



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260913

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 11/02

(22) Přihlášeno 11 06 85

(21) PV 4194-85

(40) Zveřejněno 15 06 88

(45) Vydáno 14 04 89

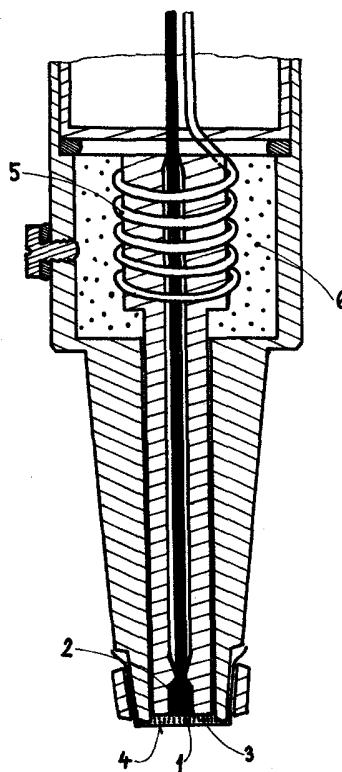
(75)

Autor vynálezu

MUSIL JAN prof. MUDr. RNDr. DrSc., PRAHA, RACEK JAROSLAV MUDr., PLZEŇ

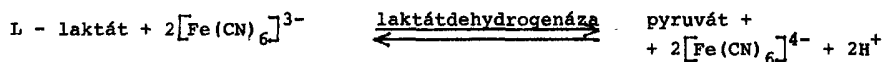
(54) Biosenzor pro stanovení laktátu

Biosenzor pro stanovení laktátu typu Clarkovy elektrody spočívá v tom, že reakční plocha platinové elektrody je zanořena do dutiny těla biosenzoru, která je překryta semipermeabilní membránou, v dutině těla biosenzoru o objemu 20 až 50 μ l jsou umístěny imobilizované kvasničné buňky.



Vynález se týká biosenzoru typu Clarkovy elektrody pro stanovení laktátu v biologických tekutinách, například v krvi a krevním séru pro potřeby medicíny a v potravinářských výrobcích.

Dosavadní způsob stanovení laktátu v biologických tekutinách je založen na stanovení účinku laktátdehydrogenasy-c-oxidoreduktasy, E.c.1.1.2.3 - označované též jako - cytochrom B₂ podle rovnice



Měří se buď fotometricky úbytek ferrikyanidu anebo ampérometricky z velikosti elektrického proudu nutného k reoxidaci reakčního produktu ferrokyanidu vzniklého ve shora uvedené reakci. Anodou je Pt-elektroda Clarkova typu spojená v článku s referenční Ag/AgCl elektrodou. Na Pt-elektrodě probíhá děj podle rovnice:



a měřený proud je úměrný koncentraci laktátu.

Dosud známé laktátové senzory založené na Clarkově elektrodě, jejíž povrch je překryt semipermeabilní membránou mají v prostoru mezi povrchem elektrody a semipermeabilní membránou umístěn enzym cytochromu B. Jejich hlavní nevýhoda spočívá v tom, že použitý enzym má pro daný účel jen omezeně vhodné vlastnosti. Dá se připravit izolací z přirozeného materiálu. Výsledkem je však nestandardní preparát, závislý extrémně na druhu použitých buněk a podmínkách kultivace. Enzym sám je oligomer, skládá se ze 4 podjednotek, který v roztoku velmi snadno tvoří dvě enzymově aktivní frakce. To značně omezuje způsob purifikace enzymu, například gelovou filtrací. Kromě toho je enzym v roztoku velmi nestálý. Údaje se rozcházejí, zřejmě podle stupně specifické aktivity výchozího preparátu od méně než 24 hodin do několika dní. Ze všech těchto důvodů jsou senzory tohoto typu omezené jen na laboratorní výzkum a nejsou vyráběny pro praktické použití.

Uvedené nevýhody odstraňuje biosenzor typu Clarkovy elektrody podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že reakční plocha platinové elektrody je zanořena do dutiny těla biosenzoru, která je překryta semipermeabilní membránou. V dutině těla senzoru o objemu 20 až 50 μl jsou umístěny imobilizované kvasničné buňky, které mohou být imobilizovány v hydrofilním gelu na bázi umělých nebo přirozených látek, například na bázi polyethylenglykolů nebo agaru a carrageenanu. V dutině těla biosenzoru mohou být umístěny lyofilizované kvasničné buňky. V dutině těla biosenzoru může být umístěn dále enzym urikaza.

Umístěním živých buněk do dutiny těla senzoru je možno dosáhnout reprodukovatelného použití po dobu nejméně jednoho měsíce. Toho je dosaženo schopností kvasničných buněk udržet si aktivitu enzymu cytochromu B₂ po dlouhou dobu, případně si ho v průběhu používání obnovovat a to i za podmínek používaných pro stanovení laktátu. Množství enzymu v suspenzi buněk přítomné, je vždy nadbytečné a není tedy limitujícím faktorem pro měření.

Takto uspořádaný buněčný laktátový senzor má zcela srovnatelné vlastnosti jako senzor enzymový. Výsledky s ním dosažené jsou naprosto stejné jako výsledky dosažené standardním spektrofotometrickým postupem a senzorem enzymovým. Suspenzi vhodných kvasničných buněk lze připravit poměrně jednoduchým způsobem z domácích zdrojů.

Biosenzor podle vynálezu je znázorněn na přiloženém výkresu. Je na bázi Clarkovy elektrody, která sestává z platinové elektrody 2 s reakční plochou 1 a referenční elektrody 5 Ag/AgCl umístěné v prostoru 6 vytvořeném v těle senzoru obsahujícím fosfátový pufr s chloridem draselným.

Reakční plocha 1 platinové elektrody 2 je zanořena do dutiny 3 těla senzoru, která je překryta semipermeabilní membránou 4. V dutině 3 těla senzoru o objemu 20 až 50 μl jsou umístěny imobilizované kvasničné buňky.

Na platinové elektrodě probíhá reoxidace ferrokyanidu vzniklého reakcí L-laktátu a ferrikyanidu za přítomnosti laktátdehydrogenázy obsažené v imobilizovaných kvasinkách.

Biosenzor lze připravit následovně:

1. Postup s prostou suspenzí buněk.

Suspenze krvinek typu *Hansenula anomala* byla pomnožena na Sabouraudově agaru a za přítomnosti laktátu za aerobních podmínek po dobu 48 hodin tak, aby absorbance buněčné suspenze činila při 740 nm v 1-cm vrstvě $A = 2,1$. Suspenze buněk byla zahuštěna odstředěním (10 minut při 1 000 g). Sediment byl resuspendován v kultivačním médiu. K přípravě biosenzoru bylo použito 20 μl této suspenze, které byly vneseny do vybrání v povrchu platinové elektrody a překryty fólií z acetylcelulózy tak, aby pod fólií nebyla bublinka vzduchu.

Takto připravený biosenzor je uchováván v roztoku 2 mmol.l^{-1} ferrikyanidu draselného rozpuštěném ve fosfátovém pufru (0,2 mmol.l^{-1} ; pH = 7,2) při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$. Vlastní stanovení laktátu v krevním séru se provádí takto: 0,3 ml séra krevního se vnese do komůrky naplněné 3 ml fosfátového pufru (0,2 mmol.l^{-1} ; pH = 7,2) s obsahem ferrikyanidu draselného (2 mmol.l^{-1}). Obsah komůrky je promícháván magnetickým míchadlem a teplota udržována na 25 $^{\circ}\text{C}$ vodou protékající pláštěm komůrky.

Během jedné minuty se mění intenzita proudu na citlivém ampérmetru. Koncentrace laktátu 1 mmol.l^{-1} odpovídá proudu 0,55 μA .

2. Postup se suspenzí kvasničných buněk imobilizovaných agarem

Příprava kvasinek se provádí jak uvedeno v postupu 1. Po zahuštění se k suspenzi přidá za tepla roztok agaru tak, aby jeho konečná koncentrace nepřekročila 1 %. Po zhomogenizování se směs nechá ztuhnout. Pro přípravu senzoru se použije část gelu o tvaru odpovídajícím vybrání v platinové elektrodě.

Za jinak nezměněných pracovních podmínek se stanovení laktátu provádí v plné žilní krvi, která byla odebrána za přidání kapky roztoku fluoridu sodného (2 mg/ml).

3. Postup se suspenzí živých kvasničných buněk s přidáním enzymem urikazou.

Příprava kvasinek se provádí jak je uvedeno v postupu 1. Po zahuštění se k buněčné suspenzi přidá enzym urikaza. Po rovnoměrném rozptýlení enzymu se k vlastní přípravě senzoru používá takto modifikovaná suspenze v množství 20 μl .

Biosenzor podle vynálezu lze použít při stanovení laktátu v krvi. Vzestup koncentrace laktátu v krvi je včasným příznakem rozvoje šoku u osob s rozsáhlými popáleninami, polytraumaty a s těžkou infekcí. Včasné rozpoznání nástupu šoku dovoluje přijmout potřebná opatření k jeho zástavě.

Vzestup koncentrace laktátu v krvi nad hranici 4,5 až 8,9 mmol.l^{-1} přežívá jen 33 % nemocných (vzestup koncentrace nad 9 až 10 mmol.l^{-1} přežívá již jen méně než 15 %). Proto je tento senzor vhodný k rychlému zjištění koncentrace laktátu v krvi u hromadně se vyskytávajících úrazů (shora uvedeného typu) jaké mohou nastat za míru, ale zejména při použití prostředků hromadného ničení ve válečném konfliktu. Použití senzoru umožní rychlé třídění nemocných s cílem poskytnout pomoc těm, kteří mají naději na přežití.

U špičkových sportovců stanovení laktátu slouží pro zjištění jejich trénovanosti, případně jejich výběr pro určité disciplíny. U dostihových koní pro zjištění jejich trénovanosti. Biosenzor podle vynálezu lze použít při stanovení laktátu v biologických tekutinách, například potravinářského průmyslu, při produkci výrobků založených na bázi mléčného kvašení.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Biosenzor pro stanovení laktátu typu Clarkovy elektrody, vyznačující se tím, že reakční plocha (1) platinové elektrody (2) je zanořena do dutiny (3) těla biosenzoru, která je překryta semipermeabilní membránou (4), v dutině (3) těla biosenzoru o objemu 20 až 50 μ l jsou umístěny imobilizované kvasničné buňky.

2. Biosenzor podle bodu 1 vyznačující se tím, že v dutině (3) těla biosenzoru jsou umístěny kvasničné buňky imobilizované v hydrofilním gelu na bázi přirozených gelotvorných látek typu agaru, carrageenanu, nebo umělých látek na bázi polyethylenglykolů.

3. Biosenzor podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že v dutině (3) těla biosenzoru jsou umístěny lyofilizované kvasničné buňky.

4. Biosenzor podle bodu 1 až 3 vyznačující se tím, že v dutině (3) těla senzoru je umístěn enzym urikaza.

1 výkres

260913

