استفاده از نانو لوله کربنی تک جداره در ساخت زیست‌حسگر گلوکوز

افشین فرح‌بخش*، حسنعلی زمانی، سوسن کامل رحیمی، اعظم نیازمند، ساویز عباسزادگان، سمیرا رزمی

قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان، گروه مهندسی شیمی

پیام نگار: **afshin.farahbakhsh@gmail.com**

چکیده

در این مقاله برای ایجاد بستری مناسب از آنزیم گلوکوزاکسیداز با مزایای سطح عملیاتی و بازدهی بیشتر، کنترل دقیق‌تر واکنش آنزیمی، جلوگیری از نابودی و هدررفتن آنزیم‌ها و همچنین استفاده و انتقال آسان و راحت بستر آنزیمی بعد از انجام چندین مرحله اصلاح سطح و رشد دادن نانولوله‌های کربنی تک جداره (SWCNT) برروی ورق طلا از آنها به عنوان بستر تثبیت، استفاده شده است. برای اتصال و تثبیت بهتر آنزیم برروی بستر، بستر آماده شده توسط اسید سولفوریک و اسید نیتریک غلیظ و مقدار زیادی آب یونیزه شستشه شده و برای جلوگیری از اثر مخرب فلز طلا برروی آنزیم و جلوگیری از غیر فعال شدن آن، قبل از عملیات تثبیت، سطح به ماده سیستامین آغشته گردیده است. با توجه به اندازهٔ بزرگ آنزیم گلوکوزاکسیداز در مقایسه با سطح بستر، برای ایجاد اتصال از ماده واسطی با یک سر آمیدی و یک سر پیرینی به عنوان واسط و انتقال‌دهنده استفاده شده و برای پایدار نمودن این اتصال، بستر آماده شده چندین ساعت، در محلول دی متیل فرمامید (DMF)[1] قرارگرفته است. میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده در طول موج ۴۶۰ nm توسط دستگاه طیف نورسنج اندازه‌گیری و برای بررسی پایداری آن در زمانهای مختلف، نمودار میزان فعالیت در مقابل زمان رسم شد. بستر تهیه شده که دارای میزان زیادی آنزیم گلوکوزاکسیداز است می‌تواند به عنوان الکترود در حسگرها به‌کارگرفته شود.

کلمات کلیدی: نانولوله کربنی تک جداره، آنزیم گلوکوز اکسیداز، رسوبدهی فاز بخار، زیست‌حسگر

۱- مقدمه

در چند دهه اخیر، با ورود فناوری نانو در حیطه علوم زیستی امکان ساخت حسگرهای زیستی در مقیاس بسیار کوچک (نانومتر) فراهم شده است. نانوسنسورهای زیستی سنسورهای بسیار کوچکی در اندازهٔ نانومتری هستند که از طریق تثبیت آنزیم‌ها و یا هر فراورده دیگر سلولی برروی سطح آنها، توانایی تشخیص مواد خاص شیمیایی و یا زیست‌شناختی را به طور کاملاً انتخابی و با دقت بسیار بالا فراهم می‌آورد [۱].

نانو لوله کربنی یکی از فراهم‌ترین و مناسب ترین نانو ساختارهایی است که با توجه به مشخصات فیزیکی و شیمیایی شناخته شده می‌تواند به خوبی در ساخت نانوزیست‌حسگرها به‌کار گرفته شود. البته برای بررسی دقیق‌تر این توانایی، انجام آزمایش‌ها و آزمون‌های

1. Dimethylformamide

مناسب الزامیست. یکی از مشخص‌ترین مزیت این مواد، وجود سطح عملیاتی بسیار زیاد در زمان به‌کارگیری آنهاست که این مزیت در نانولوله‌های کربنی تک جداره بارزتر است. تثبیت شناساگرهای زیست‌شناختی (مانندآنزیم) برروی این مواد، می‌تواند باعث افزایش عملکرد واکنش آنزیمی، قابل کنترل شدن واکنش، شرکت کردن تعداد بیشتری از آنزیم‌ها در واکنش، جلوگیری از نابودی و هدررفتن آنزیم‌ا و همچنین انتقال سریع‌تر اطلاعات در این نانوزیست‌حسگرها، شود[۲].

نانو لوله‌های کربنی برای اینکه بتوانند به عنوان پایهٔ حسگر قرار گیرند و بهتر عمل نمایند باید برروی سطحی تثبیت شوند. عمدتاً بسترهای تثبیت، فلزی می‌باشند که در این مقاله از ورق طلا استفاده شده است. برای رشد و تثبیت نانولوله‌های کربنی برروی بستر از روشهای مختلفی استفاده شده است که معمول‌ترین آنها روش ته نشینی بخارات شیمیایی (CVD)[1] است[۲].

عمدتاً برای تثبیت آنزیم های بزرگ برروی سطح نانولوله‌های کربنی از واکنش‌های الکتروستاتیکی، آب‌گریزی و یا پیوند کووالانسی به همراه اکسایش نانو لوله، برای یک جذب ساده بر روی سطح خارجی استفاده می‌شود. در این گونه پیوندها عمدتاً از یک مادهٔ واسط مناسب نیز استفاده می‌شود.[۳].

در ساختار نانوزیست‌حسگرها، سطح بستر پوشیده شده از نانو لوله‌ها وظیفه انتقال اثرات ناشی از واکنش به دستگاه مبدل را برای نمایش سیگنال بر عهده دارد. نانو لوله‌های کربنی می‌توانند نقش دوگانه بازی کنند یعنی هم به عنوان جایگاه تثبیت آنزیم و هم به عنوان حد واسط بین واکنش‌دهنده و مبدل باشند[۴،۵].

۲- مواد و روشها

در این مقاله سه مرحله آزمایشگاهی انجام شده است.

۱. تهیه ورق طلای پوشیده شده از نانولوله‌های کربنی تک جداره و آماده‌سازی آن

۲. آماده‌سازی آنزیم گلوکوز اکسیداز برای تثبیت برروی ورق طلا

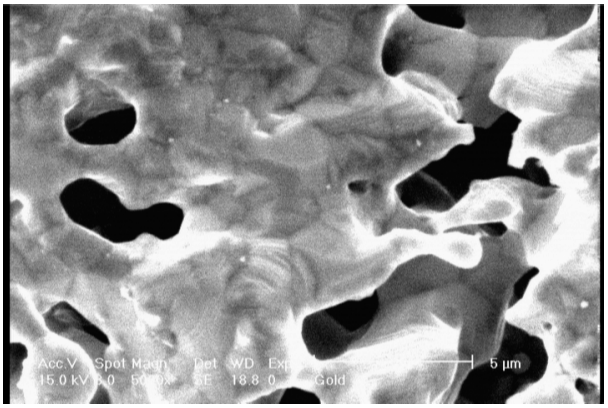
۳. تثبیت آنزیم گلوکوز اکسیداز با استفاده از ماده واسط PASE[2] برروی نانولوله‌های کربنی و برگرداندن فعالیت آنزیم

۲-۱ تهیه ورق طلای پوشیده شده از نانولوله‌های کربنی تک جداره و آماده‌سازی آن

در این مرحله اقدامات اولیه زیر برای تهیه و آماده‌سازی ورق طلا به انجام رسید:

۲-۱-۱ آماده‌سازی ورق طلا

در این مرحله ورق طلایی با ابعاد mm ۱۰ در mm۱۰ و با ضخامت mm ۱ تهیه شده و برای رفع ناصافی‌های سطحی موجود در آن (شکل (۱)) قبل از هر فرایندی سطح ورق با استفاده از روش رسوب دادن با بخارات متجانس (بخارات طلا) کاملا پوشیده شد. ضخامت این لایهٔ متجانس در حدود µm ۵-۴ اندازه‌گیری شده است. در ادامه برای حذف ناخالصیها و مقادیر زاید باقی مانده، سطح ورق طلا در دو مرحله با محلول غلیظ اسید سولفوریک (H_2SO_4) و اسید نیتریک (HNO_3) و در نهایت با مقادیر زیادی آب یونیزه به طور کامل شسته شد.

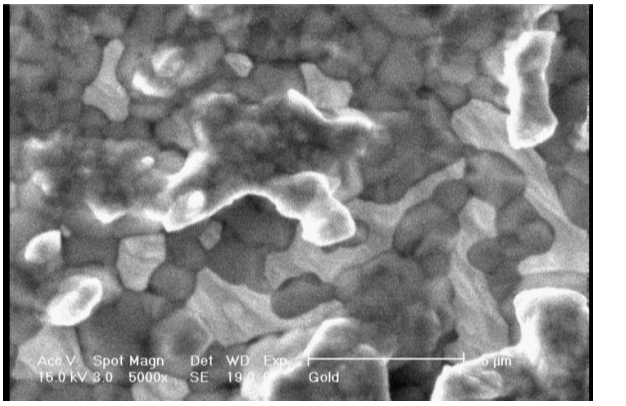


شکل ۱- تصویر SEM از ورق طلا قبل از آماده‌سازی

۲-۱-۲ نشاندن ذرات کاتالیزگر نیکل

بعد از آماده‌سازی ورق طلا برای تشکیل هسته‌های اولیه رشد نانولوله‌های کربنی و رشد منظم آنها از کاتالیزگر نیکل استفاده گردید. ذرات کاتالیزگر با اندازه‌هایی در حدود متوسط nm ۴ توسط روش لیتوگرافی با نظم و تراکم متوسط برروی سطح قرار گرفتند. (این مرحله در آزمایشگاه نانوتکنولوژی دانشگاه تهران به انجام رسیده است) (شکل (۲)).

1. Chemical Vapor Deposition
2. 1-pyrenebutanoic Acid Succinimidyl Ester



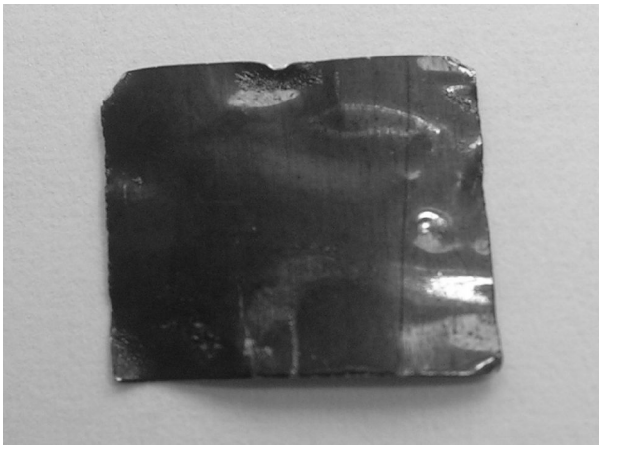
شکل ۲- تصویر SEM از ورق طلا بعد از نشاندن ذرات نانوکاتالیزگر

۲-۱-۳ رشد نانولوله‌های کربنی

برای رشد نانولوله‌های کربنی برروی نانوذرات نیکل تثبیت شده برروی ورق طلا، از روش CVD استفاده گردید. در این روش ورق آماده شدهٔ طلا در کوره تحت خلاء به طور ثابت قرار گرفت و هیدروکربن سبک (متان با درصدی بوتان) به صورت گاز وارد کوره شد. در اثر وارد شدن این ترکیب گازی و انجام واکنش شیمیایی درفضای داخلی کوره، رسوبهای کربنی برروی بستر طلا ظاهر شدند و نانو لوله‌های کربنی منظمی را تولید کردند. نانولوله‌های رشد کرده مطابق تصاویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM)[۱]، به صورت تک جداره بوده و دارای قطری حدود nm (۵۰-۲) و ارتفاعی در حد µm (۲۰-۱۵) هستند که به صورت عمودی و شانه ای شکل، برروی بستر رشد کرده اند (این عملیات در پژوهشگاه شرکت نفت و با همکاری برخی از اساتید و کارشناسان آن مرکز به انجام رسیده است) (شکل‌های (۳) و (۴)).

مساحت سطحی از بستر که توسط این نانولوله‌ها پوشانده شده است در حدود mm^2 (۱۵-۱۰) برآورد می‌شود. با توجه به اینکه هر یک از این نانولوله‌ها نقش یک پایه حسگر را ایفا می‌کند، می‌توان گفت، به طور تقریبی در کل مساحت بستر طلا ($100\ mm^2$) در حدود 10^8-10^9 پایه حسگر رشد کرده که این میزان تراکم برای تثبیت شناساگرهای زیست‌شناختی بسیار مناسب است.

برای حذف ناخالصی‌ها و رفع مواد زاید باقی مانده برروی ورق در طی فرایند رشد، سطح ورق طلا به طور کامل با محلول غلیظ اسید سولفوریک(H_2SO_4) و اسید نیتریک(HNO_3) و طی دو مرحله با مقادیر کافی از آب یونیزه، به طور کامل شسته شد.



شکل ۳- تصویر ورق طلا پوشیده شده با نانولوله‌های کربنی تک جداره

۲-۲ آماده‌سازی آنزیم گلوکوز اکسیداز برای تثبیت برروی ورق طلا

با توجه به حساسیت بالای آنزیم در مقابل شرایط محیطی و شرایط انجام واکنش و برای حفظ نقاط فعال آنزیم تا انتهای عملیات و اتصال صحیح آنزیم آماده شده برروی سطح بستر(نانو لوله رشد یافته)، اقدامات بسیار مهم و دقیقی به انجام رسید که در زیر به آنها اشاره شده است.

۲-۲-۱ تهیه آپو آنزیم گلوکوز اکسیداز

برای حفظ نقاط فعال آنزیم تا انتهای عملیات، ابتدا نقاط فعال آنزیم جداسازی شد و پوششی برروی آنزیم قرار گرفت. این فرایند با استفاده از جداسازی فلاوو آدنین دی نوکلئوتید(FAD) از ساختار آنزیم و تهیه آپوآنزیم امکان پذیر گردید. برای انجام این فرایند ابتدا یک محلول اشباع از $(NH_4)_2SO_4$ تهیه شد، و سپس PH محلول در دمای 20^oC توسط اسید سولفوریک غلیظ (۹۷٪v/v) به میزان ۱/۴ رسانده شد. آنزیم گلوکزاکسیداز حل شده در بافرفسفات با غلظت (mg/mL) ۲۰، به صورت قطره قطره و درحال هم زدن به mL ۲۰ محلول اشباع آماده شده در دمای 5^oC، اضافه شد. محلول فوق به مدت نیم ساعت در همین دما قرار گرفت و سپس با سرعت rpm ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه زرد بالایی بعد از

۱. شکل (۴) توسط دستگاه SEM دانشگاه تربیت مدرس و برای ورق طلای تهیه شده (شکل (۳)) به‌دست آمده است.

سانتریفوژ شدن (شکل (۵)- الف) از ترکیب جدا شد و رسوب حاصل(شکل (۵)- ب) مجدداً دوبار دیگر در همان شرایط نمک و pH اسیدی، سانتریفوژ شد و و رسوب حاصله جمع‌آوری گردید. رسوب نهایی به عنوان منبع آپوآنزیم گلوکوزاکسیداز در بافر فسفات سدیم حل گردید (این مرحله در مرکز تحقیقات زیست‌فناوری دانشگاه فردوسی مشهد به انجام رسیده است).

شکل ۵- تصاویری از (الف) دستگاه سانتریفوژ دور بالا و ب) رسوب منبع آپوآنزیم

۲-۳ تثبیت آنزیم گلوکوز اکسیداز با استفاده ماده واسط PASE برروی نانولوله‌های کربنی و برگرداندن فعالیت آنزیم

بعد از انجام تمام مراحل فوق، آنزیم و بستر به طور مجزا برای تثبیت آماده شدند. باتوجه به اینکه در این مقاله از الکترود طلا استفاده شده و تماس مستقیم آنزیم با فلز، ساختمان آنزیم را از حالت طبیعی خارج می‌کند، روی بستر با یک لایه سیستامین پوشانده شد.

عمدتاً تک لایه سیستامین در این گونه فرایندهای ساخت حسگر، پروتون‌دار می‌شود و در نتیجه دارای بار مثبت شده و می‌تواند جاذبه الکترواستاتیکی با آنزیم به‌کاررفته را که دارای بار منفی است، ایجاد کند. به این ترتیب، ارتباط بین آنزیم و بستر تسهیل می‌گردد[۶،۷].

برای تثبیت آنزیم گلوکوز اکسیداز برروی نانولوله‌های کربنی رشد داده شده روی ورق طلا در این مقاله از ماده واسط ۱-پرین بوتانوئیک اسید سوسینیمیدیل استر[1] استفاده شده که دارای یک سر گروه پرین[2] برای ایجاد پیوند واندروالسی با نانو لوله های کربنی و یک سر گروه آمید[3] برای اتصال به آنزیم، می‌باشد.

برای انجام دقیق تثبیت، ابتدا بستر آماده شده در محلولی به غلظت (mg/mL) ۲/۳ از ماده واسط وDMF به همراه همزدن قرار داده شد و بعد از گذشت ۲ ساعت بستر از محلول خارج گردید و با DMF خالص شستشو داده شد و به موازات این عملیات آپوآنزیم تهیه شده نیز در آب صاف شده و یون زدایی شده با غلظت (mg/mL) ۱۰، حل گردید.

در ادامه، بستر شسته شده به مدت ۱۸ ساعت در تماس با محلول آپوآنزیم قرار گرفت و در نهایت برای حذف تمام ناخالصی‌های ایجاد شده در طول فرایند، بستر حدود ۶ مرتبه با آب بسیار تمیز شستشو داده شد.

۲-۳-۱ برگرداندن فعالیت آنزیم تثبیت شده بروی بستر:

با توجه به اینکه در مراحل قبلی برای مقابله با ازبین رفتن فعالیت آنزیم در طی انجام مراحل تثبیت، آنزیم به صورت آپو در آمد، اینک بعد از تثبیت، لازم است آنزیم مجددا با برگرداندن مولکول FAD حذف شده به ساختمان آنزیم فعال شود.

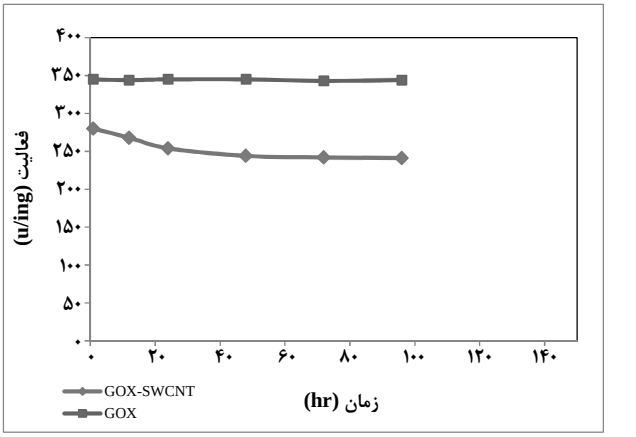
برای انجام این مرحله μM ۲۰۰ مولکول FAD بدست آمده از مرحله آپو کردن آنزیم در بافرفسفات پتاسیم M ۰/۱ به غلظت (μg/mL) ۱۵۰و ۶ =PH در دمای اتاق مخلوط و به مدت 1h انکوبه شدند. این عملیات، کمپلکس پایدار پروتئین-FAD را که در واقع همان آنزیم بازسازی شده است شکل می‌دهد که ثابت تفکیک آن بسیار کوچک (k<10M) است و به خوبی می‌تواند در برگرداندن فعالیت آنزیمی موثر باشد.

1. 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester (PASE)
2. pyrene
3. amid

۲-۳-۲ بررسی میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده برروی بستر

بعد از انجام عملیات تثبیت، برای مشخص شدن و اثبات برگشت مجدد فعالیت، میزان فعالیت آنزیمی مخلوط انکوبه شده بعد از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق به روش زیر(روش O– دیانیزیدین) اندازه گیری شد.

در این روش بستر آماده شده، در محلولی از بافر سنجش فسفات پتاسیم[۱]، ۱۰μL گلوکوز ۱۸٪ (در آب)، ۱۰μL آنزیم پراکسیداز به غلظت (۲۰۰ μg/mL و ۱۰μL آنزیم گلوکوزاسیداز (رقت۲۰۰ بار) به غلظت (۱mg/mL) قرار داده شد و میزان جذب محلول در طول موج ۴۶۰ نانومتر توسط دستگاه طیف نورسنج مدل JENWAY 6305 (موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان) در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد (شکل (۶)). (اندازه‌گیری میزان جذب نشان‌دهندهٔ میزان گلوکوز مصرفی توسط آنزیم و در نتیجه میزان فعالیت آنزیم است[۱،۸]).



شکل ۶- فعالیت آنزیم در قبل و بعد از تثبیت بر حسب زمان که نشان‌دهندهٔ فعال بودن و پایداری آنزیم بعد از تثبیت است

۳- بحث و نتیجه‌گیری

انجام تمام مراحل آزمایشگاهی در این مقاله منجر به تولید مقدماتی بستر نانویی شده است. این بستر با توجه به آنزیم تثبیت شده برروی آن، به عنوان یک نانوزیست‌حسگر با دقت و حساسیت بالا، قابل تحقیق و استفاده است.

برای جلوگیری از اثرات مخرب بسترهای فلزی برروی فعالیت آنزیم در مراحل تثبیت، پوشاندن سطح بستر با یک ماده مناسب مانند سیستامین تقریباً الزامی است.

خارج نمودن نقاط فعال آنزیم (آپو سازی) قبل از شروع مرحله تثبیت برای مراقبت از عملکرد آنزیم ضروریست.

با توجه به اندازهٔ نسبتاً بزرگ آنزیم گلوکوز اکسیداز، این آنزیم باید به دیواره بیرونی نانولوله کربنی و با استفاده از ماده واسطی مانند ۱- پرین بوتانوئیک اسید سوسینیمیدیل استر متصل گردد.

با توجه به این که بعد از هر مرحله اندازه‌گیری فعالیت، بستر در محلول بافرفسفات قرار گرفته و بطور دقیق شسته شده است، احتمال وجود آنزیم‌های آزاد (تثبیت نشده) برروی بستر بسیار کم است، و می‌توان با اطمینان بیان کرد که فعالیت اندازه‌گیری شده در حدود (۲۸۰(u/mg در زمانهای اولیه در شکل (۵)، فقط ناشی از آنزیم‌های تثبیت شده است و اثبات می‌کند که غیر فعال نمودن موقتی آنزیم و برگرداندن فعالیت بعد از انجام مراحل تثبیت، اگرچه برخی از آنزیم‌ها را از ساختار سومشان خارج می‌کند، اما مانع از غیر فعال شدن دائمی آنزیم‌ها نمی شود.

همان طور که از شکل (۵) مشخص است، میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده با گذشت زمان به میزان ناچیزی در مقایسه با فعالیت آنزیم آزاد، تغییر می‌کند که نشان‌دهندهٔ پایداری آنزیم تثبیت شده است

ایجاد تراکم متوسط (بیان شده در متن) در نانولوله‌های رشد کرده بر میزان نفوذ آنزیم و میزان تثبیت آن اثرگذار بوده است.

با توجه به سطح عملیاتی، رسانایی و انعطاف پذیری بالای نانو لوله‌های کربنی در مقایسه با سایر فلزات، آنها برای تثبیت شناساگرهای مختلف شیمیایی و زیست‌شناختی مناسب می‌باشند و استفاده از آنها در ساخت این زیست‌حسگر، باعث افزایش بازدهی و حساسیت و کاهش مقاومت در عملکرد شده است.

در این مقاله با بررسی‌های به عمل آمده در مورد کارهای صرفاً مطالعاتی و تحقیقاتی انجام شده در این زمینه، نسبت به انجام و ساخت آزمایشگاهی زیست‌حسگر گلوکوز اکسیداز با استفاده از نانولوله‌های کربنی اقدام شده است. البته این آزمایش‌ها در برخی از مراحل، مطابق تحقیقات آزمایشگاهی انجام شده در این زمینه به اجرا در آمده است، اما دستیابی به نتایجی جدید مانند غیر فعال نمودن موقتی آنزیم و استفاده از ورق طلا به تنهایی و به صورت

۱. بافر سنجش از حل کردن ۰/۱ mL از معرف۱٪ O– دیانیزیدین در ۱۲mL بافر فسفات به غلظت ۰/۱M و ۶/۰ = PH تهیه شده است.

ورقه ماکرو به عنوان بستر، از جمله موارد متفاوت انجام شده در این مقاله در مقایسه با پژوهش‌های مشابه می‌باشد.

با توجه به این که تحقیقات انجام شده در این زمینه تاکنون در حد ساخت ابتدایی این گونه حسگرها باقی مانده است اما باعث گردیده تا فضایی برای انجام کارهای تحقیقاتی پیشرفته‌تر در این زمینه، آماده گردد. اقدامات تحقیقی و آزمایشگاهی انجام شده در این مقاله و نتایج حاصله از آنها نیز با همین هدف قابل ارائه به محققین وپژوهشگران در این زمینه است. امید است با تعریف طرح‌های کاربردی‌تر، هر چه سریع‌تر بتوان به نتایج قابل قبول‌تری در این زمینه دست یافت.

۴- قدردانی

در انتها از زحمات و همکاری‌های صمیمانه جناب آقای دکتر رشیدی رئیس واحد نانوفناوری پژوهشگاه نفت و کارشناسان آن واحد، جناب آقای دکتر بهرامی مسئول مرکز تحقیقاتی زیست‌فناوری دانشگاه فردوسی و عضو هیات علمی این دانشگاه، جناب آقای رجایی در آزمایشگاه نانو و تشخیص دستگاهی دانشگاه تهران و سرکار خانم رحیمی رئیس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان تقدیر و تشکر می‌شود.

مراجع

[۱] مهر محمدی، م.، خلج، م.، و قورچیان. ه.، "بهره‌گیری از فناوری نانو در طراحی زیست حسگرهای الکتروشیمیایی گلوکوز"، ماهنامه فناوری نانو، شماره ۱۲۱، آبان (۱۳۸۶).

[2] Yuandong, Y., and Cole, B. E., "Carbon Nanotube-Based Glucose Sensor", US Pat 0265914A1, Dec. 1, (2005).

[3] Besteman, K., Lee, J. O., Wiertz, F. G. M., Heering, H. A., and Dekker, C., "Enzyme-Coated Carbon Nanotubes as Single-Molecule Biosensors", Nano Letters, Vol. 3, No. 6, 727-730, (2003).

[4] Sung Co, M., and Zhang, L., "Nanotube-Based Sensors for Biomolecules", US 0200734 A1, Oct.14, (2004).

[5] Lee, J., Chung, J. H., and Lee, K. H.," Micro/Nano-Fabricated Glucose Sensors Using Single-Walled Carbon Nanotubes", US Pat 7,118,881 B2, Oct.10, (2006).

[6] Tiano, T., Gannon, J., and Carey, C., "Carbon Nanotube-Based Electronic Devices Made by Electrolytic Deposition and Applications Thereof", US Pat 0065887A1, Mar.30, (2006).

[7] Giroud, F., Favreau, V., "Cosmetic Composition for Volumizing Keratin Fibers", US Pat 0115232 A1, Jun.17, (2004).

[8] Pathak, P., Katiyar, V. K. and Giri, Sh., "Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research", journal of nanotechnology online, Vol. 3, 1-14, (2007).