

# Биосенсоры

Карякин А.А.  
д.х.н., профессор  
Химический факультет



# Оглавление

- История создания
- Рынок
- Определение и классификация
- Диабет
- Тест-системы для диабета и их эволюция
- Новые биосенсоры первого поколения
- Неинвазивная диагностика
- Неинвазивный монитор состояния гипоксии



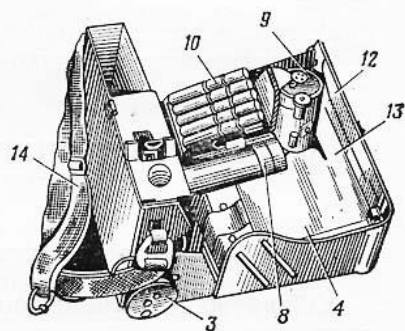


G. G. Guilbault

# Первый биосенсор

## NATO report (1956)

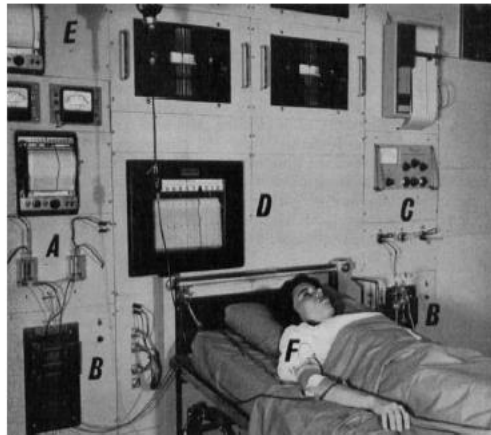
~~Зарин, зоман, Vx~~



# ИДЕЯ ФЕРМЕНТНОГО ЭЛЕКТРОДА

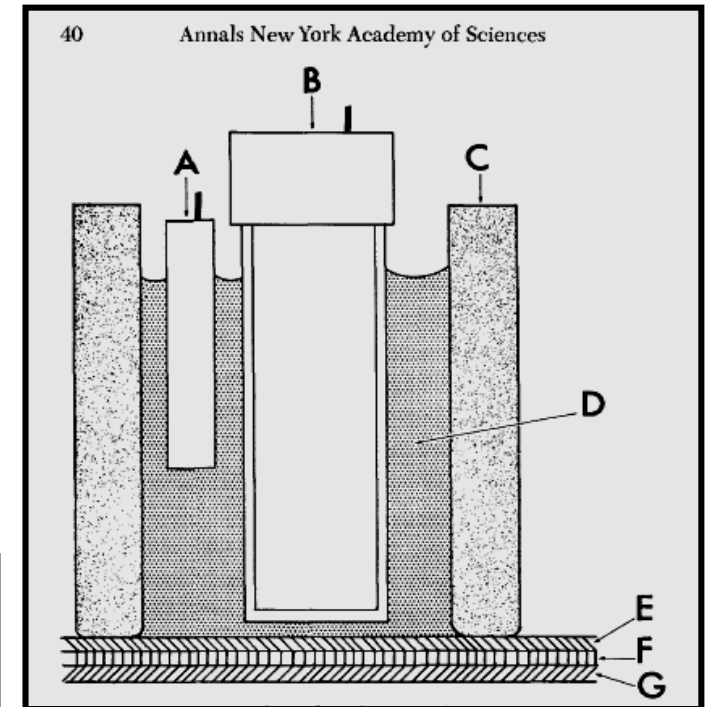
## ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY

Leland C. Clark, Jr., and Champ Lyons  
*Medical College of Alabama, Birmingham, Ala.*



*Enzyme containing membranes.* Although still in the exploratory stage, I want to mention the possibilities for use of enzyme layers trapped between membranes used with electrodes. The principle is illustrated by FIGURE 12, which shows how the specificity of response is regulated by the placement and nature of the enzyme, the nature of the detector electrode, and the nature of the membranes. The active electrode surface bears against a double layer of membrane between which is trapped a thin layer of concentrated enzyme.

ANNALS of THE NEW YORK  
ACADEMY OF SCIENCES



- А- электрод сравнения
- В- рабочий электрод
- С- цилиндр
- Д- электролит
- Е, G - мембраны
- Ф- фермент

Volume 102 Issue Automated and  
Semi-Automated Systems in Clinical Chemistry , Pages 3 - 180  
(October 1962)

# ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТА НА ПОВЕРХНОСТИ ЭЛЕКТРОДА

## The Enzyme Electrode

by

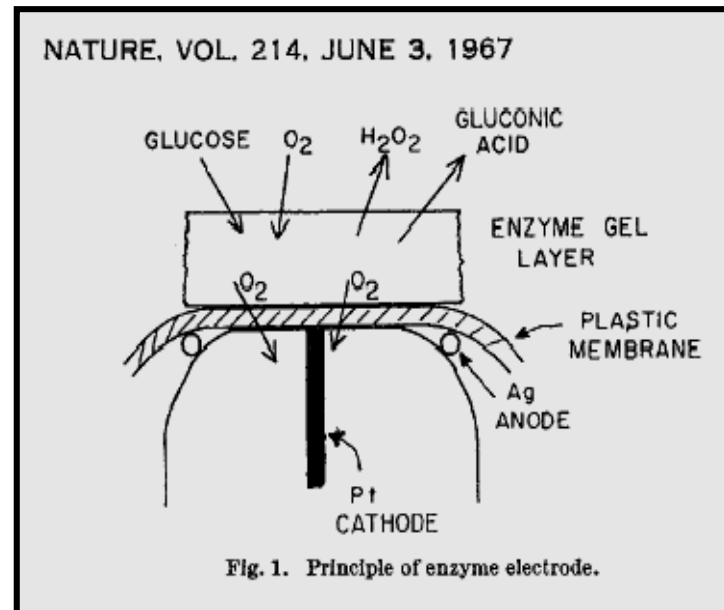
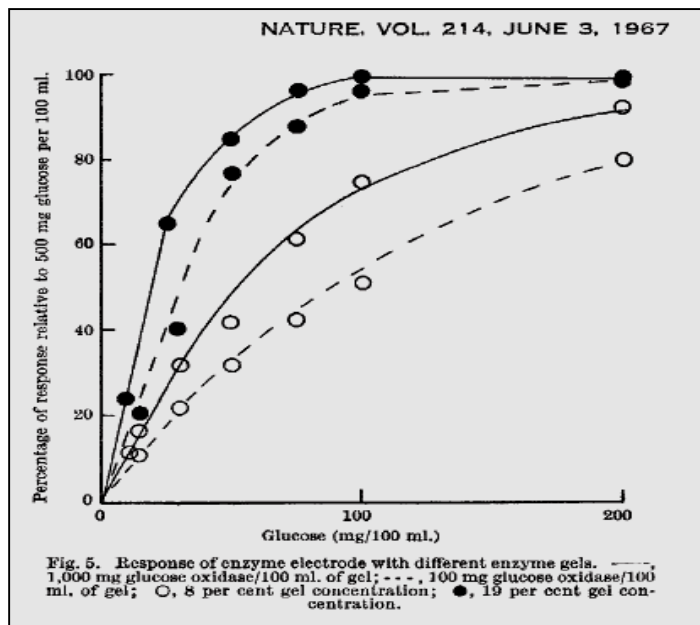
S. J. UPDIKE

G. P. HICKS

Department of Medicine,  
University of Wisconsin,  
Madison, Wisconsin



The enzyme electrode is a miniature chemical transducer which functions by combining an electrochemical procedure with immobilized enzyme activity. This particular model uses glucose oxidase immobilized on a gel to measure the concentration of glucose in biological solutions and in the tissues *in vitro*.



3 June 1967 Vol 214 No  
5092 pp957-1066

# Рынок биосенсоров

2005: 5 млрд \$ USA / год

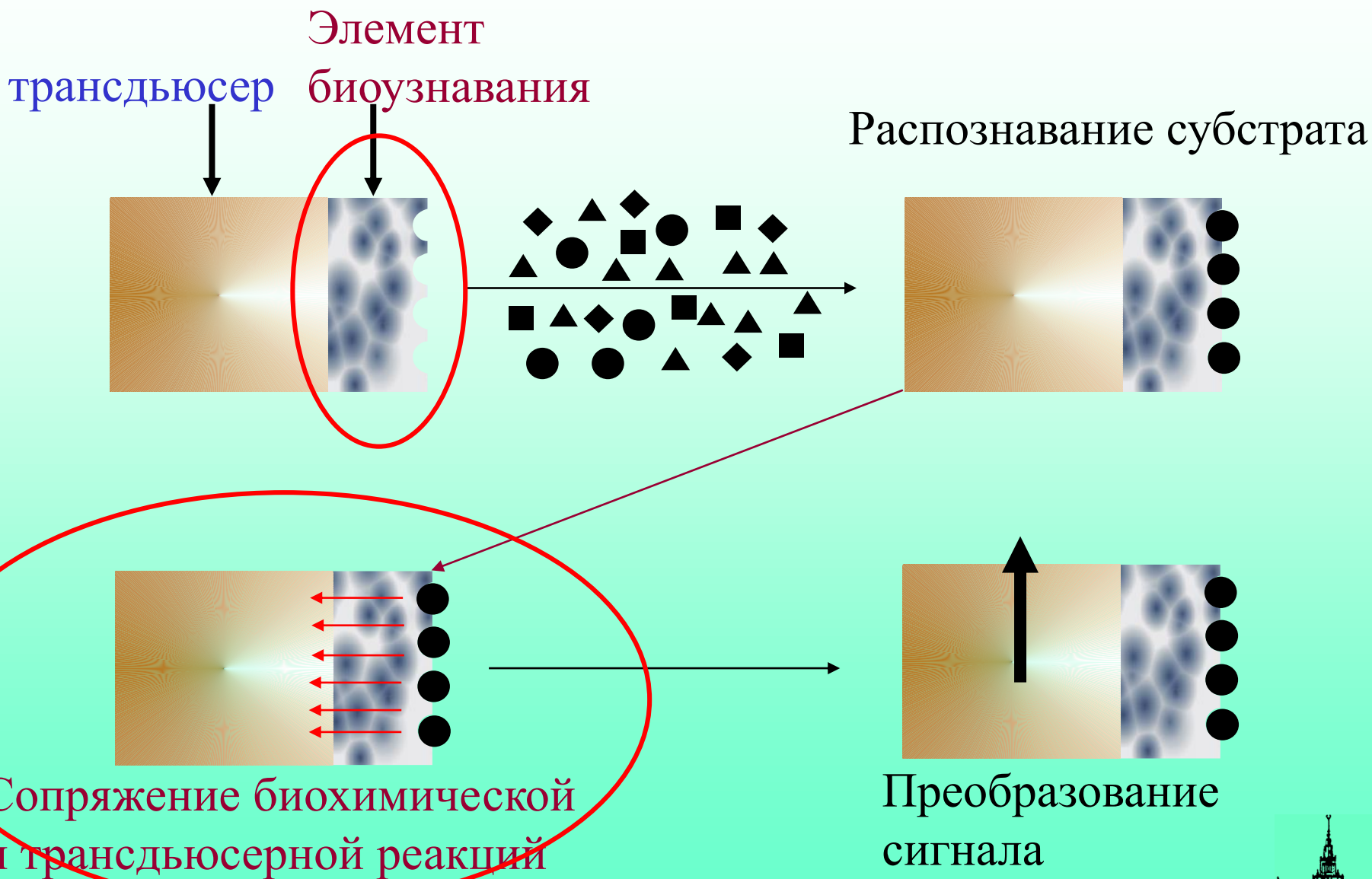
2013: 15 млрд \$ USA / год

Newman, J.D.; Turner, A.P.F. *Biosens. Bioelectron.* **20** (2005) 2435

Turner, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 3184



# Схема действия биосенсора



# Способы биоузнавания

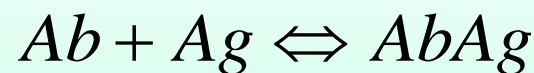
каталитические



Ферменты

Микроорганизмы

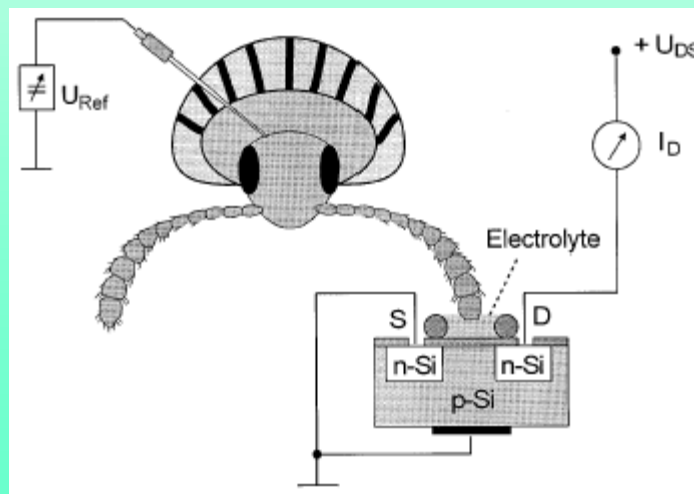
аффинные



Антиген-антитело

Лиганд-рецептор

ДНК



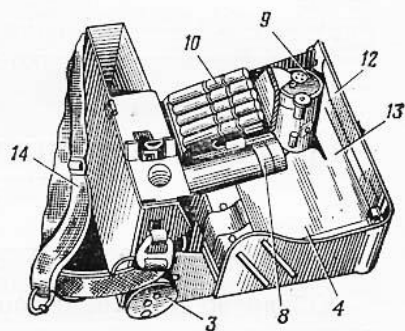




G. G. Guilbault

# Ингибиторные биосенсоры

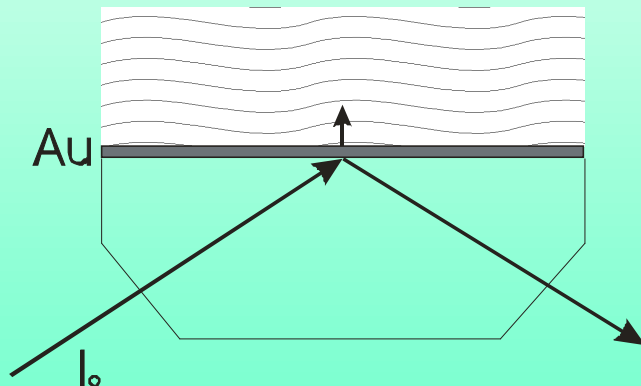
~~Зарин, зоман, Vx~~



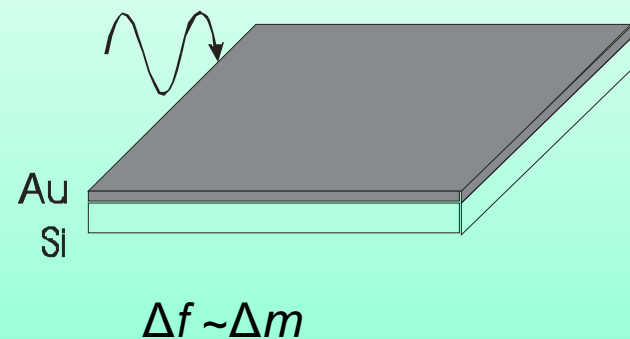
# Типы трансдюсеров

Электрохимические

Оптические



Гравиметрические



Термисторы



# Почему электроанализ:

- широчайший диапазон концентраций  
(вплоть до детекции отдельной молекулы)
- минимальное влияние матрицы  
(цвет, мутность и т.д..)
- самое дешевое оборудование



# Биоэлектрохимия

биосенсоры



биотопливные  
элементы



электросинтез



# Диабет

347 млн человек: 5% населения

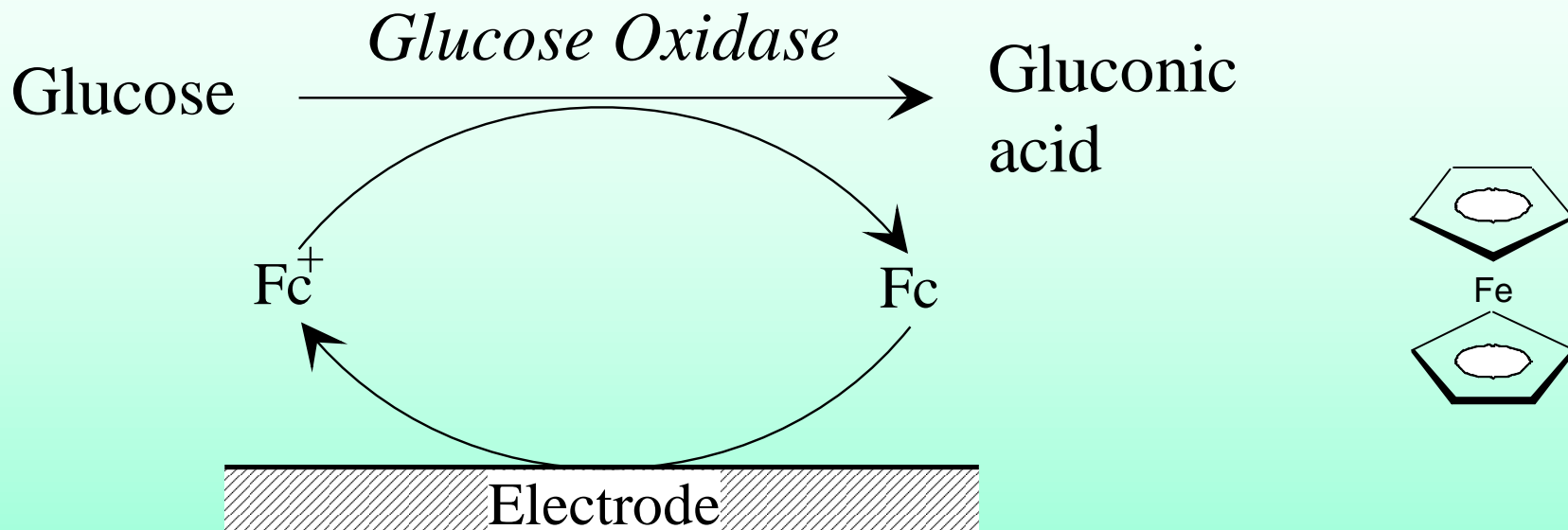
## Осложнения:

- атеросклероз
- слепота
- сердечно-сосудистые заболевания
- почечная недостаточность

Концентрация **глюкозы** в **крови** —  
для отсрочки осложнений



# Биосенсоры II поколения



A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. G. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, and A. P. F. Turner, *Analytical Chemistry* **56**, 667-671 (1984).



# ГЛЮКОЗНЫЕ ТЕСТЫ

Simple  
2-Step  
Procedure

•	<a href="#"><u>Accu-Chek Complete BG System</u></a> (Boehringer Mannheim)
•	<a href="#"><u>Accu-Chek Easy</u></a> (Boehringer Mannheim)
•	<a href="#"><u>Accu-Chek Instant</u></a> (Boehringer Mannheim)
•	<a href="#"><u>Accu-Chek Instant Plus</u></a> (Boehringer Mannheim)
•	<a href="#"><u>Autolet® II Clinisafe</u></a> (Owen Mumford)
•	<a href="#"><u>Autolet® Lite Starter Pack</u></a> (Owen Mumford)
•	<a href="#"><u>Blood Glucose Strips</u></a> (Roche)
•	<a href="#"><u>Exatech®</u></a> (Medisense)
•	<a href="#"><u>Fingerstix Lancets</u></a> (Bayer)
•	<a href="#"><u>Glucofilm™ Test Strips</u></a> (Bayer)
•	<a href="#"><u>Glucose Control Solution</u></a> (Roche)
•	<a href="#"><u>Glucose®</u></a> (Roche)
•	<a href="#"><u>Lifescan One Touch® Basic™ System</u></a> (Johnson & Johnson)
•	<a href="#"><u>Medipoint Blood Lancets</u></a> (Medipoint)
•	<a href="#"><u>Monolet Lancet</u></a> (Kendall-Sherwood)
•	<a href="#"><u>Soft-Touch® II</u></a> (Boehringer Mannheim)
•	<a href="#"><u>Softclix</u></a> (Roche)
•	<a href="#"><u>Unilet Long-Body™ Lancets</u></a> (Owen Mumford)
•	<a href="#"><u>Unistik™-2</u></a> (Owen Mumford)

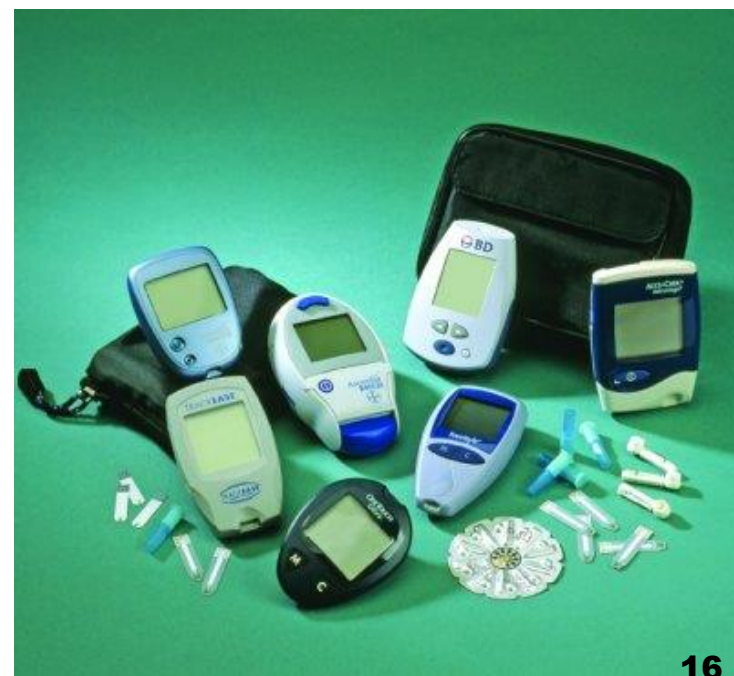




Более **33** приборов от **11** фирм.

Отличия:

- Объем крови
- Скорость тестирования
- Размер
- Операционная система
- Стоимость прибора
- Стоимость тест-полосок





# Некалибруемый глюкозный тест



A. Heller

Therasense:

0.3  $\mu\text{L}$  of blood

FreeStyle<sup>®</sup>—For Virtually  
Pain-Free Testing!  
In An Easy-To-Hold,  
Easy-To-Read Meter

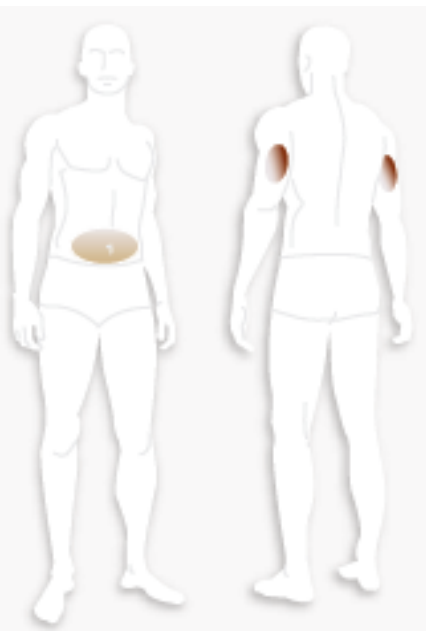


2004: 1 200 000 000 \$

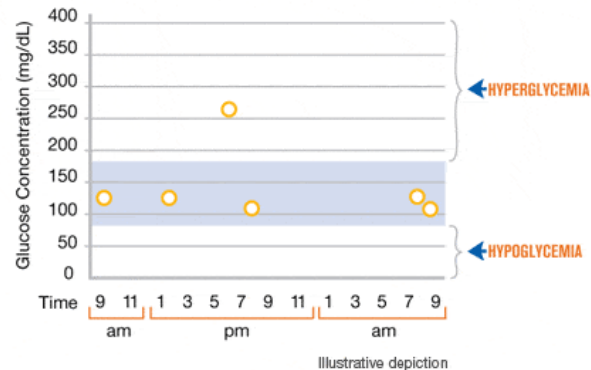
ABBOTT



# Малоинвазивный монитор

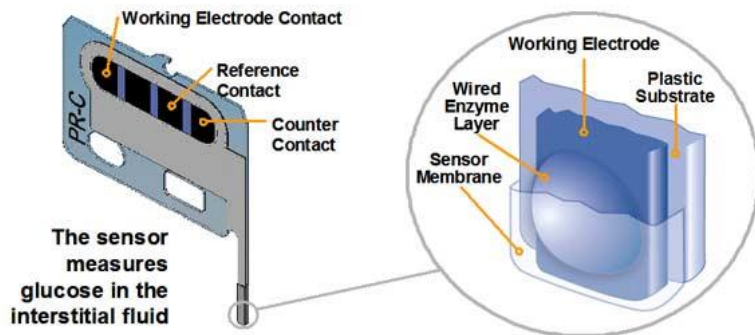


Traditional blood glucose testing (24hrs)



DOC13792\_Rev-A

A target range of 80-180 mg/dL is used in the example above.



- T.J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, *Analytical Chemistry* **66** (1994) 2451-7.  
E. Csoregi, D.W. Schmidtke, A. Heller, *Analytical Chemistry* **67** (1995) 1240-4.  
D.W. Schmidtke, A. Heller, *Analytical Chemistry* **70** (1998) 2149-55.  
T. Chen, K.A. Friedman, I. Lei, A. Heller, *Analytical Chemistry* **72** (2000) 3757.

# Неинвазивный анализ

## Glucowatch

### Iontophoresis:

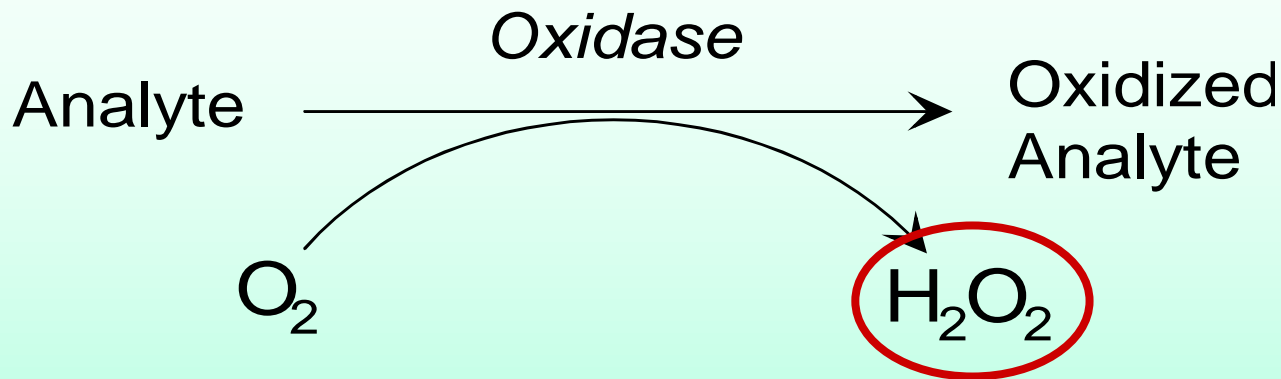
metabolite capturing during electrophoresis



Cygnus corp.



# Оксидазные биосенсоры (> 90% биосенсоров, наборов и т.д.)



## Мониторинг формирования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

### Преимущества:

- самый низкий предел обнаружения (<1 μM);
- наибольший динамический диапазон.

## Как детектировать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>?

Окисление на платине (G.G. Guilbault, et al. *Anal. Chem.* **45** (1973) 2255)

## **ПРОБЛЕМА**

Восстановители продуцируют паразитный сигнал



# Высокоэффективные биосенсоры:

## •наилучший электрокатализатор (трансдьюсер)

- A.A.Karyakin, O.V.Gitelmacher, E.E.Karyakina. *Analytical Chemistry* **67** (1995) 2419  
A.A.Karyakin, E.E.Karyakina, L.Gorton. *Electrochem. Communications* **1** (1999) 78.  
A.A.Karyakin, E.E.Karyakina, L.Gorton. *Analytical Chemistry* **72** (2000) 1720  
A.A.Karyakin, E.A.Puganova, et al. *Analytical Chemistry* **76** (2004) 474.  
A.A.Karyakin, ..., E.E.Karyakina, *Angewandte Chemie-Int. Ed.* **46** (2007) 7678.  
N.A.Sitnikova, A.V.Borisova, ..., A.A.Karyakin *Analytical Chemistry* **83** (2011) 2359  
N.A.Sitnikova, ..., E.E.Karyakina, A.A.Karyakin *Analytical Chemistry* **86** (2014) 4131

## •улучшенный протокол иммобилизации

- A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, et. al. *Analytical Chemistry* **68** (1996) 4335.  
A. Karyakin, E. A. Kotel'nikova et. al. *Analytical Chemistry* **74** (2002) 1597.  
E.I. Yashina, A.V. Borisova, ... , A.A. Karyakin. *Analytical Chemistry* **82** (2010) 1601  
A.N. Sekretaryova, ..., A.A. Karyakin *Analytical Chemistry* **84** (2012) 1220  
M.M.Pribil, ..., E.E.Karyakina, A.A.Karyakin *Analytical Chemistry* **86** (2014) 5215-9

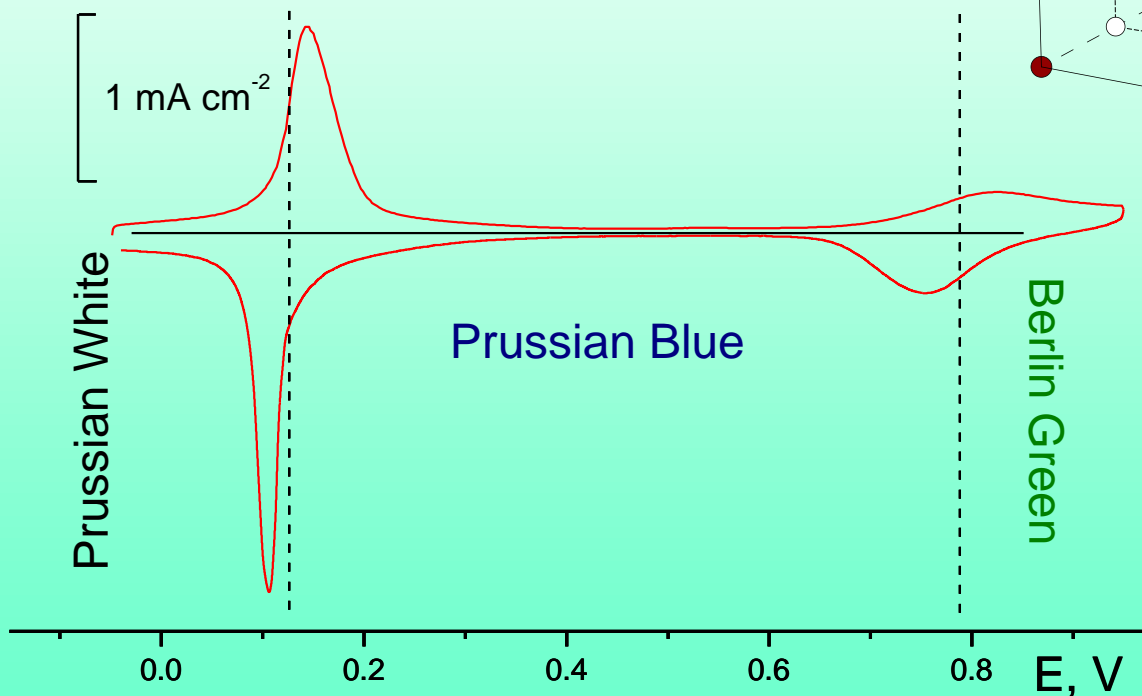
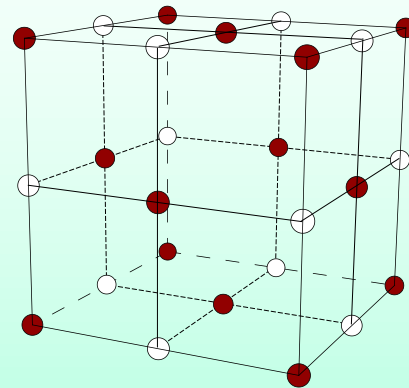


# Берлинская лазурь: $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$

(Miscellanea Berolinensia ad Incrementium Scientiarum. Berlin: (1710) p.377.)

## Электроактивный материал:

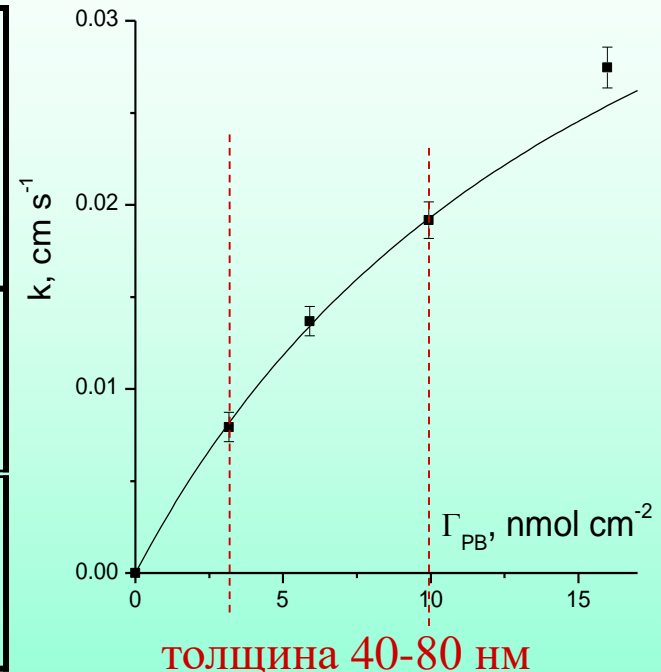
(Neff, V.D. *J. Electrochem. Soc.* **128** (1978) 886)



# Берлинская лазурь $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$

## «Искусственная пероксидаза»

Электрокатализатор	Селективность $j_{\text{H}_2\text{O}_2}/j_{\text{O}_2}$	Э/х константа, см/с
Pt	0.1	$4 \cdot 10^{-6}$
Prussian Blue	400-600	$1 \cdot 10^{-2}$



A.A.Karyakin, O.V.Gitelmacher, E.E.Karyakina. *Analytical Chemistry* **67** (1995) 2419

A.A.Karyakin, E.E.Karyakina, et al.. *Electrochem. Communications* **1** (1999) 78.

A.A.Karyakin, E.E.Karyakina, et al.. *Analytical Chemistry* **72** (2000) 1720

A.A.Karyakin, E.A.Puganova, et al. *Analytical Chemistry* **76** (2004) 474.

A.A.Karyakin, ..., E.E.Karyakina, *Angewandte Chemie-Int. Ed.* **46** (2007) 7678.

N.A.Sitnikova, ..., E.E.Karyakina, A.A.Karyakin *Analytical Chemistry* **86** (2014) 341

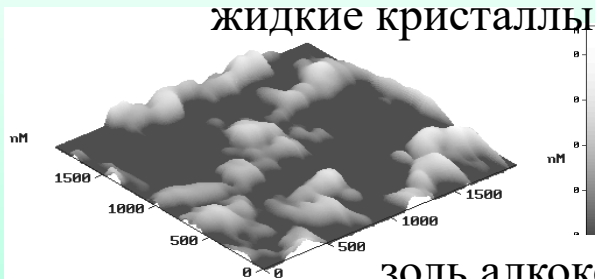


# Система нанoeлектродов Берлинской Лазури: рекордный сенсор

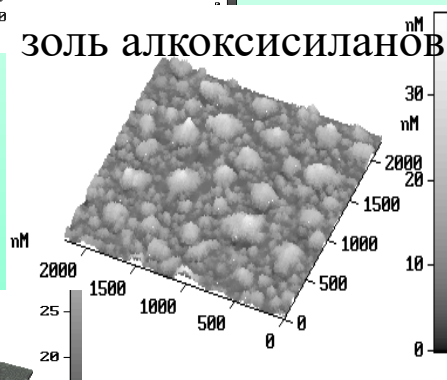
сигнал:шум  $\sim 1/r$

## нано-структуры БЛ

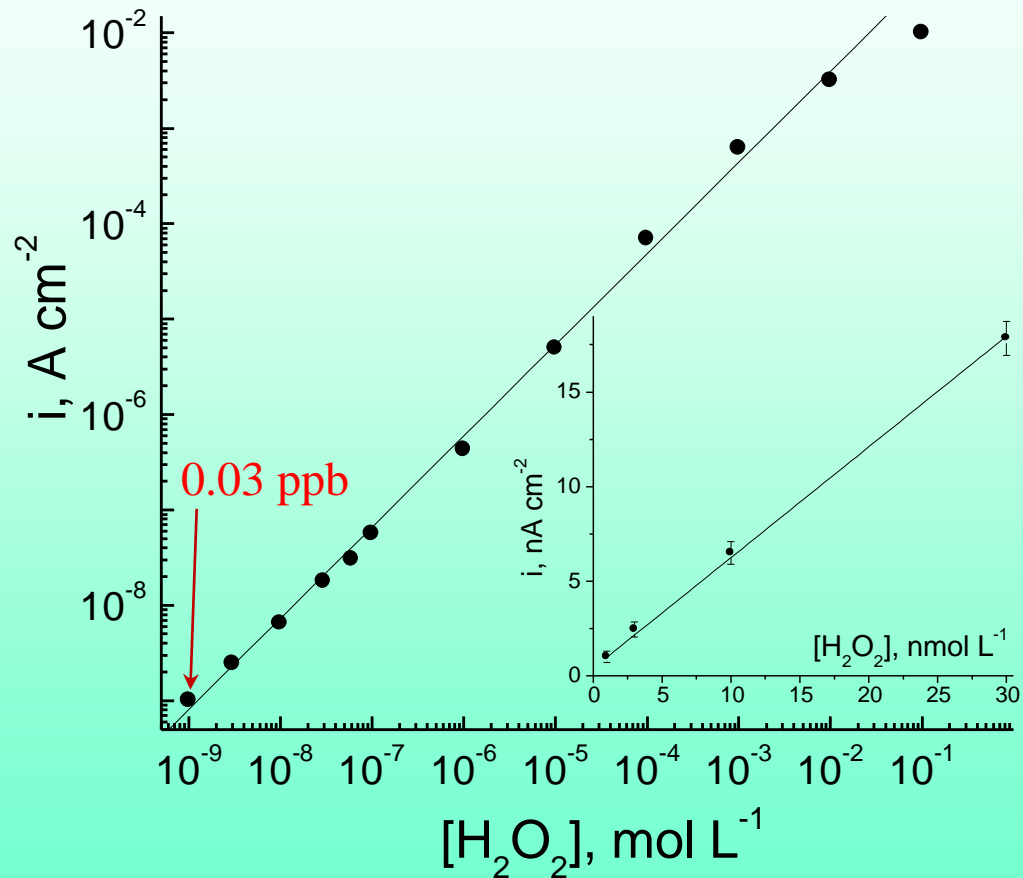
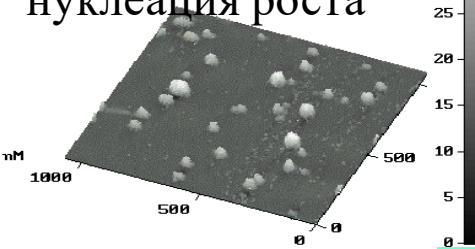
жидкие кристаллы



золь алкоксисиланов



нуклеация роста

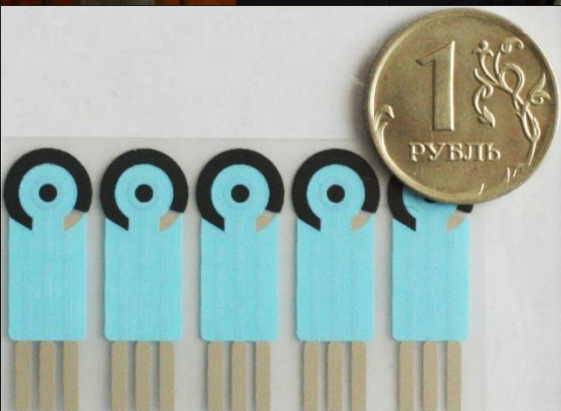
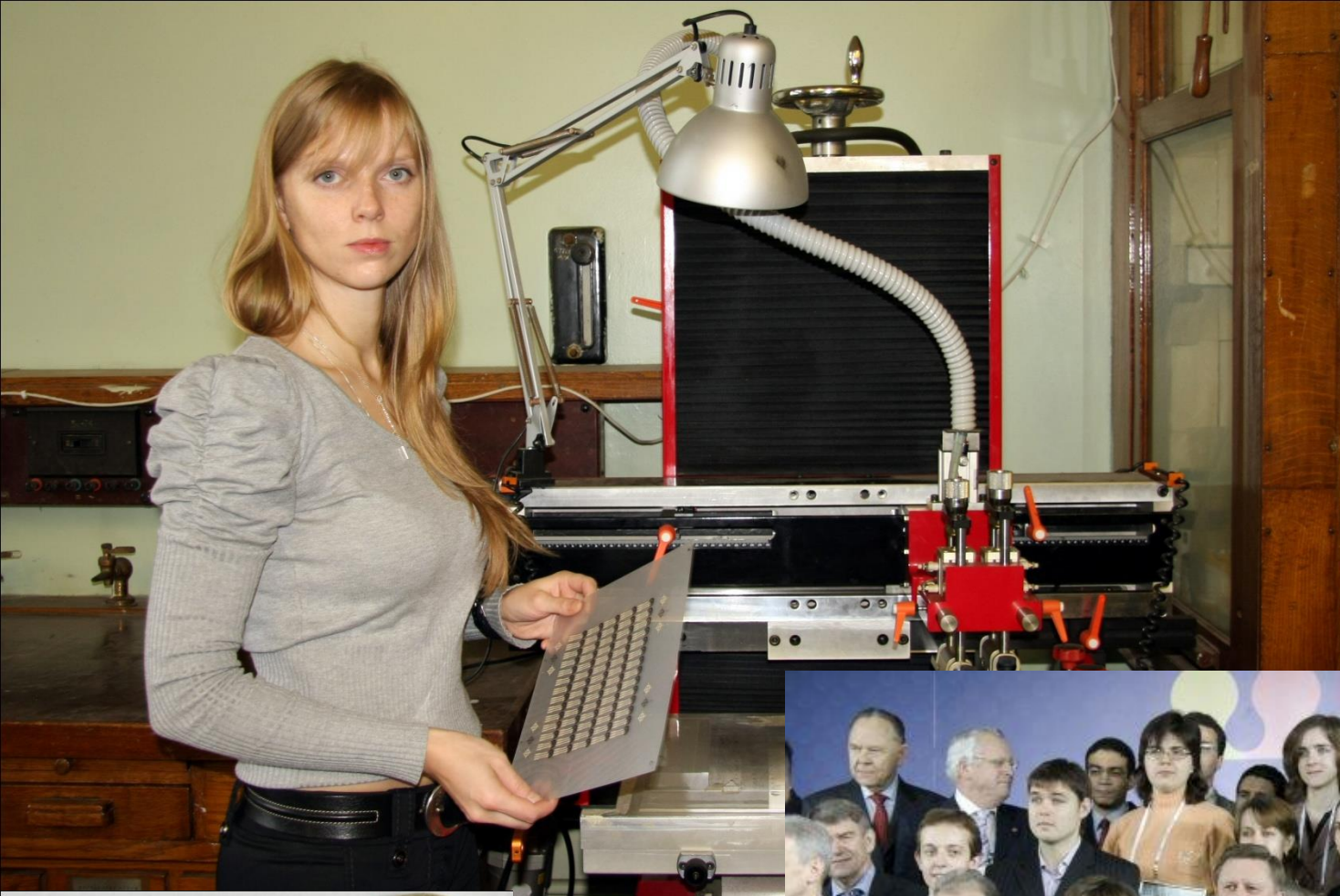


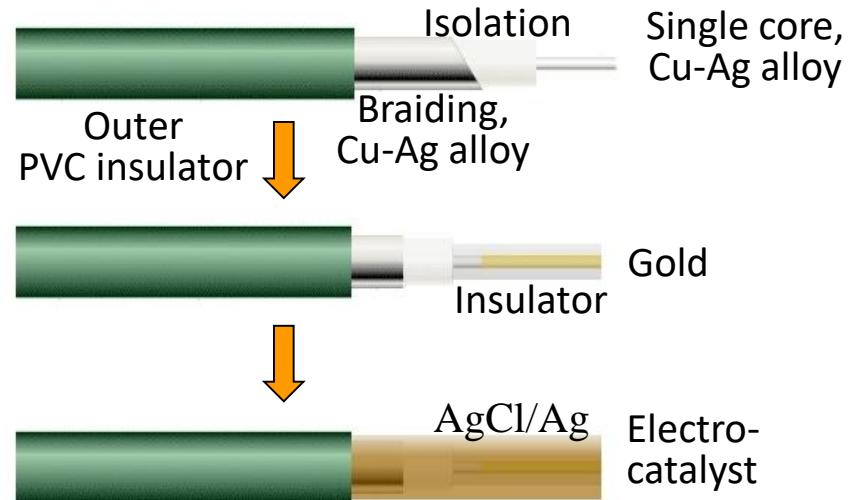
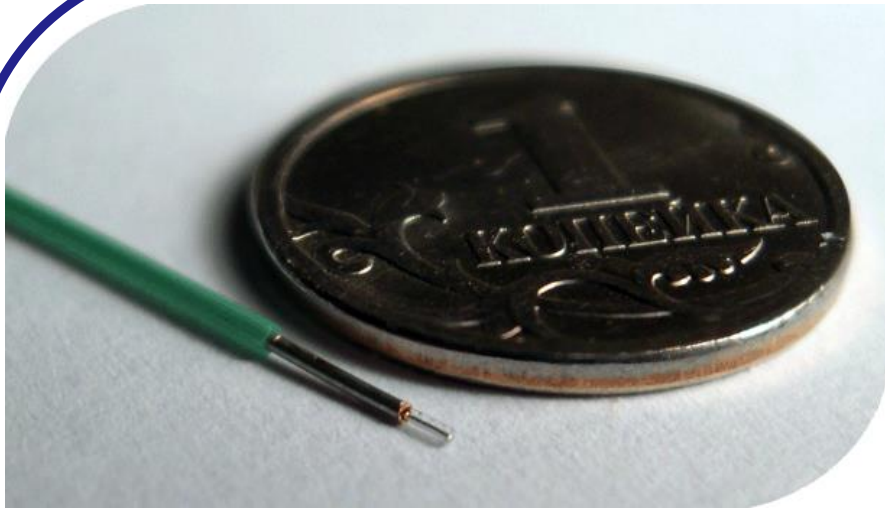
A.A. Karyakin, E.A. Puganova, I.A. Bolshakov, E.E. Karyakina

*Angewandte Chemie* **46** (2007) 7678

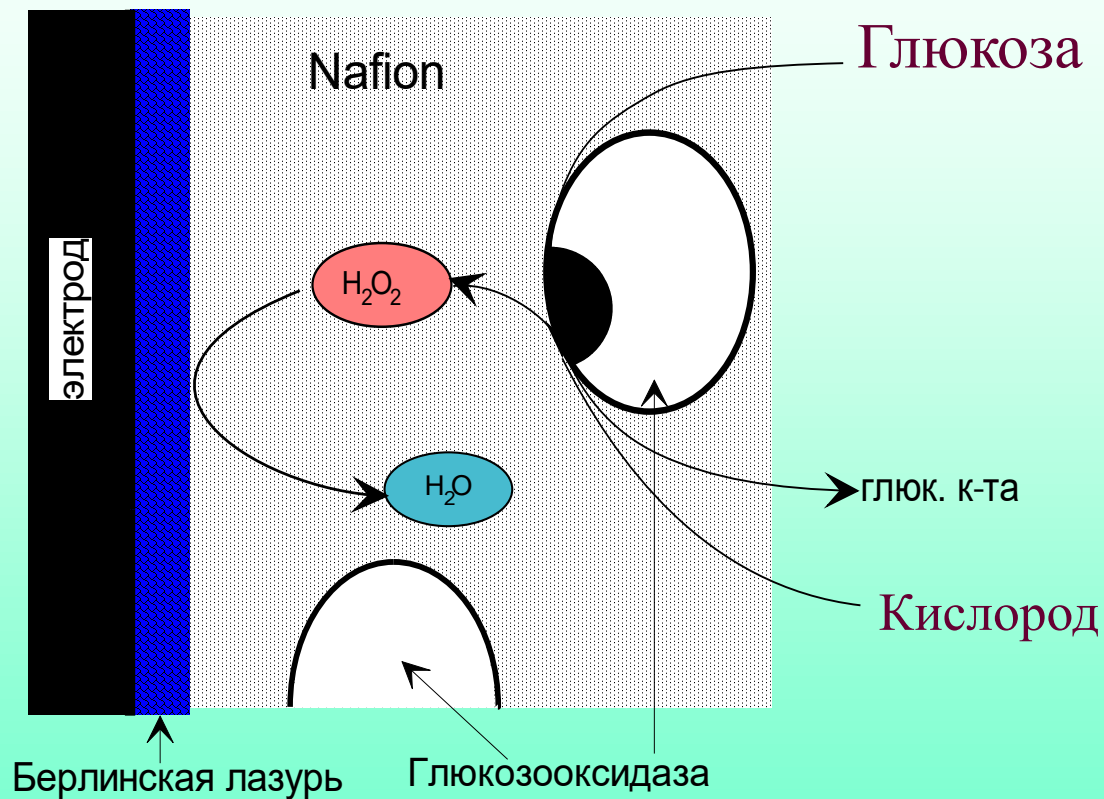








# Биосенсор на основе Берлинской лазури



A.A. Karyakin, O.V. Gitelmacher, E.E. Karyakina. *Analytical Letters* **27** (1994) 2861

*Analytical Chemistry* **67** (1995) 2419. 27



# Комбинация трансдьюсера и способа иммобилизации – рекордные биосенсоры

ГЛЮКОЗА

ГЛЮТАМАТ

ЛАКТАТ

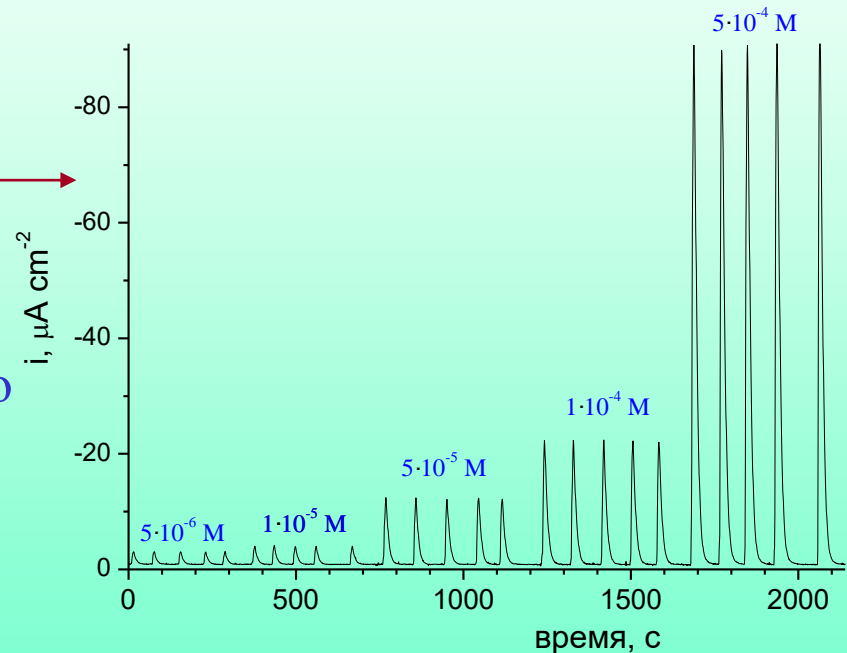
Чувствительность по сравнению

с Biosen C\_Line

в 100 раз выше

Стабильность:

> 500 измерений без калибровки



A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, et. al. *Analytical Chemistry* **68** (1996) 4335.

A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, L.Gorton. *Analytical Chemistry* **72** (2000) 1720

A.A. Karyakin, E.A. Kotel'nikova et. al. *Analytical Chemistry* **74** (2002) 1597.

E.I. Yashina, A.V. Borisova, ... , A.A. Karyakin. *Analytical Chemistry* **82** (2010) 1601

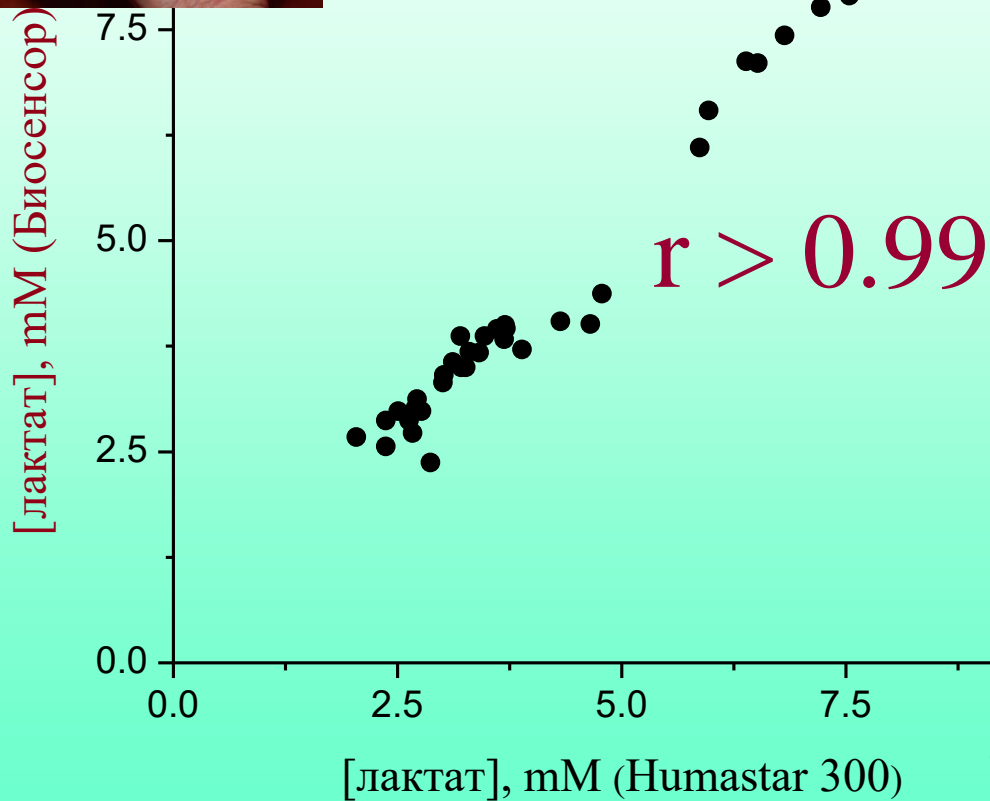


# Лактат в крови:

## корреляция со стандартным методом



27 спортсменов  
до и после нагрузки



# Фальсифицированные напитки

<b>Вино</b>	[глюкоза] mM	[сахароза] mM
Шампанское «Брют», <i>Россия</i>	<b>52</b>	<b>0.2</b>
Красное сухое “Baron de Valls”, <i>France</i>	<b>45</b>	<b>0.05</b>
Красное сухое “La Bifora”, <i>Italy</i>	<b>42</b>	<b>0.05</b>
Красное сухое “Le Chabrote”, <i>France</i>	<b>48</b>	<b>0.05</b>
Красное сухое “Каберне”, <i>Россия</i>	<b>36</b>	<b>13</b>
Красное сухое “Свадебное”, <i>Россия</i>	<b>20</b>	<b>10</b>

*Виноград не содержит сахарозы*

Квас	[лактат]
«Очаково»	7 мг/мл
«Никола»	Не найден
«Бражник»	6.5 мг/мл



# Неинвазивная диагностика ГИПОКСИИ



# Диагностическая ценность пота



*Универсальный  
коллектор пота*



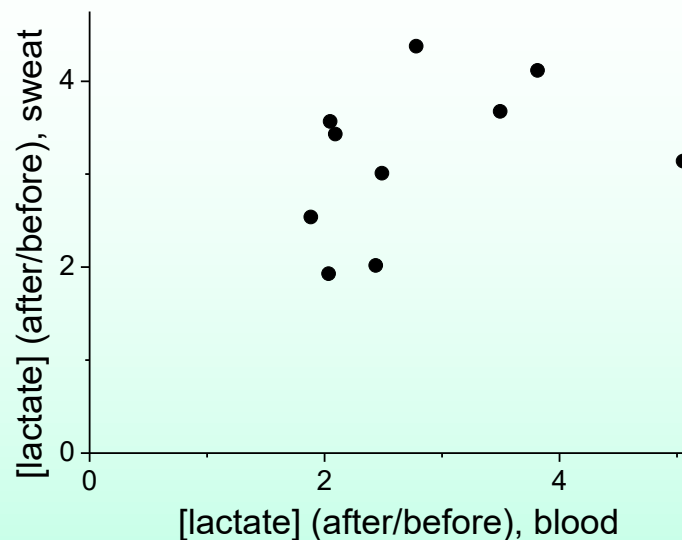
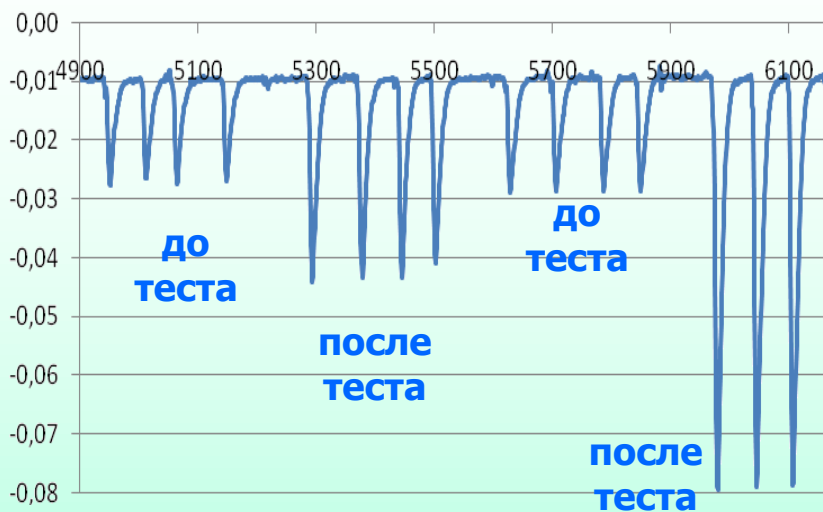
**Член юношеской сборной  
России по лыжным гонкам**





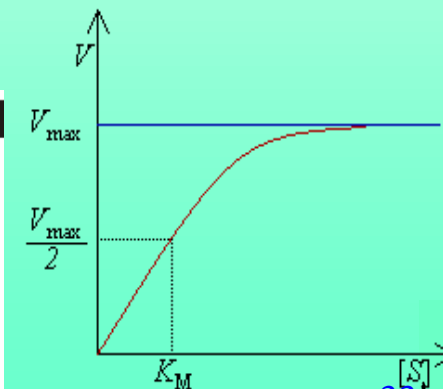
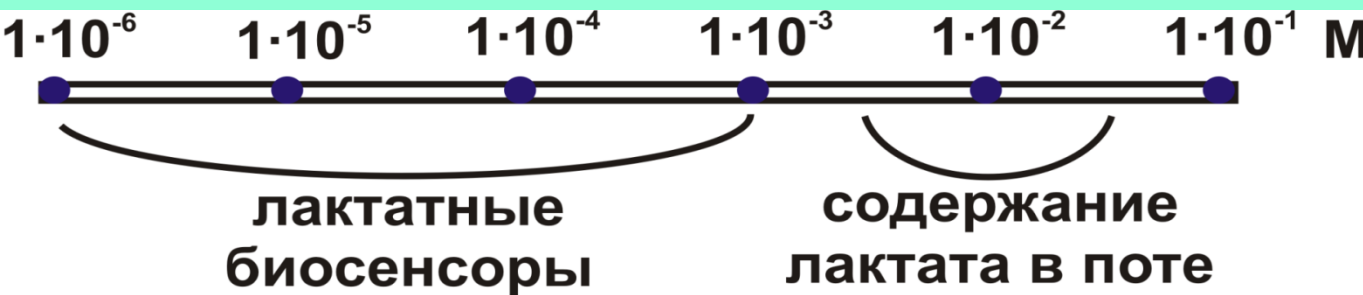
# Лактат пота ↔ лактат крови

I,  $\mu\text{A}$  - t, s (потовые пробы, разбавление в 1000 раз)

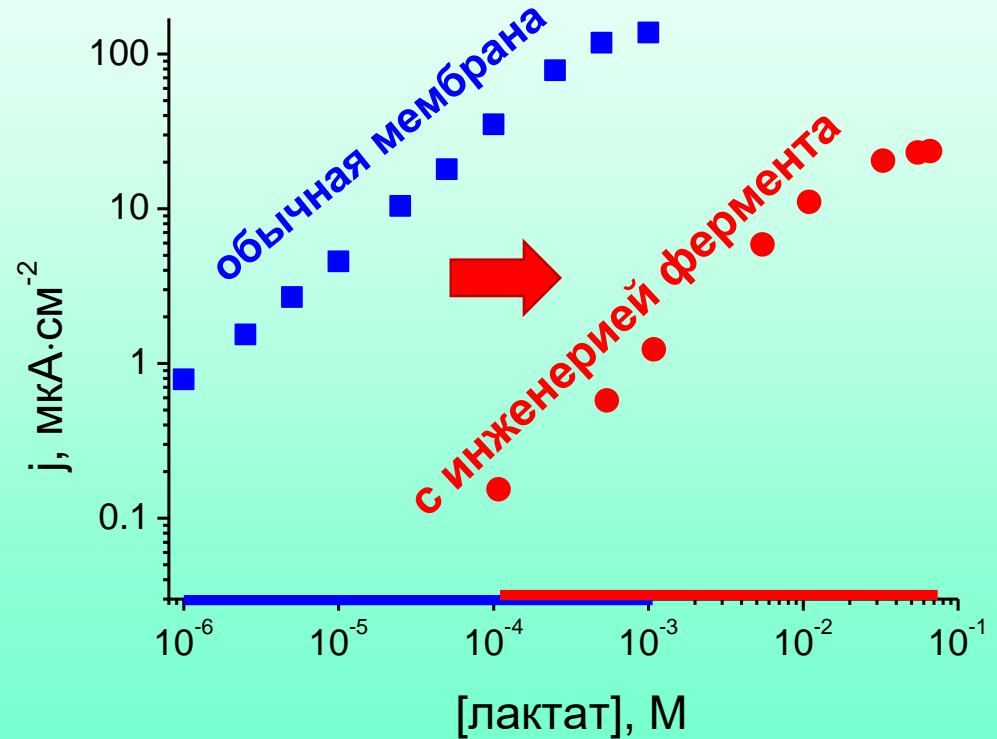
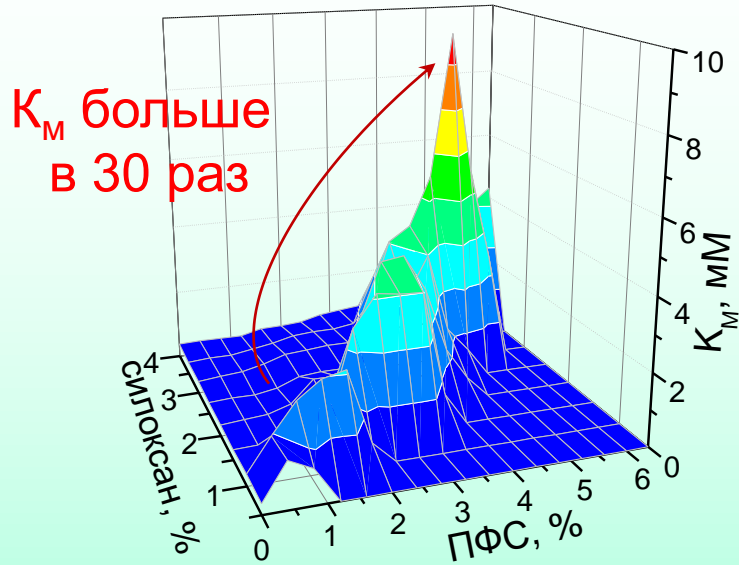


D.A. Sakharov, ... A.A. Karyakin, A.G. Tonevitsky. *Bull. Experim. Biol. Med.* **150** (2010) 83

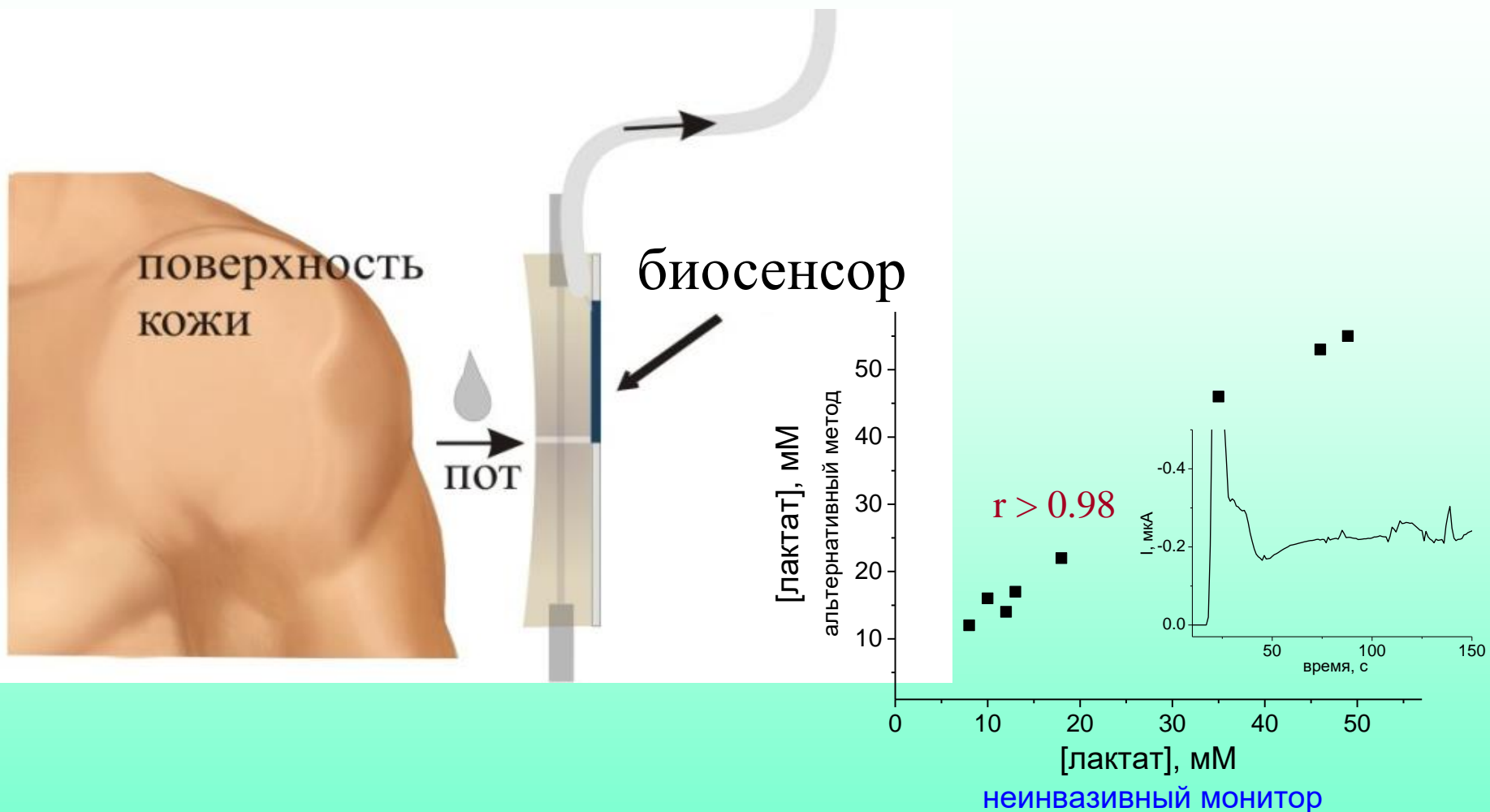
## Неинвазивный мониторинг гипоксии однако



# Негенная инженерия лактатоксидазы



# Неинвазивный монитор состояния гипоксии



М.М.Прибил, ..., Е.Е.Карякина, А.А.Карякин *Analytical Chemistry* **86** (2014) 5215



# Преимущества биосенсоров:

- высокая **селективность** (специфичность);
- **простота**: возможность персонального использования;
- **дешевизна**;
- возможность **миниатюризации**;
- возможность **мониторирования** (непрерывного контроля) анализируемого вещества непосредственно в объекте;
- большой и растущий **рынок**.

## Недостатки:

- нестабильность биомолекул.

