



Biosenzory jako nástroj pro monitorování bakteriální kontaminace pitné vody v reálném čase

Miroslav Ledvina

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

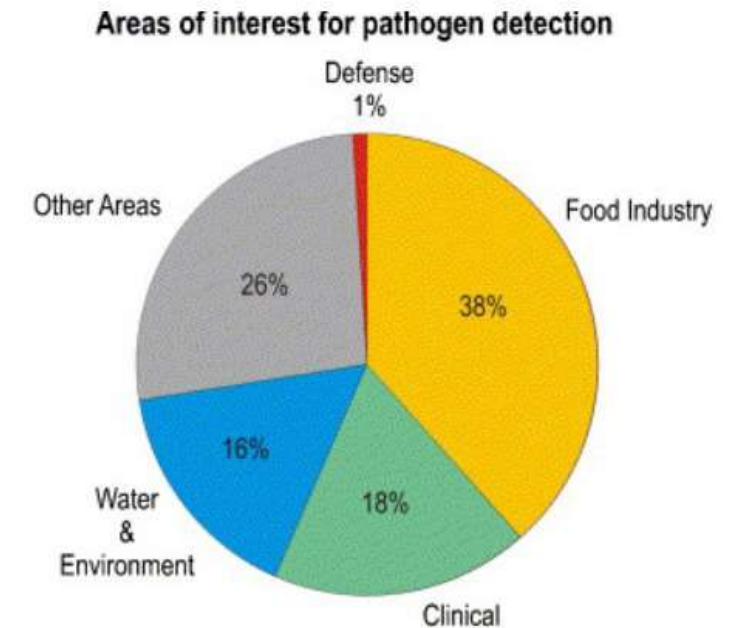
Praktický potenciál biosenzorů

Biosenzory jsou schopny oproti klasickým stanovením poskytnout požadovanou informaci s vysokou detekční citlivostí rychle a v reálném čase.

Hlavní aplikační oblasti biosenzorů:

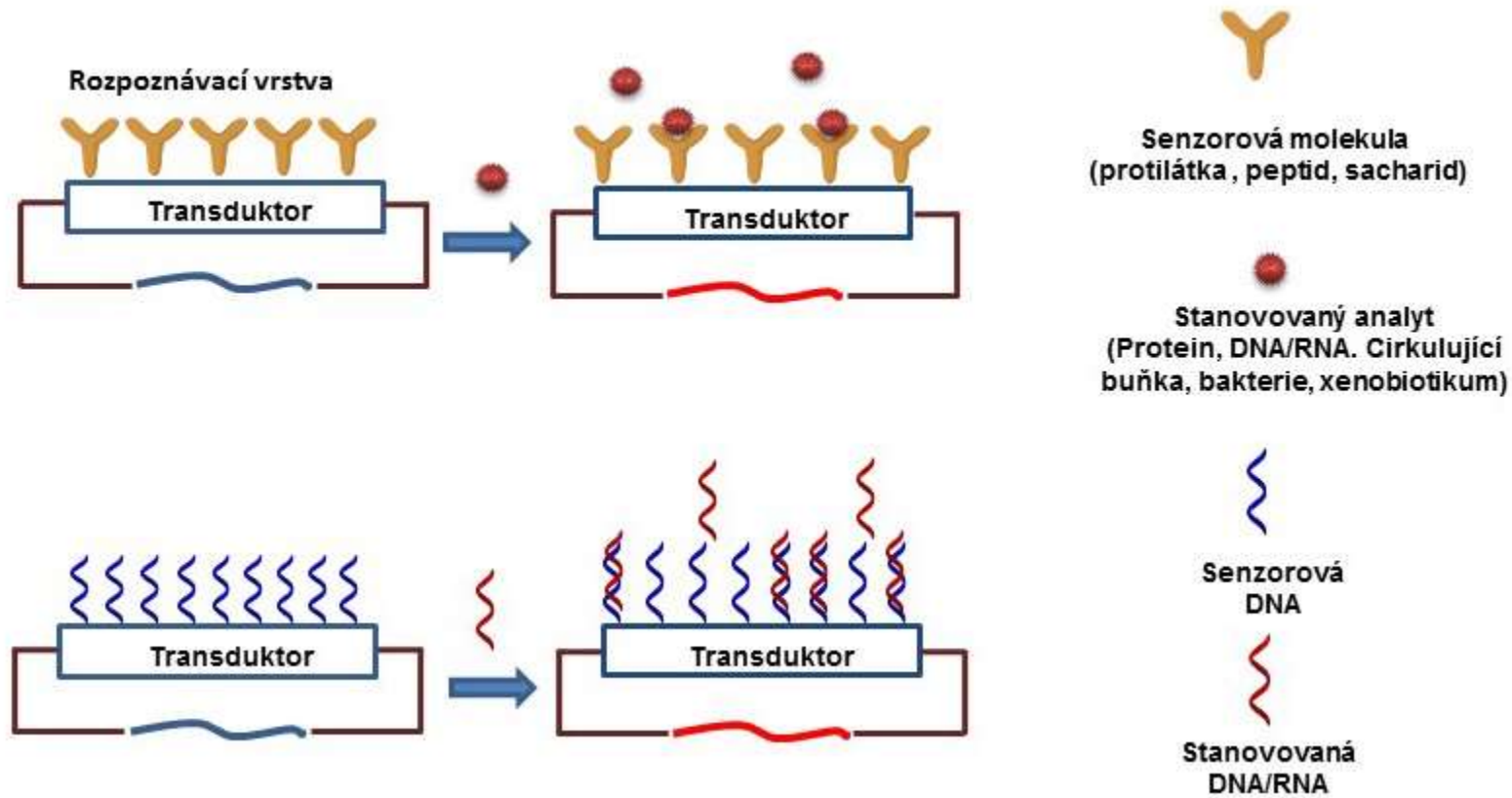
- **Potravinářský průmysl:** mikrobiální bezpečnosti potravin, rezidua pesticidů, testování geneticky modifikovaných plodin.
- **Zdravotnictví:** včasná diagnostiky patogenního procesu, možnost průběžně monitorovat terapeutický zásah.
- **Životní prostředí a vodní zdroje:** monitorování koncentrace xenobiotik (syntetických molekul a jejich metabolitů) v reálném čase.
- **Vodárenství:** monitoring bakteriální kontaminace ve vodárenských distribučních sítích.

Klasické mikrobiologické analýzy vzorků pitných vod jsou založeny na kultivacích, které jsou schopny poskytnout adekvátní výsledek v časovém horizontu 2-3 dnů což může být v případě havárie pozdě.



Hlavní aplikační oblast biosenzorů pro detekci patogenů

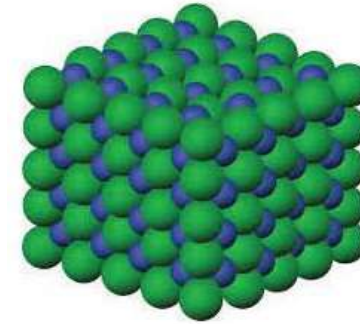
Princip biosenzoru?



Optické biosenzory

Foto-krystalické biosenzory

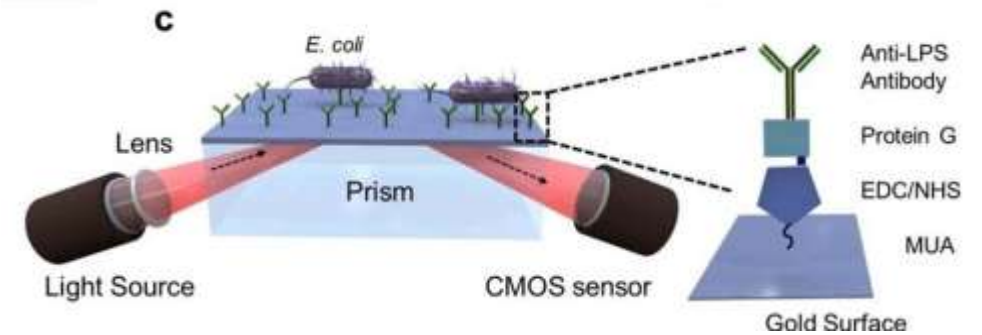
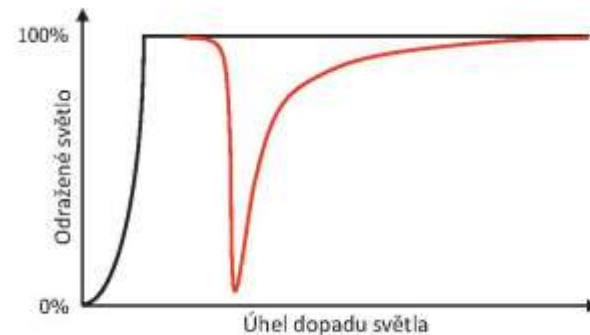
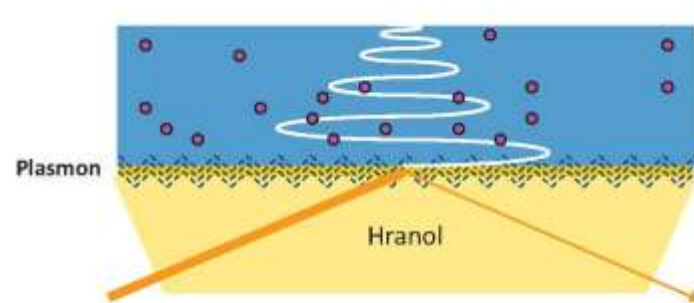
- Transduktorem jsou fotonické krystaly (též nazývané fotonické pásmové propusti -zamezují průchod fotonů určitých vlnových délek)
- Fotonické krystaly transformují vazebnou událost jako změnu fluorescence



Znázornění 3D periodického fotonického krystalu

Povrchová plasmonová rezonance (SPR)

- Optický jev založený interakcí vodivostních elektronů kovu (zlata) s dopadajícím světelným zářením a vzniku rezonance mezi zářením a povrchovými elektrony kovu (vznik tzv. povrchových plasmonů na rozhraní kov/dielektrikum).

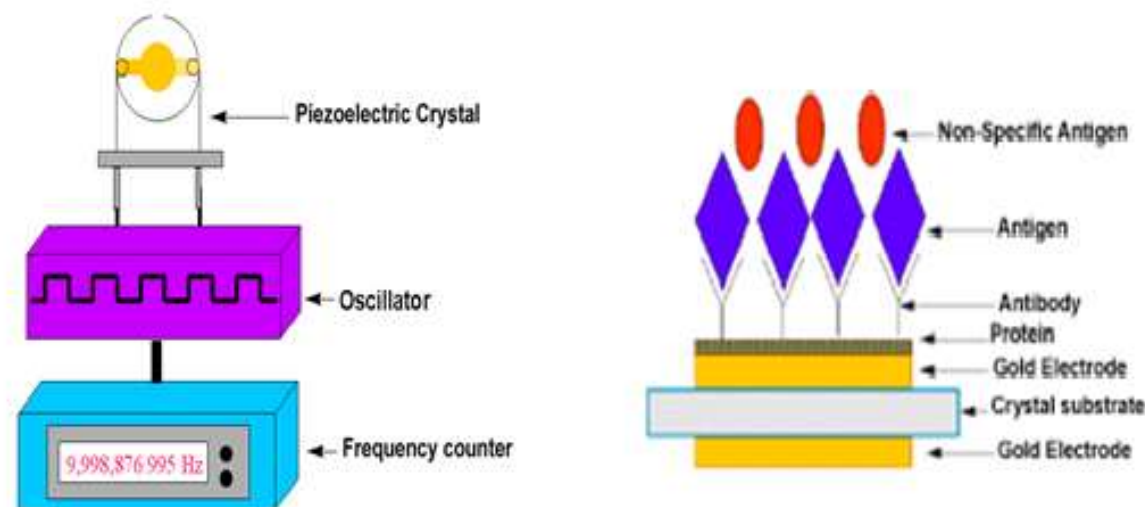


Převzato z: Tokel, O. et al. Portable Microfluidic Integrated Plasmonic Platform for Pathogen Detection. *Scientific Reports* 2015, 5, 9.

- Úhel kdy dochází k rezonanci je závislý na indexu lomu média v blízkosti rozhraní
- Při změně složení média dochází ke změně úhlu dopadu světla při kterém dochází k rezonanci

Piezoelektrické biosenzory

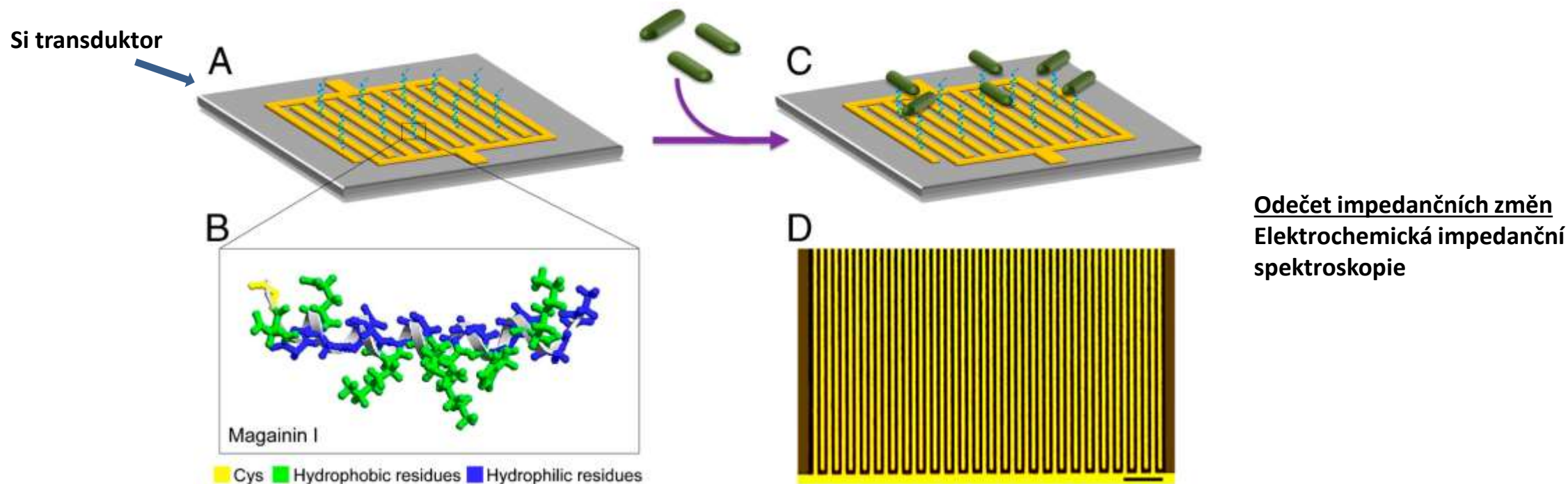
Piezoelektrické senzory jsou založeny na sledování změn rezonanční frekvence na křemenném krystalu indukované hmotnostní změnou na jeho povrchu v důsledku vazebné události na povrch senzoru ukotvené sensorové molekuly s cílovým analytem





Elektrochemické biosenzory

Impedanční biosenzor pro detekci patogenní bakterie *E. Colli* založený na polovodivém křemíkovém transduktoru a antibakteriálním peptidu Namganinu jako sensorové molekule



Převzato z: Mannoor, M. S. et al. Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107 (45), 19207-19212.



Technické limity omezující širší zavedení biosenzorů do praxe

- **Pro praktické použití biosenzorů** je klíčovou otázkou stabilita rozpoznávací složky, tj. sensorových molekul imobilizovaných na povrchu transduktoru - zejména v případě proteinů.
- **Stabilita rekogniční složky** je podmíněna charakterem materiálu transduktoru a vhodnými chemickými postupy pro připojení („roubování“, grafting) biomolekul na jeho povrch
- **Nejčastěji užívanými transduktory pro konstrukci biosenzorů** jsou křemík a zlato jejichž povrch není zcela inertní → denaturace navázaných proteinů v důsledku jejich interakce s povrchem
- **Řešení tohoto problému**
Transduktory založené na zcela inertní a biokompatibilním nanokrystalickém diamantu

Proč syntetický nanokristalický diamant?

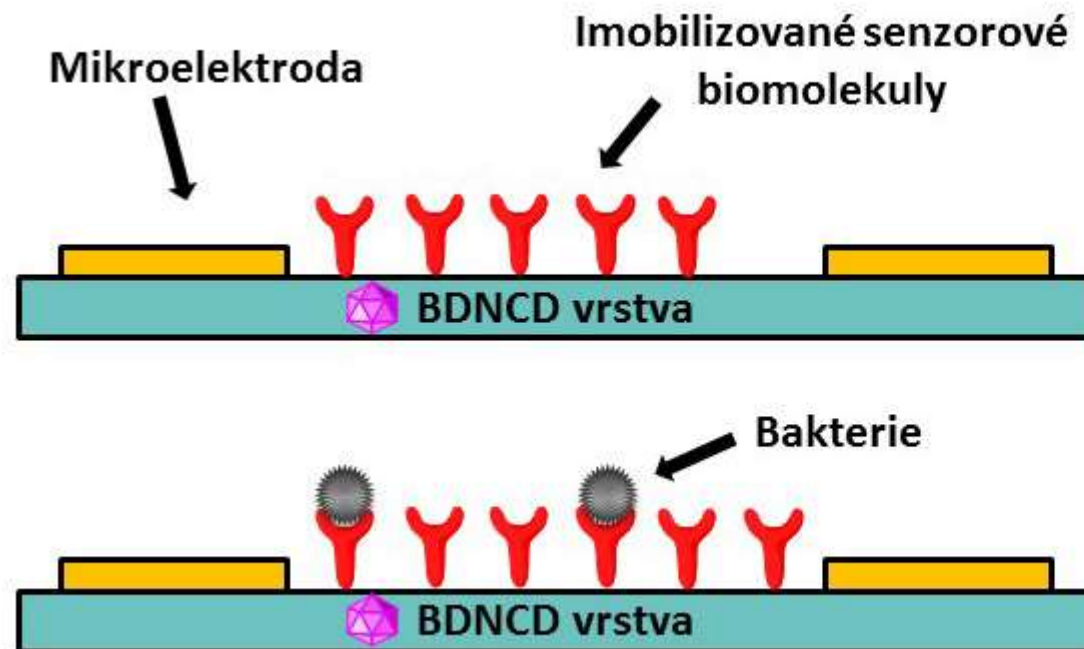


Diamant Orlov neboli Velký Mogul ,
pochází z Indie a byl darován
knížetem Orlovem carevně Kateřině

- Je zcela inertní a biokompatibilní
- Jeho inertní struktura umožňuje inkorporaci defektů jako jsou luminiscenční N-V centra která produkují stabilní časově neomezenou luminiscenci ve srovnání s jinak užívanými kvantovými tečkami (QDs) a luminiscenčními barvičkami.
- Luminiscenci lze navíc modulovat změnami elektrického pole probíhajícími blízko jeho povrch což umožňuje monitorovat blízko povrchu probíhající chemické a biologické interakce
- Při přípravě nanokristalického diamantu chemickou depozicí z plynné, tj. fáze tzv. CVD (chemical vapor deposition) technikou jej lze dopovat některými prvky a cíleně tak modulovat jeho elektrické nebo optické parametry.

Projekt MPO-TRIO: Biosenzory pro detekci bakteriální kontaminace pitné vody

Navržený biosenzor je založen bórem dopovaně nanokristalické diamantové (BDNCD) vrstvě jako transduktoru

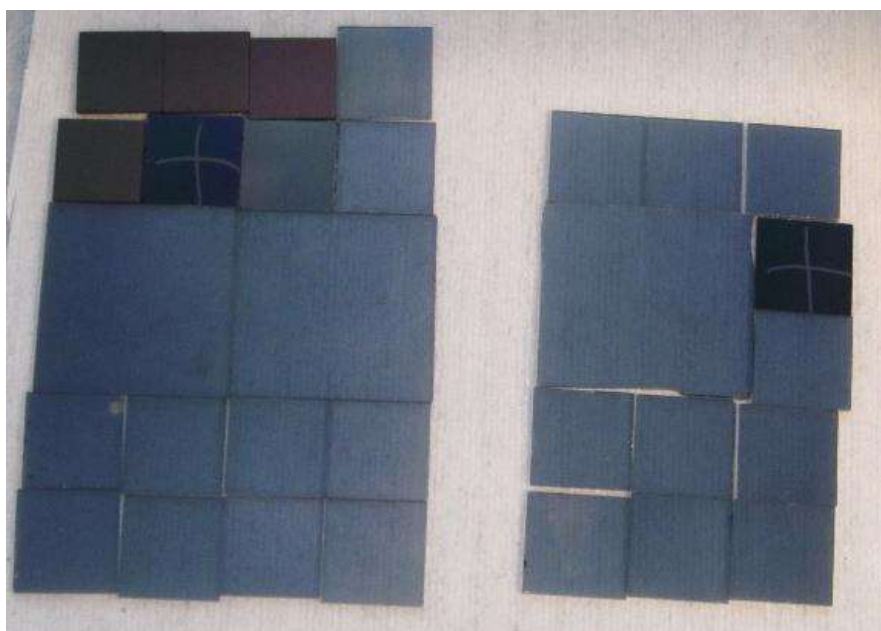


- Monoklonální scFv protilátka
- Bakteriálně specifický peptid
- Sacharid s afinitou k bakteriálnímu lektinu
- DNA oligonukleotid

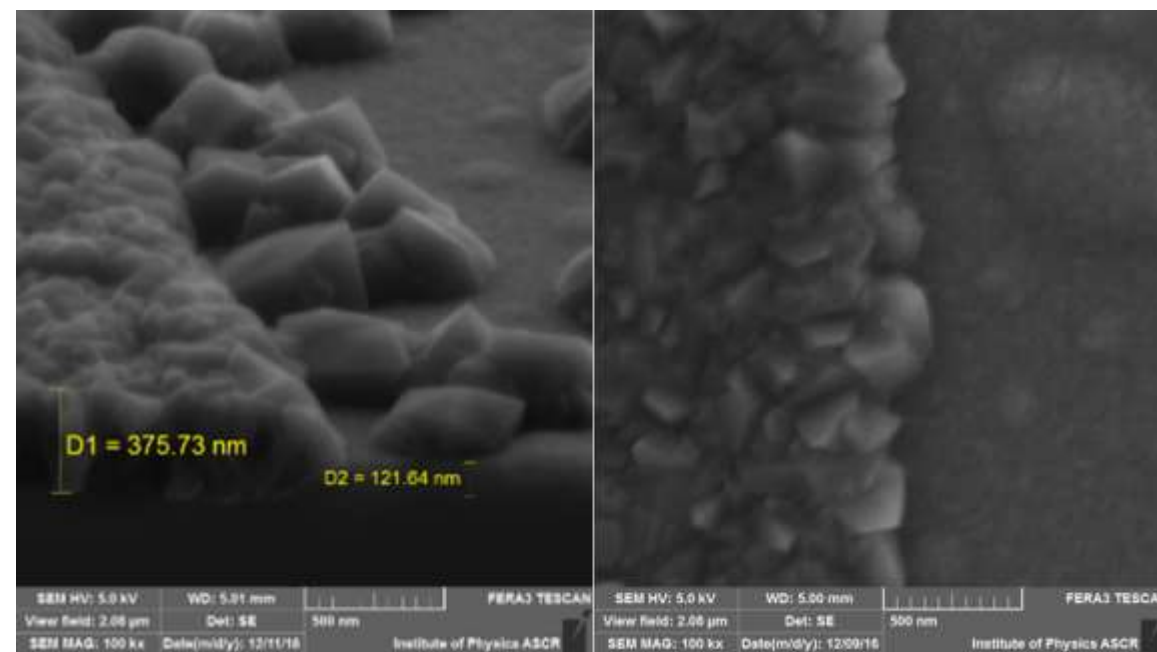
Řešitelé projektu jsou: společnost APIGENEX s.r.o., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fyzikální ústav AV ČR a Ústav molekulární genetiky AV ČR

Ukázka BDNCD vrstev připravených CVD technikou na křemíkovém a skleněném substrátu

Na FZÚ vypracované depoziční podmínky pro přípravu BDNCD vrstev založené na mikrovlnné depozici z plynné fáze umožňují přípravu vrstev v dostatečně velkých plochách.



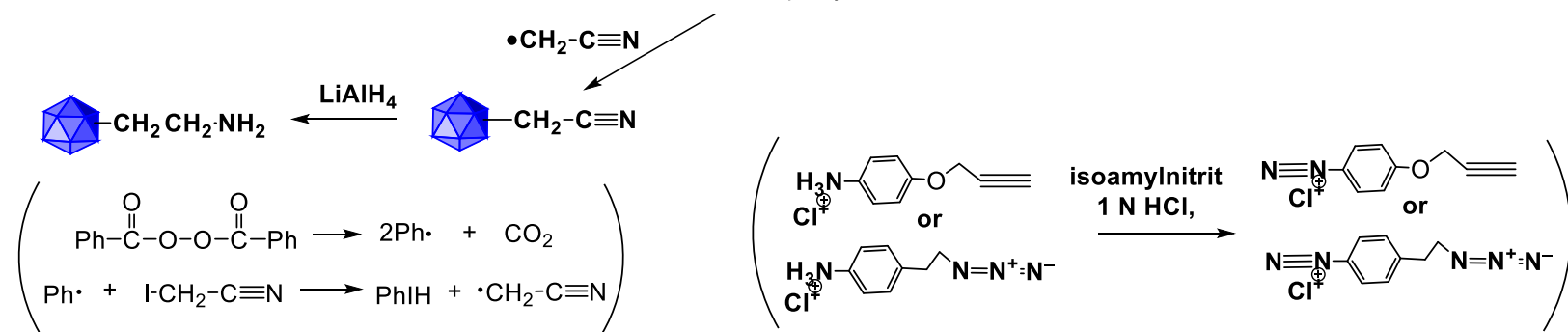
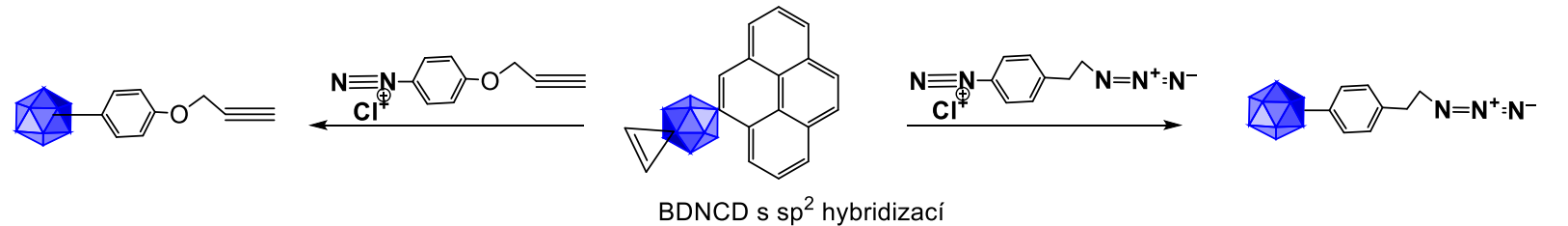
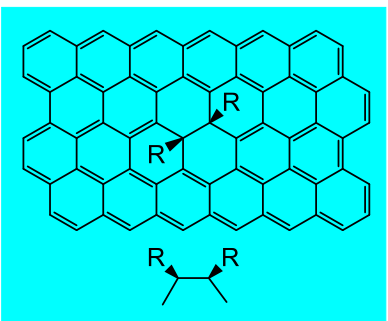
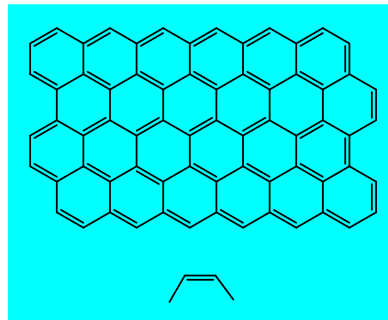
Obr. 1 Křemíkové a skleněné substráty (1 cm^2) po první depozici. Semi-průhledné vzorky připravené na skle mají typickou modrou barvu borem dopovaného diamantu.



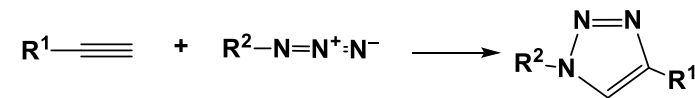
Obr. 2: SEM průřez a vrchní pohled na BDNCD vrstvu s fasetovými diamantovými zrny

Primární chemická funkcionlizace BDNCD vrstvy

Nezbytná podmínka pro úspěšné navázání senzorových molekul



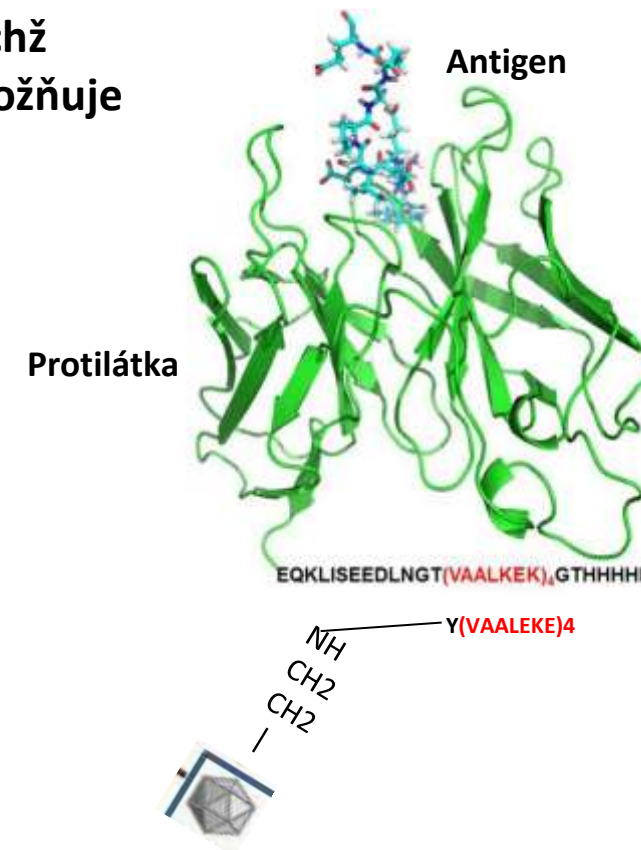
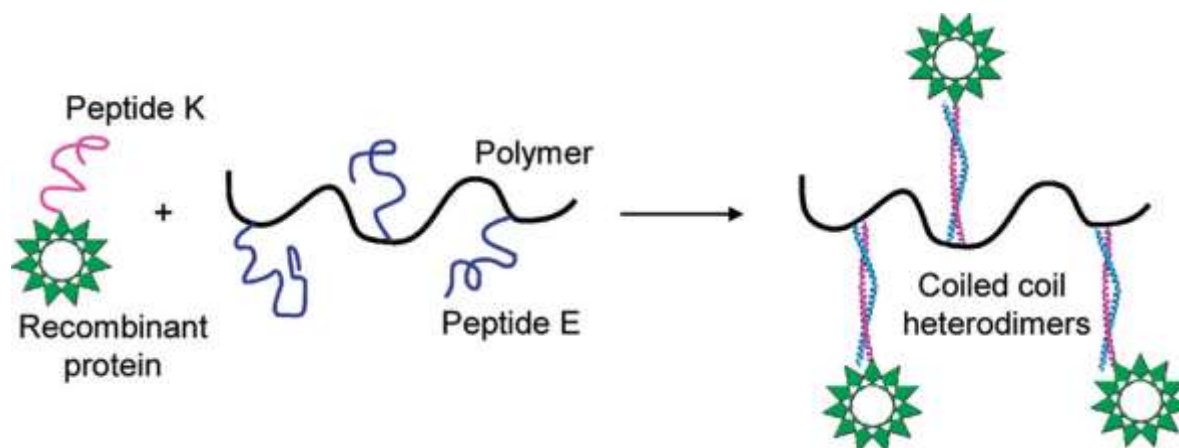
"Click chemistry"



Předností „Click chemistry“ je ortogonalita ve vztahu k dalším funkční skupinám přítomným v komplexní navazované molekule

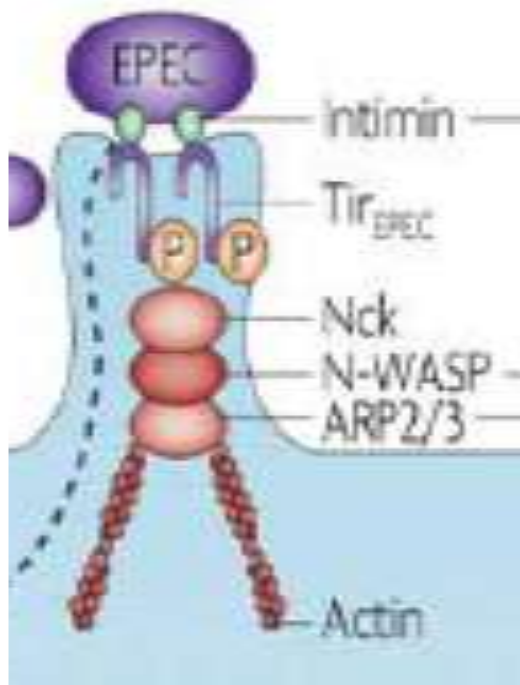
Regioselektivní „Coiled Coil“ ligace rekombinantních monoklonálních protilátek v scFv formátu

Tato technika založená na „zacívkování“ dvou komplementárních peptidů z nichž jeden nese rekombinantní protein a druhý je kovalentně navázán na nosič umožňuje navázat protilátku aniž došlo negativnímu ovlivnění jejího vazebného centra



Pechar, M. et al. Coiled Coil Peptides as Universal Linkers for the Attachment of Recombinant Proteins to Polymer Therapeutics. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (10), 3645-3655.

Intimin jako cílový markér pro detekci patogenní *E.coli*

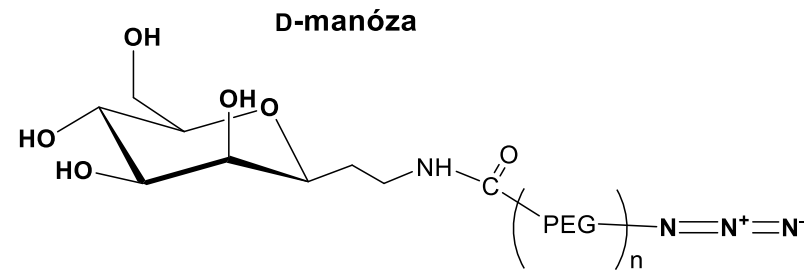
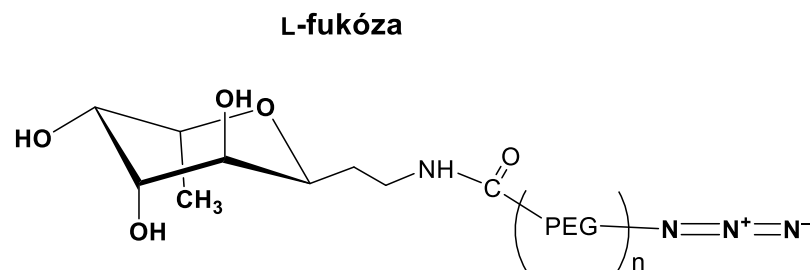


- Intimin je protein prezentovaný na vnější membráně *E. coli* a je významným a její faktorem virulence
- Dalším potenciálním cílovým markérem je translokovaný receptor intiminu (TIR) .
- Vhodné sensorové molekuly: protilátky proti intiminu a TIR, nebo vazebná doména TIR.

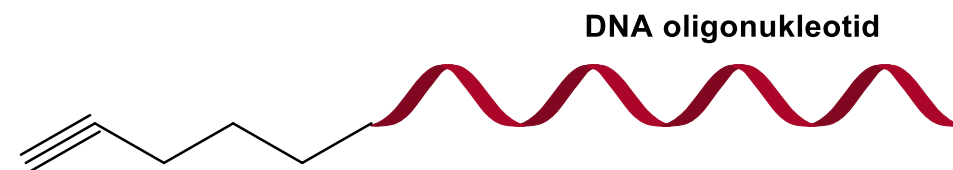
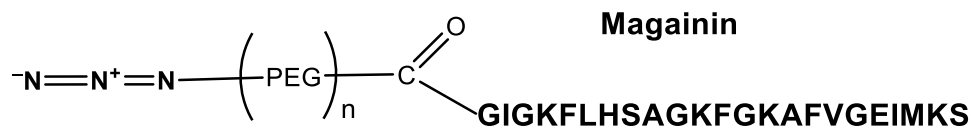
Krystalová struktura C-terminálního fragmentu intiminu v komplexu s TIR

Další senzorné molekuly s vazebnou afinitou k *E.coli*

Sacharidy s vazebnou afinitou k bakteriálním lektinům ve formátu proti enzymatické hydrolyze stabilních C-glykosidů



Antibakteriální peptid s vazebnou afinitou k *E.coli*





Děkuji z pozornost