

Új irányok a biomolekuláris felismerés detektálásában

GYURCSÁNYI E. Róbert^{a*}

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Általános és Analitikai Kémiai Tanszék, Szt. Gellért tér 4, 1111 Budapest

1. Bevezetés

A biológiai eredetű, illetve jelentőségű molekulák meghatározása a huszadik század analitikai kémiájának egyik legfontosabb, kiemelkedő nehézségű feladata volt. Tekintettel az élettudományok előtt álló kihívásokra várhatóan a bioanalitika nemcsak megőrzési kiemelt fontosságát az elkövetkezendő években, hanem jelentősége továbbra is nőni fog. Sokáig sorolhatnánk a bioanalitika alkalmazási területeit, de talán néhány címszó is meggyőző lehet fontosságának megítéléséhez. Többek között meghatározóan hozzájárult az élővilág biokémiai folyamatainak megértéséhez, az orvostudomány és a biotechnológia fejlődéséhez. Ugyanakkor az analitikai meghatározásokkal társuló nehézségeket is könnyű átlátni, ha figyelembe vesszük a biomolekulák szerkezeti komplexitását, változatosságát, számát, időben változó koncentrációját és nem utolsósorban a biológiai minták összetettségét, amelyből a biomolekulákat szelektív azonosításuk után legtöbbször mennyiségileg is meg kell határozni. A biomolekulák szelektív felismerése érdekében az analitika gyakran a természetben fellelhető tág értelemben vett bioreceptor-ligandum kölcsönhatásokra támaszkodik. A biomolekuláris felismerés biokatalitikus reakciókon vagy affinitási kölcsönhatásokon keresztül valósul meg. Ennek megfelelően megkülönböztethetünk *katalitikus aktivitású* (enzimek, mikroorganizmusok, szövetek, sejtek, stb.), illetve *bioaffinitású felismerő komponenseket* (antitestek, lektinek, nukleinsavak, protein receptorok, stb.), amelyeket az esetek döntő többségében szilárd hordozó felületen immobilizálnak és az analitikai eszköz/rendszer részét képezik. Mindkét típusú molekuláris kölcsönhatást sikeresen alkalmazták bioanalitikai célokra. A rendkívül szelektív, esetenként specifikus biomolekuláris kölcsönhatások alkalmazása jelentősen befolyásolta az analitika metodológiát és műszerezettségét. Bevezetésük a bioanalitikába sok esetben lehetővé tette a mintaelőkészítési eljárások és az analitikai műszerezettség egyszerűsítését és ezáltal bioszenzorok kialakítását. A kémiai szenzorok alcsoportját képező *bioszenzorok a molekuláris felismerést* biztosító biológiai eredetű felismerő részből és a *fizikai-kémiai* jelátvivő egységből állnak, amelyek egy analitikai eszközben vannak integrálva. Jellemző példaként említhető a vércukormérő bioszenzor, amely alkalmas a glükóz vérből történő közvetlen, mintaelőkészítés nélküli meghatározására. Emellett a szelektív biomolekuláris felismerés kihasználása lehetőséget nyújtott, az adott minta több komponensének egyidejű meghatározására alkalmas analitikai eszközök és módszerek kifejlesztésére is. Ez forradalmi változásnak tekinthető az analitikai kémiában, amely a *biochip* technológia és a *nagy áteresztő képességű bioanalizátorok* kifejlesztéséhez vezetett. Ezekben a rendszerekben a szelektív molekuláris felismerést bioaffinitási kölcsönhatások biztosítják és ennek megfelelően nagyszámú, különböző komponensekre

szelektív felismerő molekulákat alkalmaznak, amelyeket ismert és kontrollált térelosztásban immobilizálnak egy szilárd hordozó felületén. A bioaffinitási kölcsönhatásokon keresztül (pl. antigén-antitest, receptor-ligandum, nukleinsav hibridizáció) rendkívül nagyszámú és a bioanalitika területén kiemelt fontosságú komponens határozható meg. Ezek között említhetők a biológiai eredetű makromolekulák (fehérjék, DNS szálak, stb.), viszonylag kis molekulatömegű komponensek (gyógyszermolekulák, hormonok, stb.) és mikroorganizmusok (vírusok, baktériumok, stb.). Jelen közlemény elsődleges célja, hogy a fehérjék és nukleinsavak affinitáson alapuló felismerésének detektálásában kialakult általános irányvonalakat és újabb eredményeket röviden szemléltesse. Az újabb és újabb detektálási módszerek fejlesztésének hajtóereje a legtöbb esetben a szelektivitás és érzékenység növelése. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy az affinitási kölcsönhatásokon alapuló rendszerekben a műszeres detektálás csak egyike azon tényezőknek amely a kimutatási határt és a szelektivitást meghatározza. Emellett, és a jelen közleményben nincs erre mód részletesen kitérni, a nem-specifikus kötődések és az affinitási kölcsönhatás során kialakult receptor-ligandum komplex stabilitási állandója is alapvetően befolyásolja az analitikai módszer teljesítmény paramétereit.

2. Bioaffinitású felismerő komponensek

A legnagyobb alkalmazási területtel rendelkező bioaffinitású felismerő komponensek az antitestek és nukleinsavak, de a biotechnológia fejlődésének köszönhetően folyamatosan új felismerő molekulák is alkalmazásra kerülnek a bioanalitikai rendszerekben. Ilyenek az aptamerek, peptid-nukleinsavak, illetve a genetikailag módosított proteinek és receptorok.

Antitestek Az antitestek az immunrendszer elsőként azonosított elemei voltak. A ma antitest néven ismert specifikus szérumproteineket, amelyek feladata a különböző fertőző ágensek hatástalanítása, az 1800-as évek végén felfedezték fel.¹ Az antitestek fehérjemolekulák, amelyeket az immunrendszer egy adott antigén hatására termel. Tekintettel arra, hogy az antitestaktivitás általában a szérumfehérjék γ -globulin frakciójával társítható, immunglobulinoknak nevezik őket. Az emberi és állati immunglobulinok diszulfidhidakkal és nem kovalens kötésekkel összekapcsolt polipeptid láncokból, két "nehéz" és két "könnyű" peptidláncból állnak. A peptidláncok N-terminális szakaszán található változó, primer szerkezetet variábilis szakasznak hívjuk és ez a szakasz felelős az antigén és az antitest közötti kötődés létrejöttéért (FAB - fragment antigen binding). Ezzel szemben a peptidláncok C-terminális fele állandó primer szerkezetű (FC-fragment

* Főszerző. Tel.: 463 1592 ; fax: 463 3408 ; e-mail: robertgy@mail.bme.hu

crystalline). Az antitest-antigén kötődés több nem kovalens jellegű kölcsönhatás kialakulásán alapul (hidrogén hidak, elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások). A megfelelő funkcionalitások mellett, a szelektív kölcsönhatást a FAB és az antigén térbeli illeszkedése (komplementaritása) határozza meg. Az antitestek azon jellemző tulajdonsága, hogy a megfelelő antigéneket nagy szelektivitással képesek megkötni (immunreakció) az immunanalitika kifejlődésétette lehetővé. Az immunanalitika tehát azoknak a módszereknek a gyűjtőneve, amelyek specifikus antitest-antigén reakciókon keresztül szolgáltatnak analitikai információt egy adott minta komponenseiről.

Nukleinsavak A nukleinsavak természetben fellelhető két fő csoportját a ribonukleinsavak (RNS) és dezoxiribonukleinsavak (DNS) alkotják. A nukleinsavak polimer makromolekulák, melynek monomerjei, a nukleotidok, purin- illetve pirimidinszármazékok glikozidjainak foszforsav észterei. A DNS szálak szerkezetében előforduló pirimidin bázisok a citozin és timin, míg purin bázisok a guanin és adenin. Az RNS szálakban is hasonló bázisok fordulnak elő de a timin helyett uracil található. A nukleinsavak elsődleges szerkezetét a nukleotidok sorrendje (szekvencia) határozza meg. A nukleinsavak szerkezetében található bázisok funkció csoportjai alkalmasak hidrogén hidak kialakítására és ez képezi a két nukleinsav szál közötti affinitási kölcsönhatás alapját. Hidrogén hidak két nukleinsav lánc között azonban, csak a donor, illetve akceptor csoportok megfelelő térbeli elhelyezkedése esetében alakulnak ki, amely a két lánc szekvenciájától függ. A kettős DNS-szál termodinamikailag legstabilabb helikális szerkezetében a guanin a citozinnal, és az adenin a timinnel kapcsolódik hidrogén-hidak által. Amennyiben a két szál elsődleges szerkezete egymással komplementer, azaz a guanin és citozin, illetve adenin és timin bázisok egymással szemben helyezkednek el a két láncban, kialakul a DNS-DNS duplex (kettős csavar). A nukleinsavak esetében tehát a szelektív molekuláris felismerést a két komplementer szekvenciájú lánc hibridizációja biztosítja.

Aptamerek Az aptamer név a latin *aptus* szóból képződött, amelynek jelentése illeszkedés. Az aptamer olyan DNS vagy RNS oligonukleotid molekula, amely képes olyan másodlagos térbeli szerkezetet felvenni, amely nem kovalens jelegű kölcsönhatásokon keresztül egy adott célvegyület szelektív megkötésére alkalmas. A célvegyületek lehetnek makromolekulák (pl. fehérjék), de kis molekulatömegű vegyületek is (pl. metabolitok, toxinok). Az a tény, hogy DNS vagy RNS a komplementer szekvenciájú nukleinsavakon kívül egyéb molekulákhoz is kötődhetnek ismert volt. Ugyanakkor itt nem lehet előre megállapítani, hogy egy adott molekulának a felismeréséhez milyen elsődleges szerkezettel rendelkező nukleinsav szükséges. Erre az alapvető kérdésre adott választ az 1990-ben bevezetett *SELEX* módszer (*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) azaz ligandumok exponenciális kinyerése *in-vitro* evolúcióval.^{2,3} A következőkben ennek az aptamer előállítási folyamatnak a leegyszerűsített elvét ismertetjük. A módszer során a célvegyületet egy szilárd hordozóra immobilizálják, majd nagyszámú (tipikusan 10^{15}) random szekvenciájú, 30-70 nukleotid hosszú oligonukleotidok kötődését tesztelik. A célvegyülethez gyengébben kötődött

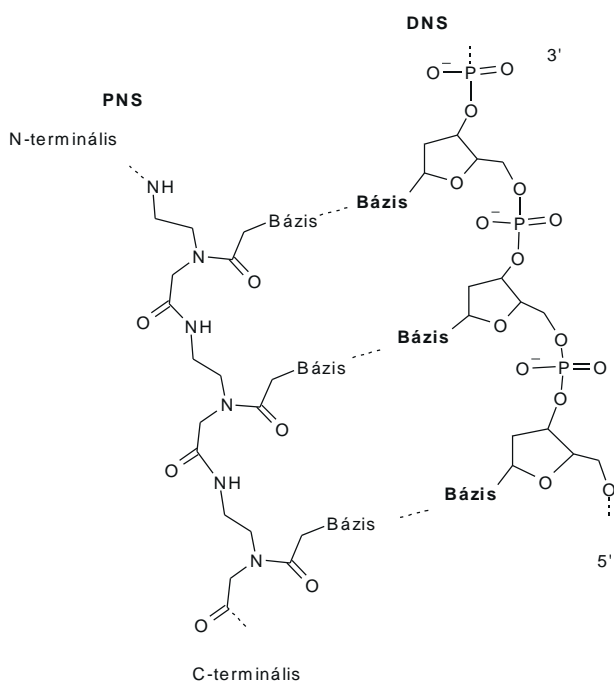
oligonukleotidokat megfelelő szelekciós mosási lépéssel választják el a rögzített célvegyületről. Ezt követően a többi, erősebben kötődött oligonukleotidot kinyerik és polimeráz láncreakcióval sokszorosítják. Ezeket újból reagáltatják a célvegyülettel és az előbb leírt folyamatot 3-5 cikluson keresztül megismélik a végleges szekvenciák kinyerése előtt. A végleges szekvenciák lesznek a célvegyülethez szelektíven és erősen kötődő, úgynevezett aptamerek. Összehasonlítva az antitestekkel az aptamerek alkalmazása a következő előnyökkel jár: *in-vitro* előállítás (nem igényelnek aktív immunizációt); nagy tisztaságú preparátum kinyerés; stabilabbak a fehérjékénél; irányított kémiai szintézissel a molekula kémiai stabilitása és affinitása tovább javítható; kisebb molekulatömegükből kifolyólag szilárd hordozókon nagyobb receptor sűrűséget lehet biztosítani; elvileg bármilyen molekulára szintetizálható aptamer. Hátrányuk a kiindulási oligonukleotid könyvtár szintézisének igénye.

Peptid-nukleinsavak A peptid-nukleinsavak (PNS, PNA-peptide nucleic acid) szintetikus molekulák, amelyek abban különböznek a DNS molekulától, hogy a dezoxiribóz foszfátészter lánc helyett a bázisok N-(2-aminoetil)glicin vázon vannak.⁴ Ez a váz a DNS láncokhoz hasonló helyezkedést biztosít a bázisoknak és ezáltal a PNS, a DNS molekulához hasonló hibridizációs tulajdonságokkal bír.⁵ Ami viszont lényeges, hogy a PNS szálak semleges töltésűek, míg a DNS molekulák a foszfát csoportok miatt negatív töltéssel rendelkeznek és ennek fontos következményei vannak. Így míg a DNS-DNS duplexben a szálak közötti elektrosztatikus kölcsönhatások a duplex kialakulását gátolják, amelynek kiküszöbölésére nagy ionerősségű közeg szükséges, addig a PNS-DNS duplex esetében ilyen jellegű kölcsönhatás nincs és a duplex kialakulását az ionerősség gyakorlatilag nem befolyásolja. A PNS molekulák alkalmazása DNS analízisre⁶ nemcsak nagyobb érzékenységre és specifitásra nyújtanak lehetőséget, hanem a PNS szálak kiváló hőmérséklet, pH és biológiai stabilitással is rendelkeznek (ellenállnak nukleázok és proteázok hatásának). Alkalmazásuk többek közt a pontmutációk vizsgálatában lehet nagyon előnyös.

Receptorok A biológiai receptorok biomolekulák specifikus megkötésére alkalmas peptidek, fehérjék. A receptor-ligandum közötti kölcsönhatás olyan konformációs átalakulásokat eredményez a receptor szerkezetében, amely bizonyos sejt választ indukál, mint például egy ionsatorna megnyitását vagy egy bizonyos enzim aktiválását, illetve az intracelluláris receptorok esetén génaktivációs-profil változását. Jelenleg a receptorok (ionsatornák, G-protein kapcsolt receptorok, stb.) analitikai célokra való alkalmazása toxinok, agonisták illetve antagonisták meghatározására jelenleg rendkívül korlátozott.⁷ Ennek okai között említhető a viszonylag kis stabilitásuk, estenként a megfelelően érzékeny jelátalakítás hiánya és magas előállítási költségük. Ugyanakkor a gyógyszerfejlesztésben való fontosságuk miatt a jövőben nagyobb mértékű alkalmazásuk várható.

3. Affinitáson alapuló biomolekuláris felismerés detektálása. Rövid történeti áttekintés

A bioaffinitáson alapuló analitikai módszerek fejlődését több tudományágban elért eredmények együttesen határozták meg. Ezek között említhető a biokémia, biotechnológia,



1 Ábra. PNS-DNS szálak szerkezete és hibridizációjának sematikus ábrája

immunológia, molekuláris biológia és analitikai kémia. A bioaffinitási felismerés nyilvánvalóan csak akkor detektálható ha ez a reakcióközegben megfelelő fizikai-kémiai változásokat okoz. Kezdetben a módszerek többsége a kötődés során kialakult komplex valamilyen belső tulajdonságának vizuális vagy rendkívül egyszerű műszerezettségű (pl. turbidimetriás) detektálásán alapult. Jellemző példa az 1897-ben⁸ Kraus által leírt specifikus agglutináción alapuló tífuszteszt. Az agglutináción alapuló immunanalitikai tesztek közül érdemes még kiemelni a Coombs-tesztet, amely a szervezet vörösvérsejtjei elleni autoimmunválasz diagnosztikájára szolgál és a hemolízis eredetére ad információt⁹. A direkt Coombs-teszt esetében a páciens vörösvérsejtjeihez poliklonális anti-humán globulin szérumot adnak és pozitív válasz esetén agglutináció lép fel. Az 1940-es években kifejlesztett immundiffúzió¹⁰ és az immuncsapadékképzésen (immunprecipitáció) alapuló módszerek, majd az 1953-ban bevezetett immunoelektroforézis¹¹ is még csak elsősorban minőségi illetve félmennyiségi eredményeket szolgáltattak. Az analitikai teljesítményparaméterek szempontjából forradalmi előrelépést a különböző jelöléses módszerek bevezetése jelentett. Ilyen az 1960-as évek elején, a Berson és Yalow által bevezetett radioimmunoassay, amelyet a plazma inzulintartalmának meghatározására dolgoztak ki.¹² A módszer későbbi népszerűségét és elterjedését részben annak is köszönheti, hogy az első radioimmunoassay módszerek hormonok meghatározását szolgálták¹²⁻¹⁴. A hormonokat, melyek a belső elválasztású mirigyek termékei, rendszerint nagyon kis mennyiségben kell meghatározni, ráadásul hatásuk és szerkezetük között rendkívül szoros összefüggés van, ezért a legcsekélyebb szerkezeti változás is változtathat az élettani hatáson. Az immunoassay bevezetése előtt a hormonok meghatározása rendkívül nehézkes volt, a fehérje természetű hormonok meghatározására, mint például az inzulin, gyakorlatilag nem létezett megfelelő analitikai módszer. Nagy jelentőségű az 1960-as évek közepén Wide¹⁵ illetve Miles

és Hales¹⁶ által kidolgozott eljárás az antitestek radioaktív izotópokkal való jelölésére, amely az immunradiometrikus assay (immunoradiometric assay, IRMA) módszer kialakulásához vezetett. A radioimmunoassay módszerek viszonylag könnyű automatizálhatóságuknak és széleskörű alkalmazhatóságuknak köszönhetően lehetőséget teremtettek nagyszámú, rutin analízis elvégzésére. Az 1970-es évek elején a kereskedelmi forgalomban már több száz radioimmunoassay állt a felhasználók rendelkezésére, elsősorban klinikai analízisre, de környezeti, élelmiszer-analitikai célokra is. A radioimmunoassay bevezetése után gyorsan megjelentek a nem-izotópos jelölésen alapuló immunoassay módszerek. Így már 1961-ben Dandliker és Feigen¹⁷ a Coons által bevezetett fluoreszcens jelölést használva, fluoreszcencia polarizáción alapuló immunoassay módszert dolgozott ki, míg 1969-ben Avrameas¹⁸ az immunreagensek enzimekkel való jelölését írta le. Az utóbbi munka az 1970-es évek elején bevezetett enzim immunoassay technikák alapját képezte^{19,20}. A későbbiekben az enzim és fluoreszcens jelölést alkalmazó immunoassay módszerek gyors fejlődésének korszaka következett. A DNS analízisben forradalmi előrelépést a *polimeráz láncreakció* (PCR-polymerase chain reaction) bevezetése jelentette az 1980-as években²¹⁻²⁴.

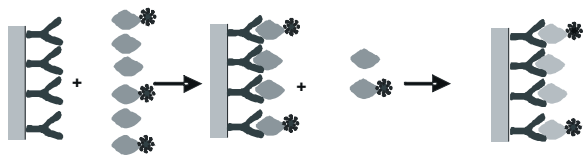
4. Affinitáson alapuló biomolekuláris felismerés detektálása. Általános irányelvek

Az affinitáson alapuló biomolekuláris felismerés esetében, egy bioreceptor-ligandum komplex alakul ki. A komplex kialakulása általában csak nagyon kismértékben változtatja meg a közeg fizikai-kémiai tulajdonságát és ezért, ahogy azt a rövid történeti áttekintésben említettem az első kvantitatív nagyérzékenységű analitikai módszerek esetében jelölő anyagokat kellett alkalmazni. Ugyanakkor ma már olyan érzékeny módszerek is rendelkezésre állnak, amelyekkel akár jelölés nélkül is nyomonkövethető a receptor-ligandum komplex kialakulása. Ennek megfelelően a detektálás szempontjából a bioaffinitáson alapuló analitikai módszerek két csoportra oszthatóak: jelöléses, illetve jelölés nélküli módszerek. A jelölést alkalmazó módszerek esetében az affinitási kölcsönhatás egyik reakciópartnerre olyan komponenssel van megjelölve, amely műszeres analitikai módszerrel nagy érzékenységgel detektálható. A jelölő anyag lehet: fluoreszcens molekula, enzim, radioaktív izotóp, kemilumineszcenciás reagens, fém karbonilok, szilárd részecskék, stb. A jelölést alkalmazó módszereket is két csoportba oszthatjuk. Amennyiben a detektálási technika különbséget tud tenni a kötött és nem kötött reagens által szolgáltatott analitikai jel között, akkor ezek elválasztása nem szükséges és homogén módszerekről beszélünk. Ezeknél sokkal elterjedtebbek az ún. heterogén módszerek, ahol az affinitási reakció végeztével, de még a detektálás előtt a szabad és kötött reagens-frakciókat elválasztják. Az elválasztást jelentősen megkönnyíti, hogy a felismerő molekulákat általában egy szilárd hordozó felületére immobilizálják. A heterogén módszerek esetében két alapvető eljárást különböztethetünk meg. A vetélkedésen alapuló (kompetitív) módszerek esetén (2. ábra), az antitest mennyisége korlátozott és versengés alakul ki a kötőhelyekért a meghatározandó antigén és konstans mennyiségű jelzett antigén között. Az immunkomplex kialakulása után a kötött és szabad antigéneket elválasztják.

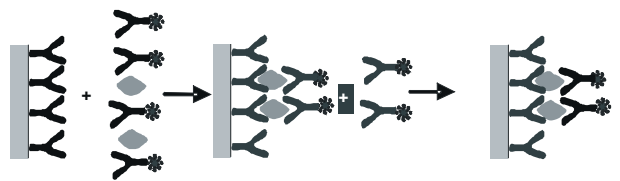
Általában az antitesthez kötődött jelzett antigénmennyiséget határozzák meg és ekkor az analitikai jel ellentétes módon változik a minta antigéntartalmával. A nem vetélkedő módszerek legismertebb változata a szendvics eljárás (lásd 2. ábra), amely nukleinsavak és legalább két kötőhellyel rendelkező antigének meghatározására alkalmazható. Ebben az esetben a felismerő antitestet a meghatározandó antigénhez viszonyítva feleslegben immobilizálják egy szilárd hordozóra. A mintában levő antigén és az immobilizált antitest közötti immunkomplex kialakulása után egy második jelzett antitestet adnak a reakció közeghez. A felismerő és jelzett antitestek "szendvicsszerűen" zárják közre az antigént. A jelzett antitest feleslegének eltávolítása után meghatározzák a szendvicskomplex mennyiségét, amely a minta antigénkoncentrációjával egyenesen arányos.

Vetélkedésen alapuló módszer

Összekeverés és inkubáció Elválasztás Mennyiségi meghatározás



Nem vetélkedésen alapuló módszer, Szendvics eljárás



● Meghatározandó antigén Y Szilárd hordozóhoz kötött antitest
● Jelzett antigén Y Jelzett antitest

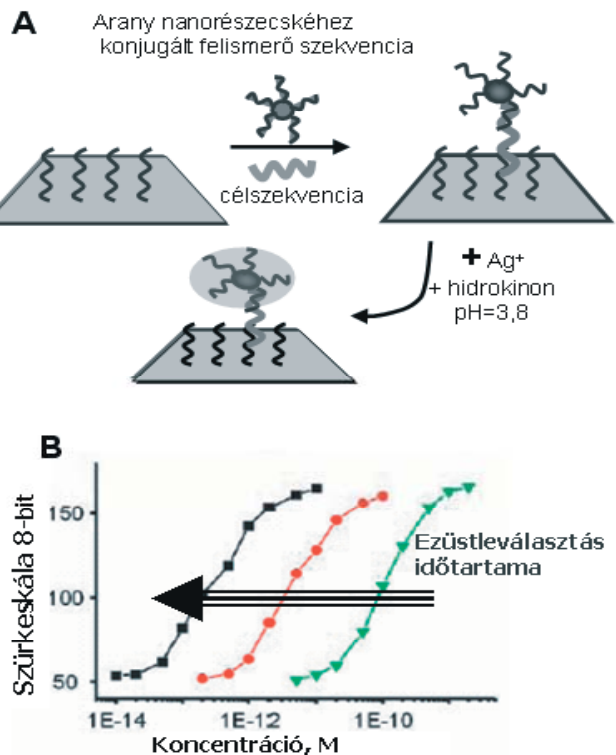
2. Ábra. A vetélkedésen és a nem vetélkedésen alapuló (esetünkben szendvics) immuneljárások sematikus ábrája

5. Új irányzatok a biomolekuláris kölcsönhatások jelölésen alapuló detektálásában

Nyilvánvalóan a jelölésen alapuló detektálások egyik meghatározó kutatási irányvonala az új típusú jelölő anyagok és eljárások fejlesztése. Az utóbbi időszakra elsősorban a nanoszerkezetű jelölő anyagok bevezetése és alkalmazása a meghatározó.

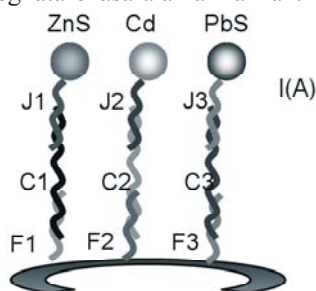
Arany nanorészecskék Az arany nanorészecskék bioanalitikai célú alkalmazása nem új keletű. Öt és ötven nanométer átmérőjű arany nanorészecskéket nagy elektronsűrűségük miatt már az 1970-es években széleskörben alkalmaztak pásztázó elektronmikroszkópiás méréseknél jelölő anyagként és ezáltal lehetőséget nyújtottak nagy térfelbontású immunocitokémiai vizsgálatok elvégzésére.²⁵ Ennek megfelelően az immunanalitikai területén az arany nanorészecskék alkalmazása ma már rutinszerűnek tekinthető.²⁶ Ugyanakkor a DNS analízisben való bevezetésük és a megfelelő oligonukleotid-arany nanorészecske konjugátumok előállítására csak az 1990-es évek második felében történt meg.^{27,28} Jellemző példa az arany nanorészecskéken alapuló nagyérzékenységű eljárásokra a Mirkin csoportja által kidolgozott szendvics módszer az anthrax-specifikus szekvencia meghatározására (3. ábra). Ennek során a szilárd hordozóra immobilizált

oligonukleotid felismerő szál, a célszekvencia és az arany nanorészecskéhez konjugált második felismerő szekvencia szendvics komplexet alkot. A célszekvencia 100 pM feletti koncentrációja esetében, a nagy optikai sűrűségű arany jelölésnek köszönhetően, a szendvics komplex kialakulása akár vizuálisan is detektálható. A kimutatási határ további csökkentése érdekében a szerzők kihasználták az arany nanorészecskék azon tulajdonságát, hogy megfelelő redukálószer jelenlétében az ezüst ionok leválását katalizálják. Az ún. ezüst-amplifikációs technika öt nagyságrenddel csökkentette a kimutatási határt, ráadásul a dinamikus koncentrációtartomány az ezüstleválasztás idejével szabályozhatóan bizonyult.²⁹ Érdekes módon a fluorofór jelzéssel összehasonlítva az arany nanorészecskékkel konjugált oligonukleotidok alkalmazása nagymértékben megnövelte az analízis szelektivitását, amely alkalmasnak bizonyult a tökéletesen komplementer és pontmutációs szálak megkülönböztetésére (SNP analízis). A módszer érzékenysége továbbnövelhető az ún. oligonukleotid bio-vonalkódok alkalmazásával. Ebben az esetben az arany nanorészecskék felületén a felismerő szál mellett nagy feleslegben immobilizálnak egy másik DNS szálakat, amely a vele komplementer szekvenciájú bio-vonalkód oligonukleotiddal duplexet képez. Az eljárás hasonló módon zajlik le, viszont a szendvics komplex kialakulása után az említett duplexet dehidridizálják és az oldatba kerülő bio-vonalkód oligonukleotidokat határozzák meg az ezüst-amplifikációs módszerrel. Tekintettel arra, hogy minden egyes célvegyület bekötődése esetén száz-ezerszeres számú bio-vonalkód szabadul fel a módszer kimutatási határa eléri az 500 zM koncentrációt.³⁰ Megfelelő módosítással és immunreagens alkalmazásával ez a rendkívül érzékeny eljárás proteinek, pl. prosztatata specifikus antigén, meghatározására is alkalmazható.³¹



3. Ábra. Ezüst-amplifikációs módszer anthrax-specifikus DNS szekvencia meghatározására. (A) működési elv (B) kalibrációs görbék különböző ezüstleválasztási idők esetében

Kvantum pontok A kvantum pontok (quantum dots) olyan félvezető *nanokristályok* amelyeknek mindhárom karakterisztikus dimenziója az 1-10 nanométeres tartományba esik. Kvantum pontok előállítására alkalmas szerves félvezető anyagok között említhetők a GaN, GaP, GaAs, InP, InAs, ZnO, ZnS, ZnSe, CdS, CdSe és CdTe.³² Ezek a nanokristályok fluoreszcenciás tulajdonsággal rendelkeznek. Rendkívül fontos, hogy a fluoreszcenciás emisszió hullámhosszát a félvezető nanokristály átmérője határozza meg. A kvantum pontok megfelelő biológiai eredetű felismerő molekulákhoz köthetők és ezáltal jelölő anyagként alkalmazhatók bioaffinitási reakciókban. Annak ellenére, hogy a kvantum pontok fluoreszcenciás kvantum hatásfoka nem feltétlenül nagyobb a szerves fluoreszcenciás vegyületekéénél, a fotostabilitásuk jelentősen jobb és ez megkönnyíti gyakorlati alkalmazásukat. Összehasonlításképpen míg egy 0,5 mW teljesítményű Ag^+ lézer gerjesztés esetében a rodamin 6G molekula fluoreszcenciája kb. 10 perc alatt a felére csökkent, addig a CdSe kvantum pont emissziója 4 óra alatt semmit nem változott.³³ A nanokristályok további előnyös tulajdonsága, hogy a méretük változtatásával egyszerűen szabályozható az emissziós hullámhossz. Ezt a tulajdonságot kombinálva a monodiszperz kvantum pontok keskeny emissziós spektrumával (mindössze 30 nm körüli felértek-szélesség) lehetőség nyílik több célvegyület egyidejű meghatározására különböző színű jelzőmolekulák alkalmazásával. Mindezek mellett a kvantum pontok nemcsak optikai hanem elektrokémiai detektálásra is lehetőséget nyújtanak (4. ábra). Ebben az esetben szendvics eljárást alkalmaznak ahol a második felismerő DNS szál kvantum ponttal jelölt. A szendvics komplex kialakulása után a nanokristályokat kis térfogatban feloldják majd a fémionokat inverz voltammetriával meghatározzák. Ezek a módszerek rendkívül nagy érzékenységgel rendelkeznek hiszen minden egyes szendvics komplex kialakulásához mérettől függően pár száztól pár ezer fématomot tartalmazó kvantum pont tartozik.³⁴ Emellett különböző anyagból készült kvantum pontok alkalmazásával több célvegyület egyidejű meghatározása is lehetséges. Ilyen meghatározás elvét mutatja be a 4. ábra ahol három felismerő oligonukleotid szál (F1-F3) három különböző célvegyület (C1-C3) meghatározására alkalmaznak.³⁵

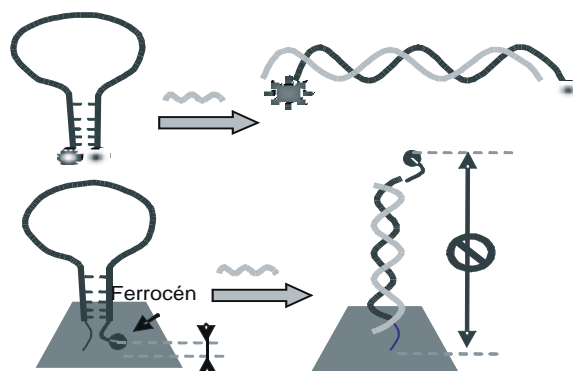


4. Ábra. Több DNS szekvencia egymásmelletti meghatározására alkalmas elektrokémiai detektáláson alapuló szendvics eljárás működési elve. A diagram a szendvics komplex kialakulása után, kis térfogatban feloldott félvezető nanokristályok fémionjainak inverz voltammetriás válaszgörbéjét mutatja be.³⁵

Donor-akceptor közötti távolság modulálásán alapuló detektálási módszerek

Mint ismeretes az elektron és energia átadás hatékonysága

egy donor és egy akceptor csoport vagy molekula között távolságfüggő. A Förster típusú *rezonancia energiatranszfer* hatékonysága a távolság hatodik hatványával csökken, míg az elektronátlépés sebességi állandója exponenciálisan csökken a távolság függvényében. Ennek megfelelően donor-akceptor közötti távolság modulálása rendkívül érzékeny bioérzékelési eljárások alapját képezik.³⁶ Példaként említhetők a proteáz és egyéb enzimek meghatározására alkalmas módszerek. A módszer leegyszerűsített elve, hogy kezdetben a fluoreszcenciát kioltó molekula egy megfelelő peptid láncon keresztül fluoreszcenciás hordozó felületére van rögzítve és ezért a hordozó fluoreszcenciás intenzitása kicsi. A proteáz enzim a peptid láncot felszakítva a kioltó molekula eltávolítását eredményezi és ennek következtében enzimaktivitás függő fluoreszcencia intenzitásnövekedést okoz.³⁷ A rezonancia energiatranszfer jelenségen alapul az ún. *molekuláris villogók* (molecular beacon) működése is.³⁸⁻⁴⁰ A molekuláris villogó egy olyan önmagához hibridizáló oligonukleotid, amelynek egyik vége általában egy fluoreszcens (5'-vég), a másik pedig egy fluoreszcenciát kioltó (3'-vég) molekulával módosított. Az önhibridizáció miatt a kialakult hurok konformáció a két molekula közelségét és ezáltal a fluoreszcencia kioltását eredményezi. A komplementer célvegyület hibridizációja során kialakult duplex a hurok konformációt felnyitja. Ezáltal a jelölt oligonukleotid két vége eltávolodik egymástól és a fluoreszcencia intenzitása megnő. A molekuláris villogók elektronikus analógjai esetében az oligonukleotid lánc egyik vége az elektród felületén rögzített míg a másik vége elektroaktív molekulával (pl. ferrocén) jelzett.⁴¹ A hurok konformáció esetében a legkisebb az elektroaktív molekula és az elektródfelület közötti távolság és legnagyobb az elektronátlépés sebessége. Hibridizáció esetén az elektroaktív komponens eltávolodik az elektródfelülettől ami az elektrokémiai jel (áramerősség) csökkenését eredményezi.



5. Ábra. Molekuláris villogók és elektronikus analógjaik működési elve

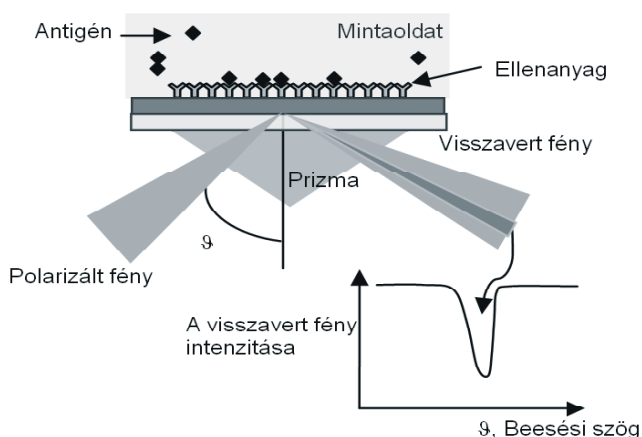
Rezonancia energiatranszferen alapuló módszerek protein analízisre is alkalmazhatók. Ebben az esetben a megfelelő aptamer lánc két végét jelölik meg az energia donor és akceptor molekulákkal. Az aptamerek oldatbeli konformációja átrendeződik a fehérjéhez való specifikus kötődés során. Ez az akceptor-donor közötti távolság és ezáltal a fluoreszcencia intenzitás megváltozását eredményezi.⁴² Fontos megjegyezni, hogy a molekuláris villogókon alapuló eljárások homogén bioanalitikai módszerek tekinthetők, azaz itt nem szükséges a kötött és nem kötött reagens frakciók egymástól való elválasztása.

6. Irányzatok a biomolekuláris kölcsönhatások jelölés nélküli detektálásában

A nagyérzékenységgel detektálható jelölő anyagok bioanalitikai célú alkalmazásának előnyei nem szorulnak külön magyarázatra. Mindazonáltal több lépéses eljárásokat és költséges jelölő anyagok alkalmazását igénylik. Emellett az esetek többségében nincs lehetőség a biomolekuláris kölcsönhatás valós időben történő nyomonkövetésére, amely lehetővé tenné a kötődési reakció kinetikájának meghatározását. Ezért a bioanalitikai rendszerek fejlesztési irányzatain belül a jelölés nélküli, de nagyérzékenységet biztosító módszerek kialakítása rendkívüli fontossággal bír.

Felületi plazmonrezonancia elvén alapuló bioérzékelés

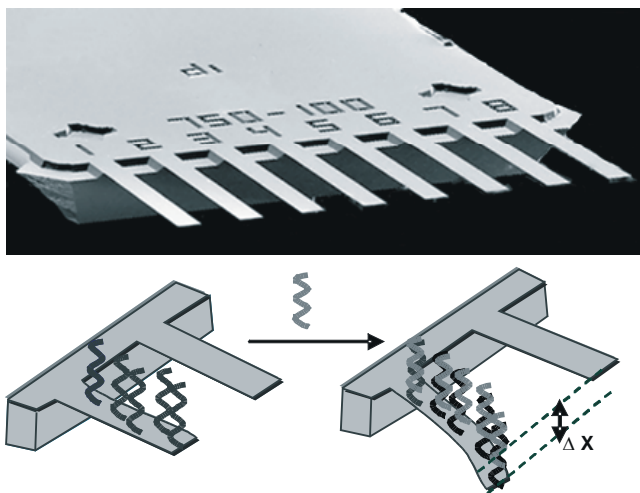
A bioanalitikában 1980-as évek elején Liedberg és munkatársai^{43,44} által bevezetett analitikai módszer, a felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance, SPR) sikere három tényezővel magyarázható: a) az SPR spektroszkópiával valós időben meghatározható a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikája, b) a biomolekulák kötődése jelölés nélkül nyomonkövethető c) az SPR technika a felületi tulajdonságokra mutatott nagy érzékenysége lehetővé teszi akár relatív gyenge felületi kölcsönhatások vizsgálatát is. A felületi plazmonok egy fém (az esetek többségében arany)-dielektrikum határfelületen a vezetési elektronok mozgásához kapcsolódó elektronsűrűség-hullámok. A plazmonok fényvel való gerjesztéséhez a fény impulzusának felülettel párhuzamos komponense meg kell egyezzen az azonos energiájú felületi plazmon impulzusával.⁴⁵ Ebben az esetben a fény energiája átadódik az elektronsűrűség hullámnak és egy rezonancia jellegű csatolás történik. A felületi plazmonok kialakításához leggyakrabban használt konfiguráció esetében a fényt egy prizma (Kretschmann elrendezés) segítségével csatolják be a tipikusan 50 nm vastag fémrétegbe. A plazmon-gerjesztés a fény egy adott beesési szögénél történik meg és ilyenkor a fém felületről visszavert fény intenzitásában egy minimum észlelhető (6. ábra). A rezonanciának megfelelő beesési szög értéke érzékenyen függ a megvilágított fémréteg másik oldalával érintkező közeg törésmutatójától. A generált evanescens hullámok intenzitása a fém/dielektrikum határfelületen maximális. Az intenzitás a határfelülettől távolodva exponenciálisan csökken és pár száz nanométeres behatolási mélységben biztosítja a felületi detektálást. A biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálatakor az affinitási reakció egyik komponense a fém felületén immobilizált, míg a másik komponens a fémmel érintkező mintaoldatban található. A bekötődés megváltoztatja a felülettel közvetlenül érintkező réteg (ahol az evanescens hullám intenzitása a legnagyobb) törésmutatóját amit a készülék a rezonancia szög eltolódásán keresztül érzékenyen detektál. Az analitikai és kinetikai információt a rezonancia szög időbeli változásának nyomonkövetése szolgáltatja. A meghatározás érzékenységét elsődlegesen a biomolekuláris kölcsönhatás során kialakult komplex stabilitása és a vizsgált komponens molekultömege határozza meg. Az SPR alkalmazása rendkívül széles körű.^{46,47} Kiterjedten használható ellenanyag-antigén, DNS hibridizáció, protein-protein, receptor - biomolekula, stb. közötti kölcsönhatások vizsgálatára. Az SPR mérések a kinetikai állandók és molekularis kölcsönhatások specificitásának meghatározásán túl alkalmasak nyomanalitikai meghatározásokra is.⁴⁸



6. Ábra. Az SPR rendszer detektálási elvének sematikus diagramja.

Mikrokonzol (mikromechanikai) szenzorok

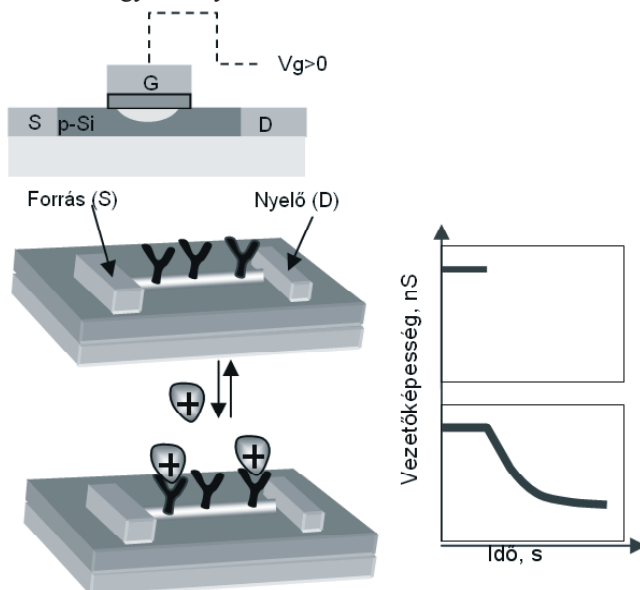
A mikrokonzol szenzorok az atomerő és más mérőszondás mikroszkópiákban alkalmazott mikrokonzolok megfelelő kémiai érzékenyítéssel kialakított változatain alapulnak. A mikrokonzolok szenzorokba való átültetése az 1990-es évek elejére tehető. Ekkor alkalmazták önálló detektorokként femtojoule felbontású fototermikus spektroszkópiás mérésekhez⁴⁹, illetve hőmérséklet, nedvességtartalom és higanykoncentráció meghatározására.⁵⁰ A mikrokonzolok tipikusan 0,2-1 μm vastag, 20-100 μm széles és 100-500 μm hosszú rugalmas lapkák, amelynek egyik vége egy szilárd tartóhoz van rögzítve. Általában a mikrokonzol elhajlását a lapka végére irányított lézerek visszaverődésén keresztül optikai detektorral követik nyomon. A mért paraméter, elhajlás vagy rezonancia frekvencia, szerint megkülönböztetünk statikus és dinamikus mikrokonzol szenzorokat. Dinamikus üzemmódban a mikrokonzolok mikromechanikai oszcillátorokként működnek és a mikrokonzol tömegváltozása a rezonanciafrekvencia változásán keresztül határozható meg. A kvarckristály mikromérlegen^{51,52} alapuló bioszenzorokkal analóg módon ha a felület megfelelő bioaffinitású reagenssel módosított akkor a ligandum bekötődése megváltoztatja a mikrokonzol tömegét és ez a tömegváltozás valós időben nyomonkövethető a rezonanciafrekvencia változásán keresztül. A statikus mikrokonzol szenzorok a receptor-ligandum kölcsönhatás energiáját mechanikai energiává alakítják át. Ennek megfelelően többretegű mikrokonzolok esetében a molekulák adszorpciója/kötődése differenciált felületi feszültség változást okoz ami a mikrokonzol elhajlását eredményezi. A mikrokonzol szenzorok rendkívül érzékenyek a hőmérsékletre (a rétegek különböző lineáris hőtágulási együtthatója miatt) és a konvektív hatásokra. Ezért a mikrokonzol szenzorokat szinte kizárólag csak differenciális felépítésben alkalmazzák. Ebben az esetben mikrokonzol sorokat használnak amelyek egy része szelektív felismerő molekulákkal módosított, a másik részét pedig a nem specifikus adszorpciónak ellenálló réteggel vonják be. Mint ahogy a 7. ábrán látható rendszer is mutatja, az analitikai jelet a DNS-el módosított és a referencia mikrokonzol elhajlásának különbsége adja. A komplementer DNS bekötődése mind az elektrosztatikus mind pedig a szterikus taszítást növeli a felismerő rétegben ezért a megfelelő mikrokonzol elhajlását okozza.⁵³ Aptamerekkel⁵⁴, illetve antitestekkel⁵⁵ módosított mikrokonzol szenzorokat sikeresen alkalmaztak különböző fehérjék meghatározására is.



7. Ábra. Többkonzolos mikromechanikai szenzor ábrája és alkalmazása DNS hibridizáció detektálására

Nanohuzalokon alapuló térvezérlésű tranzisztorok alkalmazása bioérzékelésre

A félvezető nanohuzalok kontrollált előállításában elért eredmények⁵⁶ lehetővé tették ezek térvezérlésű tranzisztorokon alapuló kémiai szenzorokba (CHEMFET) való integrálását. Mint ismeretes a térvezérlésű tranzisztorok esetében a forrás- és nyelő-elektrodok között található félvezető csatorna vezetőképességét (a töltéshordozók koncentrációját) egy vékony szigetelő rétegen keresztül kapacitíven csatolt vezérlőelektróddal modulálják. A CHEMFET szenzorok esetében a csatorna vezetőképességének változását a kémiaileg érzékenyített vezérlőelektroda és mintaoldat határfelületén lejátszódó kémiai folyamat befolyásolja. Ugyanezt az elvet követik a nanohuzal típusú térvezérlésű kémiai szenzorok itt azonban a félvezető csatorna kialakítására általában bórral adalékolt szilícium egykristály nanohuzalt alkalmaznak.⁵⁷



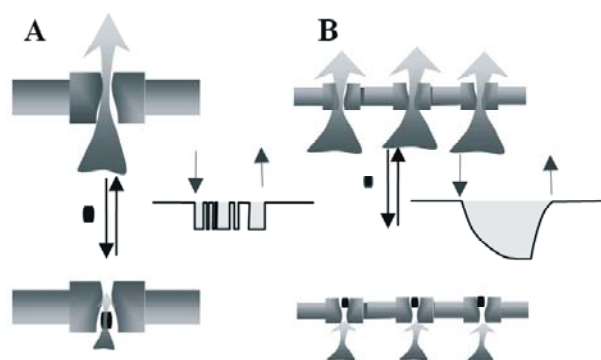
8. Ábra. A nanohuzal térvezérlésű tranzisztorokon alapuló bioérzékelés működési elve.

Az erre a célra alkalmazott nanohuzalok tipikusan 10-20 nm átmérőjűek és 2-6 mikrométer hosszúak. Itt a töltéshordozók

koncentrációja a planáris felépítésű térvezérlésű tranzisztoroktól eltérően a nanohuzal "teljes tömegében változik" amely az érzékenység jelentős növekedését, akár egy molekula kimutatásának elvi lehetőségét is magában hordozza. A szelektív felismerést a nanohuzal felületére immobilizált biomolekulákkal biztosítják. Tekintettel arra, hogy a csatornán átfolyó áram megváltozásához a nanohuzal felületi töltéssűrűség változása szükséges, ezért a bekötődő ligandumnak mindenképpen elektromos töltéssel kell rendelkeznie. Az első bioanalitikai jellegű alkalmazás során Lieber és munkatársai a nanohuzal felületét biotinnal módosították és sztreptavidin illetve monoklonális anti-biotin antitest szelektív detektálásának lehetőségét vizsgálták.⁵⁷ Az általuk alkalmazott pH-n a sztreptavidin negatív, míg az anti-biotin pozitív töltéssel rendelkezett és ennek megfelelően bekötődésük a p-típusú félvezető nanohuzal vezetőképességének növelését illetve csökkentését okozták. Jelenleg megfelelő biomolekulákkal módosított nanohuzalokat fehérjék mellett már DNS szálak⁵⁸ sőt vírusok⁵⁹ meghatározására is sikeresen alkalmazták. A kimutatási határ proteinek esetében legfeljebb 10 pM, a DNS szálak esetében 10 fM, míg az influenza A vírus esetében 80 aM (50 vírus/ μ l) volt.⁶⁰

Ioncsatorna típusú bioszenzorok

Az ioncsatorna típusú bioérzékelés rendkívül érzékeny analitikai módszer, amely akár egy molekula detektálására is lehetőséget nyújt. Az ioncsatorna típusú érzékelők esetében megfelelő receptorok/nanopórusok vannak egy elektromosan szigetelő membránban integrálva. A receptorok/pórusok szelektív kölcsönhatása a meghatározandó komponenssel megváltoztatják a membrán átteresztőképességét a detektált marker ionok számára és ez a fluxus változás szolgáltatja az analitikai jelet. A módszer érzékenysége azzal magyarázható, hogy a meghatározandó komponens már rendkívül kis mennyiségének bekötődése is jelentős modulációt okozhat a nagy koncentrációban alkalmazott marker ionok fluxusában. Az ioncsatorna típusú szenzorok esetében megkülönböztetünk egycsatornájú és többcsatornájú szenzorokat.



9. Ábra. Egy – és többcsatornás ioncsatorna típusú szenzorok működési elvének és az ionáram-idő válaszgörbéinek sematikus vázlata. A meghatározandó komponenssel való kölcsönhatás során az effektív pórusátmérő lecsökken, ami együtt jár a membránon keresztül mért áramerősség csökkenésével.⁶¹

Az egycsatornás szenzorok esetében az egyedi pórus és a meghatározandó komponensek kölcsönhatása bonyolult, újlényomatszerű áramtranzienst eredményez. A csatorna

blokkolása egy olyan sztochasztikus esemény, amelynek előfordulási frekvenciája a meghatározandó molekulák koncentrációjától függ. Ugyanakkor a jel amplitúdója, illetve a csatorna nyitott és zárt állapotainak időtartama a vizsgálandó komponens anyagi minőségétől függ. A többcsatornás szenzorok esetében ezek az egyedi kölcsönhatások időben nem bonthatók fel és csak az öszionáram változása detektálható. A gyakorlati megvalósítás során leggyakrabban α -haemolysin proteint alkalmaznak, amely a lipid kettősréteg membránban önrendeződéssel egy 100 Å hosszú és legszűkebb részén kb. 15 Å átmérőjű pórust képez. A membránt két elektrolitot tartalmazó félcella között alakítják ki, majd általában 100 mV körüli feszültség alkalmazása mellett mérik a membránon keresztül átfolyó áram erősségét (pA).

Egyszálú DNS illetve RNS molekulák elongált konformációban át tudnak hatolni az α -haemolysin póruson és ennek megfelelően kísérletet tettek ezek szekvenálására az egyedi láncok áthatolása során regisztrált áramtranziensek alapján.^{62,63} Ennek ellenére proteinek és nukleinsavak szelektív meghatározását valójában csak a géntechnológia segítségével módosított α -haemolysin pórusok tették lehetővé. Így egyszálú oligonukleotid kovalens rögzítése a pórus belsejében nemcsak a komplementer szál szelektív felismerésére adott lehetőséget,⁶⁴ hanem a duplexképződés kinetikájáról is információt szolgáltatott.⁶⁵ A protein meghatározás során, tekintettel arra, hogy a proteinek nem férnek be az α -haemolysin nanopórusba a receptort polimer távtartón keresztül kötik a pórus belső falára. Ebben az esetben a póruson kívüli szelektív ligandum-receptor kötődés a polimer távtartó konformációját változtatja meg és ezáltal modulálja a csatornán keresztüli ionáramot.⁶⁶ A biológiai nanopórusokon alapuló szenzorok alkalmazását elsősorban a lipid kettősréteg stabilitása és a megfelelő receptorokkal módosított pórusok elérhetősége korlátozza.^{67,68} Erre a problémára megoldást jelenthet a szintetikus pórusok és receptorok mint például a kémiaiailag módosított nanocsövek alkalmazása.⁶⁹

Összefoglalás

A biomolekuláris kölcsönhatások analitikai célú alkalmazása egy dinamikusan fejlődő interdiszciplináris terület. Az utóbbi időszakban kifejlesztett rendkívül érzékeny detektálási eljárások az analitika, anyag- és élettudományok együttes alkalmazásának köszönhető. Különböző biológiai, kémiai vagy fizikai jellegű jelfelerősítési sémák külön vagy együttes alkalmazása megközelíti és egyes esetekben eléri az analitikai detektálás elvi kimutatási határát. A jelöléses módszerekre az új típusú nanoszerkezetű anyagok és szintetikus receptorok bevezetése és alkalmazása jellemző. Ugyanakkor az affinitási kölcsönhatások valós idejű nyomkövetésének igénye, új jelölésmentes jelátvivők és detektálási elvek kifejlesztéséhez vezetett.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az OTKA (F037977, M041969) és az MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíj támogatásáért.

Hivatkozások

1. Ehrlich, P.; Morgenroth, J. *Dritte Mitteilung, Berl. Klin. Wochschr.* **1900**, *37*, 453.
2. Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
3. Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505-510.
4. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
5. Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, *365*, 566-568.
6. Wang, J. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, *13*, 757-762.
7. Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A.; Turner, A. P. F. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 3942-3951.
8. Kraus, R. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1897**, *10*, 736.
9. Coombs, R. R. A.; Mourant, A. E.; Race, R. R. *Lancet* **1945**, *249*, 15-16.
10. Oudin, J. *C.R. Acad. Sci.* **1946**, *222*, 115.
11. Grabar, P.; Williams, C. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1953**, *10*, 193.
12. Yalow, R. S.; Berson, S. A. *Journal of Clinical Investigation* **1960**, *39*, 1157-1175.
13. Ekins, R. P. *Clinica Chimica Acta* **1960**, *5*, 453-459.
14. Ekins, R.; Samols, E. *Lancet* **1963**, *2*, 202-&.
15. Wide, L.; Bennich, H.; Johansson, S. G. *Lancet* **1967**, *2*, 1105-&.
16. Miles, L. E. M.; Hales, C. N. *Nature* **1968**, *219*, 186-&.
17. Dandliker, W.; Feigen, G. A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1961**, *5*, 299-&.
18. Avrameas, S. *Immunochemistry* **1969**, *6*, 43-&.
19. Rubenstein, K. E.; Schneider, R. S.; Ullman, E. F. *Biochem Biophys Res Commun* **1972**, *47*, 846-51.
20. Vanweemen, B. K. *Journal of Virological Methods* **1985**, *10*, 371-378.
21. Mullis, K. B.; Faloona, F. A. *Methods In Enzymology* **1987**, *155*, 335-350.
22. Erlich, H. A.; Gelfand, D. H.; Saiki, R. K. *Nature* **1988**, *331*, 461-462.
23. Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. *Science* **1988**, *239*, 487-491.
24. Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.
25. Seydack, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20*, 2454-2469.
26. Hayat, M. A. *Colloidal gold: principles, methods, and applications*; Academic Press: San Diego, **1989**.
27. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* **1996**, *382*, 607-609.
28. Alivisatos, A. P.; Johnson, K. P.; Peng, X. G.; Wilson, T. E.; Loweth, C. J.; Bruchez, M. P.; Schultz, P. G. *Nature* **1996**, *382*, 609-611.
29. Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* **2000**, *289*, 1757-1760.
30. Nam, J. M.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A. *Journal Of The American Chemical Society* **2004**, *126*, 5932-5933.

31. Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. *Science* **2003**, *301*, 1884-1886.
32. Murphy, C. J. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 520A-526A.
33. Gerion, D.; Pinaud, F.; Williams, S. C.; Parak, W. J.; Zanchet, D.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Journal Of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 8861-8871.
34. Merkoci, A.; Aldavert, M.; Marin, S.; Alegret, S. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24*, 341.
35. Wang, J.; Liu, G. D.; Merkoci, A. *Journal Of The American Chemical Society* **2003**, *125*, 3214-3215.
36. Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 186.
37. Kumaraswamy, S.; Bergstedt, T.; Shi, X.; Rininsland, F.; Kushon, S.; Xia, W.; Ley, K.; Achyuthan, K.; McBranch, D.; Whitten, D. *PNAS* **2004**, *101*, 7511-7515.
38. Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 303-308.
39. Tan, W. H.; Wang, K. M.; Drake, T. J. *Current Opinion In Chemical Biology* **2004**, *8*, 547-553.
40. Drake, T. J.; Tan, W. H. *Applied Spectroscopy* **2004**, *58*, 269A-280A.
41. Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *PNAS* **2003**, *100*, 9134-9137.
42. Li, J. W. J.; Fang, X. H.; Tan, W. H. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **2002**, *292*, 31-40.
43. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, *10*, R1-R9.
44. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. *Sensors And Actuators* **1983**, *4*, 299-304.
45. Kroó, N. *Magyar Tudomány* **2003**, *9*, 1096-1099.
46. Homola, J. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 528-539.
47. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. *Sensors And Actuators B-Chemical* **1999**, *54*, 3-15.
48. Mullett, W. M.; Lai, E. P. C.; Yeung, J. M. *Methods* **2000**, *22*, 77-91.
49. Barnes, J. R.; Stephenson, R. J.; Welland, M. E.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K. *Nature* **1994**, *372*, 79-81.
50. Thundat, T.; Warmack, R. J.; Chen, G. Y.; Allison, D. P. *Applied Physics Letters* **1994**, *64*, 2894-2896.
51. O'Sullivan, C. K.; Vaughan, R.; Guilbault, G. G. *Analytical Letters* **1999**, *32*, 2353-2377.
52. Buck, R. P.; Lindner, E.; Kutner, W.; Inzelt, G. *Pure And Applied Chemistry* **2004**, *76*, 1139-1160.
53. Fritz, J.; Baller, M. K.; Lang, H. P.; Rothuizen, H.; Vettiger, P.; Meyer, E.; J, G.; uuml; ntherodt, H.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K. *Science* **2000**, *288*, 316-318.
54. Savran, C. A.; Knudsen, S. M.; Ellington, A. D.; Manalis, S. R. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 3194-3198.
55. Wu, G. H.; Datar, R. H.; Hansen, K. M.; Thundat, T.; Cote, R. J.; Majumdar, A. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 856-860.
56. Morales, A. M.; Lieber, C. M. *Science* **1998**, *279*, 208-211.
57. Cui, Y.; Wei, Q. Q.; Park, H. K.; Lieber, C. M. *Science* **2001**, *293*, 1289-1292.
58. Hahm, J.; Lieber, C. M. *Nano Letters* **2004**, *4*, 51-54.
59. Patolsky, F.; Zheng, G. F.; Hayden, O.; Lakadamyali, M.; Zhuang, X. W.; Lieber, C. M. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2004**, *101*, 14017-14022.
60. Patolsky, F.; Lieber, C. M. *Materials Today* **2005**, *8*, 20.
61. Bayley, H.; Braha, O.; Gu, L. Q. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 139-142.
62. Ashkenasy, N.; Sanchez-Quesada, J.; Bayley, H.; Ghadiri, M. R. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 1401-1404.
63. Deamer, D. W.; Akeson, M. *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 147.
64. Howorka, S.; Cheley, S.; Bayley, H. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 636-639.
65. Howorka, S.; Movileanu, L.; Braha, O.; Bayley, H. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2001**, *98*, 12996-13001.
66. Movileanu, L.; Howorka, S.; Braha, O.; Bayley, H. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 1091-1095.
67. Schmidt, J. *Journal Of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 831-840.
68. Bayley, H.; Cremer, P. S. *Nature* **2001**, *413*, 226-230.
69. Gyurcsányi, R. E.; Vigassy, T.; Pretsch, E. *Chemical Communications* **2003**, 2560-2561.

Trends in the analytical transduction of bioaffinity based molecular recognition events

The quantitative determination of biologically relevant compounds is clearly a major goal of the analytical sciences. Bioanalysis had much to gain from the analytical use of biomolecular recognition events. The exquisite selectivity of biomolecular interactions made not only possible the implementation of miniature biosensing devices suitable for on-site measurements, but also the development of high throughput analyzers and biochips allowing the simultaneous detection and screening of large numbers of analytes. While biomolecular recognition can be either biocatalytic or bioaffinity based, this review article focuses only on the analytical transduction of bioaffinity type interactions. Bioanalytical systems based on bioaffinity interactions involve high selectivity non-covalent binding of a ligand to a receptor (antibody-antigen, DNA hybridization, etc.) with subsequent detection of the binding event. Since the formation of the ligand-receptor complex typically does not engage large changes in the physical-chemical parameters of the reaction media, the first high sensitivity detection

methods of affinity interactions were based on the use of different labels, such as enzymes, nanoparticles, fluorophores, etc.. In the recent years the implementation of novel nanostructures such as quantum dots, nanoparticle-receptor conjugates as well as different biological and chemical type amplification schemes are pushing to the limits the analytical performance parameters. The application of nanostructures for sensing and biosensing is especially a quickly emerging area, gaining popularity from the intimate molecular level control of the detection process. It has been shown by several groups the tremendous amplification with which nanoparticle labels can assist the analysis of proteins and DNA strands. The high optical density of metal nanoparticles in certain cases made possible the visualization of target concentrations down to 100 pM with the naked eye. The catalytic effect of metal nanoparticles can also be used to induce electroless deposition of silver, which improves with another five orders of magnitude the detection limit of analytical techniques based on gold nanoparticle labels.

Moreover, since each individual molecular binding event is associated with the presence of a nanoparticle consisting of thousands of atoms, their dissolution and detection with stripping voltammetry in minute volumes provides another route for the high sensitivity detection of bioaffinity interactions. However, the use of labels can often result in laborious multi-step detection procedures and most often prohibit the real time monitoring of the affinity interactions. Therefore, there is a considerable effort directed towards the development of novel label-free, but sensitive

approaches for biosensing. Well established label-free techniques such as quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance are providing means not only for the trace analysis of biomolecules, but also to follow binding events in real time and by that to determine the kinetic parameters of the affinity reactions. Recently emerging biosensing technologies such as microcantilever sensors, nanowire based field effect transistors and stochastic sensors have demonstrated the tremendous potential of biological and synthetic nanostructures for label-free bionalysis.