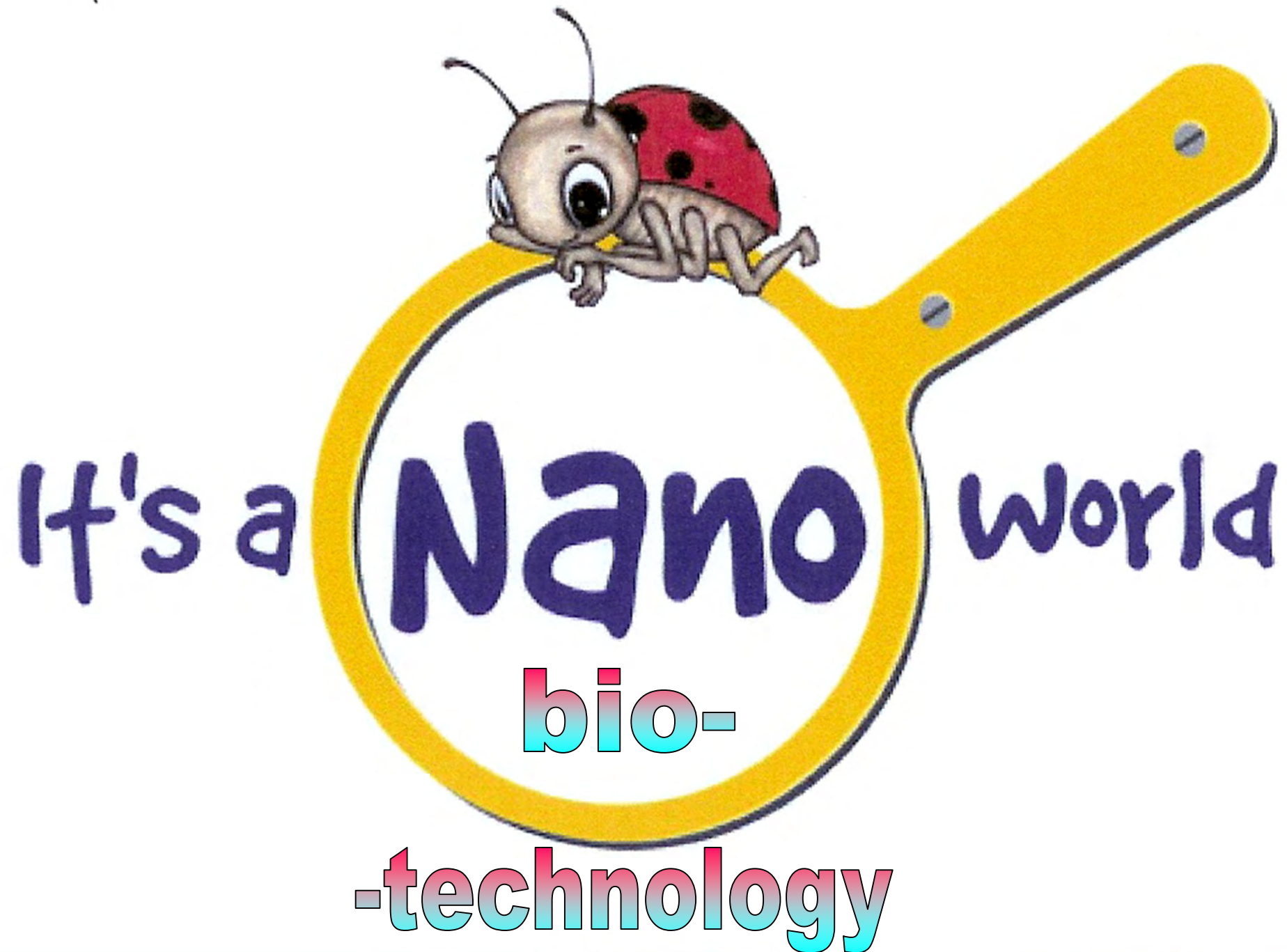




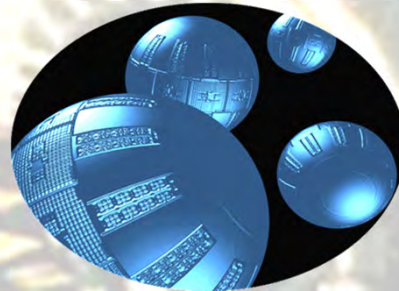
Kraków-Wisła, 20-23.04.2005

hybridmedicalanimation.com

# Mikro- i nanodiagnostyka: perspektywy dla drożdży piwowskich

**Dr. hab. Anna Sałek**  
**International Bio-Consulting,**  
**Germany**

- Noblista (1960), Richard Feynman's, wydając w 1997 roku książkę pt.: „*Nanosystem*“, zapoczątkował rewolucję XXI w. m.in. w biotechnologii.



- Świat naukowy został wówczas zaintrygowany nagłym przeskokiem do tajemniczego obszaru miniaturyzacji, gdzie fantazja stopniowo przeistacza się w rzeczywistość, a siły grawitacji straciły na ich klasycznym znaczeniu.



# Richard Feynman: napisane za pomocą „Dip-Pen” techniką nanolitografii



As soon as I mention this, people tell me about miniaturization, and how far it has progressed today. They tell me about electric motors that are the size of the nail on your small finger. And there is a device on the market, they tell me, by which you can write the Lord's Prayer on the head of a pin. But that's nothing; that's the most primitive, halting step in the direction I intend to discuss. It is a staggeringly small world that is below. In the year 2000, when they look back at this age, they will wonder why it was not until the year 1960 that anybody began seriously to move in this direction.



400 nm

Richard P. Feynman, 1960



# Przemysłowa Rewolucja XXI wieku



**Computers**



**Networks**



**Bioscience**

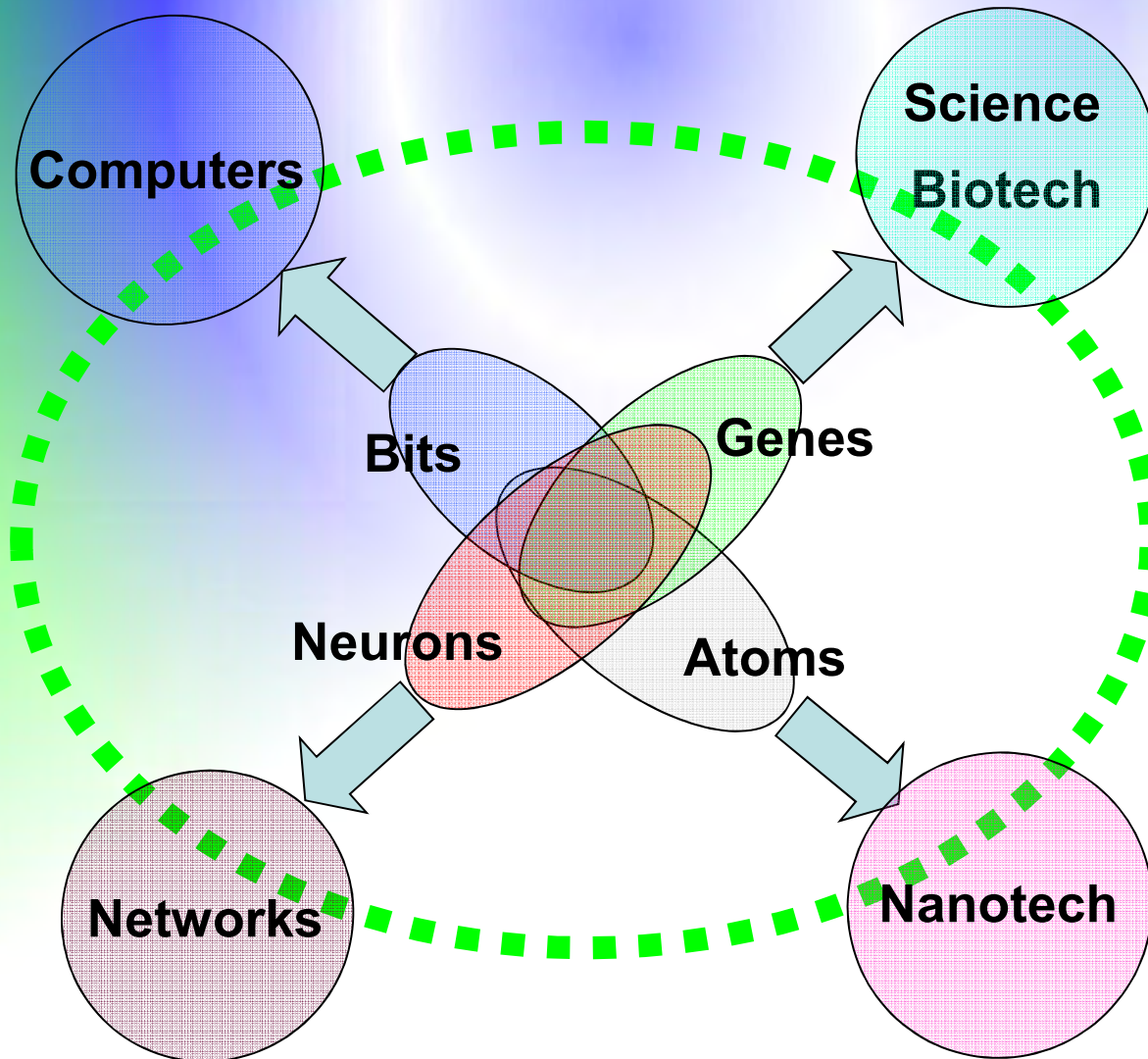


**Rewolucja  
XXI wieku**

**Nanotech**

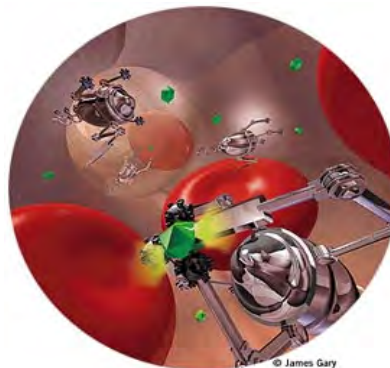




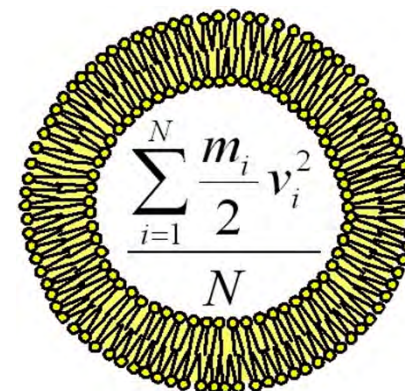
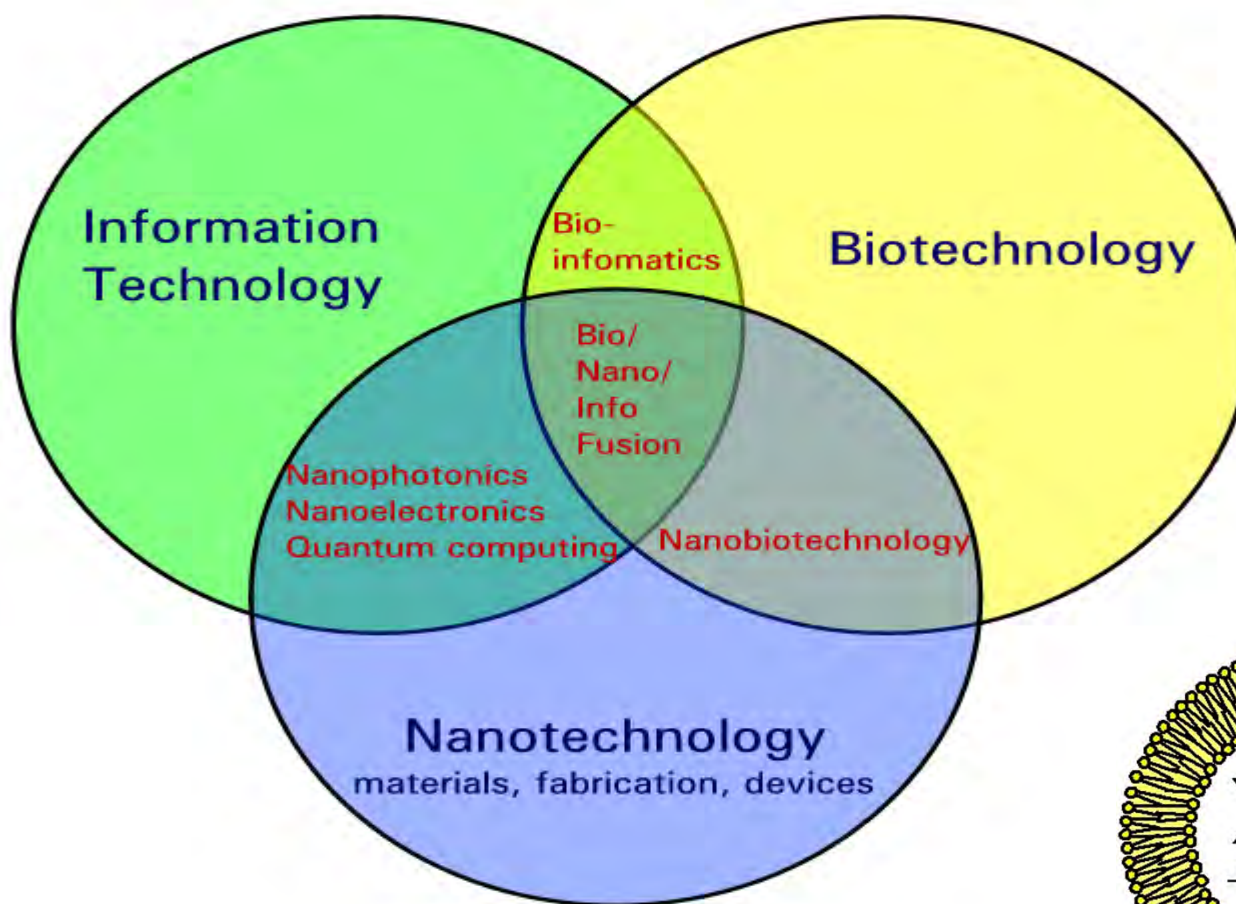




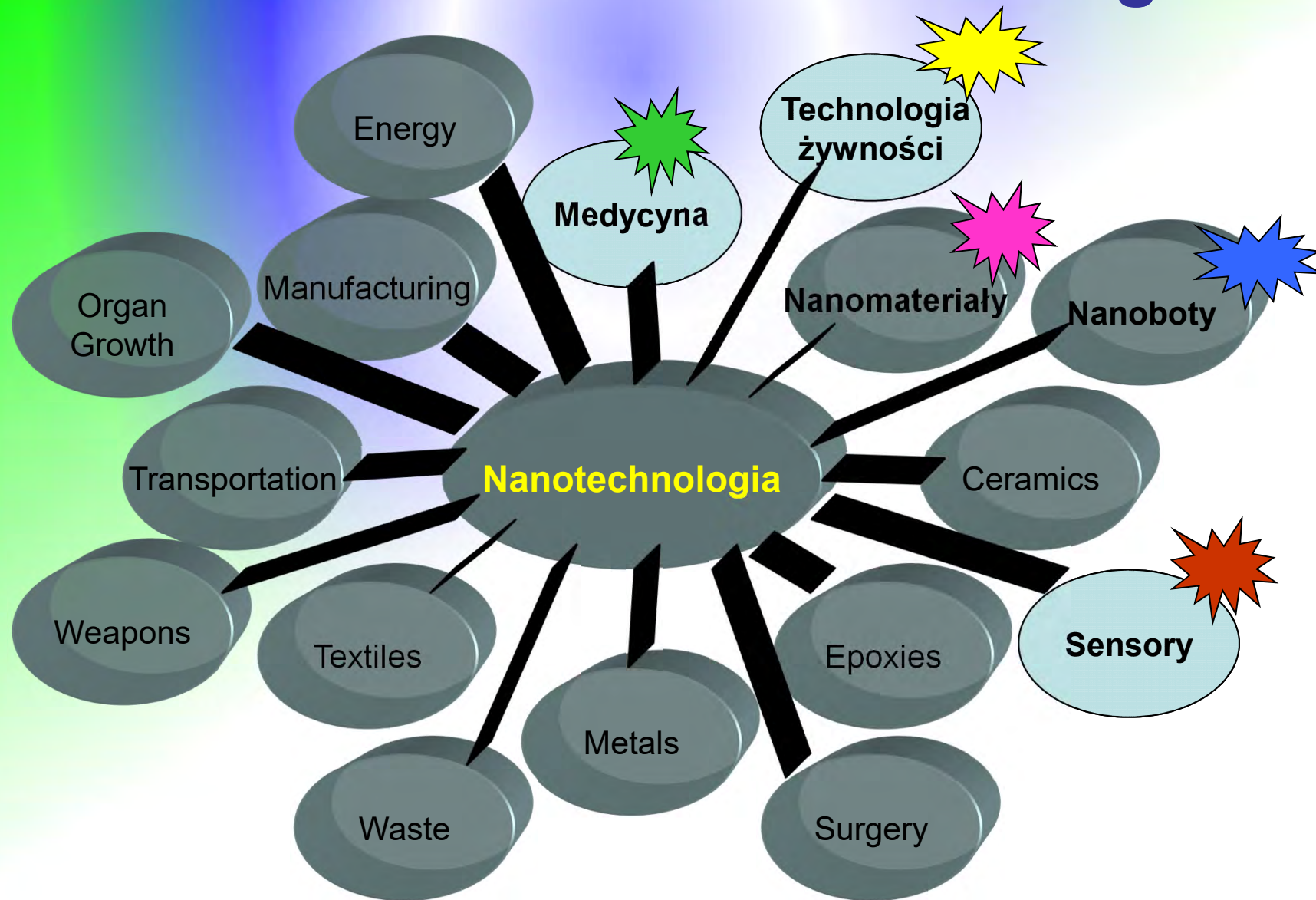
- **Mikro- i nanotechnologia są w dniu dzisiejszym najbardziej fascynującymi obiektami wielodyscyplinarnych badań naukowych, z niekonwencjonalnymi rozwiązaniami technicznymi z kilku dziedzin nauki, m.in. fizyki, chemii, biologii molekularnej, czy inżynierii elektronicznej z organiczną elektroniką, fotoniką i komputeryzacją.**



# Wielodyscyplinarne pochodzenie nanobiotechnologii



# Zakres działania nanotechnologii

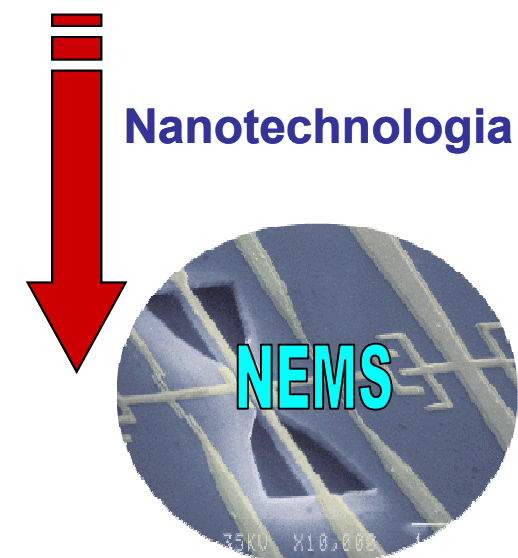
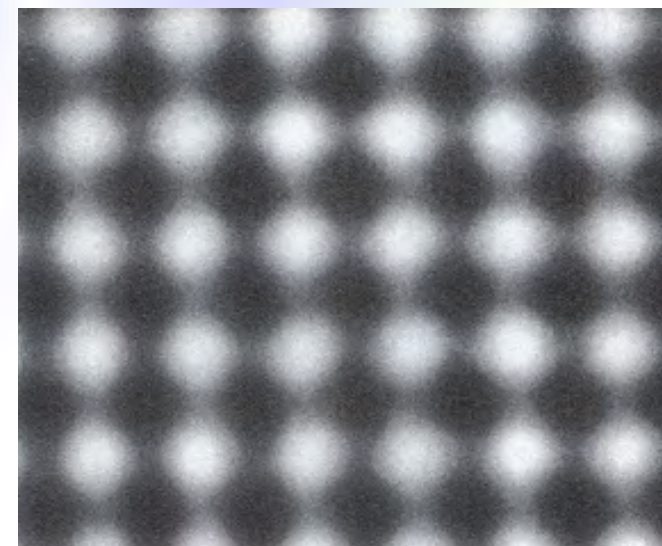
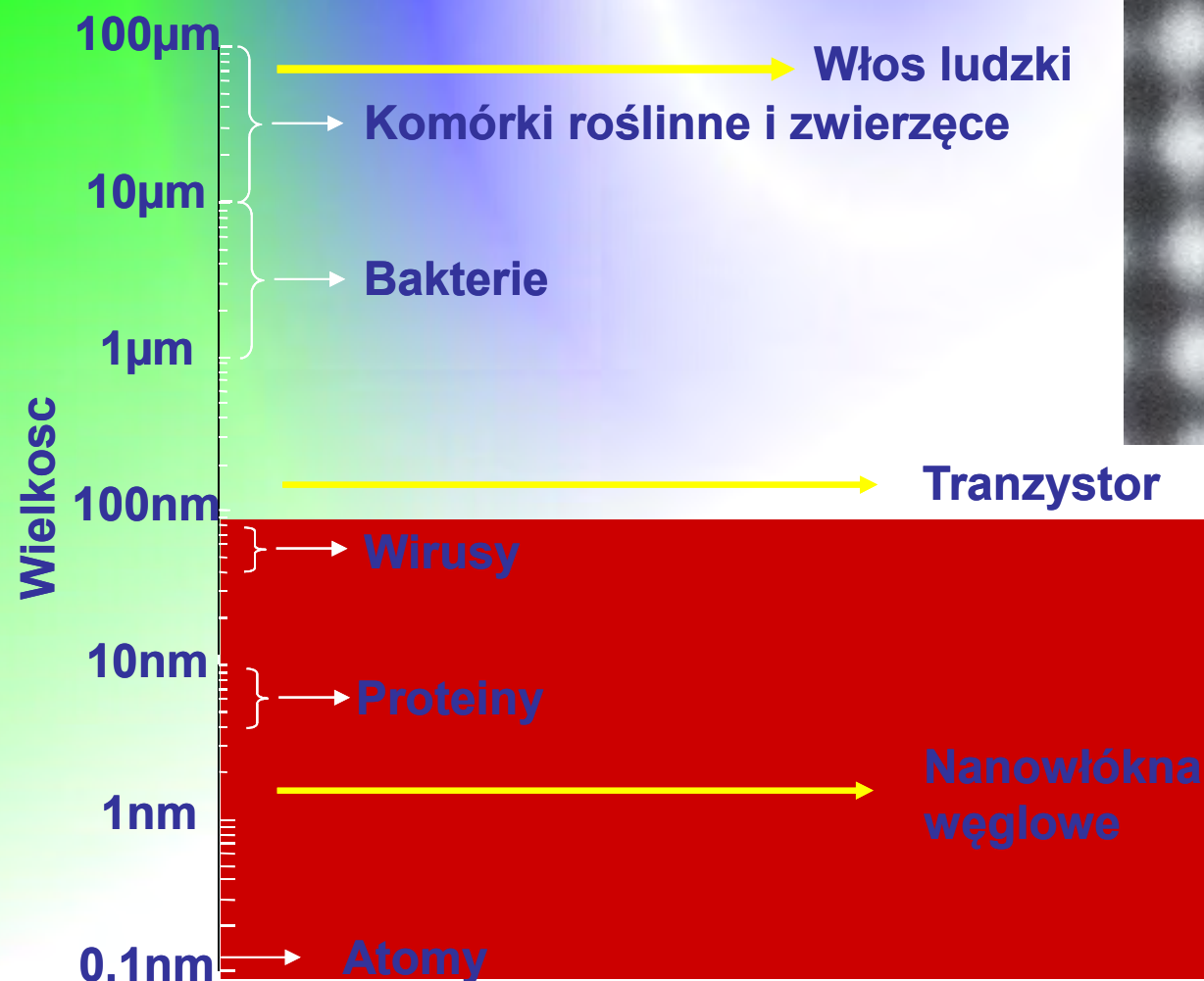




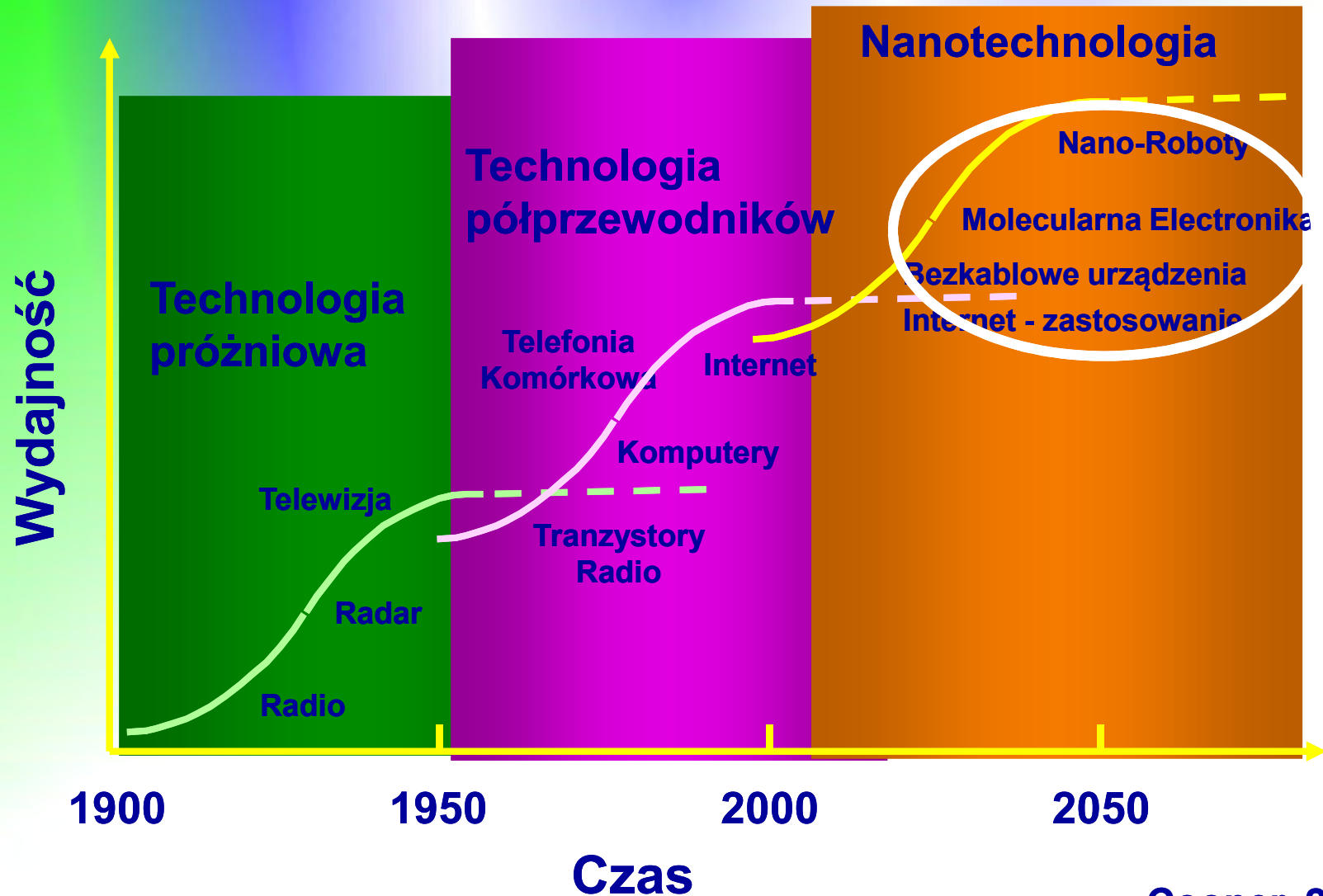
- Nanobiotechnologia obejmuje dziedziny wiedzy, badające i kontrolujące struktury, procesy oraz funkcje systemów biologicznych w nanoskali, tj. obiekty poniżej 100 nm.
- Nanobiotechnologia obejmuje konstrukcję sztucznych „nanobiorobotów“ (*assemblers* i *replicators*) oraz ich produkcję i wszelkie manipulacje kształtem „botów” na poziomie atomowym i molekularnym, tj. w skali  $10^{-9}$  m.



# Nanotechnologia: wymiary i skala



# Ewolucja w technologiach



Cooper, 2001



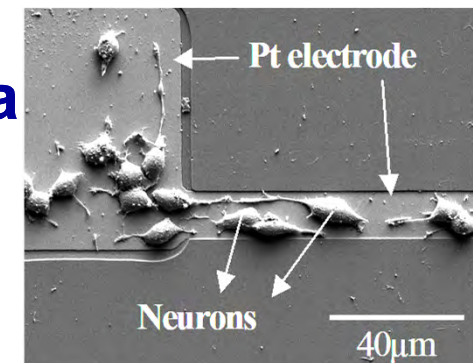
# Branże nanotechnologii

Mikro-Elektro-  
Mechaniczny  
System (MEMS)



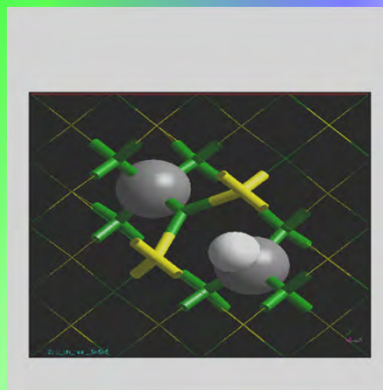
Elektroniczna nanotechnologia

Mikrofluidyzacja  
& Bio-Chipy



# Cykl prac z zakresu nanotechnologii

Projektowanie i modelowanie



Synteza i proces produkcji

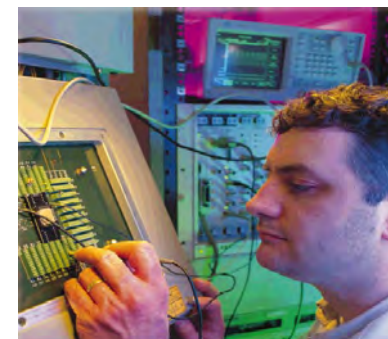


Zastosowanie

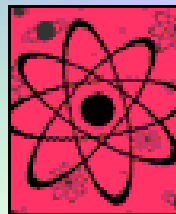


Cykl  
produkcyjny  
nanobotów

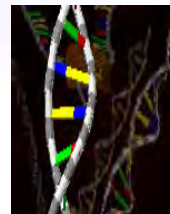
Charakterystyka



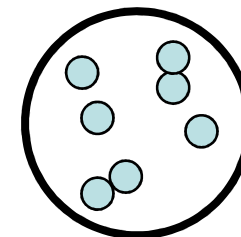
- „Nanoboty“ są hybrydową kombinacją części biologicznej i nieorganicznej i jako innowacyjne rozwiązania techniczne umożliwiają kontrolę oraz regulację procesów biologicznych, konstrukcję nowych elementów „atom-po-atomie“, aż do cząsteczek i komórek.



Atomy  
<1 nm



DNA  
~2.5 nm



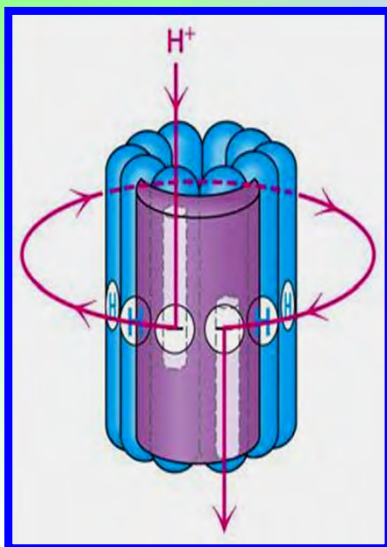
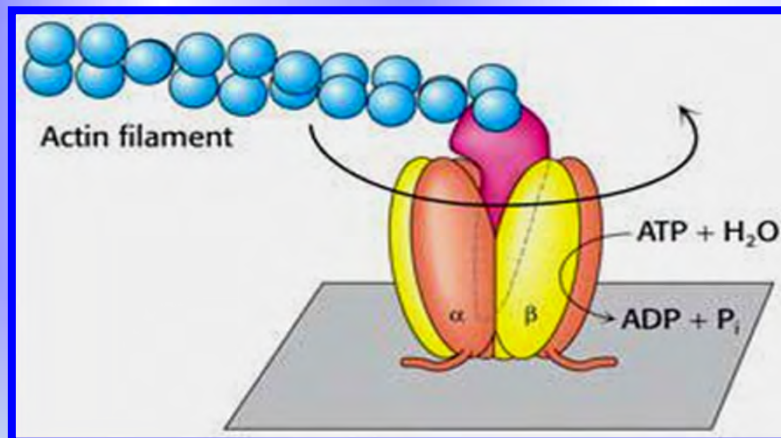
Komórki  
tysiące nm

- Budowy w.w. nanostruktur dokonuje się w specjalistycznych atomowych mikroskopach (AFM).



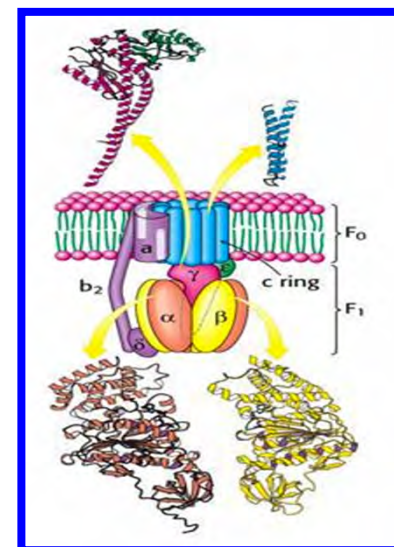
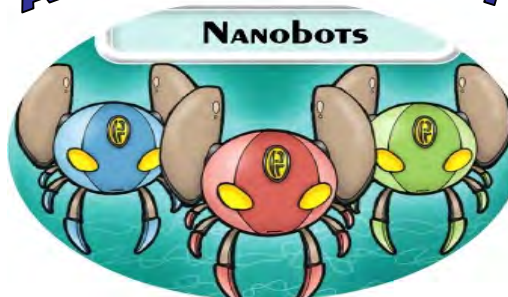
# Małe molekularne „motory“

ATP

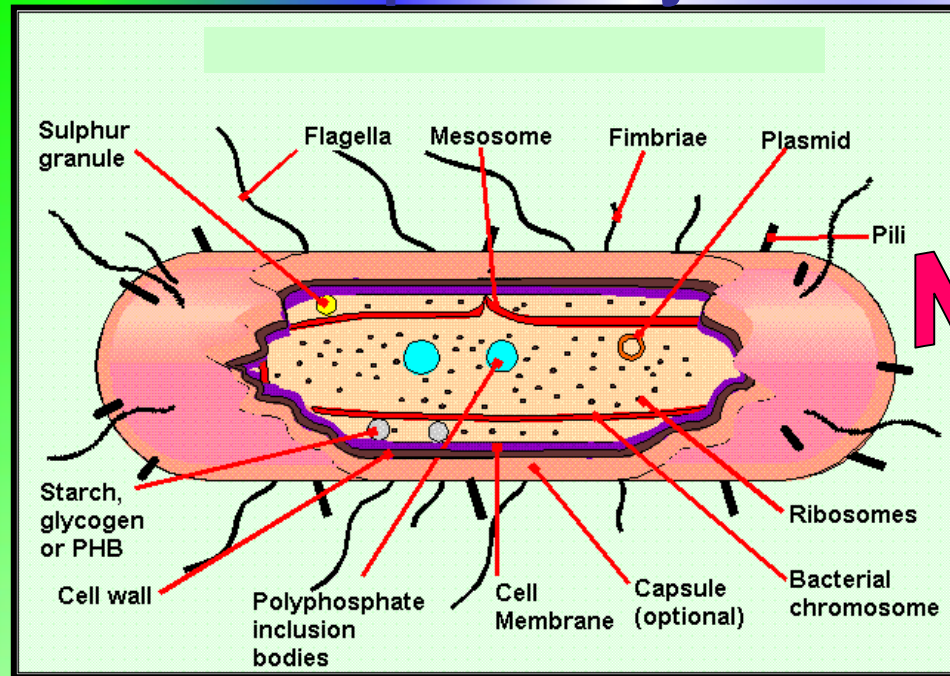


Przepływ protonów :: ATP-Syntetaza

A może bakterie?

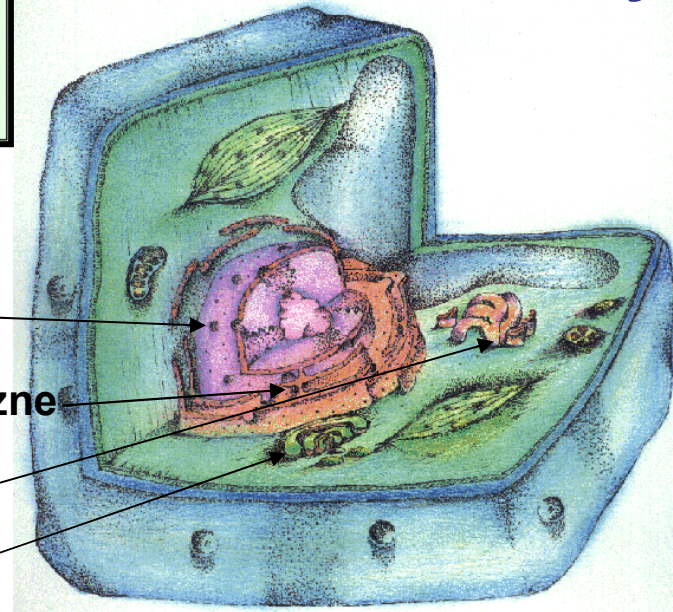


## Komórka prokariotyczna



## Naturalne bioboty

## Komórka eukariotyczna



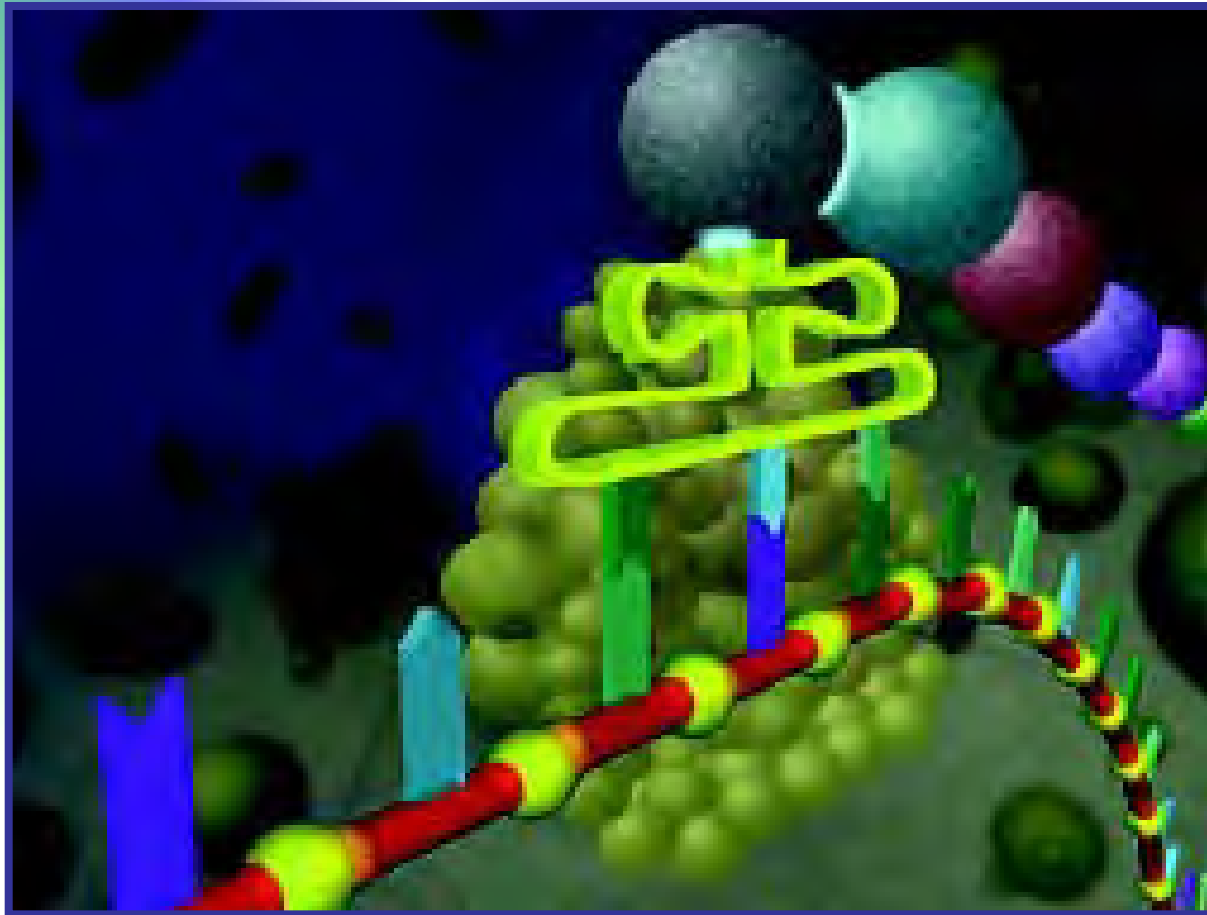
Jądro

Retikulum endoplazmatyczne

Aparat Golgiego

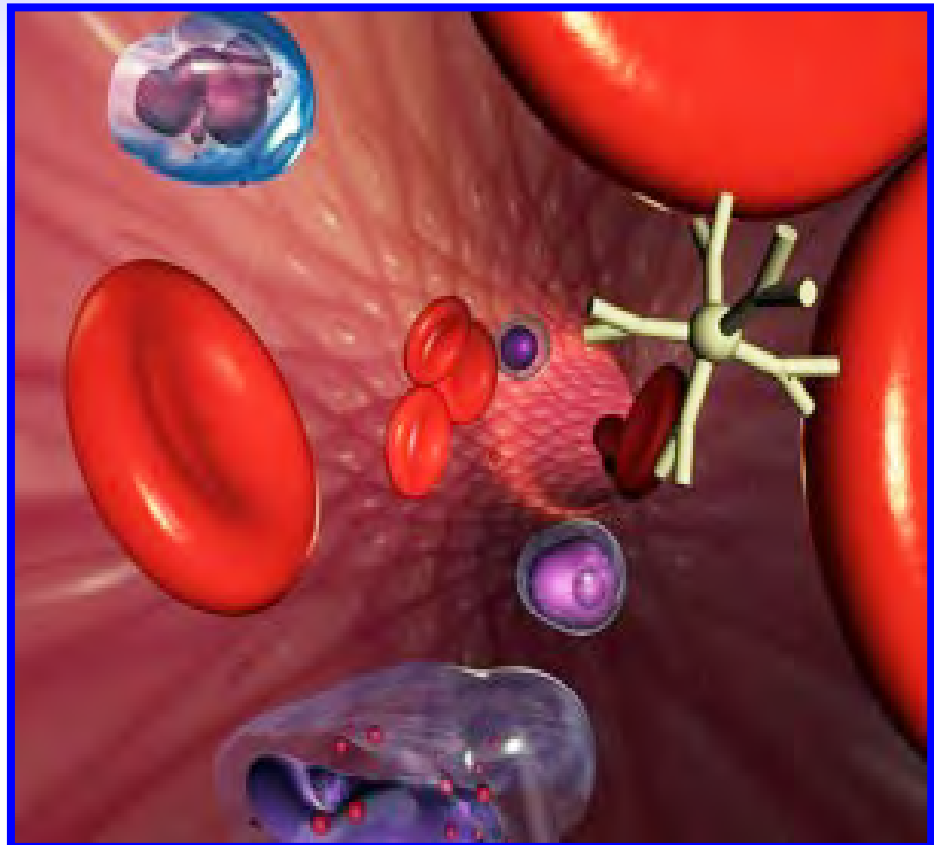
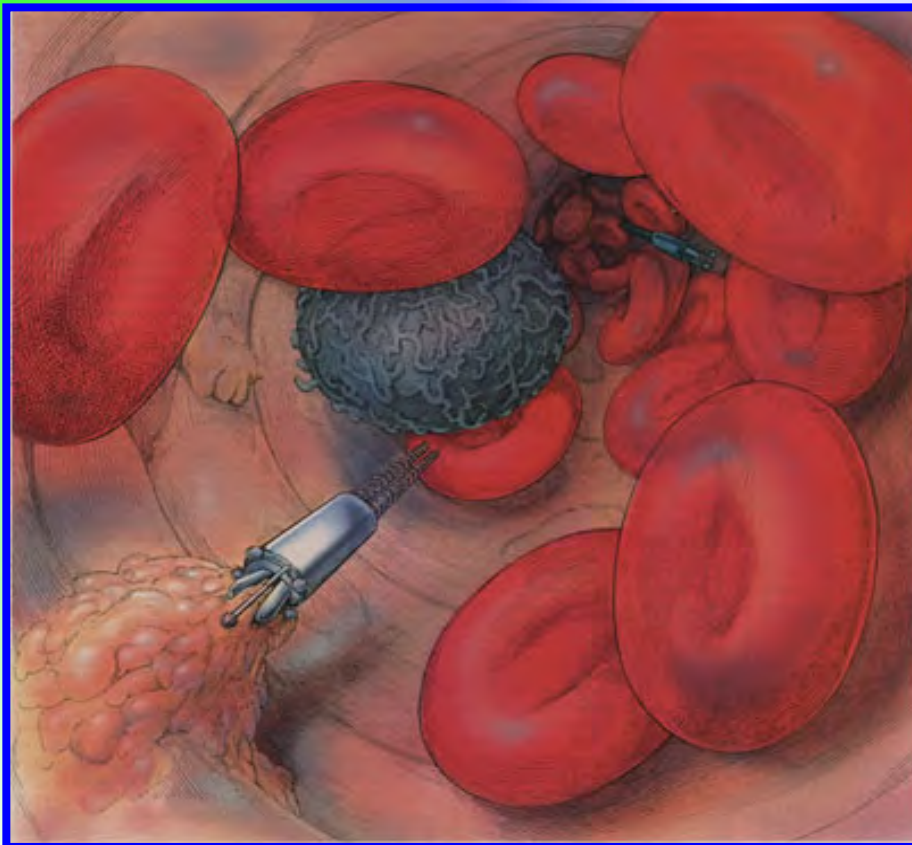
Mitochondria

# Translacja białek na rybosomie: naturalna nanomaszyna





# Nanobioroboty jako przyszłość nanobiotechnologii



# Nanoboty

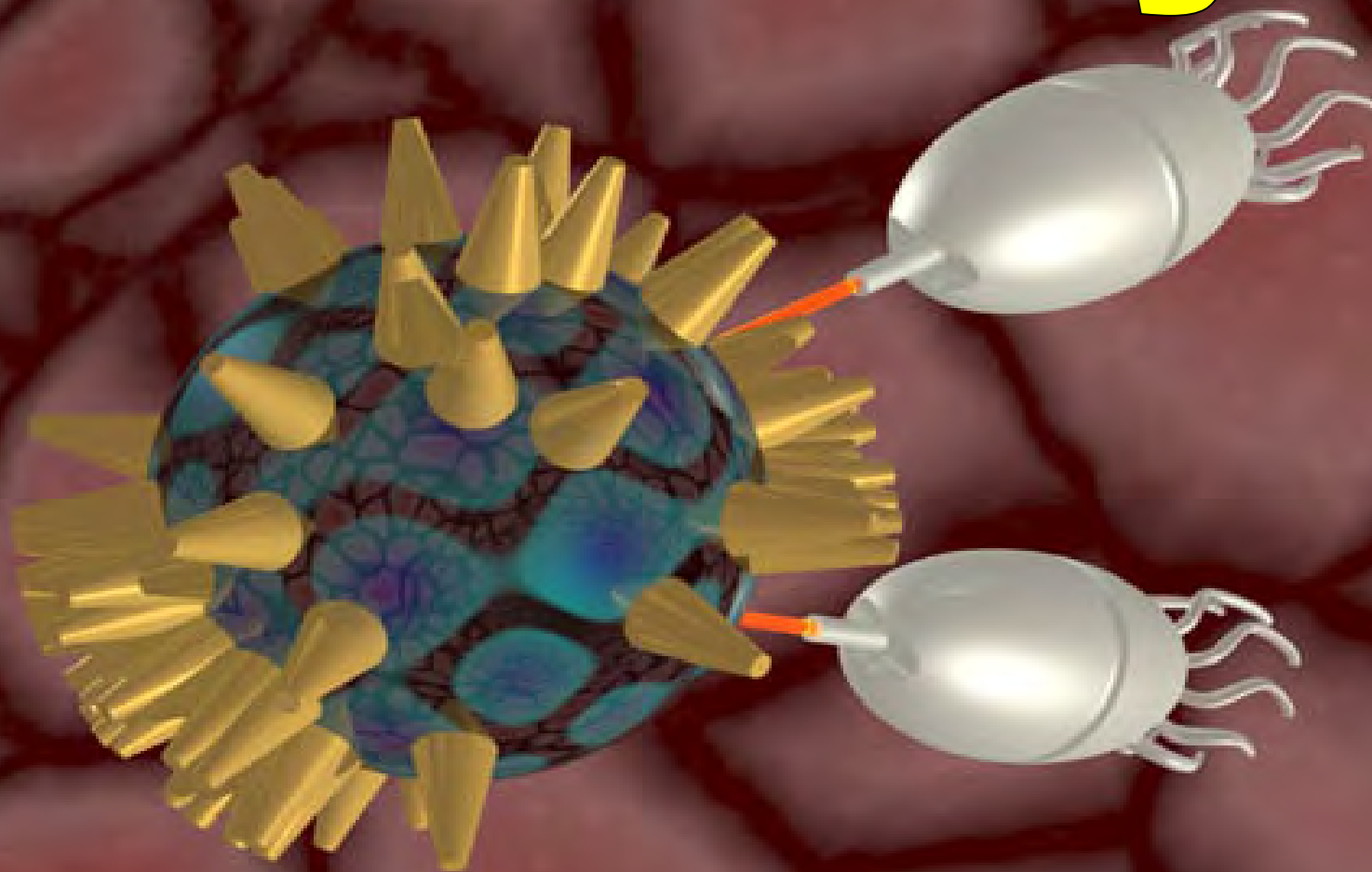


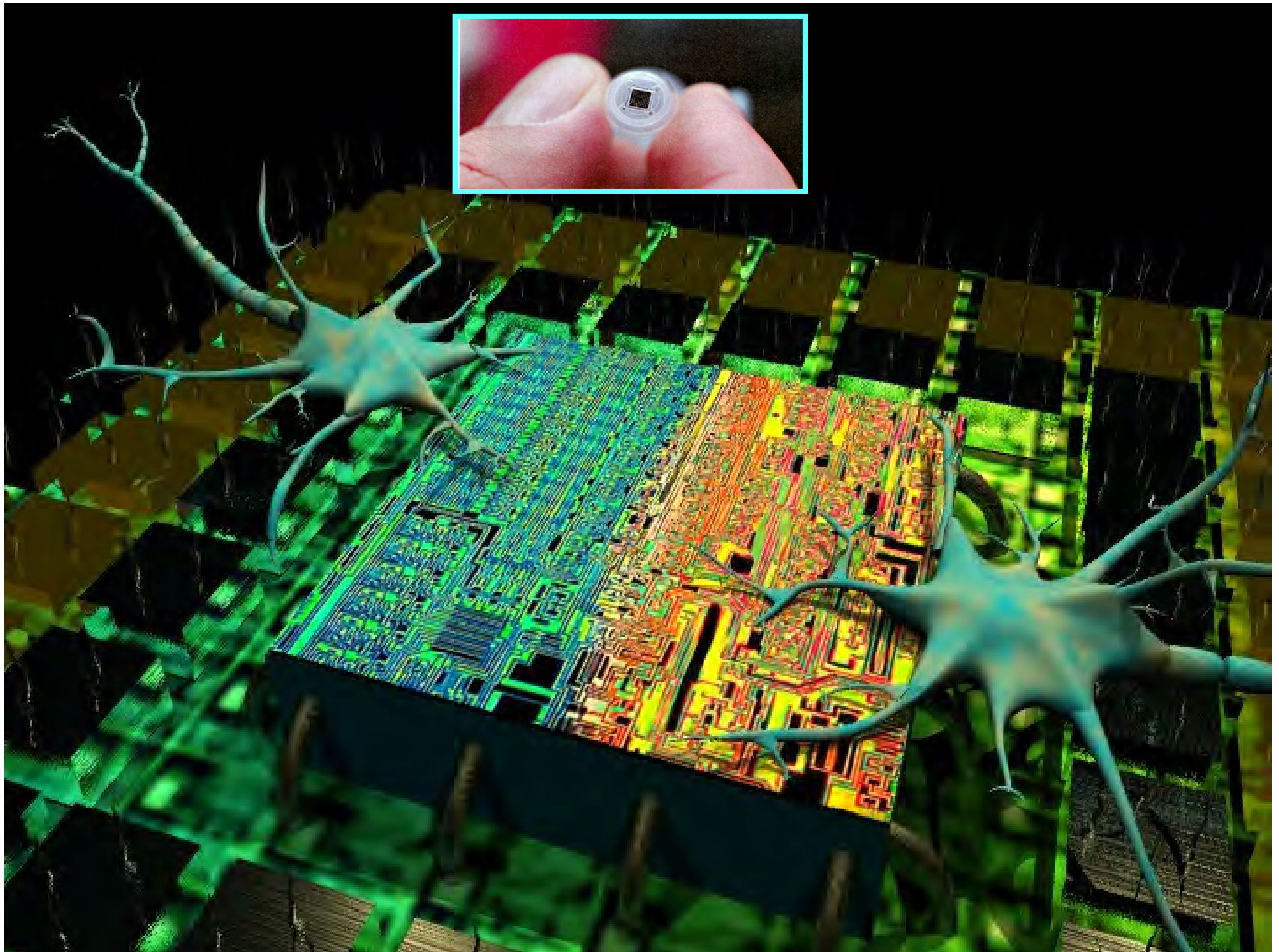
# Nanoboty

A 3D illustration depicting various nanobots in a red, cellular environment. The scene includes several distinct robotic forms: a large, dark, spherical robot with a red ring and a small antenna; a smaller, white, pill-shaped robot with a red ring; a robot with a green, textured body and a red ring; a robot with a white, boxy body and a red ring; and a robot with a dark, cylindrical body and a red ring. The background is a vibrant red, with a large, circular, white structure resembling a cell nucleus. The overall aesthetic is futuristic and scientific.



# Nanoboty





- Wiedza nanotechnologiczna skupia w sobie dwa fundamentalne kierunki badań, zw. „*top down*” i „*bottom up*”.
- Technika „*top down*” odnosi się do nanostruktur otrzymanych na drodze kształtowania mechanicznego oraz w wyniku tzw. rytowania.
- Technika „*bottom up*” odnosi się do budowania organicznych i nieorganicznych struktur „atom-po-atomie” (*atom-by-atom*) lub „cząsteczka-po-cząsteczce” (*molecule-by-molecule*).

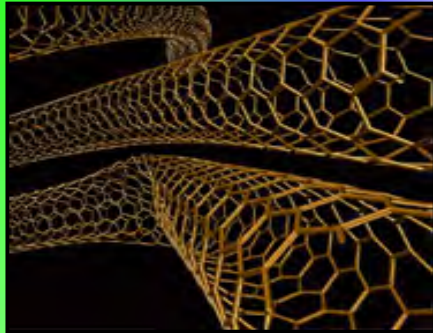


**Do budowy nanobotów, czy systemów MEMS/NEMS stosuje się obecnie materiały nowej generacji, ukształtowane np. w nano-włókna węglowe, nano-cylindry, nano-pierścienie, czy w nano-rurki/druciki.**

**Konstrukcja systemów NEMS bazuje na trzech głównych rozwiązaniach technicznych z zakresu nanotechnologii, tj. na tworzeniu:**

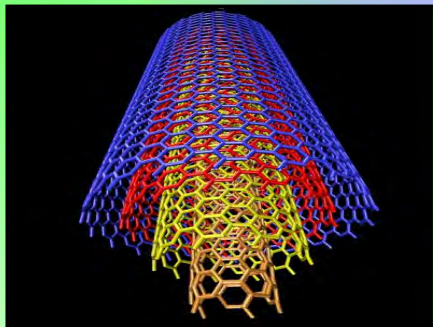
- **nano-cylindrów (*nanotubes*),**
- **nano-kanalów (*nanochannels*),**
- **bioaktywnych lub porowatych powierzchni o grubości w nm.**

## Struktury włókien węglowych (typy):



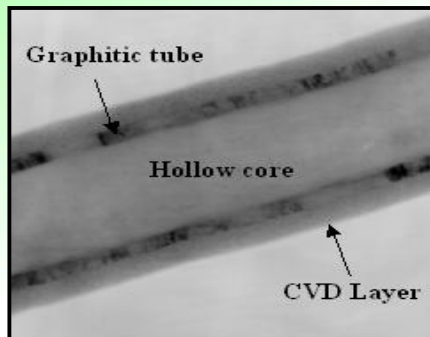
### Jednościenne nanocylindry węglowe

- minimalna średnica 0.4 nm
- przeciętna średnica 1.2 nm
- zmienna długość
- elastyczne



### Wielościenne nanocylindry węglowe

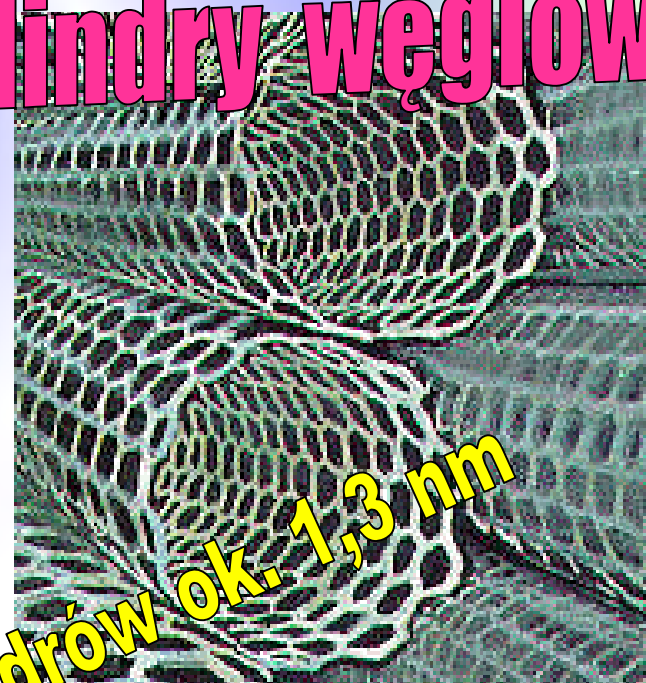
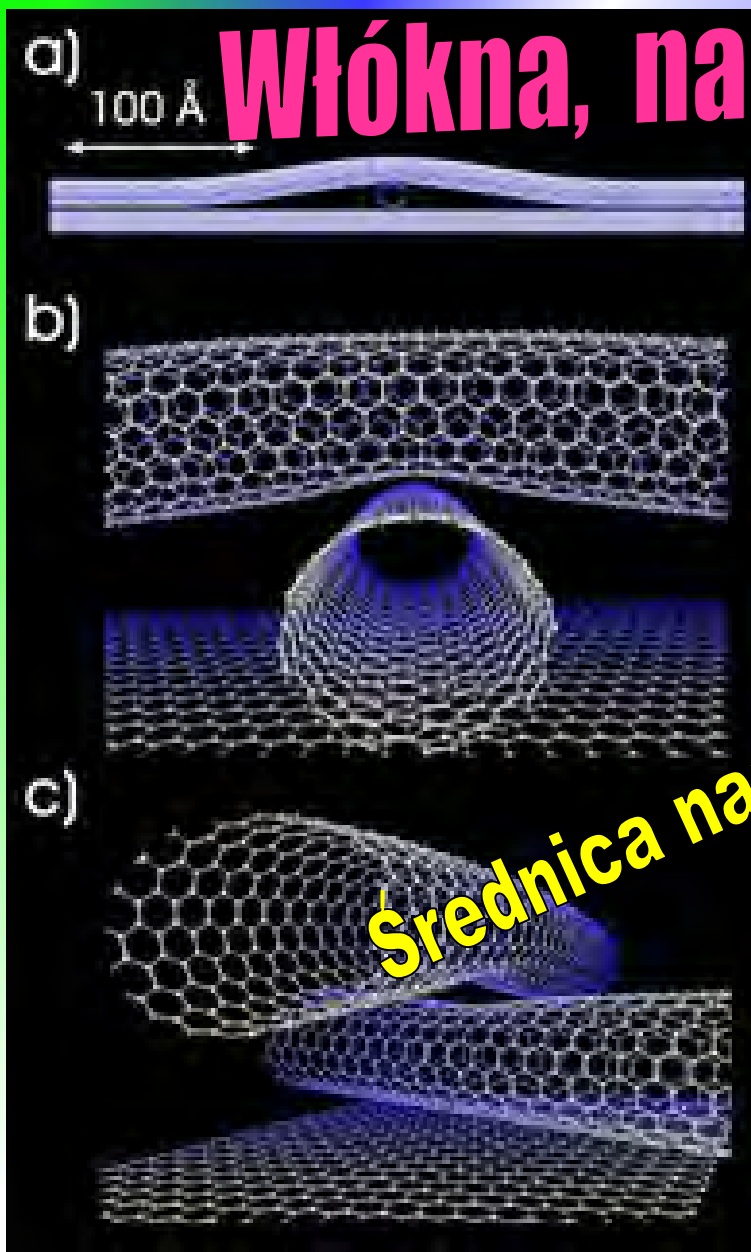
- wiele koncentrycznych cylindrow (odl. warstw 0.34 - 0.36nm)
- przeciętna średnica 20 nm
- zmienna długość
- zmienna budowa



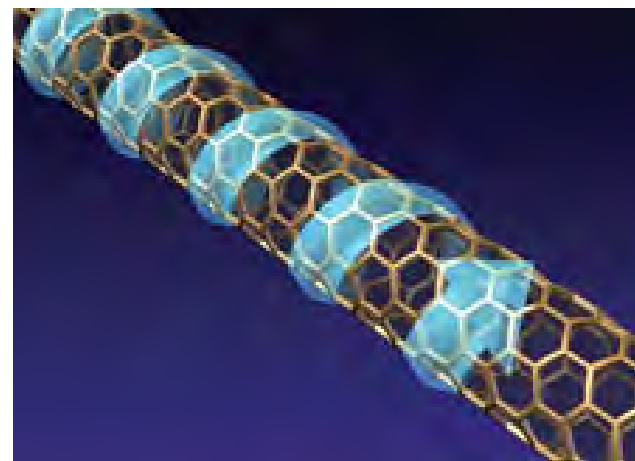
### Nanowłókna

- kombinacja grafitu i amorficznego węgla
- przeciętna średnica 100 nm
- zmienna długość
- zmienna morfologia (wewnątrz puste lub pełne)

# Włókna, nanocylindry węglowe

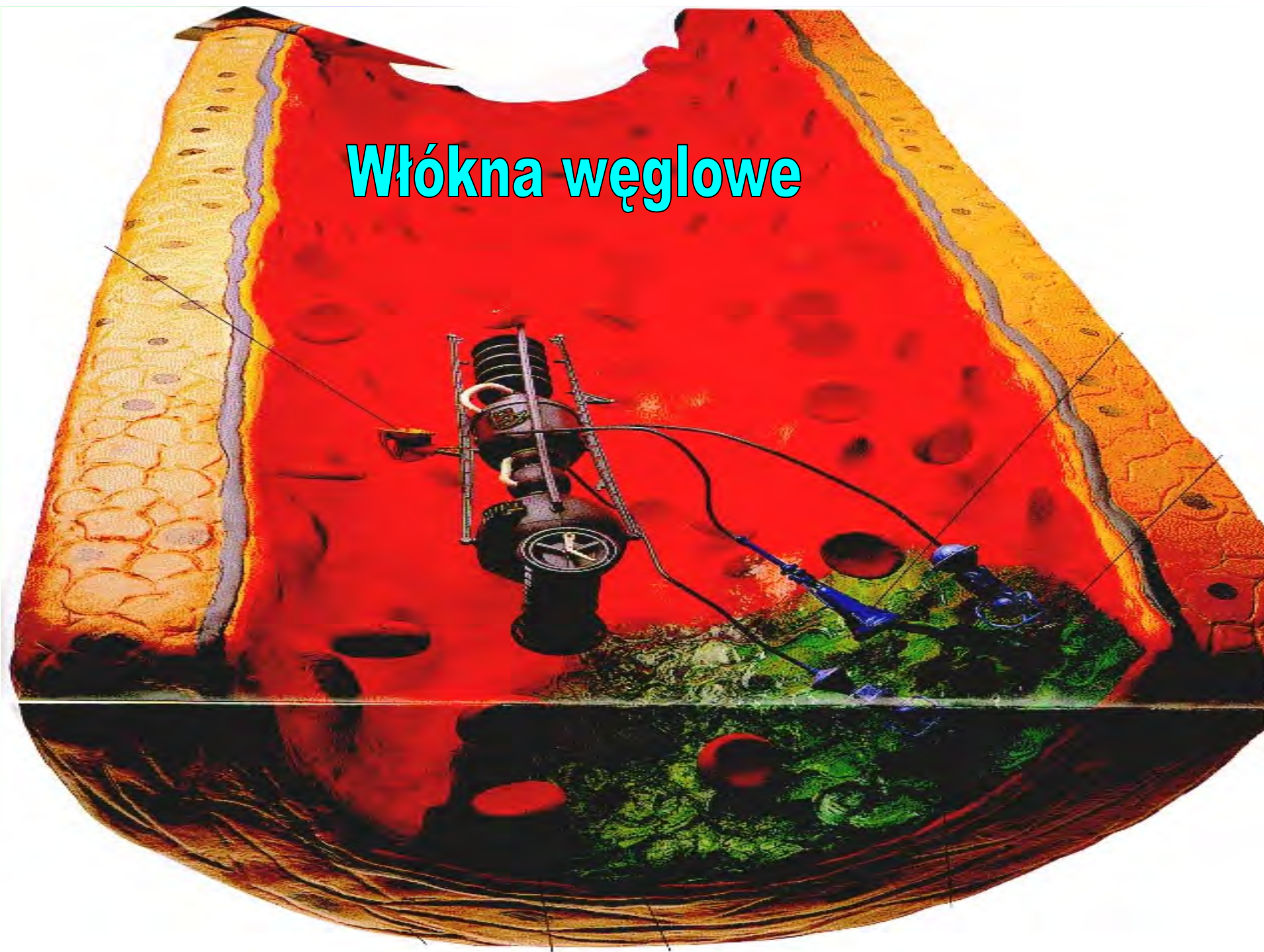


Średnica nanocylindrów ok. 1,3 nm

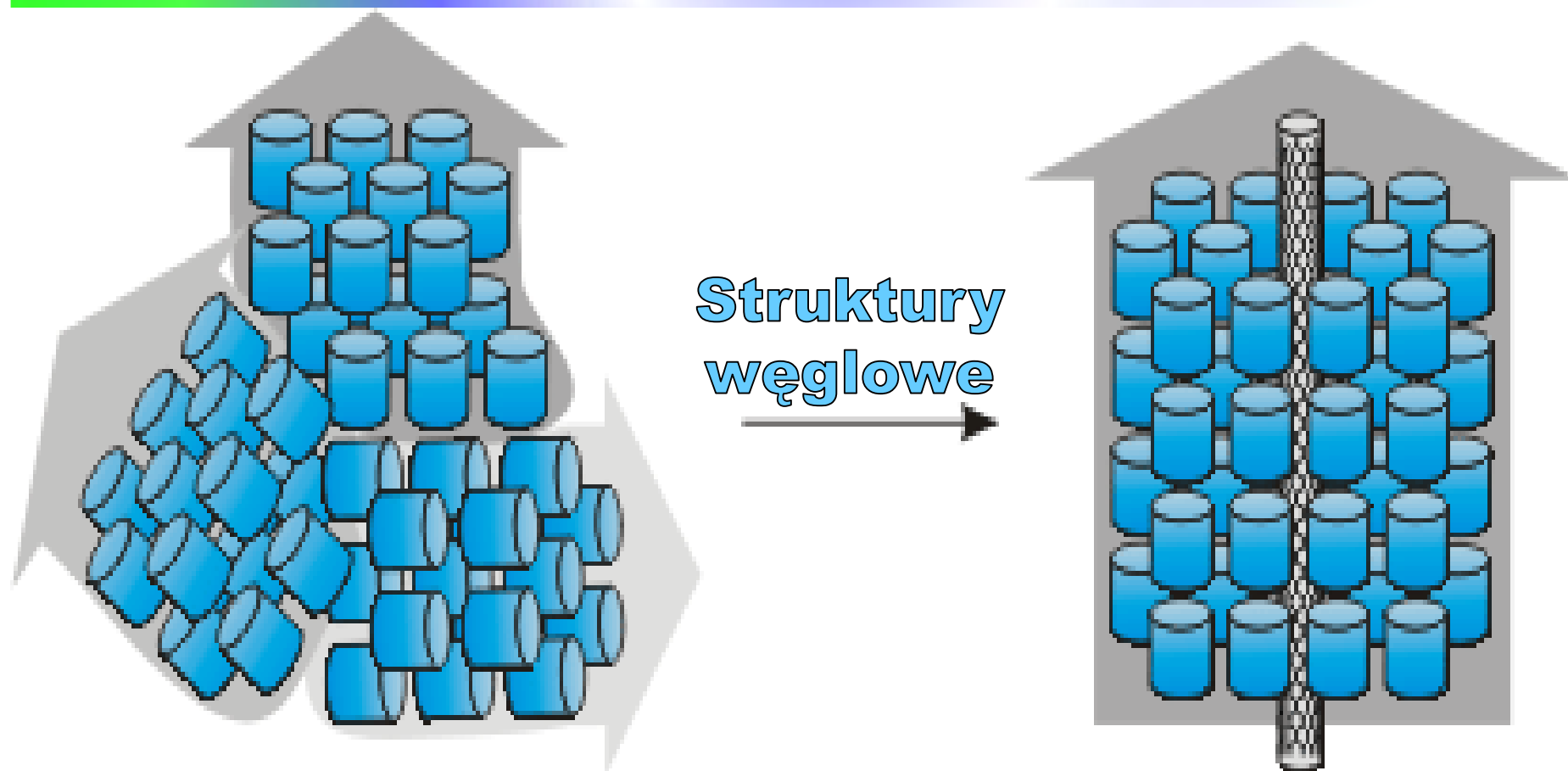




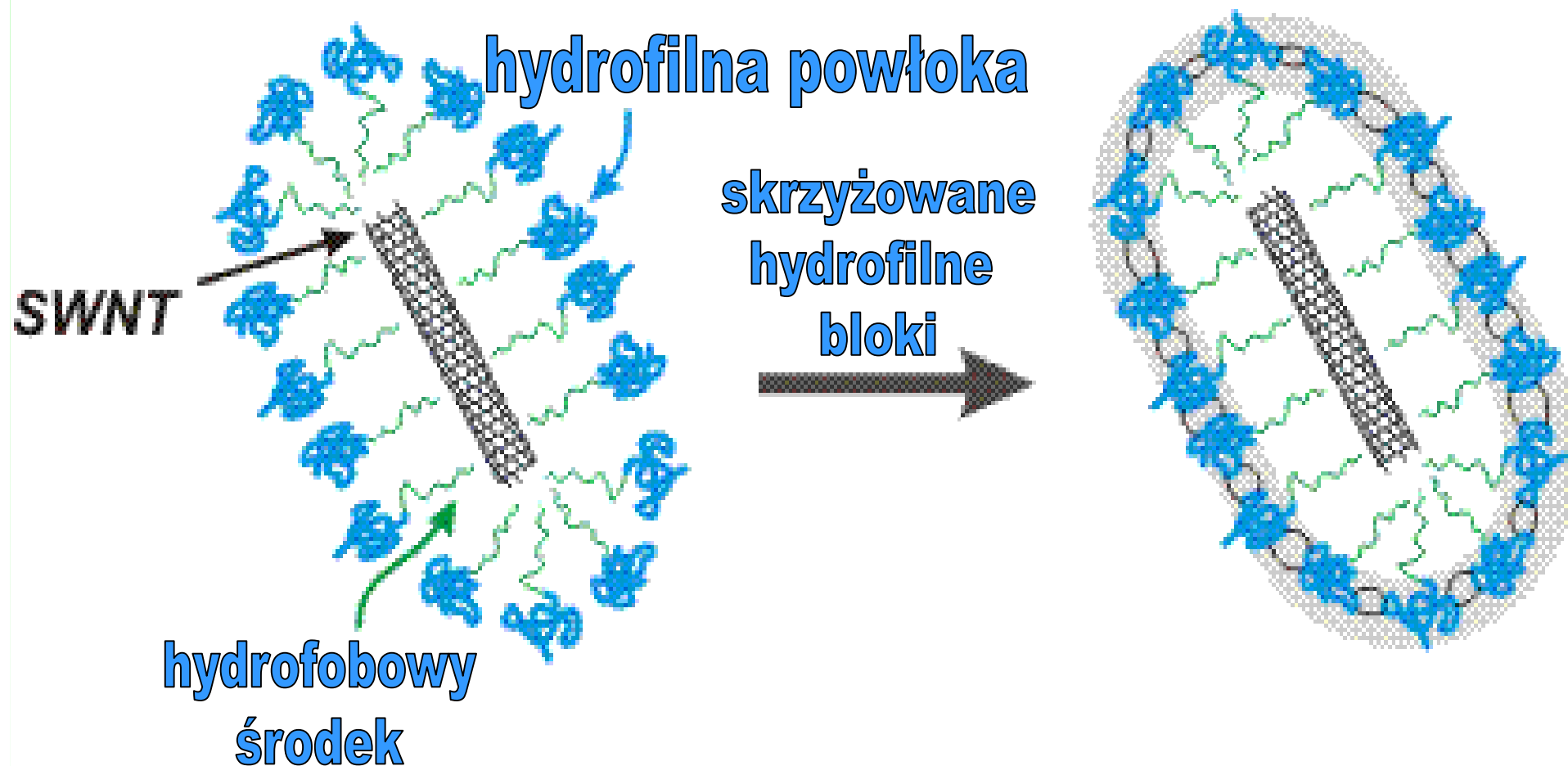
# Włókna węglowe



# Nano-cylindry węglowe

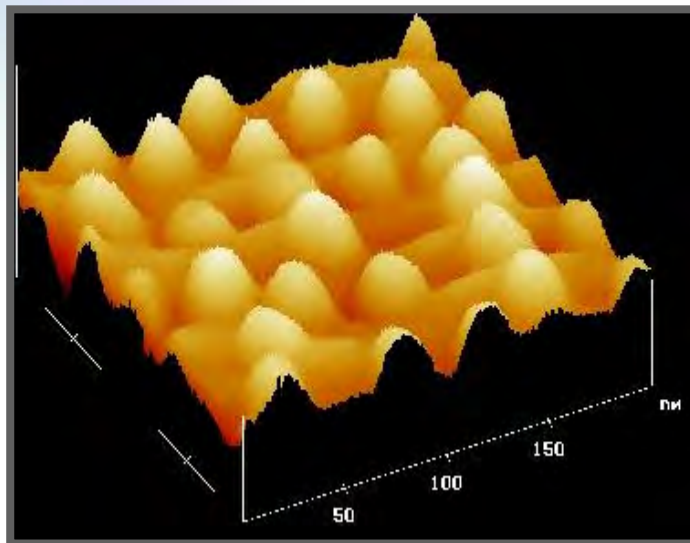


# Hydrofilne powłoki na włóknach węglowych



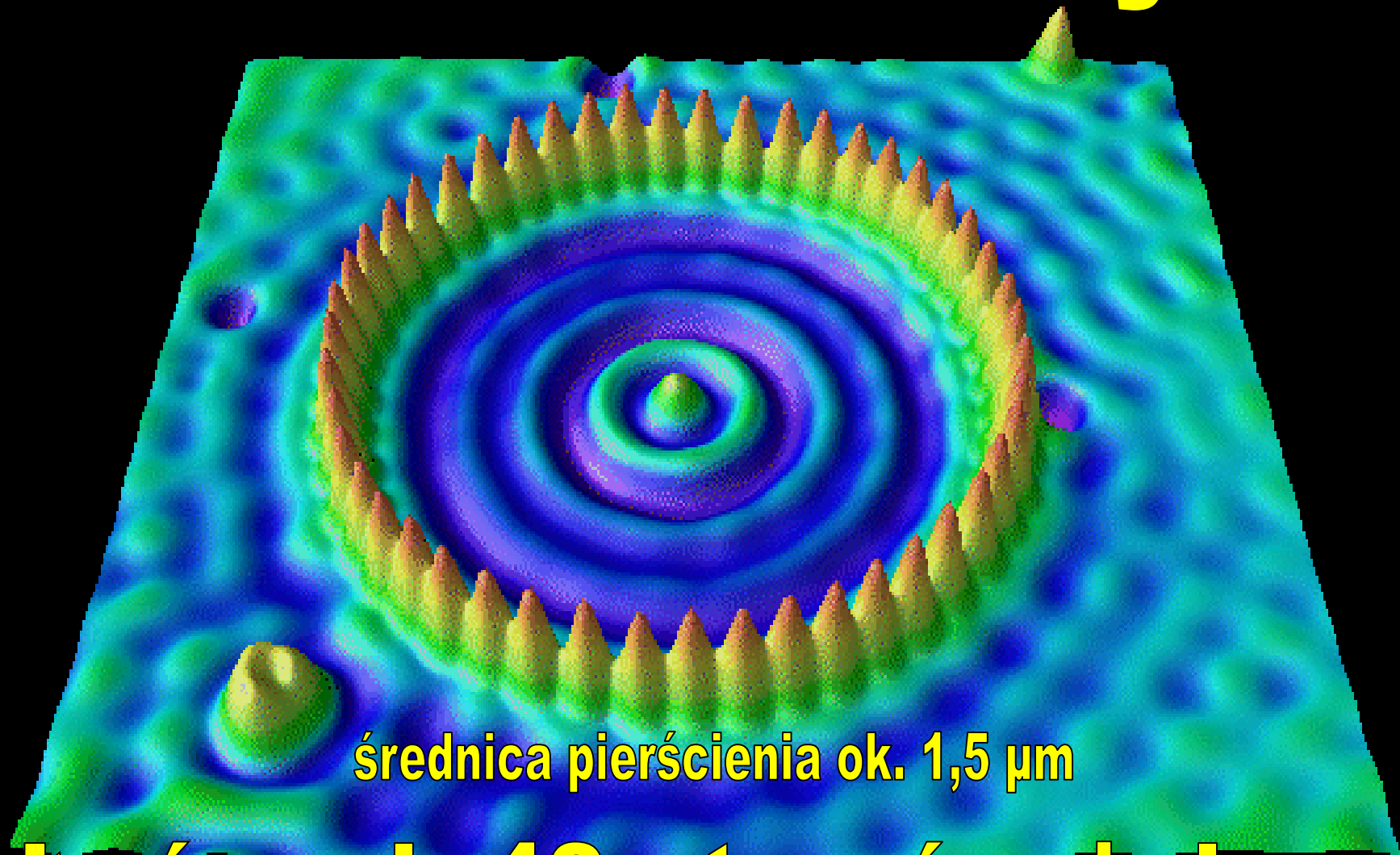
SWNT – *Single-Walled carbon Nanotubes*

**Nanomateriały, tworzące aktywne powierzchnie sensorów, nanobiobotów i NEMS są ukształtowane metodą mikrofluidyzacji albo fotolitografii, np. przy konstrukcji *array*.**





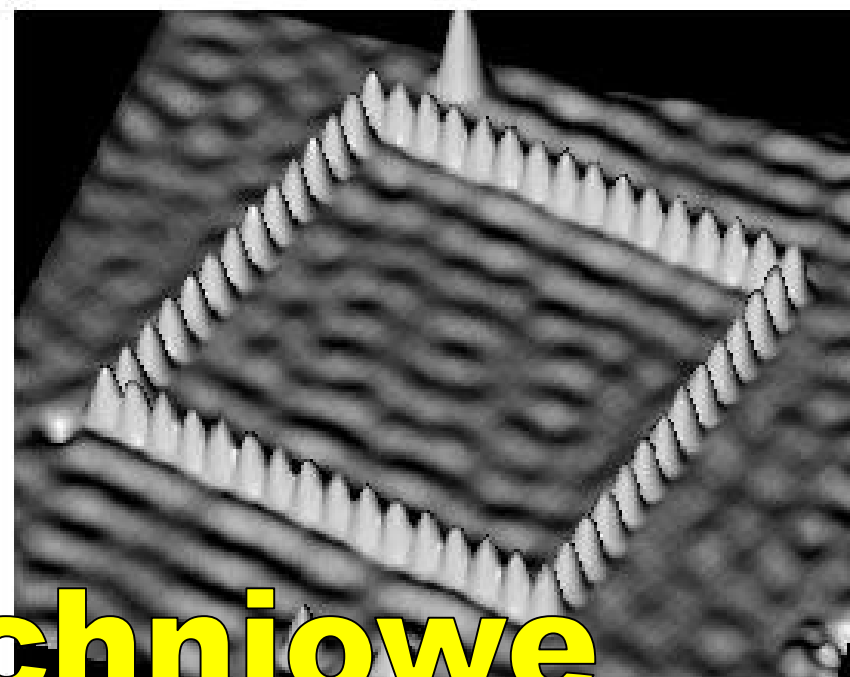
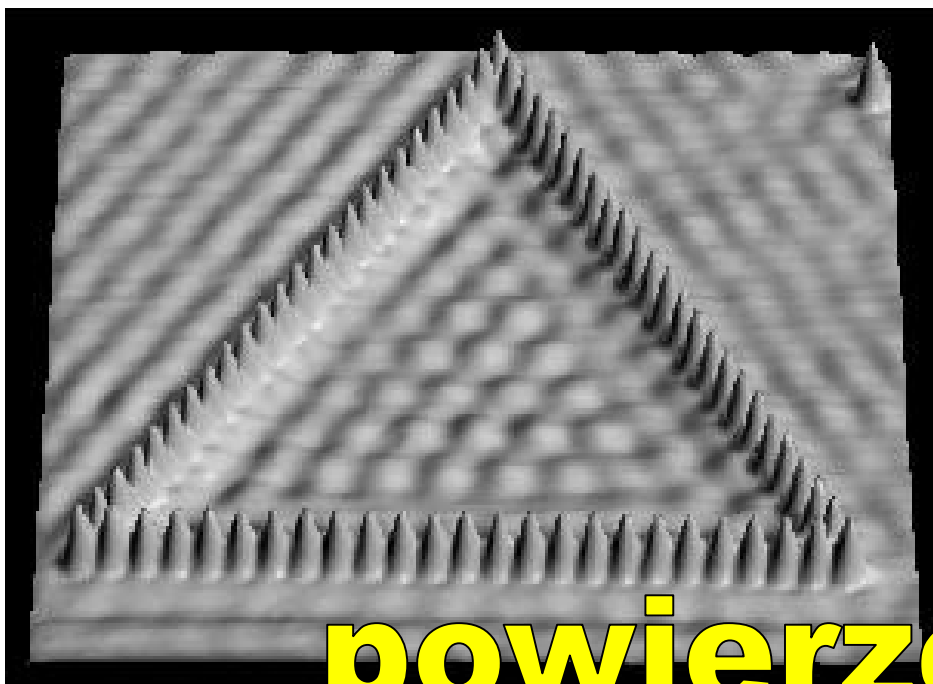
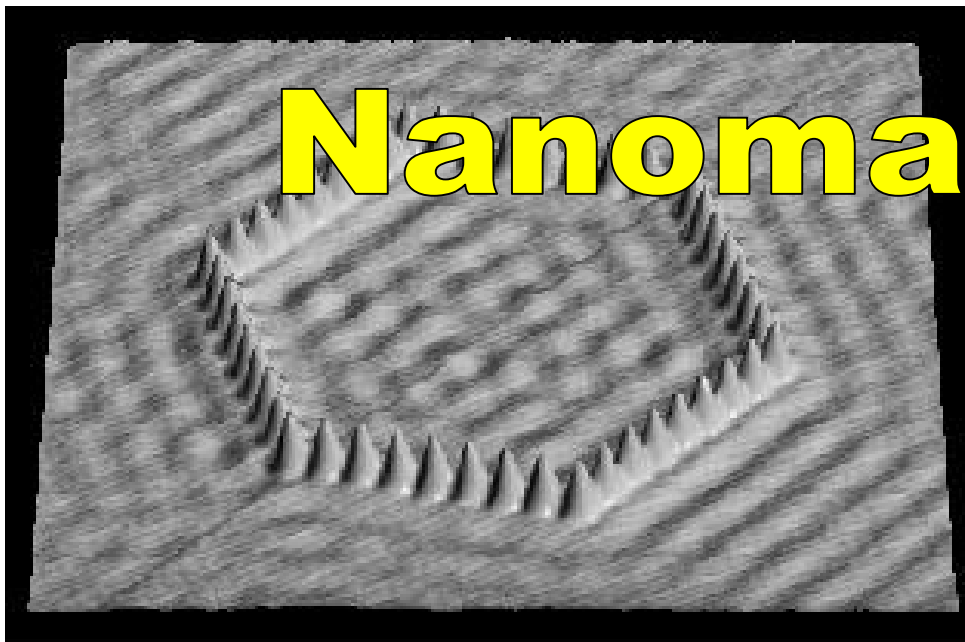
# Nanomateriały



średnica pierścienia ok.  $1,5\ \mu\text{m}$

**Łańcuch 48 atomów żelaza**

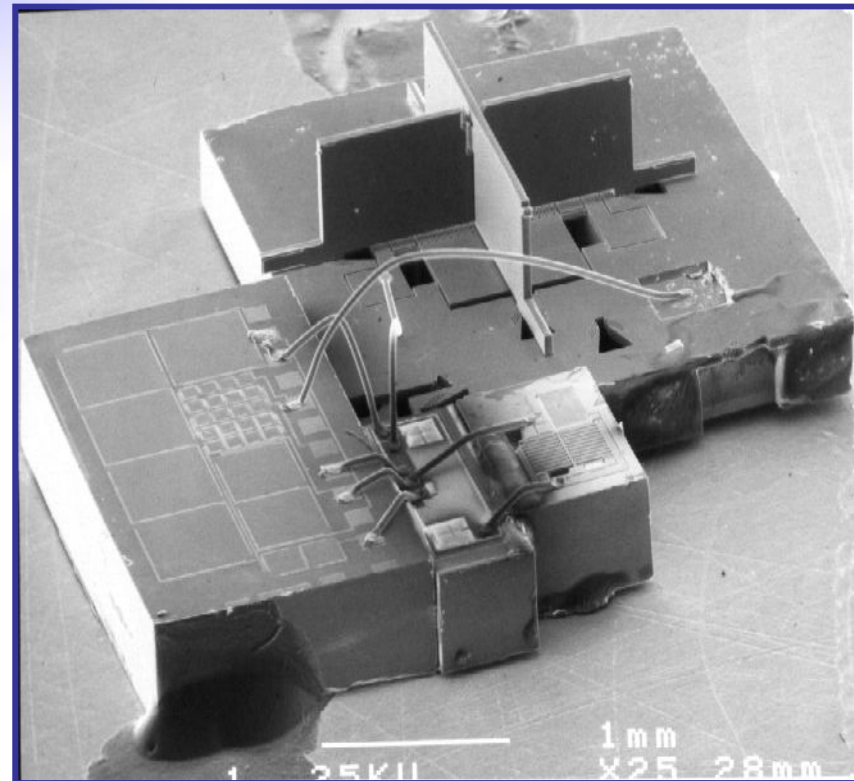
# Nanomateriały



powierzchniowe

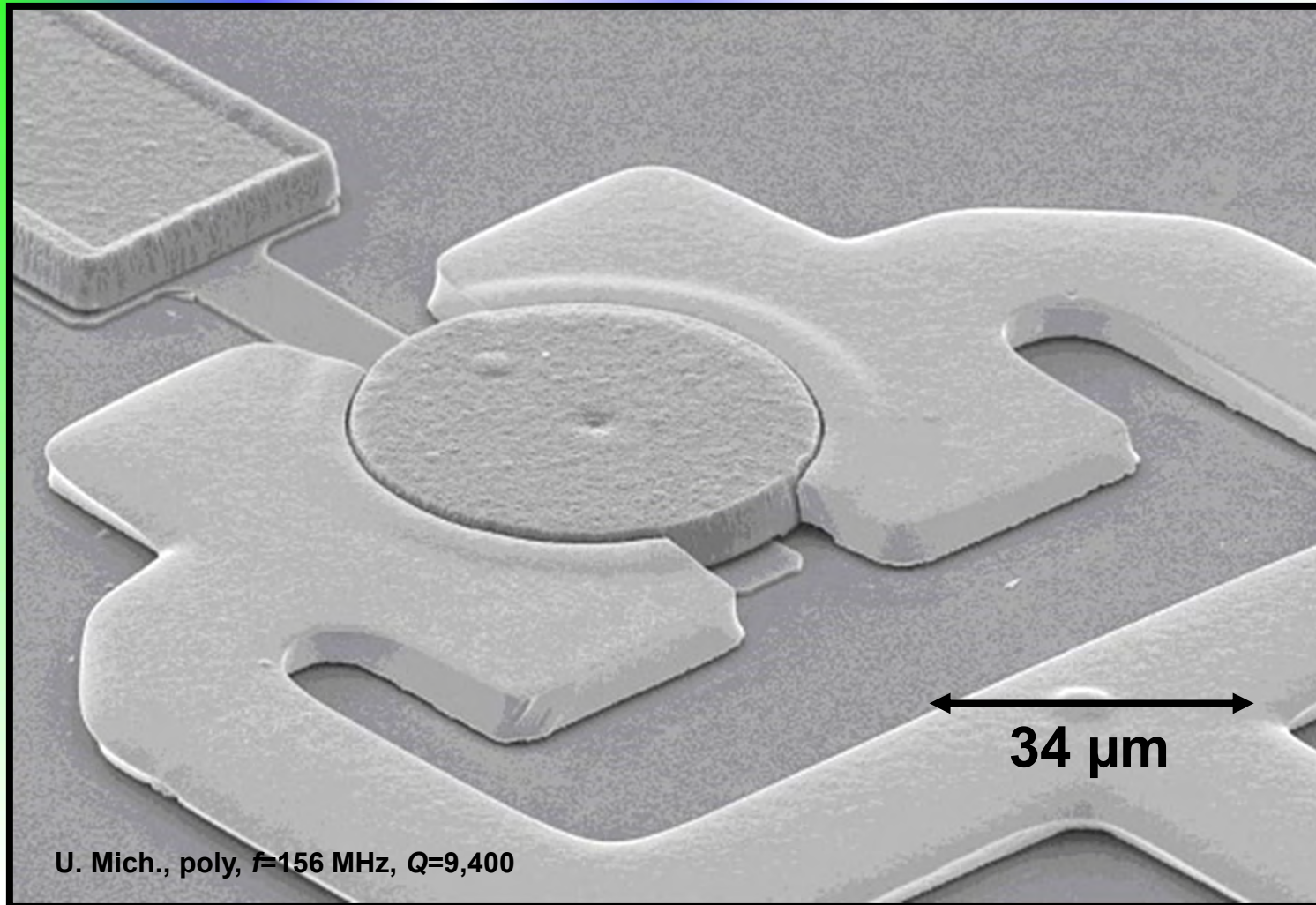
# MEMS

Mikro - Elektro - Mechaniczne Systemy



# NEMS

## Nano – Electro - Mechaniczne Systemy





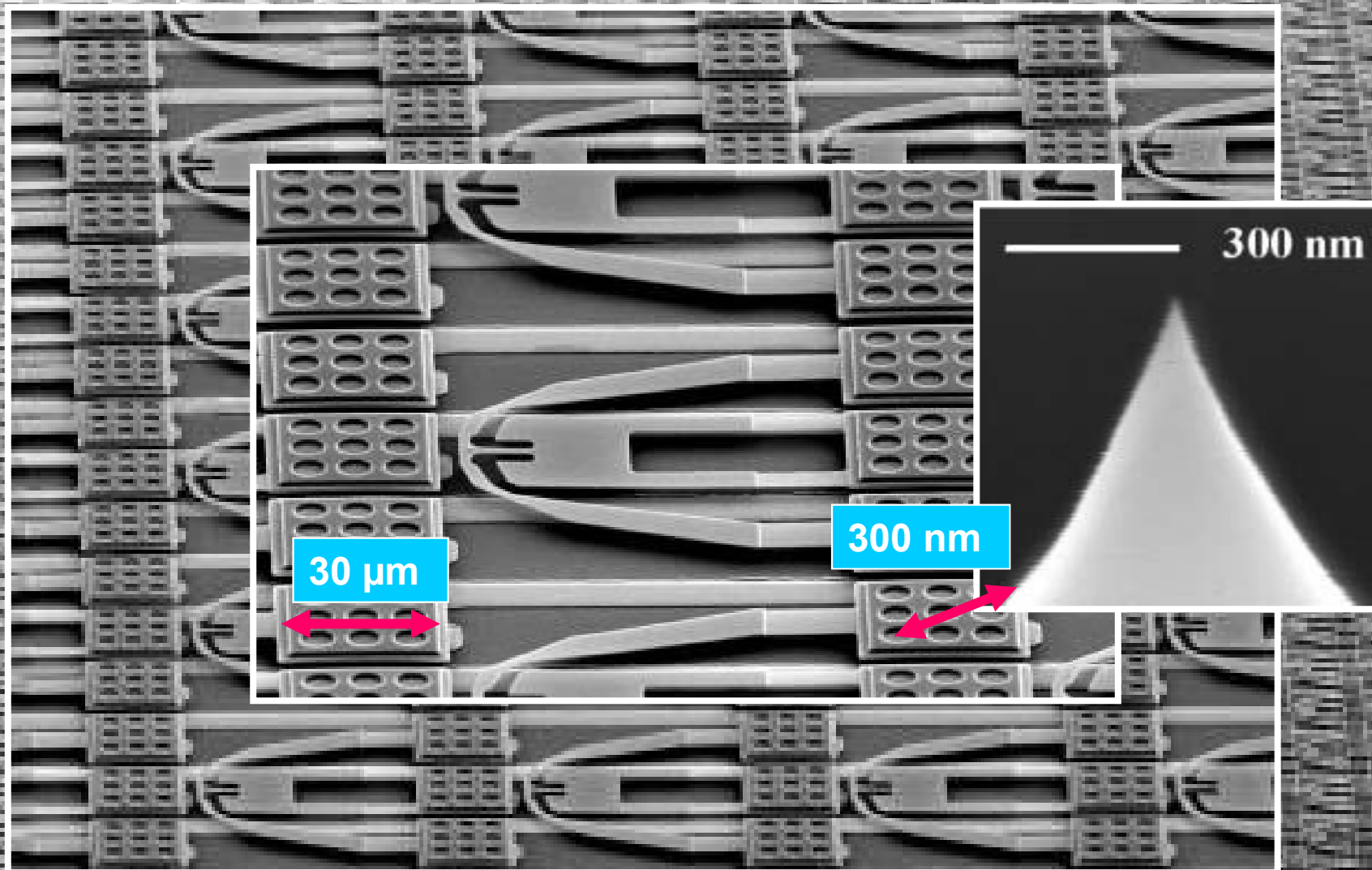
# NEMS Motor

100 nm

## MEMS Motor

0020 30KV X850 10µm WD25

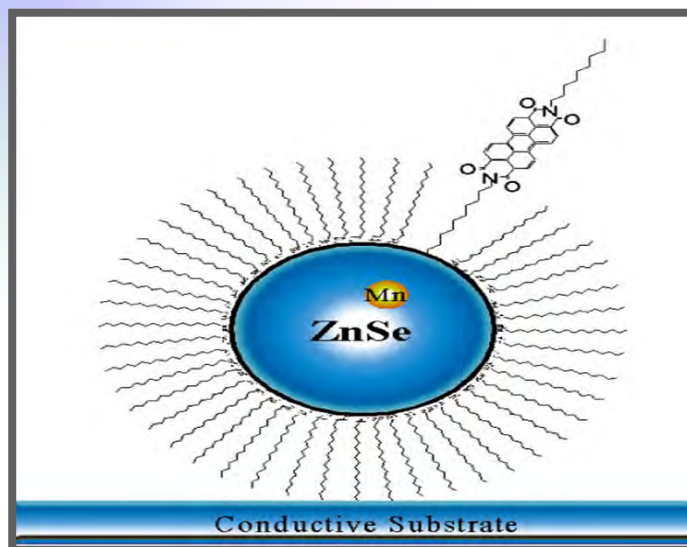
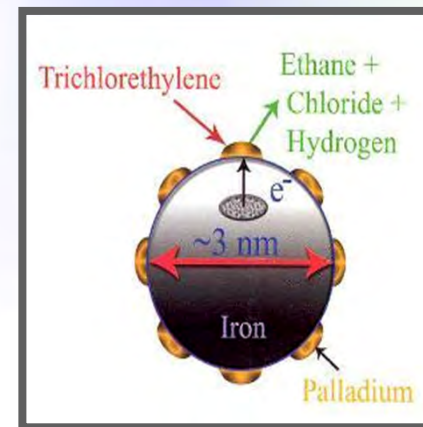
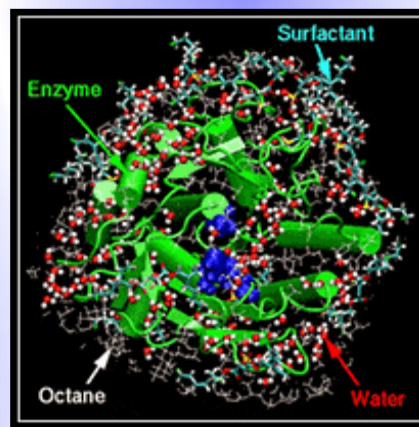
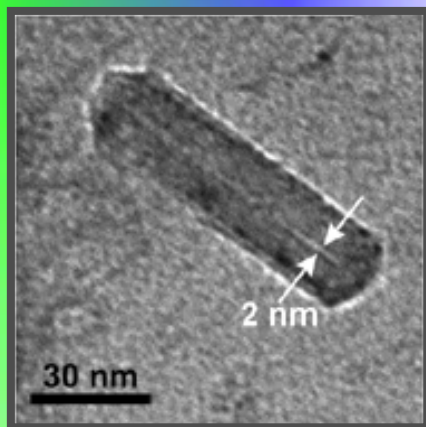
# "Millipede" array



64 x 64 cantilevers

1 mm

# Nanokompozycje materiałowe

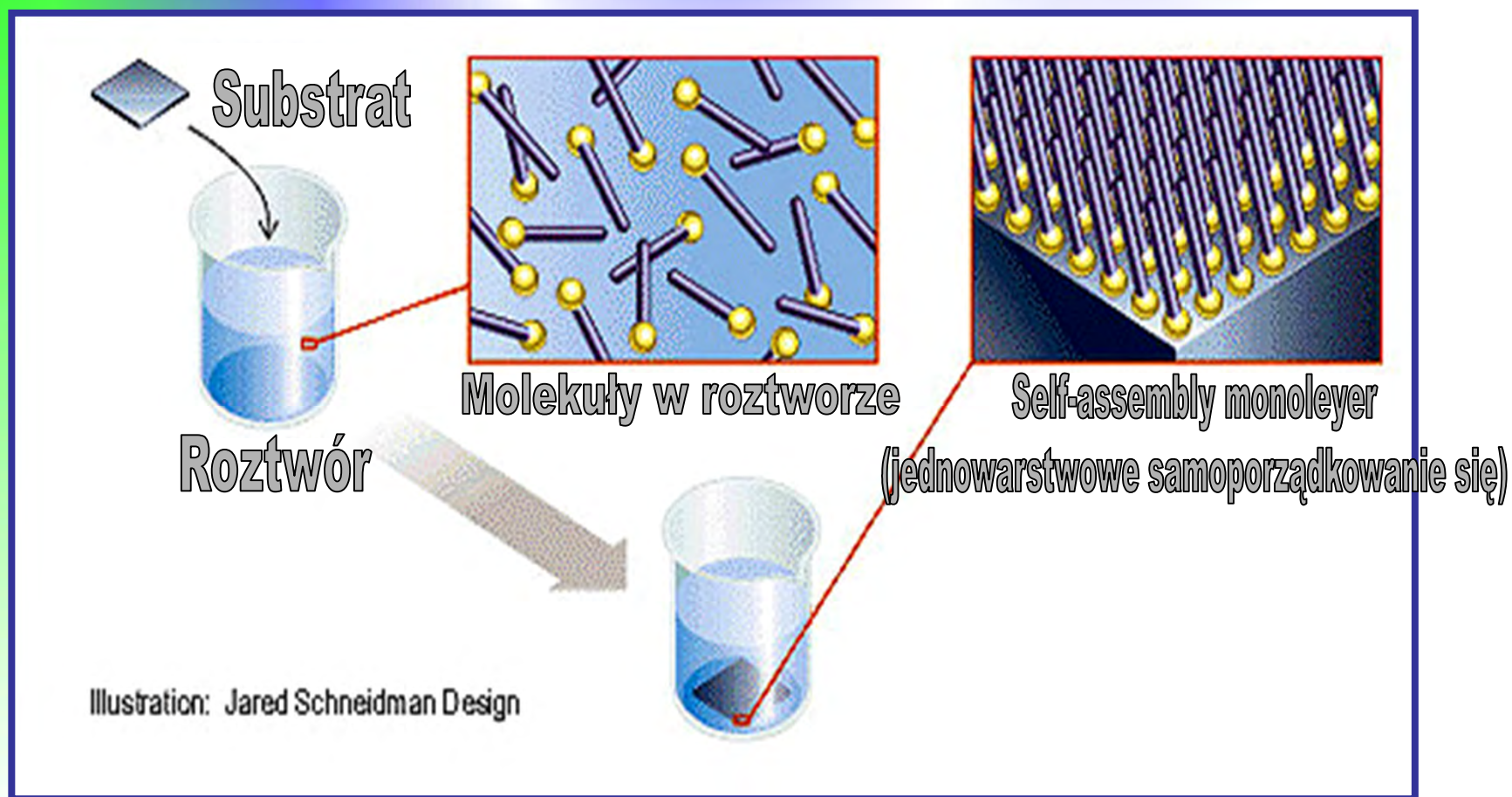


**Mieszanina organicznych i nieorganicznych nanomateriałów**

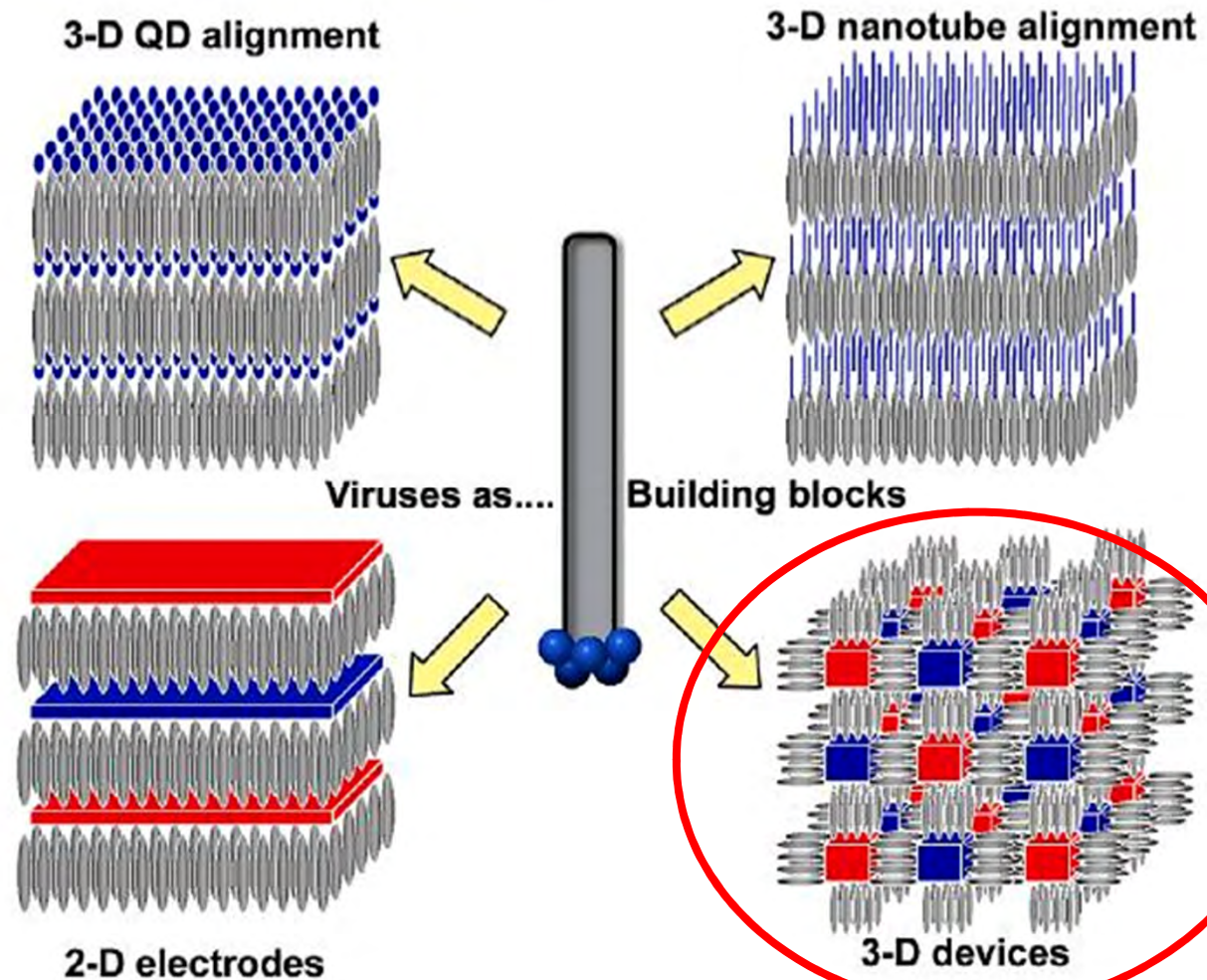
- Jednym ze sposobów otrzymywania „inteligentnych“ nanomateriałów jest tzw. technika samoporządkowania się (self assembly), kiedy atomy, bądź cząsteczki organizują się w struktury zgodnie z ich naturalnymi właściwościami, np. w przypadku tworzenia kryształów dla półprzewodników lub adsorpcja białek na sztucznych receptorach.
- Inną metodą jest użycie odpowiednich technik, celem usunięcia ze struktury materiału (w sposób kontrolowany) atomów lub cząsteczek pojedynczo (positional assembly).



# Samoporządkowanie się białek (*self-assembly*)

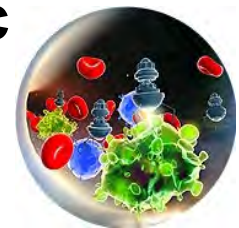


# Biologiczne struktury, np. wirusy uporządkowane w bloki



# „Smart drugs“

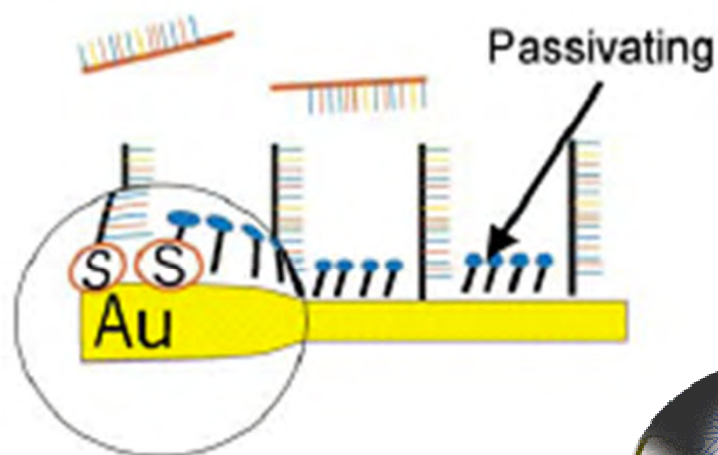
- Do tzw. inteligentnych nanomateriałów zaliczane są również kompozycje „*smart drugs*“, niosące w sobie substancje, np. antybiotyczne, bądź toksyczne dla patogenów, które są otoczone hydro-żelem, powiązanym peptydami, wrażliwymi na pewne proteazy jednostki infekującej (np. bakterii).
- W przypadku obecności patogenu, jego enzymy proteolityczne uwalniają substancje toksyczne dla tego obcego mikroorganizmu.
- „*Smart drugs*“ mogą być immobilizowane na sztucznych membranach, bądź występować w stanie *flow*.



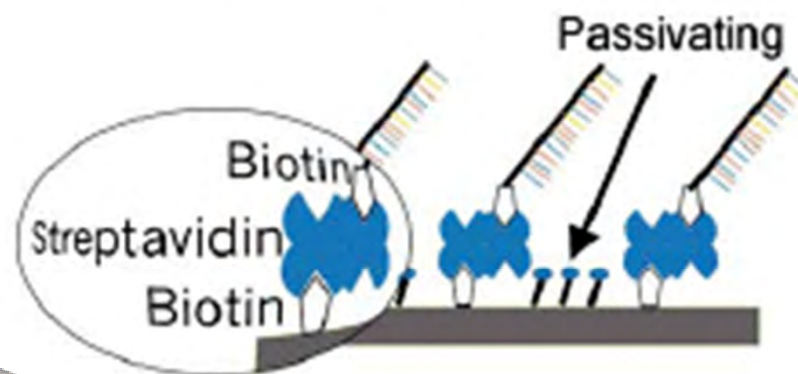


# Immobilizacja powierzchniowa próbek, np. białek

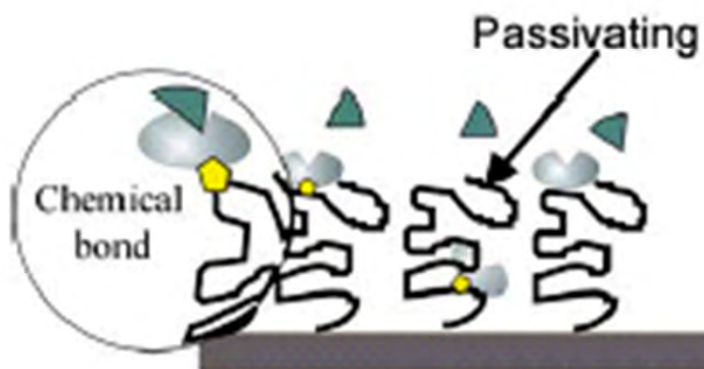
Thiol (for gold) and silane (for  $\text{SiO}_2$ ) chemistry



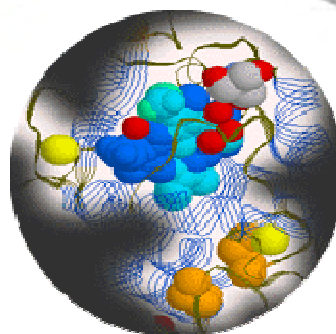
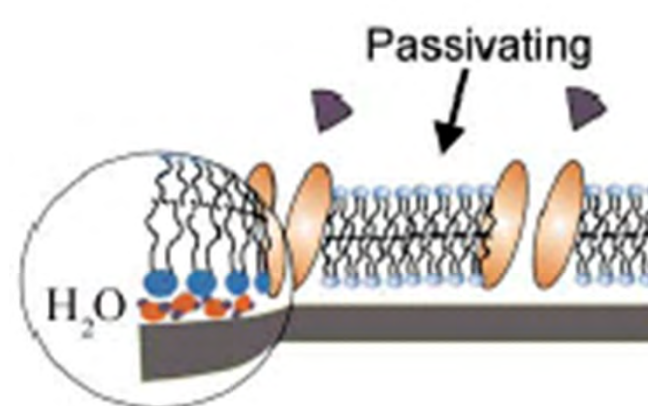
Biotin-Streptavidin binding



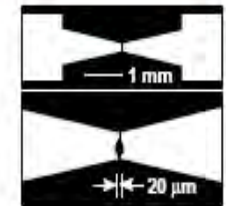
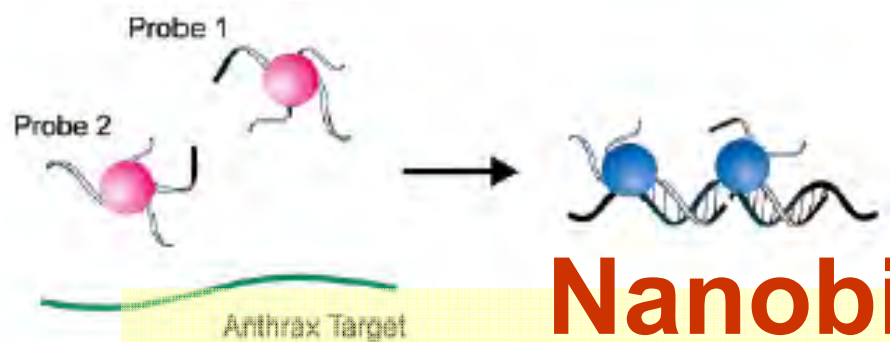
Dextran gel



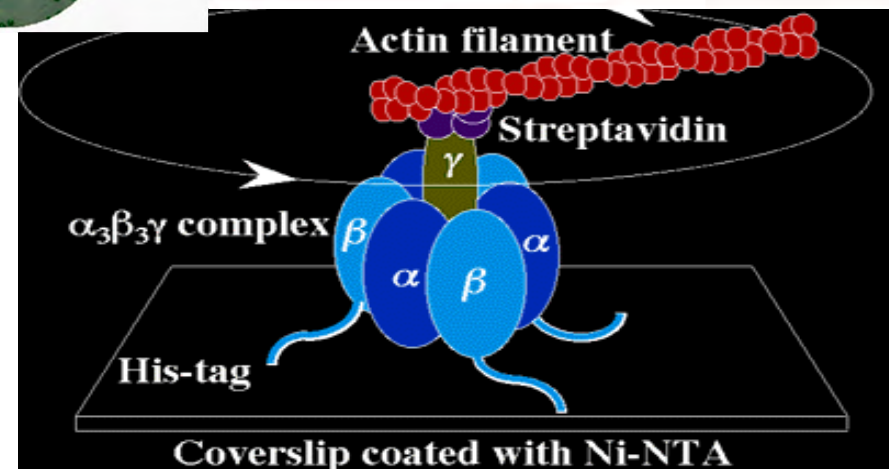
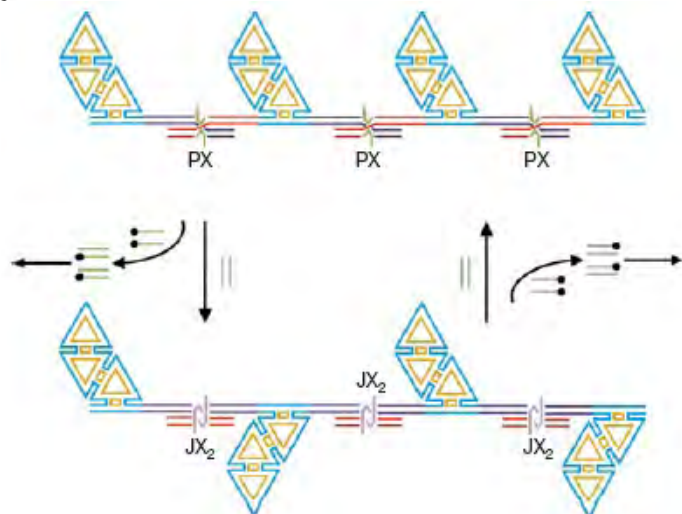
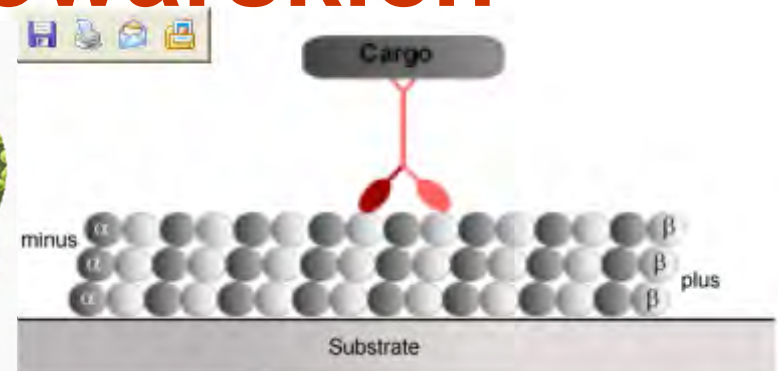
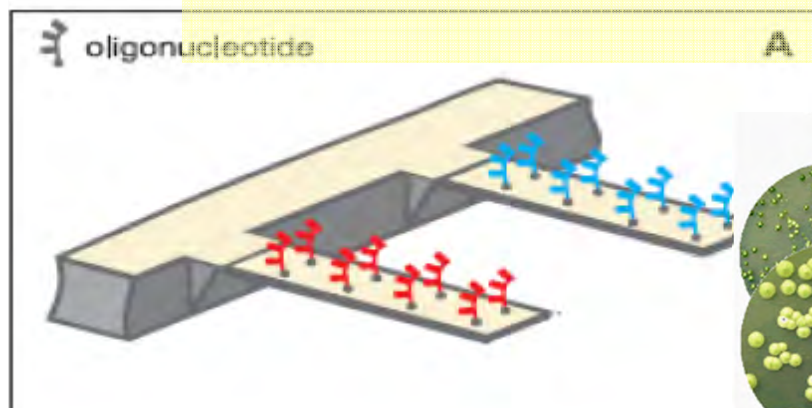
Lipid bilayer







# Nanobiotechnologia w diagnostyce drożdży piwowskich





# Pierwszy Browar





# Nowoczesny Browar



# **Drożdże a nanobiotechnologia**

## **(1)**

- **W przemyśle piwowarskim jednym z podstawowych elementów udanego procesu technologicznego są czyste i aktywne drożdże.**
- **Potencjalne możliwości zastosowania „konstrukcji” nanotechnologicznych w procesie produkcji piwa obejmują: diagnostykę drożdży i mikroflory towarzyszącej (oraz jej likwidację), monitorowanie procesu namnażania i dojrzewania drożdży, dozowanie aktywnych komórek i badanie ich procesów fizjologiczno-biochemicznych in line oraz in real time.**



**Nanosensory na etapie propagacji  
drożdży piwowskich?**



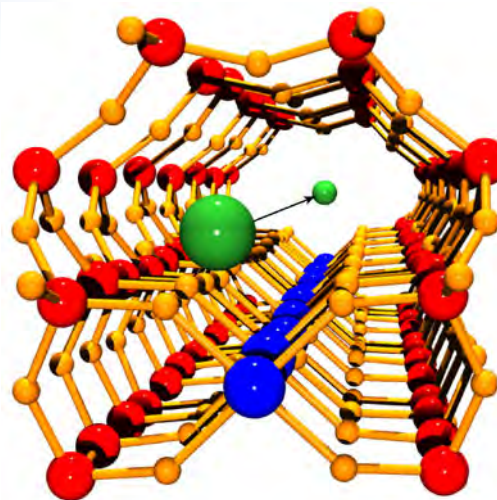
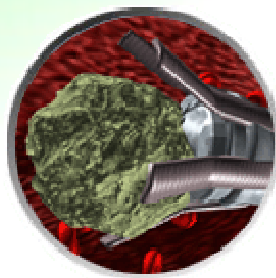
# **Drożdże a nanobiotechnologia (2)**

- **Budowanie nanobiotech systemów pomiarowych dla drożdży piwowarskich jest obwarowane pewnymi wymogami: biosensory lub nanoboty nie mogą być toksyczne i wywołujące jakikolwiek stres, zmieniający metabolizm komórek; muszą też spełniać wymogi biokompatybilności.**



# Diagnostyka drożdży a nanosensory (1)

- Dla biotechnologii produkowane są przede wszystkim różnego rodzaju nanobiosensory, nanomateriały i nanocząsteczki, które w dużej mierze mogą być użyte w diagnostyce drożdży.



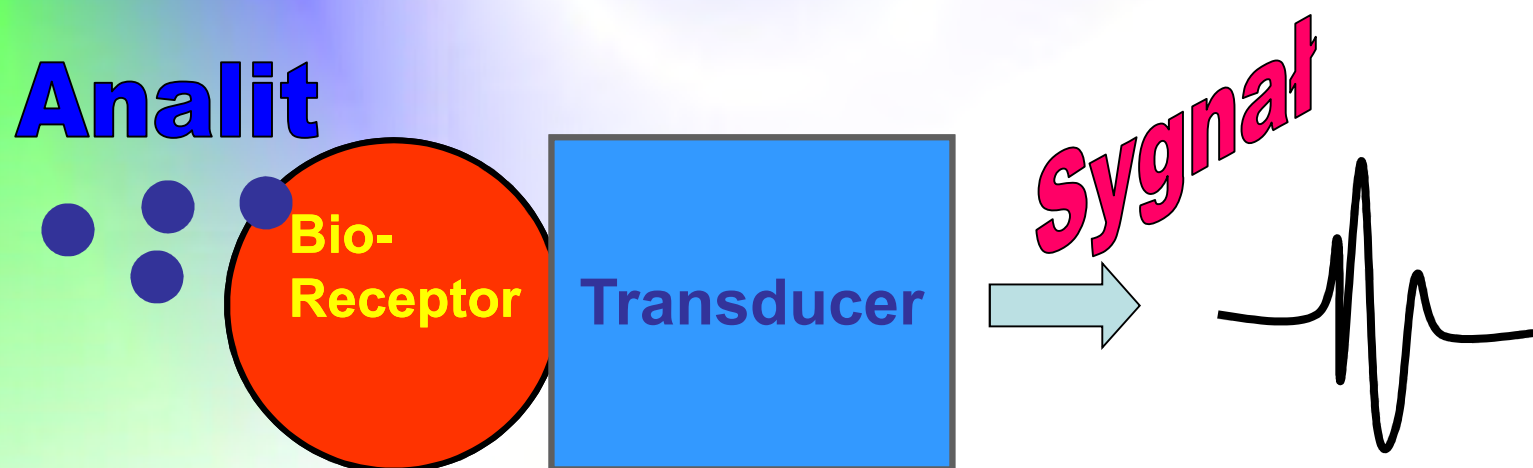


- **Miniaturowe biosensory, współdziałając z odpowiednimi markerami lub biomarkerami służą identyfikacji obcego DNA, białek, określonych metabolitów (w tym toksyn) i skażeń chemicznych oraz biologicznych.**

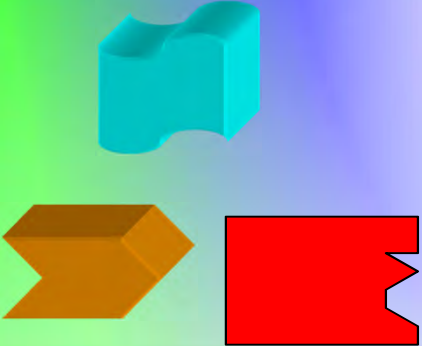


- **Biosensory są dużą podgrupą sensorów optycznych, mechanicznych i elektrochemicznych, których idea działania opiera się na biologicznych elementach, zw. bioreceptorami, rozpoznającymi analizowany składnik.**

# Konstrukcja biosensora

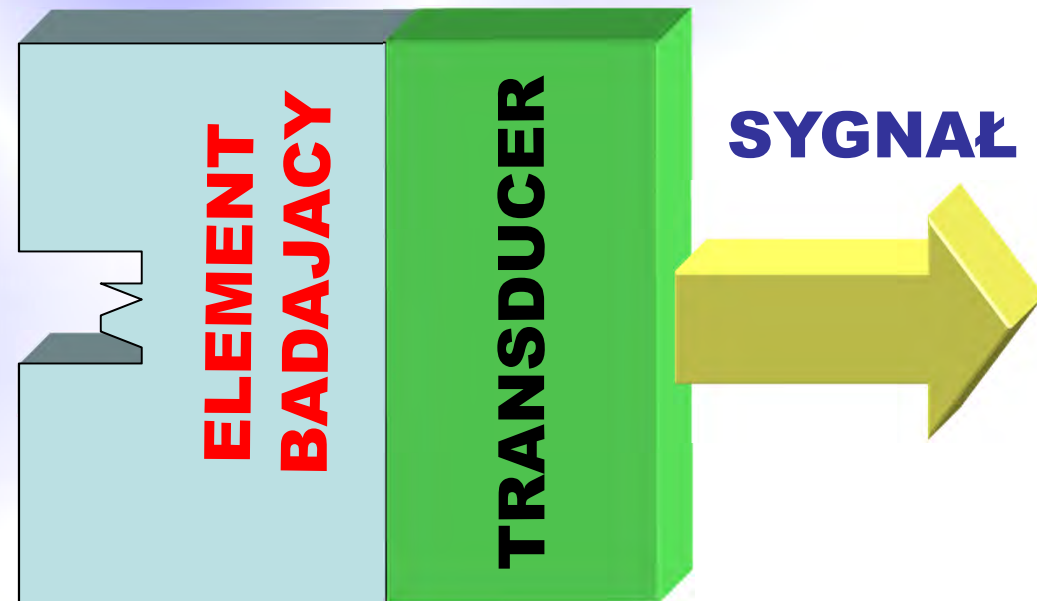


# Konstrukcja biosensora



SKŁADNIK  
ANALIZOWANY

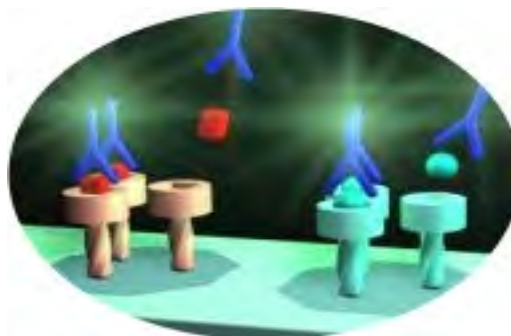
The diagram shows three interlocking 3D blocks: a cyan block at the top, an orange block at the bottom left, and a red block at the bottom right. The red block has a complex, notched shape on its right side.



# BIOSENSOR

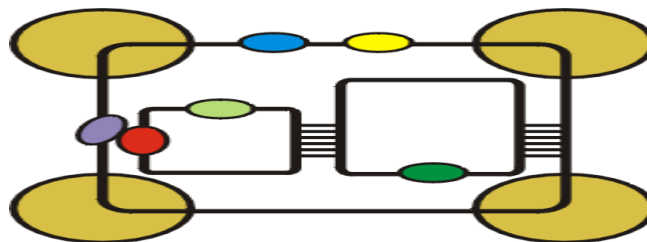


**Spośród kilku typów biosensorów, istotnych dla biotechnologii, należy wymienić te, których bioreceptory są enzymami, przeciwciałami, białkami o specyficznych receptorach, oligonukleotydami, a nawet całymi komórkami, połączonymi z transducerami (przenośnikami chemicznymi lub fizycznymi).**

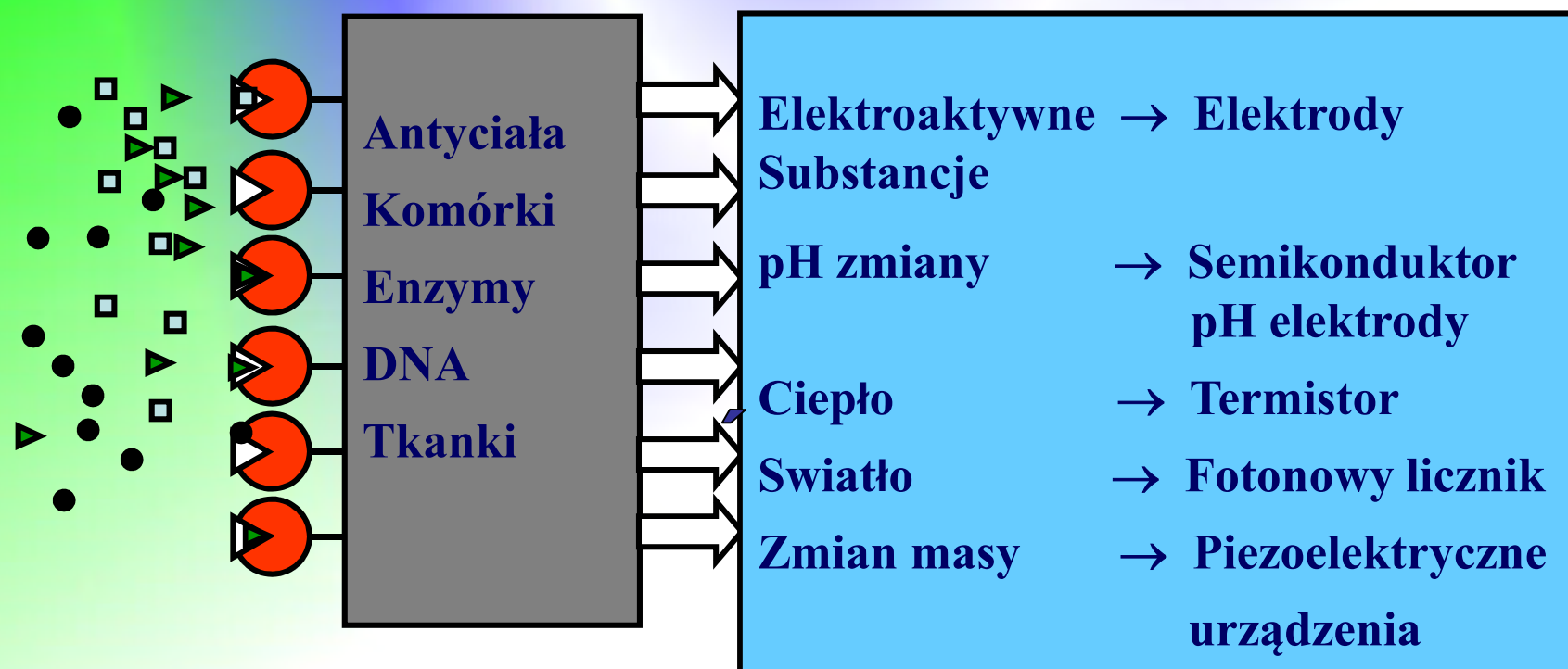


# Transducery - przenośniki

- Odbiór sygnałów z bioreceptora odbywa się poprzez pewnego rodzaju przenośniki, zw. transducerami, mierzące zmiany powstałe w wyniku połączenia się sensora z analizowaną jednostką (analitem).
- Czułość systemu pomiarowego jest zdeterminowana typem zastosowanego transducera, np. amperometrycznego, półprzewodnikowego, potencjometrycznego, cieplnego lub optycznego.



# Zasada działania biosensorów



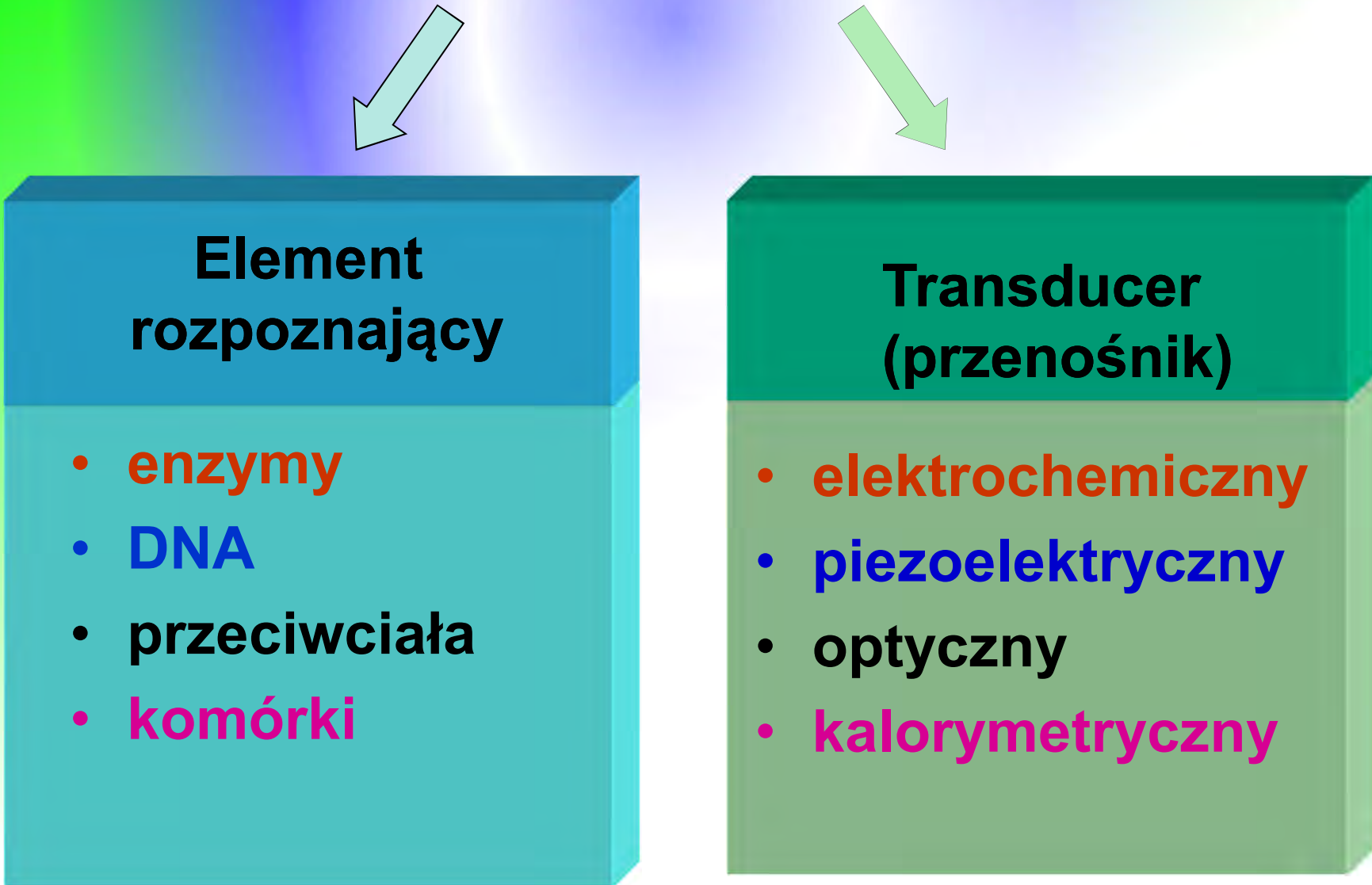
**Roztwór albo powietrze**

**Rozpoznający materiał**

**Sygnał z przekaźnika**



# Rodzaje biosensorów



```
graph TD; A[Rodzaje biosensorów] --> B[Element rozpoznający]; A --> C[Transducer (przenośnik)];
```

## Element rozpoznający

- **enzymy**
- **DNA**
- **przeciwciała**
- **komórki**

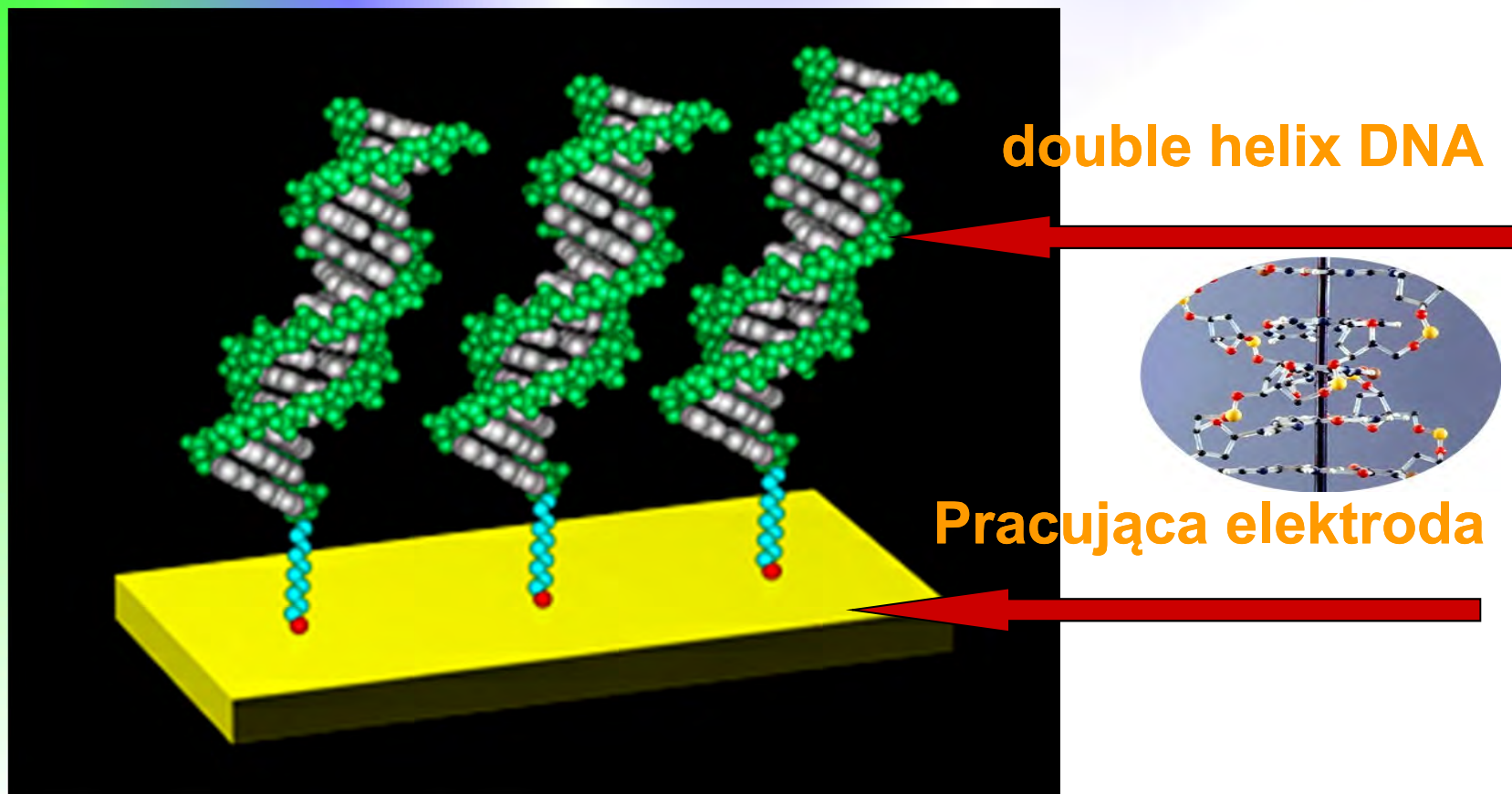
## Transducer (przenośnik)

- **elektrochemiczny**
- **piezoelektryczny**
- **optyczny**
- **kalorymetryczny**

**Biosensory z uwagi na ich bioreceptor, uzależniony od identyfikowanego biomarkera, dzieli się na:**

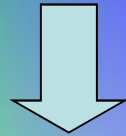
- **immunosensory, tzw. hybrydosensory (z użyciem przeciwciał i cDNA), np. znakowane złotem,**
- **biosensory enzymatyczne (z grupy białkowych),**
- **biosensory zawierające membrany z receptorami analogicznymi do naturalnych,**
  - **biosensory zawierające żywe komórki, immobilizowane w szeregi (*array*), znakowane czynnikiem fluorescencyjnym,**
- **biosensory tkankowe do pomiarów procesów metabolicznych.**

# Biosensor na bazie DNA



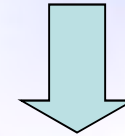


# Biosensor na bazie DNA

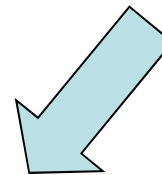


Małe cząsteczki

- metale
- aromatyczne aminy (o-dianisidine)

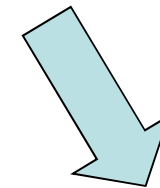


Komplementarny fragment DNA



Patogenne bakterie

•*Listeria monocytogenes*  
(gen *hlyA*)



Genetycznie modyfikowane rośliny

gen *npt II*

## 2. Cel hybrydizacji

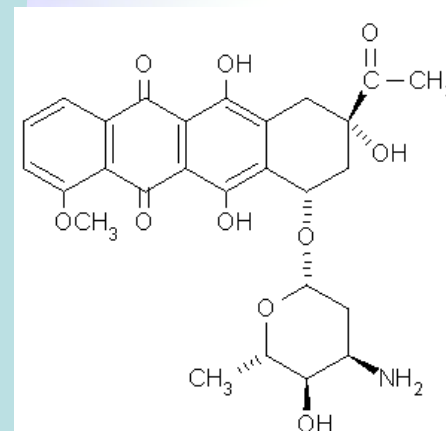
## 3. Indykator połączenia

## 1. Imobilizacja fragmentu cDNA

← Badane DNA

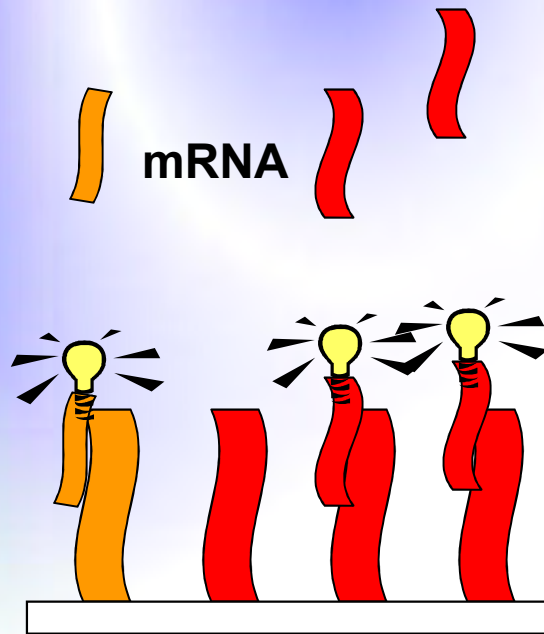
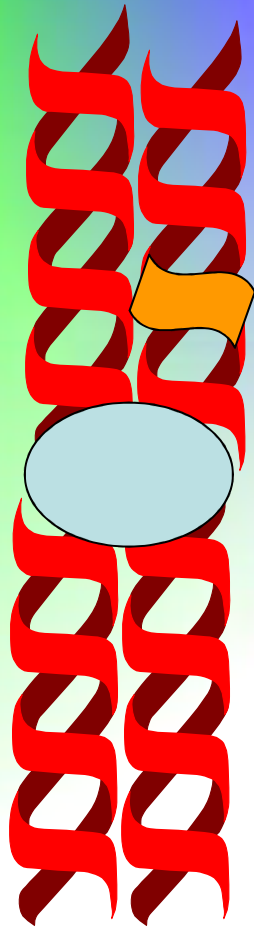
## 4. Elektrochemiczny sygnał

T  
A  
C  
A  
G  
T  
G  
G

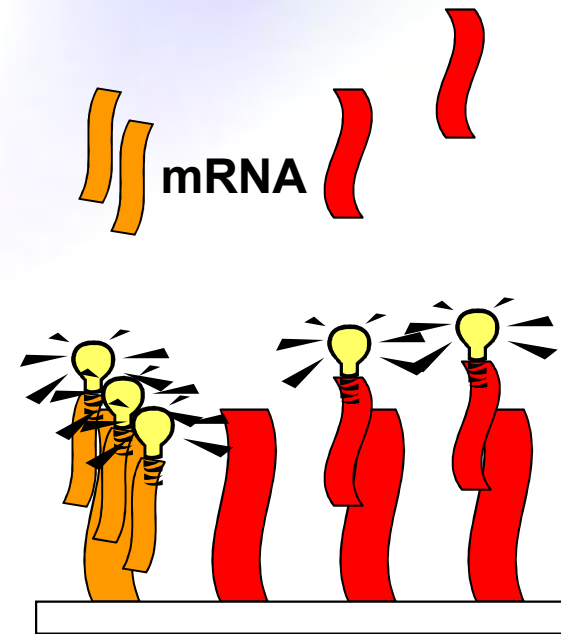


Patent No. P.354335

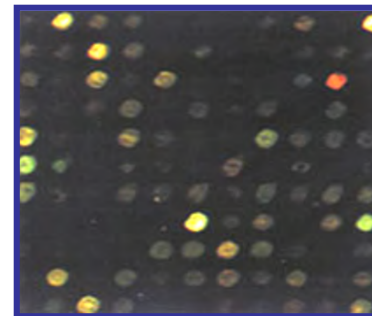
# DNA, chromosomy



DNA normalny

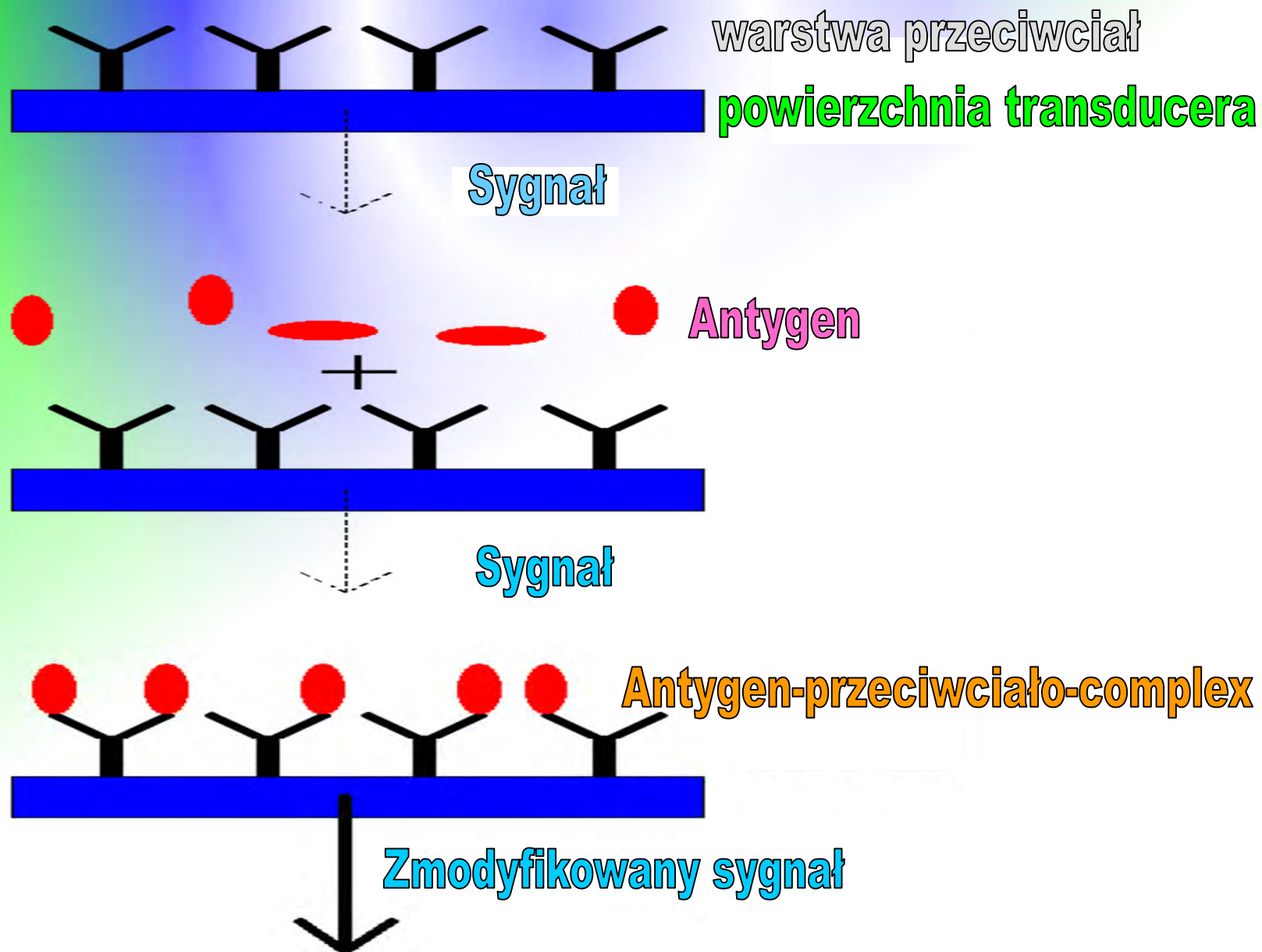


DNA wadliwy





# Biosensory na bazie przeciwciał



# Rodzaj pierwszego biosensora

## Enzymatyczna elektroda:

Pierwszy biosensor skonstruowany był przez Clarka i Lyons w 1962.

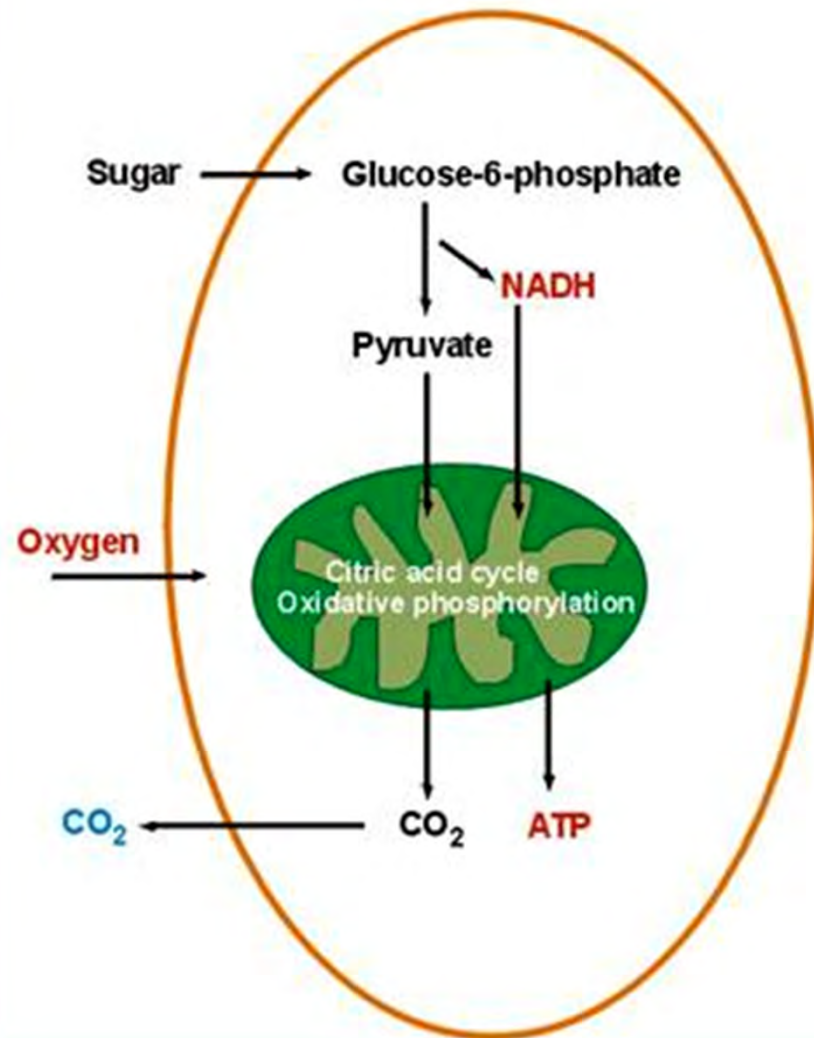
- Enzym oksydaza glukozowa był immobilizowany na platynowej elektrodzie w systemie “*membrane sandwich*”.



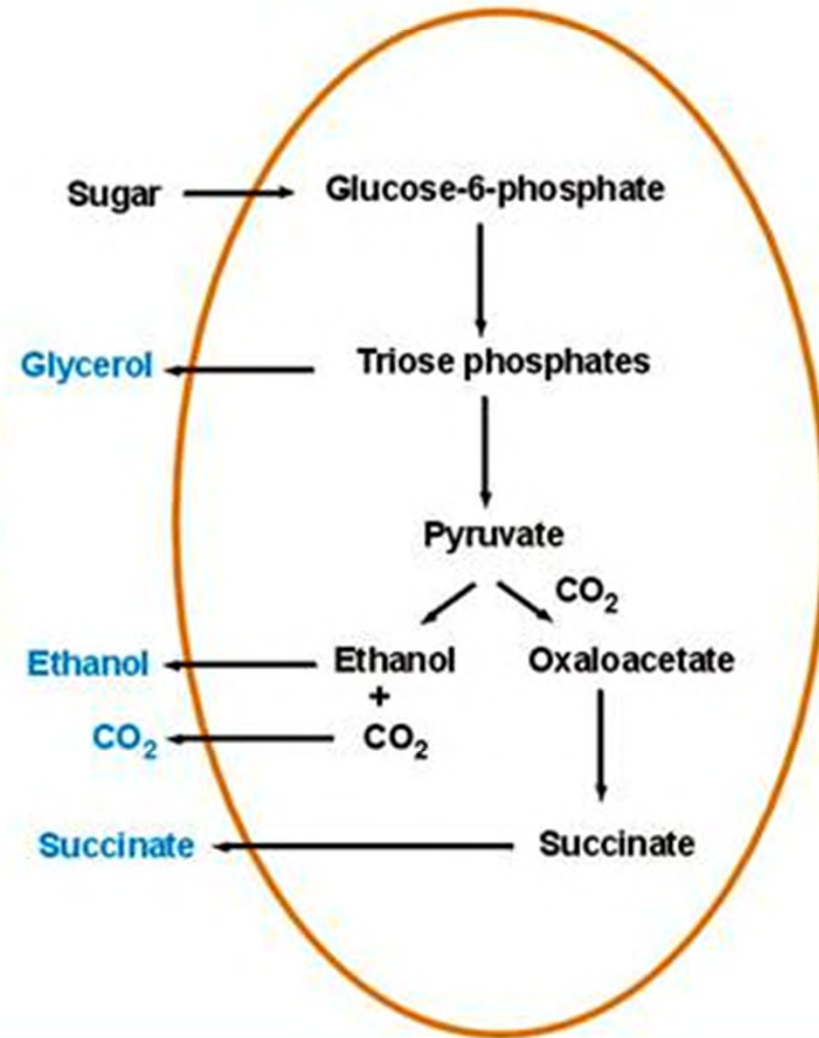
- Platynowa anoda polaryzuje przy + 0.6 V, w wyniku czego z substratu był produkowany enzymatycznie  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Pierwotnym substratem dla tego systemu była glukoza.

# Procesy kataboliczne i anaboliczne drożdży

## Aerobic respiration



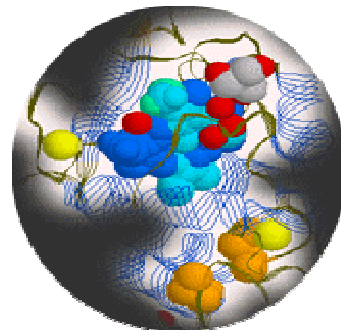
## Anaerobic fermentation



## Reasumując:

biosensory mogą być użyte do identyfikacji:

- różnych analitów (w tym biomarkerów),
- mikroorganizmów patogennych metodą fluorescencyjną, chemiluminescencyjną lub piezoelektryczną w połączeniu z metodą immunologiczną,
- pestycydów i innych związków chemicznych,
  - toksyn lub mykotoksyn, antybiotyków,
  - obcego białka lub DNA (np. w GMO)

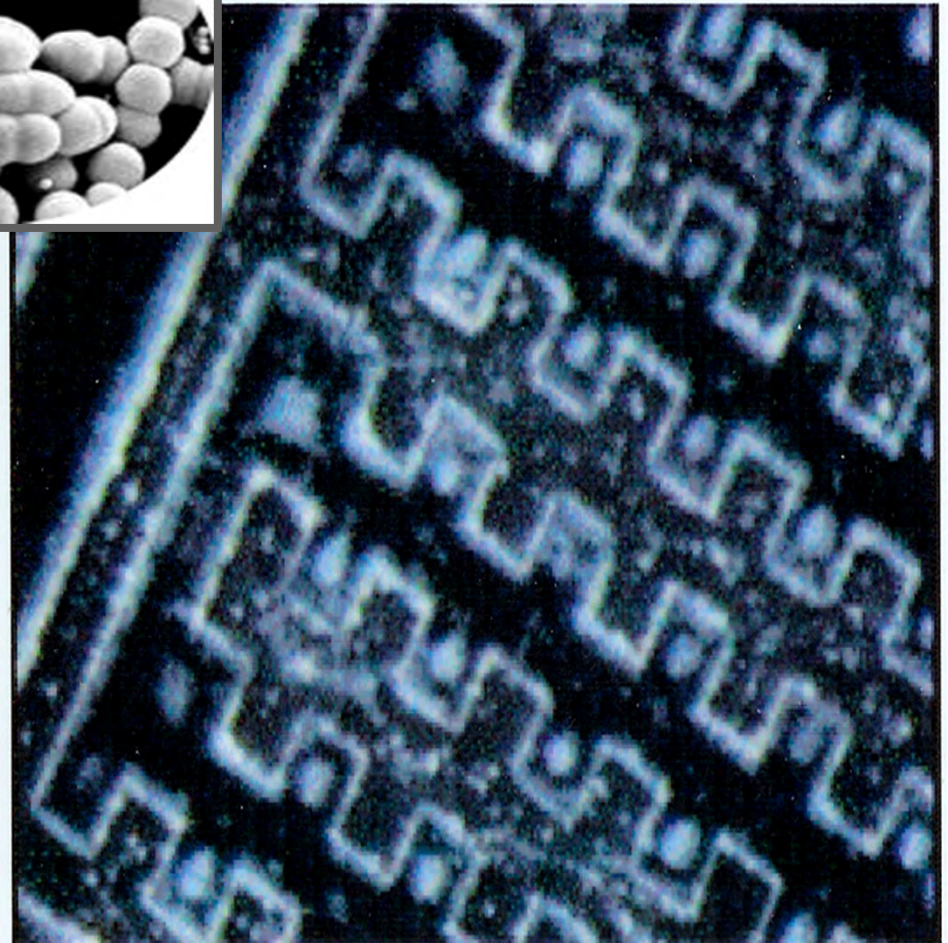
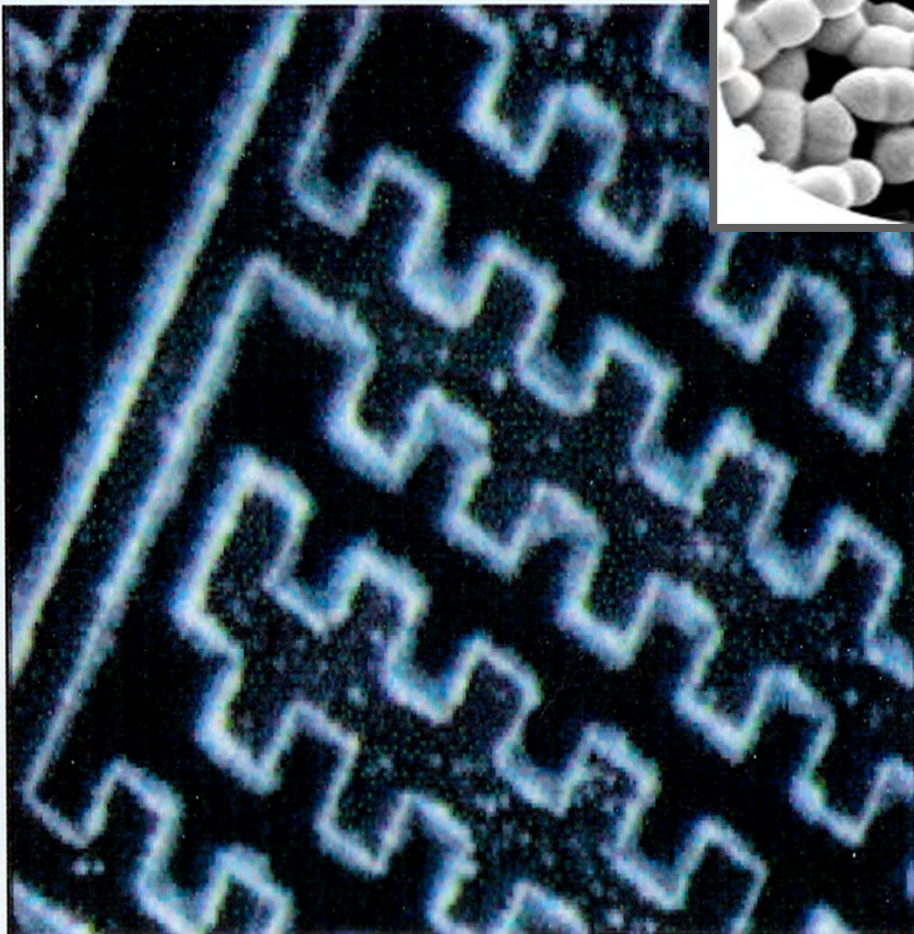
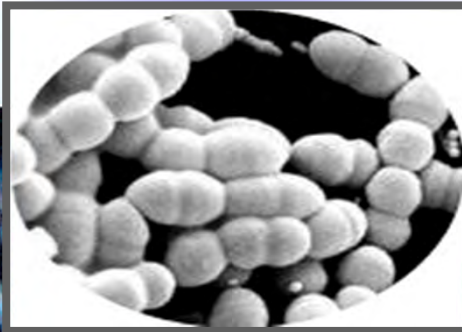




# Diagnostyka drożdży a nanosensory (2)

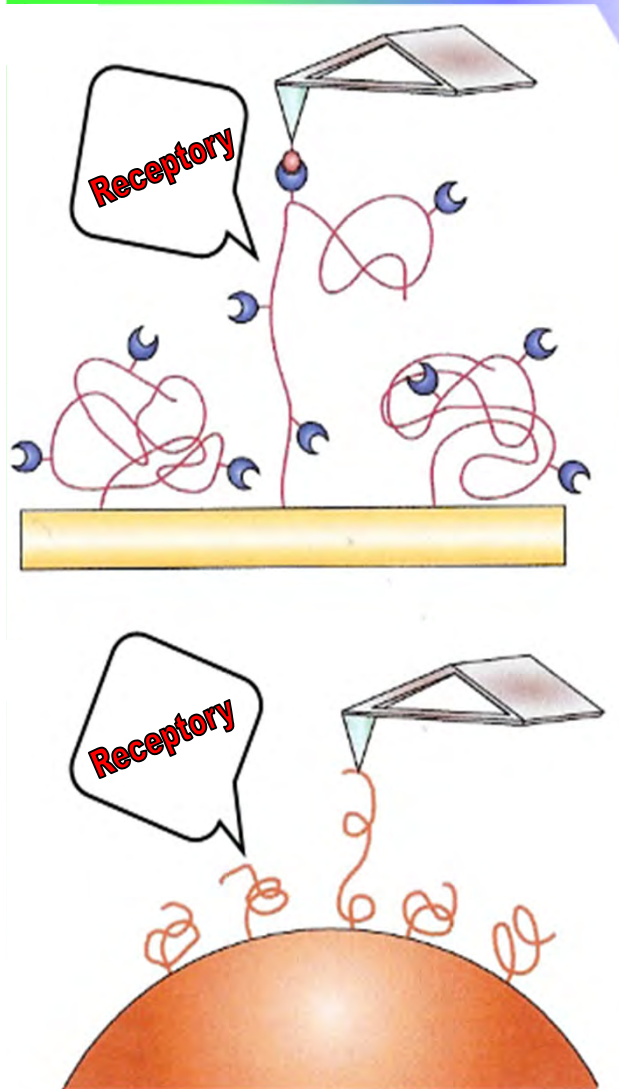
- Opracowano metodę nanodielektroforezy oraz systemy NEMS do szybkiej i pewnej separacji drożdży pod względem przynależności do określonego rodzaju lub szczepu oraz z uwagi na ich stopień żywotności (stanu fizjologicznego).

# Separacja drożdży *S. cerevisiae*: dielektroforeza



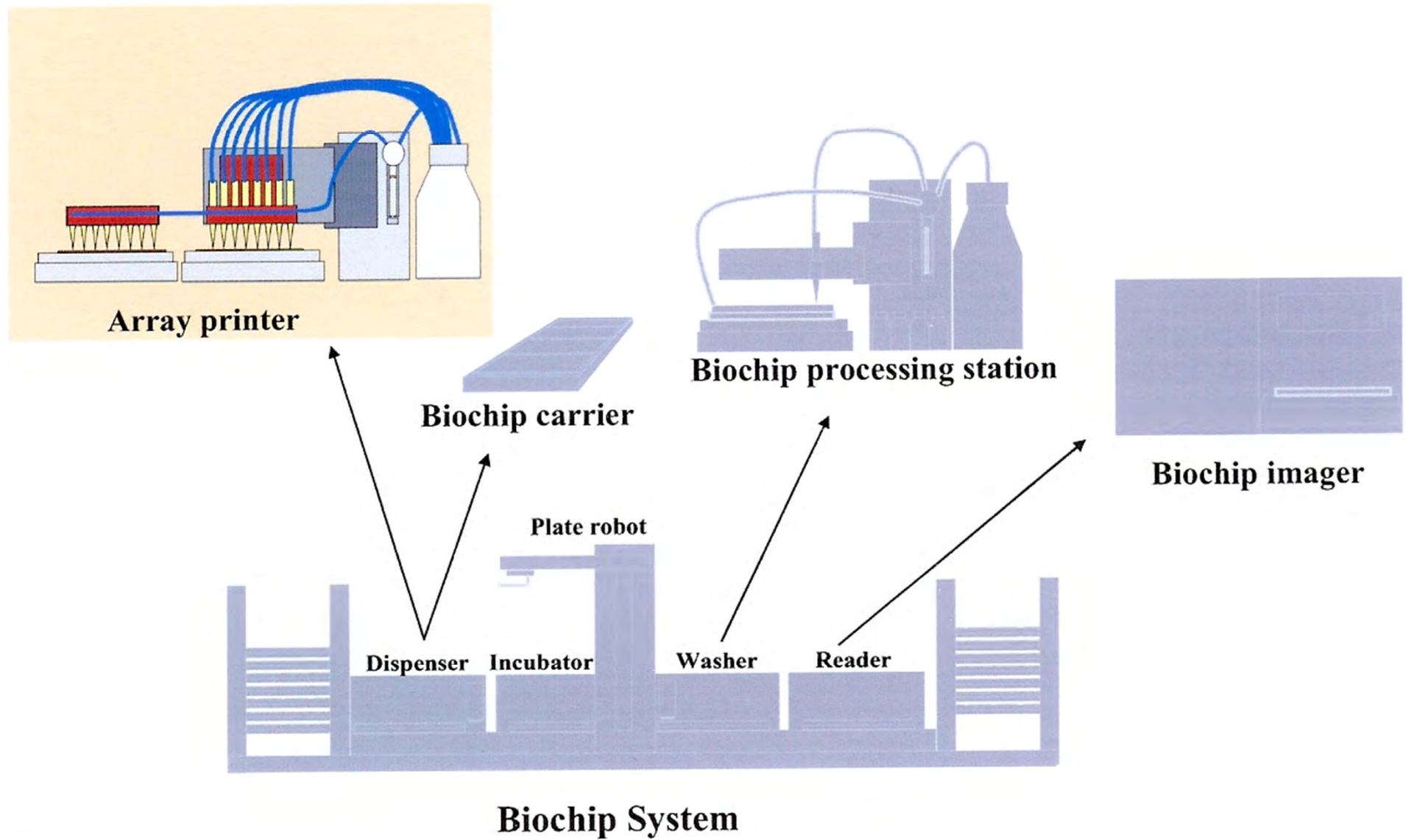


# Diagnostyka drożdży a nanosensory (3)



- Skonstruowano nano-bio-chipy (np. z cDNA, z proteinami, przeciwciałami) oraz biomimetyczne systemy membranowe biosensorów (ze sztucznymi receptorami) do selekcji określonych szczepów drożdży.

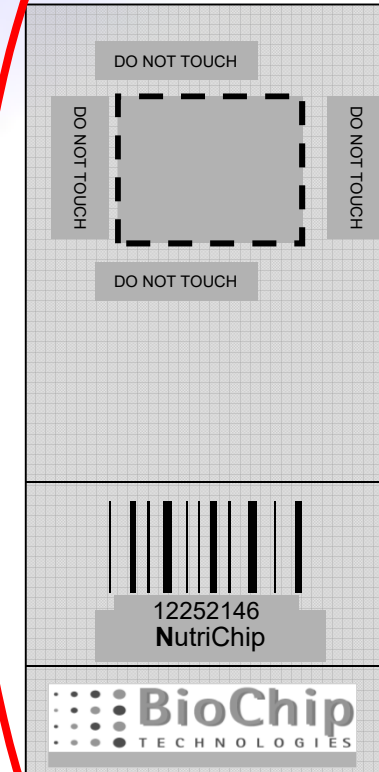
# BioChip system



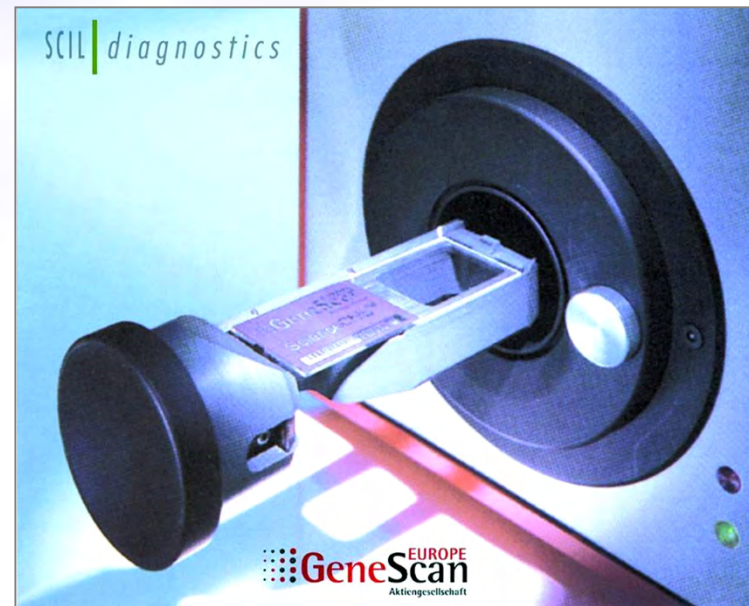


# Co to są BioChipy ?

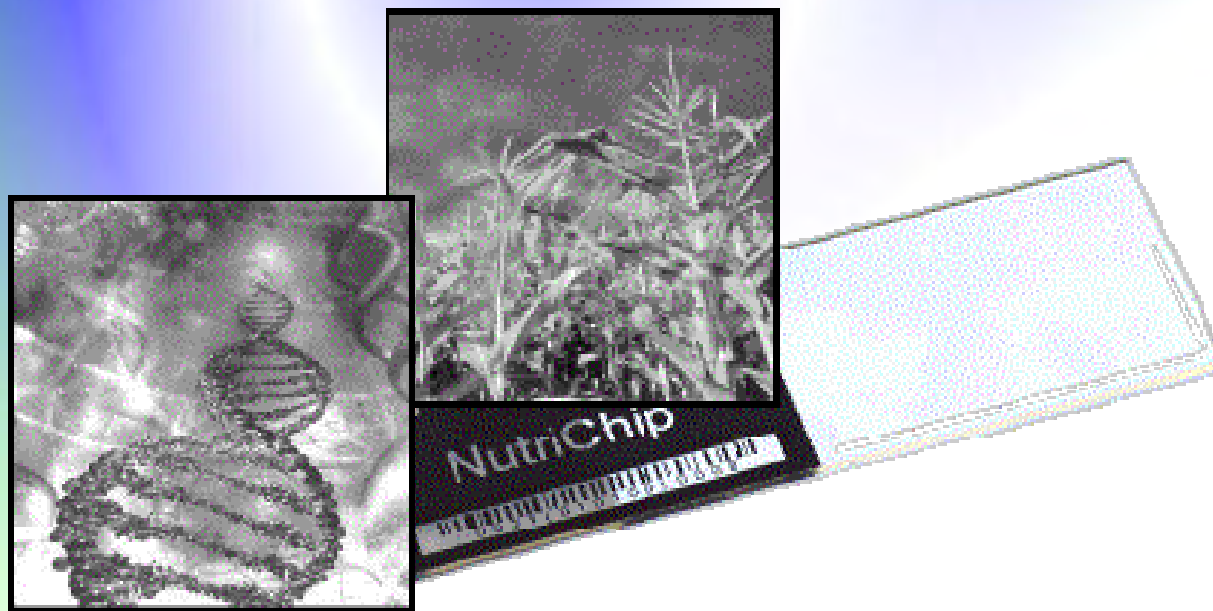
- **BioChipy, jako zminiaturyzowane nośniki, na których przymocowana jest duża liczba cząsteczek, o ogromnym zagęszczeniu, zwane są *microarrays*.**
- **BioChipy są odczytywane w urządzeniach optycznych (np. fluorescencyjnych) po hybrydyzacji badanych cząsteczek i porównywane ich ze wzorcowymi.**
- **BioChipy pozwalają na opracowanie całkowicie nowego systemu analiz w biotechnologii.**



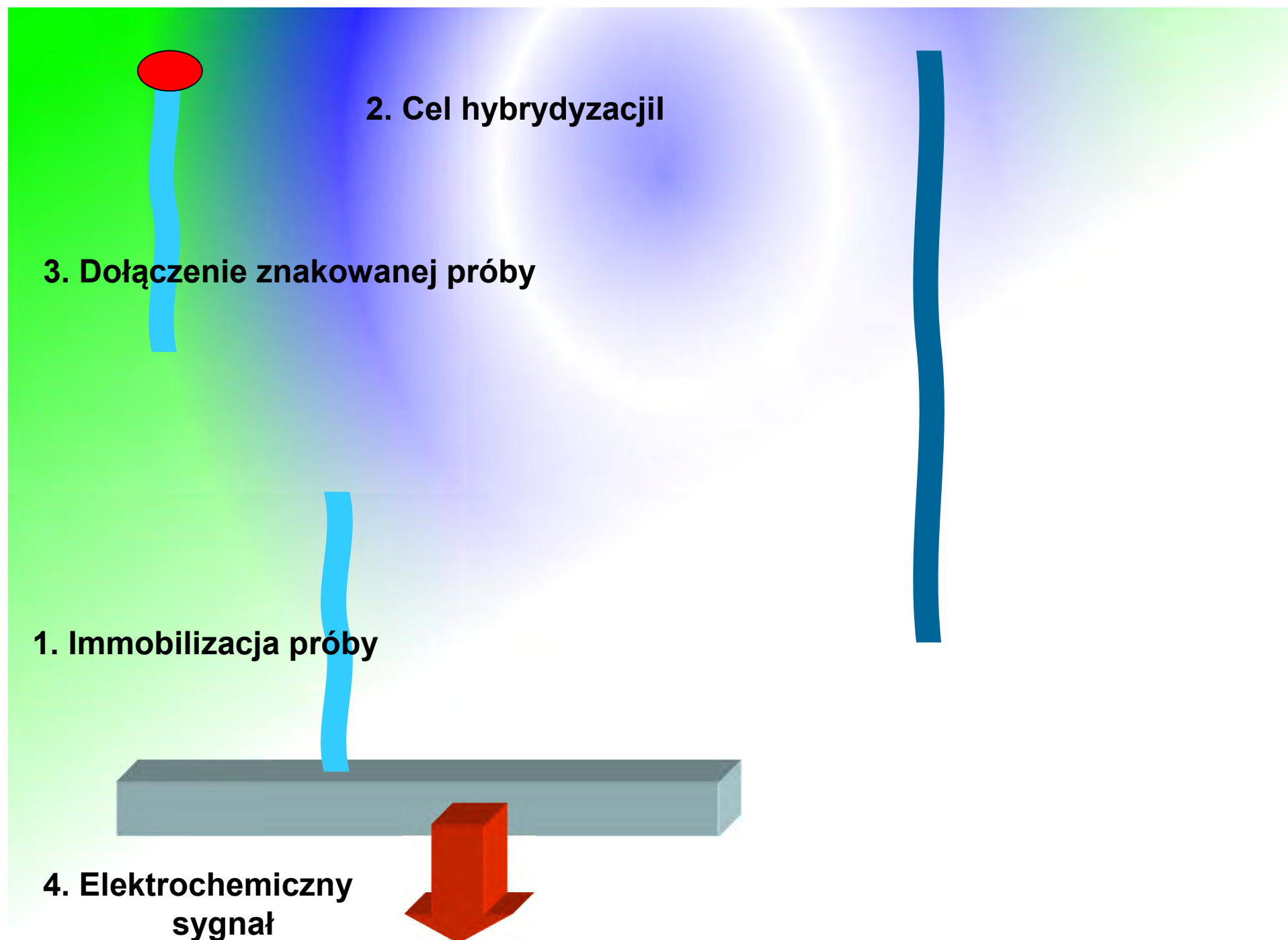
# Biochip w aparacie pomiarowym



**NutriChip™:**

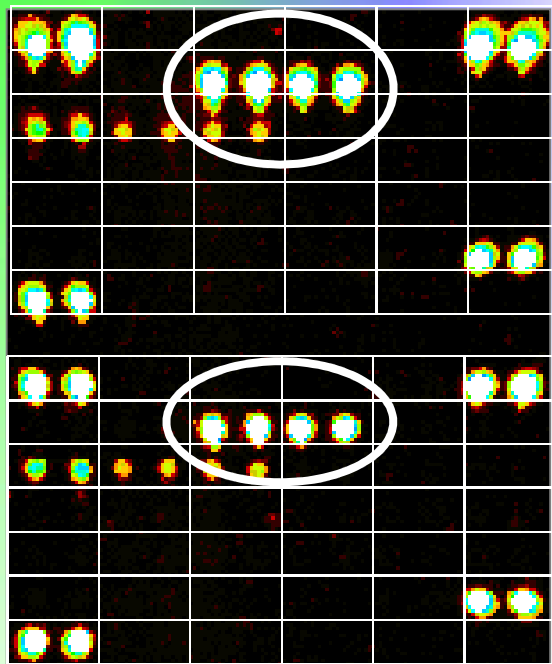


**Duży potencjał zastosowawczy  
w technologii żywności**





# Wyniki dla NutriChip™:

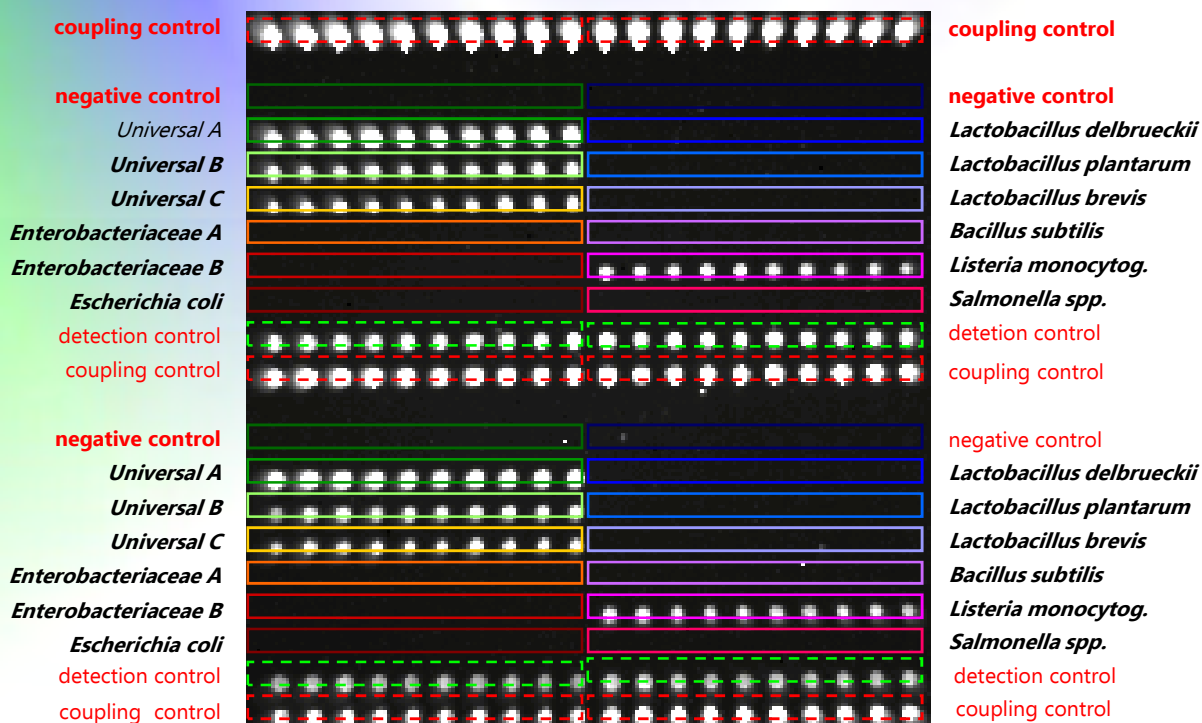


|             |           |            |            |             |
|-------------|-----------|------------|------------|-------------|
| K-Kontrolle |           |            |            | K-Kontrolle |
| Salmonella  | Campylob. | List. m. A | List. M. B |             |
| ITS Sal     | ITS Camp  | ITS Lis A  | ITS Lis B  |             |
|             |           |            |            |             |
|             |           |            |            |             |
|             |           |            |            | F-Kontrolle |
| K-Kontrolle |           |            |            |             |

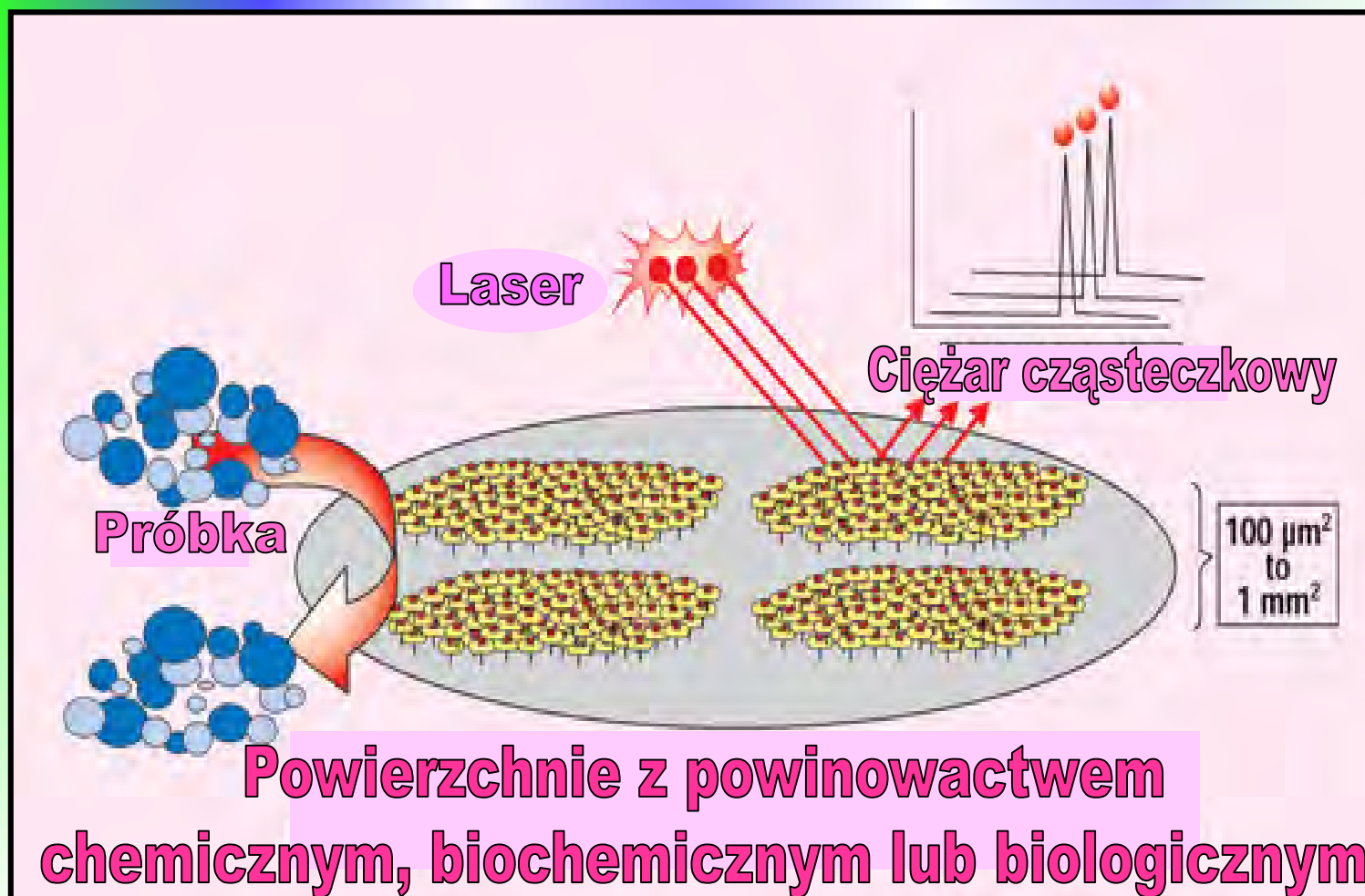
|             |           |           |            |             |
|-------------|-----------|-----------|------------|-------------|
| K-Kontrolle |           |           |            | K-Kontrolle |
| Salmonella  | Campylob. | List. m.A | List. M. B |             |
| ITS Sal     | ITS Camp  | ITS Lis A | ITS Lis B  |             |
|             |           |           |            |             |
|             |           |           |            |             |
|             |           |           |            | F-Kontrolle |
| K-Kontrolle |           |           |            |             |

# Zastosowanie NutriChip™-16S do badania patogenów w piwie:

PCR dla *Listeria monocytogenes* - ogólne DNA

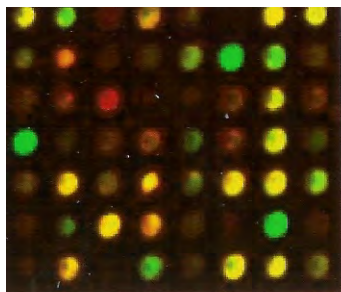


# Białkowy chip, w SELDI systemie



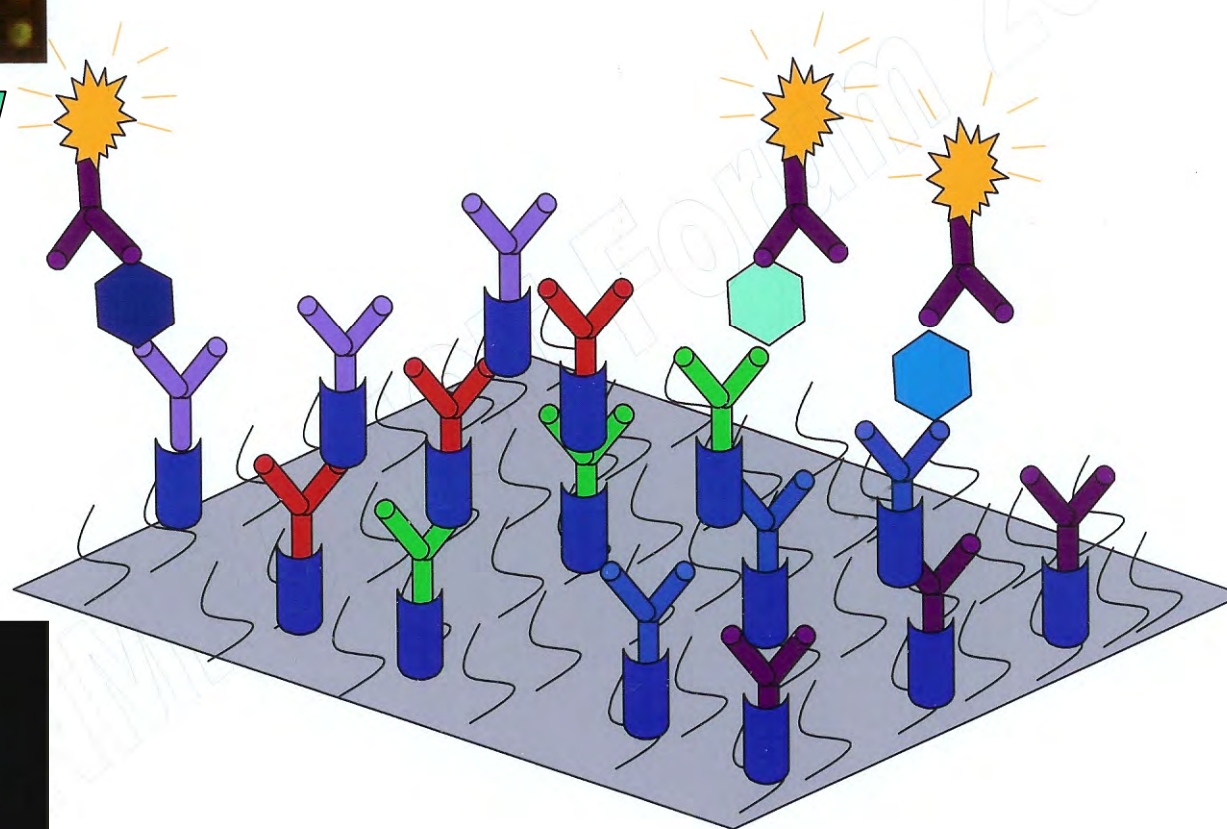
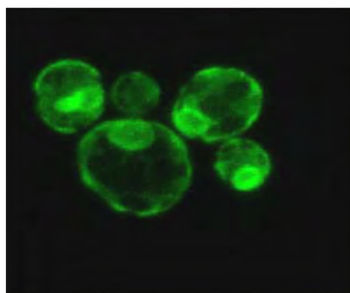
**SELDI, Surface Enhance Laser Desorption Ionization**

# Immuno-BioChip *array*: fluorescencyjne znakowanie badanego materiału



Microarray

Drożdże

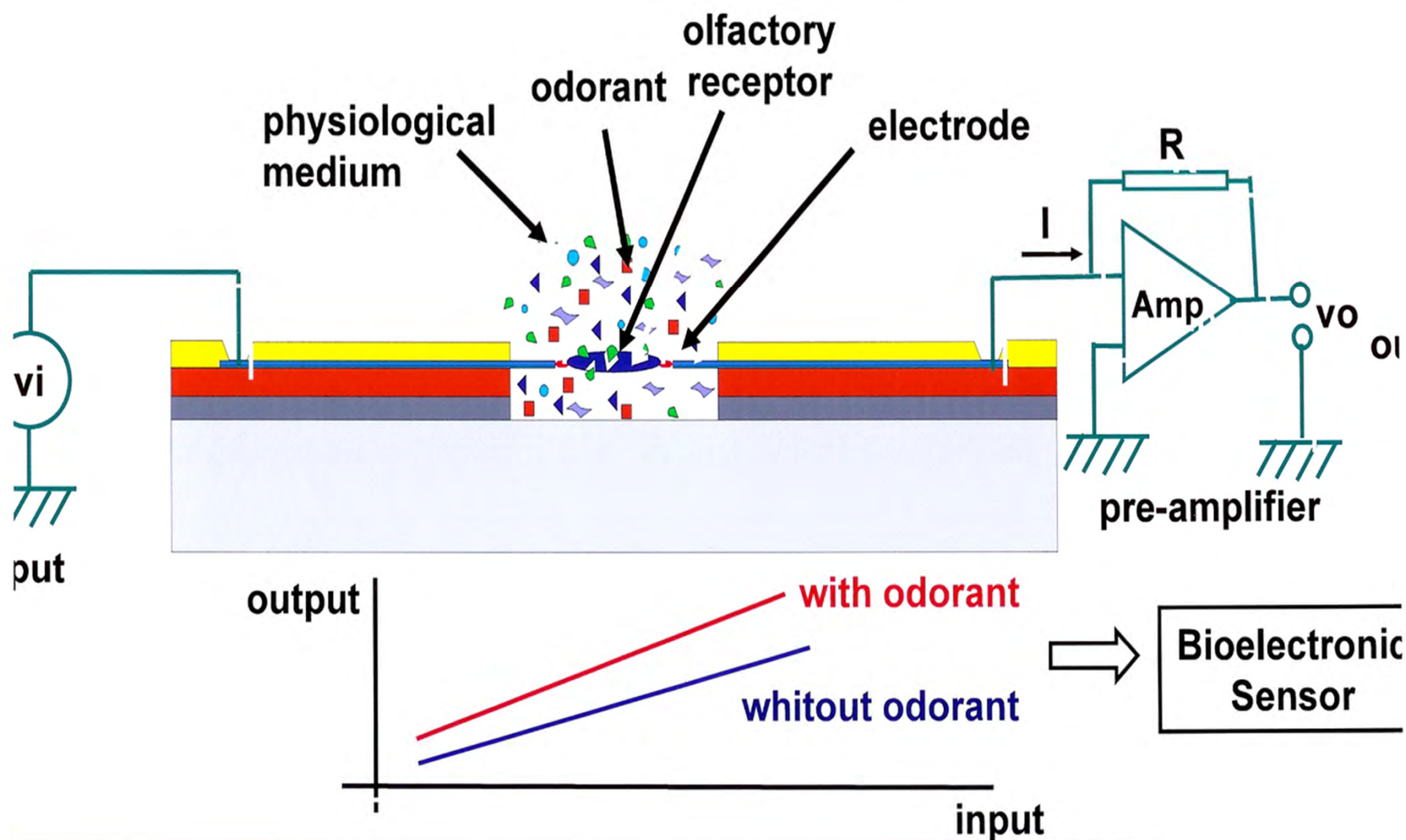




# Pojedynczy białkowy nanobiosensor grID array

IST-2001-38899 - SPOT-NOSED

## Ogólna zasada działania



**Miniaturyzacja i automatyzacja metod analitycznych  
jest możliwa dzięki wykorzystaniu:**

- technik genetycznych, **genomiki**
  - badań biochemicznych białek, **proteomiki**
  - metabolitów, **metabolomiki**
- w systemach macierzy,  
tj. mikro- i *nanoarray*.**

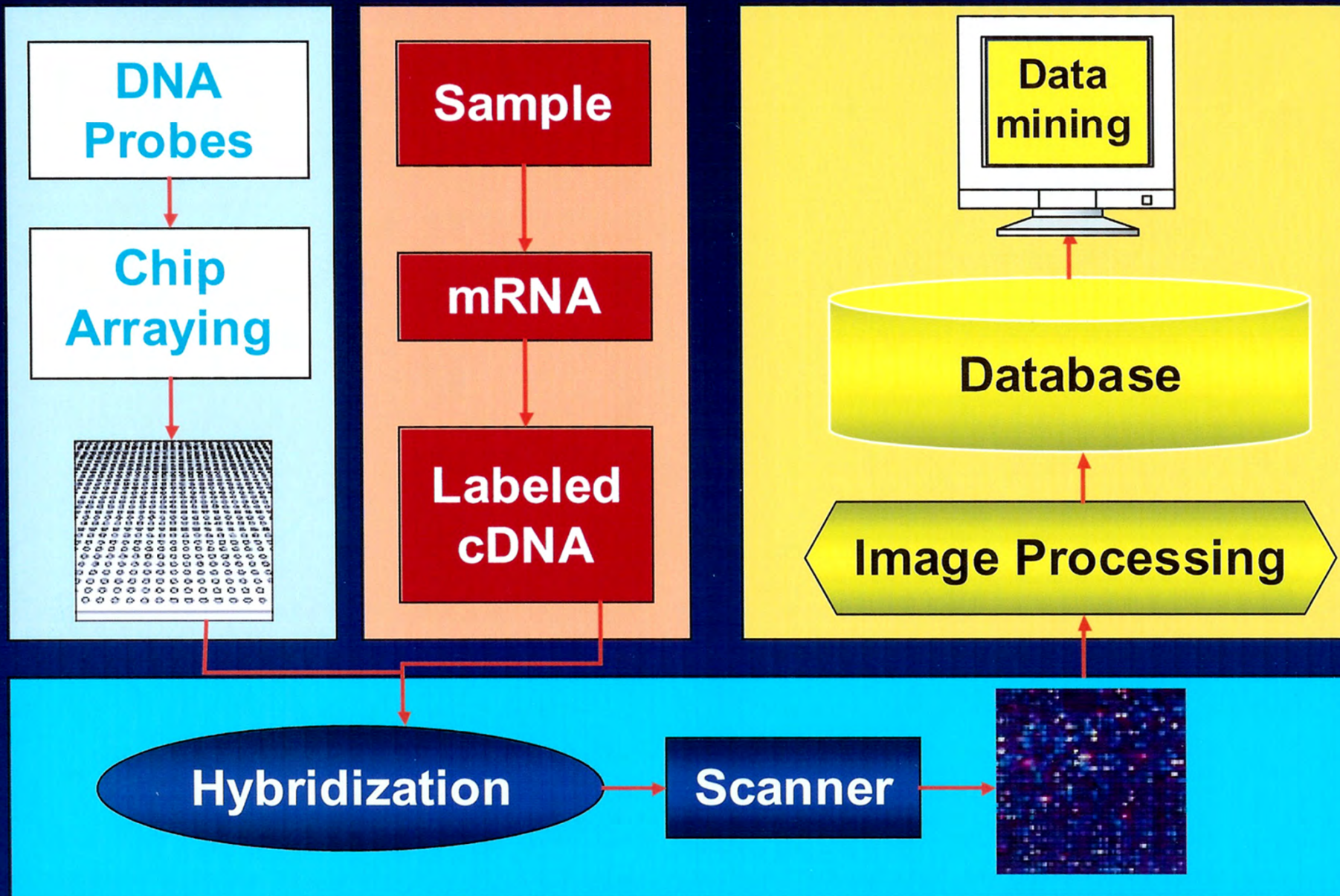


# Diagnostyka drożdży a nanosensory (4)

- Realizowane są nowe koncepcje nanotechnologiczne odnośnie budowy nanobiobotów, typu lab-on-a-chip (10 nm bot), służące do kompleksowej analizy procesów anabolicznych i katabolicznych populacji drożdży lub pojedynczych komórek on line i in real time.

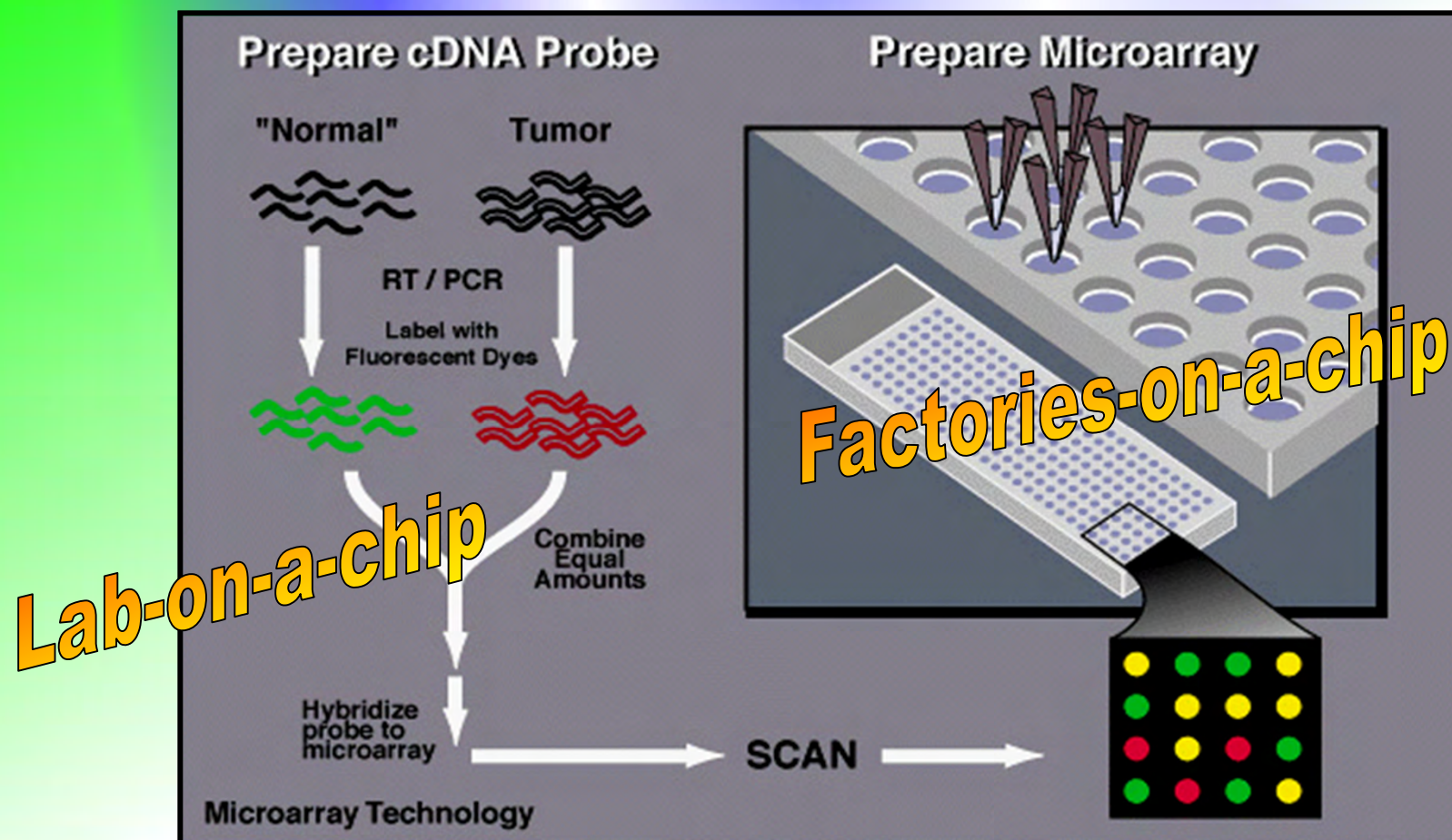


# Stadia operacyjnej systemu *microarray*





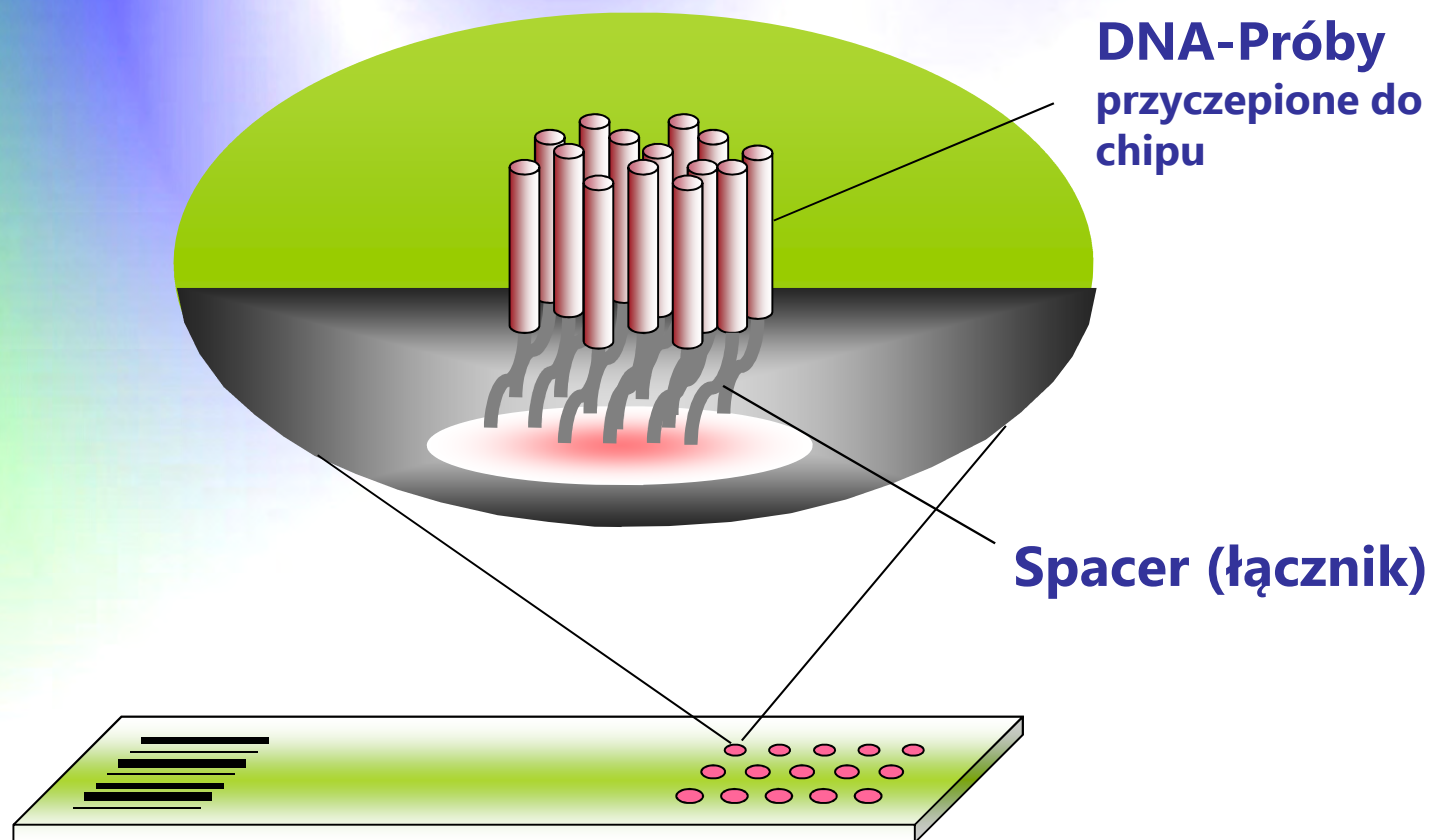
# Nowe, analityczne nanotechnologie



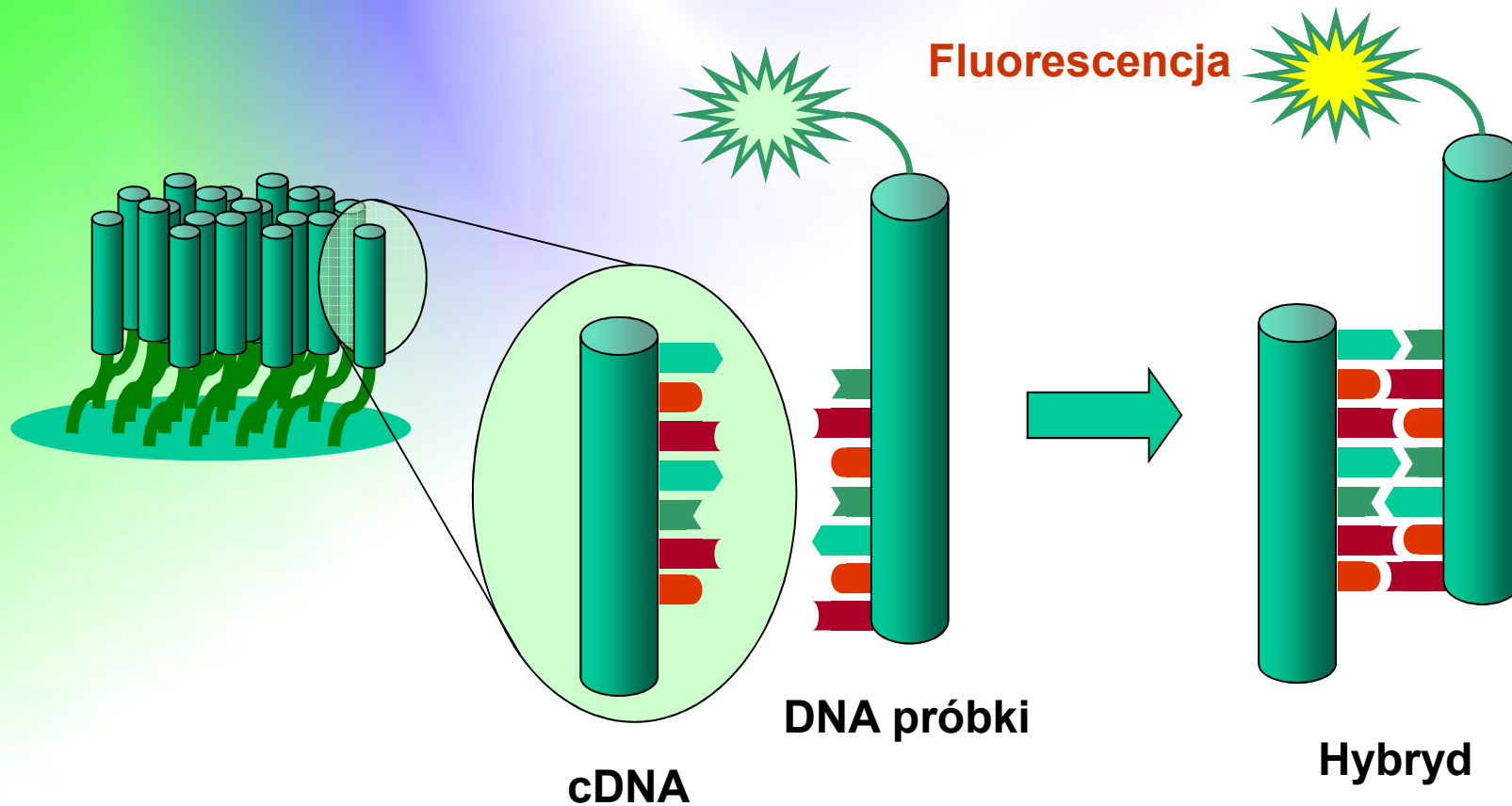
Np.: *microarray* DNA chips dla  $\gg 1000$  rodzajów DNA

- Podstawą idei sensora lab-on-a-chip (LOC) jest oparcie całego, tzw. mini laboratorium na małym elemencie nośnym, pomiędzy dwiema elektrodami, w wyniku czego procesy, np. sekwencjonowania genów poddane są ogromnej kumulacji na pojedynczej „platformie“, tj. na bardzo małej powierzchni chipu.
- Tzw. *high-density* DNA biochipy dają możliwość analizy *in real time* do 10000 genów równocześnie, zużywając minimalne ilości materiału, rzędu pikomoli.

# Struktura BioChipu *microarray*

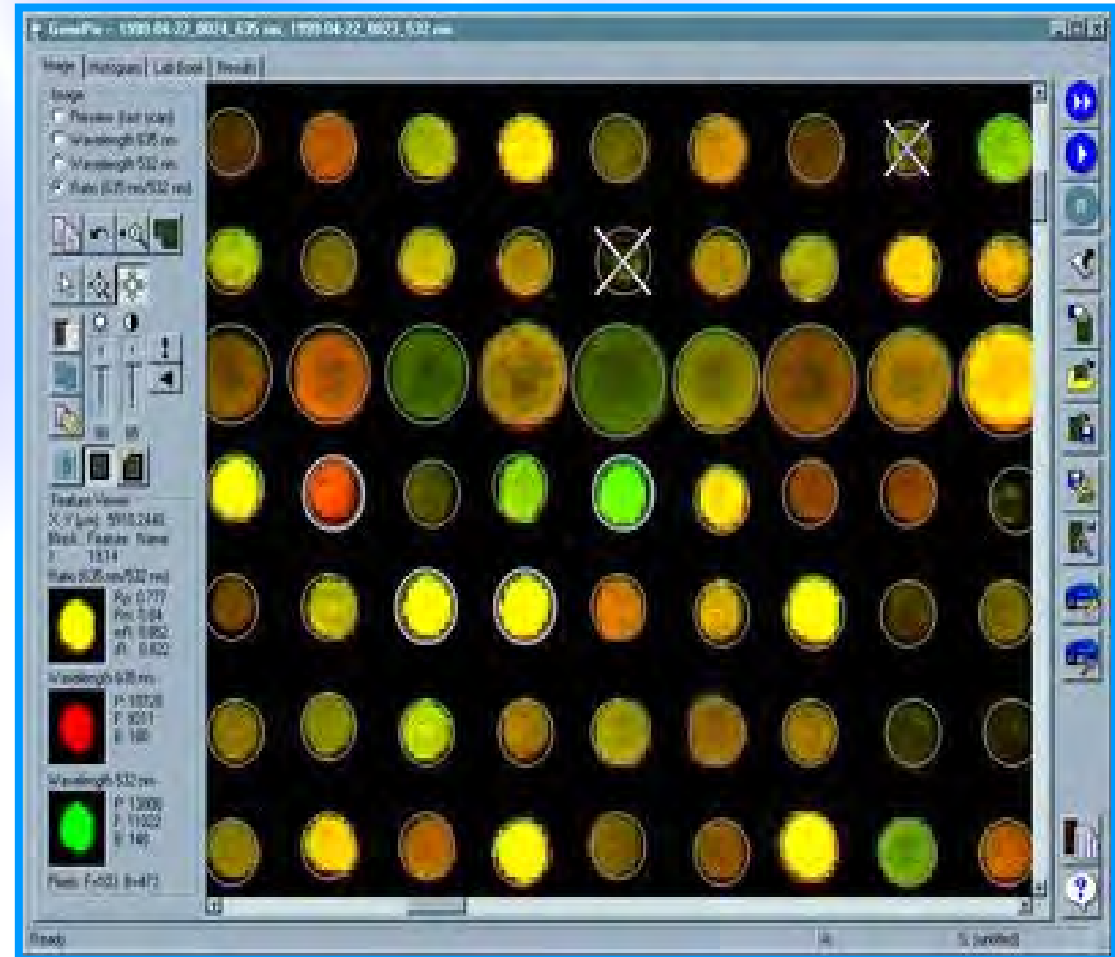
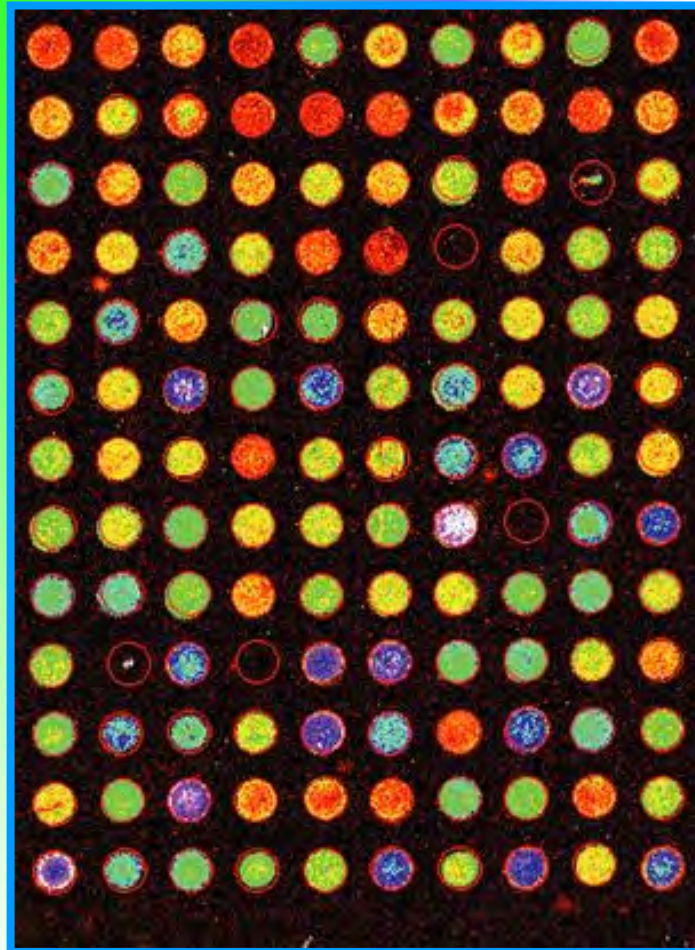


# Hybrydyzacja na BioChipie *microarray*: pomiar fluorescencyjny

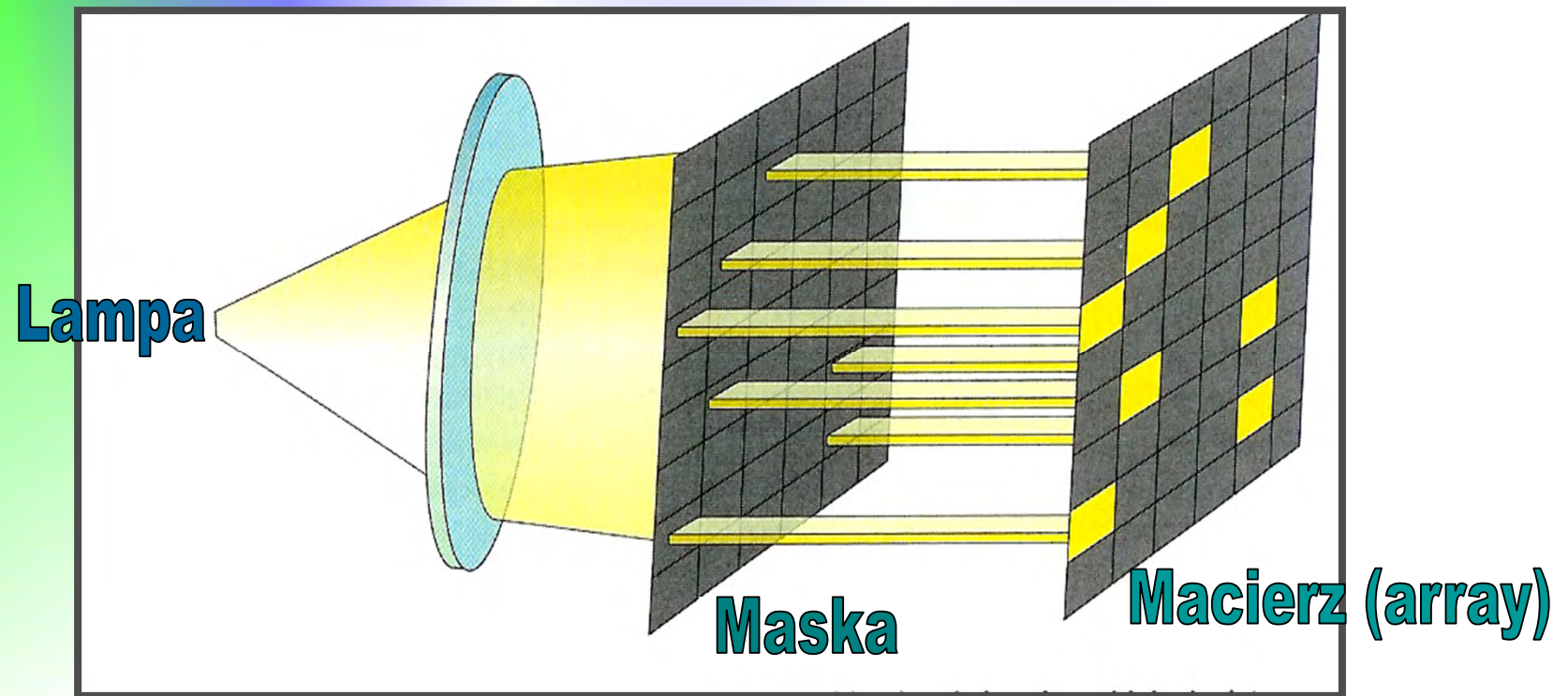




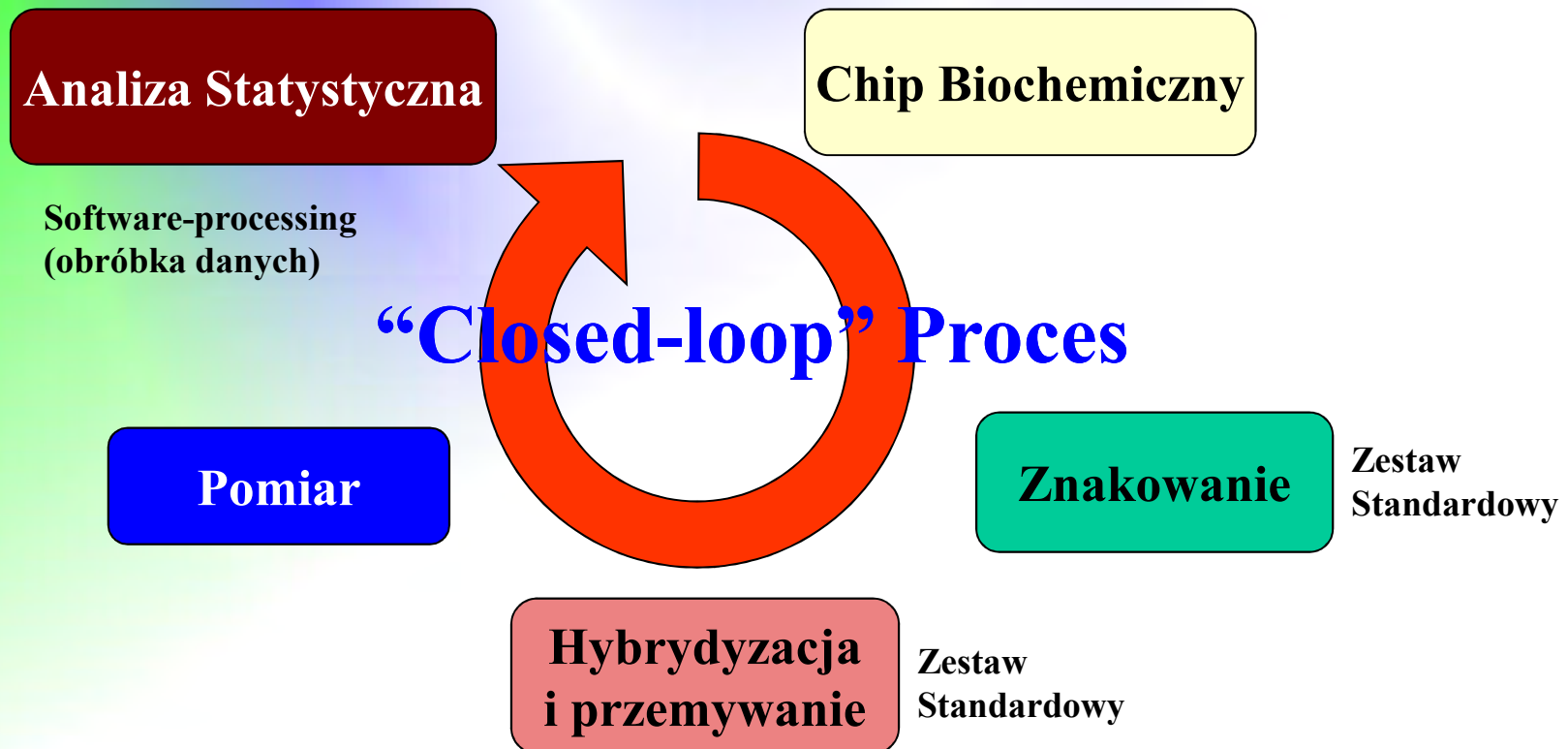
# Macierz na biochipie - *microarray*



# Biosensor na bazie *microarray*



# *Microarray systemy* są procesami zamkniętymi



# **Microarray do wykrywania GMO**



# Stadia analityczne w GMO-Chip:



**1. Preparowanie DNA (90 min)**



**2. Multiplex PCR (150 min)**



**3. Single-strand DNA, preparacja (30 min)**



**4. Hybrydyzacja (30 min)**



**5. Barwienie (50 min)**

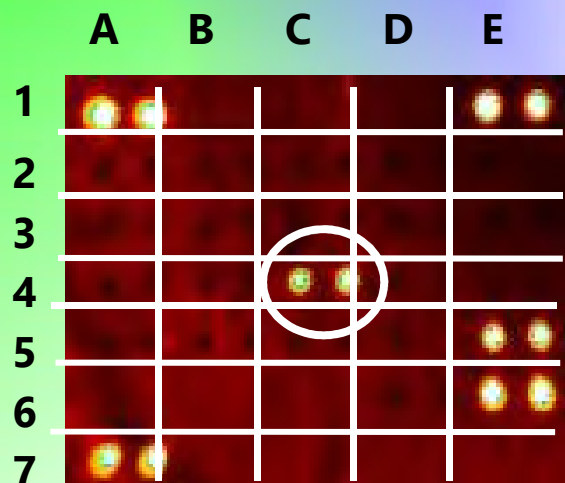


**6. Detekcja (pomiar) (10 min)**

# Wyniki dla GMO-Chip™:

- Próbkę DNA: nietransgeniczna kukurydza

Hybrydyzacja



Rozkład wyników:

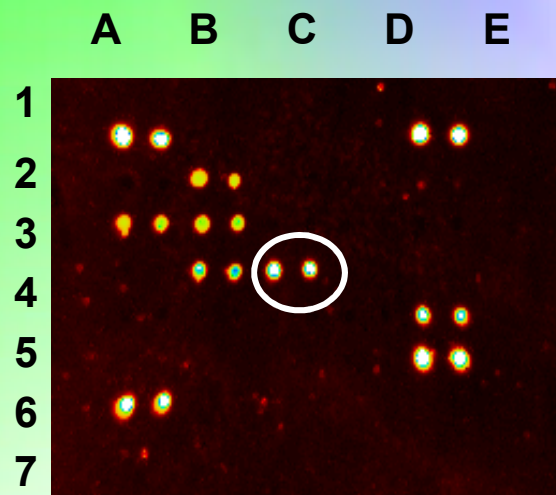
|   | A       | B       | C         | D        | E    |
|---|---------|---------|-----------|----------|------|
| 1 | FK      |         |           |          | FK   |
| 2 | BT176   | MON810  | BT11      | BTXtra   | CaMV |
| 3 | 176/810 | 11/810  | soja      | rzepak   | ryz  |
| 4 |         | P 35S   | kukurydza | ziemniak | NK   |
| 5 | bar     | pat-syn | T-nos     |          | HK   |
| 6 |         |         |           |          | KK   |
| 7 | FK      |         |           |          |      |

Pokazano jeden z wielu *array* na chipie

# Wyniki dla GMO-Chip™:

- Próba testowana 25-00-9484: **0,1% Mon810-kukurydza**

Hybrydyzacja

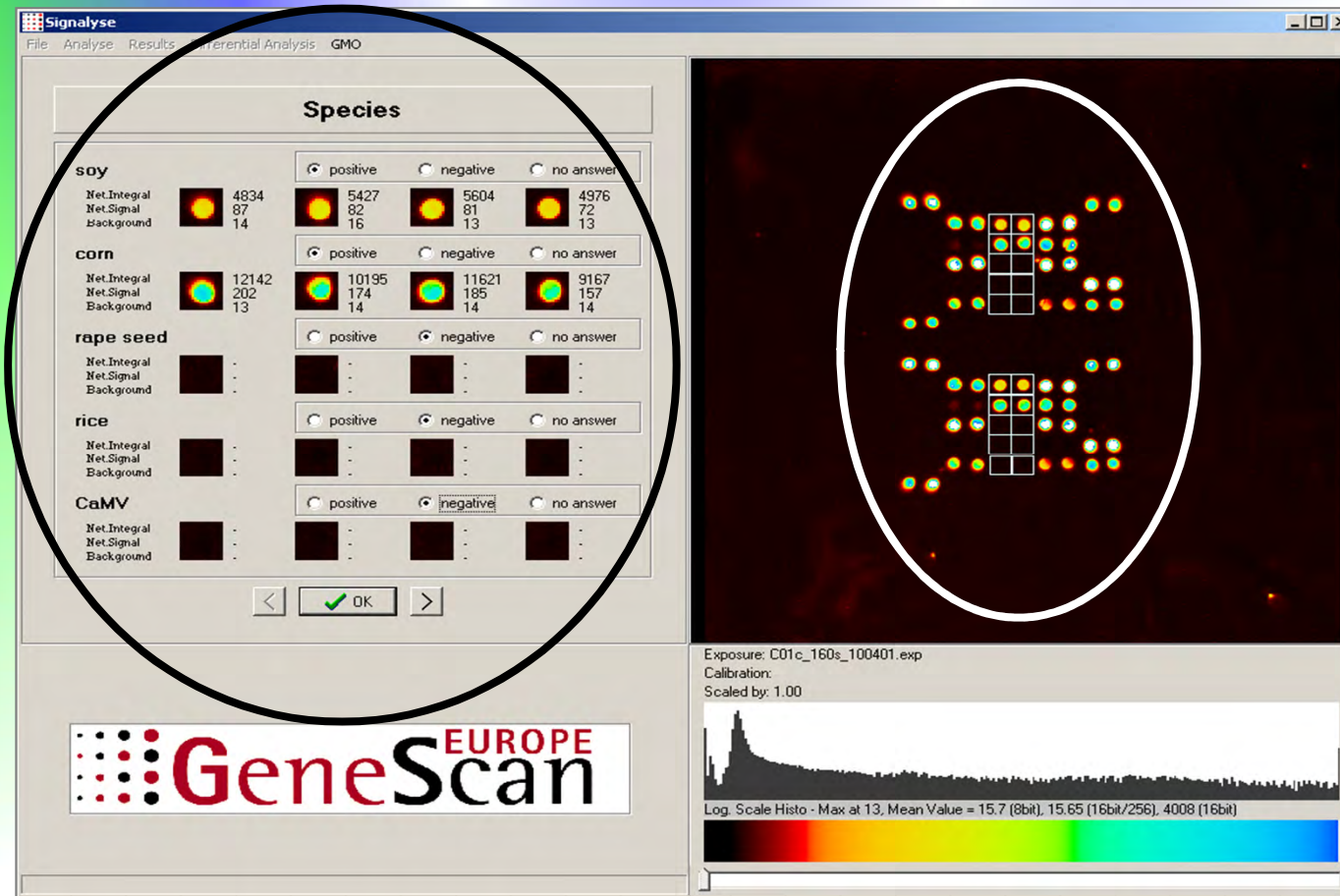


Rozkład wyników:

|   | A       | B       | C         | D        | E    |
|---|---------|---------|-----------|----------|------|
| 1 | FK      |         |           |          | FK   |
| 2 | BT176   | MON810  | BT11      | BTXtra   | CaMV |
| 3 | 176/810 | 11/810  | soja      | rzepak   | ryz  |
| 4 |         | P 35S   | kukurydza | kartofel | NK   |
| 5 | bar     | pat-syn | T nos     |          | HK   |
| 6 |         |         |           |          | KK   |
| 7 | FK      |         |           |          |      |

Pokazano jeden z wielu *array* na chipie

# Ocena wyników dla GMO-Chip:





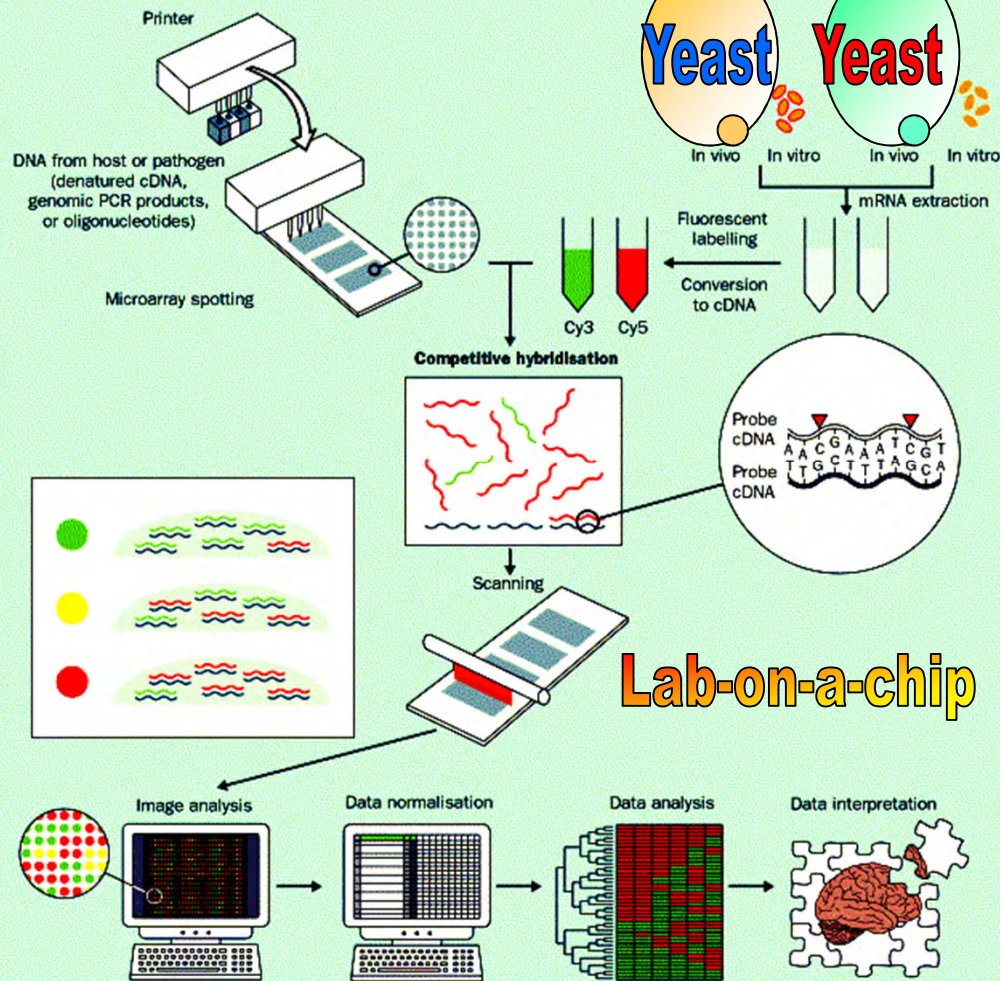
# Diagnostyka drożdży a nanosensory (5)

- Konstrukcje lab-on-a-chip pozwalają również na analizę genów, np. w drożdżach transgenicznym oraz na postranslacyjne badanie ekspresji genów.

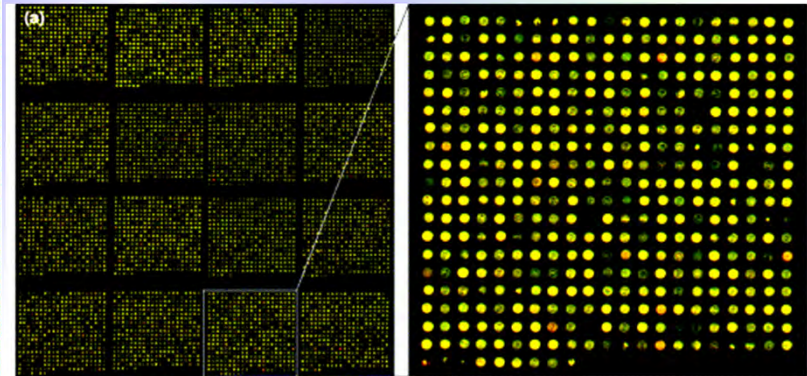


# Mutacja genów: DNA *microarray*

## Factories-on-a-chip

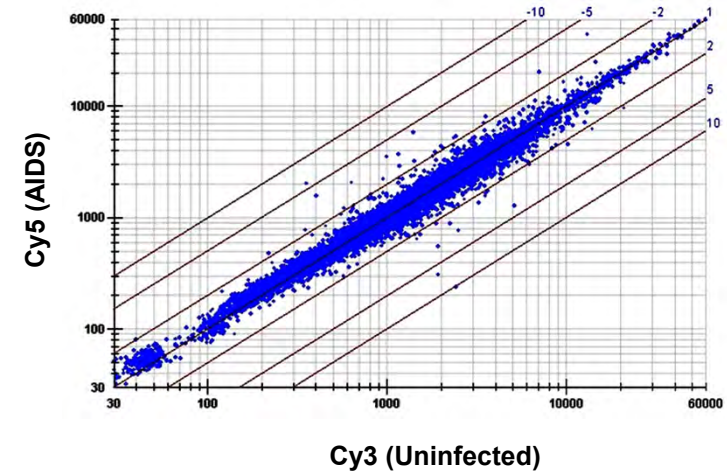


Bryant et al., *The Lancet Infectious Diseases* 4:100 (2004)



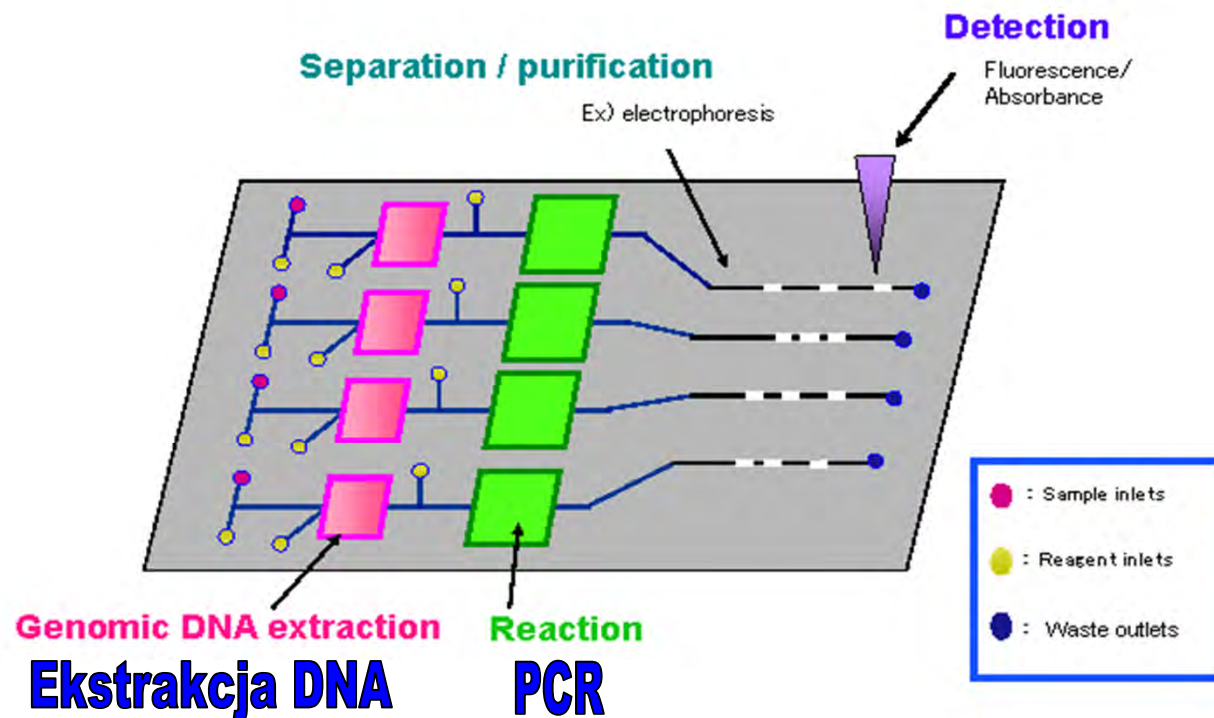
Leung & Cavalieri, *Trends in Genetics* 19:649 (2003)

## mRNA, ekspresja w komórkach





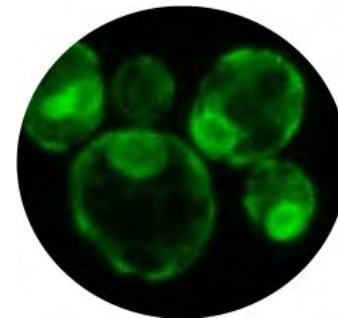
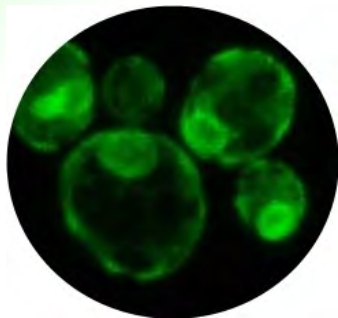
# Analiza hybrydowego DNA na mikrochipie



Badanie DNA w transgenicznym drożdżach piwowskich

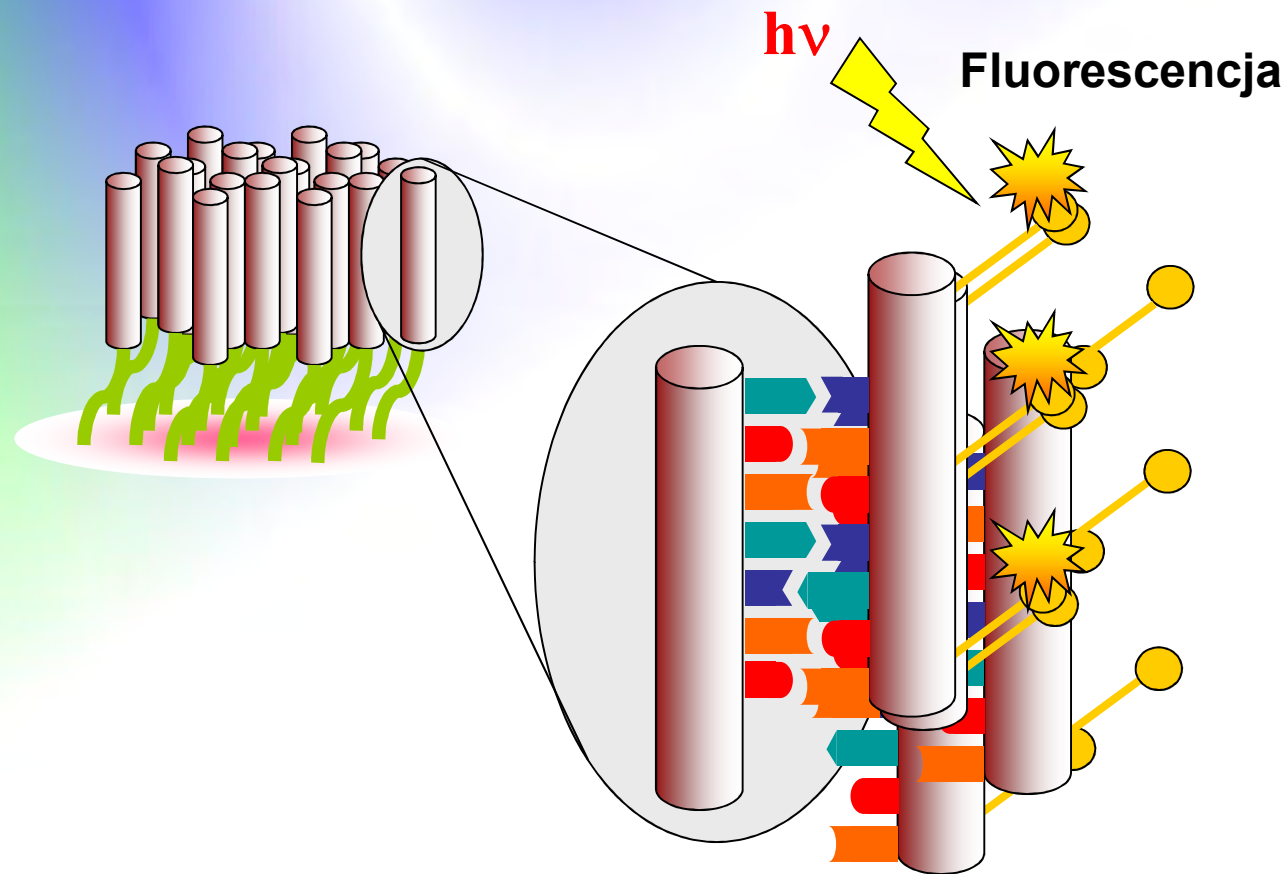
# Diagnostyka drożdży a nanosensory (6)

- Lab-on-a-chip może posłużyć do hybrydyzacji DNA drożdżowego, a więc do otrzymywania nowych rekombinantów dla technologii piwowarstwa, przy użyciu minimalnych ilości materiału genetycznego.



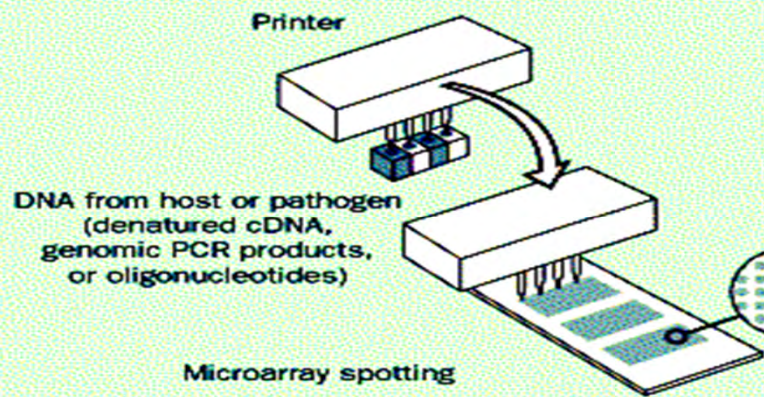


# Hybrydyzacja na BioChipie

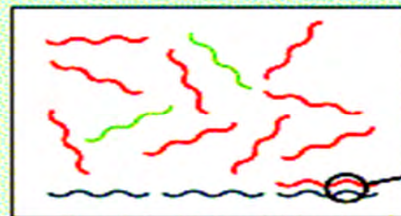




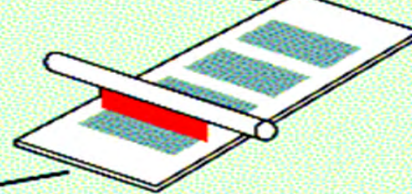
# Factories-on-a-chip



## Competitive hybridisation



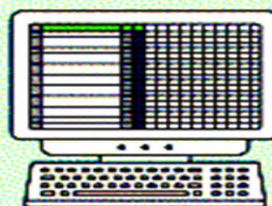
## Scanning



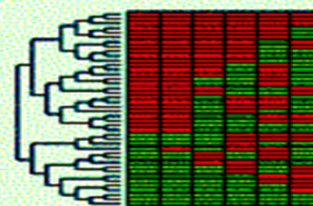
## Image analysis



## Data normalisation



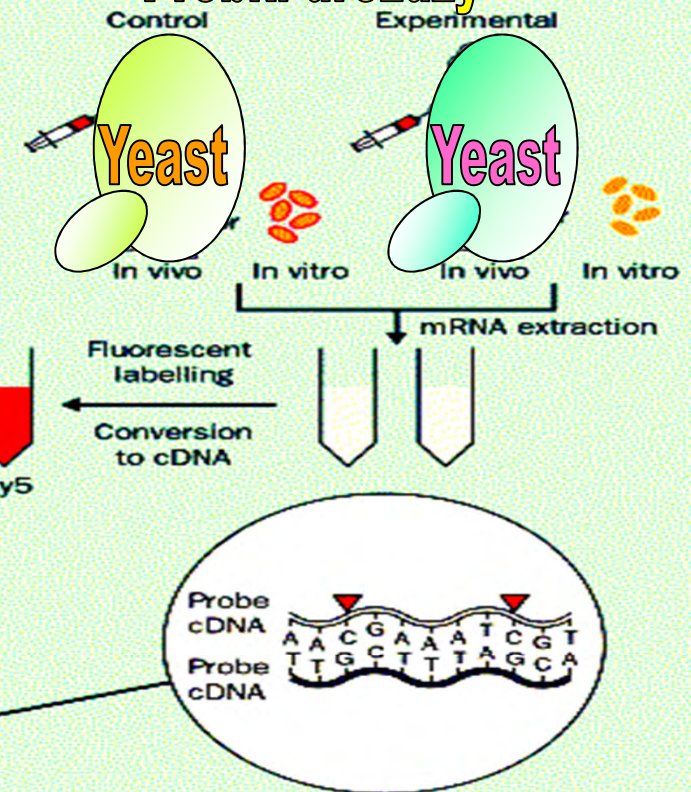
## Data analysis



## Data interpretation



# Próbki drożdży



# Lab-on-a-chip



# **Monitoring dynamiki wzrostu komórek w tzw. *real time* (1)**

**Zadaniem nanomaszyn i biosensorów jest:**

- udział w regulacji procesów wzrostu i fermentacji drożdży, poprzez dostarczanie substratu, związków towarzyszących oraz tlenu,
- pomiar pewnych parametrów technologicznych w czasie rzeczywistym (*real time*),
  - usuwanie produktów odpadowych,
- kontrola temperatury w warunkach sterylności.

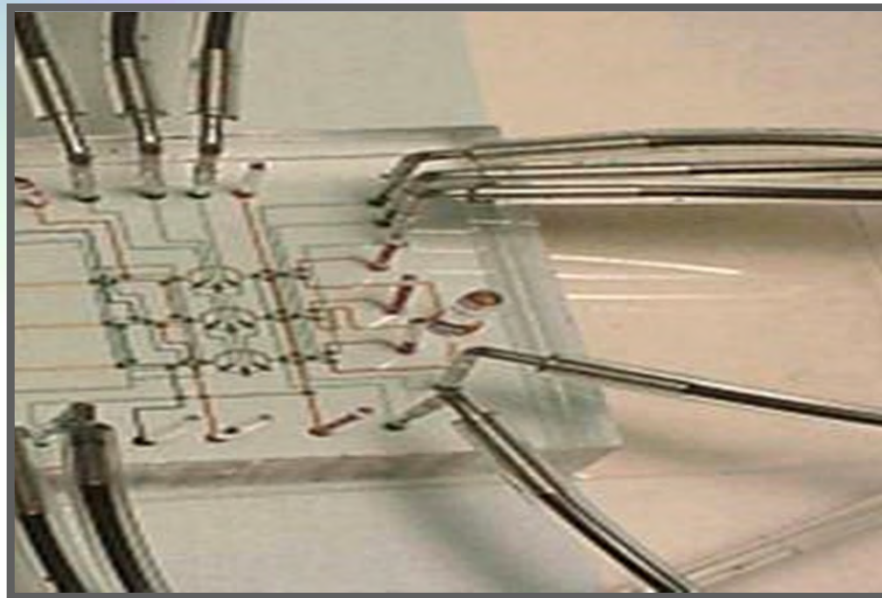
# Kontrola typowych etapów procesu fermentacyjnego





## Monitoring dynamiki wzrostu komórek w tzw. *real time* (2)

- Pierwszym systemem, który spełniał wymogi monitoringu propagacji drożdży, był system mikrofluidyzacyjny (w nanoskali).



## **Monitoring dynamiki wzrostu komórek w tzw. *real time* (3)**

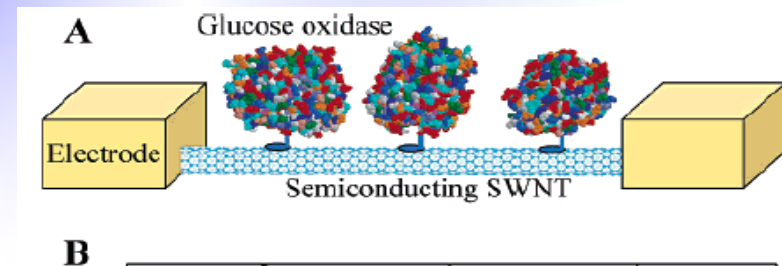
- **Monitorowano dynamikę powstawania glukozy i etanolu z dwucukrów, stymulowaną przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, które wiązano poprzez polietyleniminię na *flow-through* silikonowym mikrochipie z immobilizowanymi enzymami, tzn. z oksydazą glukozową i alkoholową.**
- **Wynik oparto na pomiarze np. chemiluminescencji.**

# Enzym glukooksydaza na powierzchni nano-cylindra węglowego

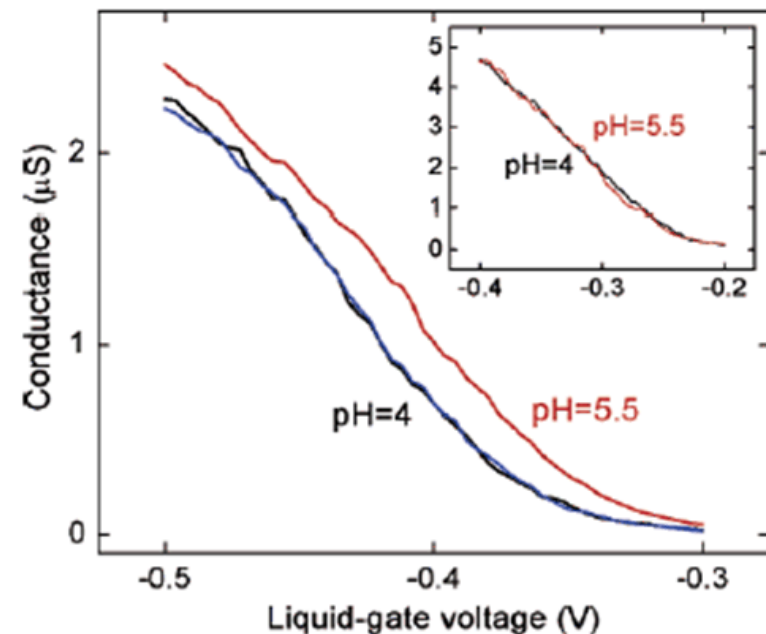
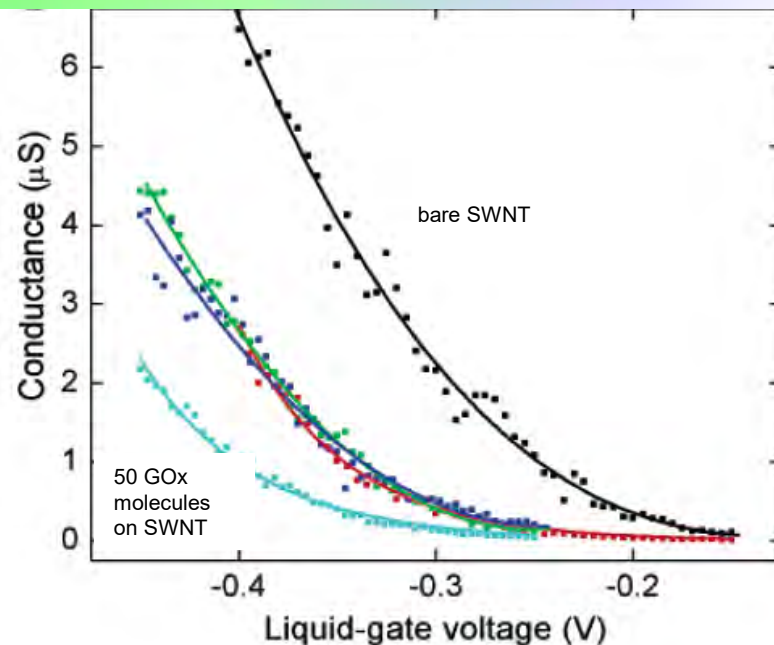
## Efekt immobilizacji GOx

Po immobilizacji:

1. AFM wysokość: 5 nm  $\rightarrow$  8 nm;
2. 1 GOx cząsteczka na 12 nm;
3. Przewodnictwo SWNT wzrasta wyraźnie (czern, cyan);



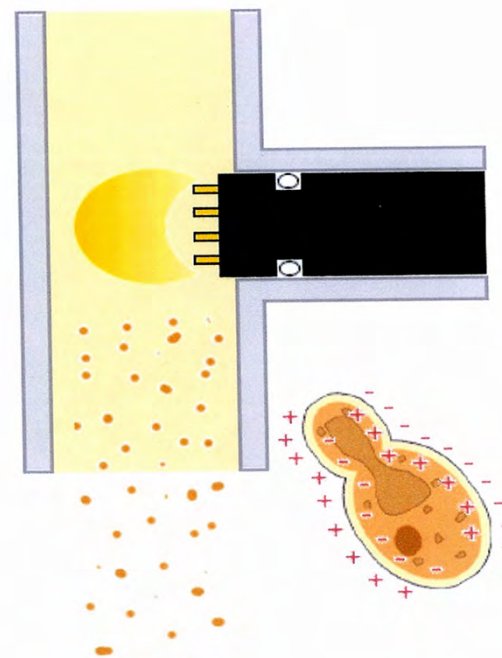
4. pH zależne;



# Monitoring dynamiki wzrostu komórek, tzw. *impedance* (4)

Firma **ABER Instrument Ltd.** unowocześniła koncepcję monitoringu biomasy drożdży piwowarskich, tj. metodę „*impedance*” do automatycznej i ciągłej kontroli namnażania drożdży oraz pomiaru współczynnika przepływu aktywnych komórek, o optymalnej gęstości (w g/l), tj. ilości komórek w 1 ml.

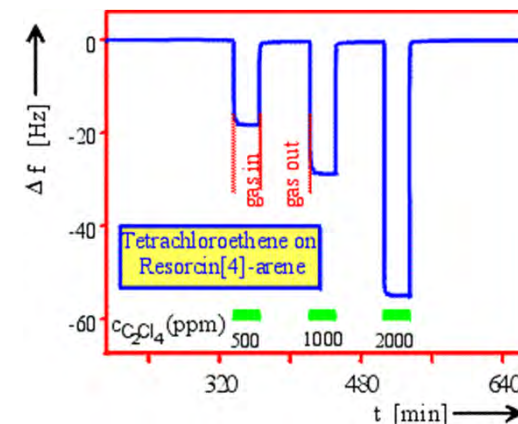
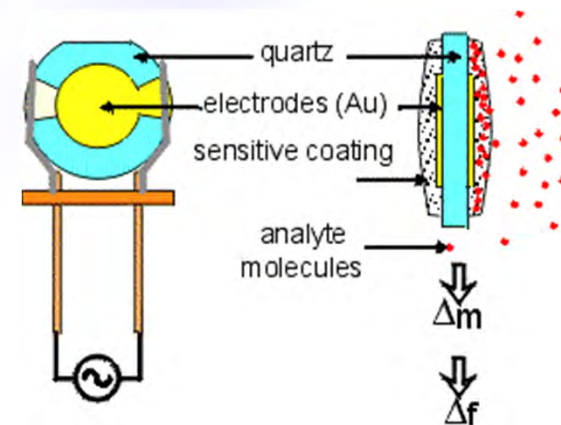
*on line*  
*in real time*





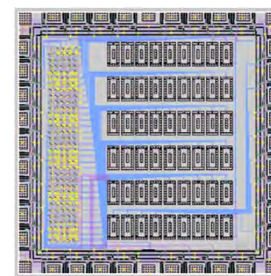
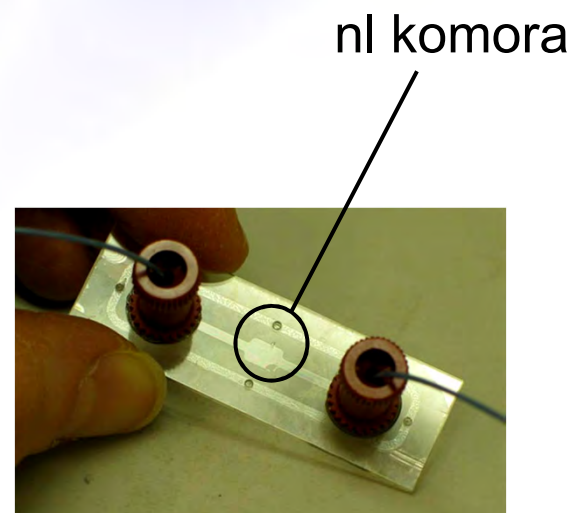
# Monitoring dynamiki wzrostu komórek: piezoelektryczny sensor (5)

- Dzięki piezoelektrycznym właściwościom materiału kwarcowego, prąd zmienny może być zamieniony w fale akustyczne. Podstawowa częstotliwość fal akustycznych jest określana jedynie na podstawie geometrycznych wymiarów kryształu.
- Masa jest oceniana na podstawie spadku częstotliwości, przy czym wzrost masy jest proporcjonalny do spadku częstotliwości.



# Jak analizować pojedyncze żywe komórki?

- Mała objętość
  - fmol na nanoliter = mM!
  - Konieczność pracy z objętościami na poziomie nl
- Mikroelektromechaniczny system (MEMS)
  - Chipy, pompy, strzykawki, zastawki, sensory, itd. w skali  $\mu\text{m}$ , nm
- Nanoelektromechaniczny system (NEMS)

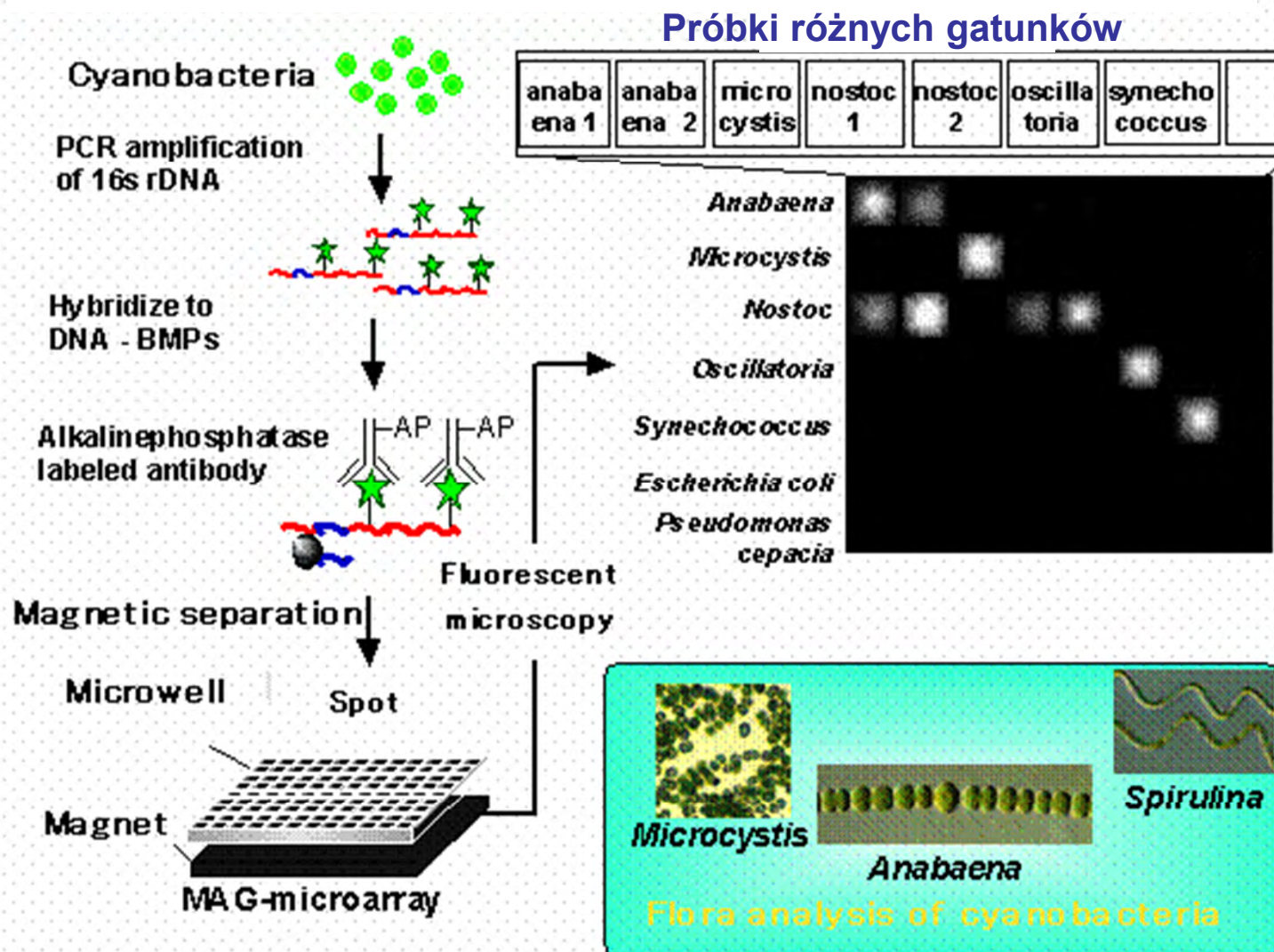


# **Identyfikacja mikroorganizmów**

- **Następne systemy, np. niemieckiej firmy FastScan, polegały na niezależnych pomiarach, zmierzających do identyfikacji mikroorganizmów, na podstawie zmienności ich RNA, DNA i białek.**
- **System analityczny opierał się na elektrycznym lub magnetycznym bio-chipie.**
- **Zdolność pomiarowa elektro-magnetycznego chipu sięgała 500 niezależnych analiz bez względu na rodzaj mierzonych cząsteczek (komórek).**



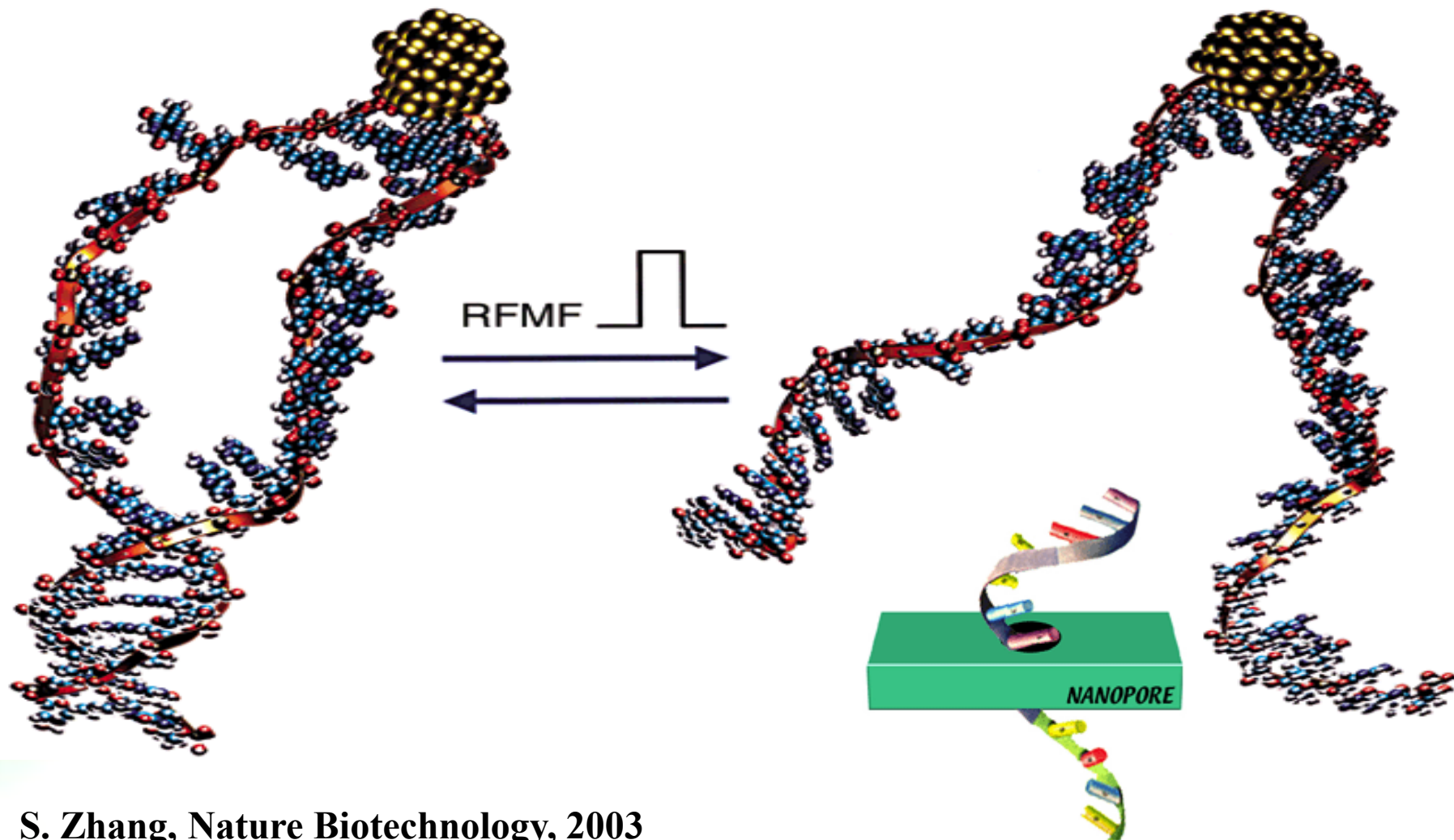
# Detekcja infekujących wodę bakterii



Detekcja gatunkowa cyanobakterii metodą magnetyczno-macierzową



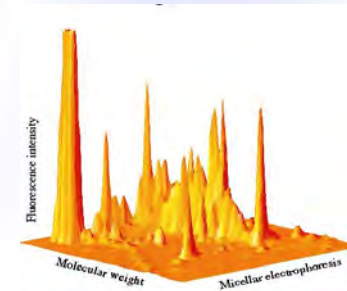
# DNA dołączone do nanokrystalów połączonych z metalem



S. Zhang, Nature Biotechnology, 2003

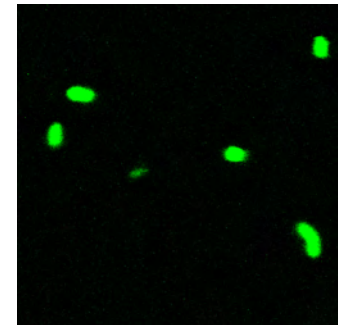
# *Post real-time* analiza martwych komórek

- Proteomika pojedynczych komórek (Norm Dovichi, Chemistry)



„Fingerprints” białek - 2D kapilarna elektrfhozeza

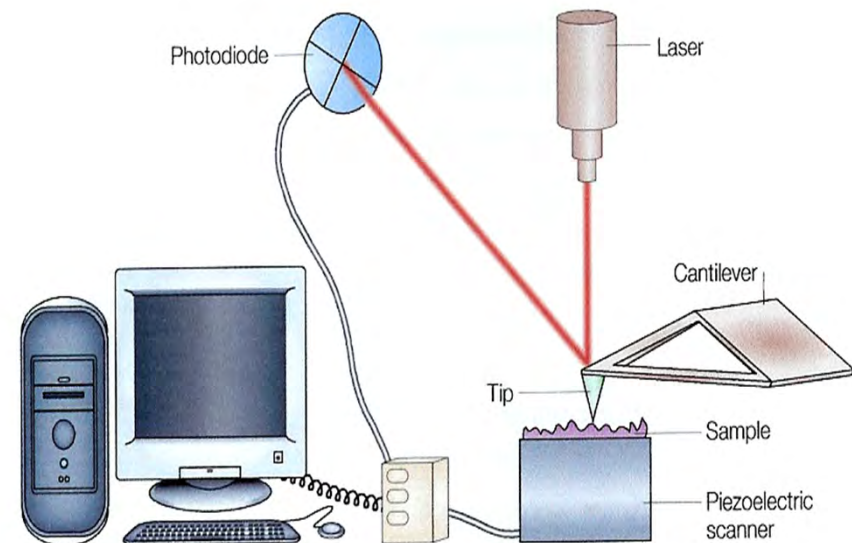
- RT-PCR pojedynczych komórek (Kelly Fitz Gerald, ChemE)



mRNA do 9 genów

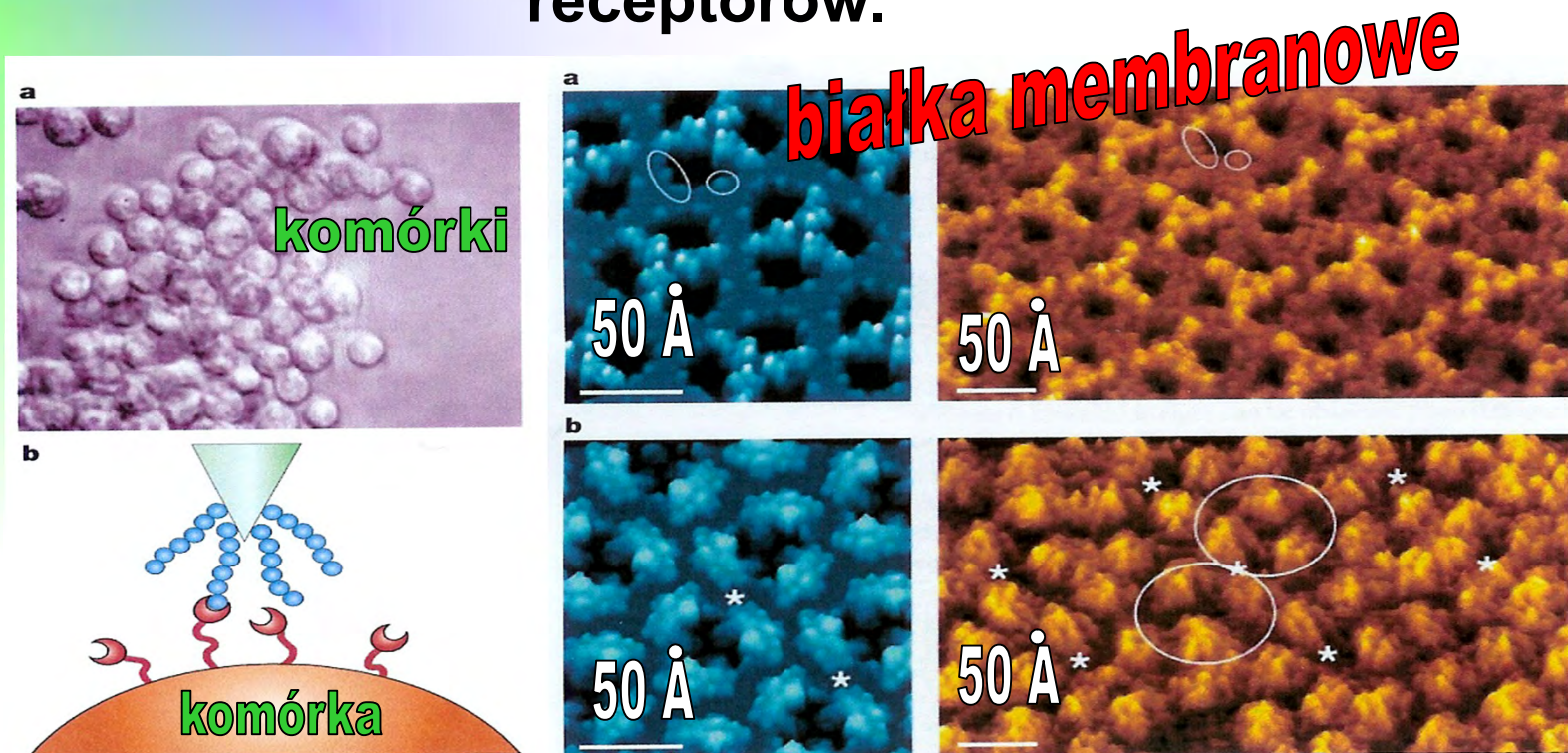
# Selekcja najaktywniejszych komórek drożdży piwowskich

**Dzięki nanobiotechnologii, mikroskop o działaniu atomowym (AFM) umożliwia manipulowanie strukturami membranowymi drożdży w ich natywnym środowisku płynnym, tj. w brzeczce.**



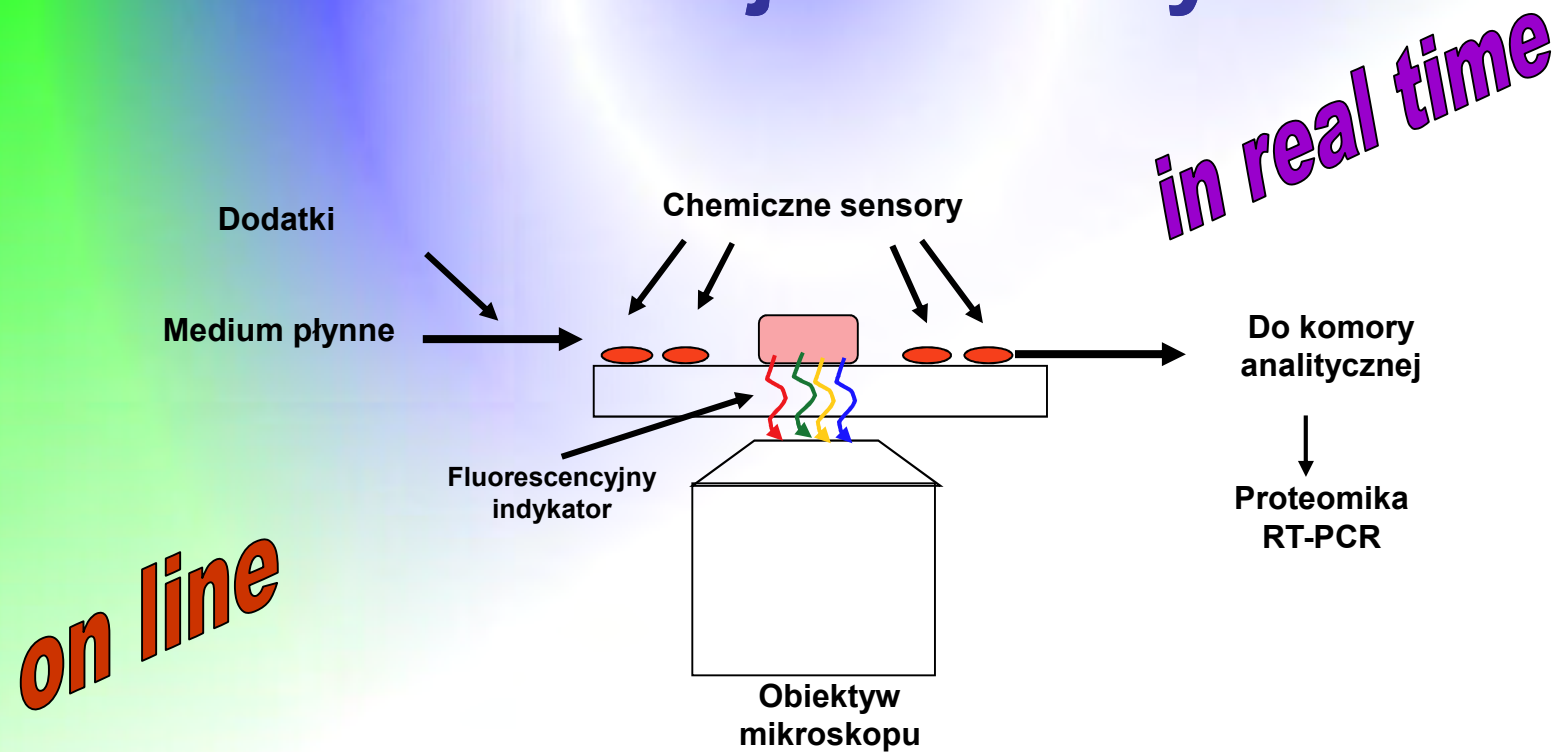


Można dokonywać zmian w pojedynczych białkach membranowych drożdży, albo obserwować w czasie rzeczywistym dynamikę zmian powierzchniowych w błonie komórkowej, dotyczących białek strukturalnych oraz identyfikacji pojedynczych receptorów.





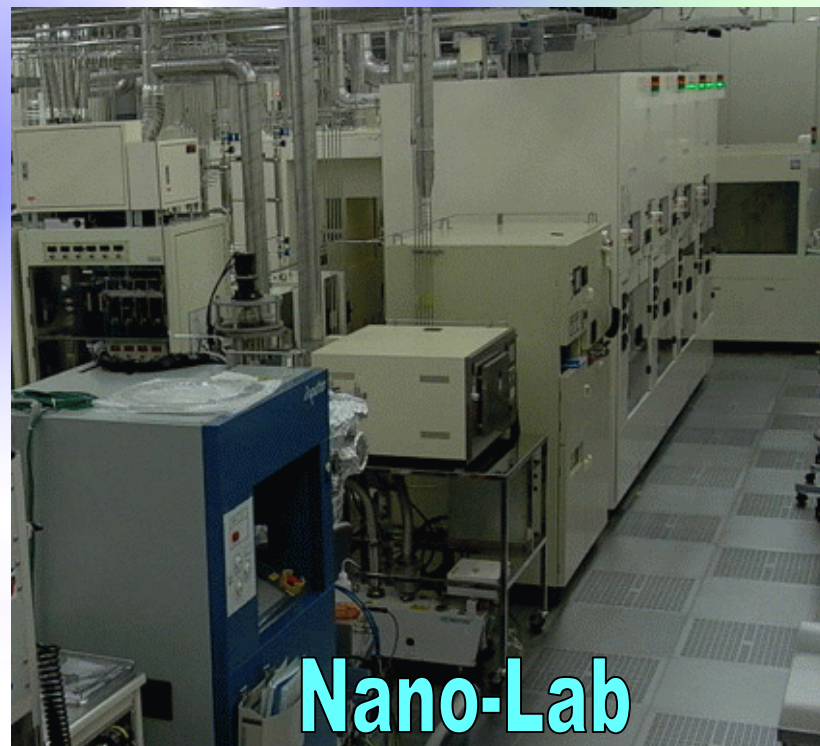
# Kontrola procesów metabolicznych i selekcja drożdży



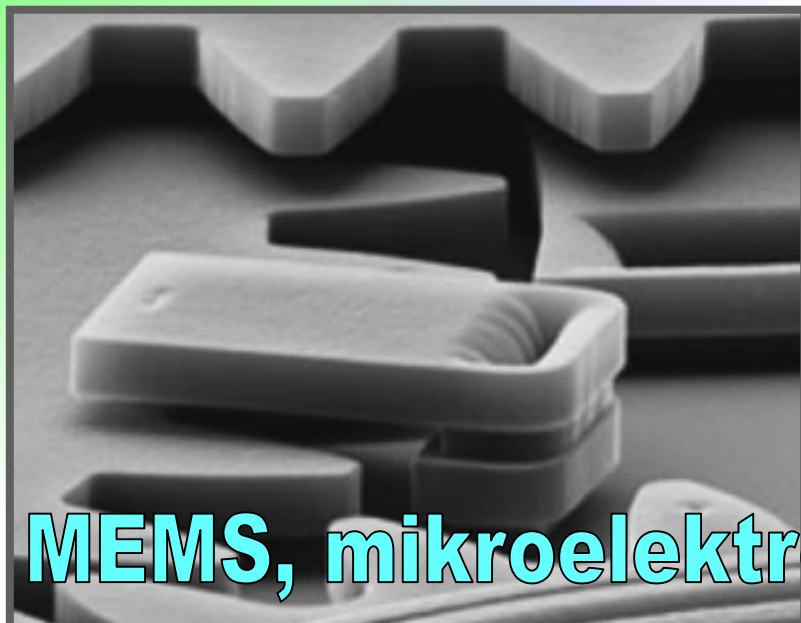
Użycie nanosensorów do identyfikacji pewnych metabolitów drożdży w środowisku fermentacyjnym



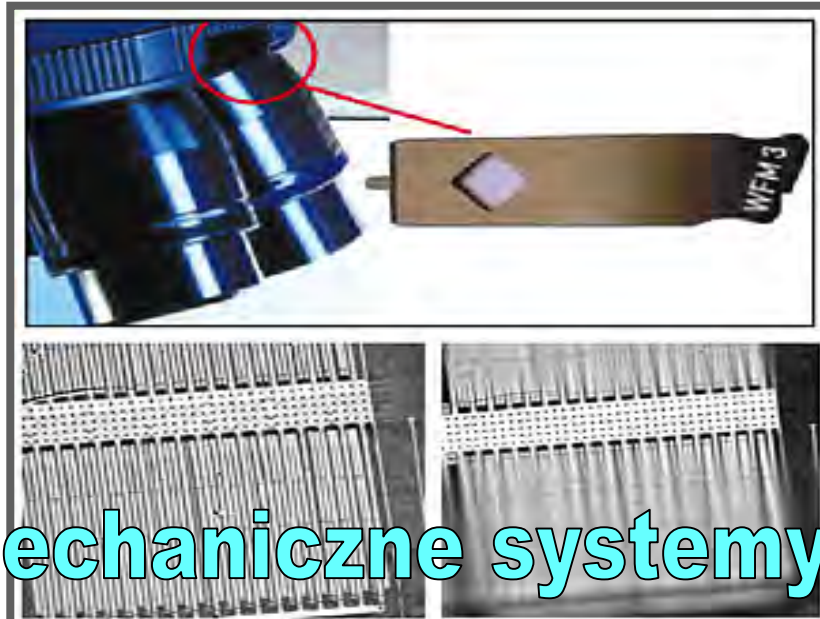
**AFM Mikroskop**



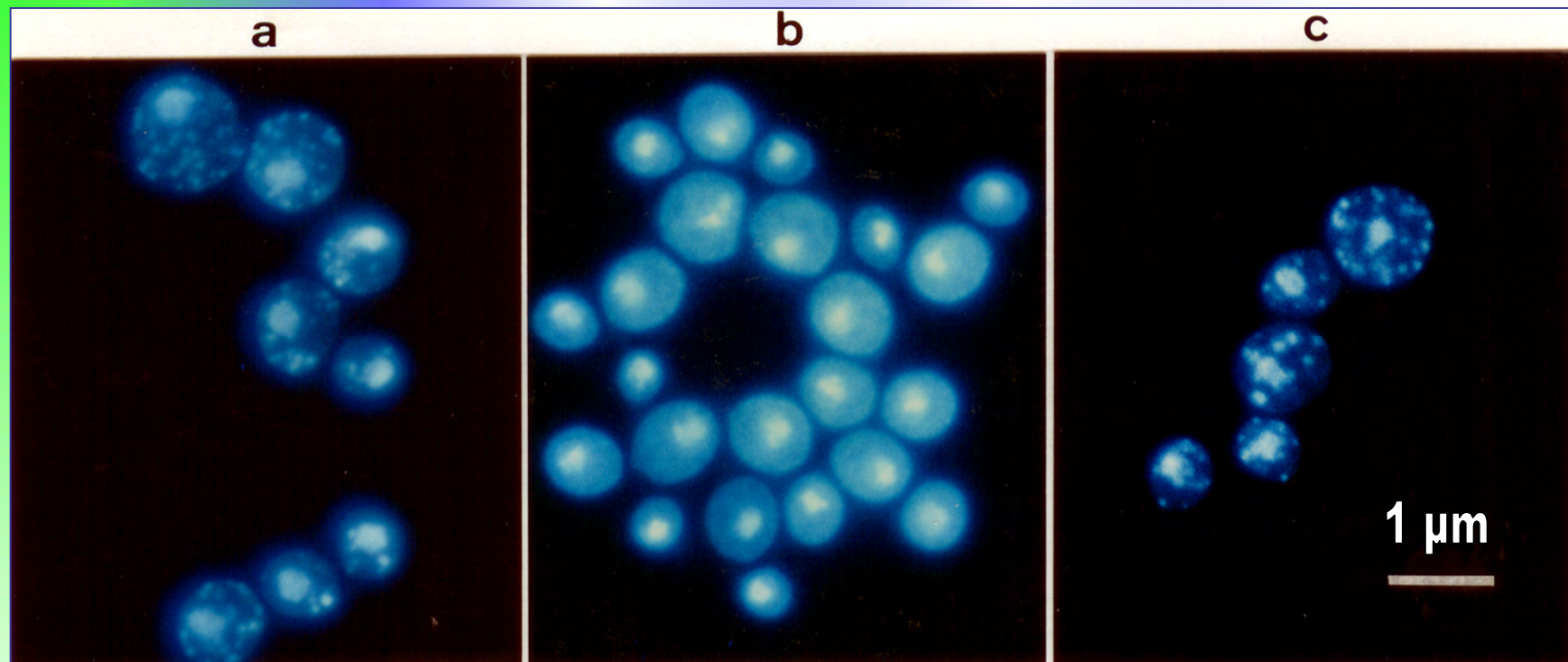
**Nano-Lab**



**MEMS, mikroelektromechaniczne systemy**

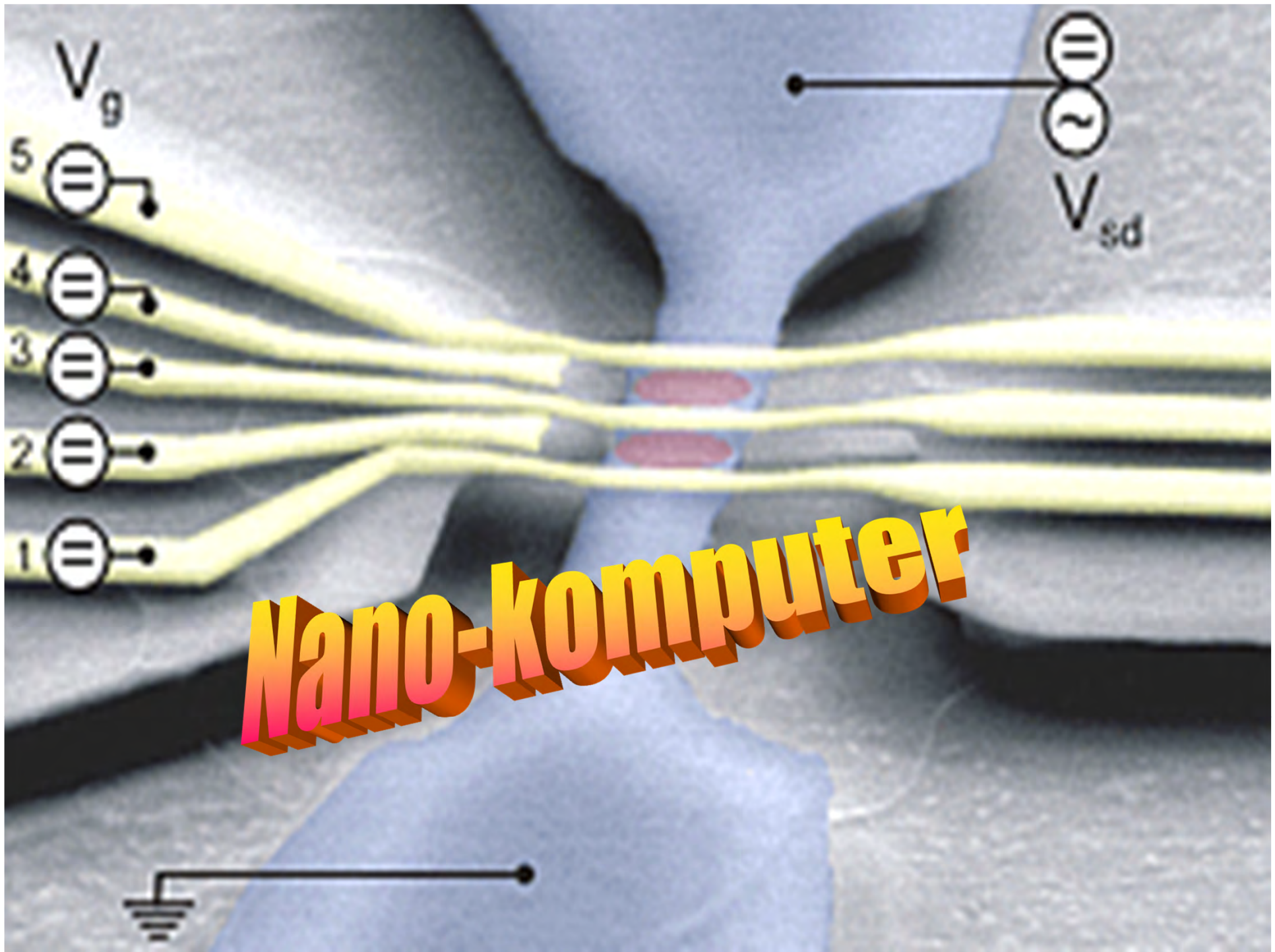


# Drożdże górnej i dolnej fermentacji



a – drożdże górnej fermentacji, b – drożdże z mutacją oddechową,  
c – drożdże dolnej fermentacji

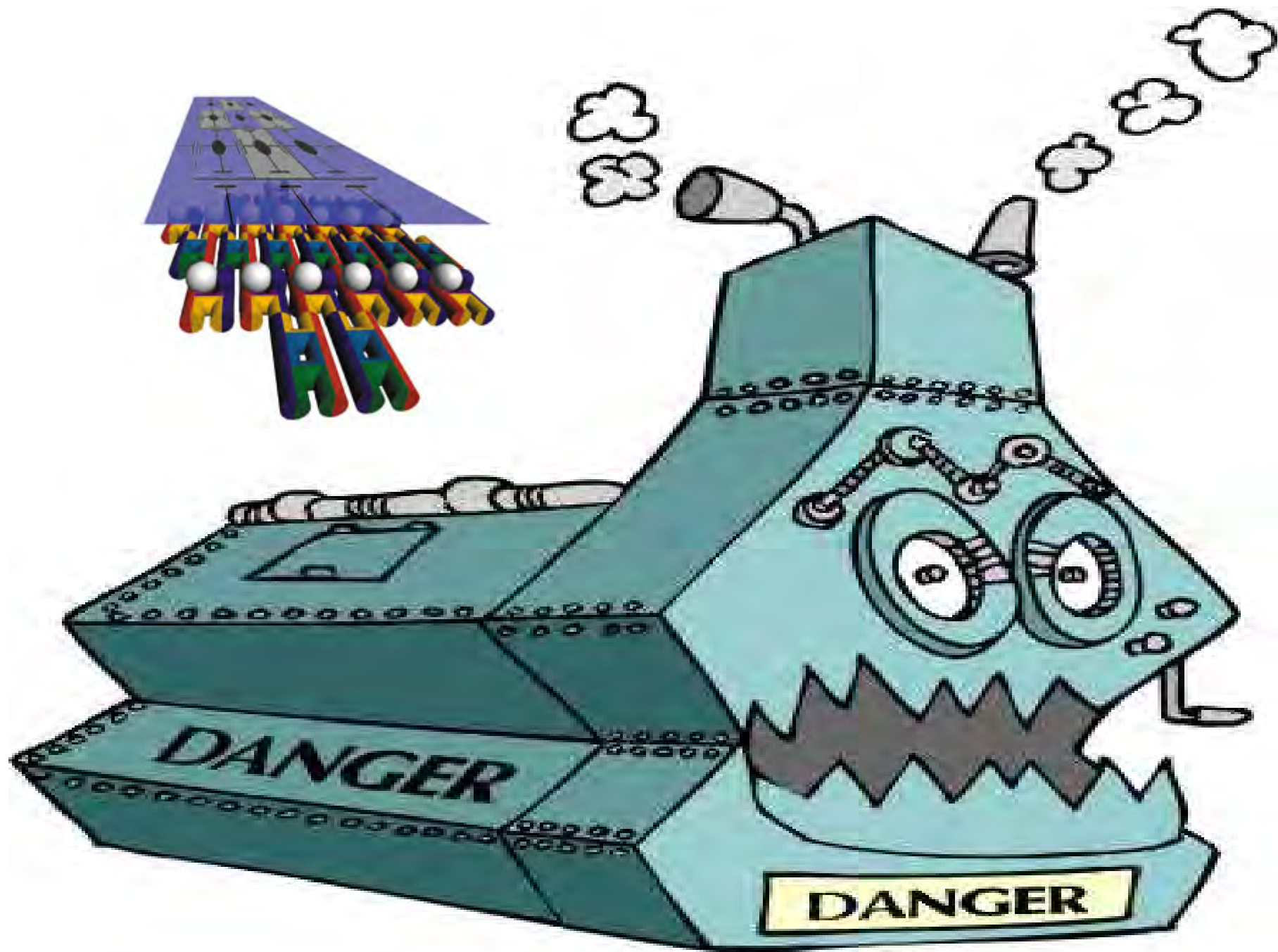








**Nanotechnologia:  
nauka czy fantazja?**





# Klasyczny bioreaktor



**Nanoroboty  
&  
Nanobiosensory**

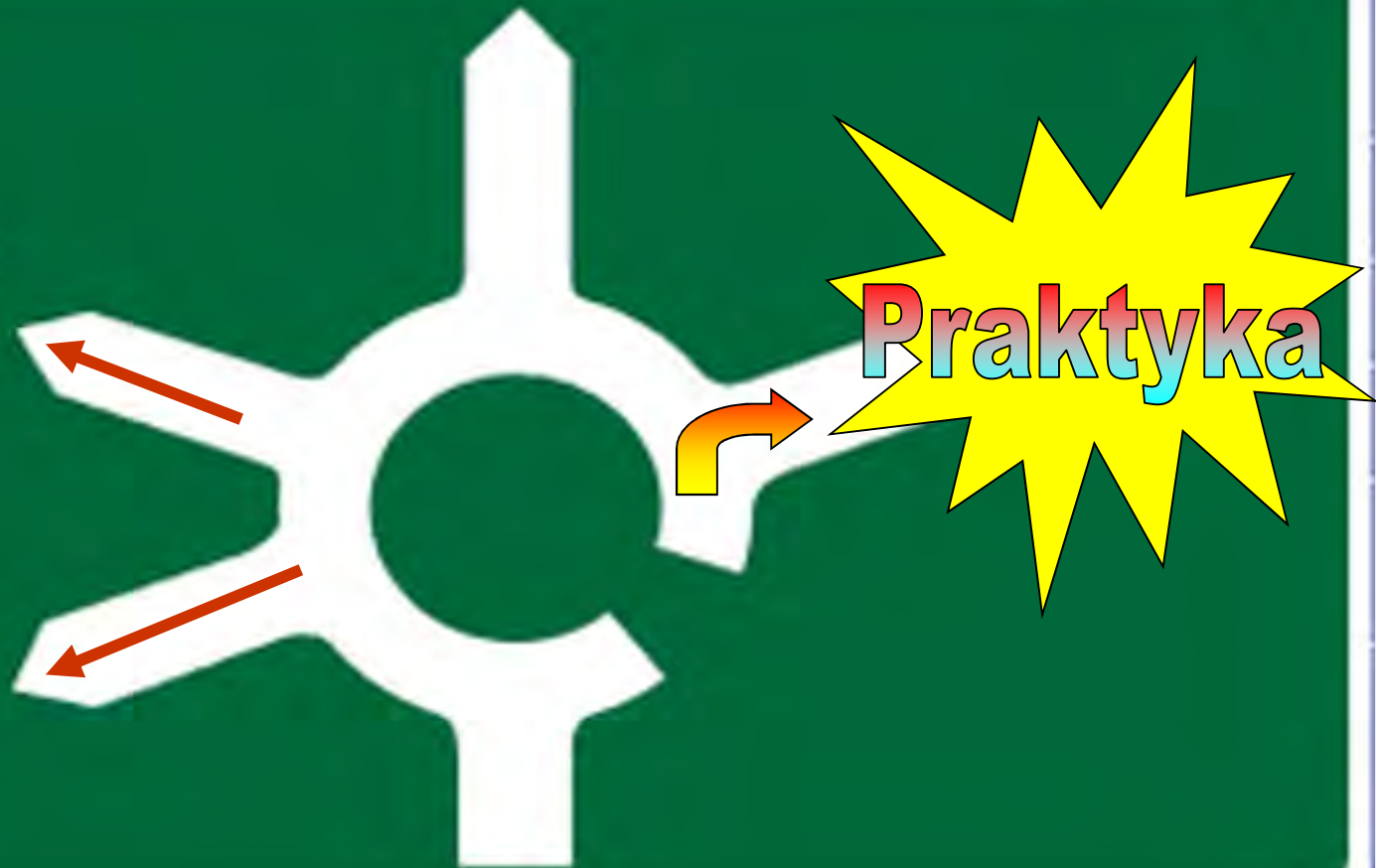
# Nanotechnology



Science  
Fiction

Science  
Project

Praktyka







Prace z zakresu  
nanobiotechnologii

# Prace badawczo-rozwojowe z zakresu nanotechnologii dla przemysłu spożywczego

| Firma                         | Sprzedaż w 2003<br>US mln \$ | Działalność w zakresie<br>nanotechnologii               |
|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Nestle'<br>(Szwajcaria)       | <b>54,2</b>                  | Nanotechnologia dla<br>przemysłu spożywczego            |
| Kraft Foods<br>(USA)          | <b>29,7</b>                  | „Smart drinks“ i nanokapsułki<br>dla przem. spożywczego |
| PepsiCo<br>(USA)              | <b>25,1</b>                  | 4 firma w rankingu firm przem.<br>spożywczego i napojów |
| Cargill<br>(USA)              | <b>20,5</b>                  | 7 firma w rankingu firm przem.<br>spożywczego i napojów |
| ConAgra<br>(USA)              | <b>19,8</b>                  | 8 firma w rankingu firm przem.<br>spożywczego i napojów |
| DuPont Food<br>Industry (USA) | <b>5,5</b>                   | Strategiczny partner dla<br>przem. spoż. i napojów      |

# Perspektywy rozwoju produkcji i dochodów z nanobiotechnologii

- 2004/2005 rok - **200** koncernów pracujących w zakresie nanobiotechnologii dla przemysłu spożywczego;
- 2010 rok – **kilka tysięcy** firm pracujących w zakresie nanobiotechnologii dla przemysłu spożywczego;
- 2010 rok – dochód ze sprzedaży urządzeń z zakresu nanobiotechnologii dla przemysłu spożywczego przewidziany jest na poziomie **20 mln \$**



# Dziękuję za uwagę !



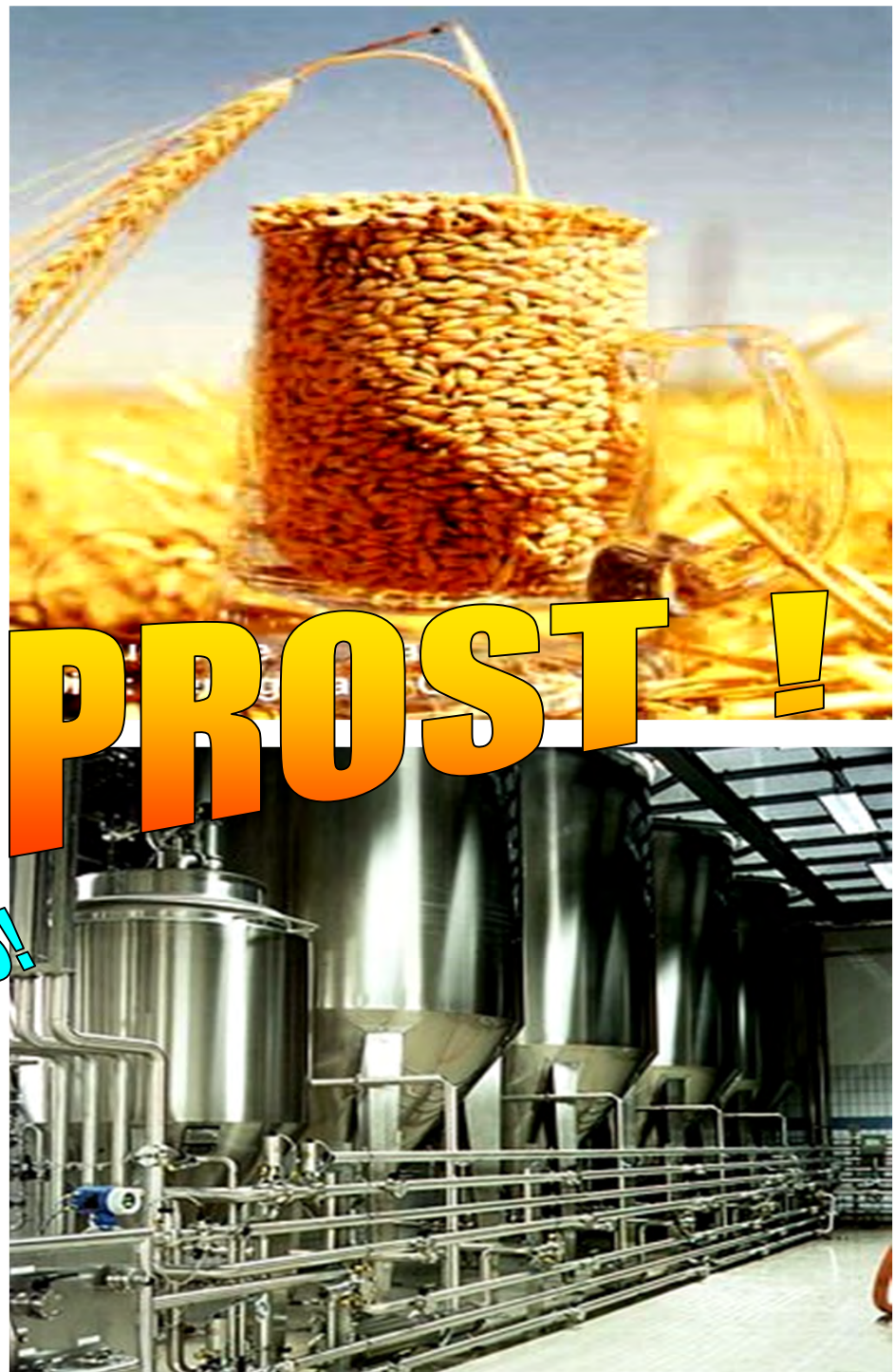
## Pytania ?







Nienanotechnologiczne piwo!



PROST !