مقاله مروری

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال دهم ● شماره ۴ ● صفحات ۳۲۹ تا ۳۳۸ ● زمستان ۱۳۹۱

تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی نانو ساختارگرافن جهت استفاده در بیوسنسور قند خون

*عبدالرحمان حسینی‌فر[۱]

تاریخ اعلام وصول: ۹۱/۴/۴ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۱/۸/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: در این مقاله ابتدا به مفهوم تثبیت آنزیم و روشهای تثبیت پرداخته. در ادامه با مطالعه موردی تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی پایه‌های گرافنی به تشریح روشهای رایج در شناسایی گلوکز پرداخته می‌شود.آنزیم گلوکز اکسیداز یک بیوکاتالیست زیستی است که فرآیند تبدیل گلوکز به آب اکسیژنه را تسریع می‌کند. اکثر دستگاه‌های رایج اندازه گیری قند خون موجود در بازار بر همین اساس فعالیت می‌کنند. برخی ساختارهای گرافنی مورد بحث قرار می‌گیرد و در ادامه بحث، تمام مقالات موجود و مرتبط با ساخت سنسورهای گلوکز بر پایه گرافنی مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: با توجه به اینکه روش استفاده از گرافن روشی جدید است و اولین مورد استفاده از گرافن برای سنسور گلوکز در سال ۲۰۰۹ گزارش شد، تعداد مقالات این حوزه نیز بسیار اندک است. در ادامه مطلب به بررسی کمی و کیفی این پژوهش‌ها پرداخته می‌شود و خلاقیت‌های بکار برده شده در هر سنسور برای افزایش حساسیت سنسور، کاهش حد تشخیص و افزایش زیست سازگاری آنها تشریح می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت روز افزون سنسورهای شیمیایی و بیوشیمیایی در تشخیص زود هنگام بیماریها و همچنین افق روشن صنایع مرتبط با این دستگاه‌ها و توانایی‌های منحصر به فرد نانو فناوری، امید است تا در آینده‌ای نه چندان دور بسیاری از بیماری‌ها در مراحل اولیه شنایایی گردند. در این میان سنسورهای گلوکز به عنوان پیش رو در این راه موفقیت‌های چشمگیری در پاسخ گویی سریع و حد تشخیص مناسب از خود نشان داده‌اند. در این میان گرافن نشان داد که از جهات مختلفی چون زیست سازگاری، هزینه، پاسخ گویی و... برتری‌های ویژه‌ای نسبت به سایر خانواده‌های کربنی نانو از خود نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: آنزیم گلوکز اکسیداز، سنسور قند خون، گرافن، تثبیت آنزیم

مقدمه

مفهوم تثبیت و روشهای تثبیت آنزیم‌ها

تثبیت آنزیم‌ها به طور ساده به معنای ساکن کردن یک گونه واکنش گر بر روی بستر (سوبسترا) بی‌اثر و خنثی در شرایط آزمایش می‌باشد. اما این تعریف را به طور دقیق‌تر نمی‌توان مورد پذیرش قرار داد چرا که هیچ ماده را نمی‌توان به طور کامل بی‌اثر نامید. لذا یکی از اولین اهداف تثبیت استفاده از ماده‌ای است که کمترین تاثیر را با ترکیبات شیمیایی موجود در شرایط واکنش داشته باشد. از سوی دیگر گاه خواص ویژه بستر به طور غیر مستقیم باعث بهبود خاصیت گونه موثر می‌شود. برای مثال، نمونه‌های فراوان ترکیبات نانو با توجه به افزایش چشمگیر نسبت سطح به حجم خود، سطح زیادتری را در اختیار گونه موثر قرار داده و به این ترتیب فعالیت گونه موثر به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

آنزیم‌ها به عنوان دسته‌ای از کاتالیزورهای زیستی کاربردهای فراوانی

۱ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی شیمی، دانشجوی دکترای نانوفناوری (*نویسنده مسئول)
تلفن: آدرس الکترونیک: a.r.hosseinifar@ut.ac.ir

www.SID.ir

در صنایع شیمیایی و ساخت سنسورها دارا می‌باشند. اهمیت این دسته از مواد به خاطر انجام فرایند واکنش در شرایط ملایم و انتخاب پذیری چه از نظر ساختاری و چه از نظر شیمیایی می‌باشد. آنزیم‌ها ترکیباتی زیست تخریب پذیر می‌باشند که در مقایسه با سایر کاتالیزورهای مرسوم در صنایع اثرات سمیت کمتری را دارا می‌باشند. از سوی دیگر با توجه به انجام فرایندهای کاتالیز شده توسط آنزیم‌ها در محیط‌های آبی و حذف اثرات حلال‌های آلی تهدید کننده محیط زیست، این دسته از کاتالیزورها در درجه اول اهمیت می‌باشند. (۱)

اما تثبیت آنزیم‌ها بر روی بسترهای دیگر با اهداف زیادی صورت می‌گیرد که مهمترین آنها عبارت اند از: افزایش پایداری حرارتی آنزیم، افزایش پایداری ساختاری در صورت تماس با محلول‌های آلی، تسهیل در فرایند جداسازی آنزیم پس از انجام آزمایش، کاهش آلودگی‌های ناشی از آنزیم در محصولات، افزایش سازگاری آنزیم در شرایط زیستی، افزایش فعالیت و راندمان تولید محصول و... می‌توان نام برد. (۱)

تثبیت آنزیم‌ها با سه روش کلی انجام می‌شود:

اتصال به سطح یا Surface binding

در این روش آنزیم مورد نظر با استفاده از اتصالات فیزیکی یا شیمیایی به سطح ثانویه متصل می‌گردد. قدرت پیوند ایجاد شده شدیداً تابعی است از نوع شیمیایی یا فیزیکی بودن این اتصال. طبیعی است که در این میان پیوندهای کووالان اتصالات قوی‌تر و پیوندهای واندروالسی اتصالات ضعیف‌تری را ایجاد نموده. آزاد شدن تدریجی آنزیم از روی سطح مورد نظر را که به اصطلاح لیچینگ گویند، شدیداً تابعی از این قدرت پیوند می‌باشد. پیوندهای بر قرار شده بین سطح و آ نزیم مورد نظر از لحاظ تمایل به لیچینگ آنزیم‌ها به ترتیب عبارت اند از: پیوند واندروالسی، پیوند یونی (۲)، پیوند کووالانی.

سوبسترا یا سطح مورد نظر می‌تواند رزین سنتزی، پلیمر زیستی و یا پلیمر معدنی، ساختارهای ماکروپروس و مزوپوروس سیلیکا، زئولیت‌ها و یا ساختارهای نانوی کربنی مانند نانو لوله‌های کربنی، فولرن‌ها و گرافن‌ها (۳) باشد.

از میان پلیمرهای زیستی مورد استفاده در تثبیت آنزیم‌ها به این روش می‌توان به سلولوز، نشاسته، آگاروز، کیتوسان و یا پروتئین‌هایی مانند آلبومن و ژلاتین را نام برد.

در محلول‌های غیرآبی که احتمال لیچینگ آنزیم‌ها از سطح بستر بسیار کمتر می‌شود می‌توان از هیدروژل یا کرایوژل نیز استفاده نمود. نمونه معروف این دسته از ژل‌ها کرایوژل پلی ونیل الکل با نام تجاری لانتیکات می‌باشد که طور گسترده‌ای استفاده می‌شود.

محبوس کردن یا Entrapment

اگر در حین سنتز شبکه پلیمر، آنزیم مورد نظر در حفرات آنزیم محبوس گردد و احتمال خروج آن از حفرات پایین باشد از روش entrapment استفاده شده. در این روش از ژل‌های مختلفی همچون هیدروژل‌های پلیمری یا سل-ژل سیلیکا استفاده می‌شود. در اکثر ژل‌های مورد استفاده جهت کاهش لیچینگ آنزیم از شبکه پلیمر استفاده از پیوندهای کووالان ثانویه بین شبکه پلیمر و آنزیم مورد نظر الزامی می‌باشد.

اتصالات متقاطع Cross-linking

استفاده از تثبت آنزیم‌ها توسط دو روش قبل با یک مشکل بزرگ رو برو است و آن اشغال کردن حجم بزرگی از فضای کاتالیست نهایی توسط بستر مورد نظر است به طوری که گاه تا ۷۰ درصد فضای کلی کاتالیست توسط ژل یا پلیمر اشغال می‌شود. به منظور رفع این مشکل از روش اتصالات متقاطع استفاده می‌شود که طبق این روش خود آنزیم مورد نظر توسط قطعات شیمیایی کوچک به هم متصل می‌شود و در نهایت یک توده پلیمری از آنزیم مورد نظر ایجاد می‌شود که درصد زیادی از آن را آنزیم اشغال کرده است. فرآیند شیمیایی این واکنش شامل یک واکنش تراکمی بین هیدروژن گروه آمین و یا آمید پروتئین‌ها و گروه آلدهیدی از یک ترکیب واسط می‌باشد. حذف بستر از لحاظ اقتصادی نیز بسیار مهم است چرا که در صنایع عموماً بستر مورد استفاده ماده‌ای هزینه بر و تثبیت آنزیم بر روی آن نیز هزینه برتر خواهد بود. استفاده از این روش همچنین پایداری شیمیایی و همچنین فعالیت و راندمان آنزیم را به طور چشمگیری افزایش می‌دهد.

گلوتر آلدهید با دو گروه انتهایی آلدهیدی خود توانایی ایجاد پیوند با گروه آمین آنزیم‌ها را دارد. این گلوتر آلدهید است که

Archive of SID
www.SID.ir

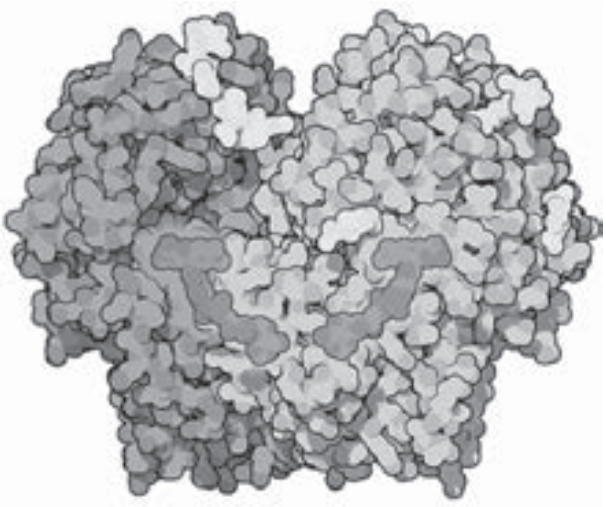
در نهایت همچون پل‌های کوچکی ما بین ملکول‌های آنزیم ایجاد پیوند نموده و در نهایت ماکروملکول آنزیمی را تهیه می‌کند که به راحتی قابل جداسازی از محلول است. البته این ایجاد پیوند گاهاً مقداری از فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد ولی در نهایت ترکیب ایجاد شده به دلیل قابلیت جدا سازی از محلول و استفاده مجدد، از نظر اقتصادی به صرفه‌تر است. (۱)

شکل ۱- شمایی از فرآیند اتصال به سطح. اشکال خورشید مانند پروتئین‌ها و صفحه مشبک سوبسترا می‌باشد

شکل ۲- شمایی از فرآیند اتصالات متقاطع جهت تثبیت آنزیم ها.خطوط خمیده دی آلدهید و اشکال خورشیدی پروتئین‌ها هستند

مکانیسم شناسایی گلوکز با استفاده از آنزیم گلوکز اکسیداز

گلوکز را می‌توان از طریق فرایند اکسداسیون کاتالیستی به اکسو لاکتون و آب اکسیژنه تبدیل نمود. بیوکاتالیست مورد استفاده در این فرآیند آنزیم گلوکز اکسیداز است که انتخاب پذیری بسیار مناسبی نسبت به گلوکز داراست. شکل ۳ ساختار دیمری این پروتئین



شکل ۳- نمایی از ساختار دیمر آنزیم گلوکز اکسیداز

آنزیمی را نمایش میدهد. خوشبختانه قسمت‌های فعال این آنزیم که گلوکز با آن واکنش می‌دهد در پاکت‌های عمیق در این آنزیم است و ایجاد اتصال‌های سطحی این آنزیم با یک سوبسترا فعالیت آن را آنچنان که در سایر آنزیم‌ها دیده می‌شود کاهش نمی‌دهد.

از سوی دیگر سرعت انجام این فرآیند نسبتاً بالاست به طوری که این واکنش را برای مقاصد شناسایی گلوکز مناسب می‌کند. از طریق فرایند تجزیه آب اکسیژنه حاصل از این واکنش بر روی سطح الکترود، می‌توان به طور غیر مستقیم گلوکز موجود در محیط را اندازه گیری نمود.خلاصه‌ای از این فرایند در شکل ۴ آمده است. pH مناسب جهت انجام این فرآیند ۷/۴ است که این pH در اکثر آزمایشات با بافر PBS ثابت نگه داشته می‌شود. در pHهای بالاتر و پایین‌تر به علت دینیچر شدن و از کار افتادگی بخش‌های فعال آنزیم، فعالیت سنسور تا حد چشمگیری کاهش می‌یابد.

$$2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

شکل ۴- شماتیک واکنش شناسایی گلوکز توسط آنزیم گلوکز اکسیداز

انتقالات الکترونی واکنش تجزیه آب اکسیژنه در سطح الکترودی از جنس پلاتین و یا گرافیت انجام گرفته که با این انتقال الکترونی سیگنالی در مدار ایجاد گردیده. از این روش به طور غیر مستقیم به اندازه گیری گلوکز در مایعاتی مثل خون استفاده می‌شود و در واقع اساس تمام دستگاه‌های تجاری اندازه گیری قند خون موجود در بازار بر این پایه است.

گرافن و ساختارهای آن

گرافیت پیریستین (تک لایهٔ خالص از کربن هیبریدی sp^2 و عاری از هر گونه نقص ناشی از حضور اتم-های غیر همجنس) با روش‌های متعددی قابل تهیه است (۴).رویکردهایی که برای تولید انبوه نانو صفحات گرافیت GNP و مواد گرافنی مطرح شدند (منظور صفحات چندلایه‌ای متشکل از صفحات تک لایهٔ کربن و دارای اتم‌های غیر همسان و نیز نقایص هندسی) در ابتدا از ترکیبات میان افزودهٔ گرافیتی

Archive of SID
www.SID.ir

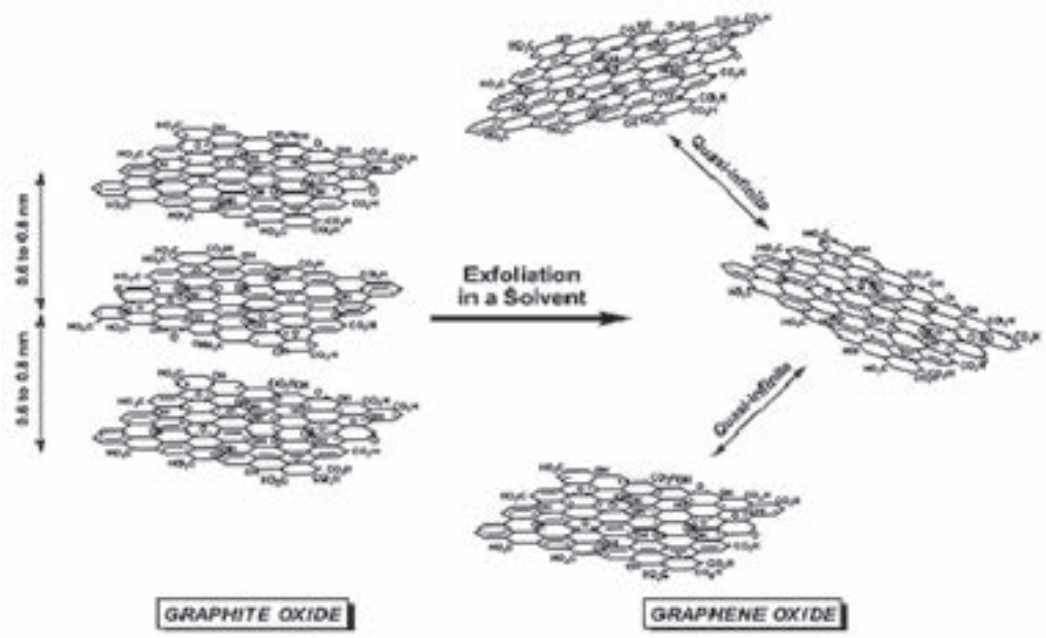
GICs و اکسید گرافیت GO به عنوان پیش ماده استفاده می‌کردند. روشهای متعددی برای ورقه ورقه کردن GICها توسعه پیدا کرد ولی اغلب این روش به تشکیل ورقه‌های تک لایه‌ای منجر نمی‌شود، صفحات تولید شده تقریباً ضخامتی در حد ۵ نانومتر دارند.

بیشتر فیلرهای گرافیتی ورقه ورقه شده از GICها مشتق می‌شوند که در واقع ترکیباتی از گرافیت هستند که یکسری اتم و ملکول (نظیر فلزات قلیایی و اسیدهای معدنی) لابه لای لایه‌های کربنی آن وارد شده است. وارد شدن این اتم‌ها و ملکول‌ها فاصله میان صفحات گرافیت را افزایش می‌دهد و افزایش فاصلهٔ میان صفحات برهمکنش میان آنها را ضعیفتر می‌کند و این امر ورقه ورقه شدن GIC را در اثر فرآیندهای مکانیکی و حرارتی تسهیل می‌کند (۵). میان افزایی گرافیت با ترکیبی از اسید سولفوریک و اسید نیتریک منجر به تولید GICای با کیفیت بالاتر (حاوی ۲ تا ۵ لایه گرافن بین هر دو لایه ماده میان افزوده) می‌گردد، این GICها را می‌توان از طریق حرارت دهی سریع یا انجام عملیات حرارتی تحت مایکروویو ورقه ورقه کرد، مادهٔ بدست آمده از این مرحله را گرافیت باز شده EG می‌گویند. EG ساختمانی لایه‌ای دارد ولی نسبت به گرافیت دارای فاصلهٔ بین لایه‌ای زیادتری است و در واقع متشکل از صفحات کوچک نازکی در حد ۳۰ تا ۸۰ نانومتر است که خیلی شل کنار هم چیده شده‌اند. شایان ذکر است که فرآوری تحت اسید ممکن است منجر به اکسیده شدن صفحات مذکور شود ولی میزان این اکسیداسیون در مقایسه با حدی که در GO ایجاد می‌شود، بسیار ناچیز است (۶).

سونیکیت کردن فلس‌های گرافیتی در آب منجر به تولید صفحات چند لایه و تک لایهٔ گرافنی می‌شود که عمدتاً عاری از نقایص هستند ولی این فرآیند مستلزم استفاده از سورفکتانت‌هایی است که بر خواص هدایت الکتریکی تاثیر منفی دارند.

GOعمدتاً از طریق واکنش گرافیت با اسیدهای معدنی قوی و عوامل اکسنده نظیر $KMnO_4$ و H_2SO_4 سولفوریک و یا در فرآیندهای مشابه بهینه شده با استفاده از HNO_3 و $KClO_3$ (NaClO۳) تولید می‌شود (۷). این واکنش‌ها درجات اکسیداسیون مشابهی را فراهم می‌کنند (نسبت کربن به اکسیژن عمدتاً ۲ به ۱ است) و کاملاً ساختار الکترونی گرافیت را دچار از هم گسیختگی می‌کند. در اثر واکنش‌های مذکور گروه‌های عاملی شیمیایی متعددی با پایهٔ اکسیژن بر سطح گرافیت تشکیل می‌شود. هر چند ساختار دقیق GO تا زمان فعلی همچنان محل بحث و اختلاف نظر است، ولی به نظر می‌رسد گروه‌های اپوکسی و هیدروکسیل با حداکثر غلظت ممکن روی صفحهٔ بنیادی تشکیل می‌شوند و گروه‌های کربوکسیلیک اسید جوانب صفحات را احاطه می‌کنند (۸) (شکل ۵).

به جز تعداد معدودی استثنا، تولید بیوسنسورهای حاوی GO با



شکل ۵- ساختار شیمیایی اکسید گرافیت GO و تفاوت ساختار آن با اکسید گرافیت ورقه‌ای G-O

www.SID.ir

توزیع بسیار خوب تا حد زیادی به کیفیت ورقه ورقه شدن GO قبل از وارد کردن به زمینه پلیمری بستگی دارد. روش‌های ورقه ورقه کردن مبتنی بر استفاده از حلال و نیز فرآیندهای ورقه ورقه کردن حرارتی نسبت به سایر فرآیندها ارجحیت بیشتری دارند. در روش‌های مبتنی بر حلال خاصیت آبدوستی و فواصل بین لایه‌ای زیاد در GO (در مقایسه با گرافیت)، ورقه ورقه کردن مستقیم لایه‌ها را در آب با کمک فرآیندهای مکانیکی نظیر هم زدن و سونیکیت کردن تسهیل می‌کند و می‌توان با این شیوه به سوسپانسیون کلوییدی از اکسید گرافن دست یافت که از این به بعد با عبارت G-O نشان داده می‌شود (۹).

خواص فیزیکی صفحات G-O به نحو چشمگیری از گرافن متفاوت است. ولی این صفحات را می‌توان از طریق احیای شیمیایی با کمک یکسری عوامل کاهنده نظیر هیدرازین مونوهیدرات و یا سدیم بوروهیدرات احیا کرد و به ماده‌ای دست یافت که تا حد زیادی به گرافن پیریستین شباهت دارد. در صفحات G-Oی احیا شده به شیوهٔ شیمیایی علیرغم نسبت کربن به اکسیژن بیش از ۱۰ به ۱ بسیاری از کارایی‌های ذاتی صفحات G-O همچنان محفوظ باقی می‌ماند. بیشتر واکنش‌های مطرح در مورد G-O با احیای G-O منجر به تشکیل صفحات اکسید گرافن احیا شده یا RG-O می‌شود که دارای رسانایی الکتریکی هستند، البته تعداد زیادی از تبدیلات شیمیایی نیز هستند که بر گروه‌های عاملی اکسیژن دار G-O عمل می‌کنند. فرآیندهای عامل دار کردن کوالانسی و غیر کوالانسی هر دو در مورد صفحات G-O با هدف ایجاد توزیع‌های پایداری از صفحات گرافنی اصلاح شیمیایی شده (CMG) در محلول‌های آلی و نیز بهبود هم‌خوانی آنها با ماتریس‌های پلیمری مختلف گزارش شده‌اند. در این میان، واکنش‌هایی که از آمین‌ها و ایزوسیانات‌ها برای عامل دار کردن صفحات G-O با کوچک ملکول‌ها، به دلیل سادگی واکنش‌ها و قابلیت انجام واکنش‌ها از مسیرهای چندگانه (به عنوان مثال: آمیداسیون، حلقه گشایی هسته دوستی اپوکساید، تشکیل کربامات و...) بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. البته ایجاد عوامل دارای اتصال کوالانسی بر روی صفحات G-O می‌تواند روی خواص هدایت الکتریکی صفحات تاثیر منفی بگذارد. شبکهٔ هیبریدی شدهٔ SP^2 برای مکانیزم هدایتی الکترون/حفره لازم است، ایجاد اتصالات کوالانسی این شبکهٔ هیبریدی را در گرافن بین می‌برد. اما عامل دار کردن غیر کوالانسی صفحات RG-O مثلاً بر همکنش‌های π-π می‌تواند تخریب هدایت الکتریکی را کاهش دهد.

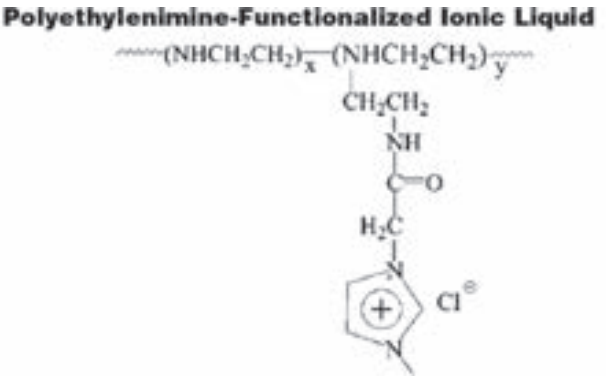
بررسی و تحلیل مقالات: روشهای تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی گرافن اکسید

در این بخش با هدف بررسی تکامل روشهای تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز و بهبود سیگنال‌های حاصل از ای فرآیند به نگاهی تاریخی به مقالات منتشر شده در این حوزه می‌پردازیم. با توجه به نوین بودن روش استفاده از صفحات گرافن در کاربردهای کاتالیستی و بیوسنسور اکثر این مقالات به پنج سال اخیر باز می‌گردد که در ادامه به ترتیب خلاصه‌ای از این مقالات ارائه خواهد شد.

لی نیو و همکارانش برای اولین بار در سال ۲۰۰۹ از صفحات گرافن برای تثبیت کوالانی آنزیم گلوکز اکسیداز استفاده نمودند. آنها جهت پراکنده سازی گرافن در ساختار الکترود از پلی اتیلن ایمین عامل دار شده با یک مایع یونی (شکل ۶) که پخش خوب و حلالیت بالایی در آب دارد استفاده نمودند. (۱۰)

دامنه خطی سنسور به دست آمده از روش لی نیو بین ۲ تا ۱۴ میلی مولار از گلوکز بود که در مقایسه با سایر روش‌های قبل از خود شامل نانو لوله‌های کربنی دامنه وسیع‌تری را شامل می‌شد که این امر به علت خواص الکتریکی بهتر گرافن نسبت به سایر ساختارهای کربنی نانو بود.

ییوها ژو و همکارانش با ابتکاری جالب‌تر جهت جلوگیری از تجمع مجدد صفحات گرافن جدا شده از هم، آنها را با $-SO_3^-$ عامل دار نمودند تا بارهای مخالف روی این صفحات باعث دفع آنها گردد. ژو نیز مانند لی نیو جهت پخش گرافن در ماتریس سنسور



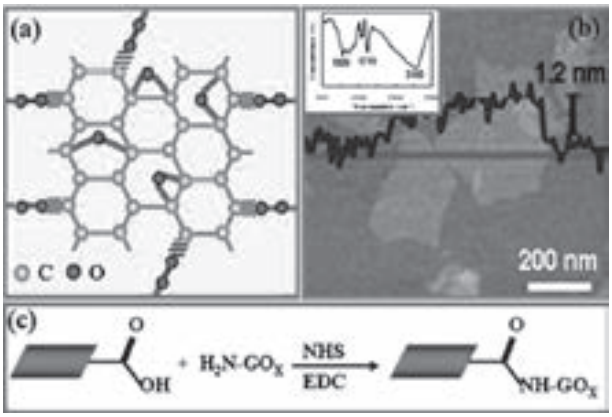
شکل ۶- نمونه‌ای از مایع یونی بکار رفته در سنسور لی نیو (۱۰)

Archive of SID
www.SID.ir

از یک پلیمر آبدوست استفاده نمود با این تفاوت که وی از نفیون که پلیمری رایج در ساخت سنسور هاست استفاده نمود. ژو نشان داد که این عامل دار کردن همزمان با اضافه نمودن نانو ذرات طلا به سنسور باعث افزایش فعالیت سنسور گلوکز می‌گردد به طوری که دامنه حساسیت او از ۱۵ میکرو مولار تا ۵/۸ میلی مولار و با تکرار پذیری بالاتر، افزایش می‌دهد که علت آن را در اثر سینرجیک بین طلا و گرافن می‌دانست. اثر سینرجیک به اثر مضاعف حاصل از بر هم کنش بین دو ماده گویند که از مجموع دو ماده بیشتر باشد به طور مثال اگر ماده‌ای دارای هدایت الکتریکی ۵ میلی زیمنس بر سانتیمتر باشد و ماده دیگری ۱۲ میلی زیمنس بر سانتیمتر، مخلوط آنها ممکن است هدایتی برابر با ۱۸ میلی زیمنس بر سانتیمتر دارا باشد. حد تشخیص سنسور ژو ۵ میکرومولار و زمان مورد نیاز برای پاسخ سنسور ۵ ثانیه گزارش شده که نسبت به سنسورهای دارای نانو لوله‌های کربنی تک جداره و چند جداره زمان کمتری را برای پاسخ گویی نیاز داشت اما نسبت به سنسور گلوکز تثبیت شده روی ژل سیلیکا بیشتر است. علت این امر در نوع تثبیت است. همان طور که در ابتدای مقاله اشاره گردید تثبیت کوالان آنزیم‌ها بر روی بستر ثانویه تا حدی از فعالیت آنها می‌کاهد که به دلیل ایجاد پیوند شیمیایی بخشهایی از آنزیم با بستر است که ممکن است این پیوند در بخش فعال آنزیم اتفاق بیفتد. در آنزیم محبوس شده در سیلیکا ژل احتمال تشکیل این پیوند کمتر می‌باشد و آنزیم آزادانه‌تر می‌تواند واکنش دهد. اما از طرفی تکرار پذیری سنسورها نیز مبحث بسیار مهمی است که در سنسور سیلکا ژل به علت آزاد شدن تدریجی آنزیم کمتر دیده می‌شود. (۱۱)

راماپ رابهو نیز در روشی بسیار مشابه با ژو از نانو ذرات طلا و پلاتین به عنوان پر کننده فضای بین صفحات گرافن استفاده نمود. این ذرات علاوه بر جلوگیری از تجمع مجدد صفحات با هم همچنین باعث افزایش فعالیت الکترود می‌گردند به طوری که حد تشخیصی برابر با یک میکرومولار گزارش کردند. (۱۲)

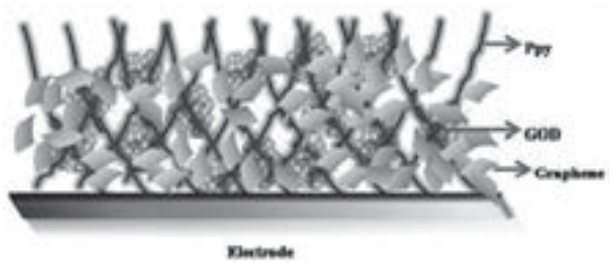
یانگ لیو در سال ۲۰۱۰ نشان داد که اتصال مستقیم گروه آمین گلوکز اکسیداز به گروه کربوکسیلیک اسید در گرافن اکسید نه تنها پیوند محکم آمیدی را ایجاد می‌کند (شکل ۷) بلکه ترکیب حاصل سازگار با محیط‌های زیستی است و برای اثبات این موضوع سنسور ساخته شده بر روی رده سلولی PRE آزمایش گردید و نشان داده



شکل ۷- a- نمایش ساختار ملکولی صفحات گرافن اکسید b- میکروگراف AFM صفحات گرافن اکسید. c- شماتیک تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی گرافن اکسید توسط پیوند پپتیدی بین گروه آمین آنزیم و کربوکسیلیک اسید گرافن اکسید. (داخل b: طیف مادون قرمز گلوکز اکسید)

شده که با توجه به زیست سازگاری سنسورهای گرافنی می‌توان از این دسته از سنسورها برای اندازه گیری قند خون به صورت in-vivo یا درون بافتی استفاده نمود.آنان همچنان نشان دادند که تکرار پذیری این سنسور پس از گذشت یک ماه از ساخت آن و انجام آزمایشات مختلف فقط ۲۰٪ کاهش می‌یابد. (۱۳)

چن ژانگ لی و همکارانش موفق شدند تا با تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی گرافن اکساید و نشاندن این ترکیب بر روی پلیمر رسانای پلی پیرول که به طریقه الکتروشیمیایی بر روی الکترود کربن نشانده شده بود، حد تشخیص گلوکز را کاهش دهند (شکل ۸). پلی پیرول نشانده شده به طریقه الکتروشیمیایی بر روی الکترود ساختار بسیار متخلخلی دارد که باعث افزایش سطح موثر الکترود و افزایش تبادلات الکتروشیمیایی بین گونه واکنش گر و آنزیم می‌شود. در واقع این روش را ترکیبی از دو روش اتصال به سطح و محبوس سازی است. وی معتقد است که با انجام پیوند کوالانی

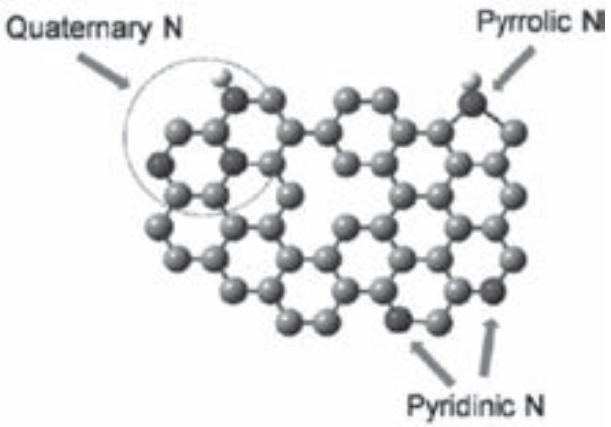


شکل ۸- نمایش ساختار محبوس شده ترکیب گلوکز اکسیداز-گرافن اکسید در شبکه پلیمری متخلخل پلی پیرول

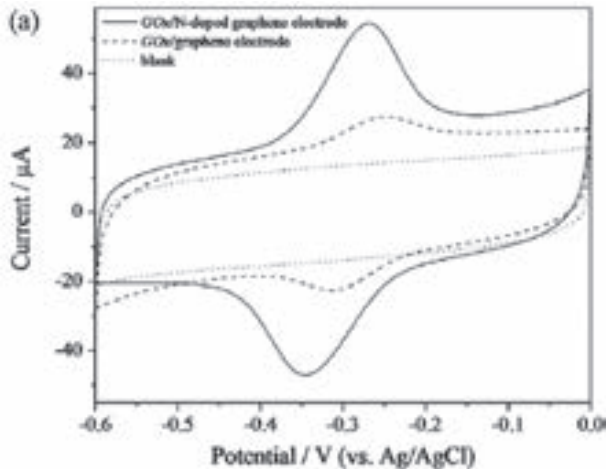
Archive of SID
www.SID.ir

بین گلوکز اکسیداز و گرافن اکسید، قسمت فعال آنزیم که در فرآیند اکسیداسیون گلوکز موثر است یعنی فلاوین آدنین دی نوکلئوتید به سطح گرافن نزدیک می‌شود و فرآیند الکتروشیمیایی ثانویه بر روی محصول واکنش یعنی آب اکسیژنه در سطح گرافن به آسانی انجام می‌شود. حد تشخیص این سنسور ۳ میکرومولار گزارش شد (۱۴).

یکی از خلاقانه‌ترین پژوهش‌ها بر روی بیوسنسورهای گرافن توسط یوحه لین انجام شد و آن دوپ کردن اتم نیتروژن در ساختار گرافن بود. دوپ کردن نیتروژن در گرافن نه تنها باعث افزایش خواص الکتریکی گرافن می‌شود، بلکه باعث افزایش سازگاری زیستی و هم چنین افزایش تمایل به عامل دار کردن می‌شود. در بیشتر گزارشات موجود درباره نحوه دوپ کردن اتم نیتروژن و یا ساختارهای نیتروژنی در ساختارهای کربنی نانو مانند نانولوله‌ها، از پلاسمای آمونیوم استفاده شده بود ولی یوحه از پلاسما نیتروژن استفاده نمود و با کنترل فشار پلاسما می‌توان مقدار نیتروژن دوپ شده در ساختار گرافن را کنترل نمود که از ۰/۱۱ تا ۱/۳۵٪ گزارش شد. فرآیند دوپینگ در فشار ۷۵۰ میلی تور و، منبع تولید پلاسما با توان ۱۰۰ وات و اتمسفر نیتروژن با زمان کنترل شده بین ۲۰ تا ۱۰۰ دقیقه بدست آمد. داده‌های آنالیز XPS نشان داد که در اثر فرآیند دوپینگ گرافن با نیتروژن، سه نوع مختلف از نیتروژن وارد ساختار گرافن می‌گردد که در شکل ۹ نشان داده شده است. هریک از انواع نیتروژن با تاثیر بر روی پتانسیل فرمی و باز کردن بندگپ‌ها، باعث تغییر در ساختار الکترونی و خواص الکتریکی گرافن می‌گردند. (۱۵)



شکل ۹- نمایی از ساختار گرافن دوپ شده با اتم نیتروژن و سه نوع ساختار نیتروژن در آن



شکل ۱۰- ولتاموگرام چرخه‌ای مقایسه‌ای بین گرافن-گلوکز اکسید و گرافن دوپ شده-گلوکز اکسید

شکل ۱۰ منحنی مقایسه ولتاموگرام چرخه‌ای گلوکز اسیداز متتصل به گرافن و گرافن دوپ شده و را نشان می‌دهد. همان طور که در شکل نشان داده شده است شدت سیگنال جریان آندی و کاتدی گرافن دوپ شده نسبت به گرافن معمولی بسیار بیشتر است که باعث افزایش حساسیت و کاهش حد تشخیص سنسور حاصله می‌گردد. البته حد تشخیص این سنسور ۱۰ میکرومولار گزارش شده است که در نگاه اول نسبت به روشهای قبل بیشتر است. اما بایستی به دو نکته توجه داشت. اولاً اینکه هزینه ساخت این سنسور نسبت به سنسورهای دارای نانو ذرات طلا بسیار کمتر خواهد بود. ثانیاً در صورت استفاده از روشهای فوق مانند اضافه کردن نانو ذرات طلا، استفاده از پلیمرهای متخلخل و...، کاهش حد تشخیص امری بدیهی خواهد بود.

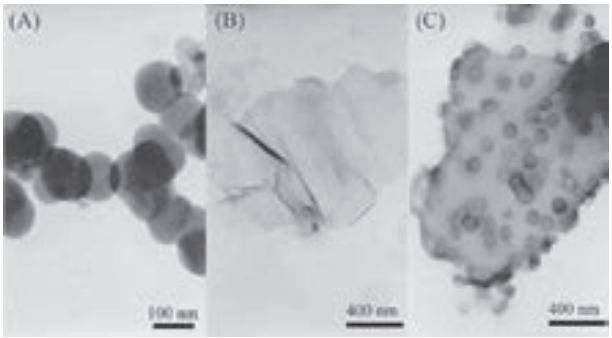
در ادامه تلاش‌ها برای کاهش حد تشخیص سنسورهای گلوکز بر پایه گرافن و هم چنین افزایش زیست سازگاری این سنسورها ژیانگ وهمکارانش در سال ۲۰۱۱ سنسوری ترکیبی از کیتوسان و گرافن را معرفی نمودند. در ادامه با تثبیت نانو ذرات پالادیوم بر روی کامپوزیت حاصل و تثبیت توام آنزیم گلوکز اکسیداز موفق به ساخت سنسوری شدند که حد تشخیص فوق العاده ۰/۲ میکرومولار و رنج خطی یک میکرومولار تا یک میلی مولار از خود نشان داد. افزودن کیتوسان که یک پلیمر زیستی است به گرافن باعث افزایش آبدوستی گرافن و هم چنین افزایش زیست سازگاری سنسور می‌شود به طوری که آن را برای استفاده in vivo مطلوب می‌سازد. آنالیز رامان و IR نشان داد که اتصالات بین کیتوسان و گرافن از

Archive of SID
www.SID.ir

نوع استری است و جهت تثبیت گلوکز اکسیداز بر روی کیتوسان مانند آنچه در قبل نیز اشاره شد. از گلوتر آلدهید به عنوان پیوند دهنده بین آنزیم و کیتوسان استفاده نمود. تکرار پذیری سنسور ساخته شده پس از ۶۰ بار آزمایش بر روی سنسور با حفظ ۹۱٪ از فعالیت اولیه پس از یک هفته و ۸۰٪ آن فعالیت پس از سه هفته همراه بود که حاکی از ایجاد پیوند کوولانی محکم بین آنزیم و کیتوسان است که مانع از لیچینگ آن در طول زمان می‌شود. در بررسی مذکور همچنین اثر مزاحمت‌های ناشی از عوامل اکسید شونده طبیعی مانند اسید اسکوربیک و اوره که ممکن است همراه گلوکز در قند خون وجود داشته باشد بررسی شد و نشان داده شد که اثر این مزاحمت‌ها در ولتاژ ۰/۵– ولت کمتر دیده می‌شود. (۱۶)

با توجه به اهمیت حذف واکنش گرهای سمی و آلوده کننده محیط زیست در شیمی سبز شیوان آی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با استفاده از فرآیند الکترولیز موفق به حذف واکنش گرهای اکسنده قوی در فرآیند معمول ساخت گرافن اکسید و همچنین احیا کننده ثانویه پس از آن شدند. معمولاً روش هامر روش رایج ساخت گرافن اکسید است که در آن از مخلوطی از اکسنده و اسید قوی استفاده می‌شود و دیفکت‌های موجود در گرافن را توسط عوامل اکسیدی عامل دار نموده و پس از آن برای بازگرداندن خواص الکتریکی گرافن به آن، گرافن اکسید را توسط یک عامل احیا کننده مثل هیدرازین به طور جزیی احیا می‌کنند. شیوان آی به جای تمام این فرآیندها از فرایند الکترولیز گرافیت به طور مستقیم استفاده کرد و در اثر فرایند اکسیداسیون الکتریکی الکترود گرافیتی در محلول پتاسیم نیترات و در آند، گرافن اکسید در محلول آزاد میشد که با توجه به حفظ خواص الکتریکی آن نیازی به احیای مجدد نبود. البته در حین این فرآیند نیر مقداری از ساختارهای کربنی کروی نیز تولید شد که خود این ذرات با ایجاد ممانعت فضایی بین صفحات گرافن ایجاد شده مانع از تجمع مجدد این صفحات شدند. شکل ۱۱ TEMترکیب حاصل که مخلوطی از صفحات گرافن و نانوکره‌های کربنی است (GNS-CNS) را نشان میدهد. اندازه کره‌های کربنی تا ۱۰۰ نانومتر گزارش شده است. (۱۷)

محدوده خطی حساسیت سنسور ساخته شده با این گرافن ۰/۴ تا ۲۰ میلی مولار گزارش شده است و حد تشخیص آن ۰/۱ میلی مولار اعلام شد.

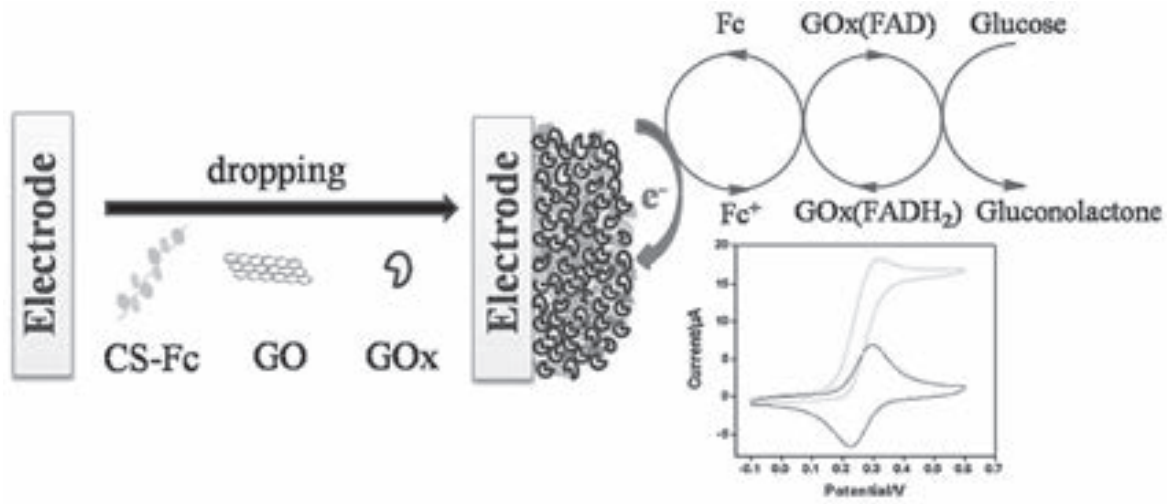


شکل ۱۱– تصویر TEM از a) نانوکره‌های کربنی b) CNS صفحات گرافن GNS-CNS c) GNS

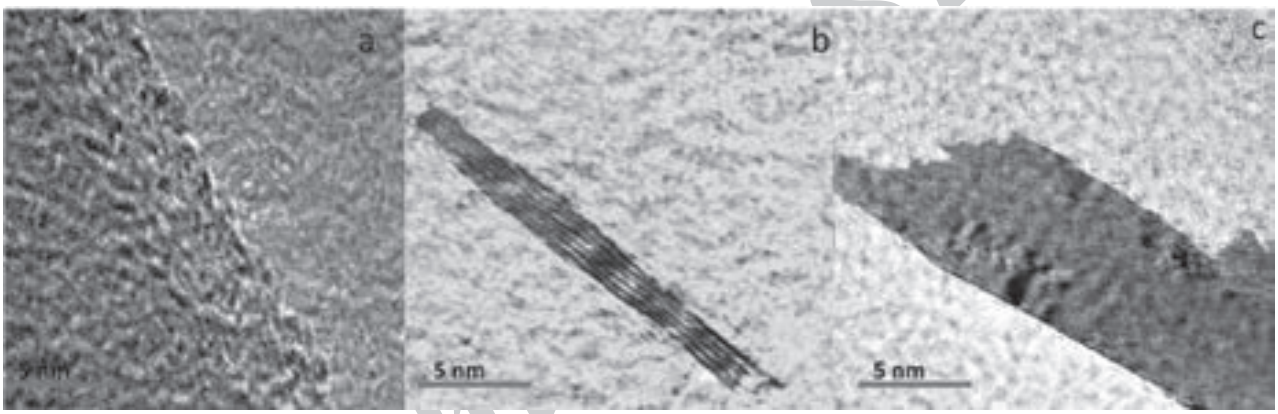
در ادامه بررسی اثر سینرجیک مواد رسانا و نیمه رسانا یر روی فعالیت الکتروشیمیایی صفحات گرافن، ونگ و همکارانش سنسور کامپیوزیتی گرافن–کادمیوم سولفید را معرفی نمودند. (۱۸) محدوده خطی حساسیت این سنسور ۲ تا ۱۶ میلی مولار گزارش شد. کیو و همکارانش نیز در آزمایشی مشابه و جهت بررسی اثر سینرجیک از فروسن استفاده نمودند و همزمان به منظور افزایش زیست سازگاری از کیتوسان در شبکه سنسور استفاده شد. شکل ۱۲ مراحل ساخت و آزمون سنسور به روش کیو را نشان می‌دهد. اثرات سینرجیک مطلوبتر فروسن نسبت به کادمیوم سولفید باعث شد حد تشخیص این سنسور به ۷/۶ میکرومولار کاهش یافت و رنج خطی آن بین ۰/۰۲ تا ۶/۸۷ میلی مولار گزارش شد.

موهاپاترا و همکارانش در سال۲۰۱۲ نیز اعلام نمودند چند لایه بودن و تک لایه بودن نوع گرافن بکار رفته در ساخت سنسور تاثیر چندانی در کارایی سنسور نخواهد داشت. او که گرافن تک لایه SLG، کم لایه (بین ۳ تا ۱۰ لایه FLG) و چند لایه (بین ۱۰ تا ۵۰ لایه MLG) (شکل ۱۳) را مورد آزمایش قرار اد به این نتیجه رسید که در تعداد لایه‌های گرافن در راندمان سنسور و تکرار پذیری آن تقریباً بی‌تاثیر است. او علت ین پدیده را این چنین تشریح کرده که مساحت سطح هر سه نوع گرافن یکسان و در نتیجه هر سه نوع گرافن مقدار یکسانی از آنزیم را روی خود جذب می‌کنند. البته این تفسیر بنا به دلایلی مورد اشکال است. اولاً این که هیچ آنالیزی برا اثبات یکسان بودن مساحت‌ها ارایه نداده و از نظر تئوری نبایستی سطوح یکسان باشد و سطح گرافن چند لایه بایستی کمتر از تک لایه باشد. ثانیاً وی در ادامه پیوندهای پای–پای استکینگ را عامل جذب گلوکز اسیداز بر روی گرافن دانسته نه پیوند بسیار محکم

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱۲- مراحل ساخت و آزمایش سنسور ونگ



شکل ۱۳- میکروگراف ساختارهای تک لایه، کم لایه و چند لایه گرافن

کوولانی. در صورتی که تمام گزاش‌های قبلی حاکی از وجود این پیوند محکم بین آنزیم و گرافن است. به نظر میرسد که علت یکسان بودن فعالیت آنزیمی هر سه نوع سنسور ساخته شده مربوط به ایجاد پیوند کوولانی بین آنزیم و گرافن در لبه‌های گرافن باشد که تجمع گروه هیدروکسیل بیشتر است و از آنجا که تعداد لبه‌ها در گرافن تک لایه و چند لایه یکسان است در نتیجه مقدار آنزیم جذب شده نیز در هر سه مورد تقریباً یکسان باشد.

نتیجه‌گیری

در سالهای اخیر دسته زیادی از ترکیبات کربنی نانو مانند نانولوله‌های کربنی تک جداره و چند جداره، نانو فیبرهای کربنی (۱۹) و گرافن (۲۰) مورد استفاده ساخت سنسورها قرار گرفته‌اند. اهمیت این مواد به خاطر نسبت سطح به حجم بالا و همچنین خواص الکتریکی منحصر به فرد آنهاست. در این میان گرافن با توجه به خواص ویژه الکتریکی و هم چنین تسهیل در روش‌های ساخت و عامل دار کردن، از توجه ویژه‌ای برخوردار هستند. از سوی دیگر آزمایشات نشان داد که گرافن ترکیبی زیست سازگار است. ایجاد اتصال کووالان بین گروههای عاملی گرافن و آمین در آنزیم‌ها به سادگی امکان پذیر است.از سال ۲۰۰۹ تا کنون تلاشهای زیادی برای بهبود حد تشخیص سنسور گلوکز ساخته شده از گرافن انجام شده است. گروهی با استفاده از افزودن نانو ذرات طلا، پلاتین و یا نیمه های‌هایی مانند کادمیوم سولفید و بررسی اثر سینرجیک این ترکیبات برروی خواص الکتریکی گرافن سعی در کاهش حد تشخیص سنسورها، افزایش حساسیت و کاهش زمان پاسخ گویی سنسور داشتند. گروهی دیگر در تلاش بودند تا علاوه بر حفظ خواص الکتریکی سنسور با استفاده از ترکیبات پلیمری زیستی مانند کیتوسان، خاصیت زیست

Archive of SID
www.SID.ir

سازگاری سنسور را زیاد کرده تا بتوان از این سنسور در شرایط in vivo استفاده نمود. گروهی نیز به فکر کاهش هزینه‌ها و اقتصادی‌تر کردن ساخت این سنسورها بوده و به جای استفاده از ذرات طلا و پلاتین، با دوپ کردن اتم نیتروژن به درون ساختار گرافن و تغییر سطوح الکترونی آن موفق به بهبود خواص الکتریکی سنسورها گشته. اما این روند تحقیقات همچنان ادامه داشته و بررسی‌ها انجام شده بر روی گرافن شدیداً تابعی از بررسی‌های انجام شده برروی سایر ساختارهای کربنی نانو است. به طوری که اندک زمانی پس از ساخت سنسورهای جدید نانولوله کربنی سریعاً این پژوهش‌ها وارد حوزه گرافن گشته و عیناً بر روی گرافن نیز آزمایش می‌شود. همچنین ظهور ساختارهای جدید گرافنی نیز ممکن است در آینده نزدیک وارد این قلمرو شود. از جمله این ساختارها ساختارهای متخلخل گرافن (۲۱) است که در ساخت ابر خازن‌ها مورد استفاده قرار گرفته ول تاکنون در مورد سنسورها مورد استفاده قرار نگرفته است. امید است که پژوهشگران بتوانند تا با گسترش این روش‌ها موفق به ساخت سنسورهایی پایدارتر، حساس‌تر و دقیق‌تر شوند.

References

1- Sheldon RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis 2007; 349(8-9): 1289-307.
2- Jiang Y, Zhang Q, Li F, Niu L. Glucose oxidase and graphene bionanocomposite bridged by ionic liquid unit for glucose biosensing application. Sensors and Actuators B: Chemical 2011.
3- Liu LH, Yan M. Simple method for the covalent immobilization of graphene. Nano Lett 2009; 9(9): 3375-8.
4- Zhu Y, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. Adv Mater 2010; 22(35): 3906-24.
5- Jang BZ, Zhamu A. Processing of nanographene platelets(NGPs) and NGP nanocomposites: a review. Journal of Materials Science 2008; 43(15): 5092-101.
6- Li X, Zhang G, Bai X, Sun X, Wang X, Wang E, et al. Highly conducting graphene sheets and Langmuir-Blodgett films. Nat Nanotechnol 2008; 3(9): 538-42.
7- Hummers Jr WS, Offeman RE. Preparation of graphitic oxide. J Am Chem Soci 1958; 80(6): 1339-.
8- Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. Chem Soc Rev 2010; 39(1): 228-40.
9- Gomez-Navarro C, Weitz RT, Bittner AM, Scolari M, Mews A, Burghard M, et al. Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets. Nano Lett 2007; 7(11): 3499-503.
10- Shan C, Yang H, Song J, Han D, Ivaska A, Niu L. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene. Anal Chem 2009; 81(6): 2378-82.
11- Zhou K, Zhu Y, Yang X, Li C. Electrocatalytic Oxidation of Glucose by the Glucose Oxidase Immobilized in Graphene-Au-Nafion Biocomposite. Electroanalysis 2009; 22(3): 259-64.
12- Baby TT, Aravind S, Arockiadoss T, Rakhi R, Ramaprabhu S. Metal decorated graphene nanosheets as immobilization matrix for amperometric glucose biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical 2010; 145(1): 71-7.
13- Liu Y, Yu D, Zeng C, Miao Z , Dai L. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. Langmuir 2010; 26(9): 6158-6160.
14- Alwarappan S, Liu C, Kumar A, Li CZ. Enzyme-doped graphene nanosheets for enhanced glucose biosensing. The Journal of Physical Chemistry C 2010; 114(30): 12920-4.
15- Wang Y, Shao Y, Matson DW, Li J, Lin Y. Nitrogen-doped graphene and its application in electrochemical biosensing. ACS Nano 2010; 4(4): 1790-8.
16- Zeng Q, Cheng JS, Liu XF, Bai HT, Jiang JH. Palladium nanoparticle/chitosan-grafted graphene nanocomposites for construction of a glucose biosensor. Biosens Bioelectron 2011; 26(8): 3456-63.
17- Yin H, Zhou Y, Meng X, Shang K, Ai S. One-step "green" preparation of graphene nanosheets and carbon nanospheres mixture by electrolyzing graphite rob and its application for glucose biosensing. Biosens Bioelectron 2011; 30(1): 112-7.
18- Wang K, Liu Q, Guan QM, Wu J, Li HN, Yan JJ. Enhanced direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose via synergy effect of graphene and CdS nanocrystals. Biosens Bioelectron 2011; 26(5): 2252-7.
19- Stavyiannoudaki V, Vamvakaki V, Chaniotakis N. Comparison of protein immobilisation methods onto oxidised and native carbon nanofibres for optimum biosensor development. Anal Bioanal Chem 2009; 395(2): 429-35.
20- Kuila T, Bose S, Khanra P, Mishra AK, Kim NH, Lee JH. Recent advances in graphene-based biosensors. Biosens Bioelectron 2011; 26(12): 4637-48.
21- Choi BG, Yang M, Hong WH, Choi JW, Huh YS. 3D macroporous graphene frameworks for supercapacitors with high energy and power densities. ACS Nano 2012; 6(5): 4020-8.

Archive of SID
www.SID.ir

Immobilization of Glucose oxidase on nano structure of graphene applied in blood glucose sensors

*Abdu Rahman Hosseini far[1]

Received: 24 Jun 2012 Accepted: 18 Nov 2012

Abstract

Background: Enzymes Immobilization methods on the fixed bed are very important for recovery, reuse and also increasing catalytic activity of enzyme. In the beginning of this review we define immobilization, then methods of enzyme immobilization are presented. Then immobilization of glucose Oxidase (Gox) on graphene substrate and determination of glucose by this catalyst is described. Gox is a biocatalyst that accelerates the reaction of Hydrogen Peroxide production from glucose. Most of the conventional glucometers for sensing blood glucose follow this method. In this review, all the recent articles correspond to new advantages of glucose sensing based on graphene substrate are discussed.

Materials and Methods: Due to the novelty of this method, there are few reports about graphene based sensors e.g. the first one was reported on 2009. Novelties lead to increasing bio-compatibility for in vivo application of sensors, decreasing LOD of sensor.

Conclusion: Due to increasing importance of chemical and biochemical sensors in early diagnosis of disease, and also obvious perspective of sensor industries and special capabilities of nanotechlogy applications in this field, this is expected to diagnose many of the disease in early steps in a near future. Herald role of glucose sensors in rapid response and low limit of detection is remarkable. Graphene shows excellent properties such as bio compatibility, cost effective, rapid response and etc, than to the other members of nano-carbonic structres.

Keywords: Enzyme immobilization, Glucose Oxidase (Gox), Blood Glucose Sensor, Graphene

Archive of SID

1- (*Corresponding Author) Researcher, PhD Student of Nanotechnology, Chemical engineering School, Tehran University, Tehran, Iran. Tel: +98 935 2222310 E-mail: a.r.hosseinifar@ut.ac.ir

www.SID.ir