

VYBRANÉ METODY MODIFIKACE POVRCHŮ BIOSENZORŮ PRO IMOBILIZACI PROTEINŮ

ROMAN KOTLÍN a JAN E. DYR

Ústav hematologie a krevní transfuze, U nemocnice 1,
128 20 Praha 2
kotlinr@centrum.cz

Došlo 21.2.05, přepracováno 29.8.05, přijato 15.9.05.

Klíčová slova: biosenzor, imobilizace proteinů, adsorpce

Obsah

1. Úvod
2. Biosenzory
3. Adsorpce proteinů na povrch senzoru
4. Metody modifikace povrchů senzorů
 - 4.1. Hydrofobizace povrchu senzoru, modifikace povrchu nanášením organického polymeru
 - 4.2. Imobilizace proteinů ve fosfatidylcholinovém filmu
 - 4.3. Imobilizace proteinů s použitím systému (strept)avidin – biotin
 - 4.4. Imobilizace založená na samoskladných mono-vrstvách
 - 4.5. Fotochemická imobilizace proteinů
 - 4.6. Imobilizace proteinů přes hexahistidinovou nástavbu
5. Závěr

1. Úvod

Biosenzory se od 60. let minulého století staly běžnou součástí laboratorní praxe mnoha oborů lidské činnosti. K jejich každodennímu použití však vedla trnitá cesta. Mnoho praktických problémů muselo být vyřešeno dříve, než se začaly vyrábět první komerční přístroje. Jedním z těchto problémů byla a stále ještě je imobilizace detekčního systému na povrch senzoru. Jelikož tímto detekčním systémem jsou biologicky aktivní látky (enzymy, protilátky, receptory atp.), je nezbytné zachovat jejich biologickou aktivitu i po imobilizaci. Přímoou imobilizací takovéto molekuly na povrch se s největší pravděpodobností změní její konformace, což může vést ke snížení nebo změně biologické aktivity. Abychom tomuto jevu zabránili, lze na povrch senzoru nejprve navázat jiné sloučeniny (malé organické molekuly, proteiny aj.), které vytvoří na povrchu senzoru film, na nějž se následně imobilizují vlastní

biologicky aktivní molekuly. Metod, jak imobilizovat enzymy, protilátky a jiné biologicky významné sloučeniny na povrch senzoru, je v současné době mnoho a zde se budeme zabývat některými z metod modifikací povrchů senzorů pro nekovalentní vazbu proteinů.

2. Biosenzory

Biosenzor může být definován jako kompaktní analytický nástroj spojující biologicky aktivní detekční prvek (buď přímo integrovaný nebo blízce přidružený) s fyzikálně-chemickým snímačem¹. Z této definice vyplývají dvě základní součásti biosenzoru: *i*) biologicky aktivní látka, která interaguje s analytem a *ii*) snímač, jenž reaguje na změnu vyvolanou interakcí analytu s detekční molekulou.

Detekční molekulou může být ionofor, enzym, protilátka, receptor, část molekuly enzymu s aktivním místem, buněčná organela, buňka, tkáň aj. Výběr biologicky aktivní látky závisí jak na stanovovaném analytu, tak na konstrukci senzoru jako takového.

Otcem biosenzorů je Leland C. Clark Jr., který v roce 1956 publikoval práci o kyslíkovém článku². Na tuto práci navázal a v roce 1962 představil na sympoziu Newyorské akademie věd, jak propojit elektrochemické senzory s detekčním snímačem. Tento koncept ilustroval pomocí glukosaoxidas, enzymu katalyzujícího oxidaci β -D-glukosy kyslíkem a kyslíkového článku. Ve stejném roce společně s L. Lyonsem vydal článek, v němž se poprvé objevil termín enzymová elektroda³ (správně enzymový článek). Roku 1969 Guilbault a Montalvo sestrojili a publikovali první potenciometrický biosenzor⁴.

První komerční biosenzor, a to na principu kyslíkového článku s glukosaoxidasou, byl vyroben v roce 1972 a znovu v roce 1975 americkou firmou Yellow Springs Instrument Company. V roce 1975 vznikl také první biosenzor s mikroorganismem jako detekčním prvkem⁵ a první imunosenzor⁶.

V současné době vyrábí biosenzory nespočet firem po celém světě. Uplatnění nalézají v biomedicině, v klinické diagnóze, ve veterinární analýze, při analýze potravin, při kontrole polutantů životního prostředí, v mikrobiologii, v potravinářském průmyslu, v zemědělství, v chemickém průmyslu, ve výzkumu, ve vojenství, atd.

A jaké jsou výhody biosenzorů? Při správné konstrukci senzoru a při použití vhodného detekčního systému je to jejich specifita. Většina biologických dvojic, jako enzym – substrát nebo antigen – protilátka, spolu interagují velmi specificky (např. pro ureasu je jediným substrátem močovina), což dovoluje, aby byl měřený analyt stanoven i ve složitých maticích. Z dalších výhod lze jmenovat rychlost stanovení, nízké detekční limity, opakovatelnost,

reprodukovatelnost či široké použití biosenzorů.

Biosenzory mají však i své nevýhody. Poměrně vysoká cena těchto zařízení je často překážkou pro jejich širší využití. Při konstrukci biosenzorů bývá také velkým problémem imobilizace biomolekul tak, aby nezpůsobila konformační změny, které by mohly vyvolat ztrátu jejich biologické aktivity a schopnosti specifické interakce se stanovovaným analytem. Další nevýhodou jsou možné nespecifické vazby látek z maticí na povrch senzoru. V neposlední řadě je to také desorpce detekčních molekul z povrchu senzoru.

3. Adsorpce proteinů na povrch senzoru

Adsorpce proteinu na tuhý povrch senzoru je komplexní jev, k jehož popisu je nutné uvažovat mnoho faktorů. Proteiny ve fyziologickém prostředí zaujímají nativní konformaci, která se liší od konformace, kterou protein zaujme po adsorpci na povrch.

Vzájemné reakce proteinů s povrchem mohou zprostředkovat všechny druhy interakcí. Na hydrofobních površích budou převládat hydrofobní interakce, které povedou k rozbalení proteinu a interakcím s hydrofobními postranními řetězci aminokyselinových zbytků. Na površích hydrofilních to budou především polární a iontové síly, které zprostředkují interakci. Na všech površích se však mohou do určité míry uplatnit všechny druhy interakcí.

Hnací síla adsorpce může mít buď entalpickou povahu (např. protein a povrch mají opačný náboj) nebo povahu entropickou (rozbalení proteinu)⁷. Obecně lze říci, že adsorpce bude probíhat pouze za předpokladu, že Gibbsova energie celého systému bude klesat.

Adsorpce proteinů na povrch je složitý proces, který se skládá z několika stupňů. Adsorpce proteinu začíná přiblížením se k rozhraní vodné a tuhé fáze, dále vzniká dočasná vazba na rozhraní a mění se konformace proteinu. Současně probíhá desorpce proteinu, jež zahrnuje uvolnění proteinu z rozhraní a transport proteinu od rozhraní⁸. Konformační změna proteinu obvykle začíná redistribucí nabitých skupin, jejímž výsledkem jsou elektrické a chemické efekty, následovaná změnou stavu hydratace molekul proteinu⁹. Průběh konformační změny je nejméně známý aspekt procesu adsorpce proteinu⁷. Je však velice důležitý, neboť má za následek další efekty, především pak ztrátu biologické aktivity.

Významným faktorem ovlivňujícím adsorpci proteinů je tzv. Vromanův efekt. Poprvé jej pozoroval Vroman při studiu adsorpce fibrinogenu a dalších proteinů z plasmy na tuhý povrch¹⁰. Brash a ten Hove¹¹ ukázali, že při delší době adsorpce jsou dříve navázané molekuly fibrinogenu na povrchu nahrazovány jinými proteiny z plasmy, které mají vyšší afinitu k povrchu, zatímco v krátkém čase po zahájení adsorpce (do 5 minut) je převládající adsorbovanou molekulou právě fibrinogen. Vromanův efekt je způsoben reverzibilitou vazby proteinu na povrch a rozdílnou rychlostí adsorpce různých proteinů na povrch. Tento jev byl studován i s různými definovanými roztoky proteinů

o různých výchozích koncentracích a na různých površích^{10–15}. Slack a Horbett¹⁵ navrhli dokonce i matematický model popisující Vromanův efekt. Tento efekt se uplatňuje i při adsorpci jiných proteinů¹⁶.

Při studiu adsorpce proteinů je důležité sledovat nejen termodynamiku, ale také kinetiku adsorpce. Při termodynamických studiích lze vycházet z Langmuirovy adsorpční isothermy (I), kde množství adsorbovaného proteinu Γ závisí na koncentraci proteinu v roztoku c a na teplotě T .

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\max} c}{1 + \beta c} \quad (1)$$

$$\beta = e^{\frac{\Delta G_{\text{ads}}^0}{RT}} \quad (2)$$

Naměřené koncentrace proteinů však musí být rovnovážné. To může být experimentálně dosti složité a nepřesné, a proto je lépe sledovat kinetiku adsorpce. Při studiu kinetiky je potřeba uvažovat jednotlivé stupně, které jsme si vyjmenovali výše, neboť každý může proces adsorpce ukončit⁸. Při studiu kinetiky adsorpce bílkoviny na povrch je nutné si zvolit vhodný model, který se porovná s naměřenými daty^{17–23}. Je potřeba provést mnoho zjednodušení a některé vlivy úplně zanedbat.

Jako příklad je možné uvést model používaný van Tesselem a spol.²³. Jde o model, ve kterém je protein uvažován jako disk o průměru σ_α , který se adsorbuje na rovný povrch nahodile, po částech a bez překrývání. Části mohou nabývat pouze dvou konformačních stavů – α , kdy se části adsorbují reverzibilně beze změny průměru, a β , kdy se adsorbují ireverzibilně a průměr se zvětší na σ_β . Vztahy (3) a (4) jsou kinetickými rovnicemi pro časový vývoj α a β , kde t je čas, ρ je hustota α a β na povrchu, $k_\alpha c$, k_d a k_s představují rychlost adsorpce, desorpce a rozprostření, c je koncentrace α a β v roztoku, Φ_α je pravděpodobnost, že přicházející α dopadne na povrch bez překryvu a $\Psi_{\alpha\beta}$ je pravděpodobnost, že α je na povrchu a má dostatečný prostor pro rozšíření.

$$\frac{\partial \rho_\alpha}{\partial t} = k_\alpha c \Phi_\alpha(t) - k_d \rho_\alpha(t) - k_s \rho_\alpha(t) \Psi_{\alpha\beta}(t) \quad (3)$$

$$\frac{\partial \rho_\beta}{\partial t} = k_s \rho_\alpha(t) \Psi_{\alpha\beta}(t) \quad (4)$$

Pokud bychom chtěli mít přesnější model a výsledky, bylo by potřeba uvažovat faktory jako je heterogenita povrchu, kooperativní efekt, různé možné konformace proteinu, drsnost povrchu, překryv molekul, skutečný tvar molekul, odpor prostředí aj.

Prostá adsorpce biomolekul na tuhý povrch tedy přináší mnohá úskalí, která je možno eliminovat modifikací povrchů pro adsorpci biomolekul.

4. Metody modifikace povrchů

Jednotlivých metod, jak modifikovat povrch senzorů pro imobilizaci proteinů, je nespočet. V tomto článku se budeme zabývat pouze některými metodami pro nekovalentní imobilizaci polypeptidů.

4.1. Hydrofobizace povrchu senzoru, modifikace povrchu nanášením organického polymeru

Jedním z nejjednodušších způsobů, jak upravit povrch pro imobilizaci proteinů, je hydrofobizace. Nejčastěji se využívá u skleněných povrchů, nebo před nanášením organického polymeru na povrch senzoru.

Hydrofobizaci skleněného povrchu lze provádět po důkladném omytí např. roztokem dichlordimethylsilanu v toluenu^{24,25}.

Na takto upravený hydrofobní povrch lze nanést tenkou vrstvu organického polymeru. Nanesená vrstva polymeru je vysoce hladká²⁴ a hydrofobní. To je výhodné pro zarovnání nerovností, jež se mohou na povrchu vyskytovat. Nanášeným polymerem často bývá polystyren, poly(tetrafluorethylen), polyethylen a další.

4.2. Imobilizace proteinů ve fosfatidylcholinovém filmu

Fosfatidylcholiny jsou přirozené součásti biologických membrán. Jejich molekuly obsahují polární a nepolární části. Nepolární část tvoří mastné kyseliny, polární část tvoří terciární amin. Spontánně mohou tvořit ve vodném prostředí dvojvrstvé váčky²⁶, v nichž jsou molekuly

fosfatidylcholinů orientovány svou polární částí ven a nepolární částí dovnitř dvojvrstvy.

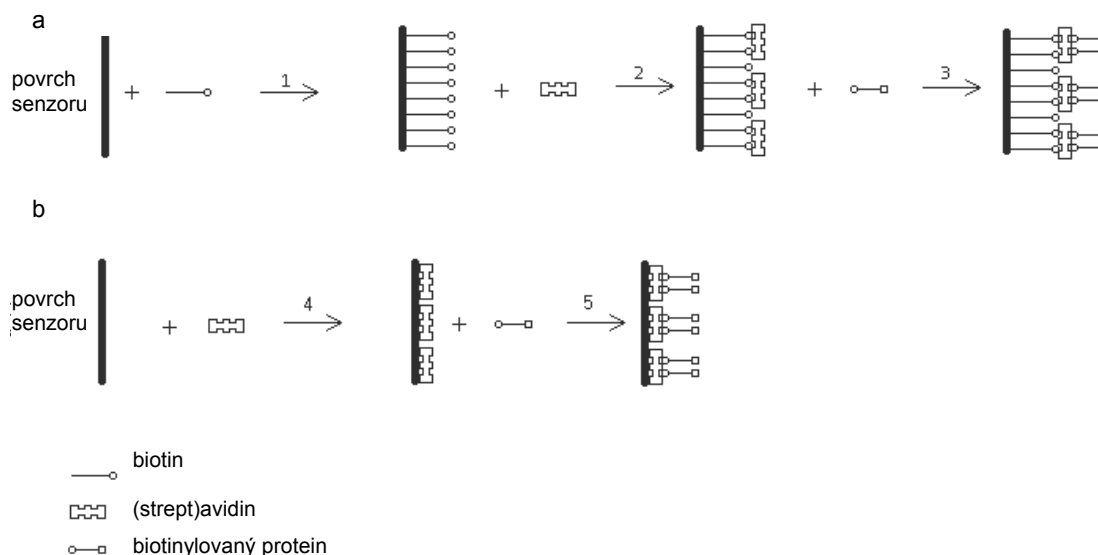
Principem imobilizace je příprava emulze fosfatidylcholinu, k níž se přidá protein. Po vytvoření dvojvrstvy a vstupu proteinu do ní se dvojvrstva přenesla na povrch senzoru.

Tato imobilizační technika je s dobrými výsledky používána pro myoglobin²⁷ nebo hemoglobin^{26,28}.

4.3. Imobilizace proteinů s použitím systému (strept)avidin – biotin

Avidin je glykoprotein vaječného bílku o molekulové hmotnosti 66 kDa (cit.^{29,30}). Podíl sacharidové složky je 10 %. Avidin je tvořen čtyřmi identickými řetězci (128 aminokyselinových zbytků) a každá podjednotka má vazebné místo s vysokou afinitou pro biotin³¹, může tedy vázat čtyři molekuly biotinu. Obsahuje velké množství kladných nábojů a má vysokou hodnotu izoelektrického bodu (pH 10,5)^{29,30}. Hodnota disociační konstanty komplexu avidin – biotin³² je $K_d = 10^{-15}$ mol dm⁻³ a patří mezi nejsilnější nekovalentní biochemické vazby. Protože jde o glykoprotein s vysokým obsahem kladně nabitých aminokyselinových zbytků, dochází často k nespecifickým interakcím s povrchem³³.

Případným nespecifickým interakcím sacharidové části molekuly lze zabránit nahrazením avidinu streptavidinem. Streptavidin je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*, má molekulovou hmotnost 60 kDa, izoelektrický bod v rozmezí pH 5 a 6 a je tvořen čtyřmi identickými řetězci (159 aminokyselinových zbytků)^{34,35}. Má nižší afinitu k biotinu ($K_d = 10^{-13}$ mol dm⁻³)³² a méně nespecificky interaguje s povrchem. Streptavidin i avidin



Obr. 1. Postup imobilizace proteinu při použití systému (strept)avidin – biotin: možné jsou dva postupy. V prvním (1a) se nejprve vytvoří na povrchu senzoru biotinová vrstva (reakce 1), na kterou se následně imobilizuje (strept)avidin (reakce 2). Na takto upravený povrch se imobilizuje biotinylovaný protein (reakce 3). Při druhé metodě (1b) se nejprve imobilizuje na povrch senzoru (strept)avidin (reakce 4), na nějž se imobilizuje biotinylovaný protein (reakce 5)

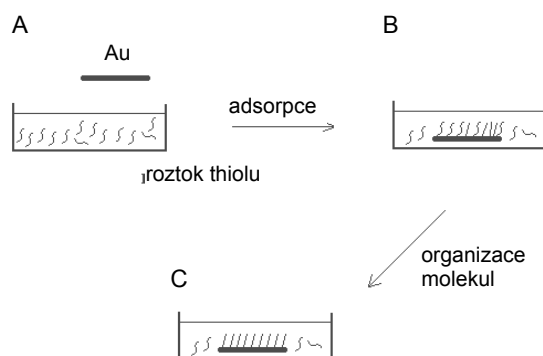
jsou stabilní vůči tepelné denaturaci³⁶ a jejich vazba k biotinu je prakticky ireverzibilní, což způsobuje problémy s obnovováním povrchu biosenzoru.

Použitím různých derivátů avidinu lze snížit nespecifické interakce a převést ireverzibilní vazbu k biotinu na reverzibilní. NeutrAvidin je deglykosylovaný derivát avidinu, který má podobné vlastnosti ve vazbě k biotinu jako avidin. Poskytuje méně nespecifických interakcí s povrchem. Izoelektrický bod je snížen na pH 6,3 a molekulová hmotnost je 60 kDa (cit.^{37,38}). Dalšími deriváty, které se v současné době začínají hojně využívat, jsou nitroavidin (CaptAvidin) resp. nitrostreptavidin, u nichž jsou selektivně nitrované tyrosinové zbytky v místě vazby k biotinu. To má za následek redukci afinity k biotinylovaným molekulám nad pH 9. Vazba na tyto deriváty je reverzibilní a imobilizovaný nitro(strept)avidin se dá opakovaně použít³⁹.

Při imobilizaci jsou dva možné přístupy. První, kdy se nejprve imobilizuje biotin, na nějž se následně váže (strept)avidin a posléze biotinylovaný protein (obr. 1a). Nebo druhý, kdy se nejprve imobilizuje (strept)avidin a na něj se váže biotinylovaný protein (obr. 1b). Vazbu obou látek k povrchu je možné uskutečnit buď přímo, nebo lépe kovalentně pomocí samoskladných monovrstev (viz dále).

4.4. Imobilizace založená na samoskladných monovrstvách

Samoskladná monovrstva (SAM z anglického self-assembled monolayer) je vrstva vytvořená na tuhém povrchu spontánní organizací molekul⁴⁰. Je několik typů takovýchto monovrstev, nejpoužívanější jsou aminoalkanthioly, hydroxyalkanthioly, ferrocenylalkanthioly, dialkylsulfidy, diethylsulfidy a sukcinimidylalkyldisulfidy nebo jejich směsi na vzácných kovech (nejčastěji na zlatě nebo



Obr. 2. Příprava samoskladné vrstvy na povrchu zlata; zlato se ponoří do roztoku thiolu, který se adsorbuje na povrch (B). Přitom se molekuly samovolně organizují orientované v jednom směru na povrchu zlata a vytvoří monovrstvu (C)

platini) nebo karboxylové kyseliny na oxidu hlinitém. Použitím alkylových řetězců delších než deset uhlíkových atomů je možné obdržet velmi uspořádané vrstvy, které mají málo defektů. Defekty bývají způsobeny především nepravidelností povrchu kovu⁴¹.

Tvorba samoskladných vrstev je v podstatě organizace molekul na rozhraní tuhé a kapalné fáze navozená silnou chemisorpcí mezi povrchem a organickou molekulou⁴². Jejich hlavní výhodou je jednoduchost jejich přípravy. Lze ji provádět přímo v laboratoři za použití dostupných chemikálií. Z dalších výhod lze uvést stabilitu vrstvy, malou spotřebu proteinů, stabilitu v čase, možnost regenerace vrstvy a další. Z nevýhod lze uvést toxicitu některých chemikálií a v některých případech i dlouhou dobu potřebnou na imobilizaci (nezřídka bývá kolem 24 h).

Postup imobilizace je poměrně jednoduchý. Povrch se nejprve řádně omyje a poté se adsorbuje dostatečně dlouhou dobu monovrstva organické látky (obr. 2). Na ni se buď imobilizuje biomolekula, nebo se k ní připojuje další sloučenina, jež zprostředkovává vazbu k proteinu. Vazba monovrstvy k povrchu je kovalentní; vzniká nejčastěji reakcí atomů síry monovrstvy s kovem.

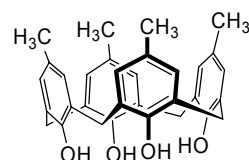
Z nejběžněji používaných látek pro přípravu monovrstev lze uvést cysteamin s glutaraldehydem; thiooktovou kyselinu; 4-aminobenzen-1-thiol, protein A; dithiobis(sukcinimidylpropionát), 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin, 3,3'-dithiodipropionovou kyselinu a mnoho dalších. Byly popsány i metody, kdy samoskladná monovrstva byla tvořena kofaktory NAD⁺ (cit.⁴³) nebo FAD (cit.⁴⁴).

Zajímavým případem samoskladných vrstev je využití kalix[n]arenů. Kalix[n]areny jsou cyklické oligomery vznikající kondenzací para-substituovaných fenolů s formaldehydem v alkalickém prostředí⁴⁵. Kalix[n]areny byly již dříve použity při syntéze umělých receptorů pro kationty, anionty a neutrální organické molekuly⁴⁶. Struktura typického zástupce této skupiny látek, *p*-methylkalix[4]arenu, je patrná na obr. 3.

Lee a spol.⁴⁷ využili modifikované kalix[4]areny k imobilizaci hovězího sérového albuminu (BSA). Použili kalix[4]arenkarboxylovou kyselinu a její ester a sledovali množství imobilizovaného BSA.

Vývoj imobilizačních technik s využitím kalix[n]arenů a jejich derivátů je velmi dobrá cesta, jak adsorbovat biomolekuly na povrchy senzorů.

Podrobnější informace o samoskladných monovrstvách a jejich využití naleznete v přehledných článcích^{42,48–50}.



Obr. 3. Struktura *p*-methylkalix[4]arenu

4.5. Fotochemická imobilizace proteinů

Jedna z novějších metod, jak rychle imobilizovat proteiny, je fotochemická imobilizace. Imobilizace je způsobena UV světlem. Tato technika je šetrná k biomolekulám a nezávisí na pH a teplotě⁵¹.

Fotoimobilizační technika může být řízena vystavením vzorku UV světlu nebo laserovému paprsku⁵².

K imobilizaci je potřeba fotoreaktivní povrch, jímž může být aminopolystyren, alkylaminosilikagel atp. Fotoaktivní polymer se připraví reakcí s 4-azido-1-fluor-2-nitrobenzenem za působení mikrovlnného záření, kdy vznikají fotolabilní skupiny⁵¹. Přídavkem proteinu a ozáření UV světlem vznikne kovalentní vazba polymeru s proteinem.

Naqvi a spol.⁵¹ tuto metodu úspěšně použili pro imobilizaci křenuvé peroxidasy a glukosaoxidasy.

4.6. Imobilizace proteinů přes hexahistidinovou nástavbu

Tato metoda je založena na afinitní chromatografii s imobilizovaným kovem⁵³. Ionty kovů (niklu, zinku, mědi) tvoří komplex s chelatačním činidlem, které obsazuje tři až čtyři koordinační vazby kovového iontu (z šesti možných) a zbylé mohou být obsazeny donory elektronů jako jsou např. histidinové skupiny⁵⁴. Histidinové kotvy jsou vnášeny do proteinu pomocí genového inženýrství. Inzert oligonukleotidového linkeru kódujícího histidinovou kotvu je vnesen do genu kódujícího protein (který již bývá umístěn na plasmidu) a protein je sekretován vhodným mikroorganismem⁵⁵.

Kröger a spol. využili tento systém k imobilizaci antilysozym F_{ab} fragmentu D1.3 (histidinový hexamer byl připojen k C-konci těžkého řetězce) a ke sledování jeho interakce s lysozymem z vaječného bílku⁵⁶. Ověřili, že sekundární struktura fragmentu se po imobilizaci nezměnila a fragment si zachoval vysokou aktivitu ve vazbě s lysozymem.

5. Závěr

Metodami imobilizace proteinů na povrchy senzorů a sledováním kinetiky a termodynamiky adsorpce se zabývá mnoho výzkumných týmů po celém světě. Cílem je vyvinout metody, které by byly levné, rychlé a které by neovlivňovaly adsorbovaný protein. Některými metodami již bylo dosaženo značného pokroku, např. při použití systému (strept)avidin-biotin.

V současnosti je k dispozici široká paleta metod, která se dá uplatnit u různých molekul bílkovinné povahy rozdílně. Některé metody jsou vhodnější pro enzymy, jiné pro protilátky a jiné použijeme pro imobilizaci strukturálních proteinů. Tato práce nepřinesla úplný výčet metod používaných při modifikaci povrchů senzorů pro imobilizaci biomolekul, ale pouze některé metody modifikace

povrchů senzorů pro nekovalentní imobilizaci proteinů.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu IGA MZ ČR číslo NA/7616-3.

LITERATURA

1. Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S.: *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford 1987.
2. Clark L. C. Jr.: *Trans. Am. Soc. Artif. Internal Organs* 2, 41 (1956).
3. Clark L. C. Jr., Lyons C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29 (1962).
4. Guilbault G. G., Montalvo J.: *J. Am. Chem. Soc.* 91, 2164 (1969).
5. Divis C.: *Annal. Microbiol., A* 126, 175 (1975).
6. <http://www.cranfield.ac.uk/biotech/chinap.htm>, staženo 18.8.2004.
7. <http://www.ipfdd.de/research/res16/a12/a12.html#Isothermal>, staženo 18.8.2004.
8. <http://afm1.pharm.utah.edu/PISMCourse/Kinetics/Kinetics2.html>, staženo 18.8.2004.
9. Norde W., Lyklema J.: *J. Colloid Interface Sci.* 71, 350 (1979).
10. Vroman L., Adams A. L.: *J. Biomed. Mater. Res.* 3, 43 (1969).
11. Brash J. L., ten Hove P.: *Thromb. Haemostasis* 51, 326 (1984).
12. Vroman L., Adams A. L.: *J. Colloid Interface Sci.* 111, 391 (1986).
13. Hobert T. A.: *Thromb. Haemostasis* 51, 174 (1984).
14. Wojciechowski P., ten Hove P., Brash J. L.: *J. Colloid Interface Sci.* 111, 455 (1986).
15. Slack S. M., Hobert T. A.: *J. Colloid Interface Sci.* 133, 148 (1989).
16. Freitas Jr. R. A.: *Nanomedicine, Volume IIA: Biocompatibility*. Landes Bioscience, Georgetown 2003.
17. Zhdanov V. P., Kasemo B.: *J. Chem. Phys.* 109, 6497 (1998).
18. Lee N. K., Vilgis T. A.: *Phys. Rev. E* 67, 050901-1 (2003).
19. Brusatori M. A., Van Tassel P. R.: *J. Colloid Interface Sci.* 219, 333 (1999).
20. Fragneto G., Su T. J., Thomas R. K., Rennie A. R.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2, 5214 (2000).
21. Ball V., Huetz P., Elaissari A., Cazenave J. P., Voegel J. C., Schaaf P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7330 (1994).
22. Burns Jr. R. A., El-Sayed M. Y., Roberts M. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 4902 (1982).
23. Van Tassel P. R., Viot P., Tarjus G.: *J. Chem. Phys.* 106, 761 (1997).
24. Kotlín R.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2004.
25. Zíka R.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2003.
26. Yang J., Hu N.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48, 117 (1999).

27. Hamachi I., Nakamura K., Fujita A., Kunitake T.: *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4966 (1993).
28. Fan C., Pang J., Shen P., Li G., Zhu D.: *Anal. Sci.* **18**, 129 (2002).
29. Green N.: *Biochem. J.* **89**, 609 (1963).
30. Green N.: *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 244 (1962).
31. Anzai J., Hoshi T., Osa T.: *Trends. Anal. Chem.* **13**, 205 (1994).
32. Bayer E. A., Ben-Hur H., Wilchek M.: *Methods Enzymol.* **184**, 80 (1990).
33. Steiger B., Padeste C., Grubelnik A., Tiefenauer L.: *Electrochim. Acta* **48**, 761 (2003).
34. Chalet L., Wolf F.: *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 1 (1964).
35. Bayer E. A., Ben-Hur H., Wilchek M.: *Methods Enzymol.* **184**, 80 (1990).
36. Bayer E. A., Ehrlich – Rogozinski S., Wilchek M.: *Electrophoresis* **17**, 1319 (1996).
37. Hiller Y., Geushani J. M., Bayer E. A., Wilchek M.: *Biochem. J.* **248**, 167 (1987).
38. Vermette P., Gengenbach T., Divisekera U., Kambouris P. A., Griesser H. J., Meagher L.: *J. Colloid Interface Sci.* **259**, 13 (2003).
39. Morgan E., Bayer E. A., Wilchek M.: *Anal. Biochem.* **243**, 257 (1996).
40. <http://www.dojindo.com/sam/SAM.html>, staženo 12.2.2005.
41. Storri S., Santoni M., Minunni M., Mascini M.: *Biosens. Bioelectron.* **13**, 347 (1998).
42. Chaki N. K., Vijayamohanan K.: *Biosens. Bioelectron.* **17**, 1 (2002).
43. Yang H., Yang Y., Liu Z., Zhang Z., Shen G., Yu R.: *Surf. Sci.* **551**, 1 (2004).
44. Vidal J.-C., Espuelas J., Castillo J.-R.: *Anal. Biochem.* **333**, 88 (2004).
45. Vincens J., Böhmer V. (ed.): *Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1991.
46. Ji H. F., Brown G. M., Dabestani R.: *Chem. Commun.* **7**, 609 (1999).
47. Lee M., An W. G., Kim J.-H., Choi H.-J., Kim S.-H., Han M.-H., Koh K.: *Mater. Sci. Eng., C* **24**, 123 (2004).
48. Göpel W., Heiduschka P.: *Biosens. Bioelectron.* **10**, 853 (1995).
49. Ferretti S., Paynter S., Russell D. A., Sapsford K. E.: *Trends Anal. Chem.* **19**, 530 (2000).
50. Tombelli S., Mascini M.: *Anal. Lett.* **33**, 2129 (2000).
51. Naqvi A., Nahar P.: *Anal. Biochem.* **327**, 68 (2004).
52. Kalachikov S. M., Adarichev B. A., Dymshits G. M.: *Bioorg. Khim.* **18**, 52 (1992).
53. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: *Nature* **258**, 598 (1975).
54. Zachariou M., Hearn M. T.: *Biochemistry* **35**, 202 (1996).
55. Sugiura M., Inoue Y., Minagawa J.: *FEBS Lett.* **426**, 140 (1998).
56. Kröger D., Liley M., Schiweck W., Skerra A., Vogel H.: *Biosens. Bioelectron.* **14**, 155 (1999).

R. Kotlín and J. E. Dyr (*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague*): **Selected Methods of Modification of Biosensor Surfaces for Protein Immobilization**

Protein immobilization plays a crucial role in biosensor construction. Conformational changes take place during protein adsorption onto a solid surface. The conformational changes may cause a loss of biological activity and may lead to impairment of the sensor. This is why different immobilization techniques have been designed; some of them are commercially utilized. This article is an overview of methods of surface modification for noncovalent protein immobilization.