

БИОСЕНЗОРИ С ЕЛЕКТРОХИМИЧНО ПРЕОБРАЗУВАНЕ НА СИГНАЛА I. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНИ СЕНЗОРИ

ВАЛЕРИ КОЧЕВ

*Катедра „Атомна физика“, Физически факултет
Софийски университет „Св. Климент Охридски“*

Валери Кочев. БИОСЕНЗОРИ С ЕЛЕКТРОХИМИЧНО ПРЕОБРАЗУВАНЕ НА СИГНАЛА. I. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНИ СЕНЗОРИ

В работата е направен преглед на онази част от биосензорите, които използват електрохимични методи за преобразуване на сигнала. Като начало са разгледани основните елементи на биосензорите, принципите на тяхното действие и областите на приложение. По-нататък вниманието е фокусирано върху организацията на детектиращата част на сензора, като са посочени някои перспективи за бъдещо развитие. Накрая са дискутирани потенциометрични схеми на биосензорен анализ.

Valery Kochev. BIOSENSORS WITH ELECTROCHEMICAL TRANSDUCTION. I. POTENTIOMETRIC SENSORS

The work is devoted to biosensors with electrochemical signal transduction. In this first part, the attention is focused on the potentiometric sensors. The basic concepts, main parts, as well as the areas of biosensors employment are considered at the beginning. The most common principles in the design of this type of sensors and popular constructions are then reviewed.

Key words: potentiometric biosensors, molecular recognition, biomembranes, ENFET

PACS numbers: 87.90.+y

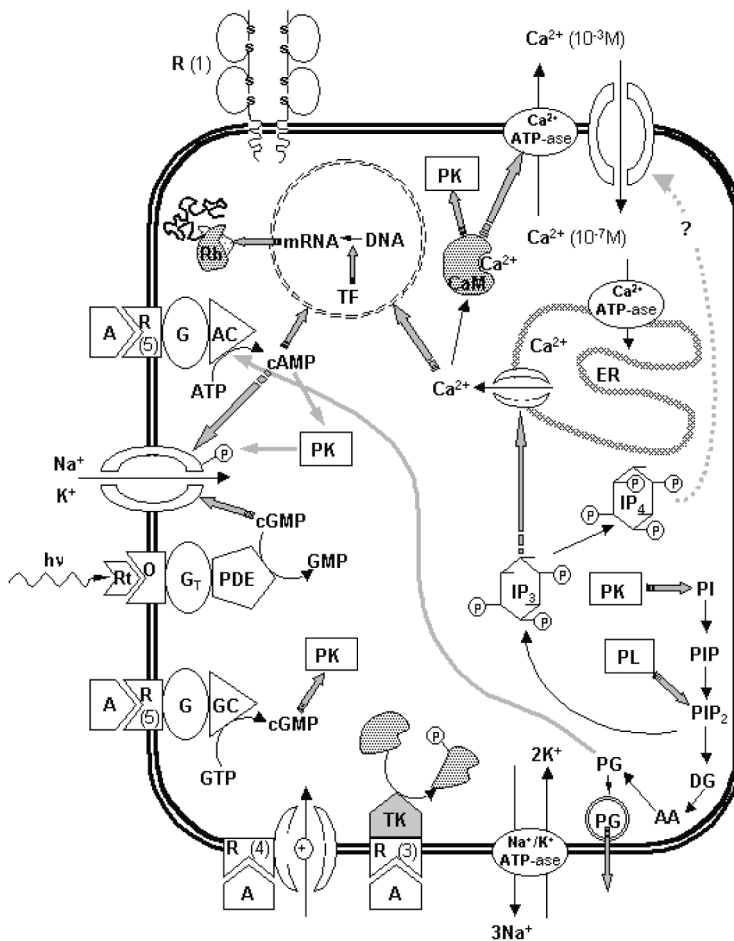
За контакти: Валери Кочев, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Физически факултет, Катедра „Атомна Физика“, бул. „Джеймс Баучер“ 5, 1164 София, България, Тел: + 359 2 8161 317, Факс: +359 2 962 5276, e-mail:vladimirova@phys.uni-sofia.bg

1. УВОД

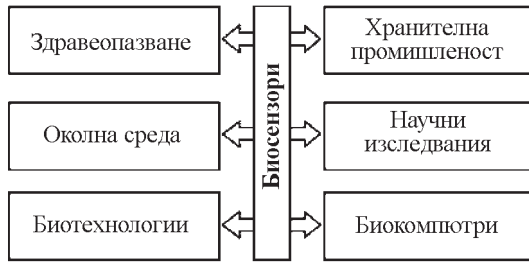
Успешната изява на химичните сензори [1] още преди няколко десетилетия даде път на идеята в тази област да се заимстват принципи от архитектурата и действието на природните сензорни системи [2]. Няма съмнение, че живите организми са снабдени с изключително чувствителни органи за възприятие, позволяващи им добре да се ориентират в заобикалящия ги свят [3]. Достатъчно е да споменем обонянието, способно да улови съединения в следи количества и да различава стереоизомери [4]. От друга страна, регулацията на метаболизма и координирането в дейността на различните части на организма изисква съвършени средства за комуникация. Ето защо клетките поддържат богат арсенал от структури и механизми за химична сигнализация (фиг. 1). Добре известна е тяхната голяма разделителна способност, т.е. високата специфичност на взаимодействията, свойствена например за образуването на комплекси от типа на ензим-субстрат, рецептор-хормон или антиген-антитяло. Нещо повече, може да се каже, че разпознаването на една молекула от друга макромолекула (molecular recognition, **MR**) е една от най-характерните черти в логиката на живата материя (**Molecular Logic of Life**) [5].

Поради техния подчертан афинитет към определени вещества, такива биомолекули, като хеморецептори, ензими или антитела биха могли да служат като естествени високоселективни сензорни елементи. Комбинирането на биологичноактивен детектиращ материал със стандартни физични методи за наблюдение на неговата реакция дава възможност да се използва уникалната чувствителност на биосистемите в съчетание с голяма селективност на разпознавателните процеси.

Усъвършенстването и развитието на нови методи в биохимията и молекулярната биология през последните години, дадоха голям тласък в разработването на биосензори и спомогнаха за утвърждаването им като много перспективна насока в техниките за анализ. Имайки предвид и гамата от решения, които предлага съвременната електроника за регистрация и обработка на сигналите, не е странно, че интересът към тях продължава да нараства. Тази популярност не на последно място се дължи на широкия обхват от приложения на биосензорите (фиг. 2). Той се простира от използването им за решаването на чисто научни проблеми до практическите задачи с технологичен характер. Едно от най-важните им приложения разбира се е в медицината [6]. Голяма част от изследванията по бисензори са насочени към един амбициозен проект по биоелектроника, имащ за цел намирането на ефективни методи, средства и материали за манипулиране на информация, които да са алтернативни на сегашната твърдотелна микроелектроника.

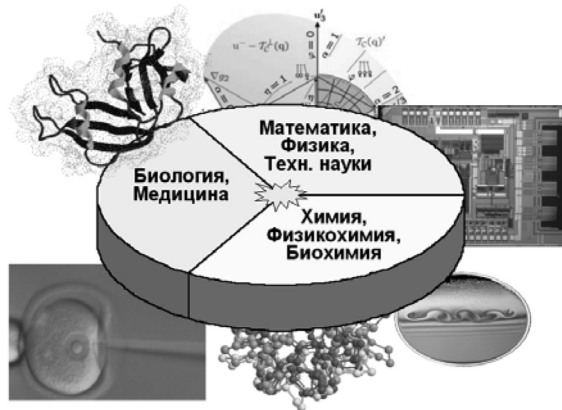


Фиг. 1. Мембранни рецептори, ефекторни системи и вътреклетъчни пътища на химична сигнализация: R(1) – имуноглобулинов тип, R(3) – рецептори/ензими с тирозин-киназна активност, R(4) – рецептори/йонни канали, R(5) – рецептори активиращи G-белтъци, Rt – ретинал, O – опсин (простетична група и апопротеин на родопсина); TK – тирозин киназа, GC – гуанилил циклаза, AC – аденилил циклаза, PDE – фосфодиестераза, GTP – гуанозин трифосфат, cGMP-цикличен гуанозин монофосфат, ATP-Аденозин трифосфат, cAMP-цикличен аденозин монофосфат, PK – протеин киназа, TF – транскрипционни фактори, CaM – калмодулин (Ca^{2+} -свързващ белтък), PL – фосфолипаза, PI – фосфатидилинозитол, PIP – фосфатидилинозитол фосфат, PIP_2 – фосфатидилинозитол-дифосфат, IP_3 – инозитол-трифосфат, DG – диацилглицерол, AA – арахидонова к-на, PG – простагландини, ER – ендоплазматичен ретикулум, Rb – рибозома



Фиг. 2. Приложение на биосензорите

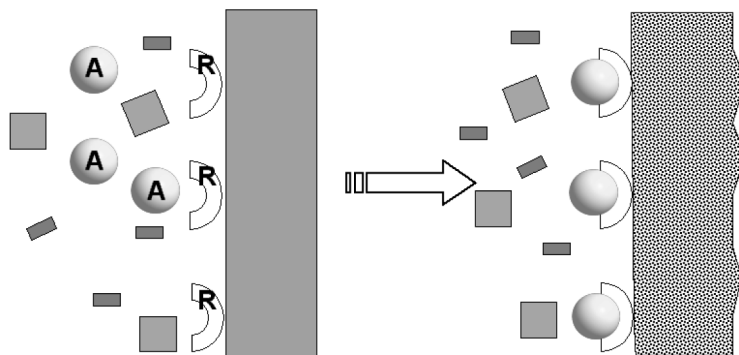
Конструирането на биомиметични устройства (от англ. *biomimetic* – имитиращи, наподобяващи, подражаващи, възпроизвеждащи характерни черти на биосистемите) изисква задълбочени познания по математика, физика, технически науки, химия, биология и медицина (фиг. 3). То очевидно може да бъде успешно само при коопериране на усилията на повече специалисти от всички тези научни направления. Неминуемо обаче, за да се намери общ език, всеки от тях трябва да има достатъчно добър поглед и върху „съседните“ области. Всичко това показва дълбоко нетривиалния характер на такъв род проучвания и огромните трудности, на които те се натъкват дори само в организационен план.



Фиг. 3. Интердисциплинните изследвания по биосензори се водят в контактната зона на области от различни науки

2. БИОСЕНЗОРИ – ОПРЕДЕЛЕНИЕ, ПРИНЦИП НА ДЕЙСТВИЕ И ВИДОВЕ

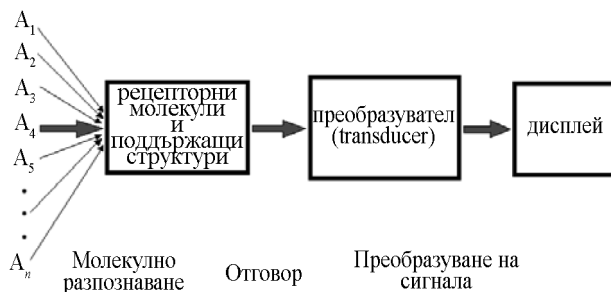
След общите думи за предговор нека се обърнем към някои по-конкретни определения. Според дефиницията на Международния съюз за чиста и приложна химия (**International Union for Pure and Applied Chemistry, IUPAC**) химичният сензор е устройство, трансформиращо информацията за химичните свойства на средата във вид, удобен за аналитични цели. Той обикновено е съставен от *рецепторна част* (детектор) и *преобразувател* (transducer) [7]. Например за потенциометричните йон-селективни електроди (вж. по-долу) ролята на рецептор играе мембраната, където се осъществяват специфичните взаимодействия с аналита. Преобразуването на сигнала пък се извършва с измерването на генерираната потенциална разлика от двете ѝ страни. *Биосензорът* от своя страна е такъв химичен сензор, чиято рецепторна част е изградена на основата на биологични структури и принципи на молекулно разпознаване.



Фиг. 4. Принцип на действие на биосензора. Структурни изменения в детектиращата матрица при свързване с аналита – **микроскопичните** специфични реакции между аналита А и рецепторните молекули R водят до **макроскопични** промени във физикохимичните параметри на детектора, които могат да бъдат регистрирани

И така ясно е, че биосензорите представляват симбиоза на два функционални елемента: 1) *биодатчик* – биологично активна субстанция, която реагира селективно с търсения аналит (Фиг. 4); 2) *преобразувател* – подходяща система, трансформираща рецепторния сигнал-отговор в макро-скопично регистрираща се форма. Съответно действието на тези устройства може да се опише в термини на информационен пренос през тях. Той се състои от две степени (фиг. 5): 1) молекулно разпознаване, MR, и отговор; 2) физичен механизъм за отчитане на измененията в ре-

цепторната част. С други думи, биосензорът може да бъде разглеждан като система, преобразуваща MR.



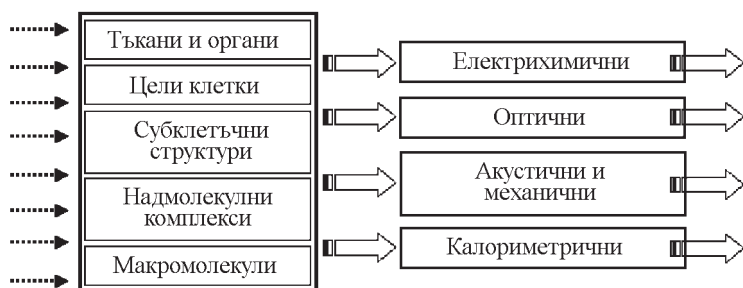
Фиг. 5. Блок-схема на преноса на информация в биосензора

Както казахме, първата стъпка в регистрирането на даден анализ от средата представлява сложният процес на неговото разпознаване на молекулно ниво и свързването му в комплекс от рецепторите на биологичната субстанция. То може да бъде последвано от образуването на нов продукт (както е при ензимния катализ) или от обратимото разпадане на комплекса. В първия случай се говори за *метаболитен* сензор, а във втория – за *биоафинитетен* (табл. 1), където за рецептори се използват антигени или антитела, лектини, апоензими, коферменти, транспортни системи и т. н. В таблицата като рецептори са посочени биомакромолекулите, а като анализи – техните лиганди. Очевидно е обаче, че в някои сензорни конструкции ролите могат да бъдат разменени, т.е. лигандът да служи за рецептор в детектиращата част, а интересуващата ни макромолекула да бъде анализ.

Таблица 1. Видове сензори в зависимост от реакцията рецептор-анализ

| Реакция | Рецептор | Анализ |
|---|----------------------------------|--|
| Биоафинитети $R + A \rightleftharpoons RA$ Нуклеинови сонди (ssDNA, RNA) | Нуклеинови сонди (ssDNA, RNA) | Олигонуклеотид (tDNA, tRNA, ген) |
| | Антитяло | Антиген, хаптен |
| | Апопротеин | Простетична група |
| | Клетъчен рецептор | Лиганд (ароматна мол., хормон, олигозахарид, пептид) |
| Метаболитни $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow P$ | Ензим | Субстрат |

Освен това ясно е, че като детекторен елемент, съдържащ рецепторни молекули, може да се използва биоматериал от различни нива на организация на живата материя (фиг. 6). Всяко едно от тези решения има своите предимства и недостатъци. Например структурите от ниските йерархични нива са трудни за изолиране в нативна форма, но могат да работят продължително време *in vitro* (естествено при подходящи условия) и предлагат дефинирана реакция с анализа. В литературата се срещат реализации на всички посочени варианти, поне като лабораторни образци. Изискванията на клиничната практика са по-сурови, затова само някои от тях се появяват в търговски вид.



Фиг. 6. Биоматериал, използван като детектиращ елемент в рецепторната част на сензора, и основни методи за преобразуване на информацията от молекулярното разпознаване

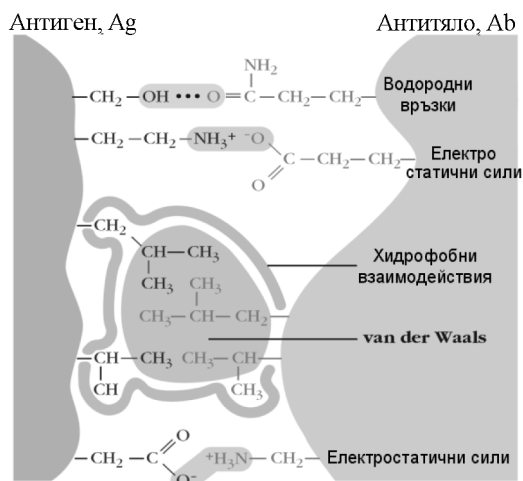
В биологичните изследвания отдавна са намерили широко разпространение редица измерителни процедури, базиращи се на физични принципи от оптиката, електрониката, акустиката, атомната физика и т. н. Поради тяхното непрекъснато развитие може да се каже, че понастоящем аналитичната практика разполага с достатъчно голям спектър от методи и апаратура за отчитане и обработка на данните. Това дава основание проблемите, отнасящи се до усъвършенстване на преобразователния елемент на сензорите, да се считат така или иначе за тривиални. Във фокуса на настоящото представяне стоят по-специално електрохимичните методи, чиито основни техники са добре разработени [8]. Ето защо изглежда оправдано да се обърне по-голямо внимание на организацията на детектора и неговото съгласуване с преобразователя. Тъй-като именно в тази основна част на биосензора се генерира първичният сигнал като отговор на свързването с анализа, очевидно нови удачни решения в нейния дизайн могат да доведат до чувствително подобрение в качеството на крайното изпълнение.

От съществено значение е пространственото оформление на детектиращата част и куплирането на чувствителните молекули с преобразувателя, т.е. начинът на прикрепване на биоматериала към някаква твърдотелна подложка. Това явно засяга в голяма степен ефективността на регистрацията на сигнала, независимо какъв е физичният метод, който се използва за преобразуването му. Главното изискване в тази насока, разбира се, е да се постигне по-стабилно закрепване на биоматериала.

В същото време обаче е необходима известна предпазливост, за да бъдат избегнати нежелателни ограничения в естествените вътрешни движения на макромолекулите. Тъй като рецепторите са предимно с пептидна природа, те се нуждаят от определена степен на свобода, осигуряваща динамика на взаимодействията им с анализа по време на разпознаването. Освен това нативната конформация, оттам и активността, силно се влияе от най-близките молекулни съседи. Това обстоятелство не е маловажно, особено като се вземе предвид, че в повечето случаи детектиращата част на сензора съдържа и някои *спомагателни структури*. Въпреки че те не взимат пряко участие в молекулното разпознаване, тяхната роля в сензорния процес е значителна. Тези елементи изграждат едно подходящо *микрообкръжение* за рецепторните молекули и връзките им с тях са от голямо значение.

От молекулярната биология се знае, че високата специфичност при реакциите от типа на антиген-антитяло, ензим-субстрат, рецептор-хормон и т. н. се дължи преди всичко на *комплементарността* на реагиращите молекули. Именно поради това MR се разглежда като процес на разпознаване на форми (Recognition by shape) [9]. **Трябва да обърнем внимание, че освен пространственото напасване на молекулните групи, определящо се от вандерваалсовите (van der Waals) радиуси, не по-малко важен е видът на силите, участващи в образуването на комплекса (фиг. 7). Свързването става за сметка на слаби нековалентни взаимодействия, които зависят от поведението на електронните обвивки (плътност на разпределение, диполни моменти, поляризуемост).**

В молекулярната биология под термина *нековалентни връзки* се разбират четири типа молекулни взаимодействия: електростатичните (кулонови) сили в разтвор, водородните връзки, вандерваалсовите сили и хидрофобните взаимодействия. Тук искам да припомня някои от най-характерните им черти [10]. **Тяхната потенциална енергия е с един-два порядъка по-ниска от енергията на ковалентните връзки и малко по-висока от топлинното движение при стайни температури. Това означава, че отделните свързвания се рушат стохастично от ударите на околните молекули. За образуването на стабилен комплекс е нужно едновременно дейст-**



Фиг. 7. Нековалентни взаимодействия в Ag-Ab комплекса

вие на голям брой слаби връзки, осъществяващи се по комплементарните повърхности на разпознаващите се молекули (кумулятивен ефект). Освен това, макар потенциалът да спада сравнително бързо с разстоянието ($\sim 1/r^6$ за вандерваалсовите), поради хетерогенност и анизотропност на средата, в която действат, тяхна отличителна особеност е проявата на сумарен ефект на далекодействие, подпомагащ MR.

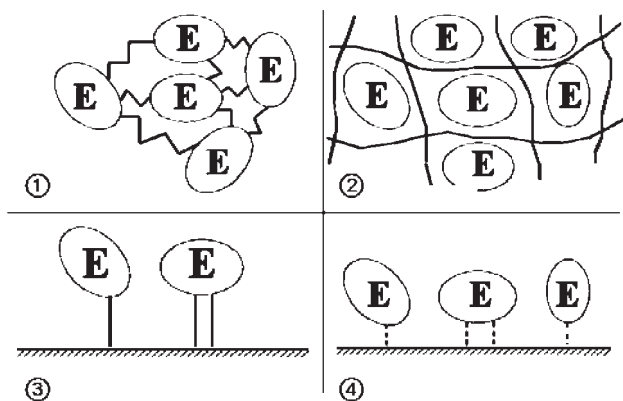
Важността на разискваните проблеми е свързана с въпроса за първичното усилване на сигнала на молекулно ниво. Същественото е, че такава микроскопично събитие като молекулното разпознаване с последващо селективно комплексиране води до промени в състоянието на рецепторната молекула. По-нататък тези промени предизвикват един отговор, който може допълнително да бъде препредаден и усилен от посредници (медиатори), или биомолекулни ефектори. Отгук при всички случаи следва необходимостта за по-близък и по-естествен контакт между молекулите, включени във функционирането на рецептора.

По този начин под въздействието на някакъв стимулант сензорът изработва макроскопичен отговор под формата на промяна в глобалните параметри на системата (като температура, импеданс, поглъщане или излъчване на светлина и т. н.), който може да бъде измерен. Като резултат от взаимодействието на рецепторните молекули с преобразувателя се извършва един преход на сигнала от микро- на макрониво.

От най-общи съображения е ясно, че висока чувствителност на каквато и да е сензорна система може да се осигури само с настъпването на достатъчно големи структурни изменения под действие на външен

стимул (механичен, химичен, електричен и т. н.). Една система, чиято структура е организирана на основата на слаби междумолекулни сили, ще бъде много по-достъпна за конформационни промени, отколкото такава, в която участват здрави връзки (като ковалентни или координационни) между изграждащите я елементи. Последната ще се нуждае от по-голяма енергия на външното въздействие, за да изработи забележими изменения и отгук значим отговор.

От друга страна, въпросните изменения трябва да бъдат обратими, позволявайки на системата да се върне в началното състояние без разрушаване, което налага условието за определена структурна стабилност. По този начин се сблъскваме с две основни концепции, които очевидно са противоречиви. За да се получи едно задоволително решение на издръжлива и в същото време достатъчно чувствителна реална система, е необходим компромис между изискванията за гъвкавост и стабилност на детекторната архитектура.



Фиг. 8. Основни техники за имобилизация на биомакромолекулите:
 1) кръстосано свързване; 2) гелно омержване; 3) ковалентно закрепване;
 4) физична адсорбция

3. ПРОБЛЕМИ И ПЕРСПЕКТИВИ В РАЗРАБОТВАНЕТО НА РЕЦЕПТОРНАТА ЧАСТ

Вече отбелязахме, че основен момент от изграждането на биосензорния детектор е прикрепването на биоматериала към преобразувателя, т. е. начинът на имобилизация на сензорните молекули към твърдотелния суб-

страт. Поради използването предимно на полипептиди като рецепторни молекули не е странно, че досега почти всички познати методи за изолиране и имобилизация на белтъци са били изпробвани при разработването на биосензори. Четири основни техники (фиг. 8), както и комбинации от тях обикновено се използват за тези цели.

Ковалентното свързване естествено предлага най-здравото закрепване на макромолекулите към всяка твърдотелна подложка. При него трябва да се внимава обаче химичната обработка да не повлияе на такива функционални групи от полипептида, които са ангажирани в молекулното разпознаване или в изработването на сигнал-отговор. Въпреки че този метод дава възможност за изграждането на много фини слоеве от макромолекули върху твърди повърхности, той страда от един сериозен недостатък. Ковалентните връзки със субстрата значително възпрепятстват латералната подвижност на рецепторите, както и отчасти вътрешномолекулните им движения. И двете са съществени за тяхното функциониране.

Кръстосано свързване (ковалентно) между макромолекулите може да се осъществи с помощта на някои бифункционални агенти. Те реагират със странични групи от пептидната верига, като по този начин навързват рецепторните молекули помежду им в мрежоподобна структура. За кръстосаното свързване също може да се каже, че намалява до известна степен рецепторната активност поради налаганите ограничения в молекулната подвижност.

При метода на *гелното омрежване* рецепторните молекули са вплетени във вътрешността на гелната матрица. За тази цел могат да бъдат използвани различни органични вещества, които дават след полимеризация гелове с подходяща конфигурация. Желатинът, който се получава при денатурацията на колагеновите суперспирали, попада също в тази категория. Омрежването предлага относително стабилно закрепване на биоматериала в зависимост от плътността на полимерните вериги в гела и междумолекулните сили. Даже и за най-добре пригответените образци обаче съществува възможност за изтичане на материал през порите на гела.

От показаните тук *адсорбцията* е методът, който най-малко нарушава подвижността на макромолекулите при тяхното закрепване към субстрата. Разчитайки на слаби неспецифични взаимодействия между рецепторите и твърдотелната подложка, той позволява по-естествено куплиране с чувствителна подвижност на молекулите. Всичко това, разбира се, е за сметка на стабилността. Адсорбираният биоматериал може много лесно да бъде отмит от разтворите, които трябва да се анализират, ако не се

приложи някаква допълнителна обработка за стабилизиране на имобилизацията.

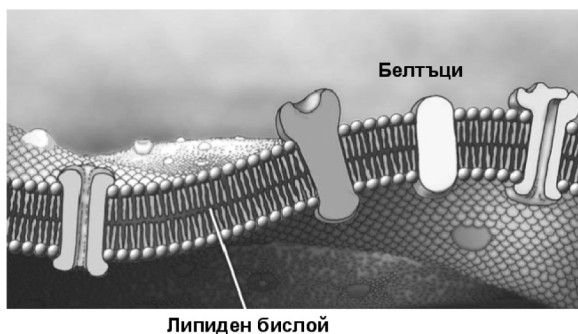
След казаното дотук за разглежданите техники на имобилизация може да се наблегне на следните по-важни моменти. В детектиращите сензорни части, получени чрез тези методики, биомолекулите в повечето случаи се оказват вградени хаотично в обемна матрица. Такива разработки, много от които са налични понастоящем в търговски вариант, би трябвало да се разглеждат като обемен тип с тримерна (3D) пространствена организация на рецепторната си част. Това поражда проблеми, свързани с ограниченията, налагани от дифузията. Както при всички реакции, така и при взаимодействието рецептор-аналит срещата на реагентите е първото необходимо условие за протичане на реакция. Поради тримерната архитектура значителна част от биологично активния материал, който е засенчен от по-външно разположените молекули, ще бъде трудно достъпен за анализа. Ето защо е ясно, че дифузията през матрицата се явява скорост лимитиращо стъпало на целия процес. Това драстично влияе върху времето за отговор на сензора, т.е. на скоростта на измерване. В не по-малка степен са повлияни ефективността и чувствителността. Тези проблеми могат да бъдат избегнати с макромолекули, подредени в двумерна решетка върху повърхността на твърдотелната подложка, където ще бъдат много по-достъпни, отколкото запечатаните в една обемна матрица.

От друга страна, в сензорния процес принципно могат да бъдат разглеждани две контактни зони – *интерфейси на взаимодействие*. Свързването на анализа, т.е. молекулното разпознаване, става на един интерфейс между анализирания разтвор и биоматериала. Изработването на сигнал пък е свързано с друг вид интерфейс, който е между биоматериала и преобразувателя [11].

Въпреки че това разделяне на първичните взаимодействия в детектирането е малко или много условно, то може да служи като допълнителна мотивация в опитите за намаляване на размерността. Разработването на един двумерен дизайн (2D), в който въпросните два интерфейса са слети в един, определено си заслужава усилията [12].

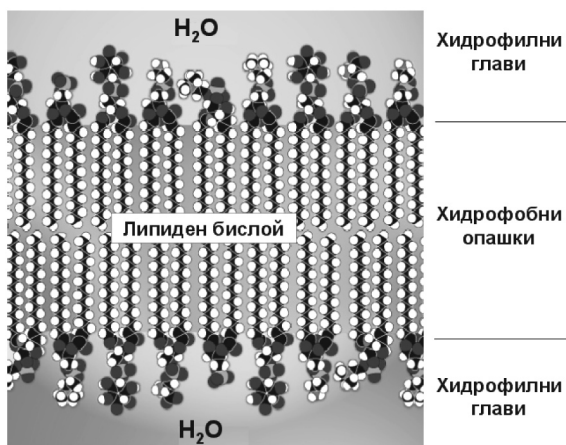
Обръщайки се отново към основната идея на биомиметичния подход, вниманието ни неминуемо е привлечено от уникалната структура и многообразните функции на *биологичните мембрани* [13] (фиг.9).

Външната клетъчна мембрана (която не случайно е известна още като *клетъчен граничен комплекс*) е именно онзи интерфейс, който свързва клетката с околната среда. Съвсем естествено е тук да бъдат съсредоточени нейните осезателни функции. Те ѝ позволяват да осъществява адекватен контакт с обкръжението си. Нещо повече, добре известно е, че по-го-



Фиг. 9. Схематично представяне на биологична мембрана.
 Флуидно-мозаечен модел на Сингър-Никълсън [14]

лямата част от природните сензорни системи са локализирани предимно в биомембраните, както в плазмалемата, така и във вътреклетъчните [15]. Притежавайки множество разнообразни пептиди в липидно обкръжение, те са в състояние да осигурят на молекулно ниво необходимите специфични механизми на сензорния процес. Тъй като липидните молекули са амфибилни, те имат удивителното свойство да се самоорганизируют във водни разтвори. Като резултат от хидрофобни и електростатични взаимодействия се образува бислой, при което полярните липидни глави са ориентирани към фазата на електролитния разтвор, а въглеродородните опашки една към друга (фиг. 10) [16].



Фиг.10. Организация на липидния бислой, основния структурен елемент на биомембраните

Макар отдавна да се правят експерименти с моделни системи, възпроизвеждащи **биомембранните сензорни функции** [17], това **направление** определено може да се счита за модерна тенденция в оформлението на детекторната част [18].

За съжаление се сблъскваме с огромни трудности при опитите да се постигне стабилен, надеждно свързан с преобразувателя монослой от рецепторни молекули, запазвайки в същото време тяхната подвижност. На практика последната обикновено е пожертвана заради стабилността. Въпреки изобилието от **цитирани в литературата моно- и мултислойни** покрития от чувствителни молекули, все още сме далеч от задоволителна имитация на **естествените мембрани**. **Необходима е много по-голяма** раздвиженост на слоя, за да се осигури един динамичен процес на преустройство едновременно на вътрешномолекулно и междумолекулно ниво. Независимо от това използването на липиди и техни производни като спомагателни структури при имобилизацията, както изобщо и усилията за намиране на ефикасни аналози на биомембранната архитектура, бележат един съществен напредък по пътя към двумерен сензорен дизайн [19]. Разбира се, има още много какво да се дискутира по отношение на организацията на рецепторната част, но това надхвърля рамките на настоящото разглеждане.

Няма да е пресилено, ако се каже, че реализацията на сензорни елементи със селективни детектиращи повърхности изглежда особено обещаваща в съчетание с електрохимичните методи за преобразуване на сигнала. Тези методи са със заслужена репутация на изключително ефективни именно при изучаването на процеси, протичащи в граничните междуфазови области. Ето защо като конкретно техническо изпълнение всяка двумерна конструкция на рецепторната част определено би била подходяща за включване в различни видове електроди и поддържащи ги електронни схеми. Съществена черта на електрохимичните методи е, че предлагат възможно най-прекия начин на преобразуване. Те притежават и още две големи преимущества: имат висока чувствителност и изискват относително проста за обслужване и евтина апаратура. Освен това за разлика от другите аналитични техники при тях приложеният потенциал определя химизма, т. е. вида на протичащите реакции, а големината на тока ги характеризира количествено, което осигурява едновременно регистрация и контрол. От гледна точка на биосензорните устройства могат да се разглеждат най-общо три типа електрохимични преобразователни елементи, трансдюсери:

1) *потенциометрични*, при които токът е пренебрежим, $i \approx 0$ и потенциалът E се определя като функция на концентрацията. Поради

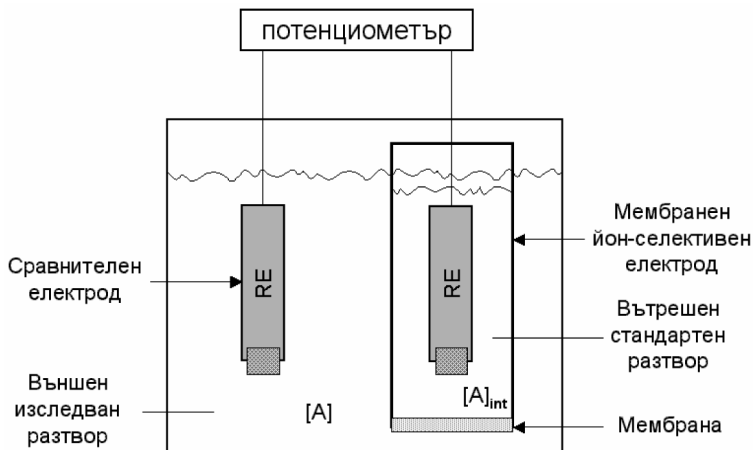
липсата на фарадееви процеси в този случай E зависи предимно от термодинамичните свойства на системата;

2) *волтамметрични/амперометрични*, където се изследва зависимостта на тока от промените в състоянието на клетката при подаден (изменящ се с времето $E = f(t)$ или постоянен $E = \text{const}$) потенциал;

3) *кондуктометрични/импедансометрични*, които измерват промяната на проводимостта, или по-общо на импеданса на системата, в зависимост от реакциите на разпознаване.

4. СЕНЗОРИ С ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНО ПРЕОБРАЗУВАНЕ НА СИГНАЛА

В тази част на обзора, както казахме, ще се спрем накратко на сензорите, използващи първия тип преобразователни елементи. Най-широкият и популярен клас *потенциометрични биосензори* се базира на приложението на *йон-селективните електроди*, ISE [20] (фиг. 11). Това са електроди, чиито мембранен потенциал е функция от концентрацията $[A]$ на даден вид йони в изследвания разтвор. Работният им диапазон обикновено обхваща концентрации от 0.1 до 10^{-5} M.



Фиг. 11. Потенциометрична клетка с мембранен йон-селективен електрод

Избирателната способност на ISE се определя от специфичните взаимодействия на мембраната с анализа A . На практика обаче нейната селективност не е идеална и електродът реагира и на други вещества (ин-

терференти, I), присъстващи в разтвора. Това се отчита с въвеждането на коефициент на селективност K_{AI} в уравнението за потенциала:

$$\begin{aligned} E_{cell} &= K + \frac{RT}{z_A F} \ln([A] + [A]_E) = K + \frac{RT}{z_A F} \ln([A] + K_{AI} [I]^{z_A/z_I}) = \\ &= K + \frac{0.05916}{z_A} \log([A] + K_{AI} [I]^{z_A/z_I}) \end{aligned}$$

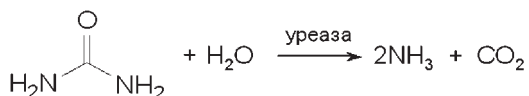
където $K = \text{const}$ е параметър на електрода, включващ потенциалите на течна свързка (LJ), на сравнителните електроди (RE) и на асиметрия (E_a), а така също и вътрешната концентрация на анализа $[A]_{\text{int}}$, а $[A]_E$ и $[I]_E$ са концентрации, даващи еднакъв потенциал. Очевидно мембраната показва добра селективност, когато

$$K_{AI} = [A]_E / [I]_E^{z_A/z_I} \ll 1$$

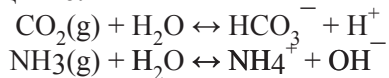
При потенциометричните биосензори, включващи ISE, обикновено се регистрира продуктът на някаква ензимна реакция, чиито субстрат е търсеният анализ. Най-често срещани са сензорите за уреа и креатинин, които използват ензими, катализиращи съответните реакции.

Уреата (карбамид) е важен метаболит в процеса на разграждане на аминокиселините. При бозайниците и много сухоzemни гръбначни тя е главното съединение, отговорно за отделянето на излишния азот от организма. Катаболизъмът на повечето аминокиселини, извлечени от външните източници на протеин, протича в черния дроб. Част от амоняка, който се генерира в тези реакции (в митохондриите на хепатоцитите) като амониев йон NH_4^+ , се използва повторно за биосинтез на различни вещества. Тъй-като той е силно токсичен, останалият, **нерециклиран** NH_4^+ трябва да бъде изхвърлен – директно при т. нар. *амонотелни* организми, като уреа при *уреотелните* или като пикочна киселина (**uric acid**) при *урико-телните*. Нормално съдържанието на карбамид в човешката урина е ~ 20 g/l. Освен това се отделя и пикочна киселина със скорост $\sim 0,6$ g/24h.

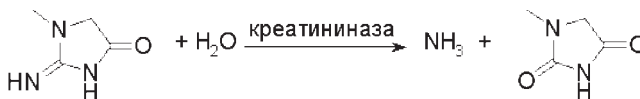
Концентрацията на уреа в кръвта и урината е важен показател за състоянието на организма. При редица заболявания тя чувствително се отклонява от нормалните стойности. В потенциометричните сензори, за нейната регистрация се използва реакцията на хидролиза, която се ускорява от ензима уреаза (EC 3.5.1.5., 483 kDa) до 10^{14} пъти:



Продуктите на тази реакция могат да бъдат отчетени по няколко начина – като газообразни (NH_3 или CO_2), като йон NH_4^+ или като промяна в рН. Това се постига с поддържане на определена киселинност на междинните буферни разтвори (фиг. 12), което измества наляво или надясно равновесието на реакциите:



Креатининът е анхидрид на креатина, съединение от изключително значение за енергетиката на мускулното съкращение. Той е основната форма, под която креатинът се отделя при разграждане на мускула. Неговата хидролиза дава метилхидантоин (**N-methylhydantoin**) и NH_3 , който се регистрира аналогично на предишния случай.



| | |
|--|----------------|
| рН електрод | |
| $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$ $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ | буфер |
| йон-селективна мембрана | |
| $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$ | буфер |
| газ-селективна мембрана | |
| $\text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$ $2\text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{NH}_4^+ + 2\text{OH}^-$ | буфер |
| имобилизирана уреаза | |
| диализна мембрана | |
|  | външен разтвор |

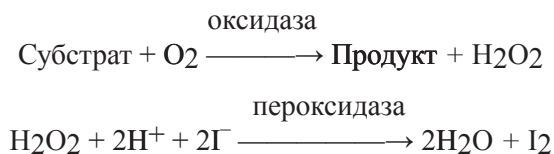
Фиг.12. Принципна схема на сензор за уреа, използващ ISE

Няколко типични примера за този вид биосензори са дадени в табл. 2.

Таблица 2. Примери за потенциометрични биосензори на основата на ISE

| Субстрат | Ензим | Ион-селективен електрод | Диапазон на конц., М |
|-------------|-----------------------|--|--|
| Уреа | Уреаза | pH, CO ₂ , NH ₄ ⁺ | 10 ⁻² – 10 ⁻⁴ |
| Креатинин | Креатининаза | NH ₄ ⁺ | 10 ⁻³ – 10 ⁻⁵ |
| Глюкоза | Глюкозооксидаза | pH, Г | 10 ⁻¹ – 10 ⁻³ 10 ⁻³ – 10 ⁻⁴ |
| Пеницилин | Пеницилиназа | pH | 10 ⁻² – 10 ⁻⁴ |
| L-Аспарагин | Аспарагиназа | NH ₄ ⁺ | 10 ⁻² – 5.10 ⁻⁵ |
| L-Тирозин | Тирозиндекарбоксилаза | CO ₂ | 10 ⁻¹ – 10 ⁻⁴ |
| L-Глутамин | Глутаминаза | NH ₄ ⁺ | 10 ⁻¹ – 10 ⁻⁴ |
| L-Глутамат | Глутаматдехидрогеназа | NH ₄ ⁺ | 10 ⁻¹ – 10 ⁻⁴ |

Редица оксидазни ензими се използват в комбинация с ISE за Г и пероксидази (напр. пероксидаза от хрян, HRP, EC 1.11.1.7) по следната схема:



Към потенциометричните сензори могат да бъдат причислени и такива, чиито преобразуватели са *йонночувствителни полеви транзистори* (ISFET), доколкото първичната реакция с анализа А води само до изменение на потенциала в рецепторната част, но не и до хетерогенен електронен пренос. Появата на ISFET [21] като симбиоза на технологиите от твърдотелната микроелектроника с принципите на ISE даде съществен тласък в развитието на потенциометричните техники за анализ. Огромният напредък в това направление роди многообразие от сензорни устройства с неоспорими предимства, като надеждност, компактност, бързодействие, възможности за автоматизация и миниатюризация и т. н. Естествено бе следващата стъпка да бъде включването на биорецептори. За пръв път такъв биосензор (ENFET) за уреа, използващ NH₃ газ-чувствителен FET, е докладван от Б. Даниелсон и сътр. [22]. Типичната конструкция на ENFET представлява полеви транзистор, който вместо метален управляващ електрод е снабден с йон-селективна мембрана, раз-

върху WE. Докато ISE отчитат потенциал, възникващ поради избирателния афинитет на мембраната към даден химичен вид, редокс-електродите регистрират потенциал (нернстов тип), дължащ се на разликата в концентрациите на окислената и редуцираната форма на някой от реагентите. Оттук произтичат и някои от предимствата и недостатъците на този вид биосензори. В качеството на WE обикновено се използват твърдотелни материали с добри проводящи свойства, като напр. благородни метали (Pt, Au, Ag) или различни форми на въглерода (пиролитен графит, стъкловъглерод и т. н.). Техният избор се определя до голяма степен от химическата им инертност. За съжаление обаче генерираният потенциал зависи силно от състоянието на повърхността им, което се обяснява с наличието на електрохимично активни функционални групи. Това налага много прецизен протокол на предварителна обработка на електрода. От друга страна, поради липсата на мембранна дифузия редокс-електродите по правило притежават по-голямо бързодействие. Освен това тяхното съпротивление е по-ниско от ISE, така че позволява използването на по-прости и по-евтини уреди с не много висок входен импеданс.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Edmonds, E. (ed.). *Chemical sensors*. Blackie and Son Ltd., Glasgow, 1988.
- [2] Turner, A. P., F. I. Karube, G. S. Wilson (eds.). *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford Univ. Press, New York, 1987.
- [3] Албертс, Б., Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс и Дж. Уотсон. *Молекулярная биология клетки*. Москва, 1986.
- [4] Margolis, F. L., T. V. Getchell (eds.). *Molecular neurobiology of the olfactory system*. New York, 1988.
- [5] Ленинджер, А. *Биохимия*. Москва, 1976.
- [6] Mascini, M., S. Tombelli. *Biomarkers*, 2008, **13**, 7–8, 637.
- [7] Sethi, R. S. *Biosens. Bioelectron.*, 1994, **9**, 243.
- [8] Bard, A. J., L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. New York, 2001.
- [9] Mathews, C. K., K. E. van Holde, K-G. Ahern. *Biochemistry*, 3rd ed. San Francisco, 2000.
- [10] Israelachvili, J. N. *Intermolecular and surface forces*, 2nd ed. London, 1991.
- [11] Göpel, W. *Sensors and Actuators B*, 1991, **4**, 1–2, 7.
- [12] Kochev, V., K. Filljov. *Sens. and Act. B*, 1992, **8**, 1, 73.
- [13] Gennis, R. B. *Biomembranes: molecular structure and function*. New York, 1989.
- [14] Singer, S. J., G. L. Nicolson. *Science*, 1972, **175**, 720.
- [15] Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. R. Scott, S. L. Zipursky, J. Darnell. *Molecular Cell Biology*, 5th ed. New York, 2003.
- [16] Ивков, В. Г., Г. Н. Берестовский. *Липидный бислой биологических мембран*. Москва, 1982.
- [17] Del Castillo, J., A. Rodriguez, C. A. Romero, V. Sanchez. *Science*, 1966, **153**, 185.

- [18] Göpel, W. *Biosens. Bioelectron.*, 1995, **10**, 853.
- [19] Кочев, В., М. Карабалиев. *Интерфейсните сензори*. София, 2003.
- [20] Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*. New York, 2000.
- [21] Bergveld, P. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1970, **BME-17**, 70.
- [22] Danielson, B., I. Lundström, F. Winqvist, K. Mosbach. *Anal. Lett.*, 1979, **B12**, 1189.
- [23] Bergveld, P. *Sens.and Act.*, 1985, **8**, 109.
- [24] van der Schoot, B. H. and P. Bergveld. – *Biosensors*, 1988, **3**, p. 161.
- [25] Chaniotakis, N., N. Sofikiti. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **615**, p. 1.
- [26] Yogeswaran, U., Shen-Ming Chen. *Sensors*, 2008, **8**, p. 290–313.