

Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA

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

Biosensory proteinowe i ich właściwości fluorescencyjne

Dr Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA

Absolwentka Instytutu Fizyki im A. Chelkowskiego Uniwersytetu Śląskiego Laureatka stypendium Marii Curie. Odbyła 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 pracy zostały opisane biosensory proteinowe oraz ich właściwości fluorescencyjne. Przybliżono podstawy projektowania biosensorów proteinowych oraz strategii stosowanych przy projektowaniu sensorów białkowych: *rational protein design* (racjonalne projektowanie), *directed evolution* (ewolucja ukierunkowana), *de novo design* (projektowanie białek de novo). Zestawiono anality oraz proteiny receptorowe wykorzystywane w badaniach fluorescencyjnych. Opisano zastosowania biosensorów w medycynie.

Słowa kluczowe: biosensor, fluorescencja, proteina, analit.

Protein based biosensors and their fluorescent properties

Abstract

This paper describes the basics of protein biosensors with particular emphasis on their fluorescent properties. Biosensors are classified on receptor layers with particular emphasis on protein biosensors. There is brought closer the base of protein sensor design, taking into account three strategies commonly use in protein engineering in order to improve sensitivity, selectivity and stability of protein biosensor: rational design, directed evolution, de novo design. The main construction problems encountered in the design of biosensor and ways of they solving have been described. The recent research on fluorescent protein biosensors receptor layer is presented. In Table 1 there is given the list of proteins and appropriate fluorescent methods: FRET (Föster Resonance energy Transfer), change in fluorescence emission spectra, for Zn^{2+} , Glc, Gal, Fruc, Arab, DMAPIP-b, Ca^{2+} , H_2O_2 , Ca^{2+} , β -CD, CB6, CB7, CFP detection. There is described the use of fluorescent protein based biosensors for clinical application. Biosensors as modern and widely used tools in environmental, medical, food industry have been presented and the future trends in scientific research have been given in the paper.

Keywords: Biosensor, fluorescence ,protein.

1. Biosensory proteinowe

Biosensory to urządzenia analityczne o wysokiej selektywności, które coraz częściej znajdują zastosowanie w medycynie [7, 8, 30, 31], ochronie środowiska [1, 23] oraz przemyśle spożywczym [1, 9, 24, 29]. W medycynie sensory te wykorzystuje się w celach diagnostycznych [37], w ochronie środowiska oraz w przemyśle spożywczym wykorzystywane są do wykrywania szkodliwych, toksycznych substancji mogących powodować efekt genotoksyczny [1].

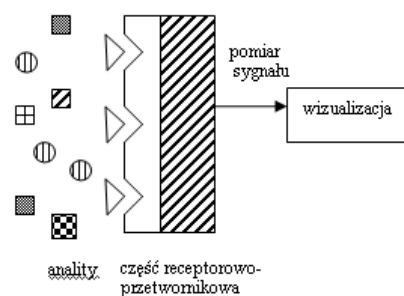
Każdy biosensor składa się z dwóch podstawowych elementów: selektywnej części receptorowej oraz części przetwornikowej.

Część receptorowa stanowi pewnego rodzaju tarczę na powierzchni, której znajdują się receptory czyli molekuly biologiczne odpowiedzialne za wychwycenie badanej cząsteczki (analitu). W części przetwornikowej natomiast następuje zamiana wyniku biologicznego oddziaływania pomiędzy molekulami receptora a molekulami badanymi na sygnał elektryczny, chemiczny lub inny [1].

W dużym uproszczeniu możemy porównać tarczę biosensora składającą się z części receptorowej i przetwornikowej do zamka, a cząsteczkę, która podlega detekcji (analit) do klucza.

W momencie odpowiedniego doboru zamka i klucza czyli innymi słowy zgodności analitu z bioreceptorem, pojawia się sygnał, który jest mierzony za pomocą odpowiednich metod zależnych od rodzaju sygnału.

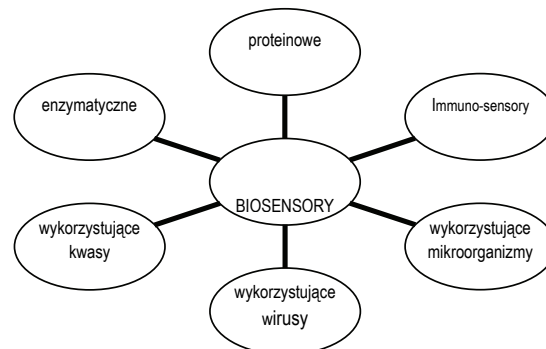
Schemat budowy biosensora przedstawia rysunek (rys. 1).



Rys. 1. Zasada działania oraz schemat budowy biosensora
Fig. 1. Principle of effect and diagram of biosensor activities

Ze względu na rodzaj receptora, wpływającego na bioselektywność czujnika, biosensory możemy podzielić na: enzymatyczne, gdy warstwę receptorową stanowi enzym; immunosensory, gdy w warstwie receptorowej znajdują się przeciwciała a analitem jest antygen; biosensory wykorzystujące wirusy, mikroorganizmy oraz biosensory proteinowe, które w warstwie receptorowej posiadają cząsteczki białka;

Powyższy podział biosensorów ilustruje schemat (rys. 2).



Rys. 2. Rodzaje biosensorów (przykłady). Podział ze względu na rodzaj receptora
Fig. 2. The type of biosensor (examples). Distribution by type of receptor

Ze względu na rodzaj przetwornika oraz powierzchnię czynną biosensora mającą istotny wpływ na czułość biosensora można wyróżnić: biosensory piezoelektryczne - przetwarzające zmiany kształtu na napięcie elektryczne i wskazujące na zmiany masy, termometryczne, magnetyczne oraz elektrochemiczne, które dalej dzielą się na potencjometryczne i amperometryczne oraz biosensory optyczne- wykorzystujące pomiary świetlne, dokonywane w spektrofotometrycznym.

Przy projektowaniu biosensorów należy zatem do analizowanej substancji (analitu) dobrać odpowiednio część receptorowo-przetwornikową w taki sposób, aby zagwarantować powstanie sygnału, a następnie do otrzymanego sygnału dobrać metodę pomiaru oraz metodę analizy.

W przypadku biosensorów proteinowych wykorzystuje się pomiary spektrofotometryczne bazujące na pomiarze światła powstającego na skutek oddziaływania analitu z częścią receptorowo – przetwornikową.

Przy tego typu sensorach należy jednak poprzez dobór odpowiedniej proteiny (naturalnie fluoryzującej) bądź znakowanej fluorescencyjnie (proteiny niefluoryzujące), w części receptorowo-przetwornikowej zagwarantować powstanie mierzalnego, optycznego sygnału, na bazie, którego dokonują się doboru metody analizy fluorescencyjnej.

Wśród dostępnych i powszechnie stosowanych technik fluorescencyjnych wyróżnić można: zmianę intensywności fluorescencji [3, 11-15], FRET czyli (Föster resonance energy transfer)[10-16, 27, 32], FLIM (fluorescence life time imaging) [33, 34] oraz FCS (fluorescent correlation spectroscopy) [22].

2. Podstawy projektowania biosensorów proteinowych

Przy projektowaniu biosensorów należy zwrócić uwagę na następujące parametry użytkowe: dokładność, powtarzalność wyników, czułość, selektywność, czas detekcji a także czas życia sensora czyli stabilność, zależną od trybu jego przechowywania i użytkowania. W przypadku sensorów biologicznych, a szczególnie w przypadku sensorów proteinowych otrzymanie zgodności wszystkich parametrów stanowi dalej wyzwanie dla naukowców oraz konstruktorów ze względu na procesy denaturacyjne białka w warstwie receptorowo-przetwornikowej, które zachodzą z upływem czasu.

W przypadku białek globularnych ograniczenie stanowi również ich kulistość, która ogranicza detekcję oraz poziom stabilności proteiny [2].

Obecnie w celu poprawy czułości, selektywności, stabilności, powiązania proteiny z warstwą receptorowo-przetwornikową oraz poprawienia przesylu sygnału wewnątrz środowiska biologicznego stosuje się trzy strategie nazwane odpowiednio: *rational protein design*, co można tłumaczyć jako (racjonalne projektowanie), *directed evolution* (ewolucja ukierunkowana) *de novo design* (projektowanie białek de novo). Każda z nich ma na celu poprawę komponentów biosensora a jednocześnie każda z nich posiada pewnego rodzaju ograniczenia w zastosowaniu.

I tak *rational protein design* dotyczy mutacji genów lub protein i koncentruje się wokół identyfikacji zmian prowadzących do zaburzenia prawidłowej funkcji genu lub białka, a *directed evolution* prowadzi do wzmocnienia, bądź wprowadzanie mutacji w celu wzmocnienia pożądanych cech.

De novo protein design zakłada projektowanie proteiny od podstaw z uwzględnieniem jej kompletnej struktury, stopnia pofałdowania, fizycznych sił, które stabilizują proteinę (siły van der Walsa, elektrostatyczne oddziaływania oraz energie środowiska przy jednoczesnym uwzględnieniu interakcji pomiędzy aminokwasami) [2].

Ostatecznie proces projektowania biosensora odbywa się w dwóch krokach: pierwszy z nich to konstrukcja rusztowania i jego zdolności do przesyłania sygnału, drugi to kreowanie aktywnej strony biosensora czyli konstruowaniu odpowiedniej warstwy receptorowej z właściwym wyborem substancji bioselektywne czułych.

Dobór właściwej warstwy receptorowej stanowi najczulsze ogniwo przy projektowaniu biosensorów, ze względu na to, że warstwa ta musi spełniać jednocześnie kilka warunków, a mianowicie: posiadać odpowiednią czułość, zapewniać selektywność oraz odpowiedni wskaźnik koncentracji, powinna pozostać stabilna po integracji jej z ciałem stałym. Ponadto powinna posiadać właściwości przewodzące czyli innymi słowy w warstwie receptorowej powinny znajdować się molekuly, które posiadają zdolność absorpcyjną bądź fluorescencyjną zmieniającą się na skutek reakcji z analitem. Ważne jest również, aby rozpoznany element (analit) wykrywany był przez warstwę poprzez jedną reakcję np.

emisję fluorescencyjną, a z kolei przebieg tej reakcji nie był zależny od chemicznych warunków otoczenia takich np. jak pH.

Ponadto warstwa ta po przeprowadzonej reakcji powinna się regenerować, tak, aby kolejna reakcja (kolejne wykrywanie analitu) było możliwe z zachowaniem takiej samej dokładności [6].

Kluczowym problemem budowy biosensorów jest unieruchomienie warstwy receptorowej na powierzchni przetwornika sygnału, który odpowiedzialny jest za stabilizację biomateriału oraz wymagana bliskość czujnika i odbiornika. Aby problem zminimalizować wykorzystuje się: absorpcję fizyczną, usieciwienie molekuł, wiązania kowalencyjne. Zastosowanie wyżej wymienionych metod umożliwia czułe, szybkie i dokładne wykrywanie nawet małych stężeń analizowanych substancji, które mogą mieć wpływ toksyczny, mutageny oraz rakotwórczy na organizmy żywe [4].

3. Badania fluorescencyjne warstw receptorowych biosensorów proteinowych

Dokonując przeglądu aktualnej literatury dotyczącej białkowych biosensorów fluorescencyjnych. Zauważyć można, że grupy badawcze koncentrują swoje wysiłki wokół dwóch zasadniczych problemów naukowych.

Pierwszy z nich to unieruchomienie biologicznej warstwy receptorowej oraz dobór odpowiedniego przetwornika dobrze transmitującego uzyskany sygnał [1, 28, 35, 38-40].

Drugi to badanie selektywności warstwy receptorowej oraz próby stabilizacji materiału biologicznego w tej warstwie [3, 10-16, 36].

Przeгляд wyników badań nad odpowiednim doбором analitu oraz białka w warstwie receptorowej a także zastosowanej metody badawczej przedstawia tabela (tab. 1).

Tab. 1. Zestawienie analitów oraz protein receptorowych wykorzystywanych w badaniach fluorescencyjnych

Tab. 1. Summary of analyte and receptor proteins use in studies of fluorescent

L.P	analit	proteina w warstwie receptorowej	metoda fluorescencyjna	literatura
1	Glc, Gal Fruc Arab	GGBP i jej mutacje (BD18, BD21, BD24)	Zmiana intensywności fluorescencji	11
2	Zn ²⁺	BFC	Zmiana intensywności fluorescencji	12
3	DMAPIP-b	BSA	Zmiana intensywności fluorescencji	13
4	Ca ²⁺	GPCR	FRET	10
5	H ₂ O ₂	HyPer	Zmiana intensywności fluorescencji	14
6	Ca ²⁺	YFP	Zmiana intensywności fluorescencji	15
7	β-CD CB6 CB7	BSA, HSA, γ-Globulina	Zmiana intensywności fluorescencji	3
8	CFP	YFP	FRET	16

Zmiana intensywności w widmach fluorescencyjnych białek posłużyła do detekcji jonów Zn²⁺ przez BFC (Blue Fluorescent Protein) [12] oraz Ca²⁺ przez YFP (Yellow Fluorescent Protein) [15], a także cukrów: glukozy (Glc) galaktozy (Gal), fruktozy, arabozy [11] przez białko GGBP (glucose/galactose binding protein) i jego mutacje [3], oraz nadtlenu wodoru (H₂O₂) przez białko Hyper [14]. Udowodniono również reaktywność pomiędzy białkami BSA (Bovine Serum Albumin), HSA (Human Serum Albumin) i γ-globuliną z β-CD (β-cyklodextrin), CB6 (Curcubit[6]uril), CD7(Cucurbit[7]uril) [7] oraz DMAPIP (2-(4'-N,N-dimethylamino)phenylimidazo[4,5-b]pyridine z BSA [13].

Na podstawie transferu energii pomiędzy donorem a akceptorem (FRET) stwierdzono wykrywanie jonów Ca^{+2} przez GPCR (G protein-coupled receptors) – ludzkimi reprezentantami rodziny 800 genów, które odgrywają kluczową rolę w wielu fizjologicznych procesach określających np. zapach czy smak [10] oraz reaktywność pomiędzy białkami CFP (Cyjan fluorescenc protein) a YFP (yellow fluorescent protein) [8].

Jak przewidują naukowcy [10-16] badania reaktywności białkowych warstw receptorowych i odpowiednich analitów są bardzo przyszłościowe i przeciągu najbliższych lat z pewnością będą się rozwijały, ponieważ dobór odpowiednich komponentów biosensora stanowi podstawę powstania sygnału.

4. Zastosowanie biosensorów w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem sensorów fluorescencyjnych

Wraz z rozwojem zainteresowań tematyką biosensorową wzrasta również liczba zastosowań biosensorów.

Obecnie biosensory powszechnie stosuje się w ochronie środowiska [1, 4, 21] gdzie technologie biosensorowi stanowią według dyrektyw Unii Europejskiej podstawowe, szybkie i ekonomiczne narzędzie biomonitoringu środowiskowego [4], a także coraz powszechnie stosowane są w medycynie w celu detekcji neurotransmiterów takich jak (acetylocholina czy dopamina, biomolekuł (np. cholesterol, glukoza) czy biomarkerów rakotwórczych (białko reaktywne C (CRP)) [17]. Fluorescencyjne biosensory mają szerokie zastosowanie podczas prac związanych z rozwojem nowych leków [18, 25] czy diagnostyce medycznej [19, 20, 26].

5. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonego studium literaturowego, śledząc najnowsze trendy w badaniach nad biosensoryką można wnioskować, że biosensory mają szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, a prace naukowców, inżynierów, konstruktorów nad ciągłym ich udoskonaleniem cały czas się rozwijają. Z roku na rok rośnie liczba publikacji naukowych poświęconych tematu biosensorów i tak w 1993 roku według Web of Science było 298, a w roku 2012 liczba ich wzrosła do 2423, świadczy to o dynamicznym rozwoju zainteresowań tym tematem.

Jednocześnie warto podkreślić, że tematyka jest niezwykle ciekawa i zgłębiając w szczegółach obszar zainteresowań wybranym typem biosensorów (np. biosensorymi proteinowymi) można powiedzieć, że stanowi ona cały czas szerokie pole badawcze, a ciągłe próby naukowców nad rozwiązaniem problemów konstrukcyjnych w przyszłości przyniosą zapewne wymierne efekty w postaci prototypu idealnego biosensora (proteinowego), który byłby czuły, selektywny, stabilny i zdolny do wielokrotnego wykorzystania.

6. Literatura

- [1] Mosińska L., Fabisiak K., Paprocki K., Kowalska M., Popielarski P., Szybowicz M., Stasiak A.: Diament jako materiał przetwornikowy do produkcji biosensorów, *Przemysł Chemiczny* 2013/6.
- [2] Lambrianou A., Denim S., Hall E.: Protein engineering and electrochemical biosensors, *Adv Biochem Engin/Biotechnol* (2008) 109: 65-96.
- [3] Parta D.: Synchronous fluorescence based biosensor for albumin determination by cooperative binding of fluorescence probe in supramolecular host protein assembly” *Biosensors and Bioelectronics* 25(2010)1149-1154.
- [4] Matejczyk M.: Potencjał aplikacyjny biosensorów mikrobiologicznych, *Post Mikrobiol* 2010, 49,4 297-304.
- [5] Yi Zhou, Kaihui Chu, Haiku Zhen, Yuan Fang, Cheng Yao: Vizualizing Hg^{+2} ions In living cells Rusing FRET based fluorescent sensor, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 106 (2013) 197-202.
- [6] Galban J., Sanz-Vicente I., Ortega E., del Barrio Melisa, de Marcos S.: Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous systems, *Anal Biol Chem* (2012) 402:3039-3054.
- [7] Vo-Dinh T., Cullum B.: Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal Chem* (2000) 366: 540-551.
- [8] Giuliana K., Taylor L.: Fluorescent protein biosensors: New tools for drug Discovery. *TIBTECH March* 1998(vol. 16) p: 135-140.
- [9] Przybył M., Bierasiak J.: Zastosowanie biosensorów do oznaczania mleczanów owocowych w sokach komercyjnych i koncentratkach. *Zywność. Nauka. Technologia . Jakość*, 2008, 5(60), 168-177.
- [10] Roelse M., Ruijter N., Vrouwe E., Jangma M.: A genetic microfluidic biosensor of G protein-coupled receptor activation- monitoring cytoplasmic $[\text{Ca}^{+2}]$ changes in human HEK293 cells. *biosensors and bioelectronics* 47 (2013) 436-444.
- [11] Der B., Dettelbaum J.: Construction of reagentless glucose biosensor using molecular exciton luminescence. *Analytical Biochemistry* 375 (2008) 132-140.
- [12] Xinxu F., Hadong L., Guiyan Z., Xuexun F., Jingwei X., Wei J.: Blue fluorescent analogs as chemosensors for Zn^{2+} : Bio-sensors and bioelectronics 42 (2013) 308-313.
- [13] Nihar D., Anasuya Mishra, Krishnamoorthy G.: Akryl chain depend interaction of ligands with bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 77 (2013) 55-62.
- [14] Mehmeti I., Lortz S., Lenzen S.: The H_2O_2 - sensitive HyPer protein targeted to endoplasmic reticulum as a mirror of the oxidizing third-disulfide milieu, *Free Radical Biology Medicine* 53 (2012) 1451-1458.
- [15] Vessel A., Bobin G., Lemmetyinen H., Karp M., Tkachenko N.: Photochemical properties and sensor applications of modified yellow fluorescent protein (YFP) covalently attached to the surfaces of attached to the surfaces of attached optical fibers (EOFs). *Anal Bioanal Chem* (2012) 402: 1149-1158.
- [16] VanEngelenburg S., Palmer A.: Fluorescent biosensors of protein function. *Current Opinion In Chemical Biology* (2008) 12: 60-65.
- [17] Justino C., Rocha-Santos T., Duarte A.: Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 29, no 10, 2010.
- [18] Fiberg E., Friberg E., Cunderlikova 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*, vol. 195, issue 1, p: 73-80, 2003.
- [19] Silva F.R.D., Bellini M.H., Tristao V.R., Schor N., Vieira N.D., Courrd L.C.: Intrinsic fluorescence of protoporphyrin IX from blood samples can yield information on the growth of prostate tumors, *Journal of fluorescence* vol. 20, issue 6, page 1159-1165, 2010.
- [20] Silva F.R.D., Nabeshima C.T., Bellini M.H., Schor N., Vieira N.D., Courral L.C.: Study of protoporphyrin IX elimination by Body excreta: A new noninvasive cancer diagnostic method?, *Journal of fluorescence* vol. 23, issue 1, p: 131-135, 2013.
- [21] De Lorimier R., Smith J., Dwyer M., Looger L., Sali K., Paavola C., Rizk S., Sadigov S., Conrad D., Loew L., Hellinga H.: Construction of biosensor family, *Protein Science* 2002, 11:2655-2675.
- [22] Klos-Witkowska A.: Biosensory i sensory fluorescencyjne. *Pomiary Automatyka Kontrola*, vol.60, nr 1, 2014.
- [23] Kołwzan B.: Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody. *Ochrona środowiska*, vol. 31, 3-14, 2009.
- [24] Peredes P., Parellada J., Fernandez V., Katasis I., Dominguez E.: Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for determination of fructose in food analysis. *Biosensor Bioelectron* 12, pp.1233-1243, 1997.
- [25] Morris M.C.: Fluorescent biosensors of intracellular targets from genetically encoded reporters to modular polypeptide probes, *Cell Biochem Biophys* 56, pp. 19-37, 2010.
- [26] Ji Young Ch., Gun-Hee K., Zhiqian G., Hye L., K.M.K, Swamy K.M.K., Jaeyoung P., Seunghoon S., Injae S., Juyoung Y.: Highly selective radiometric fluorescent probe for Au^{3+} and its application to bioimaging, *Biosensors and Bioelec-tronics* 49, pp.438-441, 2013.

- [27] Li I., Pham E., Truong K.: Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics, *Biotechnol Lett* 28, pp.1971-1982, 2006.
- [28] Murat Ates: A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers, *Material Science and Engineering C* 33, pp. 1853-1859, 2013.
- [29] Radecki J., Radecka H., Cieśla J., Udek B.: Sensory chemiczne i biosensory w kontroli żywności zmodyfikowanej genetycznie. *Biotechnologia* 3 (74), pp. 67-78, 2006.
- [30] Vo-Dihn T., Cullum B., Stokes D.: Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostic. *Sensor and Actuators B* 74, pp. 2-11, 2001.
- [31] Pickup J., Hussain F., Evans N., Rolinski O., Birch D.: Fluorescence – based glucose sensors, *Biosensors and Bioelectronics* 20, pp. 2555-2565, 2005.
- [32] VanEngelennburg S., Palmer A.: Fluorescent biosensors of protein function. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, pp. 60-65, 2008.
- [33] Sołtysiński T., Liebert A., Zawicki J., Maniewski R.: Optyczne metody obrazowania molekularnego. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica* 4 vol.14, pp. 331-335, 2008.
- [34] Cicchi R., Pavone F.: Non-Linear fluorescence lifetime imaging of biological tissue. *Anal Bioanal Chem* 400, pp.2687-2697, 2011.
- [35] Synowiecki J., Wesołowska S.: Otrzymywanie i niektóre zastosowanie unieruchomionych enzymów. *Biotechnologia* 2 (77), pp. 7-26, 2007.
- [36] Liao Z., Yang Z., Li Y., Wang B., Zhou Q.: A simple structure fluorescent chemosensors for high selectivity and sensitivity of aluminium ions. *Dyes and Pigments*, pp.124- 128, 2013.
- [37] Pawlaczyk I., Ziewiecki R., Czerchawski L., Krotkiewski H., Gancarz R.: Biosensory jako narzędzie wykorzystywane w badaniach krwi oraz wybranych białek krwi. *Przegląd Lekarski* 70/3, pp.131-134, 2013.
- [38] Ozturk G., Alp S., Timor S.: A fluorescent biosensor based on acetylcholinesterase and 5-oxazolano derivative immobilized in polyvinylchloride (PVC) matrix, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 47, pp. 111-116, 2007.
- [39] Putzbach W., Ronkainen N.: Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A Review. *Sensors* 13, pp.4811-4840, 2013.
- [40] Wolfbeis O.: Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Anal Chem* 76, pp.3269-3284, 2004.

otrzymano / received: 26.03.2014

przyjęto do druku / accepted: 02.05.2014

artykuł recenzowany / revised paper

INFORMACJE

www.energoelektronika.pl
WORTAL BRANŻOWY



Regionalne Seminary / Szkolenia dla Służb Utrzymania Ruchu

06.02.2014 - Bielsko-Biała

13.03.2014 - Legnica

24.04.2014 - Ełk

22.05.2014 - Mielec

26.06.2014 - Zamość

02.10.2014 - Szczecin

20.11.2014 - Włocławek

11.12.2014 - Konin



Ilość miejsc
ograniczona

Jeżeli jesteś zainteresowany uczestnictwem w Seminarium, zaprezentowaniem produktu lub nowego rozwiązania napisz do nas: marketing@energoelektronika.pl
Energoelektronika.pl tel. (+48) 22 70 35 291

Partnerzy:

