvyšší a maximální aktivita je většinou vykazována v úzkém rozsahu pH. Enzymová aktivita se snižuje, když reakce probíhá mimo optimální pH. [3]

2.2. Aktivace a inhibice enzymu

V přítomnosti některých iontů nebo nízkomolekulárních sloučenin v reakčním prostředí se může ovlivnit rychlost chemické reakce. Při urychlení reakce se jedná o aktivaci (daná látka je aktivátor) a při zpomalení reakce dojde k inhibici (způsobí ji inhibitor). K aktivaci enzymu muže dojít tak, že se jeho neaktivní forma proenzym přemění na formu účinnou. Podle daného mechanismu se rozlišuje několik typů inhibitorů, lze říci, že dochází k inhibici enzymu:

- Kompetitivní inhibice – molekula inhibitoru se váže na aktivní centrum, čímž brání vytvoření komplexu enzym – substrát. U této inhibice je mnohem vyšší celková koncentrace inhibitoru potřebná pro potlačení aktivity. Inhibitor a substrát mezi sebou soupeří o aktivní centrum. Tento typ inhibice je vratný.[4]

- Nekompetitivní inhibice – nedochází zde k soutěži mezi inhibitorem a substrátem o místo v aktivním centru a snižuje se aktivita enzymu. Toto způsobují většinou ionty těžkých kovů. [4] ,[5]

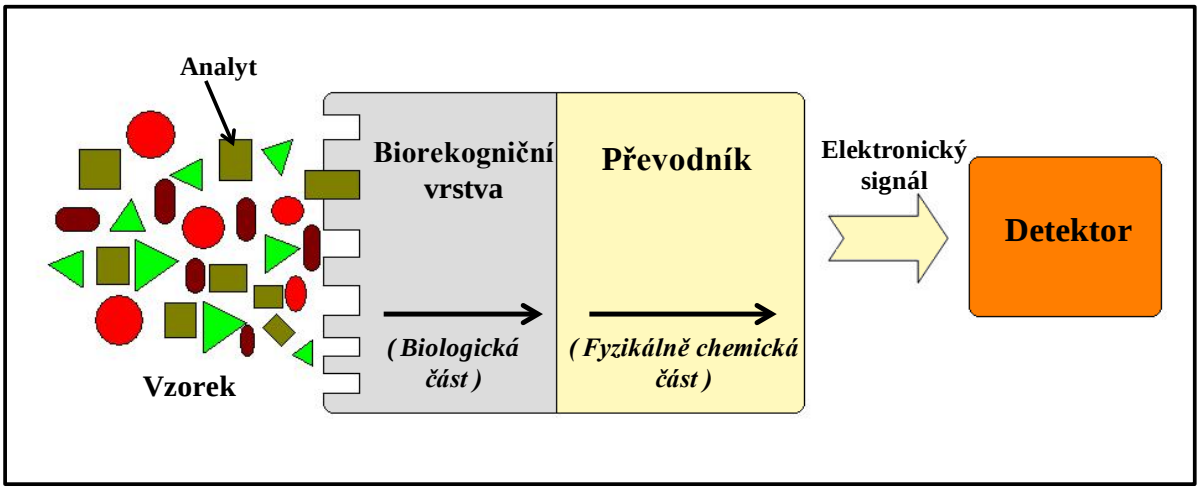
- Allosterická inhibice – tento typ snižuje aktivitu enzymu vyvolanou reversibilní vazbou inhibitoru mimo oblast aktivního centra, kam se váže substrát. Dochází k úplnému zrušení možnosti vazby substrátu na enzym. Změna teploty může změnit nejen afinitu, ale může zcela změnit danou vazbu. Afinita je největší při nízkých teplotách. [6]

Z izolovaných enzymů je jen několik set vhodných pro komerční užití v senzorech. Velmi často se používají oxidoreduktázy katalyzující oxidaci, kdy odnímají elektrony nebo redukci, kdy přidávají elektrony na enzymový substrát. Oxidoreduktázy se spojují s elektrochemickými procesy, jejichž změny lze snadno sledovat elektrochemickou detekcí.

Reálným problémem je přenos elektronů z aktivního místa a na aktivní místo. Biosenzory se v dnešní době využívají v biotechnologii, lékařské diagnostice a mají uplatnění i v životním prostředí. Je třeba si nejdříve uvědomit, jak biosenzory vůbec pracují.

3. Biosenzory

Analytické zařízení, které obsahuje citlivý prvek biologického původu, se nazývá biosenzor. Vykazují velkou selektivitu odezvy a krátký reakční čas. Biorekogniční vrstva je buď v těsném kontaktu, nebo je součástí fyzikálně - chemického převodníku. Průběžně získaný elektronický signál je přímo úměrný koncentraci jedné nebo skupině několika chemických látek ve vzorku. [7] Schématické znázornění biosenzoru lze shlédnout na obrázku 2.



Obrázek 2: *Základní schéma biosenzoru*

V ideálním případě je biosenzor vysoce specifický k určitému analytu, někdy ke skupině analytů stejné povahy a je u něj možné také stanovovat klinické vzorky, (odpadní) vody, půdy nebo sedimenty. Dalšími výhodami jsou nízké detekční limity, rychlá odezva a opakovatelnost. Určité nevýhody, které přináší využití biologického elementu, jsou omezené podmínky při stanovení (pH, teplota) a v případě proteinů nutnost jejich izolace a někdy i nízká stabilita. Vlastnosti, které ovlivňují funkčnost a přesnost měření daných biosenzorů patří k velmi důležitým prvkům.

3.1. Požadavky na biosenzory

Selektivita – dochází zde k působení interferencí. Vzniklá odezva biosenzoru by se měla objevit pouze za přítomnosti stanovované látky. Ostatní látky by se neměly projevit. Prakticky je často nutné rušivé látky eliminovat nebo paralelně určit jiným biosenzorem. [8]

Citlivost – jedná se o ustálenou změnu výstupního signálu senzoru v důsledku změny měřené veličiny. Citlivost by měla být konstantní po celou dobu životnosti biosenzoru. V reálných systémech se změny citlivosti kompenzují pravidelnou kalibrací. [9]

Kalibrace – zakládá se na vystavení senzoru různým standardním roztokům o známé koncentraci analyzované látky. Kalibrační body by měly uzavírat pracovní oblast senzoru, aby nebylo třeba provádět nespolehlivé extrapolace. [9] V praxi je snaha používat co nejméně kalibračních bodů. Nejvhodnějším výsledkem je získat přímku, kde stačí znát 1 nebo 2 body. Kalibraci je nutné periodicky opakovat.

Šum – se vyskytuje většinou jako elektromagnetický a lze ho omezit elektrickým stíněním biosenzoru a vstupních vodičů. Turbulence, které vznikají při míchání, mohou vést k šumu. Snížení velikosti šumu lze dosáhnout uspořádáním elektronických měřících obvodů nebo digitálními technikami. [8]

Životnost – je obvykle limitována nejslabším prvkem, mezi který se řadí biorekogniční složka. Je potřeba odlišit stabilitu při skladování od operační stability, která bývá závislá na počtu a druhu analyzovaných vzorků. Pro biosenzor, který má být déle skladován, je vhodnější nižší teplota. Je lepší skladování v suchém stavu. Optimální podmínky je vhodné stanovit individuálně.

Limit detekce – je to nejnižší stanovitelná koncentrace analytu. Obvykle je zhoršován vedlejšími procesy a za ideálních podmínek je dán rozlišením meřícího přístroje. Pro definici se často používá velikost šumu (N, noise) signálu a limit detekce se bere pro poměr S/N = 3. S tímto výrazem se pojí také mez stanovitelnosti metody. [8]

Linearita – za ideálních podmínek existuje v celé pracovní oblasti. Biosensor má konstantní citlivost pro všechny možné koncentrace analytu a oblast linearity je pouze užším intervalem uvnitř pracovní oblasti. V lineární oblasti stačí k vytvoření kalibrace pouze dva body. Pro praktické použití biosensorů není linearita nezbytně nutná, ale musí být stálý průběh kalibrační křivky. Nelineární úseky lze aproximovat několika přímkami. [8]

Mezi charakteristické pracovní vlastnosti biosenzorů se také řadí *hystereze, teplotní závislost, rychlost konvekce, rychlost odezvy, doba odezvy, dlouhodobá stabilita, signál pozadí.*

3.2. Biorekogniční vrstva

Biologický prvek v tomto zařízení pracuje na bázi klíče a zámku. Selektivně působí pouze na určitou část nebo skupinu analytů. Tyto látky se mohou vázat na připravenou vrstvu a měnit její vlastnosti. Tato vrstva je založena na biokatalytickém principu nebo na principu vzniku specifické pevné afinitní vazby, kde tento prvek ovlivňuje specifitu stanovení. Bioafinitní část je tvořena látkou, která je specificky vázána v afinitním komplexu a biokatalytická část je tvořena složkou, která se v průběhu chemické reakce změní. [10]

3.3. Převodník

Jedná se o fyzikálně chemickou část, ve které dochází k převodu chemického signálu při působení analytu na biorekogniční vrstvu, na elektronický signál, který je lépe měřitelný pomocí detektoru. Fyzikálně chemická část je tvořena různými druhy převodníku, mezi které se řadí optické, elektrochemické, piezoelektrické a akustické, a kalorimetrické převodníky. Fyzikálně chemický převodník se může různě kombinovat s biologickými látkami zachycenými na biorekogniční vrstvě. V tabulce 1 je vyjádřen daný přehled. [11]

Tabulka 1: *Přehled používaného převodu u citlivých látek*

Biologická část	Fyzikálně chemický převod
Organismus:	**Elektrochemický**:
Buňka	Amperometrický
Organická membrána	Impedanční
Tkáň	Potenciometrický
Receptor	**Kalorimetrický**
Enzym	**Optický**
Protilátka	**Akustický**
Nukleová kyselina	

Biosenzory umožňují velmi rychlou analýzu, snadnou obsluhu a díky relativně levnému přístrojovému vybavení a dané miniaturizaci dochází k velmi častému využití.

3.4. Rozdělení biosenzorů podle fyzikálně chemického převodníku

Rozlišujeme čtyři druhy biosenzorů podle fyzikálně chemického převodníku a zvláštní zřetel bereme na elektrochemické systémy, které budou podrobněji popsány.

3.4.1. Optické biosenzory

Tento typ biosenzorů využívá interakce světelného záření s chemickými látkami, při kterém dochází ke změně vlastností světla. V praxi dochází k zachytávání molekul ze vzorku, který protéká podél dané vrstvy na biosenzoru, přičemž vzniká chemická reakce s receptory. Nanesená vrstva na biosenzorech vytváří nebo mění světelné vlny, které jsou řízeny prostřednictvím optického vlákna ke vhodnému detektoru. Zdrojem světla jsou většinou světlo emitující diody, výbojky, lampy či lasery. Spojení optiky a biologie umožňuje detekovat i identifikovat biologické a chemické látky ve velmi nízkých koncentracích. Biosenzory s povrchovými plasmony se například staly důležitým nástrojem v biochemii a molekulární biologii a uplatňují se i při vývoji a charakterizaci nových léčiv. [12]

3.4.2. Piezoelektrické biosenzory

Využívá se piezoelektrického jevu, ve kterém je piezoelektrický krystal zapojen do oscilujícího obvodu. Stabilní vibrace nastávají pouze při přirozené rezonanční frekvenci. Specifičnost stanovení se dosáhne potažením povrchu krystalu vhodnou vrstvou bioelementu. Vibrace vzniklé v elektrickém poli se mění s tloušťkou krystalu. Nejstarším používaným piezoelektrickým systémem využívaným pro konstrukci biosenzoru jsou chemické mikrováhy. Systém je vhodný pro přímé sledování afinitních interakcí v reálném čase podobně jako optické převodníky.

3.4.3. Kalorimetrické biosenzory

U těchto biosenzorů se docílí změny teploty v průběhu enzymatických reakcí. Převodníkem bývá termistor, jehož odpor je závislý na teplotě. Kalorimetrické biosenzory mají své omezení především v přesnosti určení uvolněného tepla, přičemž je u nich

vyžadováno sledování teploty s rozlišením 0,0001°C, což vyžaduje náročné přístrojové vybavení. Naopak je výhodou, že nevadí částice ve vzorku, interferující látky a světlo. [8]

3.5. Elektrochemické systémy

Díky své jednoduché konstrukci měřícího systému, selektivitě a nízkým nákladům na výrobu se jedná o nejrozšířenější biosenzory. Jsou využívány ke snímání molekulárních složek, které jsou součástí biorekogničního prvku na snímací elektrodě. [13] Spotřebovávají nebo produkují elektrony či ionty, což způsobuje změny v elektrických vlastnostech, které se dají měřit. Sestavení takového systému vyžaduje minimálně dvě elektrody. První elektroda je pracovní, nebo-li měřící. Musí být zkonstruována z takových materiálů, aby nedocházelo k elektrochemickému rozkladu. Druhá elektroda je srovnávací, nebo-li referentní s přesně definovaným a stálým potenciálem. Podle daného použití a konstrukce lze dvouelektrodový systém doplnit o elektrodu pomocnou. Podle způsobu měření se mohou dělit na konduktometrické, potenciometrické, impedimetrické a nejvíce rozšířené ampérometrické.

3.5.1. Konduktometrické/impedimetrické

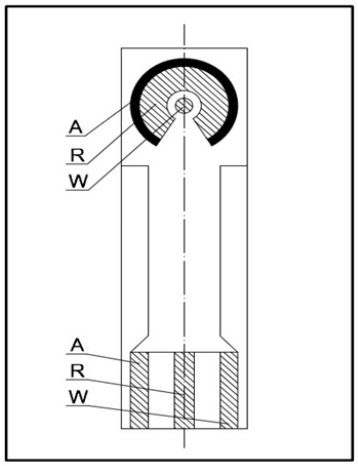
U kondumetrických systémů dochází ke sledování vodivostních změn při biochemických reakcích, při kterých se produkují a spotřebovávají ionty. Oproti potenciometrickým a ampérometrickým systémům mají malou citlivost. Jedná se o univerzální typ převodníku, kde je nežádoucí složkou vlastní vodivost prostředí. U impedimetrických systémů se stanovují změny impedance v implikaci změn vyvolaných v daném prostředí. Mají dobrou vzájemnou slučitelnost s elektrickými obvody a s počítačovými rozhraními. V případě konduktometrie a impedimetrie se neuplatňují faradaické procesy a koncentrační polarizace, jako je tomu v případě potenciometrických a ampérometrických převodníků. [14]

3.5.2. Potenciometrické

Umožňují měření potenciálu při nulovém proudu. Základním principem je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem. [8] Při potenciometrické detekci je potenciál úměrný logaritmu koncentrace analyzované látky. [15] Většinou je výhodnější použít ampérometrické sensory. K danému převodu se využívá iontově – selektivní elektroda s enzymovým povrchem. Mezi nevýhody se řadí především vysoký odpor, eroze a rozbitnost.

3.5.3. Ampérometrické

Jedná se o elektrochemickou techniku, která je využívána komerčně dostupnými biosenzory. Využívají skutečnosti, že některé chemické látky jsou oxidovány a redukovány (redoxní reakce). [16] Dochází tedy k heterogennímu přenosu elektronů mezi elektrodou a biorekogničním prvkem, nejčastěji enzymem nebo vhodnou pomocnou látkou - mediátorem. Měřenou veličinou je proud, který je úměrný množství analytu. V této práci se využívá při měření proudu obvykle konstantní potenciál pracovní elektrody a velikost proudu procházejícího za daný časový úsek v systému udává náboj, který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách. K udržení konstantního napětí u tříelektrodového biosenzoru mezi pracovní elektrodou a pomocnou se využívá potenciostat. Pracovní elektroda u těchto systémů je obvykle nějaký ušlechtilý kov nebo sítotisková vrstva, na kterou se navazuje biorekogniční složka. Jsou používány ve velkém měřítku pro analyty, jako jsou glukóza, laktát, měřit lze i inhibující látky jako organofosfáty a karbamáty. [17] Pro rychlou analýzu přítomných toxických látek mohou být použity biosenzory s rozdílnými biorekogničními elementy. K tomu lze využít i biosenzor založený na acetylcholinesterase, který funguje na inhibičním principu.



Obrázek 3: *Senzor s tříelektrodovým uspořádáním:* A - pomocná elektroda, R - referenční elektroda, W - pracovní elektroda

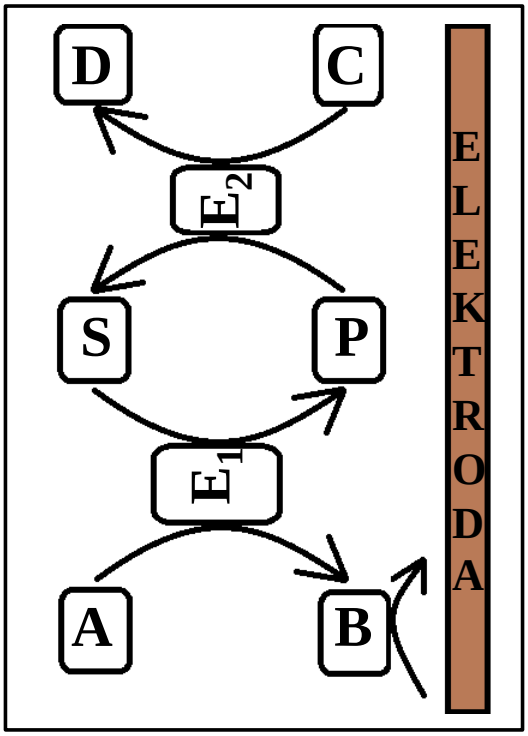
Elektrochemické biosenzory existují již téměř padesát let, a proto se zdá, že mají velký potenciál pro budoucnost. Tato technologie získává praktickou využitelnost. Využívají miniaturní elektrochemické přístroje a jsou tedy velmi výhodné pro některé sofistikované aplikace, které vyžadují mobilitu, rychlé měření a použití malého množství vzorku. Četné komerční aplikace potvrzují atraktivní výhody elektrochemických biosenzorů.

3.6. Enzymové biosenzory

Řadí se mezi biokatalytické senzory, které mají jako biorekogniční složku enzym, který dokáže přeměnit substrát na produkt. [8] Tyto senzory umožňují detekovat především látky s malou molekulovou hmotností. Rychlost enzymatické reakce, při které vzniká produkt, je určena rovnicí podle Michaelise a Mentenové:

$$\textit{Měřený signál} = \frac{\textit{Měřený signál max} \times [S]}{K_m + [S]} \tag{2}$$

Rychlost vznikajícího produktu je *Měřený signál,* maximálně Měřený signál je maximální rychlost při saturaci substrátem, K_m je Michaelisova konstanta a *[S]* je koncentrace substrátu. Pokud je koncentrace substrátu menší než Michaelisova konstanta, tak odezva bude lineární a pro měření je to užitečné. Většinou se používá purifikovaný enzym a někdy i biologický materiál, který zvyšuje enzymatickou reakci. Používá se buď jeden enzym, nebo současně i dva enzymy a někdy i více enzymů, které katalyzují následné reakce nebo probíhají jako recyklační procesy. [8] Tento princip je založen na kontinuálním způsobu reakce analytu, který je schopen přecházet mezi substrátem a produktem za přítomnosti pomocných komplementárních enzymů. Pomocné látky umožňují zapínat recyklaci a vystupují z recyklačního procesu. Ostatní látky musí být v reakci v nadbytečném množství oproti koncentraci analytu, aby rychlost reakce mohla být limitována. Je také možné použít jak chemickou recyklaci, tak i elektrochemickou recyklaci. Na obrázku 4 je zobrazena dvouenzymová recyklace.



Obrázek 4: *Znázornění recyklačního procesu*

E1 a E2 je systém komplementárních enzymů, A, B, C a D jsou jejich koreaktanty, S je substrát E1 a P je produkt katalytické reakce E1+S

Recyklační procesy patří v dnešní době mezi složky, které se nejvíce studují a využívají se i u imunochemických metod k citlivé detekci enzymových značek.

3.6.1. Možnosti stanovování inhibitorů

Enzymové biosenzory umožňují stanovovat koncentraci použitých enzymů, ale i inhibici a aktivaci enzymů. Analyt ve formě inhibitoru enzymů má širokou škálu využití. Enzymové reakce probíhají za přítomnosti inhibitorů a při poklesu aktivity enzymu, která je úměrná množství daného inhibitoru, je možné tyto reakce stanovovat. Bezpochyby zde existuje určitá forma zesilovacího mechanismu. Kalibrační křivky v logaritmickém zobrazení umožňují určovat, jak se inhibitor s imobilizovaným enzymem váže a podle toho se můžou určovat typy inhibice a relevantní měřící postupy. Tento způsob stanovení lze použít jak pro reverzibilní, tak i pro ireverzibilní typy inhibice. U měření, při kterém dochází ke stanovování ireverzibilních inhibitorů, se trvale snižuje aktivita detekčního systému a to způsobuje jeho malé použití. Nejběžnější inkubační ireverzibilní postup se skládá ze stanovení výchozího signálu biosenzoru, poté se nechá inkubovat s inhibitorem určitou dobu a potom se stanoví zbytkový signál. Je možné provést i kinetické měření, kde se inhibitor dává přímo do směsi se substrátem a sleduje se časový pokles. Je to rychlejší metoda, ale biosenzor je možné použít jen omezeně. U reverzibilního stanovování inhibitorů nedochází k žádným specifickým problémům. Zde se změří opět výchozí signál biosenzoru se substrátem a do reakční směsi se přidává vzorek s inhibitorem. Nakonec se sleduje pokles signálu, který je úměrný koncentraci signálu. Po promývacím kroku je možné měření opakovat. Tuto metodu stanovování lze využít také k analýze probíhajících reaktivačních a inhibičních procesů. Pro vyhodnocování se musí provádět různé typy transformace k linearizaci výsledků. Zlepšení citlivosti detekce je možné prodloužením doby inkubace s inhibitorem.

3.6.2. Převodník enzymových senzorů

Jak bylo popsáno výše, tak i převodník u enzymových senzorů musí být schopen převést biologické rozpoznání na měřitelný signál. Provádí se měřením změn zaznamenaných v reakci bioreceptoru. Vlastnosti ampérometrických biosenzorů založených na enzymech jsou určovány podle schopnosti imobilizovaných enzymů vyměňovat elektrony s elektrodou a umožňují měnit poměr přenosu elektronů. Spojení příčnou vazbou, kovalentní vazbou nebo fyzikálním záchytem se řadí mezi tradiční imobilizační metody. Existují však i nové metody. Slibnou imobilizační technikou je zachycení bílkoviny / enzymu ve vodivém polymerním filmu. Nejnovějším a sílícím trendem jsou ampérometrické biosenzory se začleněným biokatalytickým uhlíkovým základem (nanotrubky, grafen a další formy). Výsledky modifikovaných bioelektrod nabízejí několik výhod: blízkost biokatalyzátoru a citlivého

místa, možnost začlenění dalších komponent například kofaktorů nebo mediátorů jako redoxních prostředníků, snadnou obnovu povrchu, jednoduchou ekonomickou výrobu a vysokou citlivost inkorporovaného biokatalyzátoru.

3.6.3. Navržení biologické části u enzymových senzorů

Při návrzích biologické části je potřeba postupovat tak, aby bylo možné získávat co největší odezvu, kterou lze získat pomocí molekul nacházejících se v blízkosti fyzikálně – chemického převodníku. Proto je potřeba věnovat přípravě biologické části velkou dávku pozornosti, abychom získali dostatečnou stabilitu při navázání molekul a nedošlo k ovlivnění jejich přirozené aktivity. Na přípravě daného postupu se lpí čím dál více a existuje jich celá řada. Převážně záleží na vlastnostech, ve kterých daný senzor pracuje, na aktivitě molekul a na převodníku. [8]

3.6.4. Příprava citlivé vrstvy biosenzoru

Při přípravě citlivé vrstvy je potřeba nejdříve určit dané části povrchu převodníku, kde má být daná vrstva vytvořena. Na daném povrchu dochází ke změně chemického složení, při kterém se vytváří definovaný povrch na molekulární úrovni. Tím pádem se zlepší daná selektivita biosenzoru a podmínky pro imobilizaci. Daný povrch může být tvořen sklem, křemíkem, ušlechtilými kovy a také grafitem. Tyto techniky umožňují vytvářet systémy vazebné nebo nevazebné a monovrstvé a vícevrstvé. Kovalentně lze daný povrch tvořit oxidy nebo vrstvou hydroxidů a oxidů. Kovalentně lze vytvářet povrch i technikou silanizace, která využívá aktivaci anorganického povrchu pokrytého vrstvou oxidu a kontaktní vrstvou silanu. Jedná se o techniku ireverzibilní. K vytvoření vrstev se může využívat také chemisorpce nebo vytváření samoskladných monovrstev. Je to založeno na vytvoření tuhého povrchu spontánní organizací molekul. Existuje několik typů těchto monovrstev, asi nejpoužívanější jsou thioly na zlatě. Jejich hlavní výhodou je jednoduchost přípravy. Lze ji provádět přímo v laboratoři za použití dostupných chemikálií. Z dalších výhod lze uvést stabilitu vrstvy, malou spotřebu proteinů, možnou regeneraci vrstvy a mezi nevýhody se řadí toxicita chemikálií. Existují i nekovalentně vytvořené vrstvy, které jsou sice slabší, ale dokáží udržet imobilizovanou biomolekulu. [18] Lze použít i další techniku vícevrstvého polymerního filmu přímo na povrchu nebo zachycení pomocí elektropolymerace.

3.6.5. Imobilizace

Proces imobilizace enzymů je důležitý z hlediska aktivity biomolekul, při kterém vzniká samotná citlivá vrstva. Volba metody imobilizace závisí na mnoha faktorech, jaká je povaha biologické složky, jaký je používaný detektor, jaké jsou fyzikálně chemické složky a jaké jsou provozní podmínky. Obecně platí, že existují čtyři běžné metody pro imobilizaci enzymů.

Adsorpce – jedná se o nejjednodušší a nejrychlejší metodu pro imobilizaci enzymů. Adsorpce se rozděluje na fyzikální a chemickou. Při fyzikální adsorpci se molekuly z jedné fáze zachytávají na pevném povrchu prostřednictvím různých druhů interakcí, mezi které se řadí hydrofobní interakce, iontové síly, vodíkové můstky a van der Waalsovy síly. Přičemž tyto interakce jsou výrazně ovlivněny pH, iontovou sílou a teplotou. Chemická adsorpce je silnější a zahrnuje vytvoření kovalentní vazby. Dochází při ní k tvorbě chemických vazeb mezi adsorbentem a adsorbovanou látkou. Velké množství látek a enzymů adsorbují na povrchu (oxid hlinitý, celulóza, kaolin, silikagel a sklo). [19]

Zachycování (entrapment) – je založeno na polapení biomolekul uvnitř pórů membrány během vytváření daného povrchu. Mezi nevýhody se řadí zhoršení mechanických vlastností, vazba mezi polymerem a biomolekulou a také různá velikost pórů v membráně. U této metody je běžně používaný gel polyakryamidový, vodivý polymer a nylon. Výhodou je, že struktura membrány slouží jako difuzní bariéra pro prolínající látky. Jsou výhodné pro imobilizaci molekul, které jsou náchylnější na změny struktur a aktivity. [19]

Kovalentní vazba – v této metodě je daný povrch modifikován, tak že je tvořen funkční skupinou $-NH_2$, -COOH nebo -OH a na tu se pak váže biomolekula kovelentní vazbou. Jedná se o dlouhodobě stabilní imobilizaci. Některé z funkčních skupin, které nejsou nezbytné pro katalytickou aktivitu enzymu, mohou být kovalentně vázané. Tato metoda byla využita při přípravě biosenzorů a vyžaduje určité podmínky, při kterých daná reakce může být vykonána. Jedná se o nízkou teplotu, nízkou iontovou sílu a pH ve fyziologickém rozmezí. Navázání biomolekuly může být provedeno také pomocí vícefunkčních činidel, která spojí funkční skupinu se skupinou koncového řetězce. [19]

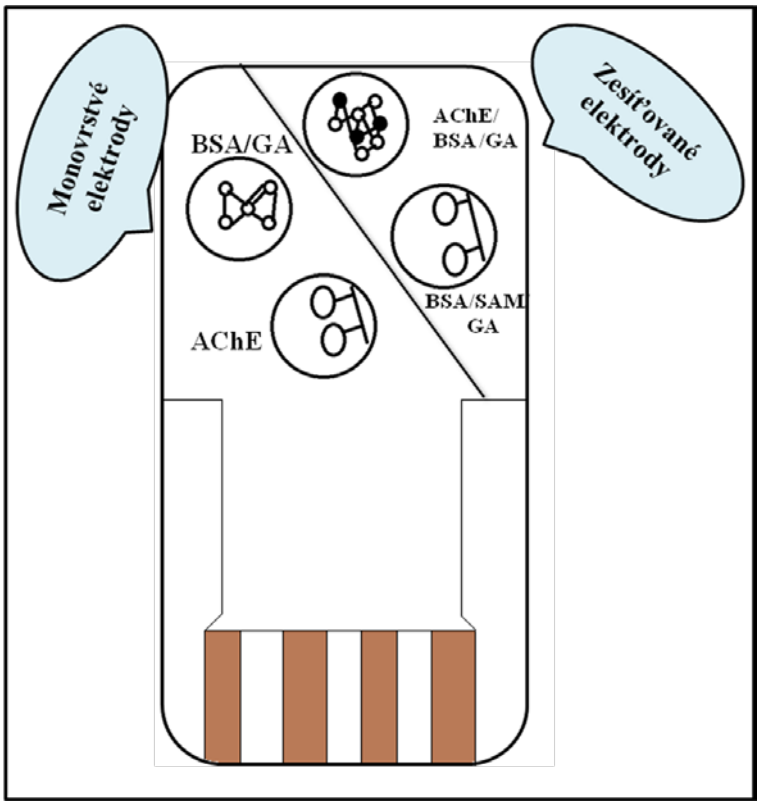
Zesíťování (cross-linking) – u této metody dochází k interakci jednotlivých bílkovin s činidly, která reagují s funkčními skupinami molekul při tvorbě intermolekulární kovalentní vazby. Vzniká tedy vícevrstvá nerozpustná membrána, která je tvořena biomateriálem připojeného kovalentní vazbou nebo adsorpcí k danému povrchu. Je to užitečná metoda pro stabilizaci

adsorbovaného biomateriálu. Jako bifunkční složka je většinou používán glutaraldehyd. Tyto složky mohou ovlivnit enzymatickou aktivitu při vysokých koncentracích. [19] Tato metoda byla použita u přípravy biosenzorů k vytvoření zesíťované vrstvy u vícekanálových biosezorů. Byl zde použit především enzym acetylcholinesterasa. Enzym může být buď zesíťován, nebo může být naředěn s inertní bílkovinou, která má hodně aminoskupin (BSA). Takové enzymové membrány se vyznačují velmi dobrou stabilitou v důsledku latentní enzymové aktivity.

3.6.6. Acetylcholinesterasa

Nejvíce stanovovanými pesticidy v rámci EU jsou, kvůli rozšířenosti jejich použití, karbamáty a organofosfáty. Tyto látky jsou nebezpečné kvůli své strukturní podobnosti s acetylcholinem, díky které inhibičně působí na acetylcholinesterasu. Jedná se o enzym, který je součástí metabolismu acetylcholinu, ten se jeho účinkem štěpí na kyselinu octovou a cholin. Je také známa pod zkratkou *AChE*. Vyskytuje se především v nervosvalových spojeních a cholinergních synapsích a v erytrocytech. [20] Řada enzymových elektrod je tvořena s cholinesterasou samostatně nebo v kombinaci s cholinoxidázou, podle kterého byly vyvinuty potenciometrické, ampérometrické a optické snímače. V krvi se vyskytuje také jako butyrylcholinesterasa. Fyziologická úloha AChE je ukončení přenosu nervových impulzů na cholinergních synapsích v nervovém systému. BChE se vyskytuje v séru a její role zůstává neznámá. Aminokyselinové sekvence byly určeny pro lidskou BChE a AChE z *Torpedo californica* a *Drosophila melanogaster*. Lze provést kinetickou inhibici na biosenzorech s imobilizovanou cholinesterasou. Jedná se o strukturu aktivního místa s obsahem serinu. Hydrolýzou přírodního substrátu acetylcholinu (AX) přes vznik komplexu enzymu a substrátu (EH.AX), vzniká cholinová molekula (HX) a je uvolněna molekula acetátu. Acetylovaný enzym (EA) je rozkládán rychlou hydrolýzou na kyselinu octovou (AOH) a volný enzym (EH) je opět uvolněn a případně alternativně tvoří komplex s inhibitorem (PX). [21] Oxofosforové sloučeniny jsou mnohem silnější než analogické thiofosfáty. U těchto reakcí se objevuje rovnovážná konstanta K_D a rychlostní konstanta k_2. V praxi se používá bimolekulární inhibiční konstanta $k_i = k_2 / K_D$, která byla stanovena pro mnoho pesticidů. Tato konstanta umožňuje předpovídat citlivost cholinesterasových biosenzorů vůči konkrétním látkám. Odezva může být určována koncentrací a nebo inhibičními účinky dané látky. Lze stanovit parametr anticholinesterasové toxicity, pokud není předem známa stanovovaná látka. Meze detekce jsou proměnlivé a tato zařízení jsou velmi variabilní. Enzym AChE je vylučován

svalovými buňkami, kde je k němu neustále připojena i tenká vrstva kolagenního vlákna, přičemž je spojuje bazální membrána. K tomu, aby acetylcholinový receptor účinně fungoval jako "switch", tak je také důležité, aby acetylcholin byl rychle odstraněn. Acetylcholinesterasa může být i ve více formách, které mají podobné katalytické vlastnosti. Liší se oligomerní strukturou a způsobem vazby na povrch buňky. Organofosfáty ji blokují ireverzibilně, karbamáty reverzibilně. Acetylcholinesterasu inhibují insekticidy, organofosfáty a karbamáty, které jsou značně používány v zemědělství a v lesnickém průmyslu. Oproti organochlorovým pesticidům jsou převážně preferovány, jako méně odolné v životním prostředí. Inhibitory AChE se mohou využívat při léčbě demence s Lewyho tělísky. I přes svou velkou citlivost mají biosenzory založené na enzymové inhibici výrazné nedostatky, mezi které se řadí dlouhé a únavné protokoly pro přípravu vzorků a špatná selektivita. Acetylcholinesterasa byla použita k imobilizaci na enzymové elektrody. Byla součástí zesíťované i monovrstvé vrsty elektrod biosenzoru. Nanesení tohoto enzymu je ukázáno na obrázku 5.



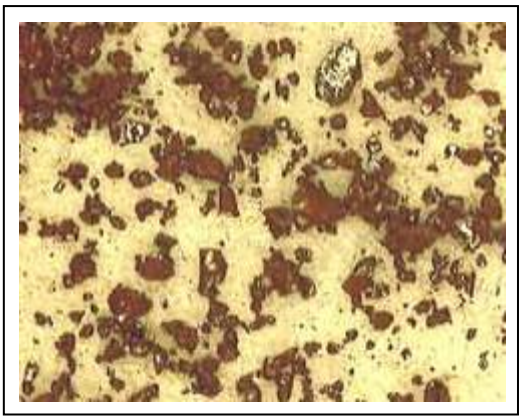
Obrázek 5: *Nanesení enzymů na čtyřkanálový biosenzor*

3.7. Druhy měření s biosenzory

Mezi základní metody patří měření v nádobce a měření v průtočném systému. Měření v nádobce umožňuje jednoduché provedení, uspořádání a nevyžaduje specifické vybavení. Je založeno na přídavku vzorku a po ustálení dojde k odečtení signálu. Tuto metodu je vhodné využít pro optimalizaci biosenzoru (pH, druh a koncentraci pufru, teplotu). Nevýhodou je manuální obsluha. Průtočný systém umožňuje provádět měření téměř automatizovaně. Průtočný systém se skládá z biosenzoru, hadiček, průtočné cely, ventilu a pumpy. Měření se může provádět buď střídavým injektováním nosného pufru, nebo se může využít neustálého průtoku pufru celou, do kterého se vstřikuje specifické množství analytu.

4. Magnetické částice

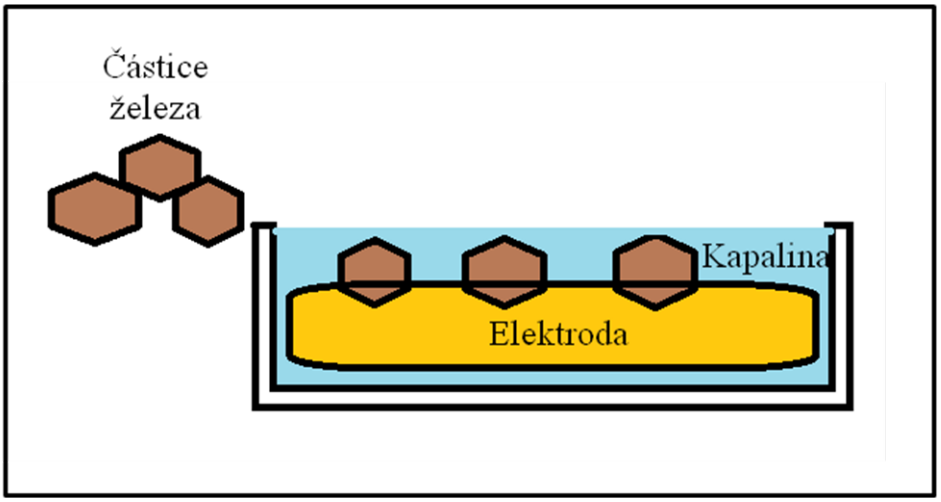
Částice, které mají magnetizovatelné vlastnosti (MPs – magnetic particles), viz Obrázek 6, se vyskytují ve všech vědeckých odvětvích. Velké uplatnění nacházejí především v izolaci, separaci a transportu od nukleových kyselin, proteinů až po celé buňky. Širokou škálu uplatnění nacházejí v biotechnologických a biomedicínských odvětvích, které se zabývají syntézou a různým působením na MPs. Jejich vývoj spojuje jednotlivé vědecké disciplíny. Poprvé byly magnetické částice popsány H. A. Lowenstamem na počátku 20. století, kde ve své práci použil biochemicky precipitovaný magnetit. R. Blakmore objevil v roce 1975 bakterii *Magnetospirillum gryphiswaldense,* jejíž schopností je vytvářet sférické krystaly magnetitu o velikosti 50 nm. [22] Vznikají tak řetězce magnetických částic, které se vyrovnávají souběžně se zemským magnetickým pólem. Zjistilo se, že bakterie na jižní polokouli plavou k jihu a na severní polokouli tomu je naopak. V medicínských a biologických odvětvích se naplno rozvinuly technologie s magnetickými částicemi na počátku 70. let 20. století. [23] Magnetické částice pro biologickou separaci využívají jedno nebo více magnetických jader s upraveným povrchem matice polymerů, hydroxylapatitu s funkciolizovanou skupinou nebo křemíku ve formě silikátového obalu. Jádro magnetických částic je tvořeno magnetitem (Fe_3O_4), nebo maghemitem (gamma Fe_2O_3), které mají feromagnetické nebo superparamagnetické vlastnosti. Superparamagnetismus je založen na pohybu částic, které se v jádře pohybují rychleji v důsledku tepelné excitace. Superparamagnetické částice mají výhody především ve snadné resuspenzi, ve velké ploše, v pomalé sedimentaci a v rovnoměrném rozložení částic v suspenzních médiích. Magnetické oddělení těchto částic bude hrát velkou roli v budoucnosti u automatizovaných stanovení a v analytických aplikacích. V důsledku působení magnetického pole se zmagnetizované částice mohou chovat jako malé magnety a vyskytují se potom jako agregáty nebo mřížky. [24]



Obrázek 6: *MPs [24]*

4.1. Působení částic v magnetickém poli

Velikost MPs se pohybuje v (nm) až (µm). Pomocí vnějšího magnetického pole mohou být částice uspořádány, což může vést k souhlasné orientaci magnetických polí jednotlivých atomů, a tím i ke značnému zesílení magnetického pole v látce. K tomuto jevu nedochází, protože mu zabraňuje tepelný pohyb. V paramagnetické látce nedochází k zesílení magnetického pole ani vnějším polem o dostatečné magnetické indukci. Magnetické částice (oxidy železa) se v magnetickém poli přitáhnou k magnetu a po nějakém čase se od magnetu pustí a dispergují, čímž ztrácí magnetické vlastnosti (neshlukují se).



Obrázek 7: *Částice železa a jejich zachycení v okolí magnetu*

Pro dokonalé využití MPs k zachycení různých biomolekul je jejich povrch modifikován. Objevuje se zde i vrstva polymeru, která chrání vlastní částice proti vnějšímu prostředí například proti oxidaci. Modifikace povrchu je závislá na izolované látce. Nejčastější

modifikací povrchu MPs jsou proteiny, protilátky a oligonukleotidy. Výhody magnetických technik spočívají v tom, že jsou rychlé a jednoduché v manipulaci se vzorkovacími lahvičkami a je možnost pracovat i s velkými i malými objemy vzorků. Díky tomu je možnost docílit velkého zisku zachycených cílených biomolekul a navíc se předejde jejich případnému fyzikálnímu nebo biologickému poškození.

4.2. Syntéza povrchu magnetických částic

MPs z oxidu kovu jsou v popředí zájmu, vzhledem k jejich netoxicitě na rozdíl od jiných kovů (kobalt či nikl), které mají lepší magnetické vlastnosti. Metody založené na syntéze obsahují postupy, které využívají:

i. usazování částic v plynné fázi,
ii. mikroemulsi,
iii. litografii,
iv. hydrolytické reakci,
v. sonochemickou syntézu [25] [26] [27]

Základní postup chemické syntézy MPs z magnetitu je založen na hydrolytické reakci. Příprava těchto částic se skládá z následujících kroků – nejdříve proběhne koprecipitace magnetitu při 80°C ve vodném roztoku Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů v prostředí 25% hydroxidu amonného. Vzniknou tak malé částice magnetitu. Ty se dál prostorově stabilizují pomocí kyseliny laurové, myristové nebo olejové. Potom se musí jednotlivé částice oddělit od zbylého roztoku. To se provádí dekantací, tj. volným usazováním. Roztok nad částicemi se pak odsaje, přidá se promývací roztok a postup se opakuje. V mnoha laboratořích patří tento postup mezi standardní přípravu magnetických částic a umožňuje tyto částice využít pro aplikaci v biologii.

4.3. Modifikace a charakterizace povrchu MPs

K dalším krokům při přípravě povrchu magnetických částic se řadí modifikace, která následuje po stabilizaci. Teprve tato část udělá z částic správný nástroj pro jejich použití. Modifikace se používá především k imobilizaci biomolekul na jejich povrch, aby nedocházelo k adsorpci interferujících látek. Modifikovat částice je důležité z hlediska vznikající oxidace, které podléhají. Dochází zde také ke vzniku interakcí, které mohou způsobovat vznik shlukujících částic, nebo–li vznik agregátu, což je z hlediska využití nevyhovující. Je tím velice ovlivněna biokompatibilita částic. Pokrytím tenkou vrstvou zlata na komerční částice se zlepšuje přichycení protilátek na povrch částic a účinně se tak redukuje nespecifická adsorpce. [28] Pro funkcionalizaci magnetických částic se používá například silanizace na povrchu částic, která využívá tří základních technik. Při této metodě dochází k odstraňování organických látek. Pro další modifikace povrchu se využívají hlavně polymery, organické látky a nejrůznější pokovování. [29] Jedním z velmi využívaných postupů při modifikaci je obalení částic vnější slupkou, která může být tvořena organickými či anorganickými látkami. Tyto částice lze využít k navázání redoxních látek, což umožňuje zvýšení přenosu elektronů mezi aktivním místem enzymu a elektrodou. [30] Vytvořené mikročástice je nutné obvykle charakterizovat. Charakterizace vzniklé částice je možná pomocí transmisní elektronové mikroskopie, které umožňují získat informaci o velikosti a povrchu částic. Dále lze použít k charakterizaci daného povrchu magnetizační měření pomocí magnetometrů, infračervenou spektroskopii a termické analýzy. Modifikovat a charakterizovat částice je potřeba z důvodů imobilizace biomolekul.

4.4. Imobilizace

Díky velkému povrchu MPs je možné imobilizovat větší množství enzymu, s tím potom souvisí nižší limit detekce, větší citlivost a rychlost stanovení. Zároveň se během imobilizace na částicích vytvoří pro biomolekuly vhodné prostředí, díky čemuž molekuly získají vyšší odolnost ke změnám pH a teploty a jejich zásobní roztoky je možné dlouhodobě skladovat bez významnějších ztrát aktivity. [31] Na povrchu magnetických částic bývá imobilizováno velké množství vysokomolekulárních a nízkomolekulárních aktivních látek. Biologicky aktivní látky navázané na magnetické nosiče mohou být odstraněny pomocí vnějšího pole. Imobilizované sloučeniny mohou být použity pro zachycení a upravení cílových molekul a buněk. [32] Imobilizaci lze provádět celou řadou způsobů. Jednou z nich je klasická

fyzikální sorpce. Tato metoda je jednoduchá, ale málo stabilní oproti imobilizaci s kovalentními vazbami. Imobilizace může také probíhat na zabudovávání aktivních látek do magnetické gelové matrice. Minimalizuje se denaturace aktivních látek a jsou zachovány jejich biologické vlastnosti, avšak může docházet k postupnému uvolňování. Nejčastěji se k imobilizaci využívá kovalentní vazba, která vyžaduje přítomnost funkční skupiny na povrchu nosiče, aby při navázání biomolekuly mohlo dojít k aktivaci této skupiny. Lze využít i funkční skupiny aktivních látek (-NH_2, -COOH, -OH, -SH). U karboxylové skupiny se využívají karbodiimidy a u NH_2 skupiny roztok glutaraldehydu. Jako velmi dobrá metoda pro imobilizaci se jeví navázání avidinu nebo streptavidinu na povrch magnetických částic, které vykazují vysokou afinitu pro biotin. Biomolekuly určené k imobilizaci jsou biotinylovány a potom jsou vázány na povrch částic při interakci mezi streptavidinem nebo avidinem a biotinem. Tento komplex je dostatečně odolný a pevný. [33] Dále se využívá magnetopolisomů pro imobilizaci membránově vázaných enzymů. Imobilizace enzymů na magnetických částicích je významná v laboratorních a biotechnologických aplikacích. Enzymy navázáním na MPs mohou získat lepší stabilitu, optimální teplotu a pH a nízkou toxicitu. Enzymatické reakce mohou probíhat v magneticky stabilizovaných reaktorech. Enzymy, které se podílejí na imobilizaci, na magnetických částicích jsou lipasy a proteasy. Lze imobilizovat na povrchu MPs i nukleové kyseliny, oligonukleotidy, protilátky, sacharidy a ostatní aktivní látky.

4.5. Určení vzniklého amplifikovaného signálu

Magnetické částice, které jsou zachyceny na elektrodě, vytváří difuzní povrch, který má za následek zhoršení přístupu substrátu (zde ATCh-I) k biomolekulám uvnitř povrchu MPs a elektricky aktivních látek k povrchu elektrody. Proudový signál je limitován rychlostí difuze. Je důležité tento jev minimalizovat. Ke zlepšení je dobré použít vnější rotující magnetické pole. Na částice působí vnější magnetické pole, které vtahuje MPs do silnějšího pole. Částice se pohybují ve směru vnějšího pole a po rotování daného pole dojde ke stejnému pohybu i u částic navázaných na elektrodě. Přičemž dojde ke zvýšení signálu, zeslabení difuze a zvětší se daná citlivost. [34] Používá se také rotační disk elektrody, při kterém se zvýšený signál odchyluje od lineárního charakteru. Nemusí docházet ke spojení s elektrodou, což může být způsobeno vibracemi. Naopak rotační disk má velkou plochu pro funkcionalizované MPs a tím umožňuje jejich snadnou úpravu, třídění a dopravu k biomateriálům, bez nutnosti recyklace a regenerace elektrod. [35] Tento postup byl studován v článku zabývajícím se

stanovením telomerázy. Použitím magnetických částic ke stanovení telomerázy by se daný postup mohl zrychlit. Při smíchání částic s danou látkou emitovalo světlo, jehož intenzita závisí na objemu telomerázy a rychlosti rotujících MPs.

4.6. Detekce pesticidů

Magnetické částice při konstrukci biosenzoru umožňují rychle obnovovat biokatalytickou vrstvu, což je důležité z hlediska stanovování výsledků například u pesticidů. Pesticidy jsou chemické prostředky, které se užívají k zamezení ztrát na kulturních rostlinách, zásobách potravin i krmiv. Podle biologické účinnosti se dělí na insekticidy, herbicidy, fungicidy a rodenticidy. Pesticidy se dnes používají na 95 % zemědělské půdy. [36] Účinku pesticidních látek jsou vystaveny všechny složky biosféry. Biosenzory se prosadily i ke stanovování těchto látek, protože chromatografické metody jsou náročné z hlediska upravování vzorku. Jako pesticidy se hodnotí především organofosfáty a karbamáty. Jsou nebezpečné z hlediska podobnosti s acetylcholinem, přičemž působí inhibičně na AChE. U většiny testovaných karbamátů jsou nejnižší detekční limity získané pomocí biosenzorů založených na AChE. [37] Jak je známo, tak po ireverzibilní inhibici není možné rychle a účelně obnovit biorekogniční vrstvu vytvořenou imobilizací biomolekul. Výhodné je tedy použít magnetické částice, které tento proces zjednoduší a urychlí. Jsou také platné z hlediska vytvoření malého senzoru pro detekci. V dnešní době už byl použit i sensor pro stanovení organofosfátových pesticidů, při kterém bylo použito modifikované AChE imobilizované na povrch magnetických částic, pomocí její afinitní interakce Ni-His, která zrychlila danou analýzu. [38] Ve studii došlo k porovnání se senzorem využívající běžnou AChE zachycenou v polyvinylalkoholové vrstvě. Senzor s magnetickými částicemi má vyšší citlivost až o řád, naopak běžný srovnávací systém má lepší reprodukovatelnost, což je zapříčiněno manuální obnovou dané vrstvy. Odchylky se dají minimalizovat použitím automatizované metody. Automatizovat daný proces je možné pomocí průtočného systému, což bylo využito během určování nejnebezpečnějšího pesticidu, karbofuranu. Je založeno na porovnávání odezvy mezi AChE a acetythiocholinem před a po inkubaci s pesticidem. Vzniklá odezva byla získána pomocí ampérometrického měření. Významné úsilí v oblasti daného výzkumu je zaměřeno na cholinesterasové biosenzory při použití MPs. Je v našem zájmu věřit, že tato zařízení se brzy stanou komerčně dostupné a přispějí ke zlepšení ochrany životního prostředí a lidského zdraví.

5. Matematická analýza dat

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí rovnice regrese, chybových úseček a hodnoty spolehlivosti. Provedl se u určitých výsledků také výpočet směrodatné odchylky a výpočet mediánu pro odezvy signálu.

Výpočet *kalibrační křivky,*nebo–li lineární regrese, umožňuje aproximaci daných hodnot polynomem prvního řádu (přímkou) metodou nejmenších čtverců. Jedná se tedy o proložení několika bodů v grafu přímkou, aby se získal součet druhých mocnin odchylek jednotlivých bodů od přímky, který bude minimální. Součet čtverců reziduí (nebo také chyb) regresního odhadu je suma druhých mocnin rozdílů regresních odhadů od původních hodnot:

$$SSy(x_i) = \sum_{i=1}^{N} (y_i - y(x_i))^2 \tag{3}$$

A součet čtverců pro regresní odhad je suma druhých mocnin odchylek původních proměnných závislé proměnné od jejího průměru:

$$SSy(x_i) = \sum_{i=1}^{N} (y_i - m(y))^2 \tag{4}$$

Chybové úsečky slouží k zakreslení lišících se údajů od požadovaného průběhu. Mohou být zakresleny do grafu ke každému datovému bodu řady. U výpočtů kde jsou přidány chybové úsečky, byly zobrazeny pětiprocentní kladné i záporné chyby.

Vypočítala se *směrodatná odchylka* a *medián* pro určité experimenty. Směrodatná odchylka je definována jako druhá odmocnina rozdílnosti. Je to kořenový střední čtverec (RMS) odchylky od aritmetického průměru. Směrodatná odchylka je vždy kladné číslo nebo nula a je změřena ve stejných jednotkách jako originální data. Směrodatná odchylka se vypočítá jako:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N}} \sum_{i=1}^{N} (xi - \bar{x})^2 \tag{5}$$

A *medián* je prostřední hodnota uspořádané řady hodnot. Pro nalezení mediánu se hodnoty seřadí podle velikosti a vezme se hodnota, která se nalézá uprostřed. Pokud se v souboru hodnot vyskytuje sudý počet prvků, tak se obvykle za medián označí aritmetický průměr. Podle rozdělení pravděpodobnosti je mediánem číslo m, které splňuje rovnost $P(X \leq m) \geq 0{,}5$

a P(X ≥ m) ≥ 0,5. Podle spojitého rozdělení zadaného hustotou pravděpodobnosti f pro medián platí:

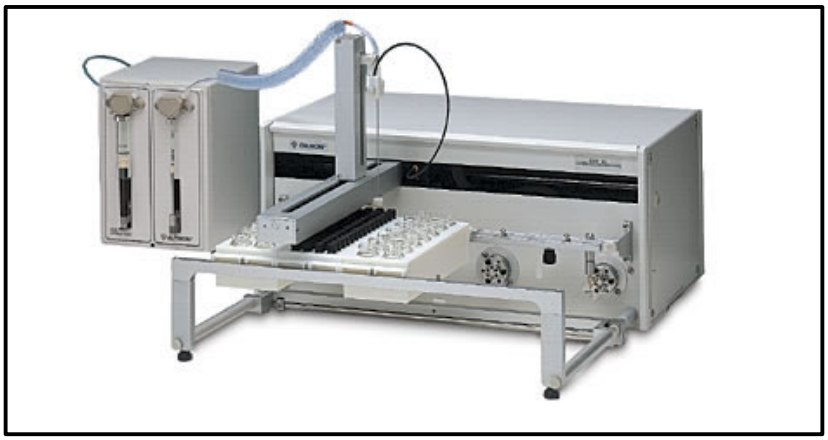
$$\int_{-\infty}^{m} f(x)dx = 0{,}5 \tag{6}$$

Kalibrační křivky mají ve svých výsledcích zobrazeny směrnice přímky. Jedná se o tangens úhlu, který svírá daná přímka s kladným směrem osy x pravoúhlých souřadnic. Směrnicový tvar přímky vypadá jako $y = kx + q$, kde k je směrnice přímky. Pokud je $k > 0$, jedná se o rostoucí funkci, a pokud je $k < 0$, jedná se o funkci klesající. Pokud je $k=0$, tak je přímka rovnoběžná s osou x. Přímka, která je rovnoběžná s osou y není možné pomocí směrnice vyjádřit.

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Technický nástroj - autoinjektor Gilson 231 XL

Pro automatické měření bude využit přístroj GILSON 231 XL od firmy GILSON z USA. Tento přístroj umožňuje ovládat elektromagnet, který je potřebný pro práci s magnetickými částicemi a pomocí tohoto přístroje je také možné získávat automatizovaný záznam dat, jehož odezvy jsou získávány pomocí ampérometrického detektoru. Pomocí autoinjektoru je umožněno zcela zautomatizovat celý proces s magnetickými částicemi spolu s enzymovými elektrodami. Tento přístroj obsahuje různé druhy příslušenství, které jsou kompatibilní s autoinjektorem. Lze použít špičky o různých velikostech objemu, lahvičky, zásobníky, magnet, stojany a systémovou hlavu s výměnnými dutými jehlami. Autoinjektor umožňuje rychlé, přesné a reprodukovatelné pipetování a dávkování kapalin. Používá se pro purifikační procesy, pro chronografická měření a přípravu vzorků, bez chyb způsobených lidským faktorem. Pipetování je možné do různých formátů zásobníků a destiček. Zaleží pouze na vlastním nastavení uživatele. Ředění nebo promíchání se může nastavit v softwaru. Pipetování a dávkování probíhá bez kontaktu s povrchem. Výška hladiny se snímá opticky. Umožňuje bezkontaktní rozeznávání hladiny kapalin v různých jamkách. Jedná se o čistší proces oproti manuálnímu použití a šetří drahé vodivé jehly. Rozeznává nejen výměnné hlavice, ale i jednotlivé formáty zkumavek, držáky reagencií a držáky vzorků. GILSON XL je ukázán na obrázku 8.

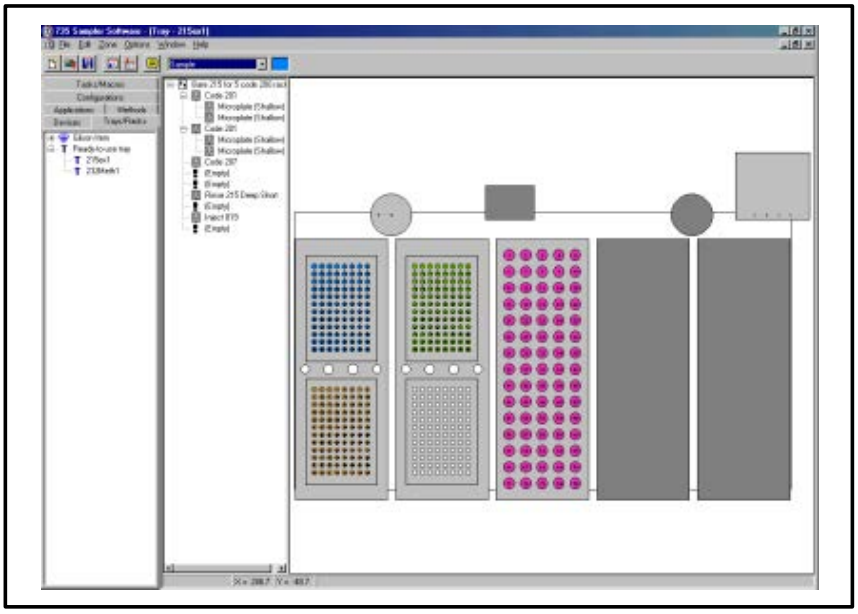


Obrázek 8: *Autoinjektor GILSON 231 XL*

Důležitým prvkem tohoto přístroje je prostředí, ve kterém dochází k vytvoření programu, aby mohlo dojít k nastavení všech kroků pro měření. V dnešní době si metody žádají plně automatizované postupy, které řeší čas a experimentální chybu.

6.1. 735 Sampler Software

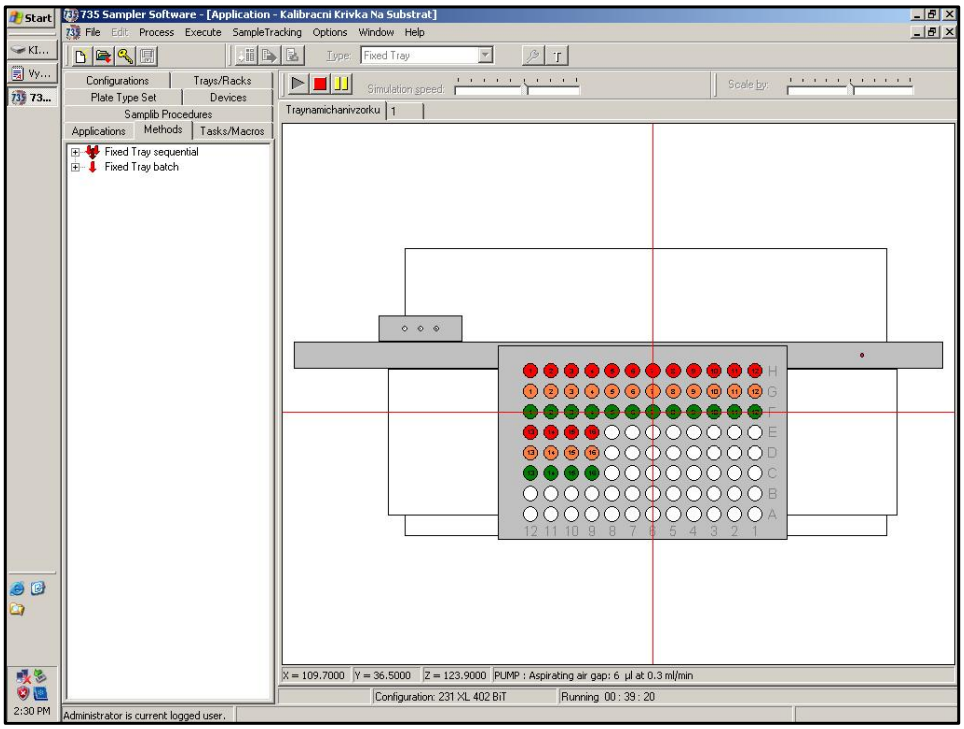
Jedná se o intuitivní, silný a plně validovaný softwarový balík, který nabízí kompletní kontrolu nad většinou nástrojů pro manipulaci s kapalinami a umožňuje definovat různé komponenty (hardware, zásobníky a stojánky, pozice zón atd.). Program nabízí rychlou a snadnou tvorbu jednoduchých i složitých metod a umožňuje maximalizovat propustnost, přenos metod a aplikací. Ukázka pracovního prostředí je na obrázku 9. Součástí je také simulační prostředí, které umožňuje předem spouštět výpočet objemu a kontrolovat vzniklé chyby, což šetří čas a zajišťuje přesnost. Umožňuje si vybírat z více jak 90 úkolů pro manipulaci s protokolem kapalin (od jednoduchého ředění až k složitějšímu). Zásobníkový editor zadává informace o tom, kde jsou umístěny lahvičky ve stojanech, a nastavuje pozice zón. Následně určí dané parametry, které jsou potřebné pro přidání kapaliny a vzorku. Prvky, které se používají pro vytvoření celé sestavy stojanů a k oplachování stanice jsou uvedeny v uživatelském okně. XL Sampler vzorkovač může být konfigurován buď s kódem 80 stojanů, nebo s kódem 30- řad stojanů a je jen na uživateli, kterou stopu ve stromu schématu vybere. Zóna je skupina nádob, které obsahují stejné typy roztoků (vzorky, standardy, činidla, rozpouštědla). Dochází k nastavování typu kapaliny, objemu a číslování vzorku v hadičkách. [39]



Obrázek 9: *Softwarové rozhraní*

6.1.1. Simulační prostředí a programování

Nedílnou součástí Sampler softwaru je také simulační prostředí (viz Obrázek 10) sloužící ke kontrole programu. Uživatel si simulační prostředí může spustit v tom případě, když si není jistý ve svém postupu programování nebo se mu nezdá, co přístroj dělá při reálném užívání. Také si lze ověřit, jestli jsou správně nastaveny jednotlivé kroky a jestli program správně funguje. Umožňuje neplýtvat se vzorky nebo s drahým materiálem.



Obrázek 10: *Simulační prostředí*

Programování

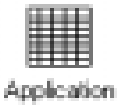
K programování se používá skupina speciálních editorů a příkazů v prostředí Windows XP na PC. Ještě předtím než se začne programovat, je nezbytné nakonfigurovat si správný typ autoinjekoru, lineárních pump a zásobníků, který je důležitou součástí programovacího balíku. V softwaru jsou uložena geometrická data jednotlivých komponent, aby bylo možné správně dávkovat kapaliny, vzorky a jiné reagencie. Tyto informace jsou uloženy v daném softwaru a mohou se případně kdykoliv otevřít. Pro programování různých metod lze vybrat části, které jsou k dispozici v programovacím balíku. Potom se v následujícím programování objeví pouze tyto části. Výběr se zjednoduší a lze jej i měnit. K částem z výroby lze přidávat i další jednotky editované uživatelem. Ty se musí nastavit s předstihem, než se spustí software. Technické základy pro editory a příkazy (např. rychlost dávkování, výška nasávání

nebo dávkování kapaliny nebo rychlost mixování a také ovládání dalších komponent) musí být specificky naprogramovány. Specifické vzorce, jako vícenásobné přenosy z jedné jamky nebo pro přenos vzorků, vkládání mikrotitračních destiček se musí také definovat předem. Důležité je si vytvořit určité metody, které budou sloužit pro vytvoření dané aplikace, která je z těchto metod vytvořena.

6.1.2. Skupina speciálních editorů a příkazů

Pracovní postup a vytváření daných úkolů je tvořen určitými příkazy a editory. Jejich úkolem je správně vytvářet kroky, které uživatel zadává. K dispozici jsou následující příkazy a editory.

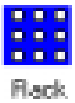
Metody – umožňuje vybrat určitou metodu, podle které bude možno nastavit daný projekt. Skládá se z různých oblastí aktivního okna editoru a funkcí. Výchozí konfigurace jsou automaticky používány při práci s novou metodou.



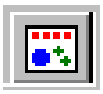
Aplikace – skládá se z jednoho nebo více operačních seznamů. Veškeré operace jsou uvedeny v jedné aplikaci a musí být spojeny se stejným zásobníkem a konfigurací. Pokud je několik aplikací, z nichž každá souvisí s jinou konfigurací, tak aplikace mohou běžet současně.

Konfigurace – je na prvním místě pro vytváření daných aplikací. Konfigurace odpovídá systému zařízení. K dispozici jsou přednastavené systémy, které odpovídají běžné konfiguraci. U této kategorie jsou přístroje rozděleny do čtyř kategorií zařízení: vzorkovače, čerpadla, armatury a "ostatní" (termostaty, stojany).

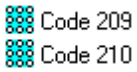
Zásobník - definuje zásobník s racky a zónami, které mají být používány pro dané aplikace. Mohou být přidávány existující vlastní komponenty, které byly deklarovány pomocí zásobníkového editoru. Zásobníkový editor umožňuje zadat informace o tom, kde jsou umístěny stojany a lahvičky, a kde zóny a nastavení týkající se zón.



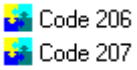
Stojany - definování vlastních komponent: stojanů, lahviček, možnosti bez lahviček, prvky jako rack s držáky, různé stopy a zásobníky.



Zóny – umožňuje definovat vlastnosti zóny. Vybere pozici v zóně a definuje číslování lahviček. Určuje tedy pořadí, ve kterém se dané lahvičky nachází.



Určení racku (stojanů) – umožňuje určit danou pozici na použitém stojanu. Zde to vyjadřuje konkrétně 209 a 210 pozici.



Určení elementů – vyjadřuje, na které pozici se nachází daný prvek na stojanu. Zde to vyjadřuje konkrétně 209 a 210 pozici daného prvku.

Výběr zásobníku – jaký typ zásobníku se použije a umožňuje nastavit dané parametry. Také slouží k výměně použitých zásobníku.

Výběr parametrů – nastavení výchozích parametrů.

Dávkový režim - všechny vzorky jsou zpracovávány v rámci jednoho úkolu před dalším úkolem. V tomto režimu se úkoly objeví v jednom řádkovém editoru.

Sekvenční režim – umožňuje provést všechny úkoly v rámci jednoho vzorku. Může být vytvořeno více vláken v sekvenčním režimu. Umožňuje získat čas, a to zejména při vytvoření dlouhého programu.

Editační úkoly - upravuje nastavení v zadaných úkolech, které již probíhají v metodě.

Mix – promíchávání kapaliny, které je nezávislé.

Ředit – zjednodušení ředících řad.

Čekání - čekací doba mezi příkazy, po uplynutí nastaveného času následuje další krok.

Přidání kapalin a vzorků - přidává další úkoly, které jsou potřebné k napipetování vzorků a kapalin. Po přidání prvního se mohou přidávat další a vytváří se určité vlákno.

Přidání prvků – lze použít existující prvky nebo vytvořit nové prvky a přidávat jednotlivé prvky v daném časovém pásmu, nebo v poli prvků. Například stojan je prvkem stopy, lahviček nebo volných lahviček.

Úprava prvku – slouží k upravování stop, lahviček nebo vlastních lahviček. Před úpravou je potřeba se ujistit jestli se nepoužívá daný prvek v zásobníku. Prvky se nemohou upravovat v Gilson.

7. Materiál a metody

Všechny používané chemikálie byly MiliQ čistoty a společně s parafilmem byly zakoupeny od firmy (Sigma, USA). Jednotlivé koncentrace chemikálii byly připravovány společně se zásobním roztokem fosfátového pufru o koncentraci 50 mM (Sigma-Aldrich, Česká republika) a rozpuštěny ve vodě. Veškeré chemikálie byly skladovány ve tmě při – 20 °C. Voda byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěná pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA).

7.1. Chemikálie

Cysteamin (C_2H_7NS) – Sigma

Glutaraldehyd ($C_5H_8O_2$) – Fluka

Acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7) – Sigma

Acetylthiocholin jodid - Sigma

Dichlorvos – Sigma

Tween – Fluka

7.2. Magnetický materiál

NH_2 modifikované magnetické částice (amine-terminated magnetis particles) – Sigma

Syntetizované magnetické částice – Česká republika, David Kovář, vyrobeny v laboratoři Biosenzorů na Ústavu chemie Masarykovy univerzity

7.3. Přístroje

Thermomixer 535 – Eppendorf

pH metr – Weilheim

LT_ImmunoSMART - software – vyvinul P. Skládal

ImmunoSMART - detektor – Smart, ČR

Ovládací program MultiLab_615x a LabTools – vyvinul P. Skládal

USB port E5805A – Agilent Technologies

Autoinjektor 231 XL s lineárními pumpami 402 a peristaltickou pumpou MP3 – Gilson

735 Sampler software – Gilson

Zdroj napětí pro elektromagnet – Manson

7.4. Příprava pufrů a ostatních roztoků

Skladovací pufr

Byl připraven rozpuštěním 3,07 g NaCl a 35 mg BSA v 400 ml 50 mM fosfátového pufru.

Fosfátový pufr 50mM

Pufr byl připraven rozpuštěním a smícháním 6,95 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ a 0,873 g $NaH_2PO_4.H_2O$ v destilované vodě. pH tohoto pufru bylo upraveno na hodnotu 7,4 za použití 1 M roztoku NaOH. Pufr byl doplněn destilovanou vodou na celkový objem 500 ml. Tento pufr byl připraven jako zásobní roztok.

Roztok glutaraldehydu (5%, 3%)

Byl připraven pětinásobným resp. osminásobným zředěním 25% zásobního roztoku do 0,05 M fosfátového pufru.

Síťovací směs

První druh síťovací směsi byl připraven smícháním 3 µl 3% roztoku glutaraldehydu, 50 µl 10 nkat/ml acetylcholinesterasy, 7 µl 50 mg/ml sérového albuminu (BSA) a 40 µl 50 mM fosfátového pufru. Druhý druh síťovací směsi byl vytvořen z 10 µl 50 mg/ml sérového albuminu (BSA), 3 µl 3% glutaraldehydu a 87 µl 50 mM fosfátového pufru.

Roztok cysteaminu (10 mg/ml)

Roztok byl připraven rozpuštěním 10 mg cysteaminu v 1 ml destilované vody.

Roztok inhibitoru (10 mg/ml)

Tento roztok byl připraven rozpuštěním 10 mg dichlorvosu v 1 ml methanolu a následně byl zředěn destilovanou vodou.

Roztok substrátu (200 mM v 1 ml)

Roztok byl připraven rozpuštěním 57,8 mg acetylthiocholin – jodidu v 991 µl destilované vody. Připravený roztok substrátu byl následovně ředěn podle potřebných měření.

7.5. Imobilizace na jednokanálové a vícekanálové elektrody

K získání dostatečně přesných výsledků je potřeba si připravit povrch biosenzorů. Měření, v případě nedostatečně ošetřeného povrchu, bývá neúčinné. K této přípravě byly použity specifické biosenzory a na přípravu jednokanálových a vícekanálových biosenzorů se používají následující imobilizace.

7.5.1. Kovalentní imobilizace

Byly použity jednokanálové a vícekanálové platinové biosenzory, které byly součástí komerčního tříelektrodového (W, A, R) a čtyřelektrodového (4 x W) systému vyráběného sítotiskovou metodou (BVT Technologies, ČR). Kvůli odmaštění byly ponořeny do acetonové lázně. Po třiceti minutách byly vyjmuty a po usušení byl jejich povrch modifikován metodou samoskladných monovrstev nanesením 1 µl cysteaminu (10 mg/ml), pro vytvoření monovrstvy se elektroda nechala s cysteaminem dvě hodiny inkubovat. Následovalo opláchnutí elektrod destilovanou vodou a aktivace za pomoci 1 µl 3% roztoku glutaraldehydu. U jednokanálových biosenzorů byla elektroda po jedné hodině opět opláchnuta a pak na ni byl nanesen 1 µl AChE (20 mg/ml). U vícekanálových biosenzorů byly elektrody opláchnuty a pak na každou elektrodu zvlášť byla nanesena určitá směs. Takto ošetřené elektrody byly ponechány přes noc v lednici v Petriho misce s navlhčeným kouskem filtračního papíru, aby se předešlo vysychání dané vrstvy. Druhý den se elektrody opláchly destilovanou vodou a byly v uzavřené nádobě uchovány v lednici pro další použití.

7.5.2. Imobilizace pomocí zesíťování na povrchu elektrody

U jednokanálových a vícekanálových biosenzorů bylo na odmaštěné platinové porézní elektrody naneseno 1 µl síťovací směsi. U jednokanálových biosenzorů se zesíťovací směs aplikovala pouze na polovinu biosenzorů z patnácti použitých. U vícekanálových biosenzorů se tato směs aplikovala na vybranou elektrodu. Na ostatních elektrodách byla aplikována jiná směs. Takto ošetřené elektrody byly ponechány přes noc v lednici. Způsob ošetření a uchování byl stejný jako u kovalentní vazby.

7.6. Imobilizace na magnetické částice

V případě této práce byl použit následovný postup imobilizace na NH_2, který byl modifikován na magnetické částice. Nejdříve se odeberou 2 ml částic, které je nutné třikrát promýt 0,05 M fosfátovým pufrem. Dále se smíchá 4 ml 5% roztoku glutaraldehydu, se kterým jsou tyto částice 2 hodiny promíchávány na třepačce. Po aktivaci jsou opět třikrát promyty. V dalším kroku se k nim přidá 150 µl cholinesterasy (10 nkat/µl) a směs je třepána po dobu 5 hodin při teplotě 10°C za využití Thermomixeru 5355 Comfort/Compact (Eppendorf, Německo). Nastavení tohoto přístroje: doba promíchávání je tedy 5 hodin a vždy po 120 s byly MPs 10 sekund třepány při otáčkách 1350 rpm. Takto připravené částice se ponechaly do druhého dne v lednici. Druhý den se částice třikrát promyly 0,05 M fosfátovým pufrem a po dobu 30 minut se promíchávaly na Thermomixeru 5355 se 3 ml skladovacího pufru, aby mohlo dojít k vysycení volných vazebných míst. Imobilizované magnetické částice jsou zobrazeny na obrázku 11. V tomto pufru jsou uskladněny a ponechány v lednici pro pozdější použití.

Obrázek 11: *Imobilizované MPs*

7.7. Příprava syntetizovaných magnetických částic

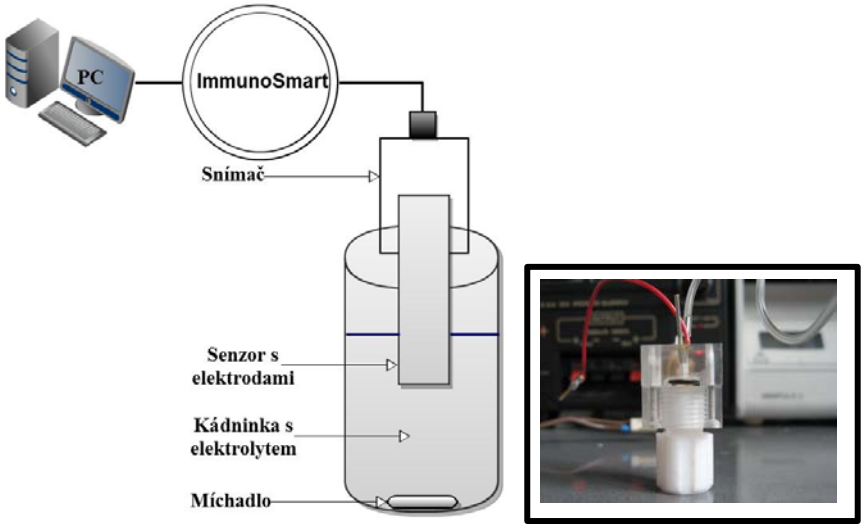
Pro připravení syntetizovaných magnetických částic byl vytvořen postup, který umožňuje vytvořit MPs, které mají stejné vlastnosti jako NH_2 modifikované magnetické částice. Připravilo se tedy 25 ml roztoku obsahujícího $FeCl_2$ (10 mM) a $FeCl_3$ (20 mM) rozpuštěného v 1 M HCl. Připravený roztok byl probubláván po dobu 15 minut argonem. Ve vzniklé argonové atmosféře a za stálého intenzivního míchání byl velmi pomalu přikápáván 2 M hydroxid ammonný (cca 75 ml). Po ukončení reakce (pH roztoku musí být větší než 11) se reakční směs zahřívala při 80°C po dobu 1 - 2 hodin (v sušícím přístroji). Výsledný produkt byl magneticky separován a promýván destilovanou vodou, dokud roztok nad MPs nebyl čirý a pH neutrální. Celkem se provedlo 5 promývacích kroků. Promyté MPs byly ihned aktivovány pomocí 10 ml roztoku APTES (5% v ethanolu) a byly uskladněny přes noc. Druhý den bylo zjištěno množství MPs (celkem 200 mg). Aktivované MPs byly 3x promyty bezvodým ethanolem a poté byly promyty 2x fosfátovým pufrem. V závislosti na těchto krocích se provedla imobilizace na MPs podle postupu, který je popsán v kapitole 7.6. Tyto částice poté bylo možné použít pro následovná měření.

7.8. Stanovení množství magnetických částic

Množství NH_2 modifikovaných magnetických částic po imobilizaci enzymu bylo určeno z rozdílu hmotností mikrozkumavky, která byla zvážena před a po napipetování roztoku MPs a poté se provedlo pečlivé vysušení 100 µl zásobního roztoku částic pomocí vysušovacího přístroje. Bylo zjištěno, že v roztocích je přítomno 50 mg/ml $–NH_2$ MPs. Stejný způsob stanovení daného množství byl použit i pro druhý typ částic pouze s tím rozdílem, že bylo odebráno 10 µl zásobního roztoku a bylo zjištěno, že v zásobních roztocích je přítomno 25 mg/ml $-NH_2$ částic. Proto se provedlo zakoncentrování MPs na 50 mg / ml.

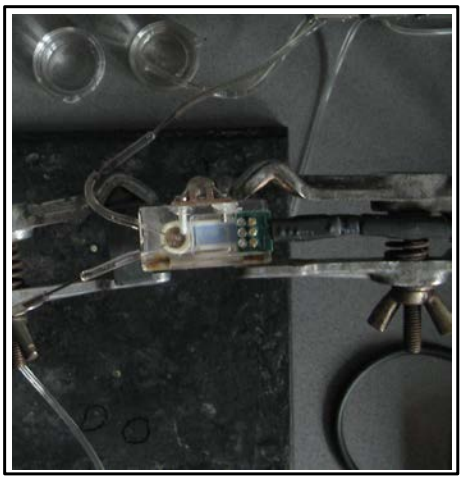
8. Schéma zapojení a postup práce

Ke zjištění obsahu substrátu v roztoku bylo využito amperometrické detekce. Došlo k proměření závislostí elektrod, na které byl enzym imobilizován přímo. Proměření bylo provedeno v nádobce, kterou představovala skleněná kádinka (10 ml) s 5 ml 50 mM fosfátového pufru. Roztok elektrolytu v nádobě byl míchán prostřednictvím magnetické míchačky. Do kádinky byla pomocí stojanu umístěna elektroda spojená s ImmunoSmartem a ten byl přes USB port propojen s počítačem, skrze který, za použití programu LT_ImmunoSMART, byla tato měřící sestava ovládána. Na pracovní elektrodě byl nastaven potenciál E = 300 mV a změny proudu byly pozorovány za přídavku substrátu do celkové koncentrace. Tento postup byl proveden, jak pro elektrody s kovalentní imobilizací, tak i pro elektrody se zesíťovanou imobilizací. Jednoduché znázornění měřící sestavy je opět patrné z obrázku 12. Fotka znázorňuje celu, se kterou byla měření prováděna.

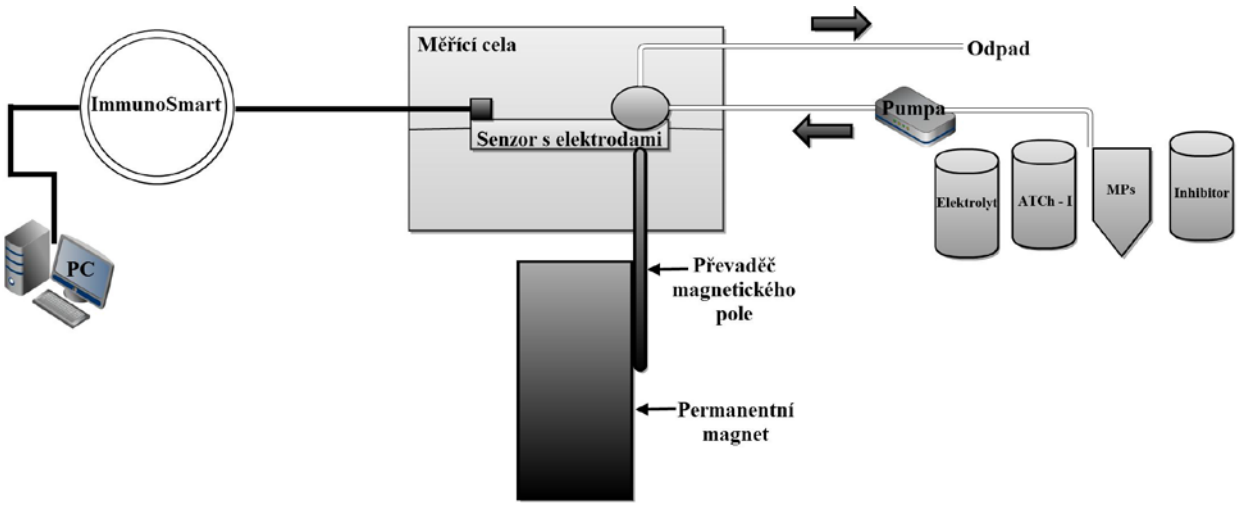


Obrázek 12: *Schéma měření v nádobce a cela*

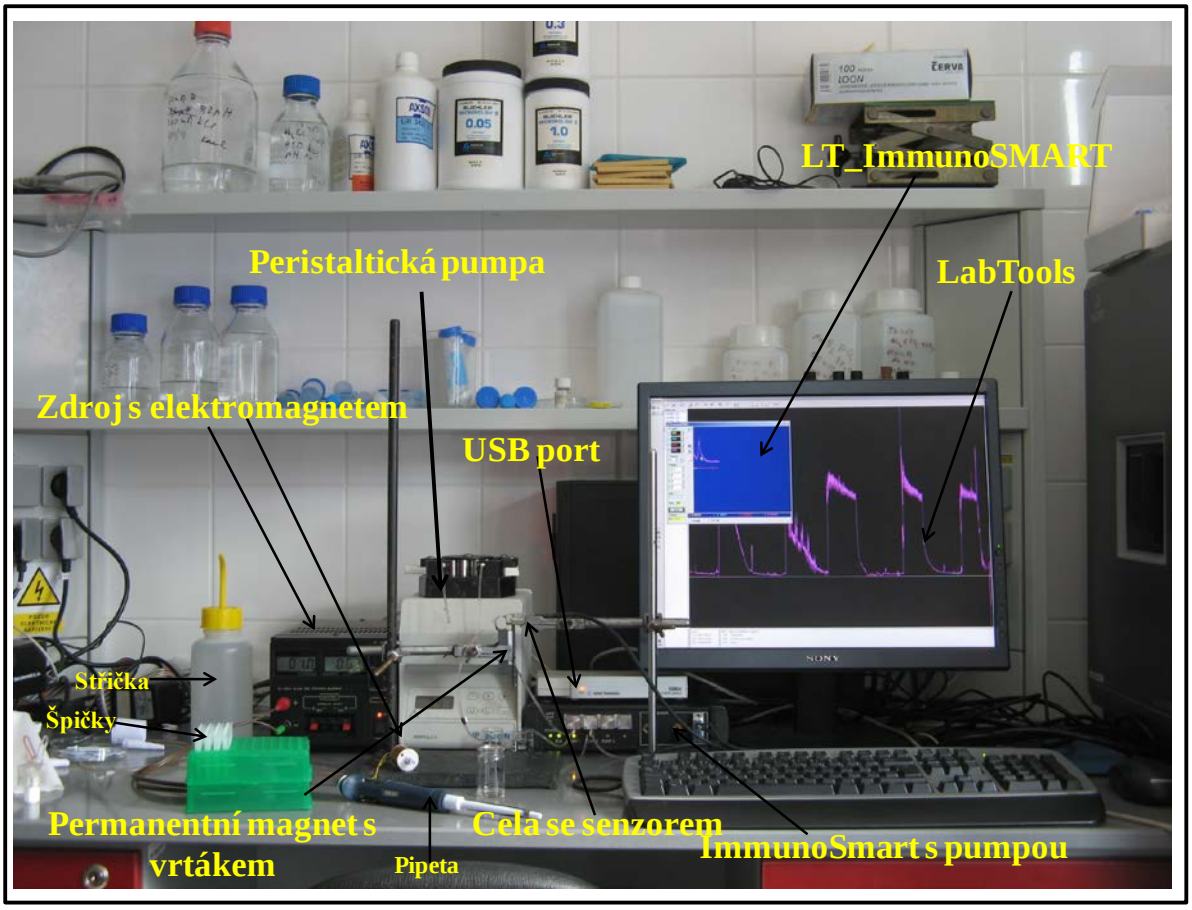
V daných experimentech se používalo většinou měření, které bylo založeno na průtočném uspořádání. K tomu byla použita plastová průtočná cela, která měla vyvrtaný otvor o průměru 4,4 mm v důsledku vzniku magnetického pole. Cela byla teflonovými hadičkami spojena s průtočným systémem, který obsahuje peristaltickou pumpu. Tento průtočný systém přiváděl dovnitř cely roztoky elektrolytu (0,05 M fosfátového pufru), magnetických částic, substrátu a inhibitoru. Do plastové cely byla umístěna nemodifikovaná a také nijak upravená porézní platinová elektroda (BVT Technologies, Brno), na kterou byly MPs zachyceny pomocí permanentního magnetu (nástavec o průměru 4,4 mm), který přenáší magnetické pole těsně pod spodní část elektrody. Tento postup byl zvolen u manuálního postupu, k vytvoření biosenzoru s magnetickými časticemi. Účelem bylo vytvořit improvizované magnetické pole s malým průměrem. Měřící aparatura byla spojena s počítačem skrz detektor ImmunoSMART. Měření bylo provedeno při potenciálu pracovní elektrody E = 300 mV, který byl nastaven pomocí programu MultiLab 615x, kterým se ovládal i celý zbylý průběh měření. Elektrický proud byl sledován pro různé přídavky substrátu, MPs, inhibitorů a výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu LabTools. Schéma měřící aparatury s průtočným systémem je zobrazeno na obrázku 14 a na obrázku 15 je zachycena aparatura v praxi.



Obrázek 13: *Cela se senzorem*



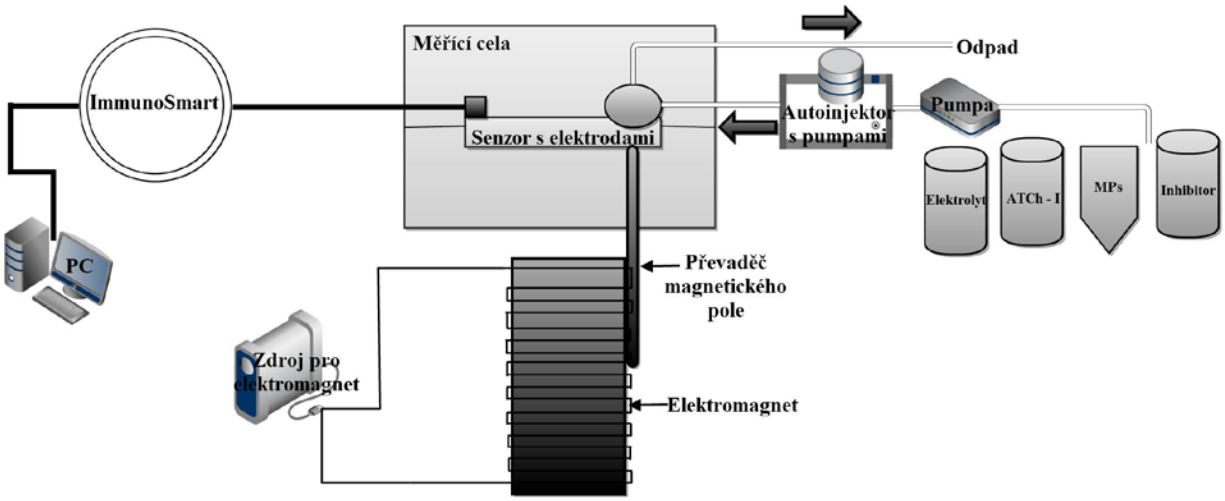
Obrázek 14: *Schéma měření v průtočném systému*



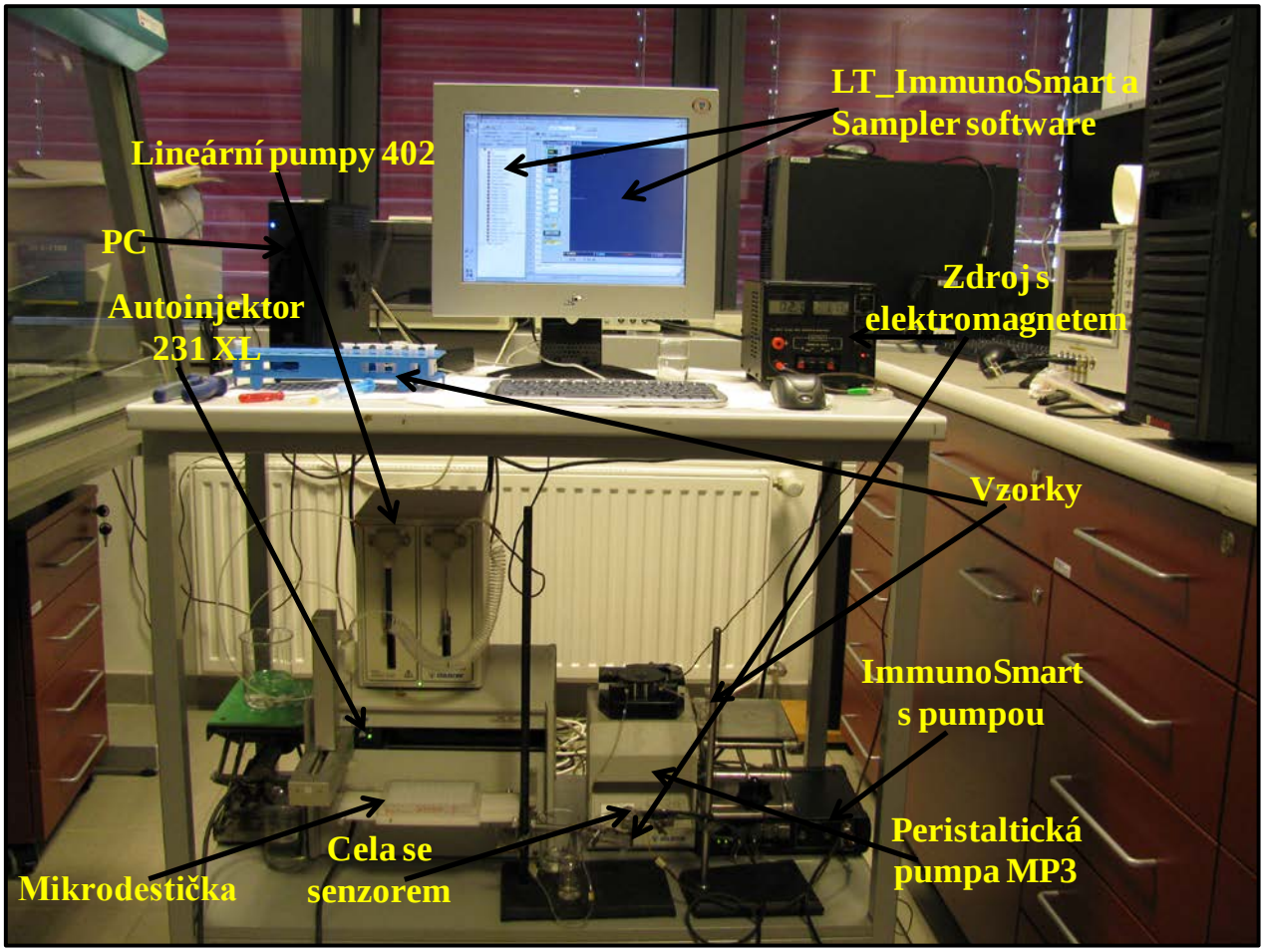
Obrázek 15: *Aparatura pro měření*

Automatizované měření, ve kterém byl použit senzor, který byl pokryt vrstvou magnetických částic, bylo provedeno v průtočném uspořádání za účasti autoinjektoru GILSON, z důvodů automatizace postupu. Byla zde opět použita plastová průtočná cela, do které byl vložen nemodifikovaný platinový senzor (BVT Technologies, Brno) a ten byl pokryt MPs. MPs byly zachyceny pomocí elektromagnetu spojeného s celou ocelovou tyčkou (neodymová tyčka o průměru 3,5 mm), který přenáší magnetické pole těsně pod spodní část elektrody. Byla zde také použita peristaltická pumpa k nepřetržitému průtoku elektrolytu a byla propojea s autoinjektorem, který obsahoval ventil rpo nástřik vzorků. Autoinjektor umožňoval automatické nasávání a přípravu roztoků pro měření. Po propojení všech komponent došlo k úspěšnému měření. Výsledná aparatura byla spojena s počítačem skrze detektor ImmunoSMART. Měření bylo provedeno při potenciálu pracovní elektrody E = 300 mV, který byl nastaven pomocí programu MultiLab 615x, kterým se ovládal průběh měření. Odezvy byly sledovány pro různé přídavky MPs, objem substrátu nebo pro různou koncentraci inhibitoru. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu LabTools. Navrhnuté schéma měřící aparatury s průtočným systémem je zobrazeno na obrázku 16 a na obrázku 15

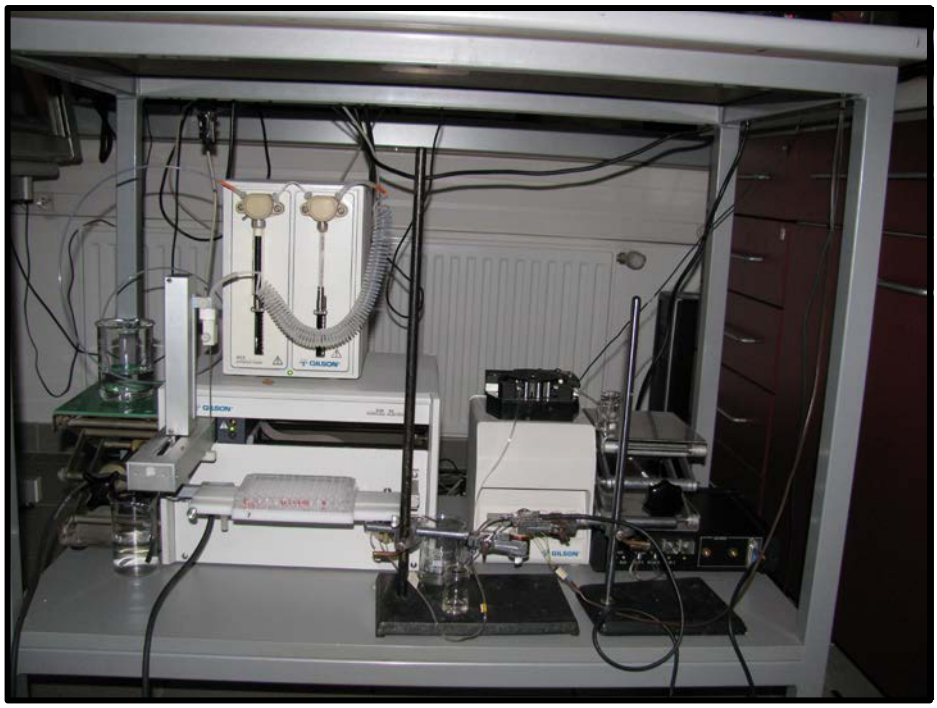
je vytvořená automatizovaná měřící aparatura v praxi, která obsahuje veškeré komponenty pro automatizované měření.



Obrázek 16: *Automatizované schéma měřícího systému*



Obrázek 17: *Automatizovaná aparatura pro měření*



Obrázek 18: *Detail autoinjektoru*

9. Výsledky a diskuse

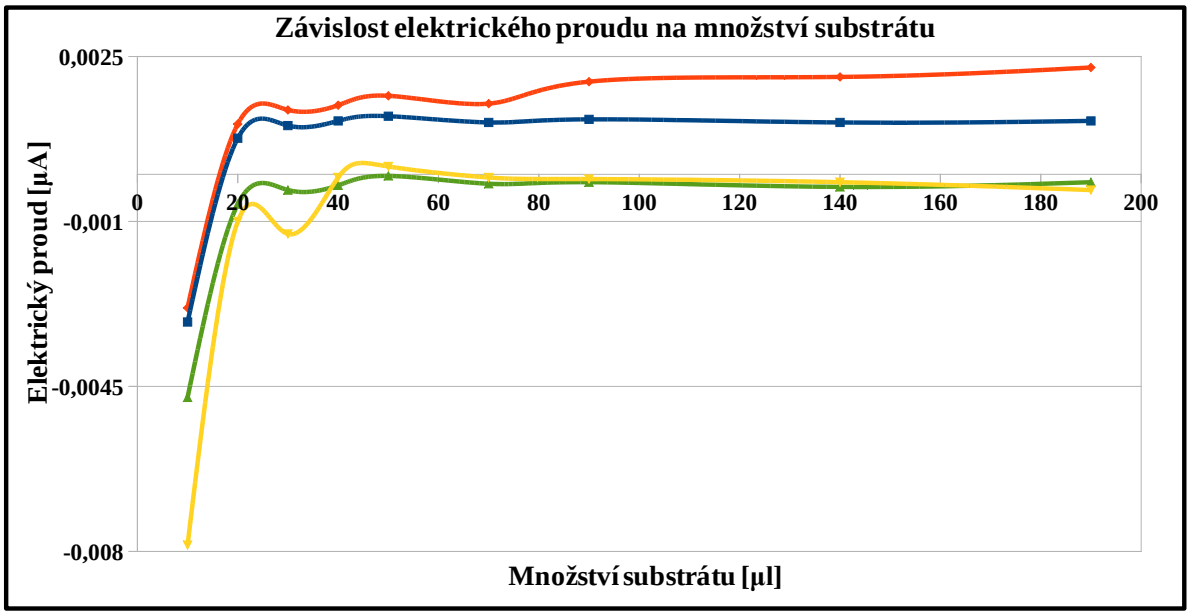
Nejprve byl vytvořen manuální postup pro analýzu elektrického proudu poskytovaného biosenzorem s AChE, který byl získán potenciostatem ImmunoSMART a vyhodnocen v LabTools. V programu je obsažena řada funkcí a nástrojů potřebných k analýze. Poté mohla být provedena automatická optimalizace postupu, která byla zaměřena na studium vlivu substrátu na enzym za přítomnosti magnetických částic. Získané výsledky byly následně matematicky zpracovány a vyhodnoceny v OpenOffice.

9.1. Optimalizace podmínek pro enzymový biosenzor za využití magnetických částic a matematická analýza dat

Po navrhnutí základního postupu vytvoření MPs a postupu práce s MPs se mohlo přistoupit k optimalizaci jednotlivých parametrů. U většiny výsledků byla porovnávána účinnost působení substrátu na enzym vzhledem k provedenému experimentu. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí rovnice regrese, hodnoty spolehlivosti a chybových úseček. Provedl se také výpočet mediánu a směrodatné odchylky pro odezvy signálu.

9.1.1. Určení citlivosti připravených biosenzorů bez použití průtočného systému

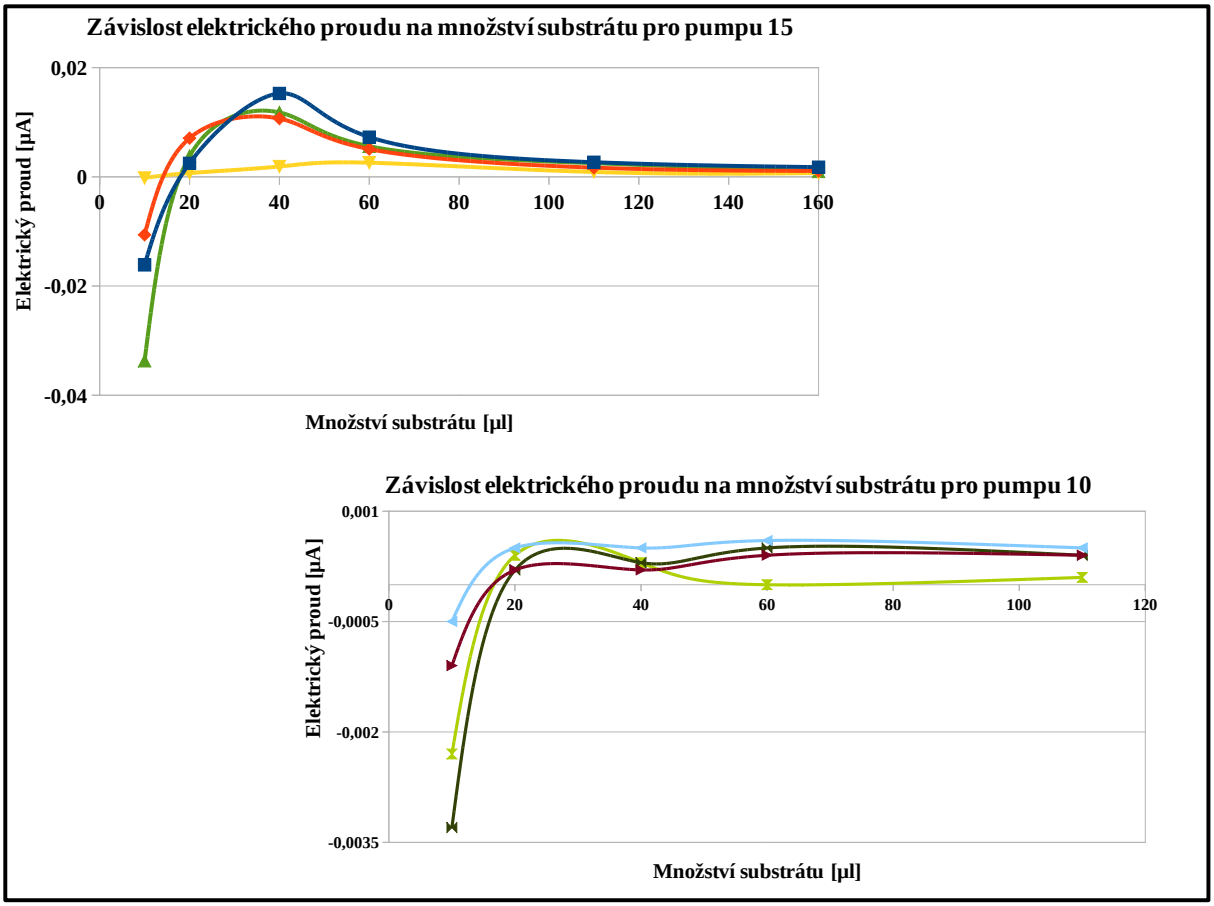
V tomto experimentu byla určena citlivost čtyřelektrodového biosenzoru. Byla použita kádinka, která byla naplněna fosfátovým pufrem. Do této kádinky, ve které byl ponořen biosenzor, byl přidáván substrát. Substrát byl přidáván postupně o objemech 5 x 10 µl, 2 x 20 µl a 2 x 50 µl. Daný experiment byl 3 x opakovaný a daný výtěžek je zobrazen v následujícím grafu, kde jsou porovnány jednotlivé elektrody, na kterých byla nanesena různá směs látek v zavislosti na působení substrátu. Na svislé ose y jsou vyneseny hodnoty elektrického proudu (napětí bylo nastaveno konstantní 300 mV), které byly zaznamenány po jednotlivých přídavcích substrátu (ATCh - I), které jsou uvedeny na ose x. Jak lze rozpoznat z vykresleného grafu, tak největší odezva signálu je po přidání 140 µl substrátu, poté se dané elektrody ustálily a další výtěžek nebyl shledán. Došlo k ověření, že čím bude větší objem substrátu přidán, tak tím se získá větší odezva signálu. Připravené biosenzory se chovaly podle předpokladů.



Obrázek 19: *Závislost elektrického signálu na množství substrátu* (Vzorky obsahovaly ATCh - I o koncentraci 200 mM. Substrát byl přidáván v rozmezí od 10 µl do 190 µl. V tomto měření byla nejvyšší odezva signálu u přidávku 140 µl)

9.1.2. Určení rychlosti u průtočného systému

V tomto experimentu byl určen vliv rychlosti průtočného systému v závislosti na množství substrátu. Byl použit opět čtyřelektrodový biosenzor. Použila se kádinka, která byla naplněna fosfátovým pufrem a kádinka ve které byly přídavky substrátu. Biosenzor byl umístěn v cele, která byla propojena s pumpou. Celou se nechal protékat roztok elektrolytu a po ustálení došlo k protékání substrátu o objemech 2 x 10 µl, 2 x 20 µl a 2 x 50 µl. Nasávání substrátu trvalo okolo 2 minut. Daný experiment byl 2 x opakovaný a daný výtěžek je zobrazen v následujících grafech. Bylo provedeno měření pro různé relativní rychlosti pumpy (15, 10 a 5), kde docházelo k různým výtěžkům odezvy signálu. Na svislé ose y jsou vyneseny hodnoty elektrického proudu (napětí bylo nastaveno konstantní 300 mV), které byly zaznamenány po jednotlivých přídavcích substrátu (ATCh - I), které jsou uvedeny na ose x. S využitím nastavení 15 se získaly dostatečné odezvy, u hodnoty 10 při posledním přídavku 50 µl (což je 160 µl) přestal daný biosenzor fungovat a při použití hodnoty 5 nebyly získány žádné výsledky získány, jelikož průtok byl velmi malý. Proto se další měření prováděla s rychlostí průtočného systému 15.

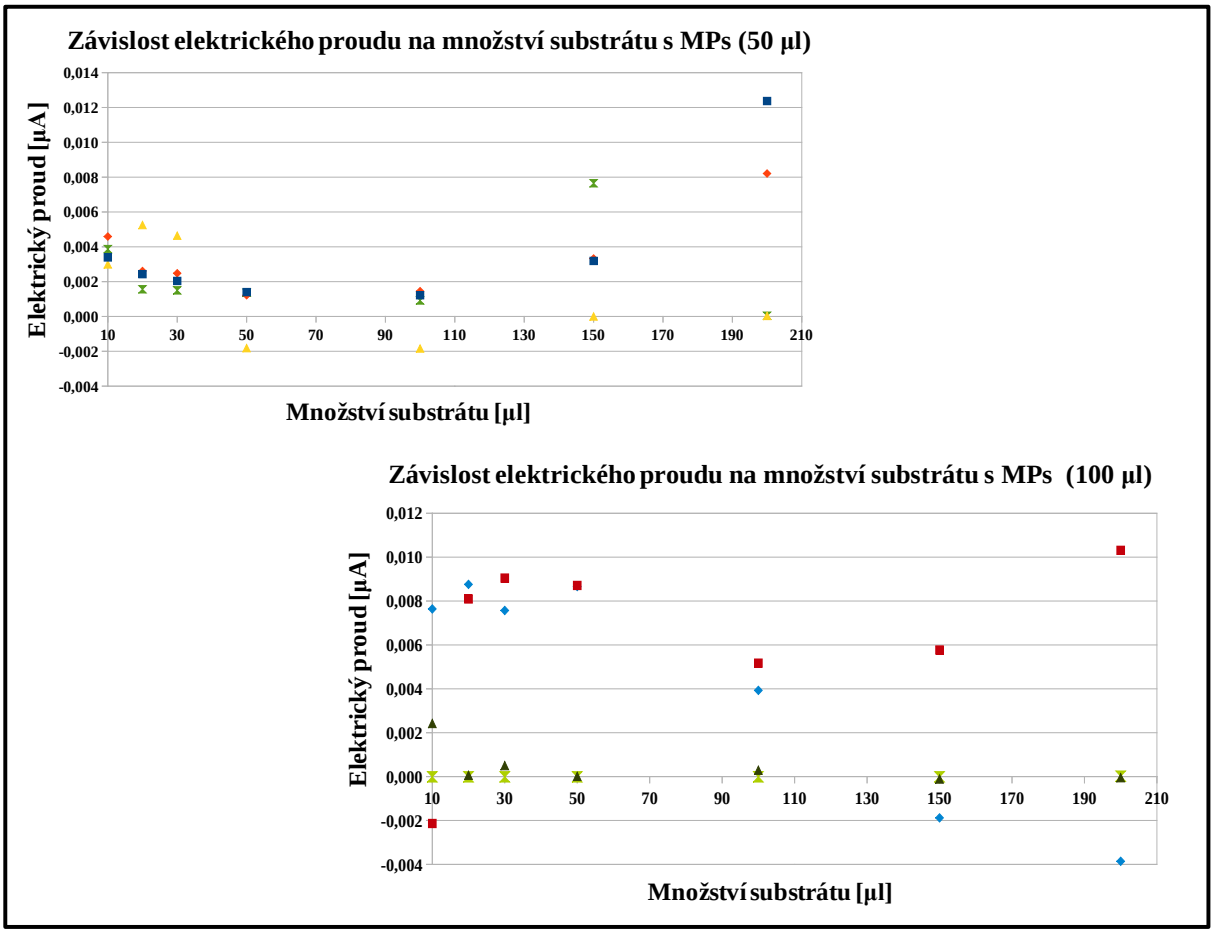


Obrázek 20: *Závislost elektrického proudu na množství substrátu pro pumpu 15 a 10* (Vzorky obsahovaly ATCh - I o koncentraci 200 mM. Substrát byl přidáván v rozmezí od 10 µl do 160 µl. V tomto měření byla průměrně nejvyšší odezva signálu u přidávku 60 µl u pumpy 15 i u pumpy 10. Každá ze čtyř křivek představuje odezvu signálu, která odpovídá jednotlivým elektrodám vícekanálového biosenzoru)

9.1.3. Určení funkčnosti MPs s navázanou cholinesterasou

Provedlo se určení funkčnosti MPs (50 mg/ml) s přidáváním substrátu (200 mM). Byl použit opět vícekanálový biosenzor a kádinka, která byla naplněna elektrolytem, dále kádinka, ve které byl substrát (200 mM) o objemech (3 x 10 µl, 1 x 20 µl a 3 x 50 µl) a eppendorfka s 50 µl a se 100 µl MPs. Dané objemy ATCh – I byly ředěny. Biosenzor byl umístěn v cele, která byla propojena s pumpou (rychlost 15). Celou se nechal protékat roztok elektrolytu a po ustálení došlo k protékání substrátu o objemu 50 µl, po 2 min. se opět nasával elektrolyt a potom došlo v 1. měření k přidání 50 µl MPs a v 2. měření k přidání 100 µl MPs. Potom se provedlo postupné nasávání substrátu o daných objemech po 2 min. intervalech, mezi kterými stále protékal elektrolyt. Dané výtěžky jsou zobrazeny v následujících grafech. Na svislé ose y jsou vyneseny hodnoty elektrického proudu (napětí bylo nastaveno konstantní 300 mV), které

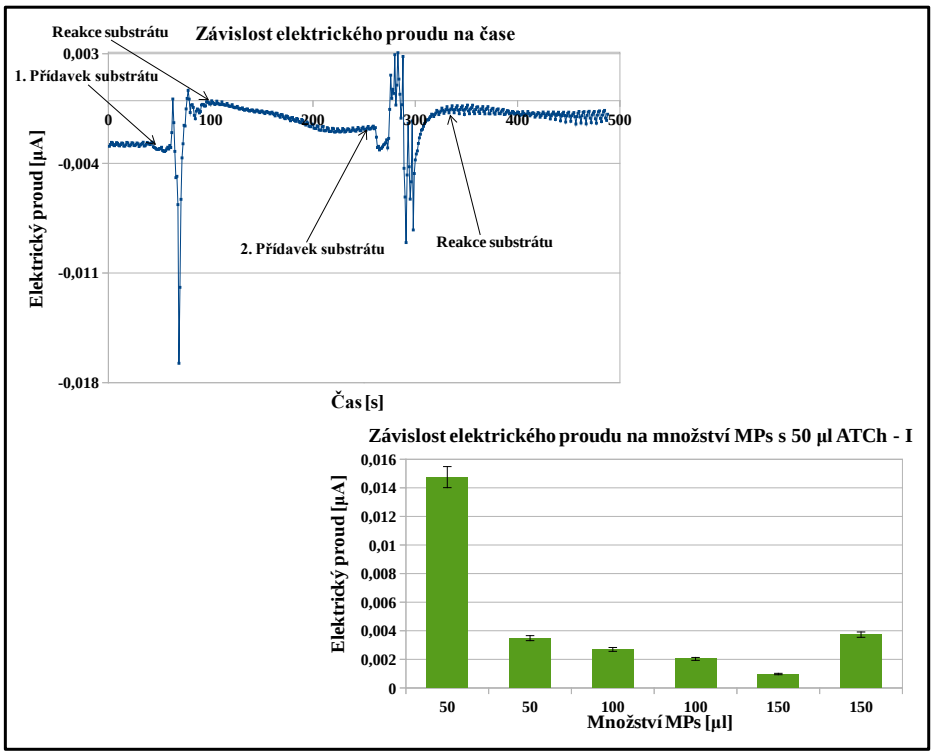
byly zaznamenány po jednotlivých přídavcích substrátu (ATCh - I) a ty jsou uvedeny na ose x. V experimentu se zjistilo, že dané MPs fungovaly a v závislosti elektrického proudu na koncentraci substrátu docházelo ke zvyšování odezvy signálu. V našem případě fungovala, jak pro MPs s 50 µl, tak i se 100 µl nejlépe elektroda [1] (tvar čtverce) a elektrody [3], [4] (tvar trojúhelníku a přesýpacích hodin) přestaly fungovat od prvního přídavku ATCh – I (50 µl). Tento problém mohl být způsoben vznikající limitovanou difuzí uvnitř cely nebo špatnou reakcí s MPs. Po provedení každého experimentu byly dané MPs zváženy na vahách. MPs (50 µl) měly hmotnost 0,00976 g a MPs (100 µl) měly hmotnost 0,01465 g. Při měření s MPs (100 µl) se zachytilo na biosenzor o 0,00489 g více magnetických částic než u MPs (50 µl).



Obrázek 21: *Závislosti elektrického proudu na množství substrátu s MPs (50 µl a 100 µl).* (Vzorky obsahovaly ATCh - I o koncentraci 200 mM. Substrát byl přidáván v rozmezí od 10 µl do 200 µl. Největší odezva signálu biosenzoru byla u elektrody [1])

9.1.4. Vliv opakovaného přídavku substrátu na různé množství MPs

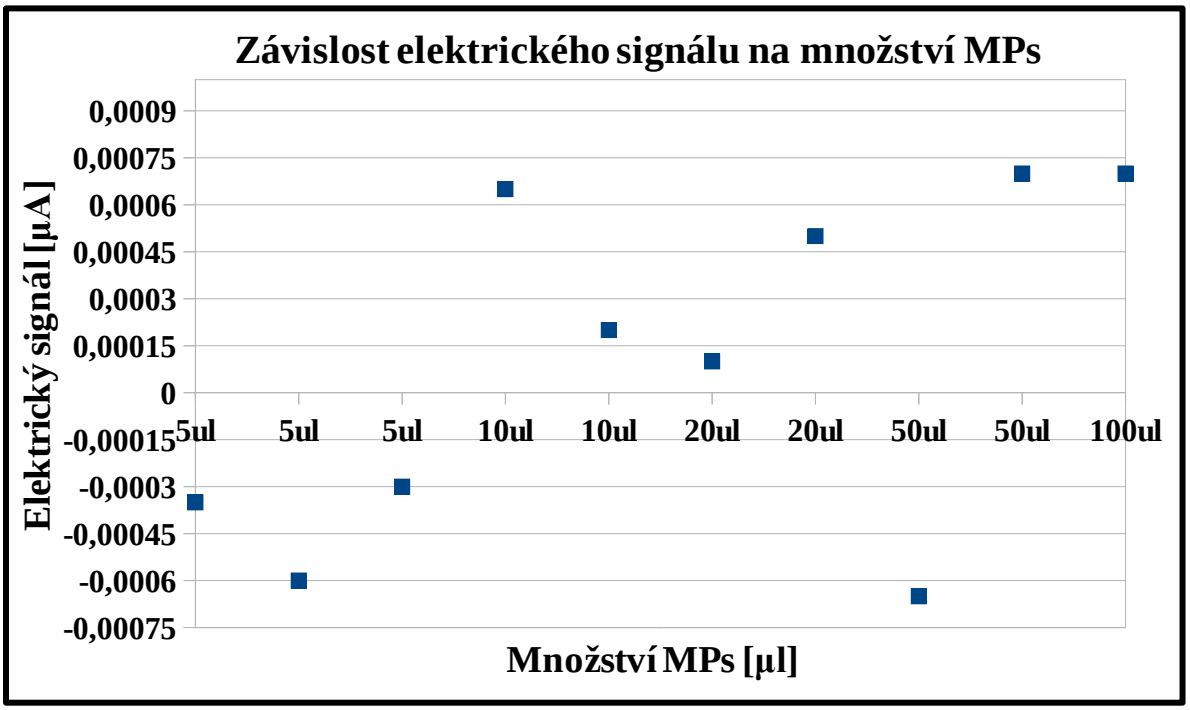
V daném experimentu bylo provedeno měření s různým množstvím MPs (50 mg/ml) o objemech 50 µl, 100 µl a 150 µl. Substrát (200 mM) byl nasáván o konstatním objemu 50 µl. Objem substrátu byl 40x naředěn. Použil se jednokanálový biosenzor, který byl umístěný v cele propojené s průtočným systémem. Nejprve se přidalo 50 µl MPs a dvakrát se nasával substrát (čas 2 min.). Tento postup se provedl jak pro objem 100 µl, tak i pro objem 150 µl. V prvním grafu je zobrazen záznam dvou přídavků ATCh – I a v druhém grafu je zobrazen účinek množství MPs na přídavek substrátu. Nejvyšší hodnota odezvy signálu při přidání 50 µl ATCh - I byla získána při prvním přidání 50 µl MPs. Z následovných výsledků na obrázku 22 lze vyčíst, že rozdíl mezi dvěma přídavky byl velmi vysoký. Z toho lze usuzovat, že daný výsledek byl ovlivněn neobvyklou reakcí mezi částicemi a daným substrátem. Autoři, kteří se zabývají danou problematikou, usuzují, že čím větší množství MPs se zachytí na pracovní elektrodu, tím by se měla získat větší odezva signálu. V našem případě se také tak děje, což lze zpozorovat při šestém přidání ATCh – I. V závislosti na prováděném experimentu se muselo určit jaké je nejoptimálnější množství MPs použít.



Obrázek 22: *Záznam měření dvou přídavku substrátu při přidání 50 µl MPs a závislost elektrického proudu na množství MPs.* (Vzorky obsahovaly ATCh - I o koncentraci 200 mM. Přidávání substrátu (50 µl) bylo stejné a MPs bylo v rozmezí od 50 µl do 150 µl. V grafu jsou zobrazeny chybové úsečky)

9.1.5. Ověření způsobu použití různého množství MPs

V následujícím experimentu bylo provedeno měření s různým množstvím MPs (50 mg/ml) o objemech 3 x 5 µl, 20 µl, 2 x 50 µl a 100 µl a s přídavkem substrátu o objemu 100 µl, který byl nasávan po dobu 2 minut a byl naředěn 40 x. Průtočný systém byl spojen s celou, ve které byl umístěn jednokanálový biosenzor a druhý konec byl propojen s kádinkami, ve kterých byl elektrolyt a v následujících byly MPs a substrát. Tento experiment byl dvakrát opakován a následující výsledky jsou zobrazeny v obrázku 23, ze kterého lze vyčíst, že největší odezva signálu je získána při použití 100 µl MPs. Při porovnání výsledku s předešlým pokusem lze vyhodnotit, že nejoptimálnější je použít 100 µl MPs. Z tohoto důvodu se budou provádět dané experimenty, se 100 µl MPs, protože dané měření probíhá bez komplikací a bez ucpávání průtočného systému a cely.

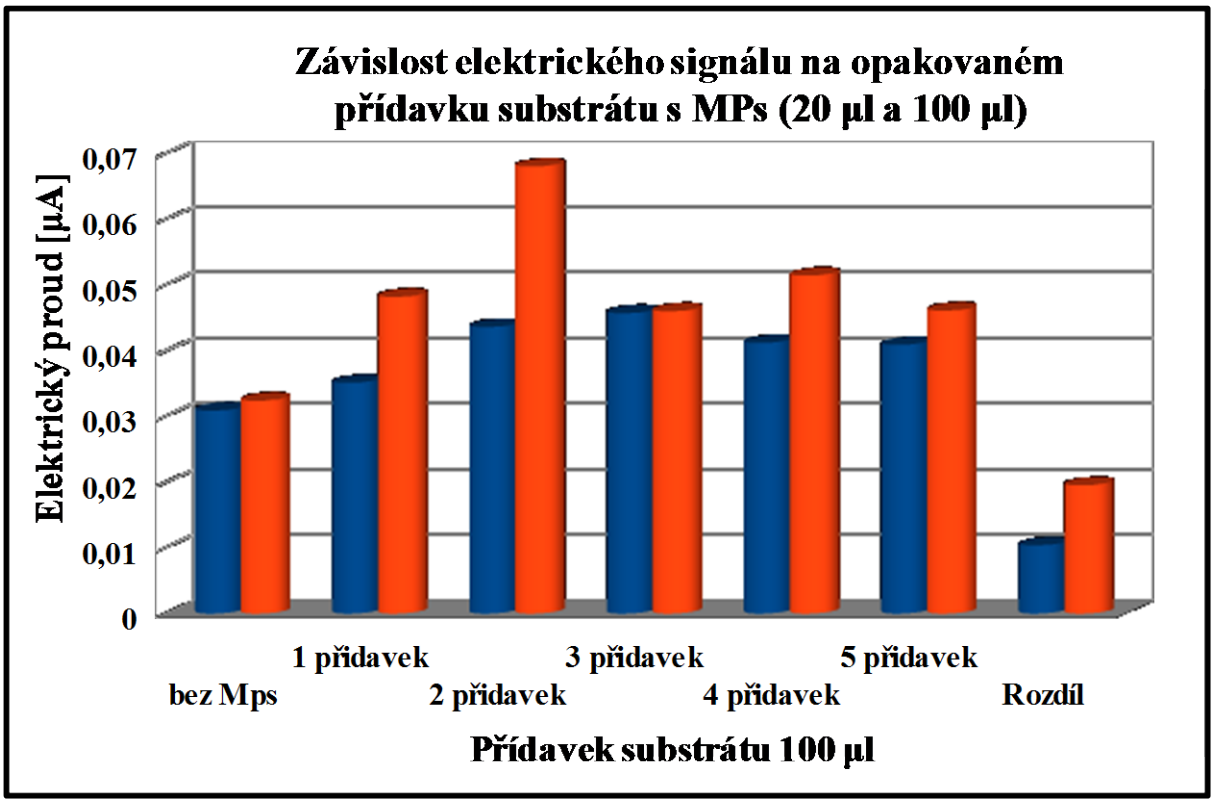


Obrázek 23: *Závislost elektrického signálu na množství MPs.* (Vzorky obsahovaly ATCh – I (200 mM) o objemu 100 µl. MPs bylo v rozmezí od 5 µl do 100 µl)

9.1.6. Vliv opakovaného přídavku substrátu na 20 µl a 100 µl MPs

Daný experiment byl založen na pěti přídavcích 100 µl ATCh – I s použitím 20 µl a 100 µl MPs. Objem ATCh – I byl naředěn čtyřicetkrát. Použil se jednokanálový biosenzor, který byl umístěný v cele, která byla propojena s průtočným systémem. Nejprve se přidalo 20 µl MPs a opakovaně se nasával substrát (čas 2 min.) o zmíněném objemu a poté došlo k promytí cely a bylo přidáno 100 µl MPs a opět se pětkrát nasávalo ATCh – I (t = 2 min.).

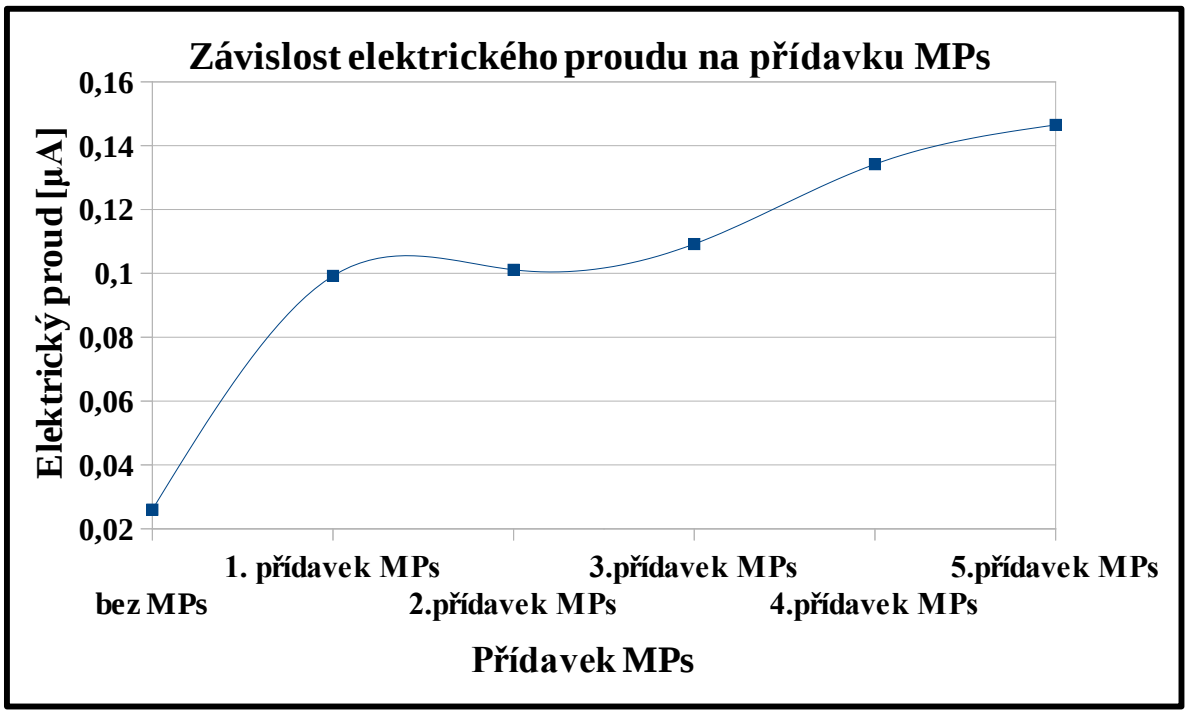
V následujícím obrázku 24 jsou porovnávány odezvy signálu s přidaným množstvím MPs. Na svislé ose y jsou vyneseny hodnoty elektrického proudu (napětí bylo nastaveno konstantní 300 mV), které byly zaznamenány po jednotlivých přídavcích substrátu, které jsou zobrazeny na ose x. Hodnoty elektrického proudu s použitím 20 µl MPs se pohybovaly průměrně okolo 0,0413 µA a rozdíl mezi přidaným substrátem bez MPs a substrátem s využitím MPs je 0,0104 µA. Hodnoty elektrického proudu s použitím 100 µl MPs se pohybovaly průměrně okolo 0,05194 µA a rozdíl mezi přidaným substrátem bez MPs a substrátem s využitím MPs je 0,01954 µA. Z výsledků je zřejmé, že vliv substrátu bez navázaného enzymu byl minimální a po použití MPs se hodnota elektrického proudu zvýšila téměř o 0,02 µA. Použití 100 µl MPs mělo téměř ve všech pěti případech větší odezvu elektrického proudu než 20 µl MPs. V daném měření se potvrdilo, že 100 µl MPs má větší využitelnost. Jejich účinek bude mít větší uplatnění, než kdyby se použilo menší množství, protože by rozdíl od původního přidání substrátu činil pouze malý nárůst elektrického proudu.



Obrázek 24: *Závislost elektrického proudu na opakovaném přídavku substrátu.* (Bylo využito MPs (50 mg/ml) o objemu 20 µl a 100 µl a bylo použito 5 x 100 µl ATCh – I (200 mM). Modrá barva je 1. měření s 20 µl MPs a oranžová barva vyjadřuje 2. měření se 100 µl MPs)

9.1.7. Vliv konstantního 100 µl ATCh – I při opětovném přidávání 20 µl MPs

V daném experimentu bylo provedeno měření s 20 µl přídavkem MPs a s konstatním přídavkem ATCh – I (200 mM) o objemu 100 µl. Objem ATCh – I byl naředěn čtyřicetkrát. Zde se použil jednokanálový biosenzor, který byl umístěný v cele, která byla propojena s průtočným systémem. Nejprve se přidalo 20 µl MPs a opakovaně se nasál substrát (čas 2 min.) a potom zase 20 µl MPs dokud nebylo získáno 100 µl MPs. Obrátil se daný postup. V daném grafu je zobrazen účinek různého množství MPs na stejný přídavek substrátu. Hodnota odezvy signálu lineárně rostla s větším množstvím MPs.

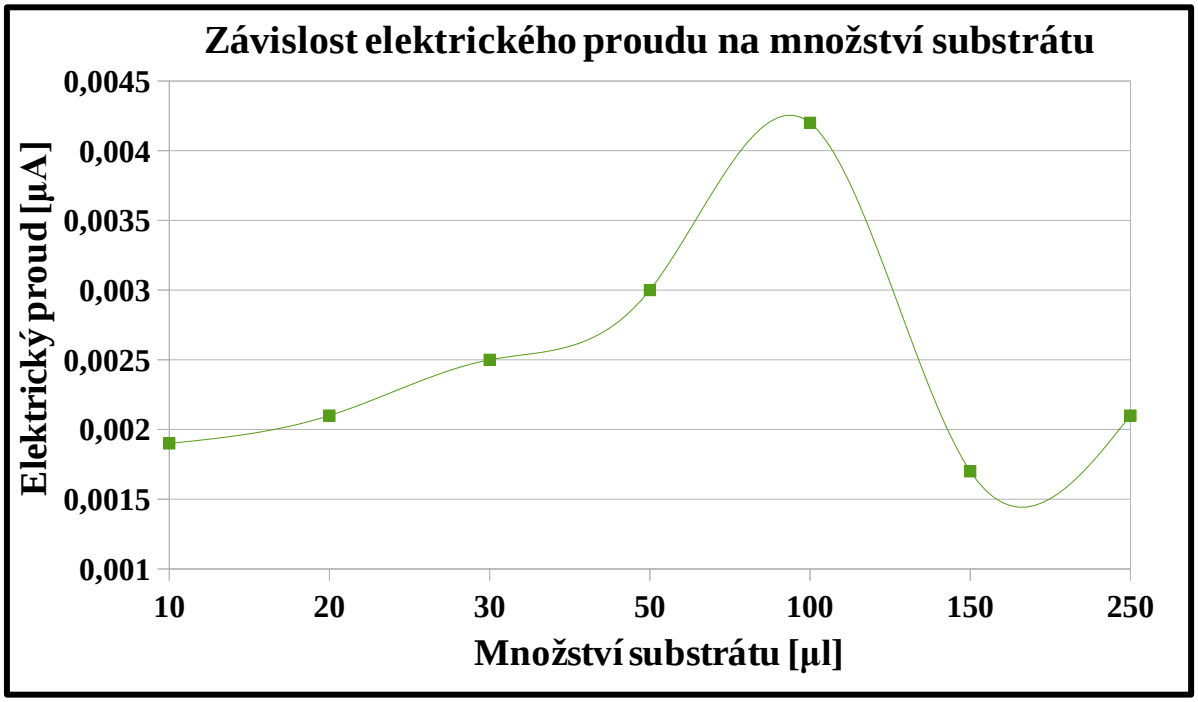


Obrázek 25: *Závislost elektrického proudu na přídavku MPs.* (MPs (50 mg/ml) bylo přidáváno postupně o objemu 20 µl. ATCh – I (200 mM) bylo 100 µl)

9.1.8. Vliv různého přídavku substrátu na konstantní množství MPs

V experimentu se provedlo měření s různým přídavkem ATCh - I (200 mM) o objemech 3 x 10 µl, 20 µl, 2 x 50 µl a 100 µl, které byly naředěny. MPs (50 mg/ml) bylo přidáno o objemu 100 µl. Zde se použil jednokanálový biosenzor, který byl umístěný v cele, která byla propojena s průtočným systémem. Nejprve se přidalo 100 µl MPs a opakovaně se nasával substrát (čas 2 min.) o zmíněných objemech. V daném grafu je zobrazen účinek různého množství ATCh - I na stejný přídavek MPs. Nejvyšší hodnota odezvy signálu byla při objemu

ATCh – I 100 µl. U objemu 150 a 250 µl ATCh - I se elektrický proud výrazně snížil v důsledku neobvyklé reakce mezi substrátem a MPs a špatným kontaktem měřícího aparátu.

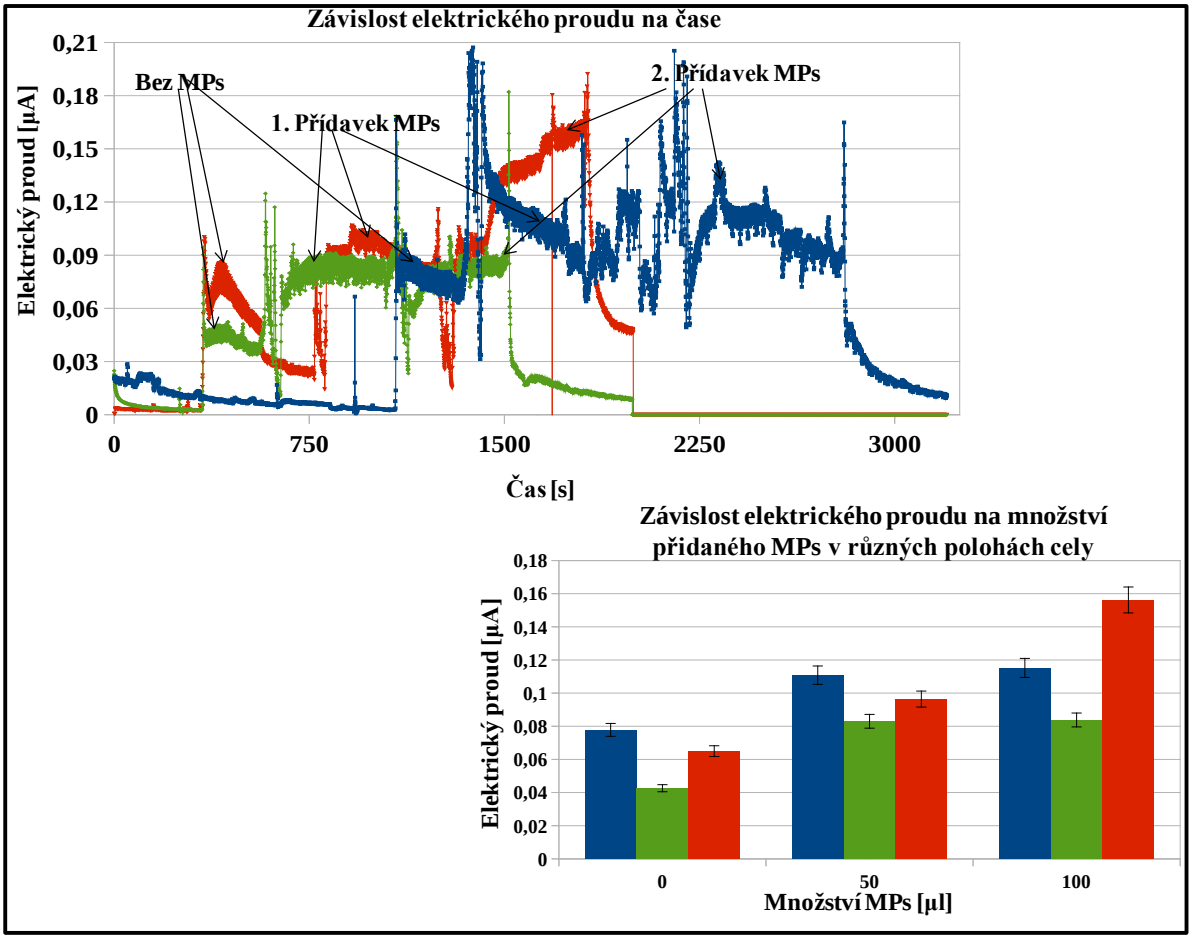


Obrázek 26: *Závislost elektrického proudu na množství ATCh - I.* (Vzorky obsahovaly MPs (50 mg/ml) o objemu 100 µl. Celkový objem substrátu byl od 10 µl do 250 µl)

9.1.9. Vliv polohy cely na odezvu signálu

V tomto experimentu se provedla tři různá měření založená na zjišťování polohy cely (boční, horní, spodní pozice). V závislosti na této poloze cely bylo možné získat největší proudovou odezvu signálu. V měření se použilo 100 µl ATCh - I (200 mM) a dva přídavky MPs (50 mg/ml) o objemu 50 µl. Objem substrátu byl opět naředěn. Druhý přídavek MPs měl celkový objem 100 µl. Použil se jednokanálový biosenzor, který byl umístěný v cele, která byla propojena s průtočným systémem. Nejprve se změřil ATCh – I bez MPs a po přidání MPs se nasávaly a změřily po 2 min. intervalech dva přídavky ATCh – I. V následujících grafech byly zobrazeny přídavky MPs, kde modrý signál zobrazuje odezvu signálu (cela je v boční pozici a nástavec na ni působí z boku). Zelený signál zobrazuje odezvu signálu (cela je v pozici ze shora a nástavec působí ze shora). Červený signál zobrazuje odezvu signálu (cela je v pozici ze spodu a nástavec působí ze spodu). Druhý graf z obrázku 27 zobrazuje dané výtěžky odezev signálu z následujících poloh cely a nástavce. Největší odezvy signálu byly získány s celou v poloze ze spodu, což je pravděpodobně způsobeno rozptýlením MPs po celé elektrodě. Dalo by se tedy obecně tvrdit, že nejvyšší odezvu signálu bude mít taková

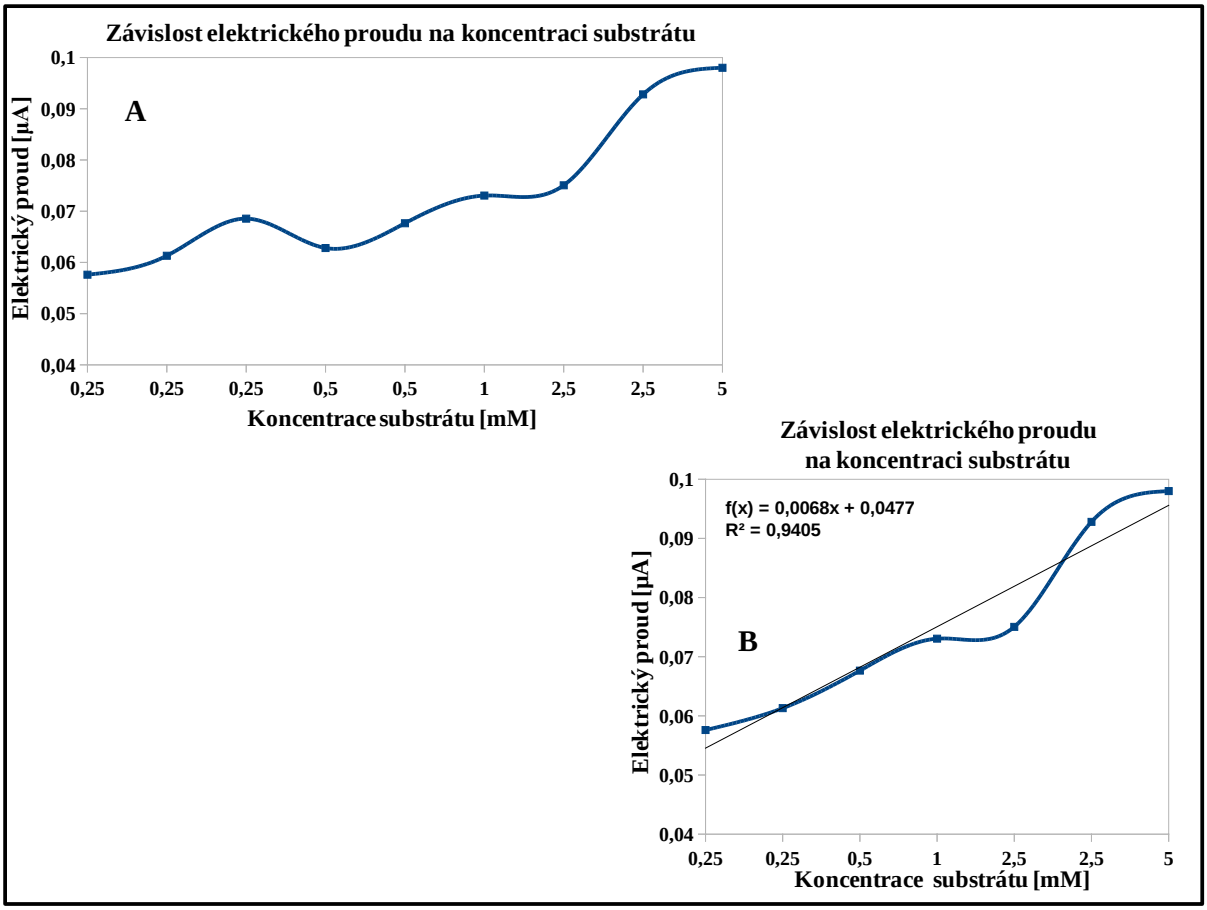
pozice cely, kterou se podaří vytvořit vrstvu částic rovnoměrně kolem pracovní elektrody. Při použití ze spodu dochází také k optimálnímu měření a nedochází ke stíkání MPs na stěny cely. Hodnota odezvy signálu (orientace cely ze spodu) u druhého přídavku MPs (100 µl) dosahuje 0,1562 µA a u prvního přídavku MPs (50 µl) byla ještě hodnota odezvy největší při orientaci cely z boku, ale potom už je lepší použít celu orientovanou ze spodu. Díky těmto výsledkům se jeví jako nejvhodnější použít celu orientovanou ze spodu společně s taktéž umístěným nástavcem.



Obrázek 27: *Určení polohy cely v závislosti na přídavku MPs.* (Vzorky obsahovaly MPs (50 mg/ml) o objemu 50 µl a celkový objem substrátu byl 100 µl. Modrý signál – cela z boku, Zelený signál – cela ze shora a červený signál – cela ze spodu)

9.1.10. Závislost elektrického proudu na koncentraci substrátu pomocí MPs

Po provedení optimalizačních kroků se s připravenými roztoky provedl postup měření popsaný v kapitole 8 a bylo tedy možné získat největší odezvy signálu zachycením MPs na biosenzor, na které se poté navázal ATCh – I. Byl použit jednokanálový biosenzor, který byl umístěný v cele. S celou byl propojen průtočný systém, který měl nastaven průtok 15. Použila se kádinka, která byla naplněna elektrolytem a kádinka, ve které byly přídavky substrátu. Celou se nechal protékat roztok elektrolytu a po ustálení se přidalo 100 µl MPs a následně protékal elektrolyt. Po každém ustálení došlo k protékání substrátu (200 mM) o objemech 3 x 5 µl, 2 x 10 µl, 20 µl, 2 x 50 µl a 100 µl. Došlo k přepočítání objemů substrátu (200 mM) na koncentrace substrátu. Čas nasávání ATCh – I byl okolo 2 minut. K ověření správnosti postupu se provedl experiment, kde se sledovala schopnost zachycení ATCh- I pomocí MPs. Po elektrochemické detekci získaných vzorků byla data vyhodnocena a sestrojena kalibrační křivka (Obrázek 28). Odezva signálu lineárně roste, pokud se nevezme v úvahu třetí přídavek (5 µl nebo–li 0,25 mM) a první přídavek (10 µl nebo–li 0,5 mM), podle rovnice regrese $f(x) = 0{,}0068x + 0{,}0477$ a s faktorem spolehlivosti $R^2 = 0{,}9405$. Od koncentrace 2,5 mM je nárůst signálu pozvolný. Tímto experimentem se potvrdila účinnost postupu při vzniku komplexu enzym – substrát na syntetických molekulách. Proto se mohla provést inhibice a daný postup zautomatizovat.



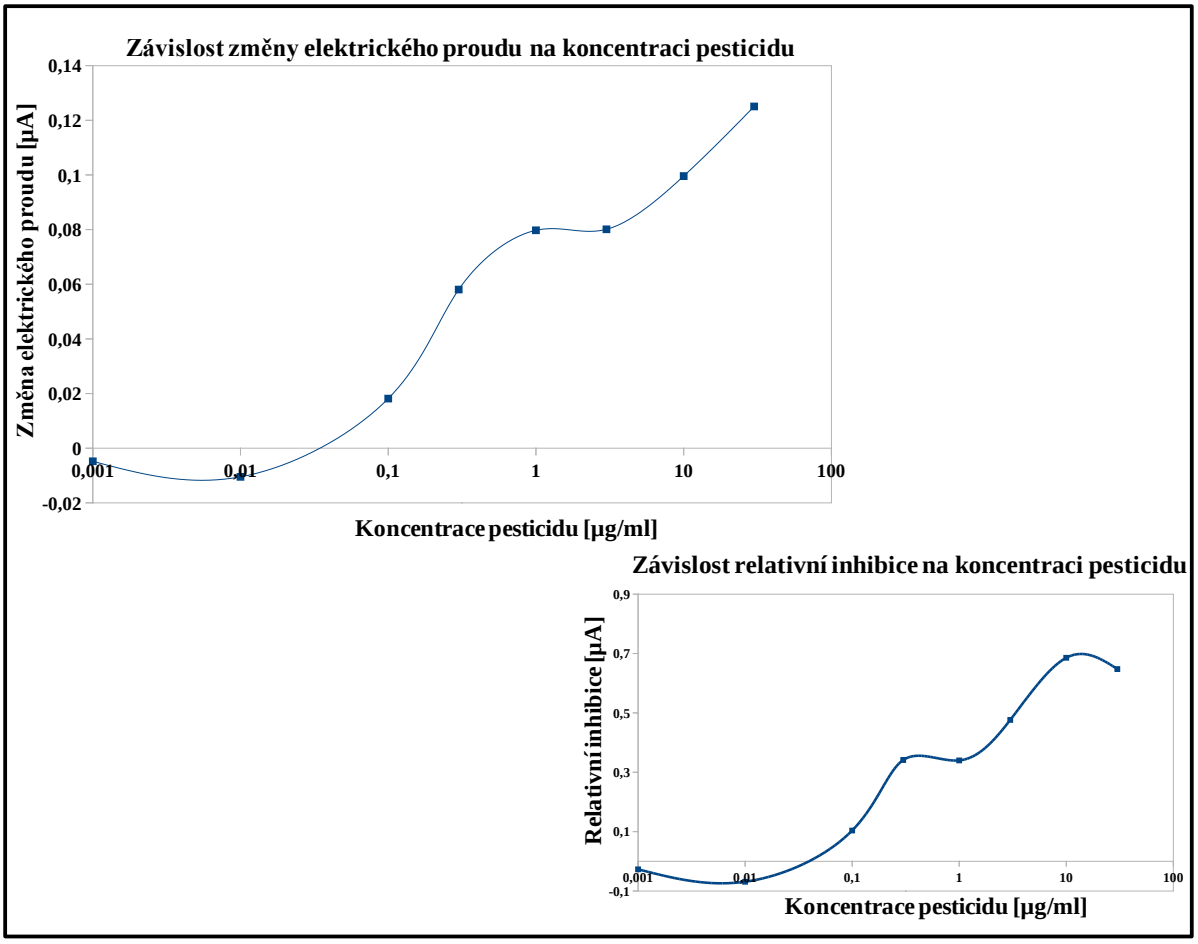
Obrázek 28: *Kalibrační křivka.* (MPs (50 mg/ml) o objemu 100 µl. ATCh – I bylo od 5 µl do 100 µl. A) Závislost proudu (µA) na koncentraci *0,25 - 5* mM a B) závislost proudu (µA) na koncentraci *0,25 – 5* mM bez třetího přídavku 0,25 mM a prvního přídavku 0,5 mM ATCh - I. U obrázku B je zobrazena hodnota regrese a hodnota spolehlivosti. Hodnota směrodatné odchylky byla 0,01311 µA a medián se rovnal 0,06855)

9.2. Stanovení organofosfátového pesticidu pomocí inhibice cholinesterasy imobilizované na MPs

Další úkol byl založen na testování, použití a sledování vlivu organofosfátového pesticidu pomocí inhibice cholinesterasy imobilizované na magnetické částice různé velikosti. V řadě případů je způsob imobilizace ideální při stanovení enzymových substrátů, ale méně vhodný při stanovení inhibitorů enzymů. Použití magnetických částic s imobilizovaným enzymem umožňuje právě jednoduché obnovení enzymové vrstvy uvolněním inaktivovaných částic a zachycení čerstvého enzymu pomocí magnetu a proto lze provádět inhibici bez použití nového biosenzoru. Pouze se provede výměna MPs, což se sleduje v následujícím úkolu.

9.2.1. Vliv inhibitoru na enzym, který je imobilizovaný na MPs

Daný experiment byl prováděn s průtočným systémem, který byl propojen s celou, ve které byl umístěn jednokanálový biosenzor. Byl zde použit permanentní magnet, který umožňoval dostatečné zachycení MPs, aby se vytvořila vrstva na biosenzoru. Po přidání 100 µl MPs byly změřeny dva přídavky ATCh – I (100 µl) ve 4 min. intervalech. V následujícím postupu byl přidán inhibitor o různých koncentracích. Inhibitor působil na daný povrch 5 min. a potom byly přidány dva přídavky ATCh – I po inhibici. V záznamech je zobrazena změna elektrického proudu na přidaném pesticidu a relativní inhibice na přidaném pesticidu. V obou případech se se zvyšujícím množstvím pesticidu, dochází k silnějšímu útlumu odezvy signálu. Z kinetického hlediska se systém choval tak, jako by bylo přítomno menší množství enzymu, neboť část je ho inaktivována vazbou inhibitoru a hodnota Michaelisovy konstanty by neměla být tímto typem inhibice ovlivněna, byla však snížena hodnota limitní rychlosti. Na svislé ose y jsou vyneseny hodnoty elektrického proudu (napětí bylo nastaveno konstantní 300 mV), které byly zaznamenány po jednotlivých přídavcích inhibitoru, které jsou uvedeny na ose x. Z vykreslených grafů si lze všimnout, že při koncentracích 0,001; 0,01 a 0,1 µg/ml pesticidu docházelo k velmi pozvolnému ovlivnění povrchu MPs. Z toho lze usuzovat, že hranice, při které je danou inhibici ještě možné sledovat je v rozmezí od 0,1 do 0,3 µg/ml.

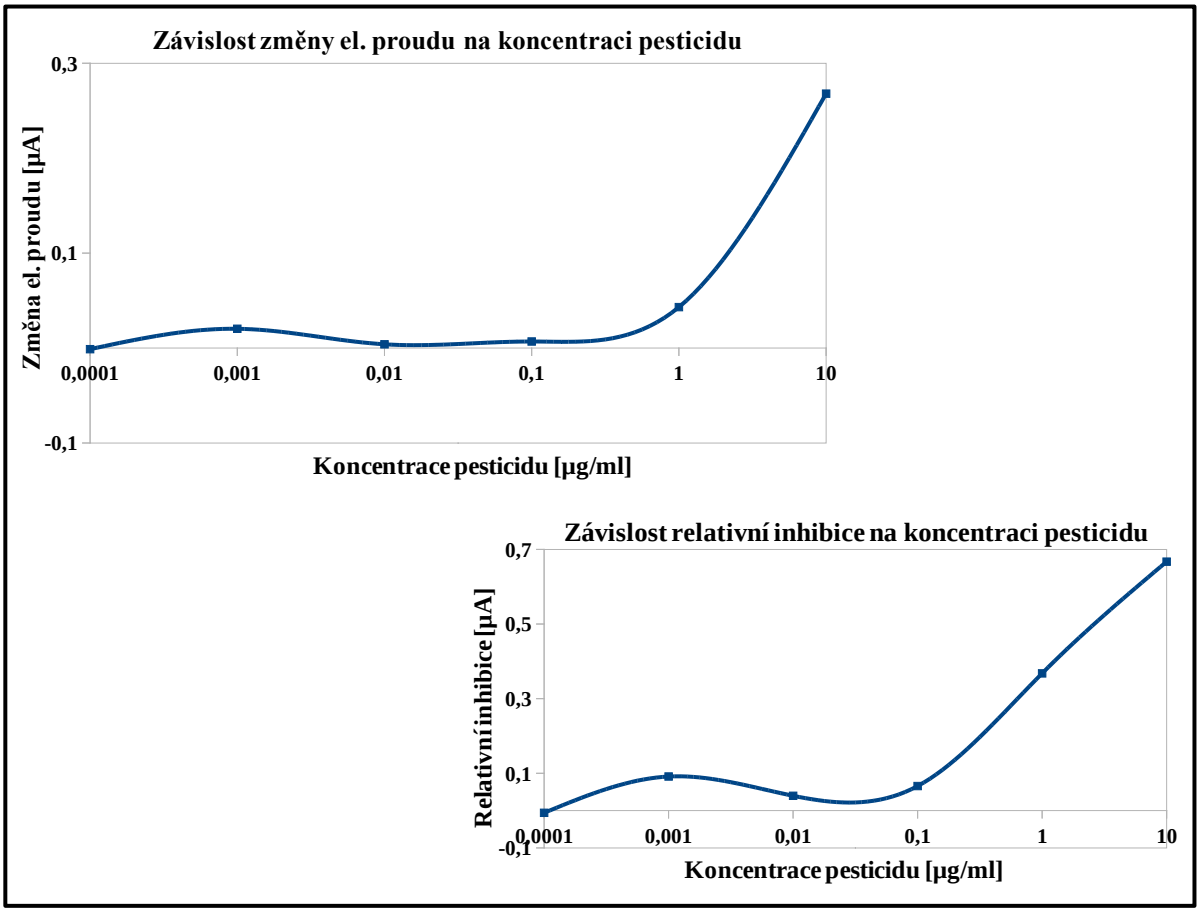


Obrázek 29: *Závislost změny proudu a relativní inhibice na koncentraci pesticidu.* (MPs (50 mg/ml) o objemu 100 µl. ATCh – I (200 mM) bylo 100 µl. Závislost změny el. proudu (µA) na koncentraci pesticidu (*0,001; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 a 30 µl*). Druhá závislost relativní inhibice (µA) na koncentraci pesticidu (*0,001; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 a 30 µl*). Hodnota směrodatné odchylky byla 0,0502 µA a medián se rovnal 0,05805)

9.2.2. Vliv inhibitoru na enzym, který je imobilizovaný na MPs

Experiment byl založen na stejném způsobu, jako předešlý experiment. Bylo zde stejné uspořádání systému i stejný způsob provádění měření. Pouze se lišil daný způsob měření v použití MPs. Použily se syntetizované MPs (6 mg/ml) o objemu 200 µl a byly změřeny dva přídavky ATCh – I 200 mM (100 µl) před inhibicí a po inhibici. V obou případech se se zvyšujícím množstvím pesticidu, dochází k pomalejšímu útlumu odezvy signálu, než u měření kde byly použity modifikované MPs (50 mg/ml). V tomto případě musely být použity jiné koncentrace pesticidu, protože v předchozím případě se zjistilo, že při použití 30 µg/ml docházelo k ustálení inhibice. Zde se použil inhibitor o koncentracích 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 µg/ml. Na svislé ose y jsou vyneseny hodnoty elektrického proudu (napětí bylo nastaveno konstantní 300 mV), které byly zaznamenány po jednotlivých přídavcích

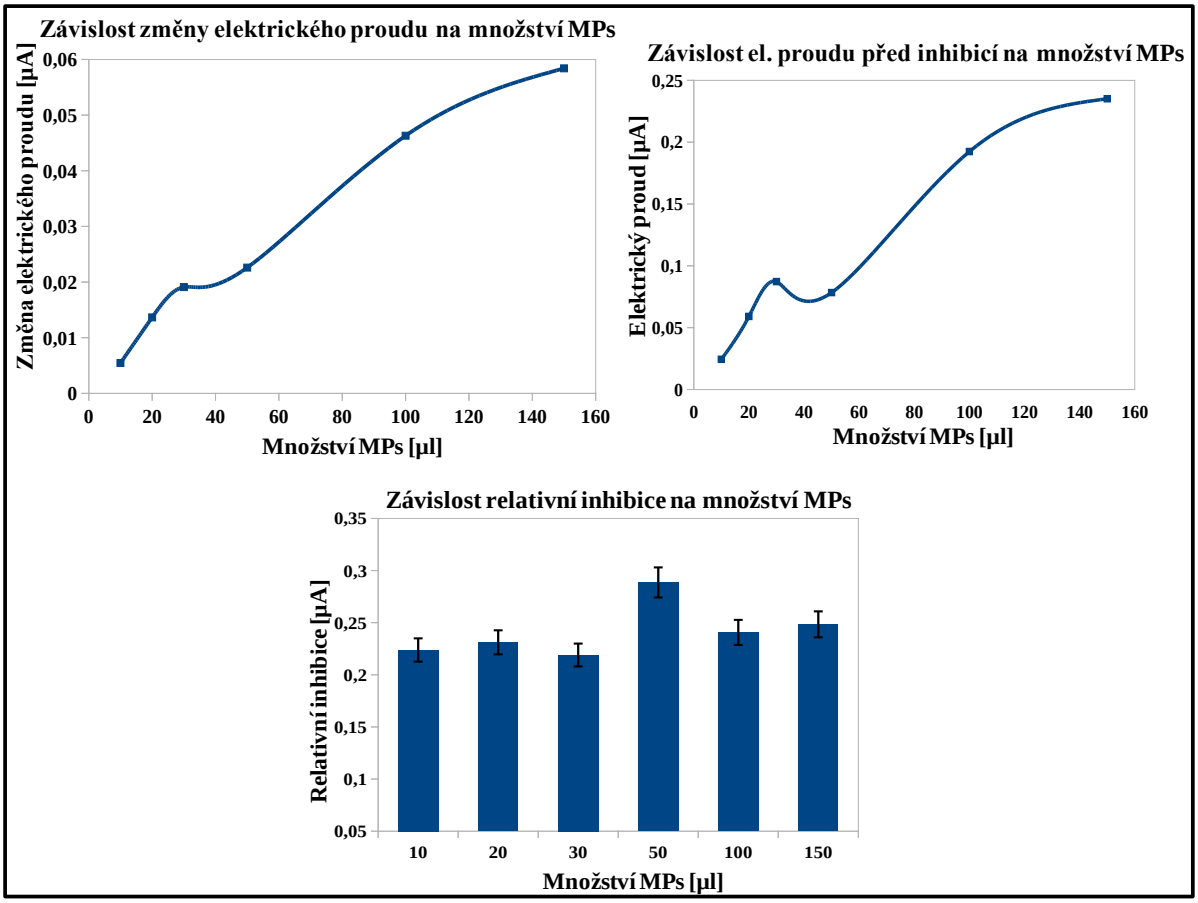
inhibitoru, které jsou uvedeny na ose x. Z vykreslených grafů si lze všimnout, že při koncentracích 0,0001; 0,001; 0,01 a 0,1 µg/ml pesticidu docházelo k velmi pozvolnému ovlivnění povrchu MPs. Pouze při koncentraci 0,001 µg/ml došlo k menšímu navýšení odezvy signálu. Při koncentraci 0,0001 µg/ml nebyla inhibice účinná. U syntetizovaných MPs lze výraznou změnu před inhibicí a po inhibici sledovat při koncentraci 1 µg/ml.



Obrázek 30: *Závislost relativní inhibice a změny proudu na koncentraci pesticidu.* (MPs (6mg/ml) o objemu 200 µl. Bylo použito ATCh – I (200 mM) o objemu 100 µl. Závislost změny el. proudu (µA) na koncentraci pesticidu (*0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 µl*). Druhá závislost relativní inhibice (µA) na koncentraci pesticidu (*0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1a 10 µl*). Hodnota směrodatné odchylky byla 0,0962 µA a medián se rovnal 0,0203)

9.2.3. Vliv různého množství MPs na účinek pesticidu

V tomto experimentu byl zkoumán vliv různého množství MPs na inhibici, při použití stejné koncentrace inhibitoru. Průtočný systém byl propojen s celou, ve které byl umístěn jednokanálový biosenzor. Byl zde použit permanentní magnet, který umožňoval dostatečné zachycení MPs, aby se vytvořila biorekogniční vrstva na biosenzoru. Po přidání syntetizovaných MPs (50 mg/ml) o objemech 150, 100, 50, 30, 20 a 10 µl byly změřeny dva přídavky ATCh – I 200mM (100 µl) ve 4 minutových intervalech. V následujícím postupu byl přidán inhibitor o koncentraci 1 µg/ml. Inhibitor působil na daný povrch 5 minut a potom byly přidány dva přídavky ATCh – I po inhibici. V záznamech je zobrazena změna elektrického proudu na množství MPs a relativní inhibice na množství MPs a ve třetím záznamu jsou zobrazeny odezvy signálu před inhibicí. Čím menší množství MPs bylo použito, tím byla změna elektrického proudu menší. Při relativní inhibici bylo zjištěno, že daný biosenzor se choval při každém přídavku inhibitoru a MPs podobně, což značí, že daný biosenzor fungoval správně. U závislosti el. proudu před inhibicí dochází k nárůstu el. proudu, při každém použití většího množství MPs. Lze hovořit o tom, že docházelo téměř k lineárnímu nárůstu signálu. Pouze při hodnotě 50 µl došlo k nepatrnému snížení odezvy signálu. Z vykreslených grafů si lze všimnout, že při objemu 50 µl MPs docházelo k ovlivnění výsledků, což mohlo být způsobeno difuzí nebo neobvyklou reakcí na povrchu MPs s inhibitorem. Protože u relativní inhibice docházelo k nárůstu signálu a u změny el. proudu pouze k pozvolnému nárůstu. V případě daného přeměření tato hodnota ukazovala podobné výsledky.

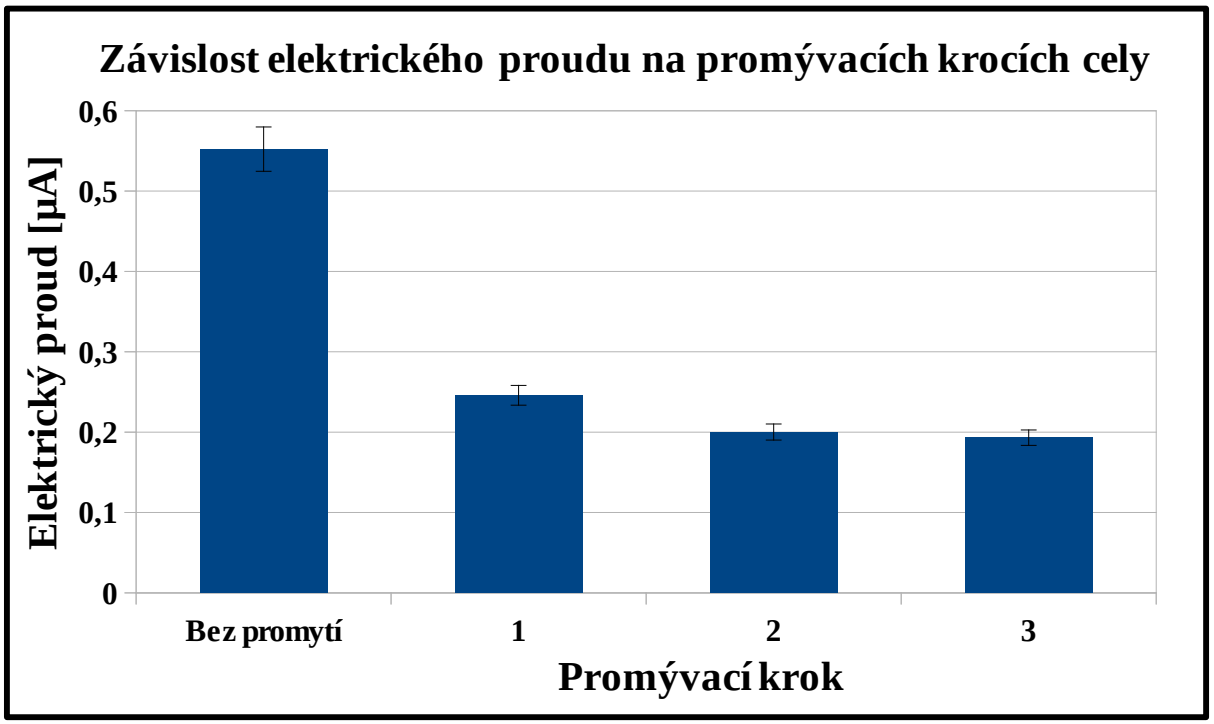


Obrázek 31: *Závislost relativní inhibice, změny proudu a el. proudu na množství MPs.* (Syntetizované MPs (50 mg / ml) o objemech 10, 20, 30, 50, 100, 150 µl. Bylo použito ATCh – I (200 mM) o objemu 100 µl. Hodnota směrodatné odchylky byla 0,0204 µA a medián se rovnal 0,0209)

9.3. Stanovení funkčnosti a ovládání elektromagnetu

V této části výzkumu byla provedena optimalizace funkčnosti a ovládání elektromagnetu, který je potřebný pro automatizaci vzniklého manuálního postupu. Byl použit přesnější průtočný systém, který umožňuje nastavovat optimální rychlost průtoku. Daný systém byl propojen s celou, ve které byl umístěn jednokanálový biosenzor. U této pumpy bylo provedeno nejprve měření na zjištění optimální rychlosti. Určovala se rychlost 1; 2; 3,5; 5 a 7 otáček/min. Při nasávání MPs je nejoptimálnější použít rychlost 3,5 otáček/min., což odpovídá průtoku 17 µl/min. Místo permanentního magnetu byl použit elektromagnet, u kterého bylo potřeba zjistit nejoptimálnější nastavení napětí a proudu, protože elektromagnet měl schopnost se zahřívat. Hodnota napětí a proudu elektromagnetu se stanovila na základě proměření, kde se nastavilo napětí a proud na hodnoty 1 V a 0,65 A; 1,5 V a 0,89 A; 1,8 V a 1 A; 2 V a 1,16 A a 2,2 V a 1,36 A. Napětí a proud elektromagnetu

byl určen na hodnotu 2 V a 1,16 A, aby elektromagnet vydržel délku měření bez velkého teplotního zatížení. Především bylo potřeba zoptimalizovat promytí cely v důsledku působení elektromagnetu na MPs. Z tohoto důvodu bylo provedeno měření s elektromagnetem, při kterém byla získána závislost elektrického proudu před a po promytí cely. Z grafu lze vyčíst, že promytí proběhlo při napětí 2 V a proudu 1,16 A za daných podmínek optimálně a čím více promývacích kroků, tím docházelo k lepšímu promytí. Může být zarážející, že byly získané takové odezvy signálu, ale bylo to způsobeno novými syntetizovanými MPs (50 mg/ml) a použitím daného biosenzoru. Na základě získaných poznatků se mohlo přejít na zautomatizování daného postupu.



Obrázek 32: *Závislost el. proudu na promývacích krocích.* (Použili se syntetizované MPs (50 mg/ml) o objemu 100 µl a byl použit ATCh – I (200 mM) o objemu 100 µl, který se naředil.)

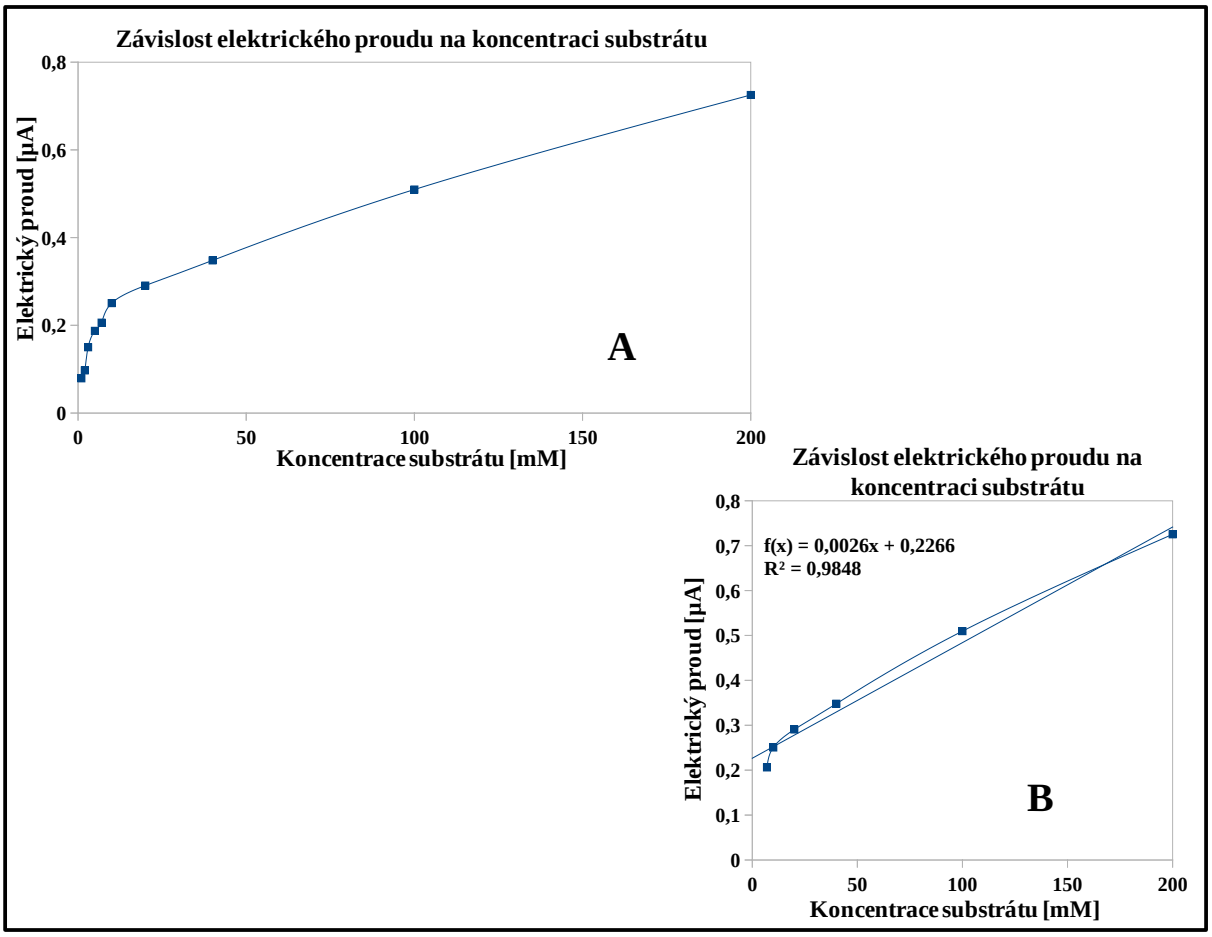
9.4. Návrh protokolu pro automatické stanovení komplexu enzym - substrát

Další úkol spočíval v seznámení se s autoinjektorem a ve vytvoření odpovídajících programů (viz přílohy) pro úspěšné stanovení komplexu enzym – substrát. V dnešní době si metody žádají plně automatizované postupy, které řeší čas a experimentální chybu. Automatický postup byl proveden pomocí komerčně dostupného autoinejktoru s lineárními pumpami. Program byl vytvořen pomocí SAMPLER softwaru, který byl součástí autoinjektoru. Dále bylo nutné celý program vyzkoušet a optimalizovat jednotlivé technické parametry nastavení. Postup vychází z optimalizace, která byla provedena při manuálním vytvoření daného postupu. Výsledný program pro závislost elektrického proudu na koncentraci substrátu je zobrazen v příloze a druhý program pro vliv inhibitoru na enzym je obsažen také v příloze.

9.4.1. Závislost elektrického proudu na koncentraci substrátu

Byla sestavena měřící aparatura společně s autoinjektorem a s lineárními pumpami, což vedlo k provedení automatického měření po provedení optimalizace u manuálního postupu. Autoinjektor umožnil naředit a injektovat substrát (200 mM) k vytvoření kalibrační křivky a také injektovat 100 µl syntetizovaných MPs (50 mg/ml) do daného oběhu. Pomocí automatizovaného systému bylo možné získat největší odezvy signálu zachycením MPs na biosenzor, na které se navázal ATCh – I. Byl použit jednokanálový biosenzor, který byl umístěný v cele. Cela byla propojena se zdrojem a elektromagnetem a také byla propojena autoinjektorem s lineárními pumpami a peristaltickou pumpou MP 3, která měla nastaven průtok na 3,5 otáček/min. pro nepřetržitý průtok elektrolytu, který byl umístěný v 10 ml kádince. Při nasávání MPs se rychlost průtoku u peristaltické pumpy MP 3 musela snížit na 0,8 otáček/min., z hlediska lepšího zachycení MPs na biosenzor. Celou se nechal protékat roztok elektrolytu a po ustálení se nainjektovalo 100 µl MPs a následně nepřetržitě protékal elektrolyt. Po každém ustálení došlo k protékání 100 µl substrátu o koncentracích 200 mM, 100 mM, 40 mM, 20 mM, 10 mM, 7 mM, 5 mM, 3 mM, 2 mM a 1 mM. Je, ale potřeba říci, že dané koncentrace substrátu byly ještě zředěny po nainjektování do průtočného sytému, protože v celém systému neustále protékal elektrolyt. Po elektrochemické detekci získaných vzorků byla data vyhodnocena a sestrojena kalibrační křivka (Obrázek 33). Odezva signálu lineárně roste a pokud se nevezmou v úvahu menší koncentrace a pouze koncentrace od 7 - 200 mM, tak rovnice regrese je $f(x) = 0{,}0026x + 0{,}2266$ a faktor spolehlivosti je

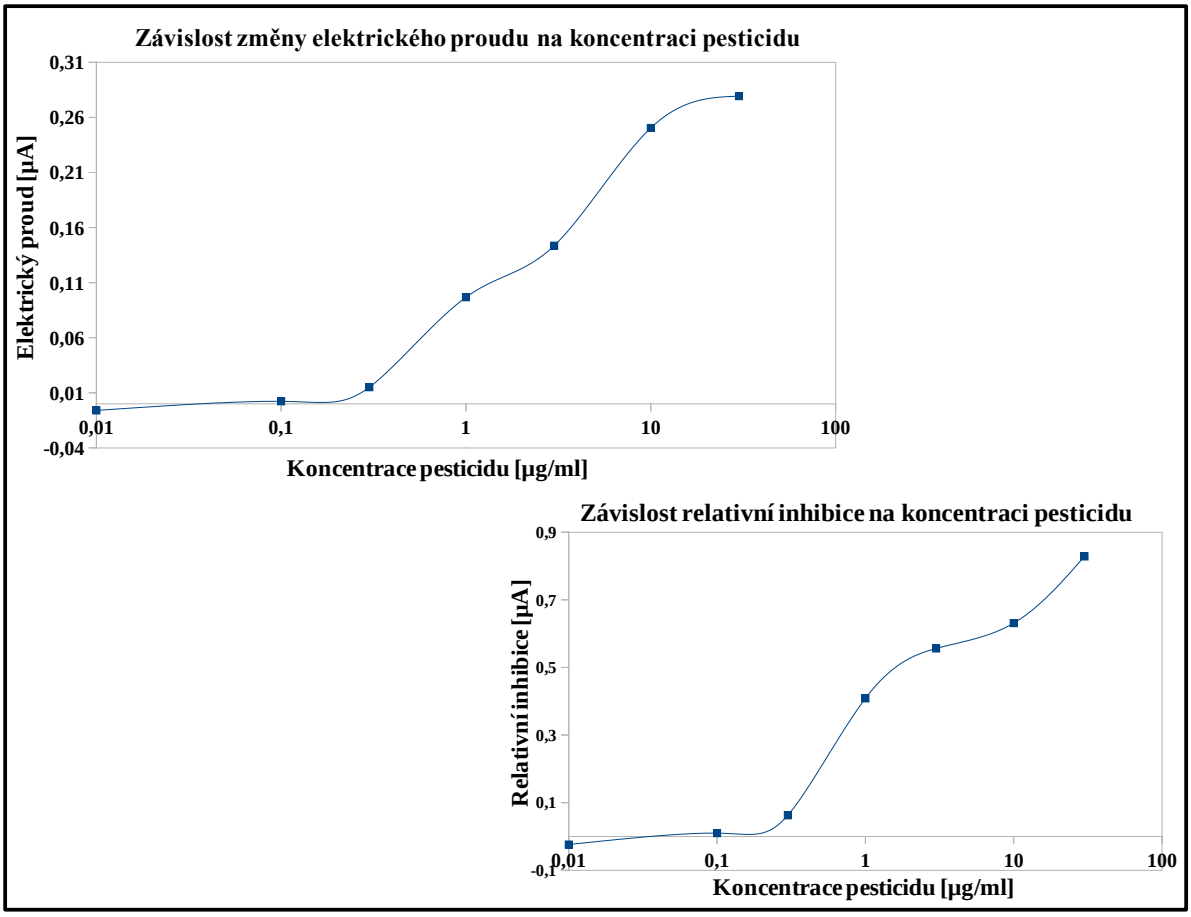
R^2 = 0,9848. Tímto experimentem se potvrdila účinnost automatizovaného postupu při vzniku komplexu enzym – substrát na syntetických molekulách a daný program fungoval bez komplikací. Rozdíl mezi faktorem spolehlivosti při manuálním postupu a faktorem spolehlivosti při zautomatizovaném postupu je 0,0443.



Obrázek 33: *Kalibrační křivka* (Syntetizované MPs (50 mg/ml) o objemu 100 µl. ATCh – I bylo od koncentrace 1 mM do 200 mM, ale byly ještě během průtoku zředěny. A) Závislost proudu (µA) na koncentraci *1 - 200* mM a B) závislost proudu (µA) na koncentraci *7 – 200* mM. U obrázku B je zobrazena hodnota regrese a hodnota spolehlivosti. Hodnota směrodatné odchylky byla 0,19 µA a medián se rovnal 0,23)

9.4.2. Vliv inhibitoru na enzym, který je imobilizovaný na MPs

Daný experiment byl prováděn opět autoinjektorem s lineárními pumpami a peristaltickou pumpou MP 3 s průtokem 3,5 otáček/min. pro nepřetržitý průtok elektrolytu. Dané komponenty byly propojeny s celou, ve které byl umístěn jednokanálový biosenzor. Elektromagnet se zdrojem umožňoval dostatečné zachycení syntetizovaných MPs (50 mg/ml), aby se vytvořila vrstva na biosenzoru a také bylo možné pomocí autoinjektoru automatické vypínání z hlediska promývání cely od MPs. Po nainjektování 100 µl MPs byly změřeny dva přídavky 100 µl ATCh – I (20 mM), které byly opět zředěny z hlediska neustálého průtoku elektrolytu. V následujícím postupu byl přidán inhibitor o různých koncentracích. Inhibitor působil na daný povrch 5 min. a potom byly přidány dva přídavky 100 µl ATCh – I po inhibici. V záznamech je zobrazena změna elektrického proudu na přidaném pesticidu a relativní inhibice na přidaném pesticidu. Z výsledků je patrné, že se zvyšujícím se množstvím pesticidu, dochází k silnějšímu útlumu odezvy signálu. Z kinetického hlediska se systém choval tak, jako by bylo přítomno menší množství enzymu, neboť část je ho inaktivována vazbou inhibitoru a hodnota Michaelisovy konstanty by neměla být tímto typem inhibice ovlivněna, byla však snížena hodnota limitní rychlosti. Na svislé ose y jsou vyneseny hodnoty elektrického proudu (napětí bylo nastaveno konstantní 300 mV), které byly zaznamenány po jednotlivých přídavcích inhibitoru, které jsou uvedeny na ose x. Z vykreslených grafů si lze všimnout, že při koncentracích 0,01 a 0,1 µg/ml pesticidu docházelo jen k velmi nepatrnému ovlivnění povrchu MPs. Z toho lze usuzovat, že hranice, při které je danou inhibici ještě možné sledovat je stanovena na 0,3 µg/ml. Automatický postup umožnil získat mnohem přesnější odezvy signálu a závislost změny elektrického signálu na koncentraci lineárně roste. U manuálního postupu byly nepřesnosti způsobeny lidským faktorem. U relativní inhibice automatizovaného sytému daný výsledek také lineárně roste oproti manuálnímu postupu kde při 3 µg/ml a 30 µg/ml došlo jen k nepatrné chybě způsobené buď lidskou chybou nebo neobvyklou reakcí a povrchu MPs.



Obrázek 34: *Závislost změny el. proudu a relativní inhibice na koncentraci pesticidu.* (Syntetizované MPs (50 mg/ml) o objemu 100 µl. ATCh – I (20 mM) bylo jej 100 µl, ale byl ještě během průtoku zředěn. Závislost proudu (µA) na koncentraci pesticidu (*0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 a 30 µl*). Druhá závislost relativní inhibice (µA) na koncentraci pesticidu (*0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 a 30 µl*). Hodnota směrodatné odchylky byla 0,12 µA a medián se rovnal 0,096)

10. Závěr a souhrn

Diplomová práce je zaměřena především na vytvoření enzymového biosenzoru za přítomnosti MPs, na které je imobilizován enzym. Pomocí autoinjektoru a MPs lze provádět měření opakovaně, bez poškození senzoru a plně automaticky. Vyjdeme-li z teoretických i praktických poznatků, je jistě nejvýhodnější provádět detekci pomocí amperometrie. Její nespornou výhodou, oproti ostatním metodám, je dynamičnost a schopnost měřit vysoké koncentrace analytu. Tato práce byla zaměřena na vytvoření zcela unikátního postupu prostřednictvím komerčně dostupných a syntetizovaných MPs částic. Vzhledem k faktu, že podmínky pro tento postup nebyly přesně definovány, protože nebylo známé chování MPs za přítomnosti enzymu, bylo nutné se zaměřit na optimalizaci podmínek. Práce je zaměřena na vytvoření a optimalizaci nového postupu, který je automatizovatelný. Nejdůležitější podmínky, které hrají roli při vytvoření daného postupu pomocí MPs jsou a) množství MPs, které bylo podle získaných výsledků u MPs (50 mg/ml) stanoveno na 100 µl a u MPs (6 mg/ml) bylo stanoveno na 200 µl; b) množství substrátu 200 mM, což podle provedených experimentů bylo stanoveno na 100 µl, což je v tomto případě 5 mM roztok substrátu; c) poloha cely a rychlost průtočného systému, kde poloha cely by měla být umístěna se shora a rychlost průtočného systému by měl být u pumpy 15 nebo 3,5 otáček/min. u druhé pumpy MP 3 a d) nastavení napětí a el. proudu pro záchytný elektromagnet, což bylo stanoveno na 2 V a 1,16 A. Bylo také studováno působení inhibitoru na MPs, na které je imobilizován enzym za využití průtočného systému. Po analýze získaných dat bylo zjištěno, že se se zvyšující se koncentrací inhibitoru dochází k většímu potlačení odezvy signálu. U modifikovaných MPs (50 mg/ml) bylo možné sledovat inhibici ještě při 0,1 µg/ml a u syntetizovaných MPs (6 mg/ml) bylo možné sledovat dostatečnou inhibici při 1 µg/ml. V této práci se porovnávaly dva druhy MPs. V závislosti na získaných výsledcích, lze říci, že modifikované i syntetizované MPs fungovaly shodně. Potom se vytvořil automatický postup a program pro vytvoření biosenzoru s MPs, na které byl imobilizován enzym. Také se vytvořil program a automatický postup pro vliv pesticidu na enzym. Byly vytvořeny kalibrační křivky, které byly vyhodnoceny, a podle dostupných výsledků se potvrdila domněnka, že účinnost automatického postupu jak u vlivu ATCh – I na MPs, tak i vlivu pesticidu na enzym bude větší než u manuálního postupu. Automatizovaný postup zlepšil danou účinnost o 30 %. MPs ve spojení autoinjektoru s lineárními pumpami a biosenzorem umístěným v cele jsou vhodné pro daná měření, jak naznačují výsledky, které jsou popsány v diplomové práci výše.

Magnetické částice umožňují tedy jednoduché obnovení aktivity u enzymů. Automatizovanou metodu měření aktivity AChE v průtočném systému by bylo možné použít k určování, jestli se hodnota pesticidu ve výrobcích shoduje s uvedenou hodnotou nebo ne či zda nebyl překročen limit daný legislativními předpisy. Kromě automatizace analýzy má použitá metoda výhodu v kontinuálním zaznamenávání detekovaného signálu a v použití imobilizovaného enzymu, což zaručuje správný výsledek analýzy. Náhodné chyby a nepřesnosti mohly být způsobeny ručním zpracováváním naměřených experimentálních dat. Na příkladu cholinesterasy bylo demonstrováno, že daný postup je možné velmi dobře uplatnit pro měření enzymových aktivit a mohou být levnější. Jediné zlepšení, které by bylo potřeba udělat, je použít dostatečně široké teflonové hadičky, aby nedocházelo k ucpávání při přetlaku v systému a následnému vytékání pufru ve spojích hadiček nebo před celou.

11. Seznam zkratek

MPs	magnetické částice
AChE	acetylcholinesterasa
BChE	butyrylcholinesterasa
E	enzym
S	substrát
P	produkt
AX	substrát acetylcholin
EH.AX	komplex enzymu a substrátu
EA	acetylovaný enzym
El. proud	elektrický proud

Seznam použité literatury

[1] Petr. *Microsoft Word - enzymy.doc* [online]. 24.4.2008 [cit. 2011-10-30]. Enzymy. Dostupné z WWW: <http://www.gvi.cz/files/chemie/enzymy.pdf>.

[2] DOSTÁL, J., PAULOVÁ H., SLANINA J., TÁBORSKÁ E., *Biochemie pro bakaláře*. 1.dotisk 1.vydání. Brně : Masarykova univerzita, 2005. 173 s.

[3] TARABA, J., *Jantaraba.wz.cz* [online]. 21.11.2009 [cit. 2011-10-28]. Enzymy. Dostupné z WWW: <http://www.jantaraba.wz.cz/download/Bioch_enzymy.pdf>.

[4] CHAPLIN, M., *Lsbu.ac.uk* [online]. 20.12.2004 [cit. 2011-12-01]. Enzyme Inhibition. Dostupné z WWW: <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/inhibition.html>.

[5] THOMPSON, A., *Getyournotes.blogspot* [online]. 1.6.2011 [cit. 2011-11-17]. Competitive vs Non-Competitive Inhibition ~ Science Decoder. Dostupné z WWW: <http://getyournotes.blogspot.com/2011/06/competitive-vs-non-competitive.html>.

[6] R. HORN, J.; K. SHOICHEN, B., Allosteric Inhibition Through Core Disruption. *JMB* [online]. 2004, 336, 10, [cit. 2011-11-11]. Dostupný z WWW: <http://shoichetlab.compbio.ucsf.edu/publications/horn_published.pdf>. ISSN 1283–1291.

[7] RECHNITZ, G. A., *Electroanalysis* [online]. Honolulu : U.S.A, 9.3.1991 [cit. 2011-11-24]. Dostupné z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.1140030202/abstract>.

[8] SKLÁDAL, P., *Biosensory* [online]. Brno: PřF MU, 1999 [cit. 2011-11-23]. Dostupné z WWW: <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>.

[9] HUBÁLEK, J.; KÍZEK, R.; KLOSOVÁ, K., *Chemosenzory a biosenzory, Šablona elektronického učebního textu* [online]. Brno : VUT FEKT, 29.9.2009 [cit. 2011-11-6]. Dostupné z WWW: <https://www.vutbr.cz/www_base/priloha.php?dpid=22040>.

[10] KISSINGER, P. T., Biosensors - a perspective. *Biosensors and Bioelectronics*. 9.8.2004, 20, s. 2512-2516.

[11] HUSÁK, M., Biosenzory. In *10. Biosenzory* [online]. Praha : ČVUT FEL, 9.1.2009 [cit. 2011-11-8]. Dostupné z WWW: <http://www.micro.feld.cvut.cz/home/X34SES/prednasky/>.

[12] HOMOLA, J., - [online]. Praha : 30.6.2011 [cit. 2011-10-24]. Jiří Homola vyvíjí nové biosenzory. Dostupné z WWW: <http://www.avcr.cz/miranda2/export/sitesavcr/data.avcr.cz/sys/galerie-download/jiri_homola.pdf>.

[13] WANG, J., Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* . 29.6.2009, 21, s. 1887-1892.

[14] KÍZEK, R., VACEK J., TRNKOVÁ L., KLEJDUS B., KUBÁŇ V., Elektrochemické biosenzory v analýze zemědělských produktů a vzorků životního prostředí. *Chemické listy*. 2003, 97, s. 1003 - 1006.

[15] TKÁČ, J.; ŠVITEL, J.; ŠTURDÍK, E., Biosenzory na stanovenie sacharidov. *Chemické listy*. 1999, 93, s. 563 - 569.

[16] D´ORAZIO, P., Biosensors in clinical chemistry. *Biosensors and Bioelectronics* . 2003, 334, s. 41 - 69.

[17] POHANKA, M.; SKLÁDAL, P., Electrochemical biosensors – principles and applications. *Journal of APPLIED BIOMEDICINE*. 2008, 6, s. 57 - 64. ISSN 1214-0287.

[18] KOTLÍN, R.; DYR, J. E., Vybrané metody modifikace povrchů biosenzorů pro imobilizaci proteinů. *Chemické listy*. 2006, 100, s. 178 - 183.

[19] SMILJANIC, T., *Biosensors*. Indie : -, 2010. 301 s. ISBN 978-953-7619-99-2.

[20] SIROKAZ., *Cviceni4* [online]. 18.3.2008 [cit. 2011-11-15]. Cvičení 4. Dostupné z WWW: <http://vfu-www.vfu.cz/fvhe/toxikologie/web/soubory/cviceni/Cviceni4.pdf>.

[21] SKLÁDAL, P., Biosensors based on cholinesterase for detection of pesticides. *Food_Technol-Biotechnol*. 1996, 34, s. 43 - 49. ISSN 1330-9862.

[22] Science [online]. 1978 [cit. 2011-11-29]. *Magnetotactic bacteria*. Dostupné z WWW: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/203/4387/1355>.

[23] OBATA, K., TAJIMA H., YOHDA M. S., MATSUNAGA T., Recent developments in laboratory automation using magnetic particles for genome analysis : *Pharmacogenomics*. Si. 2005, 3, 5, s. 697-708.

[24] Chemicell [online]. - [cit. 2011-11-26]. *Biomagnetic Separation*.

[25] STOLNIK, S., ILLUM L., DAVIS S. S., Long circulating microparticulate drug carriers : *Advanced Drug Delivery Reviews*. Si. 1995, 16, 2-3, s. 195-214.

[26] RISHTON, S. A., LU Y., ALTMAN R. A., MARLEY A. C., Magnetic tunnel junctions fabricated at tenth-micron dimensions by electron beam lithography. Science. 1996, -, s. 249-252.

[27] KANG, Y .S., RISBUD S., RABOLT J. F., STROEVE P., *Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and gamma-Fe_2O_3 particles* : Chemistry of Materials. Science. 1996, 8, 9, s. 2209-&.

[28] ZHANG, H. R.; MEYERHOFF, M.E., *Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: Enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance* : Analytical Chemistry. Si. 2006, 78, 2, s. 609-616.

[29] GUPTA, A. K.; GUPTA, M., *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials. Si. 2005, 26, 18, s. 3995-4021.

[30] STANCIU, L., WON Y-H., GANESANA M., ANDREESCU S., Magnetic Particle-Based Hybrid Platforms for Bioanalytical Sensors . *Sensors*. 2009, 9, s. 2976 - 2999. ISSN 1424-8220.

[31] JAFFREZIC-RENAULT, N., MARTELET C., CHEVOLOT Y., CLOAREC J-P., Biosensors and Bio-Bar Code Assays Based on Biofunctionalized Magnetic Microbeads. *Sensors*. 2007, 7, s. 589 - 614. ISSN 1424-8220.

[32] ŠAFAŘÍK, I.; ŠAFAŘÍKOVÁ, M., Magnetic Nanoparticles and Biosciences. *Monatshefte für Chemie*. 2002, 133, s. 737 - 759.

[33] PEČOVÁ, M., POLÁKOVÁ K., ČUDA J., ZAJONCOVÁ L., Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, 105, s. 524 - 530.

[34] HOFFMAN, J.; URBANOVÁ, M., *Fyzika I*. Praha : VŠCHT PRAHA, 2005. 327 s.

[35] KATZ, E.; WILLNER, I., Enhancement of Bioelectrocatalytic Processes by the Rotation of Mediator-Functionalized Magnetic Particles on Electrode Surfaces: Comparison with a Rotating Disk Electrode .*Electroanalysis*. 2005, 17, s. 1616 - 1626.

[36] *Chemie v potravinách* [online]. 2011 [cit. 2011-11-27]. Pesticidy - pomocníci a zabijáci. Dostupné z WWW: <www.posumavi.jz.cz/sdruzenispol/spolecne/download_soubor.php?ids=1217>.

[37] SKLÁDAL, P., NUNES G. S., YAMANAKA H., RIBEIRO M. L., Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase based-biosensors. *Electroanalysis*. 1997, 7, s. 1083 - 1087.

[38] ISTAMBOULIE, G., ANDREESCU S., NOGUER T., MARTY J-L., Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics* . 2007, 23, s. 506 - 512.

[39] *Gilson 231* [online]. 2011 [cit. 2011-12-05]. LabWrench. Dostupné z WWW: <http://www.labwrench.com/?equipment.view/equipmentNo/1301/Gilson/231/>.