



Biosensoreiden uudet sovellusalueet teollisuuden mittauksissa

Vesa Virtanen
Biotekniikan laboratorio
Kajaanin yliopistokeskus



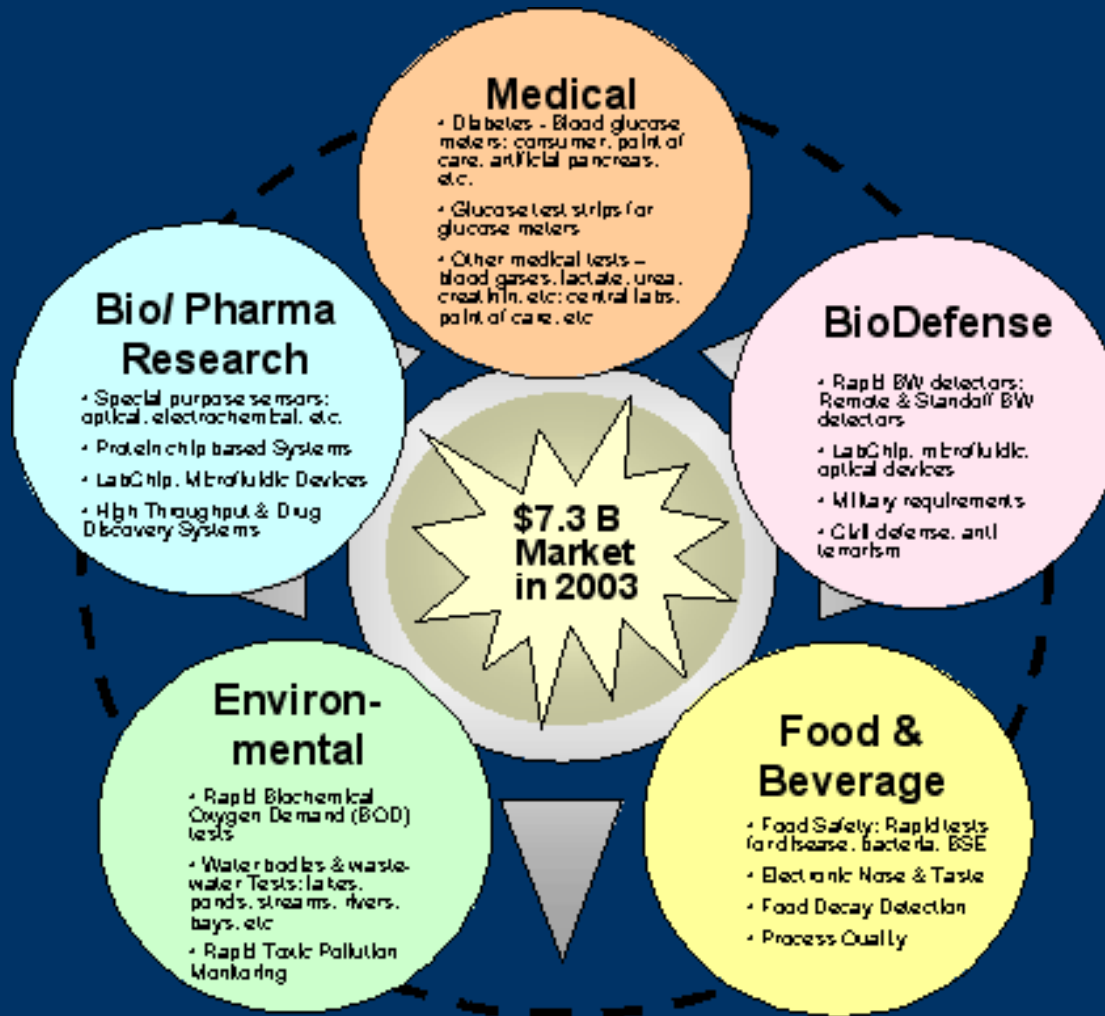
Miksi kiinnostus biosensoreihin?

Biosensorit ovat:

- Tärkeitä työkaluja kliinisessä ja ympäristö diagnostiikassa, lääkemonitoirinnissa, ruoan turvallisuuden tarkkailussa ja sodankäynnin varoitussysteemeissä (turvallisuus)
- Tärkeitä laitteita tarjoten yksinkertaisuutta sekä analyttisessä laboratoriossa että kentällä.
- Selektiivinen, nopea ja herkkä instrumentti kemiallisten ja biokemiallisten kohdeyhdisteiden määrittämiseen



Biosensoreiden markkinaosuus



\$7.3 miljardia 2003

10.2 miljardia 2007

Kasvuvauhti noin 10.4%

Source: Takeda Pacific

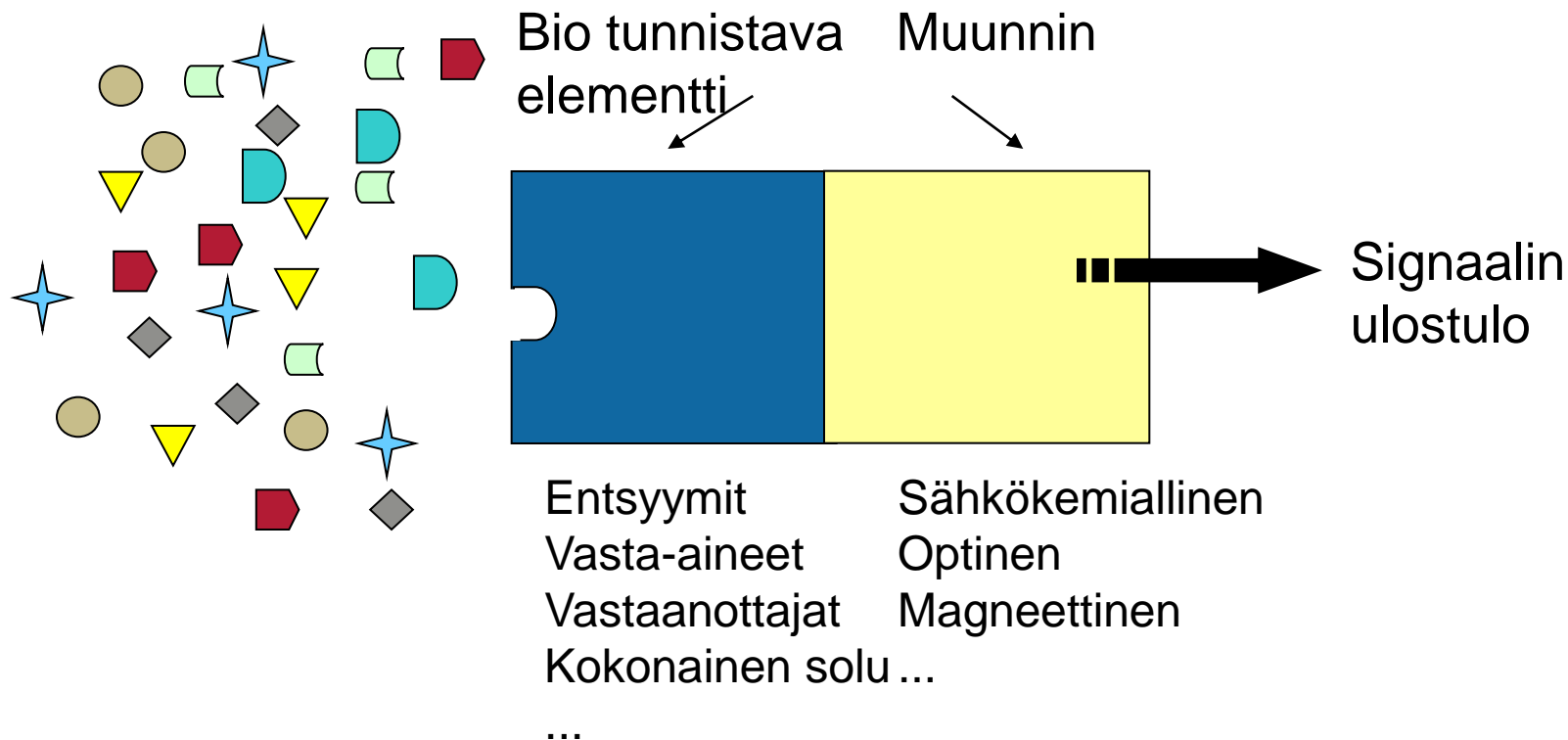
V V 20.4.2010

Analytiikkapäivät, Kokkola



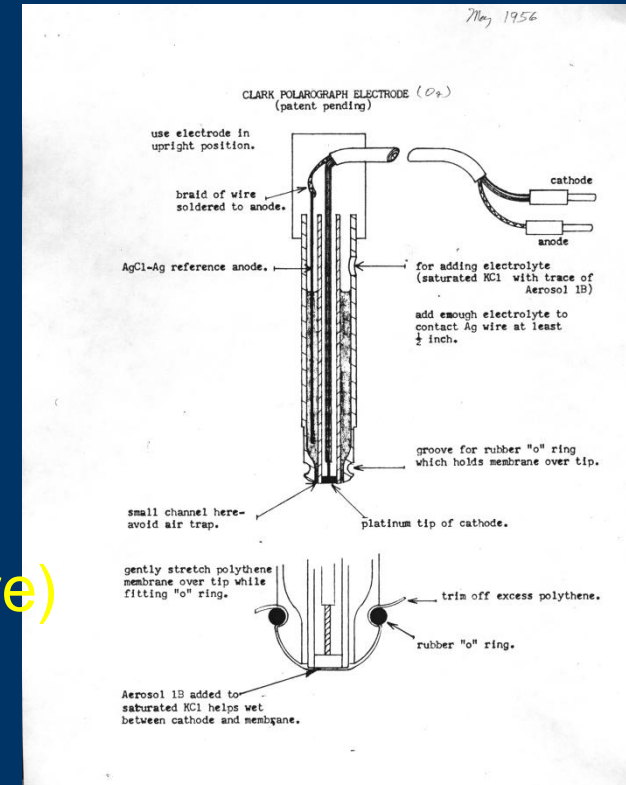
MIKÄ ON BIOSENSORI?

“Klassinen” Määritelmä



BIOSENSORIT- Historia

- 1956: Oxygen electrode (Clark)
- 1962: Enzyme electrode
- 1972: Commercial glucose sensor (YSI)
- 1975: Microbe-based biosensor
- 1983: Surface plasmon resonance (Biacore)
- 1987: Screen printed enzyme electrode (MediSens)





Biosensori sovelluksia

- Terveystenhoito ja diagnostiikka
- Ruoan laadun määrittäminen
- Ympäristön saastuttajien määrittäminen
- Teollisuuden prosessikontrollit

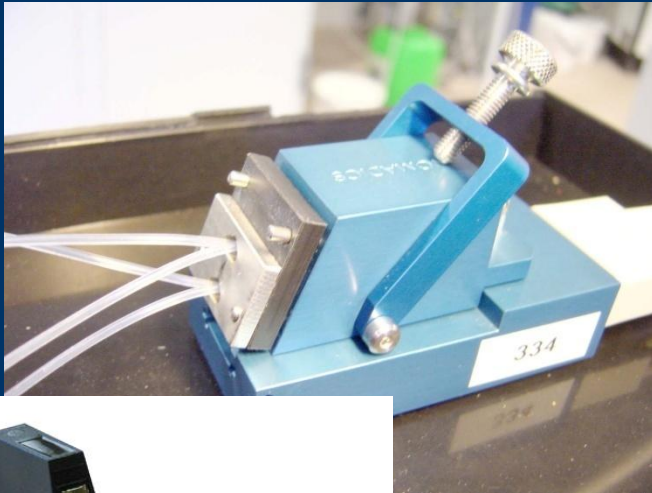


Tavoite

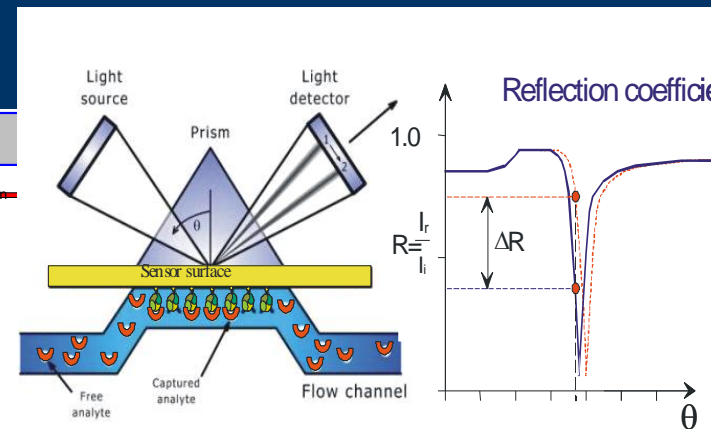
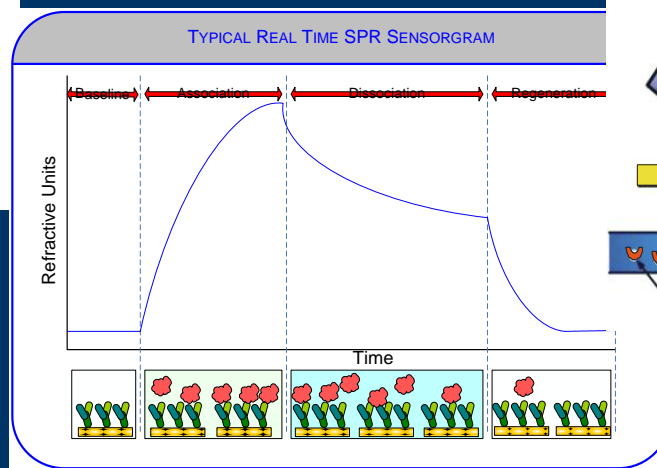
- Kehittää biosensoreita ja menetelmiä, joilla voidaan spesifisesti määrittää haluttuja biomolekyylejä ja metalleja liittyen ihmisfysiologisiin ja vesi- sekä ympäristömittauksiin useita eri tekniikoita hyväksi käyttäen.
- Kehittää mittalaite, jossa hyödynnetään yo. menetelmiä



Pintaplasmoni resonanssi biotunnistus (SPR)



- Erittäin herkkä menetelmä
- Voi olla pieni ja kannettava
- Reaali aikainen analyysi, ei leimaamistarvetta



Sähkökemiallinen Biotunnistus



Screen printed electrode

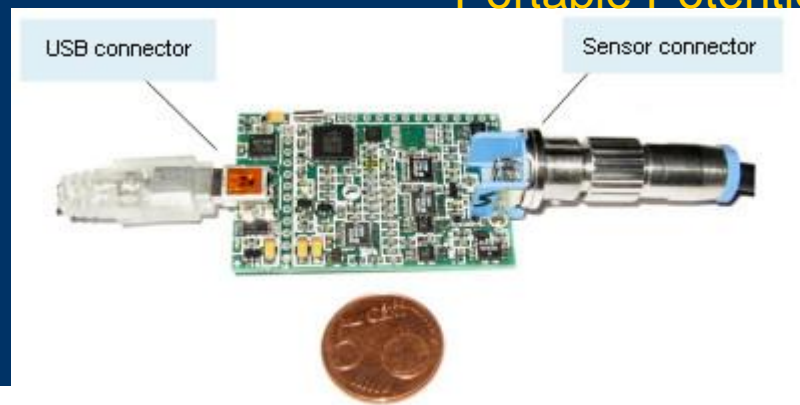
Kannettava Potentiostat



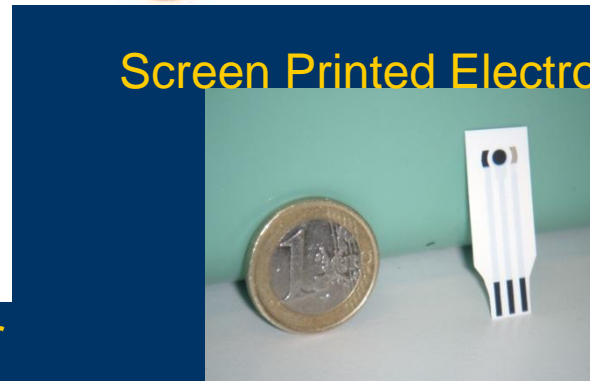
SPR:n ja sähkökemiallisten tekniikoiden yhdistäminen samaan



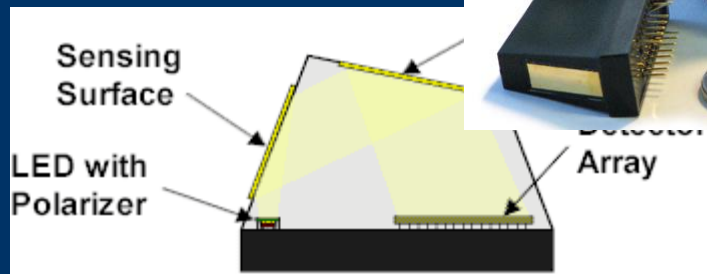
Spreeta flow-cell and housing



Portable Potentiometer



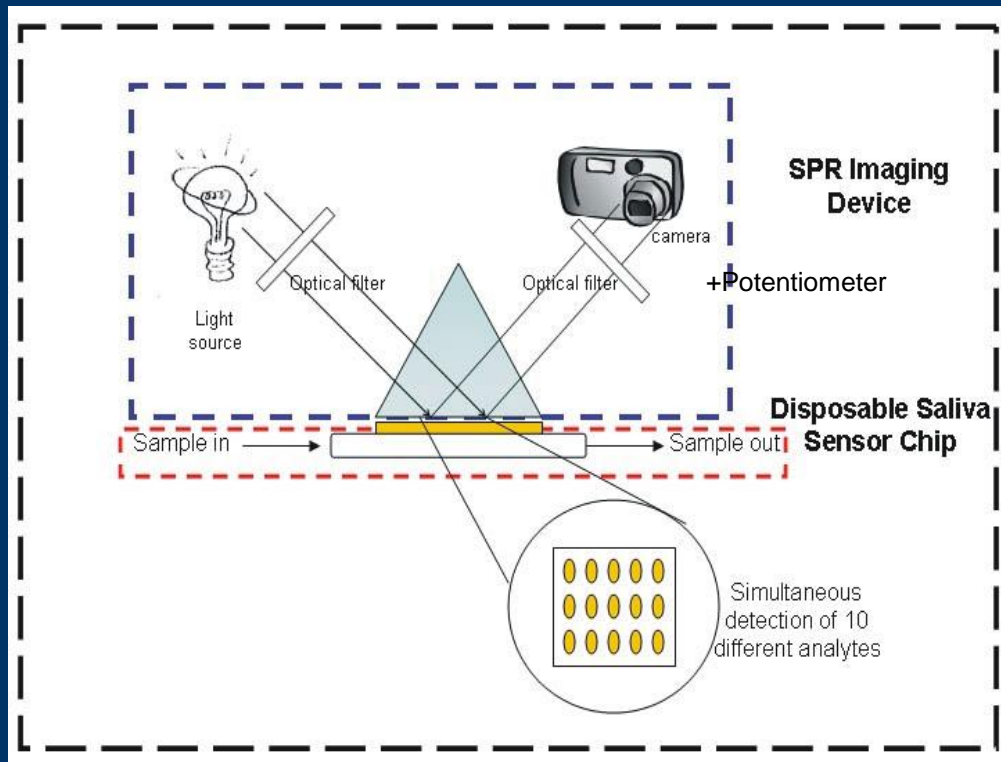
Screen Printed Electrode



Spreeta sensor



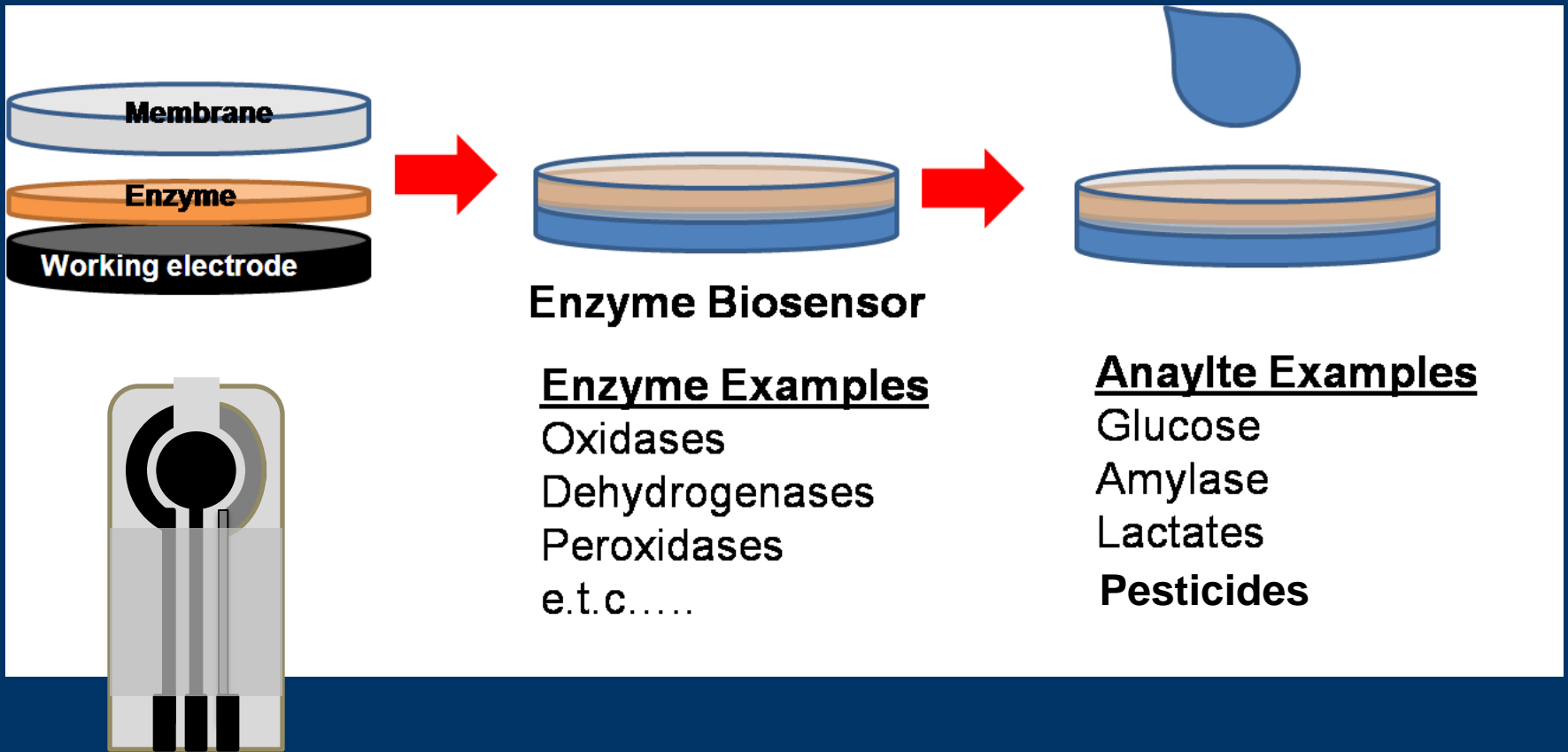
Kannettavan laitteen kehitys



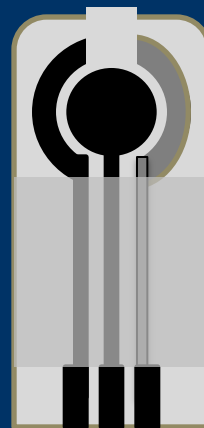
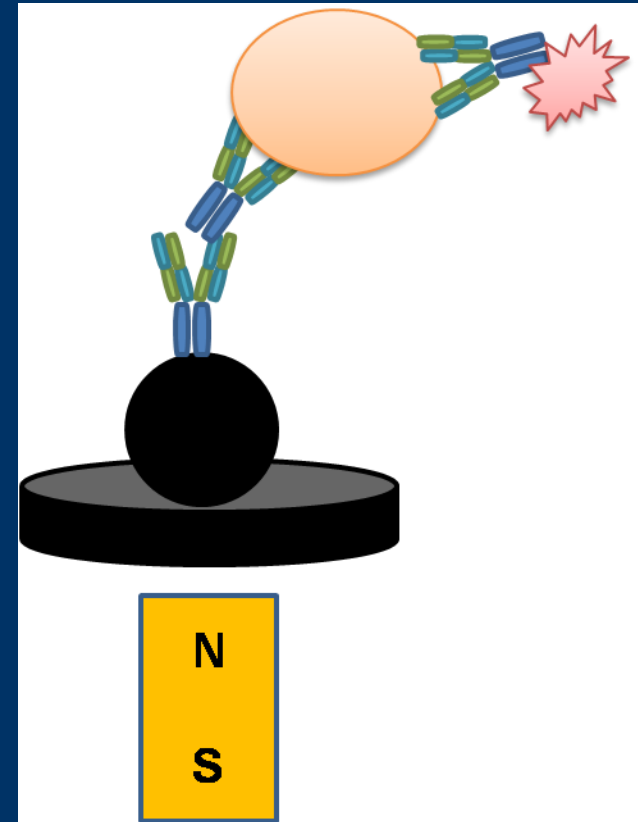
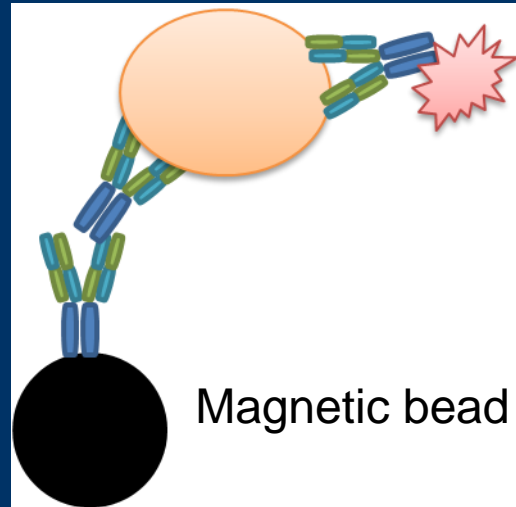
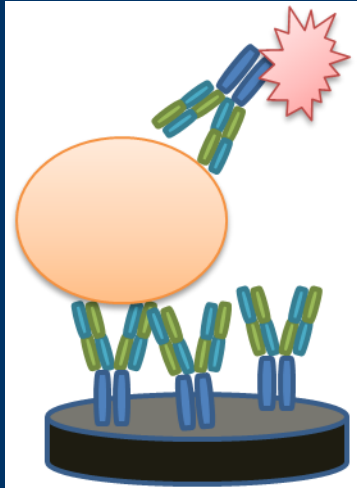
- Useita määrittämisalueita
- Näytekammiot ja näytteen käsittely
- Näytteen jakaminen useampaan linjaan
- Näytteen siirto määrittämisalueille
- Yhteistyö muiden toimijoiden kanssa



ENTSYYMI BIOSENSORI



Magneettisten kuulien hyödyntäminen



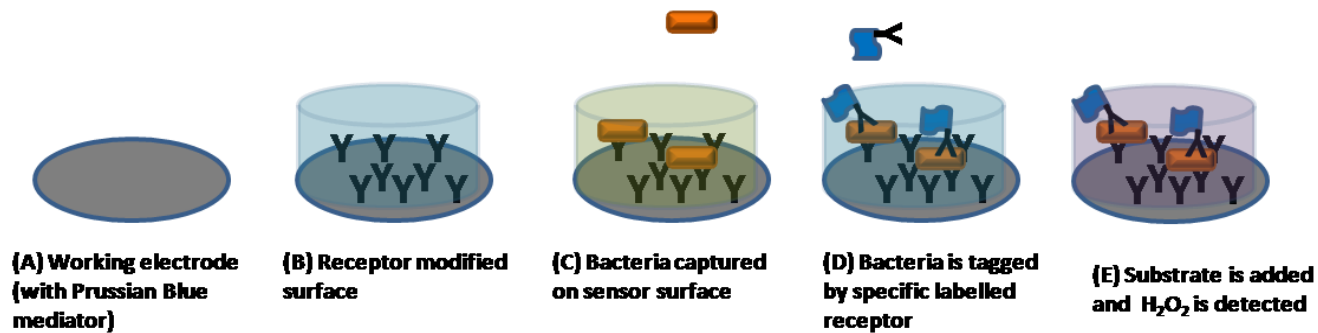
Magneettisten kuulien tuottamat edut

- Ei riipu diffuusio asteesta
- Esikonsentrinti ja näytteen puhdistus
- Sensori voidaan uudelleenkäyttää
- Voidaan käyttää useanlaisten reseptoreiden kanssa (esim. DNA probes, polymeeri reseptorit jne.)



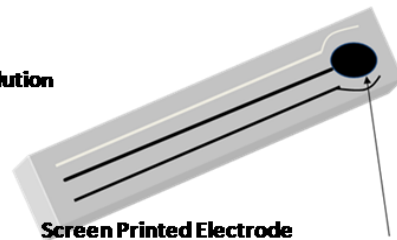
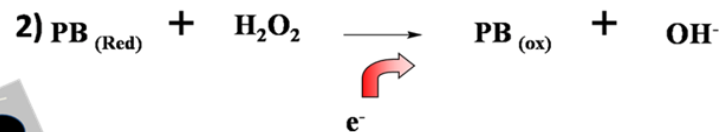
Immunosensori: suora analyysin detektointi

General Schema of a Biosensor Format



KEY

- Y** Specific bacteria receptor
- Bacteria
- Labelled bacteria receptor
- Carrier Buffer
- Sample
- Substrate solution



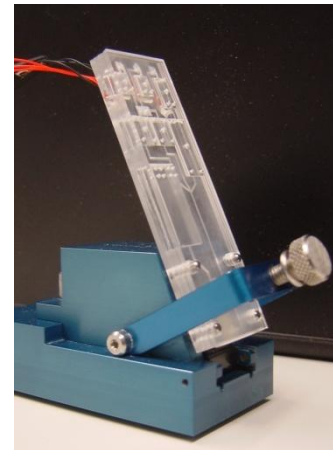
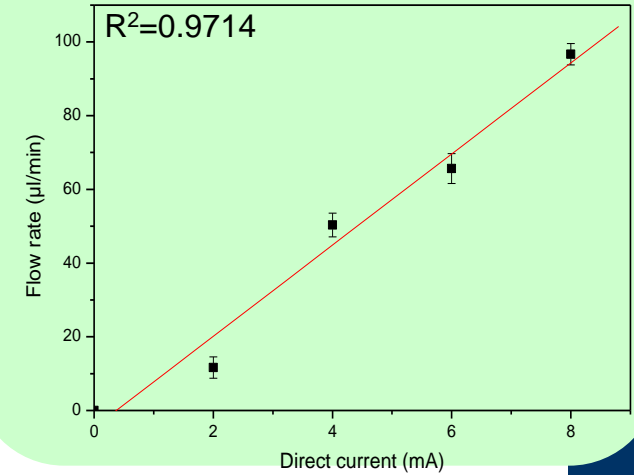
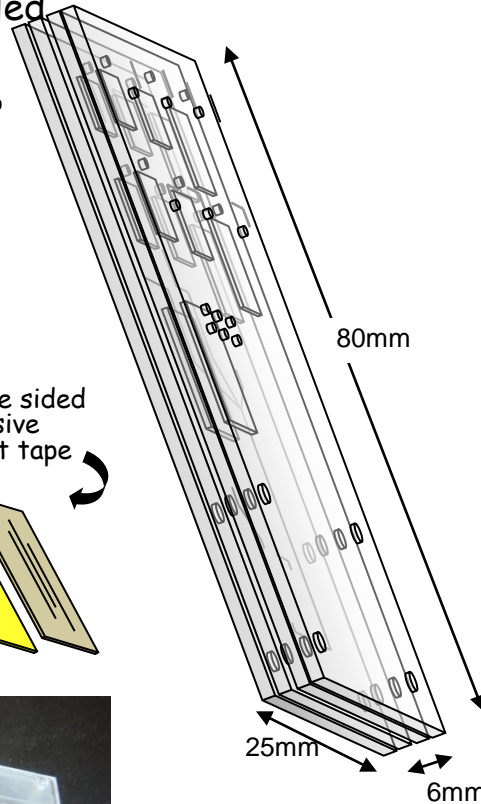
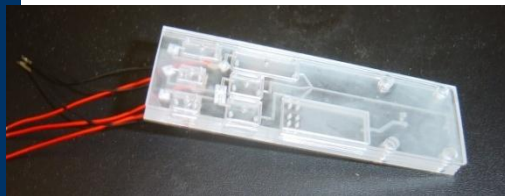
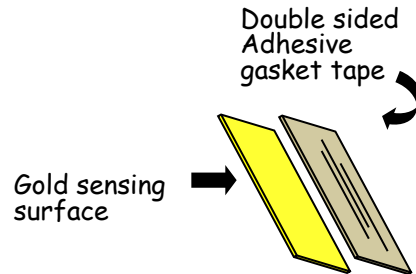
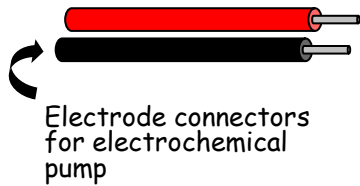
Screen Printed Electrode

Graphite modified with Prussian blue



Integroidun nestevirtauspiirin yhdistäminen

- Reservoir filled with NaSO_4
- Sample chambers filled



Ihmisfysiologiset muutokset ja biomarkkerit

- Pitkäaikaisessa fyysisessä rasituksessa tapahtuu fysiologisia muutoksia ihmiskehon “biologisessa kemiassa”
- (esim. Kortisoli, Laktaatti, α -Amylaasi, vasta-aineet, Proteiinit, Elektrolyytit)
- Näiden yhdisteiden pitoisuus voi antaa hyvän yleiskuvan yksilön terveydestä, kunnosta ja suorituskyvystä
- Useat yhdisteet relevantteja sekä liikuntateknologisiin että terveydenhuollollisiin määrittelyksiin
- Nämä yhdisteet voidaan mitata verestä, seerumista ja virtsasta.



Ihmisfysiologiset mittaukset; Miksi sylki ?

- Helppo, ei-invasiivinen näytteenotto aiheuttamatta stressiä ja epämiellyttävyyttä yksilölle (esim. Pienet lapset ja vanhukset, verisuonten vaikea löytäminen)
- Hyvä korrelaatio veri- ja seeruminäytteisiin.

Kiinnostavat yhdisteet	
Vasta-aine IgA, IgG	Indikoi tulehduksia ja immunologisia muutoksia
a-Amylaasi	liittyy anaerobiseen kynnykseen ja stressistä palautumiseen
C-Reaktiivinen proteiini (CRP)	Tulehduksen biomarkkeri
Kortisoli	Stressistä palautuminen ja ylipaino
Laktaatti	Anaerobinen ja aerobinen kynnykset
Insuliini	Ravinnollinen glykeminen indeksivaste ja resistanssi

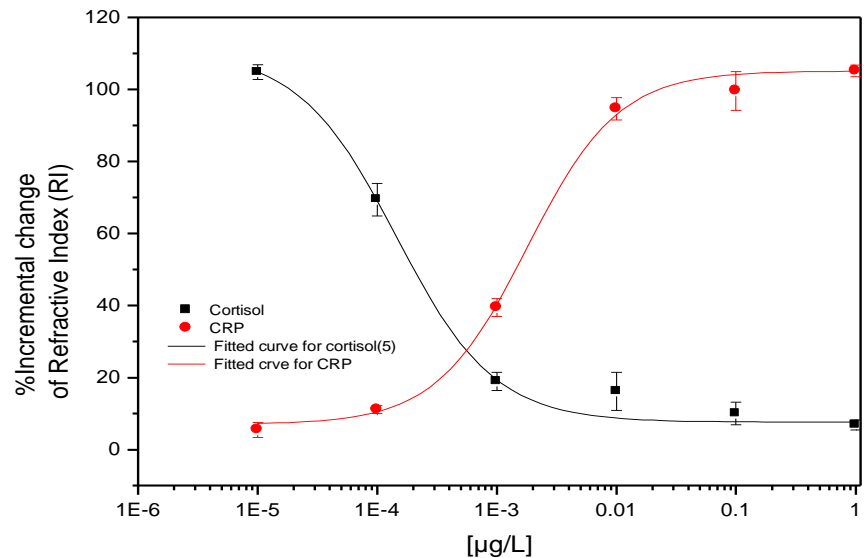


Biosensorikehitys, ihmisfysiologia

Optinen Surface Plasmon Resonance	Sähkökemiallinen (Screen Printed Electrodes)
Sylki IgA	Kortisoli
CRP	α -Amylaasi
Lääkeaineet	Laktaatti
IgG	Insuliini



SPR Samanaikainen C-reaktiivisen proteiinin (CRP) ja Kortisolin määrittäminen

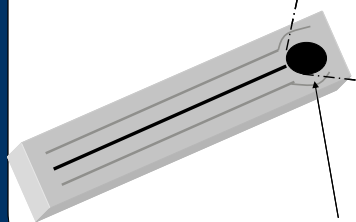
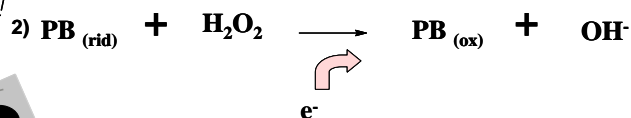
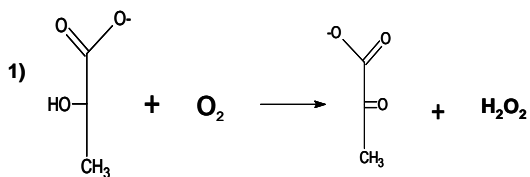


Spreeta SPR laitteella

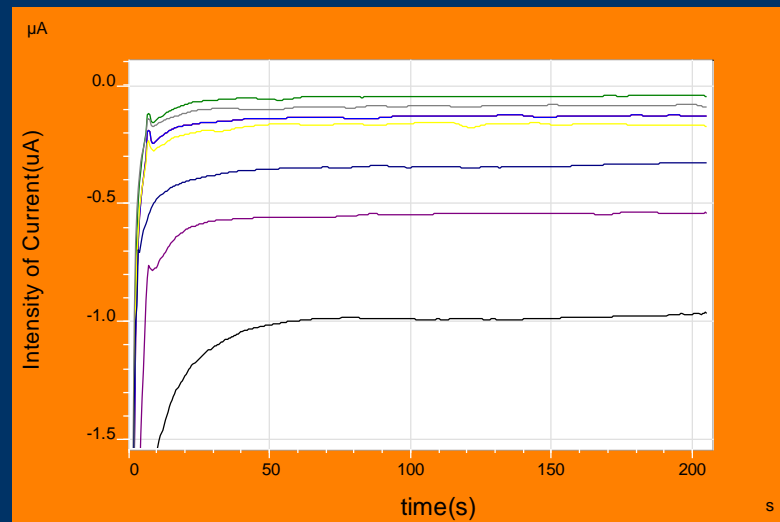


Syljen L-Laktaatin määrittäminen

LOX



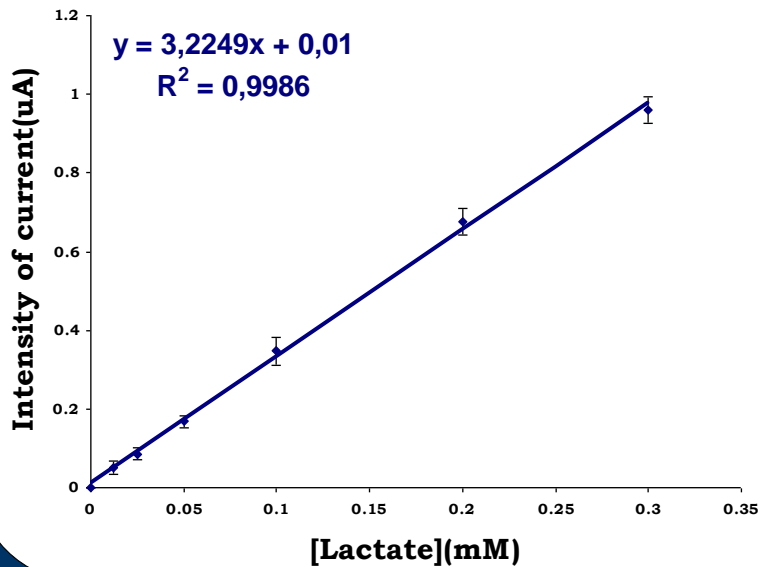
Graphite modified with Prussian blue



Kalibrointi sensorigrammi käyrät
PalmSens laitteelta saatuna



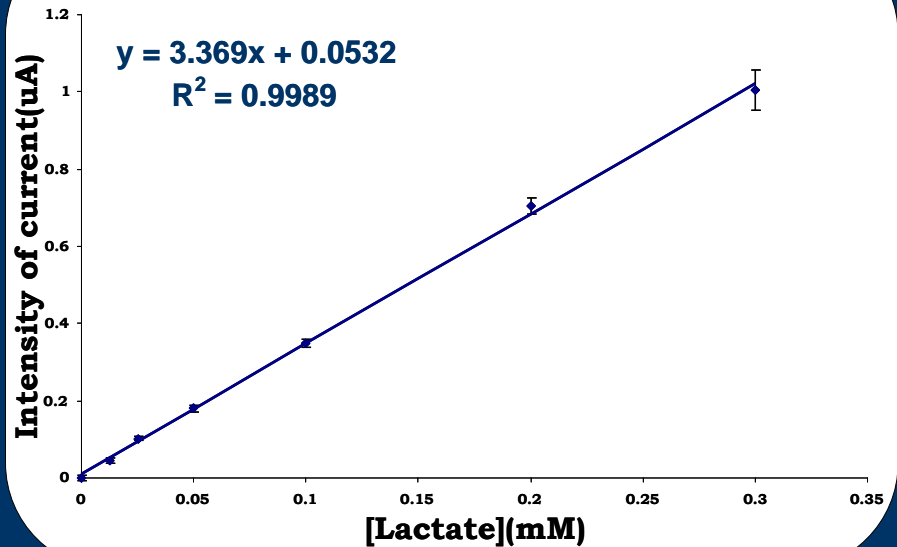
Laktaatin määrittäminen



*Inter electrode
repeatability n=5*

LOD: 0.01mM

Working range: 0.01 - 0.30mM



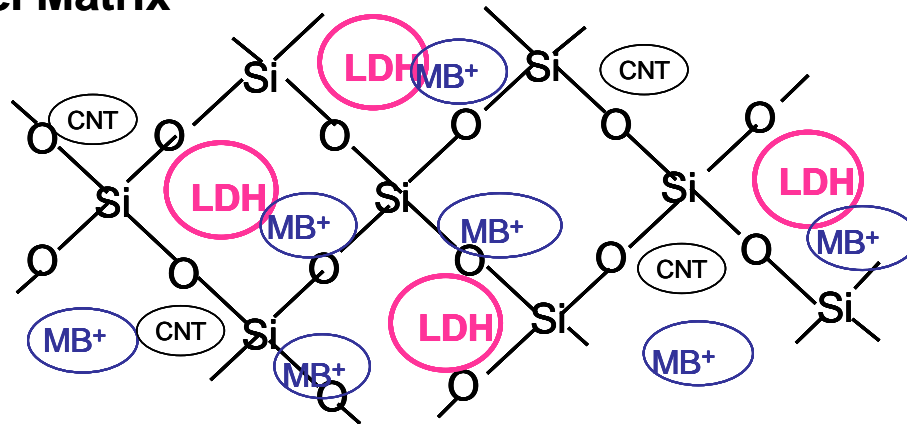
*Intra electrode
repeatability, n=3*

Reaalinäytteen tyypillinen pitoisuus 0.1-3.0mM



Printattu elektrodi modifioituna nano-komposiitti materiaalilla

Sol-Gel Matrix



LDH = Laktaatti dehydrogenaasi

MB = Meldola Blue

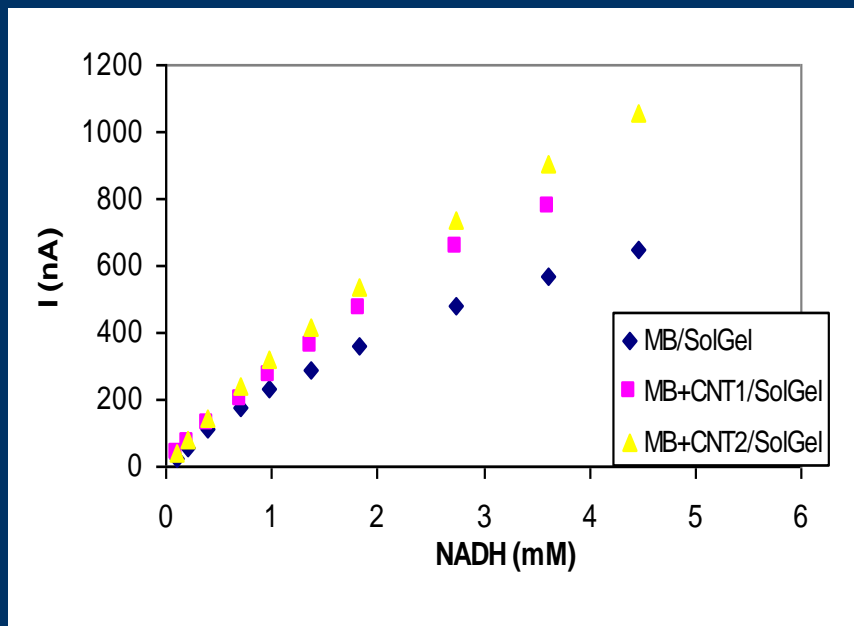
Electrode Configuration

Sol-gel matrix { CNT + Mediator + LDH

Screen-printed electrode

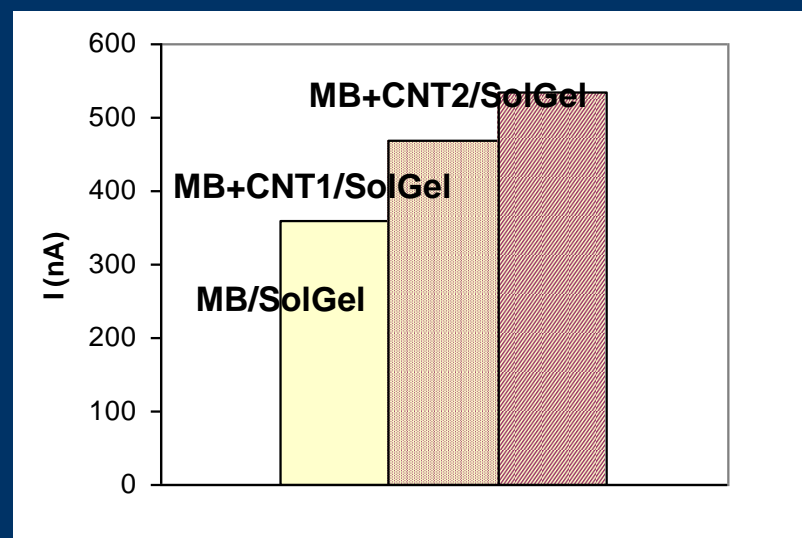


Sol-Gel modifioituna hiilinanoputkilla (CNT)



CNT1 = jauheessa

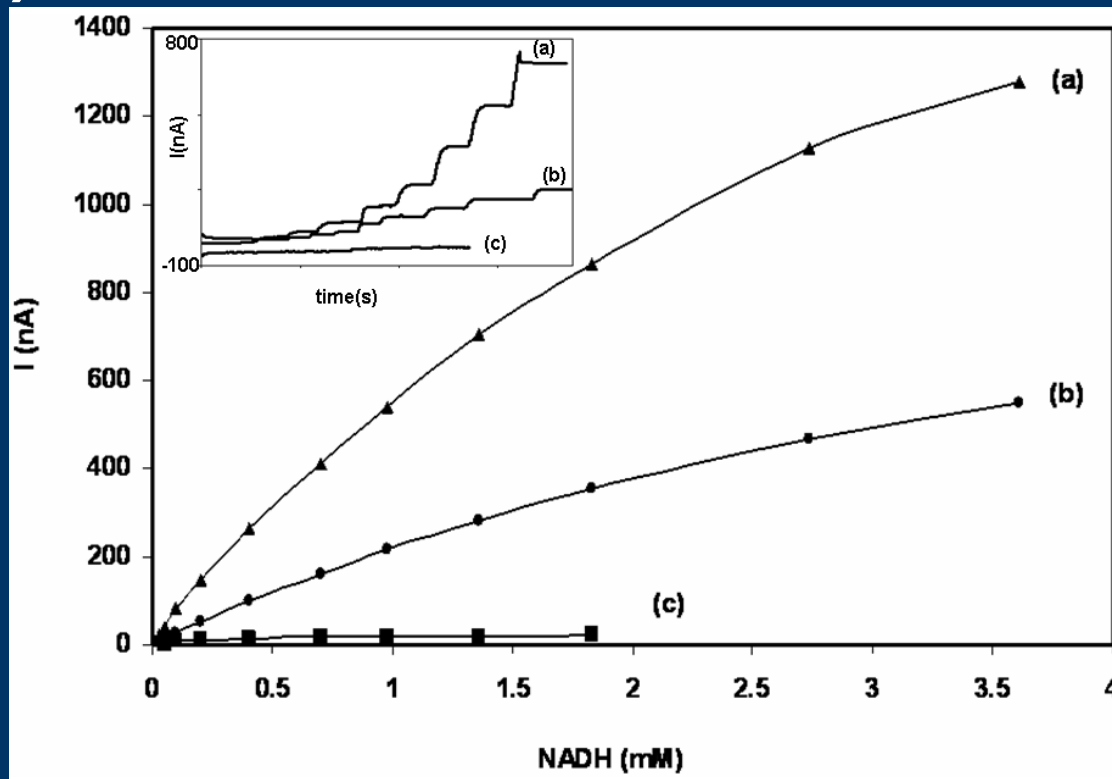
CNT2 = suspendoituna DMF:ään



Herkkyuden parantuminen



Sol-Gel modifioituna hiilinanoputkilla (CNT)



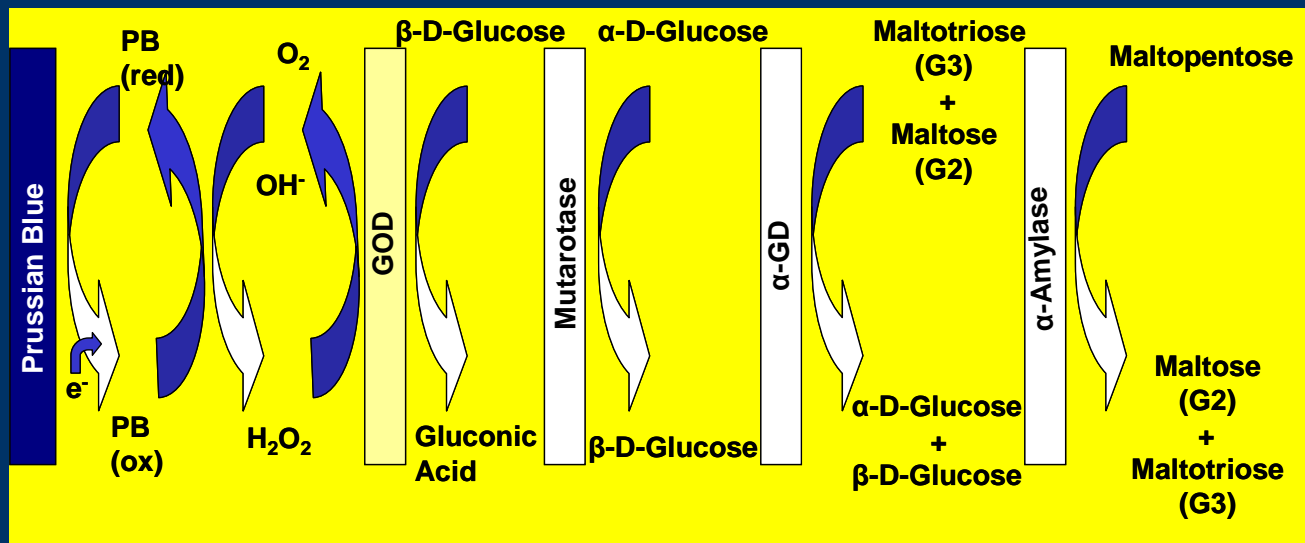
•:(a) MB-SWNT-SG/SPE, (b) MB-SG/SPE ja (c) SWNT-SG/SPE; $E = -50$ mV;.



Herkkyuden parantuminen



α -Amylaasin määrittäminen

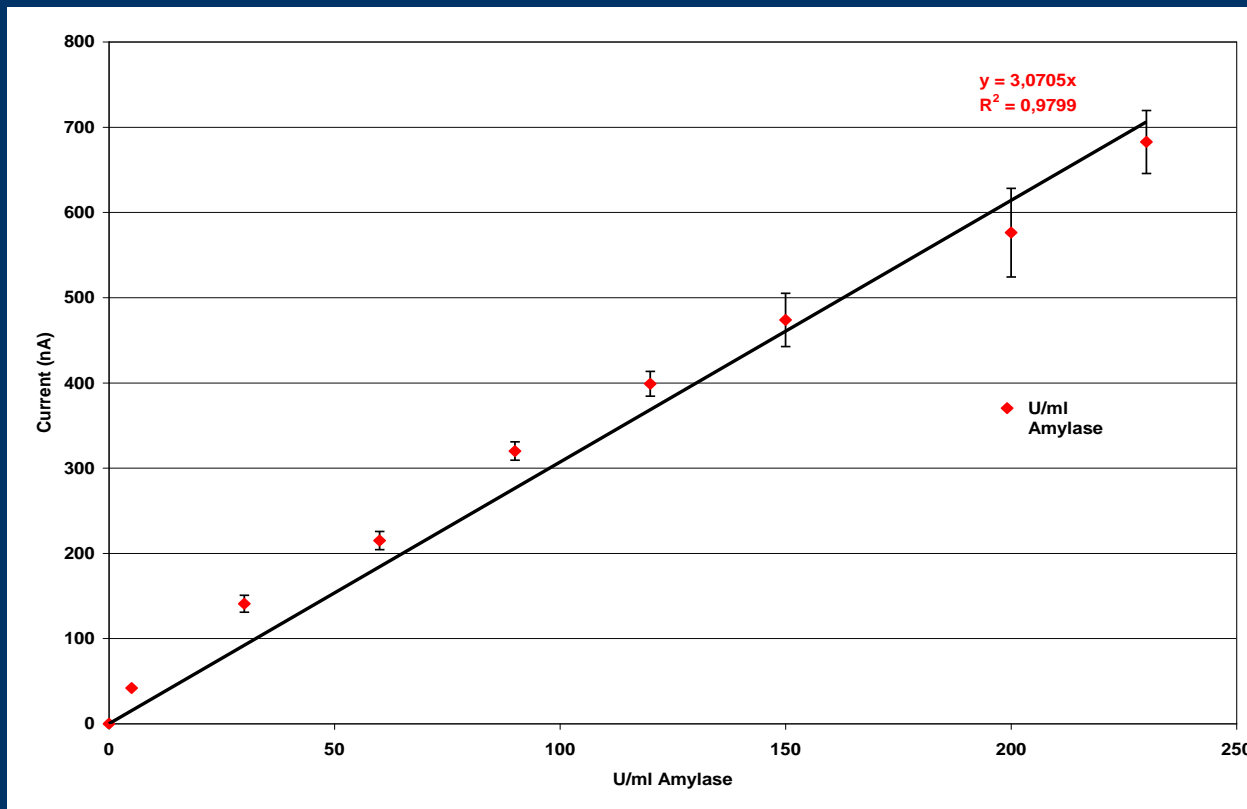


Reaktioketju

Micheli, L., Caprio, F., Mahosenaho, M., Sesay, A., Palleschi, G., and Virtanen, V. (2010)
• A disposable biosensor for the determination of alpha-amylase in human saliva
Microchimica Acta, in press



Tuloksia α -Amylaasille



*Saman elektrodin
toistettavuus, n=4*



α -Amylaasi biosensori parametrit

LOD mM	Working range (mM)	Average RSD% INTRA ELECTRODE	Average RSD% INTER ELECTRODE	Sensitivity $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}/\text{mM}^*$
0,01mM	0,01-0,30	7%	10%	26

	Glukoosi	Maltoosi	Maltotriooosi	α -Amylaasi
Lineaarisuus (R²)	0.998	0.993	0.998	0.998
Alue	0.05 – 1mM	1-100mM	10-100mM	10-230 U/ml
LOD	0,05mM	1mM	20 mM	15 U/ml

Aikuisnäytteen keskiarvo 92.4 U/ml

Micheli, L., Caprio, F., Mahosenaho, M., Sesay, A., Palleschi, G., and Virtanen, V. (2010)

• A disposable biosensor for the determination of alpha-amylase in human saliva

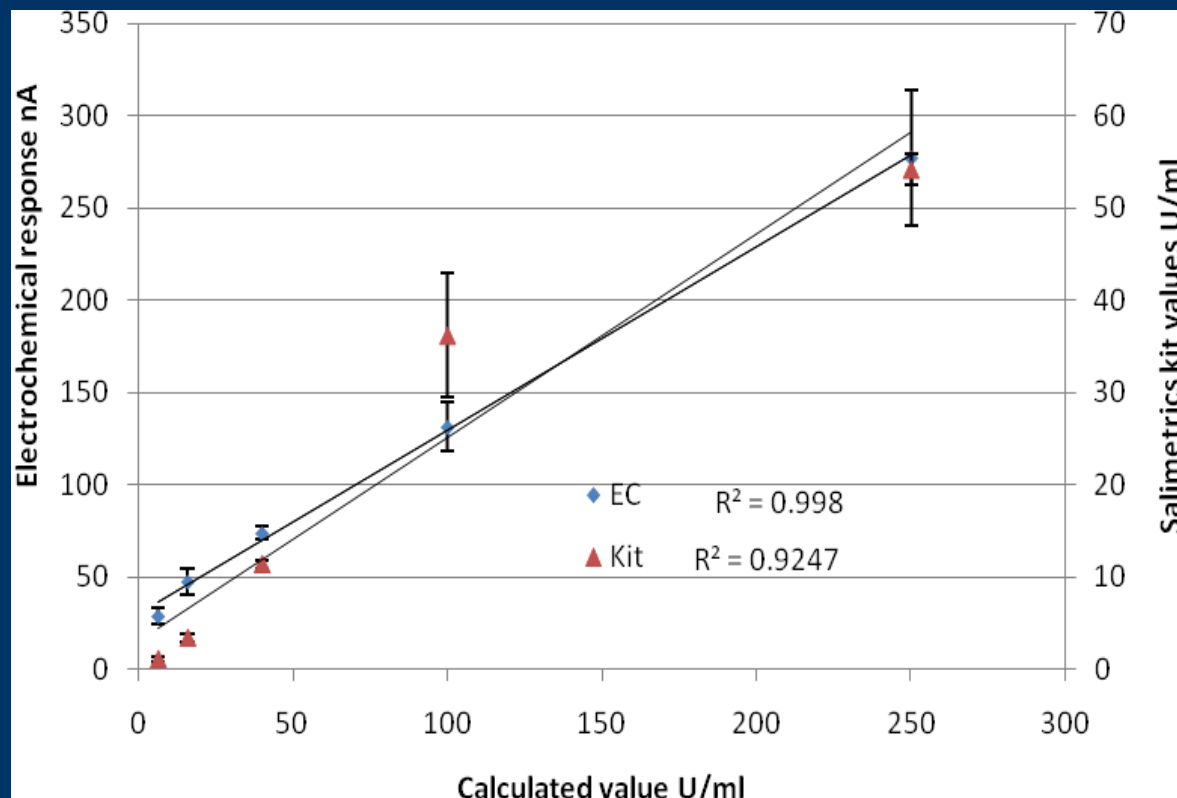
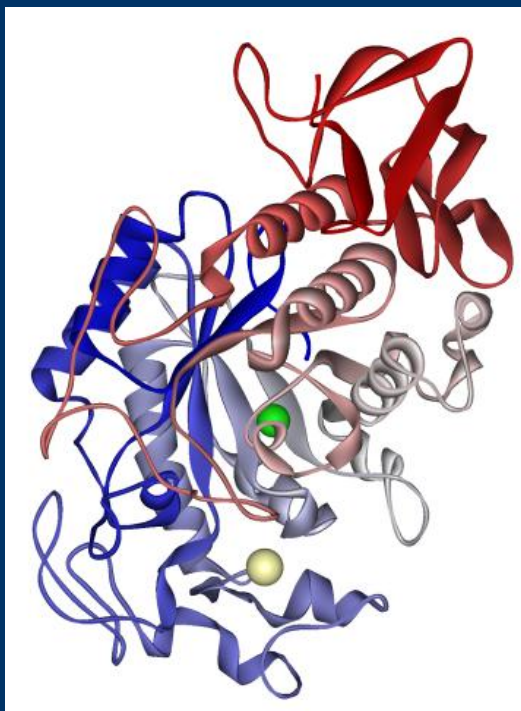
Microchimica Acta, in press

V V 20.4.2010

Analytiikkapäivät, Kokkola



Sähkökemiallinen sensori vs kaupallinen kit



- vertailukuvaaja sähkökemiallisen sensorin ja kaupallisen kitin antamista tuloksista verrattuna laskettuihin arvoihin



Vesi ja Ympäristömittaukset elektrokemiallisilla menetelmillä

Raskasmetallien (Pb, Cd, Zn, Cu, Ni, Co, Mn jne) elektrokemiallisen määrittämisen edut verrattuna muihin tekniikoihin (AAS, ICP):

- Nopeus
- Herkkyyks
- Selektiivisyys
- Yksinkertaisuus
- Edullisuus
- Online-mittaus
- Soveltuvuus kenttäkäyttöön





Kiinnostavat yhdisteet	
Raskasmetalli ionit (Pb, Cu, Ni, jne....)	Teollisuuden prosessivedet– Ympäristösovellukset
bakteerit	Teollisuuden prosessivedet– Ympäristösovellukset



Differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV)

- Perustuu metalli-ionin pelkistämiseen elohopea(Hg)-päällysteiselle elektrodille sopivalla potentiaalilla E_{red} , jolloin muodostuu amalgaami-yhdiste:

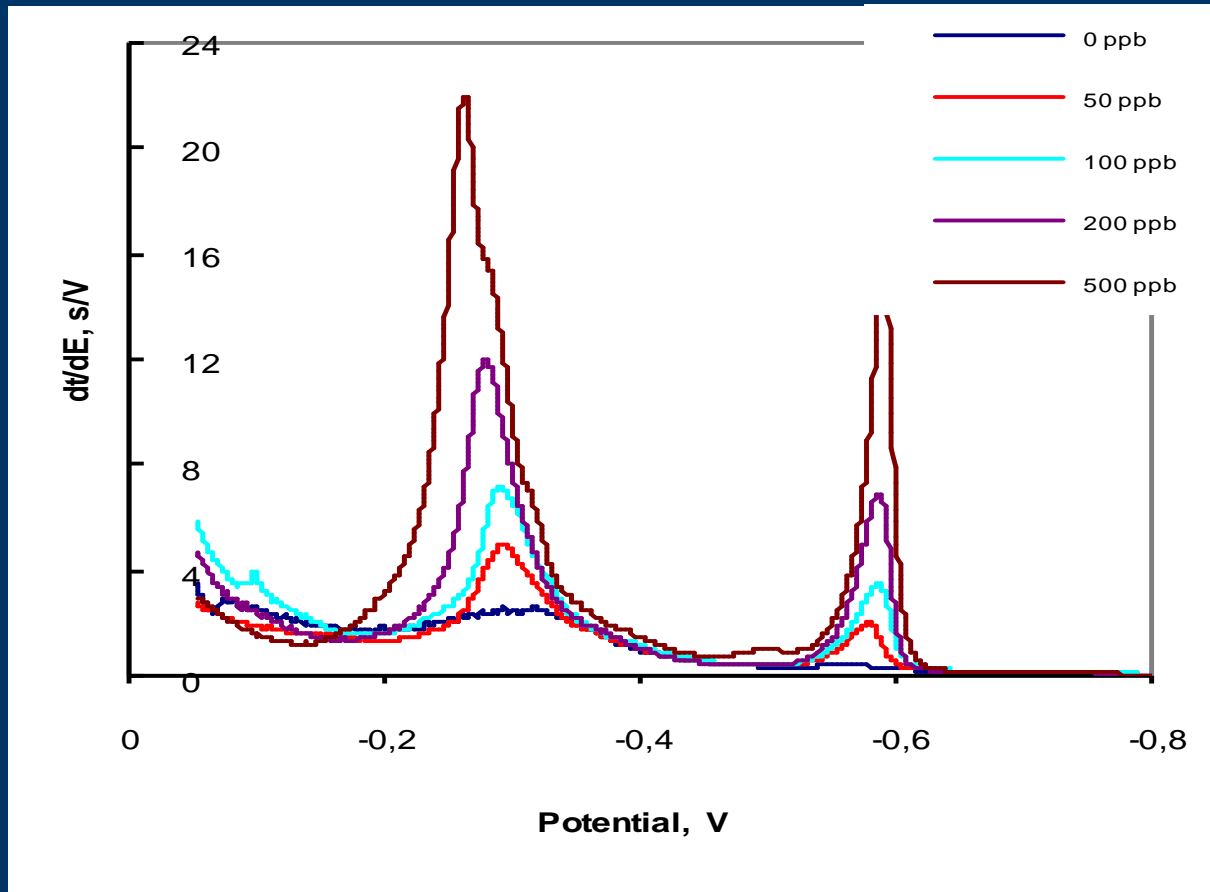


M = esim. Pb, Cd, Zn, Cu, Mn

- Skannattaessa potentiaalialue anodisesti metallit hapettuvat kullekin ominaisessa potentiaalissa E_{ox}
 - Yhdellä mittauskerralla jopa 4-6 analyytin määrittäminen
 - Samaa elektrodia voidaan käyttää useita kertoja
- Kaupalliset analysaattorit yleensä yhdelle metallille!



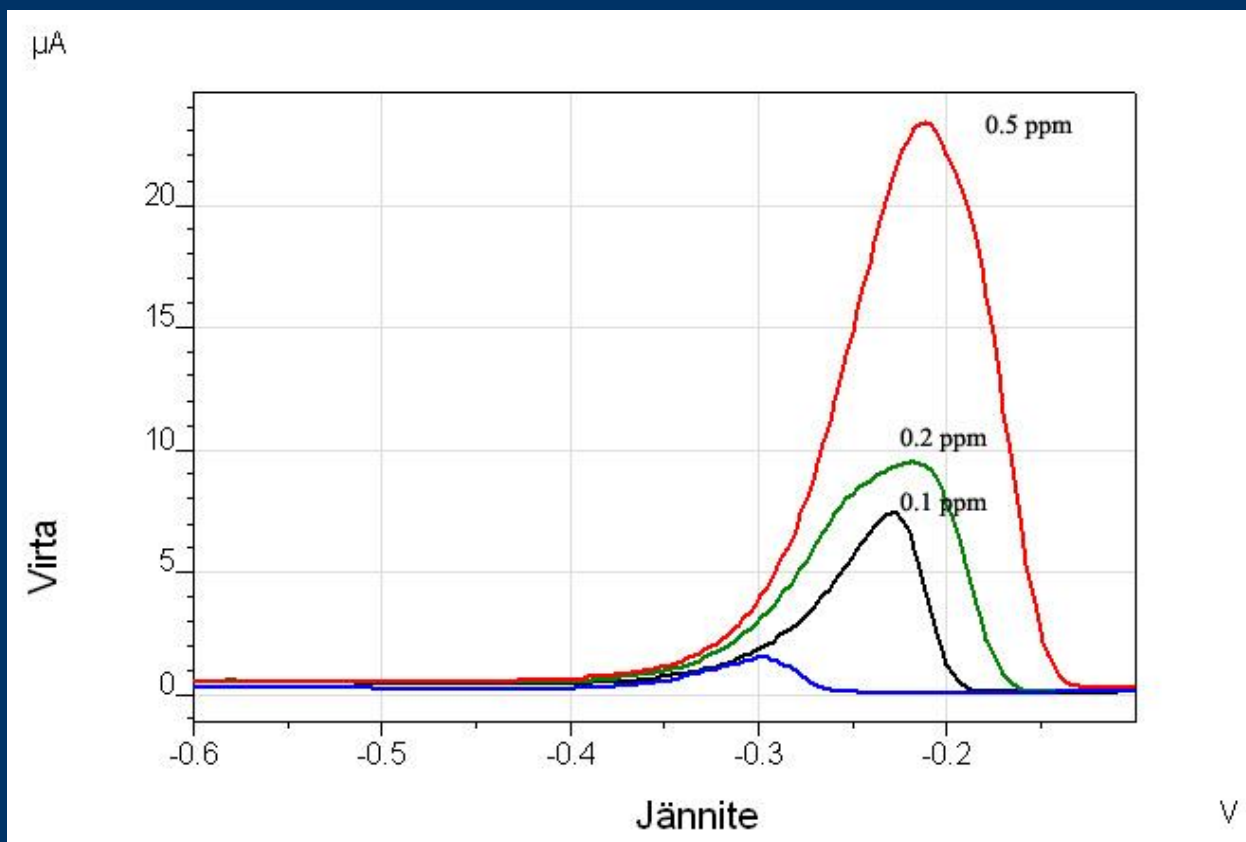
Cu, Pb: Square wave anodic stripping voltammetry (SWASV)



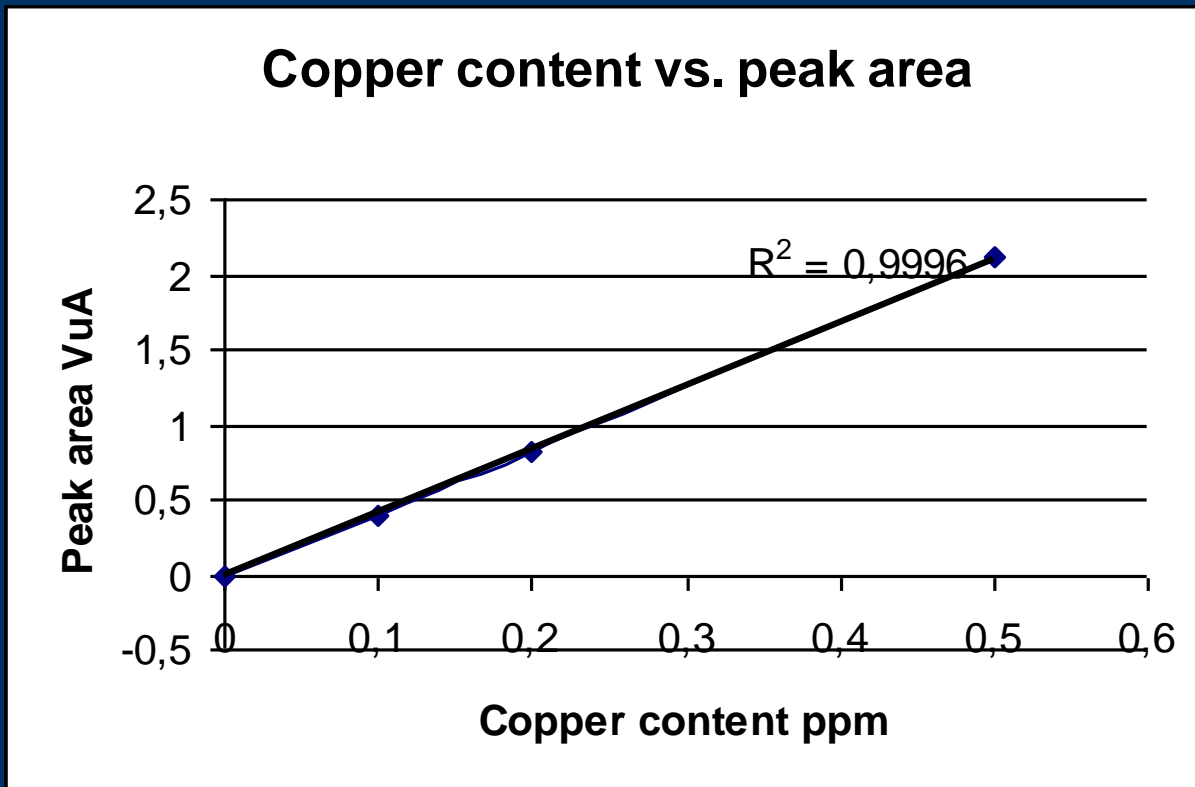
I. Tothill et al



Kuparin elektrokemiallinen määrittäminen vesinäytteestä.



Kuparin lineaarisuus



Ni, Co: Differential Pulse Adsorptive stripping voltammetry (DPAdSV)

- Menetelmä käytössä tietyille metalleille (esim. Ni ja Co), jotka eivät muodosta amalgaamia elohopean kanssa
→ tarvitaan lisäksi kompleksinmuodostaja (dimetyyiliglyoksimi, DMG):
$$\text{Ni}^{2+} + 2 \text{DMGH}_2 + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{Ni}(\text{DMG})_2$$
muodostunut kompleksi adsorboituu elektrodille
- Kehittämistarpeet:
 - Elektrodeissa käytetty elohopea korvaaminen vähemmän myrkyllisellä yhdisteellä, esim. vismutilla (Bi)
→ hapenpoistoa ei tarvita
 - kompleksinmuodostajaksi nioksimi



Entsyymien inhibitioon perustuva nikkelin (Ni^{2+}) määrittäminen

- Sarkosiini oksidaasi -entsyymi pilkkoo sarkosiinin tuottaen samalla vetyperoksidia
- Vetyperoksidi mitataan Prussian Blue – modifioidulla elektrodilla
- Nikkeli inhiboi entsyymiä, jolloin vetyperoksidia muodostuu vähemmän



Vesi- ja Ympäristö sovellutukset; Tulevaa

- Sensoreiden kehitys kaivosten poistovesien metallipitoisuuksien monitorointiin
- Myös muut vedet
- Myös eloperäiset määritykset vesistä
- Bakteerien määrittäminen
- On-line määrittäminen



Tulevaisuuden biosensorisovellukset

- Henkilökohtaiset point-of-care laitteet
- Dynaamiset non-invasiiviset ja invasiiviset sensorit
- Henkilökohtaiset terveyst ja fitness monitorit
- Interaktiiviset ympäristösensorit ja aktiiviset suojauslaitteet
- Teollisten prosessien tarkkailu ja säätö
- Uudet sovellusalueet



Ympäristösensorit / Minewater



Kaivosteollisuuden jätevesiin tulossa reaaliaikaiset mittaukset

Aikataulu: Kittilän kultakaivokselle on jo asennettu mittaristo, Talvivaara myöhemmin mukaan

AHTISAARELA
Kajanti

Kaivosteollisuuden jätevesien pienten metallipitoisuuksien määrittämisen kehittämiä reaaliaikaisesti toimivia mittausmenetelmiä. Minewater-hanketta vetää Oulun yliopiston Kajaanin yliopistokeskus, jonka mittalaitelaboratorio on Kajaanissa ja biotekniikan laboratorio Sotkissa.

Projekti on alkanut, ja se kestää ensi vuoden loppuun saakka.

Ensimmäinen mittaristo on jo asennettu Kittilän suurkuusikon kultakaivokselle. Toista ollaan rakentamassa Pyhäsalmen koparissa ja sinkkikaivoksella. Edessä on vielä paljon kehitystyötä. Laitteiden luotavuus pitäisi saada korkealle tasolle ja hinta-ero kohtuulliseksi, tutkija Ilpo Niskanen mittalaitelaboratoriosta sanoo.

Talvivaaran nikkelikaivos ei ole vielä hankkeessa mukana, koska se on keskittynyt nautannon käynnistämiseen. Todennäköisesti se liittyi hankkeeseen myöhemmin.

Kajaanin yliopistokeskuksessa kehitettiin oman ryhmän ohella kansi tutkijajoukosta mittausmenetelmiä.

Tampereen teknillisessä yliopistossa kaksi henkilöä tekee samaa työtä.

Minewaterin rahoittaa Tekesin vesiohjelma. Sen budjetti on 7,5 miljoonaa euroa. Se on yhteistyössä Minewater-ohjelman kanssa, jonka budjetti on 1,3 miljoonaa euroa.

Maailmasta ja kullusta

Metallien analysointi vesistä tapahtuu vielä manuaalisesti kaivoksen pöytävesipisteistä ja analyysit kertyvät myrkyt laboratorioissa pari kertaa viikossa.

Laboratoriossa käytössä olevat veden laadun mittausmenetelmät sisältävät työhöitä myrkytönto- ksisittely- ja analyysivaiheita. Tästä syystä mittaukset ovat liian kallit ja hitaita suorittavaksi niin usein kuin luotavan seurantariedon saaminen edellyttäisi, Niskanen sanoo.



Suurkuusikon kultakaivoksesta tulee edelläkävijä kaivosvesien uuden mittaustien soveltajana. Ensimmäiset laitteet on jo alkuun asennettu.

Fakta

Minewater

kanikaos), Mittatekniikan keskus (Mikes), Suomen ympäristökeskus (Syke), Outotec Oy, Agnico-Eagle Finland, Labtium Oy, EHP-teknikka Oy ja Pyhäsalmi Mine Oy.
Kilteillä yhdistetyillä tehdään samansuuntaista kuuluvien omläisäsvetoisen Minewater-

hankkeen kanssa
Minewater-projektin toteuttajat ovat VTT, Oulun yliopisto, Kuopion yliopisto, Suomen Ympäristökeskus, Rautaruukki, Metsä, Outekumpu, Arizona Chemical, Militech, Keliber, Alab, GasEK ja ITC Group.

Fakta

Useita kaivoksia

Kaikkialta kaivoksista on aloittamassa tuotannon, Agnico-Eaglen kultakaivos Kittilässä ja Talvivaaran nikkelikaivos Sot-

kamossa.
Pitkälle valmistettuja kaivoslaitteita ovat rautamalnikkaivos Kolarissa, Kehilvan nikkelikaivos Sodankylässä, palladilurikaivos Ranualla, fosforikaivos Savukoskella ja hopeikaivos Sotkissa.

Kaivosteollisuuden kasvava ympäristövaikutus on tullut entistä tärkeämpää.

Mittauksissa saatu reaaliaikainen tieto auttaa ymmärtämään paremmin prosessin tilaa, mikä mahdollistaa materi-

tarpeeseen, Niskanen korostaa.
Maailman ensimmäinen Minewater-hankkeen tavoitteena on luoda edellytykset maailman ensimmäisen reaaliaikaisen kaivosteollisuuden jäte-

ja prosessivesien monitorointijärjestelmän kehittämiseksi. Tutkimusryhmä haaveilee vahvistusta menetelmiä erittäin pienten metallipitoisuuksien on-line mittaamiseen ja samalla pyritään luomaan monipu-

- Sähkökemiallisten ja biosensorien kehitys kaivos- ja ympäristövesien metallipitoisuuksien määrittämiseen

- Minewater/TEKES Vesi-ohjelma 2009-2011

- Yhteishanke Moniwaterin kanssa (VTT vetoinen)

- Partnerit: Mila, TTY, SYKE, MIKES, Outotech, Agnico-eagle, Pyhäsalmi Mine, Labtium, EHP-teknikka

linen reaaliaikaisen prosessi- ja jätevesien mittausten menetelmien markkinoita, kehittämis- ja koealustoja.
Laitteisiin tulevat muun muassa sähkökemialliset, optiset ja biologiset sensorit.

