

BIOLOGICKÉ SLOŽKY BIOSENZORŮ PRO STANOVENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ

**PAVEL VOPÁLENSKÝ, TOMÁŠ RUML
a PAVEL KOTRBA**

*Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
pavel.kotrba@vscht.cz*

Došlo 4.1.07, přijato 25.1.07.

Klíčová slova: proteinový biosenzor, imunochemický biosenzor, aptazym, buněčný biosenzor, transkripční regulátor, reportérový gen

Obsah

1. Úvod
2. Proteinové biosenzory
 - 2.1. Biosenzory založené na inaktivaci enzymů
 - 2.2. Biosenzory založené na aktivaci enzymů
 - 2.3. Biosenzory založené na neenzymových proteinech
 - 2.4. Imunochemické biosenzory
3. Biosenzory využívající aptazymy (a aptamery)
4. Buněčné biosenzory
 - 4.1. Reportérové geny a proteiny
 - 4.2. Nespecifické buněčné biosenzory
 - 4.3. Specifické buněčné biosenzory
5. Závěr

1. Úvod

Biosenzory jsou definovány jako zařízení využívající specifické biochemické reakce zprostředkované izolovanými enzymy, imunosystémy, tkáněmi, organelami nebo celými buňkami k detekci chemické látky, nejčastěji měřením elektrického, tepelného nebo optického signálu¹, které se provádí pomocí vhodného fyzikálně-chemického snímače. Mezi vyjmenované biologické elementy je nutno zařadit i neenzymové proteiny a nukleové kyseliny, které jsou dnes pro konstrukci biosenzorů neméně významné. Zatímco biologická složka interaguje s analytem a tak přímo určuje specifitu biosenzoru, je citlivost biosenzoru vedle vlastností biologického prvku dána především druhou komponentou biosenzoru, snímačem, a závisí na způsobu převodu signálu a jeho detekce. Používání principy a instrumentace snímačů a technikami imobilizace biologického prvku se zabývá několik aktuálních přehledných článků^{2–7}. V ideálním případě je biosenzor vysoce specifický k určitému analytu, někdy ke skupině analytů stejné

povahy, a umožňuje tak stanovení i v komplexních maticích, jako jsou klinické vzorky, (odpadní) vody, půda nebo sedimenty. Dalšími výhodami jsou nízké detekční limity, rychlá odezva, opakovatelnost a reprodukovatelnost. Určitými nevýhodami, které přináší využití biologického elementu, jsou omezené podmínky při stanovení (pH, teplota) a v případě proteinů nutnost jejich izolace a někdy i nízká stabilita.

Následující přehled je zaměřen na biologické prvky biosenzorů pro detekci těžkých kovů. Klasické instrumentální metody používané pro stanovení polutantů v životním prostředí, ač velmi propracované a poskytující přesné výsledky, jsou většinou finančně a časově náročné, vyžadují vysoce kvalifikovanou práci a jsou vesměs vázány na laboratorní prostředí. Těmito metodami je navíc určena celková koncentrace látek ve vzorku (např. i nerozpustných forem těžkých kovů), která však nemusí vypovídat o jejich reálném dopadu na životní prostředí a potenciálním nebezpečí pro ekosystém daném především biodostupností kovů. S ohledem na celosvětové zpřísňování legislativy v oblasti životního prostředí je stále větší důraz kladen na použití levných, snadno proveditelných, dostatečně spolehlivých a rychlých metod stanovení s možností sledovat změny koncentrace analytu v reálném čase a *in situ*. Metody genového inženýrství a miniaturizace umožňují vývoj přenosných biosenzorů, které poskytují rychlé, spolehlivé a vysoce specifické stanovení látek srovnatelné s konvenčními metodami. Velkou výhodou, zejména tzv. (celo)buněčných biosenzorů, je možnost postihnout skutečný účinek iontu kovu nebo jiné látky v prostředí na organismy. Některé buněčné biosenzory dále umožňují sledovat celkový vliv daného prostředí – vliv všech přítomných látek na organismus, jejichž synergický účinek se může značně lišit od vlivu každé jednotlivé látky.

2. Proteinové biosenzory

2.1. Biosenzory založené na inaktivaci enzymů

V úvodu této kapitoly je třeba předeslat, že ačkoliv byl inhibiční účinek těžkých kovů, založený především na jejich interakci s thiolovými a methylthiolovými skupinami enzymů⁸, využit pro konstrukci řady biosenzorů, jejich praktické použití je omezeno nepřítelí vysokou specifičností⁹. Důležité charakteristiky vybraných biosenzorů této skupiny uvádí tabulka I. Mezi prvními enzymy použitými pro přípravu biosenzorů pro těžké kovy byly oxidasy a dehydrogenasy, jejichž aktivitu lze přímo, nebo s využitím spážených reakcí, monitorovat amperometricky měřením úbytku kyslíku z reakční směsi. Biosenzory založené na inhibici L-glycerolfosfát oxidasy, pyruvát oxidasy a nebo

Tabulka I
Enzymové biosenzory

Enzym	Analyt	Detekce	Dynamický rozsah/ detekční limit (DL)/ IC ₅₀ ^a [μmol l ⁻¹]	Lit.
Alkalická fosfatasa ^b	Zn ²⁺	amperometrická	2–200	20
	Co ²⁺		50–1000	
Asorbát oxidasa ^b	Zn ²⁺	kalorimetrická	10–1000	22
	Cu ²⁺	amperometrická	2–100	21
	Cu ²⁺		50–1000	20
Galaktosa oxidasa ^b	Cu ²⁺	amperometrická	10–1000	19
Glycerolfosfát oxidasa ^c	Hg ²⁺	amperometrická	IC ₅₀ = 20	10
Křenová peroxidasa ^c	Hg ²⁺	kolorimetrická	5·10 ⁻⁶ –0,005	17
	CH ₃ -Hg ⁺		0,02–1000	18
L-Laktát dehydrogenasa ^c spřažená s L-laktát oxidasou	Ag ⁺	amperometrická	IC ₅₀ = 0,1	10
	Cd ²⁺		IC ₅₀ = 10	
	Cu ²⁺		IC ₅₀ = 250	
	Hg ²⁺		IC ₅₀ = 1	
	Pb ²⁺		IC ₅₀ = 50	
	Zn ²⁺		IC ₅₀ = 10	
	Ag ⁺	amperometrická	DL = 0,02	11
	Cu ²⁺		DL = 0,5	
	Hg ²⁺		DL = 0,002	
	Pb ²⁺		DL = 0,2	
	Zn ²⁺		DL = 5	
Pyruvát oxidasa ^c	Hg ²⁺	amperometrická	IC ₅₀ = 50	10
Ureasa ^c	Ag ⁺	potenciometrická	0,1–100	12
	Cu ²⁺		0,1–100	
	Ag ⁺	spektrofotometrická	DL = 0,20	15
	Cu ²⁺		DL = 4,0	
	Hg ²⁺		DL = 0,35	
	Hg ²⁺	potenciometrická	0,09–2,0	13
	Hg ²⁺	potenciometrická	0,05–1,0	8
Ureasa ^c spřažená s glutamát dehydrogenasou	Cd ²⁺	amperometrická	9–270	14
	Cu ²⁺		0,15–1,5–	
	Hg ²⁺		0,05–0,5	
	Zn ²⁺		15–450	

^a Koncentrace kovu inhibující aktivitu enzymu z 50 %, ^b aktivace analytem, ^c inhibice analytem

L-laktát dehydrogenasy ionty těžkých kovů v reakcích s přirozenými substráty byly konstruovány pokrytím povrchu kyslíkového článku polysulfonovou membránou s imobilizovanými enzymy^{10,11}. Pro spřažení redukce pyruvátu na L-laktát s reakcí spotřebovávající kyslík byla

spolu s laktát dehydrogenasou na membráně imobilizována L-laktát oxidasa, která těžkými kovy inhibována není, a která zpětně oxiduje laktát na pyruvát. Uvedené enzymové elektrody v kombinaci s vhodnými reakčními pufrý umožňují s jistou mírou selektivity detekci Hg²⁺, Zn²⁺,

Tabulka II
Neenzymové proteinové a DNA biosenzory

Biologická komponenta	Analyt	Detekce	Dynamický rozsah/detekční limit (DL)/ [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
Protein DsRed	Cu^{2+}	fluorimetrie	0,1–2,5	34
	Cu^{+}		0,09–2,3	
Protein BFPms1	Zn^{2+}	fluorimetrie	neuvedeno	33
	Cu^{2+}		neuvedeno	
Protein MerR	Hg^{2+}	kapacitance	10^{-9} – 10^3	28
	Cd^{2+}		10^{-9} – 10^3	
	Cu^{2+}		10^{-9} – 10^3	
Metalothionein SmtA	Cd^{2+}	kapacitance	10^{-9} – 10^3	28
	Cu^{2+}		10^{-9} – 10^3	
	Hg^{2+}		10^{-9} – 10^3	
	Zn^{2+}		10^{-9} – 10^3	
Fytochelatin „EC20“	Cd^{2+}	kapacitance	10^{-7} – 10^4	29
	Cu^{2+}		10^{-7} – 10^4	
	Hg^{2+}		10^{-7} – 10^4	
	Pb^{2+}		10^{-7} – 10^4	
	Zn^{2+}		10^{-7} – 10^4	
Savčí metalothionein	Cd^{2+}	rezonance povrchového plasmonu (SRP)	2–1000	30
	Ni^{2+}		20–100	
	Zn^{2+}		20–100	
Protilátka 2A81G5	Cd^{2+}	ELISA/spektrofotometrie	$\text{DL} = 2,5 \cdot 10^{-4}$	37
	Hg^{2+}		$\text{DL} = 0,01$	36
Protilátka 15B4	Co^{2+}	ELISA/spektrofotometrie	$\text{DL} = 0,01$	37
	Ni^{2+}		$\text{DL} = 0,8$	36
Protilátka 2C12	Pb^{2+}	ELISA/spektrofotometrie	$\text{DL} = 0,006$	37
protein CueR/operátor	Ag^{+}	fluorimetrie	$\text{DL} = 0,2^a$	32
	Au^{+}		$\text{DL} = 0,2^a$	
	Cu^{2+}		$\text{DL} = 0,2^a$	
Protein MerR/operátor	Hg^{2+}	fluorimetrie	$\text{DL} = 0,5^a$	32
DNA aptazym „8–17“	Pb^{2+}	fluorimetrie	0,01–4,0	42

^a Aplikace tohoto biologického prvku byla demonstrována pouze při uvedené koncentraci a skutečný DL nebyl evaluován

Ag^{+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} a Pb^{2+} a elektrody lze po regeneraci opakovaně použít.

Nejčastěji studovaným enzymem pro stanovení Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{+} a Cu^{2+} je ureasa katalyzující hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak, jehož vznik lze snadno detegovat potenciometricky pomocí pH elektrody^{12,13}. Nevýhody spojené s měřením pH v reálných vzorcích, které mohou mít různou pufrovací kapacitu, byly eliminovány spřažením ureasové reakce s reakcí katalyzovanou

glutamátdehydrogenasou, v níž z amoniaku a α -keto-glutarátu za spoluúčasti NADH jako donoru vodíkového ekvivalentu vzniká L-glutamát. Oxidace NADH pak byla monitorována amperometricky¹⁴. Jednoduchý biosenzor „na jedno použití“ pro stanovení Hg^{2+} , Ag^{+} a Cu^{2+} založený na inhibici ureasové reakce byl připraven potažením stěn polystyrenové kyvety membránou obsahující ionofory selektivní pro amonné ionty, amoniak nebo protony¹⁵. Koncentrace amoniaku vznikajícího při reakci v kyvetě

pak byla stanovována na základě změn barvy, fluorescence nebo refrakce světla na iontově selektivní membráně. Nam a spol.¹⁶ ukázali, že selektivitu biosenzoru založeného na urease (autoři použili instrumentaci s iontově selektivní elektrodou) lze zajistit přidávkem NaI pro potlačení inhibice Ag^+ a EDTA pro eliminaci Cu^{2+} .

Dalším enzymem využitelným pro inhibiční stanovení Hg^{2+} a organortuťnatých sloučenin je křenová peroxidasa^{17,18}. Tento enzym byl imobilizován na chitosan, polystyren nebo chromatografický papír a jeho aktivita byla stanovována spektrofotometricky jako rychlost oxidace chromogenních substrátů H_2O_2 .

2.2. Biosenzory založené na aktivaci enzymů

Skutečností, že některé těžké kovy jsou nepostradatelnou součástí aktivního místa enzymů a že tyto enzymy jsou pro daný kov často vysoce specifické, využívají biosenzory založené na aktivaci metaloenzymů (tab. II). Pro stanovení Cu^{2+} byl popsán biosenzor využívající apoformu galaktosaoxidasy¹⁹ katalyzující oxidaci D-galaktosy kyslíkem na D-galaktohexodialdosu za produkce H_2O_2 . Aktivita tohoto enzymu v závislosti na koncentraci Cu^{2+} byla stanovována amperometricky. Další biosenzor s amperometrickou instrumentací, který umožňuje stanovení Zn^{2+} a Cu^{2+} , byl konstruován imobilizací alkalické fosfatasy (kofaktor Zn^{2+}) a askorbát oxidasy (kofaktor Cu^{2+}) na polyakrylonitrolové membráně na povrchu kyslíkového článku^{20,21}. Enzymy katalyzují spážené reakce, v nichž alkalická fosfatasa defosforyluje L-askorbát-2-fosfát a vzniklý L-askorbát je oxidován kyslíkem za katalýzy askorbát oxidasou na dehydroaskorbát. Přidáním L-askorbát-2-fosfátu, Cu^{2+} a analytu k apoenzymům je tak možno stanovit množství Zn^{2+} a přidáním L-askorbátu lze v analytu stanovit množství Cu^{2+} . Ke stanovení Zn^{2+} prostřednictvím aktivace alkalické fosfatasy byla popsána též kalorimetrická instrumentace²², neboť katalyzovaná reakce má exotermické tepelné zabarvení. Sensory založené na aktivaci alkalické fosfatasy je teoreticky možno použít i pro stanovení Co^{2+} , který v porovnání se Zn^{2+} aktivuje alkalickou fosfatu v 3–5× menší míře^{20,22}.

Jistou nevýhodou pro posuzování praktické využitelnosti tohoto typu enzymových biosenzorů pro stanovení těžkých kovů je skutečnost, že autoři nepopisují vliv jiných kovů, často přítomných v reálných vzorcích (např. Cd^{2+} , Pb^{2+} nebo Hg^{2+}). Ty mohou svými případnými inhibičními účinky zkreslovat výsledky stanovení cílových analytů. Skutečností zůstává, že širší aplikace se dočkaly pouze enzymové biosenzory pro stanovení organických analytů – přirozených substrátů enzymů².

2.3. Biosenzory založené na neenzymových proteinech

S ohledem na vysokou afinitu a případně i selektivitu k iontům těžkých kovů našly některé peptidy a proteiny produkované organismy v odezvě na intoxikaci těžkými

kovy uplatnění i v oblasti konstrukce biosenzorů. Metalothioneiny (MT) jsou skupinou 6 kDa intracelulárních peptidů s vysokým obsahem cysteinových zbytků, které imobilizují ionty těžkých kovů s vysokou afinitou ve formě tetrathiolátových komplexů a eliminují tak jejich cytotoxický účinek^{23,24}. Podobnou funkci plní v rostlinách a některých kvasinkách phytochelatin (PC), enzymově syntetizované peptidy obsahující 2–11 tandemových opakování dipeptidu, v němž je Glu spojena s Cys peptidovou vazbou prostřednictvím svého γ -karboxylu^{24,25}. Rezistence řady prokaryot k těžkým kovům je založena na enzymech a iontových pumpách umožňujících účinnou detoxikaci nebo exkreci kovů^{26,27}. Expresi odpovídajících genů kontrolují transkripční regulátory, jejichž aktivita je závislá na poměrně specifické vazbě daného iontu kovu. Vybrané vlastnosti biosenzorů využívajících neenzymové proteiny jsou shrnuty v tabulce II.

Imobilizací produktu rekombinantní fúze metalothioneinu SmtA ze sinice *Synechococcus* PCC 7942 s glutathion-S-transferasou a nebo regulátoru operonu rtuťové rezistence – proteinu MerR na povrchu zlaté elektrody byly připraveny biosenzory umožňující stanovení Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} a Zn^{2+} s velice nízkým detekčním limitem na femtomolární úrovni a neobvykle širokým dynamickým rozsahem do 1 mmol l^{-1} (cit.²⁸). Vlastní stanovení je založeno na měření změn kapacitance na povrchu elektrody vyvolaných konformační změnou imobilizovaných peptidů po navázání iontu kovu. Stejně uspořádání bylo použito i pro přípravu biosenzoru využívajícího analogu PC s 20 opakováními Glu-Cys spojených α -peptidovou vazbou²⁹. Tento biosenzor se vyznačoval také velmi dobrou citlivostí a širokým dynamickým rozsahem pro stanovení Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} (100 fmol l^{-1} až 10 mmol l^{-1}). Popsán byl i biosenzor testovaný pro stanovení Cd^{2+} , Zn^{2+} a Ni^{2+} , jehož biologickým elementem byl králičí MT imobilizovaný na zlaté nanovrstvě³⁰, kde pro detekci konformačních změn spojených s vazbou kovu byla využita optická metoda rezonance povrchového plasmonu (SRP, z angl. „Surface Plasmon Resonance“). Ačkoliv v případě použití proteinu MerR bylo dosaženo vyšší selektivity vůči Hg^{2+} , nevýhodou výše popsaných biosenzorů zůstává jejich nízká specifita k jednotlivým iontům kovů.

S ohledem na specifitu se jako zajímavý přístup jeví konstrukce biosenzorů založených na interakci transkripčního regulátoru aktivovaného ionty kovů s jeho operátorovou oblastí *in vitro*. Transkripční regulátory rodiny MerR proteinů se ve formě dimeru v nepřítomnosti kovu váží na příslušnou regulační oblast DNA a po navázání kovu prochází konformační změnou, rozplétají dvojšroubovici a ruší vodíkové vazby mezi dvěma páry bází v centrální oblasti operátoru³¹. Náhradou jedné z těchto bází fluoreskujícím analogem cytosinu, pyrrolo-C, v operátorové oblasti rozpoznávané transkripčním proteinovým regulátorem CueR nebo MerR připravili Chen a He³² biosenzory s poměrně výraznou selektivitou vůči Cu^+ , Ag^+ a Au^+ nebo Hg^{2+} . Zatímco v nepřítomnosti těchto iontů je v komplexu regulátor-DNA fluorescence pyrrolo-C zhaslá tvorbou vodíkových můstků a vlivem patrových interakcí se sou-

sedními bazemi, dochází po rozrušení dvojšroubovice působením regulátoru s navázaným analytem k uvolnění fluorochromu a k zesílení fluorescenčního signálu. V případě senzoru založeného na využití regulátoru CueR byla fluorescenční odezva 200× vyšší s Cu^+ , Ag^+ a Au^+ než s Cd^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} . Při stanovení pomocí MerR senzoru nejvýznamněji interferovala přítomnost Cd^{2+} , který však indukoval fluorescenční odezvu se 100× nižší účinností než Hg^{2+} .

V poslední době se jako slibné biologické prvky pro konstrukci biosenzorů ukazují proteiny přirozeně vykazující fluorescenci. Ty mohou být využity pro velmi jednoduché metody stanovení v případě, že při interakci s analytem dochází ke změně fluorescenčních vlastností. Mutacemi zeleného fluoreskujícího proteinu (GFP) původně izolovaného z medúzy *Aequorea victoria* byl získán protein BFPms1, jehož fluorescence byla v přítomnosti Zn^{2+} zesílena a přítomnost Cu^{2+} způsobovala zhášení a posun fluorescenčního spektra³³. Nedávno byl z tropického korálu *Discosoma* izolován červený fluoreskující protein (DsRed), jehož fluorescence je selektivně zhášena Cu^+ a Cu^{2+} ionty³⁴.

2.4. Imunochemické biosenzory

Metody využívající protilátka jako biologického prvku jsou rychlé, nenákladné, jednoduché a často umožňují konstrukci přenosných zařízení. Při kontrole kvality životního prostředí byly úspěšně použity imunochemické metody pro stanovení pesticidů a halogenovaných aromátů a teoreticky se dají využít vždy, je-li možno připravit protilátku proti danému analytu. Popsány byly protilátky proti komplexu Hg^{2+} iontů s glutathionem³⁵. Výhodnější přístup je použití protilátek proti kovu vázanému organickými chelatačními činidly používanými k extrakci kovu z matrice vzorku. Takové protilátky by neměly vázat volné chelatační činidlo, které je používáno pro extrakci kovu ve velkém nadbytku, a jejich afinita ke komplexu jiného kovu by měla být alespoň 10× menší než k analyzovanému kovu. Těmito parametry do značné míry odpovídají monoklonální protilátky připravené Blakovou a spol. pro stanovení komplexů EDTA, diethyltriaminopentaacetové kyseliny (DTPA) a jejich derivátů s Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} a Co^{2+} metodou kompetitivní ELISA (cit. ^{36,37}).

3. Biosenzory využívající aptazymy (a aptamery)

Aptamery (z lat. „aptare“ – přizpůsobovat) jsou molekuly DNA nebo RNA schopné, podobně jako protilátky, velmi specificky vázat určitý ligand³⁸. Aptazymy navíc vykazují v přítomnosti daného ligandu, který často plní funkci kofaktoru, enzymovou (fosfoesterasovou) aktivitu³⁹ a doplňují tak skupinu dosud popsaných biokatalytických molekul – enzymů a ribozymů⁴⁰. Přirozený výskyt molekul DNA s enzymovou aktivitou však dosud nebyl zazna-

menán.

DNA aptazymy (a podobně i RNA aptazymy) jsou připravovány uměle procesem tzv. *in vitro* selekce, která je založena na postupném nabohacení souboru molekul jednořetězcových DNA zástupci s vhodnými vlastnostmi^{41,42}. Vychází se z knihovny (přibližně 10^{15} molekul) syntetických oligonukleotidů, obsahujících na 5' a 3' konci definované úseky, mezi které je vložena nahodilá sekvence 30 až 50 nukleotidů. Definované úseky jsou shodné pro všechny molekuly a umožňují pomnožení molekul s požadovanými vlastnostmi pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro selekci DNA aptazymu s fosfoesterasovou aktivitou je knihovna nejprve pomnožena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jeden z oligonukleotidů sloužících jako primery v PCR obsahuje ve své sekvenci ribonukleotid a je na 5' konci modifikován kovalentně navázaným biotinem (obr. 1a). Fosfodiesterová vazba mezi deoxyribonukleotidem a ribonukleotidem je díky 2' hydroxylu ribosy nejnáchylnější ke štěpení⁴¹. Biotin umožňuje nekovalentní zachycení produktů PCR (dvojřetězcová DNA) na koloně s navázaným streptavidinem. Po odstranění nebiotinylovaného komplementárního vlákna (přerušením vodíkových vazeb mezi bazemi v alkalickém prostředí) zaujme navázané vlákno konformaci určenou převážně náhodnou sekvencí variabilního 30 až 50ti nukleotidového úseku a vznikajícími vodíkovými vazbami mezi bazemi. Následně je na kolonu aplikován roztok ligandu (kofaktoru) a zástupci knihovny katalyzující štěpení fosfodiesterové vazby mezi ribonukleotidem a deoxyribonukleotidem pouze za účasti tohoto ligandu (kofaktoru) jsou z kolony eluovány. Takto získané molekuly jsou amplifikovány pomocí PCR (znovu je tak připojen biotinylovaný primer s ribonukleotidem) a postup se opakuje se sníženou koncentrací kofaktoru. Po 6–8 cyklech jsou získány molekuly štěpící fosfoesterovou vazbu i v přítomnosti stopové koncentrace kofaktoru. Účinnost selekce aptazymu specifického k jedinému kofaktoru lze zvýšit negativní selekcí, kdy před elucí pomocí cílového ligandu je na kolonu aplikován roztok příbuzných látek a dojde tak k odštěpení aptazymů vykazujících skupinovou selektivitu.

Aplikaci spojující vysokou selektivitu aptazymu s vysokou senzitivitou fluorescenčního stanovení u biosenzoru pro stanovení Pb^{2+} popsali Lu a spol.⁴². Na základě analýzy sekundární struktury katalytického centra aptazymu získaného výše uvedeným způsobem autoři rozdělili jeho nukleotidovou sekvenci na substrátové vlákno s fluorochromem 6-karboxytetramethylrhodaminem (TAMRA) na 5' konci a na katalytické vlákno modifikované na 3' konci zhášečem fluorescence 4-(4'-dimethylamino-fenylazo)benzoovou kyselinou (Dabcyl). V nepřítomnosti Pb^{2+} jsou díky hybridizaci obou vláken molekuly TAMRA a Dabcyl v těsné blízkosti a fluorescence je účinně zhášena (obr. 1b). Po navázání Pb^{2+} v katalytickém centru je v substrátovém vláknu štěpena fosfodiesterová vazba mezi deoxyribo- a ribonukleotidem, dojde k disociaci odštěpené části s TAMRA a zvýšení intenzity fluorescence. Díky zařazení kroku negativní selekce při izolaci aptazymu ten-

to biosenzor neposkytoval signál v přítomnosti Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} .

Aptamery jsou podobně jako aptazymy získávány *in vitro* selekcí z knihovny oligonukleotidů založené především na zachycení aptazymu na nosiči s imobilizovaným ligandem. Doposud byly popsány aptamery selektivně vážící různé skupiny látek jako organická barviva, aminokyseliny, antibiotika, peptidy a proteiny⁴³, nicméně principiálně je možno izolovat i aptamery specifické vůči iontu kovu nebo jeho komplexu s chelatačním činidlem. Aptamery, jejichž řetězce jsou značeny fluorochromem, umožňují konstrukci biosenzorů využívajících skutečnosti, že po interakci s ligandem prochází aptamer konformační změnou, která se projeví změnou chemického prostředí molekuly fluorochromu. Tu je možno zaznamenat jako změnu v intenzitě, vlnové délce nebo anisotropii fluorescence⁴⁴.

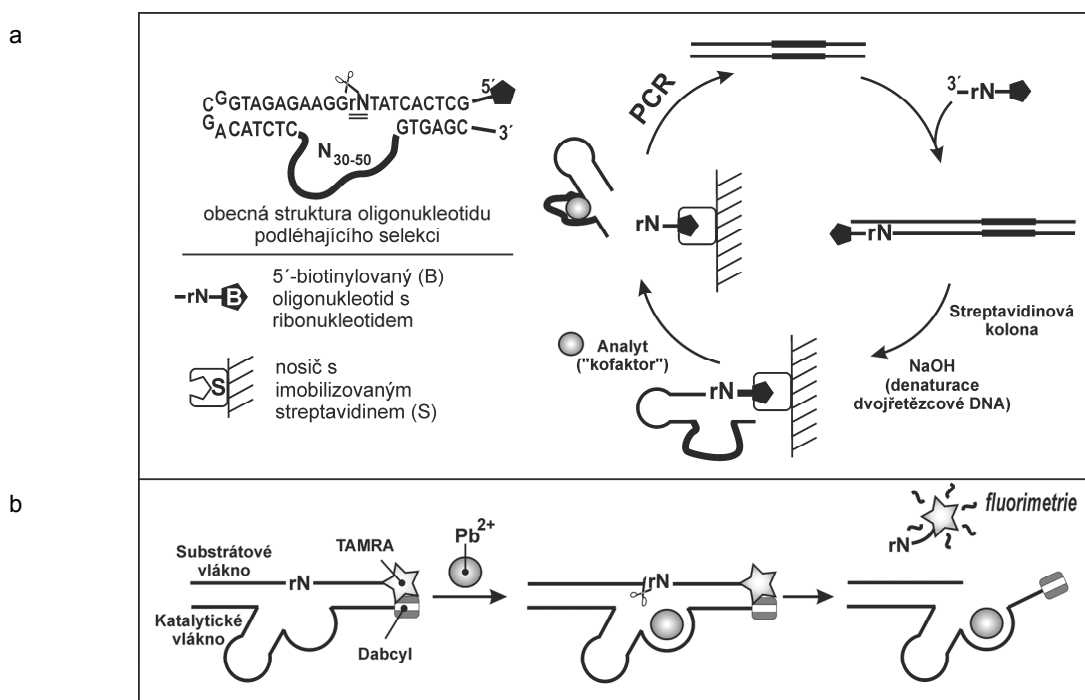
4. Buněčné biosenzory

V porovnání s proteinovými biosenzory a aptazymy umožňují buněčné biosenzory odlišný analytický přístup. Díky použití celých buněk jsou postihnutele komplexní parametry jako biologická dostupnost, toxicita a genotoxicita, které mají v oblasti sledování kvality životního prostředí zásadní význam⁴⁵. Další výhody buněčných biosenzorů v porovnání s proteinovými spočívají v jejich nižší

ekonomické náročnosti, neboť nejsou nutné složité izolační a purifikační kroky sensorových biomolekul a kofaktory jsou enzymům dodávány samotnou buňkou⁴⁶. Fyziologické prostředí uvnitř buňky dále zajišťuje optimální reakční podmínky a do jisté míry pufruje změny vnějšího prostředí, což přispívá k vyšší stabilitě biosenzoru⁴⁷. Díky přítomnosti mnoha metabolických drah mohou v živé buňce probíhat víceokrové přeměny nezbytné pro stanovení některých analytů². Použití živých buněk dále poskytuje možnost „pomnožení“ a částečné regenerace biosenzoru kultivací ve vhodném médiu⁴⁷. Jisté nevýhody buněčných biosenzorů spočívají v delší době odezvy, která je nejvíce limitována transportem analytu do cytoplasmy⁴⁸.

Při konstrukci buněčných biosenzorů pro sledování kvality životního prostředí jsou nejčastěji používány jednobuněčné mikroorganismy, zejména bakterie. Hlavními důvody jsou jejich rychlý růst, vysoký stupeň poznání buněčných mechanismů a pokročilé techniky genových manipulací, které umožňují cílenou konstrukci buněk citlivých k požadovanému analytu⁴⁵. Při výběru bakteriálního kmene pro aplikaci v oblasti biosenzorů je třeba zohlednit jejich přirozené prostředí. Nejvyužívanější laboratorní kmeny *Escherichia coli* nejsou přirozené organismy vnějšího životního prostředí a vhodnější alternativou pro environmentální aplikace jsou proto např. bakterie rodu *Pseudomonas*⁴⁹ nebo *Ralstonia*⁵⁰.

Metody stanovení těžkých kovů pomocí buněčných



Obr. 1. Schematické znázornění selekce DNA aptazymu (1a) a aptazym pro stanovení Pb^{2+} nazvaný „8-17“ (1b); postup při selekci aptazymu a princip využití aptazymu „8-17“ jsou detailně popsány v textu. N_{30-50} - nahodilá sekvence deoxyribonukleotidů podléhající selekci, rN - ribonukleotid, TAMRA - fluorochrom, Dabcyl - zhášec fluorescence

biosenzorů vycházejí ze dvou základních přístupů. První je založen na toxickém účinku těžkých kovů na organismy, kdy je detegována snížená biologická aktivita organismů, nebo jejich odpověď na stres. Druhý přístup využívá interakci těžkého kovu se specifickým rozpoznávacím prvkem, nejčastěji regulačním proteinem, který v závislosti na přítomnosti analytu působí jako aktivátor nebo represor exprese tzv. reportérových genů.

4.1. Reportérové geny a proteiny

Reportérový gen může být definován jako gen, jehož exprese vytváří měřitelný signál snadno odlišitelný od pozadí^{49,51–53}. Produkt reportérového genu (reportérový protein) má buď vlastnosti, které jsou detegovatelné přímo (např. fluoreskující proteiny), nebo katalyzuje biochemickou reakci produkující signál. Povaha produktu reportérového genu, metody jeho stanovení a použité detekční zařízení určují senzitivitu systému⁵¹. Při výběru reportérového genu pro konstrukci biosenzorů je zapotřebí splnit následující požadavky: *i*) projev reportérového genu musí být snadno odlišitelný od projevů ostatních buněčných proteinů, *ii*) detekce produktu reportérového genu by měla být dostatečně rychlá a citlivá a *iii*) produkovaný signál by neměl být rušen maticí měřeného vzorku. V následujícím textu jsou představeny reportérové proteiny použité při konstrukci biosenzorů pro těžké kovy. Obsáhlý přehled reportérových genů pro různé aplikace uvádí Daurert a spol.⁵⁴.

β -Galaktosidasa

Plní-li β -galaktosidasa kódovaná genem *lacZ* (cit.⁵⁵) funkci reportérového proteinu, používají se k jejímu stanovení deriváty β -galaktosidů, které umožňují spektrofotometrické (např. *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid, ONPG), fluorimetrické (fluorescein di- β -D-galaktopyranosid, FDG)⁵⁶ nebo bioluminescenční (3-{4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-tricyklo-(3.3.1.1.^{3,7}]dekan-4-yl} fenyl- β -D-galaktopyranosid, AMPGD)⁴⁷ stanovení produktů hydrolýzy. Tato stanovení vyžadují permeabilizaci nebo lyzi buněk. Pro stanovení β -galaktosidasové aktivity v neporušených buňkách byl vyvinut alternativní substrát (*p*-aminofenyl- β -D-galaktopyranosid) umožňující amperometrické stanovení uvolněného *p*-aminofenolu jeho oxidací na iminochinon⁵⁷.

Zelený fluoreskující protein (GFP)

GFP kodovaný genem *gfp* tvoří monomer vykazující po ozáření světlem o vlnové délce 395 nm fluorescenci s maximem při 508 nm. Fluorescence je způsobena přítomností vnitřního fluoroforu, který vzniká posttranslační cyklizací a oxidací tří aminokyselinových zbytků⁵⁸. Veliké výhody GFP jako reportérového proteinu spočívají v jeho vysoké stabilitě a schopnosti autofluorescence, díky níž nevyžaduje stanovení přísadavek vnějšího substrátu⁵⁹. Fluoreskující proteiny s pozměněnými spektrálními vlastnostmi byly získány pomocí řízené mutagenese genu *gfp* nebo

izolací proteinů z dalších organismů⁶⁰. Detekce a kvantifikace fluoreskujících proteinů se provádí pomocí fluorimetru, fotonásobiče nebo zařízení s vázaným nábojem (CCD z angl. „Charge-Coupled Device“)⁶¹.

Luciferasa

Luciferasy (z lat. „lux“ – světlo, „ferrare“ – nosit) jsou bakteriální nebo eukaryotní enzymy, jejichž katalytickou činností vzniká viditelné světlo. Luciferasy poskytují rychlejší odezvu a vyšší senzitivitu⁵⁸ než fluoreskující proteiny, neboť je měřena enzymová aktivita, nikoliv pouze množství proteinu. Geny pro bakteriální FMNH₂-dependentní luciferasu byly nalezeny v několika rodech bakterií (např. *Vibrio*, *Photobacterium*)⁶². Enzym se skládá ze dvou podjednotek kódovaných geny *luxAB* a katalyzuje oxidaci alifatického (C_{10–15}) aldehydu (bakteriální luciferin) na příslušnou mastnou kyselinu za současného uvolnění světla⁶³. Při stanovení aktivity samotné bakteriální luciferasy je nutné dodávat luciferin exogenně, proto se častěji jako reportéru využívá celá kazeta obsahující geny *luxC-DABE*, kde geny *luxCDE* kódují enzymový komplex zodpovědný za syntézu a recyklaci substrátu uvnitř buňky, přičemž další substráty – kyslík a kofaktor – jsou za aerobních podmínek v bakteriích přítomny v dostatečném množství⁶⁴.

Nejčastěji používané eukaryotní luciferasy jsou kódovány genem *lucFF* (izolován z *Photinus pyralis*) nebo *lucGR* (izolován z *Pyrophorus plagiophthalmus*). Aktivní forma enzymu se skládá z jedné podjednotky a v přítomnosti kyslíku, Mg²⁺ a ATP katalyzuje oxidaci benzothiazolového luciferinu za vzniku světla^{65,66}. Ve srovnání s bakteriální luciferasou poskytuje eukaryotická luciferasa díky vysokému kvantovému výtěžku vyšší citlivost stanovení⁶⁷.

Aktivita luciferasy se stanovuje v buněčném lysátu nebo v celých buňkách po přidavku substrátů. Při použití kazety *luxCDABE* lze sledovat v neporušených buňkách změny luciferasové aktivity v čase. Detekci lze provádět pomocí fotografického filmu, scintilačního počítače, nebo luminometru, novější metody využívají i optická vlákna nebo CCD prvky⁶⁷. Jistou nevýhodou obou typů luciferasy je jejich nízká tepelná stabilita^{64,68}.

4.2. Nespecifické buněčné biosenzory

Pro kontrolu kvality životního prostředí často není důležité, které konkrétní toxické látky jsou ve vzorku přítomny, nýbrž jaká je jeho toxicita celková⁴⁵. Popsané buněčné biosenzory pro stanovení celkové toxicity lze rozdělit do dvou skupin:

Přirozené buněčné biosenzory

U tohoto typu biosenzorů způsobuje celková toxicita vzorku inhibici buněčného růstu nebo pokles metabolické aktivity. Některé mikroorganismy přirozeného původu mohou obsahovat konstitutivně exprimovaný reportérový gen, jehož měřitelný signál se vlivem toxického účinku

snižuje. Tento princip je základem komerčního testu Microtox® (AZUR Environmental), v němž je sledován pokles přirozené bioluminiscence mořské bakterie *Photobacterium phosphoreum*⁶⁹. Bez účasti reportérového genu lze toxicitu stanovit pouhým sledováním inhibice buněčného růstu. Vedle klasických plotnových nebo turbidimetrických metod bylo na případu sledování inhibičního účinku Cu^{2+} demonstrováno použití zařízení, ve kterém byl růst halotolerantních bakterií čeledi *Mikrobacteriaceae* sledován s akustickou detekcí pomocí piezoelektrického krystalu, jehož frekvence kmitání byla závislá na hustotě kultury⁷⁰.

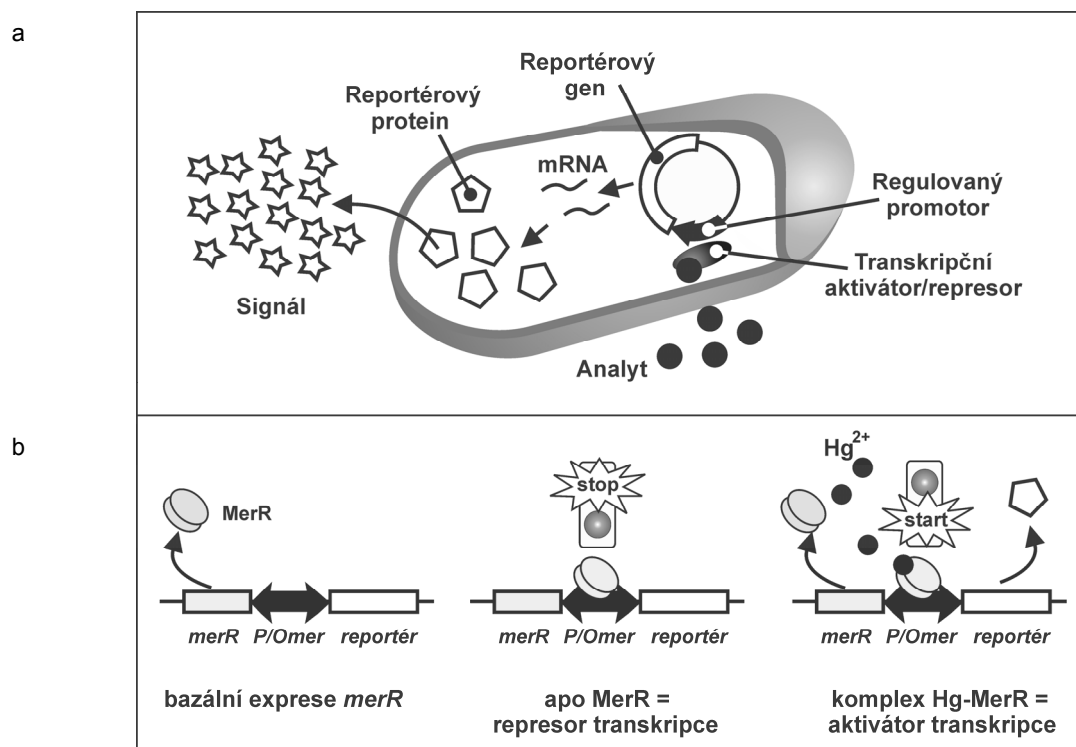
Buněčné biosenzory odpovídající na stres

Bližší informaci o typu přítomných toxických látek poskytují buněčné biosenzory obecného stresu. Senzorové buňky obsahují reportérový gen ve fúzi s promotorem zahrnutým v regulační kaskádě zprostředkující buněčnou odpověď na stresové podmínky. Pro detekci látek způsobujících buněčný stres byla takto vyvinuta souprava obsahující buňky *E. coli* nesoucí *luxCDABE* pod kontrolou promotorů genů *grpE*, *recA*, *katG*, *micF* a *fabA* (cit. ⁷²). K aktivaci transkripce *lux* genů pak dochází během stresové odpovědi na obecné poškození proteinů („heat shock“;

promotor *grpE*), poškození DNA (promotor *recA*), oxidační stres způsobený peroxidy (promotor *katG*), stres způsobený superoxidy (promotor *micF*) a inhibicí syntézy mastných kyselin (promotor *fabA*). Na rozdíl od přirozených biosenzorů, kdy je sledován pokles luminiscence, je v tomto uspořádání monitorován její nárůst, což umožňuje stanovení toxicity v širším rozmezí koncentrací xenobiotik.

4.3. Specifické buněčné biosenzory

První buněčný biosenzor specifický k určité látce – naftalenu – popsali v roce 1990 King a spol.⁷³. Senzorové buňky *Pseudomonas fluorescens* byly transformovány plasmidem, v němž byla kazeta *luxCDABE* vložena mezi strukturní geny operonu zodpovědného za degradaci naftalenu. Expres strukturních genů tohoto operonu je řízena regulačním proteinem NahR, který aktivuje transkripci po vazbě meziproduktu odbourávání naftalenu. Systém založený na spojení reportérového genu s promotorem, jehož aktivita je řízena proteinem reagujícím na přítomnosti analytu (obr. 2a), se stal základem všech specifických buněčných biosenzorů. Aplikace regulačních elementů odpovídajících na přítomnost těžkých kovů při konstrukci spe-



Obr. 2. Obecný princip specifických buněčných biosenzorů (a) a regulace *mer* promotoru (b); vazba analytu na regulační protein spouští expresi reportérového proteinu (2a), který produkuje (v některých případech až po přidání substrátu) signál úměrný množství přítomného analytu. V konkrétním případě buněčného senzoru pro stanovení Hg^{2+} (2b) jsou buňky transformovány hybridní DNA obsahující kazetu tvořenou genem *merR* kódujícím transkripční aktivátor/represor MerR, promotor-operátovou oblastí operonu (*P/Omer*) a reportérovým genem

Tabulka III
Buněčné biosenzory

Regulátor (gen)	Analyt	Reportér	Hostitelský organismus	Dynamický rozsah/ detekční limit (DL)/ [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
<i>arsA</i>	AsO_2^-	<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	10^{-3} –1	87
		<i>lucFF</i>	<i>B. subtilis</i>	DL= 3,3	88
	AsO_4^{3-}	<i>lucFF</i>	<i>B. subtilis</i>	DL= 330	88
		<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	DL= 10^{-9}	90
<i>cadC</i>	Cd^{2+}	<i>lucFF</i>	<i>S. aureus</i>	0,01–1	93
		<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	10^{-4} –750	92 ^b
		<i>lucFF</i>	<i>S. aureus</i>	0,033–1	93
	Pb^{2+}	<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	0,01–10	92 ^b
		<i>lucFF</i>	<i>S. aureus</i>	1–330	93
		<i>gfp</i>	<i>E. coli</i>	10^{-4} –10	92 ^b
<i>chrB</i>	$\text{CrO}_4^{2-}/\text{Cr}^{3+}$	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	1–40	84
		<i>lucFF</i>	<i>R. metallidurans</i>	DL= 0,03 ^c	83
		<i>lucFF</i>	<i>R. metallidurans</i>	DL= 0,05	83 ^b
<i>cnrYXH</i>	Co^{2+}	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	9–400	96 ^b
		<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	0,1–60	96 ^b
<i>copSR</i>	Cu^{2+}	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	1–200	84
<i>merR</i>	Hg^{2+}	<i>luxCDABE</i>	<i>E. coli</i> ^a	DL= $5 \cdot 10^{-4}$	76 ^c
		<i>lucFF</i>	<i>E. coli</i>	DL= 10^{-12}	79
		<i>luxAB</i>	<i>E. coli</i> ^a	$2 \cdot 10^{-6}$ – $2,5 \cdot 10^{-4}$	78
		<i>luxCDABE</i>	<i>P. fluorescens</i>	$5 \cdot 10^{-4}$ –0,012	77 ^b
<i>merR</i>		<i>lacZ</i>	<i>P. fluorescens</i>	0,001–0,05	77 ^b
		<i>gfp</i>	<i>P. fluorescens</i>	0,12–12	77 ^b
<i>pbrR</i>	Pb^{2+}	<i>luxCDABE</i>	<i>R. metallidurans</i>	0,5–8	84
<i>zntR</i>	Zn^{2+}	<i>lacZ</i>	<i>E. coli</i>	DL= 0,1	56
		<i>lucFF</i>	<i>R. metallidurans</i>	DL= 40	83 ^b

^a Biosenzorový kmen exprimoval i gen *merT*, ^b použit pro stanovení biodostupných kovů v půdě, ^c použit pro stanovení biodostupných kovů v říční vodě

cifických buněčných biosenzorů jsou uvedeny v následujícím textu a tabulka III shrnuje jejich důležité charakteristiky.

Buněčné biosenzory pro detekci Hg^{2+} využívají promotor/operátorovou oblast *mer* operonu (*P/O_{mer}*) a gen *merR* kódující regulační protein. Přirozený *mer* operon, který byl spolu s dalšími geny pro rezistence k různým látkám nalezen na některých transpozonech a plasmidech, je zodpovědný za rezistenci bakterií ke sloučeninám rtuť^{26,31}. V gramnegativních bakteriích je gen *merR* transkribován divergentně od strukturních genů *merTPCABD*, které jsou zodpovědné za přenos Hg^{2+} a organortuťných sloučenin do buněk a jejich detoxikaci redukcí na elementární rtuť, která volně propustuje z buňky do okolního

prostředí. Jak bylo naznačeno výše, funkční protein MerR se sestává ze dvou identických podjednotek, které vytvářejí dvě místa pro vazbu Hg^{2+} . Ta jsou tvořena dvěma Cys jedné podjednotky a jedním Cys podjednotky druhé³¹. Nejsou-li v buňce přítomny Hg^{2+} ionty, probíhá bazální exprese genu *merR* a protein MerR po vazbě na promotor/operátorovou oblast *P/O_{mer}* vytváří neaktivní komplex s RNA-polymerasou. Vazba Hg^{2+} na MerR způsobuje konformační změnu proteinu a DNA, čímž dochází k přechodu na aktivní transkripční komplex^{31,74} (obr. 2b). Homologní proteiny regulující transkripci v přítomnosti určitého kovu na základě stejného principu jsou řazeny do tzv. MerR rodiny transkripčních regulátorů.

Biosenzory využívající regulační element *merR-P/*

O_{mer} ve fúzi s reportérovými geny *luxCDABE* (cit.^{75–77}), *luxAB* (cit.⁷⁸) *lacZ* (cit.⁷⁷), *gfp* (cit.⁷⁷), *lucFF* (cit.⁷⁹) a *lucGR* (cit.⁸⁰) vykazují velmi dobrou senzitivitu pro Hg^{2+} . Indukční účinek mají i Cd^{2+} , Zn^{2+} , Au^+ a Au^{3+} ionty, avšak v koncentracích o dva až tři řády vyšších^{79,81}. Senzitivita a rychlost odezvy byla dále zvýšena expresí genu *merT* (cit.^{76,78}), který kóduje translokasu transportující Hg^{2+} do buňky.

Dalším zástupcem rodiny MerR je protein ZntR, regulující transkripci genu *zntA*, který kóduje ATPasu pro transport Zn^{2+} , Pb^{2+} a Cd^{2+} z buněk *E. coli*. ZntR indukuje transkripci zejména v přítomnosti Zn^{2+} a Cd^{2+} , ačkoliv mírný indukční účinek vyvolávají i Hg^{2+} a Pb^{2+} ionty⁸². Pro biosenzory byl použit gen kódující ZntR a *P/O_{zntA}* ve fúzi s reportérovými geny *lacZ* (cit.⁵⁶) a *lucFF* (cit.⁸³).

Transkripční regulátor PbrR (MerR rodina) vykazující vysokou míru selektivity k Pb^{2+} iontům byl nalezen na megaplasmidu bakterie *Ralstonia metallidurans*²⁷. Tento protein kontroluje expresi genů zodpovědných za transport Pb^{2+} iontů z buňky a spolu s odpovídajícím promotorem ve fúzi s *luxCDABE* stal základem poměrně citlivého biosenzoru⁸⁴.

Druhou velkou skupinou transkripčních regulátorů citlivých na přítomnost kovů je tzv. rodina ArsR proteinů. Na rozdíl od regulátorů MerR rodiny je funkce proteinů typu ArsR založena pouze na represí transkripce. Bez přítomnosti kovu tvoří regulační protein komplex s DNA a brání tak nasazení RNA-polymerasy. Vazba kovu na represor způsobí jeho uvolnění z promotor-opérátorové sekvence a umožní tak zahájení transkripce⁸⁵. Regulační protein ArsR citlivý na AsO_2^- a SbO_2^- reprimuje bez jejich přítomnosti expresi genů *arsABC*, které kódují proteiny zajišťující redukci AsO_4^{3-} na AsO_2^- a transport těchto oxoaniontů z buňky⁸⁶. Při konstrukci buněčných biosenzorů byl použit regulační element *arsR-P/O_{ars}* kontrolující expresi *gfp* (cit.⁸⁷), *lucFF* (cit.^{88,89}) a *lacZ* (cit.⁹⁰).

Do ArsR rodiny patří i regulační protein CadC, který řídí v *cad* operonu expresi genu *cadA*, který kóduje ATPasu zodpovědnou za export Cd^{2+} z buňky⁹¹. Regulační oblast *cadC-P_{cad}* byla při konstrukci biosenzorů pro Cd^{2+} a Pb^{2+} využita ve spojení s reportérovými geny *gfp* (cit.⁹²) a *lucFF* (cit.⁹³). Nedávno objevený transkripční regulátor CadR, který je řazen do MerR rodiny⁹⁴, vykazuje vyšší specifitu k Cd^{2+} , dosud však nebyl při konstrukci buněčných biosenzorů využit.

Buněčný biosenzor specifický k Cu^{2+} využívá kontrolu *luxCDABE* promotorem *P_{cop}* a produkty genů *copSR* z *Ralstonia metallidurans*⁸⁴. Produkty *copSR* přirozeně aktivují expresi *cop* genů zodpovědných za export Cu^{2+} , regulační mechanismus však dosud není plně objasněn.

Rezistence rodu *Ralstonia* k Co^{2+} a Ni^{2+} je řízena geny *cnrYXH*. Protein CnrH, který reguluje expresi genů zodpovědných za export Co^{2+} a Ni^{2+} z buňky, je σ -faktor, jehož aktivita je pravděpodobně řízena membránovými proteiny CnrX a CnrY (cit.⁹⁵). Buněčný biosenzor citlivý k Co^{2+} a Ni^{2+} byl získán spojením genů *cnrYXH* s kazetou *luxCDABE* (cit.⁹⁶). Dalšími geny nalezenými na megaplasmidu *Ralstonia metallidurans* jsou geny *chr*, jejichž pro-

dukty zajišťují rezistenci ke sloučeninám chromu²⁵. Při konstrukci biosenzorů byla použita regulační jednotka *chrB-P_{chrA}* ve fúzi s kazetou *lucFF* (cit.⁸³) a *luxCDABE* (cit.⁸⁴).

Některé z buněčných biosenzorů byly úspěšně použity ke stanovení biologicky dostupné složky kovů v reálných vzorcích (tab. III). Obtížně definovatelné složky značně komplexních reálných vzorků mohou zkreslovat signál produkovaný reportérovým proteinem, proto je většinou k produkci referenčního signálu používán kmen exprimující reportérový gen konstitutivně. Metoda tzv. duálního značení, která využívá dvojice reportérových genů (např. luciferas produkujících světlo o různých vlnových délkách nebo variant GFP s odlišným emisním spektrem), z nichž jeden je produkovan konstitutivně a druhý v závislosti na přítomnosti analytu, umožňuje produkci obou signálů v jedné buňce⁴⁵. Ačkoliv jsou stanovení kovů pomocí buněčných biosenzorů většinou prováděna v suspenzi buněk, pro konstrukci přenosných zařízení, která by umožňovala detekci analytů *in situ*, je výhodnější buňky imobilizovat. Dobrý přehled imobilizačních technik využívaných při konstrukci buněčných biosenzorů uvádí D'Sousa⁷. Imobilizace buněk je též předpokladem pro konstrukci čipů, na kterých jsou naneseny senzorové buňky obsahující fúze různých regulačních elementů s reportérovými geny⁵⁶. Tyto čipy ve spojení s optickými vlákny nebo CCD prvky povedou pravděpodobně ke vzniku nové generace buněčných biosenzorů.

5. Závěr

V této práci jsme se pokusili popsat kategorie biologických složek biosenzorů a jejich významné zástupce využívané v konstrukcích biosenzorů pro těžké kovy. Neuvádíme zcela vyčerpávající výčet všech popsaných biosenzorů pro těžké kovy a popis dalších, především proteinových biosenzorů, lze nalézt v referátech jiných autorů^{2,97}. Biosenzory založené na interakci kovů s izolovaným proteinem sice poskytují rychlé odezvy a lze je většinou po regeneraci vícenásobně použít, ale biosenzory využívající inhibice enzymů, metalothioneiny (MT) a fytochelatinu (PC) postrádají užší specifitu. V porovnání s biosenzory založenými na MT nebo PC navíc enzymové biosenzory vykazují vyšší detekční limity a užší dynamický rozsah. Vyšší specifitu a dostatečnou citlivost poskytují imunochemické senzory, jejichž využití je díky popularitě immunochemických metod v běžné praxi spíše reálné. Jako slibné se jeví využití transkripčních regulátorů jak v podmínkách *in vitro*, tak především *in vivo*, jako součástí buněčných biosenzorů. Souprava specifických buněčných biosenzorů založená na bakterii *R. metallidurans*, obsahující specifické regulační elementy kontrolující expresi kazety reportérových genů *luxCDABE* (tab. III) v závislosti na přítomnosti iontu kovu, je již komerčně dostupná pod označením BIOMET (cit.^{50,98}).

Tato práce vznikala za finanční podpory GA ČR (grant č. 203/03/P095) a MŠMT ČR (granty č. IM6837805002 a MSM6046137305).

LITERATURA

1. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 64, 148 (1992).
2. Castillo J., Gaspár S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneau S. A., Ryabov A. D., Csöregi E.: Sens. Actuators B102, 179 (2004).
3. Choi M. M. F.: Microchim. Acta 148, 107 (2004).
4. Vo-Dinh T., Kasili P.: Anal. Biol. Chem. 381, 141 (2005).
5. Lei Y., Chen W., Muchandani A.: Anal. Chim. Acta 568, 200 (2006).
6. Kotlín R., Dyr J. E.: Chem. Listy 100, 178 (2006).
7. D'Souza S. F.: Biosens. Bioelectron. 16, 337 (2001).
8. Krawczyk T. K., Moszcynska M., Trojanowicz M.: Biosens. Bioelectron. 15, 681 (2000).
9. Castro M. D. L., Herrera M. C.: Biosens. Bioelectron. 18, 279 (2003).
10. Gayet J., Haouz A., Geloso-Meyer A., Burstein C.: Biosens. Bioelectron. 8, 177 (1993).
11. Fennouh S., Casmiri V., Geloso-Meyer A., Burstein C.: Biosens. Bioelectron. 13, 903 (1998).
12. Ogonczyk D., Tymecki L., Wyzkiewicz I., Koncki R., Glab S.: Sens. Actuators, B106, 450 (2005).
13. Yang Y., Wang Z., Yang M., Guo M., Wu Z., Shen G.: Sens. Actuators B114, 1 (2006).
14. Rodriguez B. B., Bolbot J. A., Tothill I. E.: Biosens. Bioelectron. 19, 1157 (2004).
15. Preininger C., Wolfbeis O. S.: Biosens. Bioelectron. 11, 981 (1996).
16. Nam Y. J., Kim N., Volotovskiy V.: Sens. Actuators, B42 233 (1997).
17. Veselova I. A., Shekhovtsova T. N.: Anal. Chim. Acta 392, 151 (1999).
18. Shekhovtsova T. N., Muginova S. V., Bagirova N. A.: Anal. Chim. Acta 344, 145 (1997).
19. Satoh I., Kasahara T., Goi N.: Sens. Actuators B1, 499 (1990).
20. Satoh I., Iijima Y.: Sens. Actuators B24-25, 103 (1995).
21. Satoh I.: Sens. Actuators B13-14, 162 (1993).
22. Satoh I.: Biosens. Bioelectron. 6, 375 (1991).
23. Coyle P., Phicox J. C., Carey L. C., Rofe A.-M.: Cell. Mol. Life Sci. 59, 627 (2002).
24. Kotrba P., Ruml T.: Collect. Czech Chem. Commun. 65, 1205 (2000).
25. Cobbett C., Goldsbrough P.: Annu. Rev. Plant Biol. 53, 159 (2002).
26. Silver S.: Gene 179, 9 (1996).
27. Nies D. H.: FEMS Microbiol. Rev. 27, 313 (2003).
28. Bontidean I., Lloyd J. R., Hobman J. L., Wilson J. R., Csöregi E., Mattiasson B., Brown N.: J. Inorg. Biochem. 79, 225 (2000).
29. Bontidean I., Ahlqvist J., Mulchandani A., Chen W., Bae W., Mehra R. K., Mortari A., Csöregi E.: Biosens. Bioelectron. 18, 547 (2003).
30. Wu Ch., Lin L.: Biosens. Bioelectron. 20, 864 (2004).
31. Barkay T., Miller S. M., Summers A. O.: Microbiol. Rev. 27, 355 (2003).
32. Chen P., He Ch.: J. Am. Chem. Soc. 126, 728 (2003).
33. Barondeau D. P., Kassmann C. J., Tainer J. A., Getzoff E. D.: J. Am. Chem. Soc. 124, 3522 (2002).
34. Summer J., Westerberg N. M., Stoddard A. K., Hurst T. K., Cramer M., Thompson R. B., Fierke C. A., Kopelman R.: Biosens. Bioelectron. 21, 1302 (2006).
35. Wylie D. E., Lu D., Carlson L. D., Carlson R., Babacan K. F., Schuster S. M., Wagner F. W.: Immunology 89, 4104 (1992).
36. Blake D. A., Blake R. C., Khosraviani M., Pavlov A. R.: Anal. Chim. Acta 376, 13 (1998).
37. Blake D. A., Jones R. M., Blake II R. C., Pavlov A. R., Darwish I. A., Yu H.: Biosens. Bioelectron. 16, 799 (2001).
38. Ellington A. D., Szostak J. W.: Nature 346, 818 (1990).
39. Breaker R. R., Joyce G. F.: Chem. Biol. 2, 655 (1995).
40. Fedor M. J., Williamson J. R.: Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6, 399 (2005).
41. Breaker R. R., Joyce G. F.: Chem. Biol. 1, 223 (1994).
42. Lu Y., Liu J., Li J., Brusehoff P. J., Pavot C. M.-B., Brown A.K.: Biosens. Bioelectron. 18, 529 (2003).
43. Tombelli S., Minunni M., Mascini M.: Biosens. Bioelectron. 20, 2424 (2005).
44. Hesselberth J., Robertson M. P., Jhaveri S., Ellington A. D.: Rev. Mol. Biotech. 74, 15 (2000).
45. Belkin S.: Curr. Opin. Microbiol. 6, 206 (2003).
46. Riedel K.: Bioelectroch. Bioener. 25, 19 (1991).
47. Ramanathan S., Ensor M., Daunert S.: Trends Biotechnol. 15, 500 (1997).
48. Rainina E. I., Efremenco E. N., Varfolomeyev S. D., Simonian A. L., Wild J. R.: Biosens. Bioelectron. 11, 991 (1996).
49. Purohit H. J.: J. Clean. Prod. 11, 293 (2003).
50. Corbisier P., Mergeay M., Diels L. (Flemish Institute for Technological Research): US 5786162 (435/7.32).
51. Lewis J. C., Feltus A., Ensor C. M., Ramanathan S., Daunert S.: Anal. Chem. 70, 579A, (1998).
52. Naylor L. H.: Biochem. Pharmacol. 58, 749 (1999).
53. Rensing Ch., Maier R.: Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 140 (2003).
54. Daunert S., Barrett G., Feliciano J. S., Shetty R. S., Shrestha S., Smith-Spencer W.: Chem. Rev. 100, 2705 (2000).
55. Silhavy T. J., Beckwith J. R.: Microbiol. Rev. 49, 398 (1985).
56. Biran I., Rissin D. M., Ron E. Z., Walt D. R.: Anal. Biochem. 315, 106 (2003).
57. Biran I., Klimentiy L., Hengge-Aronis R., Ron E. Z., Rishpon J.: Microbiology 145, 2129 (1999).
58. Hakilla K., Maksimow M., Karp M., Virta M.: Anal. Biochem. 301, 235 (2002).

59. Kendall J. M., Badminton M.: Trends Biotechnol. 16, 216 (1998).
60. Wachter R. M., Elsliger M., Kallio K., Hanson G. T., Remington S. J.: Structure 6, 1267 (1998).
61. Bongaerts R. J. M., Hautefort I., Sidebotham J. M., Hinton J. C. D.: Methods Enzymol. 358, 43 (2002).
62. Meighen E. A.: Microbiol. Rev. 55, 123 (1991).
63. Baldwin T. O., Christopher J. A., Raushel F. M., Sinclair J. F., Ziegler M. M., Fisher A. J., Rayment I.: Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 798 (1995).
64. Winson M. K., Swift S., Hill P. J., Sims C. M., Griessmayr G., Bycroft B. W., Williams P., Stewart G. S. A. B.: FEMS Microbiol. Lett. 163, 193 (1998).
65. Hastings J. W.: Gene 173, 5 (1996).
66. Brau F., Bernengo J., Min K., Steghens J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 270, 247 (2000).
67. Billard P., Dubow M. S.: Clin. Biochem. 31, 1 (1998).
68. Harrison E. M., Garden O. J., Ross J. A., Wigmore S. J.: J. Immunol. Methods 310, 182 (2006).
69. <http://www.azurenv.com/mtx.htm>, staženo .
70. Abbondanzi F., Cachada A., Campisi T., Guerra R., Raccagni M., Iacondini A.: Chemosphere 53, 889 (2003).
71. Yamasaki A., Cunha M. A. S. D. A., Oliviera J. A. B. P., Duarte A. C., Gomes M. T. S. R.: Biosens. Bioelectron. 19, 1203 (2004).
72. Belkin S., Smulski D. R., Dadon S. A., Vollmer A. C., Van Dyk T. K., Larossa R. A.: Wat. Res. 31, 3009 (1997).
73. King J. M. H., DiGrazia P. M., Applegate B., Burlage R., Sanseverino J., Dunbar P., Larimer F., Sayler G. S.: Science 249, 778 (1990).
74. Ansari A. Z., Brander J. E., O'Halloran T. V.: Nature 374, 370 (2002).
75. Rasmussen L. D., Sorensen S. J., Turner R. R., Barkay T.: Soil Biol. Biochem. 32, 639 (2000).
76. Selifonova O., Burlage R., Barkay T.: Appl. Environ. Microb. 59, 3083 (1993).
77. Hansen L. H., Sorensen S. J.: FEMS Microbiol. Lett. 193, 123 (2000).
78. Omura T., Kiyono M., Pan-Hou H.: J. Health Sci. 50, 379 (2004).
79. Virta M., Lampinen J., Karp M.: Anal. Chem. 67, 667 (1995).
80. Petanen T., Romantschuk M.: Anal. Chim. Acta 456, 55 (2002).
81. Ralston D. M., O'Halloran T. V.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3846 (1990).
82. Khan S., Brocklehurst K. R., Jones G. W., Morby A. P.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 438 (2002).
83. Ivask A., Virta M., Kahru A.: Soil Biol. Biochem. 34, 1439 (2002).
84. Corbisier P., van der Lelie D., Borremans B., Provoost A., de Lorenzo V., Brown N. L., Lloyd J. R., Hobman J. L., Csöregi E., Johansson G., Mattiasson B.: Anal. Chim. Acta 387, 235 (1999).
85. Busenlehner L. S., Pennella M. A., Giedroc D. P.: FEMS Microbiol. Rev. 27, 131 (2003).
86. Ji G., Silver S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9474 (1992).
87. Roberto F. F., Barnes J. M., Bruhn D. F.: Talanta 58, 181 (2002).
88. Tauriainen S., Karp M., Chang W., Virta M.: Appl. Environ. Microbiol. 63, 4456 (1997).
89. Flynn H. C., Mc Mahon V., Chong Diaz G., Demergasso C. S., Corbisier P., Meharg A. A., Paton G. I.: Sci. Total Environ. 286, 51 (2002).
90. Ramanathan S., Shi W., Rosen B. P., Daunert S.: Anal. Chim. Acta 369, 189 (1998).
91. Endo G., Silver S.: J. Bacteriol. 177, 4437 (1995).
92. Liao V. H., Chien M., Tseng Y., Ou K.: Environ. Pollut. 142, 17 (2005).
93. Tauriainen S., Karp M., Chang W., Virta M.: Biosens. Bioelectron. 13, 931 (1998).
94. Brocklehurst K. R., Megit S. J., Morby A. P.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 308, 234 (2003).
95. Grass G., Grobe C., Nies D. H.: J. Bacteriol. 182, 1390 (2000).
96. Tibazarwa C., Corbisier P., Mench M., Bossis A., Solda P., Mergeay M., Wyns L., van der Lelie D.: Environ. Pollut. 113, 19 (2001).
97. Verma N., Singh M.: BioMetals 18, 121 (2005).
98. <http://www.vito.be/english/environment/environmentaltech2d.htm>, staženo 20.12.2006.

P. Vopálenský, T. Ruml, and P. Kotrba
(Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague): **Biological Components of Heavy Metal Biosensors**

Biosensor is an analytical device that couples a biological element, such as a biopolymer or microorganism capable of sensing the target analyte, with a physicochemical signal transducer to enable rapid, accurate and sensitive detection. The biological element determines the specificity of the biosensor and significantly contributes to its sensitivity. In this paper we review heavy metal biosensors with emphasis on their biological components – enzymes activated or inhibited by heavy metal ions, metal-sequestering peptides, non-enzymatic proteins, DNAs possessing metal-dependent enzymatic activity, antibodies against metal chelates, metal-dependent transcription activators/repressors combined with their target DNA sequence as well as whole bacterial cells, both natural and genetically engineered by introducing the metal-responsive transcription regulation elements controlling the expression of a reporter gene.