

# Analizne metode v karakterizaciji materialov in bioloških sistemov

Kemijski senzorji, imunski testi

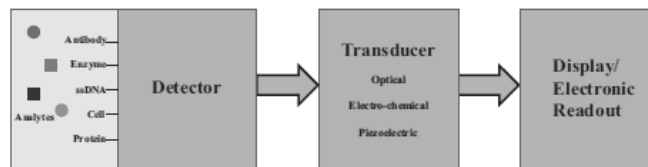
H. Prosen, UL FKKT

## Definicija senzorja

- analizna naprava, ki generira določen merljiv odziv (signal) v prisotnosti določene spojine (ali spojin)
- IUPAC: "...naprava, ki pretvori kemijsko informacijo v analizno uporaben signal."
- kvalitativna ali kvantitativna določitev analita
- čim bolj selektiven
- čim bolj linearen odziv na analit
- kalibriran s preizkušeni in specifičnimi analiznimi metodami za analit
- preprost za uporabo: avtomatsko delovanje oz. ga lahko uporabljajo tudi laični uporabniki

## Definicija biosenzorja

- kombinira biološki prepoznavni element (angl. *recognition element*; protitelo, fag, aptamer, enojno DNA vijačnico...) z ustreznim fizikalno-kemijskim pretvorbenim mehanizmom, da generira merljiv odziv (signal)
- električni ali optični signal je sorazmeren številu interakcij med analitom in prepoznavnim elementom



## Zakaj potrebujemo senzorje?

- določitev v realnem času
- poenostavitev analiz: nenadzorovano delovanje, zmanjšanje porabe energije
- učinkovita procesna kontrola
- izvajanje določitev na težko dosegljivih mestih
- podrobni podatki o prostorski in časovni porazdelitvi (ceneno)
- miniaturizirane naprave
- hkratno določanje več analitov (angl. *multi-analyte*)
- stroškovno učinkovita analizna orodja

## Zahteve za senzor

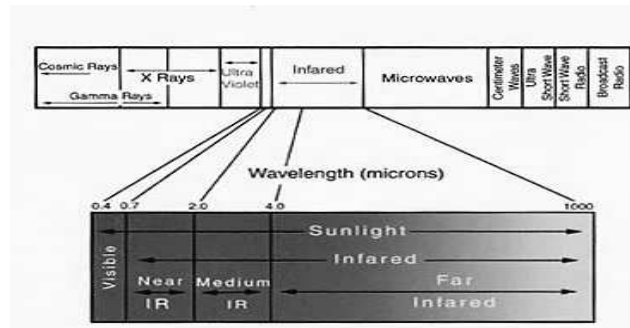
- točnost: brez lažno negativnih in z malo lažno pozitivnimi rezultati
- hitrost odziva: čim večja (biosenzorji < 1 h)
- meja zaznave: čim nižja; vsaj zakonska meja
- specifičnost: čim manjši odziv na interferente
- ponovljivost: znotraj  $\pm 10\%$
- kalibracija: čim bolj enostavna
- robustnost: mehanska in kemijska
- enostavnost uporabe: avtomatiziran oz. minimalna usposobljenost uporabnikov
- validacija: glede na veljavno standardno analizno metodo za analit

## Senzorji na principu optične spektroskopije

- absorpcija, odboj v IR spektralnem območju
  - absorpcija v UV/Vis spektralnem območju
  - fluorescenca in luminiscenca
  - odboj in sipanje svetlobe
  - lomni količnik
- } imunski biosenzorji (imunski testi)

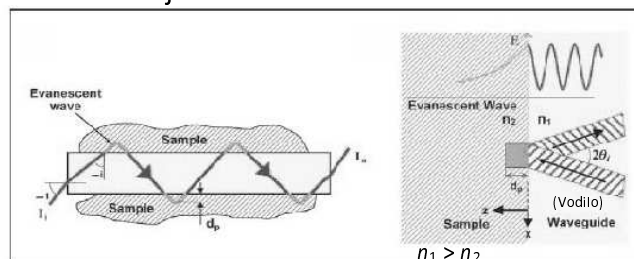
IR - delitev glede na spektralno območje:

- bližnja IR spektroskopija (angl. *near IR*, NIR): 0,78-2,5  $\mu\text{m}$
- srednja IR spektroskopija (angl. *mid IR*, MIR): 2,5-50  $\mu\text{m}$
- daljna IR spektroskopija (angl. *far IR*, FIR): 50-1000  $\mu\text{m}$



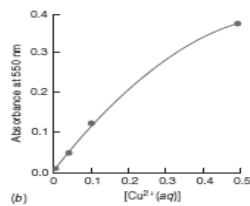
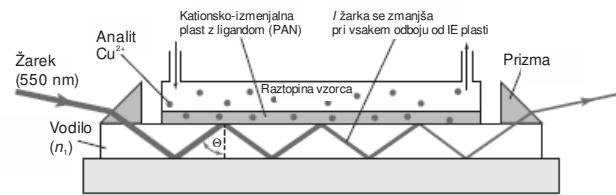
## Odbojne tehnike snemanja

- **oslabljeni popolni odboj** (angl. *attenuated total reflectance*, ATR): običajno v MIR ali NIR območju
- za vzorce, ki premočno absorbirajo IR ali predebeli (oz. bi z mletjem izgubili del informacij) ali preveč dragoceni (nedestruktivno!)
- žarek se odbije, le del em polja prodre ("izginjajoči" val, angl. *evanescent*) in eksponentno zamre: pri določenih  $\lambda$  (odv. od analita) se  $I$  žarka zmanjša



$$\frac{E}{E_0} = e^{-\frac{x}{d_p}} \quad d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi\sqrt{\sin^2 \Theta_i - (n_2/n_1)^2}}$$

$E, E_0$ ... jakost el. polja izginjajočega in vpadnega žarka  
 $x$ ... razdalja prodora v vzorec  
 $d_p$ ... globina penetracije ( $E = E_0/e$ )  
 $n_1, n_2$ ... lomna količnika vodila in vzorca  
 $\Theta_i$ ... vpadni kot žarka

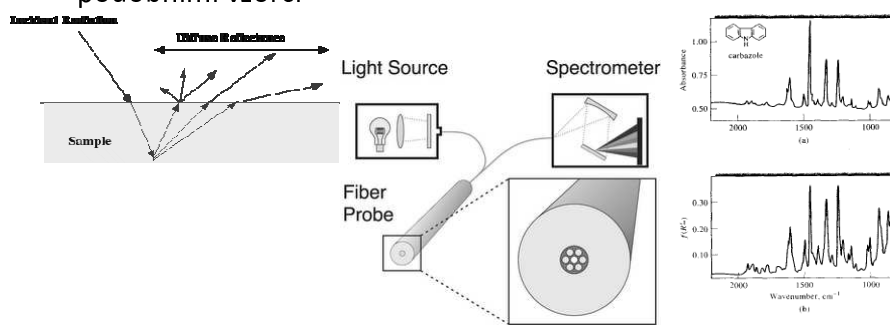


Primer senzorja za določanje  $\text{Cu}^{2+}$  z ATR. Prepoznavni element je ligand PAN (1-(2-piridilazo)-2-naftol), ki selektivno veže  $\text{Cu}^{2+}$ . Nad 0,5 M odziv ni več linearen zaradi nasičenja IE plasti.

Slike: D. Harris, Quantitative Chemical Analysis



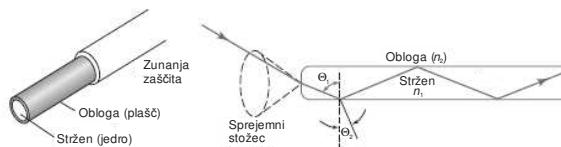
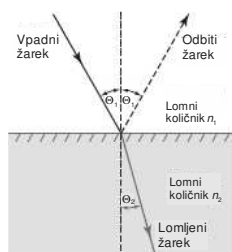
- **difuzna reflektanca** (angl. *diffuse reflectance*, DR) v NIR območju (krajše  $\lambda$  se bolj sipljejo od daljših)
- žarek prodre pod površino delcev, vzbudi vibracije in se razprši v vse smeri  $\Rightarrow$  dobimo reflektančni spekter
- za praškaste vzorce ali take z grobo površino
- večinoma za določanje posamičnih sestavin (npr. vode, skupnih proteinov...) po predhodni kalibraciji z zelo podobnimi vzorci



## Optoda ali optroda (angl. *optical + electrode*)

- senzorji na osnovi optičnih vlaken: prenos svetlobe na principu popolnega notranjega odboja (angl. *total internal reflection*, TIR)

Snellov zakon:  $n_1 \cdot \sin\theta_1 = n_2 \cdot \sin\theta_2$        $n$ ... lomni količnik  
 $\theta$ ... kot glede na pravokotnico

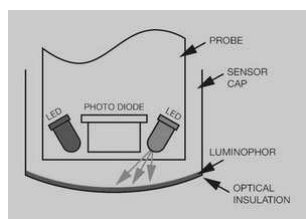


$n_1 > n_2 \Rightarrow$  pri  $\theta_1 > \theta_{\text{krit}}$  ( $\sin\theta_{\text{krit}} = n_2/n_1$ ) znotraj sprejemnega stožca se vsa svetloba, ki vstopa v vlakno, odbije od notranje stene (obloge) in praktično brez izgub prenese na drugi konec vlakna.

Primer: optoda s pH indikatorji – določanje pH preko absorbance barvila

Primer: optoda za določanje O<sub>2</sub> na osnovi dušenja luminiscence

- luminiscenčna spojina: Ru(II) kompleks s 4,7-difenil-1,10-fenantrolinom absorbira modro svetlobo in emitira rdečo (610 nm)
- senzor za O<sub>2</sub> (dušilec fluorescence) – senzorska spojina na koncu optičnega vlakna, ki ga pomočimo v vzorec
- ob vključitvi encima glukoza oksidaza: senzor za glukozo



## Kvantni izkoristek

- velja za vse fotokemične procese: delež absorbiranih fotonov, ki dajo želeni rezultat (t.j. fotokemična rkc, luminiscenca...)

$$\Phi = \frac{\text{emitirani\_fotoni / s}}{\text{absorbirani\_fotoni / s}} = \frac{\text{hitrost\_emisije}}{\text{hitrost\_absorpcije}} = \frac{k_{em} \cdot [M^*]}{k_{ab} \cdot [M]}$$

M... analit  
 M\*... vzbujeni analit

- vrednosti med 0 in 1
- nanj vplivajo: temperatura, prisotnost spojin dušilcev (angl. *quencher*): npr. topila, tripletni kisik...

## Dušenje luminescence (angl. *luminescence quenching*)

- absorpcija svetlobe:  $M + h\nu \rightarrow M^*$  hitrost absorpcije =  $k_{ab} \cdot [M]$
- emisija svetlobe:  $M^* \rightarrow M + h\nu$  hitrost emisije =  $k_{em} \cdot [M^*]$
- neradiacijska deaktivacija:  $M^* \rightarrow M + \text{toplota}$  hitrost =  $k_d \cdot [M^*]$
- prisotnost dušilca:  $M^* + Q \rightarrow M + Q^*$  hitrost =  $k_q \cdot [M^*] \cdot [Q]$
- v ravnotežju velja:  $k_{ab} \cdot [M] = k_{em} \cdot [M^*] + k_d \cdot [M^*] + k_q \cdot [M^*] \cdot [Q]$

• v odsotnosti dušilca ( $[Q] = 0$ ):  $\Phi_0 = \frac{k_{em}}{k_{em} + k_d}$

• če je dušilec prisoten ( $[Q] \neq 0$ ):  $\Phi_Q = \frac{k_{em}}{k_{em} + k_d + k_q \cdot [Q]}$

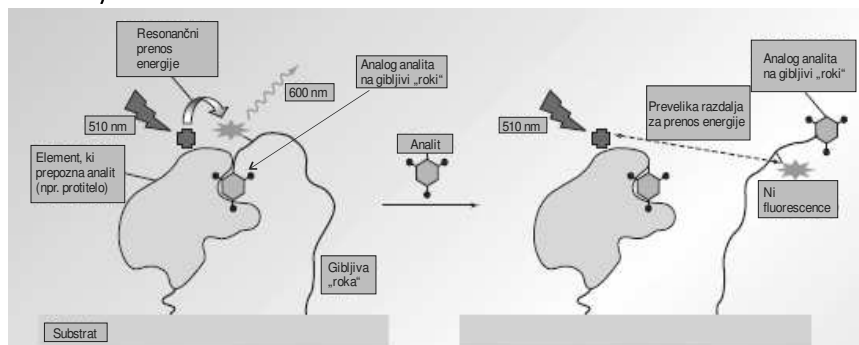
- merimo relativni izkoristek ( $\Phi_0/\Phi_Q$ ) kot funkcijo  $[Q]$ : linearna odvisnost

$$\frac{\Phi_0}{\Phi_Q} = \frac{k_{em} + k_d + k_q \cdot [Q]}{k_{em} + k_d} = 1 + \left( \frac{k_q}{k_{em} + k_d} \right) \cdot [Q]$$

Stern-Volmerjeva enačba

$$\frac{\Phi_0}{\Phi_Q} = \frac{F_0}{F_Q}$$

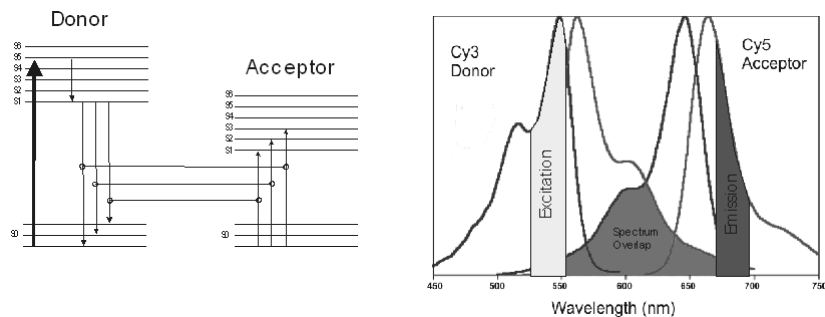
## Senzorji na osnovi fluorescenc po resonančnem prenosu energije (angl. *fluorescence resonance energy transfer, FRET*)



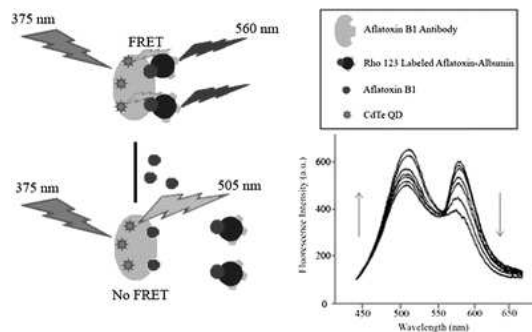
Slika: D. Harris, Quantitative Chemical Analysis

Če sta kromofor - donator (☒) in emitor fluorescence - akceptor (★) dovolj blizu skupaj, pride do resonančnega prenosa absorbirane energije, sicer pa ne  $\Rightarrow$  zmanjšanje  $F$ , ko analit izpodrine vezani analog iz vezavnega mesta (sorazmerno z  $d^6$  – razdalja).





Donor je vedno fluorescentna spojina. Pri FRET pride do kompeticije med relaksacijo z lastno fluorescenco donorja in prenosom energije na akceptor (akceptor mora absorbirati pri  $\lambda$  emisije donorja). Detektiramo lahko preko fluorescenco akceptorja ali preko dušenja fluorescenco donorja.

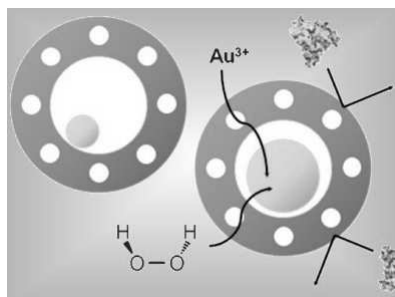
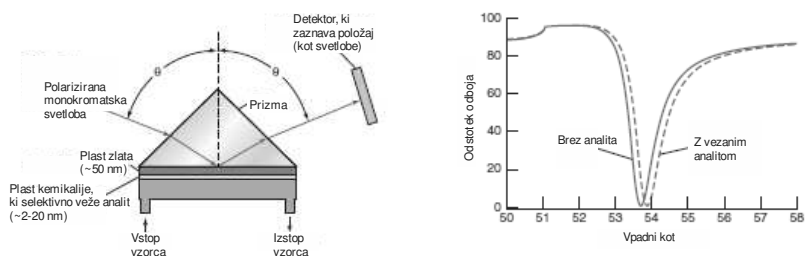


Mikrosenzor za aflatoksin B1 na osnovi kvantnih pikic (angl. *quantum dots*, QD) kadmijevega telurida.

Vir: Zekavati *et al.*, *Microchim. Acta* 180 (2013) 1217-1223.

## Senzorji na osnovi površinske plazmonske resonance (angl. *surface plasmon resonance*, *SPR*)

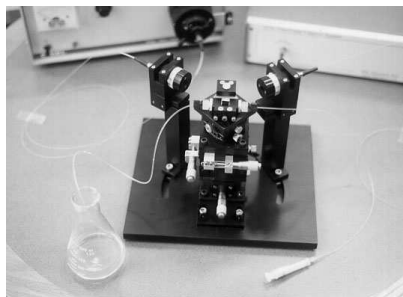
- **površinski plazmon** ali površinski val plazme: emv val, ki se razširja vzdolž meje med kovino in dielektričnim (izolacijskim) materialom



Primer: SPR senzor za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in glukozo na osnovi zlatih nanodelcev (AuNP), zaprtih v porozni (polprepustni) nanoškoljki iz SiO<sub>2</sub>, ki prepreči dostop večjim makromolekulam iz vzorca.

Vir: Ha *et al.*, *Chem. Asian J.* 7 (2012) 36-39.

Zunanji videz  
SPR  
senzorjev.



**Table 1**

Planar configurations of ATR-based SPR biosensors. Cross-dashed area: SPR-carrying metal, blank area: dielectric layer, gray triangle: prism, dotted area: dielectric waveguiding layer. The black small triangles show the interface at which surface plasmon resonance occur, while the black circles show a propagating waveguide mode resonance.

Nomenclature	Design	Related reference
Otto configuration		Otto (1968)
Kretschmann configuration		Kretschmann (1971)
Long-range SPR (LRSR)		Sarid (1981)
Plasmon-waveguide resonance (PWR)		Salamon et al. (1997)
Waveguide-coupled SPR (WCSPR)		Kovacs and Scott (1977)

Vir: Abbas *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 1815-1824.

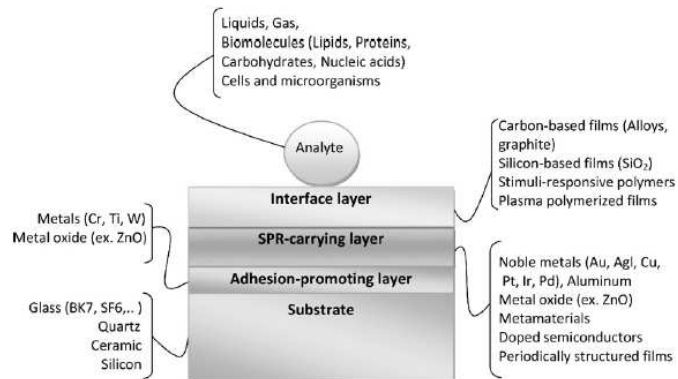


Fig. 5. Different materials used in SPR-based chips.

Novejši materiali za izdelavo SPR senzorjev.

Vir: Abbas *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011) 1815-1824.

## Elektrokemični senzorji

- potenciometrični: ISE, ISFET, CHEMFET, ENFET
- amperometrični
- kulometrični
- konduktometrični
- impedančni
- piezoelektrični

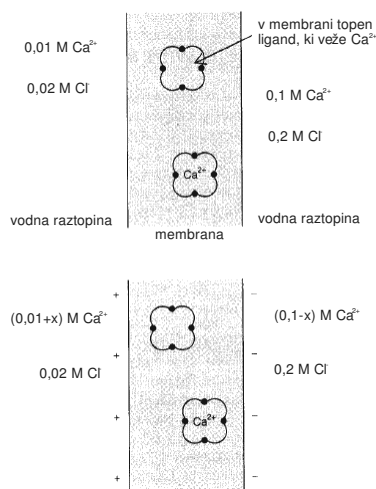
### Potenciometrični senzorji: iono-selektivne (membranske) elektrode (ISE)

do potencialne razlike na elektrodi ne pride zaradi redoks rkc, temveč zaradi različnih fizikalnih pojavov z  $\Delta G \neq 0$ , npr. koncentracijskega gradienta skozi polprepustno membrano

tipi iono-selektivnih elektrod

- nekristalinične: steklena, imobilizirana tekočinska...
- kristalinične: čisti ali mešani/dopirani kristali
- kombinirane: običajna elektroda obdana s polprepustno membrano

## Delovanje iono-selektivne elektrode



Zgoraj: začetni pogoji pred prehodom Ca<sup>2+</sup> skozi membrano.

Po prehodu x mol/L Ca<sup>2+</sup> skozi membrano je na levi strani membrane naboj +2x mol/L in na desni -2x mol/L ⇒ nabiranje nabojev prepreči nadaljnje prehajanje Ca<sup>2+</sup>.

Na membrani se vzpostavi potencialna razlika, ki je sorazmerna razliki v koncentracijah Ca<sup>2+</sup> na obeh straneh.

Pri izpeljavi odvisnosti  $E$  od  $a$  ( $c$ ) analita upoštevamo spremembo Gibbsove proste energije zaradi difuzije ionov v membrano iz raztopine (na zunanji strani):

$$\Delta G = \Delta G_{\text{solv.}} - R \cdot T \cdot \ln \frac{a_{\text{membr.}}}{a_{\text{zun.}}}$$

Hkrati pa prihaja do povratne difuzije v vodo in nabiranja istovrstnega naboja v plasti raztopine tik ob membrani, in ta ustvarja potencialno razliko:  $\Delta G = -z \cdot F \cdot E_{\text{zun.}}$

V ravnotežju je skupna sprememba Gibbsove proste energije (vsota zgornjih dveh) enaka 0. Izrazimo  $E_{\text{zun.}}$ :

$$E_{\text{zun.}} = \frac{\Delta G_{\text{solv.}}}{z \cdot F} - \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{a_{\text{membr.}}}{a_{\text{zun.}}}$$

Enako izpeljavo lahko naredimo za notranjo stran membrane, kjer pa je  $E_{\text{notr.}}$  konstantna zaradi konstantne aktivnosti analita v notranji raztopini.

Izrazimo potencialno razliko med zunanjo in notranjo raztopino z upoštevanjem, da so nekateri členi konstantni ( $E_{notr.}$ ,  $\Delta G_{sol.v.}$ ) ali skoraj konstantni ( $a_{membr.}$ ):

$$E = konst + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln a_{zun.} \Rightarrow konst + \frac{0,05916}{z} \cdot \log a_{zun.}$$

splošen izraz za  $E$  iono-selektivne elektrode (desno pri 25 °C)

Velja za vse tipe iono-selektivnih elektrod.

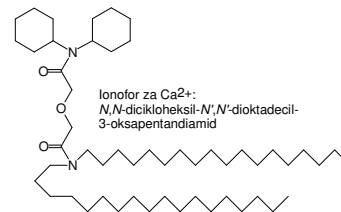
- če je  $z = 1$ , npr. pri stekleni elektrodi ( $a_{H_3O^+}$ ), bo pri 10-kratni razliki v  $a_{H_3O^+}$ , t. j. 1 pH enota, prišlo do  $\Delta E$  59,16 mV
- pri  $z = 2$  (npr. iono-selektivna elektroda za  $Ca^{2+}$ ) bo pri 10-kratni spremembi aktivnosti ionov razlika potenciala le 29,58 mV (slabša občutljivost)
- za anione ima z negativen predznak

**kristalinične ISE** (angl. *solid-state*) imajo kot membrano čiste ali mešane kristale, tudi prevodne polimere: fluoridna ( $LaF_3$ , dopiran z  $Eu^{2+}$ ), bakrova ( $CuS+Ag_2S$ ), cianidna ( $AgI$ ), jodidna ( $AgI$ ), kloridna ( $AgCl$ ), sulfidna ( $Ag_2S$ ); keramična  $LiLaTiO_4$  za pH...

nekristalinične ISE: **imobilizirane tekočinske** (ISE s tekočim ionskim izmenjevalcem): membrana je iz hidrofobnega polimera (največkrat polivinil klorid), ki vsebuje hidrofobni ionski izmenjevalec za analit (ionofor) – npr. za  $Ca^{2+}$ :

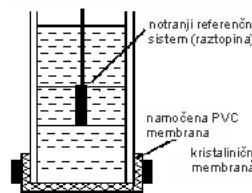
$$E = E' + \beta \cdot \frac{0,05916}{2} \cdot \log [Ca^{2+}]$$

- meja zaznave omejena s puščanjem analita (iona) iz notranje raztopine skozi membrano v raztopino vzorca; omejen rok trajanja (se hitro "postarajo")



Pri novejših ISE zamenjujejo notranjo raztopino z elektroprevodnim polimerom (angl. *all-solid state electrode*):

ISE z notranjo raztopino



ISE z običajno PVC membrano

ISE v trdnem stanju



ISE s kristalinično membrano

PVC elektroda v trdnem stanju

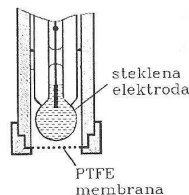
## kombinirane ISE (običajno plinske)

indikatorska elektroda (npr. steklena) ločena od raztopine s polprepustno hidrofobno membrano (guma, teflon, polietilen...), ki prepušča pline ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ) ali druge manjše molekule ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ...)

Primer: plinska elektroda za  $\text{CO}_2$   
(Severinghaus elektroda)

$$K = \frac{[\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{P_{\text{CO}_2}}$$

$$E = E' + 0,05916 \cdot \log P_{\text{CO}_2}$$



## Selektivnost iono-selektivnih elektrod

ISE se odziva samo na aktivnost prostega analita, torej je odziv odvisen od tvorbe kompleksov, disociacije...

zaradi narave delovanja membrane nobena elektroda ni povsem selektivna le za izbrani analit – zaznava tudi interference

Primer: analit A, interferenca X.

Odziv ISE za interference z istim nabojem kot analit:

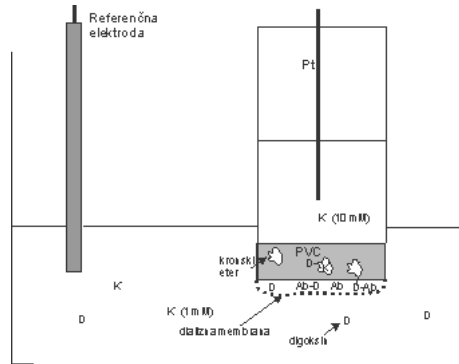
$$E = konst. \pm \frac{0,05916}{z_A} \cdot \log \left[ a_A + \sum_{X_i} K_{A,X_i}^{Pot} \cdot a_{X_i} \right]$$

$$K_{A,X}^{Pot} = \frac{odziv\_za\_X}{odziv\_za\_A}$$

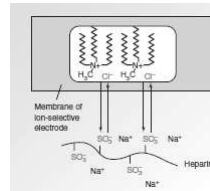
selektivnostni koeficient

idealno, če  $\ll 1$

## Potenciometrični imunosenzor za digoksin

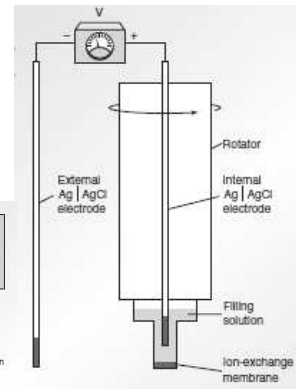


Priljeno po: Mikkelsen, Corton, Bioanalytical Chemistry, Wiley 2004

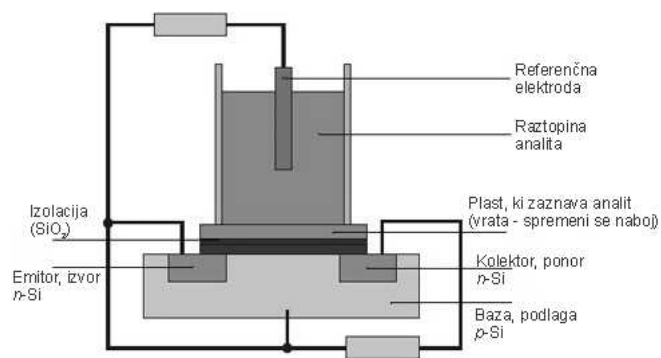


Vir: Harris, Quantitative Chemical Analysis, 7th ed., W.H. Freeman & Co. 2007

## ISE za heparin



- tranzistor z učinkom polja (angl. *field effect transistor*, FET): ISFET, CHEMFET, ENFET (encimatski)



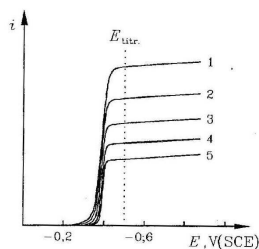
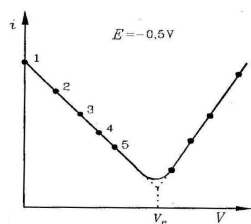


## Primeri FET (bio)kemijskih senzorjev

Vrsta	Prepoznavni element (vrata)	Analit
GASFET (adsorpcija H <sub>2</sub> )	Pd, Ir	H <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S
ISFET	polimerna iono-selektivna membrana	H <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup>
ENFET	imobilizirani encimi: ureaza, β-laktamaza, kreatinin iminohidrolaza...	sečnina, penicilin, kreatinin...
IMFET	imobilizirani imunoreagenti (protitelo, antigen)	veliko štev. analitov glede na specifično protitelo

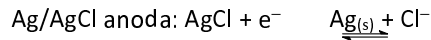
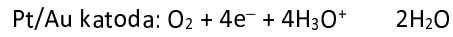
## Amperometrični senzorji

elektrokemijska tehnika, pri kateri merimo limitni difuzijski tok  $i_l$  pri stalnem potencialu indikatorske elektrode ( $E_{ind} = \text{konst.}$ ), ki je izbran tako, da je ta popolnoma polarizirana glede na reaktant (območje limitnega toka)  $i_l = k \cdot c$  preko merjenja limitnega toka lahko določimo koncentracijo reaktanta, ki se reducira/oksidira na indikatorski elektrodi v splošnem bolj občutljivi, večje linearno območje kot potenciometrični senzorji



### Clarkova O<sub>2</sub> elektroda

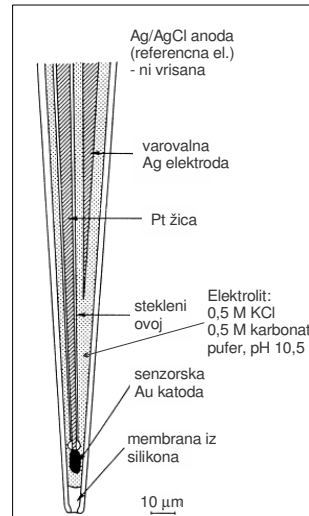
delovanje temelji na reakcijah:



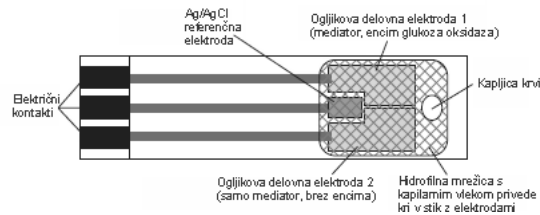
$$E_k - E_a = -0,75 \text{ V}$$

membrana prepušča O<sub>2</sub>

varovalna Ag elektroda reducira O<sub>2</sub>, ki difundira iz vrhnjega dela senzorja



### • monitor za glukozo v krvi (pri diabetesu)

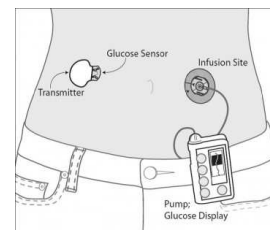


Prirejeno po: D. Harris, Quantitative Chemical Analysis

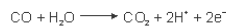
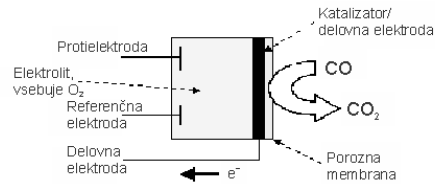
- glukoza se na el. 1 oksidira z mediatorjem (prenos e<sup>-</sup>), reakcijo katalizira encim glukoza oksidaza
- na el. 2 se oksidirajo samo interference iz krvi, ne pa Glu
- mediator se regenerira (oksidira) na delovnih elektrodah pri potencialu 0,2 V nasproti referenčni el.
- merimo tok zaradi oksidacije mediatorja – razlika med el. 1 in el. 2 je sorazmerna koncentraciji Glu v krvi

Slabosti: tok odvisen od hitrosti reakcije, ta pa odvisna od encimske kinetike, temperature, difuzije mediatorja...

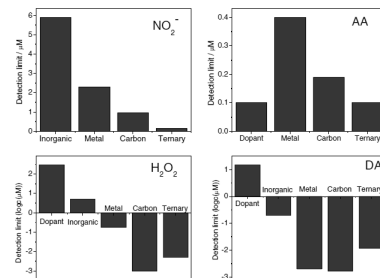
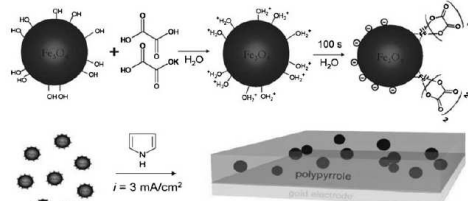
Novjši monitorji kulometrični: merimo tok v odvisnosti od časa, iz naboja izračunamo celotno množino Glu v kapljici.



- amperometrični plinski senzorji (angl. *amperometric gas sensor*, AGS) - CME



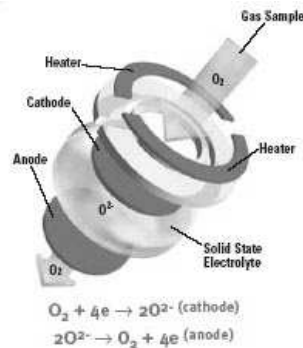
- senzorji na osnovi hibridnih elektrod s konjugiranimi polimeri (CP) – kemično modificirane el. (CME)



Vir: Janaky & Visy, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3489-3511.

## Kulometrični senzorji

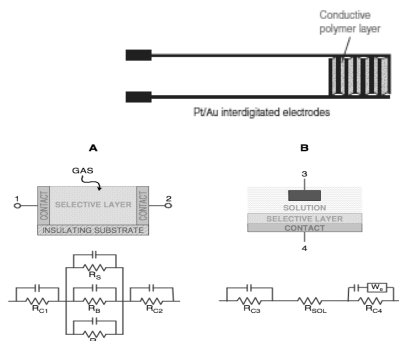
pri konstantni napetosti delovne elektrode  
 trielektrodni sistem (delovna elektroda, protielektroda,  
 referenčna elektroda), potenciostat  
 zaporedno z elektrolizno celico vezan **kulometer**, s katerim  
 določimo pretečeni naboj: *elektronski*  
*integrator*, ki avtomatsko meri  $i$  in  $t$   
 ter izračuna  $Q$



## Elektronski nosovi (EN)

Princip elektronskega nosa: čim bolj podobno živalskemu vohu; ne zanima nas ena sama spojina, temveč kombinirani odziv za vse potencialno vonjave spojine (kvali, kvanti analiza).

- konduktometrični:



Elektrode prekrte z različnimi prevodnimi polimeri (angl. *conducting polymer*, CP), ki vežejo različne molekule plina  $\Rightarrow$  sprememba prevodnosti. Lahko so tranzistorskega tipa, prekrte s kovinskimi oksidi (angl. *metal-oxide semiconductor*, MOS) – MOSFET.

Drugi tipi: amperometrični, optični (IR, SPR), piezoelektrični, kalorimetrični (termični)... Biosenzorji: olfaktorični receptorji kot prepoznavni element.

## Elektronski jeziki (angl. *electronic tongue*, ET)

- enako kot pri el. nosu se želimo čim bolj približati čutu okusa; zanima nas kombinirani odziv na vse spojine, ki bi dale določen okus (kvali, kvanti analiza)
- potenciometrični, amperometrični, impedimetrični senzorji
- primeri: sistem ISFET potenciometričnih senzorjev (>20) za ione različnih organskih kislin (kisel okus); sistem senzorjev za  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  in  $\text{Cl}^-$  v potu novorojenčkov (cistična fibroza); sistem 27 ISFET senzorjev za topne ionske zvrsti v prsti na Marsu (Phoenix projekt, Mars surveyor Lander)...
- običajno odziv evaluiramo preko kemometrične prepoznavne vzorcev (angl. *pattern recognition*), npr. z nevronskimi mrežami (ANN), PCA, PLS...

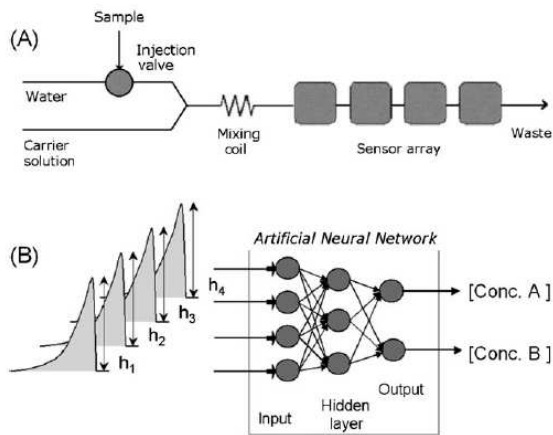
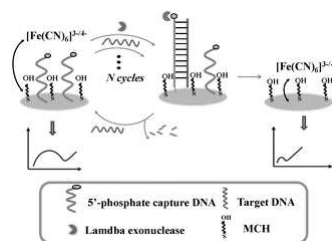


Fig. 4. Schematic illustrating the use of a potentiometric electronic tongue within a FIA system: A) typical flow manifold to use a sensor array. B) Conceptual approach for a multidetermination application employing ANNs that use as input information the obtained FIA peak heights.

Vir: M. del Valle, *Electroanalysis* 22 (2010) 1539-1555.

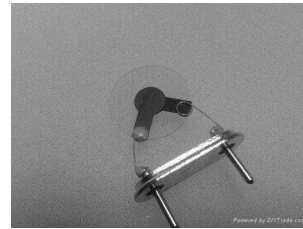
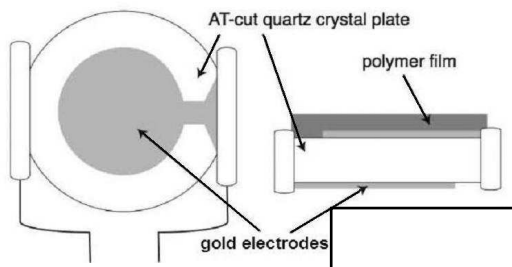
## Impedimetrični senzori

- impedanca: upornost pri izmeničnem toku, upoštevamo velikost in fazo, označimo z  $Z$ , podajamo pri določeni frekvenci
- med dve elektrodi pritismo nizko izmenično napetost in merimo tok v odvisnosti od frekvence (elektronska impedančna spektroskopija, EIS); ena od elektrod prekrita s prepoznavnim elementom  $\Rightarrow$  ob vezavi analita se spremeni impedanca



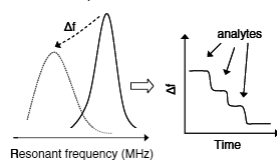
## Piezoelektrični senzorji

- kremenov (kvarčni) piezoelektrični kristal (tudi: mikrotehnica s kvarčnim kristalom, angl. *quartz crystal microbalance*, QCM)– anizotropni material, ki ob mehanskem stresu (npr.  $\Delta m$ ) generira el. dipole
- v prisotnosti el. polja generira oscilacije z določeno frekvenco ( $f_0$ ), ki se obratno sorazmerno spreminja z maso na površini; na površini prepoznavni element (npr. protitelo), ki specifično veže analit



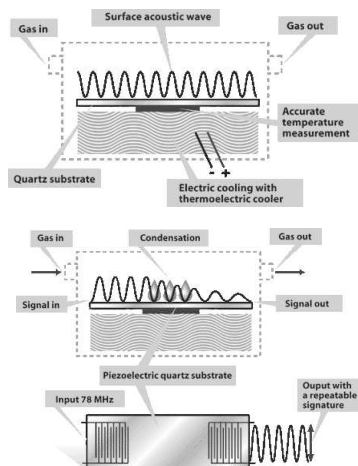
$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A \cdot \sqrt{\rho_q \mu_q}} \cdot \Delta m = -S_f \cdot \Delta m$$

c Sensor response



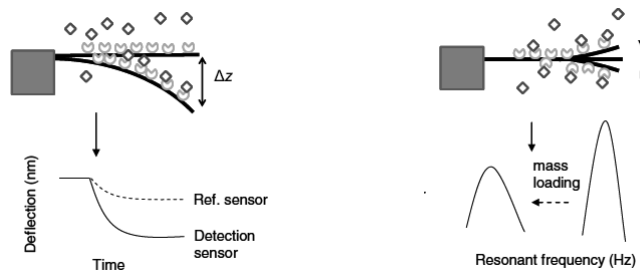
$\Delta f$ ... zmanjšanje resonančne frekvence [Hz]  
 $f_0$ ... intrinzična resonančna frekv. kristala [Hz]  
 $\Delta m$ ... dodana (vezana) masa [g]  
 $A$ ... površina kristala  
 $\rho_q$ ... gostota kremenca ( $2,65 \text{ g/cm}^3$ )  
 $\mu_q$ ... strižni modul ( $2,95 \cdot 10^{11} \text{ dina/cm}^2$ )  
 $S_f$ ... integralna masna občutljivost

- senzorji na površinski akustični val (angl. *surface acoustic wave*, SAW): piezoelektrični kristal med dvema elektrodama, med katerima izmenično el. polje; to v kristalu inducira napetost in generira površinski akustični val; vezava analita na površino s prepoznavnim elementom spremeni frekvenco tega vala



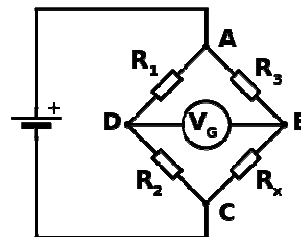
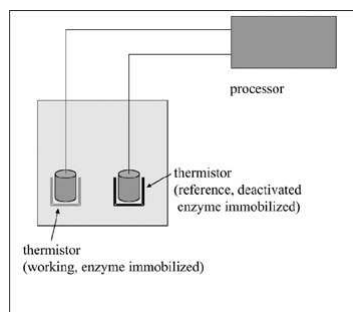
## Vzvodni senzorji (angl. *cantilever sensor*)

- na površini prepoznavni element (npr. protitelo), ki specifično veže analit
- zaradi dodatne masne obremenitve pride do merljivega upogiba (upogljivi tip, angl. *bending-mode*) – sl. levo; premik zaznamo z odbitim laserskim žarkom
- ali pa pride do spremembe frekvence nihanja (resonančni tip, angl. *resonant-mode*) – sl. desno



## Termični biosezorji - encimski termistorji

- encimi imobilizirani na površini termistorja, zaradi reakcije z analitom se sprošča toplota, ki spremeni upornost termistorja; merimo z Wheatstonovim mostom nasproti referenčnemu termistorju



$$\frac{R_2}{R_1} = \frac{R_X}{R_3}$$

## Označevalne metode (angl. *labelling m.*)

Splošni princip:

- v vzorec uvedemo znano količino označenega (angl. *tagged, labelled*) analita
- zaradi značke tak analit lahko ločimo od neoznačenega analita in od ostalih spojin v vzorcu, vendar pa ne spremeni njegovih kemijskih lastnosti
- pustimo, da se označeni analit razporedi in premeša z vzorcem
- od vzorca in v njem določimo razmerje med obema oblikama analita; iz njega sklepamo na količino neoznačenega analita v vzorcu

## Direktno izotopsko razredčenje z radioaktivnim izotopom

- radioaktivni izotop elementa ali izotopsko označeno spojino (radioaktivni sledilec – *tracer*) z maso  $m_s^*$  in s specifično aktivnostjo  $A_s$  dodamo znani količini vzorca, nato od vzorca alikvot, izmerimo aktivnost. Velja:

$$A_s \cdot m_s^* = A_x \cdot (m_s^* + m_x) \quad \begin{array}{l} A_x \dots \text{spec. aktivnost vzorca z dodatkom [Bq/g]} \\ m_x \dots \text{masa neoznačenega analita} \end{array}$$

- izračunamo  $m_x$ :

$$m_x = m_s^* \cdot \left( \frac{A_s}{A_x} - 1 \right) \cong m_s^* \cdot \frac{A_s}{A_x}$$

- če analit le v sledovih: substehiometrično izotopsko razredčenje, oba analita (označen in neoznačen) izoliramo iz vzorca (npr. z obarjanjem); primerjamo  $A$  oborine z  $A$  oborine, dobljene samo z rdkd analitom



### Radio-imunski testi (angl. *radio immunoassay*, RIA)

- princip substehiometričnega izotopskega razredčenja
- vzorcu dodamo znano količino rdkt označenega analita, premešamo
- dodamo specifično protitelo za analit
- izoliramo protitelo z vezanim analitom (označenim in neoznačenim) z obarjanjem
- določimo aktivnost
  
- sedaj le redko v uporabi, izpodrinili so jih encimski imunski testi

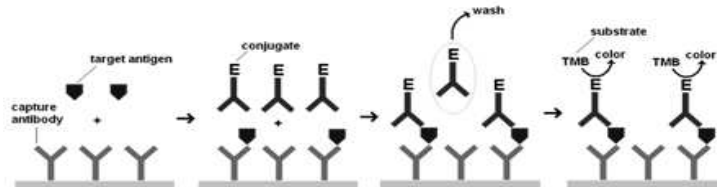
### Encimski imunski testi (angl. *enzyme immunoassay*, EIA)

#### Fluorescenčni imunski testi (angl. *fluorescent immunoassay*, FIA)

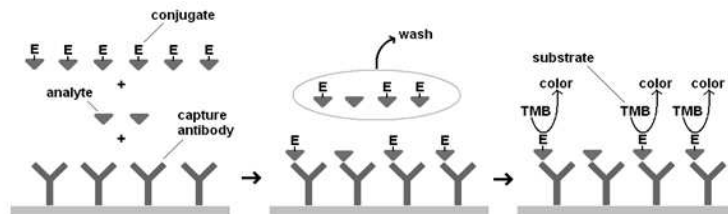
- temeljijo na vezavi antigena na protitelo (poliklonska, monoklonska)
- merimo (ocenimo) jakost barve (encim hrenova peroksidaza) ali fluorescence (encim alkalna fosfataza)
- razviti za visokomolekularne antigene (proteini, hormoni, virusi...) in za nizkomolekularne spojine – hapteni (zdravilne učinkovine, prepovedane droge, okoljska onesnaževala...)
- najbolj znan ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*): direktni (nekompetitivni), indirektni (kompetitivni)
- produkt elektrokemijsko aktiven  $\Rightarrow$  elektrokemična detekcija
- vezava magnetnih delcev  $\Rightarrow$  detekcija magnetnega polja

## Običajnejši izvedbi ELISA

- direktni ELISA (nekompetitivni)



- indirektni ELISA (kompetitivni)



## Delitev imunskih testov (angl. *immunoassay*, IA):

- separacija vezanega in nevezanega označenega antigena pred meritvijo potrebna (**heterogeni IA**) ali pa ne (**homogeni IA**)
- označena zvrst je protitelo ali antigen
- vrsta značke

## Zaželene lastnosti značke (angl. *label*):

- poceni, varna uporaba
- preprost način označevanja, stabilno vezana
- kovalentno in na več mestih se veže na reagent  $\Rightarrow$  visoka občutljivost
- ne spremeni jakosti vezave *Ag-Ab* glede na neoznačeni analog
- jo zlahka zaznamo s poceni inštrumentacijo, možna avtomatizacija
- ima lastnosti, ki omogočajo razlikovanje med prosto in vezano obliko brez predhodne separacije

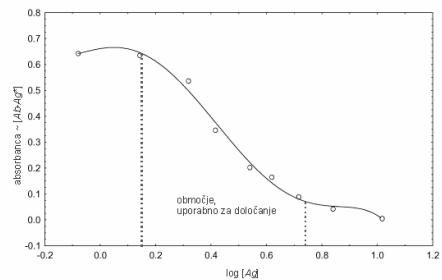
## Merske karakteristike IA

### Metode z označenimi protitelesi

- teoretično zelo nizke meje zaznave (ena molekula  $Ag$ )
- linearno razmerje med merjeno količino in  $[Ag]$

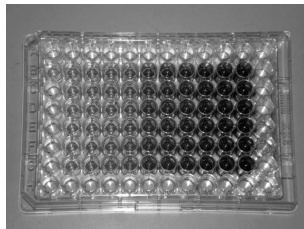
### Metode z označenimi antigeni

- presežek označenega antigena ( $Ag^*$ ), ki tekmuje z neoznačenim (analitom) za vezavna mesta na  $Ab$
- rišemo inhibicijsko krivuljo



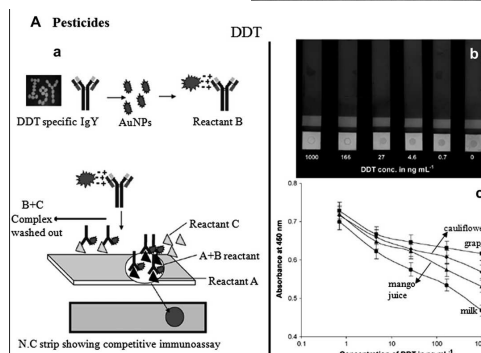
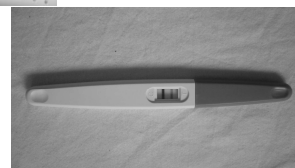
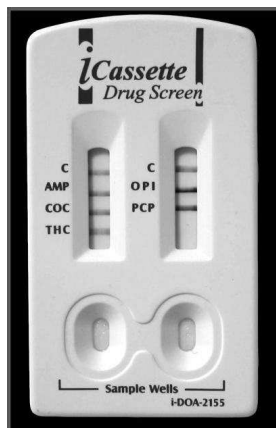
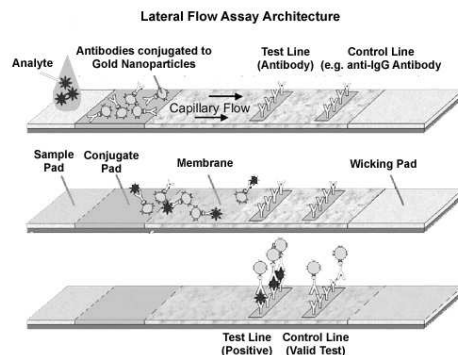
## Meje zaznave odvisne od načina detekcije značke:

- RIA  $\approx 10^{-12}$  mol/L (ni motenj)
- fluorescentna značka  $\approx 10^{-10}$  mol/L; motnje zaradi sipanja svetlobe, dušenja, fluorescence ozadja (proteini, material za mikrotitrne plošče); izboljšamo z merjenjem časovno odvisnega odziva (angl. *time-resolved fluorescence*)
- encimska značka  $\approx 10^{-12}$  mol/L; pride do katalitske ojačitve signala – ena molekula encima lahko tvori veliko (obarvanih, fluorescentnih) produktov, ki jih detektiramo; običajno reakcijo ustavimo po določenem inkubacijskem času z dodatkom denaturanta in nato merimo odziv za produkt; osnova ELISA testov



## IA v obliki pomočljivih paličic (angl. *dipstick*)

- tehnika obstranskega toka (angl. *lateral flow*)
- protitelesa, označeni antigeni, encimsko konjugirani antigeni vezani na delce (npr. magnetne nanodelce) na določenih predelih suhega papirja ali polimera
- tekoči vzorec (npr. urin) s kapilarnim vlekom potuje mimo predelov, analit reagira z reagenti, razvije se barva v obliki črte



## Problemi IA

- ozko merilno območje, zlasti pri kompetitivnih testih
- niso primerljivi med serijami, občutljivi na temperaturo
- velik vpliv matrice: reakcije zelo občutljive na prisotnost proteinov, encimov, lipidov, ionsko moč... ⇒ kalibracija na standarde, pripravljene v živalskem/človeškem serumu ali v drugih matricah (urin, CSF...)
- vedno možnost lažno pozitivnih rezultatov – navzkrižna reaktivnost na podobne spojine (angl. *cross-reactivity*)
- selektivnost Ab možno kontrolirati med pripravo; poliklonska Ab običajno slabše selektivna
- nespecifične interference; vezava interferentov (lipidi, pigmenti, encimi) na podlago, reagente – ovirajo detekcijo

## IA (in drugi senzori) kot kvalitativni – pregledovalni (angl. *screening*) testi

- mejna vrednost (angl. *cut-off value*): vrednost, ki razmejuje binarni odgovor DA/NE – običajno odziv za LOD ali LOQ (ali zakonska ipd. meja); preverimo na veliki populaciji in s primerjavo z rezultati sprejete analizne metode – ločimo:
  - pravi pozitiven rezultat (PPR): obe metodi pozitiven rez.
  - pravi negativen rezultat (PNR): obe metodi negativen rez.
  - lažni pozitiven rez. (LPR): nova m. pozitiven, sprejeta m. negativen rez.
  - lažni negativen rez. (LNR): nova m. negativen, sprejeta m. pozitiven rez.

$$\text{Občutljivost} = \frac{PPR}{PPR + LNR} \cdot 100\% \quad \text{angl. } \textit{sensitivity}; \text{ delež identificiranih pozitivnih vzorcev}$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{PNR}{PNR + LPR} \cdot 100\% \quad \text{angl. } \textit{specificity}; \text{ delež identificiranih negativnih vzorcev}$$

$$\text{Učinkovitost} = \frac{PPR + PNR}{N_{\text{vzorcev}}} \cdot 100\% \quad \text{angl. } \textit{efficiency}; \text{ delež pravih rezultatov}$$