

Biosensory

Aleksandra Kłos-Witkowska

Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Katedra Elektrotechniki i Automatyki, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała

Streszczenie: W prezentowanej pracy została opisana budowa i zasada działania biosensorów. Podano przykłady analitów oraz substancji biologicznych stosowanych w warstwach receptorowych. Przedstawiono zastosowanie biosensorów w medycynie, przemyśle spożywczym, ochronie środowiska, przemyśle obronnym oraz w badaniach biofarmaceutycznych. Opisano trendy i perspektywy rozwoju tego typu urządzeń.

Słowa kluczowe: biosensor, sensor, analit, warstwa receptorowa, warstwa przetwornikowa

1. Wprowadzenie

Rozwój technologiczny i cywilizacyjny, zwiększające się wymagania dotyczące ochrony środowiska oraz konieczność stawiania szybkiej, precyzyjnej i trafnej diagnozy, przyczyniły się do intensyfikacji prac badawczych i konstruktorskich nad nową generacją czujników zwanych biosensorami. Urządzenie te łączą ze sobą czułość i selektywność klasycznych metod analizy z bogatym spektrum rozwiązań konstrukcyjnych dostosowanych do określonego przeznaczenia.

Terminem biosensor określa się rodzaj czujnika chemicznego, który zawiera w swej budowie element biologiczny.

Według definicji przyjętej przez IUPAC (*International Union of Pure Applied Chemistry*), biosensor jest samowystarczalnym, zintegrowanym urządzeniem, które dostarcza specyficznych ilościowych lub półilościowych informacji analitycznych za pomocą składników umieszczonych w bezpośrednim kontakcie z elementem przetwarzającym [1].

Biosensory ze względu na szeroki wachlarz zastosowań mogą być stosowane w ochronie środowiska do detekcji szkodliwych substancji takich jak fenole [2], metale ciężkie [3], gazy (do określenia toksyczności atmosfery) [4], pestycydy [5]. Znajdują również zastosowanie w przemyśle, wszędzie tam, gdzie potrzebny jest monitoring reakcji chemicznych, a także w medycynie, gdzie za pomocą biosensorów wykrywane są markery chorobotwórcze, np. markery choroby nowotworowej [6].

Pierwsze biosensory opracowano w drugiej połowie XX wieku (1956 r.), kiedy to C. Clark Jr. wynalazł pierwszy sensor – elektrodę tlenową. On też opisał pierwszy sensor enzymatyczny dla glukozy [7]. Z biegiem czasu pojawił się pierwszy sensor amperometryczny (1962 r.), a w ślad za nim (1969 r.), dzięki pracom Guilbauta i Montalvo, pierwszy sensor potencjometryczny. W latach 70. zaczęto koncentrować wysiłki nad komercjalizacją urządzeń oraz wprowadzaniu ich na rynek. Ogromny sukces ekonomiczny biosensorów glukozy przyczynił się do zwiększe-

niego zainteresowania tematem biosensorów wśród firm farmaceutycznych oraz zainwestowania ogromnych środków finansowych w badania i rozwój.

Obecnie rynek biosensorów rozwija się bardzo dynamicznie. Rosną możliwości aplikacyjne i konstruktorskie. Według opublikowanego przez *Transparency Market Research* raportu szacuje się, że jego wielkość cały czas rośnie i osiągnie w 2018 r. wartość 18,9 biliona USD [8]. O ogromnym potencjale biosensorów świadczy również wzrastająca liczba publikacji naukowych, która na podstawie naukowej bazy danych Web of Science, na przestrzeni ostatnich 20 lat, wzrosła niemalże 10-krotnie.

Biosensory to urządzenia, w konstrukcji których wykorzystywane są najnowsze osiągnięcia nauki i techniki z wielu dziedzin takich jak: chemia, fizyka, biologia, elektronika, inżynieria. Dlatego też, coraz częściej zespoły badawcze i konstruktorskie skupiają fachowców o różnorodnych polach badawczych, ale jednocześnie o wspólnym zainteresowaniu naukowym.

Mimo ogromnego sukcesu, biosensory stanowią w dalszym ciągu duże pole dla konstruktorów i naukowców. Obecnie wysiłki koncentrują się na poprawie parametrów biosensorów, uzyskaniu specjalistycznych, tanich, prostych w obsłudze, niewielkich rozmiarów urządzeń. Jednocześnie dokładnych, dzięki wysokiej selektywności i czułości oraz zdolnych do wielokrotnego użycia.

2. Budowa i zasada działania biosensorów

W skład budowy biosensora wchodzi selektywna część receptorowa oraz część przetwornikowa. Warstwa receptorowa jest najistotniejszym elementem biosensora, decydującym o jego selektywności, czasie odpowiedzi oraz czasie życia [9]. Na jej powierzchni znajdują się receptory (zazwyczaj molekuly biologiczne), które są odpowiedzialne za wychwycenie badanej cząsteczki (analitu). W części przetwornikowej następuje zamiana wyniku biologicznego oddziaływania między molekułami receptora a molekułami badanymi na sygnał elektryczny, chemiczny lub inny.

W dużym uproszczeniu można porównać biosensor składający się z części receptorowej i przetwornikowej do zamka, a cząsteczkę, która podlega detekcji (analit) do klucza. W przypadku odpowiedniego doboru zamka i klucza, czyli zgodności analitu z bioreceptorem, powstaje sygnał charakterystyczny dla zjawiska biologicznego, który jest przetwarzany w części przetwornikowej, a następnie mierzony za pomocą odpowiednich metod w zależności od jego rodzaju [10].

Autor korespondujący:

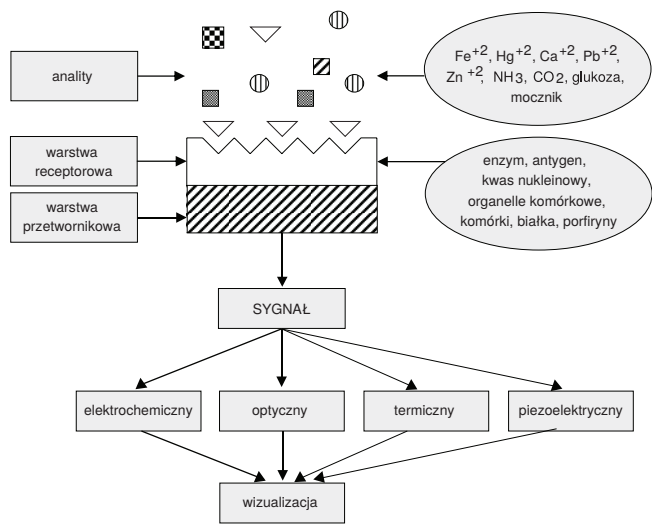
Aleksandra Kłos-Witkowska, awitkowska@ath.bielsko.pl

Artykuł recenzowany

nadesłany 15.06.2015 r., przyjęty do druku 17.08.2015 r.



Zezwala się na korzystanie z artykułu na warunkach licencji Creative Commons Uznanie autorstwa 3.0



Rys. 1. Schemat budowy biosensora wraz z przykładowymi analitami i substancjami biologicznymi w warstwie receptorowej oraz zasada działania bioczuźnika

Fig. 1. Diagram of biosensor with sample analytes and biological substances in receptor layer, operating principle of the biosensor

Anality to składniki wykrywane przez selektywną warstwę receptorową. Mogą nimi być m.in.: Fe^{+2} , Hg^{+2} , Ca^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , NH_3 , CO_2 , glukoza, mocznik [9–12]. Anality dyfundują z medium na powierzchnię biosensora, reagują specyficznie i efektywnie z warstwą receptorową, w której może znajdować się element biologiczny, np. enzym, antygen, kwas nukleinowy, organelle komórkowe, komórki, białka, porfiryny.

W wyniku oddziaływania, po transformacji zjawiska w sygnał w warstwie przetwornikowej, następuje jego detekcja. Sygnał może być termiczny, elektrochemiczny, optyczny, piezoelektryczny. W zależności od natury sygnału dobiera się odpowiednie metody pomiarowe, np. w przypadku sygnału optycznego stosuje się spektrofotometrię wykorzystującą emisję promieniowania [12], spektroskopię UV/Vis [13] bazującą na zjawisku absorpcji, czy też spektrometrię odbiciową [14]. Końcowym etapem jest wizualizacja.

Schemat biosensora oraz zasadę jego działania ilustruje rys. 1.

Zarówno rodzaj przetwornika, jak i rodzaj materiału biologicznego użytego w warstwie receptorowej, są podstawą klasyfikacji biosensorów. Powszechnie klasyfikacja ta obejmuje podział biosensorów ze względu na rodzaj receptora wpływającego na bioselektywność czujnika oraz na rodzaj przetwornika mającego wpływ na czułość biosensora.

Biorąc pod uwagę podział ze względu na rodzaj receptora, a uściślając biologiczny element rozpoznawczy biosensory można podzielić na biosensory bazujące na enzymach, biosensory wykorzystujące wirusy, antyciała, antygeny, proteiny, kwasy nukleinowe.

- Ze względu na sposób generacji sygnału, biosensory można podzielić na:
- biosensory elektrochemiczne, które dzielą się dalej na biosensory potencjometryczne, amperometryczne, kalorymetryczne;
 - biosensory optyczne, które dalej sklasyfikować można ze względu na wykorzystane zjawisko fizyczne i metody detekcji:
 - luminescencyjne,
 - fluorescencyjne,
 - absorpcyjne UV-Vis,
 - biosensory wykorzystujące metodą powierzchniowego rezonansu plazmowego;
 - biosensory piezoelektryczne;
 - biosensory termiczne [37].

3. Zastosowanie biosensorów

Biosensory powszechnie stosowane są w wielu dziedzinach takich jak medycyna, gdzie biosensory wykorzystywane są do monitorowania poziomu glukozy we krwi [15], wykrywania choroby nowotworowej [6, 7, 35] między innymi w celu wykrywania nowotworów płuca, zapalenia wątroby [17], czy też wirusa HIV (ang. *human immunodeficiency virus*) [16]. Prowadzone są również prace nad śledzeniem procesu gojenia się ran [36]. Wykorzystując biosensory piezoelektryczne [32] i fluorescencyjne [34] podejmowano próby detekcji toksyny cholery. W przemyśle spożywczym biosensory stosowane są do wykrywania obecności komponentów alergicznych [18], detekcji patogenów w produktach spożywczych [18, 21], wykrywania pestycydów [18, 20] lub detekcji bakterii [19, 21].

W ochronie środowiska biosensory stosowane są do oceny jakości czystości wody [5], detekcji toksycznych gazów [4] czy też wykrywania jonów metali ciężkich: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} [22]. W przemyśle obronnym biosensory wykorzystywane są w celu wykrywania zagrożeń spowodowanych bronią biologiczną [23] lub detekcji środków bojowych [24]. Przykładem są prace prowadzone przez rząd Stanów Zjednoczonych w ramach walki z terroryzmem, których celem jest wykrywanie toksyny

Tabela 1. Przykłady zastosowań biosensorów w medycynie, przemyśle spożywczym, ochronie środowiska, przemyśle obronnym oraz w badaniach biofarmaceutycznych
Table 1. Examples of biosensors applications in medicine, food industry, environmental protection, defense industry and bio-pharmaceutical research

Dziedziny zastosowania biosensorów	Przykłady zastosowań biosensorów	Bibliografia
Medycyna	monitorowanie poziomu glukozy we krwi	15
	wykrywanie choroby nowotworowej	6, 7, 35
	detekcja zapalenia wątroby	17
	wykrywanie wirusa HIV (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)	16
Przemysł spożywczy	wykrywanie obecności alergicznych komponentów w żywności	18
	detekcja patogenów w produktach spożywczych	18, 21
	wykrywanie pestycydów w jedzeniu	18, 20
	detekcja bakterii w pożywieniu	19, 21
Ochrona środowiska	ocena jakości czystości wody	5
	detekcja toksyczności gazów	4
	wykrywanie jonów metali ciężkich: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}	22
Przemysł obronny	wykrywanie zagrożeń spowodowanych bronią biologiczną	23, 34
	detekcja środków bojowych	24
Badania biofarmaceutyczne	badanie biomolekuł i ich oddziaływań	27
	badania farmakokinetyki i farmakodynamiki nowych leków	25, 26

botulinowej (zwanej jadem kielbasianym) wytwarzanej przez bakterie *Clostridium botulinum* i powoduje paraliż mięśni [34].

Biosensory coraz częściej znajdują również zastosowania w badaniach bio-farmaceutycznych, gdzie wykorzystywane są do badania biomolekuł i ich oddziaływań [27], jak również do badania farmakokinetyki i farmakodynamiki nowych leków [25, 26].

4. Perspektywy

Mimo zwiększającej się liczby badań naukowych oraz postępów konstruktorskich, cały czas istnieje potrzeba doskonalenia istniejących urządzeń, w celu tym samym poprawienia ich parametrów pracy takich jak: selektywność, czułość, powtarzalność oraz niezawodność pomiarów. W tym celu wykorzystywane są najnowsze osiągnięcia techniki oraz nowe technologie. Wśród nich z pewnością można wyróżnić nanotechnologie, które stosuje się w celu poprawy jakości biodekacji oraz możliwości analizy na poziomie molekularnym. Nanotechnologie stanowią ogniwo łączące dwie dziedziny naukowe – naukę o materiałach (na poziomie nanoskali) oraz biochemię. Przykładem wykorzystania nanotechnologii są amperometryczne immunosensory [28, 29].

Wyraźny trend stanowią biosensory, które mogłyby dokonywać jednoczesnej detekcji kilku analitów. Urządzenia te mogłyby być stosowane w ochronie środowiska przy detekcji zanieczyszczeń oraz w medycynie do wykrywania czynników chorobotwórczych. Zastosowanie tego typu biosensorów skracaloby czas detekcji (w porównaniu z czasem wykrywania pojedynczych analitów) oraz minimalizowałoby rozmiar potrzebnej do analizy próbki. Prace nad rozwojem multianalitowych immunosensory prowadzone były między innymi przez Gonzaleza-Martinez [30, 28]. Obecnie powszechnie stosowane są również aptamery pełniące rolę elementów czułych w warstwie bioreceptorowej. Aptamerami mogą być sztuczne oligonukleotydy, fragmenty kwasów nukleinowych, które oznaczają się wysoką selektywnością [37]. Wśród obserwowanych trendów wyjątkowo duży potencjał prezentuje zastosowanie grafenu w biosensorach [7]. Grafen, w porównaniu z innymi nanomateriałami, charakteryzuje się większą przewodnością elektryczną, elastycznością, stabilnością chemiczną i termiczną oraz umożliwia pokrycie nim dużych powierzchni. Zastosowaniom grafenu w konstrukcjach biosensometrycznych poświęca się coraz więcej miejsca [31].

5. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych analiz, biorąc pod uwagę różnorodność zastosowań biosensorów można jasno stwierdzić, że czujniki mające w warstwie receptorowej element biologiczny należą do zagadnień rozwojowych. Mimo bardzo dużej liczby wykonanych w tym zakresie prac, biosensory w dalszym ciągu stanowią ogromne pole badawcze.

Bibliografia

- Thévenot D., Toth K., Durst R., Wilson G., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*, Technical Report, "Biosensors and Bioelectronics", Vol. 16, 1-2/2001, 121-131, DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
- Sulak M.T., Erhan E., Keskinler B., *Amperometric Phenol Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Entrapped PVF and PPy Composite Film Coated GC electrode*, "Applied Biochemistry and Biotechnology", Vol. 160, 3/2010, 856-867, DOI: 10.1007/s12010-009-8534-y.
- Verma N., Singh M., *Biosensors for Heavy Metals*, "Bio-metals", Vol. 18, 2/2005, 121-129, DOI: 10.1007/s10534-004-5787-3.
- Gil G., Mitchell R., Chang S., Gu M., *A biosensor for the detection of gas toxicity using a recombinant bioluminescent bacterium*, "Biosensors and Bioelectronics", Vol. 15, 1-2/2000, 23-30, DOI: 10.1016/S0956-5663(99)00074-3.
- Kołwzan B., *Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody*, "Ochrona Środowiska", Vol. 31, Nr 4/2009, 3-14.
- Tothill I.E., *Biosensors for cancer marker diagnosis*, "Seminars in Cell & Developmental Biology", Vol. 20, 1/2009, 55-62, DOI: 10.1016/j.semcdb.2009.01.015.
- Cynk P., Gawel E., *Zastosowanie biosensorów w diagnostyce choroby nowotworowej*, "Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie", Nr 3, 2012, 373-378.
- Transparency Market Research., *Biosensors Market (Electrochemical, Optical, Piezoelectric & Thermistor) – Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2012–2018*, 2013-06-27, [www.transparencymarketresearch.com/biosensors-market.html].
- Brzózka Z., Wróblewski W., *Sensory chemiczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999.
- Kłos-Witkowska A., *Biosensory proteinowe i ich właściwości fluorescencyjne*, "Pomiary Automatyka Kontrola", Vol. 60, 6/2014, 378-381.
- Kłos-Witkowska A., *Biosensory i sensory fluorescencyjne*, "Pomiary Automatyka Kontrola", Vol. 60, 1/2014, 3-5.
- Bozkurt S., Cavas L., *Can Hg (II) be Determined via Quenching of the Emission of Green Fluorescent Protein from Anemonia sulcata var. smaragdina?*, "Applied Biochemistry and Biotechnology", Vol. 158, 1/2009, 51-58, DOI: 10.1007/s12010-008-8435-5.
- Que X., Tang D., Xia B., Lu X., Tang D., *Gold nanocatalyst-based immunosensing strategy accompanying catalytic reduction of 4-nitrophenol for sensitive monitoring of chloramphenicol residue*, "Analytica Chimica Acta", 830/2014, 42-48, DOI: 10.1016/j.aca.2014.04.051.
- Alvarez S., Li Ch., Chiang C., Shuller I., Sailor M., *A Label-Free Porous Alumina Interferometric Immunosensors*, "ASC Nano", 10/2009, 3301-3307, DOI: 10.1021/nn900825q.
- Pickup J., Hussain F., Evans N., Rolinski O., Birch D., *Fluorescence-based glucose sensors*, "Biosensors and Bioelectronics", Vol. 20, 12/2005, 2555-2565.
- Tombelli S., Minunni M., Luzi E., Mascini M., *Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein*, "Bioelectrochemistry", Vol. 67, 2/2005, 135-141, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2004.04.011.
- Meric B., Kerman K., Ozkan D., Kara P., Erensoy S., Akarca U., Mascini M., Ozsoz M., *Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue*, "Talanta", Vol. 56, 1/2002, 837-846, DOI: 10.1016/S0039-9140(01)00650-6.
- Murugaboopathi G., Parthasarathy V., Chellaram C., Prem Anand T., Vinurajkumar S., *Application of Biosensors in Food Industry*, "Biosciences Biotechnology Research Asia", Vol. 10, 2/2013, 711-714, DOI: 10.13005/bbra/1185.
- Rustagi S., Kumar P., *Biosensor and Its Application in Food Industry*, "Advances in Bioresearch", Vol. 4, 2/2013, 168-170.
- Richter E., *Biosensors: Applications for Dairy Food Industry*, "Journal of Dairy Science", Vol. 76, 10/1993, 3114-3117.
- Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., Quinn J., Chakraborty T., O'Kennedy R., *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water*, "Enzyme and Microbial Technology", Vol. 32, 1/2003, 3-13, DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00232-6.
- Bontidean J., Ahlqvist J., Mulchandani A., Chen W., Bae W., Mehra R., Mortari A., Csöregi E., *Novel synthetic phytochelatin-based capacitive biosensor for heavy metal ion*

- detection, "Biosensors and Bioelectronics", Vol. 18, 5-6/2003, 547-553, DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00026-5.
23. Bartoszcze M., *Methods of biological weapon threats detection*, "Przegląd Epidemiologiczny", Vol. 57, 2/2003, 369-376.
 24. Burnworth M., Rowan S, Weder Ch., *Fluorescent Sensors for the Detection of Chemical Warfare Agents*, "Chemistry", Vol. 13, 28/2007, 7828-7836.
 25. Morris M., *Fluorescent biosensors – Probing protein kinase function in cancer and drug discovery*, "Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics", Vol. 1834, 7/2013, 1387-1395, DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.025.
 26. Giuliano K., Taylor L., *Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery*, "Trends in Biotechnology", Vol. 16, 3/1998, 135-140.
 27. Niu W., Guo J., *Expanding the chemistry of fluorescent protein biosensors through genetic incorporating of unnatural amino acids*, "Molecular bioSystems", Vol. 9, 12/2013, 2961-2970, DOI: 10.1039/c3mb70204a.
 28. Rodriguez-Mozaz S., Maro M., Lopez de Alda M., Barcelo D., *Biosensors for environmental applications: future development trends*, "Pure and Applied Chemistry", Vol. 76, 4/2004, 723-752.
 29. Kossek S., Padeste C., Tiefenauer L., Siegenthaler H., *Localization of individual biomolecules on sensor surfaces*, "Biosensors and Bioelectronics", Vol. 13, 1/1998, 31-43, DOI: 10.1016/S0956-5663(97)00081-X.
 30. Gonzales-Martines M., Puchades R., Maquieira A., *On-line immunoanalysis for environmental pollutants: from batch assays to automated sensors*, "Trends in Analytical Chemistry", Vol. 18, 3/1999, 204-218.
 31. Myung S., Solanki A., Kim C., Park J., Kim K., Lee K., *Graphene-Encapsulated Nanoparticle-Based Biosensors for Selective Detection of Cancer Biomarkers*, "Advanced Materials" 23, 2011, 2221-2225.
 32. Chen H., Q-Y Hu., J-H Jiang., G-L Schen., R-Q Yu, *Construction of supported lipid membrane modified piezoelectric biosensor for sensitive assay of cholera toxin based on surface-agglutination of ganglioside-bearing liposomes*, "Analytica Chimica Acta", Vol. 657, 2/2010, 204-209, DOI: 10.1016/j.aca.2009.10.036.
 33. Lian W., Wu D., Lim DV., Jin S, *Sensitive detection of multiplex toxins using antibody microarray*, "Analytical Biochemistry", Vol. 401, 2/2010, 271-279, DOI: 10.1016/j.ab.2010.02.040.
 34. Kirsch J., Siltanen Ch., Zhou Q., Revzin A, Simonian A, *Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine*, "Chemical Society Reviews", Vol. 42, 22/2013, 8733-8768, DOI: 10.1039/c3cs60141b.
 35. Altintas Z., Tothil I., *Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer*, "Sensors and Actuators B: Chemical", Vol. 188, 2013, 988-998, DOI: 10.1016/j.snb.2013.07.078.
 36. Dargaville T, Ferrugia B, Broadbent J., Pace S, Upton Z., Voelcker N, *Sensors and imaging for wound healing: A review*, "Biosensors and Bioelectronics", Vol. 41, 2013, 30-42, DOI: 10.1016/j.bios.2012.09.029.
 37. Thakur M., Ragavan K., *Biosensors in food processing*, "Journal of Food Science and Technology", Vol. 50, 4/2013, 625-641, DOI: 10.1007/s13197-012-0783-z.

Biosensors

Abstract: This paper describes design and operation of biosensors. The examples of analytes and biological substances used in bioreceptor layer have been given. Biosensors application in medicine, food, environmental and defence industry as well as in biopharmaceutical research have been presented. Trends and prospects of the development this type of sensors have been shown.

Keywords: biosensor, sensor, analyte, bioreceptor layer, transducer layer

dr Aleksandra Kłos-Witkowska

awitkowska@ath.bielsko.pl

Adiunkt w Katedrze Elektrotechniki i Automatyki na Wydziale Budowy Maszyn i Informatyki Akademii Techniczno-Humanistycznej. Zainteresowania naukowe: sensory i biosensory.

