

zapewnienia warunków transportu z zachowaniem ich odpowiedniej funkcjonalności. Dużym wyzwaniem jest także możliwość jednoczesnego wykrywania wielu biomarkerów oraz kontrola, a wręcz eliminacja niepożądanego procesu nieswoistej adsorpcji analitu, jak również interferentów obecnych w próbkach biologicznych. Nie ma żadnych wątpliwości, że opracowanie i wdrożenie tego rodzaju systemów w diagnostyce POC przyspieszy podejmowanie decyzji klinicznych, a co za tym idzie zmniejszy stres pacjenta i koszty opieki zdrowotnej. Niewątpliwie, dzięki ciągłemu rozwojowi biologii molekularnej jak i nanotechnologii nanosensory immunochemiczne będą mogły z powodzeniem zastąpić procedury stosowane obecnie w rutynowych oznaczeniach biomarkerów.

Chociaż dogłębna analiza doniesień literaturowych pokazuje, że istnieje duża liczba immunosensorów skonstruowanych na bazie biomolekuł zdolnych do spełnienia wymaganej czułości i selektywności dla zastosowań praktycznych, większość z nich nadal pozostaje w fazie koncepcyjnej lub na prototypowych etapach rozwoju i tylko ich ograniczona liczba wykazała przydatność w analizie rzeczywistych próbek pobranych od pacjenta w sposób nieinwazyjny lub mało inwazyjny (głównie surowica, mocz i ślina). Warto jednak wspomnieć, że liczba rzeczywistych próbek pacjentów wykorzystywanych w tych metodach nigdy nie jest wystarczająca, aby zapewnić wiarygodną walidację immunosensora i że obecnie tylko bardzo ograniczona liczba biomarkerów znalazła zastosowanie kliniczne. Obowiązkowa walidacja tych urządzeń do oznaczania różnego typu biomarkerów przy użyciu dużej liczby próbek pacjentów musi być przeprowadzana nie tylko pod względem czułości, selektywności i dokładności, ale także szybkości, prostoty obsługi i kosztów w odniesieniu do innych dostępnych metod analitycznych stosowanych w diagnostyce medycznej. Niestety, pomimo ogromnych postępów poczynionych w ostatnich latach i bardzo obiecujących możliwości wykazanych w już przeprowadzonych oznaczeniach biomarkerów przy użyciu immunosensorów, ich komercjalizacja wciąż jest bardzo dużym wyzwaniem. Związane jest to przede wszystkim z trudnościami w osiągnięciu powtarzalnych wyników ilościowych, które zależą zarówno od wytworzenia identycznych partii czujników, jak i od kontroli zmiennych zewnętrznych, które mogą znacząco wpłynąć na ich wydajność.

5.4

Biosensory DNA i aptasensory

Marta JARCZEWSKA, Robert ZIÓŁKOWSKI

W wyniku rozpoczętego w 1990 roku projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu (*Human Genome Project*) okazało się, że geny stanowią jedynie około 5% całej sekwencji ludzkiego DNA. Pozostała część jest związana m.in. z regulacją szeregu procesów w organizmie. Dotyczy to inicjacji oraz regulacji procesu transkrypcji (wiązanie się z określonymi białkami czy komplementarnymi kopiami genów), przeprowadzania w sposób pośredni szeregu reakcji chemicznych poprzez stanowienie matrycy dla katalitycznych fragmentów DNA/RNA tzw. rybozymów, czy chociażby wpływanie na powstawanie mutacji punktowych i zmianę ilości DNA w komórce poprzez występowanie transpozonów i retrotranspozonów [71]. Jak się zatem okazuje, poza kodowaniem przez kwasy nukleinowe kopii podstaw życia, wykazują one wiele ciekawych właściwości, w tym funkcje katalityczne czy powinowactwa do odpowiednich ligandów w tym np. białek. Możliwe jest zatem uzyskanie przez warstwę receptorową biosensora (do tworzenia której wykorzystano fragmenty DNA lub RNA) funkcji odpowiadającej praktycznie każdej cząsteczce biologicznej jak enzym, przeciwciało, receptor itp. Ta różnorodność form oraz możliwości zastosowania kwasów nukleinowych w warstwach receptorowych pozwala wyróżnić dwa typy biosensorów stworzonych z ich udziałem:

- biosensory powinowactwa – w warstwie receptorowej są unieruchamiane typowe sekwencje DNA/RNA oraz sekwencje kwasów nukleinowych należących do grupy aptamerów i ryboprzełączników;
- biosensory katalityczne – jak element bioczuły stosowane są tzw. DNAzymy.

Biosensory powinowactwa, w szczególności dedykowane wykrywaniu określonej sekwencji DNA, znajdują zastosowanie wszędzie tam, gdzie niezbędna jest analiza sekwencji genów. Jest to np. rozpoznawanie chorób, za które są odpowiedzialne geny, w tym badania prenatalne czy też wstępna diagnostyka pacjentów, wykrywanie infekcji bakteryjnych lub wirusowych, badania organizmów oraz żywności genetycznie modyfikowanej [72]. Podstawą opracowania biosensorów zawierających w warstwie receptorowej aptamery/ryboprzełączniki czy też DNAzymy były wspomniane już właściwości enzymatyczne i receptorowe niektórych naturalnie występujących cząsteczek RNA [73].

Do jednych z najistotniejszych typów tzw. funkcjonalnych kwasów nukleinowych (*functional nucleic acids*) należą aptamery, które są krótkimi, liczącymi do 80 nukleotydów jednoniciowymi sekwencjami DNA lub RNA [74]. Cząsteczki te w wyniku oddziaływania z określonym analitem zmieniają swoją konformację, czemu towarzy-