



Ústav chemie přírodních látek  
VŠCHT PRAHA

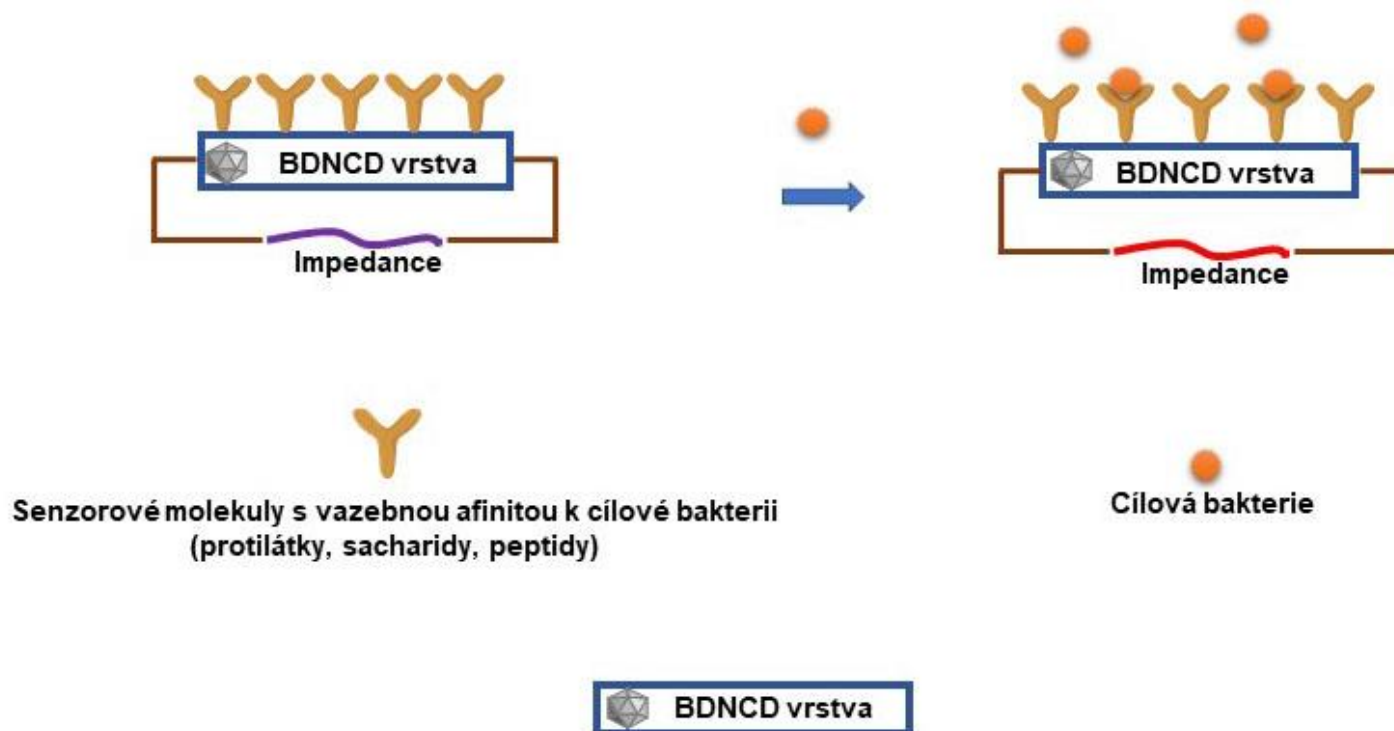
# NOVÉ VODIVOSTNÍ BIOSENZORY PRO SELEKTIVNÍ DETEKCI ESCHERICHIA COLI V PITNÉ VODĚ

Vodárenská Biologie 2020

Roman Effenberg, Miroslav Ledvina,

Jana Zuzáková

## Princip vodivostního biosenzoru na platformě borem dopované nanokrystalické diamantové (BDNCD) vrstvy jako transduktoru



Polovodivá BDNCD (borem dopovaná nanokrystalická diamantová) vrstva je transduktor který převádí vazebnou událost mezi na něj ukotvenou senzoremolekulou a cílovou bakterií ve změnu impedance.

## **Materiály pro výrobu senzorů:**

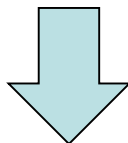
**Zlato** – denaturace navázaných proteinů, nestálá thioetherové vazba

**Křemík** - denaturace navázaných proteinů, nestálá silietherová vazba

**Nanodiamant** – inertní ve vztahu k navázaným biomolekulám, které lze navázat stabilní kovalentní C-C vazbou, po zavedení boru vodivý

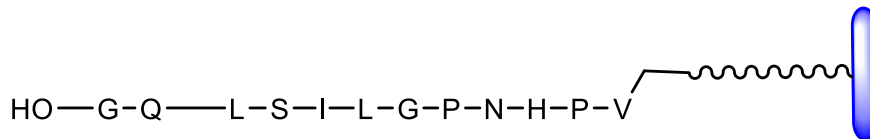
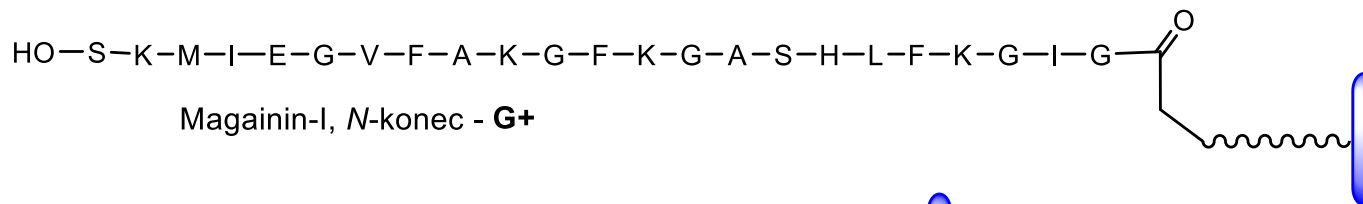
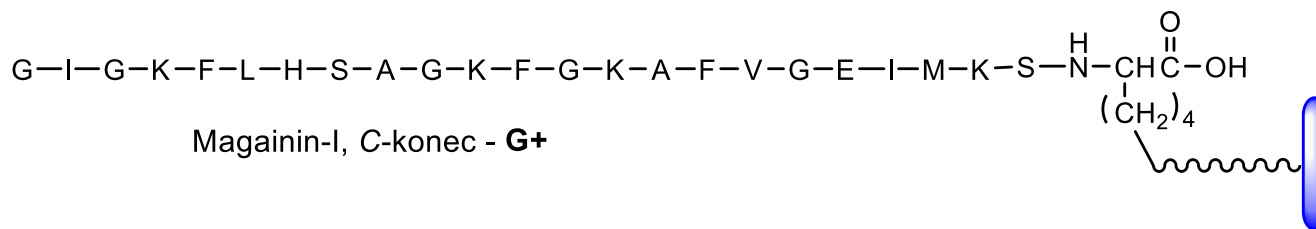
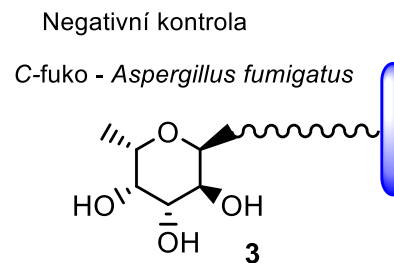
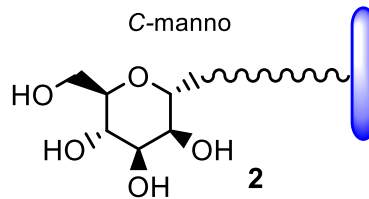
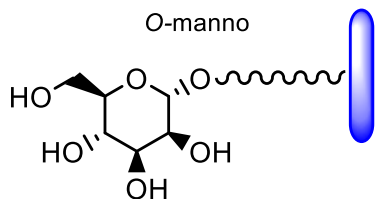
## ***Escherichia coli:***

- **Indikátor fekálního znečištění pitné vody**
- **Časově náročné kultivační analytické stanovení (2 - 3 dny)**
- **Nehody: Dejvice (2014, 2015), Nový Bor (2015), Trnová (2014)...**



- **Řešení pomocí biosenzorů, kde dojde k okamžité fyzikálně měřitelné odezvě po interakci s analytem**

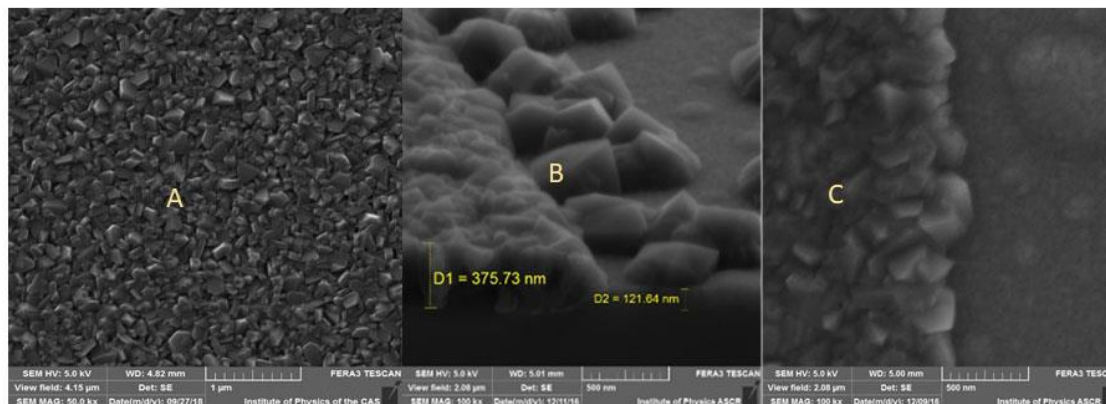
## Vybrané senzorné molekuly



SA5-1 - **G-**, *S.Aureus*

## Příprava BDNCD vrstev

- BDNCD vrstvy byly připravovány pomocí lineárního mikrovlnného plazmového systému pro chemickou depozici z plynné fáze tzv. CVD (chemical vapor deposition) technologií zavedenou na FZÚ AV ČR, v.v.i.
- Zdrojem prvků byly plyny v plazmatickém stavu  $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $B_2H_6$  nebo  $B(CH_3)_3$  a  $CO_2$
- Vysoká elektrická vodivost cca. 35 S/cm, 2000 ppm B
- Na obrázku snímek SEM: A (pohled na vrstvu z vrchu), B (pohled na okraj vrstvy) a C (řez vrstvy) je patrná vysoká homogenita vrstvy tvořená fasetovými diamantovými krystaly



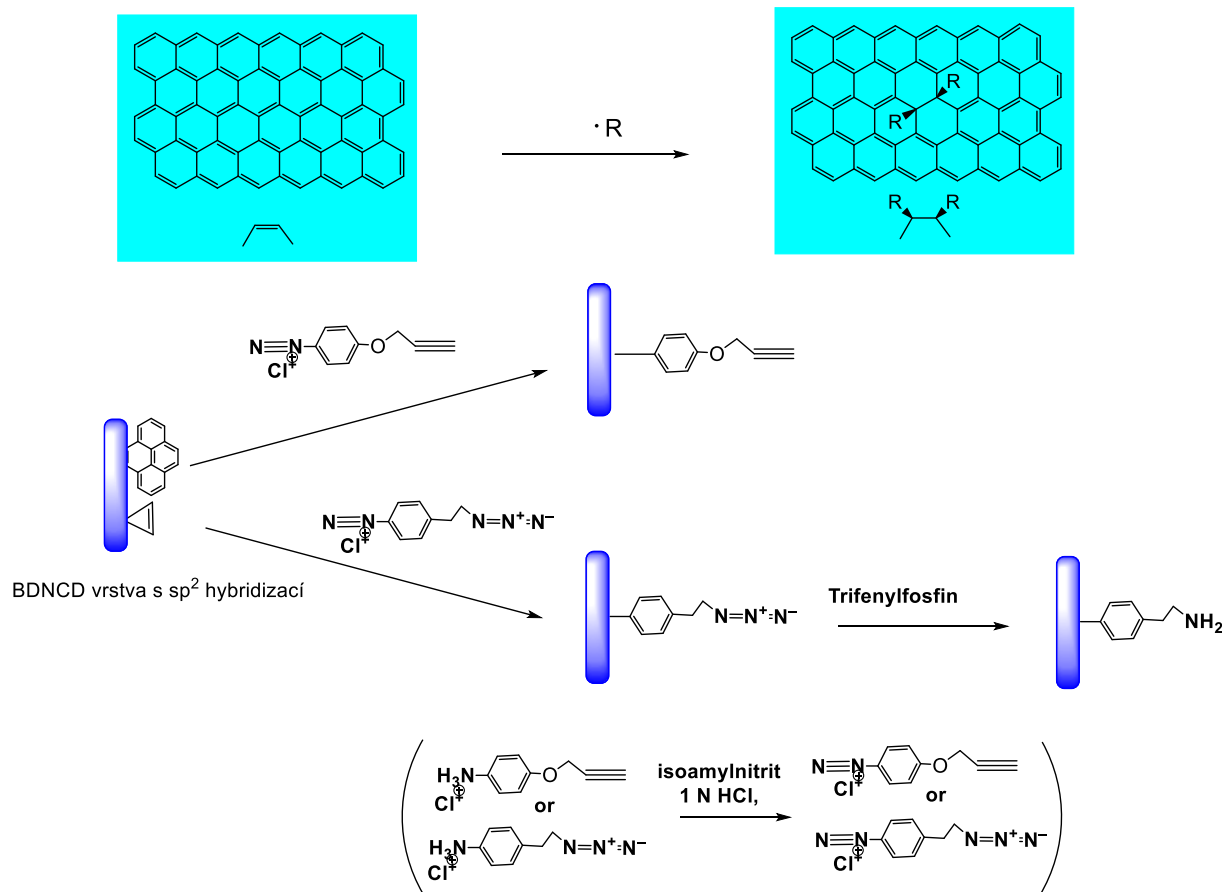
SEM vrchní pohledu a průřezu BDNCD vrstvy připravené systémem MW-LA-PECVD

- Následné povrchové úpravy a) kontrolované žhání - povrch s  $sp^2$  hybridizací  
b) redukce vodíkovou plazmou – H-terminovaný povrch

# Výsledky a diskuze

## Primární funkcionalizace BDNCD vrstev s $sp^2$ hybridizací

Zavedení funkčních skupin pro 1,3 cykloadiční reakce trojné vazby s azidoskupinou („klik chemie“)

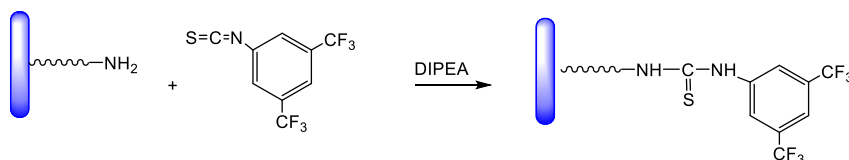


Pokrytí 1,3 nmol/cm<sup>2</sup>

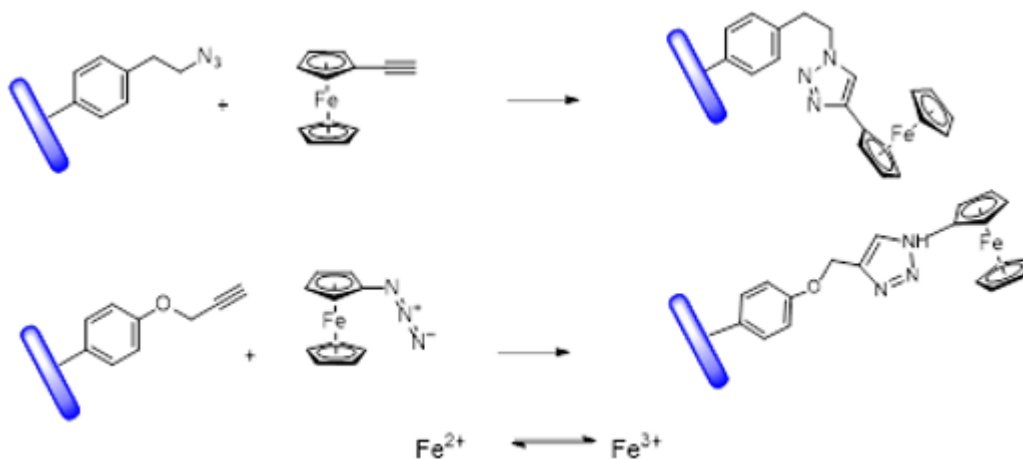
## Analýza provedených funkcionalizací BDNCD vrstev

**Analýza povrchu pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS), případně zavedením dalších specifických prvků:**

**F** – ve formě 3,5-bis(trifluoromethyl)fenylisothiokyanátu, pro stanovení volných aminoskupin



**Stanovení hustoty pokrytí BDNCD vrstev zavedením Fe – ve formě ferocenu, elektrochemické stanovení**

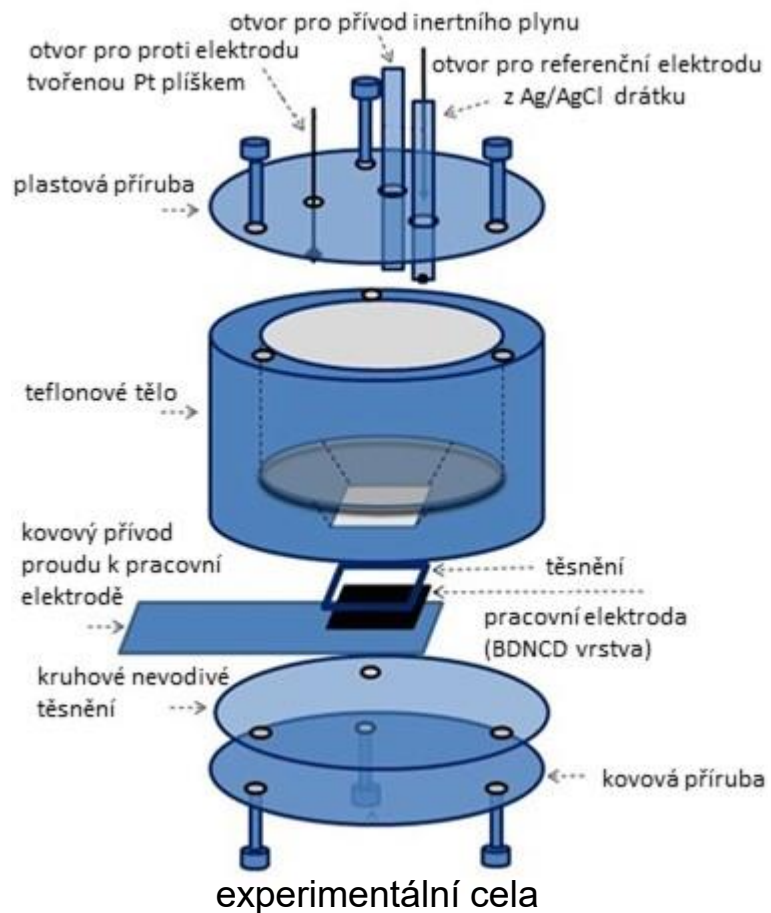


# Výsledky a diskuze

## Experimentální elektrochemická cela pro stanovení bakterií

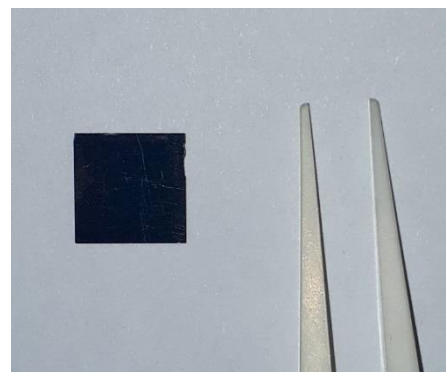
### Elektrochemická cela pro stanovení bakteriální kontaminace pitné vody

- Chráněná forma užitého vzoru pod názvem „Elektrochemická cela pro stanovení bakteriální kontaminace pitné vody“ č. dokumentu 33 021



Měření bakterií *E. Coli* CCM 3954 v roztoku 0,01 M PBS

Oplach 70 % EtOH



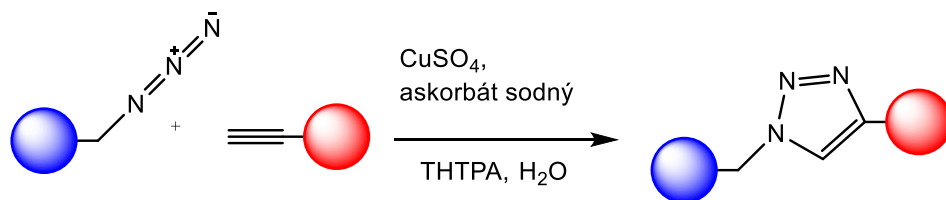
BDNCD biosenzor

Již máme zkonstruovaný prototyp integrované elektrochemické mikrocely

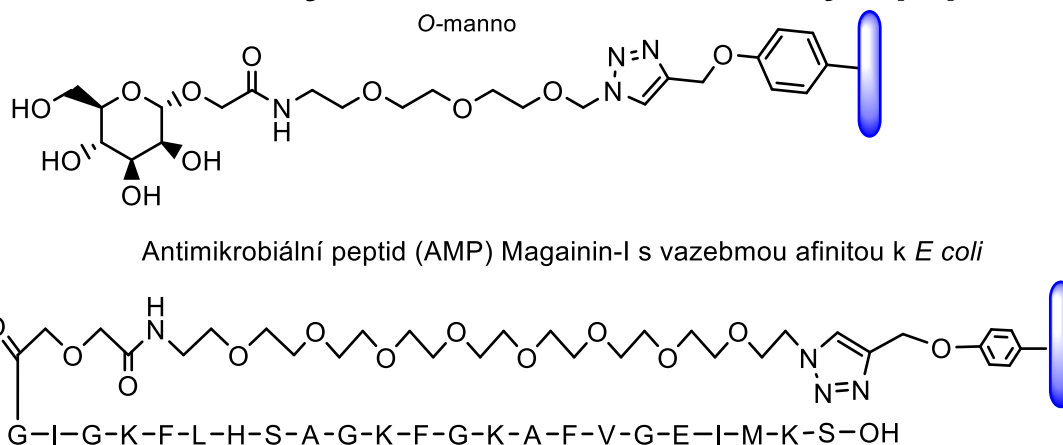


## Navázání senzorových molekul na BDNCD vrstvy s $sp^2$ hybridizací klik chemií

Mědí promotovaná 1,3 cykloadiční reakce azidu na trojnou vazbu



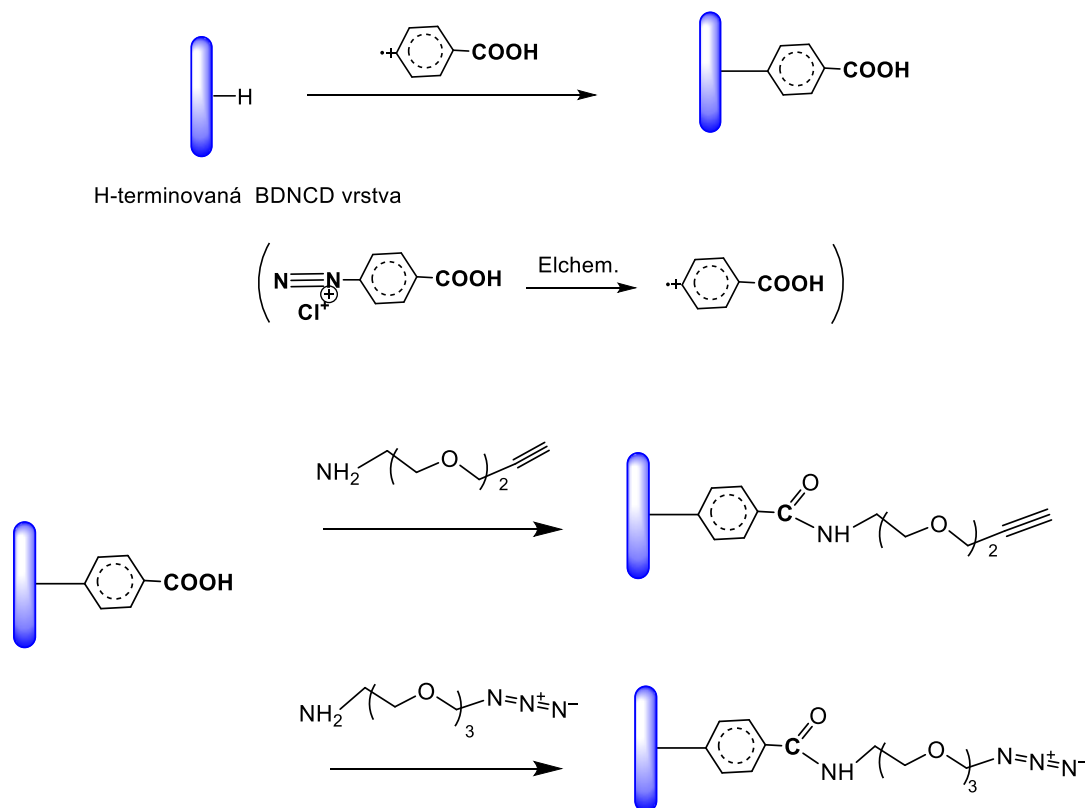
Navázané senzorové molekuly odvozené od O-mannosy a peptidu Magaininu-I



- nulová změna odezvy při měření impedance, pravděpodobně kvůli přítomnosti grafenových vrstev
- přechod k H-terminovaným BDNCD transduktorům

## Primární funkcionlizace H-terminovaných BDNCD vrstev

Zavedení karboxylové skupiny elektrochemickou radikálovou arylací s následným zavedením ethylenglykolových kotev vhodných pro klik reakce

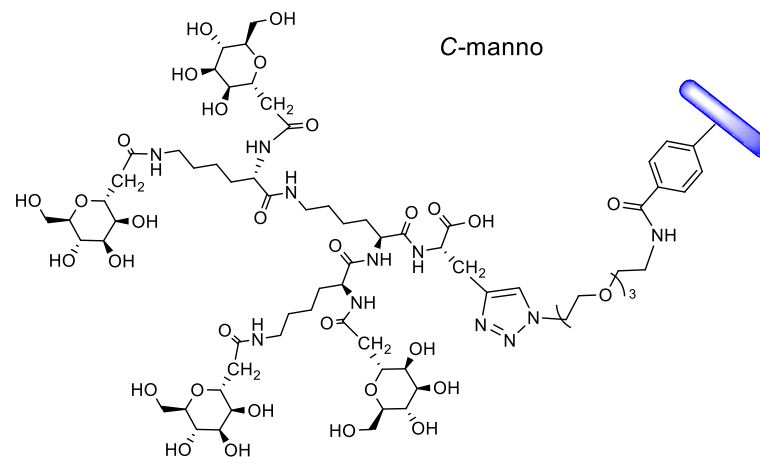
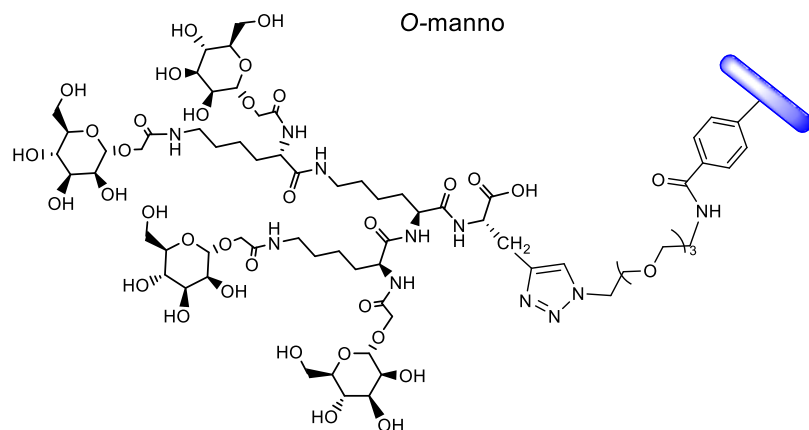
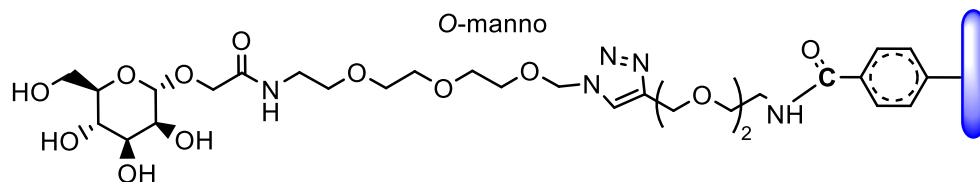


Pokrytí 0,3 nmol/cm<sup>2</sup>

## Navázané senzorní molekuly na H-terminálních BDNCD vrstvách

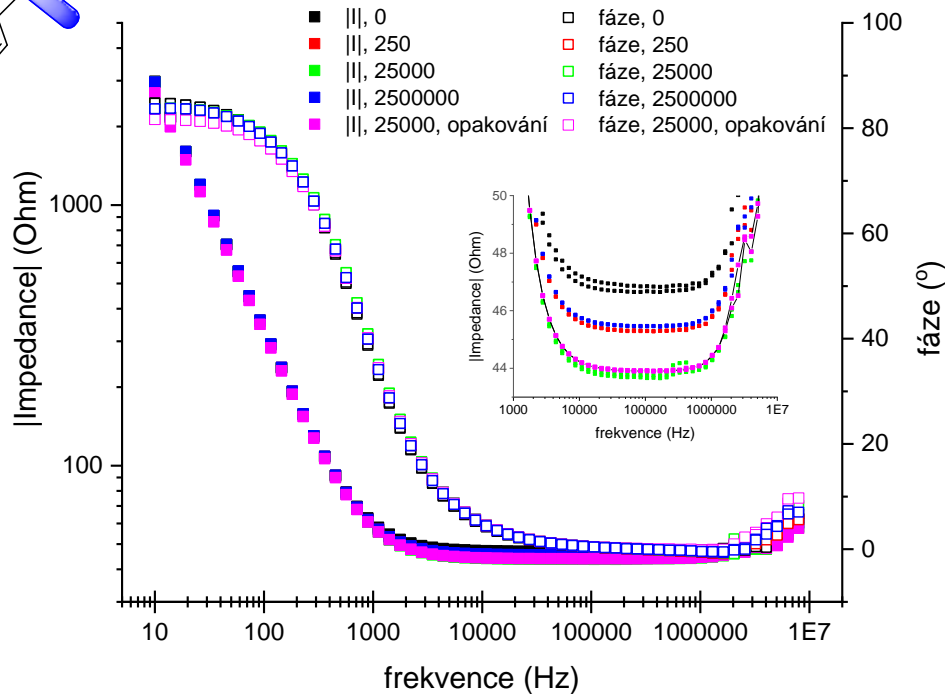
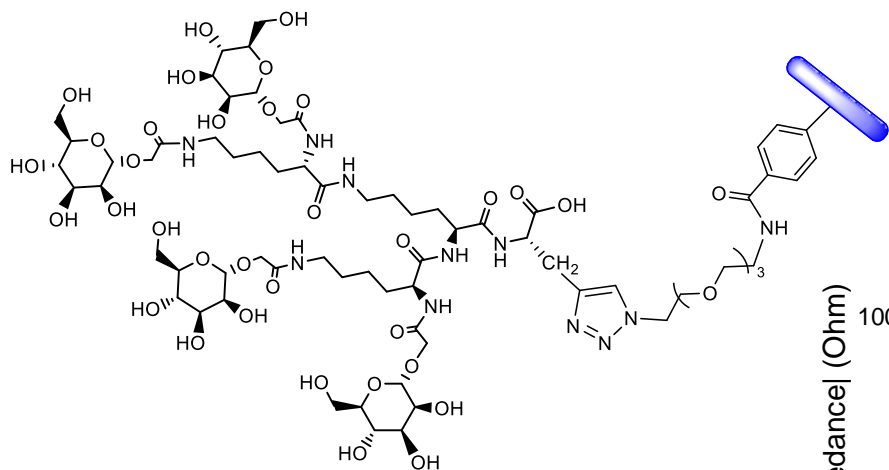
Navázané senzorní molekuly odvozených od O- a C-mannosy ve formě lysinových glykodendrimerů a monomer O-manosy

- u monomeru relativně nízká odezva + 1  $\Omega$  - přechod k glykodendrimerům



## 5. Impedimetrické stanovení bakterií v experimentální cele

Impedanční spektra naměřená s pracovní elektrodou modifikovanou glykodendrimerem s O-glykosidickou vazbou



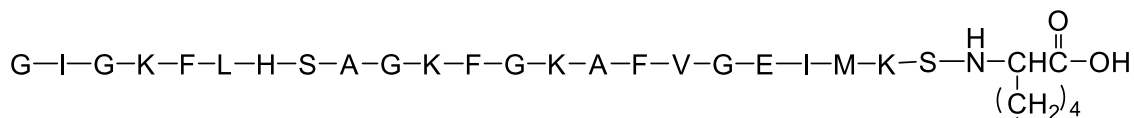
- opakovatelná měření,
- rozdíl mezi 0 a 250000 bakteriemi je cca +4  $\Omega$
- opakovatelná měření
- nutné porovnat stabilitu C- a O-glykosidů

# Výsledky a diskuze

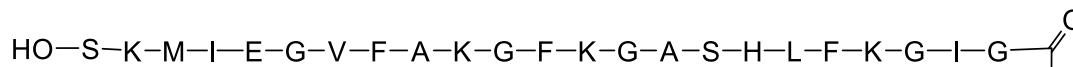
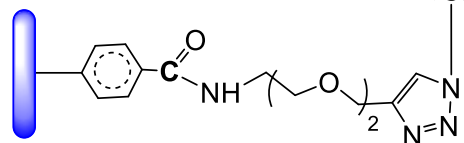


## Navázané senzorné molekuly na H-terminovných BDNCD vrstvách

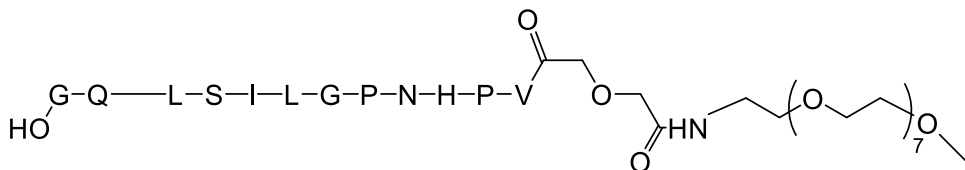
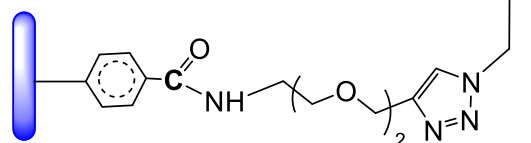
Peptidy s vazebnou afinitou k *E. coli*. Magainin – I (G-) a Sa5-1 (G+) peptid jako negativní kontrola s afinitou k *Staphylococcus aureus*



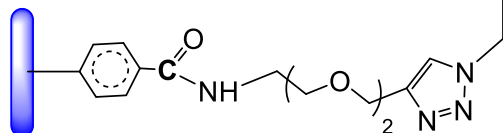
Magainin-I, C-konec - *E.coli*



Magainin-I, N-konec - *E.coli*



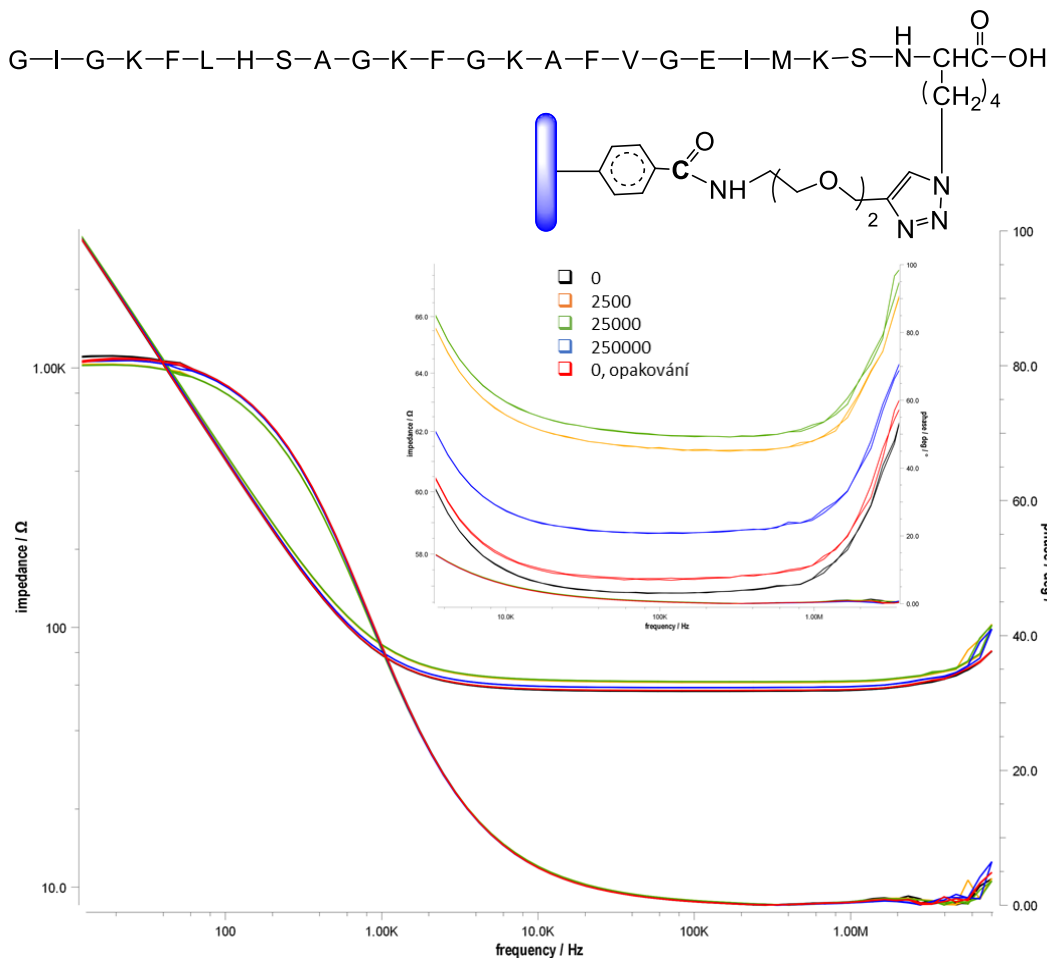
SA5-1 - *S.aureus*



## 5. Impedimetrické stanovení bakterií v experimentální cele

Impedanční spektra naměřená s pracovní elektrodou modifikovanou Magaininem-1 ukotveným za C-konec

- pozitivní výsledky při prvních měřeních
- rozdíl mezi 0 a 25000 bakteriemi je cca +5  $\Omega$
- druhý den bez odezvy
- změny na povrchu dle XPS



- Byly připraveny biosenzory na bázi modifikovaných BDNCD vrstev, s rozdílnými sensorovými molekulami
- Byla změřena odezva při interakci bakterií s připravenými biosenzory
- Perspektivními se ukázaly glykodendrimery odvozené od D-mannosy.
- Reprodukovatelnost v případě peptidů, jako sensorových molekul, byla nízká, selektivita je jen pro G-, nebo G+ bakterie
- Univerzální využití navržené platformy v závislosti na navázané sensorové molekule

## Další cíle

- Další výzkum bude zaměřen na ověření funkčnosti a studování stability biosenzorů prezentujících glykodendrimery s O i C-mannosovými glykosidy
- Bude přistoupeno k testování integrované cely



**Děkuji za pozornost a za spolupráci svým spolupracovníkům  
Práce byla podpořena MPO ČR, grantem číslo FV10312**