

## Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA

AKADEMIA TECHNICZNO-HUMANISTYCZNA W BIELSKU BIAŁEJ, WYDZIAŁ BUDOWY MASZYN I INFORMATYKI,  
KATEDRA ELEKTROTECHNIKI I AUTOMATYKI, 43-309 Bielsko-Biała, ul. Willowa 2

# Ewolucja i rozwój biosensorów – problemy i perspektywy

Dr Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA

Absolwentka Instytutu Fizyki im A. Chelkowskiego Uniwersytetu Śląskiego Laureatka stypendium Marii Curie. Odbyla staże naukowe w Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie (Niemcy), University of Ioannina (Grecja), University of Helsinki (Finlandia). Jest adiunktem w Katedrze Elektrotechniki i Automatyki na Wydziale Budowy Maszyn i Informatyki Akademii Techniczno- Humanistycznej. Zainteresowania naukowe: sensory i biosensory.



e-mail: awitkowska@ath.bielsko.pl

### Streszczenie

W artykule przedstawiono ewolucję i rozwój biosensorów. Zaprezentowano historię biosensorów i najważniejsze wydarzenia mające wpływ na rozwój tej tematyki. Przedstawiono definicję i ogólne zasady działania tego typu urządzeń, opisano parametry, które świadczą o jakości biosensora i brane są pod uwagę przy jego konstrukcji takie jak: selektywność, czułość, liniowość odpowiedzi, powtarzalność, szybki czas reakcji i czas powrotu, stabilność i operacyjny okres użytkowania. Zaprezentowano wady i zalety powszechnie stosowanych biosensorów, a także przedstawiono perspektywy w ich rozwoju.

**Słowa kluczowe:** biosensor, sensor.

## The evolution and development of biosensors - problems and perspectives

### Abstract

The paper describes the evolution and development of biosensors. History and the most important events affecting the growth of the subject have been presented. Examples of biosensor application in environmental monitoring, clinical diagnosis, military biodefense industry and the biosensors market size analysis prepare by Transparency Market Research have been given. Definition and general principles of these type devices have been shown. Examples of substances use in receptor and transduction layers have been given. Physico-chemical phenomena occurring in transduction layer which could be transform into detectable signal have been described. Parameters that provide the quality of biosensors and are taken into account during its design, such as: selectivity, sensitivity, linearity of response, repeatability, fast response time and recovery time, stability and operational life time have been described. The advantages and disadvantages of commonly used biosensor have been presented. well as perspectives on development have been described. New trends in biosensor development like: use of aptamers in receptor layers, nanobiosensors evolution, construction biosensor with graphen and the miniaturization in this type devices have been given.

**Keywords:** Biosensor, sensor.

## 1. Wprowadzenie

Wraz z postępem cywilizacyjnym, rozwojem, nowych technologii oraz ciągłym dążeniem do poprawy jakości życia i usprawnieniem codziennych czynności, w ostatnich latach można zaobserwować trend związany z rozwojem biosensorów. Urządzenia te stanowią podgrupę czujników chemicznych i podobnie jak one znajdują szerokie zastosowanie w ochronie środowiska [1-5], w przemyśle obronnym [6-10], w monitorowaniu jakości żywności czy też w diagnostyce medycznej [11-15]. Bogata oferta zastosowań biosensorów sprawia, że są one przedmiotem zainteresowań zarówno przedstawicieli przemysłu jak i naukowców. W ostatnich dwudziestu latach liczba publikacji naukowych poświęconych tej tematyce wzrosła niemalże 10 krotnie jak podaje jedna w najbardziej popularnych baz danych Web of Science. Wysiłki naukowców koncentrują się wokół udoskonalania już istniejących urządzeń,

poprawy ich parametrów takich jak selektywność, granice detekcji, czas pomiarów, prostoty obsługi czy miniaturyzacji, jak i stworzenia nowych typów biosensorów przy wykorzystaniu najnowszych technologii. Najnowsze analizy rynku amerykańskiego wykonane przez Transparency Market Research [16] szacują, że wartość rynku biosensorowego cały czas wzrasta i w 2018 roku osiągnie wartość 18,9 miliarda USD. Dlatego też nie brakuje inwestorów, którzy lokują znaczne środki finansowe w badania i rozwój nad tego typu sensorami, dzięki czemu możliwe jest przeprowadzanie coraz bardziej zaawansowanych badań naukowych.

## 2. Historia biosensorów

Już w 1916 roku pojawiłyby się pierwsze doniesienia na temat unieruchomionych białek na podłożu stałym. W sześć lat później w 1922, ukazały się informacje na temat elektrody szklanej, natomiast prawdziwy przełom w tematyce biosensorowej dokonał się 1956 r za sprawą Profesora Lelanda C. Clarka, Jr. Clark studiował elektrochemię redukcji tlenu na elektrodzie platynowej, która potem stała się sensorem tlenu i zyskała określenie elektrody Clarka. Służyła ona do określenia zawartości tlenu we krwi, wodzie i innych cieczach w czasie rzeczywistym. W 1962 roku opisał pierwszy amperometryczny biosensor, którym była elektroda enzymatyczna dla glukozy. W ślad za nim, tematyka biosensorów zaczęła się bardzo rozwijać i tak w 1969 roku dzięki pracy Guilbauta oraz Montalvo pojawił się pierwszy biosensor potencjometryczny służący do oznaczania mocznika. Sensor ten wykorzystywał ureazę unieruchomioną na elektrodzie selektywnej na jony amonowe. W latach 1972-1975 po raz pierwszy na skalę komercyjną wprowadzono biosensor do oznaczania glukozy (Yellow Springs Instruments- YSI) .W ślad za nim, w 1975 pojawił się pierwszy immunosensor, który wykorzystywał bakterie. Rok później zastosowano elektrochemiczny biosensor na glukozę z przyłózkowym układzie nazywanym sztuczną trzustką, a w 1982 pojawił się pierwszy światłowodowy sensor na glukozę. Rozwój techniki przyczynił się do postępu prac nad biosensoryką, i tak 1983 roku pojawił się pierwszy immunosensor z detekcją powierzchniowego rezonansu plazmonów, a rok później w 1984 pojawiły się pierwsze amperometryczne biosensory enzymatyczne, które wykorzystywały ferrocen i oksydazę glukozową do oznaczania glukozy. Wzrost zainteresowania ze strony firm medycznych, zainwestowane przez nie środki w badania i rozwój nad biosensorykami sprawiły, że w 1987 roku, na rynek został wprowadzony biosensor do pomiaru glukozy we krwi firmy MediSense ExacTech, a w trzy lata później immunosensor firmy Pharmacia BIACore. W 1992 firma i-Stat zaczęła produkować miniatury biosensor służący do pomiaru parametrów krwi, a cztery lata później w 1996 na rynku pojawił się biosensor Glucocard [17]. W 2007 roku pierwszy raz wszczepiono do organizmu żywego biosensor , który działał przez 5 dni.

## 3. Definicja i ogólne zasady działania biosensorów

Jak podaje przyjęta w 1997 roku definicja podawana przez IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), biosensor to samowystarczalne zintegrowane urządzenie, dostarczające specyficznych ilościowych lub półilościowych informacji analitycznych przy użyciu składników umieszczonych w bezpośrednim kontakcie z elementem przetwarzającym [17].

Biosensor to rodzaj czujnika bazujący na procesie rozpoznawania biochemicznego /biologicznego składający się z części receptorowej i części przetwornikowej. Receptor pełni funkcję wykrywającą.

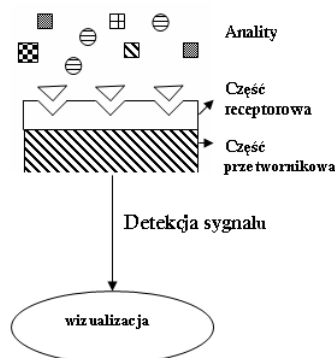
Część receptorowa zawiera składnik biologicznie czynny (np. enzym, białko, kwasy nukleinowe: DNA, RNA, antygen, przeciwciało, liposomy, fragmenty tkanek roślinnych lub zwierzęcych).

Część przetwornikowa natomiast przetwarza rozpoznany element w sygnał nadający się do detekcji, sygnał: (elektryczny, chemiczny, optyczny, piezoelektryczny czy termiczny). Intensywność mierzonego sygnału jest proporcjonalna do stężenia analitu (substancji poddawanej detekcji) oraz czułości warstwy receptorowej. W części przetwornikowej następuje zamiana zjawisk fizyczno-chemicznych na mierzalny sygnał. Wynikiem reakcji zachodzącej w warstwie receptorowej może być:

- zmiana masy w wyniku absorpcji cząsteczek analitu (biosensor piezoelektryczny)
- wydzielanie ciepła lub absorpcja w czasie reakcji (biosensor kalorymetryczny)
- przeniesienie elektronu, transport jonów, dyfuzja elektroaktywnych cząstek (biosensor elektrochemiczny)
- emisja lub absorpcja fal elektromagnetycznych (biosensor optyczny).

W dużym uproszczeniu zasadę działania biosensora można porównać do zamka i klucza. Klucze to anality, natomiast zamek to warstwa przetwornikowo-receptorowa. Jak się łatwo domyśleć nie każdy klucz pasuje do odpowiedniego zamka, dlatego też jest tu duże pole badawcze dla naukowców, aby do powszechnie znanych kombinacji rozpoznawania biologicznego/biochemicznego dodać nowe. Bardzo wiele badań naukowych koncentruje się na odpowiednim doborze warstw receptorowych do mierzonych analitów [19] oraz unieruchomieniu cząstek biologicznie czynnych w warstwach receptorowych [18]. Drugą grupę badań stanowią badania nad sygnałem. Jego czystością czy intensywnością, poprawą jego jakości czy parametrów [24].

Schemat biosensora przedstawia rysunek (rys. 1).



Rys. 1. Schemat działania biosensora  
Fig. 1. Diagram of biosensor activity

#### 4. Wymagania wstępne dla biosensorów

Podczas prac konstrukcyjnych nad biosensorem poniższe wymagania są bardzo istotne i nie sposób ich pominąć przy konstrukcji komercyjnie opłacalnego projektu [21].

- selektywność: biosensor powinna cechować wysoka selektywność w stosunku do badanych analitów. Warstwa receptorowa powinna wykazywać minimum reaktywności z grupami nie będącymi analitami, a posiadającym i podobną strukturę chemiczną,
- czułość: biosensor powinien wykazać zdolność pomiaru w zakresie zainteresowania dla badanych analitów. Ponadto powinien wykazywać zdolność pomiaru analitu z minimalnymi dodatkowymi krokami takimi jak oczyszczanie wstępne, czy dobór odpowiednich próbek,
- liniowość odpowiedzi: zakres liniowej odpowiedzi powinien pokrywać się zakresem stężenia powyżej którego badany analit jest mierzony,

- powtarzalność odpowiedzi sygnału: w przypadku wielokrotnego badania próbek o tych samych stężeniach, uzyskane odpowiedzi za każdym razem powinny być jednakowe,
- szybki czas reakcji i czas powrotu: odpowiedź na reakcje w biosensorze powinna być wystarczająco szybka. Czas powrotu do stanu przed pomiarem powinien być krótki w celu możliwości ponownego użycia biosensora,
- stabilność i operacyjny okres użytkowania: większość biologicznych próbek jest niestabilna w różnych biochemicznych i środowiskowych warunkach. Biologiczny element użyty do konstrukcji biosensora powinien być połączony tak, żeby jego aktywność była zatrzymana na długi okres czasu.

#### 5. Zalety i wady powszechnie stosowanych biosensorów

W zależności od pojawiającego się sygnału i jego natury stosuje się odpowiednie metody detekcji i dlatego też w literaturze można spotkać określenia: biosensory optyczne (gdy sygnał jest emitowany w postaci kwantów światła), biosensory elektrochemiczne, biosensory piezoelektryczne, biosensory kalorymetryczne [25-31]. Zaletą biosensora elektrochemicznego jest możliwość miniaturyzacji. Podobnie jak sensor optyczny, sensor elektrochemiczny posiada wysoką czułość, krótki czas wykonania pomiaru oraz możliwość niskich granic detekcji. Niestety ten typ sensora wykazuje wrażliwość na zakłócenia pola elektromagnetycznego w przeciwieństwie do sensora optycznego, który na zakłócenia pola elektromagnetycznego wrażliwy nie jest. Za pomocą biosensora piezoelektrycznego możliwe jest oszacowanie parametrów fizyko-chemicznych monowarstw, niestety w przeciwieństwie do biosensorów elektrochemicznych i optycznych, biosensor piezoelektryczny cechuje niska czułość oraz wysokie granice detekcji. Wysoką selektywnością odznaczają się biosensory potencjometryczne oraz kalorymetryczne. Biosensory kalorymetryczne są tańsze w porównaniu do biosensorów elektrochemicznych, optycznych czy piezoelektrycznych, mają szeroki zakres dynamiczny oraz krótki czas odpowiedzi. Biosensory kalorymetryczne dają możliwość analizy bardzo zanieczyszczonych próbek, aczkolwiek do ich stosowania potrzebna jest skomplikowana aparatura.

#### 6. Perspektywy rozwoju biosensorów

Perspektywa rozwoju biosensorów obejmuje przede wszystkim ich komercjalizację i wprowadzenie tych urządzeń do masowej produkcji i powszechnego użycia, jak również poprawę parametrów detekcji i ich miniaturyzację. Prace naukowców i konstruktorów koncentrują się na uzyskaniu biosensorów, które byłyby specjalistyczne, wytrzymałe, tanie, proste w obsłudze, niewielkich rozmiarów, a jednocześnie dokładne, dzięki wysokiej selektywności i czułości oraz wykazywałyby zdolność do wielokrotnego użycia. Wiele nadziei budzi zastosowanie w diagnostyce medycznej (zwłaszcza w diagnostyce chorób nowotworowych) aptasensorów (łac. aptus- dopasowany), wykorzystujących jako element czuły aptamery. Aptamerami są sztuczne oligonukleotydy, np. fragmenty DNA, RNA, które odznaczają się wysoką selektywnością i specyficznością. Aptamery posiadają możliwość immobilizacji lub modyfikacji w celu przyłączania cząsteczek receptorowych bez wpływu na ich powinowactwo [20]. Wykrywanie komórek nowotworowych polega na identyfikacji znaczników, które w takich komórkach się pojawiają. Aptasensory mogą być również wykorzystywane w wykrywaniu wirusów i mikroorganizmów [20]. W ostatnich latach rozwój nanotechnologii przyczynił się do postępu w obszarze nanobiosensorów, które przejawiają znaczny potencjał we wczesnym ostrzeganiu i wykrywaniu czynników nowotworowych [20, 23]. Duże zainteresowanie budzi również wykorzystanie grafenu w biosensoraх z tranzystorem polowym [20, 22]. Trendy w obszarze biosensorów kierują również uwagę konstruktorów na miniaturyzację biocujników oraz na osiągnięcie mobilności urządzenia, które mogłyby być powszechnie użyte

zarówno przy łóżku pacjenta, jak również na odległość. Dzięki bezprzewodowej transmisji danych, wyniki pomiarów biosensorycznych mogłyby być transmitowane na znaczną odległość między innymi do oddalonych daleko placówek służby zdrowia.

## 7. Podsumowanie

W świetle zainteresowań naukowców oraz szerokiego wachlarza możliwości badawczych proponowanego przez biosensory, można z całą pewnością stwierdzić, że tematyka biosensorów jest niezwykle interesująca i daje ogromne możliwości rozwoju zarówno naukowcom, konstruktorom jak i przedstawicielom przemysłu.

## 8. Literatura

- [1] Kumar J., Souza S.: Biosensor for environmental and clinical monitoring. BARC. Newsletter .324, 34, 2012.
- [2] Ramirez N.S., Salgado A.M., Valdman B.: The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: Problems and perspectives. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 26 (2), 227, 2009.
- [3] Getting S., Schiltz A., Fulgsang A.: Perspectives for using genetically encoded fluorescent biosensors in plants. Frontiers in Plant Science. 4, 234, 2013.
- [4] Yagi K.: Application of whole-cell bacterial sensor in biotechnology and environmental science. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 1251, 2007.
- [5] Szabo M., Ptes J., Szilagui L., Miklossy J., Abraham B., Lanyi S.: Possible application of metal sensitive red fluorescent proteins in environmental monitoring. Environmental Engineering and Management Journal. 11 (1), 193, 2012.
- [6] Bartoszcze M.: Methods of biological weapon threats detection. Przegląd Epidemiologiczny. 57, 369, 2003.
- [7] Burnwort M., Rowan S., Weder CH.: Fluorescent sensors for detection of chemical warfare agents. Chem. Eur. J. 13, 7828, 2007.
- [8] Levent K.: The use of biosensors for detection of chemical and biological weapons. Turk. J. Biochem 35 (1), 72-74, 2010.
- [9] Tan, Hsih Yin; Loke, Weng Keong, Nam-Trung Nguyen: Lab on a chip for rapid electrochemical detection of nerve agent Sarin. Biomedical Microdevice, 16 (2), 269-275, 2014.
- [10] Svabenska E.: System for detection and identification of biological aerosols. Defence Science Journal 62 (6), 404-411, 2012.
- [11] Ispas C.R., Crivat G., Andresscu S. Review: Recent developments in enzyme-based biosensor for biomedical analysis. Analytical Letters 45, 168, 2012.
- [12] Morris M. C.: Fluorescent biosensors- probing protein kinase function in cancer and drug discovery. Biochimica et Biophysica Acta. 1834, 1387, 2013.
- [13] Aoki K., Komatsu N., Kamioka Y., Matsuda M.: Stable expression of FRET biosensors: A new light in cancer research. Cancer Science. 103 (4), 614, 2012.
- [14] Friberg E., Curdelnikova B., Pettersen E., Moan J.: pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. Cancer Letter. 195 (1), 73, 2003.
- [15] Sausa S., Cardoso L., Reed S., Reis A., Martins-Filho O., Silvestre R, Cordeiro Da Silva A.: Development of fluorescent based immunosensor for serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. PLOS Neglected tropical diseases 7 (8) 2371, 2013.
- [16] Transparency Market Research "Biosensors Market (Electrochemical, Optical, Piezoelectric & Thermistor) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2012 – 2018", 2013-06-27, <http://www.transparencymarketresearch.com/biosensors-market.html>.
- [17] Thevenot D., Toth K., Dust R., Wilson G.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical Report), Pure Appl.Chem, vol. 71, No 12, pp.2333-2348, 1999.
- [18] Newman J. N., Setford S.J.: Enzymatic biosensor. Molecular Biotechnology, vol 32, 2006.
- [19] Klos-Witkowska A.: Biosensors and fluorescent sensors. Pomiar Automatyka Kontrola. 60 (1), 3, 2014.
- [20] Cynk P, Gawel E.: Zastosowanie biosensorów w diagnostyce choroby nowotworowej. Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, 3, 373-378, 2012.
- [21] Thakur M., Ragavan K.: Biosensors in food processing. J. Food. Sci. Technol, 50, 625-641, 2012.
- [22] Myung S., Solanki A., Kim C., Park J., Kim K., Lee K.: Graphene-Encapsulated Nanoparticle-Based Biosensor for selective detection of cancer biomarkers., Adv Mater, 17, 2221-2225, 2011.
- [23] Jain K.: Advances in the field nanotechnology" BMC Medicine, 8, 83, 1-11, 2010.
- [24] Mosińska L., Fabisiak K., Paprocki K., Kowalska M., Popielarski P., Szybowski M., Stasiak A.: Daumont as a transducer material for the production of biosensors. Przem. Chem., 92, 6, 919, 2013.
- [25] Liang S., Wenzhao J., Changjun Hou., Yu L.: Microbial biosensors. Biosensors and Bioelectronics 26, 1788-1799, 2011.
- [26] Suzuki S., Satoh I., Karube I.: Recent trends of biosensors on Japan, Applied Biochemistry and Biotechnology 7, 147-155, 1982.
- [27] Podbierska H.: Optyka Medyczna wybrane zagadnienia, Rozdz 11: Optyczne czujniki chemiczne, 295-313, Oficyna wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2011.
- [28] Dybko A., Wroblewski W.: Analyte recognition and signal conversion in potentiometric and optical chemical sensors. Polish Journal of Environmental Studies, 11(1), 5-10, 2002.
- [29] De Lorimier R., Smith J., Dwyer M., Looger L., Sali K., Paavola Ch., Rizk S., Sadigov S., Conrad D., Loew L., Hellinga H.: Construction of a fluorescent biosensor family. Protein Science 11, 2655-2675, 2002.
- [30] Kurytnik I.: Wykłady z techniki sensorowej, 2012.
- [31] Monosik R., Stredansky M., Strudlik E.: Biosensors- classification, characterization and new trends. Acta Chemica Slovaca. 5(1), 109, 2012.

otrzymano / received: 23.09.2014

przyjęto do druku / accepted: 03.11.2014

artykuł recenzowany / revised paper

## INFORMACJE

# Wersja elektroniczna miesięcznika PAK

Artykuły opublikowane w PAK po roku 1989 są dostępne w wersji elektronicznej m.in. w bazie artykułów PAK ([www.pak.info.pl](http://www.pak.info.pl)), w folderze „Archiwum numerów miesięcznika PAK”:

- pełne teksty artykułów z poprzednich lat i streszczenia artykułów najnowszych można pobrać bezpłatnie,
- pełne teksty artykułów z bieżącego roku można otrzymać za opłatą (5 PLN +1,15 PLN VAT).