

Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA<sup>1</sup>, Vasył MARTSENYUK<sup>2</sup>

## WPLYW CZYNNIKÓW ZEWNĘTRZNYCH APLIKOWANYCH RAZEM NA KOMPONENT WARSTWY RECEPTOROWEJ BIOSENSORÓW

**Streszczenie:** Prezentowana praca przedstawia wpływ czynników zewnętrznych aplikowanych razem na komponent warstwy receptorowej biosensorów. Wybranymi czynnikami były: promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie UV, metabolit NAA, -18°C, 4°C. Zaaplikowano: dwa, trzy, cztery, pięć różnych czynników. Wykonano analizę na podstawie modeli. Wykazano stabilizujący wpływ NAA na badaną proteinę.

**Słowa kluczowe:** BSA, biosensor, warstwa receptorowa, stabilność

## INFLUENCE OF EXTERNAL FACTORS APPLIED TOGETHER ON THE COMPONENT OF THE BIOSENSOR RECEPTOR LAYER

**Summary:** The paper presents the influence of external factors applied together on the component of the biosensor receptor layer. Selected factors were: microwave radiation, UV radiation, metabolite NAA, -18°C, 4°C.

Two, three, four, five different factors were applied. The analysis was based on models. The stabilizing effect of NAA on the tested protein was demonstrated.

**Keywords:** BSA, biosensor, receptor layer, stability

### 1. Wstęp

Rozwój technologiczny i cywilizacyjny, zwiększające się wymogi dotyczące ochrony środowiska, rosnąca świadomość zdrowotna i ekologiczna społeczeństw, nowe zagrożenia (w tym terrorystyczne) oraz konieczność stawiania szybkiej, precyzyjnej i trafnej diagnozy, przyczyniły się do intensyfikacji prac badawczych i konstruktorskich nad biosensorami.

Urządzenia te łączą ze sobą czułość i selektywność klasycznych metod analizy z bogatym spektrum rozwiązań konstrukcyjnych dostosowanych do określonego przeznaczenia. Według definicji przyjętej przez IUPAC (*International Union of Pure*

---

<sup>1</sup> dr, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, email: awitkowska@ath.bielsko.pl

<sup>2</sup> prof. dr hab. inż, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, email: vmartsenyuk@ath.bielsko.pl

*Applied Chemistry*), biosensor to samowystarczalne, zintegrowane urządzenie, dostarczające specyficznych ilościowych lub półilościowych informacji analitycznych przy użyciu składników umieszczonych w bezpośrednim kontakcie z elementem przetwarzającym [1]. Biosensory powszechnie stosowane są w wielu dziedzinach, takich jak medycyna, weterynaria, farmacja, przemysł spożywczy, ochrona środowiska, w przemyśle obronnym czy biotechnologia. W medycynie biosensory wykorzystywane są do monitorowania poziomu glukozy we krwi [2], nowotworów płuc, zapalenia wątroby [3], czy też wirusa HIV [4]. Prowadzone są również prace nad zastosowaniami biosensorów do śledzenia procesu gojenia się ran [5]. W przemyśle spożywczym biosensory stosowane są do wykrywania obecności komponentów alergicznych, detekcji patogenów w produktach spożywczych, wykrywania pestycydów lub detekcji bakterii [6]. W ochronie środowiska biosensory stosowane są do oceny czystości wody [7], detekcji toksycznych gazów czy też wykrywania jonów metali ciężkich:  $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  [8]. W przemyśle obronnym biosensory wykorzystywane są do wykrywania zagrożeń spowodowanych bronią biologiczną [9] lub do detekcji środków bojowych. Obecne trendy naukowe dotyczące biosensorów można podzielić następująco:

- rozwój biosensorów, które mogłyby jednocześnie wykonywać detekcję kilku analitów,
- miniaturyzacja już istniejących czujników,
- zastosowanie w biosensorach nowatorskich materiałów (np. grafenu),
- poprawa biodetekcji poprzez użycie osiągnięć nanotechnologii,
- tworzenie nowych analiz teoretycznych, które pomagają śledzić obecny stan wiedzy prezentując problem biosensorów z nowej perspektywy,
- udoskonalanie już istniejących czujników poprzez poprawę ich czułości, selektywności, powtarzalności oraz niezawodności pomiarów.

Wśród nich można wyróżnić również badania nad poprawą stabilności parametrów biosensorów, w tym także nad poprawą stabilności matryc biosensorowych, które decydują o czasie użyteczności całego urządzenia.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano albuminę surowicy wołowej (Bovine Serum Albumin–BSA), która powszechnie wykorzystywana jest w procesie sieciowania w warstwie receptorowej biosensora i stanowi komponent tej warstwy. Badano wpływ czynników zewnętrznych na stabilność tej substancji.

Celem przeprowadzonych badań było ocenienie w jaki sposób jednoczesna aplikacja czynników wpływa na stabilność badanego komponenta warstw receptorowych biosensorów.

Praca stanowi kontynuację wcześniej prowadzonych eksperymentów i analiz, gdzie badano wpływ poszczególnych czynników aplikowanych na komponent warstwy receptorowej pojedynczo [10,11,12].

## 2. Materiały i metody

Do badań wykorzystano wodne roztwory albuminy wołowej (Bovine Serum Albumin) o stężeniu 2mg/ml.

Skrystalizowany i liofilizowany proszek czystości 99%, lot: SLBK3063V wyprodukowany przez firmę Sigma Aldrich rozpuszczono w wodzie

demineralizowanej. Użyto również metabolitu mózgowego NAA (N-Acetyl-L- aspartic acid ) o stężeniu 3mg/ml

Badania widm absorpcji zostały przeprowadzone za pomocą dwuwiązkowego spektrofotometru UV/Vis (Halo DB-20 R) firmy Dynamica. Przygotowane roztwory umieszczano w kuwetach kwarcowych o wymiarach 10x10x45mm. Długość drogi optycznej wynosiła 10mm. Błąd pojedynczego pomiaru wynosił  $\pm 0,002$ . Eksperyment wykonano w trzech seriach pomiarowych. Analizy statystycznej dokonano przy użyciu programu Excel 2010. Widma nagrywano w zakresie 220-350nm.

Badano wpływ czynników zewnętrznych takich jak: NAA, promieniowanie UV, promieniowanie mikrofalowe, temperatura 4°C oraz -18°C aplikowanych na komponent warstwy receptorowej razem.

Badaniu poddano 14 próbek. Próbkę bazową stanowiącą komponent warstwy receptorowej oznaczono numerem 1. Kolejno aplikowano dwa różne czynniki razem dla próbek oznaczonych numerami 2, 3, 4, 5; a następnie dokonano aplikacji trzech różnych czynników dla próbek: 6, 7, 8, 9, a także czterech różnych czynników dla próbek: 10, 11, 12, 13. Aplikację wszystkich 5 czynników wykonano dla próbki 14. Rodzaj poszczególnych czynników oraz ich aplikację szczegółowo prezentuje tabela 1.

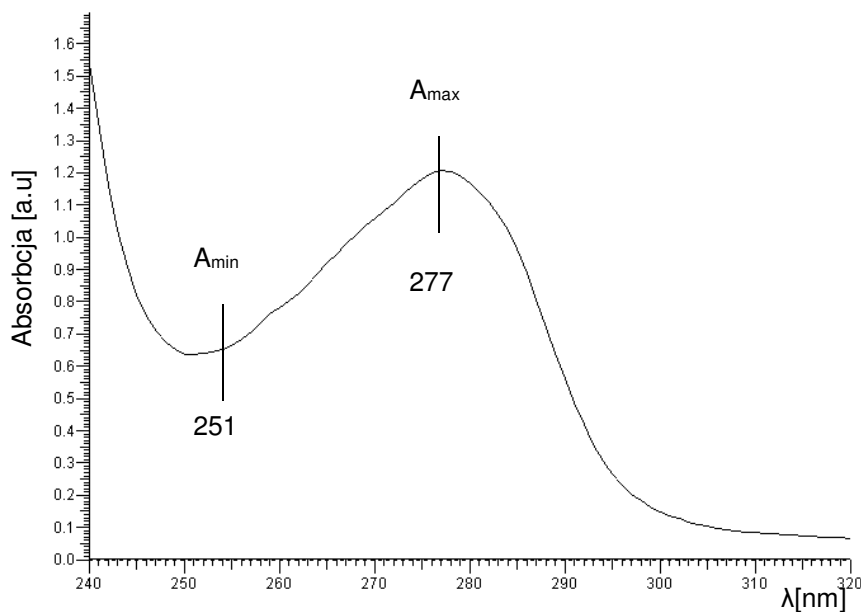
Tabela 1. Aplikowane czynniki zewnętrzne

Czynniki zewnętrzne					
	NAA	UV	mikrofałe	4°C	-18°C
<b>1 czynnik</b>					
próbka bazowa 1					
<b>2 czynniki</b>					
próbka 2	+			+	
próbka 3	+				+
próbka 4	+	+	+		
próbka 5	+		+		
<b>3 czynniki</b>					
próbka 6			+	+	+
próbka 7	+		+	+	
próbka 8	+		+		+
próbka 9	+	+	+		
<b>4 czynniki</b>					
próbka 10	+		+	+	+
próbka 11	+	+		+	+
próbka 12		+	+	+	+
próbka 13	+	+	+		+
<b>5 czynników</b>					
próbka 14	+	+	+	+	+

Badano stabilność komponenta warstwy receptorowej po aplikacji kilku czynników. Na podstawie widm absorpcyjnych UV-Vis śledzono zmiany w próbkach postępujące wraz z upływem czasu oraz pod wpływem czynników. Eksperyment wykonano w czasie 15 dni, a widma zostały zbierane kolejno w 1, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15 dniu.

### 3. Rezultaty i dyskusja

Rysunek 1 przedstawia widmo absorpcyjne komponenta warstw receptorowych biosensorów jakim jest albumina surowicy wołowej (BSA). Przykładowe widmo zostało zebrane dla próbki bazowej w 6-stym dniu. Zauważalny jest obły pik absorpcyjny (277nm) pochodzący od występowania w proteinie aminokwasów aromatycznych takich jak: tyrozyna (Tyr), fenyloalanina (Phe) oraz tryptofan (Thr). Wraz upływem czasu zaobserwowano wzrost absorpcji w pikie co może świadczyć o zmianach konformacyjnych zachodzących w próbkach wraz z upływem czasu. Odzwierciedlają one zmiany w strukturze drugorzędowej oraz interakcję ze środowiskiem rozpuszczalnika [13].



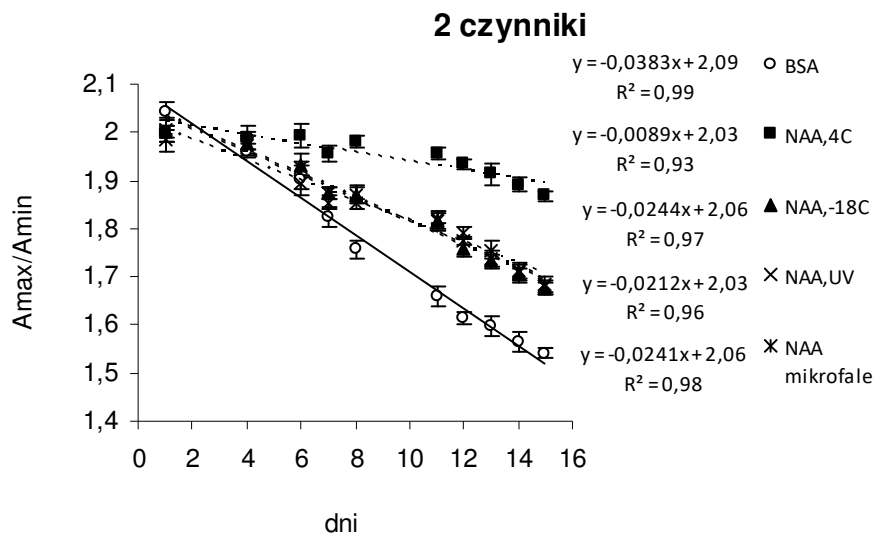
Rysunek 1. Widma UV/Vis 6 – dniowego roztworu BSA (bez aplikacji czynników zewnętrznych)

Na rysunku widoczne są również zaznaczone wielkości  $A_{\min}$  dla (251nm) oraz  $A_{\max}$  dla (277nm). Wielkości te posłużyły do szczegółowej analizy stabilności badanego komponentu warstwy receptorowej.

W tym celu wykorzystano model analizy zmian konformacyjnych białek zaproponowany przez A. Michnik [12].

Zgodnie z założeniami modelu obliczono parametr ( $A_{max}/A_{min}$ ). Badany zakres widma dla zmian jest również zgodny z modelem Artyukhowa [13], w którym parametr ( $A_{max}/A_{min}$ ) jest wyznacznikiem zmian zachodzących w albuminie surowicy wołowej (BSA). Malejący trend współczynnika związany jest z destrukcyjnymi procesami zachodzącymi w aminokwasach aromatycznych proteiny a tym samym spadkiem stabilności komponenta warstw receptorowych biosensora.

Wyniki analizy przeprowadzonej na podstawie wcześniej opisanych modeli widoczne są kolejno na rysunkach 2 (Rys.2) , rysunku 3 (Rys.3), rysunku 4 (Rys.4) oraz rysunku 5 (Rys.5).



Rysunek 2. Zmiana parametru  $A_{max}/A_{min}$  wraz z czasem dla dwóch czynników aplikowanych na komponent warstwy receptorowej jednocześnie

Rysunek 2 przedstawia zmianę parametru ( $A_{max}/A_{min}$ ) w kolejnych dniach trwania eksperymentu, otrzymaną po aplikacji na komponent warstwy receptorowej biosensora dwóch czynników: NAA, 4°C; NAA, -18°C; NAA, UV; NAA, promieniowania mikrofalowego oraz dla porównania czystą BSA jako próbkę bazową.

Wcześniejsze badania [10,11] wykazały, że aplikowanie pojedyncze czynników: NAA, 4°C wpływa na poprawę stabilności badanego komponenta warstwy receptorowej, podczas gdy promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie UV oraz temperatura obniżona do -18°C zmniejsza stabilność, przyspieszając procesy denaturacyjne.

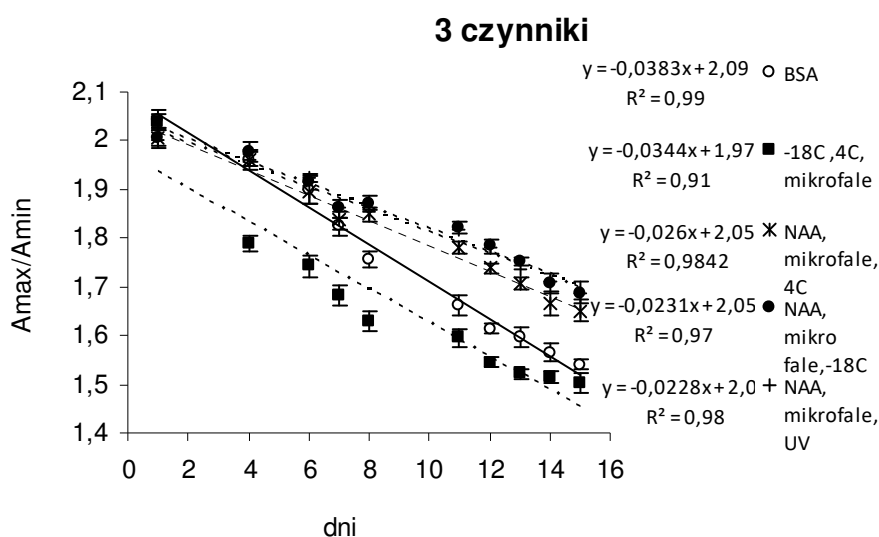
Na rysunku 2 można dostrzec, że wraz z upływem czasu następuje spadek wartości parametru ( $A_{max}/A_{min}$ ) co może świadczyć o denaturacji badanej proteiny wraz z czasem.

Widać również, że zmiany w próbce kontrolnej zachodzą szybciej niż w pozostałych próbkach o czym można wnioskować biorąc pod uwagę parametr „a”, liniowej funkcji trendu ( $y = ax + b$ , gdzie „a” świadczy o dynamice zmian). Dla czystej BSA wynosi on

(-0,0383) podczas gdy dla pozostałych czynników aplikacyjnych wynosi odpowiednio: dla NAA, 4°C (-0,0089), dla NAA, UV (-0,0212), dla NAA, promieniowanie mikrofalowe (-0,0241).

Można zatem domniemywać, że czynnik NAA jest czynnikiem dominującym i dodanie go do próbki BSA poprawia jej stabilność.

Rysunek 3 obrazuje zmianę parametru  $A_{max}/A_{min}$  wraz z czasem dla trzech czynników aplikowanych na komponent warstwy receptorowej jednocześnie. Oprócz czystej próbki bazowej (BSA) przedstawiono wpływ 3 czynników aplikowanych na komponent warstwy receptorowej, kolejno: -18°C, 4°C, promieniowania mikrofalowego; NAA, promieniowania mikrofalowego, 4°C; NAA promieniowania mikrofalowego, -18°C; NAA, promieniowania mikrofalowego, promieniowania UV.



Rysunek 3. Zmiana parametru  $A_{max}/A_{min}$  wraz z czasem dla trzech czynników aplikowanych na komponent warstwy receptorowej jednocześnie

Widać, że wraz z czasem wartość parametru spada, co podobnie jak wcześniej odzwierciedla zmiany strukturalne w badanym komponencie warstwy receptorowej polegające na wzroście konformacji helisy i spadku struktury  $\beta$ , która prowadzi do utraty szkieletu proteiny [12]. Przyglądając się dopasowanym trendom liniowym można dostrzec, że linia trendu dla próbki poddanej czynnikom (-18°C, 4°C oraz promieniowaniu mikrofalowemu) leży niżej niż linia bazowa czystej BSA.

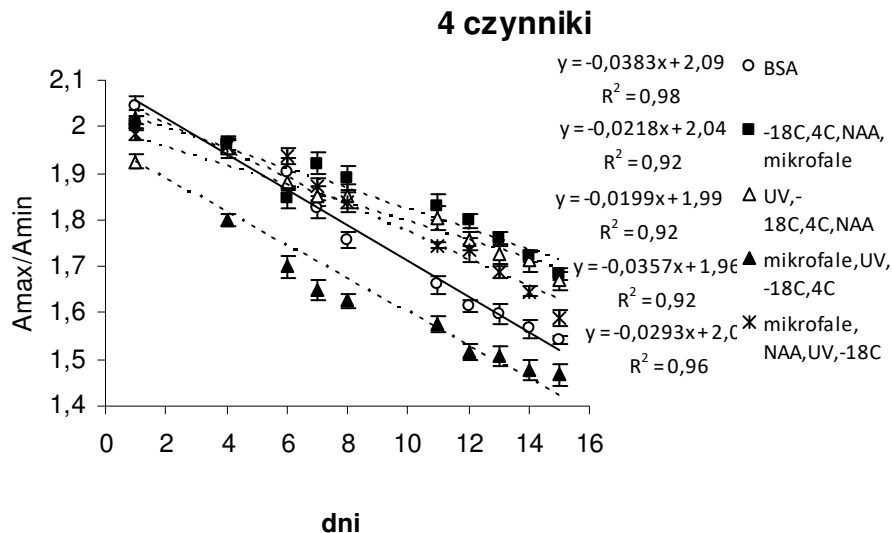
Świadczy to, że denaturacja pod wpływem (-18°C, 4°C oraz promieniowaniu mikrofalowemu) zachodzi szybciej niż dla próbki bazowej.

Natomiast wszystkie pozostałe próbki (NAA, promieniowanie mikrofalowe, 4°C; NAA, promieniowanie mikrofalowe, -18°C; NAA, promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie UV), w których występuje poprawiający stabilność czynnik NAA starzeją się wolniej niż próbka kontrolna.

Analiza wykonana poprzez parametr „a” liniowej funkcji trendu, potwierdza ten efekt. I tak odpowiednio parametr „a” dla próbki bazowej (BSA) wynosi (-0,0383), dla próbki: -18°C, 4°C, promieniowanie mikrofalowe (-0,0344), podczas gdy dla NAA,

promieniowanie mikrofalowe, 4°C (-0,026), dla: NAA, promieniowanie mikrofalowe, -18°C (-0,0231), NAA, promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie UV (-0,0228).

Na rysunku 4 (Rys.4) widoczny jest wynik analizy wykonanej na podstawie modeli zaproponowanych w pracach [12,13] dla komponenta warstw receptorowych biosensorów pod wpływem czterech zaaplikowanych czynników.



Rysunek 4. Zmiana parametru  $A_{max}/A_{min}$  wraz z czasem dla czterech czynników aplikowanych na komponent warstwy receptorowej jednocześnie

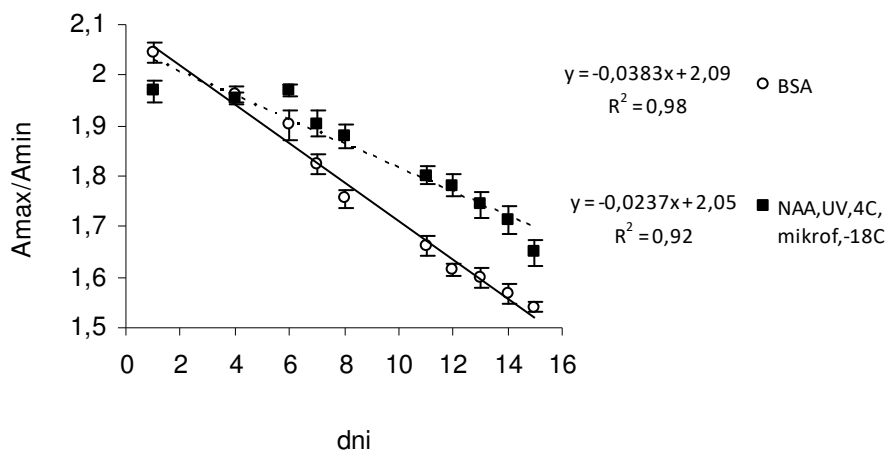
Oprócz próbki kontrolnej (bez czynnika) widoczne są zmiany parametru  $A_{max}/A_{min}$  kolejno dla: -18°C, 4°C, NAA, promieniowania mikrofalowego; promieniowania UV, -18°C, 4°C, NAA; promieniowania mikrofalowego, promieniowania UV, -18°C, 4°C oraz promieniowania mikrofaloweo, NAA, promieniowania UV, -18°C. Zaobserwowany malejący trend wraz z upływem czasu świadczy o zmianach denaturyzacyjnych, którymi mogą być: denaturyzacja, agregacja oraz zmiany w lokalnym środowisku proteiny na skutek zmniejszonego wraz a czasem działania sił van der Waalsa [15].

Analiza wykonana na podstawie parametru „a” lini trendu , podobnie jak dla 2 czynników oraz 3 czynników, potwierdza ten efekt.

I tak wartość parametru „a” wynosi kolejno: dla: -18°C, 4°C, NAA, promieniowania mikrofalowego (-0,0218); promieniowania UV, -18°C, 4°C, NAA (-0,0199); promieniowania mikrofalowego, promieniowania UV, -18°C, 4°C (-0,0357) oraz promieniowania mikrofaloweo, NAA, promieniowania UV, -18°C (-0,0293).Warto zwrócić uwagę, że dla próbki bez czynnika wartość parametru „a”to (-0,0383).

Przyglądając się położeniom lini trendu dla próbek na którym zaaplikowano cztery czynniki i porównując je z próbką kontrolną, można spostrzec ,że próbki w których występowała substancja NAA leżą powyżej próbki kontrolnej, podczas gdy próbki bez NAA poniżej próbki kontrolnej.

### 5 czynników



Rysunek 5. Zmiana parametru  $A_{max}/A_{min}$  wraz z czasem dla pięciu czynników aplikowanych na komponent warstwy receptorowej jednocześnie

Można zatem wnioskować, że dla próbek z NAA: (-18°C, 4°C, NAA, promieniowanie mikrofalowe: promieniowania UV, -18°C, 4°C, NAA ; promieniowania mikrofalowe, NAA, promieniowania UV, -18°C) zmiany konformacyjne zachodzą wolniej niż w próbce kontrolnej, natomiast dla próbki bez NAA (promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie UV, -18°C, 4°C) zachodzą szybciej.

Rysunek 5 obrazuje wpływ wszystkich rozważanych pięciu czynników na komponent sieciujący warstwy receptorowej biosensorów. Podobnie jak wcześniej zauważalny jest spadek wartości parametru  $A_{max}/A_{min}$  wraz z czasem. Spadek ten jest łagodniejszy dla próbki z aplikowanymi czynnikami niż dla próbki kontrolnej, co można również dostrzec biorąc pod uwagę parametr „a”, który dla próbki kontrolnej wynosi -0,0383 podczas gdy dla próbki z zaaplikowanymi czynnikami to -0,0237.

Świadczyć to może o większej stabilności próbki po zaaplikowaniu czynników zewnętrznych niż próbki kontrolnej.

Przypuszcza się, że efekt ten jest spowodowany zastosowaniem czynnika NAA, który podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań (z dwoma czynnikami, z trzema czynnikami, czterema czynnikami) wpływa w sposób stabilizujący na komponent warstw receptorowych biosensorów oraz spowalnia zmiany denaturacyjne postępujące wraz z czasem.

#### 4. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały wpływ czynników zewnętrznych aplikowanych razem na komponent warstwy receptorowej. Wykonane analizy na podstawie modeli [12,13] wykazały wpływ czynników zewnętrznych na badaną proteinę. W zależności



od zaaplikowanych czynników, zaobserwowano destabilizację proteiny lub poprawę stabilności.

Wykonane badania dwóch zaaplikowanych czynników wykazały, że zmiany w próbce kontrolnej (bez czynnika) zachodzą szybciej niż w pozostałych próbkach (NAA, 4°C; NAA, -18°C: NAA promieniowanie UV, NAA promieniowanie mikrofalowe).

Badania trzech zaaplikowanych czynników wykazały, że denaturacja pod wpływem (-18°C, 4°C oraz promieniowaniu mikrofalowemu) zachodzi szybciej niż dla próbki bazowej.

Natomiast wszystkie pozostałe próbki, w których występował czynnik NAA starzeją się wolniej niż próbka kontrolna.

(NAA, promieniowanie mikrofalowe, 4°C; NAA, promieniowanie mikrofalowe, -18°C; NAA, promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie UV),

Badania czterech zaaplikowanych czynników wykazały, że większą stabilność wraz z czasem wykazują próbki: (-18 °C, 4°C, NAA, promieniowanie mikrofalowe; promieniowanie UV, -18°C, 4°C, NAA; promieniowanie mikrofalowe, NAA, promieniowanie UV, -18°C) niż próbka (promieniowanie mikrofalowe, promieniowanie UV, -18°C, 4°C). Można, zatem wnioskować, że dodanie czynnika NAA poprawia stabilność komponenta warstw receptorowych biosensora.

Badania wpływu na proteinę pięciu czynników (NAA, promieniowania UV, promieniowania mikrofalowego, 4°C, -18°C) wykazały większą stabilność dla próbek poddanych działaniu czynnika niż próbek kontrolnych.

Warto również zwrócić uwagę, że wśród czynników znajdował się również metabolit NAA.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały wpływ czynników zewnętrznych na komponent warstwy receptorowej oraz poprawę stabilności komponenta sieciującego warstwy receptorowej pod wpływem metabolitu mózgowego NAA.

## LITERATURA

1. THEVENOT D., THOD K., DURST R., WILSON G.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, Technical Report, *Biosensors and Bioelectronics*, **16**(2001), 121-131.
2. PICKUP J., HUSSAIN F, EVANS N., ROLINSKI O., BIRCH D.: Fluorescence-based glucose biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**(2005)12, 2555-2565.
3. MERIC B., KERMEN K, OZGAN d., KARA P., ERENDOY S., ACARCA U., MASCINI M., OZSOZ., Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, **56**(2002)1, 837-846.
4. TOMBELLIS., MINUNNI M., LUZI E., MASCINI M.: Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein, *Bioelectrochemistry*, **67**(2005), 135- 141.
5. DARGAVILLE T., FERRUGIA B., BROADBENTJ., PACE S., UPTON Z., VOELCKER N.: Sensors and imaging for wound healing: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, **41**(2013), 30-42.

6. LEONARD P., HEARTY S., BRENNANJ., DUNNE L., QUINN J., CHAKRABORTY T., O'KENNEDY R.: Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme and Microbial Technology*, **32**(2003), 3-13.
7. KOŁWZAN B.: Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody, *Ochrona Środowiska*, **31**(2009), 3-14.
8. BONTIDEAN J., AHLQVISIT J., MULCHANDANI A., CHEN W., BAE W., MEHRA R., MONTARI A., CSOREGI K.: Novel synthetic phytochelatin- based capacitive biosensor for heavy metal ion detection, *Biosensors and Bioelectronics*, **18**(2003), 547-553.
9. BARTOSZCZE M.: Methods of biological weapon threats detection, *Przegląd Epidemiologiczny* **57**(2003), 369-376.
10. KŁOS-WITKOWSKA A., AKHMETOV B., ZHUMANGALIEVA N., KARPINSYI V., GANCARCZYK T.: Bovine Serum Albumin stability in the context of biosensors ICCAS 2016 : 16th International Conference on Control, Automation and Systems (2016), 976-980
11. KŁOS-WITKOWSKA A., MARTSENYUK V., RAJBA S., SZKLARCZYK R., WIĘCŁAW Ł.: Study of biosensor receptor layer component stability under the influence of variable environment acidity. 18 th International Multidisciplinary Scientific Geo Conference SGEM, (2018), 637-644
12. MICHNIK A., MICHALIK K., DRZAZGA Z.: Stability of Bovine Serum Albumin at different pH, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **80**(2005), 399-4066.
13. ARTYUKHOV V., PANTYAVIN G., VASHANOV J.: Vacuum UV radiation induced structural functional changes in Serum albumin molecules, *Appl. Spectrosc* **68**(2001)291-298.
14. SERVAGENT-NOINVILLE S., REVAULT M., QUIQUAMPOIX H., BARON M.: Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Induced by Adsorption on Different Clay Surfaces: FTIR Analysis, *J Colloid Interface Sci* **221**(2000), 273-283.
15. SOCHACKA J., PACHOLCZYK M., WÓJCIK P.: Sposoby graficznej prezentacji wyników dokowania molekularnego uzyskanych za pomocą dedykowanych programów komputerowych. *Trendy i rozwiązania technologiczne- odpowiedź na potrzeby współczesnego społeczeństwa. Tom 1* red M. Maciąg, M. Maciąg, 2017. 81-101.