

FFIBM/719/144

Godkjent
Kjeller 19 januar 2000


Bjørn Arne Johnsen
Forskningsjef

**OVERSIKT OVER BIOSENSORER FOR
IDENTIFIKASJON AV BIOLOGISKE VÅPEN**

FYKSE Else Marie, OLSEN Jaran Strand, ØKSTAD
Ole Andreas

FFI/RAPPORT-2000/00492

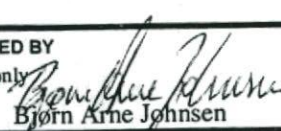
FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT
Norwegian Defence Research Establishment
Postboks 25, 2027 Kjeller, Norge

FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT (FFI)
Norwegian Defence Research Establishment

UNCLASSIFIED

P O BOX 25
2027 KJELLER, NORWAY
REPORT DOCUMENTATION PAGE

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
(when data entered)

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2000/00492	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 44
1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/719/144	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE OVERSIKT OVER BIOSENSORER FOR IDENTIFIKASJON AV BIOLOGISKE VÅPEN (IDENTIFICATION OF BIOLOGICAL WEAPONS BY BIOSENSORS - A REVIEW)		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) FYKSE Else Marie, Olsen Jaran strand, ØKSTAD Ole Andreas		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH:		IN NORWEGIAN:
a) <u>Biological weapons</u>		a) <u>Biologiske våpen</u>
b) <u>Toxins</u>		b) <u>Toksiner</u>
c) <u>Detection</u>		c) <u>Deteksjon</u>
d) <u>Identification</u>		d) <u>Identifikasjon</u>
e) <u>Biosensors</u>		e) <u>Biosensorer</u>
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT This review discusses biosensors for identification of toxic material of defence interest with particular emphasis on biological weapons. Biosensors are defined as analytical devices combining the molecular recognition capabilities of biomolecules with electronics for signal measurement. Although, an enormous effort is being put into developing biosensors, relatively few analytes, especially toxic materials, can yet be measured by commercially available devices. Thus not all toxic materials of possible interest to defence forces can currently be detected by biosensors. Biosensors are required in an automatic, unattended, remote sensing mode or carried as part of an analytical test system to be used under field conditions. Under field condition the equipment will usually be carried in a vehicle. It is required that a biosensor is highly selective for their designed analytes in a matrix of other chemical or biological elements. In this review, the types of biological components of biosensors used for identification of biological weapons and toxins will be discussed. Different biosensors using antibodies (immunosensors) as the sensing element are reviewed. Sensors using nucleic acid (DNA) technology are discussed. Especially the polymerase chain technique (PCR) is described and the future potential of using PCR technique for identification of biological weapons. Biosensors using enzymes or receptors as the sensing elements are also mentioned. So far these sensors are not very useful for identification of biological weapons.		
9) DATE 19 January 2000	AUTHORIZED BY This page only  Bjørn Arne Johnsen	POSITION Director of Research

UNCLASSIFIED

ISBN-82-464-0403-2

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
(when data entered)

INNHold

	Side	
1	INNLEDNING	7
2	BAKGRUNN	8
3	BIOSENSORER	10
3.1	Bruk av antistoffer i biosensorer	12
3.2	Antistoffbaserte biosensorer (immunsensorer)	13
3.2.1	Optiske immunsensorer	15
3.2.1.1	Surface Plasmon Resonans (SPR)	15
3.2.1.2	Resonant mirror (RM)	17
3.2.1.3	Fluorimetriske immunsensorer	17
3.2.2	Akustiske biosensorer	19
3.2.3	Elektrokjemiske sensorer	20
3.3	Bruk av deoksyribonukleinsyre (DNA) som gjenkjenningsmolekyl i biosensorer	23
3.4	Reseptorer og enzymer	31
3.5	Kunstige reseptorer	32
3.6	Mikrobrikketeknologi- laboratorium på 1cm^2	33
4	DISKUSJON	36
5	KONKLUSJON	39
	Fordelingsliste	44

OVERSIKT OVER BIOSENSORER FOR IDENTIFIKASJON AV BIOLOGISKE VÅPEN

1 INNLEDNING

Denne rapporten gir en beskrivelse av de viktigste biosensorer som kan benyttes for identifikasjon av biologiske våpen og toksin våpen. En biosensor er et analytisk instrument der en spesifikk biologisk reaksjon omformes til et elektronisk signal som registreres (1).

Vanligvis vil et angrep eller en terrorhandling med biologiske våpen eller toksin våpen være svært vanskelig å oppdage før eventuelle symptomer bryter ut. Muligheter for varsling så tidlig som mulig er derfor viktig for å begrense antallet mennesker som smittes av bakterier eller virus eller forgiftes av toksiner. Tidlig varsling gjør det også mulig å vaksinere befolkningen og starte behandling med antibiotika eller antisera tidlig. For å kunne varsle et biologisk angrep er det nødvendig raskt å kunne detektere og identifisere en rekke biologiske organismer og toksiner. Slike metoder må derfor være sensitive, pålitelige og responstiden må være kort (se også side 10). Dette er teknologisk vanskelig, og mange land bruker i dag store ressurser på å utvikle biosensor-teknologi. Ingen enkelt teknologi som eksisterer i dag tilfredsstiller alle krav til deteksjon og identifikasjon av mikroorganismer og toksiner, og flere ulike metoder må derfor benyttes. Spredning av mikroorganismer og toksiner i form av en aerosol er en effektiv spredningsmetode, men det finnes i dag ingen metoder for fjerndeteksjon av biologiske stridsmidler eller toksiner. De metodene man har for å varsle et angrep inkluderer (2):

- 1) Ikke-spesifikk deteksjon: En aerosol inneholder partikler av størrelsen 1 til 5 μm . De er ofte symmetriske og kan skilles fra andre partikler i luften. Etter innsamling av luftprøver kan spesielle flowcytometer og laserinstrumenter brukes til å skille ulike partikler pga ulik lysspredning.
- 2) Generisk deteksjon: Et system som kan påvise om en aerosol inneholder levende celler. Alle levende organismer inneholder stoffet ATP som kan måles ved den svært følsomme bioluminiscens-metoden.
- 3) Spesifikk identifikasjon: Det finnes flere metoder som kan brukes til spesifikk identifikasjon av mikroorganismer eller toksiner i en aerosol. Biosensorer kan benyttes til identifikasjon av mikroorganismer og toksiner. Mikroorganismer og toksiner spredt via mat eller vann kan også identifiseres ved å bruke de samme spesifikke identifikasjonsmetoder. Spesielle flowcytometer kan også brukes til spesifikk

identifikasjon av bakterier. Ved hjelp av lysspredning og fluorescensmerkede antistoff kan ulike karaktertrekk ved den enkelte bakteriecelle avsløres.

Tilgjengelig informasjon om biosensorer som kan identifisere potensielle biologiske våpen og toksin våpen er hentet fra åpen vitenskapelig litteratur. I tillegg vil arbeid som er utført ved Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) diskuteres.

2 BAKGRUNN

Naturen har av ulike evolusjonsmessige grunner utviklet en rekke forskjellige farlige mikroorganismer og toksiner som er dødelige for mennesker. Mennesker har utnyttet dette til å utvikle masseødeleggelsesvåpen. Slike våpen, biologiske våpen, er levende bakterier, virus eller sopp (disse kalles med en fellesbetegnelse mikroorganismer). Toksin våpen produseres av levende mikroorganismer, men de kan også produseres ved industrielle prosesser.

Mikroorganismer og toksiner kan benyttes til å fremkalle sykdom på mennesker, dyr eller planter og forgiftninger. I tillegg kan slike våpen føre til en forringelse av forsyninger (f eks mat eller vann) og materiell. I verden i dag skjer det ca 50 millioner dødsfall per år, og av disse utgjør dødsfall etter infeksjonssykdommer nesten 40 %. Historisk sett har kriger ført til utbrudd av store epidemier, og infeksjoner var den viktigste dødsårsak i kriger før 2. verdenskrig. Under Krimkrigen (1853-56) utgjorde dødsfall pga infeksjonssykdommer 90 % av totalt antall dødsfall. Under 1. verdenskrig var andelen 66 %, mens andelen var sunket til 1 % under 2. verdenskrig (3). Genève-konvensjonen om biologiske og toksin våpen av 1972 (BTWC) forbyr utvikling, produksjon og lagring av slike våpen. Den har også retningslinjer om tilintetgjørelse av slike våpen, men den inneholder ingen retningslinjer om en kontrollordning (verifikasjon). På tross av internasjonale konvensjoner regnes biologiske våpen og toksin våpen i dag som en trussel mot verdenssamfunnet. Norske styrker kan forvente å delta i operasjoner i andre land der det er økt risiko for at slike våpen blir brukt. Det er også økt risiko for at biologiske våpen kan bli brukt som terrorvåpen, eller bli brukt ved sabotasje av f eks matforsyninger og drikkevann.

I dag regner man med at nær 100 land i verden har teknologi som gjør landet i stand til å produsere biologiske våpen. Av disse landene har muligens 10 til 15 % et biologisk våpenprogram. Foruten Russland som har avsluttet sitt biologiske våpen program og Sør-Afrika som offisielt også har avsluttet sitt program i forbindelse med avvikling av apartheid styret, ligger flere av de mistenkte landene i Midtøsten, Øst og Sørøst-Asia og Nord-Afrika (4). Det skjer i dag en stadig teknologisk og økonomisk utvikling av fattige land i den tredje verden,

og det fører til at flere land er i stand til å skaffe seg biologiske våpen hvis de ønsker. Biologiske våpen kalles ofte for den tredje verdens atomvåpen fordi de er billige og forholdsvis enkle å produsere. Det stilles imidlertid høye teknologiske krav til våpensystemer for levering av slike våpen. De siste 10 til 15 årene har det skjedd en stor utvikling innen bioteknologien. Det har ført til at genetisk modifisering av bakterier, virus, dyr og planter er mulig. Dette muliggjør genmodifisering av potensielle biologiske våpen. En slik genmodifisering kan få store konsekvenser ved at det f.eks. utvikles bakterier som er resistente overfor de mest brukte antibiotika og tilgjengelige vaksiner. En genmodifisering av bakterier eller virus kan også føre til at eksisterende metoder for identifikasjon ikke kan benyttes.

Biologiske våpen og toksin våpen kan spres gjennom mat og drikkevann, men spredning i form av en aerosol som innåndes er sannsynligvis den mest effektive måten. Innen legemiddelindustrien foregår forskning på metoder for å stabilisere legemidler i aerosolform. En slik utvikling kan føre til at f.eks. toksiner som immunmodulatorer og bioregulatorer kan stabiliseres i ren form og dermed tåle en spredning i form av en aerosol. Levende organismers mulighet til å overleve i luft etter en spredning er en viktig parameter for at en effekt skal oppnås. Det er først og fremst organismenes evne til å motstå UV-stråling og uttørking som påvirker effekten etter en spredning. Ved å innkapsle organismene i f.eks. gelatin, gummi, stivelse, alginat, fett osv. kan overlevelsessevnen økes. Tabell 2.1 viser eksempler på ulike bakterier, hvilke sykdommer de fremkaller, infeksjonskilde og potensiell dødelighet hvis de skulle bli brukt som biologiske våpen. Tabellen er et utdrag fra en oversiktsartikkel av Ivniiski og kolleger (5).

Bakterie	Sykdom	Toksin	Infeksjonskilde	Dødelighet, brukt som BV
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax	Ødem faktor Lethal faktor Protective antigen	Melk, kjøtt, BV	Fatal
<i>Brucella melitensis</i>	Brucellose	-	Melk, kjøtt, BV	Lav
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme	Nevrotoksin	Mat, BV*	-**
<i>Coxiella burnetti</i>	Pneumoni (Q-feber)	-	BV	Lav
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritt	Enterotoksin	Mat generelt	-
<i>Francisella tularensis</i>	Harepest	-	BV	Lav
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberkulose	-	BV	Høy
<i>Rickettsia rickettsi</i>	Rocky Mountain-spotted fever	-	BV	Høy
<i>Salmonella typhi</i>	Tyfoidfieber	-	BV	Høy
<i>Vibrio cholera</i>	Kolera	Enterotoxin	Vann	Høy
<i>Yersinia pestis</i>	Pest	Pest toxin	BV	Fatal

Tabell 2.1 Eksempler på patogene bakterier, sykdommer de fremkaller, infeksjonskilde og potensiell dødelighet hvis organismen brukes som biologisk våpen

* BV er ikke angitt som infeksjonskilde for *Clostridium botulinum* i artikkelen. **Forventet dødelighet ved bruk av *Clostridium botulinum* som biologisk våpen er ikke angitt i artikkelen. BV; Biologisk våpen.

3 BIOSENSORER

Biosensorer er som nevnt analytiske instrumenter der en spesifikk biologisk reaksjon omformes til et elektronisk signal som registreres (1,6). Biologiske gjenkjenningmolekyler som benyttes kan være antistoffer, deoksyribonukleinsyre (DNA), enzymer, reseptorer, celler eller vevsbiter. Slike biologiske komponenter gir en spesifikk respons på ulike stoffer. Forskjellige biologiske elementer kan kombineres med ulike fysiske signalomformere (transducere).

Signalomformere kan være optiske fibre, akustisk baserte omformere som piezoelektriske krystaller, eller elektroder av ulike typer for elektrokjemisk anvendelse.

Kommersielle biosensorer har vært på markedet i USA, Europa og Japan i flere år. Det største markedet for biosensorer har vært måling av sukker i blod og urin (7,8). På flere andre

områder innen medisin, jordbruk og miljøanalyser (f eks pesticider) er bruk av biosensorer aktuelt. Når det gjelder bruk av biosensorer til påvisning av kjemiske og biologiske stridsmidler gjenstår fremdeles mye forskning før gode kommersielle systemer er tilgjengelig. Mange av de eksisterende biosensorer har et relativt lite sensorelement der den biologiske reaksjonen foregår, mens det elektroniske "hardware" systemet er relativt stort (f eks 40x40x50 cm). Med få unntak er de produsert for bruk i et forskningslaboratorium eller et klinisk laboratorium. Det finnes få utviklede små bærbare instrumenter. Et eksempel er Analyte 2000 utviklet ved Naval Research Laboratory, USA (9). Utvikling av små instrumenter er ønskelig for feltbruk.

Denne rapporten begrenses til å omtale biosensor-systemer beskrevet i litteraturen som har vært benyttet til påvisning av biologiske stridsmidler, dvs mikroorganismer og toksiner. Rapporten gir ingen fullstendig oversikt over alle biosensorer som har vært brukt til analyse av mikroorganismer og toksiner, men de systemene som er mest brukt og som man har kommet lengst i utviklingen av er beskrevet. For videre detaljer vedrørende biosensorer generelt, se Handbook of Biosensors and Bioelectronic noses (6). I rapporten inndeles biosensorene etter type biologisk gjenkjenningsmolekyl. Biosensorer som baseres på antistoffer, DNA-molekyler, reseptorer og enzymer vil bli omtalt. I tillegg vil såkalte kunstige reseptorer (molecular imprinting) og mikrobrikke-teknologi bli diskutert. Mikrobrikke-teknologien har et stort fremtidig potensiale når det gjelder deteksjon av mikroorganismer og toksiner.

Følgende kriterier brukes ofte for å evaluere en biosensor:

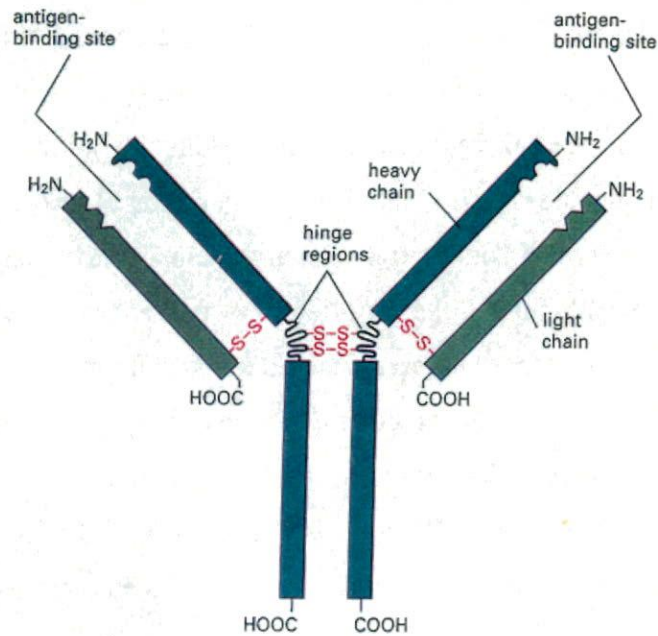
- Sensitivitet
- Selektivitet
- Reproduserbarhet
- Antall prøver som kan analyseres samtidig
- Grad av automatisering av instrumentet
- Analysetid
- Vekt og størrelse av instrumentet
- Brukervennlighet/ opplæringstid
- I hvilken grad målinger påvirkes av forurensninger tilstede i prøvene

Den biologiske reaksjonen i en biosensor avgjør spesifisiteten/ selektivitet av sensoren, mens både den biologiske reaksjonen og signalomformereren avgjør sensitivitet. Det er nødvendig å kunne analysere flere prøver samtidig og analysetiden bør være så kort som mulig. En biosensor bør ha høy sensitivitet ettersom en bakterieprøve kan forventes å inneholde få kopier

av den aktuelle organisme i forhold til det totale antallet av organismer tilstede. Spesifisitet og selektivitet er også viktig. En biosensor bør være enkel å håndtere for operatøren, den bør være automatisert og analysen bør i minst mulig grad påvirkes av tilstedeværende forurensninger i prøvene. Analyseresultatene må være reproduserbare og sensorene bør være reversible, dvs kunne brukes gjentatte ganger. Ingen enkelt biosensor som finnes i dag oppfyller alle disse kravene.

3.1 Bruk av antistoffer i biosensorer

Et antistoff (Ab) er et molekyl som normalt produseres i et levende dyr som respons på en fremmed substans, et antigen (Ag). Et slikt antistoff vil bindes mer eller mindre spesifikt til antigenet som induerte dannelsen. Slike antigener kan bl a være proteiner eller lipopolysakkarider i overflaten av bakterier eller virus, eller toksiner. Antistoffer er proteiner i klassen immunoglobuliner (Ig). Figur 3.1 viser en skjematisk fremstilling av et immunoglobulin av underklassen G (IgG) (10). Biosensorenes spesifisitet, reversibilitet og i noen grad deteksjonsgrense bestemmes av antistoffet som er benyttet. Et antistoffs affinitet for et antigen er et mål for stabiliteten av antistoff – antigen komplekset (Ab-Ag). I en biosensor er optimal affinitet og rask bindingskinetikk viktig (11). Det kreves at en biosensor reagerer på endringer i konsentrasjonen av en komponent i løpet av kort tid (5-15 min). Vanligvis kreves flere timer for å oppnå likevekt i reaksjonen mellom antistoff og antigen. I en biosensor må derfor målingen foretas lenge før likevekt er oppnådd. I en biosensor er antistoffene ofte immobilisert på en sensoroverflate ved adsorpsjon. De kan være direkte bundet til overflaten, eller de kan være bundet via andre molekyler som øker overflaten. Et stort overflate til volumforhold på sensoroverflaten øker bindingshastigheten. Gjennomstrømning av væske over sensoroverflaten bringer prøven aktivt i kontakt med sensoroverflaten. Dette favoriserer også en raskere binding av antistoff til antigen. Antistoffets affinitet for antigenet må heller ikke være for høy, da en ønsker at reaksjonen skal være reversibel for å kunne regenerere sensoroverflaten for gjentatt bruk. Selv om bindingen mellom antistoff og antigen ofte er spesifikk, vil antistoffer i varierende grad også bindes til strukturelt liknende molekyler. Bindingen mellom et antistoff og et antigen kan beskrives som en likevektsreaksjon der bindingskonstanten K beskriver antistoffets affinitet til antigenet (figur 3.2). Alle trinn i en immunologisk reaksjon må nøye titreres inn og optimaliseres for å få et vellykket resultat, og antistoffene må være spesifikke i det systemet som benyttes. Prøvene kan godt inneholde andre antigener i tillegg til det søkte antigenet.



Figur 3.1 Skjematisk fremstilling av et immunoglobulin



Ab: antistoff

Ag: antigen

$$K = \frac{[\text{Ab-Ag}]}{[\text{Ab}][\text{Ag}]}$$

Ab-Ag: antistoff – antigen kompleks (immunkompleks)

K: Bindingskonstant (affinitetskonstant)

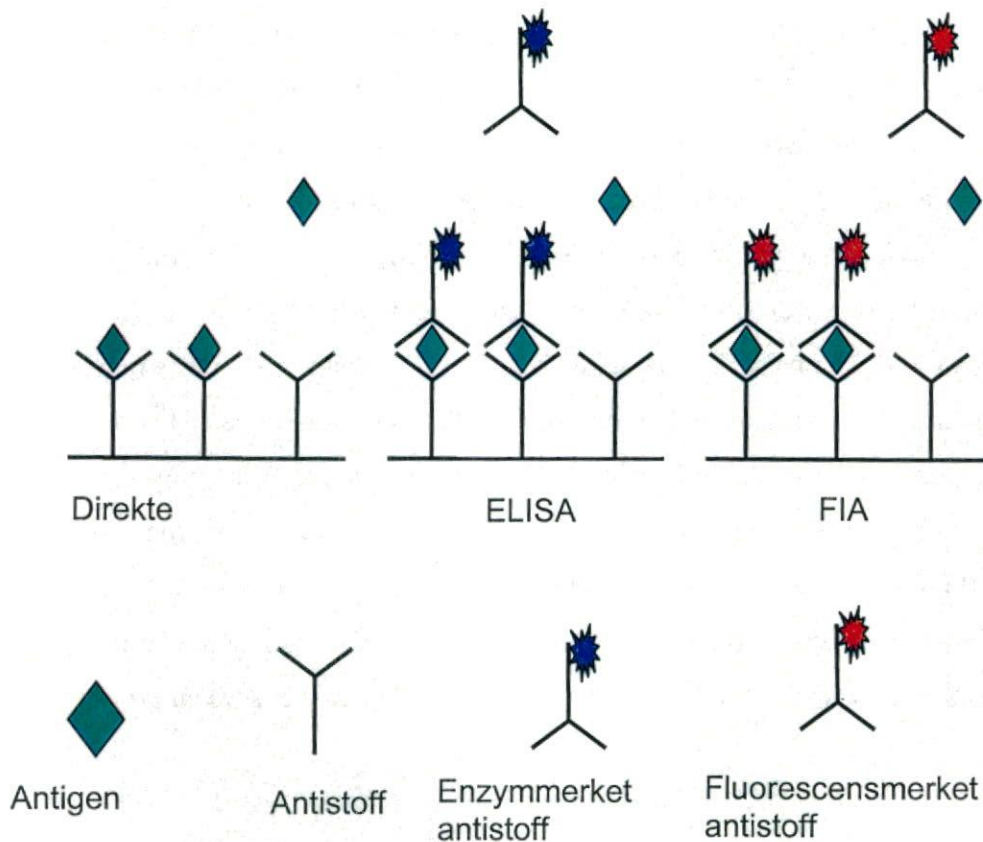
Figur 3.2 Likevektsreaksjon mellom antigen og antistoff

3.2 Antistoffbaserte biosensorer (immunsensorer)

Bindingen mellom antigen og antistoff kan utnyttes til analyse av ulike reaktanter i en prøve i forbindelse med forskning, medisinsk diagnostikk, miljøovervåkning og analyse av f eks drikkevann og mat. Teknikker som er hyppig benyttet er de såkalte enzymatiske immunanalysene (EIA; enzyme-immunoassay). Antigen eller antistoff er merket med et enzym for å synliggjøre en bestemt reaktant. Et slikt enzym kan f eks være peroxidase. Ved tilsettelse av substratet, H_2O_2 , utvikles en blåfarge. EIA-teknikkene inndeles bl a etter hvilken metode som anvendes til separasjon av immunkompleksene. I heterogen EIA, f eks Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) immobiliseres antistoff eller antigen på en fast overflate hvor videre reaksjoner foregår. ELISA-teknikken utføres ofte i en 96-brønners mikrotiterplate.

Potensielle biologiske stridsmidler kan analyseres ved ELISA-teknikk (12,13,14). I homogen EIA, f eks Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS) isoleres immunkompleksene fra løsningen ved filtrering. For å synliggjøre en reaktant er det også mulig å bruke et fluorescensmerket antistoff istedenfor enzymmerket. Denne teknikken kalles fluorimetrisk immunanalyse (FIA; fluoroimmunoassay) (6). Man skiller også mellom konkurrerende og ikke-konkurrerende EIA. Ved en typisk konkurrerende analyse kan antistoff være bundet til sensoroverflaten med merket antigen bundet til antistoffet (enzym eller fluorescens). Hvis prøven inneholder det spesifikke antigen vil umerket antigen konkurrere med merket antigen om binding til antistoffet, og mengden umerket antigen i prøven er proporsjonal med nedgangen i signal. Figur 3.3 viser tre eksempler på ikke-konkurrerende immunologiske reaksjoner, direkte analyse, som brukes i Surface Plasmon Resonans (SPR) sensorer, Resonant Mirror (RM) sensorer og akustiske sensorer, og ELISA- og FIA-teknikker. Ved direkte analyse synliggjøres reaktantene direkte ved deteksjon av en forandring i et elektrisk signal når antigenet bindes til antistoff. SPR, RM, LAPS, FIA og akustiske sensorer er nærmere beskrevet under. Tabell 3.1 (side 23) viser en oversikt over de ovenfor nevnte biosensortyper og deteksjonsgrense for potensielle biologiske våpen og toksin våpen.

I dette kapitlet gis eksempler på immunsensorer som kan benyttes for identifikasjon av potensielle biologiske våpen og toksin våpen. Optiske, akustiske og elektrokjemiske sensorer vil bli beskrevet. Sensorene som er beskrevet kan brukes til analyse av vannprøver, mat og biologiske/fysiologiske prøver. For analyse av aerosoler i luft må sensorene koples til en luftprøvetaker som samler inn og komprimerer store mengder luft ned til et lite væskevolum. De biologiske reaksjonene i en biosensor foregår i væskeløsning. Alle biosensorene som beskrives under må ha en datamaskin koplet til.



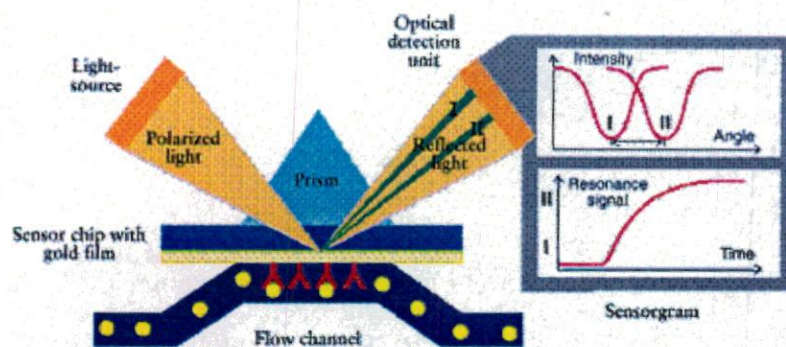
Figur 3.3 Tre eksempler på immunologiske reaksjoner

3.2.1 Optiske immunsensorer

3.2.1.1 Surface Plasmon Resonans (SPR)

Prinsippet bak denne typen biosensorer er beskrevet i mer detalj i litteraturen (6,15). Kort beskrevet: Polarisert lys blir totalt internt reflektert fra overflaten av en bølgeleder som er dekket med en tynn (~ 60 nm) metallfilm. Denne metallfilmen kan være av gull eller sølv. Ved en gitt innfallsvinkel vil det reflekterte lyset bli kraftig svekket. Dette skyldes at energien i lyset blir overført til overflateelektroner som genererer et intenst "evanescent" elektrisk felt. Den vinkelen hvor dette finner sted er avhengig av lysets bølgelengde samt brytningsindeksen til bølgelederen og det ytre mediet. Når ulike forbindelser binder seg til sensoroverflaten (metallfilmen) vil brytningsindeksen i det ytre mediet forandres. Det fører igjen til en forandring i innfallsvinkelen som gir totalrefleksjon og det intense elektriske feltet. Den resulterende vinkelforandringen er derfor proporsjonal med mengden stoff som er bundet på metallfilmen.

Figur 3.4 viser en skjematisk fremstilling av de fysiske reaksjonene som skjer. BIAcore-SPR er en kommersiell helautomatisk SPR-biosensor fra Pharmacia Biotech, Sverige (figur 3.5). Dette instrumentet kan brukes til analyse av toksiner, bakterier, virus, lipidvesikler og eukaryote celler. Prøvene tilsettes i en autosamplere. Løsningen blir ført over sensoroverflaten hvor komponenter i prøven fester seg til immobiliserte gjenkjenningmolekyler. Utviklingen har kommet lengst for de metodene der immobiliserte antistoff benyttes. I figur 3.3 er den biologiske reaksjonen som foregår på sensoroverflaten beskrevet. Antistoffene er ofte bundet til sensoroverflaten via dekstran som er en sukkerpolymer. Dette øker sensoroverflaten og dermed også sensitiviteten. Apparatet har 4 kanaler og 4 ulike komponenter kan analyseres samtidig. Instrumentet er sensitivt, reaksjonen foregår direkte uten tilsetning av andre reagenser og responstiden er kort (10-15 min). Instrumentet veier 10 kg og størrelsen er 19x31x36 cm. Texas Instrument, USA, har produsert en miniatyrgave av en SPR-biosensor som vi har anskaffet ved FFI. Denne sensoren er imidlertid ikke automatisert, og er mer som en prototype å regne.



Figur 3.4 Skjematisk fremstilling av de fysiske reaksjonene som skjer i en SPR-biosensor



Figur 3.5 En BIAcore-SPR biosensor

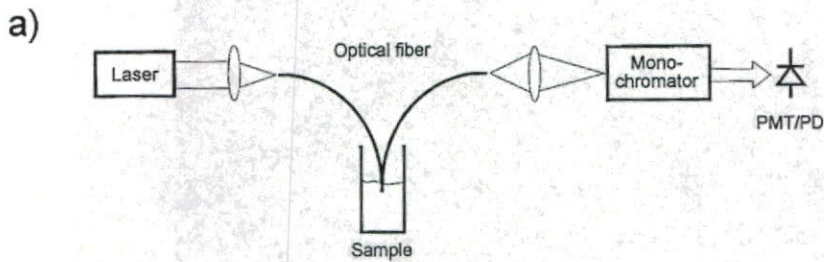
3.2.1.2 Resonant mirror (RM)

RM-biosensoren bygger på et lignende prinsipp som benyttes i SPR-sensorene. RM-sensoren har vist seg å være noe mer sensitiv enn SPR-sensoren. IAsys-biosensoren er en kommersiell RM-sensor fra firmaet Affinity. Prinsippet er nærmere beskrevet i Handbook of Biosensors and Bioelectronic noses (6,16). RM-sensoren har også bl a vært brukt til deteksjon av hele celler (17).

3.2.1.3 Fluorimetriske immunsensorer

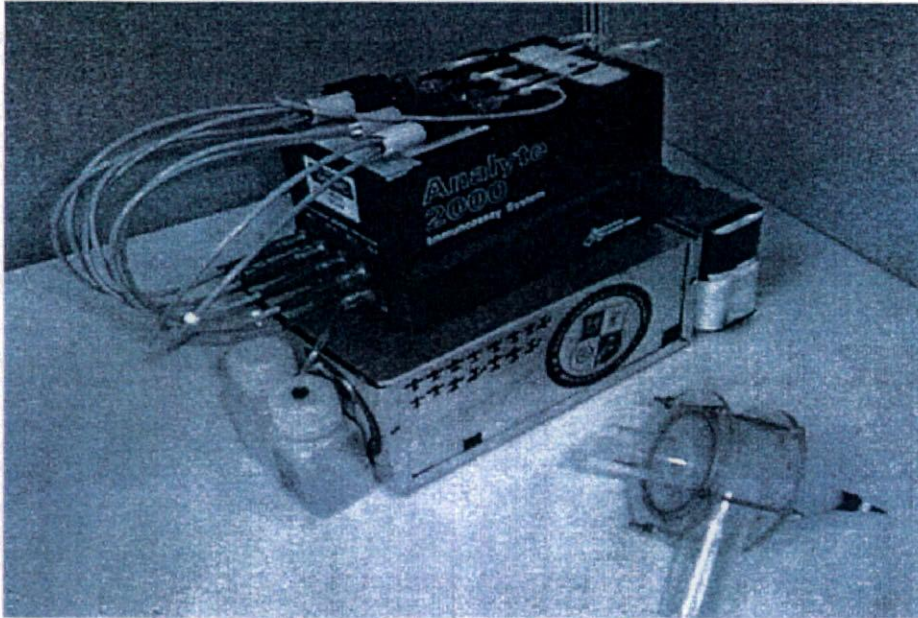
Fluorimetriske immunsensorer bruker fluorescensmerkede antistoff til synliggjøring av reaktanter i prøven (FIA – "Fluoroimmunoassay"). Slike teknikker kan brukes til påvisning av bakterier, virus, toksiner og andre molekyler. Som analysemetode er dette en svært sensitiv metode. Forskjellige fluorescerende prober er utviklet for biologiske og biokjemiske reaksjoner og klinisk bruk. Fluorescein som er en slik probe er mye brukt. Fluorescein absorberer lys ved 492 nm (eksitasjonsbølgelengde), og sender ut lys ved 520 nm (emisjonsbølgelengden). Andre fluorescerende prober har andre eksitasjons- og emisjonsbølgelengder. Biologiske molekyler gir en bakgrunnsfluoresens i området 350 til 600 nm, og vil dermed overlappe med emisjonspekteret til mange fluorescerende prober. Det vil derfor være en fordel å velge en probe med emisjonsbølgelengde lenger enn 600 nm. Nærmere beskrivelse av prinsippene for ulike fluorimetriske biosensorer finnes bl a i boken Handbook of Biosensors and Bioelectronic noses (6).

Fluorimetric Immunosensors

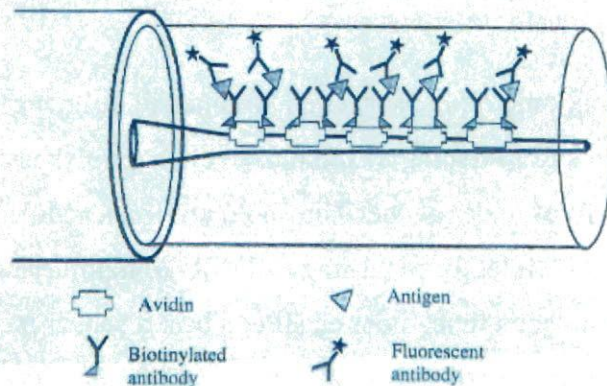


Figur 3.6 Skjematisk skisse av et fiberoptisk basert fluorimeter

En type fluorimetrisk biosensorer er fiberoptiske biosensorer. Figur 3.6 viser en skjematisk fremstilling av et fiberoptisk basert fluorimeter. Et eksempel på en slik biosensor er Analyte 2000, utviklet ved Naval Research Laboratory, Washington DC, USA. Analyte 2000 er et lite (20x10x5 cm) og bærbart (1 kg) analyseinstrument. I Analyte 2000 kan det utføres 4 analyser samtidig ved at 4 optiske prober kan operere samtidig (9) (figur 3.7). Antistoffer som gjenkjenner det aktuelle antigen er immobilisert i en kjegleformet optisk probe. I Analyte 2000 er biotinmerket antistoff bundet til sensoroverflaten gjennom proteinet avidin. Bindingen mellom avidin og biotin er ikke-kovalent, men likevel svært sterk. Hvert avidinmolekyl kan også binde opptil 4 biotinmolekyler, noe som øker sensitiviteten. Når sensoren eksponeres for en prøve bindes det spesifikke antigen, hvis det er tilstede i prøven, til antistoff på sensoroverflaten. Bundet antigen synliggjøres ved bruk av et fluorescensmerket antistoff, som også bindes spesifikt til det aktuelle antigen. Figur 3.8 viser en skjematisk fremstilling av en fiberoptisk probe og reaksjonene som skjer på sensoroverflaten. Den fiberoptiske proben består av en fiberbunt. Enkelte av fiberne i proben tilfører laserlys som eksiterer det fluorescerende antistoffet, mens omliggende fibre samler emisjonslyset som detekteres i en fotodetektor. Intensiteten av det emitterte lyset som registreres er proporsjonal med mengde antigen bundet til proben. Analyte 2000 er en såkalt "evanescent wave" sensor. Det innebærer bl a at sensitiviteten er høy pga lav bakgrunnsfluorescens. Analyte 2000 kan opereres automatisk og det er mulig å oppnå høy sensitivitet.



Figur 3.7 En Analyte 2000 sensor



Figur 3.8 Skjematisk skisse av en fiberoptisk probe i en immunsensor

3.2.2 Akustiske biosensorer

Ved hjelp av en piezoelektrisk kvartskrystall biosensor kan små mengder av biologiske eller kjemiske substanser påvises ved masse-akkumulering (Quartz Crystal Microbalance (QCM)). QCM-sensoren er nærmere beskrevet i litteraturen (6,18). En tynn kvartskrystall med en gulloverflate på hver side bestemmer resonansfrekvensen av en elektronisk oscillator. Tykkelsen av kvartskrystallen avgjør frekvensen som er viktig for sensitiviteten av sensoren. En liten mengde masse som festes på overflaten fører til en endring av resonansfrekvensen. I en immunsensor kan antistoff (eller antigen) være immobilisert på sensoroverflaten og binding av antigen (eller antistoff) forårsaker en masseforandring. En nedgang i resonansfrekvens korreleres til akkumulert masse. Slike immunsensorer kan bli brukt til

påvisning av virus, bakterier og toksiner og målingen foregår uten tilsetning av noen reagenser, dvs en direkte måling (real time). Opprinnelig ble slike akustiske sensorer brukt til måling av gasser. Det finnes flere kommersielt tilgjengelige QCM-sensorer. Slike sensorer kan være små av størrelse (35x20x10 cm) og lette (ca 2 kg) (18).

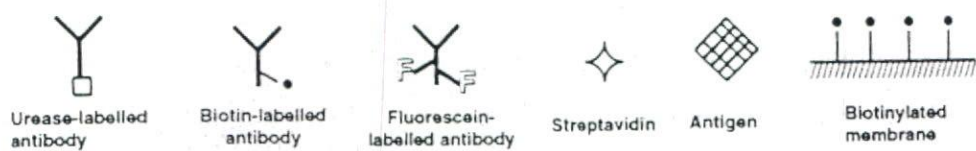
I tillegg kan de være automatisert. Biosensor Application, Sverige, har utviklet en biosensor for analyse av sprengstoff. I denne sensoren benyttes en såkalt kompetitiv reaksjon der antistoff er bundet til sensoroverflaten via en antigen-analog. Hvis prøven inneholder sprengstoff vil antistoffene frigjøres og en målbar frekvensøkning kan registreres. Siden antistoffene er omtrent 600 ganger tyngre enn et typisk sprengstoffmolekyl skal det være mulig å detektere så lite som 10 pg. Denne sensoren inneholder også en luftprøvetaker. En ulempe med QCM-immunsensorer er mangelen på reproduserbarhet når det gjelder immobilisering av antistoff på sensoroverflaten, men det er teknologi i utvikling som skal bedre dette. Antistoff bindes ofte til overflaten via binding til protein A eller G, proteiner som spesifikt bindes til antistoffmolekyler. Silanisering av overflaten eller binding av ulike polymerer blir også brukt.

3.2.3 Elektrokjemiske sensorer

LAPS (Light-Addressable Potentiometric Sensor) er en kommersielt tilgjengelig biosensor med høy sensitivitet som kan benyttes til påvisning av biologiske eller kjemiske komponenter i en prøve. LAP-sensoren markedsføres under navnet Threshold av firmaet Molecular Devices, USA. Sensoren ble opprinnelig utviklet for påvisning av DNA-kontaminering i genmodifiserte farmasøytiske produkter. Instrumentet inneholder en silicon basert sensor med pH sensitive områder. Threshold instrumentet er relativt stort (56x38x17 cm) og tungt (15 kg).

Prinsippene for LAP-biosensorer er nærmere beskrevet i litteraturen (6). En metode som kan benyttes i en LAP-biosensor er som følger: En blanding reagenser som inneholder fluoresceinmerket antistoff, biotinmerket antistoff og streptavidin blandes med den aktuelle prøven (antigen) som skal analyseres. Det dannes et konjugat av fluoresceinmerket og biotinmerket antistoff bundet til det aktuelle antigenet og streptavidin. Dette konjugatet filtreres gjennom en nitrocellulosemembran impregnert med biotin, og immunkomplekset som er dannet immobiliseres på overflaten av nitrocellulosemembranen ved binding av streptavidin til biotin. Et antifluorescein (antistoff som bindes til fluorescein molekylet) /urease konjugat filtreres også. Enzymet urease hydrolyserer urea som tilsettes i løsningen med dannelse av NH_3 og en pH forandring kan måles. pH forandringen som måles er proporsjonal med mengden antigen tilstede i prøven. En alternativ metode er å blande ureasemerket og biotinmerket antistoff med prøve og streptavidin. Dette filtreres gjennom en biotinmerket

nitrocellulosemembran og resten av reaksjonen foregår som beskrevet over med måling av pH forandringer. Figur 3.9 viser en skjematisk fremstilling av disse reaksjonene. Ved å bruke et fluoresceinmerket antistoff økes sensitiviteten da to ureasemerkede antistoff kan bindes per antigenmolekyl. I Threshold instrumentet analyseres kun en prøve om gangen, men mange prøver kan analyseres fortløpende i løpet av kort tid. Instrumentet er ikke automatisert og det kreves flere trinn for å håndtere prøvene under analysen.



Scheme A

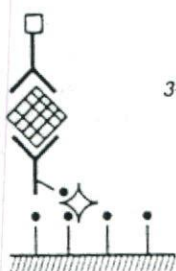
1- mix reagents, incubate



2- filter, wash

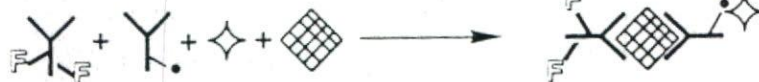


3- read

urea
NH₃

Scheme B

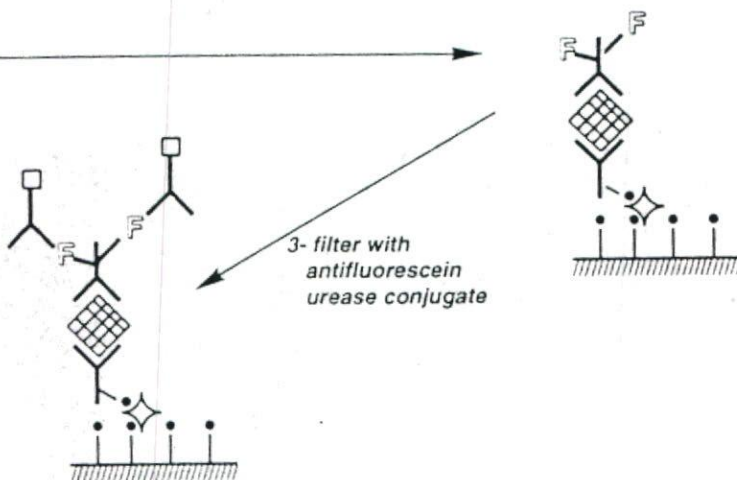
1- mix reagents, incubate



2- filter, wash



4- read

urea
NH₃3- filter with
antifluorescein
urease conjugate

Figur 3.9 Eksempler på immunanalyser i en LAP-sensor

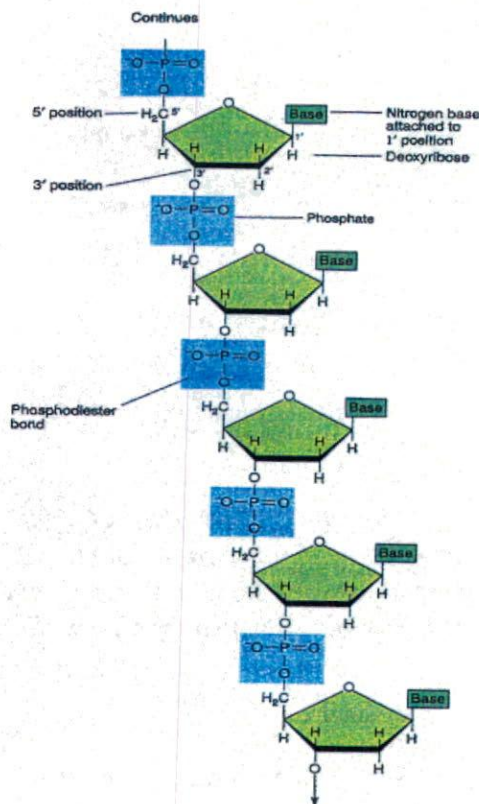
Bakterietype/toksin	Biosensor type	Deteksjonsgrense/tid	Referanse
Optiske biosensorer			
<i>Stahylococcus aureus</i>	RM	8x10 ⁶ celler/ml	17
<i>Vibrio cholerae</i>	SPR	1x10 ⁴ celler/ml	20
<i>Clostridium botulnium toksin B</i>	SPR	200 ng /ml	21
<i>Staphylococcal enterotoxin B (SEB)</i>	FIA	0,5 ng/ml	22
<i>Ricinus communis toksin (Ricin)</i>	FIA	0,1 ng/ml	23
<i>Yersinia pestis</i>	FIA	1 ng/ml	24
		5 ng/ml/15 min	25
		50 ng/ml/30 min	
<i>Clostridium botulinum toksin A</i>	FIA	5 ng/ml/1 min	26
<i>Bacillus anthracis (sporer)</i>	FIA	3x10 ³ celler/ml	27
Akustiske biosensorer			
<i>Escherichia coli</i>	QMC	1x10 ⁶ celler/ml	28
<i>Salmonella</i>	QCM	1x10 ⁶ celler/ml	39
<i>Staphylococcal enerotoxin B (SEB)</i>	QCM	100 ng/ml	30, 31
<i>Ricinus communis toksin (Ricin)</i>	QCM	500 ng/ml/60 min	32
<i>Vibrio cholerae</i>	QCM	1x10 ⁶ celler/ml/60 min	33
Elektrokjemiske biosensorer			
<i>Brucella melitensis</i>	LAPS	6x10 ³ celler/ml	19, 34
<i>Francisella tularensis</i>	LAPS	3x10 ³ celler/ml	35
Newcastle disease virus	LAPS	1,3 ng/ml/60 min	19
		10 ng/ml/15 min	
		400 ng/ml/1 min	
<i>Ricinus communis toksin (Ricin)</i>	LAPS	1 pg	36

Tabell 3.1 Oversikt over ulike biosensortyper der antistoff er benyttet som gjennkjenningsmolekyl. Deteksjonsgrense for utvalgte bakterier og toksiner er oppgitt. Deteksjonsgrense for de ulike organismene er målt i bufferløsning for å kunne sammenlignes. Ved måling i biologiske prøver eller miljøprøver kan verdiene endres noe

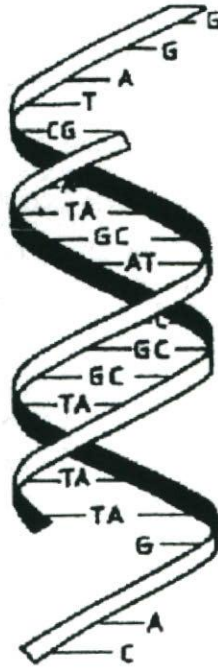
3.3 Bruk av deoksyribonukleinsyre (DNA) som gjennkjenningsmolekyl i biosensorer

Levende organismer inneholder deoksyribonukleinsyre (DNA) molekyler som arvemateriale bortsett fra noen virus som inneholder ribonukleinsyre (RNA) (figur 3.10). DNA-molekylet består av to komplementære kjeder som danner en dobbelheliks (10). Sekvensen av nukleotider i et gen bestemmer de unike egenskapene til genproduktet som er et protein i de fleste tilfeller. I prinsippet kan alle levende organismer identifiseres på bakgrunn av deres unike DNA-sekvens. En gen-probe er et segment av et DNA-molekyl som spesifikt

gjenkjenner og bindes (hybridiserer) til et bestemt DNA-molekyl (figur 3.11). Slike gen-prober kan f eks brukes til å avsløre mutasjoner som opptrer ved bestemte genetiske sykdommer. En annen viktig anvendelse er å detektere sykdomsfremkallende mikroorganismer i vann og matforsyninger, dyr, planter og fysiologiske prøver og i aerosolprøver fra luft. Bruk av gen-prober til identifikasjon forutsetter at DNA-sekvensen er helt eller delvis kjent, og en rekke mikroorganismer er allerede helt eller delvis sekvensert. Etter hvert som bioteknologi-revolusjonen skyter enda mer fart vil flere og flere planter, dyr og mikroorganismer bli genmodifisert. Utvikling av systemer der en bruker gen-prober for å overvåke disse vil bli nødvendig, f eks overvåking av pollenspredning fra genmodifiserte planter. Genmodifisering av potensielle biologiske våpen er også et problem en kan stå overfor i fremtiden. Utvikling av gen-prober til å identifisere slike organismer vil være avgjørende for mulighetene for vern mot slike organismer.



Figur 3.10 En nukleotidkjede i et DNA-molekyl



Figur 3.11 Hybridisering av en DNA-probe til et enkelttrådet DNA-molekyl

Så langt har bruk av gen-prober i biosensorer vært forholdsvis komplekst og tidkrevende. Gen-prober har vært forsøkt brukt i tradisjonelle biosensorer som SPR, LAPS og akustiske sensorer (6,37). Det er gjort flere forsøk på måling av DNA-hybridisering ved bruk av SPR (38). Oligonukleotidprober bestående av henholdsvis 17 eller 50 baser ble bundet til en sølv-dekket sensoroverflate i en konsentrasjon på ca 100 fmol/mm^2 (ca 1 ng). Etter 30 minutters hybridisering kunne en spesifikk sekvens detekteres, og 1 fmol/mm^2 (30 pg) kunne påvises. Senere er DNA-sekvenser detektert med følsomhet i femtegram området (320 fg) i løpet av 5 minutter (39).

Det er undersøkt om akustiske biosensorer kan brukes til deteksjon av DNA-hybridisering. Teknikken var noe tidkrevende og komplisert. For LAP-sensoren er det også utviklet en gen-probeanalyse. Denne analysen var også tidkrevende og kompleks å utføre. Analysen tok en time og deteksjonsgrensen var $1 \mu\text{mol}$ (40).

Bruk av gen-prober vil bli mer og mer aktuelt i systemer der det er en løsere kopling mellom biologisk reaksjon og signalsystem. *In vitro*-amplifikasjon av DNA (PCR) er en etablert teknikk som har vært i bruk de siste 15 årene (41). Gen-prober benyttes, og metoden gjør det mulig å raskt (2-3 timer) oppformere et gitt stykke DNA uten bruk av kloningsteknikker i mikroorganismer som kan ta flere dager.

Det følgende er en kort beskrivelse av PCR-metoden (se også figur 3.12).

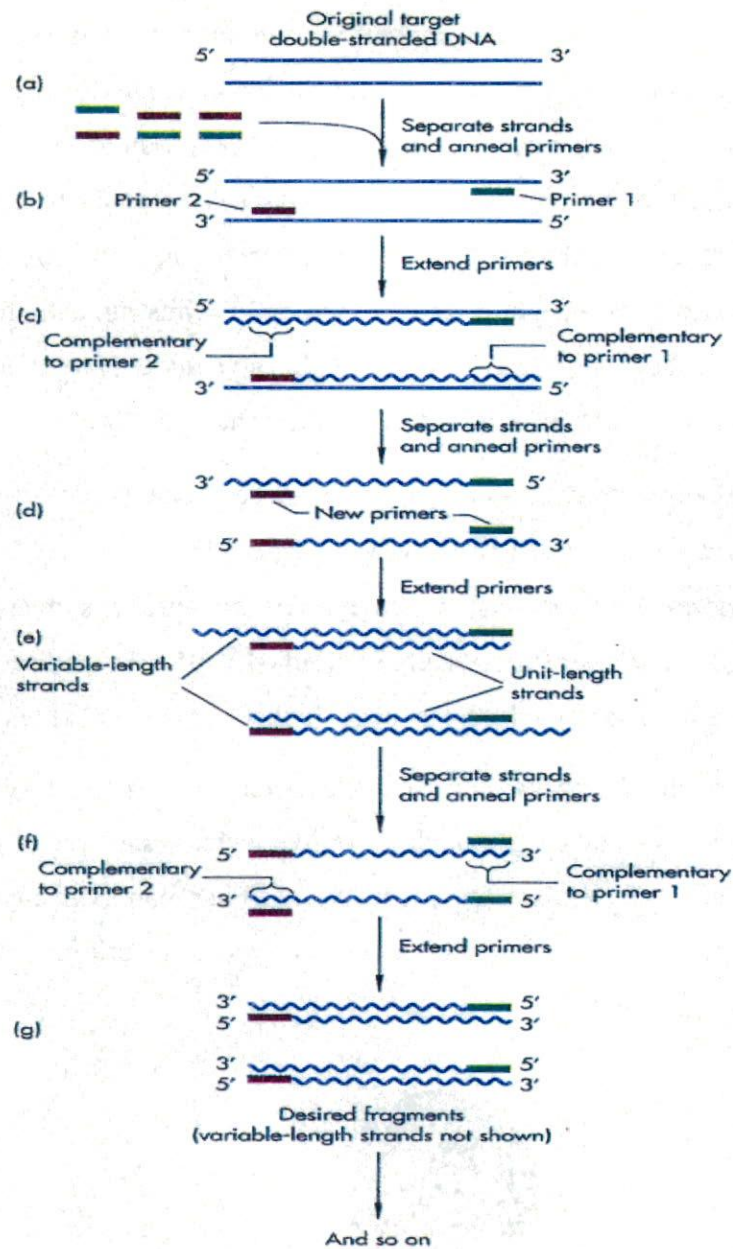
Som DNA-kilde (templat) er det i teorien nok med ett DNA-molekyl som inneholder den sekvensen man ønsker masseprodusert. En celle fra en person, en bakterie eller en viruspartikkel kan være utgangspunktet. Materialet kan godt inneholde andre DNA-molekyler i tillegg. Hvis PCR-reaksjonen er tilstrekkelig optimalisert skal ikke andre DNA-molekyler påvirke analysen (figur 3.11).

Man må kjenne sekvensen av ca 15-20 baser i hver ende av det DNA-fragmentet man skal oppformere. På grunnlag av det må det lages to syntetiske oligonukleotider som er komplementære til disse områdene. Disse oligonukleotidene fungerer som primere for DNA-syntese (startsekvenser). Det må brukes enkelttrådede primere, som er komplementære til motsatte DNA-tråder.

Reaksjonsblandingen i PCR må inneholde templat DNA, de to primerne, byggesteinene dATP, dGTP, dCTP og dTTP, og DNA-polymerase (enzym som katalyserer DNA-syntese).

Reaksjonen foregår i en buffer og med optimalisert konsentrasjon av magnesium-ioner, som er en essensiell faktor for DNA-polymerasen.

DNA-kilden (templat) denatureres ved å varme opp til 94°C. Man får da enkelttrådet DNA. Man avkjøler så til ca 50-60°C (annealing), hvor primerne binder seg til hver sin DNA-tråd som har komplementære områder. Man varmer så opp til 72°C, som er den optimale temperaturen for den DNA-polymerasen som benyttes (Taq DNA-polymerase). Det vil da foregå DNA-syntese med utgangspunkt i stedet hvor primerne er bundet, og det lages en ny komplementær tråd for hver av de to opprinnelige. En ny runde startes med oppvarming til 94°C, avkjøling og DNA-syntese. Denne syklusen kan gjentas mange ganger (30-40 ganger) med en dobling av antall DNA-molekyler for hver runde. Hvis man starter med et DNA-molekyl har man etter 30 runder (teoretisk) 268 millioner DNA-molekyler. Ved første syklus vil templatet ikke ha noe naturlig endepunkt, og polymeriseringen fortsetter i ubestemt lengde. Dette opprinnelige templatet vil være tilstede i alle sykluser, og gi et slikt langt produkt for hver runde. Når et produkt fra en PCR-runde brukes som templat i neste runde, vil DNA-syntesen stoppe der den skal. Ved endepunktet for PCR-reaksjonen vil størstedelen av PCR-produktene ha en veldefinert størrelse, nemlig den bestemt av avstanden mellom primerne.



Figur 3.12 Beskrivelse av PCR-metoden. Figuren er hentet fra FFI/Rapport -99/04992 (42)

En ulempe med PCR-teknikken frem til nå har vært at metoden har vært relativt tidkrevende og at det kreves tidkrevende prøveopparbeidelse. I tradisjonell PCR tar hver syklus ca 5 minutter slik at hele syntesen tar 2-3 timer. I tillegg kommer tiden det tar å analysere PCR-produktene. Til å analysere PCR-produktene brukes ofte gel-elektroforese teknikker. Det finnes eksempler i litteraturen der potensielle biologiske våpen er påvist ved bruk av tradisjonell PCR-teknikk.

Roche Molecular Biochemicals, Sveits, har nylig lansert en PCR-maskin (LightCycler™) der både syntese og analyse av produktene kan gjennomføres i løpet av ca 20 minutter (figur 3.12) (43). Dette instrumentet består av to ulike hovedkomponenter, en syntesedel og en fluorimeterdel til analyse av produktene. Kvantifisering av PCR-produktene er også mulig. Syntesedelen er optimalisert for å utføre hurtige PCR-analyser ved at reaksjonene foregår i kapillarrør med høy overflate- til volumratio, og kapillarrørene er plassert i en karusell i et kammer hvor varme tilføres direkte fra luft. Temperaturen i PCR-instrumentet forandres med 20°C per sec, og det fører til at hver syklus kan gjennomføres på under 30 sekunder. Både sekvensuavhengig og sekvensspesifikk deteksjon av produktene er mulig.

- Sekvensuavhengig fluorescens deteksjon med SYBR-Green I som bindes til dobbelttrådet DNA som syntetiseres i hver syklus (eksempel vist i figur 3.14).
- Sekvensspesifikk fluorescerende deteksjon med hybridiseringsprober som er tilkoblet egnede fluorescerende molekyler (fluorescein, LC Red 640/705). Hybridiseringsprobene hybridiserer til PCR-produktene i avkjølings-steget (annealing) i hver syklus.

I LightCycler™, som er et lite kompakt instrument som er enkelt å betjene, kan man direkte følge dannelsen av og kvantifisere PCR-produktene for hver syklus (såkalt real-time PCR) både ved å bruke SYBR-Green I og hybridiseringsprober. Ved FFI har man nylig anskaffet et slikt instrument. Dette instrumentet fungerer som en biosensor, og det kan utføres raske analyser med høy spesifisitet og sensitivitet.



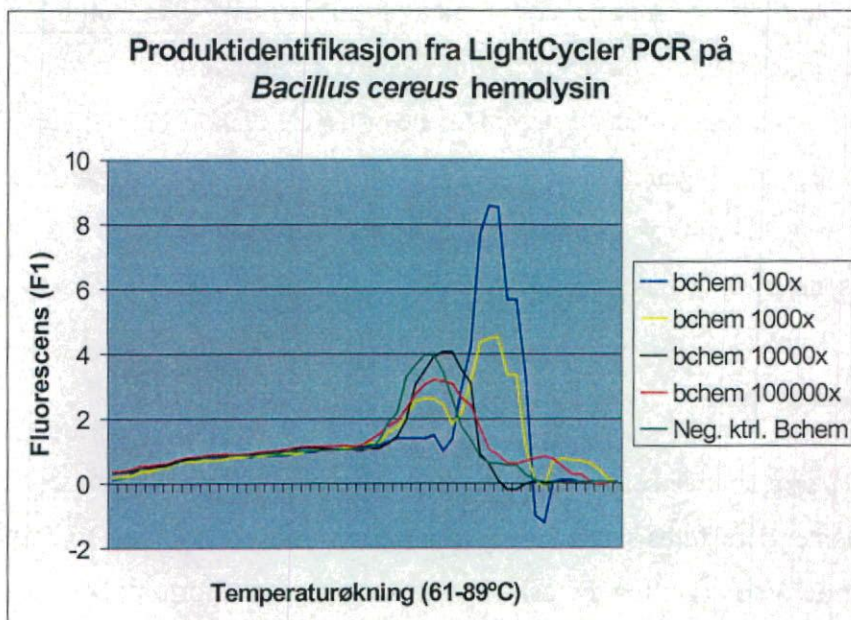
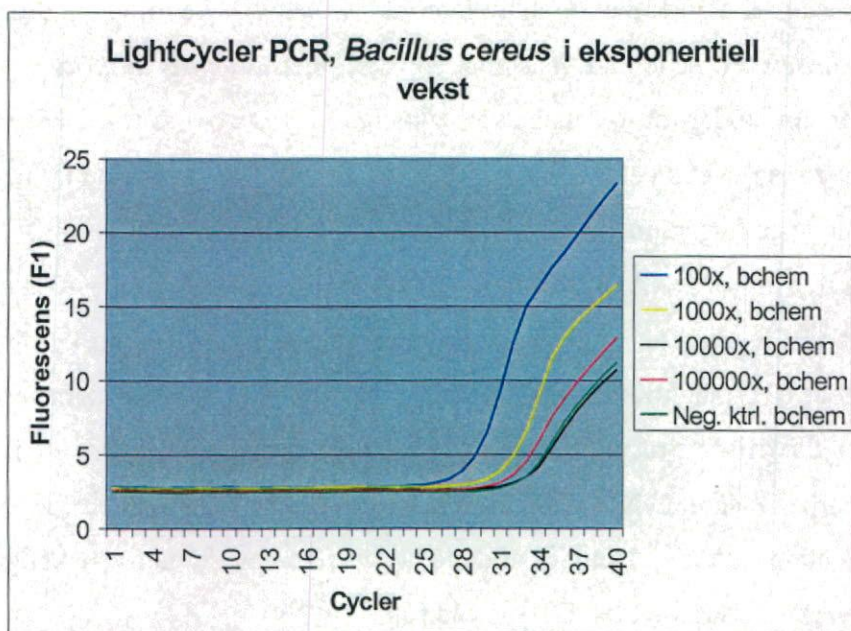
Figur 3.13 LightCycler™ PCR-instrument

Spesifisiteten av en PCR-reaksjon er hovedsakelig bestemt av sekvensen i primerne som brukes. I tillegg er eksperimentelle betingelser som "annealing" temperatur og konsentrasjon av ulike reagenser viktig. PCR-betingelsene må nøye optimaliseres for LightCycler™. Ved FFI har vi benyttet *Bacillus cereus* som modellorganisme for bl a optimalisering av PCR-betingelser. *Bacillus cereus* er en nær slektning av *Bacillus anthracis*. Genomet til *Bacillus cereus* og *Bacillus anthracis* er meget like (nesten identiske), men *Bacillus anthracis* inneholder to plasmider som koder for toksinene som gjør *Bacillus anthracis* toksisk og farlig (44,45). Figur 3.14 viser resultatet av en PCR-analyse av ulike fortyntinger av en kultur av *Bacillus cereus*. Den høyeste fortyntingen som kunne detekteres direkte, uten prøveopparbeidelse og rensing av DNA, inneholdt 20 bakterier (2×10^4 celler/ml). Kun en μl av hver prøve ble brukt ved PCR-analysene. PCR-produktene ble detektert ved å bruke SYBRGreen I som bindes til dobbeltrådet DNA. Bruk av hybridiseringsprober som spesifikt bindes til PCR-produktet verifiserer resultatene oppnådd med SYBR-Green I. Det ble ikke foretatt noen prøveopparbeidelse med isolering av DNA før analysen. *Bacillus cereus* er en gram-positiv sporedannende bakterie. Det gjør at dette bør være en av de mer vanskelige bakterier å få PCR-produkt fra direkte uten DNA-isolering.

Vi har også analysert potensielle stridsmidler ved bruk av LightCycler™. I tabell 3.2 vises det en oversikt over hvilke organismer vi har påvist. Optimale PCR-betingelser er kartlagt, men deteksjonsgrensene som er bestemt for disse organismene er usikre da konsentrasjonen av bakterier i den opprinnelige løsningen ikke er nøyaktig kjent. Prøvene var inaktivert ved gammastråling, og det er usikkert hvor stor andel av DNA-molekylene i de enkelte prøvene som var ødelagt. Konsentrasjon av bakterier i prøvene er anslått til $0.5 \times 10^6 - 10^7$ / ml. Vi har mottatt prøvene fra Dr Bruce Harper, US Army Dugway Proving Ground, USA. En μl av hver prøve ble brukt i PCR-analysene.

I LightCycler™ kan 32 prøver analyseres samtidig. Hele analysen tar ca 20 minutter. På den måten kan flere organismer detekteres samtidig selv om flere primerpar benyttes til deteksjon av hver enkelt organisme. Ved utvikling av raske og effektive metoder for prøveopparbeidelse er mulighetene tilstede for å kunne utvikle raske og spesifikke metoder for identifikasjon av flere mikroorganismer ved bruk av LightCycler™. *Bacillus cereus* ble påvist direkte uten isolering av DNA på forhånd (figur 3.14). Når det gjelder vann- og jordprøver er prøveopparbeidelse nødvendig da flere komponenter i prøvene vil hemme PCR-reaksjonen. I hvilken grad det er nødvendig å isolere DNA før PCR-analyse av luftprøver er ikke kjent. Ved luftprøvetaking kondenseres store mengder luft til et lite væskevolum (f eks 1000 l luft

kondenseres til en ml væske). Ved FFI er vi i gang med å utvikle raske og effektive metoder for prøveoparbeidelse ved bl a å bruke magnetiske kuler fra Dynal (46).



Figur 3.14 Påvisning av *Bacillus cereus* ved LightCyclerTM PCR-analyse. 1000x fortyning tilsvarer 20 bakterieceller (gul kurve). Det nederste diagrammet viser smeltepunktene for produktene som er dannet. Det er kun dannet PCR-produkt ved 100x (blå kurve) og 1000X fortyning av kulturen. De høyere fortyningene og negativ kontroll gav kun primer-dimerer med lavere smeltepunkt

Organisme	Primersett	Produktstørrelse	Deteksjonsgrense Antall organismer
<i>Bacillus anthracis</i>	Ba813-1/2	152 basepar (bp)	<10
<i>Bacillus anthracis</i>	Balef-1/2	993 bp	
<i>Bacillus anthracis</i>	Balef-1/2*	233 bp	
<i>Yersinia pestis</i>	Yppla	344 bp	700-1500
<i>Yersinia pestis</i>	Ypcaf	501	
<i>Coxiella burnetii</i>	CB-1\2	501 bp	< 10
<i>Coxiella burnetii</i>	CB-1\2	157 bp	
<i>Coxiella burnetii</i>	CB23SrRNA1/2	477 bp	
<i>Coxiella burnetii</i>	CB23SrRNA1/22	105 bp	
<i>Bacillus cereus</i>	Bcpc-1/2	569 bp	< 20
<i>Bacillus cereus</i>	Bcpc-1*/2	184 bp	
<i>Bacillus cereus</i>	Bchem-1/2	185 bp	

Tabell 3.2 *Analyse av potensielle biologiske våpen og andre organismer ved LightCycler™ PCR-analyse. Primersettene som er brukt gjenkjenner spesifikke gener. Primere som er merket * er primersett for samme gen, men de gir et kortere PCR-produkt. Ved bruk av LightCycler™-PCR kan ikke produktene være for lange. Effektiviteten av PCR-analysen er bedre for korte produkter. Analysen kan også gjøres raskere når korte PCR-produkter produseres*

3.4 Reseptorer og enzymer

Reseptorer og enzymer kan brukes som biologiske gjenkjenningmolekyler i biosensorer. Det er lite informasjon i litteraturen når det gjelder analyse av mikroorganismer og toksiner ved slike biosensorer. Av den grunn vil disse biosensorene kun bli kort beskrevet i denne rapporten.

Enzymer og reseptorer er proteiner som kan immobiliseres i et lipid-dobbeltlag på en sensoroverflate. Stabiliteten av proteinene bestemmer levetid av biosensorene. Både akustiske (QCM), optiske (SPR, RM, FIA) og elektrokjemiske (LAPS) biosensorer kan benyttes. Enzybaserte biosensorer kan være godt egnet for påvisning av organofosfater som nervegasser og pesticider da enzymene acetylkolinesterase og butyrylkolinesterase, som begge

hemmes av organofosfater, har blitt isolert og rensert og er kommersielt tilgjengelige (47,48). Slangegift-toksinet, α -bungarotoksin, har blitt påvist ved bruk av en enzymbasert LAP-biosensor. Deteksjonsgrensen var 1 pmol/ml og analysetiden var 20-30 minutter (49).

Reseptorer er ikke-katalytiske membranproteiner. De stikker ut av membranen både på den intracellulære og ekstracellulære delen av membranen. De kan være sansereseptorer (f eks lukt og smak) eller reseptorer som styrer metabolske, nevrologiske og biokjemiske reaksjonsveier. I cellene virker reseptorer i celle-celle kommunikasjon ved å reversibelt binde hormoner og signalstoffer frigjort fra en annen celle. Reseptorer er også bindingssted for en rekke farmaka og toksiner. De spesifikke bindingsegenskapene til reseptorer har blitt utnyttet i biosensorer. Binding av en reaktant til en immobilisert reseptor kan direkte måles ved å bruke en akustisk sensor til å detektere masseendring eller en kan bruke optiske sensorer til å måle forandringer i brytningsindeks i en tynn metallfilm.

Binding av en reaktant til en reseptor kan også måles indirekte ved å merke en av komponentene med et fluorescerende stoff eller et enzym. Det muliggjør at også kompetitive bindingsteknikker kan brukes. Et fluorescerende signal kan detekteres på overflaten av en fiberoptisk probe (FIA; nærmere beskrevet under avsnittet om immunsensorer). Et enzymatisk signal kan detekteres elektrokjemisk, f eks en LAP-sensor.

Forsøk på å bruke nevroreseptorer i biosensorer er stort sett begrenset til å bruke nikotin-acetylkolin-reseptorer (nAChR) som kan isoleres fra elektrisk organ i elektrisk fisk eller ål i relativt store mengder. Disse reseptorene kan brukes til å detektere slangegiftene α - og β -bungarotoksin (49). Grunnen til at andre reseptorer ikke er benyttet er at de finnes i forholdsvis små mengder i vevet og de blir ofte ustabile straks de isoleres fra sitt naturlige lipid-membranmiljø. Fremtidig utnyttelse av bioteknologi kan endre på dette ved at stabile genmodifiserte reseptorer kan fremstilles i store mengder.

Mange reseptorer er koblet til en ionekanal i membranen. Binding av en reaktant til reseptoren fører til en endring i strømmen av ioner over membranen som kan måles ved elektrofysiologiske metoder. Et fremtidig potensiale kan ligge i å utnytte dette i biosensorer (50).

3.5 Kunstige reseptorer

En viktig begrensning ved biosensorer er stabiliteten av de biologiske gjenkjenningsmolekylene. I en biosensor stilles det krav til lagringstemperatur, pH og

ionestyrke av løsninger. En mulig løsning for å lage en sensor som er uavhengig av fysiologiske faktorer er å produsere en syntetisk reseptor ved å lage en avstøpning av molekylet i et polymermateriale (molecular imprinting) (51). Avstøpninger laget av kryssbundet organiske silika-polymerer er fysisk stabile og slike sensorer har et stort potensiale når det gjelder å kunne påvise flere kjemiske og biologiske molekyler samtidig, f eks ulike peptid-toksiner. Slike sensorer kan også være egnet for påvisning av organofosfater, f eks nervegassen sarin.

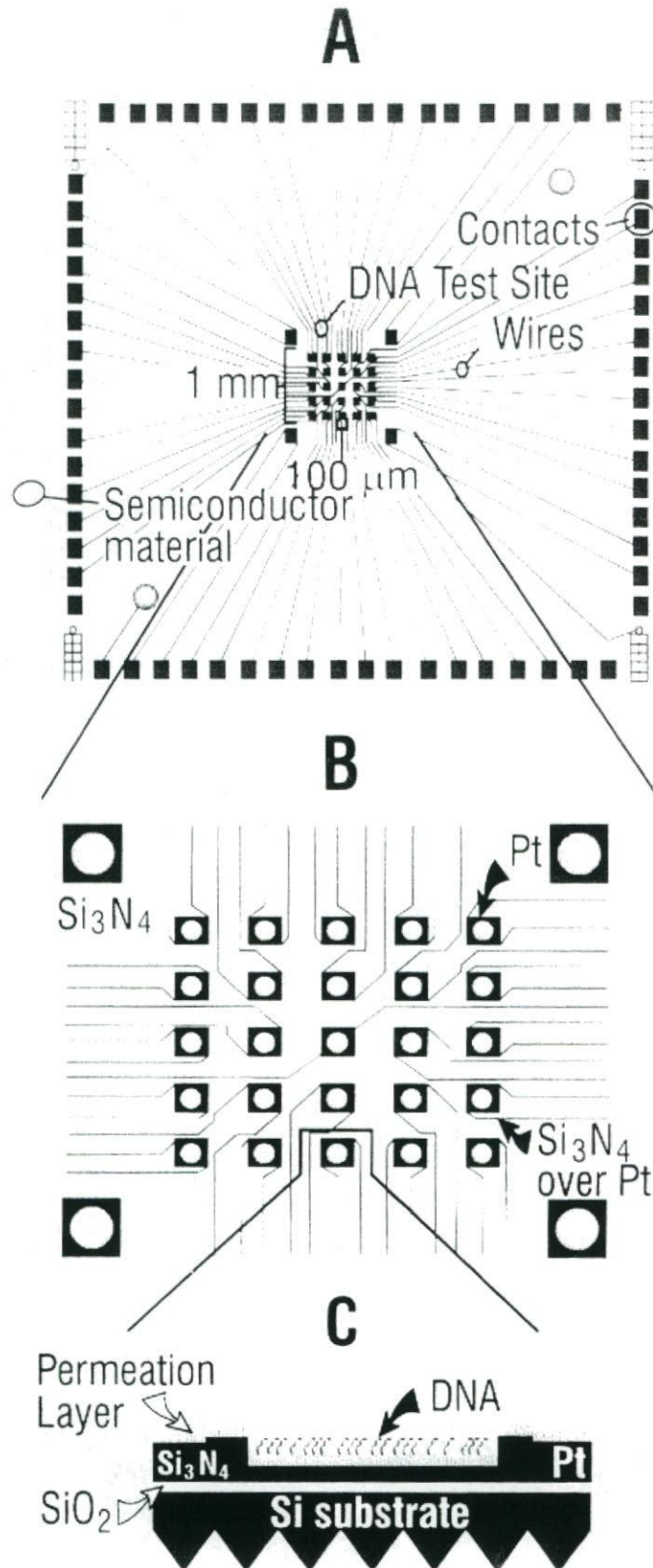
3.6 Mikrobrikketeknologi- laboratorium på 1cm^2

De fleste kjenner til mikrochipen - silisiumbrikken, som har revolusjonert dataverdenen (52). Miniaturiseringsprosessen i dataindustrien har skalert computeren ned fra en maskin som okkuperte flere rom, til notisbokformat. Nå har også silisiumbrikkene fått funksjon i den biologiske verdenen. De elektroniske kretsene i brikken koples mot biologiske reaksjoner, f eks påvisning av bakterier. Bruk av bioteknologi og mikroengineering kan komme til å revolusjonere biologiske analyser. Et hovedmål innen mikroengineering er å integrere mikroelektroniske kretser med mikromaskin strukturer, og på den måten produsere fullt integrerte systemer. Flesteparten av forskerne som har utviklet chip-teknologien hadde bakgrunn fra elektronisk og mekanisk engineering.

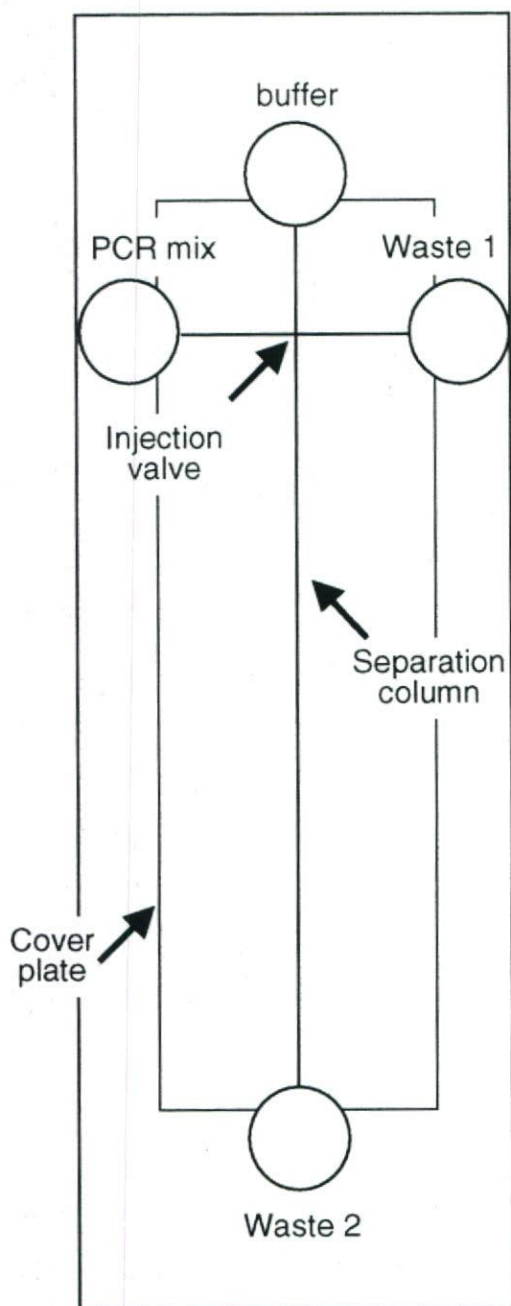
Applikasjoner av mikromaskinering mot kjemi og bioteknologi er et relativt nytt område. Silisiumbrikker (chip) med ulike analytiske funksjoner til bruk i basisforskning, rettsmedisin og diagnostikk er prøvd ut. Andre applikasjoner er avsløring av narkotikamisbruk, genetisk testing, separasjonsteknikker og påvisning av mikroorganismer. Mikrobrikkene har strukturer i mikrometerstørrelsen og reaksjonskammer for mikroliter og nanoliter volum. En enkel brikke er vanligvis $1\text{-}2\text{ cm}^2$. Ved å tilføre elektriske pulser til membranene vil en få ventiler eller porter som åpnes eller lukkes. Stadiet flere typer og varianter av brikker blir tatt i bruk. Figur 3.15 viser en skjematisk fremstilling av Nanogen, USA, sin DNA-brikke.

DNA-prober har vært et av hovedverktøyene innen DNA-teknologien så langt, men det er ofte et tidkrevende verktøy. Teknikker som gjør at en kan analysere tusenvis av DNA-sekvenser samtidig vil revolusjonere sensorteknologien. Det vil også utviklingen av små, raske mikrobiologiske tester som er enkle å utføre. Firmaet Nanogen, USA, har lansert en bioelektronisk brikke der bakterier blir oppkonsentrert vha elektriske felt, lysert vha pulsspenninger, og de karakteristiske DNA-bitene blir identifisert vha kunstige DNA-biter som binder seg til bakterie DNA'et. Det finnes også brikker som kombinerer prøveopparbeidelse,

analyse og deteksjonsreaksjoner. I en slik brikke kan f eks celler lyses, DNA amplifiseres (PCR) og fragmentene kan detekteres ved kapillærelektroforese. Figur 3.16 viser et skjema over en bioelektronisk brikke for lysing av celler, PCR-amplifisering og elektroforese. Figuren er hentet fra Waters et al., 1998 (53). Den bioelektroniske brikken til Nanogen er et eksempel på en førstegenerasjons bioelektronisk brikke. Det er i dag mulig å utføre en rekke PCR-amplifikasjoner og analyser samtidig ved bruk av bioelektroniske brikker (54). I et eksempel har mikroorganismer som *Bacillus subtilis*, MS2 virus og *Erwinia herbicola* blitt detektert samtidig ved å bruke en bioelektronisk brikke (microchip PCR array instrument) (55). Deteksjonstiden var kun 16 minutter, og deteksjonsgrensen for de ulike organismene var 1×10^2 - 10^4 celler/ml. Det finnes også mikrobrikker der antistoff benyttes til deteksjon (56,57). Mikrobrikke teknologi har et stort potensiale når det gjelder deteksjon av mikroorganismer i fremtiden. Det vil bli mulig å gjennomføre mange, raske og billige analyser samtidig. Det at man kan analysere en rekke ulike organismer samtidig er den største fordelen med mikrobrikke-teknologien. Det er også en stor fordel at prisen per analyse er lav.



Figur 3.15 Nanogen sin DNA-brikke. A) Skjematisk oversikt over prototype med 25 mikroelektroder. Dimensjonen er 1 cm². B) Elektrode array området. Det sentrale testområdet er 1x1 mm. C) Snitt gjennom en elektrode



Figur 3.16 Skjema over en biobrikke for lysing av celler, PCR-amplifisering og elektroforese. Figuren er hentet fra Waters et al 1998 (53)

4 DISKUSJON

Ulike biosensorer for identifikasjon av biologiske stridsmidler er beskrevet. Biosensorene er inndelt etter hvilken biologisk reaksjon som foregår på sensoroverflaten. Biosensorer er egnet til å identifisere biologiske stridsmidler som foreligger i en væskeløsning. Prøver av mat, vann,

fysiologiske prøver, miljøprøver og luftprøver komprimert til et lite væskevolum kan analyseres for deres innhold av biologiske stridsmidler. En biosensor inngår som et av flere instrumenter i et system for varsling av et angrep med biologiske våpen (se innledning). På tross av den store utviklingen en har sett innen bioteknologi og elektronikk de siste årene gjenstår det fremdeles mye forskning før en har et varslingssystem for biologiske våpen og toksiner som fungerer optimalt. Per i dag er det ingen biosensor som kan påvise alle aktuelle biologiske stridsmidler. Det stilles for øvrig en rekke krav til slikt utstyr for operativ bruk (se også side 10). En av utfordringene fremover er å utvikle nye, raskere og mer sensitive metoder for flere aktuelle organismer. Når det gjelder toksiner har man kommet enda kortere i utviklingen av metoder for identifikasjon. Proteintoksiner som botulinumtoksin og ricin kan identifiseres ved antistoff i immunsensorer. Immunologiske metoder som f eks ELISA kan benyttes til analyse av en rekke peptider. Automatiserte immunsensorer burde derfor også være godt egnet til analyse av peptidtoksiner. Det finnes likevel få eksempler fra litteraturen på identifikasjon av peptidtoksiner ved bruk av biosensorer. En av de begrensende faktorene for kommersialisering av biosensorer for peptider og toksiner har vært tilgjengeligheten av egnede biomolekyler som antistoffer, reseptorer og enzymer. Små molekyler gir ofte dårlig immunrespons ved injeksjon i dyr, og slike molekyler må kobles til større molekyler som i seg selv ikke gir noen immunrespons ved injeksjon. Fremtidig utnyttelse av reseptorer, ionekanaler og kunstige reseptorer (molecular imprinting) har et stort potensiale når det gjelder identifikasjon av ulike toksiner. Utnyttelse av bioteknologi og mikrobrikketeknologi kan i tillegg revolusjonere fremtidige analysemetoder for bl a toksiner ved at et stort antall toksiner kan påvises samtidig med kort responstid.

Når det gjelder identifikasjon av biologiske stridsmidler har man per i dag kommet lengst med utviklingen av immunsensorer. Spesifisitet og selektivitet av antistoffet som brukes er viktig, med det kan være vanskelig og arbeidskrevende å skaffe gode og spesifikke antistoff mot alle potensielle biologiske stridsmidler og toksiner. Det finnes flere kommersielt tilgjengelige immunsensorer, men tilgjengelighet av gode antistoff begrenser foreløpig utnyttelsen av sensorene. Fremtidig utvikling av bioteknologi vil kunne øke tilgjengeligheten. Som tidligere nevnt finnes det i dag ingen metoder for fjerndeteksjon av en aerosol av biologiske stridsmidler. Ved Naval Research Laboratory, USA, ble en fiberoptisk biosensor (Analyte 2000) integrert med en luftsamler og plassert på et modellfly. Systemet var istand til å samle bakterier fra en aerosol og identifisere denne bakterien og overføre resultatene til bakken (58). Det finnes en rekke eksempler fra litteraturen der fiberoptiske fluorescens-biosensorer er brukt til identifikasjon av potensielle biologiske stridsmidler og toksiner (tabell 3.1). Disse sensorene

er forholdsvis sensitive og det er oppnådd deteksjonsgrenser under 1 ng/ml for enkelte organismer. I Analyte 2000 er det mulig å analysere 4 ulike organismer samtidig.

Deteksjonsgrense og responstid varierer noe for de ulike mikroorganismene og toksinene beskrevet i tabellen. Optiske biosensorer som SPR og RM har et stort potensiale. BIAcore SPR sensoren er automatisert og 4 organismer kan analyseres samtidig. I litteraturen finnes det få eksempler på bruk der potensielle biologiske våpen er identifisert. Akustiske biosensorer påviser en biologisk substans ved å måle en masseforandring. Av tabell 3.1 ser en at akustiske biosensorer har en noe høyere deteksjonsgrense for enkelte organismer og toksiner.

Deteksjonstiden er også noe lengre. QCM-sensorene er ofte automatisert, men vanligvis kan kun en organisme analyseres om gangen. Elektrokjemiske sensorer (LAPS) kan være meget sensitive, men de er i liten grad automatisert og analysene er noe arbeidskrevende. De ulike immunsensorene som er beskrevet har forskjellige egenskaper. SPR, RM og de fiberoptiske sensorene er automatiserte, enkle å betjene og analysertiden er relativt rask. LAP-sensoren krever mer håndtering av prøvene, men kan være et verdifullt supplement pga høy sensitivitet.

Rask PCR-metodikk, f.eks. LightCycler™, er en teknologi som er i rask utvikling og vil etter hvert spille en vesentlig rolle. En PCR-basert biosensor vil være meget sensitiv. I teorien er ett molekyl tilstrekkelig for PCR-amplifikasjon. Det er viktig å optimalisere hver enkelt analyse for å unngå falske positive eller falske negative resultater. Valg av primere er viktig for sensitivitet og selektivitet. Det må velges primere som er helt spesifikke for den organismen man ønsker å påvise og primerne må samtidig kunne detektere alle stammer (varianter) av organismen. Det er også en fordel å bruke mer enn ett primersett per organisme. Selv om det allerede finnes en rekke publiserte arbeider for påvisning av potensielle biologiske stridsmidler vha PCR er det fremdeles mye forskning som må gjøres før man har pålitelige, reproducerbare, raske og sensitive metoder for de fleste potensielle biologiske våpen. Det er som oftest foretatt en tidkrevende prøveopparbeidelse før PCR. Ved FFI har vi vist at PCR-analyse kan gjøres direkte på fortynnede kulturer av bakterier. Bakterier i bufferløsninger kan også analyseres direkte. DNA i miljøprøver som inneholder jord må derimot renses før PCR. Humus i jord vil bli påvirket av PCR-analysen. Utvikling av raske og enkle metoder for DNA-isolering er derfor viktig. Om det er nødvendig å rense DNA fra luftprøver før PCR er ikke kjent. Ved FFI vil vi teste ut hvilke forurensninger som tolereres i en PCR-reaksjon og hvilke som må fjernes. Dette er viktig da høy reproducerbarhet og pålitelighet kreves ved identifikasjon av biologiske stridsmidler. Ved bruk av PCR-teknikk er det også mulig å skille ulike genetiske stammer av en art. Ulike genetiske stammer av en art kan finnes i forskjellige miljøer. For å avgjøre om en bakterie stammer fra et biologisk angrep kan det være viktig å bestemme hvilken genetisk

stamme som er påvist slik at en eventuell naturlig forekomst kan utelukkes. PCR-biosensorer vil etter hvert spille en vesentlig rolle ved identifikasjon av biologiske stridsmidler, og de vil være et verdifullt supplement til immunsensorene. Et typisk virus er ca $0,1 \mu\text{m}$ i diameter. En gjennomsnittlig bakterie er ca $10 \mu\text{m}$ i diameter. Virus inneholder mindre protein enn bakterier, og de kan være vanskeligere å detektere med en immunsensor. PCR-teknologi har derfor et stort fremtidig potensiale også når det gjelder påvisning av virus. Noen virus, som er potensielle biologiske våpen, inneholder RNA istedenfor DNA. Disse kan også påvises ved PCR-teknikk.

5 KONKLUSJON

Eksempler på biologisk krigføring finnes helt tilbake til Middelalderen. En historisk oversikt finnes i rapporten "Biological and toxin weapons: Research, development and use from the middle ages to 1945" utgitt av Stockholms Internasjonale Fredsforskningsinstitutt (SIPRI) (59). Hvorvidt biologiske våpen er brukt i internasjonale konflikter de siste 100 år er usikkert da det ikke foreligger sikre bevis for slik bruk. På tross av internasjonale konvensjoner er trusselen fra biologiske våpen og toksin våpen fremdeles reell. Det er flere årsaker til dette. Det finnes ennå ikke gode nok varslingsystemer for biologiske våpen. Flere NATO land satser store ressurser på forskning for å utvikle deteksjonssystemer (2). Forskning relatert til deteksjon av biologiske våpen er nå også under utvikling ved FFI. Beredskapslagre av antibiotika og vaksiner bør også bygges opp slik at man er så godt forberedt som mulig ved en eventuell hendelse.

Denne rapporten presenterer utvalgte biosensorer som kan brukes til identifikasjon av biologiske våpen. Når det gjelder spesifikk identifikasjon av mikroorganismer og toksiner er man kommet et stykke på vei med utvikling av immunsensorene og hurtig PCR-teknikk. Når DNA-sekvensen av flere og flere mikroorganismer blir kjent vil PCR-teknikken få stor betydning for identifikasjon av mikroorganismer. Teknologisk vil det komme instrumenter som er enda bedre og raskere enn LightCycler™. PCR-teknikken har også et stort potensiale i forbindelse med multiple analyser som utføres på små silisiumbrikker (mikrobrikketeknologi).

Litteratur

- (1) Paddle B M (1996): Biosensors for chemical and biological agents of defence interest, *Biosensors & Bioelectronics* **11**, 11, 1079-1113.
- (2) (1997): Detection and identification of biological warfare agents, Concept paper, Nato, Brussel, 23 juni 1997 (Ugradert).
- (3) (1995): FOA informerar om Biologiska vapen, Försvarets forskningsanstalt, Sverige, ISBN 91-7056-095-1.
- (4) Fykse E M (1997): Rapport fra møte i Nato Advanced Study Institute "New scientific and technological aspects of verification of the BTCW, Budapest 6-16 juli 1997, FFI/REISERAPPOR-98/01947, Forsvarets forskningsinstitutt (Ugradert).
- (5) Ivnitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E (1999): Biosensors for detection of pathogenic bacteria, *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 599-624.
- (6) (1997): Handbook of Biosensors and Electronic Noses. Medicine, food and the environment (Eds Erika Kress-Rogers), CRC Press.
- (7) Roe JN (1992): Biosensor development, *Pharmaceutical Research* **9**, 835-844.
- (8) Weetall H N (1996): Biosensor technology - What? Where? When? and Why?, *Biosensors & Bioelectronics* **11**, 1/2.
- (9) Golden J P, Saaski E W, Shriver-Lake L C, Anderson G P, Ligler F S (1997): Portable multichannel fiber optic biosensor for field detection, *Opt Eng* **36**, 4, 1008-1013.
- (10) (1994): Molecular biology of the Cell, (Eds Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D Watson), 3 ed. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- (11) Sadana A, Beelaram A M (1995): Antigen-antibody diffusion-limited binding kinetics of biosensors: a fractal analysis, *Biosensors & Bioelectronics* **10**, 301-316.
- (12) Dupont H, Therasse J, Pinon J M, Binder P (1990): Detection of staphylococcal enterotoxin B. A comparative study of ELISA and ELIFA systems, *J of Immunol Meth* **128**, 287-291.
- (13) Thiele D, Karo M, Krauss H (1992): Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella Burnetii* in clinical specimens, *Eur J Epidemiol* **8**, 4, 568-574.
- (14) Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Ueno Y (1999): A new type sandwich immunoassay for microcystin: Production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody, *Nat Toxins* **7**, 49-55.
- (15) Homola J, Sinclair S Y, Gauglitz G (1999): Surface plasmon resonance sensors: review, *Sensors and Actuators* **54**, 3-15.

- (16) Cush R, Cronin J M, Stewart W J (1993): The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions Part I: Principle of operation and associated instrumentation, *Biosensors & Bioelectronics* **8**, 347-353.
- (17) Watts H, Lowe C R (1994): Optical biosensor for monitoring microbial cells, *Anal Chem* **66**, 2465-2470.
- (18) O'Sullivan C K, Guilbault G G (1999): Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications, *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 663-670.
- (19) Lee W E, Thompson H G, Hall J G, Fulton R E, Wong J P (1993): Rapid immunofiltration assay of Newcastle disease virus using a silicon sensor, *J of Immunol Meth* **166**, 1234-131.
- (20) Choi K, Youn H J, Ha Y C, Kim K J, Choi J D (1998): Detection of cholera cells using surface plasmon resonance sensor, *The J of Microbiol* **36**, 1, 43-48.
- (21) Choi K, Seo W, Cha S, Choi J (1998): Evaluation of two types of biosensors for immunoassay of botulinum toxin, *Journ of Biochem and Molecul Biol* **31**, 1, 101-105.
- (22) Tempelman L A, King K D, Anderson G P, Ligler F S (1996): Quantitating staphylococcal enterotoxin B in diverse media using a portable fiber-optic biosensor, *Anal Biochem* **233**, 50-57.
- (23) Narang U, Anderson G P, Ligler F S, Burans J (1997): Fiber optic-based biosensor for ricin, *Biosensors & Bioelectronics* **12**, 9-10, 937-945.
- (24) Ogert R A, Burans J, O'Brien T, Ligler F S (1994): Comparative analysis of toxin detection in biological and environmental samples, *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* **2068**, 151-158.
- (25) Cao L K, Anderson G P, Ligler F S, Ezzell J (1995): Detection of *Yersinia pestis* fraction 1 antigen with a fiber optic biosensor, *J of Clinical Microbiol* **33**, 336-341.
- (26) Ogert R A, Brown J E, Singh B R, Shriver-Lake L, Ligler F S (1992): Detection of *Clostridium botulinum* toxin A using a fiber optic-based biosensor, *Anal Biochem* **205**, 306-312.
- (27) Berg D A, Williams J D, Reeves J, Reeves P J (1993): Proceedings of the 1993 ERDEC Scientific Conference on Chemical Defence Research, Report No. ERDEC-SP-024, 671-677.
- (28) Plomer M, Guilbault G G, Hock B (): Development of piezoelectric immunosensor for the detection of *Enterobacteria* , *Enzyme Microb Technol* **14**, 230-235.
- (29) Koenig B, Grazel M (1993b): Detection of viruses and bacteria with piezoelectric immunosensors, *Anal Lett* **26**, 8, 1567-1585.
- (30) Harteveld J L N, Nieuwenhuizen M S, Wils E R J (1997): Detection of Staphylococcal enterotoxin B employing a piezoelectrical crystal immunosensor, *Biosensors & Bioelectronics* **12**, 7, 661-667.

- (31) Hartevelde J L N (1998): Acoustic microsensors III. Direct detection of Staphylococcal Enterotoxin B employing a piezoelectric crystal immunosensor with a flexible carboxylated dextran matrix as the biochemical interface. *TNO report PML 1997-A58*.
- (32) Carter R M, Jacobs M B, Lubrano G J, Guilbault G G (1995): Piezoelectric detection of ricin and affinity-purified goat antiricin antibody, *Anal Lett* **28**, 8, 1379-1386.
- (33) Carter R M, Mekalanos J J, Jacobs M B, Lubrano G J, Guilbault G G (1995): Quartz crystal microbalance detection of *Vibrio cholerae* O139 serotype, *J of Immunol Meth* **187**, 121-125.
- (34) Lee W E, Jacobson T V, Thompson H G (1993a): Characteristics of the biochemical detector sensor, *Def Res Est Suffield, Canada. Suffield Memorandum* **1402**, 1-23.
- (35) Thompson H G, Lee W E (1992): Rapid immunofiltration assay of *Francisella tularensis*, *Def Res Est Suffield, Canada. Suffield Memorandum* **1376**, 1-17.
- (36) Dill K, Blomdahl J A, Lydon S R, Olson J D (1994): Improvements in Threshold™ immunoassay technology In: *Proc 1993 ERDEC Scientific Conference on Chemical Defence Research* (Eds Berg D A, Williams J D Jr, Reeves P J), ERDEC-SP-024, 45-50.
- (37) Downs M E A (1991): Prospects for nucleic acid biosensors, *Biochem Soc Transactions* **19**, 39-43.
- (38) Graham C R, Leslie D, Squirrell D J (1992): Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor, *Biosensors & Bioelectronics* **7**, 487-493.
- (39) Schwarz T, Yeung D, Hawkins E, Heaney P, McDougall A (1991): Detection of nucleic acid hybridisation using surface plasmon resonance, *Trends Biotechnol* **9**, 339-340.
- (40) Olson J D, Panfili P R, Zuk R F, Sheldon E L (1991): Quantitation of DNA hybridisation in a silicon sensor-based system: application to PCR, *Mol Cell Probes* **5**, 351-
- (41) (1992): Principles and applications for DNA amplification In: *PCR Technology* (Eds Erlich H A), W H Freeman and Company, New York, USA.
- (42) Olsen J S, Fykse E M, Skogan G (1999): Genetic identification of potential biological warfare agents by the polymerase chain reaction (PCR), FFI/RAPPORT-99/04992, Forsvarets forskningsinstitutt (Ugradert).
- (43) (1998): Light Cycler. Roche Molecular Biochemicals Biochemica 3.
- (44) Kaneko T, Nozaki R, Aizawa K (1978): Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, *Microbiol Immunol* **22**, 639-641.
- (45) Turnbull P C B, Hutson R A, Ward M L, Jones M N, Quinn C P, Finnie N J, Duggleby C J, Krammer J M, Melling J (1992): *Bacillus anthracis* but not always anthrax, *J Appl Bacteriol* **72**, 21-28.
- (46) Rudi K, Kroken M, Dahlberg O J, Deggerdal A, Jakobsen K S, Larsen F (1997): Rapid,

- universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads, *BioTechniques* **22**, 506-511.
- (47) Valdes J J, Wall J G Jr, Chambers J J, Eldefrawi M E (1988): A receptor-based capacitive biosensor, *John Hopkins APL Technical Digest* **9**, 1-4.
- (48) Eldefrawi M E, Sherby S M, Andreou A G, Mansour N A, Annau Z, Blum N A, Valdes J J (1988): Acetylcholine receptor-based biosensor, *Anal Lett* **21**, 9, 1665-1680.
- (49) Rogers K R, Fernando J C, Thompson R G, Valdes J J, Eldefrawi M E (1992): Detection of nicotinic receptor ligands with a light addressable potentiometric sensor, *Anal Biochem* **202**, 111-116.
- (50) Cornell B A, Braach-Maksvytis V L B, King L G, Osman P DJ, Raguse B, Wieczorek L, Pace R J (1997): A biosensor that uses ion-channel switches, *Nature* **387**, 580.
- (51) Mosbach K, Ramström O (1996): The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Biotechnology* **14**, 163-
- (52) Nogva H K (1998): Biochips- revolusjon i liten målestokk, *NBS-nytt*, **4**, 16-19.
- (53) Waters L C, Jacobson S C, Kroutchinina, Khandurina J, Foote R S, Ramsey J M (1998): Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification and electrophoretic sizing, *Anal Chem* **70**, 158-162.
- (54) Rowe C A, Tender L M, Feldstein M J, Golden J P, Scruggs S B, MacCraith B D, Cras J J, Ligler F S (1999): Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral and protein analytes, *Anal Chem* **71**, 3846-3852.
- (55) Belgrader P, Benett W, Hadley D, Long G, Mariella R Jr, Milanovich F, Nasarabadi S, Nelson W, Richards J, Stratton P (1998): Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument, *Clin Chem* **44**, 10, 2191-2194.
- (56) Wadkinst R M, Golden J P, Pritsiolas L M, Ligler F S (1998): Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor, *Biosensors & Bioelectronics* **13**, 3-4, 407-415.
- (57) Rowe C A, Scruggs S B, Feldstein M J, Golden J P, Ligler F S (1999): An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes, *Anal Chem* **71**, 433-439.
- (58) Ligler F S, Anderson G P, Davidson P T, Foch R J, Ives J T, King K D, Page G, Stenger D A, Whelan J P (1998): Remote sensing using an airborne biosensor, *Environ Sci Techol* **32**, 2461-2466.
- (59) (1999): Biological and toxin weapons: Research, development and use from the middle ages to 1945 (Eds Erhard Geissler and John Ellis van Courtland Moon), SIPRI, Sverige.