

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA BIOCHEMIE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Markéta Bocková**

**OPTICKÉ BIOSENZORY A STUDIUM  
BIOMOLEKULÁRNÍCH INTERAKCÍ**

Školitelé: RNDr. Tomáš Kučera, Ph.D.  
Ing. Jiří Homola, CSc.

Praha 2007

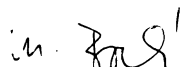
Děkuji Ing. Jiřímu Homolovi, CSc. a RNDr. Tomáši Kučerovi, PhD. za cenné rady a ochotnou pomoc při vypracování této práce.

Děkuji svým kolegům z Oddělení optických senzorů Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR za přátelskou atmosféru a laskavou pomoc v laboratoři.

Děkuji rodině, přátelům a svému manželovi za podporu a trpělivost během studia.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jiřího Homoly, CSc. a RNDr. Tomáše Kučery, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 3. 9. 2007

Podpis: 

## OBSAH

<b>Seznam zkratek</b>	1
<b>1. ÚVOD</b>	2
<b>1.1. Biosenzory</b>	3
1.1.1. Elektrochemické biosenzory	4
1.1.2. Piezoelektrické biosenzory	4
1.1.3. Kalorimetrické biosenzory	5
1.1.4. Optické biosenzory	5
<b>1.2. Klasifikace bezznačkových afinitních optických biosenzorů</b>	7
1.2.1. Interferometrické biosenzory	7
1.2.2. Senzory založené na spektroskopii vedených vln	8
1.2.2.1. Senzory s povrchovými plazmony (SPR)	9
1.2.2.2. Senzory s vazební mřížkou	9
1.2.2.3. Senzory s rezonančním zrcadlem	10
<b>1.3. Aplikace optických senzorů založených na spektroskopii vedených vln</b>	12
1.3.1. Imobilizace biomolekul na povrch senzoru	12
1.3.2. Detekce biologických látek	13
1.3.3. Analýza biomolekulárních interakcí	15
1.3.3.1. Proteinové interakce	17
1.3.3.2. Hybridizace nukleových kyselin	18
<b>2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE</b>	20
<b>3. METODY A MATERIÁL</b>	21
<b>3.1. Reagenty</b>	21
<b>3.2. SPR biosenzor</b>	22
<b>3.3. Funkcionalizace SPR senzoru</b>	24
<b>3.4. Detekce hybridizace oligonukleotidů</b>	26
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE</b>	27
<b>5. ZÁVĚR</b>	31
<b>6. POUŽITÁ LITERATURA</b>	32

## SEZNAM ZKRATEK

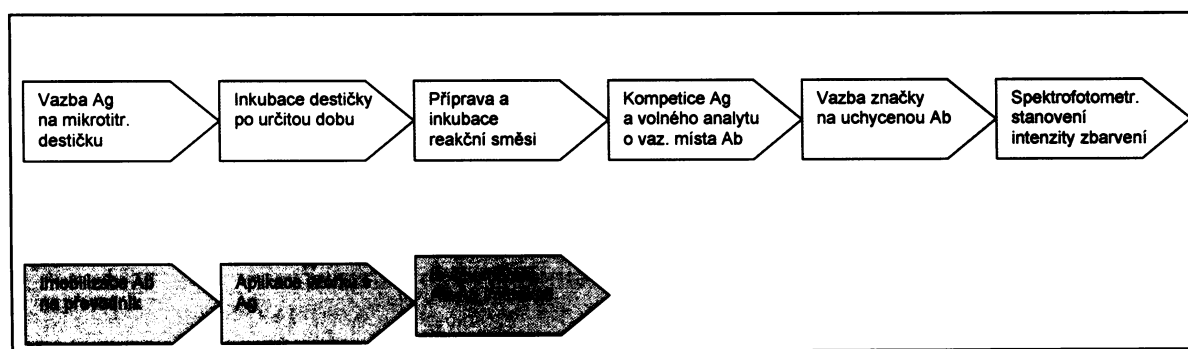
<b>17<math>\beta</math> – HSD10</b>	enzym 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenasa typu 10
<b>Ab</b>	protilátka
<b>AD</b>	Alzheimerova demence
<b>Ag</b>	antigen
<b>ATR</b>	zeslabený totální odraz (z angl. <i>attenuated total reflection</i> )
<b>BdO<sub>23</sub></b>	biotin-(TEG) <sub>2</sub> -5'-d(CAG TGT GGA AAA TCT CTA GCA GT)-3'
<b>C11</b>	11-alkylthiol zakončený diethylen glykolem
<b>C16</b>	merkaptohexaundekanová kyselina
<b>CdO<sub>23</sub></b>	5'-d(ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TG)-3'
<b>dA<sub>23</sub></b>	5'-d(A) <sub>23</sub> -3'
<b>dT<sub>23</sub></b>	5'-d(T) <sub>23</sub> -3'
<b>DMF</b>	N,N-dimethylformamid
<b>ELISA</b>	enzymová imunoanalýza (z angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>HCOOH</b>	kyselina mravenčí
<b>IUPAC</b>	mezinárodní organizace <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>NK</b>	nukleové kyseliny
<b>ON</b>	oligonukleotid
<b>PBNa</b>	10mM fosfátový pufr, 2.9mM KCl, 0,75M NaCl, pH 7,4
<b>PBS</b>	10mM fosfátový pufr, 2.9mM KCl, 137mM NaCl, pH 7,4
<b>SA</b>	10mM sodium acetátový pufr, pH 5,0
<b>SAM</b>	samouspořádací monovrstva (z angl. <i>self-assembled monolayer</i> )
<b>SEA</b>	stafylokokální enterotoxin A
<b>SEB</b>	stafylokokální enterotoxin B
<b>SPR</b>	rezonance povrchových plazmonů (z angl. <i>surface plasmon resonance</i> )
<b>TEG</b>	tri(ethylehglykol)
<b>TNT</b>	2,4,6-trinitrotoluen
<b>TSTU</b>	N,N,N',N'-tetramethyl-O-(N-sukcinimidyl) uronium tetrafluoroborát

## 1. ÚVOD

Studium biomolekulárních interakcí se stalo nedílnou součástí medicínského výzkumu a diagnostiky, vývoje léčiv a aplikací molekulární biologie a biochemie. Výzkumné týmy se snaží jak poznat složení, strukturu a metabolismus biologicky významných molekul, tak pochopit vztah mezi jejich chemickou strukturou a biologickou funkcí. Navíc v řadě důležitých oblastí existuje potřeba přesné a rychlé detekce a identifikace chemických a biologických látek.

Většina technik, které se běžně používají k detekci biomolekul (imunologické, spektrofotometrické metody), vyžaduje určitý typ fluorescenčního, radioaktivního nebo enzymatického značení molekul nutného k zaznamenání vazby [1, 2]. Tyto metody jsou často finančně náročné, vyžadují školený personál, mnohdy i speciální laboratoře a neumožňují sledovat kinetiku měřených biomolekulárních interakcí. Tyto důvody vedly k vývoji nových alternativních technik, které značení molekul nevyžadují, jsou rychlé, levné a v některých případech plně automatizované.

Beznačkové optické biosenzory představují dnes jednu z nejvíce rozvinutých technik pro detekci biomolekul a studium biomolekulárních interakcí. Umožňují rychlou a přímou detekci v reálném čase, jsou vysoce citlivé a nevyžadují značení látek (viz obr. 1).

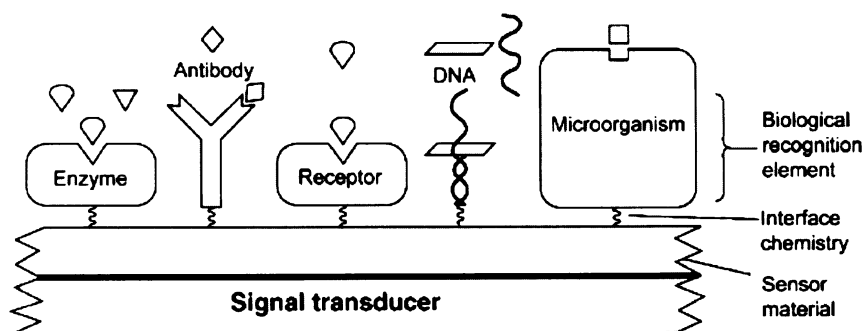


Obr. 1. Základní experimentální kroky u ELISA (z angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) a u optického biosenzoru (Ag – antigen, Ab - protilátka).

## 1.1. BIOSENZORY

Podle definice IUPAC z roku 1992 je biosenzor zařízení, které využívá specifické biochemické reakce zprostředkované izolovanými enzymy, imunosystémy, tkáněmi, organelami nebo celými buňkami k detekci látek obvykle pomocí elektrických, kalorimetrických nebo optických metod. Jinými slovy to je zařízení, které transformuje biochemickou informaci úměrnou koncentraci dané složky vzorku na analyticky vhodný signál. Tím může být viditelné světlo, tlak, rozdíl v napětí, atd.

Biosenzor je zpravidla tvořen dvěma základními prvky: biochemickým (molekulárním) rozpoznávacím systémem neboli receptorem či ligandem a fyzikálně chemickým převodníkem (viz obr. 2). Podle typu převodníku (metody transformace signálu) nebo principu rozpoznávacího systému dělíme biosenzory do několika skupin. Na biosenzory elektrochemické [3-5], piezoelektrické [6-9], magnetické [10], kalorimetrické [11, 12] a optické [13, 14] podle typu převodníku a biosenzory imunochemické neboli afinitní [15, 16], enzymatické [3, 17], buněčné [18] nebo DNA biosenzory [19, 20] podle druhu použitého receptoru.



Obr. 2. Schématické znázornění biosenzoru (převzato z [21]).

Existuje široká paleta biosenzorů počínaje klasickou amperometrickou elektrodou s imobilizovaným enzymem [22] a konče optickými biosenzory určenými k získávání dat týkajících se reakční kinetiky specifických reakcí [23]. Když navíc uvážíme velké množství použitelných biologických receptorů (protilátky, proteiny, enzymy, nukleové kyseliny, ...), mají biosenzory obrovský potenciál, a nacházejí stále větší uplatnění

ve zdravotnictví [15, 24, 25], potravinářském průmyslu [26], vojenských aplikacích [27] nebo sledování kvality životního prostředí [28, 29].

### 1.1.1. Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory patří mezi biosenzory s nejdelsí historií. Využívají změny různých elektrochemických parametrů, podle kterých je můžeme dále dělit na biosenzory konduktometrické, amperometrické a potenciometrické.

Konduktometrické biosenzory využívají změny ve vodivosti vzorku vyvolané biochemickou reakcí. Příkladem je konduktometrický biosenzor pro analýzu alkalické fosfatasy a detekci toxických látek, který jako bioreceptor využívá imobilizované buňky *Chlorella vulgaris* [30].

Měření elektrického proudu generovaného oxidací nebo redukcí elektroaktivní látky (po vložení konstantního napětí mezi dvě elektrody) využívají biosenzory amperometrické. Zřejmě jedním z nejrozšířenějších senzorů tohoto typu je glukosový biosenzor. Nejjednodušší podoba tohoto biosenzoru využívá enzymatický rozklad glukosy glukosoxidasou na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku:



Potenciometrické biosenzory měří změnu potenciálu mezi měřicí a referenční elektrodou. Převodníky, které zde nacházejí uplatnění, jsou např. iontově selektivní elektrody, skleněné, plynové nebo kovové elektrody. Například potenciometrický biosenzor pro detekci organofosfátových neurotoxinů využívá skleněnou pH elektrodu k detekci protonů generovaných při štěpení P-O, P-F, P-CN nebo P-S vazeb [31].

### 1.1.2. Piezoelektrické biosenzory

Převodníky použité v piezoelektrických biosenzorech jsou tvořeny piezoelektrickým krystalem (tj. anizotropní krystal např. křemen, turmalín, Rochellova sůl), který vibruje s určitou rezonanční frekvencí. Nárůst hmoty na krystalu (např. tvorba komplexu

protilátka - antigen) vede ke snížení této frekvence. Z časové závislosti změn rezonanční frekvence lze získat informace o průběhu tvorby nebo zániku komplexů molekul na povrchu. Piezoelektrické biosenzory se v současné době hojně a s oblibou používají, protože poskytují rychlou odezvu, jsou cenově dostupné a jednoduše se ovládají. Řada z nich se komerčně vyrábí. Princip, instrumentaci i široké pole aplikací piezoelektrických biosenzorů popisují např. články [32, 33]. Z konkrétních příkladů využití lze uvést např. detekci kontaminantů v potravinách [34] nebo nepřímou detekci patogenní bakterie *Francisella tularensis* [35].

### **1.1.3. Kalorimetrické biosenzory**

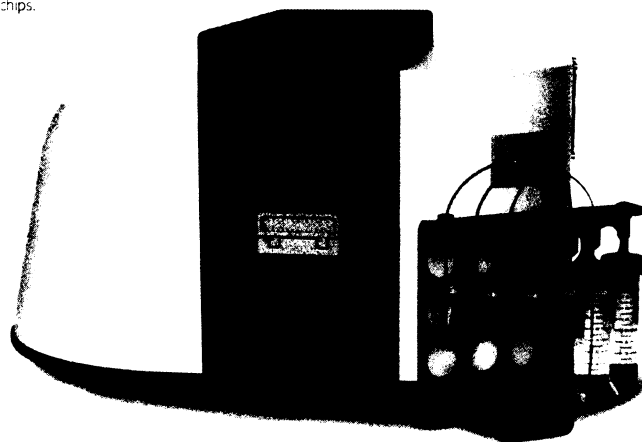
Kalorimetrické biosenzory využívají změny tepla, ke kterým dochází při biochemické reakci. Proto jsou významným prostředkem k analýze biochemických procesů jako enzymaticky katalyzované reakce a metabolická aktivita mikroorganismů nebo živých buněk. Stanovení glukosy v krvi může být založeno například na měření tepla uvolněného při průchodu vzorku krve malým sloupcem s imobilizovanou glukosoxidase a katalasou [36].

### **1.1.4. Optické biosenzory**

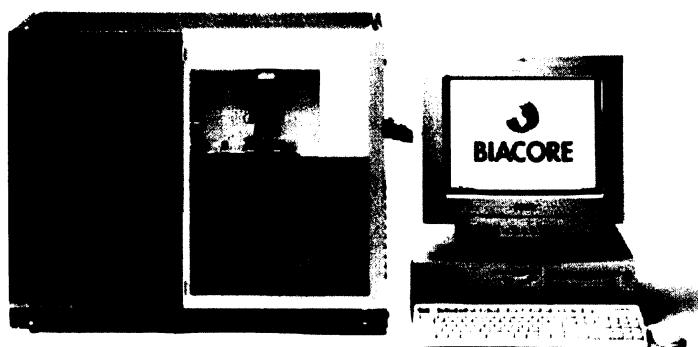
Optické biosenzory jsou založeny na detekci změn vlastností elektromagnetického záření, které se mění v přítomnosti detekované látky. Existují dva typy optické detekce. Přímá – k detekci se využívají vlastní optické vlastnosti analytu a nepřímá, kdy analyt nemá vlastní optické vlastnosti a k detekci je třeba indikátor nebo značení. Při přímé detekci detekovaný analyt může přímo ovlivňovat vlastnosti světla, při nepřímé detekci se musí pomocí převodníku signál měřené veličiny (např. hmotnost, napětí, pH, koncentrace, atd.) převést na veličinu, která světlo přímo ovlivňovat může (např. optická dráha, index lomu, absorpance, ...). Na obrázcích 3 a 4 jsou příklady komerčně používaných optických biosenzorů.



olid phases,  
chips.



Obr. 3. BIAffinity – optický senzor pro studium biomolekulárních interakcí vyráběný firmou Analytik Jena AG, Německo (převzato z [www.analytik-jena.de](http://www.analytik-jena.de)).



Obr. 4. Biacore 3000 – optický afinitní biosenzor pro kvalitativní kinetickou analýzu molekulárních mechanismů vyráběný firmou Biacore, Švédsko (převzato z [www.biacore.com](http://www.biacore.com)).

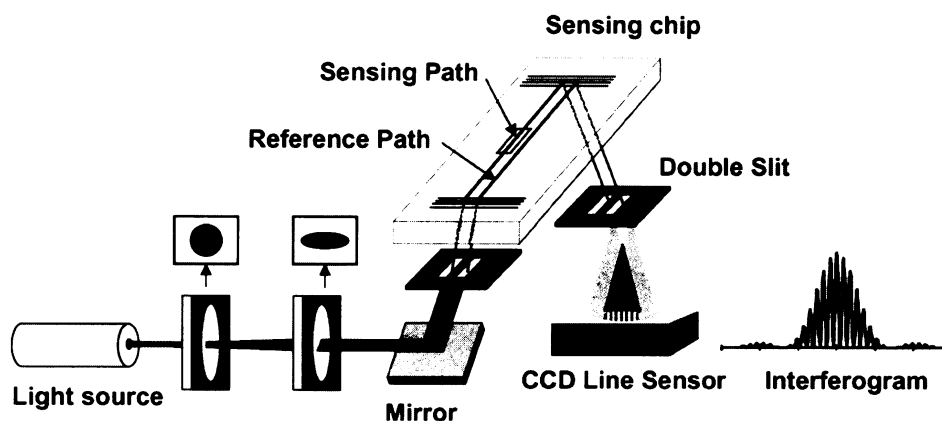
## 1.2. KLASIFIKACE BEZZNAČKOVÝCH AFINITNÍCH OPTICKÝCH BIOSENZORŮ

Podle principu optického převodníku můžeme optické biosenzory dělit na absorbanční, luminiscenční, reflektometrické, interferometrické, senzory založené na spektroskopii vedených vln a další. Senzory založené na spektroskopii vedených vln a interferometrické senzory patří mezi tzv. bezznačkové (label-free) biosenzory.

### 1.2.1. Interferometrické biosenzory

Interferometrie je optická metoda, která sleduje rozdíly mezi dvěma optickými svazky, které urazily podobnou dráhu. Preferovaným typem interferometru v oblasti biosenzorů je tzv. Mach-Zehnderův interferometr. Mach-Zehnderův interferometr využívá vliv evanescentního pole na šíření vedeného záření ve vlnovodu. Evanescentní pole je ovlivňováno indexem lomu prostředí, ve kterém se šíří, proto změna na povrchu senzoru (změna koncentrace, vazba analytu) vede ke změně ve fázi záření a následně ke změně v interferenčním obrazci. Aby se tento rozdíl dal měřit, používá se zároveň referenční svazek, který je veden v blízkosti toho měřicího, ale není detekovanou reakcí ovlivňován. Světelné svazky se těmito rameny šíří odlišně v závislosti na indexech lomu náležících ramenům vlnovodu. Po zpětné rekombinaci a interferenci vystupujících svazků se určí jejich fázový posun. (viz obr. 5, str. 8).

Interferometry umožňují kromě detekce chemických a biologických látek [37] také monitorování biomolekulárních interakcí v reálném čase [38, 39].



Obr. 5. Schéma interferometrického biosenzoru využívajícího evanescentní pole (převzato z [39]).

### 1.2.2. Senzory založené na spektroskopii vedených vln

Senzory založené na spektroskopii vedených vln využívají vedené módy speciálních vlnovodů k detekci refraktometrických změn v blízkosti povrchu senzoru. Měřenou veličinou je buď samotný index lomu nebo veličina, která moduluje index lomu převodníku (např. zvýšení indexu lomu vrstvy receptorů v důsledku vazby molekul analytu na receptory). Jsou vhodné pro studium biomolekulárních interakcí mezi analytem v roztoku a jeho biospecifickým partnerem imobilizovaným na povrchu.

Mód je rozložením elektromagnetického pole, charakterizované svým prostorovým rozložením a konstantou šíření  $\beta$  a daným optickým prostředím se šíří beze změny těchto charakteristik.

Hlavní typy senzorů založených na spektroskopii vedených vln jsou senzory s vazební mřížkou, senzory s rezonančním zrcadlem a senzory s povrchovými plazmony. První dva typy využívají spektroskopii vln v dielektrických vlnovodech, typ s povrchovými plazmony spektroskopii v dielektricko - kovových vlnovodech.

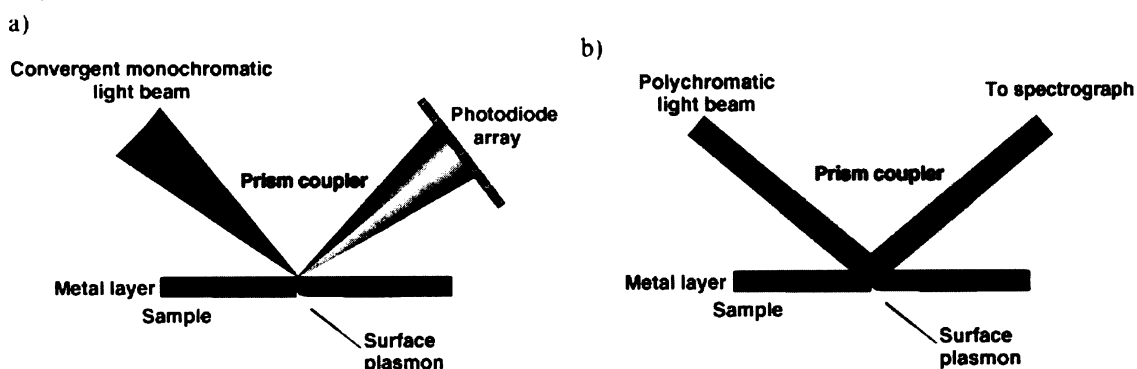
### 1.2.2.1. Senzory s povrchovými plazmony (SPR)

Princip senzoru s povrchovými plazmony je založen na měření změny konstanty šíření speciální optické vlny tzv. povrchového plazmonu. Povrchový plazmon vzniká na rozhraní mezi tenkou kovovou vrstvou a dielektrikem. K excitaci povrchového plazmonu dojde, pokud složka vlnového vektoru světelné vlny rovnoběžná s rozhraním je stejná jako ta u povrchového plazmonu. Tedy pokud je splněna podmínka

$$k_z = 2\pi/\lambda \cdot n_h \cdot \sin\theta = \beta,$$

kde  $k_z$  je tečná složka vlnového vektoru,  $\lambda$  vlnová délka dopadající světelné vlny,  $n_h$  index lomu hranolu,  $\theta$  úhel dopadu světelného paprsku a  $\beta$  konstanta šíření povrchového plazmonu. Jako vazebný prvek je v těchto senzorech využíván optický hranol.

Změna indexu lomu dielektrika (např. vazba analytu na receptory) vyvolá změnu konstanty šíření povrchového plazmonu a výsledně dojde ke změnám charakteristik světelné vlny interagující s povrchovým plazmonem. V závislosti na tom, jakou charakteristiku světelné vlny interagující s povrchovým plazmonem sledujeme, může SPR sensor být založen na modulaci vlnové délky, úhlu, intenzity, fáze nebo polarizace. (viz obr 6).



Obr. 6. Senzory s povrchovými plazmony. (a) Senzor s modulací úhlu, (b) senzor s modulací vlnové délky (převzato z [40]).

### 1.2.2.2. Senzory s vazební mřížkou

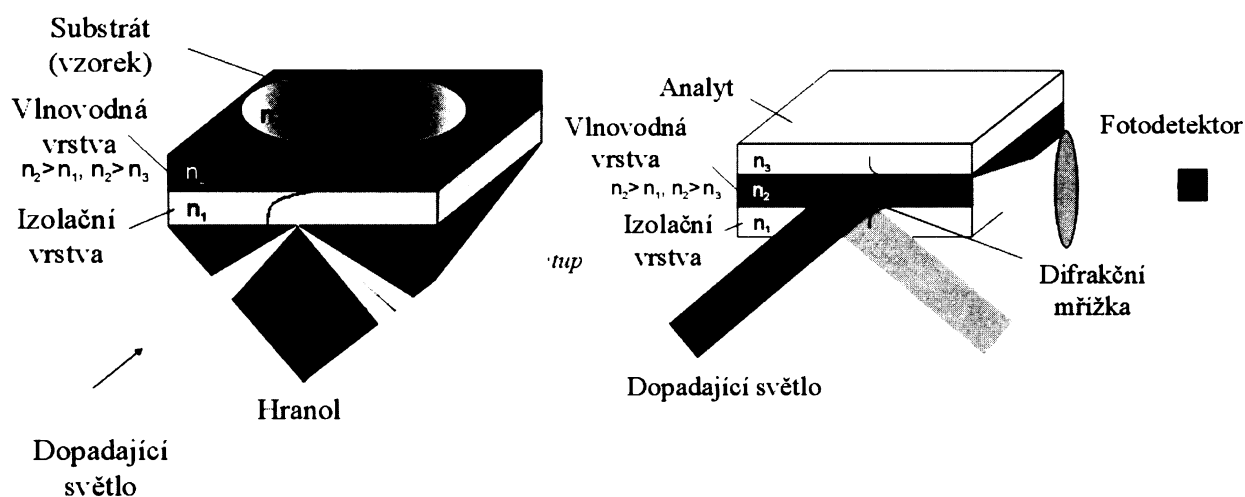
Mřížka má úlohu vazebného členu a jejím prostřednictvím se světelný paprsek do planárního vlnovodu navazuje, resp. vyvazuje. V senzorech s vazební mřížkou

na vstupu je tečný vlnový vektor dopadajícího světelného paprsku zvětšen difrakcí na mřížce zabudované ve vlnovodu. V tomto uspořádání detekujeme intenzitu světla navázaného do vlnovodu (viz obr 7). Nejvyšší intenzitu uvidíme, když bude splněna podmínka rezonance

$$\beta = 2\pi/\lambda \cdot n_1 \cdot \sin\theta + m \cdot K,$$

kde  $\beta$  je konstanta šíření módu vlnovodu,  $\lambda$  vlnová délka dopadajícího světelného paprsku,  $n_1$  index lomu prostředí,  $\theta$  úhel dopadu světelného paprsku,  $m$  řád difrakce a  $K$  vlnový vektor mřížky.

V senzorech s vazební mřížkou na výstupu je světelný paprsek do vlnovodu zaveden pomocí čočky, šíří se vlnovodem a v místě s mřížkou se vyvazuje z vlnovodu pod určitým úhlem, který je úměrný konstantě šíření módu vlnovodu. Změny indexu lomu na povrchu senzoru ovlivňují konstantu šíření módu vlnovodu, což vede ke změně úhlu, pod kterým světlo vystupuje z vlnovodu.



Obr. 7. Senzor s rezonančním zrcadlem a úhlovou modulací (vlevo), senzor s vazební mřížkou na vstupu (vpravo). Převzato z [41].

### 1.2.2.3. Senzory s rezonančním zrcadlem

V senzorech s rezonančním zrcadlem je vlnovodná vrstva nanášena na optický hranol, světlo se pomocí hranolu naváže do vlnovodu a několikanásobným odrazem ve vlnovodné

vrstvě produkuje evanescentní vlnu. Ta vzniká při totálním vnitřním odrazu v opticky hustším prostředí, pokud úhel dopadajícího světla překročí kritickou hodnotu a šíří se podél rozhraní v prostředí opticky řidším. Její intenzita exponenciálně klesá směrem od rozhraní a v přítomnosti měřeného vzorku se mění její vlastnosti. K navázání světla do vlnovodu dojde, pokud se budou rovnat konstanty šíření evanescentní vlny a módu vlnovodu. Změny konstanty šíření  $\beta$  způsobené změnami indexu lomu vzorku se určují sledováním rezonanční podmínky

$$\beta = 2\pi/\lambda \cdot n_h \cdot \sin\theta,$$

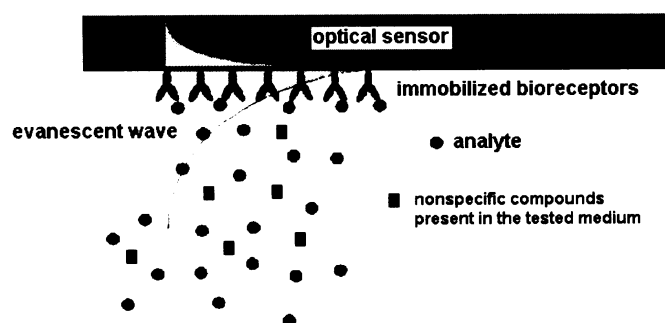
kde  $\beta$  je konstanta šíření módu,  $\lambda$  vlnová délka dopadajícího světelného paprsku,  $n_h$  index lomu hranolu a  $\theta$  úhel dopadu světelného paprsku. Lze tedy sledovat, při jakém úhlu dopadu dochází k navázání světelného paprsku do vlnovodu a tím k poklesu intenzity odraženého světla (viz obr.7, str 10).

### 1.3. APLIKACE OPTICKÝCH BIOSENZORŮ ZALOŽENÝCH NA SPEKTROSKOPII VEDENÝCH VLN

Základní aplikace senzorů založených na spektroskopii vedených vln můžeme rozdělit do tří skupin: (1) měření fyzikálních veličin, (2) detekce chemických a biologických látek a (3) studium biomolekulárních interakcí. První dvě skupiny nejsou tak významné, hlavní potenciál optických senzorů leží ve třetí skupině. Například biosenzory s povrchovými plazmony (SPR) představují dnes nejvíce rozvinutou techniku bezznačkových optických biosenzorů a neuvěřitelně rychle rostoucí počet publikací (dnes jich je již několik tisíc) svědčí o rostoucím zájmu je aplikovat na studium rozmanitých biomolekulárních interakcí.

#### 1.3.1. Imobilizace biomolekul na povrch senzoru

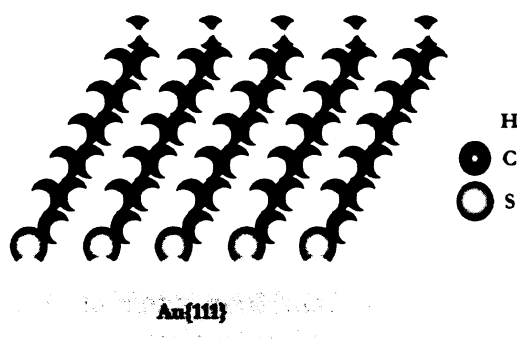
Imobilizace receptorů na povrch je nutné zvážit již při vývoji biosenzoru, protože způsob uchycení receptorů významně ovlivňuje výslednou citlivost a selektivitu biosenzoru. Cílem při imobilizaci je dosáhnout vysoké hustoty pokrytí povrchu receptory beze ztráty jejich biologické funkce a zabránit nespecifickým vazbám analytu a ostatních molekul z roztoku na povrch senzoru (viz obr. 8).



Obr. 8. Specifická vazba analytu (převzato z [41]).

Obecně metody imobilizace biomolekul na povrch senzoru využívají fyzikálně-chemické interakce jako je chemisorpce [42], kovalentní uchycení [43, 44], hydrofobní a elektrostatické interakce [45] nebo vysoce afinitní biomolekulární systémy (např. streptavidin - biotin [46, 47], proteiny A a G [13] nebo komplementární oligonukleotidy [48]).

Velice rozšířenou technikou k uchycení biomolekul na povrch biosenzorů založených na spektroskopii vedených vln je spontánní uspořádání *n*-alkylthiolů nebo disulfidů na zlatém substrátu s výsledkem vytvoření homogenní monovrstvy “self-assembled monolayer” (SAM) [49] (obr. 9). Aby bylo dosaženo cílené povrchové hustoty receptorů a aby zároveň bylo na čipu vytvořeno pozadí zabraňující nespécifickým vazbám molekul, typicky se používá směs delších řetězců *n*-alkylthiolů ( $n \geq 12$ ) zakončených funkční skupinou pro připojení biomolekul v kombinaci s kratšími *n*-alkylthioly ( $n \leq 11$ ) pro zaplnění povrchu chemicky nereaktivními molekulami [50].



Obr. 9. Schéma dodekanthiolátové vrstvy (SAM) na zlatém substrátu. Vrstva je stabilizována vazbami mezi SH-koncovou skupinou alkylthiolů a zlatem a van der Waalsovými a hydrofobními interakcemi (převzato z [51]).

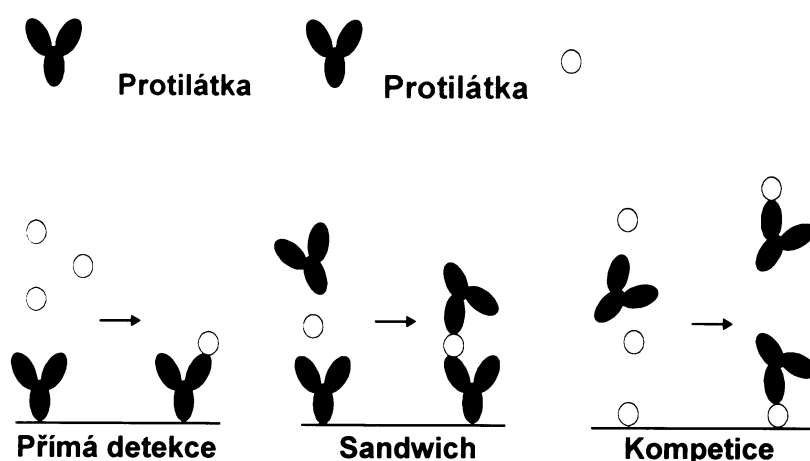
### 1.3.2. Detekce biologických látek

Technologie afinitních biosenzorů poskytuje platformu pro rychlou a citlivou detekci a identifikaci velkého množství chemických a biologických látek. Proto je i oblast využití široká. Z hlavních odvětví vzpomeňme ochranu životního prostředí (detekce polutantů a



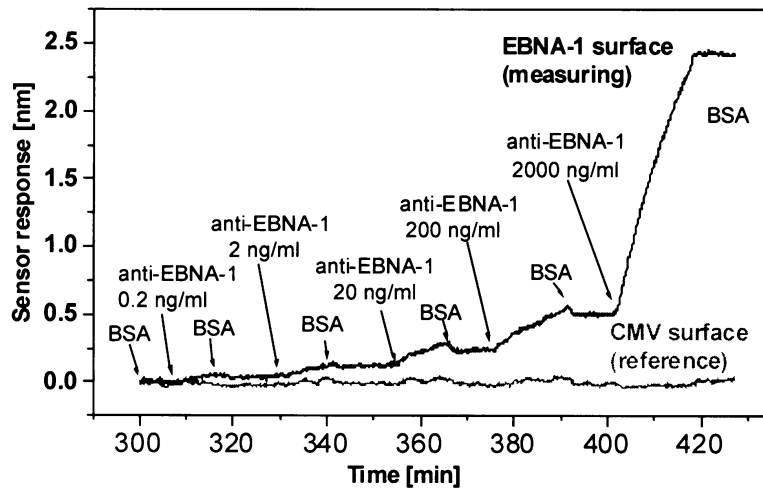
škodlivin), kontrolu potravin (detekce patogenů a toxinů), lékařskou diagnostiku (detekce markerů chorob, protilátek, hormonů) nebo ochranu před terorismem (rychlá detekce chemických a biologických zbraní).

Afinitní biosenzory nacházejí využití pro detekci malých (herbicidy, pesticidy, toxiny, drogy), středních (bakteriální enterotoxiny) i velkých (bakterie) analytů. Podle velikosti analytu, vazebných vlastností biomolekulárního rozpoznávacího členu (receptoru) a rozsahu koncentrací, které chceme stanovit, se zvolí detekční formát (viz obr. 10).



Obr. 10. Detekční formáty používané v afinitních biosenzorech založených na spektroskopii vedených vln.

Přímá detekce se obvykle preferuje v aplikacích, kde je afinita analytu dostatečně velká k vyvolání odezvy, tzn. středně velké a velké analyty jako jsou protilátky. Přímá detekce protilátek proti viru Epstein – Baarové v pufru (viz obr. 11) i v 1% séru byla provedena s využitím SPR biosenzoru s detekčním limitem pod 0,2 ng/ml [25]. Pokud je třeba, lze zvýšit odezvu senzoru použitím sendvičového uspořádání. To je vhodné zejména pro malé a středně velké analyty v malých koncentracích, například k detekci stafylokokálního enterotoxinu A i B (SAE, SEB). Zesílením signálu užitím sekundární protilátky detekovali v mléce Homola a kol. koncentrace nižší než 0,5 ng/mL [40, 52]. Malé analyty ( $M_r < 10\,000$ ) v nízkých koncentracích se zpravidla detekují použitím kompetice. Např. Shankaran a kol. vyvinuli SPR imunosenzor pro detekci TNT pomocí kompetice, v pufru dosáhli detekční limit pod 0,09 ng/mL [53].



Obr. 11. Odezva SPR senzoru na různé koncentrace protilátky proti viru Epstein – Barrové v měřicím a referenčním kanále (převzato z [25]).

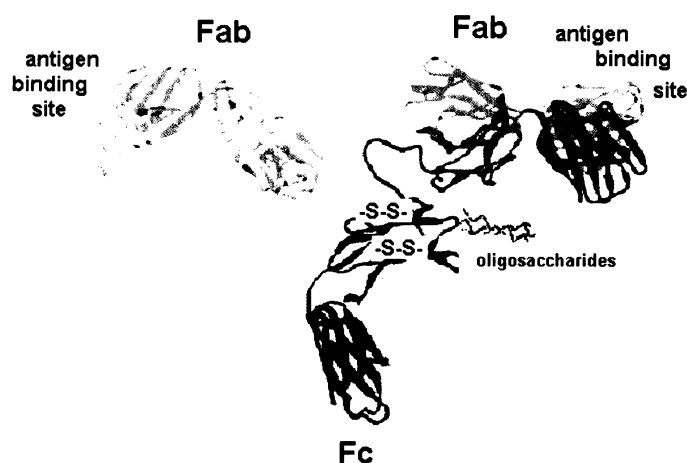
### 1.3.3. Analýza biomolekulárních interakcí

Schopnost optických afinitních biosenzorů detekovat molekulární interakce v reálném čase poskytuje možnost určit kinetické a termodynamické parametry, interakční modely, vzájemnou specifitu mezi ligandem a analytem nebo mapovat vazebná místa na molekulách. Díky tomu můžeme biosenzory využít ke studiu biomolekulárních mechanismů jako jsou interakce protein - protein, protilátka - antigen, DNA - DNA, DNA - RNA, RNA - RNA, DNA - enzym, atd.

Proteiny neboli bílkoviny jsou široce využívané makromolekuly, které neslouží jen jako stavební kameny buňky, ale provádějí i většinu buněčných funkcí. Díky různému složení aminokyselin nabývají proteiny různých konformací, které pak určují funkci jednotlivých proteinů. Biologické vlastnosti proteinu závisí na fyzikálních interakcích s jinými molekulami. Schopnost proteinu selektivně a s vysokou afinitou se vázat k ligandu je dána vytvořením množství slabých nekovalentních vazeb (vodíkové můstky, iontové vazby, van der Waalovy síly a hydrofobní interakce) mezi interakčními partnery.

Tím vzniká pár, který má charakteristiku porovnatelnou s kovalentní vazbou, ale změnou vnějších podmínek (pH, iontová síla) jej lze rozrušit.

Jedním ze speciálních typů proteinů jsou protilátky produkované buňkami imunitního systému B-lymfocyty. Molekula protilátky sestává ze čtyř polypeptidových řetězců – dvou lehkých a dvou těžkých, vzájemně propojených disulfidickými můstky do tvaru písmene „Y“. Sekvence aminokyselin na koncích „Y“ se mění s typem protilátky. Tato variabilní oblast obsahuje vazebné místo pro antigen (viz obr. 12).



Obr. 12. Molekula imunoglobulinu G (IgG). IgG se skládá ze dvou identických Fab fragmentů, z nichž každý obsahuje vazebné místo pro vazbu antigenu, a Fc fragmentu, který se na vazbě antigenu nepodílí (převzato z [41]).

Nukleové kyseliny (NK) jsou vysokomolekulární lineární polymery složené z nukleotidů, které přenášejí genetickou informaci. Existují dvě třídy nukleových kyselin: deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a ribonukleové kyseliny (RNA). DNA je nositelkou dědičnosti ve všech buněčných formách života a také v mnohých virech. RNA má v buňce rozličné biologické funkce a strukturální úlohy. Genetická informace se nejprve přepíše procesem transkripce do „messenger“ RNA (mRNA), z mRNA procesem translace do pořadí aminokyselin ve vznikajícím proteinu.

Základní funkce DNA, tedy předávání informace o celém genomu, je umožněna tvorbou komplementárních řetězců spojených interakcemi nukleotidových bází (adenin, guanin, thymin, cytosin). Lineární sekvence těchto bází poskytuje informaci genetického kódu, kde tři po sobě jdoucí báze určují jednu aminokyselinu. Prostorovou strukturu DNA

stabilizují vodíkové můstky mezi bázemi, interakce  $\pi$  - elektronů aromatických cyklů bází umístěných nad sebou ve šroubovici (tzv. stacking) a iontové síly mezi  $\text{PO}_2^-$  a kationty. Právě vodíkové můstky hrají významnou roli při procesu hybridizace (renaturace), kdy se komplementární řetězce spojují a dochází k vytvoření vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi. K hybridizačním reakcím dochází mezi libovolnými jednovláknovými molekulami NK (DNA – DNA, DNA – RNA, RNA - RNA), pokud obsahují kompletní nukleotidové sekvence. Díky svým chemickým, fyzikálním a biologickým aktivitám jsou NK využívány v mnoha biosenzorech a bioanalytických stanoveních.

### 1.3.3.1. Proteinové interakce

Téma proteinových interakcí sledovaných pomocí optických biosenzorů bylo zpracováno a popsáno v mnoha stovkách odborných publikací. Snad nejobsáhlejší článek na toto téma sepsali Rebecca L. Rich a David G. Myszka [54].

Sledování biologické aktivity proteinů (protilátky, antigeny, enzymy, atd.) je jedním z klíčových kroků při vývoji léčiv nebo hledání biomarkerů, jejichž přítomnost v tělních tekutinách signalizuje onemocnění, často již v jeho ranných stádiích a dříve, než se projeví první symptomy. Například biomarker pro Alzheimerovu demenci (AD) odrážející rozpad neuronů za různých patologických stavů by mohl být založen na nervově specifických cytoskeletárních proteinech jako je protein Tau, amyloid  $\beta$  nebo nervově specifický tubulin. Dalším ukazatelem AD, který ale zatím není zcela prokázán, je enzym 17 $\beta$ -hydroxysteroidová dehydrogenáza typu 10 (17 $\beta$ -HSD10). Cytotoxické účinky má jeho komplex s amyloidem  $\beta$ . Termodynamickou závislost vzniku komplexu 17 $\beta$ -HSD10 a amyloidu  $\beta$  popsal Yan a kol. [55].

Enzymy katalyzují vysoce specificky a selektivně obrovské množství reakcí. Rychlost enzymově katalyzovaných reakcí může být regulována pomocí inhibitorů, které snižují enzymovou aktivitu. Pro medicínské aplikace je přínosné sledovat interakce enzymů a dalších proteinů s nukleovými kyselinami [56, 57] nebo z hlediska kinetiky a termodynamiky charakterizovat průběh reakce enzymů s jejich inhibitory nebo substráty [58, 59]. Například studium interakce T7 DNA polymerasy s různými DNA duplexy

přineslo kromě kinetických parametrů sledované reakce také informace o konformačních změnách během interakce enzymu s NK [60]. Klíčovou vlastností DNA polymerasy je její schopnost prodlužovat polydeoxyribonukleotidové řetězce i opravovat řetězce špatně nasyntetizované. DNA polymerasa z bakteriofága T7 má polymerasovou aktivitu a 3' → 5' exonukleasovou aktivitu. Na obrázku 13 je vidět komplex T7 DNA polymerasy a DNA dvoušroubovice.



Obr. 13. Komplex DNA polymerasy a deoxyribonukleové kyseliny (převzato z [www.bio.davidson.edu](http://www.bio.davidson.edu)).

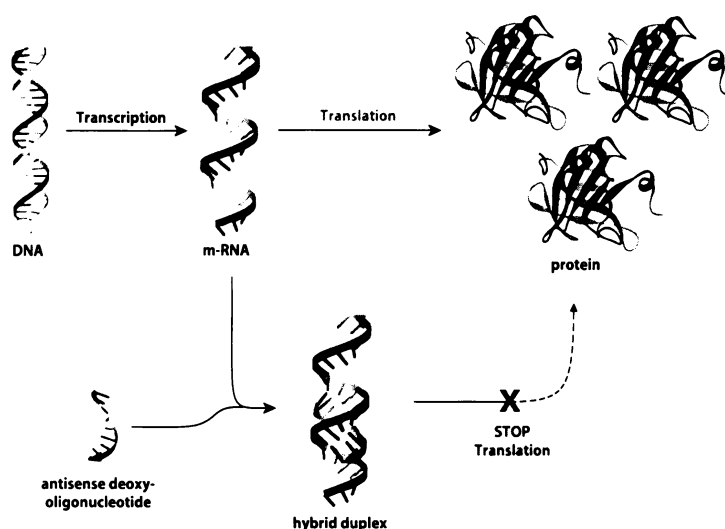
Biosenzory, které jako bioreceptory využívají protilátky, patří díky pokrokům v syntéze protilátek mezi nejrychleji se rozvíjející diagnostické technologie [61]. Optické biosenzory jsou v dnešní době dostatečně citlivé a umožňují studovat interakce nízkomolekulárních protilátek a antigenů [62] nebo stanovit kinetické parametry interakcí protilátek a antigenů v komplexních roztocích jako mozkomíšni mok [25] nebo krevní sérum [63].

### 1.3.3.2. Hybridizace nukleových kyselin

Hybridizace komplementárních nukleotidových sekvencí je zásadním krokem v procesu replikace a transkripce DNA do RNA. Hybridizační reakce se dnes standardně využívá v celé řadě technik molekulární biologie jako je polymerázová řetězová reakce nebo

metody přenosu DNA, resp. RNA nebo proteinů z elektroforetických gelů na nitrocelulosoové membrány [64]. Tyto metody závisí na vysoce citlivé a specifické detekci hybridizace mezi krátkými syntetickými oligonukleotidy (ON) a cílovou sekvencí nukleové kyseliny ve vzorku.

Stále větší počet výzkumných skupin se dnes zabývá vývojem strategií pro genovou terapii založenou na hybridizaci ON [65, 66]. Princip takových terapií je zablokovat syntézu proteinů esenciálních pro růst nádorových buněk nebo pro reprodukci viru již na úrovni nukleových kyselin (viz obr. 14). Přirozené oligonukleotidy nejsou v živých buňkách dostatečně stabilní, proto se používají jejich syntetické analogy [67].



Obr. 14. Antisensní oligonukleotid se specifickým párováním bází naváže na cílovou komplementární sekvenci a dojde k zablokování translace.

NK a jejich hybridizace jsou obrovským zdrojem informací, které jsou velmi důležité především pro základní výzkum. Díky optickým biosenzorům lze získat informace o kinetických konstantách hybridizační reakce [68], o mechanismu tvorby komplexů NK [69] nebo vlivech na jejich stabilitu [70].

## 2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo zpracovat tematiku optických biosenzorů a jejich využití pro studium biomolekulárních interakcí. Mým úkolem bylo vypracovat rešerši, popsat principy fungování a aplikace jednotlivých typů biosenzorů a zaměřit se na bezznačkové afinitní optické biosenzory, jejich klasifikaci a oblasti použití.

Na optickém biosenzoru s povrchovými plazmony vyvinutém na Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd jsem měla provést experimenty zaměřené na pozorování interakcí nukleových kyselin. Tyto experimenty by měly poskytnout základní informace, které budou využity k optimalizaci podmínek hybridizace, tzn. ke zvýšení úspěšnosti hybridizace.

### 3. METODY A MATERIÁL

Na základě vypracované rešerše jsem si pro svou práci zvolila optický afinitní biosenzor s povrchovými plazmony (SPR biosenzor) a použila ho ke sledování interakcí nukleových kyselin. Seznámila jsem se s instrumentací a měřicími metodami SPR biosenzoru, dále jsem si osvojila práci v biochemické laboratoři s přísnými nároky na čistotu a hygienu, proces regenerace skleněných čipů a přípravu vzorků pro měření. V návaznosti na svou předchozí práci s nukleovými kyselinami [66] jsem navrhla modelový experiment zaměřený na hybridizaci komplementárních oligonukletidů. Mnou provedené experimenty přispěly k optimalizaci podmínek hybridizace NK, ze získaných dat jsem určila efektivitu hybridizace a kalibrační křivku senzoru. Sekvence oligonukleotidů (23 bází) byla biotin-(TEG)<sub>2</sub>-5'-d(CAG TGT GGA AAA TCT CTA GCA GT)-3' (= BdO<sub>23</sub>) a komplementární vlákno 5'-d(ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TG)-3' (= CdO<sub>23</sub>), kde „TEG“ je tri(ethylenglykol).

#### 3.1. Reagenty

##### Chemikálie:

**C<sub>11</sub>** (11-alkylthiol zakončený diethylen glykolem) byl obdržen od firmy Prochimia, Polsko.

**C<sub>16</sub>** (merkaptohexaundekanová kyselina),

**DMF** (N,N-dimethylformamid),

**HCOOH** (kyselina mravenčí),

**KCl** (chlorid draselný),

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (dihydrogen fosforečnan draselný),

**NaCl** (chlorid sodný),

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O** (hydrogen fosforečnan sodný dodekahydrát),

**roztok sodium acetátového pufru (3M),**

**Streptavidin** ze *Streptomyces avidinii*,

**TSTU** (N,N,N',N'-tetramethyl-O-(N-sukcinimidyl) uronium tetrafluoroborát), vše od firmy Sigma-Aldrich, USA.

**Absolutní ethanol** od firmy MERC, ČR.



### Pufry:

**SA** (10 mM sodium acetátový pufr, pH 5,0),

**PBS** (10mM fosfátový pufr, 2.9mM KCl, 137mM NaCl, pH 7,4),

**PBNa** (10mM fosfátový pufr, 2.9mM KCl, 0,75M NaCl, pH 7,4).

### Oligonukleotidy:

Biotinovaný deoxyribooligonukleotid se sekvencí

biotin-(TEG)<sub>2</sub>-5'-d(CAG TGT GGA AAA TCT CTA GCA GT)-3' (**BdO<sub>23</sub>**),

**dT<sub>23</sub>**,

**dA<sub>23</sub>**

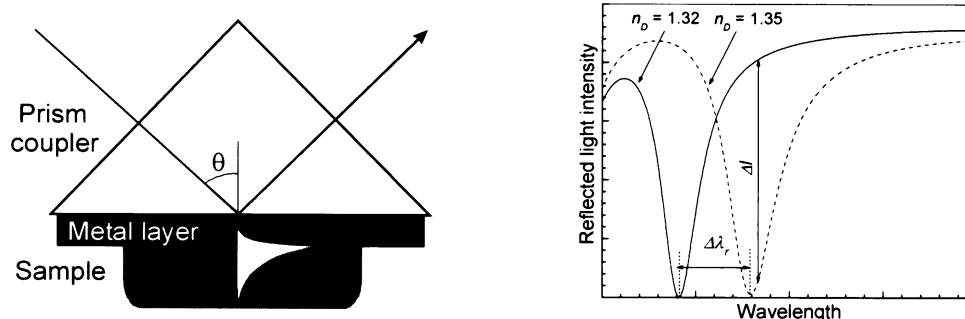
a komplementární vlákno 5'-d(ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAC TG)- 3' (**CdO<sub>23</sub>**)

byly zakoupeny u Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně, ČR, Oddělení funkční genomiky a proteomiky.

## **3.2. SPR biosenzor**

Povrchový plazmon je speciální vlna, kterou lze excitovat na rozhraní kovu (nejčastěji se používá zlato) a dielektrika, šíří se v rovině rozhraní a amplituda jejího pole exponenciálně klesá směrem od zlatého povrchu do dielektrického média (penetrační hloubka povrchového plazmonu je podle použitého kovu a dielektrika 200 – 400 nm). Excitace povrchového plazmonu na principu konfigurace totálního odrazu (ATR) s využitím optického hranolu jako vazebného prvku je jedním z nejčastějších způsobů excitace. V takových SPR senzorech (s modulací vlnové délky) dopadá na tenký kovový film svazek polychromatického záření pod pevným úhlem dopadu a excituje povrchový plazmon (viz obr. 15 vlevo, str. 23). Konstanta šíření povrchového plazmonu je pak měřena podle intenzity odraženého záření v širším spektru vlnových délek, přičemž pro vlnovou délku, pro kterou došlo k převázání energie dopadajícího záření do excitace povrchového plazmonu, pozorujeme charakteristický pokles intenzity (viz obr. 15 vpravo, str. 23). Posun rezonanční vlnové délky je přímo úměrný povrchové koncentraci biomolekul

zachycených na povrchu senzoru a může být na tuto koncentraci vhodnou kalibrací převeden.

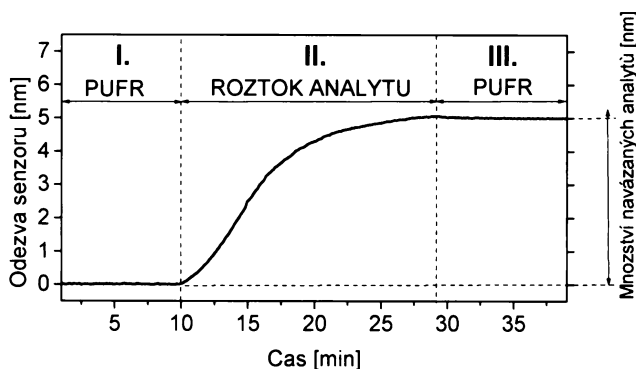


Obr. 15. Excitace povrchového plazmonu s využitím optického hranolu jako vazebného členu (vlevo). Intenzita odraženého světla jako funkce vlnové délky pro fixní úhel dopadu - zobrazené křivky odpovídají dvěma různým indexům lomu dielektrika (vpravo).

Typická odezva SPR senzoru získaná z kontinuálního měření rezonanční vlnové délky v čase odpovídající vazbě analytů na receptory v průtokovém režimu je ukázaná na obr. 16, str. 24. V jednom SPR grafu je možné rozlišit tyto tři fáze detekce: (I) protékání pufru nebo jiného média podél povrchu senzoru pokrytého receptory, (II) proudění roztoku analytu podél povrchu – pozorujeme tvorbu komplexů s receptory, (III) protékání pufru nebo jiného média podél povrchu senzoru – můžeme pozorovat disociaci komplexů (viz obr. 16, str. 24). Tvar křivky je závislý na velikosti molekul analytu, vstupní koncentraci analytu, počtu dostupných vazebných míst na povrchu, rychlosti průtoku, rozměrech průtokové komory a na afinitě páru receptor-analyt [71].

Pro své experimenty jsem využila čtyřkanálový senzor s modulací vlnové délky vyvinutý v Oddělení optických senzorů Ústavu fotoniky a elektroniky Akademie věd [72]. Polychromatické záření z halogenové lampy, které bylo zkolimované a polarizované, dopadalo na vlastní sensorovou část skládající se z optického hranolu a skleněného čipu pokrytého tenkým titanovým filmem ( $\sim 2$  nm) a vrstvou zlata ( $\sim 55$  nm). Po dopadu světlo excitovalo povrchový plazmon ve čtyřech různých místech na zlatém čipu. Odražené světlo bylo odvedeno čtyřmi optickými vlákny do čtyřkanálového spektrografu. Spektra byla analyzována v reálném čase s pomocí speciálního softwaru s vyhodnocováním

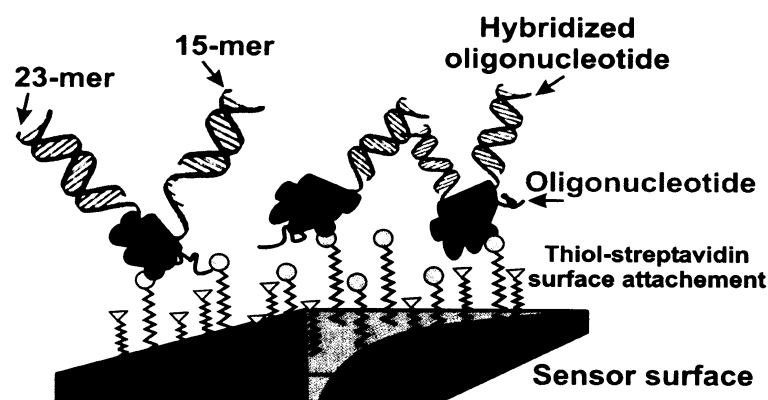
rezonanční vlnové délky nezávisle pro každý kanál [73]. Pro přivedení vzorků k povrchu senzoru byla použita peristaltická pumpa (Ismatech, Švýcarsko).



Obr. 16. Typická odezva SPR senzoru odpovídající kontinuálnímu měření vazby analytů na povrch senzoru pokrytého receptory. V první fázi je povrch senzoru promýván pufrům (I.), dále po aplikaci roztoku analytu je monitorována tvorba biomolekulárních komplexů (II.), ve třetí fázi je povrch senzoru opět promýván pufrům. Počet navázaných analytů může být určen z rozdílu odezev pufru před a po protékání roztoku analytu.

### 3.3. Funkcionalizace SPR senzoru

K funkcionalizaci senzoru jsem použila kovalentním uchycení streptavidinu na alkylthiolátovou vrstvu vytvořením amidové vazby mezi primární aminovou skupinou lysinu nebo argininu a koncovou karboxylovou skupinou thiolů a následně vazbou biotinovaného oligonukleotidu [74] (viz obr. 17, str. 25). Streptavidin je tetramerní protein (60 kDa) získaný z bakterie *Streptomyces Avidinii*, který vytváří velice pevnou vazbu s molekulou biotinu. Disociační konstanta komplexu streptavidin - biotin je řádově  $10^{-15}$  mol/l, což je jedna z nejsilnějších známých nekovalentních interakcí. Každá molekula streptavidinu obsahuje čtyři vazebné „kapsy“ pro biotin.



Obr. 17. Uchycení oligonukleotidů na povrch SPR biosenzoru.

Směs alkylthiolů (řetězce  $C_{11}$  a  $C_{16}$ ) byla rozpuštěna v poměru 7:3 v absolutním ethanolu (celková koncentrace thiolů byla 1mM). Očištěné čipy byly ponořeny do roztoku s thiolu, 10 min inkubovány při teplotě 40 °C, a poté uskladněny na tmavém místě při pokojové teplotě nejméně na 24 hod. Po této době byly čipy opláchnuty etanolem a osušeny čistým dusíkem. Koncové karboxylové skupiny byly aktivovány pomocí TSTU rozpuštěného v DMF o koncentraci 2 mg/ml a třepáním na třepáče asi 2 hodiny. Po aktivaci byly čipy opláchnuty ethanolem, opět osušeny dusíkem a ihned použity v SPR biosenzoru.

Uchycení receptorů probíhalo *in situ* při průtokové rychlosti 30 $\mu$ l/min. Po krátkodobém protékání sodiumacetátového pufru (SA) (dokud se neustálila odezva senzoru) byl k povrchu senzoru přiveden na 20 minut roztok SA pufru a streptavidinu o koncentraci 50 $\mu$ g/ml a následně opět pufr SA. Poté podél povrchu protékal pufr PBNa s vysokou iontovou silou (k odmytí nekovalentně uchycených ligandů) a dále puftrem SA a puftrem PBS, dokud se neustálila odezva senzoru. Na závěr funkcionalizace byl povrch senzoru na 15 minut inkubován v roztoku 50nM biotinovaných oligonukleotidů a nakonec opět v PBS pufru.

### 3.4. Detekce hybridizace oligonukleotidů

Hybridizační reakce probíhaly při průtokové rychlosti 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Všechna měření byla provedena při teplotě 25°C.

Detekce hybridizace: PBS pufr protékal podél povrchu senzoru, dokud se neustálila odezva senzoru. Poté byl k povrchu senzoru na 15 minut přiveden vzorek komplementárního oligonukleotidu  $\text{CdO}_{23}$  v PBS pufru (koncentrace 50nM), a poté byl vystřídán pufrem PBS.

Test specifity: PBS pufr protékal podél povrchu senzoru, dokud se neustálila odezva senzoru. Poté jednotlivými kanály 15 minut protékly vzorky s oligonukleotidy  $\text{CdO}_{23}$ ,  $\text{dT}_{23}$  a  $\text{dA}_{23}$  (všechny o koncentraci 50nM) v PBS pufru následovány čistým pufrem PBS.

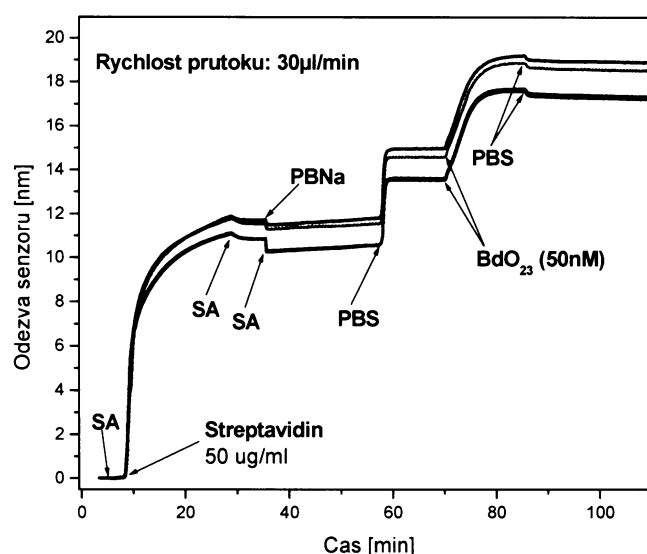
Kalibrační křivka: Po ustálení odezvy senzoru v PBS pufru byl povrch inkubován po dobu 15-ti minut v roztoku  $\text{CdO}_{23}$  o koncentracích 5, 20, 50, 150, 200 a 2000 nM.

Regenerace povrchu: Po ustálení odezvy senzoru v PBS pufru byl povrch inkubován po dobu 15-ti minut v roztoku  $\text{CdO}_{23}$  (koncentrace 10nM, 20nM) a následně v PBS pufru. Dále byla aplikována 1%  $\text{HCOOH}$  (3 minuty), a poté opět pufr PBS.

#### 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Všechna získaná data jsem zpracovala v programu Origin.

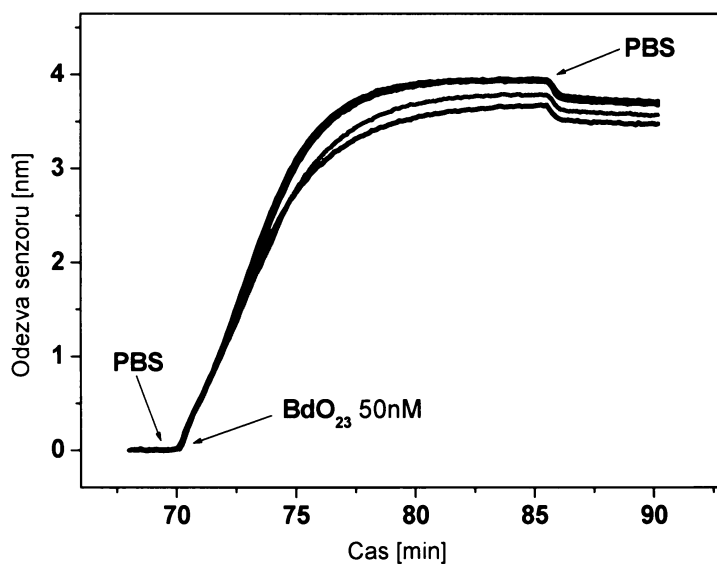
Biotinované nukleotidy jsem na povrch senzoru ukotvila pomocí vazby na streptavidin. Typická odezva senzoru na vazbu biotinovaných oligonukleotidů na streptavidin je ukázána na obr. 18. Průměrná odezva senzoru na vazbu streptavidinu o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  byla  $10,9 \pm 0,5$  nm. Tato hodnota byla vypočtena z odezvy 16 nezávislých kanálů.



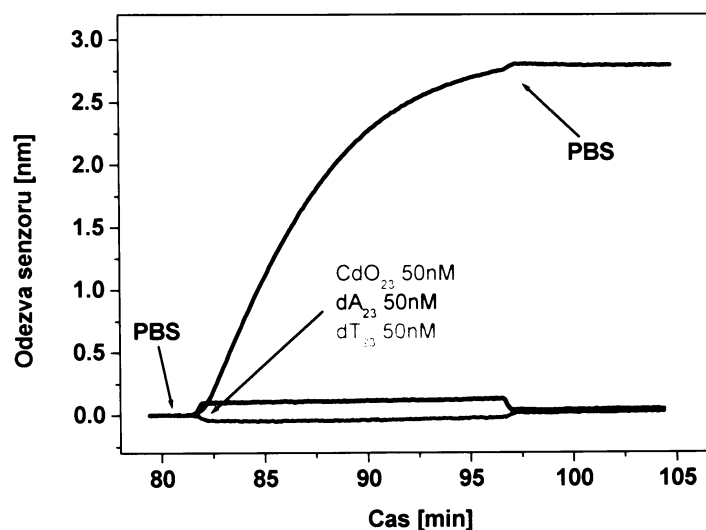
Obr. 18. Odezva senzoru na vazbu  $\text{BdO}_{23}$  na streptavidin imobilizovaný na povrchu senzoru.

Odezva senzoru na vazbu  $\text{BdO}_{23}$  na streptavidin imobilizovaný na povrchu senzoru je zobrazena na obr. 19, str. 28. Průměrná odezva senzoru na vazbu 50 nM  $\text{BdO}_{23}$  byla  $3,7 \pm 0,1$  nm. Tato hodnota byla vypočtena z odezvy 12 nezávislých kanálů. Vlákna  $\text{BdO}_{23}$  a  $\text{CdO}_{23}$  jsou plně komplementární a jejich interakce je vysoce specifická. Jak ukazuje obr. 20, str. 28, homomerní (obsahují pouze jeden typ báze) vlákna  $\text{dT}_{23}$  a  $\text{dA}_{23}$  se na povrch pokrytý heteromerním (obsahuje více než jeden typ báze)  $\text{BdO}_{23}$  nevážou. Pokud porovnáme odezvu senzoru na vazbu  $\text{BdO}_{23}$  zkalibrovanou na jednotný počet receptorů uchycených na povrchu a odezvu na komplementární  $\text{CdO}_{23}$ , vidíme, že

stechiometrie komplexu je přibližně 1:1. To potvrzuje předpoklad tvorby duplexu mezi těmito dvěma vlákny. Úspěšnost hybridizační reakce (tzn. procento navázaných ligandů, kteří se účastní tvorby komplexu) byla vyšší než 82 %. Tato hodnota je vyšší než hodnoty účinností hybridizace pozorované metodou SPR uvedené v literatuře [75, 76].

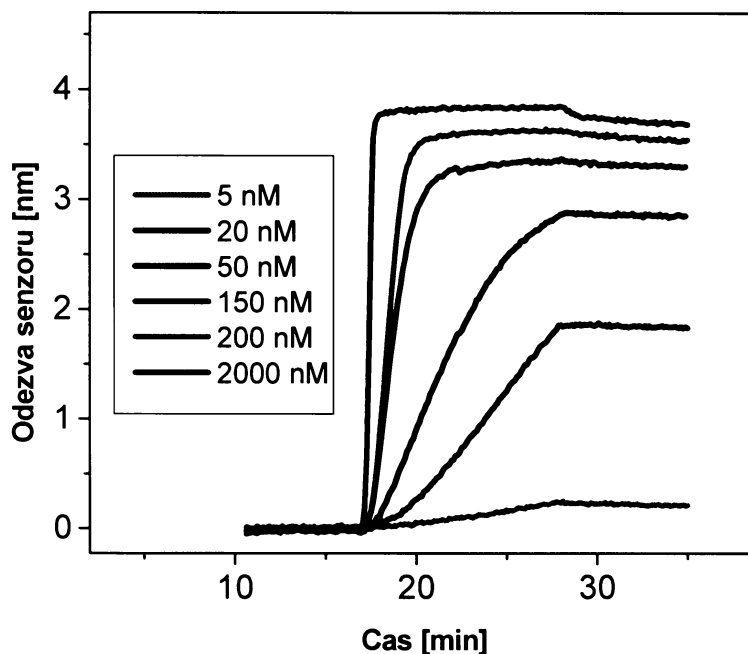


Obr. 19. Odezva senzoru odpovídající vazbě BdO<sub>23</sub> na streptavidin získaná ze čtyř nezávislých kanálů.

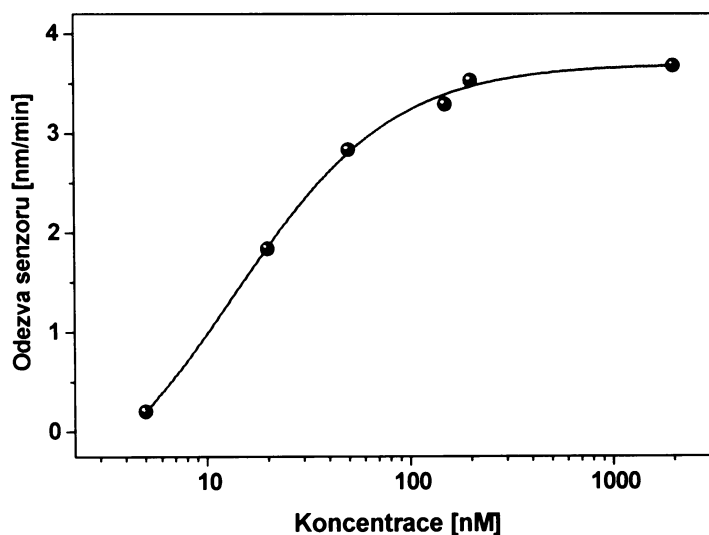


Obr. 20. Odezva senzoru ukazující specifickou vazbu CdO<sub>23</sub> na BdO<sub>23</sub>.

Na obr. 21 je zobrazena detekce různých koncentrací komplementárního oligonukleoditu  $\text{CdO}_{23}$ . Jak je patrné z obr. 21, k vysycení vazebných míst pro receptory postačuje koncentrace 150 nM. Ze směrnic lineárních částí křivek pro jednotlivé koncentrace jsem získala kalibrační křivku (obr. 22).

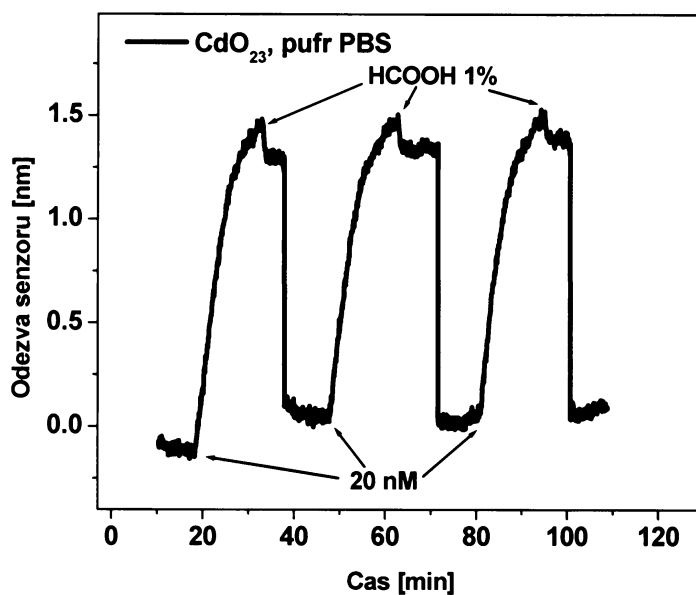


Obr. 21. Odezva senzoru odpovídající vazbě  $\text{CdO}_{23}$  na  $\text{BdO}_{23}$  imobilizované na povrchu senzoru při různých koncentracích  $\text{CdO}_{23}$ .



Obr. 22. Kalibrační křivka senzoru





Obr. 23. Odezva senzoru na regeneraci povrchu.

Obr. 23 ukazuje tři regenerační cykly povrchu. Působením 1% HCOOH se narušily vazby mezi komplementárními oligonukleotidy a na povrchu zůstala pouze vlákna B<sub>d</sub>O<sub>23</sub>. Biologická aktivita B<sub>d</sub>O<sub>23</sub> zůstala zachovaná, protože odezva senzoru na vazbu stejné koncentrace CdO<sub>23</sub> po každém regeneračním kroku zůstává stejná. Nedochází ke ztrátě citlivosti senzoru.

SPR biosenzor umožňuje citlivou detekci hybridizace nukleotidů v reálném čase. Imobilizace receptorů (biotinovaných oligonukleotidů) na povrch senzoru pomocí vazby streptavidinu na alkythiolátovou vrstvu zajistila dostatečný počet receptorů pro dosažení vysoké úspěšnosti hybridizace. Použitím uvedeného postupu lze detekovat subnanomolární koncentrace oligonukleotidů. Povrch senzoru je regenerovatelný, proto lze senzor opakovaně použít beze ztráty jeho citlivosti.

## 5. ZÁVĚR

Vypracovala jsem rešerši na téma optické biosenzory a studium biomolekulárních interakcí. Popsala jsem jednotlivé typy biosenzorů, jejich instrumentaci a využití pro pozorování molekulárních mechanismů. Podrobněji jsem se věnovala bezznačkovým optickým afinitním biosenzorům založených na spektroskopii vedených vln.

Seznámila jsem se s metodou a instrumentací senzorů s povrchovými plazmony (SPR) a navrhla experiment, kdy jsem pozorovala hybridizaci komplementárních vláken deoxyribooligonukleotidů. Po provedení experimentů jsem zpracovala a interpretovala získaná data, vytvořila kalibrační křivku senzoru a určila úspěšnost hybridizace, která byla vyšší než 82 %.

V budoucnu bych se dále chtěla věnovat práci s SPR senzory a prohloubit znalosti této experimentální techniky v oblasti nanotechnologií nebo multikanálové detekce. Ráda bych se věnovala detailnějšímu studiu interakcí nukleových kyselin, zkoumání kinetických parametrů jejich hybridizace a tvorby triplexů.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

1. Blohm, D.H., Guiseppi-Elie, A.: New developments in microarray technology, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, p. 41-47 (2001).
2. Wang, N., He, M., Shi, H.C.: Novel indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to detect Total E-coli in water environment, *Anal. Chim. Acta.* **590**, p. 224-231 (2007).
3. Chu, X., Duan, D.X., Shen, G.L., Yu, R.Q.: Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode, *Talanta.* **71**, p. 2040-2047 (2007).
4. Eggenstein, C., Borchardt, M., Diekmann, C., Grundig, B., Dumschat, C., Cammann, K., Knoll, M., Spener, F.: A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer, *Biosens. Bioelectron.* **14**, p. 33-41 (1999).
5. Wang, X.J., Dzyadevych, S.V., Chovelon, J.M., Renault, N.J., Ling, C., Xia, S.Q., Zhao, J.F.: Conductometric nitrate biosensor based on methyl viologen/Nafion (R)/nitrate reductase interdigitated electrodes, *Talanta.* **69**, p. 450-455 (2006).
6. Park, I.S., Kim, N.: Thiolated Salmonella antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal, *Biosens. Bioelectron.* **13**, p. 1091-1097 (1998).
7. Saber, R., Mutlu, S., Piskin, E.: Glow-discharge treated piezoelectric quartz crystals as immunosensors for HSA detection, *Biosens. Bioelectron.* **17**, p. 727-734 (2002).
8. Susmel, S., Toniolo, R., Pizzariello, A., Dossi, N., Bontempelli, G.: A piezoelectric immunosensor based on antibody entrapment within a non-totally rigid polymeric film, *Sens. Actuators, B.* **111**, p. 331-338 (2005).
9. Uttenthaler, E., Kosslinger, C., Drost, S.: Characterization of immobilization methods for African swine fever virus protein and antibodies with a piezoelectric immunosensor, *Biosens. Bioelectron.* **13**, p. 1279-1286 (1998).
10. Meyer, M.H.F., Stehr, M., Bhujju, S., Krause, H.J., Hartmann, M., Miethe, P., Singh, M., Keusgen, M.: Magnetic biosensor for the detection of *Yersinia pesos*, *J. Microbiol. Methods.* **68**, p. 218-224 (2007).

11. Lerchner, J., Wolf, A., Wolf, G., Baier, V., Kessler, E., Nietzsche, M., Krugel, M.: A new micro-fluid chip calorimeter for biochemical applications, *Thermochim. Acta.* **445**, p. 144-150 (2006).
12. Xie, B., Ramanathan, K., Danielsson, B.: Mini/micro thermal biosensors and other related devices for biochemical/clinical analysis and monitoring, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **19**, p. 340-349 (2000).
13. Anderson, G.P., Jacoby, M.A., Ligler, F.S., King, K.D.: Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **12**, p. 329-336 (1997).
14. Fang, Y., Ferrie, A.M., Li, G.S.: Cellular functions of cholesterol probed with optical biosensors, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1763**, p. 254-261 (2006).
15. Choi, S.H., Lee, J.W., Sim, S.J.: Enhanced performance of a surface plasmon resonance immunosensor for detecting Ab-GAD antibody based on the modified self-assembled monolayers, *Biosens. Bioelectron.* **21**, p. 378-383 (2005).
16. Tschmelak, J., Proll, G., Gauglitz, G.: Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example, *Talanta.* **65**, p. 313-323 (2005).
17. Tsai, H.C., Doong, R.A.: Simultaneous determination of pH, urea, acetylcholine and heavy metals using array-based enzymatic optical biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **20**, p. 1796-1804 (2005).
18. Lanyon, Y.H., Marrazza, G., Tothill, L.E., Mascini, M.: Benzene analysis in workplace air using an FIA-based bacterial biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **20**, p. 2089-2096 (2005).
19. Kroger, K., Jung, A., Reder, S., Gauglitz, G.: Versatile biosensor surface based on peptide nucleic acid with label free and total internal reflection fluorescence detection for quantification of endocrine disruptors, *Anal. Chim. Acta.* **469**, p. 37-48 (2002).
20. Li, X.M., Ju, H.Q., Ding, C.F., Zhang, S.S.: Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator, *Anal. Chim. Acta.* **582**, p. 158-163 (2007).
21. Rogers, K.R.: Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta.* **568**, p. 222-231 (2006).

22. Katz, E., Helegshabtai, V., Willner, B., Willner, I., Buckmann, A.F.: Electrical contact of redox enzymes with electrodes: Novel approaches for amperometric biosensors, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **42**, p. 95-104 (1997).
23. Myszka, D.G.: Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology, *Anal. Biochem.* **329**, p. 316-323 (2004).
24. Abel, P.U., Von Woedtke, T.: Biosensors for in vivo glucose measurement: can we cross the experimental stage, *Biosens. Bioelectron.* **17**, p. 1059-1070 (2002).
25. Vaisocherová, H., Mrkvová, K., Pilarik, M., Jinoch, P., Šteinbachová, M., Homola, J.: Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus, *Biosens. Bioelectron.* **22**, p. 1020-1026 (2007).
26. Verma, N., Singh, M.: A disposable microbial based biosensor for quality control in milk, *Biosens. Bioelectron.* **18**, p. 1219-1224 (2003).
27. Golden, J.P., Taitt, C.R., Shriver-Lake, L.C., Shubin, Y.S., Ligler, F.S.: A portable automated multianalyte biosensor, *Talanta.* **65**, p. 1078-1085 (2005).
28. Altamirano, M., Garcia-Villada, L., Agrelo, M., Sanchez-Martin, L., Martin-Otero, L., Flores-Moya, A., Rico, M., Lopez-Rodas, V., Costas, E.: A novel approach to improve specificity of algal biosensors using wild-type and resistant mutants: an application to detect TNT, *Biosens. Bioelectron.* **19**, p. 1319-1323 (2004).
29. Proll, G., Kumpf, M., Mehlmann, M., Tschmelak, J., Griffith, H., Abuknesha, R., Gauglitz, G.: Monitoring an antibody affinity chromatography with a label-free optical biosensor technique, *J. Immunol. Methods.* **292**, p. 35-42 (2004).
30. Chouteau, C., Dzyadevych, S., Chovelon, J.M., Durrieu, C.: Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae, *Biosens. Bioelectron.* **19**, p. 1089-1096 (2004).
31. Rainina, E.I., Efremenco, E.N., Varfolomeyev, S.D., Simonian, A.L., Wild, J.R.: The development of a new biosensor based on recombinant E-coli for the direct detection of organophosphorus neurotoxins, *Biosens. Bioelectron.* **11**, p. 991-1000 (1996).
32. Bunde, R.L., Jarvi, E.J., Rosentreter, J.J.: Piezoelectric quartz crystal biosensors, *Talanta.* **46**, p. 1223-1236 (1998).
33. Chang, S.M., Muramatsu, H., Nakamura, C., Miyake, J.: The principle and applications of piezoelectric crystal sensors, *Mater. Sci. Eng., C.* **12**, p. 111-123 (2000).

34. Adányi, N., Váradi, M., Kim, N., Szendrő, I.: Development of new immunosensors for determination of contaminants in food, *Curr. Appl. Phys.* **6**, p. 279-286 (2006).
35. Pohanka, M., Pavlis, O., Skládal, P.: Diagnosis of tularemia using piezoelectric biosensor technology, *Talanta*. **71**, p. 981-985 (2007).
36. Harborn, U., Xie, B., Venkatesh, R., Danielsson, B.: Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood, *Clin. Chim. Acta*. **267**, p. 225-237 (1997).
37. Drapp, B., Piehler, J., Brecht, A., Gauglitz, G., Luff, B.J., Wilkinson, J.S., Ingenhoff, J.: Integrated optical Mach-Zehnder interferometers as simazine immunoprobes, *Sens. Actuators, B*. **39**, p. 277-282 (1997).
38. Lin, S.M., Lee, C.K., Lin, Y.H., Lee, S.Y., Sheu, B.C., Tsai, J.C., Hsu, S.M.: Homopolyvalent antibody-antigen interaction kinetic studies with use of a dual-polarization interferometric biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **22**, p. 715-721 (2006).
39. Schmitt, K., Schirmer, B., Hoffmann, C., Brandenburg, A., Meyrueis, P.: Interferometric biosensor based on planar optical waveguide sensor chips for label-free detection of surface bound bioreactions, *Biosens. Bioelectron.* **22**, p. 2591-2597 (2007).
40. Homola, J., Dostálek, J., Chen, S.F., Rasooly, A., Jiang, S.Y., Yee, S.S.: Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk, *Int. J. Food Microbiol.* **75**, p. 61-69 (2002).
41. Baldini F., C.A.N., Homola J., Martellucci S.: Optical Chemical Sensors. Springer, Netherlands (2006). :
42. Nuzzo, R.G., Allara, D.L.: Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, p. 4481-4483 (1983).
43. Johnsson, B., Lofas, S., Lindquist, G.: Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface-Plasmon Resonance Sensors, *Anal. Biochem.* **198**, p. 268-277 (1991).
44. Oshannessy, D.J., Brighamburke, M., Peck, K.: Immobilization Chemistries Suitable for Use in the Biacore Surface-Plasmon Resonance Detector, *Anal. Biochem.* **205**, p. 132-136 (1992).
45. Koubová, V., Brynda, E., Karasová, L., Škvor, J., Homola, J., Dostálek, J., Tobiška, P., Rošický, J.: Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors, *Sens. Actuators, B*. **74**, p. 100-105 (2001).

46. Busse, S., Scheumann, V., Menges, B., Mittler, S.: Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods, *Biosens. Bioelectron.* **17**, p. 704-710 (2002).
47. Tombelli, S., Mascini, M., Turner, A.P.F.: Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals, *Biosens. Bioelectron.* **17**, p. 929-936 (2002).
48. Ladd, J., Boozer, C., Yu, Q.M., Chen, S.F., Homola, J., Jiang, S.: DNA-directed protein immobilization on mixed self-assembled monolayers via a Streptavidin bridge, *Langmuir.* **20**, p. 8090-8095 (2004).
49. Knoll, W., Liley, M., Piscevic, D., Spinke, J., Tarlov, M.J.: Supramolecular architectures for the functionalization of solid surfaces, *Adv. Biophys.* **34**, p. 231-251 (1996).
50. Jung, L.S., Nelson, K.E., Stayton, P.S., Campbell, C.T.: Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers, *Langmuir.* **16**, p. 9421-9432 (2000).
51. Smith, R.K., Lewis, P.A., Weiss, P.S.: Patterning self-assembled monolayers, *Prog. Surf. Sci.* **75**, p. 1-68 (2004).
52. Rasooly, L., Rasooly, A.: Real time biosensor analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food, *Int. J. Food Microbiol.* **49**, p. 119-127 (1999).
53. Shankaran, D.R., Gobi, K.V., Sakai, T., Matsumoto, K., Toko, K., Miura, N.: Surface plasmon resonance immunosensor for highly sensitive detection of 2,4,6-trinitrotoluene, *Biosens. Bioelectron.* **20**, p. 1750-1756 (2005).
54. Rich, R.L., Myszka, D.G.: Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature, *J. Mol. Recognit.* **19**, p. 478-534 (2006).
55. Yan, Y.L., Liu, Y.Z., Sorci, M., Belfort, G., Lustbader, J.W., Yan, S.S., Wang, C.Y.: Surface plasmon resonance and nuclear magnetic resonance studies of ABAD-A beta interaction, *Biochemistry.* **46**, p. 1724-1731 (2007).
56. Hendrix, M., Priestley, E.S., Joyce, G.F., Wong, C.H.: Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, p. 3641-3648 (1997).
57. Shumaker-Parry, J.S., Zareie, M.H., Aebersold, R., Campbell, C.T.: Microspotting streptavidin and double-stranded DNA Arrays on gold for high-throughput studies

- of protein-DNA interactions by surface plasmon resonance microscopy, *Anal. Chem.* **76**, p. 918-929 (2004).
58. Casper, D., Bukhtiyarova, M., Springman, E.B.: A Biacore biosensor method for detailed kinetic binding analysis of small molecule inhibitors of p38 alpha mitogen-activated protein kinase, *Anal. Biochem.* **325**, p. 126-136 (2004).
59. Shuman, C.F., Markgren, P.O., Hämäläinen, M., Danielson, U.H.: Elucidation of HIV-1 protease resistance by characterization of interaction kinetics between inhibitors and enzyme variants, *Antiviral Res.* **58**, p. 235-242 (2003).
60. Tsoi, P.Y., Yang, M.S.: Surface plasmon resonance study of the molecular recognition between polymerase and DNA containing various mismatches and conformational changes of DNA-protein complexes, *Biosens. Bioelectron.* **19**, p. 1209-1218 (2004).
61. Lippa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W.: Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta.* **314**, p. 1-26 (2001).
62. Adamczyk, M., Moore, J.A., Yu, Z.G.: Application of surface plasmon resonance toward studies of low-molecular-weight antigen-antibody binding interactions, *Methods.* **20**, p. 319-328 (2000).
63. Campagnolo, C., Meyers, K.J., Ryan, T., Atkinson, R.C., Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Ritter, G., Old, L.J., Batt, C.A.: Real-Time, label-free monitoring of tumor antigen and serum antibody interactions, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **61**, p. 283-298 (2004).
64. Persson, B., Stenhag, K., Nilsson, P., Larsson, A., Uhlen, M., Nygren, P.A.: Analysis of oligonucleotide probe affinities using surface plasmon resonance: A means for mutational scanning, *Anal. Biochem.* **246**, p. 34-44 (1997).
65. Bates, P.J., Reddoch, J.F., Hansakul, P., Arrow, A., Dale, R., Miller, D.M.: Biosensor detection of triplex formation by modified oligonucleotides, *Anal. Biochem.* **307**, p. 235-243 (2002).
66. Vaisocherová, H., Zítová, A., Lachmanová, M., Štěpánek, J., Králíková, S., Liboska, R., Rejman, D., Rosenberg, I., Homola, J.: Investigating oligonucleotide hybridization at subnanomolar level by surface plasmon resonance biosensor method, *Biopolymers.* **82**, p. 394-398 (2006).



67. Nordgren, S., Slagter-Jager, J.G., Wagner, E.G.H.: Real time kinetic studies of the interaction between folded antisense and target RNAs using surface plasmon resonance, *J. Mol. Biol.* **310**, p. 1125-1134 (2001).
68. Koval, V.V., Gnedenko, O.V., Ivanov, Y.D., Fedorova, O.S., Archakov, A.I., Knorre, D.G.: Real-time oligonucleotide hybridization kinetics monitored by resonant mirror technique, *Iubmb Life.* **48**, p. 317-320 (1999).
69. Zhao, Y., Kan, Z.Y., Zeng, Z.X., Hao, Y.H., Chen, H., Tan, Z.: Determining the folding and unfolding rate constants of nucleic acids by biosensor. Application to telomere G-quadruplex, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, p. 13255-13264 (2004).
70. Sugimoto, N., Wu, P., Hara, H., Kawamoto, Y.: pH and cation effects on the properties of parallel pyrimidine motif DNA triplexes, *Biochemistry.* **40**, p. 9396-9405 (2001).
71. Myszka, D.G.: Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors, *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, p. 50-57 (1997).
72. Homola, J., Lu, H.B.B., Nenninger, G.G., Dostálek, J., Yee, S.S.: A novel multichannel surface plasmon resonance biosensor, *Sens. Actuators, B.* **76**, p. 403-410 (2001).
73. Nenninger, G.G., Piliarik, M., Homola, J.: Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface plasmons, *Meas. Sci. Technol.* **13**, p. 2038-2046 (2002).
74. Lahiri, J., Isaacs, L., Tien, J., Whitesides, G.M.: A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on an active ester as a common reactive intermediate: A surface plasmon resonance study, *Anal. Chem.* **71**, p. 777-790 (1999).
75. Su, X.D., Wu, Y.J., Robelek, R., Knoll, W.: Surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance study of streptavidin film structure effects on biotinylated DNA assembly and target DNA hybridization, *Langmuir.* **21**, p. 348-353 (2005).
76. Yang, N., Su, X.D., Tjong, V., Knoll, W.: Evaluation of two- and three-dimensional streptavidin binding platforms for surface plasmon resonance spectroscopy studies of DNA hybridization and protein-DNA binding, *Biosens. Bioelectron.* **22**, p. 2700-2706 (2007).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

<b>Jméno, příjmení, adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>