

ELEKTROCHEMICKÉ BIOSENZORY V ANALÝZE ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTŮ A VZORKŮ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

RENÉ KIZEK^a, JAN VACEK^{a,b},
LIBUŠE TRNKOVÁ^c, BOŘIVOJ KLEJDUS^a
a VLASTIMIL KUBÁN^a

^aÚstav chemie a biochemie a ^bÚstav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cKatedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo 20.3.03, přepracováno 29.5.03, přijato 18.6.03.

Klíčová slova: elektrochemické biosenzory, DNA-biosenzory, enzymové a uhlíkové elektrody, avidin-biotinová technologie, pesticidy, polutanty, zemědělská kontrola, životní prostředí

Obsah

1. Úvod
2. Biosenzory
 - 2.1. Dělení a principy
 - 2.2. Elektrochemické biosenzory
 - 2.3. Biosenzory na bázi imobilizovaných činidel
3. Závěr

1. Úvod

Analytická elektrochemie je obsáhlou a rychle se vyvíjející vědní disciplínou, která nachází své uplatnění v oblasti sledování znečištění životního prostředí. Zemědělství je prostředek k získávání potravy a analýzy škodlivých látek na vstupu a následně v jeho produktech jsou prvořadým úkolem pro udržení kvality lidského zdraví¹. Naproti tomu je právě zemědělská činnost příčinou kontaminace biosféry a metody analýzy znečištění jednotlivých složek životního prostředí jsou prostředkem, jak sledovat a následně regulovat koncentrace škodlivin. Jednou z možných alternativ kvalitativní i kvantitativní chemické analýzy v zemědělské praxi a v oblasti kontroly kvality životního prostředí je použití biosenzorů.

2. Biosenzory

Technologie biosenzorů dnes nachází uplatnění v klinické diagnostice, genomice a proteomice, ochraně životního prostředí, průmyslové výrobě a obecně studiu biologických procesů v případech, kdy klasická laboratorní analytická technika selhává z důvodů malé citlivosti, vysokých provozních nákla-

dů, vysoké spotřeby vzorků, nepřípustných zásahů do dynamické rovnováhy studovaných systémů či jiných důvodů. V tomto krátkém přehledu je pojednáno o využití potenciometrických a amperometrických biosenzorů pro chemické analýzy v zemědělské praxi a při kontrole kvality životního prostředí. Cílem textu není podat vyčerpávající přehled, ale naopak seznámit čtenáře s nejnovějšími trendy a přístupy, které byly nedávno publikovány.

Diskutovány jsou možnosti využití elektrochemických biosenzorů pro stanovení toxických látek jako jsou těžké kovy, pesticidní přípravky a některé organické polutanty, např. polychlorované bifenylly, akridinové deriváty a látky fenolické povahy. S ohledem na využití moderních technologií pro stanovení specifických sekvencí RNA nebo DNA je část textu věnována nejnovějším elektrochemickým trendům DNA-hybridizace a enzymatické modifikace (avidin-biotinová technologie) pevných uhlíkových elektrod. Takovéto možnosti stanovení specifické nukleové kyseliny zemědělských škůdců nebo patogenních organismů, popřípadě stanovení jednotlivých proteinů v proteomové výbavě organismů, představují jednu z hlavních předností pevných elektrod modifikovaných nukleovými kyselinami nebo proteiny. V souvislosti s DNA imobilizovanou na povrchu indikační elektrody je také uvedena možnost využití elektrochemických biosenzorů pro stanovení poškozené DNA, což by mohlo mít značný význam pro studium genotoxických vlivů škodlivin na organismy za použití kompaktních a přenosných diagnostických zařízení. Všechny tyto poznatky jsou důležité pro konstrukci selektivních a citlivých elektrochemických zařízení a jejich aplikaci v zemědělské chemii nebo ochraně životního prostředí a lidského zdraví.

2.1. Dělení a principy

Biosenzory jsou podskupinou chemických senzorů, ve kterých je analytické zařízení složeno z biologického prvku (enzym, protilátka, oligonukleotid, biomembrána, buněčná organela, tkáň, mikroorganismus) spojeného s fyzikálně-chemickým převodníkem. Tento převodník může být optický, hmotnostní, teplotní a nebo elektrochemický^{1,2}. Výsledkem této kombinace biologicky aktivní látky a převodníku, funkčně založeného na měření fyzikálně-chemických veličin, je velmi citlivý analytický nástroj, který může být aplikován v zemědělské a obecně chemické analýze složek životního prostředí pro svou finanční nenáročnost, rychlost a jednoduchost samotného měření. Elektrochemické biosenzory lze rozdělit na konduktometrické, impedimetrické, potenciometrické a amperometrické¹. O obecných principech a využití biosenzorů pojednává např. přehled³.

2.2. Elektrochemické biosenzory

Konduktometrické převodníky vycházejí z měření změny konduktivity G analytu, ve kterém mikroorganismy metabolizují elektricky inaktivní substráty, jejichž koncentraci zjišťujeme nepřímým měřením elektricky aktivních metabolitů. Kon-

centrace těchto elektroaktivních metabolitů je ekvivalentní koncentraci stanovených elektroinaktivních substrátů a odpovídá změně konduktivity¹.

Další skupinou jsou impedimetrické biosenzory, které jsou založeny na sledování vektorové veličiny tzv. impedance Z po vložení střídavého napětí na elektrody^{4,5}. Tyto změny jsou opět nejčastěji způsobeny nepřímo metabolizací mikroorganismů vedoucí k nárůstu konduktance/kapacitance a naopak poklesu převodníkem registrované impedance¹.

V případě konduktometrie a impedimetrie se neuplatňují faradaické procesy a koncentrační polarizace, jako je tomu v případě potenciometrických a amperometrických převodníků. Ty fungují na základě měření potenciálu U nebo proudu I na elektrodové membráně či samotném povrchu pracovní (indikační) elektrody zapojené proti srovnávací (referenční) elektrodě.

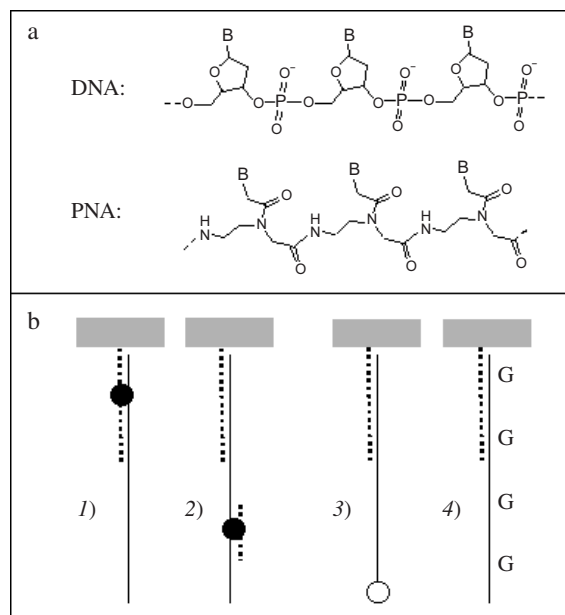
Pro analýzy znečištěného životního prostředí těžkými kovy je elektrochemická analýza jednou z nejčastěji používaných metod^{6,7}. Nedávno vyvinutý biosenzor založený na chelataci iontů kovů ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA) a diethylentriaminpentaoctovou kyselinou (DTPA) a následnou vazbou komplexů monoklonálními protilátkami umožňuje stanovit nanomolární koncentrace iontů kovů. Takto navržený biosenzor byl autory použit pro analýzu kadmia v přírodní vodě⁷.

Své uplatnění našly elektrochemické biosenzory také v zemědělské chemii jako analyzátoři pesticidních přípravků^{8,9}. Pro stanovení organofosfátového pesticidu (2,2-dichlorvinyl)-dimethylfosfátu (DDVP) byl použit průtokový amperometrický detektor využívající inhibice acetylcholinesterasy (AChE), která je imobilizována na membránové elektrodě umístěné v průtokové cele¹⁰. Princip stanovení spočívá v degradaci acetylthiocholin-chloridu (ATCh), jakožto substrátu enzymu AChE, účinkem toxického organofosfátu, přičemž produktem degradace je thiocholin a octová kyselina. Takto vzniklý thiocholin reaguje s hexakvanoželezitými ionty v analyzovaném roztoku a redukce $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ na $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ je elektrochemicky sledována¹⁰.

Kromě inhibice systému AChE se dá pro stanovení herbicidních přípravků a polutantů použít i inhibice laktátdehydrogenasy¹¹. V poslední době nacházejí uplatnění i mikroelektrodové systémy. V roce 2001 tým španělských elektrochemiků použil pro stanovení linuronu (3-(3,4-dichlorfenyl)-1-methoxy-1-methylmočovina) v půdě mikroelektrodu vyrobenou ze skelných vláken s mezí detekce $80 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ (cit.¹²). Zajímavou technologií je také použití multielektrodových biosenzorů pro simultánní stanovení insekticidních preparátů, jako např. uvádí Bachmann¹³.

2.3. Biosenzory na bázi imobilizovaných činidel

V posledních letech je často používána technologie, která je založena na imobilizaci nukleových kyselin (obr. 1a) nebo proteinů na povrchu pracovní elektrody^{14,15}. Takto imobilizovaná vrstva vysoce citlivého biopolymeru je schopná kovalentní či nekovalentní interakce se studovanou látkou (např. pesticidy, organické mutageny atd.). Tyto senzory byly navrženy řadou autorů a vychází z různých principů samotného stanovení^{14,16–18}. V případě DNA-hybridizačních biosenzorů je na povrchu pracovní elektrody vytvořena vrstva jednořetěz-



Obr. 1. a) Chemická struktura negativně nabitě molekuly DNA a neutrálně nabitě peptidové nukleové kyseliny (PNA); B: purinová nebo pyrimidinová báze. b) Schéma různých postupů DNA-hybridizace na povrchu pracovní elektrody; k ukotvené DNA-sondě (oligonukleotid) na elektrodovém povrchu je na základě komplementarity bází (A–T, C–G) hybridizována další molekula nukleové kyseliny za vzniku duplexu. Takto vzniklý duplex může být elektrochemicky detegován různými způsoby: V případě 1) je vytvoření duplexu registrováno sledováním rozdílu mezi elektrochemickou odezvou samotné sondy (ssDNA) před hybridizací a duplexu po hybridizaci. V tomto případě je možné využít skutečnosti, že ssDNA poskytuje výrazně vyšší katodickou odezvu adeninu a cytosinu než duplexní řetězec. Nebo může být pro hybridizační proceduru použita redoxní značka vážící se pouze na vytvořený duplex. 2) Dále může být použita značená sonda nesoucí elektroaktivní značku (angl. reporter probe), která se váže na molekulu hybridizující se k DNA-sondě ukotvené na povrchu elektrody. 3) Hybridizaci lze stanovit pomocí elektroaktivní značky (např. enzymu), která je navázána na konec molekuly tvořící hybridizační duplex s DNA-hybridizační sondou a nebo 4) stanovením guaninových zbytků v její molekule (více v cit.^{14,26}); ■ elektroda, DNA-sonda, ○ enzym, ● redoxní značka, — komplementární DNA, G guanin

cových molekul DNA (ssDNA) se známou sekvencí. Většinou jde o syntetický oligonukleotid (obvykle se stupněm polymerace 15–40), který nazýváme sonda (angl.: probe), a který má komplementární sekvenci ke stanoveným molekulám DNA nebo RNA. Takto modifikovaný povrch převodníku poskytuje jinou proudovou či potenciálovou odezvu než v případě, že je k ssDNA molekulám podle Watson-Crickova schématu navázán (hybridizován) komplementární řetězec stanovené molekuly ssDNA (angl.: target DNA) za vzniku duplexu¹⁴.

Základem samotného analytického postupu je izolace DNA nebo RNA z biologického vzorku. Po purifikaci jsou izolované molekuly naneseny na povrch pracovní elektrody, který je modifikovaný DNA-sondou. Důkaz hybridizace může být proveden různými způsoby, ve kterých se často využívá různých elektroaktivních značek, specificky se vážících na dvouřetězcovou DNA (dsDNA) nebo ssDNA (viz obr. 1b). Možné je např.

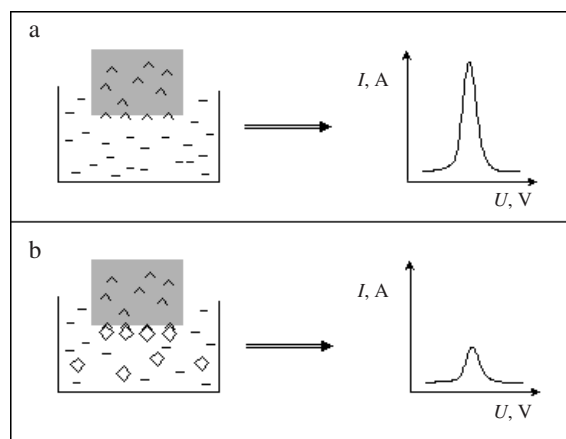
řešení pomocí kovalentně se vázající osmiové značky na molekulu thyminu¹⁹.

Wang a spol. vyvinuli chronopotenciometrický DNA-hybridizační biosenzor pro stanovení DNA izolované z oocyst patogenní bakterie *Cryptosporidium parvum* v pitné vodě za použití uhlíkové pastové elektrody (CPE) (cit.¹⁴). Voltametrické biosenzory lze také použít pro stanovení populace mikroorganismů v potravinářských a environmentálních vzorcích²⁰. Jako sonda může být použit nejen syntetický nukleotid, který má negativně nabitou cukr-fosfátovou kostru, ale i molekula, jejíž kostra nesoucí purinové a pyrimidinové báze je nahrazena neutrálním peptidovým řetězcem tvořeným jednotkami *N*-(2-aminoethyl)glycinu²¹ (peptidová nukleová kyselina (PNA), viz obr. 1a). Molekuly PNA imobilizované na elektrodu převodníku mohou tvořit PNA-DNA duplex, podobně jako je tomu v případě DNA-DNA hybridizace, se stanovovanou nukleovou kyselinou izolovanou z mikrobiálního nebo jiného škůdce²².

Analýzy toxických látek v životním prostředí mohou být také prováděny pomocí elektrody modifikované vrstvou dsDNA¹⁴. Pokud je takto modifikovaná vrstva vystavena vlivu toxické látky, dojde k její vazbě na imobilizovanou vrstvu dsDNA, což se projeví změnou oxidačního proudu guaninu. V této souvislosti byl vyvinut potenciometrický DNA-biosenzor pro stanovení aromatické sloučeniny antracen-2-aminu (2-anthramin) v podzemních vodách. Stanovení vychází z toho, že se zvyšující se koncentrací 2-anthraminu se snižuje anodický pík guaninu, což je způsobeno vazbou 2-anthraminu na molekuly dsDNA, čímž jsou zablokována oxidační místa v molekule guaninu¹⁴. Podobné experimenty byly provedeny s dimethylhydrazinem v říční vodě²³ a s deriváty 1,3,5-triazinu²⁴. DNA-biosenzory nacházejí své uplatnění i při stanovení různých teratogénů a mutagenů, např. při studiu benzo[*a*]pyren-DNA aduktů²⁵.

Jednou z dalších možností je využití biosenzorů pro studium poškození DNA, přičemž DNA je opět prekoncentrována na povrchu indikační elektrody pomocí ultrafialového a γ -záření^{16,26}. Signálem umožňujícím sledovat poškození molekul dsDNA je opět guaninový oxidační pík¹⁴. Takto navržené biosenzory pro studium poškození DNA pracují na principu fotokonverze guaninových zbytků na 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin.

Jak se v poslední době ukazuje, je použití CPE vhodným nástrojem nejen pro DNA-hybridizační sondy a biosenzory indikující poškození DNA, ale i pro modifikaci uhlíkové pasty enzymem, který může specificky vázat protein přítomný ve vzorku. Avidin je toxický protein, který produkuje půdní bakterie *Streptomyces avidinii*. Toxicita avidinu spočívá ve vazbě biotinu. Tohoto principu lze využít při navrhování technologie biologické ochrany rostlin, které jsou geneticky manipulovány k produkci avidinu²⁷. Avidin-biotinové technologie bylo využito pro konstrukci amperometrického biosenzoru vyrobeného z uhlíkové pasty, do které byl imobilizován biotin. Z transgenních rostlin kukuřice (*Zea mays*) produkujících avidin jako ochranu proti škůdcům, byl získán buněčný obsah ze semen. Díky navrženému biosenzoru bylo možné rozpoznávat avidin-transgenní rostlinu od rostliny genetiky nemodifikované (avidin-biotinové technologie viz obr. 2) (cit.²⁸). Podobné technologie představují možnost jednoduchého stanovení daného proteinu či jiné látky v geneticky modifikovaných zemědělských plodinách. Naopak, DNA-hy-



Obr. 2. Schéma ilustrující využití avidin-biotinové vazby v technologii elektrochemických biosenzorů. a) Biotinem modifikovaná uhlíková pastová elektroda poskytuje anodický pík aminokyseliny tyrosinu a tryptofanu, které jsou součástí molekuly biotinu. b) Pokud je v analyzovaném vzorku přítomný avidin, vytvoří se na povrchu elektrody komplex s biotinem a zmenší se oxidační pík v důsledku vazby biotinu s avidinem. Pokles píku je způsoben zablokováním oxidovatelných skupin v molekule biotinu molekulou avidinu. V případě biotin-avidinové technologie může být použit i biotinem značený oligonukleotid jako indikátor DNA-hybridizace. Biotin-avidinová technologie má široké spektrum použití u biosenzorů používaných pro stanovení proteinů a nukleových kyselin (viz cit.²⁸); ■ elektroda, - - - elektrolyt, ◇ komplex avidinu a biotinu, ◇ avidin, ^ biotin

bridizační biosenzory jsou efektivním nástrojem pro určení transgenní sekvence nebo jiné aminokyselinové sekvence, např. hygienicky nežádoucích organismů či zemědělských škůdců.

3. Závěr

Výše uvedené příklady prezentují biosenzory jako efektivní analytický nástroj v zemědělské a environmentální chemii. Tyto biosenzory představují budoucnost v rozvoji terénních analýz a plně automatizovaných zařízení pro monitorování nejrůznějších polutantů. Nejeftivnější a ekonomicky nejvýhodnější technologií se jeví použití převodníku složeného z galvanostatu či potenciostatu zapojeného s pevnou elektrodou, jako jsou CPE a nebo elektrody vyrobené z uhlíkového vlákna či pyrolytického grafitu²⁹.

Na druhou stranu jako biologický prvek biosenzoru je výhodné používat enzymy a některé další proteiny se schopností specifické vazby, nebo v DNA-hybridizační technologii používané syntetické oligonukleotidy a PNA. Především elektrochemické biosenzory pro poškození DNA se mohou stát vhodným nástrojem pro studium genotoxických vlivů zemědělských preparátů nebo jiných průmyslově využívaných látek³⁰.

Využití biosenzorů je možné i v on-line zapojení s elektroforetickými nebo chromatografickými separačními technikami². Všechny tyto možnosti jsou dnes intenzivně studovány, nicméně použití velmi nadějných technologií DNA-hybridizace pro stanovení chromosomové DNA se prozatím bez složitější přípravy vzorku příliš nedaří. V budoucnu by mohl být prob-

lém vyřešen použitím automatických mikro-PCR systémů (PCR: polymerasová řetězová reakce)¹⁵. Jednou z nejnovějších technik je např. provedení DNA-hybridizace na velkém pracovním povrchu (povrch H) komerčně vyráběných paramagnetických kuliček a stanovení redoxní a nebo enzymatické značky indikující hybridizaci na malém povrchu indikační elektrody. Princip a využití této techniky je detailně popsán v cit.^{31,32}

Jak z výše uvedeného textu vyplývá, jsou elektrochemické biosenzory nástrojem s perspektivou k budoucím nanotechnologiím nejen v zemědělské a environmentální kontrole, ale i v celé škále vědních disciplín, jako je medicína, farmacie, molekulární biologie a další.

Práce na tomto článku byla finančně podporována grantem FRVŠ č. 1203/2003 a MSM 432100001 Ministerstva školství a tělovýchovy České republiky a projektem č. A 1163201 Grantové agentury Akademie věd České republiky.

LITERATURA

- Mello L. D., Kubota L. T.: *Food Chem.* 77, 237 (2001).
- Bossi A., Piletsky S. A., Righetti P. G., Turner A. P. F.: *J. Chromatogr., A* 892, 143 (2000).
- Skládal P.: *Biosensory*, str. 149. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno 1999.
- Hasoň S., Dvořák J., Jelen F., Vetterl V.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 167 (2002).
- Hasoň S., Vetterl V.: *Bioelectrochemistry* 56, 43 (2002).
- Fennouh S., Casimiri V., Geloso-Meyer A., Burstein C.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 903 (1998).
- Blake D. A., Jones R. M., Blake R. C., Pavlov A. R., Darwish I. A., Yu H.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 799 (2001).
- Trojanowicz M., Hitchman M. L.: *Trends Anal. Chem.* 15, 38 (1996).
- Skládal P., Fiala M., Krejčí J.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 65, 139 (1996).
- Neufeld T., Eshkenazi I., Cohen E., Rishpon J.: *Biosens. Bioelectron.* 15, 323 (2000).
- Young S. J., Hart J. P., Dowman A. A., Cowell D. C.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 887 (2001).
- Huebra G. M. J., Hernández P., Ballesteros Y., Hernández L.: *Talanta* 54, 1077 (2001).
- Bachmann T. T., Schmid R. D.: *Anal. Chim. Acta* 401, 95 (1999).
- Wang J., Rivas G., Cai X., Paleček E., Nielsen P., Shiraiishi H., Dontha N., Luo D., Parrado C., Chicharro M., Farias P. A. M., Valera F. S., Grant D. H., Ozsoz M., Flair M. N.: *Anal. Chim. Acta* 347, 1 (1997).
- Lowe C. R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 106 (1999).
- Fojta M.: *Electroanalysis* 14, 1449 (2002).
- Chiti G., Marrazza G., Mascini M.: *Anal. Chim. Acta* 427, 155 (2001).
- Marrazza G., Chianella I., Mascini M.: *Anal. Chim. Acta* 387, 297 (1999).
- Kizek R., Havran L., Fojta M., Paleček E.: *Bioelectrochemistry* 55, 119 (2002).
- Han S., Li X., Guo G., Sun Y., Yuan Z.: *Anal. Chim. Acta* 405, 115 (2000).
- Tomschik M., Jelen F., Havran L., Trnková L., Nielsen P. E., Paleček E.: *J. Electroanal. Chem.* 476, 71 (1999).
- Nielsen P. E.: *Acc. Chem. Res.* 32, 624 (1999).
- Wang J., Chicharro M., Rivas G., Cai X. H., Dontha N., Farias P. A. M., Shiraiishi H.: *Anal. Chem.* 68, 2251 (1996).
- Oliveira-Brett A. M., Silva L. A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 1717 (2002).
- Kerman K., Meric B., Ozkan D., Kara P., Erdem A., Ozsoz M.: *Anal. Chim. Acta* 450, 45 (2001).
- Paleček E., Fojta M., Tomschik M., Wang J.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 621 (1998).
- Kramer K. J., Morgan T. D., Throne J. E., Dowell F. E., Bailey M., Howard J. A.: *Nature Biotechnol.* 18, 670 (2000).
- Masařík M., Kizek R., Kramer K. J., Billová S., Brázdová M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J. A.: *Anal. Chem.* 75, 2663 (2003).
- Gilmartin M. A. T., Hart J. P.: *Analyst* 120, 1029 (1995).
- Bentley A., Atkinson A., Jezek J., Rawson D. M.: *Toxicol. in Vitro* 15, 469 (2001).
- Paleček E., Kizek R., Havran L., Billová S., Fojta M.: *Anal. Chim. Acta* 469, 73 (2002).
- Paleček E., Billová S., Havran L., Kizek R., Mičulková A., Jelen F.: *Talanta* 56, 919 (2002).

R. Kizek^a, J. Vacek^{a,b}, L. Trnková^c, B. Klejduš^a, and V. Kubáň^a (^aDepartment of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, ^bDepartment of Botany and Plant Physiology, Mendel University of Agriculture and Forestry, ^cDepartment of Theoretical and Physical Chemistry, Masaryk University): **Electrochemical Biosensors in Agricultural and Environmental Analysis**

The technology of biosensors has found extensive applications in clinical diagnostics, genomics and proteomics, environmental protection, and industry, as well as in studies of biological processes in cases where classical analytical techniques are not applicable. In this communication, the use of potentiometric and amperometric biosensors for chemical analysis in agriculture and environmental science are briefly reviewed with emphasis on the determination of toxic substances, such as heavy metals, pesticides, and selected organic pollutants. Also covered are some modern electrochemical trends, particularly the use of solid carbon electrodes in DNA-hybridization and enzymatic modification (avidin-biotin technology), related to the determination of specific sequences in mRNA or DNA. An important application of solid electrodes, modified with nucleic acids or proteins, is in the field of genom investigation of agricultural pests or pathogenic organisms in the environment, or in the determination of specific proteins in organisms. The modified electrodes, in conjunction with compact, portable diagnostic instrumentation, also seem to be promising for the investigation of DNA damage, which could be important for the identification of genotoxic effects of harmful substances on organisms.