МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ТВЕРСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет химико-биолого-географический

Кафедра неорганической и аналитической химии

***Курсовая работа***

**“Настоящее и будущее биосенсоров”**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Выполнил: | студент Х-Б-Г факультета |
|  | Курс: | 2 |
| Проверил: | Группа: | 26(2) |
| «\_\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2002г. | Фамилия: | Лапшин С.В. |

Тверь - 2002г.

Содержание

Введение 3

Что такое биосенсор 3

Как работает биосенсор 5

Где применяют биосенсоры 6

Биосенсоры на основе других биоматериалов 7

Проблемы и перспективы развития 9

Литература 11

# Введение

Биологические методы позволяют судить о присутствии какого-либо вещества или его количественном содержании по характеру и величине его воздействия на определенный организм, взятый как индикаторный. Аналитическим сигналом при этом является изменение состояния жизнедеятельности этого организма, то есть его реакция на раздражитель, которым, например, могут быть токсиканты среды обитания или какие-либо другие биологически активные соединения, вызывающие нарушение жизненных функций индикаторного организма или его гибель. К биологическим методам относят и биохимические методы, в частности ферментативные, а также различные методики, например индикаторные трубки на основе ферментов и других биологических материалов. Интересно, что механизм получения информации о составе какого-либо объекта с помощью этих методов и устройств моделирует процесс в живой природе, что особенно важно при анализе объектов биологического происхождения.

Известно, что ферменты - это биологические катализаторы, обладающие ярко выраженной способностью избирательно катализировать многие химические превращения как в живой клетке, так и вне организма. Замечательные свойства ферментов давно привлекали внимание исследователей, в том числе и аналитиков, но практическому применению ферментов, например для аналитических целей, препятствовали прежде всего малая доступность чистых ферментов, неустойчивость во времени их растворов, препаратов при хранении и воздействии на них различных факторов (тепловых, химических), невозможность многократного использования одной порции фермента из-за сложности отделения его от других компонентов раствора, высокая стоимость очищенных препаратов. Однако выход из положения вскоре был найден, и появилась возможность использования каталитических свойств ферментов вне их связи с живым организмом и возможность сохранения этой способности в течение длительного времени практически без изменения. Достижения в этой области биохимии и энзимологии дали начало развитию нового направления аналитической химии - безреагентных методов анализа, основанных на использовании различных биохимических сенсоров.

# Что такое биосенсор

Под термином "биосенсор" следует понимать устройство, в котором чувствительный слой, содержащий биологический материал: ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены / антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК, непосредственно реагирующий на присутствие определяемого компонента, генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Конструктивно биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей, или трансдьюсеров, - биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. Биохимический преобразователь, или биотрансдьюсер, выполняет функцию биологического элемента распознавания, преобразуя определяемый компонент, а точнее, информацию о химических связях в физическое или химическое свойство или сигнал, а физический преобразователь это свойство фиксирует с помощью специальной аппаратуры. В данном случае реализуется принципиально новый способ получения информации о химическом составе раствора. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким дополнительным операциям, связанным с использованием других реагентов, концентрированием и т. д. (отсюда и название - безреагентные методы анализа).

Существует большое разнообразие физических трансдьюсеров: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические, трансдьюсеры на поверхностных акустических волнах и т.п. В настоящее время наибольшее распространение получили электрохимические преобразователи. Одни из них генерируют потенциал на специальном электроде, на поверхность которого нанесен слой биоматериала, другие генерируют электрический ток реакции продукта превращения определяемого вещества на поверхности электрода, вызванного биоматериалом. Другими словами, существуют потенцио- и амперометрические биосенсоры. Если физический преобразователь использует изменение светопоглощения в области биослоя, то такой биосенсор называется, например, оптоволоконным, поскольку измеряемый сигнал будет передаваться измерительному прибору по оптическому волокну. Соответствующий физический преобразователь по аналогии с электродом называют оптродом. По названию преобразователя можно сделать вывод о характере физического свойства, которое измеряется аппаратно, причем, как правило, при таком измерении используется микропроцессорная техника, позволяющая сделать устройство достаточно компактным.

Первое упоминание об аналитических устройствах на основе ферментов или ферментсодержащих материалов появилось сравнительно недавно, в 60-х годах нашего столетия. Затем в обиход вошло понятие "биосенсор" или "биочип". Это важное событие в науке. Здесь отражаются глубокие причины, связанные с так называемыми интеграционно-синтетическими процессами в науке, приводящими к появлению новых знаний. Функционально, таким образом, биосенсоры сопоставлены с датчиками живого организма - биорецепторами, способными преобразовывать все типы сигналов, поступающих из окружающей среды, в электрические.

# Как работает биосенсор

Принцип работы биосенсора достаточно прост. Определяемое вещество диффундирует через полупроницаемую мембрану в тонкий слой биокатализатора, в котором и протекает ферментативная реакция. Поскольку в данном случае продукт ферментативной реакции определяется с помощью электрода, на поверхности которого закреплен фермент, то такое устройство еще называют ферментным электродом. Таким образом, определения "биосенсор" и "ферментный электрод" в данном случае синонимы.

Следует отметить, что характер ферментативной реакции зависит от природы фермента, типа его каталитического действия. Среди ферментов можно выделить оксидоредуктазы, осуществляющие реакции окисления и восстановления, гидролазы, катализирующие гидролиз, трансферазы, вызывающие перенос ацильных, гликозидных и т.п. остатков и т.д. Многие ферменты сейчас доступны, их чистые препараты включены в каталоги ряда фирм-производителей. Важно отметить, что при конструировании биосенсора увеличение продолжительности действия фермента становится основной задачей. Дело в том, что нативный фермент сохраняет свои свойства лишь в течение относительно короткого времени. Поэтому была разработана операция так называемой иммобилизации фермента. В ходе иммобилизации с помощью специальных реагентов фермент "закрепляют" либо на поверхности адсорбентов, например силикагеля, угля или целлюлозы, либо вводят в пленку пористого полимера, либо ковалентно, то есть с помощью химических связей, "пришивают" к какой-либо подложке. При этом фермент закрепляется, перестает быть подвижным, не вымывается из биослоя, а его каталитическое действие сохраняется.. Как видно, при иммобилизации ферментов используют разнообразные способы их закрепления, в том числе и комбинированные. Биосенсоры могут быть сконструированы и по так называемой объемной технологии, при которой индивидуальные компоненты, составляют как бы единый физический ансамбль. Хотя такие биосенсоры в настоящее время и применяются на практике, они имеют недостатки, есть трудности и при их изготовлении. В самом деле, послойное покрытие электрода или какого-либо твердого преобразователя мембраной должно быть воспроизводимо. Соответствующая технология формирования поверхности должна допускать возможность изготовления достаточно миниатюрного электрода. Кроме того, биосенсоры со сравнительно толстыми мембранами дают в итоге большее время отклика, имеются сложности и при их градуировке. Успехи в области развития средств микроэлектроники подтолкнули разработчиков конструкций биосенсоров к новым решениям. Оказалось перспективным использовать так называемую планарную технологию (фотолитографию, полупроводниковую технику покрытий и т. д.), по которой можно изготовить так называемый биочип, объединяющий сенсорную систему, трансдьюсер, аналого-цифровой преобразователь и микропроцессор для измерения аналитического сигнала и расчета результатов анализа. Хотя такие биочипы могут тиражироваться, основной проблемой в данном случае будет являться воспроизводимость состояния, то есть микроструктуры поверхности с нанесенным слоем биологически активного фермента. Трудной задачей представляется в данном случае и оптимизация такой структуры в отличие от объемной технологии, реализованной присутствием в конструкции сенсорной части нескольких молекулярных слоев. Тем не менее "молекулярный дизайн" при конструировании биосенсоров будущего может составить реальную конкуренцию объемному их варианту.

# Где применяют биосенсоры

По-видимому, самым распространенным в настоящее время является амперометрический биосенсор на основе иммобилизованной глюкозоксидазы для определения сахара в крови. Исторически этот биосенсор является самым "древним". В настоящее время для определения глюкозы создано наибольшее число различных биосенсоров, что связано с необходимостью контроля за содержанием сахара в биологических жидкостях, например в крови, при диагностировании и лечении некоторых заболеваний, прежде всего диабета. Схема функционирования биосенсора на глюкозу в принципе типична и для других амперометрических биосенсоров с аналогичным трансдьюсером. Ток восстановления кислорода на платиновом катоде прямо пропорционален концентрации кислорода. В присутствии субстрата (например, глюкозы в крови, взятой для анализа) ферментативная реакция понижает концентрацию O2.Таким образом, ток восстановления кислорода уменьшается пропорционально концентрации субстрата

Преимущество данного типа биосенсора состоит прежде всего в его высокой селективности. Избирательность подобных биосенсоров определяется высокой специфичностью глюкозоксидазы и природой электрохимической реакции, в которой участвуют компоненты ферментативного процесса. В целом класс ферментов - оксидаз является высокоспецифичным по отношению к определяемым субстратам. Системы же на основе небиологического преобразователя, напротив, не столь селективны, как этого бы хотелось, что обусловлено рядом причин. Тем не менее имеются ограничения и по применению данной конструкции биосенсора, обусловленные влиянием кислорода и других посторонних веществ, способных проникать через биослой (точнее, через мембрану), а потому задача совершенствования конструкций биосенсоров на глюкозу представляется весьма актуальной.

Один из возможных путей такого усовершенствования заключается в следующем. Если изменить полярность включения электрода-трансдьюсера в глюкозном биосенсоре на противоположную, то есть платиновый катод сделать анодом, то при потенциале +0,6В он становится совершенно нечувствительным к кислороду, но зато дает отклик на пероксид водорода, который при данном значении потенциала окисляется до воды. Чувствительность такого электрода к пероксиду водорода оказалась привлекательной, а поскольку вода образуется как продукт ферментативной реакции, по его содержанию можно сделать вывод о концентрации, например глюкозы в различных объектах. Другой способ улучшения селективности биосенсоров и устранения помех от посторонних примесей состоит в использовании различных мембран - пленок, предотвращающих их попадание непосредственно на электрод-преобразователь. При этом внутренняя мембрана выполняет функцию защиты от примесей, а внешняя мембрана пропускает субстрат в биослой. Однако необходимо отметить, что с помощью специальных приемов, называемых химической модификацией, можно до такой степени изменить свойства поверхности электрода, что он будет "глухим" к большинству примесей и, напротив, чувствительным к компонентам ферментативной реакции.

Биосенсоры, основанные на кислородном электроде как физическом трансдьюсере, позволяют определять разнообразные субстраты ферментов: кроме глюкозы - лактаты, L-аминокислоты, салицилаты, оксалаты, пируваты, то есть анионы соответствующих карбоновых кислот. В литературе описаны другие биосенсоры подобного типа, ряд которых применяется на практике.

С помощью биосенсоров можно решить и обратную задачу: при некоторой определенной концентрации субстрата оценивать активность собственно фермента по величине измеряемого сигнала ( потенциала, тока и т. д.). Из описания работы фермента следует, что измеряемый сигнал зависит не только от концентрации субстрата, но и от каталитической активности биологического преобразователя, то есть фермента. Такое использование биосенсоров позволяет измерить активность большого числа ферментов, например в крови. Оценка активности ферментов, связанных с сердечной деятельностью, таких, как аспартамаминотрансфераза, креатинкиназа, позволяет в клинических условиях оценивать глубину инфаркта миокарда. Измерения активности фермента амилазы используются в педиатрии.

# Биосенсоры на основе других биоматериалов

Многие ферменты дороги и быстро теряют свою активность, использование выполненных на их основе биосенсоров не может быть экономически целесообразным. Поэтому применение бактерий, микроорганизмов и биологических тканей различного происхождения более предпочтительно, поскольку в данном случае отпадает необходимость в предварительном получении и очистке ферментов. К существенным недостаткам таких биосенсоров можно отнести низкую селективность определения вследствие того, что клетки живых организмов фактически являются источником самых разнообразных ферментов. Помимо этого время отклика биосенсоров на основе тканей и микроорганизмов может быть достаточно большим, что также уменьшает их практическую ценность. Тем не менее в последнее время наблюдается повышенный интерес к разработке конструкций электродов, содержащих не сами ферменты в очищенном виде, а их первозданные источники - биологические материалы. Так, было установлено, что тканевые срезы в биосенсорах могут выполнять функцию источников каталитической активности. Например, создан биосенсор на аскорбиновую кислоту, состоящий из платинового электрода и пластины кожуры огурца или тыквы, служащей источником аскорбиноксидазы. Активность фермента в такой природной матрице достаточна для проведения 50-80 определений аскорбиновой кислоты в различных объектах. Установлено, что пластины биоматериала могут храниться без потери активности в течение года в 50%-ном глицерине.

Аналогичный подход использовали при создании конструкции биосенсора на допамин - важнейший биогенный амин, участвующий в регуляции деятельности мозга. В данном биосенсоре ткань плода банана была иммобилизована на поверхности кислородного электрода. В рассмотренных случаях биоматериалы создают "естественное окружение" для ферментов, способствующее стабилизации их активности. Тканевые материалы достаточно долго сохраняют высокую специфичность, что очень важно для биосенсора, тогда как выделенные ферменты в тех же условиях быстро разрушаются. Известны биосенсоры, в которых использован цельный фрагмент ткани печени быка, являющийся носителем фермента каталазы и иммобилизованный на кислородном электроде. Ферментативное действие каталазы, проявляющееся в катализе реакции разложения пероксида водорода, используют в этом случае для создания соответствующего электрода. Разработан биосенсор на основе кожуры кабачка или огурца и кислородного электрода для определения L-аскорбиновой кислоты во фруктовых соках, функционирующий подобно аналогичному типу электрода, уже рассмотренного выше. Тем не менее, несмотря на успехи в развитии биосенсоров на основе биологических материалов, надежность их функционирования все еще остается спорной. Еще один пример конструкции биосенсорного устройства относится к ферментному электроду на основе микроорганизмов - дрожжей, помещаемых между двумя пористыми мембранами. Биосенсор на основе иммобилизованных дрожжей и кислородного электрода позволяет определять этанол и метанол, например в промышленных стоках.

Интерес представляют биосенсоры на основе иммобилизованных на мембране микроорганизмов, служащих элементом так называемого микробного сенсора. В качестве примера таких устройств можно упомянуть амперометрический сенсор на аммиак (в сточных водах) на основе иммобилизованных нитрифицирующих бактерий и кислородного электрода. Такой биосенсор полезен при решении вопросов охраны окружающей среды, и в частности при контроле степени очистки промышленных стоков.

Можно отметить также использование биосенсоров на основе гидролаз - ферментов, являющихся катализаторами гидролитического расщепления субстратов. Эти биосенсоры предназначаются, как правило, для эколого-аналитического контроля остаточных количеств пестицидов класса фосфорорганических соединений, а также для определения некоторых ОВ. Если при гидролизе какого-либо субстрата ферментом класса гидролаз образуется электрохимически активное соединение, то, контролируя содержание последнего, можно контролировать ферментативную реакцию так же, как в предыдущих случаях. Однако в присутствии веществ, являющихся ингибиторами, активность фермента уменьшается, что и обнаруживается по сигналу, регистрируемому электродом. Интересно отметить высокую чувствительность такого определения: эффект изменения активности фермента доступен для измерения уже при действии ультраследовых количеств ингибитора - на уровне пико- и фемтограмм

# Проблемы и перспективы развития

Концепция распознавания определяемого вещества с помощью иммобилизованного биоматериала оказалась плодотворной. В итоге исследователи приобрели новое средство, позволяющее быстро получить достоверную информацию о состоянии окружающей среды и здоровья человека. Некоторые биосенсоры уже получают распространение для индивидуального использования в домашних аптечках (чаще всего для определения сахара в крови). Интерес к биосенсорам непрерывно растет. В 1996 году состоялись четыре крупные международные конференции по биосенсорам.

Если иметь в виду все разнообразие ферментов, присутствующих и действующих в живом организме и являющихся потенциальными биологическими преобразователями, то следует отметить, что существующее сегодня число конструкций биосенсоров может быть увеличено в десятки и даже сотни раз. Биосенсоры получают распространение в биотехнологии. Хотя здесь и встречаются трудности, связанные с невысокой термической устойчивостью предложенных устройств, приводящей к дезактивации биослоя, есть основания полагать, что данный недостаток будет в скором времени преодолен. Так, полагают, что для увеличения срока службы биосенсоров в обозначенных выше условиях можно использовать ферменты, выделенные из термофильных бактерий и одноклеточных водорослей - микроорганизмов, устойчивых к действию высоких температур. Определенные трудности представляют собой также проблемы градуировки биосенсоров и надежности их показаний. Для улучшения последнего показателя, в частности, предлагается использовать мультисенсорную систему, состоящую из ряда биочипов. Для получения определенной "емкости" надежных данных производится расчет необходимого числа таких датчиков. Однако в целом так называемые метрологические характеристики биосенсоров вполне приемлемы. Относительное стандартное отклонение определяемой концентрации не выше 10-12 %, притом что нижняя граница определяемых содержаний достигает 10-15 моль/л. Некоторые биосенсоры работают по принципу да-нет, что вполне приемлемо, когда решается вопрос о присутствии ультрамалых количеств высокотоксичных веществ в объектах окружающей среды. Если определяемые компоненты находятся в сложной смеси или матрице или же близки по своим свойствам, то при анализе используют хроматографические методы разделения. Контроль за разделением осуществляют с помощью системы детекторов на основе биосенсоров. И здесь получены поразительные результаты: разделяют и количественно определяют оптические активные изомеры, различные сахара (лактозу, фруктозу, глюкозу и т.д.), сложные по структуре биологически активные соединения и т.п.

Вот один из недавних примеров разработки биосенсоров, основанных на использовании природного хеморецептора. Хеморецептор, извлеченный из чувствительных антенн (органелл) голубого морского краба, был прикреплен к ультрамикроэлектроду, измеряющему потенциал. В результате был изготовлен новый тип потенциометрического детектора, чрезвычайно быстро реагирующего на ничтожные изменения состава среды, в которую он погружен. Сам голубой краб очень чувствителен к следам тяжелых металлов и живет только в чистейшей морской воде.

На очереди создание биосенсоров, заменяющих рецепторы живых организмов, что позволит создать "искусственные органы" обоняния и вкуса, а также применить указанные разработки для возможно более точной и информативной диагностики ряда заболеваний. Несомненно, что в ближайшем будущем в этой смежной области биологии и химии следует ожидать новых открытий.

# Литература

1. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернера и др. М.: Мир, 1992. 614 с.
2. Будников Г.К., Майстренко В.Н., Муринов Ю.И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикроэлектродами. М.: Наука, 1994. 239 с.
3. Будников Г.К., Медянцева Э.П., Бабкина С.С. // Успехи химии. 1991. Т. 60. С. 881.