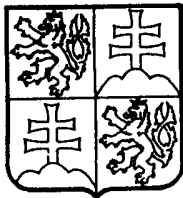


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 01927-91.K

(13) A3

5(51) C 12 N 11/14

(22) 24.06.91

(32) 29.06.90

(31) 90/546101

(33) US

(40) 19.02.92

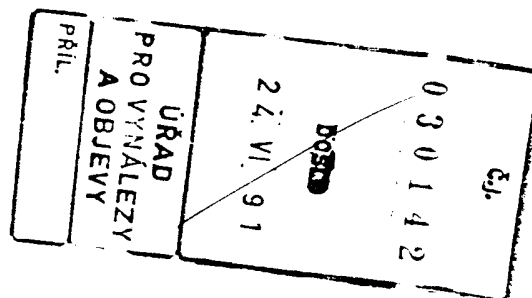
(71) Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana, US

(72) Kirk Willis Johnson, Indianapolis, Indiana, US

(54) Způsob imobilizace biomolekul

(57) Způsob imobilizace biomolekul na vodivém substrátu, při kterém se připravuje roztok alespoň jednoho druhu namášené biomolekuly dostatečně pufrovaný k předcházení denaturace biomolekul a k dosažení stejného znaménka elektrického náboje. Do roztoku se ponoří biosensorová elektroda a elektroda s opačným nábojem, mezi oběma elektrodami se vytvoří potenciálový rozdíl menší než 1 V, přičemž se potenciál mění k udržení v podstatě konstantního proudu mezi elektrodami, dostatečného k vytvoření migrace biomolekul a k jejich namášení na biosensorovou elektrodu v požadované tloušťce filmu.

Způsob imobilizace biomolekul



Oblast techniky

Vynález se týká způsobu imobilizace biomolekul na vodivém substrátu. Především se vynález týká způsobu elektrodepozice biomolekul, jako jsou enzymy a protilátky, na vodivém substrátu s následným chemickým sesítním biomolekul za vytvoření ve vodě nerozpustné hmoty.

Dosavadní stav techniky

Imobilizace biomolekul na substrátu je důležitá pro četné běžné analytické nebo průmyslové účely využívající biomolekul. Imobilizací se převádějí typicky ve vodě rozpustné biomolekuly, jako jsou enzymy nebo protilátky, na komplexy ve vodě nerozpustné vázáním alespoň nějakých molekul na fyzikální nosičový materiál, nerozpustný ve vodě. Takto imobilizovaných biomolekul se často může používat pro četné účely beze změny jejich koncentrace nebo účinnosti v závislosti na čase. Imobilizace má tu přídatnou výhodu, že se biomolekuly mohou uchovávat toliko ve specifických žádaných oblastech zařízení nebo čidla /=sensoru/ za minimalizace materiálových nákladů a za maximalizace zjistitelné biologické účinnosti.

Důležité analytické použití imobilizovaných biomolekul, například enzymů, protilátek nebo glykoproteinů jako lecitinů, je v biosenzorech, kterých se používá pro zjišťování přítomnosti nebo koncentrace vybraných fyziologických molekul jakožto výsledek vzájemného působení fyziologického ligandu a imobilizovaných biomolekul. Dosud bylo však obtížné přizpůsobit známé imobilizační techniky se zřetelem na použití ve spojení s miniaturními elektrochemickými biosenzory, vyráběnými běžnými způsoby výroby polovodičů. Současné techniky z oblasti polovodičů umožňují výrobu čidla s povrchem tak malým, jako je  $1,0 \mu\text{m}^2$ . Tento malý rozměr představuje při konstrukci čidla obtíže, jelikož výroba biosenzorů obecně vyžaduje

ukládání biomolekuly jediné na povrchu pracovní elektrody, které se používá k monitorování produktu enzymatické reakce. Biomolekuly, uložené na jiném povrchu biosenzoru, by reagovaly za vzniku produktu, který by nemohl být stanoven, čímž přicházejí nazmar často drahé biomolekuly.

Způsobem předcházení problémům při ukládání biomolekul je elektroforeza k podpoře migrace nabitých biomolekul, například proteinů, amfipatických lipidů nebo nukleinové kyseliny. Ve vhodném prostředí mají takové biomolekuly pozitivně nebo negativně nabitý podíl, který je přitahován na pole s opačným nábojem ve vytvořeném elektrickém poli. Migrace biomolekul v prostředí směrem k elektrodě s opačným nábojem, než má biomolekula a její ukládání na takové elektrodě, je podporována vytvořením potenciálu v prostředí mezi dvěma elektrodami.

Způsoby elektroforetického ukládání popisuje například Ikariyama a kol., J. Electrochem. Soc., 136/6/, str. 702 až 706, 1989/. Při tomto popisovaném způsobu se současně ukládají platinové částice a glukosoxidasa jakožto enzym. Při hodnotě pH, při které dochází normálně k platinizaci, má glukosoxidasa čistě pozitivní náboj, jelikož hodnota pH je nižší než její isoelektrický bod 4,3. Glukosoxidasa je proto přitahována k elektrodě s opačným nábojem spolu s ionty platiny. K podpoře stability uloženého enzymu se čidlo ponoří do roztoků albuminu a glutaraldehydu k sesítní molekul. Tento způsob však může vést k deaktivaci enzymu, jelikož se pro podporu současného ukládání enzymu používá poměrně nízké hodnoty pH.

Aizawa a kol., J. Chem. Soc. Japan /Nippon Kagaku Kaishi, 11, str. 2210 až 2213, 1987/ popisují vývoj způsobu elektrolytického ukládání glukosoxidasy. Glukosoxidasa se absorbuje na povrchu platinové elektrody za řízeného potenciálu z vodného roztoku. Jakožto optimální podmínky pro ukládání glukosoxidasy se uvádí 0,1 V, Ag/AgCl a pH 3. Maximální tloušťka, dosahovaná tímto způsobem, jsou vrstvy tlusté 4 molekuly glukosoxidasy, což je ekvivalentní tloušťce filmu glukosoxidasy přibližně maximálně  $56 \times 10^{-9}$  m. Způsob se

zkoušel při hodnotách pH 3 až 9, přičemž se optimálního ukládání dosáhlo při hodnotě pH 3. Mimořádně tenká vrstva, nanesená tímto způsobem, je nepřiměřená pro mnohé účely, kdy se vyžaduje vzájemné působení ligandu a biomolekuly nijak omezenou reakcí. Dalším nedostatkem je omezená životnost a nová použitelnost tenkých vrstev imobilizovaných molekul.

Úkolem vynálezu je proto vyvinout způsob ukládání a imobilizace poměrně tlusté vrstvy molekul na vodivém substrátu pro dosažení neomezeného působení ligandu a biomolekuly.

Úkolem vynálezu je také vyvinout způsob reprodukovatelného a přesného ukládání a imobilizace biomolekul na miniaturních elektronických čidlech. Rovněž je úkolem vynálezu vyvinout způsob současného ukládání a imobilizace četných různých biomolekul na vodivém substrátu.

Přídavně je úkolem vynálezu vyvinout způsob ukládání a imobilizace biomolekul způsobem, který by vedl k vrstvám o tloušťce  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  m.

### Podstata vynálezu

Podstata způsobu imobilizace biomolekul a zvláště přípravy biosenzorové elektrody s biomolekulární složkou podle vynálezu spočívá v tom, že se připravuje roztok alespoň jednoho druhu biomolekuly určené k nanášení, dostatečně pufovaný k předcházení denaturace biomolekul a na hodnotu, kdy všechny biomolekuly, určené k nanášení, mají stejné znaménko čistého elektrického náboje v důsledku svých isoelektrických bodů, do roztoku se ponoří biosenzorová elektroda a elektroda s opačným nábojem, mezi biosenzorovou elektrodou a elektrodou s opačným nábojem se vytvoří potenciální rozdíl menší než 1 V, přičemž se potenciál mění k vytvoření v podstatě konstantního proudu mezi elektrodami, dostatečného k vytvoření migrace biomolekul určených pro ukládání na biosenzorové elektrodě a na hromadění na ní.

Mezi oběma elektrodami se vytváří potenciálový rozdíl 100 minivoltů až 1 volt. Když se na biosenzorové elektrodě

dosáhne žádané tloušťky nánosu, může se stabilita nanoseného filmu biomolekul podpořit jeho sesítním vhodným sesítujícím činidlem.

Při výhodných provedeních způsobu podle vynálezu je roztok, obsahující biomolekuly vodný a proud mezi biosensorovou elektrodou a elektrodou s cpačným nábojem se volí přibližně  $5 \text{ mA/cm}^2$ . Napětí se upravuje směrem nahoru v průběhu procesu ukládání k udržení konstantního proudu přesto, že vzrůstá elektrický odpor biosensorové elektrody v důsledku ukládání biomolekulárního filmu. Ukládání biomolekul pokračuje tak dlouho, až je střední tloušťka filmu na biosensorové elektrodě větší než 5 mikrometrů.

Výhodou způsobu podle vynálezu je jeho široká použitelnost pro vodivé substráty s nejrůznější geometrií. Jelikož je ukládání biomolekul na elektroforetickém základu, mohou se biomolekuly ukládat skutečně na jakémkoliv vodiči nebo polovodiči, nezávisle na jeho tvaru nebo topografii. Například se mohou rovnoměrně biomolekulárním filmem povlékat povrchy velmi drsného vodiče nebo se mohou velmi snadno biomolekuly ukládat uvnitř vodivého materiálu například v platinové trubce a mohou se vkládat do systému pro analytické účely. Na rozdíl od mnohých jiných způsobů ukládání filmu je u takových elektroforetických způsobů ukládání biomolekul lokalizováno, přičemž se žádaná biomolekula ukládá jen v blízkosti vodivého substrátu.

Jinou výhodou způsobu podle vynálezu jsou poměrně tlusté vrstvy biomolekul, které se mohou ukládat na biosensorovou elektrodu. Mnohá fyziologická použití zahrnují vzájemné působení mezi relativně velkým množstvím zvláštního fyziologického ligandu, který se má zjistit, a biomolekulou, uloženou na biosensorové elektrodě. Velmi tenké monomolekulární filmy nebo filmy mající tloušťku mnohem menší než 1 mikrometr, mohou způsobit reakci mezi fyziologickým ligandem a biomolekulou omezenou v důsledku malého množství biomolekul dostupných

pro reakci, v důsledku klesající citlivosti senzoru a pro nelineární vztah vzájemného působení /mezi biomolekulou a ligandem/, což vše může znesnadňovat stanovení množství ligandu, obsaženého v roztoku.

Jiná výhoda způsobu podle vynálezu vyplývá z použití konstantního proudu v průběhu ukládání na biosensorovou elektrodu. To vede ke stálému ukládání biomolekul na biosensorové elektrodě i když biomolekulární nános blokuje povrch elektrody a nejzáže vzroste elektrický odpor. Jelikož odpor biosensorové elektrody vzrůstá v průběhu procesu ukládání jak proud tak rychlost ukládání biomolekuly by zpravidla klesaly pokud by se postupně nezvyšovalo napětí. Tento pokles rychlosti ukládání by pokračoval tak dlouho, až by již k žádnému ukládání nedocházelo, i kdyby byl ukládaný film méně tlustý, než je požadováno. Na rozdíl od toho zůstává proud konstantní a způsob podle vynálezu umožňuje zvyšování napětí se vzrůstajícím odporem tak dlouho až se napětí přiblíží hodnotě, při které se voda buď oxiduje nebo redukuje za vzniku plynových bublinek, čímž se podporuje vytváření filmů o tloušťce větší než 10 mikrometrů.

Jinou předností způsobu podle vynálezu je použitelnost při hodnotách pH srovnatelných s fyziologickými hodnotami pH, při kterých se biomolekula vytváří. Velmi tlusté filmy bílkovinových biomolekul, například enzymů, se mohou ukládat při fyziologických hodnotách pH /7,4/ ve vodných roztocích, čímž se snižuje na minimum nebezpečí ztráty účinnosti nebo denaturace enzymu, k čemuž může docházet při jiných způsobech ukládání enzymových filmů.

Výhody a přednosti způsobu podle vynálezu vyplynou pracovníkům v oboru také z následujícího popisu příkladných provedení, která však vynález nijak neomezují.

Pro názornost je na obr. 1 schéma zařízení pro elektrodpozici biomolekul na biosensorovou elektrodu, ponořenou do kapaliny, obsahující nanášenou biomolekulu.

Na obr. 1 je zařízení 10 pro elektrodepozici, vhodné pro provádění způsobu podle vynálezu. Zařízení 10 zahrnuje nádobu 12, určenou pro kapalinu 30. Kapalinou 30 může být buď roztok nebo suspenze obsahující biomolekulu, určenou k nanášení. Zdroj 14 elektrické energie má +vodič 16, spojený s biosensorovou elektrodou 22 a -vodič 18, spojený s elektrodou 20 s opačným nábojem, který dodává v podstatě konstantní proud mezi elektrodou 20 a elektrodou 22. Biosensorová elektroda 22 vytváří část biosensorové jednotky 25, která zahrnuje biosensorovou elektrodu 22 a elektricky nevodivý substrát 24. +Vodič 16 a -vodič 18 jsou elektricky stíněny nevodivým materiálem, schopným vydržet ponoření do kapaliny 30.

Směr toku proudu se může obrátit popřípadě přepnutím spojů +vodiče 16 a -vodiče 18 na zdroji 14 elektrické energie, čímž získá +vodič 16 negativní náboj a -vodič 18 pozitivní náboj. Jelikož je jak +vodič 16 tak -vodič 18 stíněn a substrát 24, obklopující biosensorovou elektrodu je konstruován z nevodivého materiálu, ukládání biomolekulárních látek, obsažených v kapalině 30, probíhá jen na elektrodě 20 nebo na elektrodě 22 s opačným nábojem než je náboj biomolekuly v kapalině 30.

Jakožto biomolekuly, vhodné pro ukládání na elektrodě 20 nebo na elektrodě 22 se uvádějí, nikoliv však jako nějaké omezení, nýbrž příkladně, následující třídy přírodně se vyskytujících nebo uměle syntetizovaných molekul nebo molekulových skupení, která mohou být složkami biologických systémů: peptidy, oligopeptidy, bílkoviny, apoproteiny, glykoproteiny, antigeny a jejich protilátky, fragmenty protilátek, hapteny a jejich protilátky, receptory a jiné membránové proteiny, analogy proteinů, ve kterých alespoň jedna nepeptidová vazba nahrazuje peptidovou vazbu, enzymy a enzymové prekursory, koenzymy, enzymové inhibitory, aminokyseliny a jejich deriváty, hormony, lipidy, fosfolipidy, glykolipidy, liposomy, nukleotidy, oligonukleotidy, polynukleotidy a jejich v oboru známé a biologicky účinné analogy a deriváty včetně například: methylovaných polynukleotidů a nukleotidových analogů mají-

cích fosforthioátové vazby; plasmidů, kosmidů, umělých chromosomů, jiných vektorů nukleinových kyselin; antisenspolynukleotidů včetně v podstatě komplementárních k alespoň jedné endogenní nukleinové kyselině nebo majících sekvence opačné se zřetelem k alespoň částem vybraných virálních nebo retrovirálních genomů a jakýchkoliv jiných biologicky aktivních molekul. Všechny shora uvedené biomolekuly, mající slabou nebo neexistující polaritu nebo indukovatelnou polaritu za podmínek v zařízení 10, se mohou kovalentně vázat na nosič se vhodným nábojem za vzniku komplexu s nábojem, který se může ukládat na elektrodě 20 nebo na elektrodě 22.

Jednotlivé ze shora uvedených tříd biomolekul a jejich jakékoliv kombinace se mohou vnášet do roztoku nebo do suspenze jakožto koloidní částice do kapaliny 30 způsobem závislým na složení kapaliny 30. Obecně je kapalinou 30 vodný roztok, jako je fyziologický roztok, schopný vést elektrický proud. Popřípadě se do kapaliny 30 mohou přidávat přísady, jako jsou povrchově aktivní látky a protipěnicí přísady.

Směr, rychlost migrace a rychlost ukládání biomolekul původně v roztoku nebo suspendovaných v kapalině 30 na elektrodu 20 a na elektrodu 22 se může řídit velmi citlivě vhodným nastavením hodnoty pH kapaliny 30. Toto řízení je založeno na použití běžných elektroforetických technik použitelných na permanentně nabitě podíly, což poskytuje biomolekule čistý náboj v kapalině 30 v závislosti na hodnotě pH kapaliny 30. Hodnota pH, při které má molekula nulový čistý negativní náboj a proto nemigruje působením elektrického pole, je definována jakožto její isoelektrický bod. Při větší hodnotě pH, než je isoelektrický bod, má molekula čistý negativní náboj; naopak při hodnotě pH menší, než je isoelektrický bod, má molekula čistý pozitivní náboj. Proto se v zařízení podle obr. 1 hodnota pH kapaliny 30 nastavuje na hodnotu vyšší než isoelektrický bod nebo na hodnotu nižší než isoelektrický bod příslušné biomolekuly, která se má ukládat na elektrodu 20 nebo 22. Toto nastavení hodnoty pH je možné použitím o sobě známých kyselin nebo alkálií.

Sesíťující činidla se do roztoku zavádějí buď současně s biomolekulou nebo po jejím uložení na elektrodě 20 nebo 22 a jsou vhodné pro podporu vytvoření v podstatě ve vodě nerozpustných nanosených hmot na elektrodách. Sesíťující činidla zahrnují obecně polyfunkční můstkovací skupiny, schopné kovalentní vazby s žádanou biomolekulou, mohou však také zahrnovat ozáření nebo jiná činidla, která podporují vytvoření kovalentní vazby mezi biomolekulami bez skupin vytvářejících můstky. Druh používaného sesíťujícího činidla závisí na případně nanášené biomolekule; jakožto příklady sesíťujících činidel se uvádějí: silanová činidla, alkylaminová kopulační činidla, isothiokyanátová kopulační činidla, triazinová kopulační činidla, azokopulační činidla, fenylylhydrazinová kopulační činidla, karbodiimidová kopulační činidla a kopulační činidla na bázi chloridu kyseliny. Při způsobu podle vynálezu je obzvláště vhodné používání glutaraldehydu, jakkoliv se může používat jiných kopulačních činidel ze souboru zahrnujícího například 4-azidofenacylbromid, benzofenon-3,3'-4-4'-tetrakarboxylovou kyselinu ve formě dianhydridu, biotin-N-hydroxysukcinimidester, biotin-4-nitrofenylester, 2,2'-bichinolon-4,4'-dikarboxylovou kyselinu, bis/4-fluor-3-nitrofenyl/sulfon, 1,5-bis/sukcinimidoxykarbonyloxy/pentan, 4-/BOC-aminomethyl/fenylisothiokyanát, N-BOC-1,6-diaminohexanhydrochlorid, brompyrohroznovou kyselinu, kyanurchlorid, 4,4'-diazidostilben-2,2'-disulfonovou kyselinu ve formě dvojsodné soli, dianhydrid diethylentriaminpentaoctové kyseliny, diethylenpyrokarbonát, 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen, 1,6-diisokyanohexan, 4,4'-diisothiokyanátstilben-2,2'-disulfonovou kyselinu ve formě dvojsodné soli, dimethyladipimidátdihydrochlorid, N-/dimethylaminopropyl/-N'-ethylkarbodiimidhydrochlorid, dimethyl-3,3'-dithiodipropionimidátdihydrochlorid, dimethylpumelindiimidátdihydrochlorid, dimethylsuberimidátdihydrochlorid, 3,3'-dithiodipropionová kyselina ve formě bis/N-hydroxysukcinimidester/u, 4-fluor-3-nitrofenylazid, formaldehyd, fumaronitril, glutaraldehyd, glutaronitril, glykolaldehyd, hexamethylendiisokyanát, 6-hydroxy-2-naftyldisulfid, 3-/4-hydroxyfenyl/propionová kyselina ve formě N-hydroxysukcin-

imidesteru, 2-iminothiolanhydrochlorid, 4-maleimidobutyraminomethylpolystyren, N,N'-/1,4-fenylen/dimaleimid, polyethylenglykol-600-dikyselina, N-sukcinimidyl-3-/2-pyridylthio/propionát, N-sukcinimidyl-3-maleimidobenzoát, N-sukcinimidyl-4-maleimidobutyrate, N-sukcinimidyl-6-maleimidokaproát, N-sukcinimidyl-3-maleimidopropionát, thiodiethylenglykol, toluylen-2,4-diisokyanát a m-xylylendiisokyanát. Uvedených bivalentních sesíťovacích činidel lze tedy používat.

Biosensorových elektrod, vyrobených způsobem podle vynálezu, lze používat pro nejrozličnější molekulární detekční systémy včetně amperometrických elektrochemických biosensorů, kalorimetrických, akustických, potenciometrických a optických biosensorů a biosenzorů na bázi ISFET.

Vynález blíže objasňuje, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení.

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

Připraví se hmotnostně 5% roztok glukosidasy za použití fosfátem pufovaného solankového roztoku /hodnota pH 7,4/ jakožto rozpouštědla. Glukosidasa se pečlivě rozpustí v solankovém roztoku za mírného míchání, přičemž se míchání pečlivě provádí, aby se předešlo pění roztoku, které by mohlo vést k denaturaci glukosidasy. Elektrodepoziční zařízení se naplní připraveným roztokem a do roztoku se ponoří biosensorová elektroda, na kterou se má enzym ukládat, spolu s elektrodou s opačným nábojem. Proveďte se elektrické propojení s galvanostatem a proud se udržuje na konstantní hustotě  $5 \text{ mA/cm}^2$  na povrchu elektrody. Tok proudu se řídí ve směru, který vede k pozitivnímu čistému náboji na povrchu elektrody k vázání negativně nabitých molekul glukosidasy. Proud je zapojen na dvě minuty. V průběhu ukládání nemá napětí přestoupit 0,5 V. Elektroda se pak vyjme z enzymového roztoku a ponoří se do deionizované, destilované vody bez míchání

na dobu 5 sekund k odstranění zbytkové glukosoxidasy.

Elektroda se pak ponoří do roztoku obsahujícího objemově 2,5 % glutaraldehydu v solance pufované fosfátem /hodnota pH 7,4/ na dobu 30 minut ke kovalentnímu sesítní glukosových molekul a k vytvoření hmoty nerozpustné ve vodě. Elektroda se pak ponoří do deionizované, destilované vody na dobu 5 sekund a nechá se schnout na vzduchu po dobu 30 minut.

Zjištěno po zaschnutí, že vrstva glukosoxidasy, uložená na elektrodě, má tloušťku přibližně 1,5  $\mu\text{m}$ . Následující zkouškou zjištěno, že sesítní glutaraldehydem je účinné k předcházení převodu glukosoxidasy zpět do roztoku. Zjišťuje se, že v tomto bodu je enzymatická složka biosensoru funkční.

#### Příklad 2

Je také možné současné ukládání dvou nebo několika biomolekul na povrchu elektrody za podmínky, že jejich isoelektrické body jsou vždy vyšší nebo nižší než hodnota pH deponičního roztoku. V tomto případě se připraví solankový roztok pufovaný fosfátem /hodnota pH 7,4/, obsahující hmotnostně 5 % glukosoxidasy a 5 % albuminu. Glukosoxidasa a albumin mají hodnoty isoelektrického bodu 4,3 a 4,7, takže obě molekuly mají negativní náboj při hodnotě pH roztoku 7,4. Na elektrodě se použije hustoty proudu 5  $\text{mA}/\text{cm}^2$  po dobu dvou minut při jejím ponoření do roztoku glukosoxidasy a albuminu. Molekuly se sesítí v glutaraldehydovém roztoku, jak je popsáno v příkladu 1, načež se elektroda opláchne a vysuší. Vzniklá vrstva glukosoxidasy a albuminu má tloušťku přibližně 5  $\mu\text{m}$ . Při dlouhodobé zkoušce glukosoxidasové účinnosti se pozoruje, že vrstva glukosoxidasy a albuminu je výrazně stálejší než vrstva toliko glukosoxidasy, vytvořená způsobem podle příkladu 1.

#### Příklad 3

Připraví se roztok 2,4 mg/ml králičí antifluoresceinové

protilátky /afinita čištěno/ za použití borátového puřrového roztoku /hodnota pH 9,0/. Hodnota pH se volí se zřetelem na udržení maximální pojící účinnosti protilátky. Elektrodepoziciční nádoba se naplní připraveným roztokem a vloží se biosensorová elektroda, na které se má ukládat protilátka a do roztoku se rovněž ponoří elektroda s opačným nábojem. Proveď se elektrické propojení s galvanostatem a proud se udržuje na konstantní hustotě  $5 \text{ mA/cm}^2$  na povrchu elektrody. Tok proudu se směruje ve směru, který vede k negativnímu čistému náboji na povrchu biosensorové elektrody k přitahování pozitivně nabitých molekul protilátky. Proud se aplikuje po dobu 50 minut. Elektroda se pak vyjme z roztoku protilátky a ponoří se do deionizované, destilované vody bez jakéhokoliv míchání na dobu 5 sekund k odstranění zbytkové protilátky.

Elektroda se pak ponoří do roztoku obsahujícího objemově 2,5 % glutaraldehydu v solance puřrované fosfátem /hodnota pH 7,4/ na dobu 30 minut ke kovalentnímu sesíťení molekul protilátky a k vytvoření hmoty nerozpustné ve vodě. Elektroda se opět ponoří do deionizované, destilované vody na dobu 5 sekund a nechá se schnout na vzduchu po dobu 30 minut. Vyšetřením elektrody zjištěno, že elektrodepozicí vzniklá vrstva protilátky má po zaschnutí tloušťku přibližně  $5,5 \text{ } \mu\text{m}$ .

Jakkoliv je tedy vynález blíže objasněn shora uvedenými příklady praktického provedení, jsou pracovníkům v oboru jasné možnosti jeho variací a modifikací v rámci vynálezu.

#### Průmyslová využitelnost

Zlepšený způsob výroby biosensorových elektrod, kterých lze používat pro nejrůznější molekulární detekční systémy.

JUDr. Otakar ŠVORČEK  
advokát

## P A T E N T O V É      N Á R O K Y

PRIL.	URAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	030142 24. VI. 91 DOSKA	čj.
-------	----------------------------------	-------------------------------	-----

1. Způsob imobilizace biomolekul a zvláště přípravy biosensorové elektrody s biomolekulární složkou, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se připravuje roztok alespoň jednoho druhu biomolekuly, určené k nanášení, dostatečně pufovaný k předcházení denaturace biomolekul a na hodnotu, kdy všechny biomolekuly, určené k nanášení, mají stejné znaménko čistého elektrického náboje v důsledku svých isoelektrických bodů, do roztoku se ponoří biosensorová elektroda a elektroda s opačným nábojem, mezi biosensorovou elektrodou a elektrodou s opačným nábojem se vytvoří potenciálový rozdíl menší než 1 V, přičemž se potenciál mění k vytvoření v podstatě konstantního proudu mezi elektrodami, dostatečného k vytvoření migrace biomolekul, určených pro ukládání na biosensorové elektrodě, a na hromadění na ní.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se mezi elektrodami udržuje v podstatě konstantní elektrický proud po dostatečnou dobu k akumulaci na biosensorové elektrodě filmu molekul o tloušťce větší než 1,0 mikrometrů.

3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se biosensorová elektroda s povlakem biomolekul ponořuje do roztoku sesíťovacího činidla v dostatečném množství a po dostatečnou dobu ke vzájemnému sesíťení biomolekul za vytvoření ve vodě nerozpustné hmoty na biosensorové elektrodě.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se pro nanášení připravuje roztok obsahující bílkovinu.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že bílkovinou je enzym.

6. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že bílkovinou je protilátka.

7. Způsob přípravy biosensorové elektrody s bílkovinou složkou, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se připravuje roztok alespoň jednoho druhu bílkoviny, určené k nanášení, dostatečně pufrovaný k předcházení denaturace bílkoviny, do tohoto roztoku se ponořuje biosensorová elektroda a elektroda s opačným nábojem, mezi biosensorovou elektrodou a elektrodou s opačným nábojem se vytvoří potenciálový rozdíl menší než 1 V, přičemž se potenciál mění k vytvoření v podstatě konstantního proudu mezi elektrodami, dostatečného k vytvoření migrace biomolekul, určených pro ukládání na biosensorové elektrodě a nános, vytvořený na biosensorové elektrodě se sesítuje sesítujícím činidlem k vytvoření ve vodě nerozpustné hmoty na biosensorové elektrodě.

8. Způsob přípravy enzymatického biosensoru, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se připravuje roztok glukosoxidasy určené na ukládání na biosensorové elektrodě, do tohoto roztoku se ponořuje biosensorová elektroda a elektroda s opačným nábojem, mezi biosensorovou elektrodou a elektrodou s opačným nábojem se vytváří potenciálový rozdíl menší než 1 V, přičemž se potenciál mění k vytváření v podstatě konstantního proudu mezi elektrodami, dostatečného k vytváření migrace glukosoxidasy určené pro ukládání na biosensorové elektrodě a hromadění na ní za vytvoření filmu o tloušťce větší než 10 mikrometrů.

JUDr. Ota ŠVORČEK  
advokát