

DETEKČNÉ METÓDY PRE ŠTÚDIUM GLYKÁN PROTEÍNOVÝCH INTERAKCIÍ

ANDRÁS HUSHEGYI, TOMÁŠ BERTÓK
a JAN TKÁČ

*Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
andras.hushegyi@savba.sk*

Došlo 24.5.13, prijaté 29.8.13.

Kľúčové slová: biočip, biosenzor, glykány, spektroskopia, voltametria

Obsah

1. Úvod
2. Fluorescenčná detekcia
3. Detekčné metódy bez značenia
 - 3.1. Mechanické detekčné metódy
 - 3.2. Elektroanalytické detekčné metódy
 - 3.3. Optické detekčné metódy
4. Záver

1. Úvod

Glykánové biočipy a biosenzory našli svoje využitie hlavne pre štúdium interakcií medzi proteínmi (napr. lektíny, protilátky) a glykánmi. Uplatňujú sa aj pri detekcii virálnych a bakteriálnych infekcií a v klinickej diagnostike. Pomocou glykánových biočipov sa môže študovať aj imunitná odpoveď organizmu a dajú sa sledovať aj vlastnosti niektorých enzýmov.

Biosenzory merajú chemické substancie a biologické komponenty v kvalitatívnej alebo kvantitatívnej forme. Majú dve primárne zložky, 1. biorozpoznávajúci element, ktorý rozpoznáva skúmanú zložku vo vzorke, 2. prevodník, ktorý zaznamenáva biologický signál, a premení ho na merateľný fyzikálny signál. Biočipy sa odlišujú od biosenzorov tým, že biorozpoznávajúci element nie je spojený s prevodníkom. Vzniknutý signál sa detekuje nepriamo, najčastejšie fluorescenčnými metódami.

Jedným z predpokladov pre presnú detekciu glykán proteínových interakcií je vhodná voľba detekčných techník. Existuje viacero možností ako sledovať interakcie prebiehajúce na povrchu biočipov a biosenzorov. Detekčné metódy môžeme rozdeliť do dvoch väčších skupín. Detekcia so značením využíva hlavne fluorescenčné značky. V poslednej dobe sa čoraz viac začali používať detekčné metódy bez značenia, ktoré nevyžadujú prítomnosť značiek

a využívajú hlavne elektrické, elektrochemické, termické a piezoelektrické metódy. Metódy detekcie bez značenia môžeme rozdeliť do troch väčších skupín: 1. mechanické, 2. elektroanalytické a 3. optické detekčné metódy.

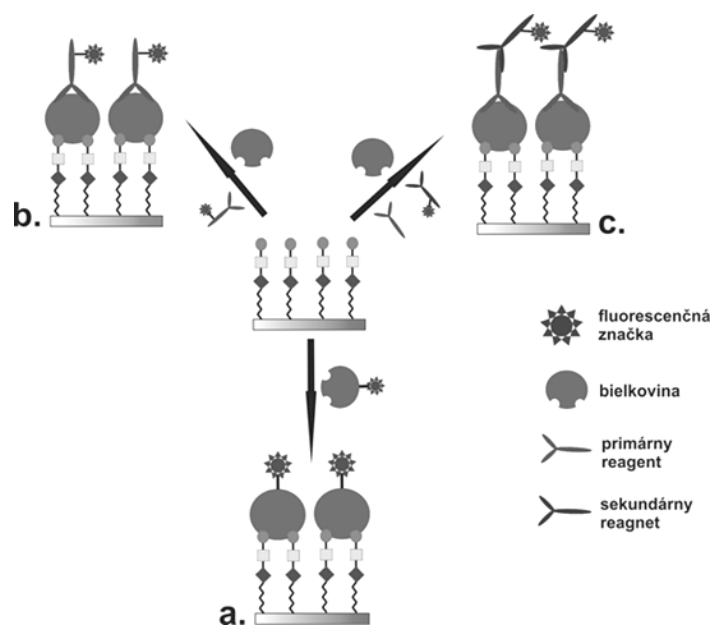
2. Fluorescenčná detekcia

Najvšeobecnejší prístup pri biočipoch zahŕňa detekciu fluorofórom značených proteínov, ktoré sa viažu priamo alebo nepriamo ku glykánom na povrchu s použitím fluorescenčného skenera. Je mnoho možností pre detekciu, tri hlavné postupy sú nasledovné: 1. priame značenie proteínov fluorofórom, 2. použitie fluorofórom označeného primárneho reagentu (napr. primárna protilátka), ktorý sa viaže priamo na proteín, 3. použitie fluorofórom označeného sekundárneho reagentu (napr. sekundárna protilátka), ktorý sa viaže na primárny reagent (napr. primárna protilátka) naviazaného na proteín (obr. 1). Biotinylovaný proteín môže byť monitorovaný s fluorofórom značeným (strept)avidínom, a antiglykánová protilátka môže byť detekovaná so značenou sekundárnou protilátkou¹. Zhou a Zhou viazali biotínom značený lektín konkanavalín A (Con A) na biočip s imobilizovanými sacharidmi. Najvyššiu fluorescenčnú intenzitu dosiahli pri manóze, glukóze a *N*-acetylglukozamíne².

Pri fluorescenčnej detekcii je značenie možné aplikovať dvakrát. Často sú glykány značené fluorescenčne, čo napomáha ich purifikácii a kvantifikácii. Väčšina týchto značiek má excitačné a emisné maximum pod 450 nm. Druhé značenie sa používa pre proteíny, kde sa používajú značky s excitačným a emisným maximom nad 450 nm, čím sa zabráni interferencii jednotlivých fluorescenčných značiek. Ak proteíny nie sú priamo značené, tak môžu byť detekované nepriamo so značenými protilátkami³.

Pre väčšiu citlivosť sa dajú využiť biočipy s fotodiódami s integrovaným zosilňovačom. S týmto nastavením sú fotodiódy vysoko citlivé a sú schopné detekovať aj chemiluminiscenčné reakcie s nízkou intenzitou. Oproti konvenčnému detekčnému systému, akým sú fluorescenčné skenery, umiestnenie fotodiód do tesnej blízkosti miesta, kde sa odohráva reakcia emitujúca svetlo, poskytuje zvýšenie senzitivity senzora. Detektor je v nanometrovej blízkosti k miestu, kde sa odohráva reakcia, pri konvenčných skeneroch je vzdialenosť niekoľko milimetrov až centimetrov (angl. microarray fluorescence readers, electrochemiluminescence plate readers)⁴. Rôzne metódy prípravy glykánových biočipov sťažujú porovnanie detekčných výsledkov medzi dvoma biočipmi⁵.

Napriek tomu, že fluorescenčná detekcia je univerzálne používaná, pri detekciách má svoje limitácie. Modifikácia proteínov, ako značenie fluorofórom a biotinylácia môžu redukovať aktivitu alebo zmeniť selektivitu



Obr. 1. **Fluorescenčná detekcia glykán-proteínových interakcií**, a) detekcia s fluorescenčne značeným proteínom, b) nepriame značenie proteínu s použitím značeného reagentu (protilátka), c) nepriama značenie proteínu so značeným sekundárnym reagentom cez primárny reagent

viazania⁶. Fluorofór obsahujúce značky (napr. primárne protilátky) nie sú dostupné pre všetky proteíny, hlavne pre novo objavené. Sekundárne značky zase môžu mať glykán viažuce vlastnosti. Zmes polyklonálnych protilátok používaných na detekciu proteínov často obsahuje glykán-viažuce protilátky. Mnoho fluorofórov je citlivých na svetlo a je náchylných na oxidatívnu degradáciu, čo vedie ku zníženiu intenzity signálu. Kvôli limitáciám spôsobených fluorescenčným typom detekcie by sa mali na monitorovanie glykánových biočipov a biosenzorov využívať aj iné detekčné stratégie, hlavne metódy bez značenia¹.

3. Detekčné metódy bez značenia

Detekčné metódy, ktoré nevyužívajú značenie, zahŕňujú stratégie ako kremenné mikrováhy (angl. quartz crystal microbalance, QCM), konzolové biočipy, mikroskopia atomárnych síl (angl. atomic-force microscopy, AFM), elektrochemická impedančná spektroskopia (angl. electrochemical impedance spectroscopy, EIS), voltamperometrické metódy a povrchová plazmónová rezonancia (angl. surface plasmon resonance, SPR).

3.1. Mechanické detekčné metódy

Základným princípom QCM je sledovanie zmeny rezonančnej frekvencie kremikového kryštálu spojeného so zmenou hmotnosti na jeho povrchu. Priebeh tohto deja je vyjadrený tzv. Sauerbreyho rovnicou, v ktorom μ_q je modul pružnosti, ρ_q je hustota kremíku, A je plocha čipu, f_0

je nominálna frekvencia, Δm je zmena hmotnosti na povrchu kryštálu.

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m f_0^2}{\left[A(\mu_q \rho_q)^{1/2}\right]} \quad (1)$$

Zmena frekvencie kryštálu je úmerná zmene hmotnosti, čo umožňuje sledovanie interakcií na povrchu čipu umiestneného na povrchu kryštálu. QCM sa dá využiť na sledovanie kinetiky prebiehajúcej väzobnej reakcie medzi dvoma molekulami. Interakcia medzi molekulou a povrchom spôsobí nárast hmotnosti na povrchu kryštálu, čo sa prejaví znížením jeho frekvencie. Pri príprave QCM sa najprv na povrch kryštálu silne naadsorbujú alebo kovalentne naviažu receptorové molekuly, frekvencia je monitorovaná v reálnom čase počas väzby ligandu na imobilizované molekuly. Adsorpcia molekúl sa zaznamenáva ako pokles frekvencie. Výhodou QCM je, že koncept a realizácia metódy je jednoduchá a rýchla a citlivosť detekcie závisí od modifikácie povrchu a od analytu. Limitácie sú spôsobené nešpecifickými adsorpciami, ktoré sa dajú obísť pozornosťou prípravou/modifikáciou povrchu. Ďalšou limitáciou je interakcia malých molekúl s modifikovaným povrchom, keďže možnosť zosilnenia signálu závisí od rozpoznávacieho systému⁷.

Konzolové biočipy (angl. cantilever biochips) patria k detektorom s nanorozmermi, ktoré sa dajú použiť na sledovanie väzby molekúl zmenou hmotnosti. V minulosti bola táto technológia využívaná na meranie pikomolárnych množstiev mRNA. Väzba medzi receptorom a analytom

spôsobuje ohyb konzoly, ktorý je zaznamenaný výchylkou lasera, čo umožňuje priamu detekciu väzobných dejov⁸. Hermann a spol. sledovali interakciu medzi manózou a antivirálnym proteínom cyanovirínom-N (CV-N). Konzolový biočip bol aktivovaný trimanózou, glykánom s deviatimi zvyškami manózy a galaktózou s rôznou hustotou vo forme tiolov. Na internú kontrolu použili galaktózu. Po pridaní CV-N signál ohybu lasera pri konzole s trimanózou bol 3–4krát väčší ako pri galaktóze. Podobná reakcia sa urobila aj s použitím Con A. Odchýlka pri glykáne s deviatimi zvyškami manózy bola o mnoho významnejšia ako pri trimanóze, čo nasvedčuje multivalentnej väzbe Con A s manózou. Konzola s nanomanózou vykazovala o 20 % vyšší signál ako to bolo pri trimanóze po pridaní CV-N. Citlivosť metódy je porovnateľná s inými technikami ako aj SPR alebo QCM (cit.⁹). Konzolové senzory majú značný potenciál na simultánne kvantitatívne stanovenie viacerých interakcií medzi glykánmi a proteínmi súčasne.

Zaujímavá stratégia na sledovanie povrchových štruktúr je mikroskopia atomárných síl (AFM). AFM skúma povrch pomocou ostrého hrotu umiestnenom na flexibilnej konzole, ktorá sa správa ako pružina. Základná výbava AFM zahŕňa piezoelektrický skener, flexibilnú konzolu s ostrým hrotom, laser, fotodiodový detektor a spätnoväzbovú elektroniku. Princíp analýzy je veľmi jednoduchý. Konzola s hrotom prechádza ponad povrch, jeho pohyb je monitorovaný laserom. Pri zmene smeru pohybu konzoly sa laser odráža pod iným uhlom, čo sa zaznamená pomocou fotodiódy. Piezoelektrický snímač sa používa pre priamu kontrolu pohybu konzoly. Najčastejšie využívaný povrch pre AFM je vysoko usporiadaný pyrolytický grafit alebo sklo. Pre glykány sa najčastejšie využíva zlatý povrch¹⁰. Poznáme tri typy skenovania: 1. kontaktný mód, pri ktorom sa ihla dotýka povrchu, 2. nekontaktný mód, pri ktorom hrot osciluje v tesnej blízkosti povrchu (5–15 nm). Medzi ihlou a povrchom môžu pôsobiť v závislosti od vzdialenosti van der Walsove sily, coulombové alebo dipólové interakcie. 3. Metóda priblíženia a vzdľavovania sa hrotu (tapping mode), pri ktorej konzola s ihlou osciluje smerom hore a dole istou frekvenciou¹¹.

3.2. Elektroanalytické detekčné metódy

Elektroanalytické detekčné metódy sú založené na detekcii elektrického signálu bez nutnosti použiť elektrochemickú značku biorozpoznávajúceho páru, zahrňujúc elektrochemickú impedančnú spektroskopiu (EIS) a sledovanie efektu pola (angl. field-effect sensing). Nanomateriálom modifikované elektródy sú charakterizované metódami ako cyklická voltametria (CV), diferenčná pulzná voltametria (DPV), voltametria štvorcových vln (square wave voltametry, SWV) a EIS (cit.⁷). Výhoda elektrickej transdukcie je, že ide často o nedeštruktívnu analytickú techniku. Existujú tri základné elektrochemické metódy:

1. Elektrochemický senzor využívajúci nanomateriály bol široko študovaný v kvapalnej fáze pre sledovanie intermolekulárných interakcií. Elektrochemická impedančná

spektroskopia (EIS) je obzvlášť využívaná pre detekciu rôznych biologických analytov¹².

2. Tranzistor s efektom pola (field effect transistor, FET) meria prúd, ktorý preteká medzi dvoma elektródami, ktoré sú spojené polovodičom. Ak sa analyt naviaže na povrch polovodiča, dochádza k zmene vodivosti polovodiča, čo sa prejaví zmenou prúdu¹³. Nanotrúbkové FET (NTFET) sú nádejnými kandidátmi pre elektronickú detekciu biologických dejov, meraním zmien elektrickej vodivosti nanotrúbok pred a po väzbe biomolekuly⁷.

3. Biologické póry a polovodičové nanopóry predstavujú ďalšiu skupinu elektrickej platformy, ktoré sa využívajú v detekcii biomolekúl¹⁴.

V prípade elektrochemickej impedančnej spektroskopie sa meria odpor voči prúdu pretekajúcemu systémom spolu s ďalšími veličinami (difúzne charakteristiky, kapacitancia) počas aplikácie striedavého napätia s meniacou sa frekvenciou v elektrochemickej cele. Sinusoidný excitačný potenciál je znázornený v nasledujúcej rovnici:

$$E = E_0 \cdot \sin(2\pi ft) \quad (2)$$

Príslušný signál elektrického prúdu sa dá vyjadriť ako:

$$I_t = I_0 \cdot \sin(2\pi ft + \phi) \quad (3)$$

E_0 je amplitúda napätia, f je frekvencia udaná v Hertzoch, I_0 je amplitúda elektrického prúdu, ϕ je fázový uhol, t je čas. V analógii s ohmovým zákonom, impedancia systému sa dá vyjadriť nasledujúcim spôsobom:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \cdot \sin(2\pi ft)}{I_0 \cdot \sin(2\pi ft + \phi)} = \frac{Z_0 \cdot \sin(2\pi ft)}{(2\pi ft + \phi)} \quad (4)$$

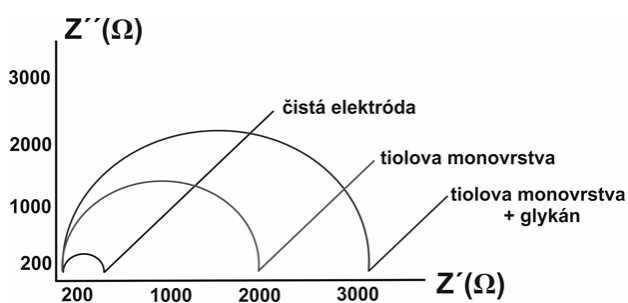
Pre matematické spracovanie údajov, pre presnú reprezentáciu impedančného vektorového modulu musíme použiť komplexný zápis, odozva vstupnej fázy prúdu reprezentuje reálnu zložku impedancie, odozva výstupnej fázy prúdu reprezentuje imaginárny komponent. Všetky komponenty, ktoré generujú fázový posun, prispievajú k imaginárnej zložke impedancie. Komponenty, ktoré neprodujú žiadny fázový posun, prispievajú k reálnej zložke systému.

Celý impedančný modul sa dá vyjadriť ako súčet reálnej a imaginárnej zložky:

$$Z = Z'_{\text{real}} + Z''_{\text{imag}} \quad (5)$$

Impedančné spektrum EIS je často prezentované Nyquistovým plotom, ktorý zahrňuje polkruhový a lineárny časť (obr. 2). Polkruhová časť (resp. priemer polkruhu) reprezentuje odpor voči prenosu náboja, pričom lineárna časť pri nižších frekvenciách opisuje difúziu limitovaný proces¹⁵. Po naviazaní glykánov a následne proteínov na zlatý povrch dochádza ku zvýšeniu odporu elektródy, tým dochádza k limitácii difúzie redoxnej próby (roztok ferri- a ferokyanidu) na jej povrch, čo sa prejaví ako zvýšenie priemeru polkruhu.

Cyklická voltametria (CV) patrí medzi najvyužívanejšie elektrochemické techniky. Meria sa prúd pri cyklickej



Obr. 2. Nyquistov plot pre reprezentáciu výsledkov z elektrochemickej impedančnej spektroskopie, Z' = reálna zložka impedancie, Z'' = imaginárna zložka impedancie

zmeny potenciálu v určitom potenciálovom okne. Metóda nevyžaduje drahé alebo vysoko sofistikované zariadenia, a preto je široko dostupná¹⁶. Počas CV je potenciál zavedený medzi referenčnú a pracovnú elektródu a prúd je meraný na pracovnej elektróde. Výsledok sa zaznamená ako závislosť prúdu od potenciálu. Pri skenovaní vznikajú prúdové odozvy pre všetky analyty, ktoré môžu byť redukované (alebo oxidované) cez zvolený interval potenciálu. Prúd sa zmení, ak potenciál dosiahne redukujúcu hodnotu analytu. Ak je redoxný dej reverzibilný, tak v ďalšom kroku sa analyt reoxiduje na pôvodný stav a produkuje prúd reverzný od predchádzajúceho skenu. Oxidačný signál najčastejšie má podobný tvar ako redukčný. Dôležité parametre pri cyklickej voltametrii sú potenciálové píky (E_{pc} , E_{pa}) a prúdové píky (i_{pc} , i_{pa}) katodických a anodických píkov. Ideálne CV má symetrické píky, a lineárny vzťah medzi prúdovou odozvou a počtom skenov (obr. 3a)¹⁷.

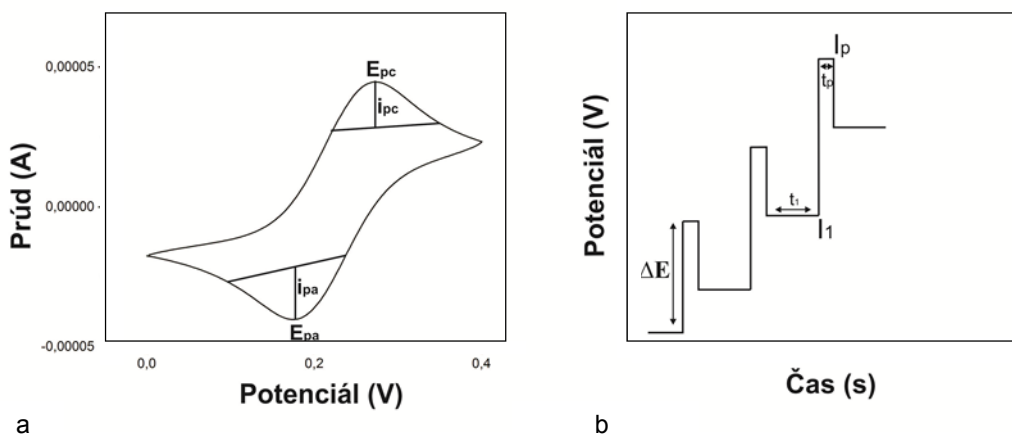
Diferenčná pulzná voltametria (DPV) skenuje potenciál so sériami pulzov. Predchodcom DPV je metóda nazývaná normálna pulzná voltametria (NPV), pri ktorej sa postupne aplikuje séria pulzov so zvyšujúcou amplitúdou v predvolenom časovom intervale. Pri DPV sú všetky po-

tenciálové pulzy fixované s malou amplitúdou od 10 do 100 mV a sú zvyšované pomaly rastúcim základným potenciálom. Prúd je meraný v dvoch bodoch pre jednotlivé pulzy, prvý bod je pred aplikáciou pulzu a druhý bod je po skončení pulzu¹⁷. V DPV je dĺžka druhého pulzu o mnoho kratšia ako dĺžka prvého, pri SWV dĺžka oboch pulzov je rovnaká (obr. 3b)¹⁸.

Signál pri voltametrii štvorcových vln (SWV) sa skladá zo symetrických štvorcových vlnových pulzov, umiestnených na schodiskových vlnách zo stúpajúceho základného potenciálu. Oxidácia a redukcia látok je zaregistrovaná ako pík, alebo cez signál prúdu je zaznamenaný potenciál, pri ktorých sa látka oxiduje alebo redukuje. Prúd je meraný na konci zmien potenciálu, hneď pred ďalšou nastupujúcou zmenou, tým sa zníži príspevok kapacitného prúdu k meranému prúdu. SWV má niekoľko výhod – metóda je veľmi citlivá a je schopná potláčať rušivé prúdy. Ďalšou výhodou tohto typu voltametrie je jej rýchlosť¹⁹. Analýza pomocou SWV trvá niekoľko sekúnd, pri DPV sa dá získať výsledok behom pár minút²⁰.

Chronoampérometria je skoková potenciálová metóda. V experimente s jedným skokom aplikujeme potenciál na pracovnú elektródu a útlm prúdu je hneď meraný ako funkcia času. Pri dvojskokovom experimente je potenciál aplikovaný symetricky okolo formálneho potenciálu redoxného centra analytu. Ak je formálny potenciál redoxného centra analytu 0,0 V, prvý a druhý aplikovaný potenciál budú mať hodnotu +0,05 V a –0,05 V. Dôležitým aspektom je dĺžka času medzi potenciálovými skokmi, ktorá musí zabezpečiť úplný útlm prúdu pred ďalším skokom¹⁶.

Nanotrúbkové field effect tranzistory (NTFET), pri ktorých uhlíkové nanorúrky majú úlohu ako vodiace kanáliky medzi dvoma elektródami, sú udržiavané pri konštantnom predpätí²¹. Stavba NTFET senzorov je založená na vysokej citlivosti polovodivých uhlíkových nanorúrok voči zmene náboja v ich bezprostrednej blízkosti. Na NTFET senzoroch sú všetky atómy na povrchu uhlíkových nanorúrok vystavené okoliu tak, aby aj malé zmeny náboja v prostredí spôsobili významné zmeny v elektrických



Obr. 3. Grafické znázornenie voltametrických detekčných metód, a) cyklická voltametria, b) diferenčná pulzná voltametria

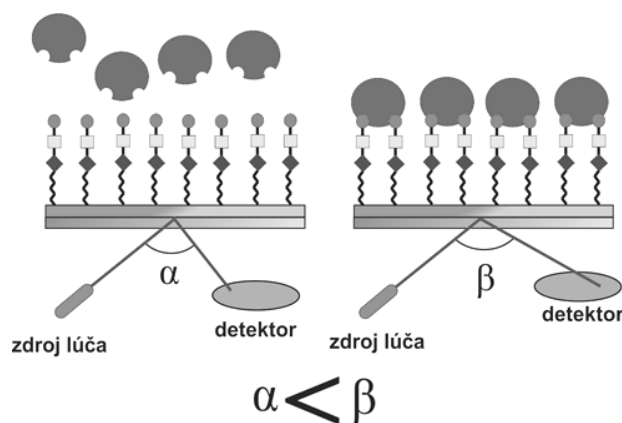
vlastnostiach nanorúrok. Veľké množstvo organických, anorganických a biologických materiálov môže byť aplikovaných na funkcionalizáciu povrchu uhlíkových nanorúrok. Kovalentné modifikácie nanorúrok spôsobujú defekty v povrchu, ktoré môžu obmedzovať elektrické vlastnosti senzora, z tohto dôvodu sa častejšie využívajú nekovalentné modifikácie. Mnoho syntetických polymérov a biomolekúl zahrňujúce DNA, polysacharidy, enzýmy, protilátky, baktérie a bunky môžu byť adsorbované alebo inkubované na povrch cez hydrofóbne alebo π - π interakcie. Významnú aplikáciu NTFET senzorov pre detekciu glykán-proteínových interakcií zaznamenal Star a spol.^{7,22}, ktorí urobili FET senzor obsahujúci sieť glykokonjugátových uhlíkových nanorúrok, ktorý dobre demonštroval špecifickú väzbu bakteriálnych lektínov²³. V porovnaní s inými mechanickými stratégiami, ako je napr. QCM, tieto elektrochemické metódy dávajú lepšiu možnosť znižovať rušivé signály, ich citlivosť však priamo závisí od čistoty polovodivých nanorúrok⁷.

Nanoporové senzory zaznamenávajú signál pri prechode rôznych analytov cez nanopóry tak, že prúdový signál zaznamená väzobné udalosti cez čiastočné blokovanie iónového prúdu²⁴. Rôzne rozpoznávacie molekuly môžu byť umiestnené do dutiny pórov na dobu dostatočnú pre sledovanie interakcií. Väzobné interakcie medzi rozpoznávacou a cieľovou molekulou spôsobujú zmeny v prúde, ktoré umožňujú kvantifikáciu a identifikáciu skúmaných molekúl²⁵.

3.3. Optické detekčné metódy

Povrchová plazmónová rezonancia (surface plasmon resonance, SPR) je optická technika pre analýzu kinetiky biomolekulárných interakcií bez nutnosti značenia. Najčastejšie je používaná ako optická metóda pre meranie indexu lomu na rozhraní tenkej vodivej vrstvy (napr. napareného zlata) a prizmy. Pri SPR je väzobný ligand naviazaný väčšinou na zlatý povrch a druhá väzobná molekula je transportovaná na povrch prietokovým systémom pomocou jedného alebo viacerých kanálov. Index lomu povrchu sa zmení po obsadení naviazaných ligandov (obr. 4)²⁶. SPR je kolektívna oscilácia povrchových elektrónov (plazmónov) pozdĺž povrchu rozhrania indukovaná dopadajúcim žiarením, čím dochádza k vzniku tzv. miznúceho poľa, ktoré je veľmi citlivé na zmenu indexu lomu v blízkosti zlatého povrchu²⁷.

Bežný SPR experiment má tri fázy: 1. asociácia, 2. disociácia a 3. regenerácia. V asociáčnej fáze je analyt s konštantnou koncentráciou zavedený na povrch. V disociáčnej fáze sa už nepridáva analyt, povrch sa premyje mobilnou fázou (tlmivým roztokom). Regeneračná fáza zabezpečí odstránenia naviazaného analytu a teda prípravu na ďalšie meranie. Tieto fázy sú replikované s rôznymi koncentraciami analytu pre stanovenie jej väzobnej kinetiky k povrchovým ligandom. Výhodou SPR je, že je schopná stanoviť rozsiahlu škálu afínit (od pM do mM), je schopná stanoviť kinetické konštanty a analyzuje vzorky v reálnom čase. SPR vyžaduje na imobilizáciu iba



Obr. 4. Znáznornenie princípu detekcie povrchovej plazmónovej rezonancie

1–5 μg vzorky. Nevýhodou povrchovej plazmónovej rezonancie je, že analyt musí mať výraznú hmotnosť, aby došlo k zmenám v indexe lomu, preto sa najčastejšie využívajú proteíny ako analyt a glykány sa viažu na povrch. Limitovaný transport analytu na povrch môže ovplyvniť meranie kinetických parametrov⁷. Suenaga a spol. analyzovali pomocou SPR väzbu hemagglutínínu (trimerický glykoproteín nachádzajúci sa na membráne vírusov chrípky) ku povrchu pokrytému glykánmi, ktoré obsahovali ako terminálnu skupinu kyselínu sialovú. Vyvinuli metódu, ktorá sa môže použiť na detekciu vírusov chrípky²⁸.

4. Záver

Glykánové biočipy a biosenzory v posledných rokoch našli svoje uplatnenie vo viacerých vedných odboroch. Majú tendenciu stáť sa užitočným nástrojom pre štúdium interakcií medzi glykánmi a proteínmi, čo by sa dalo využiť napr. na rýchlu a presnú detekciu rôznych chorôb a infekcií. Pre dosiahnutie vysokého výkonu biočipov a biosenzorov je veľmi dôležité zvoliť si vhodnú detekčnú metódu. Fluorescenčná detekcia predstavuje jednoduchú možnosť ako sledovať zmeny prebiehajúce na povrchu biočipu, avšak použitie rôznych značiek má svoje nevýhody, ako napr. zmena väzobných vlastností proteínu. V súčasnosti sa vo väčšej miere začali používať detekčné metódy bez značenia, ktoré sú schopné sledovať interakcie medzi glykánmi a proteínmi s vysokou citlivosťou bez toho, aby spôsobili zmenu v štruktúre analytu. Citlivosť detekčných metód je silne závislá od konštrukcie glykánových biočipov a biosenzorov. Je veľmi dôležité, aby povrch biočipov a biosenzorov bol pripravený tak, aby sa čo najviac obmedzila možnosť vzniku nešpecifických interakcií, ktoré môžu skresliť výsledok merania.

Tato publikácia bola vytvorená v rámci projektov APVV-0282-11, VEGA 2/0127/10 a ERC 311532.

LITERATÚRA

1. Park S., Gildersleeve J. C., Blixt O., Shin I.: *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4310 (2013).
2. Zhou X., Zhou J.: *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1451 (2006).
3. Lonardi E., Balog C.I., Deelder A.M., Wuhler M.: *Expert Rev. Proteomics* **7**, 761 (2010).
4. Baader J., Klapproth H., Bednar S., Brandstetter T., Rühle J., Lehmann M., Freund I.: *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1839 (2011).
5. Song E. H., Pohl N. L.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 626 (2009).
6. Fe Y. I., Sun Y. S., Li Y., Lau K., Yu H., Chokhawala H. A., Huang S., Landry J. P., Chen X., Zhu X.: *Mol. Biosyst.* **7**, 3343 (2011).
7. Reuel N. F., Mu B., Zhang J., Hinckley A., Strano M. S.: *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5744 (2012).
8. Zhang J., Lang H. P., Huber F., Bietsch A., Grange W., Certa U., McKendry R., Guntherodt H. J., Hegner M., Gerber C.: *Nat. Nanotechnol.* **1**, 214 (2006).
9. Gruber K., Horlacher T., Castelli R., Mader A., Seeburger P. H., Hermann B. A.: *ACS Nano* **5**, 3670 (2011).
10. Whited A. M., Park P. S.-H.: *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 56 (2014).
11. Chang K.-Ch., Chiang Y.-W., Yang Ch.-H., Liou J.-W.: *Tzu Chi Med. J.* **24**, 162 (2012).
12. Suni I. I.: *Trends Anal. Chem.* **27**, 604 (2008).
13. Vedala H., Chen Y. A., Cecioni S., Imberty A., Vidal S., Star A.: *Nano Lett.* **11**, 170 (2011).
14. Li W. W., Claridge T. D. W., Li Q. H., Wormald M. R., Davis B. G., Bayley H.: *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1987 (2011).
15. Chen S. H., Yuan R., Chai Y. Q., Min L. G., Li W. J., Xu Y.: *Electrochim. Acta* **54**, 7242 (2009).
16. Eckermann A. L., Feld D. J., Shaw J. A., Meade T. J.: *Coord. Chem. Rev.* **254**, 1769 (2010).
17. Settle F. A.: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, Arlington 1997.
18. Laborda E., Molina A., Martinez-Ortiz F., Compton R. G.: *Electrochim. Acta* **73**, 3 (2012).
19. Lovric M., Komorsky-Lovric S.: *Int. J. Electrochem.* **2012**, 1 (2012).
20. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH, New York 2000.
21. Star A., Gabriel J. C. P., Bradley K., Gruner G.: *Nano Lett.* **3**, 459 (2003).
22. Liu S., Shen Q., Cao Y., Gan L., Wang Z. X., Steigerwald M. L., Guo X. F.: *Coord. Chem. Rev.* **254**, 1101 (2010).
23. Vedala H., Chen Y. A., Cecioni S., Imberty A., Vidal S., Star A.: *Nano Lett.* **11**, 170 (2011).
24. Bayley H., Cremer P. S.: *Nature* **413**, 226 (2001).
25. Gu L. Q., Braha O., Conlan S., Cheley S., Bayley H.: *Nature* **398**, 686 (1999).
26. Yakes B. J., Papafragkou E., Conrad S. M., Neill J. D., Ridpath J. F., Burkhardt W., Kulka M., Degrasse S. L.: *Int. J. Food. Microbiol.* **162**, 152 (2013).
27. Pirvu C., Manole C. C.: *Electrochim. Acta* **89**, 71 (2013).
28. Suenaga E., Mizuno H., Penmetcha K. K. R.: *Biosens. Bioelectron.* **32**, 195 (2012).

A. Hushegyi, T. Bertók, J. Tkáč (*Slovak Academy of Science, Institute of Chemistry, Bratislava*): **Detection Methods for the Study of Glycan-Protein Interactions**

Glycan biochips and biosensors are potentially important tools for detection of glycan – protein interactions. Among several applications they can be used for rapid and precise diagnosis of various diseases and infections. Two major detection techniques available for construction of glycan biochips and biosensors – fluorescent labelled and label-free methods are discussed.