

طراحی بیوسنسور آنزیمی ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز مبتنی بر الکتروود نواری (Screen Printed) اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی

زهرا میرزایی‌زاده^۱، ارغوان گلبازحق^۱، فهیمه خورسند^۱، کبری امیدفر^{۱*}

چکیده

مقدمه: تشخیص دقیق ۳- هیدروکسی بوتیرات در نمونه‌های بیولوژی برای مدیریت بیماری‌های دیابتی مهم می‌باشد. **روش‌ها:** در این مطالعه بیوسنسور آنزیمی ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز مبتنی بر الکتروود نواری (Screen Printed) تغییر یافته با نانولوله‌های کربنی تک دیواره برای تعیین غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات (HB) در سرم، طراحی گردید. آنزیم ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز به طور فیزیکی بر روی نانولوله‌های کربنی تک دیواره (SWCNT) در سطح الکتروودهای نواری تثبیت شد.

یافته‌ها: اندازه‌گیری الکتروشیمیایی ۳- هیدروکسی بوتیرات مبتنی بر سنجش ولتامتری چرخه‌ای (CV) بوده و سیگنال تولید شده توسط یکی از محصولات واکنش آنزیمی به نام بتا نیکوتین آمید دی نوکلئوتید (NADH) اندازه‌گیری گردید. کاربرد نانولوله‌های کربنی تک دیواره (SWCNT)، کاهش پتانسیل اکسیداسیون NADH به حدود ۰/۰۵- ولت است. اندازه‌گیری الکتروشیمیایی نشان داد که این بیوسنسور قادر است طیف خطی ۲-۱/۰ میلی مولار را شناسایی کرده و دقت اندازه‌گیری آن ۰/۰۰۹ میلی مولار می‌باشد. اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی با دیگر ترکیبات مداخله‌گر، ویژگی و اختصاصیت این بیوسنسور را تأیید کرد. همچنین در بررسی پایداری درازمدت، این بیوسنسور بازده قابل قبولی تا حدود ۱۰۰ روز را نشان داد.

نتیجه‌گیری: بیوسنسور طراحی شده دارای پتانسیل پایین اکسیداسیون NADH، حساسیت بالا، پایداری بالا و محدوده خطی مناسب بوده و سهولت طراحی این بیوسنسور، آن را الگوی خوبی برای طراحی سایر بیوسنسورهای مبتنی بر دهیدروژناز قرار می‌دهد.

واژگان کلیدی: بیوسنسور، ۳- هیدروکسی بوتیرات، نانولوله‌های کربنی تک دیواره، NADH

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۳۷-۸

نمبر: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۲/۱۹

تاریخ درخواست اصلاح: ۹۰/۱۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۵

مقدمه

غلظت هیدروکسی بوتیرات (HB) می‌تواند توسط تشخیص NADH تولید شده در واکنش آنزیمی انجام شود. تشخیص غیر مستقیم NADH با استفاده از واسطه‌های انتقال الکترونی همچون یون‌های فری سیانید و ترکیبات کوینوئیدی در بعضی بیوسنسورهای آمپرومتریک که مقدار غلظت هیدروکسی بوتیرات (HB) را تعیین می‌کند مورد بررسی قرار گرفته است [۷-۸]. این بیوسنسورها در اثر مهار واسطه‌های الکترونی و همچنین دخالت مواد الکترو فعال، فعالیت آنزیمی خود را از دست می‌دهند. همچنین سیستم‌های دو آنزیمی، بر اساس تثبیت همزمان هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز با سالیسیلات هیدروکسیلاز (SHL) روی الکتروود کلارک مورد بررسی قرار گرفته است [۱]. سالیسیلات هیدروکسیلاز (SHL) برای تولید دوباره کوفاکتور NAD^+ از NADH استفاده می‌شود. در هر حال، این روش پیچیدگی و هزینه سیستم را افزایش داده و ممکن است مشکل از دست دادن حساسیت در طول زمان را داشته باشد. همچنین تشخیص مستقیم NADH در بیوسنسور هیدروکسی بوتیرات (HB) توسط Fang و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت که مدل اصلی سنسور تغییر یافته ایریدیوم بود که توسط چاپ فیلم ضخیم آماده شده بود. گرچه استفاده از این تکنیک به آزمایشگاه‌هایی با ابزار و دستگاه‌های پیشرفته محدود می‌باشد [۹].

در این مطالعه، روش ساده‌ای برای ساخت بیوسنسور هیدروکسی بوتیرات (HB) با استفاده از نانولوله‌های کربنی تک دیواره ارائه گردیده است. استفاده از نانولوله‌های کربنی، پتانسیل اکسیداسیون NADH را به -0.05 ولت کاهش می‌دهد که این حالت برای تشخیص الکتروشیمیایی خیلی مناسب است.

نانو مواد به علت ظرفیت‌شان در افزایش ثبات و افزایش حساسیت همراه با پیشرفت راندمان در طراحی بیوسنسورها [۱۰] و انواع مختلف روش‌های تشخیصی ایمونولوژیک [۱۱-۱۴] استفاده شده‌اند. در این میان، نانو لوله‌های کربنی (CNT) به علت واکنش شیمیایی و پایداری بالا و مقاومت مکانیکی مناسب انتخاب خوبی برای تثبیت آنزیم در سطح سنسورهای الکتروشیمیایی هستند. جذب

اجسام کتون‌ی همچون ۳- هیدروکسی بوتیرات (HB) و استو استات به طور غیر عادی در خون بیماران دیابتی با کتواسیدوز دیابتی (DKA) انباشته می‌گردند. کتواسیدوز دیابتی به عنوان نشانه تهدید کننده حیات همراه با دیابت، اغلب در بیماران دیابتی نوع ۱ اتفاق می‌افتد، گرچه می‌تواند در بیماران دیابتی نوع ۲ هم مشاهده شود. هیدروکسی بوتیرات (HB)، ترکیب کتون‌ی اصلی تولید شده در بیماران با کتواسیدوز دیابتی است و مقدار آن نسبت به اجسام کتون‌ی دیگر ۱۰ به ۱ است. مقادیر کمتر از یک میلی‌مولار هیدروکسی بوتیرات به طور نرمال در خون افراد سالم تشخیص داده شده در حالی که سطوح هیدروکسی بوتیرات در محدوده ۱-۳ میلی‌مولار می‌تواند در بیماران با هایپرکتونمیا و تحت کتواسیدوز دیابتی مشاهده شود. غلظت هیدروکسی بوتیرات می‌تواند بالای مقدار عددی ۳ هم برود و به ۱۲ میلی‌مولار نیز برسد [۱-۳]. بنابراین، تعیین سطوح هیدروکسی بوتیرات در نمونه‌های بیولوژی برای تشخیص زود هنگام دیابت و کتونمیا ارزشمند است. غلظت هیدروکسی بوتیرات (HB) معمولاً توسط روش‌هایی همچون کروماتوگرافی، سنجش‌های ایزوتوپیک و اسپکتروفوتومتریک سنجیده می‌شود [۴-۶]. به هر حال، این روش‌ها اغلب وقت‌گیر هستند و مراحل پردازش چندگانه دارند. همچنین به تجهیزات و معرف‌های خاص و تعداد زیاد کارکنان حرفه‌ای نیاز دارند. سرعت رو به رشد نیاز به تست‌های تشخیص بالینی در این روزها مستلزم توسعه تکنیک‌های دیگر است. حساسیت و اختصاصیت بالا، هزینه کم و سهولت در استفاده و تفسیر، سبب شده است که امروزه بیوسنسورها، ابزاری مفید و ایده‌آل جهت اندازه‌گیری آنالیت‌ها باشند. تا به حال، چندین بیوسنسور برای تشخیص هیدروکسی بوتیرات (HB) در نمونه‌ها طراحی شده و اساس همه آنها تشخیص آنزیمی ۳- هیدروکسی بوتیرات است که این ماده توسط ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز به استو استات اکسید می‌شود و همزمان کوفاکتور این آنزیم یعنی نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD^+) به شکل احیا شده آن ($NADH$) تبدیل می‌شود. بنابراین، تشخیص الکتروشیمیایی

نانو لوله‌های کربنی تک دیواره عامل دار

۵ میلی‌گرم از نانو لوله‌های کربنی تک دیواره با ۱۰ ml از ۰.۶۵٪ HNO_3 مخلوط شده و به مدت ۵ ساعت در 4°C ، سونیکیت شد. نانو لوله‌های کربنی تک دیواره سونیکیت شده در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و مکرراً با آب مقطر و بافر پتاسیم (pHV) شستشو شد. این شستشو تا زمانی ادامه دارد که pH بافر نانو لوله‌های کربنی تک دیواره در ۷ ثابت بماند.

آماده سازی بیوسنسور ۳ - هیدروکسی بوتیرات

۴ μl از محلول نانو لوله‌های کربنی تک دیواره در DMF (۲ mg/ml)، روی سطح الکتروود کار SPCE چکانده شد. بعد از خشک شدن، ۱U (بافر) از ۳ - هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز روی الکتروود اصلاح شده SWCNT ریخته و در 4°C قرار داده شد تا خشک شود و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید.

اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی

الکتروود اصلاح شده را در سیل الکتروشیمیایی قرار داده شد و ۵۰ μl از محلول استاندارد به گونه‌ای روی آن ریخته شد که تمام منطقه ۳ الکتروود را برای مطالعات الکتروشیمیایی بپوشاند. پاسخ زمینه در حضور بافر فسفات 0/1 مولار با pH ۷/۵ ثبت شد. محدوده پتانسیل ۱ تا -۱ ولت و سرعت خوانش ۵۰ mV/s برای اندازه‌گیری‌های ولتامتری چرخه‌ای (CV) استفاده شد. ولتامتری چرخه‌ای در حضور محلول ۴ میلی‌مولار NAD^+ انجام شد. همه اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی در دمای اتاق انجام شد.

پایداری

برای آزمایش ثبات پایداری الکتروودها طبق پروتکل امیدفر و همکاران عمل شد [۱۷]. پایداری بیوسنسورها برای نگهداری طولانی مدت مورد آزمایش قرار گرفت (با استفاده از یک غلظت هیدروکسی بوتیرات توسط ولتامتری چرخه‌ای) که در قسمت اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی شرح داده شده است. بعد از هر آزمایش بیوسنسور با بافر

فیزیکی و پیوند کووالانسی با نانو لوله‌های کربنی، از رایج‌ترین روش‌ها برای تثبیت آنزیم‌ها در سطح این نانو مواد است [۱۵،۱۶].

در این مطالعه، نانو لوله‌های کربنی تک دیواره عامل‌دار، برای تغییر سطح الکتروود نواری کربن (SPCE) یکبار مصرف مورد استفاده قرار گرفت و ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز به طور فیزیکی جذب الکتروود تغییر یافته شد. بیوسنسور پایداری و فعالیت الکترو کاتالیتیکی خوبی در طی آزمایش از خود نشان داد.

روش‌ها

مواد شیمیایی

نانو لوله‌های کربنی تک دیواره (SWCNT) با قطر ۱-۲ نانومتر از Netrino خریداری شد. ۳- هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز (۴۰۰ U/mg)، NAD^+ ، ۳- هیدروکسی بوتیرات از سیگما و بقیه مواد که در این مطالعه استفاده شده‌اند از شرکت‌های تجاری معتبر خریداری شده‌اند.

ابزار

اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی توسط دستگاه پتانشیواستات (DropSens μ 400) متصل به کامپیوتر انجام شد. الکتروودهای نواری که برای ساخت بیوسنسور استفاده شده است از DropSens خریداری گردید و شامل الکتروود کار گرافیتی گرد با قطر ۳۰ میلی‌متر، الکتروود مرجع Ag/AgCl و الکتروود کمکی گرافیتی است. مطالعات الکتروشیمیایی با استفاده از سیل الکتروشیمیایی از جنس تفلون با قطر ۵ میلی‌متر (حجم ۵۰-۵۰ ماکرولیتر) انجام شد [۱۱].

طیف‌های فوریه تبدیل مادون قرمز (FTIR) با دستگاه طیف سنج Thermo Nicolet Nexus 870 FTIR اندازه‌گیری شد. دستگاه اولتراسونیک ۴D برای عامل‌دار کردن نانو لوله‌های کربنی تک دیواره (SWCNT) مورد استفاده قرار گرفت. همه سانتریفوژها توسط دستگاه سانتریفوژ سیگما انجام شد.

اساس کار بیوسنسورهای طراحی شده بر پایه آنزیم‌های دهیدروژناز، جریان حاصل از رها شدن الکترون از واکنش اکسیداسیون NADH است [۲۱، ۲۲]. به همین ترتیب تشخیص هیدروکسی بوتیرات، وابسته به تشخیص آندی اکسایش NADH است. اثر غلظت NAD^+ روی پاسخ جریان توسط اندازه‌گیری هیدروکسی بوتیرات در محدوده غلظتی ۰/۵ تا ۵ میلی‌مولار، NAD^+ بررسی شد. جریان، با افزایش غلظت NAD^+ افزایش یافت و در غلظت ۴ میلی‌مولار اشباع شد. بنابراین غلظت ۴ میلی‌مولار در آزمایش استفاده شد. شکل ۲ پیک آندی مربوط به اکسایش NADH در حدود ۰/۵- ولت را نشان می‌دهد. پیک جریان، با افزایش غلظت هیدروکسی بوتیرات در محلول در نتیجه تشکیل مقدار بالاتر NADH افزایش می‌یابد. در این الکتروود، آنزیم به طور فیزیکی روی نانو لوله‌های کربنی تک دیواره عامل‌دار جذب شده و وجود گروه‌های عامل‌دار روی SWCNT حداکثر پتانسیل اکسایشی NADH را روی الکتروود نواری کاهش می‌دهد. نزدیک شدن پتانسیل اکسایشی NADH به محدوده پتانسیل معمول زوج اکسید و احیاء Q/QH_2 (۰/۷- ولت)، می‌تواند به کینون‌های فعال اکسید و احیاء نسبت داده شود که توسط تیمار اسیدی روی سطح نانو لوله‌های کربنی تک دیواره عامل‌دار تشکیل شده است [۲۳].

هدف اصلی از طراحی انواع مختلف بیوسنسورهای آنزیمی دهیدروژناز معرفی مدلی است که بتواند پتانسیل اکسیداسیون NADH را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. اکسیداسیون NADH، روی الکتروودهای مختلف انجام شده، این کار با استفاده از واسطه‌های انتقال الکترون متفاوت، از مولکول‌های شیمیایی گرفته تا نانو مواد با ساختارهای متنوع صورت گرفته است [۲۴]. پتانسیل اکسیداسیون NADH با الکتروود کربنی شیشه‌ای اصلاح نشده، ۰/۸۲+ ولت گزارش شده بود در حالی که پیک اکسیداسیون با الکتروود اصلاح شده با CNT تک دیواره و چند دیواره به ترتیب ۰/۳۳+ و ۰/۳۶+ ولت گزارش شد [۲۵]. الکتروودی که در مقاله ما معرفی شده نتایج مشابهی با یکی از گزارشات اخیر نشان داده که از تیمار CNT برای

شسته و در $4^\circ C$ نگهداری شد. اندازه‌گیری‌ها در ۱۸۰ روز انجام شد.

یافته‌ها و بحث

نانو لوله‌های کربنی تک دیواره عامل دار

اولین قدم برای ساخت بیوسنسور تیمار خاص نانو لوله‌های کربنی برای ارائه شرایط مناسب اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی است. پروتکل‌های مختلفی برای عامل‌دار کردن اسیدی نانولوله‌های کربنی وجود دارد [۱۸]. در مطالعه حاضر، از روش ساده و تنها از یک نوع اسید استفاده شد. شکل ۱ طیف FTIR از نانو لوله‌های کربنی تک دیواره تیمار نشده (SWCNT) و تیمار شده (F-SWCNT) با اسید نیتریک را نشان می‌دهد. طیف FTIR از نانو لوله‌های کربنی تک دیواره باندهایی در ۳۴۱۸، ۱۳۸۰، ۱۰۶۲، ۱۶۴۵ و باند ضعیف‌تری در 1769 cm^{-1} نشان می‌دهد. گروه‌های $C=O$ در کینون در منطقه 1600 cm^{-1} تا 1700 cm^{-1} جذب می‌شوند و ظهور باند در محدوده 1635 cm^{-1} تا 1655 cm^{-1} می‌تواند نتیجه آرایش گروه‌های $C=O$ در انتهای لوله‌ها باشد [۱۹]. دو باند مشاهده شده در این منطقه در شکل ۱ با گروه‌های عملکردی $C=O$ مطابق است. باند موجود در ۳۴۱۸ به کشش O-H در گروه‌های الکلی یا کربوکسیلیک اسید مربوط است و باند ۱۳۸۰ ممکن است به اثر متقابل خمش O-H و کشش C-O در گروه‌های فنلی مرتبط باشد. از آنجایی که باندها در محدوده 1260 cm^{-1} تا 1000 cm^{-1} ، به کشش C-O در الکل مربوط می‌شود، می‌تواند با ارتعاش کشش C-C همراه شود، باند ۱۰۶۲ در شکل ۱ می‌تواند به کشش C-C-O در گروه‌های اشباع نشده هیدروکسیل نسبت داده شود [۱۹، ۲۰]. وجود باندهای مربوط به کربوکسیل، کربونیل و گروه هیدروکسیل نشان دهنده عامل‌دار شدن SWCNT است.

ساخت بیوسنسور

طرح ۱ مراحل متوالی ساخت بیوسنسور را نشان می‌دهد. آنزیم روی سطح الکتروود اصلاح شده SWCNT گذاشته شد و محلول NAD^+ برای هر اندازه‌گیری اضافه شد.

هیدروکسی بوتیرات تعریف شده است. منحنی در غلظت‌های بالای ۲ میلی‌مولار به طور ثابت باقی ماند و در محدوده ۰/۱-۲ میلی‌مولار خطی شد. محدوده خطی تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات برای اندازه‌گیری مقاصد بالینی کافی است. منحنی کالیبراسیون در شکل ۴، رفتار میکائلیس-متن را نشان می‌دهد. طبق طرح لینیور برک نشان داده شده در بخشی از منحنی کالیبراسیون، ثابت میکائلیس-متن (K_m) محاسبه شده است. این پارامتر می‌تواند برای ارزیابی فعالیت زیستی تثبیت آنزیم‌ها استفاده شود. محدوده تشخیص بیوسنسور با معادله $3S_p/k$ محاسبه شد، که در آن k حساسیت بیوسنسور، S_b انحراف استاندارد از هشت اندازه‌گیری متوالی بلانک با استفاده از محلول بافر بدون ۳- هیدروکسی بوتیرات است [۲۶]. محدوده تشخیصی برای این بیوسنسور ۰/۰۸ میلی‌مولار محاسبه شد که کاملاً با اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی در مقایسه با مطالعات قبلی متناسب است (جدول ۱). برای اطمینان پیدا کردن از کار این بیوسنسور، نتایج حاصل از تعیین غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات که در ۵ نمونه سرمی با حجم‌های کوچک توسط بیوسنسور انجام شده بود با نتایج حاصل از کیت سنجش بتا هیدروکسی بوتیرات Biovision مقایسه شد. همبستگی معنی‌داری که بین این دو روش وجود دارد نشان دهنده این است که بیوسنسور طراحی شده می‌تواند برای تشخیص‌های بالینی ۳- هیدروکسی بوتیرات در نمونه‌های اصلی به کار رود (شکل ۵).

تست تداخل

برای بررسی ویژگی این بیوسنسور در تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات، اندازه‌گیری‌های الکتروشیمیایی در بعضی غلظت‌های هیدروکسی بوتیرات در حضور و عدم حضور ترکیب ۰/۵ میلی‌مولار اسیدهای آمینه نوع L انجام و با هم مقایسه شدند. حضور اسیدهای آمینه نوع L در محلول بلانک تا به حال هیچ تأثیر قابل توجهی روی پاسخ بیوسنسور نداشته است ولی حضور آنها در غلظت‌های مختلف هیدروکسی بوتیرات باعث نوسان ۱٪ تا ۳/۵٪ شد که می‌تواند با توجه به اثر اندک خود روی پاسخ نهایی نادیده گرفته شود. در آزمایشات دیگر، دخالت اسید

اکسیداسیون NADH روی الکتروود (GC) Glassy Carbon استفاده کردند و پتانسیل را به ۰/۰۷- کاهش داد [۲۳].

پایداری و قابلیت تکرارپذیری بیوسنسورها

شکل ۳ پایداری این بیوسنسور بعد از ذخیره‌سازی در مدت ۱۸۰ روز را نشان می‌دهد. همان طور که دیده می‌شود، جریان نسبی با گذشت زمان افزایش یافته و بیشترین مقدار جریان در روز ۴۰ مشاهده شد، در روز ۸۰، فعالیت بیوسنسور حدود ۶۰٪ کاهش یافت. به علاوه اندازه‌گیری بیوسنسور در روز ۱۸۰ کاهش شدید حساسیت را نشان داد. در مقایسه با بعضی از گزارش‌های قبلی روی بیوسنسورها برای تشخیص هیدروکسی بوتیرات که دارای عمر مفیدی کمتر از ۲ ماه بودند [۷-۱] بیوسنسور مورد مطالعه یک نوع موفقیت است. خصوصیات آنالیتیکالی این بیوسنسور با بیوسنسورهای هیدروکسی بوتیرات دیگر در جدول ۱ مقایسه شده است.

قابلیت تکرارپذیری پاسخ بیوسنسورها در غلظت‌های بالا و پایین ۳- هیدروکسی بوتیرات (۰/۱ و ۳ میلی‌مولار) در ۸ آزمایش آنالیتیکالی مستقل مورد بررسی قرار گرفت. درصد CV برای غلظت‌های هیدروکسی بوتیرات اشاره شده در بالا به ترتیب، ۸/۰۱ و ۱/۵۰٪ بود که قابلیت تکرارپذیری قابل قبولی را برای بیوسنسور نشان می‌دهد.

عملکرد آنالیتیکالی بیوسنسورها

غلظت‌های سریالی از محلول استاندارد توسط رقیق کردن غلظت شناخته شده‌ای از ۳- هیدروکسی بوتیرات با نمونه‌های نرمال سرم برای به دست آوردن غلظت‌های نهایی ۰ تا ۳ میلی‌مولار تهیه شد. این آزمایش برای هر غلظت ۳ بار انجام شد. مخلوط $50 \mu\text{l}$ از سری غلظت‌های استاندارد و محلول NAD^+ روی سطح SPCE اصلاح شده قرار داده شد. بعد از نگه داشتن الکتروود کار در محدوده پتانسیل ۱ تا -۱ ولت و سرعت خوانش 50 mV/s ، ولتاژتری چرخه‌ای انجام شد.

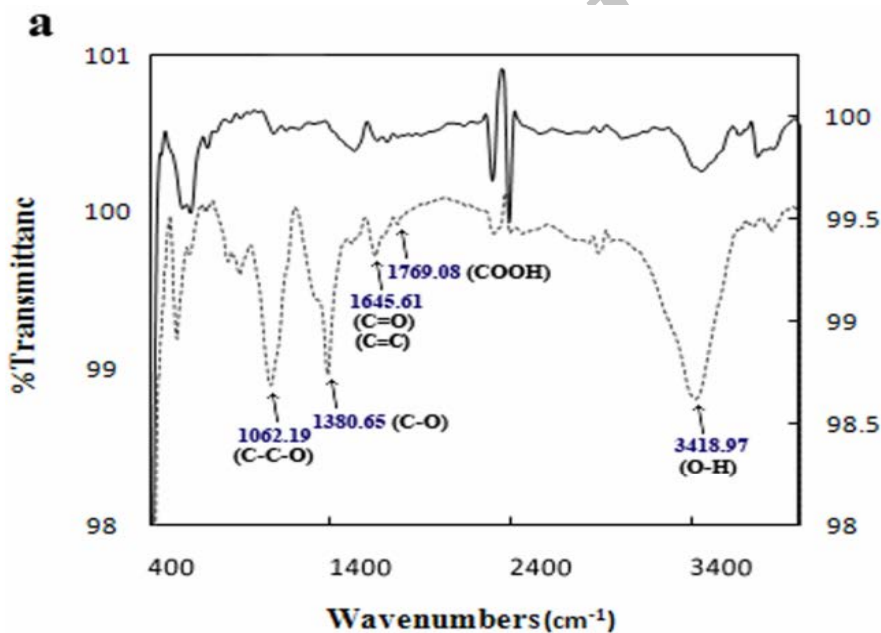
نتایج نشان می‌دهد که منحنی کالیبراسیون برای نمونه‌های مختلف سرم با غلظت‌های تعیین شده ۳- هیدروکسی بوتیرات برای رسیدن به غلظت نهایی ۰-۳ میلی‌مولار

قابل انکار است، اما افزایش یکنواخت در جریان می‌تواند نادیده گرفته شود و باید مطالعات بیشتری انجام شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، بیوسنسوری مبتنی بر آنزیم دهیدروژناز برای تشخیص ۳- هیدروکسی بوتیرات طراحی گردیده است. همچنین برتری نانولوله‌های کربنی برای تسهیل در انتقال الکترون نشان داده شد. در اثر حضور نانولوله‌های کربنی و استفاده از الکترودهای نواری Screen Printed، بیوسنسور خواص عالی از خود نشان داد که شامل پتانسیل پایین اکسیداسیون NADH، حساسیت بالا، پایداری بالا و محدوده خطی مناسب می‌باشد. سهولت طراحی این بیوسنسور، آن را الگوی خوبی برای طراحی سایر بیوسنسورهای مبتنی بر دهیدروژناز قرار می‌دهد.

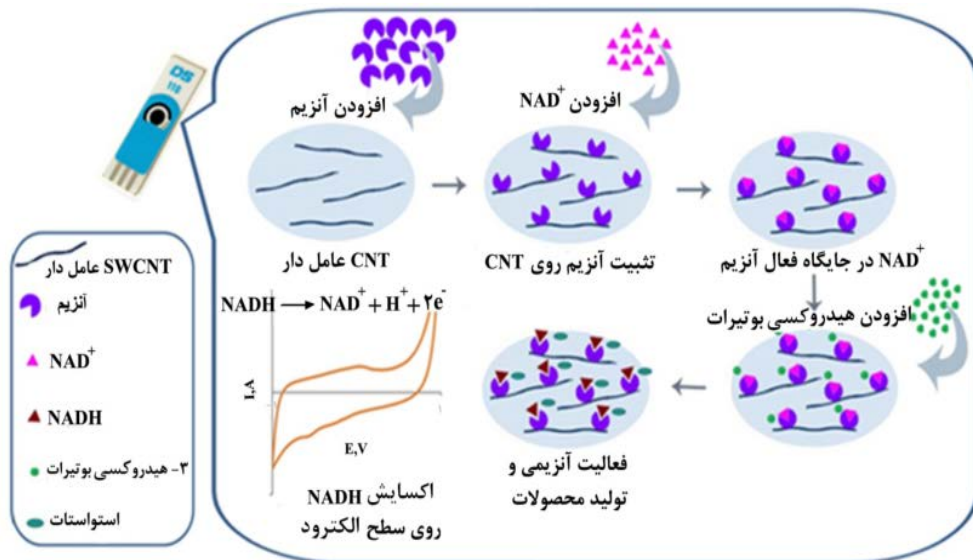
آسکوربیک (۰/۱ میلی‌مولار) و اسید اوریک (۰/۵ میلی‌مولار) روی غلظت‌های مختلف هیدروکسی بوتیرات مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده یک افزایش شدت جریان معادل ۱۷٪ هم در تست بلانک (آزمایش انجام شده در فقدان هیدروکسی بوتیرات) و همچنین در تست‌های الکتروشیمیایی در حضور هیدروکسی بوتیرات را نشان داد. دخالت اسید آسکوربیک و اسید اوریک روی پاسخ نهایی با مقایسه دو طرح مربوط به کالیبراسیون هیدروکسی بوتیرات در حضور و عدم حضور عوامل مداخله‌گر بررسی شد. در هر دو مورد، جریان زمینه تولید شده در تست بلانک کمتر از جریان هر یک از غلظت‌های هیدروکسی بوتیرات بود. معادله‌های خطی اتصالات برای طرح کالیبراسیون هیدروکسی بوتیرات در حضور و عدم حضور اسید آسکوربیک و اسید اوریک شبیه هم بودند. اگرچه تأثیر این عوامل مداخله‌گر روی جریان خروجی غیر



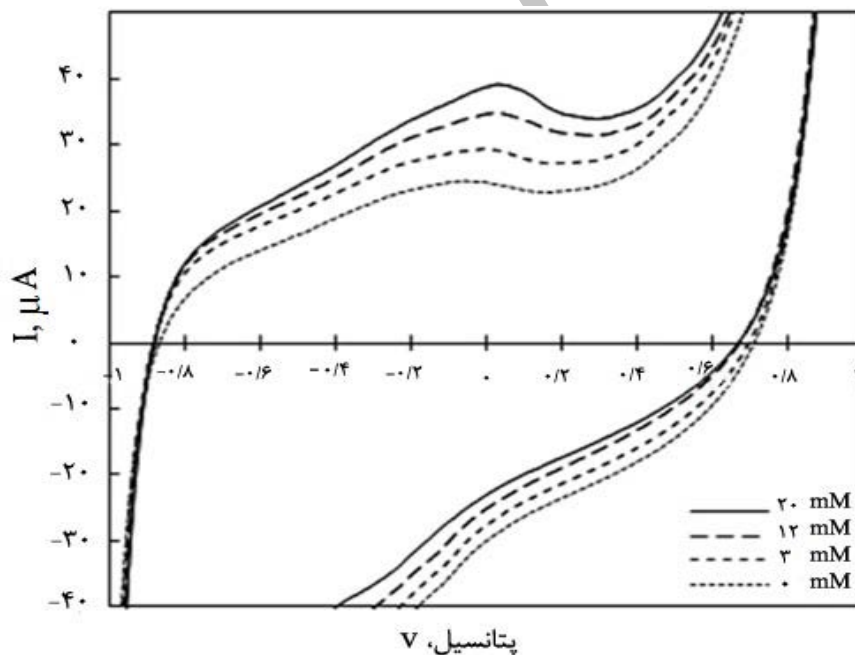
b

Functionalized Single-walled Carbon Nanotubes	
cm ⁻¹	Obs.
1062	C-C-O str.
1380	C-O str., O-H bend.
1645	C=O, C=C
1769	COO(H)
3418	O-H str.

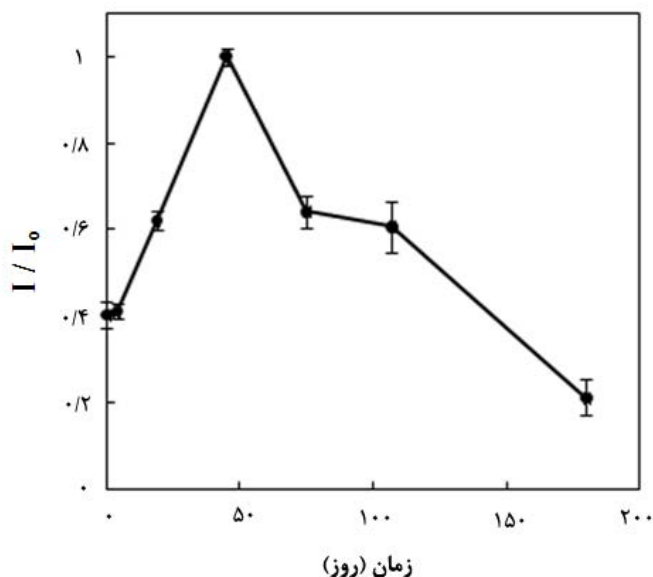
شکل ۱- طیف FTIR از نانولوله‌های کربنی تک دیواره قبل از عامل دار شدن (SWCNT) و بعد از آن (F-SWCNT)



طرح ۱- تصویر الگوبرداری از بیوسنسور: CNT تک دیواره عامل دار، روی سطح الکتروود کار، تثبیت و آنزیم اضافه گردید، تا به طور فیزیکی به مولکول های CNT متصل شود. اضافه کردن NAD^+ و ۳- هیدروکسی بوتیرات باعث واکنش آنزیماتیک و آزاد شدن محصول گردید. پیک اکسایش NADH در منحنی نشان داده شده است.



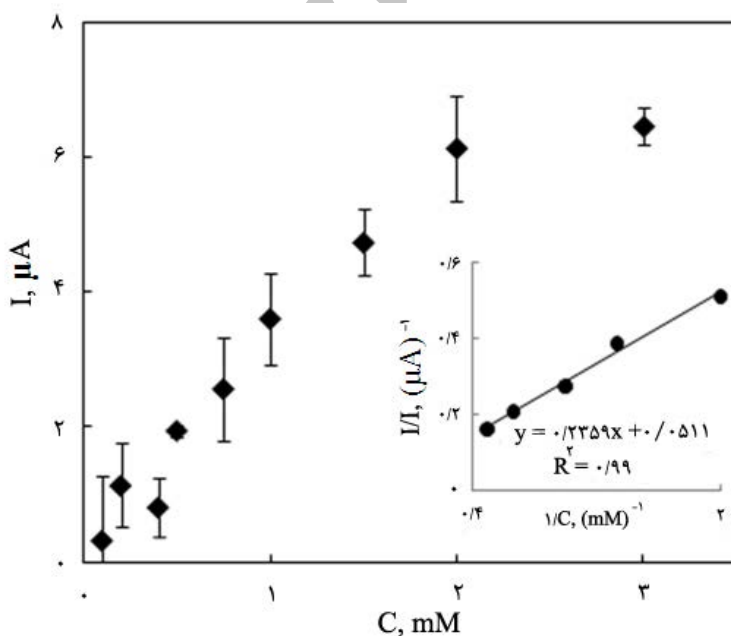
شکل ۲- ولتامتری چرخه ای از بیوسنسور در غلظت های مختلف ۳- هیدروکسی بوتیرات. جریان با افزایش در غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات افزایش یافت و پیک اکسیداسیون در ۰/۰۵ - ولت است.



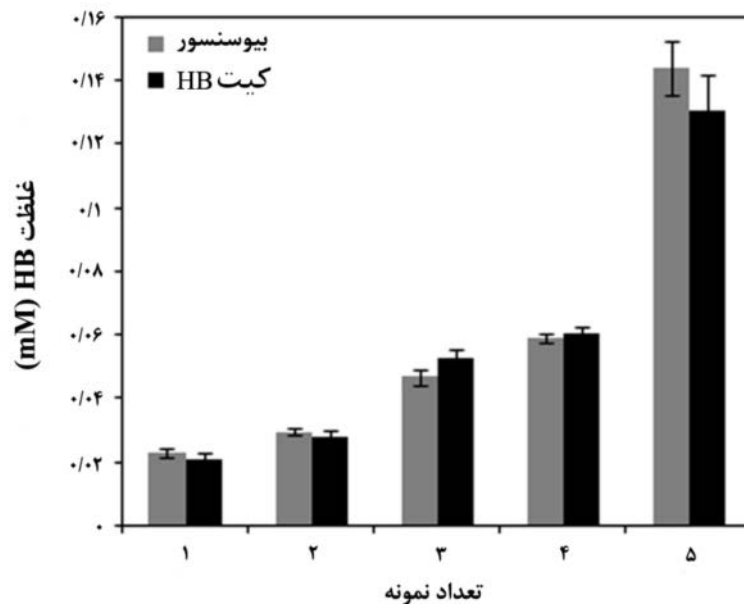
شکل ۳- پایداری طولانی مدت در ذخیره سازی بیوسنسور مطالعه شده. جریان بدست آمده در روز ۴۰ به عنوان سیگنال ماکزیم (I_0) در نظر گرفته شده و پاسخ نسبی (I/I_0) توسط تقسیم سیگنال به سیگنال ماکزیم محاسبه شده است.

جدول ۱- خصوصیات آنالیتیکی بیوسنسورهای هیدروکسی بوتیرات مبتنی بر دهیدروژناز

مرجع	پایداری ذخیره	دامنه خطی (mM)	محدوده تشخیص (μM)	بیوسنسور
این کار	< ۲ ماه	۰/۱-۲	۸۰	SPCE اصلاح شده با SWCNT
(۱)	۷ روز	۰/۰۰۸-۰/۸	۳/۹	الکتروود کلارک/سیستم آنزیمی
(۸)	۱۸ ماه	۰-۶	-	الکتروود نواری screen printed/واسطه های انتقال الکترون
(۷)	۲ ماه	۰/۰۱۴-۵/۲۸	۱۴	الکتروود نواری screen printed/پتاسیم فری سیانید
(۹)	-	۰-۱۰	-	سنسور اصلاح شده ایریدیوم



شکل ۴- منحنی کالیبراسیون در حضور غلظت های مختلف ۳- هیدروکسی بوتیرات (۰/۱ تا ۲ میلی مولار). رابطه میکائلیس- منتن بین غلظت های HB و جریان ایجاد شده مشاهده می شود. نمودار لینیور برک ($1/I$ در برابر $1/C$) در بخشی از شکل نشان داده شده است. ثابت میکائلیس- منتن (K_m) مطابق طرح لینیور برک ۴/۶۱ میلی مولار محاسبه شده است.



شکل ۵- مقایسه غلظت ۳- هیدروکسی بوتیرات توسط کیت سنجش بتا هیدروکسی بوتیرات و بیوسنسور ۳- هیدروکسی بوتیرات در نمونه‌های مختلف. تناسب پاسخ کیت سنجش بتا هیدروکسی بوتیرات با بیوسنسور ما، عملکرد خوب آنها را برای اندازه‌گیری سرم هیدروکسی بوتیرات نشان می‌دهد

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

مأخذ

1. Kwan R. C. H, Hon P. Y. T, Mak W. C, Law L. Y, Hu J., and Renneberg R. Biosensor for rapid determination of 3-hydroxybutyrate using bienzyme system. *Biosens Bioelectron* 2006; 21, (7), pp. 1101-1106.
2. Wallace T. M. and Matthews D. R. Recent advances in the monitoring and management of diabetic ketoacidosis. *QJM* 2004; 97, (12), pp. 773-780.
3. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15, (6), pp. 412-426.
4. Kiba N., Saegusa K., and Furusawa M. Post-column enzyme reactors for chemiluminometric detection of glucose, 1,5-anhydroglucitol and 3-hydroxybutyrate in an anion-exchange chromatographic system. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 689, (2), pp. 393-398.
5. Kimura M., Kobayashi K., Matsuoka A., Hayashi K., and Kimura Y. Head-space gas-chromatographic determination of 3-hydroxybutyrate in plasma after enzymic reactions, and the relationship among the three ketone bodies. *Clin Chem* 1985; 31, (4), pp. 596-8.
6. Tabata, M. and Totani, M. A Chemiluminescence-Flow Injection Analysis of Serum 3-Hydroxybutyrate Using a Bioreactor Consisting of 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase and NADH Oxidase. *Anal Biochem* 1995; 229, (1), pp. 133-138.
7. Li G., Ma N. Z., and Wang Y. A new handheld biosensor for monitoring blood ketones. *Sensor Actuat B-Chemical* 2005; 109, (2), pp. 285-290.
8. Forrow N. J., Sanghera G. S., Walters S. J., and Watkin J. L. Development of a commercial amperometric biosensor electrode for the ketone D-3-hydroxybutyrate. *Biosens Bioelectron* 2005; 20, (8), pp. 1617-1625.
9. Fang L., Wang S.-H., and Liu C.-C. An electrochemical biosensor of the ketone 3-[beta]-hydroxybutyrate for potential diabetic patient management. *Sensor Actuat B-Chem* 2008; 129, (2), pp. 818-825.
10. Hyun S. and Park T. H. Integration of biomolecules and nanomaterials: Towards highly selective and sensitive biosensors. *Biotechnol J* 2011; 6, (11), pp. 1310-1316.
11. Omidfar K., Dehdast A., Zarei H., Sourkahi B. K., and Larijani B. Development of urinary albumin immunosensor based on colloidal AuNP and PVA. *Biosens Bioelectron* 2011; 26, (10), pp. 4177-4183.
12. Omidfar K., Khorsand B., and Larijani B. Development of a new sensitive immunostrip assay based on mesoporous silica and colloidal

- Au nanoparticles. *Mol Biol Rep* 2012; 39, (2), pp. 1253-1259.
13. Omidfar K., Kia S., Kashanian S., Paknejad M., Besharatie A., Kashanian S., and Larijani B. Colloidal Nanogold-Based Immunochromatographic Strip Test for the Detection of Digoxin Toxicity. *Appl Biochem. Biotech* 2010; 160, (3), pp. 843-855
 14. Omidfar K., Zarei H., Gholizadeh F., and Larijani B. A high-sensitivity electrochemical immunosensor based on mobile crystalline material-41-polyvinyl alcohol nanocomposite and colloidal gold nanoparticles. *Anal Biochem* 2012.
 15. Kim J., Grate J. W., and Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci* 2006; 61, (3), pp. 1017-1026
 16. Endo M., Strano M., and Ajayan P. Potential Applications of Carbon Nanotubes. in Carbon Nanotubes. vol. 111, ed: Springer Berlin/Heidelberg 2008; pp. 13-61.
 17. Omidfar K., Rasaee M. J., Zaraee A. B., Amir M. P., and Rahbarizadeh F. Stabilization of penicillinase-hapten conjugate for enzyme immunoassay. *J Immunoassay Immunochem* 2002; 23, (3), pp. 385-398.
 18. Osorio A. G., Silveira I. C. L., Bueno V. L., and Bergmann C. P. H₂SO₄/HNO₃/HCl-Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. *Appl Surf Sci* 2008; 255, (5), pp. 2485-2489.
 19. Chakraborty S. and Raj C. R. Mediated electrocatalytic oxidation of bioanalytes and biosensing of glutamate using functionalized multiwall carbon nanotubes-biopolymer nanocomposite. *Electroanal Chem* 2007; 609, (2), pp. 155-162.
 20. Kim U. J., Furtado C. A., Liu X., Chen G., and Eklund P. C. Raman and IR Spectroscopy of Chemically Processed Single-Walled Carbon Nanotubes. *J Am Chem Soc* 2005; 127, (44), pp. 15437-15445.
 21. Radoi A., Compagnone D., Valcarcel M. A., Placidi P., Materazzi S., Moscone D., and Palleschi G. Detection of NADH via electrocatalytic oxidation at single-walled carbon nanotubes modified with Variamine blue. *Electrochim Acta* 2008; 53, (5), pp. 2161-2169.
 22. Zhou J.-L., Nie P.-P., Zheng H.-T., and Zhang J.-M. Progress of Electrochemical Biosensors Based on Nicotinamide Adenine Dinucleotide (phosphate)- Dependent Dehydrogenases. *Chinese J Anal Chem* 2009; 37, (4), pp. 617-623.
 23. Wooten M. and Gorski W. Facilitation of NADH Electro-oxidation at Treated Carbon Nanotubes. *Anal Chem* 2010; 82, (4), pp. 1299-1304.
 24. Kumar S. and Chen S.-M. Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review. *Sensors* 2008; 8, (2), pp. 739-766.
 25. Musameh M., Wang J., Merkoci A., and Lin Y. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochem Commun* 2002; 4, (10), pp. 743-746.
 26. Zhou H., Zhang Z., Yu P., Su L., Ohsaka T., and Mao L. Noncovalent Attachment of NAD⁺ Cofactor onto Carbon Nanotubes for Preparation of Integrated Dehydrogenase-Based Electrochemical Biosensors. *Langmuir* 2010; 26, (8), pp. 6028-6032.